

SmartRoot在蜜环菌菌索表型谱分析中的应用

张雪艳^{1,2}, 胡启跳², 方成武¹, 袁媛^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;

2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立获取精确的表型谱数据研究平台,是目前中药资源研究亟待解决的技术难点。如传统的蜜环菌菌索表型表征方式多为描述性文字,存在较大的主观性和经验性,亟需一种客观并准确的方法进行蜜环菌菌索表型的表征。**方法:**基于图像处理软件Image J和根系识别插件SmartRoot与Symbiosis ProtoCol 3影像分析仪相结合,对蜜环菌平板生长图片进行分析,测定蜜环菌菌索长度、生长速度、分枝情况、新生菌索夹角等,建立蜜环菌菌索表型谱分析测量体系。**结果:**基于该文开发的方法,可以在不影响蜜环菌生长情况下,实时分析蜜环菌菌索的生长长度、生长速度、分枝数、新生菌索夹角等表型谱变化,继代后9~12 d的蜜环菌生长最为迅速,新生菌索与母体菌索之间夹角接近垂直。该方法与传统的蜜环菌生物量表型参数干重呈现一定的相关性,具有较好的实际应用价值。**结论:**该研究建立了一套客观、准确、快捷和实时的蜜环菌菌索表型谱分析测量体系,拓展了SmartRoot的应用范围,可用于受控实验条件下中药资源的表型谱分析。

[关键词] SmartRoot; 表型谱; 蜜环菌; 菌索; 生长速度; 菌索总长度

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0023-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202019

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1034.009.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 10:39

Application of SmartRoot in Phenotypic Profile Analysis of *Armillaria gallica*

ZHANG Xue-yan^{1,2}, HU Qi-tiao², FANG Cheng-wu¹, YUAN Yuan^{2*}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a research platform for obtaining accurate phenotypic spectrum data is a technical difficulty that needs to be resolved in the research of traditional Chinese medicine resources. For example, the traditional phenotypic characterization method of *Armillaria* rhizomorph is mostly in a form of descriptive text, which is subjective and empirical. There is an urgent need for an objective and accurate method to characterize the phenotype of honey fungus rhizomorph. **Method:** Based on the image processing software Image J and the root identification plug-in SmartRoot combined with the Symbiosis ProtoCol 3 image analyzer, the growth picture of *Armillaria* spp. was analyzed, and the length, growth rate, branching situation, and angle of nascent rhizomorph of *Armillaria gallica* were measured to establish a measurement system for the phenotypic analysis of *Armillaria* rhizomorph. **Result:** Based on the method developed in this paper, the growth length, growth rate, number of branches, angle of nascent rhizomorph, and other phenotypic changes can be analyzed in a real-time manner without affecting the growth of *Armillaria gallica*. *Armillaria* spp. grew fastest at 9-12 days

[收稿日期] 20200113(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81891013);中央本级重大增减支项目(2060302);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZXT201907,ZZ10-008,ZZ11-116);广西科技重大专项(桂科AA18242040)

[第一作者] 张雪艳,在读硕士,从事中药鉴定与分子生药学研究,E-mail:2515101109@qq.com

[通信作者] *袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

after generation, and the angle between the nascent rhizomorph and the parent rhizomorph was nearly vertical. This method had a certain correlation with the dry weight of traditional *Armillaria* biomass phenotypic parameters, with a high value in practical application. **Conclusion:** This study has established an objective, accurate, fast and real-time phenotypic analysis and measurement system for *Armillaria* rhizomorph, which expands the scope of application of SmartRoot and can be used for phenotypic analysis of traditional Chinese medicine resources under controlled experimental conditions.

[Key words] SmartRoot; phenotype profile; *Armillaria gallica*; rhizomorph; growth rate; total length of rhizomorph

表型是指生物个体或群体在特定条件下所表现出的可观察的形态特征^[1-2],是生命科学植物研究的重要组成部分。在获得中药资源海量基因组信息的基础上,高分辨、高效地揭示其基因功能、环境影响及表型三者的相互作用机制已为一个全新的挑战^[3-4]。表型谱分析是表型组研究的主要工具,其检测指标主要包括器官的形状、大小及影像数据等结构类特征;样本的力量和反应速度、生理生化指标等功能类特征^[5]。精确的采集性状数据,并与遗传工具相结合,将有助于加快中药材品种改良;但由于存在多种环境取样和重复试验,如何实现有效、自动化获取性状表型数据一直是表型谱分析面临的挑战。

目前利用成像技术、数据分析和人工智能等可建立高效的工作流程,包括图像捕获、数据存储和管理、特征提取、机器学习/分类、模型/决策支持应用程序,实现自动和快速的表型谱分析^[6]。其中基于Image J半自动化的SmartRoot图像分析插件可以将矢量表示法与追踪演算法相结合^[7]。SmartRoot可以将像素坐标和灰度转化成有意义的生物学属性,如分段的直径和方向、与其他任意分段或拓扑位置的距离等,且不受空间间隔和原始图片分辨率的限制。利用SmartRoot可以将复杂的根系结构和生长状态进行量化,如橡胶树的细根长度、表面积、体积和平均根直径等表型谱数据^[8]以及大豆根系形态^[9]等的测定。本文拟将该软件拓展到真菌菌索的表型谱研究中,使其应用范围更广。

蜜环菌是一种药用食用真菌,同时也是名贵药材天麻和猪苓的共生菌^[10-11]。作为天麻的主要营养来源^[12],蜜环菌的生长状态决定了天麻的生长状态和品质。目前有关蜜环菌研究主要包括鉴定分类^[13]、生理生化、遗传转化^[14]等,且涉及蜜环菌生物量表型时通常使用干重法或文字描述进行表征。但上述方法存在一定的局限性,如文字描述存在较大的主观性和经验性,表型差异很难分辨;而干重

法需要经过琼脂分离、烘干和称量等繁琐步骤、耗时长,且干燥后材料不能再利用、无法测量生长速度。本研究拟利用Synbiosis ProtoCol 3测量影像分析仪拍摄蜜环菌生长状态图片,并通过SmartRoot软件测定蜜环菌菌索的分枝数、长度、生长速度等指标,建立一套真菌菌索表型谱分析体系,为进一步深入研究蜜环菌生长机制奠定基础。

1 材料

PDA固体培养基:20 g·L⁻¹葡萄糖(北京化工厂,批号20171016),4 g·L⁻¹马铃薯浸出粉,10 mmol·L⁻¹5-[N-吗啉基]磺酸(北京Solarbio Science & Technology公司,批号分别为20170728,1120C024),琼脂粉10 g·L⁻¹(RT,批号956103400),pH 5.6~5.8。MMP固体培养基:10 g·L⁻¹麦芽浸膏,5 g·L⁻¹菌体蛋白胨(美国Oxoid公司,批号分别为2410375,1737544),15 g·L⁻¹琼脂(RT,批号956103400),pH 7.0。实验所用蜜环菌(*Armillaria gallica*)菌株为本实验室分离纯化后保存的。

Synbiosis ProtoCol 3型测量影像分析仪(英国Synbiosis公司),ProtoCol 3 Ink软件,FDU-1110型冷冻干燥机(Eyela公司),Image J软件(National Institutes of Health开发),SmartRoot软件^[15],SPSS(IBM SPSS Statistics 24.0)。

2 方法

2.1 蜜环菌菌索培养与图片拍摄 在无菌环境下,取成熟蜜环菌菌索1 cm左右,接种于PDA固体培养基或MMP固体培养基上,25 °C暗培养,每20 d进行一次继代培养^[14]。接种后,每天上午9:00使用Synbiosis ProtoCol 3测量影像分析仪进行拍摄,图片保存格式为“8位TIFF图片文件”,备用。

2.2 菌索标记 对原始图片进行预处理,转化为8-bit灰度图像并设定分辨率为191 pixels/inch。参照文献[6]方法在预处理图片上手动或自动地放置节点,跟踪描绘菌索。

2.3 蜜环菌生长速度的测定及计算 对同一盘蜜

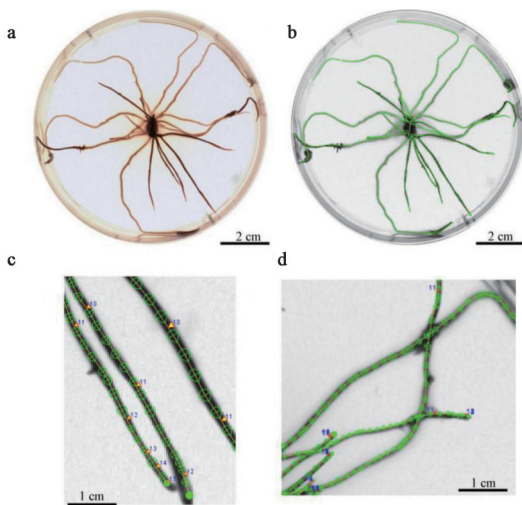
环菌逐日连续拍照,并使用 SmartRoot 对菌索进行跟踪描绘;在每个菌索上放置标记点(Mark),输入生长天数,数据导出时即可得生长速度。重复 13 次。

2.4 蜜环菌菌索长度与干重的相关性分析 取不同生长程度的蜜环菌,拍照计算菌索总长度。同时使用干重法,将该盘蜜环菌尽量剥离琼脂,在冷干机上冻干直至重量不再增加为止,记录干重。重复 14 次。

2.5 参数计算 对 SmartRoot 数据进行导出,导出的后数据文件内有分枝数、菌索总长度(即所有菌索长度之和)和平均直径,新生菌索夹角和标记点长度等数据,计算单个菌索平均长度(菌索总长度/分枝数)和生长速度(单位时间内菌索总长度生长量/生长时间)等参数。

3 结果

3.1 应用 SmartRoot 测定蜜环菌菌索长度和分枝数 蜜环菌在 PDA 平板上生长 15 d 时状况见图 1,以母体菌索为中心呈现放射性生长。利用 SmartRoot 软件对菌索进行自动跟踪和手动校正(图 1b),并在相应天数进行标记(图 1c);且利用该软件对菌索弯曲处、重叠交叉处进行自动识别和跟踪(图 1d)。



a.Synbiosis ProtoCol 3 拍摄蜜环菌生长图片;b.SmartRoot 跟踪处理后蜜环菌;c.SmartRoot 对菌索进行节点描绘,图中数字 10~15 为天数标记;d.SmartRoot 识别并标记多个交叉重叠的菌索

图 1 应用 SmartRoot 跟踪蜜环菌菌索示意

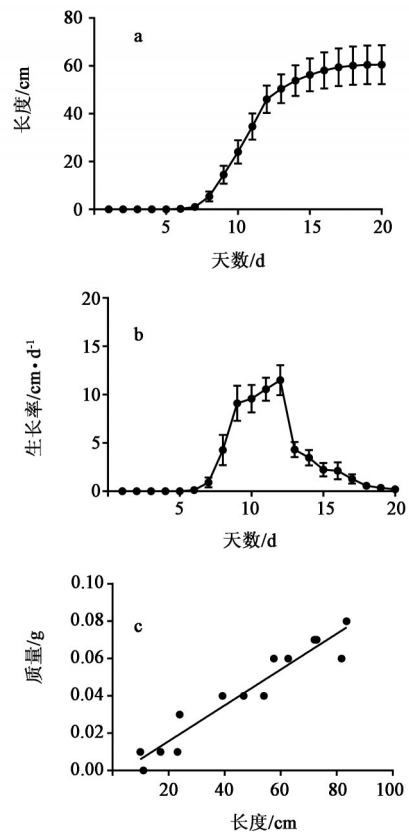
Fig. 1 Schematic diagram of tracking *Armillaria rhizomorph* with SmartRoot

蜜环菌生长 20 d 后,利用 SmartRoot 对表型数据进行统计,得出菌索平均分枝数为 (23.33 ± 0.47) 个,菌索总长度为 (71.34 ± 14.82) cm,单个菌索的平均生长长度为 (3.57 ± 0.74) cm,菌索直径为 $(0.042 \pm$

$0.014)$ cm。

为探索子菌索生长时与母体菌索的夹角是否呈现一定的规律性,按照夹角区间 $[0, 15]$, $(15, 30]$, $(30, 45]$, $(45, 60]$, $(60, 75]$, $(75, 90]$ 对 362 个菌索进行了频率统计,频率分别为 3.04, 4.70, 11.60, 14.09, 20.17, 46.41。结果表明约 50% 的子代菌索与其母体菌索呈垂直关系,这可能与子代菌索形成机制有关,有待进一步研究。

3.2 利用 SmartRoot 获取蜜环菌生长长度与生长速度 菌索总长度在继代后的 0~6 d 基本不变,第 7 天逐渐增长,至第 15 天菌索总长度趋于稳定,直至不再增加,见图 2a。计算每日生长速度,结果显示菌索 0~6 d 未萌发,第 6~7 天开始萌发,第 9~12 天生长较为迅速,其中第 12 天生长速度达到 $22.65 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$,生长至第 13 天时,生长速度急剧下降,菌索总长度趋于稳定,达到 50.34 cm,直至停止生长,见图 2b。由上述结果可知,蜜环菌的继代与转化可选择生长 12 d 至 15 d 菌索,该阶段菌索生长能力旺盛、分生能力强,有利于提高蜜环菌生长活力。在 PDA 平板上接种蜜环菌后,每 24 h 拍照并利用 SmartRoot 测得 10 个培养皿中的蜜环菌菌索总长度,见表 1。



a. 菌索总长度;b. 菌索总生长速度;c. 菌索生长长度与干重相关性
图 2 菌索的生长趋势

Fig. 2 Rhizomorph growth information

表1 菌索总长度($n=10$)

Table 1 Total length of rhizomorph($n=10$)

皿号 天数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	($\bar{x} \pm s$)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	0.02
5	-	0.11	-	-	-	-	0.04	-	-	-	0.01±0.03
6	0.73	0.64	-	-	-	-	0.05	-	-	-	0.14±0.27
7	5.93	2.45	0.01	-	-	0.01	0.98	0.12	1.06	-	1.06±1.79
8	16.73	10.78	0.02	-	0.17	0.14	13.95	2.54	7.72	1.08	5.31±6.13
9	32.77	24.53	2.10	4.98	8.00	2.78	32.97	13.81	15.46	6.74	14.41±11.23
10	46.10	40.40	8.59	9.65	17.13	9.90	49.98	23.01	19.30	15.81	23.99±14.87
11	55.35	55.95	19.98	16.06	26.53	21.34	63.66	33.36	22.56	30.54	34.53±17.25
12	63.24	70.77	32.33	27.03	37.82	31.73	74.11	44.11	25.92	53.19	46.02±18.24
13	67.77	79.64	36.96	31.95	43.24	34.63	76.41	45.77	26.82	60.23	50.34±16.41
14	72.16	88.19	40.88	36.51	48.09	36.62	77.38	46.39	27.17	64.83	53.82±19.38
15	75.63	95.98	43.79	38.73	50.30	37.10	78.58	46.54	27.81	66.03	56.05±20.77
16	82.58	103.31	46.47	40.50	51.19	37.65	78.80	46.80	28.12	66.26	58.17±22.53
17	84.63	108.42	48.44	41.74	51.81	37.94	79.60	47.11	28.35	66.46	59.45±23.58
18	85.31	110.92	48.90	42.76	51.98	38.03	79.69	47.32	28.65	66.62	60.02±24.03
19	85.88	112.20	49.18	43.53	52.12	38.15	79.82	47.39	28.78	66.73	60.38±24.28
20	85.98	112.88	49.40	43.89	52.31	38.28	79.92	47.48	28.89	66.85	60.59±24.37

3.3 蜜环菌菌索长度与干重的相关性分析 在实验过程中,一般通过干重来表征蜜环菌的生物量,然而干重法受限于培养基剥离、冻干程度等因素,繁琐步骤,耗时长,误差大且无法测量生长速度。而 SmartRoot 测定法可根据获取的图片进行处理,从而快速获得准确、客观的菌索长度信息。为探索以菌索长度代替干重来表征蜜环菌生物量的可行性和可靠性,对不同生长时期、生长状态的菌索进行长度与干重的相关性分析。结果如图 2c 所示,蜜环菌的菌索长度与干重呈线性相关($Y=0.001X-0.0042, R^2=0.9234$),表明利用 SmartRoot 测定蜜环菌菌索长度,可表征蜜环菌的生物量。

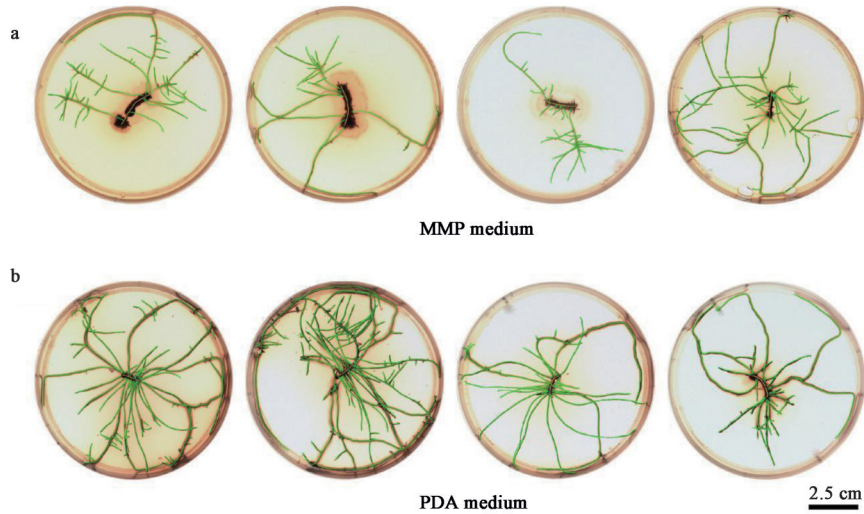
3.4 基于 SmartRoot 的蜜环菌菌索表型谱变化分析 经查阅文献,培养蜜环菌主要使用 PDA 与 MMP 固体培养基。为研究蜜环菌菌索在不同培养基上生长时表型谱变化,通过 SmartRoot 软件处理获得蜜环菌在 MMP 和 PDA 固体培养基上的菌索最大生长速度、菌索总长度、菌索直径以及菌索分枝数,统计结果显示不同培养基培养的菌索总长度、

生长速度存在明显差异($P<0.05$);分枝数、菌索直径无差异。因此,如为了获取更多生长量的蜜环菌菌索,应选择 PDA 固体培养基进行培养。见图 3,表 2。

4 讨论

表型组学是近年来发展起来的一门新交叉科学,主要对在不同环境下的基因型全部细胞表型进行系统研究,其在基因型分析,临床和认知神经科学快速发展的知识以及信息和计算机科学的发展方面、复杂性状疾病的遗传基础研究、作物改良方面都有广泛的应用,在功能基因组学,药物研究和代谢工程领域有潜在的应用价值^[16]。2011年,Robert Furbank 提出了表型研究的瓶颈问题,包括多环境中对产量相关性状的多季重复测量、遥感技术在田间监测中的误差、关键表型的高通量分析等^[17]。直到 2017 年, Francois Tardieu 和 Malcolm Bennett 共同提出了多层次表型组研究的构想^[1]。

近年来,人工智能和图像识别技术逐渐被用于表型谱分析,与传统测量方法相比,其效率显著提



a.MMP固体培养基培养蜜环菌;b.PDA固体培养基培养蜜环菌

图3 不同培养基蜜环菌生长状态

Fig. 3 Growth status of *Armillaria gallica* in different media

表2 不同培养基培养蜜环菌(n=4)

Table 2 *Armillaria gallica* was cultured in different medium (n=4)

表型指标	培养基	$\bar{x}\pm s$	P
分枝数	MMP	34.50±13.63	0.237
	PDA	56.00±29.80	
菌索总长度/cm	MMP	45.89±16.41	0.033
	PDA	94.88±28.66	
菌索直径/mm	MMP	0.44±0.04	0.320
	PDA	0.47±0.05	
最大生长速度/cm·d ⁻¹	MMP	5.94±0.64	-5
	PDA	14.14±2.58	

高。SmartRoot是一个专门为测量植物根系而设计的软件,可自由设置参数多,并且可以实现操作的半自动化。植物的根生长具有向地性,有明确的主根和侧根关系,而蜜环菌菌索生长以母体菌索为中心,呈现向四周平面扩散生长的特点,故本文将SmartRoot软件运用到蜜环菌菌索的测量上。本课题组也尝试使用其他植物根系分析测量软件如WinRHIZO,但结果表明其不能很好地运用到菌索分析上。

作为食用菌和名贵中药材天麻和猪苓的共生菌,蜜环菌的生长状况不仅会影响自身的品质与产量,还会直接影响到天麻与猪苓的品质。另一方面,蜜环菌还是森林的病害之一,其可以从活树上吸收养分,当接触到树木根部时,其菌索将入侵树根,长此以往导致树木死亡,造成极大的森林灾害。基于SmartRoot软件中测量工具对菌索的手动及半自动跟踪功能对蜜环菌菌索的生长状态进行数据

收集,菌索跟踪的准确度决定菌索测量的精度。在菌索弯曲处增加节点的数量,可以提高软件对菌索长度估算的准确性,而曲率较小的部分可以用较少的节点连接。SmartRoot的半自动模式可以自适应地跟踪菌索并放置节点,用适当的节点数量与节点分布跟踪菌索形状,从而准确地重绘菌索拓扑结构,长度及分枝情况。然而,使用SmartRoot时需要注意,在手动或半自动模式下跟踪特定菌索时,如果选择的跟踪节点及路径上存在差异,测量结果会有细微不同。如果照片的分辨率过低,SmartRoot也不能准确的识别菌索;多次图片采集时,需保持恒定的拍摄方式和拍摄距离,否则图片比例尺需重新校正。为了更好的解决了分辨率、拍摄方式、拍摄距离等问题,本研究将SmartRoot与Synbiosis ProtoCol 3影像分析仪结合,使其适用于蜜环菌菌索的表型谱分析。值得注意的是,在利用SmartRoot跟踪描绘蜜环菌直径时,当节点不能与蜜环菌菌索直径重合时,所得数据与真实数据将有较大差异,需改进拍摄工具的分辨率,以增加数据的准确性。

相较于传统的干重测量方法,使用SmartRoot分析蜜环菌的生长状态,只需每天拍摄照片即可实时获得其生长状况,用做分析的材料未遭到破坏,便于后续实验研究,具有客观、准确和快捷的优势。运用SmartRoot软件,可以测量菌索的生长长度、生长速度、分枝数等表型数据,能够为蜜环菌的品种选育和表型谱分析奠定基础,并为其他中药资源表型谱分析提供了参考。

[参考文献]

- [1] 周济, FRANCOIS T, TONY P, 等. 植物表型组学: 发展、现状与挑战[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(4): 580-588.
- [2] 赵春江. 植物表型组学大数据及其研究进展[J]. 农业大数据学报, 2019, 1(2): 5-18.
- [3] 王璟璐, 张颖, 潘晓迪, 等. 作物表型组数据库研究进展及展望[J]. 中国农业信息, 2018, 30(5): 13-23.
- [4] 杨有新, 杨泽茂, 吴才君, 等. 植物表型组学研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(6): 1105-1112.
- [5] 潘映红. 论植物表型组和植物表型组学的概念与范畴[J]. 作物学报, 2015, 41(2): 175-186.
- [6] NAIK H S, ZHANG J, LOFQUIST A, et al. A real-time phenotyping framework using machine learning for plant stress severity rating in soybean [J]. *Plant Methods*, 2017, 13(23): 1-12.
- [7] LOBET G, PAGÈS L. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(1): 29-39.
- [8] 刘季, 安锋, 袁坤, 等. 运用 SmartRoot 测量橡胶树细根[J]. 植物生态学报, 2013, 37(8): 786-792.
- [9] 韩毅强, 石英, 巩海仁, 等. SmartRoot 在大豆根系形态指标测定上的应用[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(5): 43-46.
- [10] 柳玲玲, 秦松, 朱国胜, 等. 猪苓与蜜环菌共生体系的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(4): 655-659.
- [11] 秦国夫, 赵俊, 郭文辉, 等. 蜜环菌的生物学研究进展[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(6): 89-94.
- [12] YUAN Y, JIN X, LIU J, et al. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1615.
- [13] 梁宇庭, 蒋超, 袁媛, 等. 高卢蜜环菌 PCR-RFLP 快速鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3622-3626.
- [14] 周骏辉, 袁媛, 梁宇庭, 等. 蜜环菌遗传转化体系的建立[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1770-1772.
- [15] LOBET G, PAGÈS L, DRAYE X, et al. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(1): 29-39.
- [16] 李宏, 韦晓兰. 表型组学: 解析基因型-表型关系的科学[J]. 生物技术通报, 2013(7): 41-47.
- [17] 胡伟娟, 傅向东, 陈凡, 等. 新一代植物表型组学的发展之路[J]. 植物学报, 2019, 54(5): 558-568.

[责任编辑 顾雪竹]