

SPAD 及 FT-NIR 光谱法快速筛选白三叶种质蛋白质性状

张 贤, 晏 荣, 曹文娟, 舒 彬, 张英俊*

中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

摘 要 白三叶营养丰富, 蛋白质含量高, 是最重要的牧草之一。文章对 SPAD 及 FT-NIR 光谱法筛选白三叶种质蛋白质性状进行了探讨。采用 Chlorophyll Meter SPAD-502, 测定白三叶叶片 SPAD 值, 从而评估其蛋白质含量。在营养生长期, 叶片蛋白质含量与 SPAD 值呈正相关($y=0.422x+4.984$, $R^2=0.737$); 在开花期内, 两者之间呈负相关($y=-0.345x+37.50$, $R^2=0.711$)。应用傅里叶变换近红外(FT-NIR)光谱技术, 用偏最小二乘法建立了白三叶蛋白质的预测模型, 并对模型进行了交叉验证和外部验证。结果表明, 用 NIRS 法得到的预测值与用凯氏定氮法得到的测定值间的交叉验证决定系数 R^2_{cv} 为 0.904, 交叉检验标准误差 RMSECV 为 0.988(%DM), 外部验证的相关系数为 0.987。所建立的近红外模型具有良好的准确性和预测能力。FT-NIR 法较 SPAD 法能更准确的评估白三叶蛋白质状况。NIRS 作为一种白三叶粗蛋白质快速分析的技术是可行的, 在白三叶蛋白质品质育种中, 可快速进行种质资源筛选, 提高育种效率。

关键词 SPAD; 傅里叶变换近红外; 白三叶; 蛋白质

中图分类号: S330.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)09-2388-04

引 言

白三叶分布和应用十分广泛, 世界每个洲均有白三叶的分布。白三叶可以做绿肥改良农田土壤肥力, 也可用作草坪和点缀性地被植物, 同时还是一种优质蜜源植物。更为重要的是白三叶具有很高的饲用价值, 其茎叶柔软细嫩, 适口性好, 营养丰富, 是温带地区最重要的豆科牧草。

白三叶的广泛栽培与利用, 主要是因为蛋白质含量高, 营养丰富。关于白三叶蛋白质含量的研究备受关注。蛋白质含量是决定其饲用价值的重要因素, 品质优良的白三叶种质资源是蛋白质育种的物质基础, 实现对育种材料蛋白含量的检测, 筛选蛋白质含量高或低的育种材料, 对大量的育种材料进行选优汰劣, 制定合理的育种计划, 具有十分重要的意义。测定蛋白质含量的常规方法主要是凯氏定氮法, 它是一个繁琐耗时费力的破坏性分析法。不能满足对大量白三叶种质资源进行蛋白质品质性状的鉴定筛选的需要。因此, 建立无污染、快速简便的粗蛋白质鉴定方法, 对白三叶种质资源的充分利用具有重要的现实意义。

Chlorophyll Meter SPAD-502 由发光二极管(light emit-

ting diodes)发射红光(峰值波长大约 650 nm)和近红外光(峰值大约在 940 nm)。透过样本叶的发射光到达接收器, 将透射光转换为电信号, 经过放大器的放大, 然后通过 A/D 转换器转换为数字信号, 微处理器利用这些数字信号计算 SPAD(specialty products agricultural division)。叶片的叶绿素含量与叶片含氮量有极强的相关性, 因此可以通过叶片叶绿素测定值间接地掌握植物叶片蛋白质状况。大量试验证明了 SPAD 在农作物及树木氮素检测中的有效性。

近红外光谱分析技术(Near infrared reflectance spectroscopy, NIRS)是一种利用有机化学物质在近红外谱区内的光学特性快速测定物质化学组分含量的现代光谱技术, 最早于 20 世纪 70 年代由美国的 Norris 等提出^[1], 目前已广泛应用于谷物^[2]、食品^[3]和油料^[4]等的成分分析, 具有快速、准确、无破坏性的优点, 是一种农产品高效分析法, 有常规分析法难以比拟的许多优越性。在牧草分析方面已有不少应用, 大量试验证明了近红外技术在牧草、草产品及饲料^[5-10]品质预测中的有效性。目前国内还未见有用近红外光谱分析技术对白三叶研究的报道。

本文分别对 FT-NIRS 及 SPAD 筛选白三叶种质蛋白质性状进行了探讨和比较。

收稿日期: 2008-10-06, 修订日期: 2008-12-28

基金项目: 农业部“948”重大项目(2006-G38), 国家科技支撑项目(2006DAD16B07)和教育部新世纪人才计划资助

作者简介: 张 贤, 1979 年生, 中国农业大学动物科技学院博士研究生 e-mail: zhangxian0399@gmail.com

* 通讯联系人 e-mail: zhangyj@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用白三叶种质来自中国农科院草原所种质资源库、农业部畜牧兽医总站种质资源库, 种植于中国农业大学上庄试验站。共 63 个白三叶种质, 其中我国野生白三叶 18 个, 采集自新疆、吉林、云南、贵州、四川、湖北等省份; 我国地方品种 2 个, 国外商业品种 43 个。试验材料具备了显著的地理差异和品种差异, 能够很好地代表白三叶种质。

1.2 样品准备与粗蛋白质含量的测定

白三叶鲜草样品于同一生育期收获, 60 °C 烘箱内连续干燥 48 h, 采用 FZ102 型植物粉碎机(河北振兴电器厂)和 Cyclotec™ 1093 型旋风磨(FOSS 公司)进行二次粉碎, 以获取均一样品, 装入自封袋, 保存备用。样品粗蛋白质(CP)含量采用凯氏定氮法测定, 每份样品重复测定两次, 取其平均值。

1.3 SPAD 法

1.3.1 样品测定

在 63 个白三叶种质中选取 10 个具有代表性的营养生长期(4 月 1 日~4 月 15 日)及开花期内(5 月 15 日~5 月 30 日), 每隔三天进行一次取样, 具体方法为在每天早上 9~11 时, 每个种质用 SPAD 仪随机夹取 10 片白三叶植株中上部完全展开的具有三片小叶的无病害、无生理病斑、无机械损伤的完整叶片, 测定叶片的 SPAD, 每个叶片测定 3 次(叶片的底部, 中部和顶部), 取平均值。

1.3.2 SPAD 值计算

SPAD-502 有 2 个发射光源, 分别发射 660 nm 的红色光和 940 nm 的红外光, 叶绿素吸收波长为 660 nm 的红光, 但不吸收波长为 940 nm 的红外光, 940 nm 波长的红外光的发射和接收主要是为了消除叶片厚度等方面对测量结果的影响。红光到达叶片后, 一部分被叶片的叶绿素所吸收, 剩下透过叶片被接收器转换为电信号。

$$\text{SPAD} = K \log I_0 [(I_{R_1}/I_{R_0}) / (R_1/R_0)]$$

其中, K 为常数; I_{R_1} 为接收到的 940 nm 红外线强度; I_{R_0} 为发射红外光强度; R_1 为接收到的 660 nm 红光强度; R_0 为发射红光强度。

1.4 近红外光谱法

1.4.1 仪器与样品光谱测定方法

仪器采用 Thermo Electron(美国)的傅里叶变换近红外光谱仪(Antaris), 附带应用软件 TQ Analyst v6, RESULT-Integration, RESULT-Operation。谱区范围 4 000~10 000 cm^{-1} ; 扫描次数 64 次, 分辨率 8 cm^{-1} 。

仪器开机预热 2 h 后, 进行样品扫描。取适量粉碎好的样品装入旋转样品杯中, 上机扫描。每个样品重复装样 3 次, 计算其平均光谱, 存入计算机中以消除样品均一性等因素对光谱的影响。63 个白三叶样品的近红外漫反射光谱如图 1 所示。

1.4.2 建立 NIRS 数学模型的方法

将样品分为校正集和验证集。用校正集样品建立校正模

型, 再用交互验证法检验模型。最后根据预测标准误差(RMSEP)和交互验证决定系数(R^2_v)、交互验证标准误差(RMSECV)等指标确定最优校正模型。采用基于偏最小二乘法的 TQ Analyst v6 软件完成以上分析。

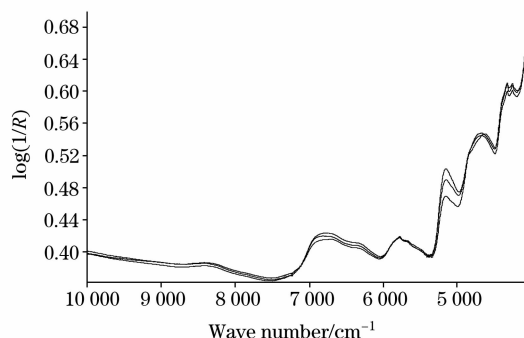


Fig. 1 Spectra of 63 white clover samples

2 结果与分析

2.1 SPAD 法

虽然叶片蛋白质含量与 SPAD 值之间的相关性随着品种的不同而不同, 但对所有不同来源、品种、及生育期的白三叶, 在白三叶种内, 其叶片蛋白质含量与 SPAD 值之间仍存在显著的相关性(营养生长期, 正相关; 开花期, 负相关)。在营养生长期, 叶片蛋白质含量与 SPAD 值之间存在着正相关($y=0.422x+4.984$, $R^2=0.737$)(图 2); 在开花期, 随着生育时间的推进, SPAD 值不断增加, 而叶片蛋白质含量却是不断降低的, 两者之间呈负相关($y=-0.345x+37.50$, $R^2=0.711$)(图 2)。在营养生长期及开花期内均可以通过叶片的 SPAD 值来估测白三叶叶片蛋白质含量的水平。

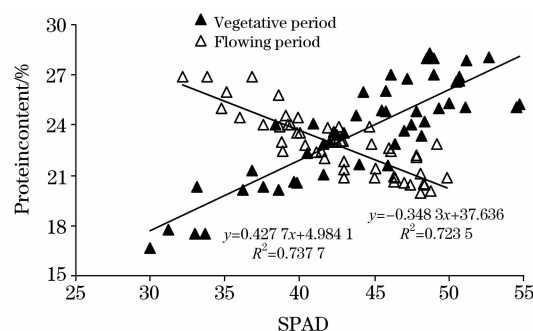


Fig. 2 Correlation of SPAD values and protein contents in white clover leaves

2.2 近红外光谱法

2.2.1 样品的选择及粗蛋白质分析结果

选取了 63 个白三叶种质, 包含野生种质, 国内培育品种, 澳洲、美洲及欧洲各国的商业品种, 样品具有代表性。样品的蛋白质含量范围较广(见表 1), 基本上覆盖了白三叶蛋白质含量常态分布, 能够用于建立白三叶蛋白质含量近红外校正模型。

Table 1 Descriptive statistic of CP contents of white clover samples(DM%)

	No.	Min	Max	Mean	S. D
China	20	13.28	22.54	17.360 5	2.653 51
Australia	16	12.92	20.52	16.826 9	2.095 72
Europe	19	14.12	21.86	17.121 1	2.329 85
America and others	8	15.24	22.46	18.288 8	2.578 40
Total	63	12.92	22.54	17.281 3	2.386 91

2.2.2 模型的建立与优化

从 63 份白三叶样品中选出 48 个粗蛋白质含量不同的样

Table 2 Main parameters and optimization results for the calibration

The main parameters		Optimization results for the calibration	
Proceeding methods	MSC+1 st Deriv +Norris	RMSEP	0.453
spectrum range/cm ⁻¹	4 616.75~9 491.91	R _{cv} ²	0.904
Parameters	3, 2	RMSECV(%DM)	0.988

注: MSC: 多元散射校正; 1st derive: 一阶求导; RMSEP: 预测标准误差; R_{cv}²: 交叉检验决定系数; RMSECV(%DM): 交叉检验标准误差

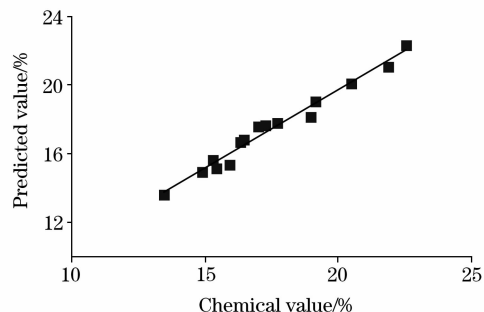
2.2.3 白三叶蛋白质含量校正模型预测效果分析

校正模型建立后,采用外部验证的方法,对所建模型的实际预测效果准确性进行评价检验。用该模型对 15 个未知样品 CP 含量进行预测。预测值和化学分析值进行成对数据双尾 *t* 测验和相关分析结果见表 3,通过 $\alpha=0.01$ 的检测值与常规分析值成对数据的双尾 *t* 测验可以看出,预测值与化学分析值之间显著性统计 Sig. 值为 0.668(>0.01)差异不显著。

Table 3 Paired samples *t*-test and correlations analysis of 15 validation samples

Correlations analysis		Paired samples <i>t</i> -test	
No.	15	<i>t</i> _{0.01}	0.438
Correlation	0.987	df	14
Sig.	0.001	Sig. (2-tailed)	0.668

预测值与化学分析值之间的相关系数为 0.987,二者存在较强的相关性。图 3 是白三叶蛋白质含量近红外模型外部

**Fig. 3** Correlation between measured and predicted value

品建立标样集。采用偏最小二乘算法建立预测方程。采用 TQ 光谱定量分析软件对获取的光谱进行预处理,选择谱区范围,及每种数据平滑方式相应的最佳参数组合,并确定主因子数。最佳光谱处理方法、谱区范围及验证效果见表 2。粗蛋白质含量的最佳谱区范围为 4 616.75~9 491.91 cm⁻¹,由此建立的模型的决定系数最大,标准误差最小。NIR 法粗蛋白质预测值与用凯氏定氮法得到的测定值之间交叉检验决定系数 R_{cv}²=0.904,交叉检验标准误差 RMSECV=0.988(%DM),结果基本达到定量水平。说明所建模型已满足白三叶种质蛋白质含量筛选对精度的要求。

验证的相关图。表明预测值与化学分析值接近,本试验所建的 FT-NIR 模型具有较高的预测准确度,可以用来对未知白三叶种质进行蛋白质含量检测。

3 讨论

SPAD 法对植物蛋白质状况监测是一个较常用的方法,但 SPAD 值随着植物品种和生育期的不同而变化。本实验中,叶片蛋白质含量与 SPAD 值之间存在正相关关系(营养生长期)及负相关关系(开花期)。

SPAD 法根据叶片叶绿素对光的吸收特性,通过测量一定波长的发射光强和透过叶片后的光强进行叶片叶绿素含量的测定,从而反映叶片的氮含量。仪器体积小、重量轻、测定方法简单,能够在原位测定白三叶蛋白质含量,但只能测量叶片上某个点的值,难以准确反映整个植株或冠层的氮素水平。

本实验所建立的 NIRS 测定白三叶种质蛋白质含量的校正模型,交叉检验决定系数 R_{cv}²为 0.904,交叉检验标准误差 RMSECV 为 0.988(%DM),外部验证的相关系数为 0.987 与 Berardo^[11]的研究结果相似。这样的测定精度可以满足对于不同白三叶种质资源的粗蛋白质品质性状的鉴定筛选。

SPAD 法被广泛应用于同一作物^[12]及水果^[13]品种叶片氮素状况的监测,但 SPAD 值随着植物品种不同与叶片蛋白质含量的相关性差异较大。对于大量不同品种白三叶种质蛋白质性状筛选,采用 NIRS 法,准确性高于 SPAD 法,不受生育期、检测部位、品种等因素影响。可满足大量种质资源的筛选要求,并显著提高其选育效率。

参 考 文 献

- [1] Norris K H, Bames R F. *Animal Science*, 1976, 43(4): 897.
- [2] Campbell M R, Mannis S R, Port H A, et al. *Cereal Chem.*, 1999, 76(4): 552.
- [3] Laporte MF, Paquin P. *Agric. Food Chem.*, 1999, 47: 2600.
- [4] Velasco L, Becker H C. *Euphytica*, 1998, 101: 221.
- [5] ZHAO Huan-huan, HU Yao-gao, ZHAO Qi-bo, et al(赵环环, 胡跃高, 赵其波, 等). *Acta Zoonutrimenta Sinica(动物营养学报)*, 2001, 13(4): 40.
- [6] CHEN Peng-fei, RONG Yu-ping, WU Jian-guan(陈鹏飞, 戎郁萍, 吴建冠). *China Feed(中国饲料)*, 2006(9): 33.
- [7] DONG Su-xiao, LIU Xian, HAN Lu-jia(董苏晓, 刘 贤, 韩鲁佳). *Journal of China Agricultural University(中国农业大学学报)*, 2007, 12(6): 85.
- [8] Garcia-Criado B, Garcia-Ciudad A. *J. Sci. Food Agric.*, 1990, 50: 479.
- [9] Villamarin B, Fernandez E, Mendez J. *Journal of AOAC International*, 2002, 85(3): 541.
- [10] WU Jian-guo, SHI Chun-hai(吴建国, 石春海). *Journal of Plant Genetic Resources(植物遗传资源学报)*, 2003, 4(1): 68.
- [11] Berardo N. *Grass and Forage Science*, 1997, 52: 27.
- [12] WANG Kang, SHEN Rong-kai, TANG You-sheng(王 康, 沈荣开, 唐友生). *Irrigation and Drainage(灌溉排水)*, 2002, 4: 1.
- [13] LEI Ze-xiang, AI Tian-cheng, LI Fang-min, et al(雷泽湘, 艾天成, 李方敏, 等). *Journal of Hubei Agriculhural College(湖北农学院学报)*, 2001, 21(2): 138.

Rapid Selection of White Clover Germplasms' Crude Protein Traits by SPAD and Fourier Transform Near-Infrared Reflectance Spectroscopy

ZHANG Xian, YAN Rong, CAO Wen-juan, SHU Bin, ZHANG Ying-jun*

College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract White clover is one of the most important forages in the world, with high nutritive value and crude protein content. Crude protein traits of white clover germplasms was selected using SPAD and near infrared reflectance spectroscopy. The SPAD value was measured by Chlorophyll Meter SPAD-502, and was used to evaluate the crude protein of white clover. In the vegetative period, there was a positive relationship between SPAD value and foliar protein content ($y=0.422x+4.984$, $R^2=0.737$), but in the flowering period, there was a negative relationship between the two indexes ($y=-0.345x+37.50$, $R^2=0.711$). Crude protein content of white clover germplasms was predicted using near infrared reflectance spectroscopy with PLS regression and the model was validated by cross validation and external validation. The results showed that the correlation coefficient of cross validation, the RMSECV, and the correlation coefficient of external validation are 0.904, 0.988%, and 0.987, respectively. NIRS model of white clover crude protein content has good accuracy and precision. FT-NIRS was more accurate than SPAD. NIRS is feasible as a rapid analysis method, and can be used in the selection and breeding of white clover germplasms to improve the breeding efficiency.

Keywords SPAD; Fourier transform near infrared reflectance spectroscopy; White clover; Protein

(Received Oct. 6, 2008; accepted Dec. 28, 2008)

* Corresponding author