

Arbejdspakke 1: Fænotyping af rodvækst og funktion, markvalidering og billedanalyse for effektivisering af rodfænotyping

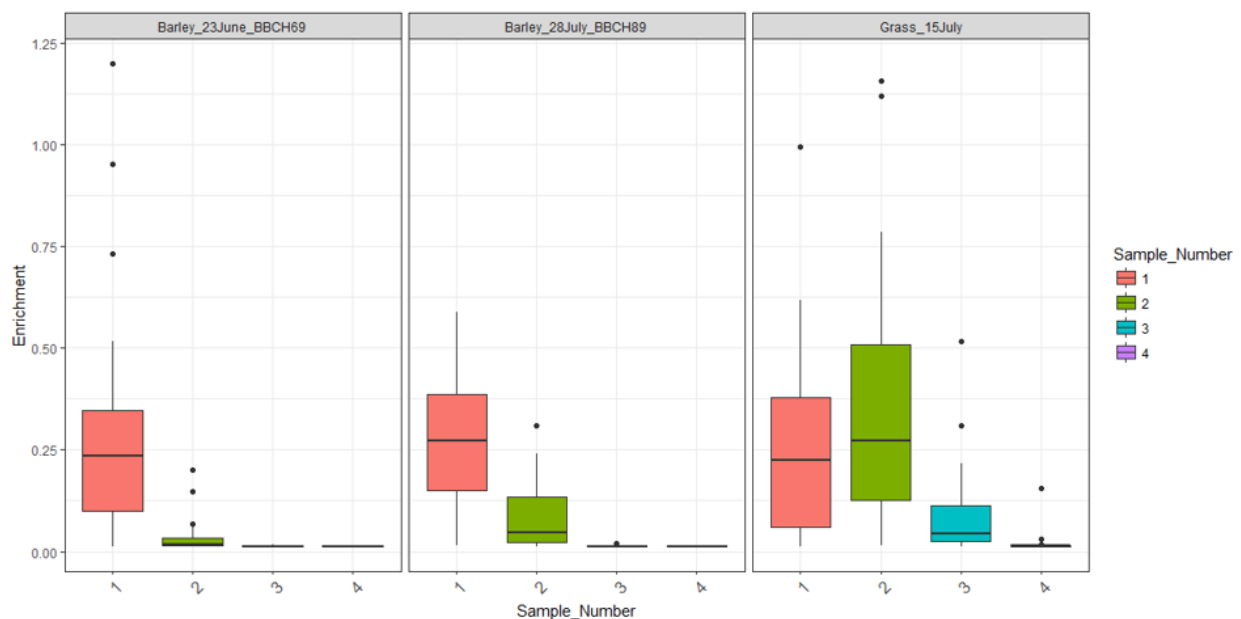
Institut for Plante og Miljøvidenskab, Københavns Universitet

Kristian Thorup-Kristensen, Jesper Svendsgaard, Simon Fiil Svane, Milan Popovic, Si Chen, Thomas Georg Roitsch

AP 1.1 Udnyttelse af RadiMax faciliteten

Direkte måling af vand og N optag: Der er i 2017 gennemført målinger af optagelse af isotopmærket kvælstof (^{15}N) og vand ($^2\text{H}_2\text{O}$), der er tilført med drypslanger som ligger langs med 15 af minirhizotruerne i hvert af de 4 RadiMax delanlæg. Der er tilført ^{15}N til 30 byglinjer (16. juni) og tilført både ^{15}N og isotopmærket vand til 15 græslinjer (20. juni). Optagelsen af ^{15}N i byggen er målt 2 gange, dels ved prøver af faneblade udtaget 23. juni og dels ved målinger på ^{15}N i det høstede kernemateriale. ^{15}N målingerne er lavet 4 steder i hver planterække, hvor ^{15}N er tilført i forskellige dybder, så optagelsen kan korreleres til de målte forskelle i roddebyde imellem genotyperne. Tilsvarende bladmålinger er lavet i græsserne med prøvetagning 15. juli.

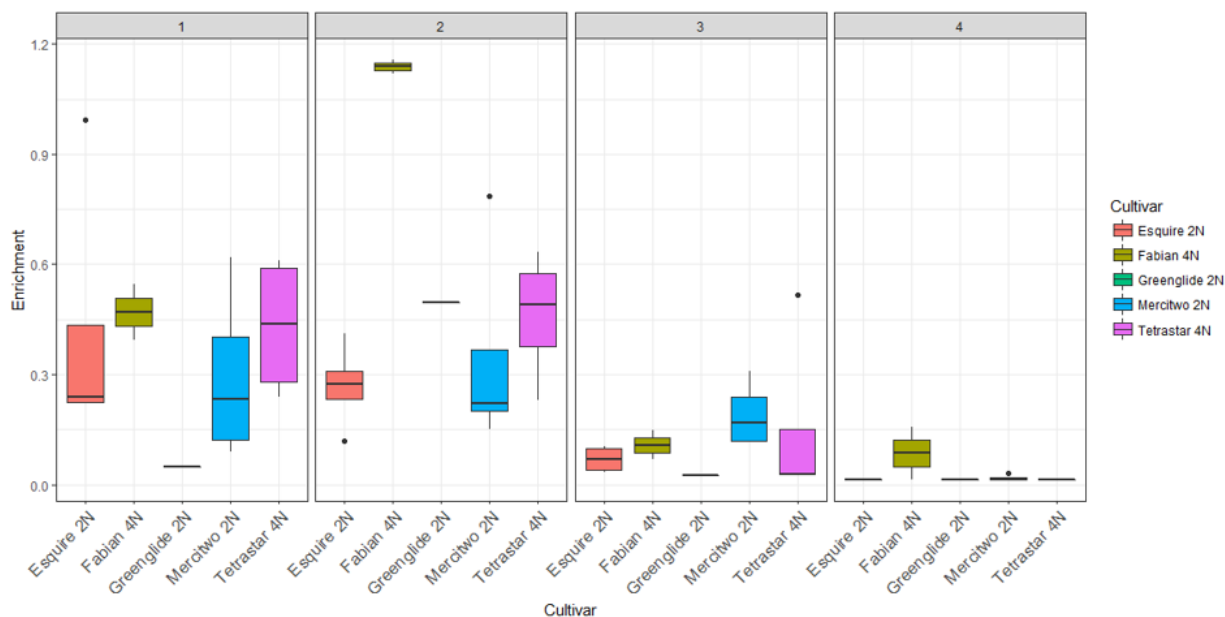
I byggen viste planterne generelt højt optag fra den mest øverste tilførsel, væsentligt lavere optagelse fra dybde 2, og stort set ingen optag fra dybde 3 og 4 (Figur 1). Optagelsen fra det næst-øverste lag var klart højere ved analyse i kerne, end ved analyse af faneblade fra 23. juni. For græsserne så vi optagelse fra alle jordlag, fuld effektivitet fra de to øverste lag, og derfra klart faldende optagelse med stigende tilførselsdybde fra dybde 3 og 4.



Figur 1: ^{15}N berigelse af byg og græs materiale efter tilførsel til 4 forskellige dybde (sample_number). Prøver fra faneblade i byg (23. juni), fra bygkerne (28. juli) og fra græsblade (15. juli). De to delanlæg med byg har total dybde på 3 meter, mens de to delanlæg med græsser kun har en dybde på 2 meter, så begge arter har haft ^{15}N optagelse ned til ca. 1,5 meters dybde, svarende til den målte roddebyde.

Målinger på nabolinjer bekræftede at ^{15}N primært optages af den linje der er sået direkte over tilførselslinjen (5 cm forskudt), de optog ca. 5 gange så meget som nabolinjen der er sået ca. 20 cm derfra.

Figur 2 viser eksempel på sortsforskelle i ^{15}N optagelse i græsser, der kunne også ses forskelle i byggen. Disse data skal nu analyseres og det skal analyseres om der kan dokumenteres sammenhænge imellem rodmålingerne og målingerne af optagelse af ^{15}N og isotopmærket vand.



Figur 1: ^{15}N berigelse i græsprøver med 4 dybder af tilførsel til 5 sorter. Sorten 'Fabian 4N' viser generelt højere optage end de andre sorter fra alle jordlag, og især fra det dybeste jordlag viser den markant højere optag.

Ved tilførsel af isotopmærket vand er målingerne foretaget ved at sætte plastikposer over planter på 5 forskellige positioner i rækkerne (21. juni, 4 sorter i 4 gentagelser), og derved opsamle transpirationsvand. I det omfang planterne optager isotopmærket vand, vil transpirationsvandet også blive mærket, så vi på den måde kan måle optagelse af vand fra forskellige dybder. Prøverne afventer analyse.

Fysiologisk fænotyping: Vi har startet arbejdet med fysiologisk fænotyping i 2017, ved at prøve det på 7 bygsorter dyrket på 5 lokaliteter i Danmark, se AP 1.3. Ud fra resultaterne af dette arbejde vil vi afgøre om og hvordan det kan inddrages i RadiMax arbejdet i 2018. Vi har sikret at de vinterhvede sorter der nu er sået ud 4 steder i landet, også alle er med i RadiMax, så vi i 2018 kan gennemføre fysiologisk fænotyping på sorterne både fra et antal markforsøg og i RadiMax langs vandstress gradienten.

$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotop ratio som tørkestres indikator: Fotosyntesen diskriminerer imellem C isotoper, sådan at der indbygges en lidt større andel af ^{12}C i biomassen end det der findes i atmosfæren. Denne diskrimination er stærkest når stomata er fuldt åbne, og afhænger derfor af i hvor høj grad planterne er tørkestressede. Måling af $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ratio er en anderkendt metode til at måle graden af tørkestres en afgrøde har været udsat for. Vi vil analysere prøver fra udvalgte prøver fra RadiMax fra 2017, for at undersøge metodens anvendelighed til at kvantificere tørkestres i RadiMax, både sortsforskelle og tørkestres gradienten i anlægget.

AP 1.2 Videreudvikling af "Herbicidkasse" til rodscreening

Der er ikke gennemført arbejde på dette i 2017, vi forventer at starte arbejdet op i 2018.

AP 1.3 Markvalidering på flere lokaliteter

Markvalidering sorter*lokaliteter, kvælstofudnyttelseseffektivitet (NUE): Der er i 2017 lavet forsøg med 7 sorter af vårbyg udsået på KUs forsøgsarealer i Taastrup og på 4 andre lokaliteter i Danmark i samarbejde med Seges, 2 i Jylland, 1 på Fyn og en på Midsjælland, for at måle genotype*environment (G*E) effekter på NUE. På KUs forsøgsarealer blev forsøget gennemført ved 2 N niveauer, dels ved optimal N gødskning og ved 40 kg N under optimal gødskning. I forsøgene er der udtaget biomasseprøver ved blomstring, og igen ved fysiologisk modenhed. Der er foretaget almindelig parcellhøst og udbytteopgørelse ved fuld modenhed. Derudover er der udtaget prøver til fysiologisk fænotyping i form af faneblade ved skridning, og faneblade og kerner midt i kernefyldningsfasen.

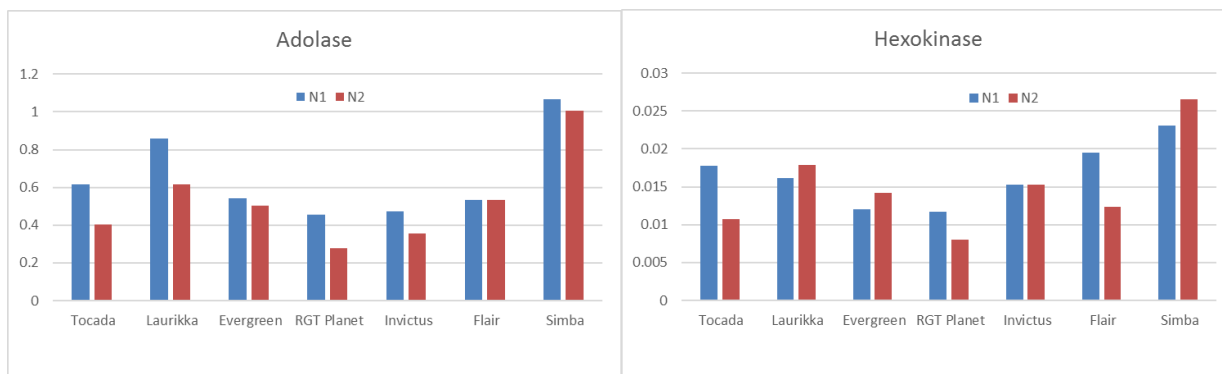
Vårbygssorterne blev udvalgt bl.a. med udgangspunkt i rodmålinger fra RadiMax i 2016, men også andre aspekter af Nitrogen Use Efficiency (NUE). Der er valgt sorter med kraftig tidlig vegetativ vækst og sorter med svagere vegetativ vækst og buskning, og sorter med forventet høj og lav NUE. Resultaterne for biomasse på de forskellige måledatoer og for udbytte og N i kerne ved høst bekræfter at vi har fundet sorter med klart forskellige egenskaber som ønsket.

Resultaterne viser at sorterne havde forskellig vækstrytme, forskelligt niveau af N i kerne og forskellig total N optagelse. Udbyttene var ret forskellige imellem lokaliteterne, men der var alligevel systematiske forskelle imellem sorterne. Udbyttet varierede med max. 14% imellem sorterne, mens N optagelse og %N i kerne varierede med max. 10%. Selvom variationen i N optagelse og %N var lidt mindre end variationen i udbytte, var sortsforskellene i N mere konstante på tværs af lokaliteterne end udbyttet, hvilket tyder på at forskelle i NUE er stærkt genetisk styrede.

Vi har dermed opnået et vellykket udvalg af sorter til de videre analyser af forskelle i NUE.

Fysiologisk fænotyping: Ved fysiologisk fænotyping analyserer vi aktiviteten af et antal enzymer som er afgørende for plantens omsætning af kulhydrater og kvælstof, og som dermed er vigtige i de processer som afgør plantens udnyttelse af kvælstof til vækst og biomasseproduktion. Ved måling på faneblade ved blomstring måler vi på væv der er afgørende for kulhydrat eksport (source tissue) til akset under blomstringsfasen som er kritisk for den senere udbyttedannelse. Ved måling på faneblade under kernefyldning er det stadig "source tissue" vi måler på, men på dette tidspunkt leverer fanebladet kulhydrat og N til de voksende kerner som udgør et kraftigt sink. Måling på kernerne på samme tidspunkt viser enzymaktiviteter i "sink tissue", da de umodne kerner på dette tidspunkt har en høj aktivitet af indbygning af kulhydrat i stivelse og N i protein.

De første resultater af enzymaktiviteter målt på prøver af faneblade høstet ved blomstring fra forsøget på KU viser at der for nogen af enzymerne er store forskelle imellem sorterne. Resultaterne tyder også på at disse forskelle kan relateres til NUE. Sorten 'Simba', der havde den klart højeste %N i kernen, havde høj aktivitet af mindst 8 af de første 12 enzymer vi målte på, mens sorten med lavest %N i kernen (RGT Planet) tilsvarende havde klart lav aktivitet af i hvert fald 7 af de 12 enzymer (Figur 3). Det er et lovende resultat, der tyder på at vi vil kunne relatere enzymaktiviteter i faneblade ved blomstring til %N i kerne ved høst, men det er naturligvis for tidligt at drage nogen konklusioner på dette. I den kommende tid skal enzymaktivitetsmålinger gennemføres på de resterende prøver, og resultaterne skal analyseres for sammenhænge imellem agronomiske mål for NUE og enzymaktivitetsdata for begge prøvedatoer og for både source og sink materiale.



Figur 3: To eksempler på markante forskelle i enzymaktiviteter målt på faneblade ved blomstring fra forsøget på KUs arealer i Taastrup, ved 2 N niveauer.

Målet er at identificere et mindre antal af enzymer som giver særlig relevant information om NUE, og som vi kan bruge i studierne i 2018 og 2019.

Sorter af vinterhvede etableret til markvalidering i 2018: Vi har i efteråret 2017 udlagt vinterhvede forsøg efter samme forsøgsplan som vårbyggen i 2017. På grund af de meget vanskelige betingelser for såning af vinterhvede var der en lokalitet hvor det ikke lykkedes at så vinterhveden, så de 7 sorter er udsået på KUs arealer (2 N niveauer) og 3 andre lokaliteter.

Hvedesorterne er udvalgt efter samme principper som bygsorterne i 2017, men for vinterhvede er der langt større sortsvariation i NUE, med fodersorter med højt udbytte og lav %N i kerne og brødhvedesorter med lavere udbytte og højt %N i kerne. Det forventes altså at de agronomiske forskelle i NUE imellem de 7 udvalgte sorter vil være væsentligt større end imellem vårbygssorterne fra 2017.

Målingerne vil være de samme som på vårbyggen for de agronomiske mål for NUE, dog kan vi forhåbentlig udvælge et mindre antal enzymer at lave aktivitetsmål på, baseret på resultaterne fra 2017.

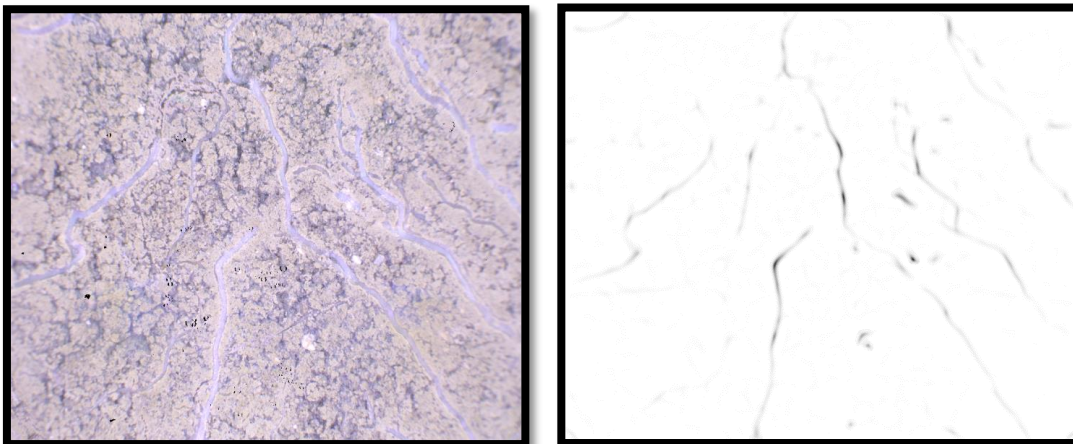
De samme 7 sorter indgår i RadiMax forsøg med vinterhvede i 2018, der også er udsået i september 2017. Vi få altså samtidige mål for rodvækst af sorterne, og mulighed for at studere deres evne optagelsesevne med studier med ^{15}N og isotopmærket vand, og målinger af tørkestres respons målt på det overjordiske plantemateriale. Enzymaktivitetsmålinger vil også blive gennemført langs tørkestres gradienten igennem rækkerne i RadiMax, så resultater fra markstudierne og RadiMax studierne kan kombineres så effektivt som muligt.

AP 1.4 Udvikling af billedanalyse for rødder og skud

Billedanalyse af rodbilleder fra RadiMax kameraerne: Formålet er at øge kapaciteten for analyse af rødder fra RadiMax anlægget, der indtil nu er gennemført ved visuel opgørelse af de mange billeder fra minirhizotronerne. Analysen baseres på multispektralbilleder (5 bølgelængder) og software fra firmaet Videometer. I dette software "træner" man systemet ved på udvalgte billeder at angive områder der viser rødder og områder der ikke gør (figur 4), hvorefter softwaren efterfølgende kan analysere de enkelte pixels, og sandsynligheden for at de enten viser rod eller baggrund.

I et næste trin bruges software som ud fra output fra Videometer software kan identificere hvor der faktisk er rødder, ved at bruge længde og bredde af identificerede områder på billederne, for at finde elementer hvor formen passer med at det er rødder. I et sidste trin bruges indtil videre software udviklet til

at analysere rødder fra billeder af rødder uden jord (WinRhizo), for at omsætte de identificerede rødder på billederne til estimater for rodlængde og roddiametre. Resultater af denne procedure bliver lige nu sammenlignet med de tal vi får ud af visuel kvantificering af rødder fra billederne, i datasæt af rodbilleder fra årets forsøg med sorter af vårbyg i RadiMax anlægget. Vi kan foreløbig se at proceduren i høj grad finder de rødder vi også visuelt kan observere, selvom der kan være begrænsninger i at finde de tyndeste rødder.



Figur 4. Billedet til venstre er et "pseudo RGB" billede fremstillet på baggrund af billeder optaget ved 5 forskellige bølgelængder. På billedet kan fluorescens fra de unge rødder fornemmes. På billedet til højre er der ved hjælp af Videometer software beregnet hvilke pixels der har høj sandsynlighed for at vise rødder, og er der lavet "Ridge detection" hvorved en del af støjen i billedet fjernes. Næste trin er at bruge form (længde/bredde) til at bestemme hvilke dele af billedet der faktisk viser en rodstruktur.

I løbet af 2017 har vi arbejdet med at optimere belysningen på de 4 kameraer, for at få mere ensartet belysning af billederne, og for at få en bedre belysning af den mest kortbølgede bølgelængde. Der er derefter arbejdet med at korrigere for de forskelle der trods alt stadig er imellem de 4 kameraer, de kan ikke gøres helt ens, og de forskelle i belysning der stadig er over billedfladerne.

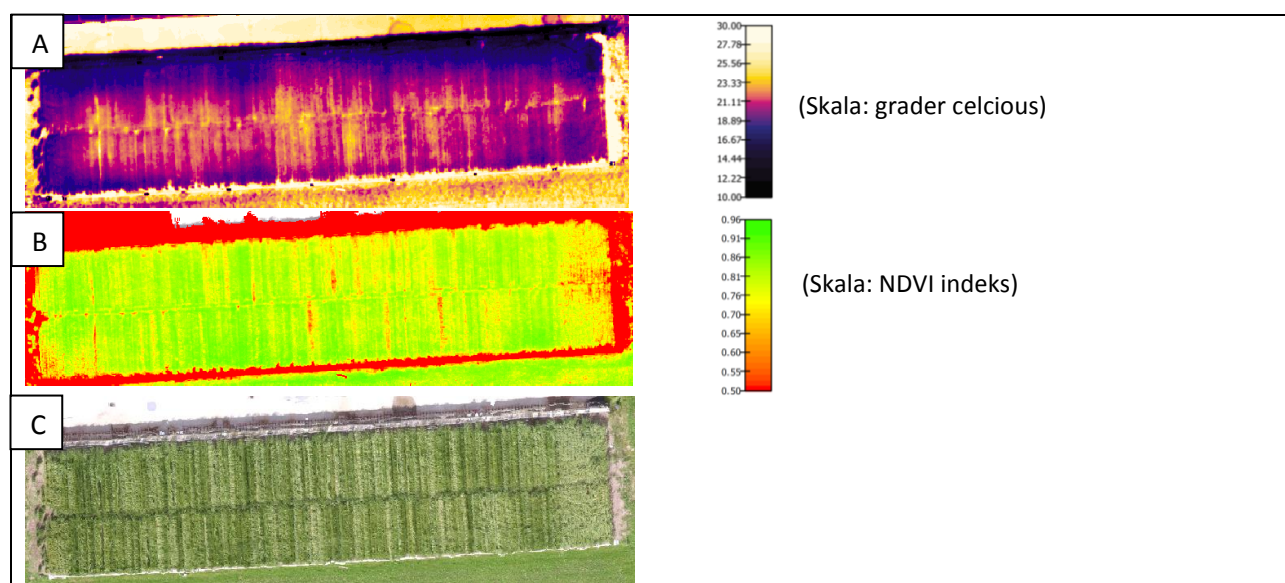
For vårbyg viser arbejdet foreløbig lovende resultater, rødderne er generelt lyse, og specielt ved belysning med kortbølget blå lys, ser der ud til at være en fluorescens som bidrager til at gøre det lettere at skelne rødder fra baggrund end ved de øvrige bølgelængder.

For græsserne er der umiddelbart flere udfordringer. Afgrøden udvikler sig over længere tid, og der tages slet, og tilsammen betyder det at der er væsentlig større forskel på nye rødder der som bygrødderne er relativt lette at identificere, og ældre rødder som har skiftet farve og mistet fluorescens. Videometer software kan også trænes på de ældre rødder, men der vil være en samtidig forekomst af både gamle og nye rødder som giver refleksion med helt forskellig spektralfordeling, og det kan blive svært at analysere for alle rødder på en gang.

Når effektiviteten af billedanalysen er testet, er en af de næste mål at få det systematiseret sådan at der ikke i praksis skal gennemføres 3 separate analysetrin. Der er behov for en mere simpel og dokumenteret protokol for hvordan billedanalysen gennemføres, så flere personer bliver i stand til at løse opgaven.

Imaging med termografi: Et vigtigt delmål er at udvikle en billedbaseret metode (drone) til analyse af tørkestres gradienter på sorterne i RadiMax. Vi har satset på at få testet termisk kamera 2017, da RadiMax er designet til at give klare tørkestres gradienter, som skal betyde forskelle i bladtemperatur som kan måles på termiske billeder.

I 2017 blev et drone-setup med termisk kamera (DJI Zenmuse XT radiometrisk kamera) testet af som metode til at detektere tørkestress via temperaturforskelle i afgrøden. Umiddelbart virker systemet let at anvende og det fungerer efter hensigten. Målinger af stomata konduktans på bladmassen i byggen (14 rækker målt hen gennem anlægget) ved blomstring viste en klar gradient med højeste transpiration hvor planterækken var tættest på undervand og laveste transpiration i midten af anlæg hvor undervandingen er dybest. Dette kunne også tydeligt observeres via det termiske kamera på samme tidspunkt (Figur 3), men ikke visuelt på biomassen, og heller ikke på NDVI målinger fra dronen. Resultaterne viser termisk billedtagning fra drone som en lovende metode, som mere systematisk vil blive testet i næste års hvede og kartofler. Figur 5 herunder illustrerer dronemålingerne og sammenligning af termisk billede med RGB og NDVI billeder fra ca. samme tidspunkt.



Figur 5: Tre forskellige drone billeder af byggen fra starten af juli 2017. A: Termisk billede af byggen, 7. juli, B: NDVI billede af byggen fra 4. juli, og almindeligt RGB billede af byggen fra 4. juli. Alle billeder er taget i 30 meters højde og lavet om til en ortomosaik.