

近红外光谱无损测定大豆种子生活力方法研究

耿立格¹, 宋春风², 王丽娜¹, 安雪松², 孙娟¹

(¹河北省农林科学院粮油作物研究所/河北省作物遗传育种实验室, 石家庄 050031; ²北京化工大学材料科学与工程学院, 北京 100029)

摘要:快速准确无损测定种子生活力是种质资源安全保存研究中的一项重要内容。采用傅立叶变换近红外漫反射光谱技术,以保存不同年限的大豆品种资源的种子为样品,利用偏最小二乘法(PLS)建立其生活力的无损测定校正模型,并对不同光谱预处理方法和不同建模波段范围对模型的预测性能进行对比分析。结果表明:利用4000~10000/cm全波段建立的模型预测性能较高。经Savitzky-Golay二阶导数和标准化预处理后,生活力的PLS模型预测性能最好,校正集的决定系数为0.937,验证集决定系数为0.902,校正均方根误差(RMSEC)和验证均方根误差(RMSEV)分别为2.190和2.684。模型预测误差接近标准发芽方法测定误差,说明该方法准确性较高,能够满足种质资源快速、非破坏性生活力检测的要求,为今后快速无损测定种子生活力提供了方法。

关键词:大豆;种质资源;近红外光谱;无损测定;种子生活力

Non-destructive Determination of Soybean Seed Viability by Near-Infrared Spectroscopy

GENG Li-ge¹, SONG Chun-feng², WANG Li-na¹, AN Xue-song², SUN Juan¹

(¹Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences/Crop Genetics and Breeding Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031;

²College of Material Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract: A fast, accurate and non-destructive assay of seed viability is a critical research subject for the preservation of germplasm. In this study, a rapid and non-destructive determination assay of seed viability was established by employing fourier transform near-infrared(FT-NIR) spectroscopy. A calibrations model using partial least squares(PLS) was developed for the relationship between FT-NTR wave band and soybean seed viability, where the seeds were processed by different preservation times. Simultaneously, the prediction performance comparisons of several models established from different spectral-pretreatment methods and different wave band were conducted. Results showed that the model with 4000 – 10000/cm of full-band range demonstrated a higher prediction accuracy, where a Savitzky-Golay second derivative and standardized pretreatment was conducted. The determination coefficient of calibration set and prediction set was 0.937 and 0.902, respectively, which was close to that of the standard germination method. RMSEC and RMSEV were 2.190 and 2.684, respectively. It indicated that this method had high accuracy, and could be considered as a rapid non-destructive determination protocol of seed viability, which was essential technique for germplasm preservation practice.

Key words: Soybean; germplasm; near-infrared spectroscopy; non-destructive assay; seed viability

据统计,世界上已收集的植物种质资源有610万份,其中90%以种子形式保存在低温种质库中,

收稿日期:2013-03-28 修回日期:2013-05-13 网络出版日期:2013-10-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1546.026.html>

基金项目:农业部农作物种质资源保护项目(NB2012-2130135);国家科技基础条件平台项目(2012-023);河北省农科院特色优势项目(A2012060201)

第一作者主要从事作物种质资源安全保存、评价鉴定研究。E-mail: glg126@yahoo.com.cn

我国国家长期库贮存的种质数量已达 34 万份,居世界前列^[1]。在保存过程中,为了检测种子生活力的动态,必须定期从有限的种子保存样品中抽取种子。常规的发芽试验都要消耗有限的种子库存数量,这必将导致更新次数的增加,进而增加遗传漂移的频率及种性改变的风险,同时又要消耗大量的人力、物力和时间,因此,快速准确非破坏性测定种子生活力对种子安全保存具有重要意义。

国内外利用电导法进行无损伤预测种子生活力的研究很多^[2-5],虽然此方法中有限次数的吸水-回干处理对某些作物种子生活力无明显的不良影响,但随着浸泡次数的增多种子生活力会明显降低。近红外光谱技术(NIRS, near-infrared reflectance spectroscopy)的应用始于 20 世纪 60 年代,早期主要用于谷物中含水量、蛋白质、脂肪等含量较高的成分的测定^[6-9]。90 年代后,利用红外光谱结合模式识别的方法又在作物品种的鉴别和分类上得到了成功应用^[10-11]。近红外光谱(NIR)技术具有快速、简便、高效、准确、低成本、非破坏性等优点,国内外学者利用近红外光谱技术仅在林业^[12-13]、牧草^[14]等种子活力定性测定方面开展了研究,有关种质库长期保存不同品种资源的种子生活力定量测定方面未见报道。

本研究利用近红外光谱分析技术,快速获取种质的傅里叶变换漫反射近红外光谱信息,寻找光谱吸光度与种质生活力之间的相关关系,并对不同光谱预处理方法和不同波段范围建立模型的预测性能进行了对比分析,建立了生活力量校正分析模型,为作物种质资源无损测定生活力提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

利用河北省农业生物资源保存中心保存的黄色种皮大豆地方品种资源中的 84 份种子作为研究材料,其中 1987 年、1988 年、1989 年、1993 年入库保存的品种分别有 46 份、20 份、14 份、4 份;发芽率 70.0% ~ 99.5%;百粒重 9.0 ~ 22.3 g;粒形有圆形、肾形、椭圆、长椭圆、扁椭圆、扁圆;种子含水量 6% ~ 7%。这些材料来自于河北省不同地区。

1.2 方法

1.2.1 样品集近红外光谱采集 采用美国 Thermo 公司 ANTARISII 型傅立叶变换近红外光谱仪,使用漫反射大体积分球作为光谱采集手段,采样光斑直径 2 cm, PBS 检测器,扫描光谱范围 4000 ~ 10000 /cm,扫描次数 60 次,分辨率 16/cm。将样品

装入 5 cm 内径的样品杯中,采集光谱时旋转样品台以增加采样面积。每个样品重复装样 3 次进行光谱采集,将采集的 3 张光谱取平均值作为样品光谱。

1.2.2 样品集生活力的测定 种子生活力的测定采用《国际种子检验规程》^[15]的标准发芽方法进行。发芽床为 3 层滤纸,加定量蒸馏水,发芽温度为 20 ℃,在黑暗中发芽,7 d 调查发芽率(代表生活力)。每份种质发芽率检测用种量为 50 粒,3 个重复。将获得的发芽率作为标准值进行建模。

1.2.3 光谱数据分析和定量校正模型的建立 数据分析与建模使用了 CM-2000 化学计量学分析软件。采用偏最小二乘法(PLS, partial least square)作为建立模型的化学计量学方法^[16-18]。84 个样品随机分为校正集和验证集,比例约为 2:1。使用留一法交互验证选择建模最佳主成分数。通过决定系数(R^2)、校正均方根误差(RMSEC)和验证均方根误差(RMSEV)评价模型的预测性能。预测性能好的模型应该具有较高的 R^2 值,较低的 RMSEC 和 RMSEV 值。RMSEC、RMSEV 的计算公式:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

其中, n 为样品数; \hat{y}_i 为校正集或验证集的性质预测值; y_i 为校正集或验证集的性质标准值。

2 结果与分析

2.1 波长范围的选择

在 4000 ~ 10000/cm 光谱区内,大豆种子的近红外漫反射光谱显示(图 1),各个样品的光谱形状基本一致,只是吸光度存在差异。种子生活力与近红外漫反射光谱吸光度的相关系数(图 2)说明,种子生活力与其近红外光谱有很好的相关性,最大相关系数可达 0.863。选择相关系数较高的波段和全波段分别进行建模。结果显示(表 1),4000 ~ 10000/cm 全波段模型的预测性能比较好。

2.2 模型的建立

由不同光谱预处理方法和波段建立的大豆种子生活力的 PLS 模型结果如表 1 所示。RMSEC 和 RMSEV 值越小,模型精度越高。RMSEC 和 RMSEV 值越接近,模型稳定性越好。由不同波段以及不同预处理方法得到的模型对应的模型评价参数可见,4000 ~ 10000/cm 全波段配合 Savitzky-Golay 二阶导数和标准化方法建立的模型最优。最佳主成分数使用留一法交互验证形成的 PRESS 图确立(图 3)。校正集决定系数为 0.937,验证集决定系数为 0.902,

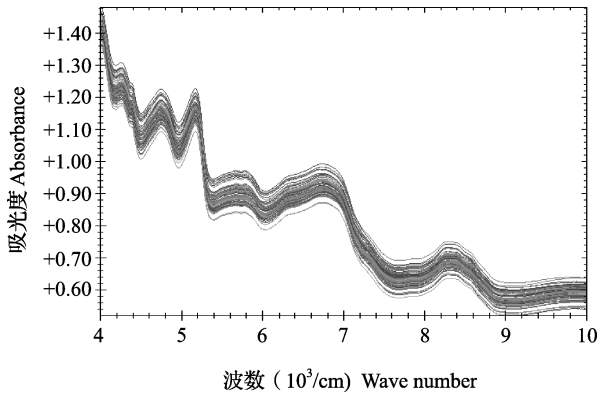


图 1 大豆种子近红外漫反射光谱图

Fig. 1 The near infrared (NIR) diffuse reflection spectra of soybean seeds

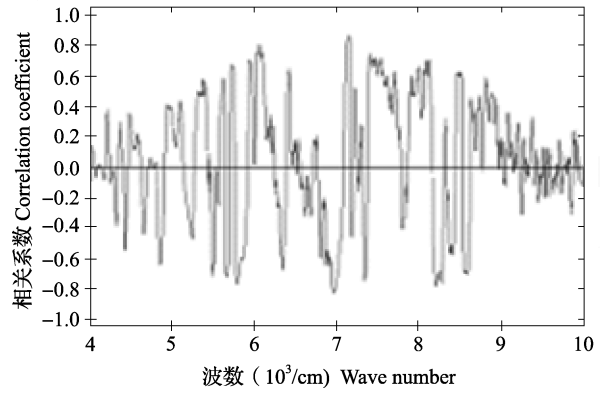


图 2 大豆种子近红外光谱与种子生活力相关系数图

Fig. 2 The curve of correlation coefficient between NIR spectra and the seed viability of soybean seeds

表 1 不同预处理方法及波段所建 PLS 模型的评价参数

Table 1 The evaluation parameters of PLS models established by different pretreatment methods and wavelength bands

预处理方法与波段 Pretreatment method and wavelength band	校正集 Calibration set		验证集 Validation set		主成分数 No. of principal component
	R_c^2	RMSEC (%)	R_v^2	RMSEV (%)	
	全波段 + Savitzky-Golay 一阶导数	0.916	2.525	0.860	
全波段 + Savitzky-Golay 一阶导数 + 均值中心化	0.820	3.510	0.808	3.700	2
全波段 + Savitzky-Golay 一阶导数 + 标准化	0.900	2.672	0.880	2.926	2
全波段 + Savitzky-Golay 二阶导数 + 标准化	0.937	2.190	0.902	2.684	4
R > 0.1 波段 + Savitzky-Golay 二阶导数 + 标准化	0.934	2.241	0.890	2.802	4
R > 0.2 波段 + Savitzky-Golay 二阶导数 + 标准化	0.933	2.229	0.892	2.808	3
R > 0.4 波段 + Savitzky-Golay 二阶导数 + 标准化	0.940	2.107	0.892	2.765	3

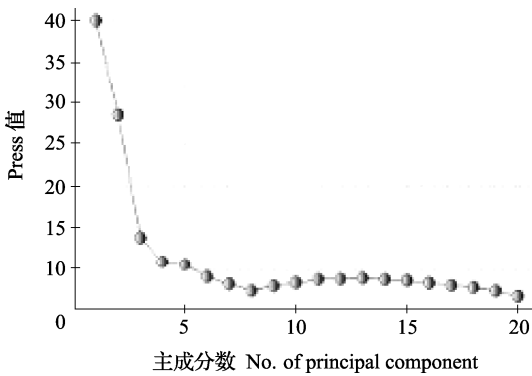


图 3 留一法交互验证得到的 PRESS 图

Fig. 3 The PRESS figure obtained by leave-one-out cross validation

RMSEC 和 RMSEV 分别为 2.190 和 2.684。该最优模型预测值与标准值的对比图如图 4、图 5 所

示。该模型建立时剔除了残差比较大的 6 个异常样品。

2.3 预测效果分析

78 个大豆种质资源生活力模型的预测值与标准值偏差情况见表 2。78 个样品预测值的变化范围是 73.8% ~ 101.2%，绝对误差最大为 5.6%，96.15% 样品的绝对误差小于 4.30%，相对误差最大为 0.06%，91.03% 样品的相对误差小于 0.04%。本试验采用标准方法测定发芽率，78 个样品标准值的变化范围为 70.0% ~ 99.5%，最大绝对误差为 4.38%，平均绝对误差为 2.29%，最大相对误差为 0.04%，平均相对误差为 0.03%，表明近红外预测结果的准确度和精确度很接近本试验所采用的标准方法。

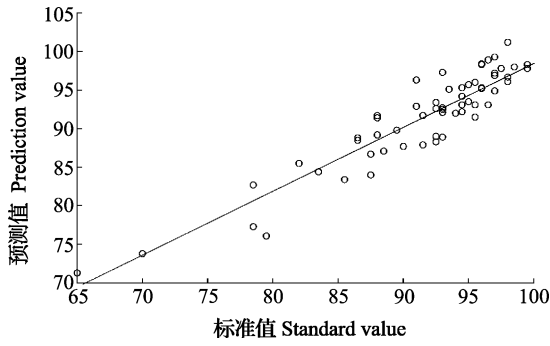


图 4 生活力校正集预测值和标准值对比图

Fig. 4 The contrast between the prediction values and standard values of calibration set

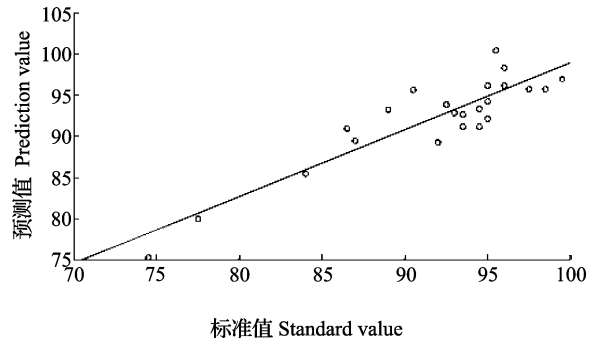


图 5 生活力验证集预测值和标准值的对比图

Fig. 5 The contrast between the prediction values and standard values of validation set

表 2 大豆种子生活力模型预测值和标准值偏差表

Table 2 The deviation of soybean seed vigor prediction values and standard values

(%)

资源编号 Accession No.	标准值 Standard value	预测值 Prediction value	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error	资源编号 Accession No.	标准值 Standard value	预测值 Prediction value	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error
1	94.5	93.1	1.40	0.01	40	97.5	97.8	-0.30	0.00
2	98.0	96.7	1.30	0.01	41	96.0	98.3	-2.30	-0.02
3	88.0	89.2	-1.20	-0.01	42	96.5	98.9	-2.40	-0.02
4	87.5	86.7	0.80	0.01	43	95.5	96.0	-0.50	-0.01
5	91.0	96.3	-5.30	-0.06	44	97.0	94.9	2.10	0.02
6	92.5	92.6	-0.10	0.00	45	96.0	98.4	-2.40	-0.03
7	89.5	89.8	-0.30	0.00	46	96.5	93.1	3.40	0.04
8	95.0	93.5	1.50	0.02	47	82.0	85.5	-3.50	-0.04
9	94.5	94.2	0.30	0.00	48	91.0	92.9	-1.90	-0.02
10	93.0	92.5	0.50	0.01	49	93.0	92.1	0.90	0.01
11	95.0	93.5	1.50	0.02	50	88.0	91.7	-3.70	-0.04
12	98.0	96.1	1.90	0.02	51	90.0	87.7	2.30	0.03
13	94.5	95.3	-0.80	-0.01	52	93.5	95.1	-1.60	-0.02
14	93.0	92.7	0.30	0.00	53	92.5	93.4	-0.90	-0.01
15	92.5	88.3	4.20	0.05	54	94.0	92.0	2.00	0.02
16	95.5	93.1	2.40	0.03	55	96.0	95.3	0.70	0.01
17	95.5	91.5	4.00	0.04	56	98.0	101.2	-3.20	-0.03
18	91.5	87.9	3.60	0.04	57	95.0	95.7	-0.70	-0.01
19	92.5	89.0	3.50	0.04	58	94.5	92.2	2.30	0.02
20	93.0	88.9	4.10	0.04	59	93.0	97.3	-4.30	-0.05
21	87.5	84.0	3.50	0.04	60	87.0	89.3	-2.30	-0.03
22	91.5	91.7	-0.20	0.00	61	93.5	92.2	1.30	0.01
23	85.5	83.4	2.10	0.02	62	86.5	89.0	-2.50	-0.03
24	98.5	98.0	0.50	0.01	63	93.5	92.6	0.90	0.01
25	86.5	88.8	-2.30	-0.03	64	84.0	84.1	-0.10	0.00
26	97.0	96.9	0.10	0.00	65	96.0	100.3	-4.30	-0.04
27	86.5	88.5	-2.00	-0.02	66	90.5	96.0	-5.50	-0.06
28	78.5	77.3	1.20	0.02	67	77.5	80.3	-2.80	-0.04
29	88.0	91.4	-3.40	-0.04	68	74.5	74.6	-0.10	0.00
30	83.5	84.4	-0.90	-0.01	69	99.5	98.6	0.90	0.01
31	88.5	87.1	1.40	0.02	70	98.5	97.0	1.50	0.02
32	78.5	82.7	-4.20	-0.05	71	97.5	96.0	1.50	0.02
33	70.0	73.8	-3.80	-0.05	72	95.5	101.1	-5.60	-0.06
34	79.5	76.1	3.40	0.04	73	94.5	91.7	2.80	0.03
35	99.5	98.3	1.20	0.01	74	95.0	96.9	-1.90	-0.02
36	96.0	95.2	0.80	0.01	75	95.0	93.0	2.00	0.02
37	99.5	97.8	1.70	0.02	76	92.0	92.2	-0.20	0.00
38	97.0	99.3	-2.30	-0.02	77	89.0	91.9	-2.90	-0.03
39	97.0	97.2	-0.20	0.00	78	92.5	94.2	-1.70	-0.02

3 讨论

在本试验中,大豆种子生活力近红外方法分析的准确性较高,与生活力标准检测方法相当甚至优于标准方法,说明在作物种质资源保存过程中,利用近红外漫反射光谱技术建立的模型进行种子生活力检测是可行的。近红外光谱分析技术具有不破坏样品、可在线检测、测定速度快、费用低、测定重现性好、操作简单快捷等特点,测定每个样品耗时仅需1 min,无需其他任何耗材。利用近红外进行生活力检测,有效解决了资源库每年进行生活力检测消耗大量种子、大量人力物力和时间的问题。

在进行近红外光谱测定时,应注意光谱的分辨率、光谱的扫描次数、重复装样测量次数和仪器性能对光谱测量的影响,应尽量选取适合的测量条件进行光谱测量,且应在同一台仪器上采集建模光谱。另外,选取足够数量的有代表性的种质,选择合适的建模波段、预处理方法、最佳主成分数和剔除异常样品,优化模型,提高模型的预测性能和适用范围,从而建立一个最优模型,也是近红外光谱分析方法成功与否的关键性因素^[19]。

本试验采用大豆不同品种的种子,入库年份不同,大小和粒形不同,来自于不同地区,因此建立的发芽率 NIR 定量分析模型适用范围较广。但本次建模种子的生活力在 70.0% ~ 99.5% 之间,子粒色均为黄色。若再补充一些生活力低及其他子粒颜色的样品,建立的模型将会更完善,模型生活力测定适用范围将更宽。另外,本研究采用种质库保存的大豆种子,更能说明近红外无损测定技术在大豆种子生活力测定中的可行性,也对种子库中保存的其他作物种子采用近红外方法进行快速无损测定具有指导意义。在以后的研究中如果能采用自然劣变及人工加速老化方法获得种子加以完善,则更能说明近红外光谱分析方法在种子生活力测定中的可行性。

参考文献

- [1] 王述民,李立会,黎裕,等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告(1) [J]. 植物遗传资源学报,2011,12(1):1-12
- [2] 李灵芝,陈叔平,卢新雄,等. 非破坏性方法测定小麦种子活力研究[J]. 华北农学报,2002,17(2):75-81
- [3] Davidson K G V, Sowa S, Moore F D, et al. Maize seed response to successive imbibition dryback cycles; viability and vigor [J]. Seed Sci Res, 1994, 4:431-437
- [4] 乔建燕,周建萍,田齐建,等. 大豆种子老化过程中生理特性变化的研究[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(5):616-620
- [5] 曾秀华,张如莲. 圭亚那柱花草种子活力的非破坏性测定方法[J]. 热带农业科学,2008,28(4):22-25
- [6] 禹山林,朱雨杰,闵平,等. 傅立叶近红外漫反射非破坏性测定花生种子蛋白质和含油量[J]. 花生学报,2003,32(S):138-143
- [7] 张晗,卢新雄,张志娥,等. 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(3):271-275
- [8] 杨传得,于洪涛,关淑艳,等. 近红外反射光谱技术预测花生种子含水量[J]. 花生学报,2012,41(1):6-9
- [9] 孙君明,韩粉霞,闫淑荣,等. 傅里叶近红外反射光谱法快速测定大豆脂肪酸含量[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(6):1290-1295
- [10] Hollung K, Øverland M, Hrustić M, et al. Evaluation of nonstarch polysaccharides and oligosaccharide content of different soybean varieties (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy and proteomics[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53:9112-9121
- [11] 赵杰文,陈全胜,张海东,等. 近红外光谱分析技术在茶叶鉴别中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(9):1601-1604
- [12] 朱大洲,王坤,周光华,等. 单粒大豆的近红外光谱特征及品种鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(12):217-222
- [13] 朱丽伟,黄艳艳,杨丽明,等. 用近红外光谱法快速无损检测苦豆子和决明子单粒种子生活力的研究[J]. 红外,2011(4):35-39
- [14] Tigabu M, Oden P C. Rapid and non-destructive analysis of vigour of *Pinus patula* seeds using single seed near infrared transmittance spectra and multivariate analysis [J]. Seed Sci Technol, 2004, 32:593-606
- [15] 韩亮亮,毛培胜,王新国,等. 近红外光谱技术在燕麦种子活力测定中的应用研究[J]. 红外与毫米波学报,2008,27(2):86-90
- [16] 国际种子检验协会(ISTA). 国际种子检验规程[M]. 北京:农业出版社,1985
- [17] 许禄,邵学广. 化学计量学方法[M]. 北京:科学出版社,2004
- [18] 王力立,段灿星,双少敏,等. 大豆中异黄酮含量的测定及其近红外分析[J]. 食品科技,2011,36(1):242-246
- [19] 褚小立. 化学计量学方法与分子光谱分析技术[M]. 北京:化学工业出版社,2011:259-307