

文章编号: 1001 - 9014(2008)02 - 0086 - 05

近红外光谱技术在燕麦种子活力测定中的应用研究

韩亮亮^{1,2}, 毛培胜^{1*}, 王新国¹, 王玉红¹

(1. 中国农业大学 草地研究所, 北京 100094 / 北京市草业科学重点开放试验室, 北京 100094;

2 上海市农业科学院 农业科技信息研究所, 上海 201106)

摘要:快速准确无损测定牧草种子活力是当前种子生理研究中的一项重要内容. 试验以甜燕麦种子为材料, 采用近红外光谱结合主成分-马氏距离模式识别方法鉴别了 3 种不同活力的燕麦种子. 研究表明, 在 $4000 \sim 6900 \text{cm}^{-1}$ 波数范围内的光谱, 通过 SNV (Standard Normal Variate) 预处理方法, 用 4 个主成分建立的模型效果最佳, 模型对校正集样本和预测集样本的鉴别率都分别达到 100%. 该研究利用近红外光谱技术为快速准确无损测定种子活力提供了一条新途径.

关键词:近红外光谱; 马氏距离; 燕麦; 种子活力

中图分类号: O434. 3, Q94 **文献标识码:** A

STUDY ON VIGOUR TEST OF OAT SEEDS WITH NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY

HAN Liang-Liang^{1,2}, MAO Pei-Sheng^{1*}, WANG Xin-Guo¹, WANG Yu-Hong¹

(1. Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100094 /

The Key Laboratory of Grassland Science in Beijing, Beijing 100094, China;

2 Agricultural Science and Technology Information Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: Nondestructive measurement of forage seed vigour is a key problem for the research of seed physiology at present. In the experiment, a new nondestructive method for discriminating different vigour of oat (*Avena sativa*) seeds was developed by near infrared spectroscopy (NIRS) combined with principal component-Mahalanobis' distance model. The result show that the prediction model is built in the spectral region between 4000 and 6900cm^{-1} by preprocessing method of SNV (standard normal variate), and the model is the best with 4 principal component factors. And the rates of identification in both calibration set samples and prediction set samples are 100%. The method will offer a new approach of testing seed vigour with quick, precise and non-destructive characters.

Key words: near-infrared spectroscopy; Mahalanobis' distance; oat; seed vigour

引言

种子活力 (Seed Vigour) 是决定种子或种子批在萌发和出苗期间活性和表现水平的所有特性总和^[1], 是反映种子质量的主要指标之一. 活力测定可反映种子在田间或贮藏条件下的潜在质量表现^[2], 在种子质量管理中具有重要意义. 种子的劣变将导致种子的活力、贮藏能力及田间建植能力等质量因素下降, 从而造成很大的经济损失. 据统计, 在美国, 每年生产的种子中, 有 25% 的种子质量问题,

造成的经济损失价值可达 5 亿美元. 在全世界范围内, 种子劣变造成的经济损失将更加巨大^[3]. 种子劣变是种子作为一个活的有机体必须经历的过程, 种子从具有高活力的状态开始逐渐下降. 直至最后被使用或完全丧失活力, 这是一个由量变到质变的过程, 具有不可逆、不可避免和群体间不相同等特点^[4]. 许多研究表明, 随着种子劣变的加深, 种子自身的能量合成、呼吸强度及生物合成能力都会发生明显的下降, 染色体发生畸变、DNA 发生降解、RNA 和蛋白质的合成、酶的活性及细胞膜都会发生变

收稿日期: 2007 - 03 - 19, 修回日期: 2007 - 09 - 26

基金项目: 国家自然科学基金 (30571321) 资助项目

作者简介: 韩亮亮 (1982-), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事牧草种子、牧草育种等工作.

* 为通讯作者, Tel: 010-62733311

Received date: 2007 - 03 - 19, revised date: 2007 - 09 - 26

化^[3,5].在种子劣变的过程中也会发生一些生化变化,而这些变化往往会引起不饱和脂肪酸和有毒物质(醇类、醛类、酮类、酸类)的增加,另外还会引起蛋白质、淀粉、可溶性糖、磷脂脂肪酸等含量的降低^[6-8].

在生产实践中,由于牧草种子粒小、休眠度高,更不易取得理想的田间建植,因而更需要进行活力测定^[9].但现有的活力测定方法^[10]如发芽速度与幼苗生长测定、冷冻测定、人工老化测定、ATP含量测定等都对种子本身造成伤害.因此,随着种子活力逐渐受到人们的重视,快速而且不破坏种子的活力检测方法逐渐成为研究的热点.

近红外光谱(NIR)分析具有速度快、效率高、成本低、测试重现性好、测量方便等特点,已被越来越多地应用于食品工业、石油化工、制药工业等领域^[11].近年来,近红外技术广泛应用于测定农作物的蛋白质、淀粉、脂类、酶、维生素、灰分等^[12-14].近红外光谱结合模式识别的方法在中草药^[15]、食品^[16]、农产品^[17]的鉴别和分类上得到了许多成功的应用.但是近红外光谱方法在种子活力测定的应用研究很少,国外学者曾对研究林业种子活力^[18],有关饲草种子活力的测定则鲜有报道.本研究探索近红外光谱技术在燕麦(*Avena sativa*)种子活力快速测定当中的应用条件,为种子活力快速测定提供理论依据和经验参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

燕麦种子由青海省畜牧兽医科学院草原所提供,品种为甜燕麦.为了得到不同活力水平的燕麦种子,采用人工加速老化方法^[18]使种子产生不同程度的劣变.

1.2 老化方法

选取均匀一致的甜燕麦种子 15g 为一个测定样本,进行人工加速老化,将甜燕麦种子(10g)平铺于装有 300ml 去离子水的老化盒内支架的干燥筛网上,加速老化盒为带盖塑料盒(长×宽×高=12.0cm×12.0cm×5.0cm)内放入一个带有耐热塑料筛网的 PVC 支架(直径 11.0cm 高 4.0cm),然后将老化盒放入老化箱内(DNP-9162 型电热恒温箱),在温度 42℃、湿度 100% 下分别老化 48h 和 96h 把人工老化后的甜燕麦种子在室温下放置两天使其恢复至原重.样品的人工老化温度、时间、发芽率及样本数量见表 1 所列.

表 1 样本材料的人工老化温度、时间、发芽率及样本数量
Table 1 Ageing temperatures and times and number of samples

人工老化温度	人工老化时间	发芽率	校正集数量	预测集数量
42	0h	96%	12	6
42	48h	29%	12	6
42	96h	7%	12	6
总计			36	18

1.3 光谱采集

近红外仪器采用 Thermo Electron (美国)的傅里叶变换近红外光谱仪(Antaris).扫描范围:4000~10000 cm^{-1} ,扫描次数:64次;分辨率:8 cm^{-1} .试验时,保持室内的温度和湿度基本一致,取适量种子(约 15g)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.

1.4 分析方法

本研究中采用的分析方法是主成分分析结合马氏距离的模式识别方法^[20,21].主成分分析能够降低数据维数,具体步骤为:利用下列式(1)对校正集中的光谱矩阵 $X_n \times m$ 进行主成分降维,得到主成分得分矩阵 $T_n \times f$ 和载荷矩阵 $P_m \times f$;按式(2)与式(3)将得分矩阵 T 进行中心化处理;按式(4)计算校正集样本中的协方差矩阵 M ;最后由式(5)计算校正集中样本的马氏距离.

$$T_n \times f = X_n \times m \times P_m \times f \quad (1)$$

在式(1)中 n 为校正集中的样本数; m 为变量数; f 为主成分数

$$\bar{T}[i:] = \bar{T}_j = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} T_{ij}}{n} \quad (2)$$

在式(2)中 $i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, f$

$$T_c = T - \bar{T} \quad (3)$$

$$M = \frac{T_c T_c^T}{n-1} \quad (4)$$

$$MD_i = \sqrt{(t_i - \bar{T})M^{-1}(t_i - \bar{T})} \quad (5)$$

在公式(3~5)中 \bar{T} 为 n 个校正集样本的平均得分矩阵; T_c 为 T 的均值中心化矩阵; t_i 为校正集中样本 i 的光谱得分向量; MD_i 为校正集中样本 i 的马氏距离; M 为校正集样本中的协方差矩阵.

根据校正集样本的马氏距离和误差允许的范围,确定判别未知样本属于第 k 类样本群体 (G_k) 的域值 (D_k).对于未知样本的光谱向量 X_{unk} , 利用校正集光谱的载荷矩阵 P , 计算其得分向量 t_{unk} , 再由 t_{unk} 计算其马氏距离 D_{unk} . 判别规则为

$$\text{当 } D_{unk} < D_k \text{ 时: } X_{unk} \in G_k;$$

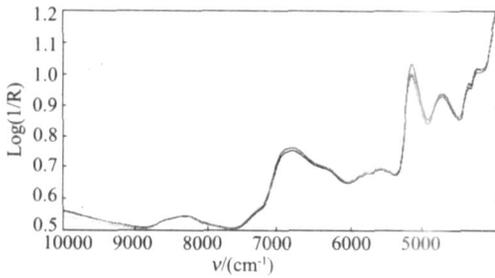


图1 不同老化时间处理后的甜燕麦种子的原始光谱图
Fig.1 The original NIR spectra of different ageing times oat seeds

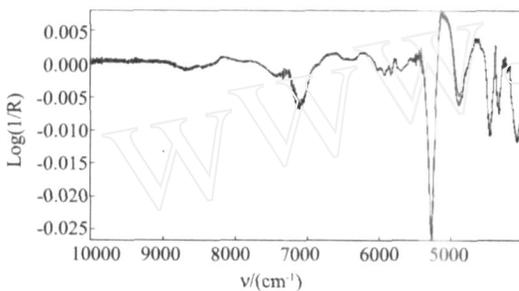


图2 不同老化时间处理后的甜燕麦种子一阶导数光谱图
Fig.2 The first derivative NIR spectra of different ageing times oat seeds

当 $D_{unk} > D_k$ 时: $X_{unk} \notin G_k$;
当 $D_{unk} = D_k$ 时: 重新选定 D_k .

2 结果与分析

2.1 波长范围的选择

3种经过不同老化时间处理后甜燕麦种子的原始光谱图显示(图1),原始光谱在波数分别为 4749.19cm^{-1} 、 5179.15cm^{-1} 、 6827.36cm^{-1} 附近 有 3 个明显的吸收峰.而一阶导数光谱在 5220cm^{-1} 波数的附近有明显波动(图2).因为纯水中的 O—H 键伸缩振动的一级基频区在 5155cm^{-1} 附近,它的一个合频区在 6940cm^{-1} 附近,在这两个波长附近是水分吸收的敏感区,选择光谱波长范围尽量避开水分吸收峰的特征波长区.本研究所采用的样本水分含量在 6.2%,为了尽量避开水分的影响,选取了 $4000\text{cm}^{-1} - 6900\text{cm}^{-1}$ 光谱范围内的数据取得比较好的试验结果.

2.2 模型的建立

由于甜燕麦种子本身的大小存在差异,所以在试验中尽量采用均匀一致性比较好的种子,但在试验中发现还是会对光的漫反射有一定影响.因此,在试验中需要对样本的原始光谱数据进行预处理,不同的预处理方法对所建的模型有一定的影响.本研

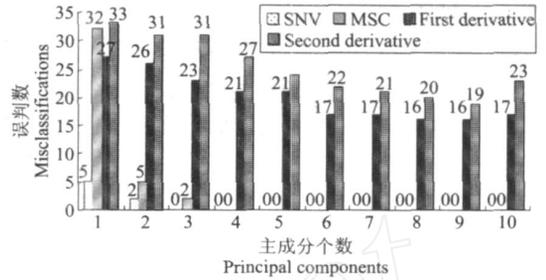


图3 模型基于不同的主成分数、不同的预处理方法时的误判数
Fig.3 The relationship between misclassifications and principal components in calibration set with four preprocessing methods

究对标准归一化(SNV)、多元散射校正(MSC)、一阶导数和二阶导数几种预处理方法进行了比较.图3表示模型基于不同的主成分数、不同的预处理方法时的误判数.

不同方法的比较结果表明(图3),用多元散射校正(MSC)和标准归一化(SNV)的预处理方法,两者都明显优于一阶导数和二阶导数.标准归一化(SNV)的预处理方法时要优于多元散射校正(MSC)处理方法时,选取 3~10 主成分时误判概率为零.所以本研究采用 SNV 的与处理方法分别选用了 3~10 个主成分建立模型对预测集样本进行预测,预测的结果表明选用 4 个主成分建立的模型预测效果最好.

2.3 校正和预测的结果

在模型的校正过程中,主成分数的多少对模型的建立会产生一定的影响.误判数作为衡量模型优劣的一个指标.首先筛选出校正集中误判数较少的几种模型,用这几种模型分别对预测集中的样本进行预测,比较预测集中的误判数,最后,校正集和预测集中误判数都相对较少的模型即为最佳模型^[20].

根据以上的分析,选用到范围内 $4000\text{cm}^{-1} \sim 6900\text{cm}^{-1}$ 的光谱数据,经过标准归一化(SNV)的预处理,选用 4 个主成分数建立预测模型最佳,误判数为零.图4是校正集光谱矩阵第一主成分和第二主成分的得分图.它表明校正集中和预测集的样本点在该二维平面上的投影,由图4知,3种不同老化时间的种子在此二维平面的投影比较集中,从而说明 3 种不同老化时间的种子的活力存在差异.

图4表示 54 个样本的第一主成分和第二主成分的得分图,图4中横坐标表示每个样本的第一主成分得分,纵坐标表示每个样本的第二主成分得

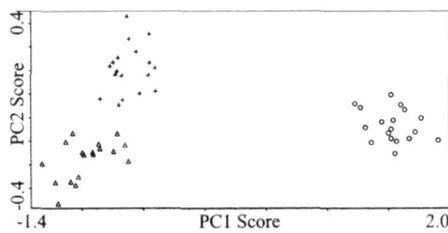


图 4 校正集和预测集光谱矩阵第 1 主成分和第 2 主成分的得分图

Fig 4 Score cluster plot by using first and second principal components (PCs)

Aged for 0h at 42 + Aged for 36h at 42 Aged for 96h at 42

分值. 每个样本对应每个主成分有一个得分值, 主成分的得分能够反映样本间的相似性和独特性, 基于样本的主成分得分图能够揭示样本的内部特征和聚类信息. 如果把每个样本的第 1 和第 2 个主成分的得分值在图中表达出来, 就得到了前 2 个主成分的二维的得分图 (如图 4 所示). 对 3 种不同活力的种子共 54 个样本进行主成分分析聚类. 分析表明前 4 个主成分有较好的聚类作用, 能直观地对 3 种不同活力的燕麦种子进行定性分析.

从图 4 中可以明显看出经过不同老化时间的燕麦种子明显的分成 3 类, 因此, 我们基于主成分 1、2 对于 54 个样本的得分图可以对 54 个样本进行定性分析. 从表 2 可以看出, 前 4 个主成分的累积贡献率达到 99.73%, 说明前 4 个主成分能够解释原始波长变量的 99.73%, 代表了近红外光谱的主要信息. 从图 4 中可以看出, 虽然经过不同老化时间的燕麦种子的聚合度不是很好, 但彼此之间没有样本重叠在一起, 这说明主成分分析结合马氏距离的模式识别方法对不同活力燕麦种子之间的区分是成功的.

3 讨论与结论

种子的劣变是一个不可逆的过程. 种子作为有生命的有机体, 其活力降低后, 种子内部发生一系列的变化, 包括生理生化水平、细胞超微结构、遗传物

质的变化等^[22]. 正是由于这些变化才造成不同劣变程度的种子内部所含的醇类、醛类、酮类、酸类等有毒物质的不同以及脂类、蛋白质、淀粉等营养物质的不同. 本研究采用人工加速老化方法来加深种子的劣变程度, 使之产生了 3 种不同劣变程度的样本, 利用这些不同劣变程度的种子内部所含醇类、醛类、酮类、酸类等有毒物质及脂类、蛋白质、淀粉等营养物质的不同, 由于它们在近红外谱区内的基频及合频吸收不同从而来测定这 3 种不同劣变程度的种子活力.

通过试验, 证明了近红外光谱在种子活力测定的可行性, 并获得了 3 种不同活力水平种子的光谱特征, 通过这些光谱特征结合主成分分析和马氏距离的模式识别方法建立了模型. 试验结果表明, 模型的预测结果很好, 对不同活力的种子的鉴别率达到 100%, 说明利用近红外光谱快速准确无损测定种子活力是可行的. 但是, 本研究采用的甜燕麦种子都是同一收获期和同一产地, 而种子活力会受到不同产地、不同收获期的影响, 所以在以后的工作中还可以尝试不同产地不同收获期及其它种类的种子来完善模型, 使结果更加准确. 另外, 本研究采用的不同劣变程度甜燕麦种子是经过人工加速老化方法来实现的, 在以后的研究中如果能采用自然劣变及贮藏年限不同的种子加以验证则更能说明近红外光谱在种子活力测定的可行性.

REFERENCES

- [1] Perry D A. Report of the Vigour Test Committee, 1974—1977 [J]. *Seed Science and Technology*, 1978, 6: 159—181.
- [2] Hampton J G, TeKrony D M. *Handbook of Vigour Test Methods* [M]. ISTA. Zurich, Switzerland, 1995.
- [3] McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment [J]. *Seed Science and Technology*, 1999, 27: 177—237.
- [4] Debucho J C. Precepts of seed storage [J]. *Process of the Mississippi State Processors Short course*, 1973, 1: 93—122.
- [5] Walters C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing [J]. *Seed Science and Research*, 1998, 8: 223—244.
- [6] Harrington J F. Biochemical basis seed longevity [J]. *Seed Science and Technology*, 1973, 1: 453—461.
- [7] Blanche C A, Elan W W, Hodges J D. Accelerated ageing of *Quercus nigra* seed: biochemical changes and applicability as a vigour test [J]. *Canadian journal of forest research*, 1990, 20: 1611—1615.
- [8] Madhava, Roa K V, Kalpana R. Carbohydrates and the ageing process in seeds of pigeonpea (*Cajanus Cajan* (L.) millsp) cultivars [J]. *Seed Science and Technology*, 1994, 22: 495—501.
- [9] Hampton J G. Report of the vigour committee [J]. *Twenty-fifth international seed testing congress Seed Science and*

表 2 前 4 个主成分及其累计贡献率

Table 2 Principal components and reliabilities				
主成分 Principal components	PC1	PC2	PC3	PC4
累计可信度 Accumulative reliabilities	96.52	95.96	99.51	99.73

- Technology*, 1999, **27**: 177—186
- [10] Bekendam, Grob R. *Seedling Evaluation* [M]. Translated by PU Xin-Chun, HAN Jian-Guo Beijing: Beijing Agriculture university Press (浦心春, 韩建国译. 种苗评定于种子活力测定方法手册. 北京: 北京农业大学出版社), 1993, 103—110.
- [11] LU Wan-Zhen, YUAN Hong-Fu, XU Guang-Tong, *et al* *The Modern Analysis Technique for Near Infrared Spectra* [M]. Beijing: Chinese Oil and Chemical Industry Press (陆婉珍, 袁洪福, 徐广通, 等. 现代近红外分析技术. 北京: 中国石化出版社), 2001, 6—8.
- [12] Delwiche R. Protein content of single kernel of wheat by near-infrared reflectance spectroscopy [J]. *Journal of Cereal Science*, 1998, **27**: 241—254.
- [13] Yang P, Shunk R J. Protein content and viscosity of starch from wet-milled corn hybrids as influenced by environmentally induced changes in test weight [J]. *Cereal Chemistry*, 2000, **77** (1): 44—7.
- [14] Dowell F E. Differentiating vitreous and nonvitreous durum wheat kernels by using near-infrared spectroscopy [J]. *Cereal Chemistry*, 2000, **77** (2): 155—158.
- [15] SUN Su-Qin, TANG Jun-Ming, YUAN Zi-Min, *et al* Discrimination of tuberous tuber *Dioscorea* by fingerprint infrared spectra and principle component analysis [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (孙素琴, 汤俊明, 袁子民, 等. 道地山药红外指纹图谱和聚类分析的鉴别研究. 光谱学与光谱分析), 2003, **23** (2): 258—260.
- [16] HE Yong, LI Xiao-Li. Discrimination of varieties of waxberry using near infrared spectra [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (何勇, 李晓丽. 近红外光谱杨梅品种鉴别方法的研究. 红外与毫米波学报), 2006, **25** (3): 192—194.
- [17] HUANG Min, HE Yong, HUANG Lin-Xia, *et al* Discrimination of varieties of silkworm egg based on visible-near infrared spectra [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (黄敏, 何勇, 黄凌霄, 等. 基于可见近红外光谱技术的家蚕蚕种鉴别方法的研究. 红外与毫米波学报), 2006, **25** (5): 342—344.
- [18] 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 Science and Technology*, 2004, **32**: 593—606.
- [19] Hampton J G, Brunton, Pemberton G M. *et al* Temperature and time variables for accelerated ageing vigour testing of pea seed [J]. *Seed Science and Technology*, 2004, **32**: 261—264.
- [20] ZHAO Jie-Wen, CHEN Quan-Sheng, ZHANG Hai-Dong, *et al* Study on the identification of tea using near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (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. 光谱学与光谱分析), 2006, **26** (9): 1601—1604.
- [21] XU Lu, SHAO Xue-Guang. *Methods of Chemometrics* [M]. Beijing: Science Press (许禄, 邵学广. 化学计量学方法. 北京: 科学出版社), 2004.
- [22] JWU Dao-fan, SONG Ming. Studies on methods and mechanisms of improving vigor in cabbage seed [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (吴道藩, 宋明. 提高甘蓝种子活力的方法与机理研究. 园艺学报), 2002, **29** (6): 542—546.