

油菜高通量根系构型定量分析与三维重建系统

余常兵¹, 陆星^{2*}, 廖星¹, 廖红²

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062;

2. 华南农业大学农学院, 根系生物学研究中心, 广东 广州, 510642)

摘要:根系构型是表征植物资源利用能力的重要指标之一, 研究方法的改进非常重要。本文在综述现有根系构型研究手段的基础上, 重点介绍了作物高通量根系构型定量分析与三维重建系统, 根据油菜根系在琼脂等介质中的生长特点, 对该系统进行改进, 建立了油菜高通量根系构型定量分析与三维重建系统, 并对该系统的可靠性进行了评价, 在油菜根系构型研究上开展了应用, 并探讨了需要进一步改进的方面。

关键词:油菜; 根系构型; 三维; 高通量; 原位

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2016)05-0681-010

High throughput root architecture quantification and three dimensional reconstruction system of oilseed rape

YU Chang-bing¹, LU Xing^{2*}, LIAO Xing¹, LIAO Hong²

(1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China;

2. Root Biology Center, College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Plant root architecture, the 3-dimensional (3D) distribution of different root types in soil, is a key feature for plant to acquire environmental resources like mineral nutrients and water, especially under limiting conditions. Increasing attention was paid on methodology research and resulted in substantial progress in describing and quantifying root system. The advances on phenotype root system had been briefly summarized in this paper, with a special focus on a novel high throughput root architecture quantification and 3D reconstruction system (root 3D system). Oilseed rape is an important oil crop with a fine dense root system difficult to quantify. Accordingly, improvements had been made for oilseed rape on root 3D system from root growth to imaging system, which allowed greater image sensitivity, higher efficiency, and a broad array of growing conditions. The performance of the updated root 3D system had been evaluated and proved to be highly reliable. To illustrate the use of this root 3D system, the growth dynamic of oilseed rape root was quantified. Further improvement for the system was also discussed.

Key words: Oilseed rape; Root architecture; Three dimension; High throughput; *in situ*

根系是植物从生长介质环境中吸收养分和水分的重要器官, 也起到支撑地上部的重要作用。植物根系构型是指根系在生长介质中的空间分布, 不同根系构型显著影响植物对养分、水分等的吸收利用和碳源分配, 影响对环境胁迫的适应能力, 甚至影响植物的抗病虫害能力等, 因此对根系构型的研究越来越受到人们重视^[1-5]。Hammer等^[6]分析表明, 美国玉米带的持续增产主要与其根系形态构型的改

变有关, 而与地上部冠层构型的改变关系不大; Uga等^[7]发现并克隆了一个控制水稻根系生长角度的基因 *DRO1*, 通过增强该基因的表达提高干旱条件下的水稻产量。White等^[8]总结了根系构型对矿质养分吸收的影响, 提出了作物高效吸收氮、磷、钾的理想根系构型。华南农业大学根系生物学研究中心根据作物根系构型与磷效率关系密切这一结论, 提出了基于根系性状的作物育种策略^[9-13], 并育成了

收稿日期: 2016-05-31

基金项目: 农业部 948 项目 (2014-Z4); 公益性行业科研专项 (201503123-09)

作者简介: 余常兵 (1975-), 男, 湖北汉川人, 助理研究员, 博士, 从事油料作物营养与施肥技术研究, E-mail: cbyu123@163.com

* 通讯作者: 陆星 (1981-), 男, 侗族, 湖南通道人, 助理研究员, 博士, 从事农作物根系构型分析方法研究, E-mail: xinglu@scau.edu.cn

多个磷高效的大豆国审品种。

1 根系构型研究方法

根系主要生长在土壤等不透明的介质中,不可见且相互交错遮挡,研究难度远远大于地上部分。根系构型研究方法可以分野外和室内两大类。

1.1 野外根系研究方法

根钻法:一般采用管状结构不锈钢钻,在有代表性的位置,人工或机械将钻头压入土中,挖取土壤中的根样。该法简单易行,获取的根系样品对根系的垂直分布特征描述较为精确,而对水平分布特征描述则存在断层,导致在估算根系总量时易出现偏差。

整根挖取法:用工具整段挖出根系所在的土方,然后对土块进行小心清除,最后对根系进行定量测量。其优点是能够获取整个根系的形态构型及根长根重量等信息,但是取样工作量很大,且挖根和洗根过程容易损失大量侧根,造成对根系总根长、数量等的低估。

钉板法:先取田间含根系的原状土,用钉板固定使根系保持在自然位置,洗去土壤后观察根系。其优点是能最大程度的反映根系在土壤中的实际空间分布及根长、根重的密度分布情况,但因其工作量巨大,操作流程复杂,无法进行大批量的试验。

土槽观察法:在距离植株根部一定距离挖开土槽,用透明塑料纸沿土壤剖面铺好,再将基根与透明塑料纸之间的交接点标在塑料纸上,最后通过茎基部距离、水平距离和垂直距离等计算出基根角度^[14]。其优点是能够在田间对根系形态构型进行观察并计算基根角度,相对工作量较小,但需要结合整根挖取法才能获得根系生物量和总根长等信息,无法进行动态观察。

基于DNA的根系定量法:通过测定土壤根系DNA浓度的变化,反映植物对环境胁迫,尤其是干旱胁迫的响应。该方法采样简便快速,缺点是无法直接获得根系生物量及根长等信息^[15]。

Shovelomics法:美国宾州大学园艺学院 Lynch 博士课题组开发的方法,用于田间玉米根系的快速表型鉴定^[16]。具体做法是:先用铁铲在根基周围挖直径40cm、深25cm的根系,小心抖掉主要的泥土,再把根系浸入较温和的洗涤液中去除大多数残留的泥土,然后用清水冲洗根系。对清洗干净的根系性状按从1至9级进行目测分级打分,打分指标包括:支撑根轮数,支撑根数目,一、二级支撑根角度,支撑根分枝密度,节根数量、角度和分枝密度。该方法快速便捷,5~10min内能完成田间10个植株根系构

型的定量测量。Buchsch 等^[17]对该方法做升级,用数码相机对根系拍照,然后通过图像软件批量获取根系构型指标,定量分析的速度大大提高,克服了不同测量者定量标准不一的问题。不过该方法最大的缺点在于破坏性取样。

在非损伤性野外根系研究方法方面,工作人员尝试通过探地雷达(ground penetrating radar)对树木根系进行原位无损探测^[18~23],由于仅仅能够估算粗根系(直径>0.5 mm)的直径、生物量和分布位置等有限信息,且测定效果受土壤质地、含水量以及根系方位等诸多因素的影响,不适合对细密根系作物进行定量分析。

1.2 室内根系研究方法

与野外相比,室内根系研究方法进展更快,先后开发了研究根系二维、三维构型的各种手段。二维研究方面,华南农业大学根系生物研究中心发明了营养袋纸培系统,即通过营养槽、吸水营养纸和透明塑料袋等材料,将植物根系固定在二维平面上,收获时可直接原位扫描,供 WinRHIZO 软件分析。该系统灵活方便,成本低廉,可进行大批量的苗期筛选^[24]。在此基础上,Marie 等^[25]和 Mathieu 等^[26]分别发展了 RhizoSlides 和 Rhizoponic 系统,进一步提高了植物二维培养系统的效率。其中 RhizoSlides 系统由有机玻璃板、发芽纸、PE膜、营养液管及固定件等部分组成,通过使用杀菌剂,长时间保持植物根系不受污染,把植物(如玉米)在系统中的生长时间延长至20d左右。而 Rhizoponic 系统主要针对根系特别细密的植物(如拟南芥)而设计,由尼龙网、蓝色发芽纸、支撑架、营养液管以及种子槽等部分组成,通过与影像及定量系统配合,实现对拟南芥地上部和根系的全生育期无损检测。以上方法的缺点是,仅能提供根系二维生长信息,不能反映根系对立体环境的适应特性。

三维研究方面,严小龙等^[27]建立了圆形根箱法。圆形根箱由栽培桶、内置金属圈架和金属筛网等三部分组成。栽培桶中间可开启,内置金属筛网,将植物生长介质分隔成不同的层次,原位固定根系三维结构,方便分层实施养分处理,收获时能对根系进行原位观察。该方法简便易行,但只能破坏性取样,易造成根系损失,实验规模受限。

此外,严小龙等^[9]设计了根室-温室复合体,该复合体地上部分为种植植物的温室,地下部分为观察和监测根系的根室系统,采用微根管摄像系统对根系生长情况进行原位观察与取样。本方法优点是可以实现对根系生长全生育期的原位连续动态观

测,缺点是成本高,灵活性差,无法进行大批量材料的根系定量测定。

X 射线断层扫描技术(X ray - CT)和核磁共振成像技术(magnetic resonance imaging, MRI)是使用较多的根系无损原位测定技术,可以直接对特定容器内的植物根系进行扫描测定。其中断层扫描技术是以 X 射线为信息载体,通过检测穿过物体的 X 射线衰减系数的差异来反映物体内部不同位置组成成分和密度的差异;而核磁共振成像技术以射频电磁波为信息载体,通过检测磁场中物体不同位置核磁共振信号的差异来反映物体组成成分和生化性质的差异。两种方法获得的信号都需要进一步利用专业软件进行识别和重建,以获得物体内部影像。Metzner 等^[28]比较了两种方法的优缺点,认为 MRI 成像易受土壤中的顺磁元素(如 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 等)干扰,而 CT 则受土壤有机质以及土壤水分的干扰较大。两种方法所需仪器设备昂贵,但因其可以进行土壤原位环境下根系的无损测定,可以作为比照方法。

Fang 等^[3]发展了基于激光成像植物胶培养的根系原位定量系统,该系统利用高透光率的琼脂糖作为透明栽培介质,植物根系在透明介质中生长,通过激光扫描成像并分析处理,实现对苗期根系的动态监测,亦能研究作物根系之间的相互作用,缺点是激光扫描成像时间偏长,琼脂糖系统不适合种植旱地作物。Clark 等^[29]在此基础上对成像方式进行了改进,采用更快捷便利的单反数码相机进行二维 360°成像,并开发出基于 Java 平台的根系三维重建和定量软件包 RootReader3D,可以同时测定植物根系构型有关的 10 多个参数,建立了作物高通量根系构型定量分析与三维重建系统。Fang^[30]应用该系统研究发现,同一基因型的水稻根系相互交叉程度显著高于不同基因型,说明根系相互作用能近距离在根尖发生,提出根尖的物理接触是除根系分泌物外的另一种信息交流方式。

2 作物高通量根系构型定量分析与三维重建系统

整个系统包括三大主要步骤,即根系三维种植、根系三维成像和根系三维重建。

2.1 根系三维种植

使用直径 9cm 的透明薄玻璃缸,注入 1.3L 凝胶(含植物胶 Phytigel 粉末 1.95g),养分含量为:2.6mmol/L $CaCl_2$, 2.0mmol/L KCl , 3.0mmol/L NH_4NO_3 , 0.4mmol/L $MgSO_4$, 1.0mmol/L $Mg(NO_3)_2$, 0.91

mmol/L $MgCl_2$, 200mmol/L KH_2PO_4 , 154mmol/L $HEDTA-Fe$, 18.2mmol/L $MnCl_2$, 50.8mmol/L H_3BO_3 , 4.7mmol/L $ZnSO_4$, 1.2mmol/L $CuSO_4$ 和 1.7mmol/L Na_2MoO_4 , pH6.0^[29]。种子消毒,催芽,当主胚根长 1cm 时移入凝胶中,放入人工气候室培养。

2.2 根系三维成像

硬件包括单反相机、成像水箱、LED 面板光源、磁力转盘、步进电机、接口盒、校准棒、三脚架、计算机等。软件包括 Camera Control Pro2 和 LabView 2012 (v12.0) 等。基本原理是通过接口盒连接相机、步进电机和电脑,用 Camera Control Pro2 控制相机拍照,用 LabVIEW 2012 (v12.0) 控制步进电机旋转,获得的照片自动存储在电脑上。单反相机选用 Nikon D800e,配置 Nikon AF-S VR 105mm f/2.8G IF-ED 镜头,在距离镜头 1.43m 处放置一个方型有机玻璃材质的水缸,使镜头平面与水箱平面保持水平,镜头中心对焦至水箱中心。拍照前往水箱中倒入已脱气的去离子水,水箱左右侧面和顶部分别装有荧光灯光源,水箱底部与步进电机相连,通过内外两个磁力有机玻璃转盘(培养植物样品的玻璃缸放入水箱内的转盘中央),实现水箱内植株的旋转运动。每株样品根系需旋转 360°,连续拍摄 100 张二维数码照片,单个样品拍摄时间约 20min^[29]。

2.3 根系三维重建

硬件为电脑,软件包括 Adobe Photoshop CS6 (64 Bit)、ImageJ v1.47、Cygwin64 Terminal、IftDetectRootMesh 和 RootReader3D 等。

2.3.1 原始图像二值化 通过 Adobe Photoshop 将 JPG 格式的根系图像进行 25% 缩放并转化成 Tiff 格式,剪取包含根系的图像部分,在 Cygwin64 Terminal 上运行 IftDetectRootMesh 生成二值化图像,用 Photoshop 把图像反相,生成背景为白色而根系为黑色的二值化图片。以上步骤均通过 Photoshop 进行批处理^[29]。

2.3.2 获取重建参数 使用 Photoshop 对 100 张校准棒图片进行 25% 的缩放(比例必须与根系图像的缩放比例保持一致),把图像模式调节成灰度(grayscale),反相 invert,调节阈值使图像中校准棒的刻度线能清晰看到而其它部分没有明显变黑,通过 ImageJ 中的 3D 重建插件逐步计算出图像的平移度(translation)、旋转度(roll)、倾斜度(pitch)以及分辨率(resolution)等参数^[29]。

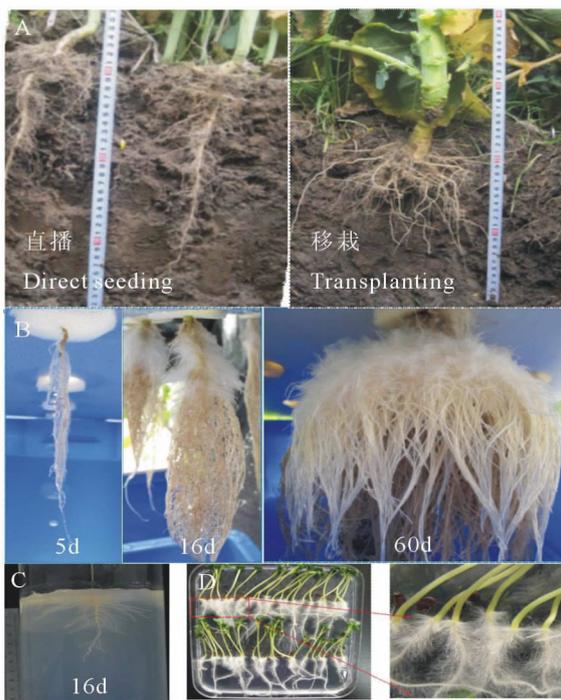
2.3.3 根系重建 在 RootReader3D 中进行阈值化图像序列、重建根系系统、细分重建体积、修饰图片切片、骨架化重建体元等过程,通过根系骨架重建根

系,获得根系相关参数和性状^[29]。

3 油菜高通量根系构型定量分析与三维重建系统建立

3.1 不同环境下油菜根系的表现

油菜根系在不同的种植环境下表现出较大的差异,可塑性很强。在田间条件下,油菜根系细密、多且脆,难于获取。另外不同栽培措施下的根系也不同。同一品种,直播栽培的主根粗壮,常下扎到土壤深层,侧根细密居于土壤上层;移栽的则无主根而侧根发达,常生长于土壤表层(图1A,鲁剑巍教授提供)。在水培条件下,油菜主根不明显,侧根明显增多,且根毛发达(图1B);在琼脂培养下,油菜主侧根生长迟缓(图1C),下扎困难,但根毛发达,且裸露在琼脂外(图1D)。其中琼脂培养还存在琼脂易变质、油菜可培养时间短等问题。



注:A:大田种植,B:水溶液培养,C:透明圆柱体琼脂培养,D:培养皿琼脂培养

Note: A: root system under field condition; B: root system in hydroponics; C: root system in a transparent cylinder by gellan gum system; D: root system on petri dish by gellan gum system

图1 不同种植条件下油菜根系特征

Fig. 1 Root systems of oilseed rape under different growth conditions

由于油菜根系的上述特点,田间条件下研究油菜根系构型非常困难,而琼脂培养不能满足油菜根系正常生长的需要。故此水培是相对准确高效的办法。根系构型定量研究能为油菜种质资源筛选,根系养分高效育种提供强有力的技术支持。本团队在

引进作物高通量根系构型定量分析与三维重建系统^[29]的基础上,根据油菜根系特点,对该系统进行了改进,建立了油菜高通量根系构型定量分析与三维重建系统。

3.2 根系三维种植

3.2.1 将琼脂培养改为水溶液培养 如前所述,油菜在琼脂培养下植株矮小,根系很容易受微生物污染,而水培系统操作简单方便,植株生长正常,而且方便设置各种养分胁迫处理,适合进行高通量的表型筛选和鉴定。将水培油菜种植系统放入人工气候生长室。主要环境参数为:光合有效辐射 200 ~ 300 mol/(m² · s),光周期为 14h/10h,昼温 24℃,夜温 20℃,通过定时运行进气排气系统,保证室内空气流通。油菜从育苗至主根 5cm 长左右即开始转入营养液培养,正常环境下可培养 15d 左右。

3.2.2 采用改良的全营养液 根据油菜营养特点,本系统以 Magnavaca 营养液^[31]为基础,调整如下(各营养元素浓度单位为 μmol/L): 10 857 NO₃⁻ - N, 1 300 NH₄⁺ - N, 3 527 Ca, 2417 K, 100 P, 855 Mg, 587 S, 25 B, 596 Cl, 9.1 Mn, 2.29 Zn, 0.83 Mo, 0.63 Cu, 20 HEDTA - Fe。营养液配制好后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节 pH 至 5.8。

3.2.3 设计基于 3D 打印的定根网 为了避免营养液更换、样品取出和拍照时根系构型变化,通过 OpenScad 软件设计了根系构型固定网(以下简称定根网)模型,选用环境友好的黑色聚乳酸 PLA 为材料,3D 打印定根网(图 2 左,第 1 代定根网),可以根据植物的根系特点及种植要求,灵活调整定根网的规格(包括直径、厚度、形状、网孔大小等)以及每层定根网的距离。针对使用过程中定根网不容易安装(需要找到各层定根网上完全一致的孔进行连接以免定根架扭曲变形,单次安装需时较长),多次使用后连接孔容易折断等问题,设计了第 2 代定根网(图 2 右),安装效率和强度明显提高。本系统根据水培条件下油菜根系横纵比大,不定根繁多纤细的特点,设计的定根网规格为:直径 20 cm,厚度 1.5 mm,蜂窝状六边形网孔,网孔直径 5.4 mm。

3.2.4 采用分段式安装方式组建定根架 原系统的定根架是用白色塑料棒穿过定根网,中间用黑色陶瓷管隔开,两端用白色螺丝固定,除安装中容易脱落和扭曲外,增减定根网数量和调节定根网间距比较困难。基于此,本系统的定根架采用分段式安装方式,每个定根网都可以通过单头柱和外六角螺栓相连,定根网层数可自由调节,网间距离也可以通过单头柱高度自由调节,提高了实用性,详情见专

利^[32]。本系统设定定根网之间的距离为 4cm, 整个定根架高度 20cm。使用方法是: 将油菜种子通过纱网法进行萌发, 待幼苗子叶完全展开, 主根长至 5cm 左右, 通过剪缝的小海绵球夹住子叶节, 固定在第一层定根网的中央, 并移入营养液中进行培养。每次拍照前, 小心把定根架移出营养液, 并移入成像水箱中进行拍摄。拍摄完毕之后, 马上移回营养液中, 避免伤害根系。

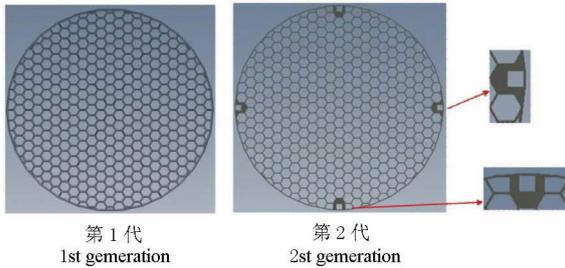


图 2 定根网

Fig. 2 Root fixed mesh

3.3 根系三维成像

3.3.1 采用玻璃制作水箱 原系统的成像水箱以有机玻璃板为材料定制, 虽然有轻便的优点, 但表面容易刮花, 老化变黄, 影响成像效果。本系统水箱以透光性能良好的超白玻璃为材料定制, 清晰度和耐磨程度显著提高, 持久耐用不老化(图 3)。

3.3.2 底座采用卡槽式设计 原系统成像水箱直接平放在底座上, 每次搬动清洗后, 位置上不能保证完全还原, 导致相机需要重新定焦, 与镜头和水箱间距离相关的参数也需要重新计算。本系统将底座上部平台改为卡槽式设计, 底座四角固定, 水箱清洗后直接推回卡槽即可, 既能保证位置固定一致, 又避免反复定焦和修改参数(图 3)。

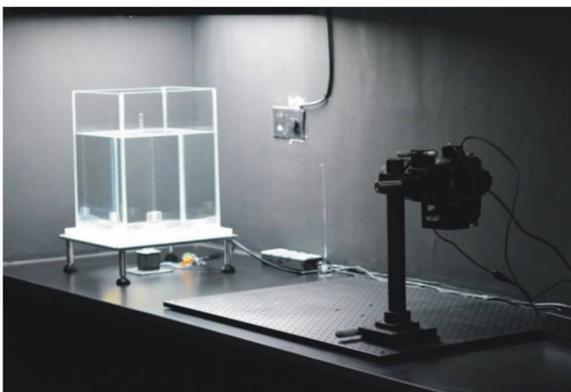


图 3 三维系统整体效果

Fig. 3 Overall effect of three-dimensional system

3.3.3 改进拍照光源 原系统采用荧光灯作为拍照光源, 成像清晰度差, 且成像水箱后方有倒影干扰。本系统采用高亮度可调节的 LED 灯为拍摄光

源, 使光面更加平衡, 提高了成像质量(图 4)。

3.3.4 剔除根系重影 原系统受水箱有机玻璃背景影响, 拍照时有重影出现。本系统通过在成像水箱后方铺设亚黑 PVC 板, 使光源集中在水箱中, 解决了重影问题, 根系图像更为清晰, 成像质量提高(图 5)。

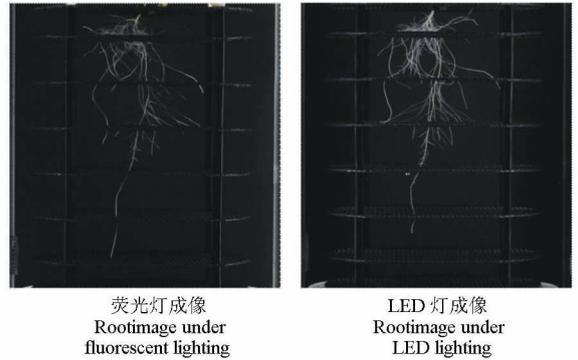


图 4 荧光灯与 LED 灯对根系成像效果比较
Fig. 4 Comparison of root images between fluorescent and LED lighting

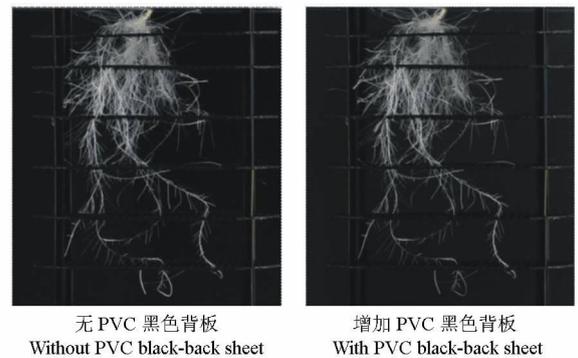
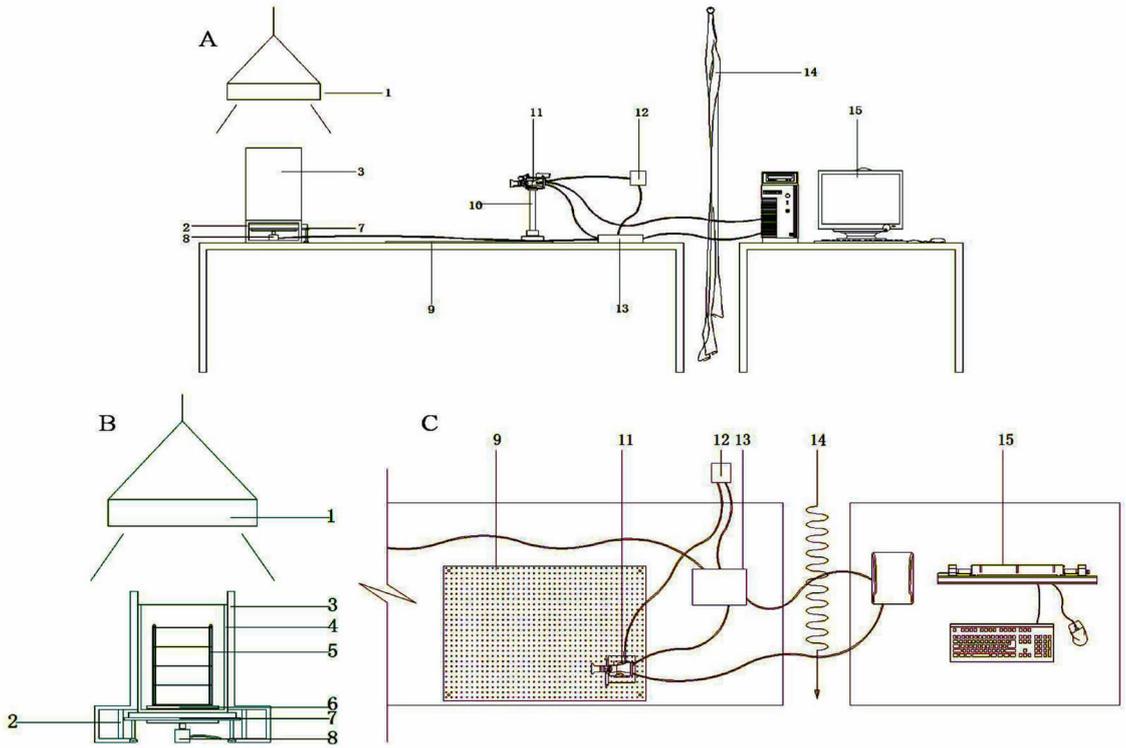


图 5 引入 PVC 黑色背板以消除根系重影
Fig. 5 Removal of double images by introducing PVC black-back sheet

3.3.5 提高成像速度 原系统采用 Nikon D300s 单反相机, 配置 Nikon 180mm f/2.8D AF ED-IF 的镜头, 因对焦距离较远(2.65m), 快门速度较慢, 所以成像速度较慢(单棵植株根系 100 张照片需要 20min)。本系统采用 Nikon D800e 相机, 配置 Nikon 105mm f/2.8G IF-ED 105, 对焦距离缩短为 1.43m, 配合高亮度的 LED 光源, 可以缩短每棵植株的成像时间至 6min, 大大提高了系统效率。

3.3.6 引入光学成像平台 原系统相机由三脚架支撑, 水箱与支架单独放置在实验台上, 由于相机和水箱位置易移动, 每次拍照时需要重新定焦, 计算水箱和镜头距离参数。本系统采用了光学成像平台, 使相机和水箱支架能稳定的固定在实验台上, 无需每次拍照时调整参数, 简化了重建步骤, 工作效率提高(图 3)。为便于对系统组成有更直观的了解, 绘

制系统平面示意图(图6)。



注:A 侧面整体视图,B 旋转部分正视图,C 拍摄部分垂直视。1. 顶灯,2. 侧灯固定架,3. 侧灯,4. 成像水箱,5. 3D 定根架,6. 磁力转盘,7. 水箱支撑架,8. 步进电机,9. 面包板,10. 相机支撑架,11. 相机,12. 插座,13. 控制盒,14. 窗帘,15. 电脑
 Note :A ;overall side view ;B ;rotating parts of front view ;C ;vertical view. 1 :top lighting. 2 ;fixed frame of side lighting. 3 ;side lighting. 4 ;imaging tank. 5 ;3 - D root fixed frame. 6 ;magnetic wheel. 7 ;tank racks. 8 ;stepping motor. 9 ;bread plate. 10 ;camera racks. 11 ;camera. 12 ;socket. 13 ;control box. 14 ;curtain. 15 ;computer

图6 系统示意图
 Fig.6 System diagram

4 油菜高通量根系构型定量分析与三维重建系统评价

为验证系统测定参数的稳定性和可靠性,选取与油菜根系粗细相似的4种型号银色铁丝(#22, Φ0.8mm; #24, Φ0.6mm; #26, Φ0.35mm; #30, Φ0.3mm),设计不同长度和直径组合共24组(表1),其

中A至D表征根总长不变(3m)但直径比例改变,F至I表征直径比例不变但根总长改变,X22至X30、Y22至Y30、Z22至Z30、E22至E30分别表征根总长不变(0.5m、1m、1.5m、2m)但直径改变,对该系统进行检验评价。

表1 不同组合铁丝型号及长度
 Table 1 Types and length of different wire combination/m

型号 Type	组合 Combination							
	A	B	C	D	F	G	H	I
#30	0.3	0.6	0.9	1.2	0.5	1	1.5	2
#26	1.2	0.9	0.6	0.3	0.25	0.5	0.75	1
#24	0.9	0.3	1.2	0.6	0.15	0.3	0.45	0.6
#22	0.6	1.2	0.3	0.9	0.1	0.2	0.3	0.4
	X22	X24	X26	X30	Y22	Y24	Y26	Y30
#30				0.5				1
#26			0.5				1	
#24		0.5				1		
#22	0.5				1			
	Z22	Z24	Z26	Z30	E22	E24	E26	E30
#30				1.5				2
#26			1.5				2	
#24		1.5				2		
#22	1.5				2			

4.1 系统稳定性检验

选择两种组合(表1中C和H),模拟根系生长状态,固定在定根架上,每种组合用本系统拍摄和重建6次,比较重建结果间的变异。结果表明(表2),

几种常见的根系或图像参数,变异系数均较小,特别是与根系特征密切相关的总根长,变异系数只在1%左右,说明该系统的稳定性很好。

表2 系统稳定性测定
Table 2 Evaluation of system performance

重复 Repeat	总根长/cm Length		水平最大宽度/cm Max width		水平最小宽度/cm Min width		垂直最大深度/cm Max depth		根尖数 Tip count	
	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H
I	257.1	213.9	20.4	18.1	19.2	15.1	25.6	21.5	492.0	109.0
II	253.8	213.1	20.4	18.1	19.0	15.7	25.6	21.4	472.0	104.0
III	256.6	216.2	20.3	20.3	18.6	15.5	25.6	21.3	491.0	115.0
IV	255.2	215.9	20.5	18.2	18.1	15.1	25.6	21.4	438.0	110.0
V	261.2	216.2	20.5	19.2	18.6	16.7	25.7	21.4	479.0	112.0
VI	254.9	212.4	20.3	19.9	18.6	16.8	25.6	21.4	419.0	119.0
平均值 Average	256.5	214.6	20.4	19.0	18.7	15.8	25.6	21.4	465.2	111.5
标准误 Standard error	2.62	1.67	0.09	0.96	0.37	0.76	0.02	0.05	29.98	5.17
变异系数 Variable coefficient/%	1.02	0.78	0.43	5.03	1.97	4.83	0.09	0.25	6.45	4.63

4.2 系统可靠性检验

将表1中各种组合模拟根系生长状态,固定在定根架上,每种组合用本系统拍摄和重建1次(获得3D值),再从定根架上面拆下来后压平,用扫描仪扫描后WinRhizo软件分析(获得2D值)。选取最常用的总根长参数,将两种方法获得的数据与各

组根系实际值进行分析。结果表明(表3),3D值与2D值、3D值与实际值、2D值与实际值间均有较好的直线相关关系,说明本系统获得总根长数据可信。

表3 两种测定值与实际值间的相关性
Table 3 Correlation between measured value and actual value

关系 Relation	回归方程 Regression equation	相关系数 r
3D值与2D值 3D value and 2D value	$y = 0.966x + 9.201$	0.960**
3D值与实际值 3D value and actual value	$y = 0.724x + 19.36$	0.976**
2D值与实际值 2D value and actual value	$y = 0.727x + 14.4$	0.986**

注:回归样本量 $n = 24$, **表示高度相关
Note: $n = 24$. ** denote statistical high correlation

组根系实际值进行分析。结果表明(表3),3D值与2D值、3D值与实际值、2D值与实际值间均有较好的直线相关关系,说明本系统获得总根长数据可信。由于在模拟根系时部分铁丝会缠绕在一起,使测定值比实际值偏小。为了确定在无遮挡情况下本系统测定值与实际值间的差异,将上述4种型号铁丝各剪50cm,分别不重叠地挂在定根架上拍摄,再取下扫描后用WinRhizo软件分析,比较系统测定3D值与2D和实际值间的差异。结果表明(表4),3D值平均比实测值缩小约9.7%,比2D测定值减少约8%,而2D值与实际值间差异较小。同时,较大的根系直径影响了测定值的准确性。虽然如此,由于本系统的高效率、无损及可连续性,10%以内的测定值损伤是可以接受的。

表4 3D值与2D值和实际值间的差异
Table 4 Differences among 3-D, 2-D and actual value

型号 Type	实际值/cm Actual value	3D值/cm 3D value	2D值/cm 2D value	(3D值-2D值)/2D值/% (3D value - 2D value) / 2D value	(3D值-实际值)/实际值/% (3D value - actual value) / actual value	(2D值-实际值)/实际值/% (2D value - actual value) / actual value
#22	50	40.00	49.97	-19.95	-19.99	-0.05
#24	50	47.70	48.41	-1.47	-4.60	-3.18
#26	50	45.18	48.71	-7.24	-9.63	-2.58
#30	50	47.70	49.38	-3.40	-4.60	-1.24
平均 Average	50	45.15	49.12	-8.01	-9.71	-1.76

4.3 系统在油菜上的应用

应用本系统,我们对水培条件下油菜苗期(1~13d)的生长动态进行了连续拍摄和三维重建(图7)。可以看出,油菜前4d内主要是主根增长,侧根数目和长度都较少增加。5d之后,油菜主根伸长变慢,而侧根的数量及长度则迅速增加,成为总根长及

总表面积的主要贡献者。

通过对重建的油菜根系进行定量测定,可以得到不同时间的根系各参数变化情况(图8)。结果表明,油菜总根长、总根表面积、总根体积等参数都随生长时间增加而增加,三者变化的趋势非常吻合,都是前5d增长比较缓和,而后快速增加;而表征根系

空间分布情况的另外三个参数(根系重心、最大根宽和最大根深)随时间变化的情况则略为不同,但三者都是随着根系的生长而持续增加,反映了油菜

根系受重力影响,总体根系不断向下生长,同时侧根也不断往水平方向生长,以在最大范围内占据生长空间,从而获取最多的资源。

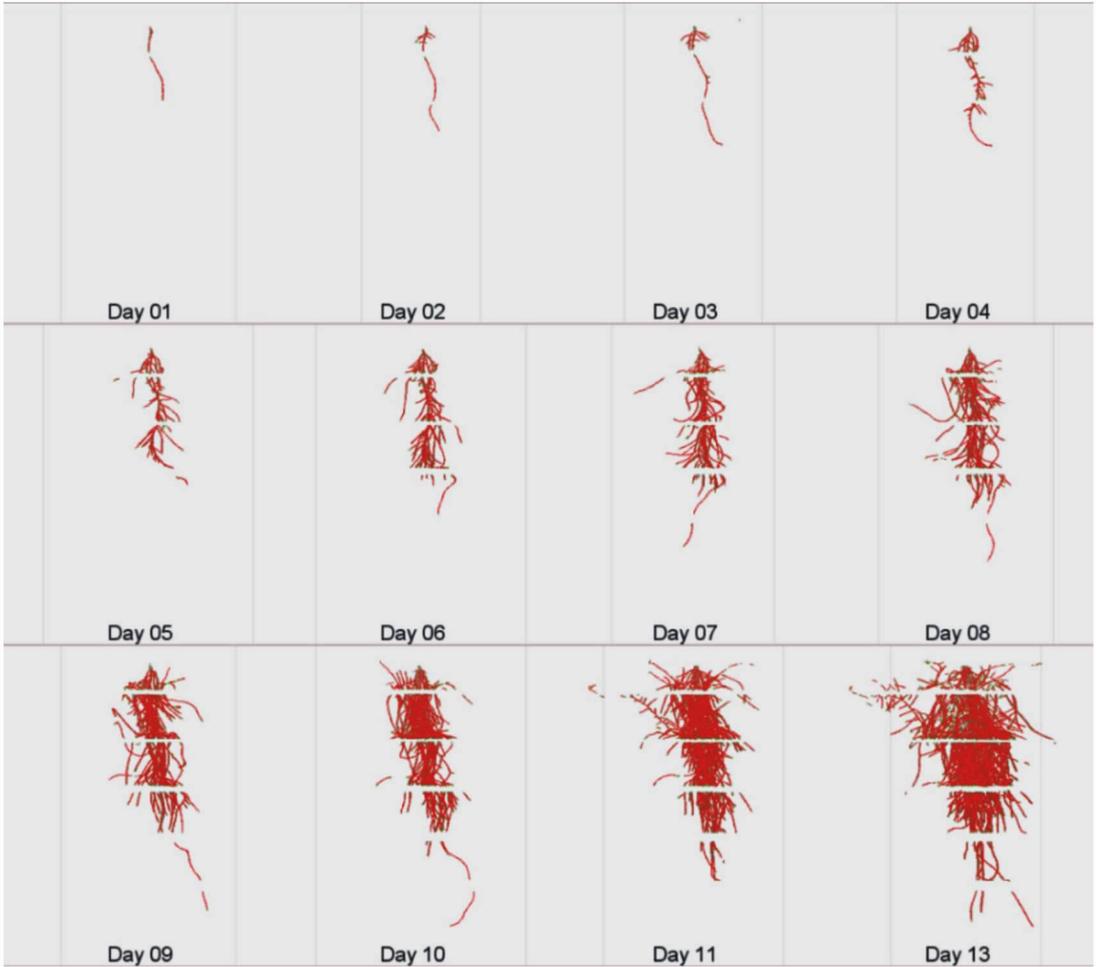


图7 油菜苗期根系三维重建效果

Fig.7 3-D reconstruction of root system for oilseed rape seedling

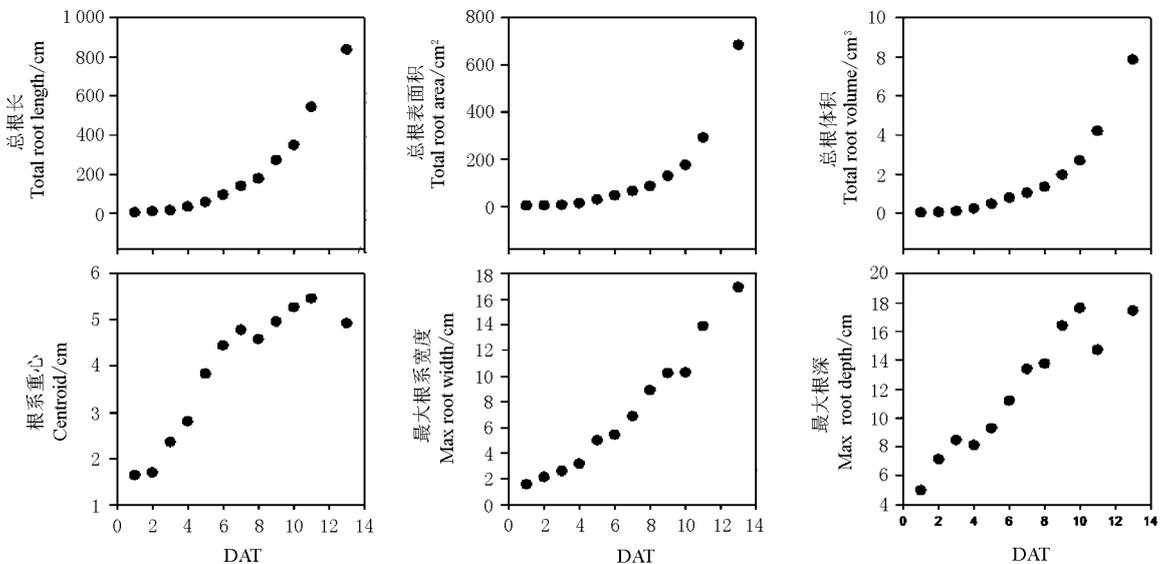


图8 水培条件下油菜苗期根系生长动态

Fig.8 Root growth dynamic under hydroponic conditions of oilseed rape seedling

5 展望

当前,农产品需求日益增长,资源浪费严重,迫切需要选育养分高效、抗逆性强的农作物新品种。分子辅助育种技术已经可以大大加快新品种的育种速度。新一代高通量 DNA 测序技术,更是使大规模的遗传群体基因组学测序变得容易。然而,如何准确快速地进行表型定量,特别是植物根系构型的表型鉴定,成为制约新品种选育的限制因子。本系统的改进,为油菜和其它农作物根系构型研究提供了新的选择。在通入氧气提高农作物对水环境适应性的条件下,通过改变营养液配方模拟养分不足或过量,通过营养液中添加一定比例琼脂和连续通氮气的方法模拟渍害胁迫,通过营养液中添加一定浓度 PEG 模拟干旱及其胁迫程度等,都能够达到试验所需目标,且相比大田或其它培养方式更加简单易行。

虽然本系统在油菜上获得成功,但从实际应用来看,仍然存在改进的必要。如成像水箱装水后重量较大,长时间使用后会使得底部的步进电机转轴扭曲;平底的成像水箱在排水时需要花较长时间,且因搬动导致支撑底座移位;通过人工调节支撑底座的四角螺丝来使水箱达到水平难度较大,并因不平加重了步进电机的扭曲。因此,在后期的改进中,可以考虑采用精密机床加工,将成像水箱、磁力转盘、步进电机、支撑架等固定在一起,将成像水箱底部做出凹状并连接出水口,用螺丝将支撑架固定在实验台上面,减少劳动强度,避免成像水箱的位置移动。另外,现有的根系三维重建过程,全部由人工逐步操作完成,需要操作者熟练掌握几种软件的使用方法,且需要等待每一步计算完成后才能进行下一步操作,耗时长,极大地影响了本系统的综合效率。因此,后期或需开发新的软件完成图像信息的获取和三维合成,或者将本系统现有的软件整合起来,通过一个自动化的操作界面,简单易行的完成全过程,降低对操作人员熟练度的要求,提高运行效率。

从本团队应用情况看,由于油菜是旱地作物,缺氧条件下有大量不定根产生,且根系细小柔弱,进行根系固定和三维重建难度是最大的。对旱地作物如玉米、高粱等,其根系粗壮(含根鞘)、硬度大,次级根少,很容易固定在定根架中作三维合成;对花生等无根鞘旱地作物,其侧根也足以保证根系能正常固定在定根架上,不定根少也有利于根系三维合成;对水稻等水田作物,一般都有大量的侧根产生,虽然有利于适应水培环境,促进其在定根架上固定,但大量根系相互遮挡会降低三维合成的效率和数据的准确

性。同时,对本系统来说,不同农作物可以培养的时间也有所不同,如油菜正常培养 15d 左右,根系已经大量分布在定根架之中,继续培养则难以完成三维合成,水稻也因侧根较多而培养时间较短,而玉米、高粱、花生等培养时间可更长一些。因此,应用本系统对其它农作物开展研究,需要根据其根系形态特征而适当调整培养时间、定根网直径和层间距离。

致谢

油菜根系构型高通量定量分析与三维重建系统在组建过程中得到美国农业部 Robert Holley Center for Agriculture and Health 的 Leon V. Kochian 教授以及三位工程师 Jon Shaff、Brandon Larson 和 Tom Walk 等的支持,在系统调试中得到中国农业科学院油料作物研究所李银水、谢立华、秦璐、胡小加等同事的帮助,特此致谢!

参考文献:

- [1] 罗锡文,周学成,严小龙,等. 基于 XCT 技术的植物根系原位形态可视化研究[J]. 农业机械工程学报, 2004,35(2):104-106.
- [2] 朱同林,方素琴,李志垣,等. 基于图像重建的根系三维构型定量分析及其在大豆磷吸收研究中的应用[J]. 科学通报, 2006,51(16):1 885-1 893.
- [3] Fang S, Yan X L, Liao H. 3D reconstruction and dynamic modeling of root architecture in situ and its application to research on rice phosphorus acquisition[J]. Plant J, 2009,60:1 096-1 108.
- [4] Fang S, Gao X, Deng Y, et al. Crop root behavior coordinates phosphorus status and neighbors: from field studies to three-dimensional in situ reconstruction of root system architecture[J]. Plant Physiol, 2011,155:1 277-1 285.
- [5] Zhu J, Ingram P A, Benfey P N, et al. From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture[J]. Curr Opin Plant Biol, 2011,14:310-317.
- [6] Hammer G, Dong Z, Mclean G, et al. Can changes in canopy and/or root system architecture explain historical maize yield trends in the U. S. corn belt? [J]. Crop Sci, 2009,49:299-312.
- [7] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions[J]. Nat Genet, 2013, 45,9:1 097-1 102.
- [8] White P J, George T S, Gregory P J, et al. Matching roots to their environment[J]. Ann Bot, 2013,112:207-222.
- [9] 严小龙. 根系生物学:原理与运用[M]. 北京:科学出版社, 2007.

- [10] 廖红,严小龙. 菜豆根构型对低磷胁迫的适应性变化及基因型差异[J]. 植物学报,2000,42:158-163.
- [11] 廖红,严小龙. 菜豆根形态特性的基因型差异与磷效率[J]. 植物学报,2001,43:161-166.
- [12] 廖红,戈振扬,严小龙. 水磷耦合胁迫下植物磷吸收的理想根构型:模拟与应用[J]. 科学通报,2001,46(8):641-646.
- [13] Wang X R, Yan X L, Liao H. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach [J]. *Ann Bot*,2010,106:215-222.
- [14] Liao H, Yan X L, Rubio G, et al. Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean[J]. *Funct Plant Biol*,2004,31:959-970.
- [15] Huang C Y, Kuchel H, Edwards J, et al. A DNA-based method for studying root responses to drought in field-grown wheat genotypes [J]. *Scient Rep*,2013,3(46):3194-3194.
- [16] Trachsel S, Kaepler S M, Brown K M, et al. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field [J]. *Plant and Soil*,2011,341(1-2):75-87.
- [17] Bucksch A, Burrige J, York L M, et al. Image-based high-throughput field phenotyping of crop roots [J]. *Plant Physiol*,2014,166:470-486.
- [18] Hruška J, Cermák J, Sustek S. Mapping tree root systems with ground-penetrating radar [J]. *Tree Physiol*,1999,19:125-130.
- [19] Butnor J, Doolittle J A, Kress L, et al. Use of ground-penetrating radar to study tree roots in the southeastern United States [J]. *Tree Physiol*,2001,21:1269-1278.
- [20] Butnor J R, Doolittle J R, Johnsen K H, et al. Utility of ground-penetrating radar as a root biomass survey tool in forest systems [J]. *Soil Sci Soc Am J*,2003,67(5):1607-1615.
- [21] Barton C V M, Montagu K D. Detection of tree roots and determination of root diameters by ground penetrating radar under optimal conditions [J]. *Tree Physiol*,2004,24(12):1323-1331.
- [22] Guo L, Chen J, Cui X, et al. Application of ground penetrating radar for coarse root detection and quantification: a review [J]. *Plant Soil*,2013,362:1-23.
- [23] Borden K A, Isaac M E, Thevathasan N V, et al. Estimating coarse root biomass with ground penetrating radar in a tree-based intercropping system [J]. *Agroforest Syst*,2014,88:657-669.
- [24] 廖红,严小龙. 植物根系二维栽培器 [P]. ZL02226214.8.
- [25] Le Marié C, Kirchgessner N, Marschall D, et al. Rhizoslides: paper-based growth system for non-destructive, high throughput phenotyping of root development by means of image analysis [J]. *Plant Methods*,2014,10:13.
- [26] Mathieu L, Lobet G, Tocquin P et al. "Rhizoponics": a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature *Arabidopsis thaliana* plants [J]. *Plant Methods*,2015,11:3.
- [27] 严小龙,郑少玲,廖红. 植物根系立体栽培器 [P]. ZL01242553.2.
- [28] Metzner R, Eggert A, van Dusschoten D, et al. Direct comparison of MRI and X-ray CT technologies for 3D imaging of root systems in soil: potential and challenges for root trait quantification [J]. *Plant Methods*,2015,11:17.
- [29] Clark R T, MacCurdy R B, Jung J K, et al. Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software platform [J]. *Plant Physiol*,2011,156(2):455-465.
- [30] Fang S Q, Clark R T, Ying Z H, et al. Genotypic recognition and spatial responses by rice roots [J]. *PNAS*,2013,110(7):2670-2675.
- [31] Magnavaca R, Gardner C O, Clark R B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution [M]. *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. The Netherlands,1987. 255-265.
- [32] 余常兵,陆星,李银水,等. 植物根系三维固定培养装置 [P]. CN204579393U.

(责任编辑:郭学兰)