

接种菌根大豆叶片光谱分析和叶绿素含量估测

陈书琳 毕银丽* 齐礼帅 冯颜博 张延旭 王瑾

(中国矿业大学(北京)地球科学与测绘工程学院,北京 100083)

摘要 为更好地指导矿区进行受损土地的微生物复垦,减少传统监测方法对植物的损害,需要运用快速有效的方法来监测菌根作用下植物的生长状况。对不同生长期的大豆叶片光谱、叶绿素含量、菌根侵染率和菌丝密度测定分析,结果表明:各生长期接种菌根叶绿素含量均高于同期对照,其叶绿素含量与侵染率间具有显著正相关性,且叶片光谱反射率在 550 nm 处显著低于对照组。同时根据叶片光谱可见光区域叶绿素敏感波段选择植被指数,然后建立以植被指数为变量的线性模型反演叶绿素含量,结果发现植被指数 MCARI 反演叶绿素含量的精度及稳定性($R^2=0.67$)都优于其他指数,其线性模型反演绝对误差为 2.504,相对误差为 6.57%。该研究结果说明高光谱技术是估测菌根作用下大豆叶绿素含量的一种简单、快捷和无损的有效方法,也为未来利用高光谱数据评估微生物对植物生长的促进作用提供理论与方法支持。

关键词 大豆; 菌根作用; 高光谱反射率; 光谱差异; 高光谱指数

中图分类号 O 657.3; S 154 **文章编号** 1007-4333(2014)02-0125-06 **文献标志码** A

Hyperspectral characteristics and estimation for chlorophyll content of soybean inoculated with AMF

CHEN Shu-lin, BI Yin-li*, QI Li-shuai, FENG Yan-bo, ZHANG Yan-xu, WANG Jin

(College of Geoscience and Surveying Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100083, China)

Abstract In order to guide the microbial land reclamation in coal mining, it is necessary to look for a quick and non-destructive way and thus obtain growth information of plants inoculated with mycorrhiza. The measured parameters included hyperspectral spectra, inoculated rate (IR), hyphal density and chlorophyll content (SPAD values) of soybeans with or without inoculation of arbuscular mycorrhiza fungi (AMF). The results showed that the chlorophyll content of soybean leaf inoculated with AMF was higher than that of the control in each period. The leaf spectra reflectance of the inoculation was apparently lower than that of the control in 550 nm. There was a positive correlation between IR and the chlorophyll content. Smoothing the leaf spectra, the ratio indices were selected by using the sensitive bands for chlorophyll in VIS. The linear models for estimating chlorophyll content were built by using ratio indices as variables. The analysis results indicated that the inversion precision and the stability of chlorophyll content calculated from ratio index MCARI were better than those from other index. The absolute error was 2.504, the relative error 6.57%. The results could not only provide with a simple, quick and non-destructive way for estimating the leaf chlorophyll content of soybean, but also supply with theories and methods for assessing the enhancement of plant growth resulted from AMF by using hyperspectral data.

Key words soybean; mycorrhizal effect; hyperspectral reflectance; spectral differentiation; vegetation indices

菌根是植物与菌根真菌在相互提供各自生存所需营养物质的过程中形成的共生体,它们是土壤中的菌根真菌与高等植物的根系形成的一种联合体,

在自然界中是一种普遍的植物共生现象。菌根真菌能够向宿主植物提供营养物质,扩大宿主植物根系的吸收面积,增加植物对营养元素和水分的吸收,改

收稿日期: 2013-08-30

基金项目: 十二五科技支撑计划(2012BAC10B03)

第一作者: 陈书琳, 博士研究生, E-mail: chen_sl@163.com

通讯作者: 毕银丽, 教授, 博士, 主要从事微生物在矿区生态重建研究, E-mail: byl@cumtb.edu.cn

善植物根际环境^[1];菌根菌丝可以吸收运输在土壤中移动性较差的磷元素,对氮和钾也有相同作用^[2-3]。因此,接种菌根能够促进植物生长,使得植物叶片水分、叶绿素、氮、磷和钾元素含量增加,这些植物生理生化参数的变化必然反映在植物叶片的光谱响应曲线上,这是利用遥感数据评估菌根作用对植物的影响以及监测接菌植物长势的基础。

与耗时长、易对植物造成伤害且结果不够准确的传统生化实验检测植物生化参数方法相比较,高光谱遥感是一种快速、高效和非损伤监测作物生长的有效方法。目前,对于微生物接种效应方面的高光谱研究多集中在致病菌胁迫下的植物高光谱特征分析,并已实现利用光谱技术对多种植物病虫害进行早期无损检测^[4-7],而针对菌根的有益作用对植物光谱影响的研究尚不多见。在近红外和短波红外波段,光谱反射率会受到植物水分含量的影响,本研究中为避免水分含量对光谱特征的影响,主要探讨菌根作用下大豆叶片光谱在可见光区域与对照大豆的特征差异,并定量反演菌根作用下大豆叶片叶绿素含量,为进一步利用高光谱遥感快速、及时和无损获取大面积微生物复垦植被的生长信息,有效评价微生物复垦技术的效果提供新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采自陕西省神木县李家畔镇活鸡兔矿和大柳塔矿塌陷区,为沙质退化矿区土壤,过 2 mm 筛,用高压灭菌锅灭菌 2 h 后风干备用。土壤的基本理化性状为:有效磷为 5.78 mg/kg, pH 为 7.46。试验所用塑料盆规格为:11 cm(高)×13 cm(盆口直径)×9 cm(盆底直径)。供试大豆种子(*Glycine max*)由中国农业科学院种子公司提供。供试菌种为由北京市农林科学研究院从污染土壤中分离筛选的丛枝菌根真菌(*Glomus mosseae*, 简称 G. m),每盆加土量 1.4 kg。种植大豆前向矿区退化土壤加入 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 和 K_2SO_4 配置营养液作为底肥,使供试土壤中氮、磷、钾的质量分数分别为 100、10 和 150 mg/kg。将大豆种子用浓度为 10% 的 H_2O_2 溶液浸泡 10 min 进行表面消毒,再用去离子水清洗 10 次,每个小盆播种大豆 5 棵,出苗后定苗为 1 株。

试验设接种丛枝菌根组(+M)和不接种菌根的对照组(CK)2个处理,每个处理4次重复。采用定量浇水方式,土壤湿度约为田间持水量的70%~

80%。所有处理放入中国矿业大学(北京)的日光温室中培养。

1.2 光谱数据测量

每盆植物选取4~6片叶片,利用美国ASD公司生产的ASD FieldSpec 4 Hi-Res便携式地物光谱仪测定大豆叶片的光谱反射率,波长范围是350~2500 nm。测量时间分别为2013年5月19日及6月1、19和30日,共测量4次。观测时使用仪器自带光源,设定10°视场角,传感器探头垂直向下紧贴叶片。每次实施光谱测量之前都进行白板标定,测量结果为大豆叶片光谱反射率。每个叶片取2个测试点,每个测试点采集5个光谱数据,取其平均值作为一个样本的结果。共获得154组有效数据。

1.3 大豆菌根侵染率和菌丝密度的测定

菌根侵染率是描述植物根系受菌根真菌感染程度和反映菌根形成的指标^[8]。根外菌丝密度反映了菌根在促进植物生长、营养吸收等方面能力,菌丝越密,越有利于促进根系对营养和水分的吸收和运输^[9]。菌根侵染率(Infection rate, IR)和菌丝密度采用常规的^[10-11]方法。

1.4 大豆叶片叶绿素含量测定

在光谱数据采集后,立即使用Konica Minolta公司生产的SPAD-502叶绿素仪进行大豆叶片叶绿素含量的测定。测量时,围绕光谱采集点周围,避开叶脉,每个采集点采样10次,求取并记录平均值。本研究直接采用SPAD-502的读数表示叶绿素浓度^[10]。

1.5 高光谱植被指数

为了更好地利用叶片光谱信息反演植物叶绿素含量,在前人研究方法与经验基础上^[12-13],根据不同处理下大豆叶片光谱特征挑选了一些光谱指数(表1)。

表1 高光谱植被指数
Table 1 Hyperspectral indices

高光谱指数 Hyperspectral indices	描述 Depict
BGI1	$R_{400}/R_{550}^{[14]}$
BGI2	$R_{450}/R_{550}^{[14]}$
GM	$R_{750}/R_{550}^{[15]}$
MCARI	$[(R_{700} - R_{670}) - 0.2(R_{700} - R_{550})] / (R_{700}/R_{670})^{[16]}$
RGI	$R_{690}/R_{550}^{[14]}$
MTVII	$1.2[1.2(R_{800} - R_{550}) - 2.5(R_{670} - R_{550})]^{[17]}$

2 结果与讨论

2.1 不同处理下大豆菌根侵染率和菌丝密度的差异和变化

菌根菌丝与根系相互识别成功之后,菌根菌丝穿透寄主植物表皮细胞的细胞壁进入根系内部建立共生关系,这个过程就是菌根的侵染。菌根真菌在宿主植物根系中定殖以后就可以源源不断地获得自身生长所需的碳水化合物,根外菌丝开始加速生长,通过其在土壤中形成的庞大菌丝网络,将植物生长所需的水分和养分输送给植物。由图1可知,+M组大豆的IR在各生长期均显著高于CK组。对于+M组大豆,22 d时IR为28.3%,表明*G. m*菌根开始侵染植物根系。此后IR迅速提高,35 d时达到了89%,说明接菌1个月左右*G. m*菌根侵染活动较为活跃。53 d时,IR达到93.3%,而到64 d时则达到了100%,这表明接菌2个月左右*G. m*菌根与大豆的共生关系已完全形成。

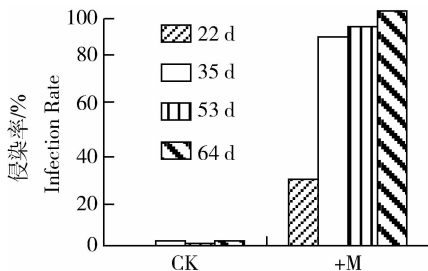


图1 不同处理对大豆菌根侵染率的影响

Fig. 1 Infection rates in different treatments in four stages

菌丝密度是反映菌丝生长好坏的指标,其大小可以反映出菌根对促进植物生长、营养吸收和增强植物抗逆性等方面能力的大小。菌丝密度越高,菌丝越长,对于植株的影响就越明显,更能促进植物的生长。不同处理下大豆的菌丝密度如图2所示。+M组大豆的菌丝密度在各生长期均显著高于CK组,

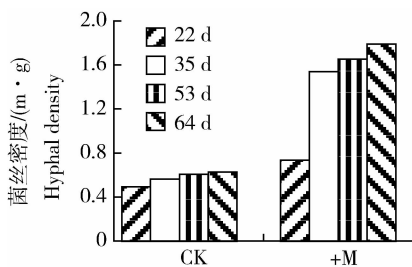


图2 不同处理对大豆菌丝密度的影响

Fig. 2 Hyphal density in different treatments in four stages

其菌丝密度在64 d时达到1.62 m/g,是CK组的约3倍。接种*G. m*增加了根系的生长空间和作用的范围,促进了植物对养分的吸收。

2.2 不同处理下大豆叶绿素含量的差异

由图2可以看出,在前53 d时2组大豆的叶绿素含量均随着大豆的生长而增加。+M组大豆的叶绿素含量在各时期都显著高于同期CK组,平均比CK组高出约10%。尤其在植物生长53 d,菌根作用趋于稳定,+M组大豆的叶绿素含量增加最多,其含量比种植第35天要高出15.23%,比同期CK组要高出12.93%。到了64 d,CK组与+M组大豆的叶绿素含量较前一时期均有所降低,但+M组的叶绿素含量仍略微高于CK组。叶绿素含量与植物的光合作用能力与生长状态密切相关,是植被光合能力强弱、营养生理状况以及衰老进程的良好指示剂^[18]。各时期不同处理大豆叶绿素含量的差异表明,接种*G. m*有利于大豆叶片叶绿素的积累,提高植被光合作用的能力,促进大豆的生长,印证了前人的研究^[19-20],丛植菌根真菌(*G. m*)侵染可改善植物的生长状况。

2.3 接种菌根大豆IR与叶片叶绿素含量的关系

如图3所示,随着IR的提高,+M组大豆叶片叶绿素含量在增加,与IR存在显著正相关性。IR提高表明菌根与植物根系的共生关系越来越密切,对植物吸收水分和营养元素的促进作用日益明显,从而促进植物的生长。因此,可通过叶绿素含量的变化辅助了解IR的状况。

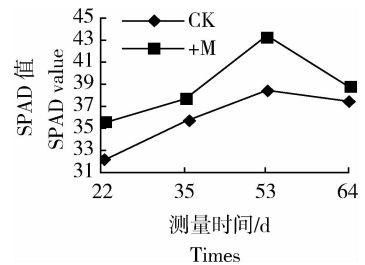


图3 不同处理对大豆叶绿素含量的影响

Fig. 3 SPAD values of bean under in different treatments in four stages

2.4 不同生长期大豆叶片光谱分析

+M组和CK组大豆叶片光谱曲线分别如图4((a)和(b))所示。在可见光区域,2组大豆反射光谱呈现先降低而后升高再降低的特点,550 nm处反射率达到最大值,形成明显的反射峰。这是因为在

蓝光和红光区域叶绿素强烈吸收,反射率较低,而在绿光区域叶绿素吸收较少,形成相对较强的反射峰。在500~650 nm波段,随着时间的推移,叶绿素含量逐渐增加,2组大豆叶片光谱的反射率值逐渐减小;到了64 d,叶绿素有所降低,因此2组大豆叶片光谱反射率在此波段范围内较前一时期略微提高。大豆叶片光谱特征与其叶绿素含量的变化相对应,这与前人得出的结论,当叶绿素含量增加时绿峰幅值减小^[21]相一致。由图4可以看出,+M组大豆叶片光谱和CK组大豆一样,均呈现出典型的绿色植物反射光谱特征,即在可见光区域表现为“两谷一峰”(蓝紫谷、红谷和绿峰),但在不同时期2组大豆叶片光谱在某些特征波段上的反射率存在一定的差异。

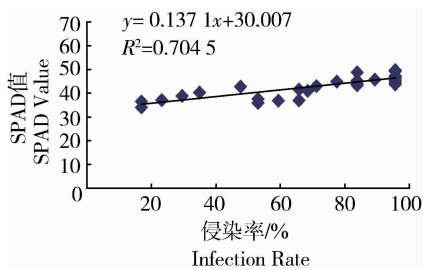


图4 菌根作用下大豆菌根侵染率和叶片叶绿素的关系

Fig. 4 Relationship between infection rate and leaf chlorophyll content

2.5 不同处理大豆叶片光谱差异分析

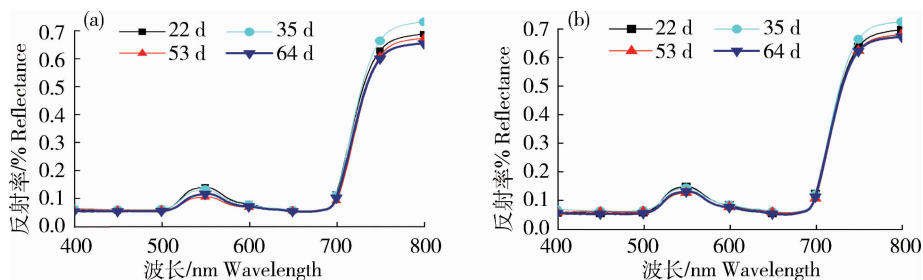
由图5可知,各时期不同处理的光谱曲线形状和变化趋势大致相同,黄边、红边和绿峰等特征波段未出现明显位移,但+M和CK植物的叶片反射值有所不同。在400~450 nm的波段区间,+M和CK处理大豆叶片的反射率以大小不同的变率呈上升趋势,并在550 nm附近形成了一个较为明显的反射峰区,且+M大豆叶片4个时期的反射率在此

区间均低于对照组的反射率。种植22 d,在550 nm处不同处理大豆光谱反射率差值微小,随着植物的生长,反射率差值逐渐增大,种植53 d不同处理大豆光谱在此处的差异达到最大。在760~800 nm波段区间,叶绿素吸收率极低,光谱曲线比较平稳,2组大豆叶片光谱差异不明显。显然,550 nm是不同处理大豆叶片光谱差异最为明显的波段,可作为判别大豆不同处理的指标。

相同植物不同处理的叶片光谱形态相似反射率大小有别,形成差异的主要原因是由植物色素(主要是叶绿素)含量不同造成的。大豆+M组叶片的反射率在绿峰(550 nm)均低于CK组,这是因为接菌大豆叶片单位面积上叶绿素含量较对照的高,对光吸收的较多,反射率较低。同时亦说明,550 nm对植物叶绿素含量很敏感。有研究表明^[22],菌根可以通过侵染植物根系而与植物形成共生关系,它可以扩大植物根系的吸收表面积,增加对土壤中多种矿物质养分的吸收,因而促进植物的生长。光谱差异与植物叶绿素含量差异所反映的结果相同,说明了接种菌根对大豆的生长有一定的促进作用。

2.6 高光谱指数定量反演大豆叶片叶绿素含量结果分析

用+M组74个样本曲线中的60个,使用回归方法构建大豆叶绿素含量反演模型,对所有模型都进行了F检验与T检验,如表2所示。所有线性模型都在A=0.01水平进行了显著性检验,P值均为0,说明这些模型都能够较好地反演接种菌根对大豆叶绿素含量的影响。以植被指数MCARI为变量的反演模型R²与F值在所有模型中是最大的,其反演大豆叶绿素含量的绝对误差(RMSE)与相对误差(Relate error, RE)仅为2.504与6.57%,是表2中所有模型最小的,其次是以GM为变量的反演模型。

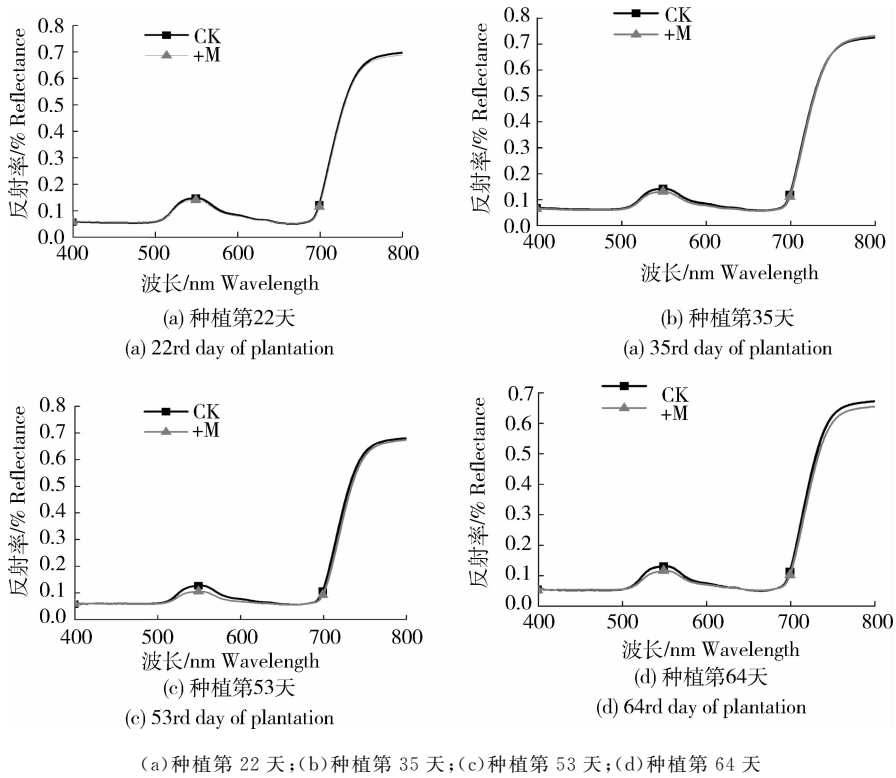


(a)+M组大豆;(b)CK组大豆

(a) beans of +M group;(b) beans of CK group

图5 不同时期+M组和CK组大豆叶片光谱曲线

Fig. 5 Effecton leaf hyperspectral curves for bean of +M group and CK group in four stages



(a) 22 rd day of plantation;(b)35 th day of plantation;(c)53rd day of plantation;(d)64th day of plantation

图 6 不同时期不同处理大豆叶片光谱的差异

Fig. 6 Effect on leaf spectra in different treatments in four stages

表 2 反演模型分析表 (n=60)

Table 2 Model analysis (n=60)

高光谱指数 Vegetation Indices	反演模型 Inversion Model	R ² R square	F 值 F value	P 值 P value	绝对误差 RSME	相对误差/% RE
BGI1	$y=48.349x+14.927$	0.502 6**	58.607	0.000	3.052	8.01
BGI2	$y=49.579x+15.630$	0.552 8**	71.685	0.000	2.894	7.60
GM	$y=5.295x+10.852$	0.638 6**	102.480	0.000	2.602	6.83
MCARI	$y=-57.709x+46.732$	0.665 2**	115.251	0.000	2.504	6.57
RGI	$y=59.799x+6.813$	0.597 1**	85.965	0.000	2.747	7.21
MTVII	$y=-42.556x+82.480$	0.338 5**	29.676	0.000	3.520	9.24

因此,可以认为以植被指数 MCARI 为变量的模型是反演菌根作用下大豆叶绿素含量的最优模型。其次是以 GM 为变量的反演模型,其绝对误差为 2.602,相对误差为,6.83%。

利用未参与回归分析的 20 个样本的光谱数据作为检验样本,分别利用以高光谱指数 MCARI 和 GM 为变量的反演模型反演菌根作用下大豆叶片叶绿素含量,以叶绿素含量的实测值为横坐标 x ,预测值为纵坐标 y 作散点图,并对散点进行趋势拟合,从而对所建模型进行验证,结果如图 6。

3 结 论

1) 接种菌根对宿主大豆的侵染率增高。接菌大豆叶片叶绿素含量(SPAD 值)均高于对照植物,菌根可以通过侵染植物根系而与植物形成共生关系,促进植物的生长。

2) 在可见光区域,接菌大豆叶片光谱在 500~650 nm 间的反射率均高于同期对照组的叶片反射率,在绿峰(550 nm)处不同处理间的光谱差异达到最大,550 nm 可作为判别大豆不同处理的指标。可

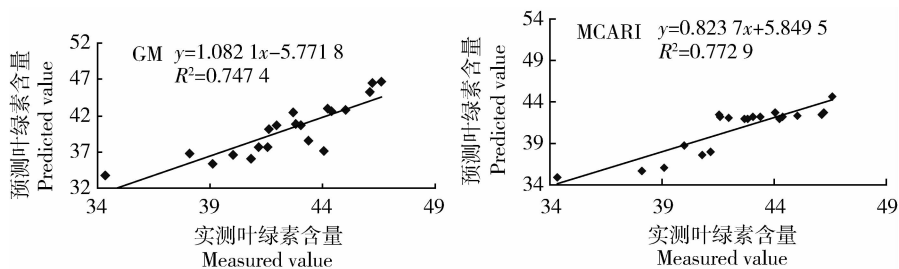


图7 叶绿素含量实测值与预测值的比较

Fig. 7 Comparison between measured Chl concentration and estimated Chl concentration

见光波段的光谱差异同时反映了不同处理间大豆叶片叶绿素含量的差异。

3) 所选择的高光谱指数,都与大豆叶片叶绿素含量具有极显著相关性,指数 MCARI 为变量的线性模型反演效果最好,其 RMSE 为 2.504,相对误差为 6.57%;其次是 GM 指数,效果也较好, RMSE 为 2.602,相对误差为 6.83%。

估测模型是基于大豆室内接种 *G. m* 菌剂处理的单叶基础上建立,因此该模型是否适用于受环境等外界因素影响较大的冠层光谱大豆接种 *G. m* 菌剂的反演还有待进一步研究。本研究结果为以后利用高光谱数据快速无损监测微生物复垦植物长势以及评价菌根对植物生长的积极作用打下良好的理论基础与方法支持。

参 考 文 献

- 北京:地质出版社,2007
- [10] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1970(55):158-161
- [11] Abbott L K, Robson A D, De Boer G. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum* [J]. *New Phytol*, 1984, 97:437-446
- [12] 浦瑞良, 宫鹏. 高光谱遥感及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,2000
- [13] Seelig H D, Hoehn A, Stodieck L S, et al. The assessment of leaf water content using leaf reflectance ratios in the visible, near-, and short-wave infrared [J]. *International Journal of Remote Sensing*, 2008, 29(13):3701-3713
- [14] P J Zarco-Tejada, A Berjón, R López-Lozano, et al. Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy [J]. *Remote Sensing of Environment*, 2005, 99(3):271-287
- [15] Gitelson A, Merzlyak M. Remote Estimation of Chlorophyll Content in higher Plant Leaves [J]. *Int J Remote Sensing*, 1997, 18(12):291-298
- [16] Daughtry C S T, Walthall C L, Kim M S, et al. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance [J]. *Remote Sensing of Environment*, 2000, 74(2):229-239
- [17] Driss Haboudane, John R Miller, Elizabeth Pattey, et al. Hyperspectral vegetation indices and novel algorithms for predicting green LAI of crop canopies: Modeling and validation in the context of precision agriculture [J]. *Remote Sensing of Environment*, 2004, 90:337-352
- [18] Noomen M F, Smith K L, Colls J J, et al. Hyperspectral indices for detecting changes in canopy reflectance as a result of underground natural gas leakage [J]. *International Journal of Remote Sensing*, 2008, 29(20):5987-6008
- [19] 郭婧婷. 微生物对煤系固废粉煤灰的改良作用及生态效应 [D]. 北京:中国矿业大学(北京),2008
- [20] 彭星. 神东采煤塌陷地微生物复垦工程设计及其生态效应 [D]. 北京:中国矿业大学(北京),2012
- [21] 丁永军, 李民赞, 安登奎, 等. 基于光谱特征参数的温室番茄叶片叶绿素含量预测 [J]. *农业工程学报*, 2011, 27(5):244-247
- [22] 张翠青. 微生物对尾矿和粉煤灰修复作用及其在废弃地生态效应 [D]. 北京:中国矿业大学(北京),2010
- [1] 崔树军, 张建云, 李钢, 等. 微生物在煤矿废弃地修复中的应用 [J]. *中国煤炭*, 2010(1):110-113
- [2] Baodong Chen, Per Roosc, Yongguan Zhu, et al. Arbuscular mycorrhizas contribute to phytostabilization of uranium in uranium mining tailings [J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2008, 99(5):801-810
- [3] 毕银丽, 吴王燕, 刘银平. 丛枝菌根在煤矸石山土地复垦中的应用 [J]. *生态学报*, 2007, 27(9):3738-3743
- [4] 申晓慧, 姜成, 张敬涛, 等. 不同氮肥水平下大豆叶片光谱反射率与叶绿素含量的相关性研究 [J]. *大豆科学*, 2012, 31(1):73-75, 80
- [5] 蒋金豹, 李一凡, 郭海强, 等. 不同病害胁迫下大豆的光谱特征及识别研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(10):2775-2779
- [6] 冯雷, 陈双双, 冯斌, 等. 基于光谱技术的大豆豆荚炭疽病早期鉴别方法 [J]. *农业工程学报*, 2012, 28(1):139-144
- [7] 宋英博. 大豆蚜虫危害单叶片生理变化及光谱特征分析 [J]. *中国种业*, 2010(6):49-50
- [8] 李云梅, 倪绍祥, 王秀珍. 线性回归模型估算水稻叶片叶绿素含量的适宜性分析 [J]. *遥感学报*, 2003, 7(5):364-371
- [9] 毕银丽. 丛枝菌根培养新技术及其对土地复垦生态效应 [M].