



Fluorescentievingerafdruk van Aardappel, Melganzenvoet en Mais

Eerste resultaten van plantonderscheid met behulp van fluorescentie

Tim Groot
Ard Nieuwenhuizen



Fluorescentievingerafdruk van Aardappel, Melganzenvoet en Mais

Eerste resultaten van plantonderscheid met behulp van fluorescentie

Tim Groot
Ard Nieuwenhuizen

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Agrosysteemkunde.

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



Oprachtgever: Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie

Projectnummer PRI: 3310403711

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Agrosysteemkunde

Adres : Postbus 616, 6700 AP Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 05 82
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Inleiding	1
Deel 1: Fluorescentie spectra van verschillende plantsoorten	2
1. Apparatuur en methode	2
1.1 Planten	2
1.2 Metingen	2
2. Resultaten	4
2.1 Fluorescentie en excitatie scans	4
2.2 De trend van de fluorescentie intensiteit bij een excitatie op 400 nm	6
3. Conclusies deel 1	8
3.1 Bepalingen voor experimenten deel 2	8
Deel 2: Plantidentificatie door middel van fluorescentie	9
4. Apparatuur en methode	9
4.1 De planten	9
4.2 De meetopstelling	9
4.3 Verwerking gegevens	10
4.3.1 Fluorescentievingerafdruk	11
4.3.2 Vingerafdrukken bepaald uit combinatiespectra gesorteerd van rood naar blauw	11
5. Resultaten	12
5.1 Vingerafdrukken uit de combinatiespectra	12
5.1.1 Onderscheid gewas versus onkruid	13
5.1.2 Vingerafdrukken bepaald uit combinatiespectra gesorteerd van rood naar blauw	13
6. Conclusies deel 2	14
7. Vervolg experimenten	15
8. Literatuur	16
Bijlage I.	1

Inleiding

Planten slaan licht energie op met de fotosystemen 1 en 2. De twee fotosystemen van planten zijn opgebouwd uit de chlorofylmoleculen van het type a en b en carotenen. Het chlorofyl (type a en type b) absorbeert licht in zowel het rood als het blauw/UV. Carotenen absorberen in het blauw (350 tot 500 nm Croce et al. 2000, Belefant-Miller et al. 2005) en dragen deze energie meteen over aan het chlorofyl. Van al deze moleculen is Chlorofyl a vrijwel het enige molecuul dat fluoresceert bij kamertemperatuur. Deze fluorescentie is zichtbaar als een dubbele piek tussen 630 en 800 nm. Rood licht exciteert het chlorofyl naar de eerste elektronische aangeslagen toestand. Blauw licht exciteert chlorofyl naar de tweede elektronisch aangeslagen toestand. Chlorofyl in de tweede aangeslagen toestand vervalt eerst altijd stralingsloos (via overdracht van warmte) naar de eerste elektronische aangeslagen toestand. Vanuit de eerste aangeslagen toestand kan de energie gebruikt worden voor de fotosynthese of kan worden geëmitteerd als fluorescentie of ook hier omgezet worden in warmte.

Longchamps et al. (2010) hebben ontdekt dat monocotylen en dicotylen van elkaar te onderscheiden zijn door de fluorescentie met een blauwe tot groene kleur (geen chlorofylfluorescentie). In verhouding tot dicotylen produceren monocotylen onder invloed van UV licht meer ferulazuur in de epidermis cellen (huid van het blad) en dat fluoresceert met blauw en groen licht. Met behulp van neurale netwerken en discriminant analyse konden zij een goed onderscheid maken tussen deze twee groepen.

In onze experimenten willen we de verschillen in fluorescentie emissie tussen plant soorten breder onderzoeken. Longchamps et al. (2010) hebben in hun onderzoek alleen met UV licht geëxciteerd. Hierdoor wordt veel informatie van de fluorescentie buiten beschouwing gelaten. In deel 1 van dit rapport wordt gekeken hoe de fluorescentie spectra van verschillende plantsoorten eruit zien bij een groot aantal verschillende excitatiegolflengten. Het doel van dit onderzoek is een overzicht te krijgen in overeenkomsten en verschillen in de structuur van de fluorescentie tussen plantsoorten.

In deel 2 van dit rapport wordt in meer detail onderzoek gedaan naar de fluorescentie vingerafdruk van planten. Er wordt gezocht naar mogelijkheden om planten van elkaar te kunnen onderscheiden door middel van fluorescentie, de fluorescentievingerafdruk. Het aantal parameters dat de fluorescentie van een plant bepaald is groot, excitatie golflengte, fluorescentie golflengte, plantsoort, bladleeftijd, blad hoogte, is de plant blootgesteld aan de zon of is het een kasplant/schaduwplant, is de plant ziek of is er een andere stressfactor aanwezig.

In deel 1 van dit rapport wordt geconcludeerd dat er veel overeenkomst is tussen de fluorescentiespectra: ze hebben een maximum in het blauw rond 440 nm, een maximum in het groen rond 530 nm, een maximum in het rood rond 685 nm en een maximum in het infrarood rond 735 nm en er zit in de rest van de spectra weinig andere informatie. Met dit resultaat kan het aantal fluorescentie golflengten terug gebracht worden tot zes, dat zijn de vier maxima van de vier pieken en de minima tussen de eerste twee pieken en de laatste twee pieken. Op deze manier is de meettijd teruggebracht en werd het mogelijk herhalingen te meten.

Met behulp van discriminant analyse zijn uit nieuwe metingen excitatiegolflengten geselecteerd zodat er een set van excitatie- en fluorescentie golflengten gevormd wordt waarmee planten van elkaar te onderscheiden zijn. Deze sets van golflengten zijn de eerste benadering van de vingerafdrukken van de planten. Daarnaast is bepaald of met de beschikbare (vaste stof) lasergolflengten goede vingerafdrukken te maken zijn en of het onderscheidend vermogen daarvan voldoende zal zijn.

Deel 1: Fluorescentie spectra van verschillende plantsoorten

1. Apparatuur en methode

1.1 Planten

De planten in dit experiment zijn: 3 planten straat gras, 2 planten tarwe, 2 planten rogge, 2 planten soja, 3 planten mais en 3 planten paardenbloem. In Figuur 1 zijn de planten afgebeeld. De straatgras- en paardenbloemplanten zijn in het veld verzameld, de andere planten komen uit de kas.



Figuur 1: Planten gebruikt in pilot experiment, planten v.l.n.r. zijn gras, tarwe, rogge, soja, mais en paardenbloem. Van voor naar achter plant 1 t/m 3.

In dit experiment is een blad van één van de planten geplukt en het fluorescentie spectrum opgenomen bij verschillende excitatie golflengte. De gebruikte bladeren van de planten waren jong (bovenste blad) behalve in het laatste experiment waarvoor een oud blad (een blad aan de onderkant van de plant) van een soja plant gebruikt is. De gebruikte planten voor de metingen zijn paardenbloem (plant 1), rogge (plant 1), soja (plant 2), mais (plant 1), tarwe (plant 1), straatgras (plant 1), soja oud blad (plant 1). In Figuur 1 correspondeert nummer 1 met de planten op de voorste rij en nummer 3 met de achterste planten. De plantnamen worden afgekort tot respectievelijk, pb, ro, so, ma, ta en gr voor paardenbloem, rogge, soja, mais, tarwe en straatgras.

1.2 Metingen

Er is gebruik gemaakt van een fluorimeter (Fluorolog 3.22, Jobin Yvon-Spex) waarmee de fluorescentie gemeten kan worden bij een ingestelde excitatie golflengte. De excitatie lamp van de fluorimeter is een Xenon lamp (450 W xenon CW lamp), de excitatie golflengte wordt uit dit 'witte' licht gefilterd door middel van een monochromator. Dat licht valt op het blad dat vervolgens fluorescentie uitstraalt. Een tweede monochromator filtert een smalle golflengteband uit het fluorescentie licht van het blad en een photon multiplier tube (PMT) met detector meet de fluorescentie intensiteit. De smalle golflengteband van de tweede monochromator wordt gescand vanaf 20 nm voorbij de excitatie golflengte tot 800 nm. De gekozen stapgrootte van het fluorescentie spectrum is 1 nm. De integratietijd is tijdens de metingen 0.2 seconden geweest.

Er is gebruik gemaakt van de fiberuitkoppelingsmodule van de fluorimeter. Het excitatie licht uit de monochromator wordt hiermee uit de fluorimeter gekoppeld en met een fiber naar het blad geleid. Een tweede fiber pikt de fluorescentie (front face) weer op en koppelt dat weer in de fluorescentie monochromator. Het afgeplukt blad werd in een Micromax Platereader geplaatst ongeveer 1 cm onder de fiberprobe. Het blad bevond zich tijdens de metingen in het donker.

De gebruikte excitatie golflengten in dit pilot experiment zijn: 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 720 en 740 nm (stapgrootte 20 nm). De volgorde tijdens de metingen was van 340 naar 740 nm. De serie metingen namen per blad ongeveer 45 minuten in beslag, de meting aan het paardenbloem blad bedroeg 2 uur omdat dit blad als eerste werd gemeten en de methodiek nog moest worden bepaald.

De intensiteit van het excitatie licht is veel hoger dan dat van de fluorescentie. De golflengte van de fluorescentie scan kan daarom niet te dicht bij de golflengte van het excitatie licht beginnen (vandaar de offset van 20 nm). Bij de verwerking van de resultaten is de offset vergroot naar 35 nm (er kwam nog te veel excitatie licht door de fluorescentie monochromator).

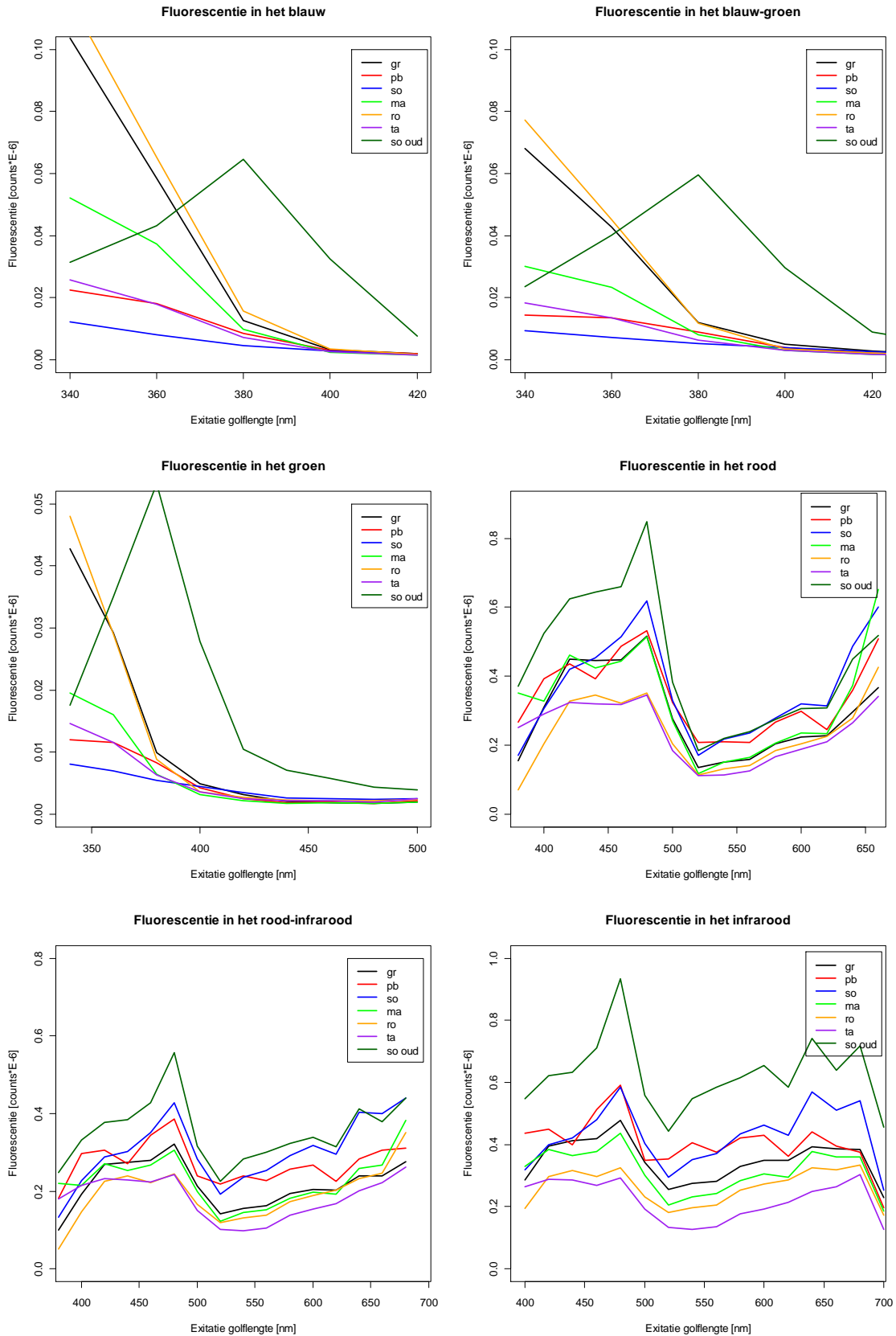
Het oppervlak van één grasspriet was te klein om afzonderlijke te kunnen meten daarom zijn meerdere grassprietten tegelijk gemeten.

2. Resultaten

2.1 Fluorescentie en excitatie scans

In de fluorescentie spectra bij elk van de excitatie golflengten laten 4 maxima zien, één in het blauw één in het groen, één in het rood en één in het infrarood. De posities van deze maxima verschillen een beetje per plantsoort, vooral het blauwe en groene maximum kan wat verschoven zijn. Naast deze maxima is verder weinig structuur te zien in de fluorescentie spectra. Naast de maxima geven de minima tussen twee maxima, informatie over de competitie tussen de maxima 's. Door alleen op deze zes fluorescentiegolflengten metingen te doen en de andere golflengten buiten beschouwing te laten wordt de meet tijd sterk gereduceerd.

Deze fluorescentie metingen kunnen ook als excitatie fluorescentie spectra weergegeven worden. In excitatie fluorescentie spectra wordt de fluorescentie intensiteit gegeven voor verschillende excitatie golflengten bij een vaste fluorescentie golflengte. In Figuur 2 zijn de excitatie fluorescentie spectra van de gebruikte plantsoorten gegeven. De fluorescentie is gemiddeld over 5 of 10 nanometer om ruis te onderdrukken. Omdat de stapgrootte van de excitatie golflengten 20 nm was is de spectrale resolutie in deze figuur laag.



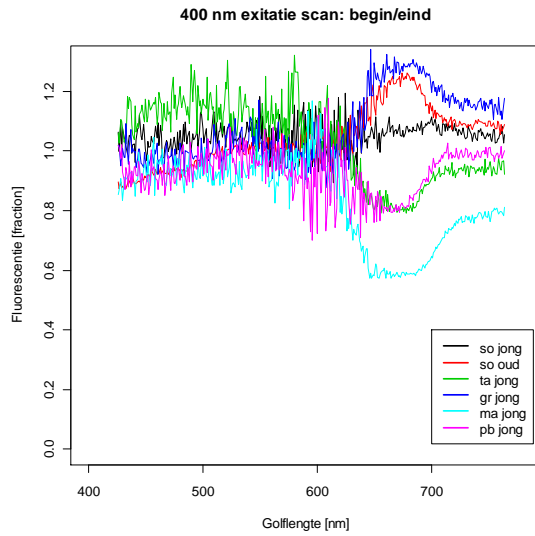
Figuur 2: Excitatie spectra van de verschillende planten voor de fluorescentie in het blauw (445 nm), blauw-groen (495 nm), groen (525 nm), rood (687 nm), rood-infrarood (705 nm) en infrarood (735 nm).

De fluorescentie in het blauw en het groen laten een vergelijkbare trend zien. De fluorescentie in het UV (< 400 nm) is het hoogst voor gras en rogge met daarop volgend mais (monocotylen). Het laagst is de fluorescentie van het jonge soja blad maar het oude soja blad laat op 380 nm juist een zeer sterke fluorescentie zien. Voor alle plant soorten neemt de fluorescentie in het groen en blauw snel af bij een excitatie golflengte van boven de 380 nm. De fluorescentie in het rood, rood-infrarood en infrarood is ook vrij gelijkvormig voor de verschillende plant soorten. Er is een sterke toename van de fluorescentie bij excitatie licht tussen 400 en 480 nm, daarna neemt de fluorescentie sterk af tot 520 nm om vervolgens weer toe te nemen tot 650 nm. In de drie grafieken lijken de spectra van het jonge en oude soja blad veel meer op elkaar dan dat deze op de spectra van een van de andere plantsoorten lijken. Voor fluorescentie in het rood lijkt het spectrum van het paardenbloem blad zich te onderscheiden van de andere door een dal bij 440 en een extra piek bij 600 nm. Verder is de fluorescentie van de monocotylen (rogge, tarwe, mais en gras) lager dan die van soja en paardenbloem planten (beide dicotylen). Dit is door Longchamps et al. (2010) ook gevonden.

2.2 De trend van de fluorescentie intensiteit bij een excitatie op 400 nm

De bladeren waarvan de fluorescentie bepaald werd zijn vlak voor het experiment van de plant geplukt. Aan het begin en eind van de metingen aan één blad is een scan met 400 nm excitatie licht gemaakt. In Figuur 3 is de verhouding gegeven van de fluorescentie tussen de eerste en tweede scan. De fluorescentie onder de 630 nm verandert niet als functie van de tijd (de ruis is hoog omdat de signalen laag zijn). Tussen 630 en 750 nm is een duidelijk verloop van de fluorescentie zichtbaar, soms neemt de fluorescentie toe en soms neemt deze af. In het 630 en 750 nm gebied fluoresceert het chlorofyl. De fluorescentie van het chlorofyl verloopt dus met tijd maar in het blauw en groen gebeurt dat niet. De stoffen die fluoresceren in het blauw en groen zijn daarom geen onderdeel van de fotosystemen omdat dan dit effect in zowel het blauw, groen als in het rood en infrarood zichtbaar moet zijn. Het is daardoor aannemelijk dat deze fluorescentie van pigmenten in de epidermis van het blad afkomstig is (Longchamps et al., 2010).

In Figuur 3 neemt voor sommige planten de fluorescentie met de tijd toe terwijl voor andere planten de fluorescentie afneemt. De bladeren van gras en soja laten een afnemende trend zien en de bladeren van tarwe, mais en paardenbloem een toename. Een trend in de fluorescentie is niet eenduidig te verklaren. Een toename van de fluorescentie betekend een afname van de efficiëntie van de fotosystemen en dit duidt op stress maar een afstervend blad zal op den duur altijd een afname in fluorescentie laten zien. Een geplukt blad zal waarschijnlijk eerst een toename van de fluorescentie laten zien en daarna een afname. De tijdsduur waarin de toename of afname optreedt, is mogelijk voor elk blad en plantsoort anders. Hieruit kunnen we concluderen dat het beter is het blad aan de plant te laten zitten bij een fluorescentie metingen.



Figuur 3: Verhouding tussen de fluorescentie scans van de verschillende planten bij een excitatie golflengte van 400 nm. Voor golflengten kleiner dan 630 nm verandert er niet veel met de fluorescentie van het blad gedurende de metingen. Tussen 630 en 750 nm is er een duidelijke verandering te zien.

3. Conclusies deel 1

De metingen laten 4 fluorescentie pieken zien de maxima hiervan zijn interessante fluorescentie golflengten in toekomstige experimenten. Daarnaast zijn de minima tussen twee maxima interessant omdat daar de competitie tussen de twee maxima zichtbaar wordt. De golflengten in het blauw, in het blauw-groen, in het groen, in het rood, in het rood-infrarood en in het infrarood zijn daarom de belangrijkste fluorescentie golflengten, fluorescentie op andere golflengten bevat geen extra informatie. Bij de vervolgmetingen zullen deze fluorescentie golflengten vast gekozen worden en de excitatie golflengten worden gevarieerd.

Het blauwe en groene maximum is vooral goed zichtbaar bij een excitatie golflengte van onder de 400 nm. De fluorescentie in het rood en infrarood laten meer structuur zien maar door de lage resolutie (excitatie stapgrootte 20 nm) is de structuur nog niet goed zichtbaar. Het lijkt er op dat de chlorofylfluorescentie van de monocotylen in het algemeen lager is dan die van de dicotylen.

Het plukken van de bladeren is bij deze metingen af te raden omdat dit de fluorescentie van het chlorofyl beïnvloed. De fluorescentie in het blauw en groen is van stoffen afkomstig die niet gekoppeld zijn met de fotosystemen.

3.1 Bepalingen voor experimenten deel 2

Bij het volgende experiment zullen de volgende aanpassingen worden gemaakt:

- De excitatie fluorescentie spectra worden gemeten bij de vaste fluorescentie golflengten in het blauw, blauw-groen, groen, rood, rood-infrarood en infrarood i.p.v. de fluorescentie spectra.
- De excitatiescan zal beginnen bij 340 nm.
- Het blad van de planten moet aan de plant blijven zitten. Een andere lichtdichte doos moet daarvoor gemaakt worden.
- Verschillende bladeren van dezelfde planten (waaronder verschillende bladleeftijd) en verschillende planten van hetzelfde soort moeten gemeten worden om de mogelijkheden van plant onderscheid te kunnen onderzoeken met behulp van discriminant analyse.
- Meer dicotyplanten moeten in het experiment mee genomen worden (lijst opstellen).
- De resolutie van het excitatie spectrum moet naar 1 nm gebracht worden.
- De integratietijd tijdens de metingen is tenminste 0.2 seconden.

Deel 2: Plantidentificatie door middel van fluorescentie

4. Apparatuur en methode

4.1 De planten

In het nieuwe experiment zijn de spectra van verschillende bladeren, verschillende plantsoorten, kasplanten en buitenplanten en van drie verschillende planten (herhalingen) gemeten. Voor dit experiment zijn straatgras-, paardenbloem-, melganzenvoet-, aardappel-, soja-, mais-, tarwe- en rogge planten gekweekt/verzameld zowel uit de kas als van het veld. De tijd die nodig was om de fluorescentie spectra van één plant te bepalen was ongeveer 1 uur, er waren 3 meetdagen beschikbaar dus het werd onmogelijk de spectra van alle planten te meten. De rogge planten uit het veld waren ziek (schimmel), de grasplantjes uit de kas waren klein en de paardenbloemen en tarweplanten uit het veld hadden weinig bladoppervlak. Maar de aardappel- mais- en melganzenvoet- planten van zowel het veld als uit de kas waren mooie exemplaren. Er is daarom besloten de fluorescentiemetingen alleen uit te voeren aan de aardappel-, mais- en melganzenvoet- planten (uit de kas en van het veld). Ook een paar metingen aan sojaplanten uit de kas zijn gedaan (foto's van de planten zijn in Bijlage I gegeven).

Op elke plant zijn drie bladeren geselecteerd en genummerd van 1 tot 3. Nummer 1 was een jong blad bovenin de plant, blad 2 was een blad halverwege de plant en blad 3 was een van de onderste bladeren. Van de aardappel en mais veldplanten waren maar 2 planten beschikbaar. Van deze planten zijn toen 2 sets (verschillende) bladeren op één van de twee planten geselecteerd.

De metingen zijn van 5-7-2011 tot en met 7-7-2011 uitgevoerd. De kasplanten zijn op 27-5-2011 gezaaid of gepoot (aardappel). De aardappel planten van het veld zijn op 26-4-2011 gepoot en de mais is op 19-4-2011 gezaaid. De leeftijd van de kasplanten tijdens de meting was daardoor ongeveer 6 weken (Tabel 1). De leeftijd van de aardappel en maisplanten van het veld was respectievelijk 10 en 11 weken. De leeftijd van de melganzenvoet van het veld is onbekend omdat dit wilde planten waren en dus de kiemdatum onbekend is.

Tabel 1: Zaai data en plantleeftijden.

Plantsoort	Kweek plaats	Zaai/poot datum	Meet datum	Plantleeftijd weken
Aardappel	kas	27-5-2011	5-7-2011	5.6
Aardappel	veld	26-4-2011	6-7-2011	10.1
Mais	kas	27-5-2011	6-7-2011	5.7
Mais	veld	19-4-2011	6-7-2011	11.1
Melganzenvoet	kas	27-5-2011	7-7-2011	5.9
Melganzenvoet	veld	?	7-7-2011	?
Soja	kas	27-5-2011	7-7-2011	5.9

De bladeren zijn bij de meting niet van de planten geplukt omdat uit het experiment in deel 1 bleek dat plukken een grote invloed heeft op de fluorescentie metingen.

4.2 De meetopstelling

De Fluorimeter bestaat uit een lichtbron met wit licht dat wordt gefilterd door middel van een monochromator (excitatie monochromator). Dit licht valt op het blad dat vervolgens fluorescentie uitstraalt. Een tweede monochromator (fluorescentie monochromator) filtert één kleur uit het fluorescentie licht van het blad en een photon multiplier tube (PMT) met detector meet de intensiteit van dit licht. Voor elk van de 6 fluorescentie golflengten (blauw, blauw-groen, groen, rood, rood-infrarood en infrarood) is een excitatie spectrum opgenomen van 340 tot 720 nm. De stapgrootte in het spectrum is 1 nm en de integratietijd 0.2 seconden. De bandpass voor de excitatie

monochromator was 5 nm (dat wil zeggen dat de slitsize van de monochromator zo gekozen is dat de bandpass correspondeert met een spreiding van 5 nm in de excitatie golflengte) en voor de fluorescentie monochromator was de bandpass 10 nm. De fluorimeter waarmee de metingen zijn uitgevoerd is een Fluorolog 3.22 (Jobin Yvon-Spex, Figuur 4). De excitatie lamp van de fluorimeter is een Xenon lamp (450 W xenon CW lamp).



Figuur 4: Fluorimeter gebruikt in de experimenten. Op de achtergrond staat de lamp.

Er is gebruik gemaakt van een fiber uitkoppelingsmodule (fiberprobe) van deze fluorimeter. Het excitatie licht uit de monochromator wordt hiermee uit de fluorimeter gekoppeld en met een fiber naar het blad geleid. Een tweede fiber pikt de fluorescentie (front face) weer op en koppelt dat weer in de fluorescentie monochromator. Een groot deel van de licht intensiteit gaat verloren met het twee keer inkoppelen in de fibers maar doordat gebruik gemaakt wordt van een PMT is maar weinig licht nodig. De fiberprobe is bij de metingen in een statief vlak boven het blad van de plant geklemd.

De planten werden tijdens de metingen in een donkere ruimte geplaatst. Voor de kleinere planten (Aardappel uit de kas, Melganzenvoet uit de kas en het veld, Soja uit de kas) is een houten kastje gebruikt dat aan de binnenkant met zwarte verf was beschilderd. Voor de wat grotere planten is een grote kartonnen doos gebruikt (Aardappel van veld en Mais uit kas). De maisplanten uit het veld waren zo groot dat ze niet in een kast pasten. De fluorescentie van deze planten is zonder afscherming in het lab gemeten (tl-licht is uitgedaan).

Er zijn referentie spectra genomen door het jongste blad van plant 1 van de aardappelplanten uit de kas bij ieder meetserie van een plant mee te meten.

4.3 Verwerking gegevens

De verwerking van de gegevens komt neer op het vinden van een set excitatie- en fluorescentiegolflengten waarbij de verschillende planten van elkaar te onderscheiden zijn. De gegevens bestaan uit excitatie spectra gemeten op 6 verschillende fluorescentie golflengten. Bij de verwerking wordt met een Quadratic discriminant analyse (QDA) routine gewerkt (uit de klaR and MASS Package van R statistical computing). Voor deze routine moet iedere meting wel uit meerdere (hier 3) herhalingen bestaan.

De ruwe excitatie spectra bevatten nog pieken die geen plant fluorescentie bevatten. Dit zijn pieken afkomstig van het directe excitatie licht (de golflengte van de excitatie is gelijk aan fluorescentie), de dubbele golflengte pieken (1^e orde van het tralie van de excitatie monochromator komt overeen met de transmissie van de fluorescentie monochromator) en de halve golflengte pieken (transmissie van de excitatie monochromator is gelijk aan 1^e orde van het tralie van de fluorescentie monochromator). Deze zijn eerst verwijderd. Vervolgens zijn de gezuiverde 6 excitatie spectra (gemeten bij elk van de fluorescentie golflengten) samen gevoegd tot één spectrum door de 6 spectra

achter elkaar te zetten in één combinatiespectrum. Deze combinatiespectra zijn gebruikt in de QDA-routine. De combinatiespectra zijn 1352 datapunten lang.

4.3.1 Fluorescentievingerafdruk

De combinatiespectra zijn te groeperen in 4 plantsoorten (aardappel, mais, melganzenvoet en soja hoewel soja niet altijd gebruikt is in de vergelijking), 2 kweekplaatsen (kas of veld), 3 herhalingen, 3 bladhoogten/bladleeftijden en referentiespectra. In totaal zijn 377 combinatiespectra gemaakt. De spectra in deze studie zijn te groeperen “soort”, “blad”, “plaats”, “soort&blad”, “soort&plaats” en “plaats&blad”. Klassennamen met een ‘&’ zijn gegroepeerd op beide kenmerken. Met de QDA-routine is 20 maal (slechts 20 maal omdat bij zulke grote combinatiespectra deze routine veel rekentijd kost) een onderscheidende set van golflengten bepaald (een vingerafdruk) waarbij bij iedere nieuwe bepaling de eerder geselecteerde golflengten uit de input set zijn verwijderd (een fluorescentie/excitatie golflengtecombinatie kan dus maar één keer worden geselecteerd door de QDA-routine). De QDA routine selecteert hierbij één rij in de matrix van combinatiespectra (behorend bij één fluorescentie golflengte en één excitatie golflengte) en bepaald daarvoor de mate waarin de planten van elkaar te onderscheiden zijn. Vervolgens wordt een nieuwe rij in de matrix van combinatie spectra geselecteerd en bepaald of het onderscheid beter wordt. Dit wordt herhaald totdat een nieuwe rij niet resulteert in een 5% beter onderscheid.

Niet al de gevonden vingerafdrucken zijn interessant omdat zij ook op toeval kunnen berusten (veroorzaakt door ruis op de meting). In discriminant analysis wordt meestal een testgroep en een evaluatie groep in de metingen onderscheiden. De vingerafdrucken worden dan bepaald uit de testgroep en gecontroleerd met de evaluatie groep). Om de verwerking zo in te richten zijn een groot aantal herhalingen nodig (>50). Voor deze metingen was dat niet mogelijk omdat metingen te veel tijd in beslag nam.

Om toch de kwaliteit van een vingerafdruk te kunnen bepalen is in dit verslag gekeken naar de volgorde van opeenvolgende geselecteerde fluorescentiegolflengten (geen excitatie golflengten) in een vingerafdruk. Omdat de geselecteerde rijen maar één keer geselecteerd kunnen worden bestaan alle vingerafdrucken uit een unieke set excitatie/fluorescentie golflengten. Wanneer een sequentie vaker optreedt moet dat komen doordat die vingerafdruk een beter onderscheid levert dan die van minder vaak voorkomende sequenties omdat het onderscheid dan op meerdere excitatie golflengten gebaseerd is (en dus niet door ruis veroorzaakt kan zijn). Als in meer dan 3 vingerafdrucken (van de 20) de zelfde sequentie fluorescentiegolflengten voorkomt is de waarschijnlijkheid groot dat die vingerafdruk niet per toeval is geselecteerd.

4.3.2 Vingerafdrucken bepaald uit combinatiespectra gesorteerd van rood naar blauw

De scans van de fluorimeter zijn altijd van blauw naar rood opgenomen waardoor de combinatie spectra ook in die richting zijn gesorteerd. Dit kan van invloed zijn op de geselecteerde golflengten in de vingerafdrucken. In deze test worden de combinatiespectra van rood naar blauw gesorteerd en de vingerafdrucken opnieuw bepaald. Als de nieuwe vingerafdrucken sterke gelijkenis vertonen met de vingerafdrucken uit de voorgaande test zal de volgorde van de golflengte in de combinatiespectra niet van invloed zijn op de vingerafdrucken.

5. Resultaten

5.1 Vingerafdrukken uit de combinatiespectra

De mate van onderscheid van de vingerafdrukken tussen de groepen in de combinatiespectra zijn gegeven in Tabel 2. In de 3^e kolom zijn de kansen gegeven voor een juiste classificatie van een plant in één van de groepen. In kolom 4 zijn de standaarddeviaties gegeven en in kolom 5 de significantie (t-test) ten opzichte van een random classificatie. In de laatste kolom is de gemiddelde kans voor correcte classificatie in een groep gegeven. De doelstelling voor deze metingen is een onderscheid tussen de planten met 95% betrouwbaarheid te kunnen maken, de classificatie op soort is met 81% het hoogst. De andere klassen hebben een veel lagere kans op juiste classificatie.

Tabel 2: Resultaten QDA-routine voor individuele groepen. "ns" staat voor niet significant.

Klassen	Groep	Gem. kans	Std.	sign.	Gem. kans
		juiste klas. per groep	kans	p	per klasse
soort	aard	0.90	0.06	<0.01	0.81
	mais	0.72	0.05	<0.01	
	melg	0.82	0.08	<0.01	
blad	1	0.34	0.03	ns	0.37
	2	0.47	0.06	<0.05	
	3	0.30	0.05	ns	
plaats	kas	0.53	0.02	ns	0.50
	veld	0.47	0.02	ns	
soort&blad	aard&1	0.44	0.08	<0.01	0.42
	aard&2	0.26	0.07	<0.05	
	aard&3	0.53	0.11	<0.01	
	mais&3	0.22	0.09	ns	
	mais&1	0.70	0.10	<0.01	
	mais&2	0.52	0.09	<0.01	
	melg&3	0.44	0.14	<0.05	
	melg&1	0.28	0.11	ns	
	melg&2	0.42	0.11	<0.01	
soort&plaats	aard&kas	0.54	0.10	<0.01	0.51
	aard&veld	0.47	0.11	<0.01	
	mais&kas	0.63	0.13	<0.01	
	mais&veld	0.51	0.11	<0.01	
	melg&kas	0.57	0.09	<0.01	
	melg&veld	0.35	0.09	<0.05	
plaats&blad	ka&s1	0.22	0.07	ns	0.21
	kas&2	0.19	0.04	ns	
	kas&3	0.12	0.07	ns	
	veld&1	0.18	0.08	ns	
	veld&2	0.23	0.07	ns	
	veld&3	0.32	0.07	<0.05	

De 20 QDA-runs geven 20 vingerafdrukken die bestaan uit een set van excitatie/fluorescentie golflengten. In de praktijk blijkt dat deze vingerafdrukken uit een set van 2 tot 3 excitatie/fluorescentie golflengte paren bestaan.

5.1.1 Onderscheid gewas versus onkruid

In veel toepassingen is het onderscheid tussen gewas en onkruid van belang. In die situatie is de vingerafdruk van het gewas bekend maar niet die van het onkruid, een bekende vingerafdruk zal dan van anderen onbekende vingerafdrukken onderscheiden moeten worden. De fluorescentiespectra van 4 soorten planten zijn in dit onderzoek gemeten. Een indicatie van het mogelijk onderscheid dat in deze situatie mogelijk is wordt verkregen door het onderscheid van iedere soort versus de rest te berekenen.

In Tabel 3 is de kans op een juiste classificatie gegeven waarbij maar twee groepen zijn onderscheiden, "gewas" en "rest". Achtereenvolgens werden de spectra van een van de plantsoorten in de groep "gewas"-planten gezet en de spectra van de andere planten in "rest". De "gewas"-planten zijn maar met een 70% zekerheid te onderscheiden, de rest (onkruid) is met 90% zekerheid te onderscheiden. Mogelijk komt dat doordat de spectra telkens uit meer "rest" planten dan "gewas"-planten bestaan.

Tabel 3: Resultaten van de QDA-routine voor een gewas versus de rest

Klassen	Groep	Gem. kans	Std.	sign.
		juiste klas. per groep	kans	p
gewas	aard	0.69	0.03	<0.01
	rest	0.92	0.02	<0.01
gewas	mais	0.69	0.01	<0.01
	rest	0.90	0.01	<0.01
gewas	melg	0.69	0.02	<0.01
	rest	0.90	0.01	<0.01
gewas	soja	0.70	0.03	<0.01
	rest	0.91	0.01	<0.01

5.1.2 Vingerafdrukken bepaald uit combinatiespectra gesorteerd van rood naar blauw

Het aantal vingerafdrukken geturfd voor spectra gesorteerd van blauw naar rood en voor spectra gesorteerd van rood naar blauw vertonen een vrijwel gelijke verdeling over de klassen die zijn gebruikt. De volgorde in de aangeboden golflengten blijkt daarom niet van belang te zijn.

6. Conclusies deel 2

Uit Tabel 2 volgt dat onderscheid tussen soorten met de QDA routine goed mogelijk is, hoewel 80% betrouwbaarheid nog aan de lage kant is. Het onderscheid tussen “blad”, “plaats”, “soort&blad”, “soort&plaats” en “plaats&blad” resulteert wel in significante maar niet in betrouwbare resultaten (kansen $\leq 50\%$). Het onderscheid tussen soorten wordt voornamelijk met de blauw-groen fluorescentie verkregen. Het onderscheid op “plaats” en “plaats&blad” wordt met golflengten in de chlorofylfluorescentie verkregen maar deze zijn niet significant (Tabel 2). De volgorde waarin de golflengten in de combinatiespectra geordend zijn blijkt geen invloed te hebben op de selectie van de vingerafdrukken.

Als het spectrum van één “soort” (gewas) vergeleken wordt met de rest (onkruid) neemt het onderscheid van het “gewas” af tot 70%. Het lijkt dus nodig ook de spectra van alle soorten onkruid in het veld te kennen om een goed onderscheid mogelijk te maken. Deze stelling moet in een uitgebreider onderzoek met meer plantsoorten verder onderzocht worden.

7. Vervolg experimenten

Uit de experimenten in de voorgaande onderzoeken (deel 1) blijkt weinig structuur in de fluorescentiespectra en veel structuur in de excitatiespectra. Het onderzoek in deel 2 laat zien dat QDA een goed onderscheid tussen een groeipindel van verschillende soorten kan maken maar dat groeipindelings naar bladhoogte, plaats (kas of veld) en de mengvormen van soort, blad en plaats een slecht onderscheid gaven. Aan de andere kant blijkt daaruit ook dat het onderscheid tussen "soort" aan de ene kant en "blad" en "plaats" aan de andere kant niet met elkaar interfereren.

De conclusies uit deze cijfers hebben nog een beperkte waarde, de spectra van maar 3 plantsoorten zijn gemeten en van elke soort maar 3 herhalingen. Het is daarom belangrijk ook bij nieuwe metingen de gehele excitatiespectra door te meten om te voorkomen dat belangrijke golflengten buiten de gemeten spectra vallen. Want het is nog niet duidelijk of de gevonden golflengten alleen voor deze plantsoorten onderscheidend zijn of dat deze golflengten ook voor andere plantsoorten een goed onderscheid geven.

De meettijd van 1 uur per plant zal daarom naar beneden gebracht moeten worden om een groot aantal nieuwe bladeren van planten door te meten. Het is mogelijk de spectra te limiteren tot alleen de interessante delen, dus zonder de stoopieken van rechtstreeks excitatielicht, dat zou de meettijd 40% verkorten. Een andere mogelijkheid is om de integratietijd naar beneden te brengen door met een lagere (golflengte)resolutie te gaan meten.

Het wordt ook interessant het onderzoek uit te breiden naar onderscheid tussen zieke en gezonde planten. Het is nog niet duidelijk of zieke en gezonde planten onderscheiden kunnen worden en of verschillende ziekten onderscheiden kunnen worden. Nu er een database aangelegd gaat worden is het misschien een goed idee ook alvast een studie naar zieke planten te doen. De gemeten spectra kunnen dan gelijk voor dit onderscheid gebruikt worden.

8. **Literatuur**

Roberta Croce, Gianfelice Cinque, Alfred R. Holzwarth en Roberto Bassi, 2000.

The Soret absorption properties of carotenoids and chlorophylls in antenna complexes of higher plants
,Photosynthesis Research, vol. 64, pp. 221–231.

Longchamps L., Panneton B., Samson G., Leroux G. D., Thériault R, 2010.

Discrimination of corn, grasses and dicot weeds by their UV-induced fluorescence spectral signature, Precision Agric
(2010) 11, pp. 181–197.

Belefant-Miller H., Miller G. H., and Rutger J. N., 2005.

Nondestructive Measurement of Carotenoids in Plant Tissues by Fluorescence Quenching, Crop Science, vol. 45, pp.
1786–1789.

Bijlage I.

De planten gebruikt in deel 2 van dit rapport.



Figuur 5: Aardappel planten gekweekt in de kas. Van links naar rechts plant 1, plant 2 en plant 3.



Figuur 6: aardappel planten van het veld. Links plant 1 en rechts plant 2 maar van deze plant is een tweede set bladeren gemeten waardoor deze plant ook plant 3 genoemd is.



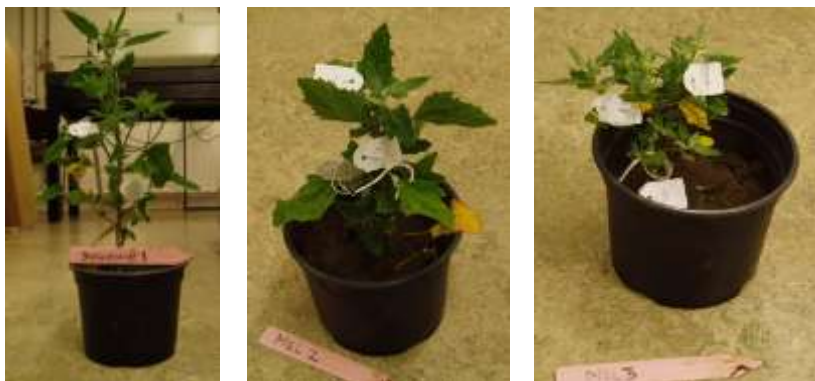
Figuur 7: Plant 1, 2 en 3 van maisplanten uit de kas.



Figuur 8: Plant 1 en 2 van de maisplanten uit het veld. Op plant 1 zijn 2 sets bladeren geselecteerd, de tweede set is plant 3 gelabeld.



Figuur 9: plant 1, 2 en 3 van de Melganzenvoet planten uit de kas.



Figuur 10: Plant 1, 2 en 3 van de Melanzenvoet planten van het veld.



Figuur 11: Soja planten 1 en 2 gekweekt in de kas.