

高光谱遥感技术在水稻转入基因表达的检测指示作用研究

李 儒¹, 陈劲松^{1*}, 袁定阳², 唐 俐², 林 琿¹, 谭炎宁², 岳跃民³, 和海霞⁴

1. 香港中文大学太空与地球信息科学研究所, 中国香港
2. 国家杂交水稻工程技术研究中心暨湖南杂交水稻研究中心, 湖南 长沙 410125
3. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南 长沙 410125
4. 中国科学院遥感应用研究所, 北京 100101

摘要 传统方法在转基因作物目的基因表达检测上做了很多工作, 但仍有发展空间。该研究利用野外高光谱仪(ASD 野外光谱仪), 避免了实验室测量带来温度水分差异造成的影响, 实地测量大田水稻样本光谱数据; 通过引入内部聚类系数控制类内波段聚合度, 使用均值光谱表征样本类光谱, 计算与光合作用高度相关的边峰以及光化学植被指数等参数, 快速定量了转基因组样本与亲本在光合作用波段的光谱表达差异。研究结果表明转入基因得到了表达、对样本产生了影响, 同时发现面积参数适合描述样本差异, 而光化学植被指数对样本差异尤为敏感。这些都证明高光谱遥感技术在水稻转入基因表达检测上具有良好指示作用和应用优势, 前景看好。

关键词 转基因水稻; 高光谱; 内聚系数; 均值光谱

中图分类号: O433; S511 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0202-04

引 言

生物技术目前备受关注, 一度被美国劳工部确定为新出现的和正在发展的三大最重要的技术之一^[1]。转基因技术作为生物技术的重大突破, 由于可以使基因优势结合, 产生强势作物(物种), 一度被当作解决人类未来粮食问题(生存)最有力的支撑技术之一。由于基因本身特性, 目前主要检测方法有: PCR 方法(polymerase chain reaction)用于检测外源目的基因^[2, 3]; ELISA 方法(enzyme-linked immunosorbent assay)用于检测目的蛋白^[4, 5]。这些方法对转入基因敏感, 可以定性或者定量、精确地检测出其存在, 但是也存在一些缺陷如高成本、使用复杂、周期长等问题^[6, 7], 对于目的基因导入后其他变化的监测这些方法也尤其有发展的必要, 原因之一在于作物培育过程中, 实时、无损、快速检测监测转入基因表达等对新品种的开发培育十分重要^[8]。

由于光谱技术无损、快速、高效、无污染及无需样品预处理等方面优势, 在转基因作物实验室识别中得到了广泛的研究和应用。Roussel 等利用光谱差异区分 Roundup ReadyTM大豆^[9]; 芮玉奎等利用近红外光谱区分出, 转基因棉花^[10]的光谱检测研究。Xie 等使用可见/近红外光谱波段区分出转

基因番茄^[8]。以上文献中, 大多是通过实验室精细光谱仪器, 如使用傅里叶变换近红外光谱仪^[8, 10]测量作物叶片等器官。该类仪器波段精细、对光谱差异敏感、精度高, 但在大量样本、大田作物转入基因快速检测中仍有不便, 尤其是当作物器官对水分、温度极度敏感的情况下, 测量数据偏差会增大^[11], 不便实时、实地、快速数据采集处理。另外, 由于仪器及测量方法的差异, 该类光谱由点推广至面等不同空间尺度, 进行大范围转基因作物种植遥感监测时也多有不便, 两者光谱分辨率的差异可能导致信息被淹没及天地模型建立中一些问题的产生。

针对上述问题, 本文使用 ASD 野外光谱仪实地大量获取转基因水稻及其亲本光谱数据, 着眼于通过均值光谱对比分析, 快速检测转入基因的表达, 为水稻转基因育种过程中转入基因的表达实时检测、监测奠定技术基础。

1 实 验

1.1 实验仪器

本文使用 ASD Field Pro 光谱仪, 波长范围 350~2 500 nm, 其中 350~1 000 nm 波段的采样间隔为 1.4 nm、光谱分辨率为 3 nm, 在 1 000~2 500 nm 波段的采样间隔为 2 nm、

收稿日期: 2009-02-02, 修订日期: 2009-05-06

基金项目: 香港特别行政区政府研究资助局项目(461907)资助

作者简介: 李 儒, 1981 年生, 香港中文大学太空与地球信息科学研究所博士研究生 * 通讯联系人 e-mail: chenjinsong@cuhk.edu.hk

光谱分辨率为 10 nm。考虑到基因性状可能的表达反映在光谱上的特征极容易被天空光等外部因素影响,本文使用 ASD 光谱仪及其高密度探头(自带光源)深入田间快速、少外界干扰直接获得叶片精细光谱数据,避免温度变化导致样本失水引起光谱差异和其他外部噪声,保证测量时各项条件与自然环境一致,这对以后大面积进行作物监测或建立相关生物物理模型也更有意义。

1.2 样本介绍

试验样本为转螺旋藻蓝蛋白基因植株及其对照亲本 R893,均由国家杂交水稻工程技术研究中心提供。该类基因的正确表达兼有提高植株光合作用能力与改良稻种营养品质的双重功能。样本共分 4 组,亲本 1 组,另 3 组为转入同类藻蓝蛋白基因但不同表达行为的转基因纯合系,编号为亲本、T1、T2、T3。

亲本与转基因植株按块种植在同一水地,充分保证水分、温度、施肥等条件相同,以减少外部因素造成的样本间光谱差异,确保对比试验稳定性。亲本和转基因组只有转入基因有无的差别,其他属性相同。样本同处蜡熟期,植株呈微黄绿色,以绿色为主,个别叶片变黄,植株整株生长旺盛。根据转入基因的特点(可能对叶片光合作用产生影响),本文只针对光合作用敏感波段(400~700 nm)研究。

2 结果与分析

2.1 光谱数据预处理

考虑水稻叶片不同部位光合作用的强弱差异,以及植被反射吸收光谱产生机理^[12],实验分别采集了同条件下样本叶尖、叶中、叶片下部 3 个部位的叶面、叶背光谱参与分析,样本总光谱数目超过 2 000 条。在保证足够的样本内聚下,将同类样本同部位不同叶片光谱平均,用以代表本组样本光谱,并引入内聚系数控制均值光谱内聚性。

使用均值光谱表征样本类光谱非常必要,因为实验着眼于分析获取样本间整体差异,就必须防止个别干扰整体。通过均值光谱滤去一些样本个别随机差异,同时避免大量杂乱无章的工作,提高效率,这也是种遵循由简入繁逐步推进的研究策略。

内聚系数(inner-clustering coefficient, inner-cc):同类样本同部位同样观测条件下,波段反射率均方差与其均值的比值,该参量表征同类样本光谱内聚程度。

$$\text{Inner-cc} = \frac{\text{Stdv}(R_{ij})}{\text{Mean}(R_{ij})} \times 100\% \quad (1)$$

R_{ij} 为第 i 波段第 j 次观测的反射率,或同类样本组内第 j 个样本个体第 i 波段的反射率。显然该值越小,说明类内波段间聚合性越好,使用均值光谱表征类光谱的可信度就越高。根据现有经验,Inner-cc ∞ (0,15%)即视为均值光谱具有足够内聚性,偏离在可接受的误差范围之内,可以使用其表征样本光谱。该参量亦可以用来控制原始光谱数据预处理的质量。

表 1 是样本的内聚系数。

Table 1 Inner-cc of samples

	亲本	T1	T2	T3
最大值	19.66%	19.62%	13.13%	11.46%
最小值	1.09%	0.59%	1.05%	0.10%
均值	4.05%	5.23%	3.55%	6.35%
均方差	3.91%	4.57%	2.36%	2.81%

根据分析发现内聚系数偏大值主要集中在可见光谱段,这是因为该波段对植被以外其他影响敏感,也由于仪器本身噪声影响,但该值最大不超过 20%。从表 1 看,样本绝大部分波段内聚系数分布在均方差不超过 5% 的 7% 以内,且保持稳定。因此本文中均值光谱完全可以用来表征样本类光谱。

2.2 参数选择

针对样本,本文分别计算了 36 种不同叶片部位的光谱参数,从中挑选出响应明显的红边、红光吸收谷、黄边、绿峰以及光化学植被指数 5 类参数。红边位置会依据叶绿素含量、生物量和物候变化沿长波或短波方向移动^[13];红谷面积与叶绿素含量有着良好的相关性^[14];黄边位置是叶黄质集中区域,该物质与植被光合作用密切相关^[15];当植物生长健康、处于生长期高峰、叶绿素含量高时,绿峰位置向蓝光方向偏移,绿峰幅值减小。这些参数与水稻光合作用能力不论经验上还是机理上都有良好的相关性(见表 2)^[16,17]。

Table 2 Spectral parameters of the middle of front leaves

	亲本	T1	T2	T3
[670, 760]红边反射峰/nm	713	717	723	716
峰值反射率	0.339	0.351	0.438	0.355
红边面积	33.260	30.314	32.207	32.659
[650, 690]红光吸收谷/nm	671	671	670	671
峰值反射率	0.047	0.050	0.045	0.042
吸收谷面积	2.130	2.582	1.975	1.875
[550, 650]黄边反射峰/nm	569	569	569	569
峰值反射率	0.124	0.113	0.104	0.113
黄边面积	9.968	9.813	8.448	8.595
[510, 560]绿光反射峰/nm	553	553	553	553
峰值反射率	0.143	0.131	0.122	0.133
绿峰面积	5.926	6.037	5.308	5.511

由于样本在同样环境中生长、同样条件下快速采集数据,排除了外界其他干扰因素,故上述参数的变动可用以直接反映样本光合作用器官的内部变化。样本只有转入基因有无的差别,其他属性相同,如果出现样本间光合作用能力变化或差异,很可能是转入基因造成,故可以从上述参数变化反映目标基因是否得到表达或对样本光合作用产生影响。

光化学植被指数 PRI(photochemical reflectance index)的定义为 531 和 570 nm 处反射率的归一化植被指数,这两个波段位置的反射率受到叶黄质循环的影响并和叶片的光能利用率密切相关^[15]。因此 PRI 为估算叶片的光能利用率提供了一种很好的方法。简单比例 PRI(Simple ratio PRI, SR-PRI)由于更体现光能利用率的含义被发提出,经过实证和比

较分析表明 SR-PRI 能够用来估算叶片的光能利用率, 并且精度略高于 PRI^[16, 17]。本文分别计算了样本两类参数(见表 3)。

$$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570}) \quad (2)$$

$$SR-PRI = R_{531} / R_{570} \quad (3)$$

R_{531} 代表 531 nm 处的反射率(叶黄质信号波段), R_{570} 代表 570 nm 处的反射率(参考波段)。

Table 3 PRI and SR-PRI of samples

	亲本	T1	T2	T3
PRI	-0.001 8	0.083 7	0.046 4	0.068 8
SR-PRI	0.9965	1.182 7	1.097 0	1.147 8

2.3 结果及其分析

比较叶面叶背三个部位光谱, 本文使用叶面中部光谱重点分析。表 2 显示转基因样本较亲本红边位置已经向长波方向移动, 表明其光合作用能力增强。红光吸收谷位置变动不大, 但区域内红光反射率变动明显, 吸收面积变化尤为突出: 较亲本, 吸收面积最多减小达 12.0%, 这说明转基因对红光吸收增强, 光合作用强势。样本黄边、绿峰位置未有很大变化, 但是区间内吸收反射面积却变化明显: 较亲本, 转基因样本中有 3 组黄边面积减少, 面积最多减少 15.2%, 黄边对应位置光谱反射率最大减少 16.1%; 绿峰处改变也很明显, 面积最大减少 10.4%, 反射率最大减少 14.7%, 这些变化都与叶片光合作用强劲与否有关。上述观测共同有利的支持了转基因样本光合作用能力发生了变化的结论。

PRI 及 SR-PRI 结果亦显示: 亲本与样本间有明显差异, 转基因组这两类参数较亲本显著增大, 最大增幅分别为 475% 和 18.7%。即便认为 PRI 参数在此处异常忽略不计,

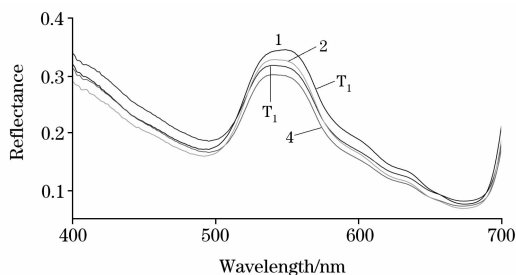


Fig. 1 Details of samples spectrum: continuum removal spectrum curve at 400-700 nm

1: Parent; 2: T2; 4: T3

从 SR-PRI 也仍能反映样本间光合作用的变化。这些差异直接反映植被光合作用效率状况, 从数值上看转基因组的光能利用率要高于其亲本。

在样本反射率光谱曲线(图 1)上可以清晰地发现亲本和转基因样本在 400~700 nm, 尤其是 500~600 nm 间光谱反射差异: 亲本反射率曲线明显高于其他组。这些差别反映样本光合作用情况的不同。同时, 从本图也反映使用面积参数描述样本在一定光谱范围内的差异要比使用点参数更容易和合理, 其结果相对稳定, 较反射率等参数随机干扰少。这些都从另一方面直观的印证了前文分析结果。

3 结论

使用 ASD 野外光谱仪获取样本精细光谱, 发现相关光谱参数相互印证了亲本和转基因水稻样本光谱间存在的明显差异, (1)尤其是在红光吸收谷和绿峰位置, 这些差异与植被光合作用直接相关, 说明转基因组样本光合作用能力要强于其亲本, 其光能利用率也要高于亲本, 并且表现稳定。(2)表 2 反映相关区间内曲线面积参数对光合作用敏感度高, 比区间内反射率更稳定, 更适宜用以描述样本光谱差异, 作为判断植被亲本与样本光合作用差异的参数具有一定的优势。(3)表 3 反映 PRI 作为转基因植被光合作用能力的直接指示因子在样本间表现更为敏感且稳定。(4)在排除外界条件干扰的情况下, 可以确认该类光谱差异是由于转入的部分藻蓝蛋白基因造成, 即实验中转入的基因个体, 虽然不够完整, 但确已对水稻样本光合作用产生影响。(5)实验结果也验证本文发展的内聚系数参数, 很好的控制了均值光谱的稳定性(内聚性), 使用均值光谱在表达样本类间差异研究是有效的。(6)这些都说明通过使用高光谱遥感技术对转入基因表达等实时、准实时检测具有明显的研究和应用价值, 尤其是在转基因植被育种过程中, 更具优势, 可以帮助研究人员实时了解转入基因发展状态, 随时调整计划避免人力财力时间的浪费, 控制实验进展。

由于考虑到转入基因的特殊性, 本实验只关注了光合作用波段的光谱差异, 未将视野扩展至全波段(350~2 500 nm); 考虑到系统连带性问题, 转入基因是否受控只影响光合作用器官, 对植被其他器官是否也产生影响还有待于继续关注和研究; 另外本次实验只采集了样本成熟期内的数据, 转入基因在其他生长期内的表现是否稳定等问题并未涉及, 仍需更多的精力投入深入研究, 以获得稳定可靠的技术方法。

参 考 文 献

- [1] Gewin V. Nature, 2004, 427: 376.
- [2] Hubner P, Studer E, Luthy J. Food Control, 1999, 10: 353.
- [3] Nikolic Z, Taski-Ajdukovic K, et al. Food Research International, 2009, 42(3): 349.
- [4] Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, et al. Food Control, 1999, 10(6): 407.
- [5] Garcia M C, Garcia B, et al. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1212.
- [6] Ahmed F E. Trends Biotechnol., 2002, 20: 215.

- [7] Griffiths K, Partis M L, et al. Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food. Australian Government Analytical Laboratories, 2002, 1-3(Executive Summary).
- [8] Xie Lijuan, Ying Yibin, Ying Tiejin, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 584: 379.
- [9] Roussel S A, Hardy C L, et al. *Society for Applied Spectroscopy*, 2001, 55(10): 1425.
- [10] TONG Qing-xi, ZHANG Bing, ZHENG Lan-fen(童庆禧, 张 兵, 郑兰芬). *Hyperspectral Remote Sensing(高光谱遥感: 原理、技术与应用)*. Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2006. 22.
- [11] Curran P J, Windham W R, Gholz H L. *Tree Physiology*, 1995, 15: 203.
- [12] SUN Xue-mei, ZHOU Qi-fa, HE Qiao-xia. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(7): 844.
- [13] Gamon J A, Peñuelas J, Field C B. *Remote Sensing of Environment*, 1992, 41: 35.
- [14] Nagendra H. *International Journal of Remote Sensing*, 2001, 22(12): 2377.
- [15] Stamps J A, Buechner M, et al. *The American Naturalist*, 1987, 129(4): 533.
- [16] WU Chao-yang, NIU Zheng, TANG Quan(吴朝阳, 牛 铮, 汤 泉). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(9): 2014.
- [17] Wu C, Niu Z, et al. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2008, 148(8-9): 1230.

Detection of the Expression of Transgene in Rice Plant Based on Hyperspectral Remote Sensing Technique

LI Ru¹, CHEN Jin-song^{1*}, YUAN Ding-yang², TANG Li², LIN Hui¹, TAN Yan-ning², YUE Yue-min³, HE Hai-xia⁴

1. Institute of Space and Earth Information Science, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

2. China National Hybrid Rice R&D Center/Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, China

3. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China

4. Institute of Remote Sensing Applications, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract The present study aims to identify the expression of transgene in given rice plant samples in certain conditions. To avoid external noise caused by temperature change and water-loss, field spectrum was collected with ASD field spectrometer in natural state. The study calculated the mean spectrum of samples as main data set analyzed which were controlled by inner clustering coefficient to ensure data quality. By mean spectrum, the noise from random distinctions in few individual cultivators, which could not be expressed in the class stably, could be weakened even with filtering. With the help of parameters, such as red edge and green peak, this study gave qualitative spectral differences between transgenic samples and their parents. The results show that the transgenes in rice plant were expressed and influenced the samples. Moreover, it was found that the parameters of area are more suitable for describing the differences/changes of the samples, while PRI and SR-PRI are more sensitive to indicate them. Most of the above results could be found on the continuum-removal spectrum curve of samples. These conclusive results demonstrate that hyperspectral remote sensing technique has good prospects and application potential in transgene expression detection and monitoring, especially in plant breeding process.

Keywords Transgenic rice; Hyperspectral; Inner-cc; Mean spectrum

(Received Feb. 2, 2009; accepted May 6, 2009)

* Corresponding author