

Geautomatiseerde (machinale) detectie van TBV in tulp: resultaten 2010

Vervolg praktijkonderzoek ziekzoeken

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

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van  
Wageningen UR,  
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit  
PPO nr. 3236108711; 3234109200; 3236085800  
PT nr. 14025  
Mei 2011

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeveelvoudigd, 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit


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



<b>Kwekers</b>
S.Schouten en Zn
Karel Bolbloemen BV
Fa. Th. Apeldoorn
Horizon Flowers
Leek bloembollen
Wit Flowerbulbs
Poel Tulpen
G. Oud
Boon Bloembollen



Ministerie van Landbouw, Natuur en  
Voedselkwaliteit

De bloembollensector investeert in dit project via het  Productschap **Tuinbouw**

Projectnummer PT: 14025

Projectnummer PPO: 3236108711; 3234109200; 3236085800

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2  
: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252-462121

Fax : 0252-462100

E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)

Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

## Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING .....	7
1.1 Algemeen.....	7
1.2 Einddoelstelling en doelstelling 2010.....	8
1.3 Plan van aanpak.....	9
2 MATERIAAL EN METHODEN .....	11
2.1 Ziekzoekar: aanpassingen aan het prototype van 2009.....	11
2.2 Het proefveld: bolbehandelingen, opplant en uitvoering.....	13
2.3 ELISA: boltoets en bladtoets op TBV .....	15
2.4 Beeldanalyse .....	16
3 RESULTATEN EN CONCLUSIES.....	19
3.1 ELISA-waarden: boltoets versus bladtoets.....	19
3.2 Ziekzoeken.....	21
3.3 Beeldopnames en analyses .....	26
4 DISCUSSIE .....	35
4.1 Ervaringen van de veldproef 2010 .....	35
4.2 Boltoets versus bladtoets .....	35
4.3 Ziekzoekers.....	36
4.4 Beeldanalyse .....	37
4.5 Vervolg 2011 .....	40
5 LITERATUUR.....	41
6 COMMUNICATIE.....	43
6.1 Begeleidingscommissievergaderingen .....	43
6.2 Schriftelijke communicatie .....	43
7 BIJLAGEN.....	45
7.1 Bijlage 1. Tabel met metingen aan cv. Barcelona.....	45
7.2 Bijlage 2. Innovatieprijs.....	47
7.3 Bijlage 3. Artikel in Agrarisch Dagblad 2010 .....	48
7.4 Bijlage 4. Keuze van de camera's.....	49
7.5 Bijlage 5. Artikel precisielandbouw symposium (JAC 2009) .....	55
7.6 Bijlage 6. Toelichting op de gebruikte visionetechnieken .....	65



## Samenvatting

Tulpenmozaïekvirus (TBV) veroorzaakt jaarlijks veel schade in tulpen. Vooral in de witte en gele cultivars is de afkeur groot. Om de virusdruk te verminderen worden in de praktijk door ziekzoekers viruszieke tulpen uit het veld verwijderd. Het is moeilijk ervaren ziekzoekers te vinden. Daarom is onderzoek gedaan naar een oplossing waarbij viruszieke tulpen op een geautomatiseerde wijze worden herkend en worden verwijderd.

In 2009 is in nauwe samenwerking met een aantal ondernemers het project “praktijkproef ziekzoekkar” uitgevoerd, waarbij een rijdend platform met speciale camera's foto's maakte van geplante tulpen. Deze beelden werden met speciale software gescreend op de aanwezigheid van virussymptomen. Gebleken is dat deze ziekzoekkar in de cultivar Barcelona slechts 25 % van de zieke tulpen wist op te sporen tegen 39% door de ziekzoekers. Een serologische bladtoets op TBV fungeerde als referentie voor de bepaling of een tulp ziek was of niet.

Dit vervolproject beoogde in 2010 te onderzoeken of met een verbeterde versie van de ziekzoekkar virus geïnfecteerde tulpennauwkeuriger konden worden opgespoord.

Naast verbetering van de bestuurbaarheid via zwenkwielen zijn kleurencamera's ingebouwd die onder een hoek van 45 en 90 graden beeldopnames maakten. Flitslampen werden gebruikt om storing via strooilicht van buiten te voorkomen. De multispectraal camera met filterwiel voor 6 verschillende golflengtes maakte alleen opnames onder een hoek van 90 graden. Dit is zo gekozen op basis van ervaringen van voorafgaand jaar. Via een zogenaamde encoder en het gebruik van labels met QR-code konden de tulpen via computeranalyse van de fotobeelden in de verschillende bedden getraceerd worden. Via deze labels waren de tulpen eveneens goed traceerbaar voor verdere visuele en ELISA-analyses.

Op het proefveld zijn TBV-geïnfecteerde tulpencultivars Barcelona, Yokohama, Monte Carlo en Prinses Irene geplant. Van elke cultivar zijn 500 bollen op nummer en op ruime afstand geplant. Bollen van de cv's Barcelona en Yokohama zijn voor het planten met ELISA aan de bol getoetst op aanwezigheid van TBV.

Metingen met de ziekzoekkar zijn uitgevoerd van 23 maart tot 18 mei van 2010. Naast de leden van de begeleidingscommissie, heeft een groep van drie ervaren ziekzoekers drie of meer keren in het groeiseizoen naar symptomen in de tulpen gezocht en de bevindingen op plantnummer genoteerd.

Voorafgaand aan het planten zijn van twee cultivars bolmonsters voor ELISA-toetsing genomen. Na afloop van de metingen met de ziekzoekkar zijn in juli bladmonsters op nummer getoetst. De boltoets vooraf is uitgevoerd om na te gaan of er voldoende virus aanwezig was. De ELISA-uitslagen van bol- en bladtoets voor TBV bij deze 4 cv's bleken te verschillen. De boltoets toonde een lager percentage virus aan dan de bladtoets. In het geval van cv. Monte Carlo en Yokohama (60% TBV in de boltoets) verschilde dit het meest: beide vertoonden meer dan 90% TBV in de bladtoets. Deze beide cultivars zijn daarom verder niet beoordeeld en ook is aan het verkregen beeldmateriaal geen beeldanalyse uitgevoerd. De correlatie tussen boltoets (BKD) en bladtoets (PPO) van Barcelona (9.5% versus 9.5%) en Prinses Irene (10% versus 7.4%) was redelijk tot goed. Deze cultivars zijn verder gebruikt voor analyse door de ziekzoekers en analyse van de beelden.

De juistheid van de beoordeling door de ziekzoekers van cv. Barcelona en cv. Prinses Irene verschilde sterk per ziekzoeker en per moment van waarneming. Het meest correcte ziekzoekresultaat in cv. Barcelona was een score van 52% in week 16 voor cv. Prinses Irene was dit een correcte score van 78% in week 14.

Het beste ziekzoek resultaat met de ziekzoekkar op basis van digitale beeldanalyse bedroeg 27% in Barcelona en 25% in Prinses Irene (beide foto's gemaakt in week 16).

Vooraf in de beginperiode van het zieke zoeken (week 13 tot 14) was het camerasysteem niet in staat de viruszieke planten te herkennen. Een positief punt was echter dat weinig virusvrije tulpen ten onrechte virusziek werden bevonden met de beeldanalyse.

Een aangepaste beeldanalyse zou het percentage correct gevonden viruszieke planten kunnen verhogen, eventueel ten koste van afkeuring van gezonde tulpen. Daarvoor is een detailanalyse van 51 computerbeelden van viruszieke en gezonde tulpen uitgevoerd, in samenwerking met twee ervaren zieke zoekers. Uit deze analyse bleek dat de symptomen in de gemaakte opnamen vaak te subtiel zijn om deze met digitale beeldanalyse op te sporen. Verbetering van de resolutie kan een oplossing zijn. Daarnaast zijn specifieke virussymptomen, zoals stand van het tweede blad, moeilijk in wiskundige programmatuur vast te leggen.

In overleg met de begeleidingscommissie zal in 2011 een kleinschalige proef worden uitgevoerd met in de kas afgebroeide tulpen besmet met TBV en TVX. TVX is een virus welke ook veel in tulp wordt aangetroffen. De beelden zullen deels in het laboratorium opgenomen worden. Er zal gewerkt worden met verbeterde belichting en hogere resolutie van de beeldopnames. Ook wordt er een beperkte veldtoets uitgevoerd, afhankelijk van de laboratoriumresultaten. Deze experimenten zullen bijdragen aan een verbeterde versie van de zieke zoekkar.

# 1 Inleiding

## 1.1 Algemeen

Tulpenmozaïekvirus (TBV) veroorzaakt jaarlijks veel schade in tulpen. Schade wordt beperkt door virus geïnfecteerde planten vroegtijdig op het veld op te sporen en deze handmatig te verwijderen. Dit is het werk van de zieke robot. Vooral in de witte en gele cultivars is het ook voor ervaren zieke robots moeilijk om aangetaste planten te vinden en te verwijderen. Op initiatief van Piet Apeldoorn is een aantal jaren geleden onderzoek gestart. Dit onderzoek zou moeten leiden tot de ontwikkeling van een zogenaamde zieke robot die virussymptomen in tulp moet kunnen waarnemen en vervolgens deze planten moet kunnen merken of verwijderen.

Robotisering van het zieke robotproces in bloembollen zou een oplossing kunnen bieden voor het tekort aan gespecialiseerde arbeidskrachten en zou kansen bieden om schaalvergroting in de bollenteelt mogelijk te maken zonder verlies van kwaliteit van het eindproduct. Een dergelijke robot kan uiteindelijk niet alleen van groot belang zijn voor de bollensector, maar mogelijk een toepassing vinden in andere sectoren van de Nederlandse land- en tuinbouw waar detectie van afwijkende planten (door virusziekte, schimmelaantasting, fysiologische afwijkingen of anderszins) bepalend is voor de kwaliteit van het eindproduct. Verlaging van het viruspercentage in de bloembollen als gevolg van gerobotiseerd zieke roboten zou bovendien een bijdrage leveren aan het verduurzamen van de teelt doordat het minder noodzakelijk wordt om chemische bestrijding van bladluizen uit te voeren bij lage viruspercentages. Ook zou de machine na implementatie bijdragen aan het verbeteren van de arbeidsomstandigheden van medewerkers in het bloembollen bedrijfsleven.

In 2009 is een veldproef uitgevoerd met een prototype zieke robot: een rijdend platform uitgerust met kunstmatige verlichting waarbij beeldopnames met zowel een kleurencamera als met een spectraal camera werden gemaakt. Visuele afwijkingen veroorzaakt door virusinfecties worden door middel van software in de opgenomen beelden herkend. Gebleken is dat het camerasysteem, tezamen met de bijbehorende software ongeveer 25% van de virus besmette tulpen (cv Barcelona) wist aan te tonen tegen 39% door ervaren zieke robots (Rapport Praktijkproef zieke robot, PT 13638). De zieke robot scoorde slechter dan de zieke robots. Op basis van een technische evaluatie zijn een aantal verbeterpunten gesignaleerd, waarvan de effectiviteit in dit project werden getest.

Hoewel in een aantal gevallen viruszieke planten konden worden gevonden, voldeden de resultaten van 2009 in het open veld niet aan de verwachting. Dit heeft mede te maken met tekortkomingen in het beeldopname systeem in 2009, zoals leklicht en opstelling van de camera's. Verdere analyses van het beeldmateriaal zijn in overleg met de begeleidingscommissie stopgezet. Op basis van de behaalde resultaten is voorgesteld de proef te herhalen in 2010 met aanpassingen in het opnamesysteem, functionaliteit van de kar en verbeteringen op proefveldniveau (zie bijlage 4). Het onderzoek is betaald door Productschap Tuinbouw (PT), een telersgroep, LTO Noord projecten fonds, het Willem Luykx's Innovatie Fonds en het Ministerie EL&I (voorheen Ministerie van LNV). De betrokken tulpentelers vormen de begeleidingscommissie met Kees Stoop als voorzitter.

## 1.2 Einddoelstelling en doelstelling 2010

In 2008 is een uitgebreid haalbaarheidsonderzoek uitgevoerd door Wageningen UR (PPO en PRI), in samenwerking met een groep telers, Agrifirm en Agrifirm Mechanisatie BV. In dit onderzoek zijn diverse technieken op hun geschiktheid vergeleken en de vier meest kansrijke technieken in een proef vergeleken op nauwkeurigheid en haalbaarheid. Hierbij werden losse tulpenbladeren met virussymptomen in een laboratoriumopstelling beoordeeld. De beste techniek scoorde bijna net zo goed als zeer deskundige ziekzoekers! Op basis van deze resultaten is besloten om deze techniek te testen en verder te ontwikkelen in een veldsituatie

Gekozen is voor de volgende aanpak:

- Fase 1: Detectiesysteem

In dit deelproject zal een eenvoudige constructie ontwikkeld worden waarmee in het veld (handmatig) beeldopnames kunnen worden gemaakt. Het systeem zal ontwikkeld en getraind worden op beelden met gezond en door virus aangetast plantmateriaal met al zijn variaties.

- Fase 2: Verwijdering systeem

Het ontwikkelen en testen van een prototype apparaat voor verwijdering van virus besmette (tulpen)planten in het open veld.

- Fase 3: Ontwikkelen en testen ziekzoekkar, integratie detectie en verwijdering

Welke optie het meest haalbaar is, zal in een nadere analyse moeten worden vastgesteld. Hierbij is de inbreng van de telers en werktuigbouwers van groot belang. Indien gekozen wordt voor een gerobotiseerde ziekzoekkar, ligt het voor de hand een multifunctionele kar te ontwerpen, die ook voor andere precisielandbouwtaken zoals bemesting, bespuiting of koppen kan worden ingezet. Wordt ervoor gekozen dat er nog een persoon bij betrokken is, dan komt een 'half automatische variant' in beeld.

Voor 2010 is de doelstelling nog steeds beperkt tot de eerste fase (fase 1): de ontwikkeling van een in het veld werkend systeem voor de detectie van TBV-geïnfecteerde tulpen. In deze fase wordt een constructie ontwikkeld waarmee in het veld beeldopnames kunnen worden gemaakt. Het softwaresysteem moet worden ontwikkeld en worden getraind met behulp van beelden van planten die virusvrij zijn, en die zichtbaar zijn geïnfecteerd met virus. In deze fase van het ontwikkelingstraject kan de beeldanalyse nog niet simultaan plaatsvinden met de beeldopnames. Training van de software en beeldanalyse vindt daarom in de tijd gescheiden plaats t.o.v. het rijden door het veld.

Fase 2 bestaat uit het ontwikkelen van een systeem dat virusverdachte tulpen kan merken, afdoden of verwijderen. Deze fase is pas voorzien na een positief resultaat van fase 1.



## 1.3 Plan van aanpak

Op basis van de ervaring uit 2009 is de opzet en de uitvoering van de experimentenaangepast. Tevens zijn diverse technische aspecten van de ziekezoekkar en het camera-systeem aangepast:

### A. Proefveld:

- Er is een grotere afstand aangehouden tussen de individuele tulpen om overlap van bladeren te voorkomen: 2 regels per bed. Hiermee wordt een stapje teruggezet in de proefopzet richting praktijksituatie, maar zou betere beelden opleveren. Voorafgaand aan het planten zijn 500 bollen van cultivars Monte Carlo en Barcelona met ELISA getoetst op TBV.
- De inzet van ervaren ziekezoekers voor optimale beoordeling van de viruszieke tulpen is gewaarborgd door het inhuren van twee ervaren tulpentelers, voorgedragen door de begeleidingscommissie, en twee ervaren medewerkers van de Bloembollenkeuringsdienst. Daarnaast zijn de leden van de begeleidingscommissie zelf ten minste eenmaal komen ziekezoeken.

### B. Ziekezoekrobot aanpassingen (hardware):

- Belichting
  - Mogelijke invloed van leklicht is verholpen door een ander type camera met korte sluitertijd (geen rolling shutter principe, zie bijlage 4) en het gebruik van sterkere flitsers;
  - Door uniformere belichting zou de kwaliteit van de beelden beter zijn waardoor een betere segmentatie van de opgenomen beelden mogelijk wordt.
- Snelheid
  - De opname snelheid is verhoogd door de inbouw van vierkleurencamera's waardoor meerdere metingen van twee planten tegelijkertijd konden plaatsvinden. Door de cameraopstelling is er meer overlap in de lengterichtingen zullen minder planten op de rand van het beeld komen
  - Naast de multispectraal camera is ook gebruik gemaakt van meerdere kleurencamera's.
- Field of view: meer camera's tegelijk nemen opnamen
  - Dit resulteert in meer snelheid van opnamen maken;
  - Door plaatsing van de camera's onder een hoek van 90° en 45° ontstaat er meer overlap in de breedte van de opnamen

Door de grotere hoeveelheid beelden die gemaakt zijn door meerdere camera's kon de beeldanalyse-software beter worden getraind. In bijlage 4 is een uitgebreide beschrijving en analyse opgenomen over de verschillende cameratechnieken. Deze notitie van december 2009 is geschreven als evaluatie naar aanleiding van de resultaten van 2009 en vormde de basis voor de besluitvorming t.a.v. de systemen voor 2010.



## 2 Materiaal en Methoden

De opzet van het veldexperiment in 2010 met de aangepaste zieke robot was op te splitsen in vier delen:

1. aanpassingen realiseren aan het prototype zieke robot van 2009 (zie 2.1)

Hierbij zijn onder meer technische aanpassingen aan de zieke robot gemaakt, en is de cameraopstelling gewijzigd (opnames onder twee hoeken voor betere symptoomanalyse en plaatsbepaling van de tulpen).

2. aanleg van het proefveld (najaar 2009- voorjaar 2010 en uitvoering van de beeldopnames met de zieke robot en (zie 2.2)

Hierbij zijn vier cultivars met TBV opgeplant op geringe dichtheid om individuele metingen van de tulpen mogelijk te maken. De tulpen zijn gelabeld en beoordeeld door zieke roboters en de zieke robot op TBV-symptomen.

3. ELISA's aan de gemeten planten middels bladtoets (zie 2.3)

De ELISA's zijn uitgevoerd vooraf aan de opplant (cv. Barcelona en Yokohama), en achteraf (na het veldexperiment) via de bladtoets aan de verschillende cv's en vergeleken met de resultaten van de beoordelingen der zieke roboters en zieke robot.

4. analyse van de opgenomen beelden (zie 2.4).

Met de zieke robot zijn van de vier tulpencultivars beeldopnames gemaakt van 23 maart 2010 t/m 18 mei 2010. Deze beeldopnames zijn via een software pakket getraind om TBV-symptomen op te sporen in de beelden.

### 2.1 Zieke robot: aanpassingen aan het prototype van 2009

#### **Zieke robot**

De standaarduitvoering van de zieke robot (figuur 1A), zoals beschreven in een eerdere rapportage (Van Doorn e.a. 2010) is begin 2010 verbeterd. De verbeteringen t.o.v. 2009 waren:

- Robuustere wielen (maat groter en dikker) waarbij de achterste wielen wendbaar zijn om de wendbaarheid van de relatief zware kar te verbeteren.
- Encoder voor automatische opnamen (Fig. 1B). Dit systeem is gekoppeld aan de omloopsnelheid van het voorste linker wiel, waardoor de camera's op vaste afstand een opname maken. Hierdoor zijn tevens de beelden te lokaliseren. Dit betekent dat er veel minder labels nodig waren. Deze labels stoorde vorig jaar soms de opnames.
- Verbeterd camera-systeem (zie hieronder) en toevoeging van extra kleurencamera's; keuzemenu op de computer van de zieke robot voor het aanschakelen van de kleuren- of spectraal camera; indicator op het beeldscherm voor de juiste snelheid van de kar voor optimale meting



Figuur 1A. De ziekzoekkar



Figuur 1B. Linker voorwiel met encoder, welke zorgt voor automatische camera-opnamen



Figuur 1C. Verschuifbare kleurencamera's 45° (achtergrond) en 90° (op de voorgrond te zien)



Figuur 1D. Spectraal camera met filterwiel voor golflengtevariatie

### Camerasysteem

In de loop van 2009 zijn nieuwe hoge resolutie CCD (charge coupled device) camera's op de markt gekomen. Hiermee kunnen opnames worden gedigitaliseerd (image sensor) en verwerkt worden met computerprogrammatuur. Daarom zijn voor de proef van 2010 drie van deze camera's aangeschaft. Deze camera's hebben een resolutie van 5 Megapixels (zie bijlage 4) zodat betere opnames (meer details) mogelijk zijn.

Wat betreft de opnames met kleurencamera's (figuur 1C) is een dubbel camerasysteem gebruikt. Opnames onder een hoek van 45°- en 90° konden nu tegelijkertijd worden gemaakt. Echter, omdat de tulpen te ver van elkaar waren geplant, moesten er alsnog tweemaal opnames gemaakt worden per bed.

Het probleem van leklicht is opgelost door planten met een zeer korte flits van 50  $\mu$ s te belichten. In 2009 werd een flitstijd van 150 ms toegepast. Op deze manier waren er weinig problemen met het omgevingslicht. Voor kalibratie van de kleurencamera werd voor elke meting in het proefveld een zogenaamde kleurenkaart gebruikt (figuur 2A).

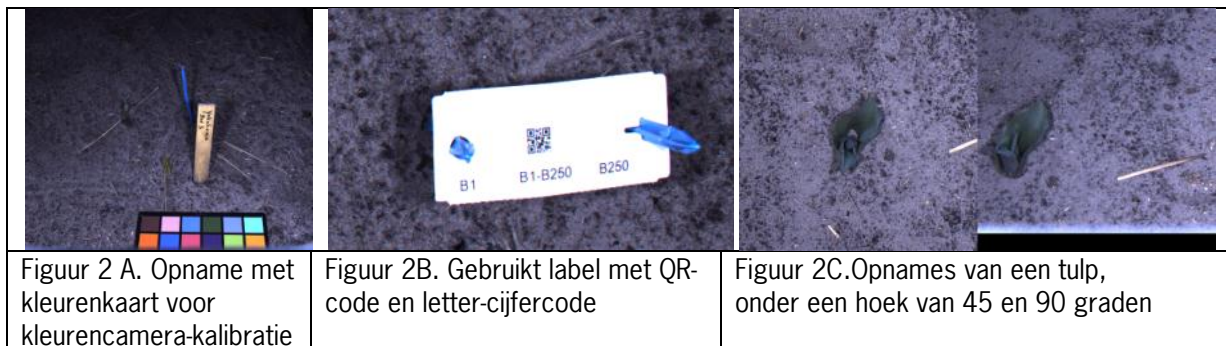
Verder is gebruik gemaakt van een systeem om de camera's automatisch aan te sturen door de encoder op het linker voorwiel. Op deze manier werden tijdens het rijden om de 20 cm automatisch kleurenfoto's gemaakt. Omdat het opslaan van de beelden op de harddisk van de computer meer tijd in beslag nam dan het verplaatsen van de kar over 20 cm is de resolutie van de beelden met een factor 4 verkleind.

De kar moest stil staan wanneer met de spectraal camera 6 aparte beelden werden gemaakt. Via de encoder werd om de 30 cm een signaal gegeven naar het computerdisplay.

De operator moest dan de kar stil zetten en automatisch werden dan na een tiental seconden de 6 multispectraal opnamen gemaakt.

De levertijd van een snelwerkend multispectraal multisensor systeem bleek, ondanks intensief contact met verschillende potentiële leveranciers, te lang. Daarom is dezelfde spectraal camera uit 2009 gebruikt (een filterwiel en zes smalband filters uitgerust met een CCD camera, (Fig. 1D)). De 6 filters met elk een bandbreedte van 50 nm, zorgden voor een golflengterange van 450 tot 700 nm. Meer toelichting over de gemaakte keuzes wat betreft camera's is te vinden in bijlage 4. Voor alle duidelijkheid wordt in bijlage 6 nog eens kort de achtergrond van de gebruikte technieken aangegeven.

## 2.2 Het proefveld: bolbehandelingen, opplant en uitvoering



### Bolbehandelingen

Voor de veldexperimenten met de ziekzoekkar zijn per cultivar in het najaar van 2009 1500 bollen geselecteerd en volgens standaard voorschrift bewaard bij 20°C en later tot aan het planten bij 17°C bewaard. Dezelfde cv's als in 2009 zijn gebruikt (Yokohama, Barcelona en Monte Carlo, Fig. 3B-E). Op verzoek van de begeleidingscommissie is de cultivar Prinses Irene toegevoegd. Deze cultivar zou de TBV-symptomen beter laten zien (figuur 3 B).

Voor het planten is de grond bewerkt en behandeld met Rizolex om een aantasting van o.a. de bodemschimmel *Rhizoctonia solani* te voorkomen.

Vlak vóór het planten zijn alle tulpenbollen ontsmet in 0,5% Captan + 1% Topsin M + 0,3% Prochloraz + 1,5% Securo.

### Opplant en gewasverzorging

Alle bollen zijn begin december 2009 geplant. Per cultivar zijn 500 bollen apart genummerd en geplant op twee regels per bed met een onderlinge afstand van 40 cm. Op de regel zijn de bollen ook met een onderlinge afstand van 40 cm (steekhoutlengte) geplant. Als plantdiepte is ongeveer 8 cm aangehouden.

Per bed en cultivar zijn de nummers 1 t/m 250 op één regel geplant en daarnaast de nummers 251 t/m 500 (zie Figuur 3A en 4).

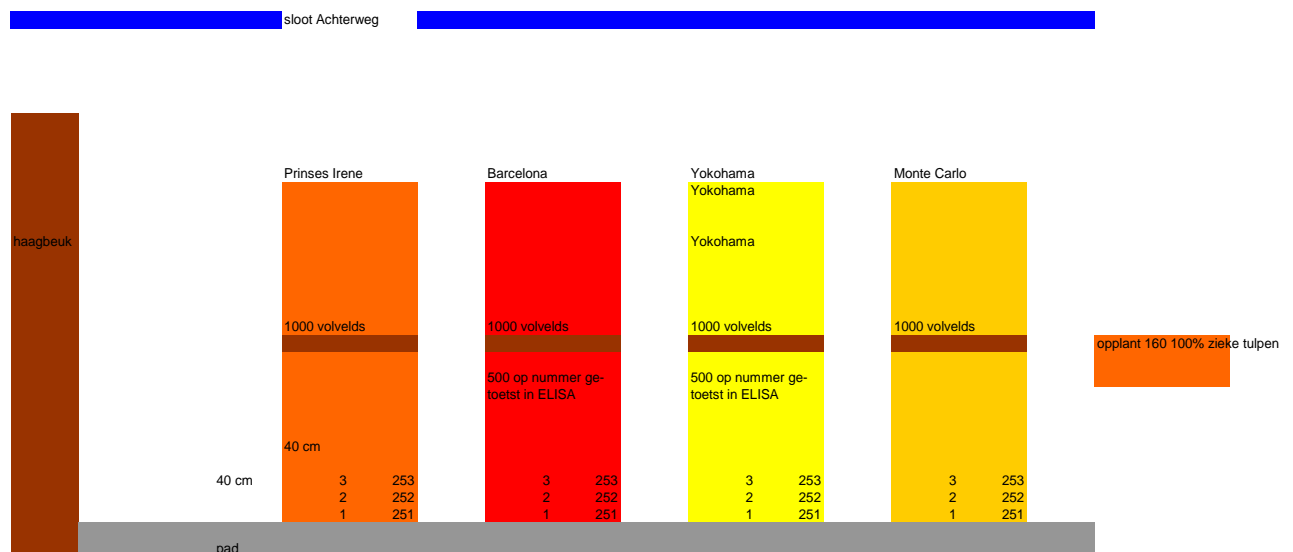
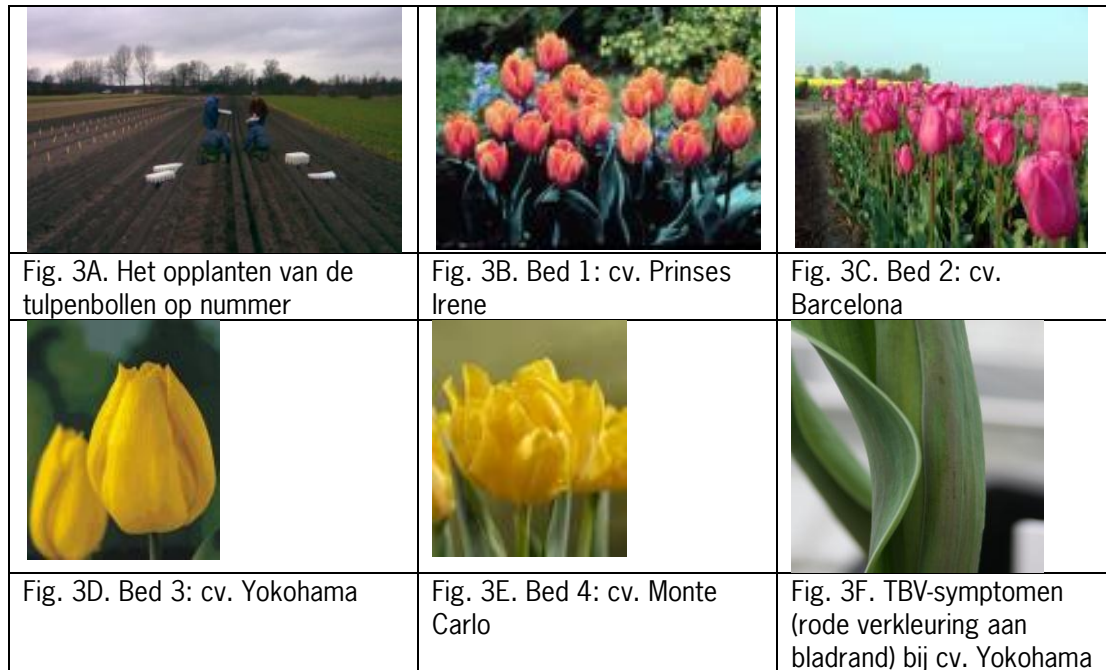
De bollen zijn met de hand geplant, met de neus naar boven gericht.

Van alle cultivars zijn per bed aansluitend ook nog 1000 bollen op praktijkdikte geplant (4 regels per bed waarbij de bollen in veuren zijn gestrooid). Dit is gedaan om ook opnames met de ziekzoekkar te kunnen maken van op praktijkdichtheid geplante tulpen. De totale lengte van een bed bedroeg ongeveer 200 meter

Na het planten zijn de bedden aangeharkt en voorzien van een licht strodek om stuiven te voorkomen.

Gedurende het groeiseizoen van de tulpen is twee keer per week gespoten met middelen om luizen te bestrijden (Decis), eenmaal onkruid te bestrijden (Asulam) en regelmatig Shirlan om vuur (*Botrytis tulipae*) te voorkomen.

De werkzaamheden in het veld zijn uitgevoerd in de periode van 25 maart tot 9 juli; hierna zijn de cv's Barcelona, Monte Carlo en Prinses Irene bemonsterd (bladmateriaal voor de bladtoets op TBV, juni 2010). Er werd maandelijks tegen vuur gespoten, en twee- tot driemaal per week tegen luizen om op deze wijze overdracht van TBV tot een minimum te beperken.



Figuur 4. Plantschema en locatie van de bedden op de proefvelden van PPO, Lisse van de 4 tulpencultivars met aangegeven hoe de nummering van de bollen is aangebracht.

### **Uitvoering veldexperimenten**

De opzet was om met een handmatig te bedienen ziekzoekkar met kleurencamera's en een spectraal camera, met flitslicht opnames van tulpen te maken. De metingen met de ziekzoekkar vonden plaats van week 12 t/m 20: maart - mei 2010.

Er is gekozen om per week alle tulpen gemiddeld tweemaal te meten met de kleurencamera's, (snelle metingen: loopsnelheid) en eenmaal per week met de spectraal camera (langzame meting: per 40 cm stoppen en 6 opnames maken: tijdsduur per 6 metingen: ongeveer 2 minuten). Deze experimentele aanpak bleek qua uitvoering in de beschikbare tijd haalbaar. De camerabeelden werden op de PC in de ziekzoekkar opgeslagen en 's avonds na afloop van de veldexperimenten via internet naar PRI Biometris gestuurd voor verdere analyse. Binnen 24 uur vond terugkoppeling plaats of de opnames van goede kwaliteit waren, of dat er een verandering aan de instelling van de camera's moest plaatsvinden.

De verzamelde data werden later gekoppeld aan de informatie verzameld door de ziekzoekers en de ELISA-resultaten per tulp (bladtoets, zie §2.3).

De labeling van de tulpen werd uitgevoerd na het opkomen van de tulpen in maart via zgn. QR-labels, zoals beschreven voor 2009 (van Doorn e.a. 2010). In het experiment van 2010 is per 10 tulpen een plastic, weerbestendig label gebruikt en middenin de regel gelegd voor vastlegging van de coördinaten van de tulpen via de camera's van de ziekzoekkar (Fig. 2B). Tevens konden zo de coördinaten van elk der geplante tulpen worden vastgelegd op formulieren van de ziekzoekers.

Ziekzoeken: voor de beoordeling van de 4 cv's op TBV-symptomen is een grote groep ziekzoekers betrokken geweest, waarvan een enkele zelfs zevenmaal is langsgekomen. In een formulier (met datum, persoon en cultivar-bolnummer score (1 = ziek, 0 = gezond) werd voor elk van de vier cv's aangegeven of de ongeveer 500 tulpen ziek, of gezond waren, of dat dit onzeker was of dat iets anders aan de hand was. Bij elk bezoek moest elke plant opnieuw worden beoordeeld (onafhankelijke opname). Sommigen gaven aan een andere virusaantasting gezien te hebben, zoals TVX. De TVX-zieke tulpen zijn in de analyse door de software van de ziekzoekkar niet als virusziek meegenomen. Bij de cv. Barcelona zijn de tulpen die door meer dan 3 ziekzoekers als ziek zijn bestempeld, maar gezond waren volgens de ELISA-toets (dus: TBV-negatief) apart in de bladtoets op TVX getoetst (zie bijlage 1).

Toets op virus: na afloop van de veldproeven en metingen met de ziekzoekkar werden in juli bladmonsters van de individuele tulpen op nummer (tweede blad) genomen voor analyse op TBV via ELISA.

## **2.3 ELISA: boltoets en bladtoets op TBV**

### **Viruspercentage en ELISA-waarden van de tulpenbollen**

Ten behoeve van dit project zijn in september 2009 partijen tulpenbollen aangekocht met een bekend percentage TBV (bepaald via een boltoets; gegevens BKD). Ook is er gebruik gemaakt van partijen tulpenbollen met TBV (Monte Carlo) uit de collectie van PPO (Tabel 1).

Vóór het planten van de bollen is per partij eerst bepaald wat het exacte percentage TBV-besmetting in de geplante bollen was. Daartoe zijn van de cultivars Barcelona en Yokohama 500 bollen individueel, en op nummer op TBV getoetst. De bollen zijn op nummer bewaard tot aan het planten. Deze TBV-ELISA-analyses zijn bij PPO uitgevoerd.

Omdat de 500 bollen van cv. Barcelona en Yokohama op nummer zijn getoetst en geplant, is dus per plant op voorhand bekend of sprake is van een virusbesmetting.

Voor de cultivars Monte Carlo en Prinses Irene is deze gedetailleerde analyse niet gedaan omwille van de kosten. Wel is van deze cultivars het percentage TBV-besmetting op basis van een monster / steekproef bekend (Tabel 1).

Van de cultivar Monte Carlo zijn 100 tulpenbollen individueel getoetst en is het percentage TBV in deze partij bepaald.

Apart zijn ook nog 185 tulpenbollen van cv. Monte Carlo geplant met 100% TBV-besmetting, als een soort referentie voor de ziekzoeker. Na afloop van de veldmetingen met de ziekzoekkar zijn in juli bladmonsters genomen van cv. Barcelona en cv. Prinses Irene en is het percentage TBV bepaald. Van cv. Barcelona konden deze data vergeleken worden met de ELISA data, bepaald aan de op nummer geplante bollen (najaar 2009).

De ELISA-data zijn in een bestand opgenomen met plantnummer en extinctiewaarde. De grens van een positieve uitslag lag op een extinctiewaarde van 0.10. Een ELISA-waarde lager dan 0.10 werd als negatief beoordeeld (dus geen TBV-besmetting). Een waarde van 0.10 - 0.14 werd als zwak positief beoordeeld (maar wel positief). Een ELISA-waarde gelijk of hoger dan 0.15 betekent dat het onderzochte monster TBV-geïnficeerd is. Voor correlatie met de visuele analyse van de ziekzoekers enerzijds, en de analyse van de beelden, gemaakt door de ziekzoekkar anderzijds werd een positieve ELISA-waarde aangegeven als "1", en een negatieve uitslag als "0".

## 2.4 Beeldanalyse

De mozaïeksymptomen in tulp, veroorzaakt door TBV (fig. 3F) zijn vaak moeilijk te zien en vereisen een kennersblik om te velde te worden waargenomen. De symptomen zijn beschreven (Ziekten in bolgewassen deel 1, p.159-161). In de veldsituatie, voordat de tulpen bloeien, zijn de belangrijkste symptomen voordat de bladeren zich spreiden een spichtige stand, soms wat smallere bladeren en vooral ook langs de bladranden een afwijkende tekening. Deze mozaïek tekening kan per cultivar verschillen, en is vaak slechts korte tijd duidelijk waarneembaar.

Met de ziekzoekkar (een verrijdbaar camerasysteem) zijn per bed vier waarnemingsrondes uitgevoerd. Met de kleurencamera links heen en rechts terug en zo ook met de spectraal camera. Dit was nodig omdat de tulpen niet in één keer in beeld kwamen. De opnames met de kleurcamera werden uitgevoerd op loopsnelheid, terwijl voor de spectraal camera steeds stilstand van de kar noodzakelijk was. Met de multispectraal camera zijn beelden onder een meethoek van 90° gemaakt, met de kleurencamera's beelden onder een meethoek van 90° en 45°. Deze meethoeken zijn gekozen op grond van enerzijds hoe de ziekzoeker het beste symptomen kan zien (45°), anderzijds om de lokalisatie van de planten op de beelden goed zichtbaar te maken (90°). Per bed zijn de linker- en rechter rij tulpen apart opgenomen, daar door de gebruikte traditionele opplant methode de veur asymmetrisch in het bed lag en de camera zo net niet beide planten in zijn geheel kon vastleggen. Door om de 20 cm een opname te maken is er een overlap in de beelden, wat belangrijk is o.a. voor de lokalisatie van de individuele planten.

Er is gemeten van 23 maart 2010 t/m 18 mei 2010; in totaal is voor ruim 700 GB aan data verzameld.

De beeldanalyses zijn uitgevoerd zoals in 2010 al beschreven (van Doorn e.a. 2010). Voor de techniek wordt ook verwezen naar een wetenschappelijk artikel (hoofdstuk 5).

Segmentatie (opsplitsing in data) van de beelden vond plaats op grond van achtergrondkleur, lokalisatie, blad en paarsverkleuring. Daarmee worden dus niet alle virussymptomen gebruikt zoals bladstand. Dit is helaas niet mogelijk.



De vormkenmerken zijn:

- Genormaliseerde groen- en blauw-waarden per plant (referentiewaarden)
- Segmentatie van paarse spots
- Aantal paarse pixels dat groene pixels raakt in zowel de 90 graden als de 45 graden opnamen. Het aantal paarse pixels dat het aantal groene pixels raakt is een maat voor de kleurbreking (vlekkenpatroon als gevolg van virusaantasting). Immers, als er veel vlekken zijn, paars in groen of groen in paars zullen er veel paarse en groene pixels elkaar raken. Bij een uniforme paarse vlek zijn dit alleen maar de randpixels van de vlek, of helemaal niet als de vlek aan de rand van het blad zit.

De processtappen voor beeldanalyse zijn:

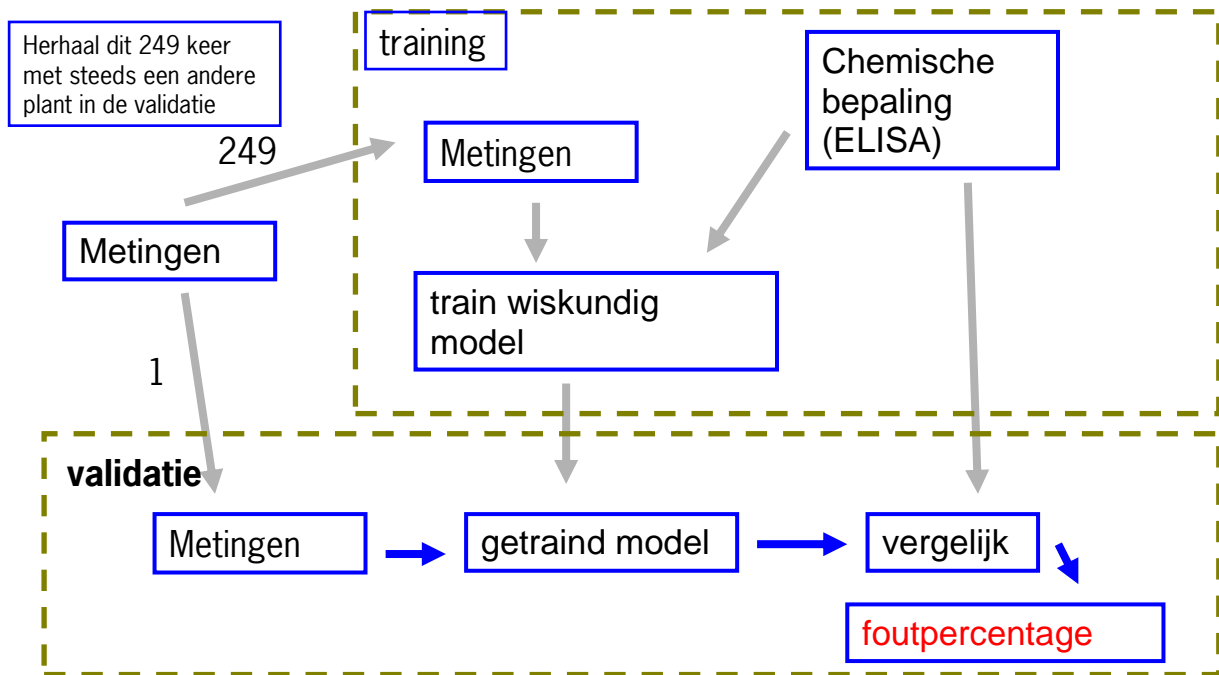
- De 90°- en 45° opnamen zijn aan elkaar gekoppeld (beelden, behorende bij één plant met nummer)
- De beelden van de 6 verschillende golflengtes (6 beelden van het filterwiel) zijn uitgelijnd (d.w.z.: over elkaar heen gelegd); dit gebeurt om alle informatie in eenzelfde opname vast te leggen
- Creëren van (false) color beelden. Hierbij zijn twee beelden gemaakt van ieder drie banden die als een normaal kleurenbeeld weergegeven kunnen worden. Band 1 wordt dan weergegeven als rood, band 2 als groen en band 3 als blauw. Vandaar de term “false color” beeld
- Creëren van een database met plantnummers, beeldcoördinaten, label -en encoderposities en scores (ziekzoekers en ELISA). De scores werden als referentie voor de beeldanalyse in een simpele tabel gezet met “0” wanneer de ELISA negatief was, en “1” wanneer de ELISA positief was
- Multispectrale segmentatie (contouren van de tulpen en paarse spots) in zowel de multispectraal- als de kleurenbeelden
- Classificatie met verschillende metingen en instellingen.

De “leave-one-out” kruis-validatie (figuur 5) is gebruikt voor het beoordelen van een plant, net als in 2009 (Van Doorn e.a. 2010). Dit is een wiskundig beslismodel, dat getraind wordt om zo goed mogelijk te kunnen beoordelen op basis van de gemeten kenmerken (zie hierboven). Het model traint zichzelf op alle planten (in dit geval 250) op één na. Daarna wordt de classificatie berekend van die overgebleven plant met het getrainde model. Deze uitslag wordt dan vergeleken met de ELISA-score. De ELISA-score (de bladtoets) wordt als referentie gezien en valideert het model. Dit wordt herhaald totdat alle planten individueel gevalideerd zijn. Meer gegevens over dit model zijn weergegeven in Polder *et al.* 2010.

De software tools die gebruikt zijn voor de beeldanalyse en statistiek zijn:

- Matlab versie 2010 (<http://www.mathworks.com>).
- Diplib Image processing toolbox voor Matlab versie 2.2 (<http://www.diplib.org/>).
- PRTTools Patroon herkenning toolbox voor Matlab versie 4.0 (<http://www.prttools.org/>).
- Halcon Imaging Library versie 9 (<http://www.mvtec.com/halcon/>).

Voor een uitgebreide beschrijving van de gebruikte techniek wordt verwezen naar bijlage 6. De beschreven techniek is schematisch weergegeven in figuur 5.



Figuur 5. Een schematische weergave van een “leave-one-out” kruisvalidatie

## 3 Resultaten en Conclusies

### 3.1 ELISA-waarden: boltoets versus bladtoets

Als referentie voor het percentage TBV in de verschillende tulpecultivars geldt de ELISA-test specifiek voor TBV. Bij de aankoop van de vier cultivars (Yokohama, Monte Carlo, Barcelona en Prinses Irene) was het percentage TBV in de bol via ELISA bekend (Tabel 1).

Er is gekozen voor een tweetal partijen tulpen (Yokohama en Monte Carlo) met een hoog percentage TBV om voldoende zieke tulpen in de metingen te hebben. Bij bv. 10% ziek moeten er zeker enkele honderden tulpen met de ziekezoekkar gemeten worden om voldoende positieve beelden te hebben voor analyses.

Voor opplant van de tulpenbollen is van de cultivars Barcelona en Yokohama van de 500 op nummer op te planten bollen een bolschijfje gesneden en met ELISA getoetst op aanwezigheid van TBV. De bollen doorstaan dit goed en geven later een goede tulp. Opvallend was dat er bij Yokohama en Monte Carlo een verschil in percentage virus werd gevonden tussen de percentages TBV vooraf en na deze boltoets (Tabel 1). PPO en BKD gebruiken vergelijkbare werkwijzen waarbij hetzelfde type materiaal van de bol getoetst wordt (tweede rok). Ook wordt door beide organisaties hetzelfde TBV-antiserum gebruikt. Het is niet aannemelijk dat het moment van toetsen (augustus versus november) invloed heeft op de betrouwbaarheid van de ELISA-toets.

Vergelijkbare verschillen in toetsuitslagen zijn ook in 2009 waargenomen (Van Doorn e.a. 2009). Opgemerkt moet worden dat viruspercentages boven de 20% in de praktijk vrijwel nooit voorkomen.

Bij Prinses Irene en Yokohama is een bladtoets uitgevoerd aan 250 planten.

Tabel 1. Viruspercentage van de geplante tulpecultivars, bepaald middels ELISA.

cultivar	Percentage TBV (boltoets BKD, augustus 2009)	Percentage TBV (boltoets PPO, november 2009)	Percentage TBV (bladtoets PPO, juli 2010)
Yokohama	60 %	72 %*	92.2 %
Monte Carlo	60 %	36 % **	90.3 %
Barcelona	9.5 %	13.2 %* (geen significant verschil t.o.v. 9.5%)	9.2 %
Prinses Irene	10 %	Niet bepaald	7.4 %

\* Van 500 bollen is een bolschijfje gesneden en getoetst voordat deze op nummer geplant zijn

\*\* Aan 100 bollen bepaald

Tabel 2. Overzicht van de uitgevoerde metingen aan de vier tulpecultivars.

Metingen	Prinses Irene	Barcelona	Yokohama	Monte Carlo
Totaal op nummer geplante bollen	500	500	500	500
Totaal niet opgekomen	12	29	73	14
Geanalyseerde bollen (ziekzoeker)	488	471	427	486
Aantal viruspositief (ziekzoeker)	68 (14.0%)	72 (12.8%)	366 (85.7%)	390 (80.2%)
Totaal virusvrij	420	399	61	96
Aantal positief in boltoets ELISA	Niet uitgevoerd	55/416 = 13.2%	349/427 = 81.7%	Niet uitgevoerd
Aantal positief in bladtoets ELISA	18/245 = 7.3%	43/471 = 9.1%	214/232 = 92.2%	439/486 = 90.3%

De percentages virus op basis van de boltoets kwamen in enkele gevallen wel, en in enkele gevallen niet met elkaar overeen:

- Bij cv. Prinses Irene was het viruspercentage op basis van de bladtoets (7.4%) vergelijkbaar met het viruspercentage dat voorafgaand aan het planten op basis van de boltoets waargenomen was (10%)
- Bij cv. Barcelona was het viruspercentage op basis van de bladtoets (9.2%) vergelijkbaar met het viruspercentage dat voorafgaand aan het planten op basis van de boltoets waargenomen was (13.2%). Bij cv. Barcelona bleken 21 tulpen met TVX besmet, zoals aangegeven door ziekzoekers (visueel beoordeeld op specifieke symptomen) en bevestigd met een ELISA op bladmateriaal met antiserum, specifiek voor TVX (zie bijlage 1).
- Bij cv. Yokohama was het viruspercentage op basis van de bladtoets (92.2%) veel hoger dan voorafgaand aan het planten op basis van de boltoets waargenomen was (60%, respectievelijk 72%). Voor het verschil tussen 60% en 72% is geen directe verklaring te geven, maar is mogelijk veroorzaakt door vroege virusverspreiding (zie hieronder).
- Bij cv. Monte Carlo was het viruspercentage op basis van de bladtoets (90.3%) veel hoger dan voorafgaand aan het planten waargenomen was (60% respectievelijk 36%). Voor het verschil tussen 60% en 36% is geen verklaring te geven behoudens mogelijk een vroege virusverspreiding (zie hieronder).
- Dat viruspercentages op basis van de bladtoets hoger zijn, kan mogelijk verklaard worden door vroege virusverspreiding tijdens het teeltseizoen. Ondanks frequente bespuiting tegen virusoverdracht is het aannemelijk dat bij een dergelijke hoge virusdruk er toch virusverspreiding heeft opgetreden waarbij virusvrije planten alsnog virus geïnfecteerd zijn geraakt. Deze recent geïnfecteerde planten vertonen nog geen visuele virusbeelden op het blad of bloem. Op basis van ervaring is bekend dat een recente virusinfectie na 4-6 weken in het blad met ELISA meetbaar begint te worden. Het is daarentegen opvallend dat bij cv. Barcelona en cv. Prinses Irene deze virustoenamen niet heeft plaatsgevonden, terwijl deze partijen in de naaste omgeving waren opgeplant.

De ELISA-uitslagen van individuele planten op nummer van cv. Barcelona van enerzijds de boltoets vooraf en anderzijds de bladtoets (Tabel 2) zijn vergeleken. Hieruit bleek, dat de boltoets gevoeliger is dan de bladtoets: 55 bollen werden als positief beoordeeld in de boltoets tegen 43 in de bladtoets. TVX is visueel bepaald door enkele ziekezoekers en aangegeven op het formulier. De tulpen van Barcelona die door de meeste ziekezoekers positief zijn gescoord, maar negatief waren in de ELISA op TBV zijn apart ook getoetst op TVX. Dit is weergegeven in bijlage 1. De ziekezoekers vonden in 72 van de 471 opgekomen planten virussymptomen, waarvan 21 planten met TVX (bevestigd middels ELISA).

## 3.2 Ziekzoeken

Er is gekozen voor een tweetal partijen tulpen met een hoog percentage TBV om voldoende zieke tulpen in de metingen te hebben. Bijvoorbeeld 10% ziek betekent dat er zeker enkele honderden tulpen gemeten worden met de ziekezoekkar om (statistisch) voldoende positieve beelden te hebben. Door enkele ziekezoekers werd in een aantal gevallen ook TVX geconstateerd.

De ziekezoekers konden in twee groepen verdeeld worden: de eenmalige ziekezoekers, en “vaker terugkomende” ziekezoekers. Andere variabelen waren het stadium van het gewas (bepaalde cv's tonen volgens kenners TBV-symptomen vroeg, andere cv's juist weer laat (tijdens de bloei)).

Niet altijd werden alle cultivars beoordeeld door alle ziekezoekers, vaak werden bij de “eenmalige” ziekezoekers de verschillende cv's verdeeld en beoordeeld met z'n tweeën.

Unaniem vond men de partijen Yokohama en Monte Carlo te zwaar besmet; de meeste ziekezoekers hebben de individuele planten van deze cultivar niet individueel beoordeeld. Bovendien bevonden zich tussen de Yokohama opplant veel dwalingen; mogelijk is deze eigen partij (randbeplanting PPO) in de bewaring gemengd geraakt met Monte Carlo. Daarom zijn deze partijen voor de uiteindelijke analyses niet gebruikt.

De cv's werden beoordeeld via een formulier waarop werd aangegeven de cultivar, datum, ziekezoeker, een 0 als deze niet ziek was en een 1 als deze wel ziek was. Ook werd aangegeven wanneer er planten op nummer niet waren opgekomen.

De planten zijn beoordeeld in week 12 t/m20: op 26, 29 maart, op 1, 2, 7, 8, 9, 15, 16, 19, 22, 23, 29, 30 april en op 9 en 24 mei.

Twee medewerkers van de BKD hebben beiden viermaal deelgenomen aan het ziekezoeken (29 maart, 8, 22 en 29 april).

Bijna alle leden van de begeleidingsgroep zijn langs geweest om te ziekezoeken (Tabel 3).

- ELISA- en ziekezoek resultaten zijn in tabellen opgenomen
- Scores waren positief wanneer de ELISA-waarde gelijk of hoger dan 0.1 was; voor ziekezoekers wanneer meer dan 3 ziekezoekers een plant positief scoorden.
- Voor de beeldanalyse zijn de data vertaald naar positief of negatief in de bladtoets ELISA, en positief voor de ziekezoekers wanneer 3 of meer ziekezoekers de planten als virusziek beoordeelden.

Tabel 3. Overzicht van de ziekzoekers en aantal keren waargenomen in 2010.

ziekzoekers	Aantal malen waargenomen	opmerkingen
Van der Salm	6	Alle cv's beoordeeld
BKD	4	Alle cv's beoordeeld
Schoorl	3	Alle cv's beoordeeld
Oud, Boon, Stoop, Karel, Apeldoorn, Schouten, Wit, Leek, Poel (leden begeleidingscommissie)	1	Allen een keer geweest; niet alle cultivars beoordeeld.

Gekozen is voor die waarnemingen in de tulpen, waarbij door de ziekzoekers is aangegeven dat de virussymptomen goed zichtbaar waren en ook de ziekzoekar gelijktijdig waarnemingen heeft uitgevoerd. Daarom is de focus op Barcelona en Prinses Irene gelegd; Yokohama en Monte Carlo bleken te zwaar ziek (Tabel 4).

Tabel 4. Analyse van de cultivars op gezond of TBV-ziek zijn via de ELISA aan bladmonsters

cultivar	aantal gezond	aantal ziek	% ziek	Totaal aantal
Barcelona (BA)	406	65	14 %	471
Monte Carlo (MC)	47	439	90 %	486
Prinses Irene (PI)	227	18	7 %	245
Yokohama (YO)	18	214	92 %	232
<b>Totaal</b>	<b>698</b>	<b>736</b>	<b>51 %</b>	<b>1434</b>

In tabel 5 is weergegeven hoe de ziekzoekers de tulpen beoordeelden. Daarbij is het oordeel van ziekzoeker vergeleken met ELISA-waarden die zijn gehanteerd als absolute referentie van TBV-ziek of niet ziek zijn van de tulpen.

Tabel 5. Correlatie tussen de uitslagen van het ziekzoeken en de uitslagen van de ELISA in week 14 voor de verschillende cultivars, beoordeeld door ziekzoeker S (A) en ziekzoeker BKD (B). Groen = correcte goedscore, rood = foutieve score. Gezond/ziek op verticale as betreft ziek of gezond volgens een ELISA bladtoets, ziek/gezond op horizontale as is hoe de ziekzoeker beoordeelde. C is verdere toelichting.

A.						B.					
S, week 14						BKD, week 14					
cultivar	ELISA	ziekzoeker		foutscore	goedscore	cultivar	ELISA	ziekzoeker		foutscore	goedscore
		gezond	ziek					gezond	ziek		
BA	gezond	378	28	7%	29%	BA	gezond	403	3	1%	42%
	ziek	46	19				ziek	38	27		
MC	gezond	30	17	36%	30%	MC	gezond	21	26	55%	80%
	ziek	308	131				ziek	88	351		
PI	gezond	209	16	7%	67%	PI	gezond	210	17	7%	78%
	ziek	6	12				ziek	4	14		
YO	gezond	14	3	18%	42%	YO	gezond	15	2	12%	58%
	ziek	125	89				ziek	89	125		

De resultaten van cultivar Barcelona van week 14 zullen als voorbeeld verder worden uitgelegd. Het betreft de volgende resultaten:

**C.**

	Volgens ziekzoeker gezond	Volgens ziekzoeker ziek	Totaal
Volgens ELISA gezond	378	28	406
Volgens ELISA ziek	46	19	65
Totaal	424	47	471

In tabel 5A en ook in de toelichting eronder zijn in totaal voor cv. Barcelona 471 planten beoordeeld.

Volgens ELISA waren er van cv Barcelona 406 planten gezond en 65 planten virusziek.

Volgens de ziekzoeker S waren er 424 planten gezond en 47 planten virusziek.

Ziekzoeker S heeft dus t.o.v. ELISA 28 planten onterecht ziek beoordeeld welke eigenlijk gezond waren. Die onnauwkeurigheid wordt uitgedrukt in een foutscore en wordt berekend t.o.v. het totaal aantal planten welke volgens ELISA virusvrij oftewel gezond waren:  $378 + 28$  planten = 406 planten. Wanneer 28 planten onterecht ziek worden beoordeeld, komt dit neer op  $28/406 = 7\%$  onterecht ziek (foutscore).

Omgekeerd heeft hij van de  $46+19=65$  planten die volgens ELISA virusziek waren slechts 19 planten correct aangewezen als zijnde virusziek. Dit is een goedscore van  $19/(46+19)=29\%$ . Beide percentages zijn belangrijk: je wilt zo veel mogelijk viruszieke planten correct herkennen (hoge goedscore) en zo min mogelijk gezonde planten afkeuren (lage foutscore).

In week 14 wist ziekzoeker S vooral Prinses Irene goed te beoordelen met een score van 67% (67% van de viruszieke planten werd daadwerkelijk herkend). Op dezelfde wijze is voor de andere cv's naast de foutscore (onterecht ziek) de goedscore bepaald (terecht ziek). De BKD scoort gemiddeld beter; viruszieke planten van cv. Prinses Irene zijn in week 14 goed te beoordelen door beide ziekzoekers (ziekmaker S: 67% tegen ziekzoeker BKD: 78%).

Bij cv. Yokohama waren in week 16 bij heel veel planten duidelijke virus symptomen zichtbaar. Daarom was het hier niet moeilijk een hoge goedscore bij het ziekzoeken te halen. Ziekzoeker S behaalde hier bijvoorbeeld een goedscore van 70% (tabel 6A en B). De BKD behaalde een goedscore van 56% voor Prinses Irene in week 16.

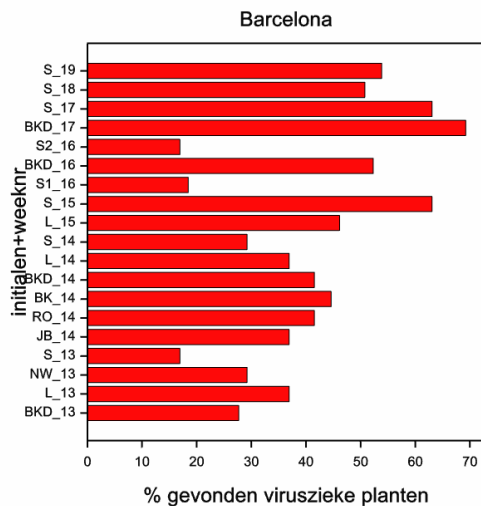
Tabel 6. Correlatie tussen de uitslagen van de ELISA voor de verschillende cultivars enerzijds en de uitslagen van het ziekzoeken anderzijds (week 16), deze laatste beoordeeld door ziekzoeker BKD (A) en ziekzoeker S (B). Groen = goedscore, rood = foutscore. Gezond/ziek verticaal = werkelijk ziek of gezond, horizontaal ziek/gezond = wat de ziekzoeker waarnam.

A

BKD, week 16					
cultivar		gezond	ziek	foutscore	goedscore
BA	gezond	389	15	4%	52%
	ziek	31	34		
PI	gezond	225	2	1%	56%
	ziek	8	10		

B

S, week 16					
cultivar		gezond	ziek	foutscore	goedscore
BA	gezond	398	6	1%	17%
	ziek	54	11		
MC	gezond	32	15	32%	36%
	ziek	281	158		
PI	gezond	226	1	0%	22%
	ziek	14	4		
YO	gezond	15	0	0%	70%
	ziek	65	149		



Figuur 6. Het percentage viruszieke Barcelona tulpen, gevonden door de verschillende ziekzoekers in week 13 t/m 19.

In figuur 6 is te zien dat de goedscores van de ziekzoekers in de loop van week 13 tot aan week 19 toenemen: de virusbeelden lijken dus in de wat verder ontwikkelde tulpen beter te beoordelen. In figuur 7 is de goedscore voor cv. Prinses Irene te zien. De BKD heeft bij deze cultivar in week 14 bijna 80% viruszieke planten gevonden. In week 16 zijn de symptomen duidelijk minder goed waarneembaar.



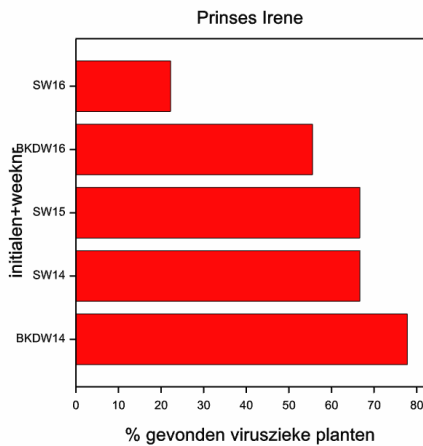
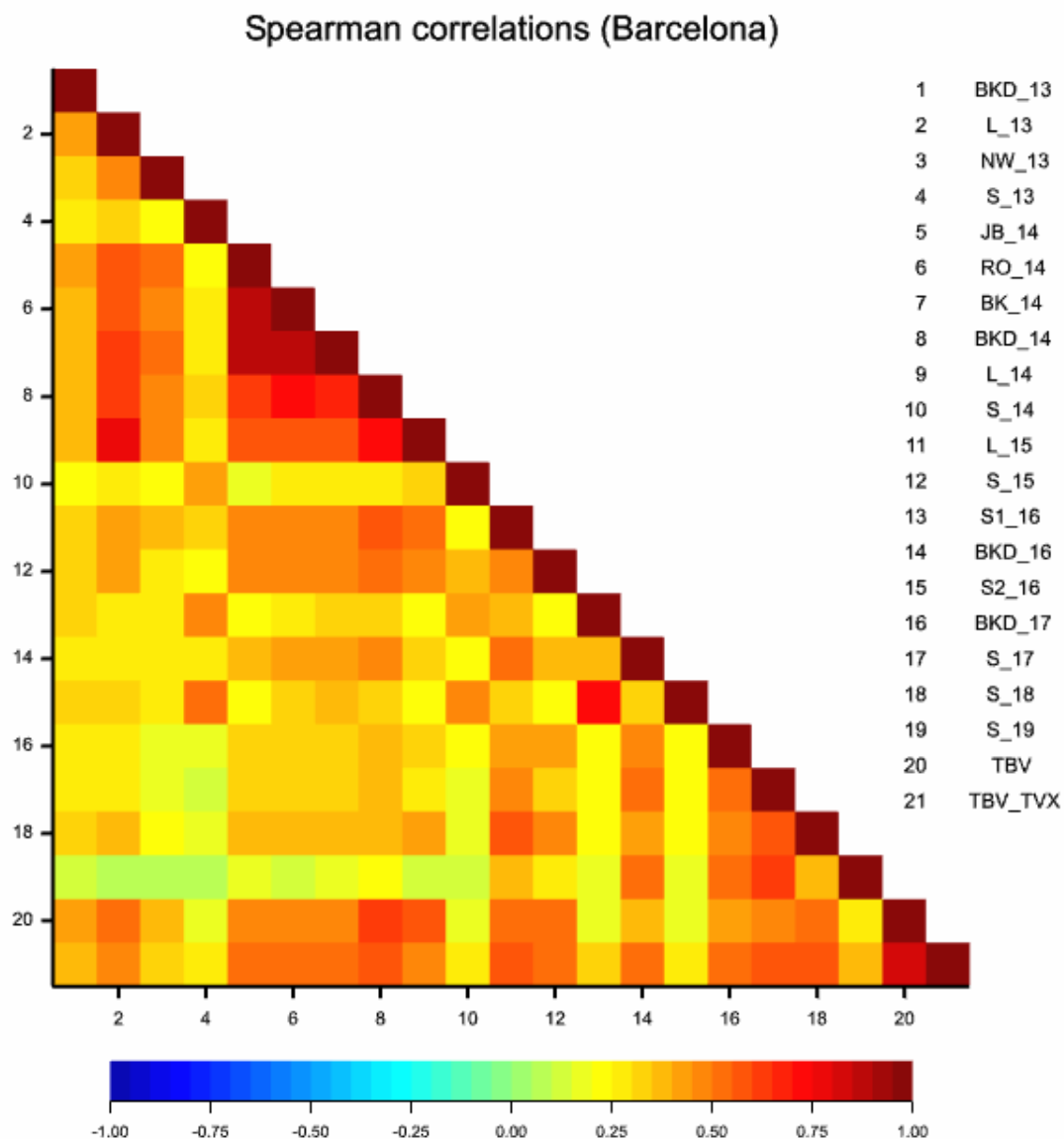


Fig. 7. Totaalanalyse van de gevonden zieke planten bij Prinses Irene in week 14 door de verschillende ziekzoekers. De letters voor W14 geven de initialen van de ziekzoekers weer: BKD en v.d. Salm.

Samenvattend kan vastgesteld worden, dat de beste goedscore (% correct gevonden zieke planten) in cv. Prinses Irene 78% was, en in cv. Barcelona 52%. Prinses Irene wordt in het algemeen ook gezien als een “eenvoudige” cultivar om te beoordelen op TBV.

Ook is de correlatie tussen de beoordelaars en de ELISA-toetsen onderzocht (figuur 8). De correlatie is een maat voor overeenstemming tussen volledig tegenovergesteld (-1) tot volledig overeenstemmend (+1). Een correlatie van nul betekent dat er geen overeenstemming is. Deze getallen geven dus niet de foutscore of de goedscore aan. Het resultaat hiervan is te zien in figuur 8 voor Barcelona. De onderste 2 rijen bevatten de ELISA toetsen (rij 20: alleen TBV; rij 21: TBV en TVX). Bij een hoge positieve correlatie is een donkerrode kleur te zien. Een lage correlatie is geel, geen correlatie is groen en een negatieve correlatie zou blauw zijn geweest. Rij 19 is S\_19, dit is dus de beoordeling door ziekzoeker S in week 19. Dit was duidelijk te laat, er is nauwelijks meer correlatie met andere beoordelaars op andere tijdstippen of met de ELISA. De ziekzoeker van de BKD in week 14 is nr. 8; de ziekzoeker van de BKD heeft een behoorlijk hoge correlatie met de ELISA toetsen (rode blokjes).



Figuur 8. Correlatie tussen ELISA toetsen (nr. 20 en 21, onderste rijen) en alle individuele meetmomenten van diverse beoordelaars voor cultivar Barcelona.

### 3.3 Beeldopnames en analyses

De opnames werden beoordeeld nadat deze aan het einde van de meetdag via internet waren doorgezonden naar Wageningen. Controle vond plaats op de kwaliteit van de opnames en of alle tulpen goed in beeld waren. Er werden kleurenopnames onder een hoek van 90° en 45° gemaakt. Multispectraal opnames werden onder een hoek van bij 90° gemaakt. Uit de analyses bleek dat de beelden die onder een hoek van 45° zijn gemaakt, veel informatiever waren en beter in beeld kwamen dan de beelden die onder een hoek van 90° zijn gemaakt.

Door de gebruikte korte sluitertijden en flitslicht was leklicht voor de camera's geen probleem, zelfs niet op zonnige dagen. De voorflap van de ziekzoekkar kon open blijven, zodat de tulpen niet beschadigd werden.

Verder bleek dat het door de constante intensiteit en kleur van het flitslicht eenvoudig was om in de kleurenbeelden de plant te segmenteren van de achtergrond. In de proef van 2009 was dit niet mogelijk en was hiervoor multispectrale segmentatie nodig.

Hoewel het flitslicht een prima oplossing was voor het leklichtprobleem, introduceerde het wel andere ongewenste effecten. Het flitslicht ontladde frontaal vanuit een centraal punt waardoor hoge planten (dicht bij de camera) erg licht en lagere delen dicht bij de grond onderbelicht raakten. Verder bleek het kleurenspectrum van het flitslicht zodanig te zijn, dat het segmenteren van de kleuren blauw/paars een stuk lastiger was dan bijvoorbeeld in de laboratoriumproef van 2008 (Van Doorn e.a. 2009). Voor de spectraal camera werd vervolgens nog een deel van het licht weggenomen door de gebruikte smalband filters, waardoor de multispectraal beelden erg veel ruis bevatten.

Ook bleek het achteraf geen goede keuze om de resolutie van de beelden te verkleinen om zodoende met de toegepaste loopsnelheid om de 20 cm een beeld te kunnen opnemen. Het blijkt dat toch de volledige informatie nodig is voor het goed zichtbaar maken van de subtiele virussymptomen.

Vanwege de ophangingshoogte en de stand van de camera's moesten toch tweemaal per bed opnames gemaakt worden om beide rijen tulpen per bed (figuur 9) goed te kunnen fotograferen. Per bed zijn daarom de linker en rechter rij van de tulpen per cultivar apart opgenomen. Door om de 20 cm een opname te maken, ontstond een overlap in beelden waardoor de 90° opnamen en de 45° opnamen goed te traceren en aan elkaar te koppelen waren.

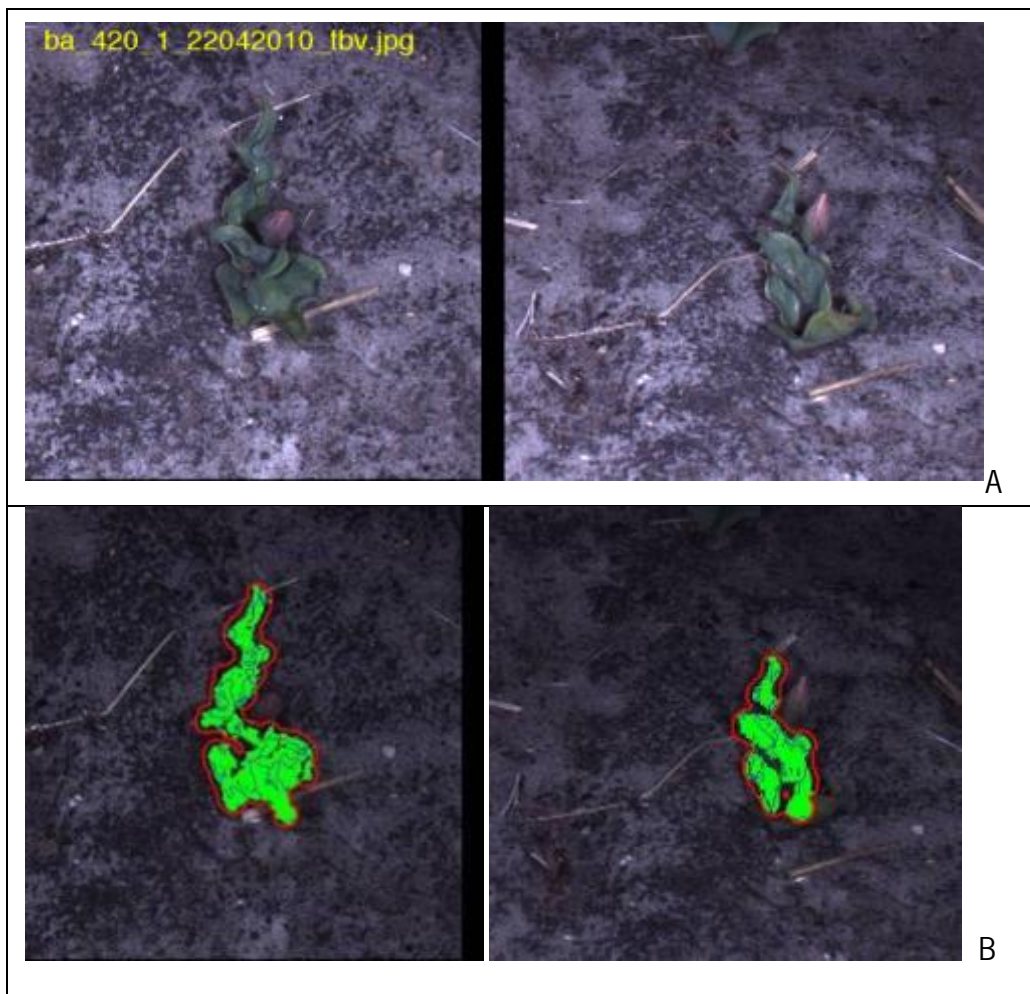
Er is gemeten van 23 maart t/m 18 mei: week 12-20. In totaal werd ruim 700 GB aan beelden opgeslagen in de computer. De eerste analyses zijn uitgevoerd aan de cultivars Barcelona en Prinses Irene (opnames uit week 14-16): in totaal ruim 900 planten waarvan 84 volgens de ELISA-gegevens waren besmet met TBV.

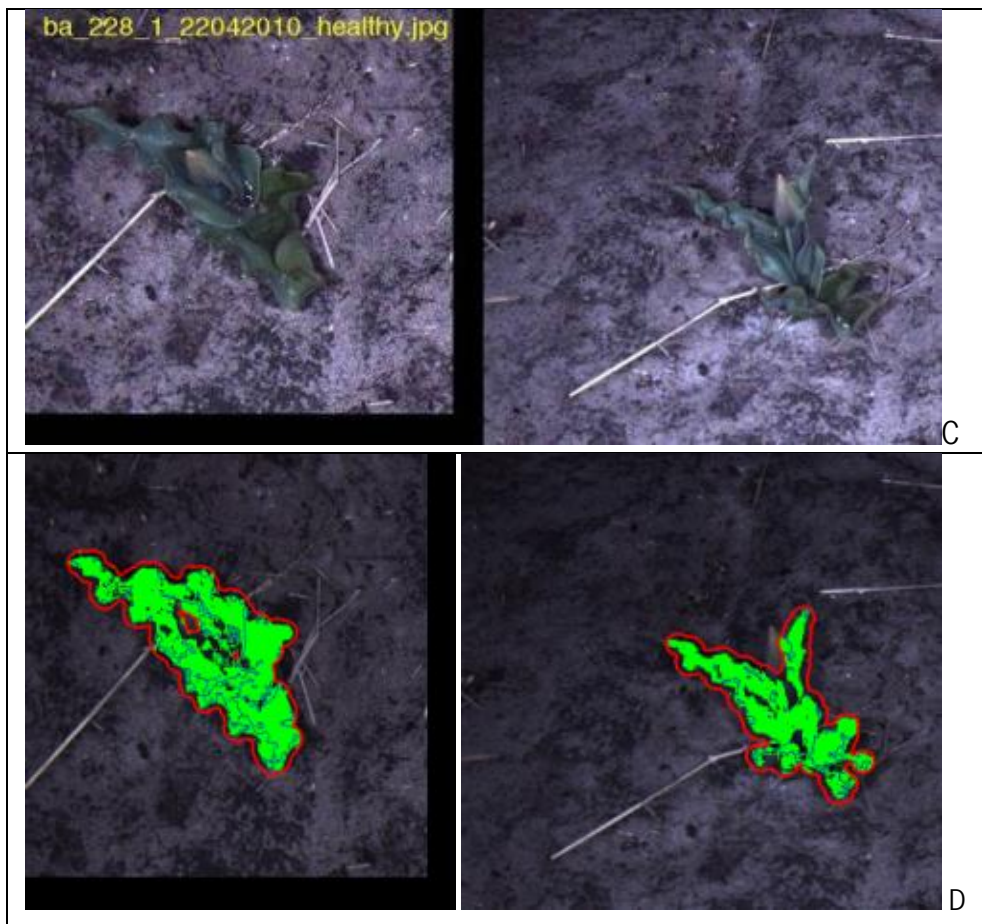


Figuur 9. De ziekzoekkar in actie.

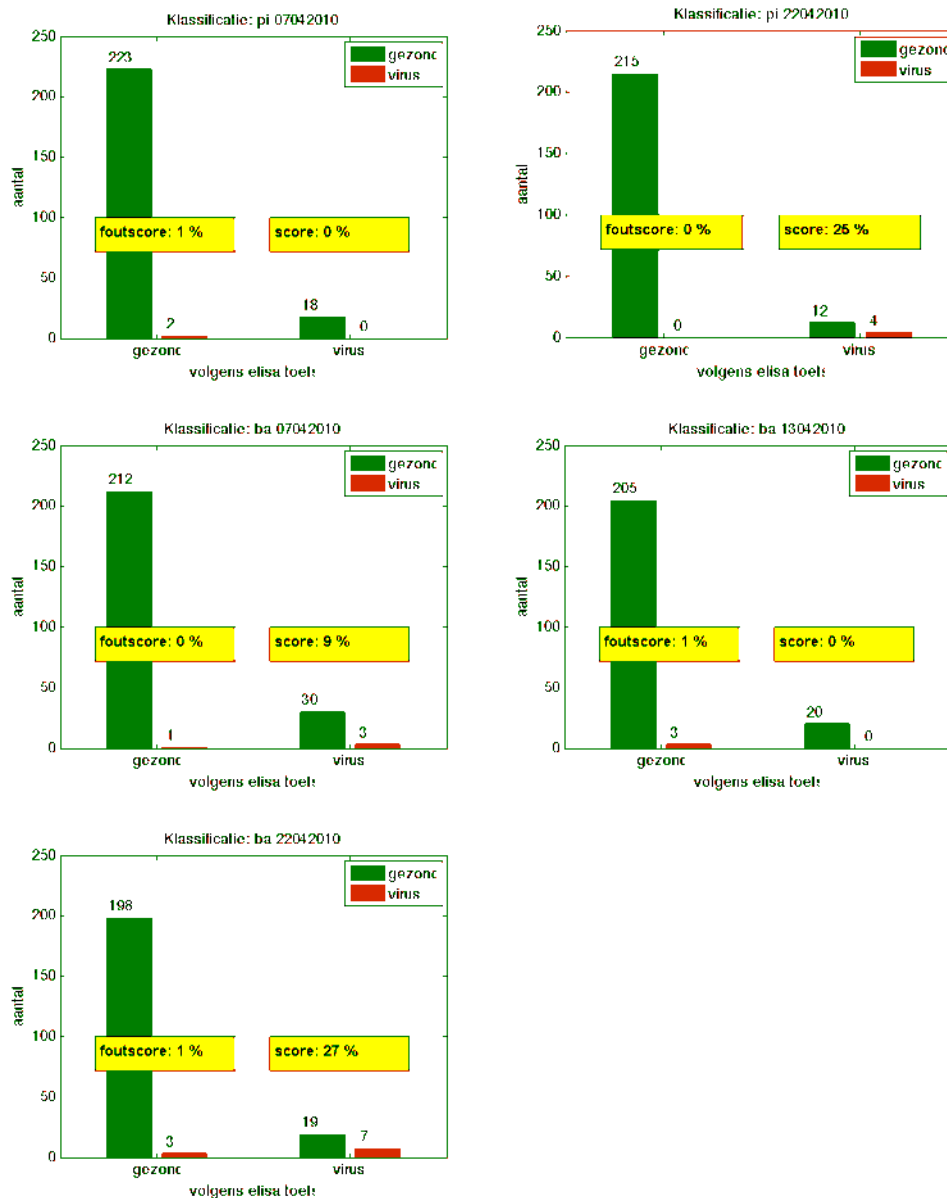
Voor de analyse zijn opnames gebruikt van cv Barcelona op 7 april, 13 april en 22 april (figuur 10 en 11). Op deze data hebben de zoekzoekers ziek gezocht en heeft ook de ziekzoekkar opnames gemaakt. Bij de analyse zijn verder de beoordelingen van de keurmeesters van de BKD gebruikt, die zij achteraf (november 2010) hebben gegeven op basis van foto's die door de ziekzoekkar op 22 april zijn gemaakt. De ELISA-gegevens zijn gebruikt als referentiekader. Alle ELISA-gegevens zijn gecodeerd als 1 (ziek) of als 0 (niet ziek).

De kenmerken van deze planten zijn via de beeldopnames gemeten en het wiskundig model (fig.5) is getraind zoals beschreven. De classificaties van Prinses Irene op 7 en 22 april 2010 (week 14 en week 16), en Barcelona op 7, 13 en 22 april zijn weergegeven in figuur 10.





Figuur10. Kleurenopnames van twee TBV- geïnfecteerde Barcelona tulpen (A) en computersegmentatie (B) van deze opnames. Hetzelfde is uitgevoerd voor twee gezonde tulpen (C resp. D). De rode pixels geven aan waar de volledige plant is gevonden t.o.v. de achtergrond. De groene pixels geven de plant aan. De blauwe pixels geven de randen aan waar paarse vlekken zijn gedetecteerd.



Figuur 11. Resultaten van de analyse van de beeldopnames in week 14 (7 april 2010) week 15 (13 april) en week 16 (22 april) van cv's Prinses Irene (PI) en Barcelona (BA). Nagestreefd wordt een foutscore van 0 % en een (goed-) score van 100 %.

Bij PI 07042010 (figuur 11) zijn 2 gezonde planten ten onrechte ziek verklaard (foutscore 1 %) en zijn alle viruszieke planten onterecht gezond (score 0 %). Op 22 april (PI 22042010) zijn alle 215 planten goed beoordeeld als gezond (foutscore 0 %, maar slechts 4 van de 16 zieke planten (score 25%) zijn juist beoordeeld. Door het geringe aantal zieke tulpen bij Prinses Irene (7.4 % volgens de bladtoets) valt de score bij het foutief beoordelen van enkele tulpen direct slecht uit. Bij Barcelona is de score op 7 en 13 april zeer laag; het beste wordt gescoord op 22 april waarbij slechts 27% van de viruszieke Barcelona als terecht ziek wordt beoordeeld. Opgemerkt moet worden dat de ziekzoekkar in week14, 15 en16 maar een enkele rij heeft geanalyseerd. Dit verklaart de lagere aantallen tulpen in figuur 11 in vergelijking met de ongeveer tweemaal hogere aantallen tulpen die door de ziekzoekers zijn beoordeeld (Tabel 5 en 6). Zij hebben namelijk twee rijen tulpen beoordeeld.

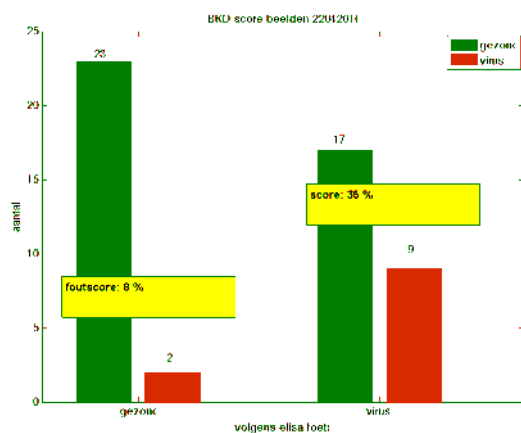
Als we dit vergelijken met de score van de ziekzoekers over de verschillende weken (zie score % gevonden zieke planten in figuur 6 en 7), dan valt op dat de goedscore van de ziekzoekkar erg laag is. Het beste resultaat is 27% voor Barcelona en 25% voor Prinses Irene. Zeker voor Prinses Irene is de goedscore laag in verhouding met de goedscore van de ziekzoekers. Positief is dat het percentage ten onrechte afgekeurde zieke planten (foutscore) voor de ziekzoekkar laag is in vergelijking met dat van de ziekzoekers (Tabel 6).

Deze lage goedscores kunnen op twee manieren worden verklaard:

1. De informatie zit niet in de beelden. De kwaliteit of het oplossend vermogen van de beelden is onvoldoende om de virusbeelden zichtbaar te maken via computerbewerking.
2. De informatie zit wel in de beelden, maar wordt er met beeldanalyse niet uitgehaald.

Om deze lage goedscores nader te verklaren, zijn 51 beelden verzameld van cv. Barcelona uit week16. Deze tulpen zijn zowel door de ziekzoekers (hoofdstuk 4.2) als door de ziekzoekkar beoordeeld.

Daartoe zijn 26 beelden, gemaakt door de ziekzoekkar, met TBV-besmette tulpen van cv. Barcelona van 22 april 2010 en 25 beelden van gezonde planten verzameld. Deze 51 digitale opnames zijn door de BKD (een expert) beoordeeld. Deze opnames zijn aangeleverd op een CD en op een computer-beeldscherm "blind" beoordeeld. Deze beoordeling is weergegeven in figuur 12.



Figuur 12. Foutscore en (goed-) score van de expert van de BKD wat betreft de beoordeling van beeldopnames (opgenomen op 22 april 2010; 26 zieke en 25 gezonde tulpen van cv. Barcelona).

Van de 25 gezonde tulpen werden twee tulpen foutief ziek bevonden, terwijl 17 van 26 zieke tulpen foutief gezond werden bevonden. De ziekzoek goedscore was dus 35% (17 van de 51). Deze score is vergelijkbaar met de gemiddelde ziekzoek goedscore in 2009 van 39% (rapport 2009, Van Doorn e.a. 2010). Bij iets oudere planten (vergelijk 7 april met 22 april) ging het beter, maar het goedscorepercentage van de ziekzoekers is nog steeds laag. Het achteraf door de BKD visueel beoordelen van beelden gemaakt door de ziekzoekkar geeft ook een gemiddeld slechter resultaat dan de goedscore in het veld door de ziekzoekers. De beelden op de computer lijken dus aanmerkelijk lastiger te beoordelen dan de beoordeling op virussymptomen rechtstreeks in het veld. Dit zou erop kunnen duiden dat in de computerbeelden belangrijke informatie waarop TBV-zieke tulpen worden beoordeeld, niet aanwezig is.

Deze beelden gemaakt door de ziekzoekkar in cv. Barcelona op 22 april 2010 zijn ook tijdens de begeleidingscommissievergadering van 11 okt. 2010 bekeken door de begeleidingsgroep. Hun analyse is genoteerd op een formulier (met aanduiding van “gezond” of “ziek”). Deze beoordeling werd bemoeilijkt door de slechte kwaliteit van de beamer waarmee de beelden werden geprojecteerd. Door de begeleidingsgroep was op deze wijze geen goede beoordeling mogelijk van de symptomen van cv. Barcelona. Daarom zijn deze resultaten van de commissie niet verder uitgewerkt.

Na overleg met de begeleidingscommissie is een vervolgspraak in december gemaakt met een selecte groep ziekzoekers (BKD en PPO) en zijn dezelfde 51 opnames opnieuw beoordeeld. De beelden werden op een goede monitor groot afgebeeld en zijn interactief bekeken. Op de beelden is ingezoomd, het contrast maximaal gezet en dit alles is door drie experts bediscussieerd. Deze experts (BKD + PPO) haalden nu een goedscore van 70 tot 80 % in de zieke planten uit de 51 foto's.

Dit percentage wijkt af van het percentage door de BKD gescoord in een eerdere sessie (figuur 12). Toen scoorde de BKD veel lager: 35% van de zieke tulpen met TBV-symptomen werden gevonden, met de kanttekening dat deze beelden toen met een te laag contrast waren weergegeven en slechts door één expert zijn bekeken.

Deze resultaten bevestigen dat een ervaren oog de typische symptomen van een TBV besmetting in de gemaakte opnames kan waarnemen. Uit de interactieve discussie is gebleken dat de experts tijdens de beoordeling van de foto's niet alleen letten op paarsverkleuring op het blad, maar ook letten op specifieke tekening op de bloemknop, het geknepen zijn van het blad. Daarnaast werd opgemerkt dat de paarsverkleuring vaak aan de onderkant van het blad zichtbaar is. Dit verklaart waarom de beeldopnames die onder een hoek van 45° zijn gemaakt informatiever zijn dan de 90° beelden. Vaak is op de 45° beelden een gedeelte van de onderkant van het blad op deze beeldopnames zichtbaar wat vanzelfsprekend niet zichtbaar is wanneer een plant van bovenaf wordt gefotografeerd (90° beelden).

Er is eveneens een vergelijking opgesteld tussen de ziekzoekkar en de ziekzoeker van de BKD op zijn beste dag qua scoren van virussymptomen. Hiervoor zijn de ziekzoek goed- en foutcores genomen van 1 dag (22 april 2010) voor de metingen met de ziekzoekkar in cv. Barcelona, en cv. Prinses Irene. De resultaten staan in Tabel 7.

Op 22 april kon zowel de ziekzoeker als de ziekzoekkar de gezonde Barcelona-tulpen goed onderscheiden: 83 versus 87%. De ziekzoekkar doet dit zelfs wat beter (Tabel 7). De ziekzoekkar scoort beter dan de ziekzoeker en beoordeelt slechts 1% onterecht ziek. De ziekzoekkar scoort slechter in het vinden van zieke tulpen (Tabel 7). Voor Prinses Irene geldt feitelijk hetzelfde verhaal (Tabel 8).



Tabel 7. Gevonden (goedscore) en niet gevonden (foutscore) gezonde en zieke tulpen van cv. Barcelona (22 april)

<b>uitslag</b>	<b>% ziekzoeker</b>	<b>Aantallen tulpen</b>	<b>% ziekzoekkar</b>	<b>Aantallen tulpen</b>
Gevonden gezonde tulpen	93%	389	99%	198
Niet gevonden gezonde tulpen	7%	31	1%	3
totaal	100%	420	100%	201
Gevonden TBV-zieke tulpen	69%	34	27%	7
Niet gevonden TBV-zieke tulpen	31%	15	73%	19
totaal	100%	49	100%	26

Tabel 8. Gevonden (goedscore) en niet gevonden (foutscore) gezonde en zieke tulpen van cv. Prinses Irene (22 april).

<b>uitslag</b>	<b>% ziekzoeker</b>	<b>Aantallen tulpen</b>	<b>% ziekzoekkar</b>	<b>Aantallen tulpen</b>
Gevonden gezonde tulpen	97%	225	100%	215
Niet gevonden gezonde tulpen	3%	8	0%	0
totaal	100%	232	100%	215
Gevonden TBV-zieke tulpen	83%	10	25%	4
Niet gevonden TBV-zieke tulpen	17%	2	75%	12
totaal	100%	12	100%	16

Doordat de ziekzoekkar maar één rij tulpen heeft opgenomen, is het aantal geanalyseerde tulpen ongeveer de helft van het aantal dat door de ziekzoekers (twee rijen) zijn beoordeeld. De conclusie is dat de ziekzoekers beter gepresteerd hebben dan de ziekzoekkar. Op 22 april vindt de ziekzoeker 69% van de TBV-zieke tulpen in cv. Barcelona tegen 27% door de ziekzoekkar; in Prinses Irene was dit 83% tegen 25%. Opvallend is, dat het aantal juist gescoorde gezonde planten erg hoog is; hier scoort de ziekzoekkar weer iets hoger.



## 4 Discussie

De uitvoering van het experiment in 2010 was een vervolg op de proef van 2009. Verbeteringen in de camera's en cameraopstelling, belichting en hardware (wielen, encoder) alsmede de opzet van de veldproef (andere nummering tulpen, andere opplant, inzet van geroutineerde ziekezoekers) moesten leiden tot betere resultaten. Dit is niet gelukt; de resultaten zijn niet beter dan in 2009. De subtiele virussympptomen bleken niet goed waarneembaar. Vooral in de beginperiode van het ziekezoeken kon het visionsysteem het virus niet waarnemen in de kleine planten. In hoofdstuk 4.4 wordt dit verder belicht.

De uitvoering van de proef 2010 is in goed overleg met de begeleidingscommissie uitgevoerd. De samenwerking was goed.

### 4.1 Ervaringen van de veldproef 2010

De aanleg van het proefveld kan verbeterd worden door de opplant van de tulpen beter af te stemmen op de cameraposities (opplant precies in het midden van het bed). Verder is versteviging van de paden tussen de bedden nodig om te voorkomen dat de ziekezoekkar valse sporen maakt wat de uitlijning van de opnames met de camera's bemoeilijkt. Tevens moet een optimale kwaliteit van de tulpenbollen beter worden gewaarborgd (minder uitschot, zo min mogelijk andere virussen in de partijen).

De ziekezoekkar bleek te zwaar en te log, ondanks de achterste zwenkwielen. De kar was nauwelijks door één persoon te bedienen. Het is noodzakelijk dat de kar in hoogte verstelbaar gemaakt wordt; de tulpen werden namelijk soms beschadigd door de kar. De kar werd intensief gebruikt en was robuust (afgezien van een enkele maal wat problemen met de encoder). Toch verdient het aanbeveling regelmatig onderhoud aan de ziekezoekkar in te plannen gedurende de opnameperiode in het veld om problemen te voorkomen.

De benodigde accu's zijn erg zwaar en de capaciteit soms niet toereikend om de camera's, flitsers en de computer gedurende de dagelijkse meetperiode te voorzien van elektriciteit. Het opstarten van de computer zou sterk vereenvoudigd moeten worden, het computerscherm groter en veel minder gevoelig voor lichtreflectie; de images waren soms door de lichtreflectie op het scherm niet goed te zien waardoor de kwaliteit soms onvoldoende gecontroleerd kon worden.

Uit bovenstaande moet niet een verkeerde conclusie getrokken worden. De opnames verliepen in het algemeen goed en veel beter dan in 2009. Tijdens de opnames werden de beelden als goed beoordeeld.

### 4.2 Boltoets versus bladtoets

De veldproef van 2010 is uitgevoerd aan 4 cultivars, waarvan de cultivars Monte Carlo en Yokohama een (veel) te hoog percentage TBV bevatten. Dit hoge percentage (meer dan 90%) bleek niet alleen uit de ELISA-data in de bladtoets, maar ook uit de analyses van de ziekezoekers. Dit was van te voren niet voorzien. De bestelde bollen gaven in de boltoets van de BKD ongeveer 60% TBV. Dit hoge percentage was wenselijk om zo minder tulpen te hoeven meten; er zijn ongeveer 100 zieke tulpen nodig voor een betrouwbare analyse van de beelden. Het is onduidelijk hoe dit verschil tussen boltoets en bladtoets nu komt. Deze bevinding (verschil bol- en bladtoets) is ook in 2009 gedaan (rapport 13638, van Doorn e.a. 2010).

De cultivar Barcelona toonde overeenkomstige ELISA-waarden in de boltoets vooraf (zomer 2009), in de boltoets voor het planten (najaar 2009) en in de bladtoets achteraf (juni 2010). Het lijkt dan ook niet te wijten aan virusverspreiding in het veld, daar er regelmatig gewasbeschermingsmiddelen tegen luizen zijn toegepast (meestal tweewekelijks). Om dit verder uit te zoeken, verdient het aanbeveling een experiment uit te voeren waarbij boltoetsen op verschillende momenten na het rooien, en de bladtoets van tulpen met TBV (maar wellicht ook betreffende andere virussoorten) worden uitgevoerd en resultaten met elkaar worden vergeleken. Vanwege het erg hoge percentage TBV zijn alleen de data geanalyseerd van cultivars Prinses Irene en Barcelona. Van cv. Barcelona waren de ELISA-data van zowel bol- als bladtoets beschikbaar. De gegevens van bol- en bladtoets (zie bijlage 1) gaven aan dat volgens de boltoets meer planten TBV geïnfecteerd waren dan dat later de bladtoets aan dezelfde planten aantoonde. In de 471 opgekomen tulpen gaf de boltoets 109 zieke planten aan tegen 64 in de bladtoets. Nagegaan is of zwaar viruszieke bollen niet zijn opgekomen. Dit was mogelijk, daar bij cv. Barcelona voorafgaande aan het planten een boltoets uitgevoerd is; van de 29 bollen die niet opgekomen zijn waren er volgens de boltoets maar 6 met TBV besmet. Er lijkt dus geen correlatie tussen niet opgekomen tulpenbollen enerzijds en de virusbesmetting (met TBV) anderzijds. Volgens de BKD is de bladtoets op TBV minder betrouwbaar dan de boltoets. Het is bv. onduidelijk waar nu het verschil zit in de uitslagen van de ELISA op TBV in bol- en bladtoets op cv. Monte Carlo (Tabel 1). Meer informatie over de correlatie tussen de boltoets en bladtoets op TBV zou verkregen kunnen worden door het toetsen van meer partijen tulpen met beide toetsen: de boltoets vòòr het planten enerzijds, en de bladtoets later in het seizoen na de bloei. Er zijn aan bladmonsters van cv. Barcelona in een aantal gevallen ook ELISA's aan TVX uitgevoerd. Gezien het feit dat de aanwezigheid van andere tulpenvirussen zoals TVX niet te voorkomen is, is het ook standaard toetsen van tulpen op TVX aan te bevelen. Hiermee zou men visuele waarnemingen aan TVX-symptomen, die als positief voor TBV door de ziekzoekers aangemerkt zijn, kunnen toetsen. Dit kan mogelijk leiden tot een relatieve verbetering van de goedscore door de ziekzoekkar.

### 4.3 Ziekzoekers

De ziekzoekers waren niet allemaal even bekend met de virussymptomen van de gebruikte cultivars. De correctheid van de beoordeling van de tulpen op virussymptomen verschilde dan ook per ziekzoeker. De analyses in dit rapport zijn vooral afgestemd op de drie ervaren ziekzoekers (van der Salm, Schoorl en BKD). Dat betekent wel dat de ziekzoekkar vergeleken wordt met de betere ziekzoekers van het land. De projectdoelstelling ligt daarmee dus op een zeer hoog niveau. De lage plantdichtheid maakte het voor de ziekzoekers moeilijk om de tulpen goed te beoordelen. Het omgevingskenmerk van gezonde versus zieke tulpen viel namelijk weg. Aan de andere kant werd aangenomen dat door de extra aandacht voor de individuele plant de beoordelingen extra goed zouden zijn. Dit verhoogde dus de kwaliteit van het ziekzoeken. Het mozaïekvirus in Barcelona bleek volgens de meeste ziekzoekers pas vanaf week 16 of 17 goed te zien. In figuur 6 is te zien dat de beoordeling door de ziekzoekers in de tijd qua juiste score op TBV varieerde van ongeveer 14% tot meer dan 70%. Het lijkt duidelijk dat factoren als moment van de dag, zon, stadium (leeftijd) van de tulp en type cultivar de kwaliteit van de beoordeling door de ziekzoekers mede bepalen. Ook werd het fenomeen van "koubont" (fysiologisch verschijnsel, vaak op schrale grond dat zich kan uiten door bv. roodverkleuring van het blad) aangegeven als mogelijke factor van vals positieve uitslagen (gezonde tulp wordt dan als ziek aangemerkt). Ook de invloed van natte planten bij de beoordeling op virus kan een rol gespeeld hebben.

In de vergelijkingen is vaak uitgegaan van de beoordeling door “de” ziekezoekers. Dit wekt de schijn dat men het altijd met elkaar eens was, maar dat was niet zo. De ziekezoekers scoorden niet allemaal even goed. Verder hebben we hier te maken gehad met ervaren en zeer goede ziekezoekers. Dit onderzoek is dus niet te vergelijken met een praktijksituatie. In de praktijk scoort de gemiddelde ziekezoeker waarschijnlijk gemiddeld slechter dan bv. de BKD. Wanneer dit in overweging wordt genomen, valt het resultaat van de metingen met de ziekezoekkar minder slecht uit.

## 4.4 Beeldanalyse

De beeldanalyses zijn uitgevoerd aan cultivars Barcelona en Prinses Irene op twee of drie verschillende tijdstippen. De beste analyse van Barcelona was ongeveer een score van 27% (27% van de zieke tulpen werd op grond van de uitslag van de ELISA-bladtoets gevonden). In Prinses Irene bedroeg dit 25%. Dit is wederom beduidend lager dan de score van de geoefende ziekezoekers zoals BKD, Schoorl en Van der Salm, hoewel hun scores ook fluctueerden en niet constant hoog waren. Hoe kan het, dat ziekezoekers de symptomen wel zien en de ziekezoekkar/beeldanalyse-programma niet?

Opvallend was dat met de ziekezoekkar het aantal gevonden zieke planten laag was, maar ook het aantal ten onrechte afgekeurde gezonde planten. De vraag was of er meer zieke planten gevonden konden worden, als er meer planten afgekeurd zouden worden. Dit is mogelijk door het verschuiven van de drempelwaarde in de analysefase. Er zou een nieuwe analyse moeten plaatsvinden bij hogere drempelwaardes om na te gaan of het percentage gevonden zieke planten daarmee verhoogd kan worden.

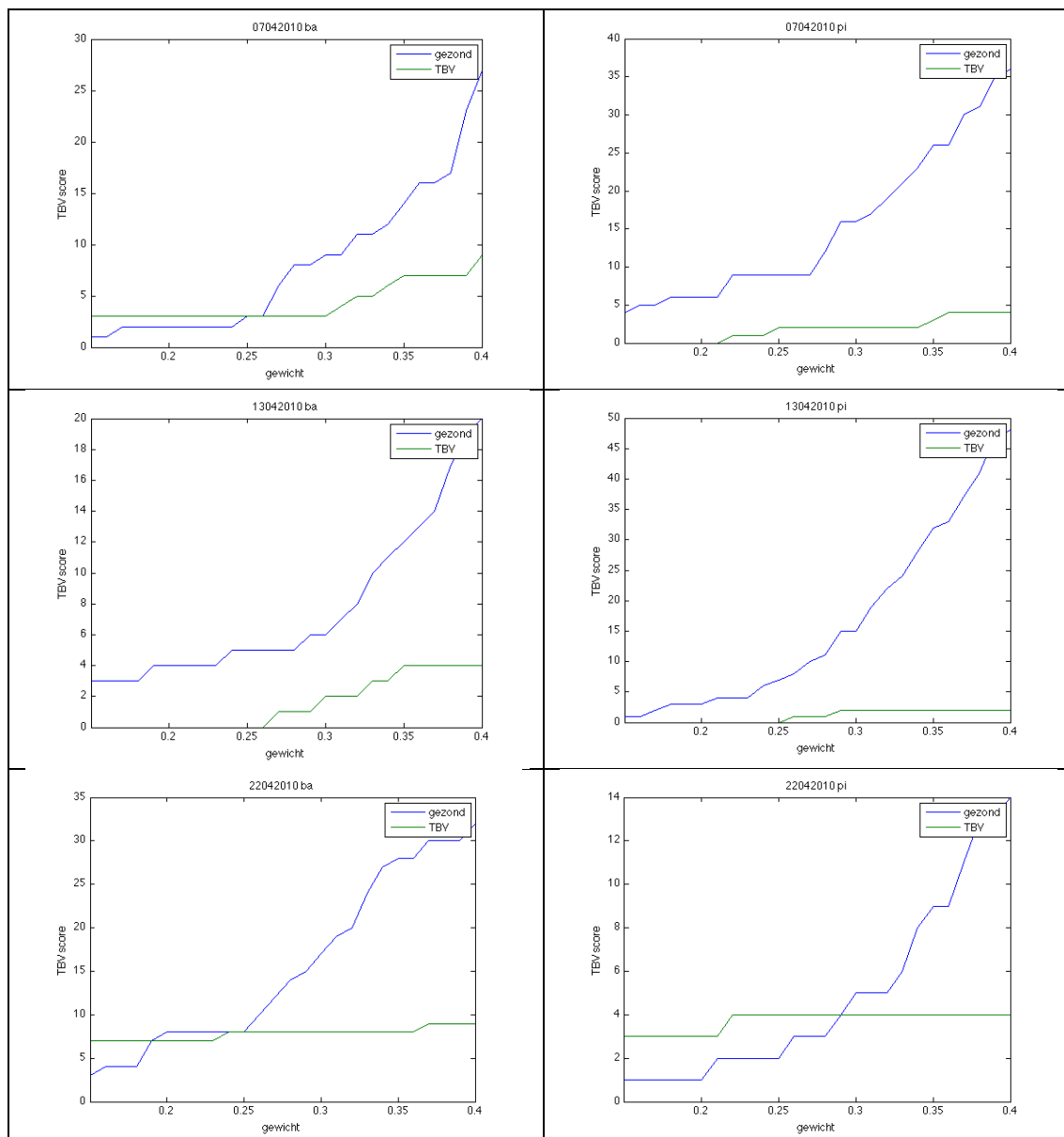
Een andere vraag was, of deskundige ziekezoekers (bv. de BKD) de viruszieke tulpen zouden kunnen opsporen in de beelden met zieke en gezonde planten, opgenomen door de camera's van de ziekezoekkar. Dus: zijn de symptomen van TBV in de beelden aanwezig, en zo ja, kunnen mogelijk andere kenmerken worden gevonden waardoor de analyse op virussymptomen verbeterd zou worden?

De eerste optie was het verschuiven van de drempelwaarde in de analysefase. Daardoor worden dan meer zieke planten gevonden. Wellicht leidt dit voor het ziek verklaren van gezonde planten, maar zorgt dan ook voor het ziek verklaren van meer zieke planten in de beoordeling.

De analyses zijn uitgevoerd voor de drie verschillende data en de twee cultivars (Barcelona, ba en Prinses Irene, pi) voor verschillende gewichten voor de klassen gezond/ziek. De resultaten hiervan zijn hieronder per cv en datum in een grafiek weergegeven (figuur 13). In de grafiek staat het aantal ziek gescoorde planten als functie van het gewicht. De groene lijn is het aantal terecht ziek gescoorde planten. De blauwe geeft het aantal onterecht ziek gescoorde planten. Op de plaats waar de blauwe en groene lijn kruisen is het aantal terecht afgekeurde planten gelijk aan het aantal onterecht afgekeurde planten, conform wat in de vergadering van 11 oktober 2010 acceptabel werd genoemd door de begeleidingsgroep. Voor cv. Barcelona op 7 april 2010 is dit bv. 3.

Voor de volledigheid is de ELISA- score er bij gegeven:

1. Barcelona 7 april: 33 planten met TBV, 213 gezond.
2. Prinses Irene 7 april: 18 planten met TBV, 225 gezond.
3. Barcelona 13 april: 20 planten met TBV, 208 gezond.
4. Prinses Irene 13 april: 15 planten met TBV, 226 gezond.
5. Barcelona 22 april: 26 planten met TBV, 202 gezond.
6. Prinses Irene 22 april: 16 planten met TBV, 215 gezond.



Figuur 13. Analyses aan cv. Barcelona (linker kolom) en cv. Prinses Irene (rechterkolom) op 7, 13 en 22 april 2010 met het aantal gescoorde planten als functie van het gewicht: de drempelwaarde om te bepalen welk percentage van de tulpen gezond of ziek (TBV-besmet) is.

In deze grafieken is te zien dat de grafiek van het aantal terecht ziek gescoorde planten ten opzichte van het gewicht heel erg vlak loopt. Dit betekent, dat wanneer men een grotere fout toelaat bij het onterecht ziek scoren van gezonde planten dit nauwelijks verbetering oplevert voor het aantal gevonden zieke planten. Dit is dus geen goede optie om zo de score te verhogen van het aantal te vinden viruszieke planten.

De andere vraag was: zitten de virusbeelden nu wel in de opnamen? De eerste analyses vonden plaats via het vertonen van 51 beelden van TBV-zieke en gezonde tulpen aan de BKD en later aan de begeleidingscommissie op 11 oktober 2010. Deze beoordelingen gaven slechte scores. Dit was echter ook te wijten aan de kwaliteit van de opgestuurde en vertoonde beelden. Daarom is een nieuwe afspraak gemaakt met onderzoekers van de BKD, PRI en PPO.

De drie aanwezige ziekzoekexperts (PPO, BKD) vonden bij gedetailleerde bestudering van de beelden naar schatting 70-80% van de zieke planten, waarbij wel relatief vaak een gezonde plant als ziek werd gescoord. De virussymptomen waren dus vaak toch wel zichtbaar in de getoonde beelden, maar niet makkelijk op te merken. De beelden van de tulpen, met de camera's onder een hoek van 45° opgenomen, bleken over het algemeen informatiever dan de beelden van opnames onder een hoek van 90°.

De beoordeling van de planten vond plaats, naast vergelijking met omringende planten (stand), op paarskleuring langs de bladranden en bladrand onderkant, strepen op bloemstengel en blad, en vaak ook op de bloemknop (het schuin weglopen van strepen).

In de gemaakte beelden viel ook op dat de planten vaak beschadigd waren. Dit kan mogelijk in een enkel geval leiden tot een probleem in de beeldanalyse. Daarnaast waren de tulpen ook soms aangetast door TVX; dit geeft aan dat een ELISA op TVX naast TBV noodzakelijk is.

Er werd geconstateerd dat de virussymptomen slechts met veel moeite met het oog herkenbaar zijn op de foto's. De details zijn veelal zo subtiel en vaag dat het niet te verwachten is dat op deze beelden een aanzienlijke verbetering van de score mogelijk is met aanpassing van de beeldanalyse.

Detectie van subtiele kenmerken zoals stand van het tweede blad en schuin weglappende verkleuring van de knop zijn met beeldanalyse niet betrouwbaar te implementeren. Het streep patroon op (de onderkant van) het blad (kleurbreking) zal mogelijk het meest geschikt zijn. De huidige opnames hadden hiervoor echter een te lage resolutie en door de gebruikte flitslampen was het kleurcontrast gering.

Om tot een betere score te komen zal de resolutie en kwaliteit van de beelden nog verder verbeterd moeten worden. Bij analyse van de beelden viel de korreligheid op; dit moet beter kunnen. Momenteel is de resolutie per tulp ongeveer 200x200 pixels. Verder kan de belichting worden verbeterd. In de huidige opstelling is de nadruk gelegd op het uitbannen van de invloed van het omgevingslicht en dit is goed gelukt. Maar door de frontale flitsbelichting zijn er andere problemen: er is een sterke invloed van de planthoogte (afstand plant-camera), het contrast tussen roodkleuring en groen is niet optimaal en er is last van spiegeling. Gedacht wordt aan de inzet van meer en diffuus/indirect licht (niet alleen flits, maar ook bv. daglichtlampen zoals TL-buizen) of speciale LED-verlichting. Ook wordt voorgesteld meer camera's onder een hoek te laten kijken. De 45° foto's zijn voor het herkennen van virussymptomen veel informatiever dan de 90° foto's. De 90° foto is daarentegen belangrijk voor positionering van planten onder de kar (i.v.m. verwijderen).

Door gebruik van twee 45° beelden (elk vanuit een andere positie) zullen enerzijds twee informatieve beelden kunnen worden verkregen en anderzijds 2D-positionering mogelijk maken. Dit laatste kan voor verwijdering interessant zijn.

Samenvattend was de conclusie:

- 1) Heranalyse van de huidige beelden met een hogere foutmarge om meer zieke planten terecht als ziek te beoordelen heeft niet het gewenste resultaat opgeleverd. Er worden dan teveel gezonde planten afgekeurd.
- 2) Heranalyse van de huidige beelden met andere kenmerken is niet zinvol, omdat de beelden hiervoor te weinig contrastrijk zijn en een te lage resolutie hebben (planten hebben nu een resolutie van slechts 200x200 pixels).
- 3) Op korte termijn zal het niet haalbaar zijn om subtiele kenmerken als stand van tweede blad en schuin weglopende verkleuring van de bloemknop te meten.
- 4) Het meeste perspectief zal het meten van het streep patroon (kleur breking) bieden op de onderkant van het blad. Hiervoor zal de opnametechniek (resolutie en contrast) verbeterd moeten worden, zodat de symptomen beter zichtbaar worden. Pas dan kan de beeldanalyse slagen.

## 4.5 Vervolg 2011

In samenspraak met de begeleidingscommissie is voorgesteld in 2011 een kleinschalige proef uit te voeren met cv. Yokohama met TBV en een cv. met TVX (Lacourtine) die in het vroege voorjaar in de kas kunnen worden afgebroeid. Deze tulpen zullen, na beoordeling door een ervaren ziekzoeker, in het laboratorium met een verbeterde cameraopstelling, meer belichting en metingen ook aan de onderkant van het blad worden gemeten met de cameraopstelling. De uitdaging is met verbeterde opnametechniek (resolutie en techniek) de symptomen aan de onderkant zichtbaar te maken.

Bij positief resultaat (het kunnen vastleggen van de subtiele virusbeelden zoals eerder beschreven (hoofdstuk 4.4)) kunnen dan metingen worden uitgevoerd met de ziekzoekkar in een kleinschalig veldexperiment. Hiertoe zijn eind 2010 cv. Yokohama met TBV en cv. Lacourtine met TVX opgeplant op vergelijkbare wijze als beschreven in dit rapport.



## 5 Literatuur

Polder G, , G. W. A. M. van der Heijden, J. van Doorn, J. G. P. W. Clevers, R. van der Schoor, and A. H. M. C. Baltissen. 2010. Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors. *Precision Agric* 11: 397-412 (*zie abstract hieronder*).

Romanow L.R, J.P. van Eijk, W. Eikelbom, A.R. van Schadewijk, and D. Peters. 1991. Determining levels of resistance to Tulip Breaking Virus (TBV) in Tulip (*Tulipa L.*) cultivars. *Euphytica* 51: 273-280.

Van Doorn J., T. Baltissen, R. Schreuder, G. Polder, R. van der Schoor en G. van der Heijden 2008. Haalbaarheidstudie automatisch ziekzoeken in tulp. PPO eindrapportage (PT12997).

Van Doorn, J., G. Polder, G. van der Heijden en T. Baltissen (2010). Praktijkproef ziekzoeken, geautomatiseerde (machinale) detectie van tulpenvirus in het open veld 2009. PT rapport 13638.

Ziekten en afwijkingen bij bolgewassen deel 1: Liliaceae. 2000. Uitgave Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse, derde druk.

Precision Agric (2010) 11:397–412  
DOI 10.1007/s11119-010-9169-2

## Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors

G. Polder · G. W. A. M. van der Heijden · J. van Doorn ·  
J. G. P. W. Clevers · R. van der Schoor · A. H. M. C. Baltissen

Published online: 23 April 2010  
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** The tulip breaking virus (TBV) causes severe economic losses for countries that export tulips such as the Netherlands. Infected plants have to be removed from the field as soon as possible. There is an urgent need for a rapid and objective method of screening. In this study, four proximal optical sensing techniques for the detection of TBV in tulip plants were evaluated and compared with a visual assessment by crop experts as well as with an ELISA (enzyme immunoassay) analysis of the same plants. The optical sensor techniques used were an RGB color camera, a spectrophotometer measuring from 350 to 2500 nm, a spectral imaging camera covering a spectral range from 400 to 900 nm and a chlorophyll fluorescence imaging system that measures the photosynthetic activity. Linear discriminant classification was used to compare the results of these optical techniques and the visual assessment with the ELISA score. The spectral imaging system was the best optical technique and its error was only slightly larger than the visual assessment error. The experimental results appear to be promising, and they have led to further research to develop an autonomous robot for the detection and removal of diseased tulip plants in the open field. The application of this robot system will reduce the amount of insecticides and the considerable pressure on labor for selecting diseased plants by the crop expert.

**Keywords** Plant virus · Image processing · Hyperspectral imaging · Spectroscopy · Machine vision

G. Polder (✉) · G. W. A. M. van der Heijden  
Biometris, Wageningen University, PO Box 100, 6700 AC Wageningen, The Netherlands  
e-mail: gerrit.polder@wur.nl

J. van Doorn · A. H. M. C. Baltissen  
Applied Plant Research, Wageningen University, PO Box 85, 2160 AB Lisse, The Netherlands

J. G. P. W. Clevers  
Centre for Geo-Information, Wageningen University, PO Box 47, 6700 AA Wageningen,  
The Netherlands

R. van der Schoor  
Plant Research International, Wageningen University, PO Box 16, 6700 AA Wageningen,  
The Netherlands

 Springer

## 6 Communicatie

### 6.1 Begeleidingscommissievergaderingen

- Najaar bijeenkomst 11 oktober 2010, Lisse
- Startbijeenkomst 23 maart 2010, Lisse
- Overleg ziekzoeken in poot aardappelen 16 febr. 2010, Lelystad
- Zevenmaal een e-mailbericht naar alle betrokkenen over voortgang van de zieke robot en metingen gedurende de meetperiodes (maart-mei 2010)

### 6.2 Schriftelijke communicatie

Type output	Onderwerp	Inhoud, titel
Artikelen	Diverse berichten in media: Agrarisch Dagblad	Winnen WLIF prijs en de cheque van 12.500 euro (bijlage 7.2)
Artikel	Boerderij 95 (2010):17	Machine zoekt zieke planten: ziekzoeken in poot aardappelen
Artikel	Gewasbescherming 2010;41(1):16-17.	De ontwikkeling van een zieke robot om mozaïekvirus in tulp op te sporen.
Artikel	Agr. Dagblad, 9 april 2010, p.9	PPO test nieuw systeem voor ziekzoeken in tulp (bijlage 7.3)
Foto met onderschrift	Meridiani 23e jaargang nr. 186, editie maart 2010	
Artikel	BloembollenVisie 189, 2010:p.20-21	Ziekzoeken in tulp: lastig voor mens en robot
Gepland artikel	Mei 2011, in BloembollenVisie	Ziekzoeken blijft moeilijk voor zowel zieke robot als machine
Wetenschappelijke publicatie	Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors	G. Polder, G.W.A.M. van der Heijden, J. van Doorn, J.G.P.W.Clevers, R. van der Schoor and A.H.M.C.Baltissen. 2010. Precision Agric. 11: 397-412
Lezing	Themadag KNPV precisielandbouw en gewasbescherming, 16 december 2009	Het project ziekzoeken
Presentaties/mailings	Begeleidingsgroep project ziekzoeken	Voortgang project en resultaten machinale detectie
websites	Ziekzoeken; precisielandbouw	<a href="http://www.precisielandbouw.eu">www.precisielandbouw.eu</a> ; <a href="http://www.knpv.org/nl/menu/Precisielandbouw">http://www.knpv.org/nl/menu/Precisielandbouw</a>



# 7 Bijlagen

## 7.1 Bijlage 1. Tabel met metingen aan cv. Barcelona

Barcelona																			
NO	NO	TSV	TVX	NO	TSV	TVX	NO	TSV	TVX	NO	TSV	TVX	NO	TSV	TVX	NO	TSV	TVX	
1	1	0,00	0,00	136	1	0,00	137	1	0,00	271	1	0,00	406	1	0,00	407	1	0,00	
2	1	0,00	0,00	138	1	0,00	139	1	0,00	272	1	0,00	408	1	0,00	409	1	0,00	
3	1	0,00	0,00	140	1	0,00	141	1	0,00	273	1	0,00	410	1	0,00	411	1	0,00	
4	1	0,00	0,00	142	1	0,00	143	1	0,00	274	1	0,00	412	1	0,00	413	1	0,00	
5	1	0,00	0,00	144	1	0,00	145	1	0,00	275	1	0,00	414	1	0,00	415	1	0,00	
6	1	0,00	0,00	146	1	0,00	147	1	0,00	276	1	0,00	416	1	0,00	417	1	0,00	
7	1	0,00	0,00	148	1	0,00	149	1	0,00	277	1	0,00	418	1	0,00	419	1	0,00	
8	1	0,00	0,00	150	1	0,00	151	1	0,00	278	1	0,00	420	1	0,00	421	1	0,00	
9	1	0,00	0,00	152	1	0,00	153	1	0,00	279	1	0,00	422	1	0,00	423	1	0,00	
10	1	0,00	0,00	154	1	0,00	155	1	0,00	280	1	0,00	424	1	0,00	425	1	0,00	
11	1	0,00	0,00	156	1	0,00	157	1	0,00	281	1	0,00	426	1	0,00	427	1	0,00	
12	1	0,00	0,00	158	1	0,00	159	1	0,00	282	1	0,00	428	1	0,00	429	1	0,00	
13	1	0,00	0,00	160	1	0,00	161	1	0,00	283	1	0,00	430	1	0,00	431	1	0,00	
14	1	0,00	0,00	162	1	0,00	163	1	0,00	284	1	0,00	432	1	0,00	433	1	0,00	
15	1	0,00	0,00	164	1	0,00	165	1	0,00	285	1	0,00	434	1	0,00	435	1	0,00	
16	1	0,00	0,00	166	1	0,00	167	1	0,00	286	1	0,00	436	1	0,00	437	1	0,00	
17	1	0,00	0,00	168	1	0,00	169	1	0,00	287	1	0,00	438	1	0,00	439	1	0,00	
18	1	0,00	0,00	170	1	0,00	171	1	0,00	288	1	0,00	440	1	0,00	441	1	0,00	
19	1	0,00	0,00	172	1	0,00	173	1	0,00	289	1	0,00	442	1	0,00	443	1	0,00	
20	1	0,00	0,00	174	1	0,00	175	1	0,00	290	1	0,00	444	1	0,00	445	1	0,00	
21	1	0,00	0,00	176	1	0,00	177	1	0,00	291	1	0,00	446	1	0,00	447	1	0,00	
22	1	0,00	0,00	178	1	0,00	179	1	0,00	292	1	0,00	448	1	0,00	449	1	0,00	
23	1	0,00	0,00	180	1	0,00	181	1	0,00	293	1	0,00	450	1	0,00	451	1	0,00	
24	1	0,00	0,00	182	1	0,00	183	1	0,00	294	1	0,00	452	1	0,00	453	1	0,00	
25	1	0,00	0,00	184	1	0,00	185	1	0,00	295	1	0,00	454	1	0,00	455	1	0,00	
26	1	0,00	0,00	186	1	0,00	187	1	0,00	296	1	0,00	456	1	0,00	457	1	0,00	
27	1	0,00	0,00	188	1	0,00	189	1	0,00	297	1	0,00	458	1	0,00	459	1	0,00	
28	1	0,00	0,00	190	1	0,00	191	1	0,00	298	1	0,00	460	1	0,00	461	1	0,00	
29	1	0,00	0,00	192	1	0,00	193	1	0,00	299	1	0,00	462	1	0,00	463	1	0,00	
30	1	0,00	0,00	194	1	0,00	195	1	0,00	300	1	0,00	464	1	0,00	465	1	0,00	
31	1	0,00	0,00	196	1	0,00	197	1	0,00	301	1	0,00	466	1	0,00	467	1	0,00	
32	1	0,00	0,00	198	1	0,00	199	1	0,00	302	1	0,00	468	1	0,00	469	1	0,00	
33	1	0,00	0,00	200	1	0,00	201	1	0,00	303	1	0,00	470	1	0,00	471	1	0,00	
34	1	0,00	0,00	202	1	0,00	203	1	0,00	304	1	0,00	472	1	0,00	473	1	0,00	
35	1	0,00	0,00	204	1	0,00	205	1	0,00	305	1	0,00	474	1	0,00	475	1	0,00	
36	1	0,00	0,00	206	1	0,00	207	1	0,00	306	1	0,00	476	1	0,00	477	1	0,00	
37	1	0,00	0,00	208	1	0,00	209	1	0,00	307	1	0,00	478	1	0,00	479	1	0,00	
38	1	0,00	0,00	210	1	0,00	211	1	0,00	308	1	0,00	480	1	0,00	481	1	0,00	
39	1	0,00	0,00	212	1	0,00	213	1	0,00	309	1	0,00	482	1	0,00	483	1	0,00	
40	1	0,00	0,00	214	1	0,00	215	1	0,00	310	1	0,00	484	1	0,00	485	1	0,00	
41	1	0,00	0,00	216	1	0,00	217	1	0,00	311	1	0,00	486	1	0,00	487	1	0,00	
42	1	0,00	0,00	218	1	0,00	219	1	0,00	312	1	0,00	488	1	0,00	489	1	0,00	
43	1	0,00	0,00	220	1	0,00	221	1	0,00	313	1	0,00	490	1	0,00	491	1	0,00	
44	1	0,00	0,00	222	1	0,00	223	1	0,00	314	1	0,00	492	1	0,00	493	1	0,00	
45	1	0,00	0,00	224	1	0,00	225	1	0,00	315	1	0,00	494	1	0,00	495	1	0,00	
46	1	0,00	0,00	226	1	0,00	227	1	0,00	316	1	0,00	496	1	0,00	497	1	0,00	
47	1	0,00	0,00	228	1	0,00	229	1	0,00	317	1	0,00	498	1	0,00	499	1	0,00	
48	1	0,00	0,00	230	1	0,00	231	1	0,00	318	1	0,00	500	1	0,00				
49	1	0,00	0,00	232	1	0,00	233	1	0,00	319	1	0,00							
50	1	0,00	0,00	234	1	0,00	235	1	0,00	320	1	0,00							
51	1	0,00	0,00	236	1	0,00	237	1	0,00	321	1	0,00							
52	1	0,00	0,00	238	1	0,00	239	1	0,00	322	1	0,00							
53	1	0,00	0,00	240	1	0,00	241	1	0,00	323	1	0,00							
54	1	0,00	0,00	242	1	0,00	243	1	0,00	324	1	0,00							
55	1	0,00	0,00	244	1	0,00	245	1	0,00	325	1	0,00							
56	1	0,00	0,00	246	1	0,00	247	1	0,00	326	1	0,00							
57	1	0,00	0,00	248	1	0,00	249	1	0,00	327	1	0,00							
58	1	0,00	0,00	250	1	0,00	251	1	0,00	328	1	0,00							
59	1	0,00	0,00	252	1	0,00	253	1	0,00	329	1	0,00							
60	1	0,00	0,00	254	1	0,00	255	1	0,00	330	1	0,00							
61	1	0,00	0,00	256	1	0,00	257	1	0,00	331	1	0,00							
62	1	0,00	0,00	258	1	0,00	259	1	0,00	332	1	0,00							
63	1	0,00	0,00	260	1	0,00	261	1	0,00	333	1	0,00							
64	1	0,00	0,00	262	1	0,00	263	1	0,00	334	1	0,00							
65	1	0,00	0,00	264	1	0,00	265	1	0,00	335	1	0,00							
66	1	0,00	0,00	266	1	0,00	267	1	0,00	336	1	0,00							
67	1	0,00	0,00	268	1	0,00	269	1	0,00	337	1	0,00							
68	1	0,00	0,00	270	1	0,00	271	1	0,00	338	1	0,00							
69	1	0,00	0,00	272	1	0,00	273	1	0,00	339	1	0,00							
70	1	0,00	0,00	274	1	0,00	275	1	0,00	340	1	0,00							
71	1	0,00	0,00	276	1	0,00	277	1	0,00	341	1	0,00							
72	1	0,00	0,00	278	1	0,00	279	1	0,00	342	1	0,00							
73	1	0,00	0,00	280	1	0,00	281	1	0,00	343	1	0,00							
74	1	0,00	0,00	282	1	0,00	283	1	0,00	344	1	0,00							
75	1	0,00	0,00	284	1	0,00	285	1	0,00	345	1	0,00							
76	1	0,00	0,00	286	1	0,00	287	1	0,00	346	1	0,00							
77	1	0,00	0,00	288	1	0,00	289	1	0,00	347	1	0,00							
78	1	0,00	0,00	290	1	0,00	291	1	0,00	348	1	0,00							
79	1	0,00	0,00	292	1	0,00	293	1	0,00	349	1	0,00							
80	1	0,00	0,00	294	1	0,00	295	1	0,00	350	1	0,00							
81	1	0,00	0,00	296	1	0,00	297	1	0,00	351	1	0,00							
82	1	0,00	0,00	298	1	0,00	299	1	0,00	352	1	0,00							
83	1	0,00	0,00	300	1	0,00	301	1	0,00	353	1	0,00							
84	1	0,00	0,00	302	1	0,00	303	1	0,00	354	1	0,00							
85	1	0,00	0,00	304	1	0,00	305	1	0,00	355	1								

Bijlage 7.1. Ziekzoek gegevens en ELISA-waarden van 500 op nummer opgeplante Barcelona in 5 kolommen weergegeven. Rood = ziek, grijs = niet opgekomen, oker = zwak in ELISA maar positief (dus ziek). De linker waarde is de boltoets, de rechter de bladtoets: 0 = geen plant aanwezig (niet opgekomen), 1 = gezond wat betreft TBV of TVX, 2 = ziek (titer in ELISA , boven de 0.15). Oranje: ELISA-waarde = zwak tussen 0.11-0.14. In totaal waren er voor Barcelona 471 planten opgekomen, 406 gezonde en 64 viruszieke planten.

De tulpen die door meer dan 3 ziekezoekers als ziek zijn bestempeld, maar gezond waren in ELISA (dus: TBV-negatief) zijn apart in een bladtoets (ELISA) op TVX getoetst.

## 7.2 Bijlage 2. Innovatieprijs



### Bollentelers winnen innovatieprijs

21 januari 2010

De broers Jan en Piet Apeldoorn uit Emond hebben met hun innovatie de Wim Luijkx Innovatiebokaal (WLIIF) gewonnen. Via een stemming op de Agrifirm Jongerendaag, welke gisteren werd gehouden, kwam hun mechanische ziekzoekmachine als meest innovatieve ontwikkeling naar voren. Jan en Piet Apeldoorn zien de ontvangen bokaal als erkenning voor de inspanning die zij de afgelopen jaren leverden om hun innovatie verder te professionaliseren. Zij ontwikkelden een machine die in tulpen machinaal de door virus besmette bollen kan detecteren en verwijderen.

De ondernemers passen cameratechnieken toe die middels kleurverschil tussen de bollen onderscheid maakt. De ontwikkeling is zover gevorderd dat het mechanisch ziekzoeken ondertussen een kleinere foutmarge kent dan het selecteren door personen. Het apparaat is ontwikkeld voor de bloembollenteelt, maar kan ook worden doorontwikkeld voor andere gewassen, zoals de pootaardappelteelt. In 2009 ontvingen vier innovaties financiële ondersteuning vanuit het Wim Luijkx Innovatiefonds. Van de ruim 400 jonge ondernemers op de Agrifirm Jongerendaag 2010 koos 42 procent de ziekzoekmachine als meest innovatieve. Vooral de brede toepasbaarheid gaf de doorslag. Wim Luijkx, voorheen directeur Akker- en Tuinbouw bij Agrifirm, reikte de WLIIF-bokaal uit aan Piet Apeldoorn (zie foto).

## 7.3 Bijlage 3. Artikel in Agrarisch Dagblad 2010

AKKERBOUW

AGRARISCH DAGBLAD VRIJDAG 9 APRIL PAGINA 9

## Areaal pootgoed vrijwel gelijk

Doetinchem – Het areaal poot-aardappelen blijft dit jaar ongeveer gelijk aan vorig jaar of zal iets groeien. Binnen de vrije rassen vindt een verschuiving plaats.

Vorig jaar is 36.490 hectare poot-aardappelen aangeveld voor de keuring door de NAK. Dat was iets meer dan in 2008, terwijl de jaren daarvoor het areaal was gekrompen.

Commercieel directeur Jan van Hoogen van coöperatie Agrico verwacht dat het areaal pootgoed dit jaar iets zal groeien. "Er wordt vooral meer Spunta geteeld. Van

de vrije rassen bracht Spunta van de oogst van vorig jaar weer het meeste op. Er is ook veel vraag geweest naar Spunta. Ondanks de grote oogst zijn alle Spunta's verkocht. De groei van Spunta gaat ten koste van de andere vrije rassen zoals Bintje en Desiree. Ook in Frankrijk groeit het areaal Spunta."

Van Hoogen verwacht dat het areaal monopollerrassen dit jaar ook iets groeit. "Want het areaal consumptieaardappelen groeit iets in Noordwest-Europa. Akkerbouwers hebben weinig alternatieven. Vooral in België groeit het



Het areaal van het vrije aardappelras Spunta groeit. Foto RB

areaal. Het is nog te vroeg om aan te geven wat de invloed zal zijn op de prijsvorming. Ook het late

voorjaar heeft geen invloed te hebben. De natuur kan zich erg goed herstellen."

Ook directeur Peter Ton van handelshuis Stet Holland verwacht een groot bij de Spunta's. "Dat gaat ten koste van vrije rassen als Nicola en Desiree. De opbrengstrijzen van deze rassen blijven achter bij die van Spunta."

Ton verwacht geen groei van het totale areaal pootaardappelen. "De monopollerrassen blijven gelijk en bij de vrije rassen vindt alleen een verschuiving plaats naar Spunta."

### IRS: kwart suikerbieten inmiddels gezaaid

Bergen op Zoom – Een kwart van de bieten is gezaaid. Dat meldt het bietesinstituut IRS op basis van de inventarisatie van de Agrarische Dienst van Suiker Unie. "Afgelopen week is er bij de koplopers in het Zuidwesten weinig gebeurd als gevolg van neerslag. In Oost- en Zuid-Flevoland is het percentage gezaaid afgelopen week opgelopen van 9 procent naar 49 procent. Hekken-sluiter is nog steeds de Noordoost-polder waar 9 procent van het bietenland is ingezaaid. De opkomst van de eerst gezaaide percelen verloopt goed. Deze percelen hebben 75.000 tot 95.000 planten boven staan."

### 'Louis Dreyfus biedt op suikerconcern Brazilië'

Marseille – Het Franse handelshuis Louis Dreyfus heeft geboden op de relatief grote Braziliaanse suiker- en ethanolproducent Usina Mandu. Dat schrijft het financieel dagblad van Sao Paulo, Valor Economico. Volgens de krant is Dreyfus concreter dan andere bedrijven die interesse hebben in het bedrijf. De Amerikaanse agribusinessgigant Bunge, Cosan en een tweetal kleinere Braziliaanse suikerproducenten.

### Oostenrijk: veel schade aan wintergewassen

Wenen – In Oostenrijk is ongeveer 10.000 hectare wintergraan en winterkoolzaad uitgewinterd. Volgens de verzekeringsmaatschappij Osterreichische Hagelversicherung is er vooral schade in de provincies Neder- en Oberösterreich. Ruim duizend akkerbouwers hebben schade gemeld door vorst. De verzekeringsmaatschappij raamt de schade op 1,8 miljoen euro.

### Rusland verlengt interventie van graan

Moskou – Rusland heeft de interventie van graan sinds begin deze week verlengd. Volgens de termijnmarkt Mizex in Moskou wordt er echter maar weinig gebruik van gemaakt. Begin februari sloot de overheid de interventie. Er ligt bijna 10 miljoen ton graan in de Russische interventiesilo's.

### Kazachstan produceert 34 procent meer graan

Astana – Kazachstan heeft vorig jaar 20,8 miljoen ton graan geproduceerd. Dat is 34 procent meer dan in 2008, zei Arman Emiev, de onderminister van landbouw van Kazachstan op het internationale graancongres in de hoofdstad Astana. Van de oogst kan 12,5 tot 13 miljoen ton worden geëxporteerd.



Onderzoekers testen de mogelijkheid om zieke planten in een perceel tulpen door een machine te laten opsporen.

Foto's PPO

## PPO test nieuw systeem voor ziekzoeken in tulpen

Lisse – Het Praktijkonderzoek Plant en Omgeving (PPO-WUR) test een nieuw systeem voor het opsporen van TBV-virusziekte tulpen in het veld. Het machinaal ziekzoeken wordt vergeleken met het visueel opsporen van zieke planten door de mens.

PPO heeft vorig jaar een ziekzoekmachine getest die was voorzien van technieken uit de sterrenkunde. Met behulp van filterwielen werden beelden gemaakt van ledere tulpe. Dit teststelsel

kost veel tijd, zegt Ton Baltissen, projectleider van het onderzoek. "Bij elke plant moet de machine stil staan om de beelden te maken. Daarom testen we dit jaar daarnaast ook een ander systeem om beelden te maken van de tulpen. Dit systeem werkt continu."

Het PPO heeft vorig jaar onderzoek gedaan met de ziekzoekmachine. Op proefvelden hebben zowel de machine als mensen tulpen aangemerkt als ziek. Na de oogst zijn de tulpenbolletjes op de proef-

velden onderzocht met de Elisa-test op virusziekte. Uit dit onderzoek bleek dat de mens iets beter kan ziekzoeken dan de machine. PPO wil het ziekzoeken automatiseren omdat het veel tijd kost. Deskundigheid vraagt en fysiek zwaar werk is.

PPO heeft nieuwe proefvelden aangelegd. Het ziekzoeken is vorige week gestart. Baltissen: "Het nieuwe onderzoek heeft dezelfde opzet als vorig jaar. Waarbij we dit jaar twee visiesystemen tes-

ten in plaats van één. Ook hebben we het geramme en de wielen van de ziekzoekmachine aangepast. En dit jaar hebben we vier cultivars in plaats van drie."

De tulpen staan op de proefvelden wijder uit elkaar dan in de praktijk. Baltissen: "Dan kan het apparaat van twee kanten ledere plant goed fotograferen. Maar voor de mens is een grote plantafstand lastiger omdat je dan minder goed gezonde en zieke planten met elkaar kunt vergelijken."

### Onderzoekers in Zweden geloven in rendabele sojaeteelt

Economisch rendabele teelt van soja in Zweden is zondermeer mogelijk. Dat meent onderzoeksinstituut voor landbouw- en milieutechniek JTI.

Het JTI wil dit aantonen met een driejarige teeltproof met als einddoel in 2013 een perceel soja van 100 hectare. Volgens projectleider Fredrik Fogelberg is in het verleden al diverse keren geprobeerd soja te telen in Zweden, maar die proeven waren slecht gedocumenteerd en de rassen die toen werden gebruikt zijn inmiddels verouderd.

"De sojaconrassen die we vandaag hebben zijn ultraklein-maatschappelijke transgeen-vrije rassen uit Canada", licht Fogelberg toe. Cor

## Ook Rusland meldt grote schade in winterkoolzaad

Moskou – In Rusland is bijna 10 procent van het winterkoolzaad kapot gevoren. Dat is meer dan vorige winter. Volgens het Russische ministerie van landbouw heeft 440.000 hectare koolzaad de strenge winter niet overleefd. Vorig voorjaar haalde 210.000 hectare koolzaad het voorjaar niet.

Eerder heeft het landbouwministerie in Oekraïne aangegeven dat ruim 15 procent van het areaal winterkoolzaad kapot is gevoren. Zo'n 292.000 hectare winterkoolzaad moet in Oekraïne opnieuw worden ingezaaid. Dat is een vijfde van het areaal. Andere schattingen lopen uiteen van 18 tot 40 procent van het areaal dat is verdwenen. Door de late oogst is het voor de houthandel van zomer-koolzaad te laat, stelt adviesbureau UkrAgroConsult in Kiev.

Analisten verwachten dat de schade aan het koolzaad in Rus-

land en Oekraïne leidt tot hogere prijzen in de EU. Een groot deel van het koolzaad uit Oekraïne gaat naar de EU. In 2008 was 85 procent van de koolzaadoogst bestemd voor afnemers in de EU.

Volgens een analist van UkrAgroConsult werd de koolzaadprijs in de EU tot nu toe vooral bepaald door de prijzen van aardolie en sojabonen. "Nu wordt de oogst in dit deel van de wereld bepaald voor de prijs in de EU. Als 40 procent van het gewas in Oekraïne verloren is gegaan, 80 procent in Wit-Rusland en er is ook schade aan het gewas in Rusland, dan stijgen de prijzen van koolzaad."

Het metcontract voor koolzaad op de termijnmarkt in Parijs noteerde woensdagavond 311 euro per ton. Dat is 6 euro meer dan een week geleden en het is de hoogste notering in bijna tien maanden.

## BAI: 12 procent aardappelen gepoot

Den Haag – Tot nu toe is ongeveer 12 procent van het aardappelareaal gepoot. Dat is inclusief de vroege aardappelen, meldt het Bureau Aardappelmarkt Informatie (BAI) van het Productieschap Akkerbouw.

Volgens het BAI komt het potentieel van de aardappelen maar langzaam op gang doordat de winterperiode lang heeft aangehouden.

"Bovendien is er de afgelopen weken in heel Nederland redelijk wat neerslag gevallen."

De weersverwachting voor de komende week is goed, stelt het BAI. "Daardoor zal binnen afzienbare tijd op de in eerste instantie wat lichtere gronden de werkzaamheden met betrekking tot het potten van aardappelen van start kunnen gaan."

### MELKTERMIJN MARKT

Voor informatie:

**De Vries & Westermann B.V.**  
Agricultural Brokers

Tel. 020-6536303 • [www.agrifutures.nl](http://www.agrifutures.nl)

Geregistreerd bij AFM als toezelaten instelling



## 7.4 Bijlage 4. Keuze van de camera's

### Spectrale camera technieken voor automatische non-destructieve detectie van tulpenmozaiekvirus: de ziekzoekrobot.

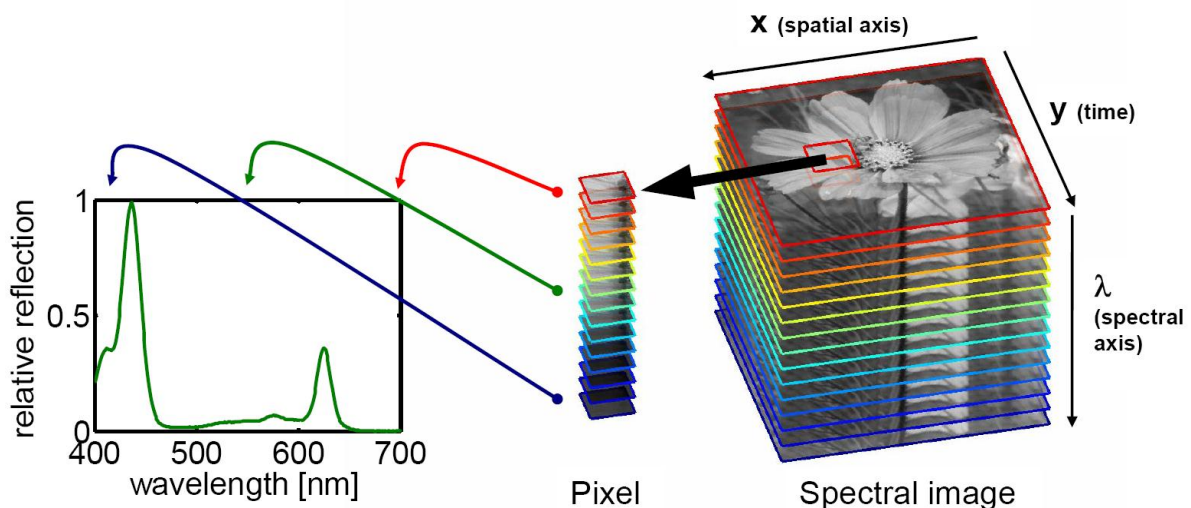
Gerrit Polder

December 2009

#### Inleiding

Voor het detecteren van tulpenmozaiekvirus is een aantal cameratechnieken onderzocht en getest. Elk systeem heeft zijn eigen voor- en nadelen met betrekking tot mogelijkheden, kwaliteiten en prijs. Het blijkt heel moeilijk te zijn om een goed systeem te vinden dat robuust genoeg is om in het veld te gebruiken en bovendien betaalbaar is.

In de eerste fase van het onderzoek is gebleken dat een spectraal camera beter onderscheid vindt tussen zieke en gezonde tulpen dan een gewone kleurencamera. Ten opzichte van een kleurencamera heeft een spectraal camera meer banden (tussenkleuren) dan alleen de drie standaard kleuren (rood, groen en blauw). Hoeveel meer hangt af van het gebruikte principe. Hieronder nog even ter verduidelijking een voorbeeld van een spectraal beeld met 15 banden van 400nm tot 700 nm (blauw-rood).



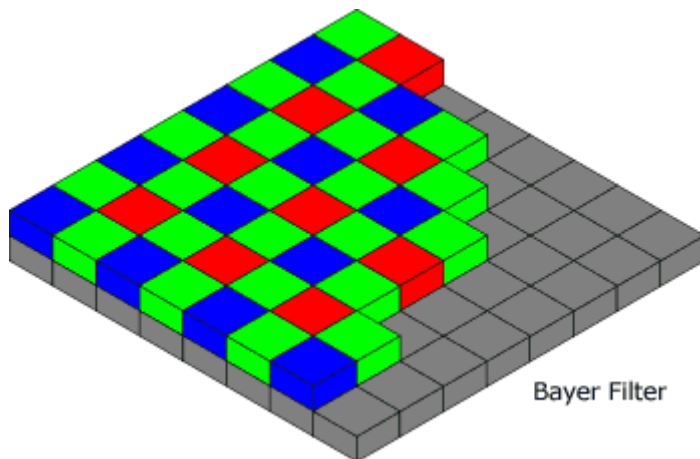
Uit de eerste fase van het onderzoek is gebleken dat de meeste informatie in het zichtbaar licht zit. Dit betekent dat er geen infrarood camera nodig is. Een 'zwart-wit' infrarood camera is heel erg duur ten opzichte van een normale zichtbaar licht camera, laat staan een spectrale infrarood camera. In dit rapport worden de verschillende soorten spectraal camera's kort op een rijtje gezet

#### Overzicht verschillende camera's

##### 1. Kleurencamera

In feite is een kleurencamera ook een spectrale camera, immers een kleurenbeeld bestaat uit drie beelden, elk met informatie uit een verschillend golflengte gebied. Voor een kleurencamera zijn dat drie brede banden, namelijk blauw, groen en rood. Over het algemeen is een kleurencamera uitgerust met één beeldsensor dat is uitgerust met een zogenaamd Bayer filter. Een Bayer filter plaatst volgens een bepaald patroon een rood, groen of blauw filter op individuele pixels. Uit de combinatie van deze pixels





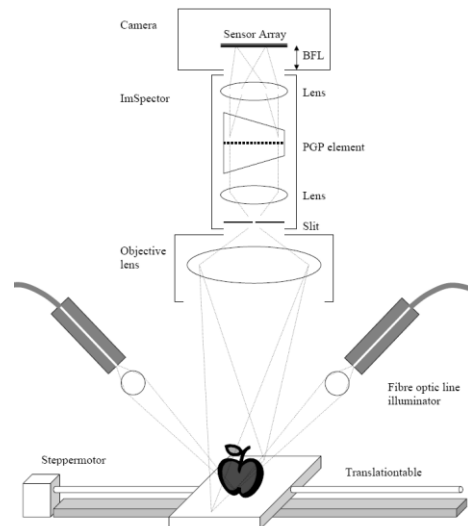
wordt uiteindelijk het volledige kleurenbeeld geconstrueerd.

Kleurencamera's worden zo veel toegepast zowel in de consumentensector, als in industriële installaties, dat er heel veel verschillende betaalbare mogelijkheden op de markt zijn.

Tijdens de haalbaarheidsstudie van het tulpenvirusproject zijn tulpen onder geconditioneerde omstandigheden in het lab opgenomen met een standaard Nikon camera. De resultaten waren goed, maar de spectrale camera gaf toen betere resultaten.

## 2. Beeldvormende spectrograaf

De beeldvormende spectrograaf gaf tijdens de haalbaarheidsstudie de beste resultaten. Dit systeem maakt gebruik van een gevoelige zwart-wit camera, met tussen de lens en de camera een spectrograaf. Het beeld op de camera sensor is het complete zichtbaar licht spectrum van één beeldlijn van de tulp. Om de complete tulp in beeld te krijgen moet stapje voor stapje de tulp onder de camera worden doorbewogen waarbij bij elk stapje een beeldlijn wordt opgenomen. In de lab opstelling hebben we daar een nauwkeurige stappentafel voor. De beelden die op deze manier worden verkregen hebben hoge resolutie, zowel ruimtelijk (beeldinformatie) als spectraal (golflengte informatie). Dit systeem is echter erg langzaam en onvoldoende robuust om in het veld te gebruiken en bovendien duur.



## 3. Tunable filter

Net als bij de beeldvormende spectrograaf wordt een tunable (afstembaar) filter geplaatst tussen de lens en de zwart-wit camera. Maar in plaats van het hele spectrum van één beeldlijn op te nemen wordt hier het hele beeld van één specifieke golflengte opgenomen. Voor het opnemen van een compleet spectraal beeld wordt het filter band voor band afgestemd en per band een beeld opgenomen. De nadelen wat betreft prijs, robuustheid en snelheid gelden ook voor dit systeem. Bovendien werkt dit systeem maar tot 700 nm, terwijl alle andere systemen tot 900 nm gaan. Voor de segmentatie van de bladeren t.o.v. de grond hebben we liever ook het gebied boven de 700 nm.



## 4. Filterwiel

Met behulp van een smalband filter voor de lens van een camera kan een klein gedeelte van het licht spectrum worden geselecteerd. Een filterwiel is een constructie waarbij meerdere van deze filters één voor één voor de lens kunnen worden geplaatst. Dit geeft een uiterst flexibele configuratie die ook nog eens veel minder kost dan de andere technieken. Echter, deze oplossing is traag en weinig robuust.

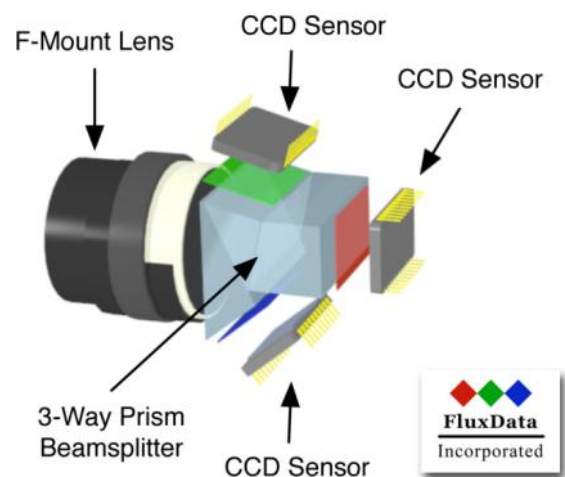


Bovendien zijn de individuele beelden door verschillende lichtbreking in de filters ten opzichte van elkaar verschoven. Voor de proef van 2009 was de ziekzoekkar uitgerust met een filterwiel met zes filters met een bandbreedte van 50 nm, van 400 – 700 nm. Tijdens de proef bleek het systeem te traag. Filterwiel systemen worden primair gebruikt in de astrofysica, op telescopen, of in lab situaties. Voor het veld blijkt het systeem niet robuust genoeg te zijn. Door kleine afwijkingen in de positie van de filters was de lichtbreking niet constant en moest achteraf voor elk beeld de onderlinge verschuiving afzonderlijk gecorrigeerd worden. Voor de proef van 2009 een rekenklus van bijna een maand computertijd.

## 5. Multi-sensor systeem met prisma en beamsplitter

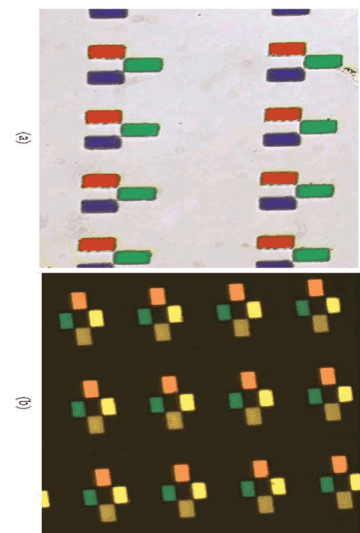
In plaats van de filters één voor één voor de camera te plaatsen kunnen ook meerdere sensoren (camera's) elk met hun eigen filter tegelijk worden belicht. Om te zorgen dat deze camera's door één lens exact hetzelfde beeld zien zijn ingenieuze optische constructies met prisma's en beamsplitters bedacht. Het voordeel van deze camera's is dat ze net zo snel zijn als een normale kleurencamera. Bovendien zijn er geen problemen met uitlijnen van de verschillende golflengtebanden. Het nadeel van deze camera's is dat ze niet flexibel zijn. De filters worden op klantspecificatie op de sensoren aangebracht en dat is een duur proces. Bij het bestellen van meerdere camera's echter gaat de prijs per camera hard naar beneden, omdat de kosten van het opbrengen van de filters dan wordt uitgesmeerd. Er zijn maar enkele camera's met dit principe op de markt, met 2 tot 5 sensoren. Voor het tulpvirus project hebben we 5-6 banden nodig. Omdat gebruik gemaakt kan worden van een Bayer patroon op één of meer van de sensoren betekend dit 3-5 sensoren. De firma JAI brengt een 4 band camera op de markt, RGB op één sensor en 750-900 nm NIR op de andere. Deze camera is redelijk geprijsd, maar de resolutie is helaas te laag (0.8 MP).

### Schematic View of 3-CCD Camera



## 6. Multispectral Bayer filter

Het gebruik van een Bayer filter kan van drie banden (rood, groen en blauw) uitgebreid worden naar meer golflengtebanden. Je levert dan wel in op ruimtelijke resolutie, maar bij hoge resolutie sensoren met 6 – 12 megapixels is dit nauwelijks een bezwaar. Een 12 Mpixel sensor met 6 banden heeft altijd nog een ruimtelijke resolutie van 2 Mpixel en die kan met postprocessing bovendien nog worden verbeterd. Camera's gebaseerd op dit principe zijn snel, robuust en hebben geen problemen met uitlijnen. Helaas zijn de aanloopkosten voor zo'n camera erg hoog. De eerste camera die op klantspecificatie besteld wordt kost meer dan 100.000 euro. Vervolgens kosten de volgende 100 of meer camera's nog geen 3000 euro.





## 7. Vergelijkingsmatrix

Principe	Kosten (€) (initieel) <sup>1</sup>	Kosten (€) (productie) <sup>1</sup>	Robuustheid	Snelheid	Aantal banden	Resolutie (Mega Pixels)	Levertijd (maand)	Opmerkingen	Fabrikanten
<b>Kleurencamera</b>	2400	2400	Hoog	Hoog	3	5	1	Mogelijk te weinig banden voor goede segmentatie	Vele, o.a. <a href="http://www.alliedvisiontec.com">www.alliedvisiontec.com</a>
<b>Spectrograaf</b>	25.000	25.000	Laag	Laag	100-300	5	1	Gebruikt in lab-proef 2008	<a href="http://www.specim.fi">www.specim.fi</a>
<b>Tunable filter</b>	22.000	22.000	Laag	Laag	30	5	?		<a href="http://www.oksi.com">www.oksi.com</a> <a href="http://www.cri-inc.com">www.cri-inc.com</a>
<b>Filterwiel</b>	4000	4000	Laag	Laag	6	5	1	Gebruikt in veldproef 2009	<a href="http://www.thorlabs.com">www.thorlabs.com</a>
<b>Multi-sensor</b>	40.000	10.000	Hoog	Hoog	3-8	1-5	4 (quest) 2 (fluxdata)	Er is een standaard camera beschikbaar met voor ons geschikte banden voor 40.000	<a href="http://www.quest-innovations.com">www.quest-innovations.com</a> <a href="http://www.fluxdata.com">www.fluxdata.com</a>
<b>Multi-sensor</b>	2800	2800	Hoog	Hoog	4	0.8	1		<a href="http://www.jai.com">www.jai.com</a>
<b>Multispectral Bayer filter</b>	100.000	3000	Hoog	Hoog	3-8		?		<a href="http://www.oceanthinfilms.com">www.oceanthinfilms.com</a>

<sup>1</sup>Prijzen kale camera zonder lens

## 8. Conclusie

Het is heel moeilijk om nu een keuze te maken. Het is gebleken dat met een standaard kleurencamera de viruspatronen op de tulpenbladeren minder goed kunnen worden gemeten. Maar dit is bepaald op een uit het multispectraal gesimuleerd kleurenbeeld. In 2009 zijn geen opnamen gemaakt met een echte kleurencamera zodat het heel moeilijk is hier harde uitspraken over te doen.

Met het filterwiel systeem wat in het experiment van 2009 gebruikt werd kon dat wel, maar het systeem had zoveel nadelen wat betreft robuustheid en snelheid dat het voor een volgende fase in het onderzoek minder geschikt is. Eigenlijk blijft alleen het multisensor systeem met prisma en beamsplitter over. Echter het geld en de tijd ontbreken om voor april 2010 een systeem te produceren met dezelfde golflengte banden als we in 2009 hebben gebruikt. Het enige wat overblijft, is een standaard 6 band systeem van Fluxdata (20.000 euro). Op dit moment zijn we hierover druk in overleg met deze firma, maar om eerlijk te zijn hebben we daar op dit moment nog niet veel vertrouwen in, onder meer omdat ze ons nog steeds geen testbeelden hebben kunnen laten zien.

Quest –innovations kan ook een 6 band systeem leveren, voor 40.000 euro, die goed aan onze specificaties voldoet. Bovendien is dit een Nederlandse firma is met ervaring in de land- en tuinbouw. Dit schept meer vertrouwen. Helaas kan Quest deze camera niet op tijd voor de proef van 2010 leveren.

JAI heeft standaard een RGB+NIR camera beschikbaar voor 2800 euro. Helaas is de resolutie van deze camera met 0.8 MP te laag en bovendien zijn de banden niet optimaal. JAI verwacht pas eind 2010 een versie te kunnen leveren met hogere resolutie.

### Samengevat:

De techniek van multispectraal camera's is sterk in ontwikkeling. Het ziet er naar uit dat deze camera's in de nabije toekomst tegen acceptabele prijzen op de markt komen. Maar op dit moment is er voor het tulpvirusproject voor de proef van 2010 met zijn strikte tijdsplanning nog geen camera beschikbaar, die voldoet aan al onze eisen.

### Alles in overweging nemende zijn er vier mogelijkheden om het project te vervolgen:

- 1- We doen de proef van 2010 alleen met kleurencamera's. We kunnen dan alle rassen met grote regelmaat snel opnemen. Nadeel is dat segmentatie van kleurpatronen minder goed gaat, en dat gaat bij de analyse zeker een rol spelen, maar het is onduidelijk hoeveel informatie we gaan missen. Vormkenmerken van plant en blad daarentegen kunnen nu wel veel beter dan in 2009 gemeten worden.
- 2- We verbeteren het huidige (trage) filterwiel systeem, zodat we geen leklicht probleem meer hebben. Om zeker te zijn dat alle planten goed in beeld komen moeten we de beelden minimaal twee keer zoveel laten overlappen als in 2009. Dit betekent dat de opnametijd veel langer wordt dan vorig jaar. Dit heeft het risico dat het zo langzaam gaat, dat we niet alles kunnen opnemen en dat we het kritieke tijdstip missen.
- 3- Combinatie van 1 en 2, waarbij we regelmatig alle velden opnemen met de kleurencamera's. De tijd die overblijft wordt gebruikt om nog zoveel mogelijk planten met het filterwiel te meten.
- 4- We slaan een jaar over.

### Advies:

De beste aanpak lijkt ons 3. Dit geeft ons de meeste informatie omdat alle planten met grote regelmaat gemeten kunnen worden. Voor een selectie van de planten maken we ook opnamen met het langzame filterwiel-systeem. Daaruit kan dan afgeleid worden hoeveel beter de segmentatie gaat bij multispectraal beelden t.o.v. kleurenbeelden. Dit kan er dan in resulteren dat de toekomstige zieke robot toch uitgerust wordt met een multispectraal camera.

## 7.5 Bijlage 5. Artikel precisielandbouw symposium (JAC 2009)

### **Detection of the Tulip Breaking Virus (TBV) in tulip using spectral and vision sensors.**

*G. Polder<sup>1</sup>, G.W.A.M. van der Heijden<sup>1</sup>, J. van Doorn<sup>2</sup>, R. van der Schoor<sup>3</sup> and T. Baltissen<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Wageningen UR, Biometris, PO Box 100, 6700 AC, Wageningen, Netherlands, <sup>2</sup>Wageningen UR, Applied Plant Research, PO Box 85, 2160 AB, Lisse, Netherlands, <sup>3</sup>Wageningen UR, Plant Research International, PO Box 16, 6700 AA, Wageningen, Netherlands*

#### **Abstract**

Experiments are described for detection of Tulip Breaking Virus in tulip plants. Four optical techniques were investigated and compared with visual assessment by crop experts as well as with Elisa (Enzyme ImmunoAssay) analysis of the same plants. The optical sensor techniques used were: an RGB Color camera, a spectrophotometer ranging from 400-2400 nm, a spectral imaging camera covering a spectral range from 400-900 nm and a chlorophyll fluorescence imaging system which measures the photosynthetic activity. Linear discriminant classification was used to compare the results of these optical techniques with the Elisa score and the visual assessment. A good correlation was found when the results of the spectral camera and the results of the visual examinations of the crop expert were compared. These are very promising results which are translated in a follow up with as final goal an autonomous robot for detection and removal of diseased tulip plants in the open field.

Keywords: plant virus, image processing, hyper spectral imaging, spectroscopy, machine vision

#### **Introduction**

Tulip and other bulbous ornamental crops are plagued by viral diseases. One of the most important viruses in tulips is the potyvirus TBV (Tulip Breaking Virus). The virus symptoms can manifest itself in different ways, including striping of the leaves and abnormal flowers (Dekker et al. 1993). The presence of virus causes a reduction of the quantity and especially the quality of the product and leads to sales and export restrictions. Current methods to keep the disease under control are twofold. Firstly, plants are sprayed with chemicals to control aphids, which spread the virus (Asjes and Blom-Barnhoorn 2001). Secondly, crop experts go through the field and remove symptomatic plants as observed visually. The total costs of the viral problem in the Netherlands is estimated at over 9 M€ yearly.

A large problem with visual assessment of infected plants is, that the symptoms are often difficult to see and require an expert eye. The visibility of the symptoms is also largely influenced by the cultivar of the tulips, the weather conditions and can only be seen during a limited period of the growing season. This causes a high peak of labor of trained personnel, which is difficult to find. In order to reduce the amount of chemicals for aphids and the high labor pressure, various alternatives, were studied and it was concluded that presently the best possibility to control the disease was by means of imaging techniques to automatically find infected tulips. In this study, our final objective is to develop a robot system which automatically detects and removes diseased plants in the field. As a first step a feasibility study was carried out to test the detection performance of several optical sensors for virus symptoms in tulips under laboratory conditions.

### Experimental setup

Three tulip varieties (Barcelona, Monte Carlo, Yokohama) with high TBV infection rates, as assessed in the former breeding season by Elisa, were used. The established infection rates for the bulb lots were 14% in Yokohama, 16% in Barcelona en 31% in Monte Carlo. Per cultivar between 400 and 800 plants per cultivar were planted in small plastic baskets and buried in the field.

Early in the growing season individual plants were visually assessed and marked when TBV symptoms were present. Afterwards, leaves of about 100 visually healthy and 100 visually infected plants were measured using four different vision sensors.

An Elisa (Enzyme ImmunoAssay) analysis using TBV-specific antisera and a validated protocol (Derks et al. 1982) was carried out on the same leaves of the measured plants. These measurements were used as the reference analysis.

### Optical techniques

Four different optical sensor techniques were assessed in this study: an RGB Color camera, a spectrophotometer ranging from 400-2400 nm, a spectral camera ranging from 400-900 nm and the Multiple Imaging Plant Stress (MIPS) system (Jalink et al. 2004; Polder et al. 2007), which measures the photosynthetic activity using Chlorophyll fluorescence.

#### *RGB Color camera*

From each leaf a digital picture was taken under controlled light conditions. The camera used was a Nikon D70 with a NIKON 18-70 mm zoom lens in a closed cabinet equipped with high frequency fluorescent illumination (Osram Biolux daylight tubes). To correct for possible changes in the illumination, a Macbeth color chart was put in each image. This makes it possible to check whether there were color changes and to correct for them if needed. To identify each leaf, each image was coded by putting a 2D QR-barcode in the image. In Figure 1 a typical image is displayed.

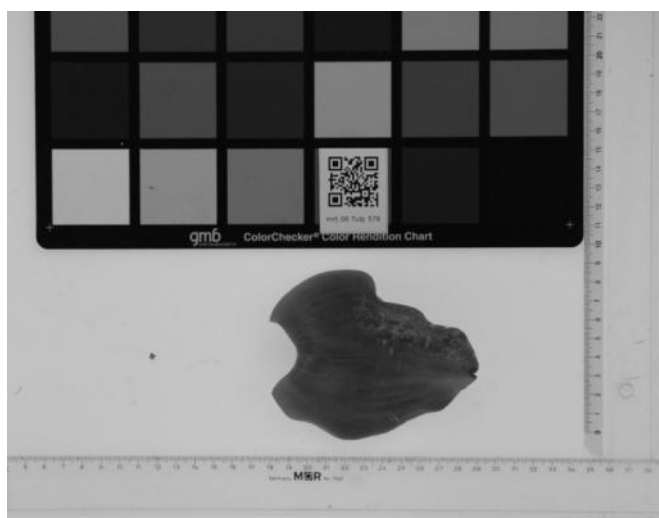


Figure 1. RGB image of tulip leaf, Macbeth color standard and barcode.

After recording, the images were segmented and a number of shape parameters were calculated for each leaf. Table 1 gives a list of the calculated shape parameters.



Table 1. calculated shape parameters

Name	Description
Dimensions	dimensions (length, width, depth) of the object
Mean	mean object intensity
StdDev	standard deviation of object intensity
Size	number of object pixels
Perimeter	perimeter length of the object
Inertia	moments of inertia of binary object
Mu	elements of the inertia tensor
CCBendingEnergy	bending energy of object perimeter (chain-code method)
P2A	circularity of the object ( $\text{Perimeter}^2/\text{Area}$ )
PodczecShapes	Podczec shape descriptors

Infected plants very often have a red/purple spot pattern on the leaves. These spots were quantified using color segmentation. Afterwards the total area of the spots, the total perimeter of the spots, and the number of separated spots were calculated (Figure 2).



Figure 2. Image of infected Tulip leaf (left), segmented color pattern (middle) and contour pixels of color pattern (right).

### *Spectrophotometer*

Using a spectrophotometer the reflection spectrum of two spots was measured on each leaf. The spectrometer used was a FieldSpec Pro FR spectroradiometer from Analytical Spectral Devices (ASD). The total range was (350-2500 nm), with a resolution of 3 nm in the visible range and 10 nm in the infrared. A leaf clip was used to measure the reflection spectrum of a circular part of the leaf with a diameter of 2 cm in a standardized way.

Since the spectrophotometer consists of three different sensors, sometimes a small mismatch between the adjacent spectral regions was present. Each spectrum is corrected for this mismatch before further processing using standard protocols. The spectrophotometer outputs 2151 data points per spectrum. This is far too much for classification and also much more than the physical resolution of the sensors. Therefore the data were reduced to 40 points, using Savitzky–Golay smoothing and sub sampling (Savitzky and Golay 1964).

The analysis of the spectrophotometer data was needed to answer two questions: can we distinguish between healthy and diseased plants using only spectral information and secondly how informative are the data in the various parts of the spectrum, especially in the (near) infrared region.

In order to answer these questions the difference between the mean spectrum of the healthy and diseased plants was investigated. Also the total spectral region was subdivided in small spectra of 100 nm, with an overlap of 90 nm. The height of the classification error of these subsets is an indication of the importance of the subsequent spectral region.

### *Spectral camera*

Whereas the color camera only has a red, green and blue value per pixel, the spectral camera gives the complete reflection spectrum from 430-900 nm with a resolution of 4.5 nm. The spectral imaging system is built around an imaging spectrograph from Spectral Imaging Ltd (Specim). A detailed description of the system has been published elsewhere (Polder et al. 2003). Figure 3 depicts an example of spectral image data, showing images at three different wavelengths as well as the reflectance spectrum of one pixel.

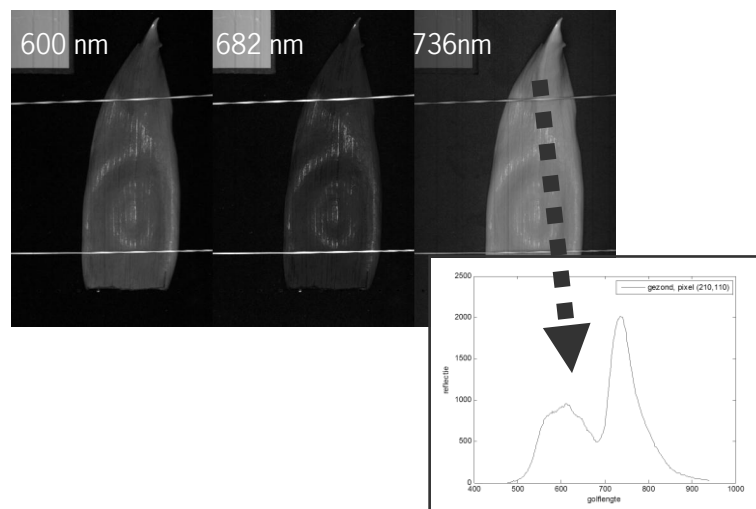


Figure 3. Part of the spectral image of a Tulip leaf. Only three images are shown. In reality 257 images at wavelengths from 430-900 nm are available. The spectrum shows the reflection of all wavelengths at the position of the selected pixel.

The same shape features as with the RGB images were calculated. The red/purple spots were quantified by dividing the sum of the images from 560-590 nm by the sum of the images from 740-780 nm.

### *Chlorophyll fluorescence imaging system*

The chlorophyll fluorescence imaging system measures the photosynthetic reaction on stress factors. The output of this system is an image where each pixel value gives the Photosynthetic Efficiency (PE) between 0 and 1. The system is developed at our institute by Jalink, (2004). The images were analyzed by calculating the mean and standard deviation for each leaf. Furthermore thresholds were applied with small differences in PE, e.g. 0.4 – 0.5, 0.5-0.6 etc. The size of the objects after these thresholds was used in the classification. Figure 4 gives an example.

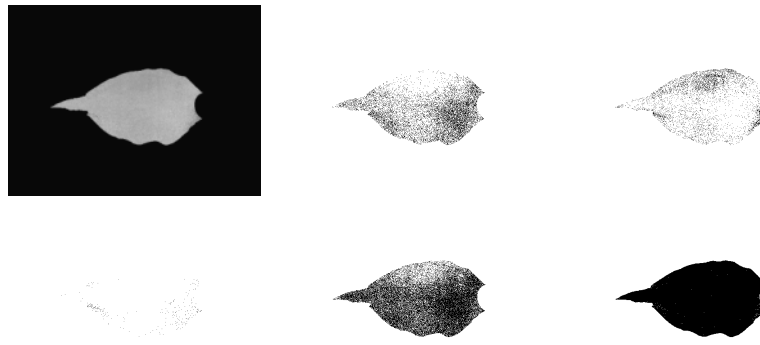


Figure 4. Photosynthetic efficiency image (upper left) and segmented images at different threshold values.

### Data analysis

Each optical technique described above gives a list of 10-40 features. These features were used in the data analysis. Linear discriminant analysis (LDA) using leave one out cross validation was used to predict whether a plant is healthy or diseased. LDA is a so called supervised technique. A model is trained using the features of known healthy or diseased leaves. As ground truth (ultimate reference) the Elisa measurements were used. The training algorithm calculates the optimal separation function. In leave one out cross validation all the samples except one are used for training and the remaining sample is used for validation. This is repeated such that each observation in the sample is used once as the validation data.

### Results

#### Visual assessment

Table 2 gives the score of the visual assessment by the crop expert compared to the Elisa score, the latter considered as the ground truth. Columns two and three give the number of plants which were scored as healthy and diseased by both the Elisa test and the crop expert. Columns four and five gives the number of plants which were diseased and healthy according to the Elisa test, but were scored as healthy and diseased respectively by the expert. The last column gives the total percentage error.

Table 2. Visual assessment score compared to Elisa analysis (H=Healthy, I=Infected).

Variety	Elisa and Expert: H	Elisa and Expert: I	Elisa: I Expert: H	Elisa:H Expert: I	Total error
Barcelona	89	86	15	10	13%
Monte Carlo	100	22	22	25	28%
Yokohama	103	88	16	4	9%

#### Color camera

Analysis of the RGB values of the Macbeth color standard showed minimal differences between images. We concluded that the illumination was consistent and correction between images was not needed. Classification is done on the shape parameters, the red/purple spot parameters and a combination of the features. The results of the combination was the best of the three and is shown in Table 3.

Table 3. Color camera score compared to Elisa analysis.

Variety	Elisa and Camera: H	Elisa and Camera: I	Elisa: ICamera: H	Elisa: HCamera: I	Total error
Barcelona	83	72	29	16	22%
Monte Carlo	93	30	14	32	29%
Yokohama	101	84	19	5	12%

Table 4. Spectrophotometer score compared to Elisa analysis.

Variety	Elisa and Camera: H	Elisa and Camera: I	Elisa: ICamera: H	Elisa: HCamera: I	Total error
Barcelona	147	137	65	51	29%
Monte Carlo	202	63	25	48	24%
Yokohama	189	172	36	25	14%

### *Spectrophotometer*

The difference between the mean spectrum of the healthy and infected plants was the largest in the region between 500 and 700 nm. The error of the classification of the 100 nm subsets was smallest in the same region, as showed for variety Yokohama(Figure 5).Table 4 shows the classification result for the full range spectra.

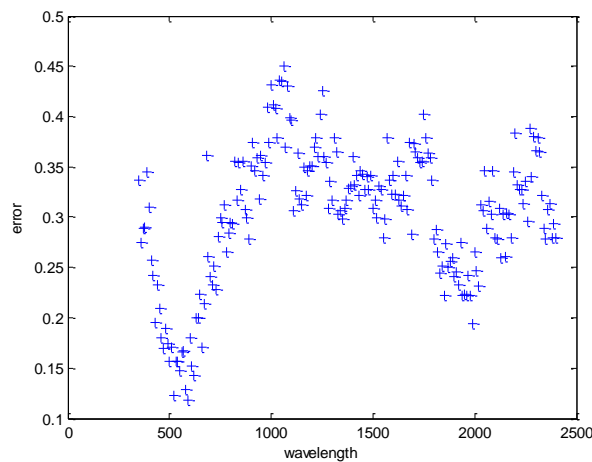


Figure 5. Classification error for subsets of 100 nm (variety Yokohama).

### *Spectral camera*

The same procedure as with the color images was applied on the spectral images using only shape parameters, spot parameters and a combination of the features. Here also the combination gives the best result, as is shown in Table 5.

Table 5. Spectral camera score compared to Elisa analysis.

Variety	Elisa and Camera: H	Elisa and Camera: I	Elisa: ICamera: H	Elisa: HCamera: I	Total error
Barcelona	94	71	30	5	17%
Monte Carlo	89	31	13	36	29%
Yokohama	102	88	15	4	9%

*Chlorophyll fluorescence imaging system*

The results for the Chlorophyll fluorescence imaging system is shown in Table 6.

Table 6. Chlorophyll fluorescence imaging system score compared to Elisa analysis.

Variety	Elisa and Camera: H	Elisa and Camera: I	Elisa: ICamera: H	Elisa: HCamera: I	Total error
Barcelona	70	57	44	29	36
Monte Carlo	68	24	20	57	46
Yokohama	73	73	31	34	31

*Combination of techniques*

Several combinations were investigated with the data from the four methods. The most interesting combination was that the result of color camera and spectral camera is taken if they predict the same and the result of the spectrophotometer is taken, if color camera and spectral camera predict differently. In this case the error for variety Monte Carlo drops significantly, as can be seen in Table 7.

Table 7. Score where if color camera and spectral camera predict different, the result of the spectrophotometer is taken.

Variety	Elisa and Camera: H	Elisa and Camera: I	Elisa: ICamera: H	Elisa: HCamera: I	Total error
Barcelona	88	74	27	11	19%
Monte Carlo	100	31	13	25	22%
Yokohama	102	87	16	4	10%

Finally the optical techniques were compared to the manual assessment.

Table 8 gives the result for the spectrophotometer, the color – and spectral camera.

Table 8. Comparison between manual assessment and optical techniques.

Variety	Camera system	Number of errors	Number of errors expert	Error in same plants	Percentage correspondence
Barcelona	Spectrophotometer	47	25	10	40%
Monte Carlo	Spectrophotometer	50	47	24	51%
Yokohama	Spectrophotometer	37	20	6	30%
Barcelona	Color camera	45	25	13	52%
Monte Carlo	Color camera	46	47	18	38%
Yokohama	Color camera	24	20	7	35%
Barcelona	Spectral camera	35	25	9	36%
Monte Carlo	Spectral camera	49	47	16	34%
Yokohama	Spectral camera	19	20	7	35%

### Conclusions and Discussion

The control of plant viral diseases in ornamental crops as for instance tulips by using plant protection agents is more and more restricted. Integrated crop protection management systems are still in progress; certain chemicals are restricted, and not only in the Netherlands.

For the control of TBV the vectors (aphids) can be controlled by the use of mineral oil with insecticides (pyrethroides)(Asjes and Blom-Barnhoorn 2001). However, due to new regulations chemical-free methods are needed to control the incidence of virus-infected tulips. As standard the results of the Elisa measurements were taken, as this serological method has been proved to be a reliable, sensitive and reproducible method. Also detection of TBV using RT-PCR might be an additional control to further confirmation of the presence of virus, also other viruses as TBV(Dekker et al. 1993). This will be needed in future, as certain other viruses than TBV might be present in tulips and noticed by the vision techniques, giving rise to false-negative results.

It was found that the error of visual assessment of symptoms differed between 9 and 28% for the different varieties (Table 2). The best result for the optical methods was for the spectral camera (Table 5). This result is only slightly worse than the visual assessment by the expert. The overall results of variety Monte Carlo were bad, which was due to hail and other problems which causes severe damage to the leaves when growing these plants. Also the number of infected plants for this variety was too low for a proper statistical analysis. The analysis of the spectrophotometer data shows that the most important features

(wavelengths) are in the visual range (below 1000 nm). This implies that for practical implementation no expensive infra-red sensors are needed, which improves the economical feasibility of the system. Results for the Chlorophyll fluorescence imaging system indicates that this method is not suitable for detection of TBV.

A possible explanation for this is that this system measures overall plant stress and can not distinguish between different stress sources such as virus symptoms.

The fact that the spectral camera performs similar as the crop expert is very promising and gives reason for follow up with as final goal an autonomous robot for detection and removal of diseased tulip plants. Although an RGB color camera is easy to implement and it performed reasonably well in the laboratory test, we opt for the spectral camera for the field test of 2009. Reason for this is that field conditions are much more difficult to control and therefore we like to get the highest signal to noise ratio from the camera system.

### **Acknowledgements**

We like to thank J.G.P. Clevers and H.M. Bartholomeus for providing the spectrophotometer and instructing its usage.

### **References**

- Asjes CJ and Blom-Barnhoorn GJ., 2001. Control of aphid-vectored and thrips-borne virus spread in lily, tulip, iris and dahlia by sprays of mineral oil, polydimethylsiloxane and pyrethroid insecticide in the field. *Annals of applied biology* 139: 11-19.
- Dekker EL, Derks AFLM, Asjes CJ, Lemmers MEC, Bol JF and Langeveld SA., 1993. Characterization of Potyviruses from Tulip and Lily which Cause Flower-Breaking. *J Gen Virol* 74: 881-887.
- Derks AFLM, Vink-van den Abeele JL and Van Schadewijk AR., 1982. Purification of tulip breaking virus and production of anti-sera for use in ELISA. *European Journal of Plant Pathology* 88: 87-98.
- Jalink H, van der Schoor R and Schapendonk AHCM., 2004. A method and a device for making images of the quantum efficiency of the photosynthetic system with the purpose of determining the quality of plant material and a method and a device for measuring, classifying and sorting plant material. Dutch Patent No. 1,021,800.
- Polder G, van der Heijden GWAM, Jalink H and Snel JFH., 2007. Correcting and matching time sequence images of plant leaves using Penalized Likelihood Warping and Robust Point Matching. *Computers and Electronics in Agriculture* 55: 1-15.
- Polder G, van der Heijden GWAM, Keizer LCP and Young IT., 2003. Calibration and Characterization of Imaging Spectrographs. *Journal of near Infrared Spectroscopy* 11: 193-210.
- Savitzky A and Golay MJE., 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 36: 1627-1639.





## 7.6 Bijlage 6. Toelichting op de gebruikte visietechnieken

### RGB kleurencamera

Van elk blad is onder geconditioneerde lichtomstandigheden in een opnamekast een digitale foto gemaakt. De camera is een Nikon D70. Samen met het blad is een Macbeth kleuren referentiekaart opgenomen, waarmee de kleuren gekalibreerd kunnen worden. Voor unieke identificatie van de bladeren is bovendien in elke opname een 2D barcode mee opgenomen.

Van alle bladeren zijn de volgende vormparameters berekend:

1. lengte en breedte
2. gemiddelde intensiteit
3. standaard deviatie van de intensiteit
4. aantal object pixels
5. lengte van de omtrek
6. traagheidsmoment van binair object
7. elementen van traagheids tensor
8. grilligheid van de contour (bending energy)
9. perimeter (chain-code method)
10. kwadraat van de omtrek gedeeld door de oppervlakte (circulariteit)
11. Podczek vorm kenmerken

Vervolgens is het rood/paarse vlekkenpatroon wat zich soms op zieke bladeren bevindt gekwantificeerd. Dit is gedaan door eerst een kleursegmentatie uit te voeren. Vervolgens zijn van de vlekken de volgende parameters berekend:

1. de totale oppervlakte van de vlekken
2. de totale omtrek van de vlekken
3. het aantal vlekken

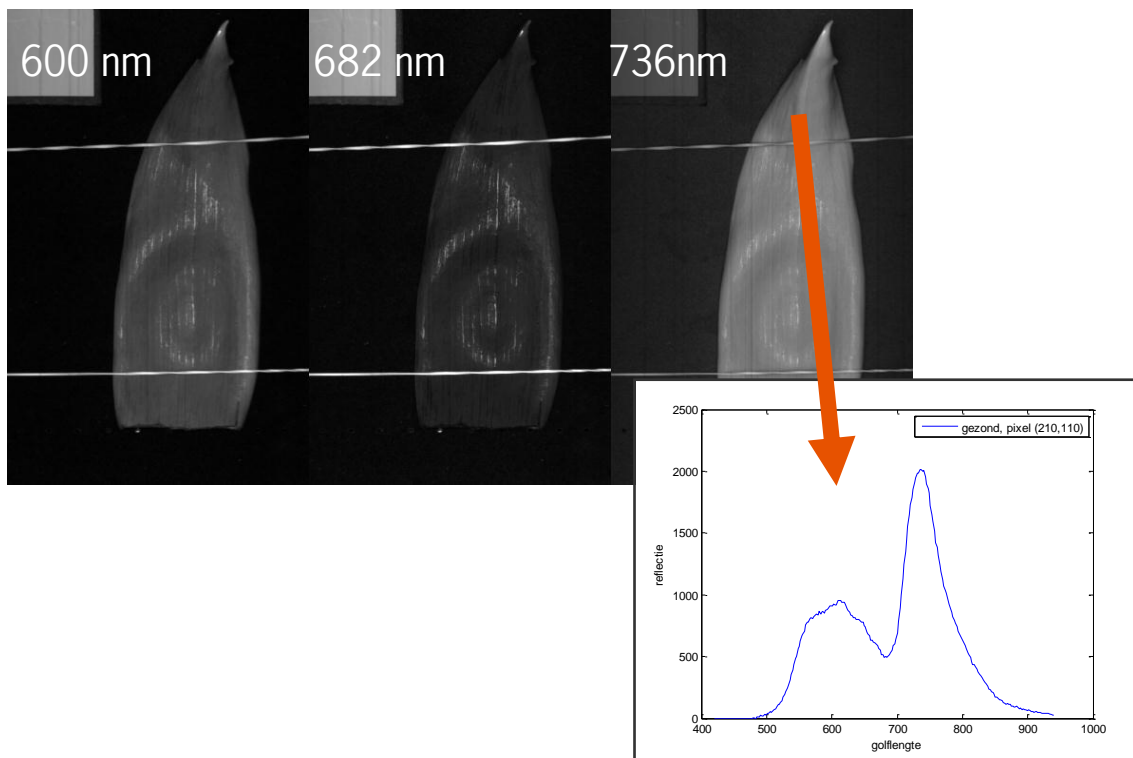
Figure 2. *Image of infected Tulip leaf (left), segmented color pattern (middle) and contour pixels of color pattern (right).* Fig.1 geeft een voorbeeld van een gesegmenteerd vlekkenpatroon.



Figuur 1. Kleurenopname van aangetast blad (links), gesegmenteerd kleurpatroon (midden) en contourpixels van het kleurpatroon (rechts).

### Spectrale camera

Waar de kleurencamera per pixel alleen een rood, groen en blauw waarde geeft, bestaat elke pixel van een spectraal beeld uit een compleet reflectiespectrum. De spectrale camera is een combinatie van een spectrofotometer en een kleurencamera. Het bereik van de spectrale camera is 430-900 nm, met een resolutie van 4.5 nm. Figuur2 geeft een voorbeeld van een spectraal beeld.



Figuur 2. Deel van het spectrale beeld van een tulpenblad. Hier zijn maar drie beelden weergegeven. In werkelijkheid zijn er 257 beelden bij golflengtes van 430-900 nm. Het spectrum linksonder geeft de reflectie van alle golflengtes op de positie van het geselecteerde pixel.

Van de bladeren zijn weer dezelfde vormkenmerken gemeten als bij de kleuren camera. De rood/paarse vlekken konden goed gekwantificeerd worden door de som van de beelden tussen 560 - en 590 nm te delen door de som van de beelden tussen 740 en 780 nm.

Vervolgens zijn op dezelfde manier als bij de kleurenbeelden kenmerken gemeten.

### Data analyse (classificatie)

Per optische techniek krijgen we zoals hierboven beschreven een lijst van 10-40 kenmerken. Deze kenmerken zijn gebruikt in de data analyse. De analyse is gedaan door de kenmerken te classificeren met behulp van "leave one out" kruis validatie. Dat gaat als volgt: Een leeralgoritme krijgt de gemeten kenmerken en per blad de echte waarde (ziek/gezond) aangeboden. Als echte waarde wordt het resultaat van de Elisa toets gebruikt. Het leeralgoritme gaat nu een optimale scheidingsfunctie bepalen. Bij het leren worden de metingen van alle bladeren op één na gebruikt. Vervolgens wordt met de berekende scheidingsfunctie de klasse (ziek/gezond) van dat ene blad voorspeld. Dit wordt herhaald met iedere keer een ander blad, tot dat alle bladeren voorspeld zijn.

Als leeralgoritme zijn een aantal lineaire en niet lineaire classificatie algoritmen gebruikt. Per gebruikte methode krijgen we voor elk blad een voorspelling ziek/gezond.