

Wie Pflanzen Wurzeln schlagen

Digitale Bildanalyse macht Wurzel-Wachstum messbar

Pflanzen sind in vielen Bereichen von hoher - auch wirtschaftlicher - Bedeutung, so in der Nahrungsmittel- oder Energieproduktion. Einer der bedeutendsten Prozesse für Pflanzen ist ihr Wachstum. Anders als höher entwickelte Tiere bestehen Pflanzen aus einer Anordnung aufeinander abgestimmter, sich wiederholender Module, wie Zweige und Blätter oder Wurzeln und Wurzelspitzen. Dieses Konstruktionsprinzip erlaubt es ihnen, ihr ganzes Leben lang zu wachsen und dabei ihre äußere Erscheinung wechselnden Umweltbedingungen anzupassen.

Wachstumsanalysen erlauben schon bei sehr jungen Pflanzen Rückschlüsse, wie sie auf veränderte Umweltbedingungen reagieren. Obwohl Wachstum eine so bedeutende Rolle für die Gesamtfunktion einer Pflanze spielt, sind die grundlegenden Zusammenhänge zwischen makroskopischem Wachstum und den darunterliegenden Mechanismen nur unzureichend verstanden. Für ein tiefer gehendes Verständnis der grundlegenden biologischen Prozesse ist es notwendig, Wurzelsysteme exakt zu vermessen. Dabei sind eine Reihe von Kenngrößen von biologischer Relevanz, wie Anzahl der Wurzelzweige, Längen und Dicken der Zweige, Abzweigungswinkel und Anzahl der Abzweigungen.

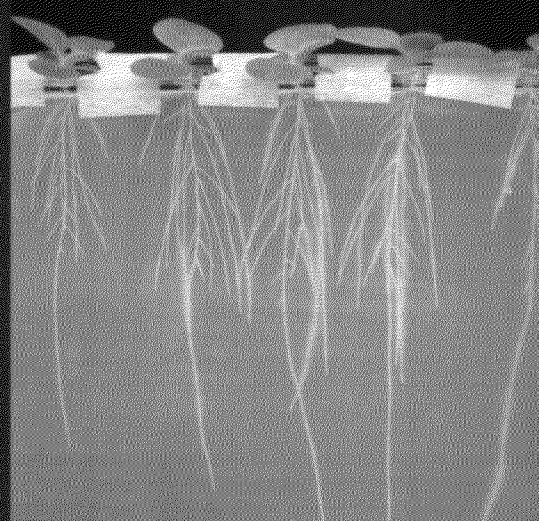
Bisher waren diese Größen für jede Pflanze nur messbar, indem man sie vorsichtig ausgräbt, die Wurzeln wäscht, hochaufgelöst einscannt und anschließend vermisst. Durch Einscannen entstandene Bilder haben den Vorteil extrem hoher Ortsauflösung und gleichmäßiger Ausleuchtung. Dies erleichtert die Auswertung durch Computer-Algorithmen. Allerdings wächst eine einmal ausgegrabene Pflanze nicht mehr genauso weiter wie zuvor. Deshalb sind so nur Momentaufnahmen möglich. Dynamische Größen wie Zuwachsraten des gesamten Wurzelsystems sind nicht zugänglich.

Um das Wachstum der Wurzeln messen zu können,

muss der zeitliche Verlauf der Bildung eines Wurzelsystems verfolgt werden. Dazu müssen dieselben Pflanzen mehrfach so vermessen werden, dass die Messungen das Pflanzenwachstum nicht beeinträchtigen. Konzentriert man sich zunächst auf die mikroskopische Erfassung des Wachstums von Wurzelspitzen, so lässt sich dies durch Aufzucht der Pflanzen in einem transparenten Nährgel umsetzen. Für die wesentlich komplexere Analyse und Vermessung ganzer Wurzelsysteme muss dieser Ansatz jedoch deutlich erweitert werden. Dieser Aufgabe stellen sich in einem gemeinsamen Forschungsprojekt der Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen und das Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre des Forschungszentrums Jülich.

Die Pflanzen wachsen dazu anstatt in Erde in Petrischalen, in die eine spezielle Agarose, also ein transparentes Nährgel eingebracht wird. Die Petrischalen selber bestehen aus zwei dünnen Glasplatten, siehe Bild 1. Diese Anzuchtform ermöglicht nun die wiederholte Aufnahme von Bildern der Wurzelsysteme, die dann mit Methoden der Bildverarbeitung analysiert und anschließend statistisch ausgewertet werden. Die Aufnahmen erfolgen automatisiert über mehrere Tage bis über Wochen hinweg. Dabei werden viele gleichartige Schalen immer wieder der Reihe nach durchgefahren. So lassen sich zukünftig sehr große Anzahlen von Pflanzen der gleichen Sorte in Form von Massen-Screening vermessen. Dieses Vorgehen erlaubt sehr treffsichere statistische Aussagen, erhöht aber die Anforderungen an die computergestützte Bildanalyse: Da die Lage der einzelnen Petrischalen beim wiederholten Hereinfahren in das Blickfeld der Kamera nicht exakt reproduziert werden kann, erscheinen die Wurzelsysteme einer Pflanze in den nacheinander aufgenommenen Bildern an leicht unterschiedlichen Positionen. Für die Bestimmung von Wachstumsraten und anderen

Bild 1:
Pflanzen werden in Petrischalen mit transparentem Nährgel angezogen, um mit Bildverarbeitungsalgorithmen das Wurzelwachstum zu analysieren.
Foto: Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre im FZ Jülich



dynamischen Größen der Entwicklung der Wurzel ist jedoch ein genauer Vergleich zwischen aufeinanderfolgenden Bildern unabdingbar. In einem ersten Verarbeitungsschritt müssen die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen Bilder einer Pflanze deshalb zuerst präzise zur Deckung gebracht oder „registriert“ werden, indem der Einfluss der unterschiedlichen Schalenpositionen bestimmt und herausgerechnet wird. Auch an die nachfolgenden Schritte der digitalen Bildanalyse werden bei diesem Massen-Screening deutlich erhöhte Anforderungen gestellt. Verglichen mit den Bildern von ausgegrabenen und dann eingescannten Wurzelsystemen sind die Bilddaten von Wurzeln in Agarose von ungleich geringerer Qualität. Die Aufnahmen müssen im nahen Infrarotbereich erfolgen, da sichtbares, photosynthetisch aktives Licht das natürliche Wachstumsverhalten einer Pflanze ändert, indem es beispielsweise ihren Tag/Nacht-Zyklus stört. Die Wurzeln werden dann mittels Durchlicht aufgenommen. Die aufzunehmende Petrischale befindet sich im Moment der Bildaufnahme dabei zwischen Infrarot-Lichtquelle und Kamera. Das Wurzelsystem erscheint dann als dunkler Schatten vor hellem Hintergrund. Eine gleichmäßige Ausleuchtung mit Infrarot-

Leuchtdioden ist jedoch nur angenähert realisierbar. Außerdem sind weitere Helligkeitsschwankungen aufgrund variierender Agarosedicke und anderer Störeinflüsse wie Lufteinschlüsse zwischen Glasplatte und Nährgel in der Praxis nicht zu vermeiden.

Darüber hinaus ist die Auflösung handelsüblicher und unserer Laboranforderungen genügenden Kameras wesentlich geringer als die Auflösung von Scannern, was die Bildqualität weiter reduziert. Wurzelzweige werden deshalb nur wenige Pixel oder Bildpunkte breit abgebildet. Die Aufgabe, die relevanten Größen wie Dicke von Wurzelzweigen computergestützt aus den Kamerabildern zu bestimmen, wird dadurch erheblich erschwert. Da verfügbare Standardalgorithmen hier versagten, wurden in dem gemeinsamen Forschungsprojekt neue und optimal auf diese Anforderungen zugeschnittene Verarbeitungsverfahren entwickelt.

Die aufgezeichneten Infrarotaufnahmen sind Grauwertbilder mit 256 Helligkeitsstufen. Aufgrund der Durchlichttechnik weisen sie dort niedrige Werte auf, wo sich Wurzeln befinden, und höhere Werte im restlichen Bild. Allerdings sind die helleren Werte durch die ungleichmäßige Ausleuchtung und die Schwankungen der Agarose-



Bild 2: Invertiertes Kamerabild des Wurzelsystems mit überlagertem Analyseergebnis. Die farbliche Darstellung gibt die Wurzelordnung jedes Zweiges an, also ob es sich um einen Primärzweig (grün), Sekundärzweig (rot) oder Tertiärzweig (blau) handelt. Foto: Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen

dicke über das gesamte Bild sehr unterschiedlich. Diese Helligkeitsunterschiede zwischen den besser und schlechter ausgeleuchteten Bildbereichen werden zunächst in einem Vorverarbeitungsschritt ausgeglichen.

Der anschließende, zentrale Bestandteil des Analyseverfahrens ist das Erkennen von Wurzelstücken. Wie bringt man diese Aufgabe einem Computer bei? Im Prinzip geht man vor wie das menschliche Gehirn: das komplexe Gebilde „Wurzelsystem“ wird in kleine Strukturmerkmale zerlegt. Diese sind Wurzelursprung, Verzweigungspunkte, Wurzelspitzen und Wurzelstücke als Verbindungselemente zwischen diesen. Wurzeln können nun, beispielsweise zwischen Wurzelursprung und der ersten Verzweigung, beliebig gekrümmt sein. Ein charakteristisches Merkmal erhält man, wenn man auf einer sehr kleinen Skala, also in vielen sehr kleinen Regionen von wenigen Pixeln Größe arbeitet, die insgesamt das ganze Bild abdecken. In einer kleinen Region erscheinen die Wurzelemente von beliebig komplexen Wurzelsystemen gleich, nämlich als eine annähernd gerade dunkle Linie vor hellerem Hintergrund. Nach solchen kleinen Mustern kann man nun durch einen geeigneten Algorithmus suchen lassen. Man beginnt nun im oberen Bereich des Bildes mit der Suche

nach Bildpunkten, die Wurzeln darstellen könnten. Für jeden Bildpunkt wird ein Wahrscheinlichkeitswert für das Vorhandensein einer Wurzelstruktur und ihre Ausrichtung oder Orientierung berechnet. Überschreiten die so berechneten Wahrscheinlichkeitswerte festgelegte Entscheidungsschwellen, so werden die gefundenen Wurzeln als Primärwurzeln identifiziert. Diese werden dann nach unten weiterverfolgt, indem man in Richtung ihrer Orientierung weitersucht, ob sich dort die Wurzel fortsetzt. Meist ist das der Fall, aber nicht immer: Wurzeln können auch krumm und abknickend wachsen, sich verzweigen oder sich kreuzen. Für Biegungen lässt sich dies modellieren, indem man die Differenz zwischen alter und neu gefundener Wachstumsrichtung bestimmt und als Wahrscheinlichkeitsmaß für die gefundene Richtung benutzt. Kleine Richtungsabweichungen, also geringe Krümmungen, sind wahrscheinlicher als stark gekrümmt wachsende Wurzeln. Das heißt: in nur unsicher erfassbaren Fällen wird deshalb angenommen, dass die Wurzel eher geradeaus weiterwächst. Gelegentlich sind auch abrupte Knicke der Wurzelstrukturen möglich. Die Analyse fordert hier aber, dass die Bildaten diese Hypothese entsprechend stark stützen: je krummer der wahrscheinliche Ver-

lauf, desto mehr Übereinstimmung zwischen Modell und Daten wird verlangt. Das den Algorithmen zugrunde liegende physikalische Modell ist das gleiche, welches das Biegen eines elastischen Stabes und die dazu notwendige Kraft beschreibt.

Kreuzungen von Wurzelzweigen erfordern eigene Vorgehensweisen. Kreuzungen sind Punkte, die durch zwei oder mehr ankommende und zwei oder mehr abgehende Wurzelstücke gekennzeichnet sind. Dabei ist die Zuordnung, welche ankommende Wurzel sich wo fortsetzt, nicht immer eindeutig. Bei manchen Wurzelbildern sind sogar menschliche Betrachter bei dieser Aufgabe überfordert. Nimmt man Informationen aus zu anderen Zeitpunkten aufgenommenen Bildern derselben Pflanze hinzu, lassen sich die Wurzelstücke jedoch fast immer eindeutig zuordnen: man weiß dann, welcher Wurzelzweig zuerst vorhanden war, und von welchem anderen Zweig er danach gekreuzt wurde.

Bild 2 zeigt die in einem Infrarotbild erkannten Wurzelsegmente. Die farbliche Darstellung gibt die Wurzelordnung jedes Zweiges an, also ob es sich um einen Primärzweig, Sekundärzweig oder Tertiärzweig handelt.

Aus den drei Analyseschritten – Wurzeln finden, Wurzeln weiterverfolgen, Abzweigungen detektieren – wird eine verkettete Datenstruktur erstellt, die der Struktur der Pflanzenwurzel gleicht. Sie besteht aus Elementen wie „Knoten“ oder „Zweig“, die jeweils eine bestimmte Menge von Datenfeldern zur Beschreibung ihrer Eigenschaften besitzen. So enthält beispielsweise jedes Wurzelstück ein Feld „Dicke“ und jeder Knoten ein Feld „Knotenordnung“. Direkt im Anschluss an das Hinzufügen eines Knotens oder eines Zweiges werden die entsprechenden Daten durch geeignete Auswertungsalgorithmen ermittelt und in die Datenfelder eingetragen. So erhält man eine Struktur, aus der sich alle erforderlichen biologi-

schen Merkmale und Kennzahlen ablesen lassen. Auch komplexe Abfragen – etwa „Wie groß ist die durchschnittliche Dicke aller Primärzweige?“ – sind so möglich.

Diese computergestützte Vermessung von Wurzelsystemen ermöglicht einen hohen Zeitgewinn gegenüber der manuellen Auswertung, wodurch ein hoher Durchsatz an Pflanzen erreicht wird. Vor allem aber waren dynamische Größen wie Zuwachsraten bisher gar nicht oder nur grob erfassbar. Mit der gewonnenen Präzision und Zeitauflösung werden neue Erkenntnisse sowohl in der biologischen Grundlagenforschung bei der Aufklärung von Wachstumsmechanismen ermöglicht, als auch in anwendungsnahen Bereichen wie Pflanzenzucht oder Tests von Pflanzenschutz- und Düngemitteln.

www.lfb.rwth-aachen.de
www.fz-juelich.de/icg/icg-3

Autoren:

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Til Ach ist Inhaber des Lehrstuhls für Bildverarbeitung. Dr.phil.nat. Matthias Mühlich ist Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bildverarbeitung, Dipl.-Phys. Dipl.-Inform. Daniel Truhn erstellte dort seine Diplomarbeit. Dr. Frank Gilmer ist Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Chemie und Dynamik der Geosphäre im Forschungszentrum Jülich, kurz ICG-3, und Leiter des Jülich Plant Phenomics Center. Dr.rer.nat. Kerstin Nagel ist Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe „Wachstum“ des ICG-3. Dr.rer.nat. Hanno Scharf ist Leiter der Arbeitsgruppe Bildverarbeitung des ICG-3. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Ulrich Schurr ist Leiter des ICG-3. Dr.rer.nat. Achim Walter ist Stellvertretender Institutsleiter und Leiter der Arbeitsgruppe „Wachstum“ des ICG-3.

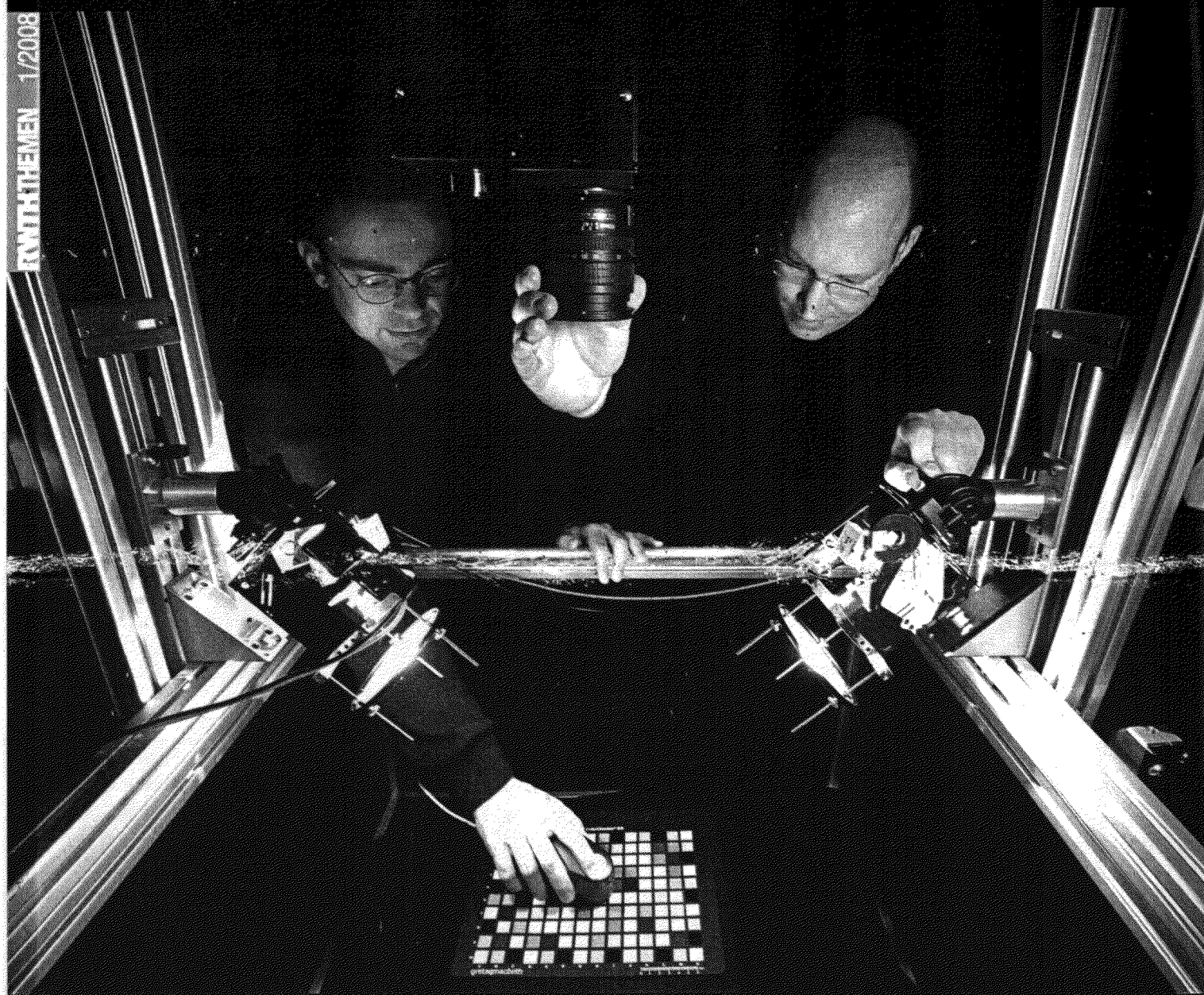


Bild 3: Dr. Matthias Mühlich und Johannes Brauers vom Lehrstuhl für Bildverarbeitung kalibrieren eine Farbkamera mit sieben Farbkanälen, indem sie 140 Farbproben auf einem Testmuster vermessen.
Foto: Peter Winandy