

植物表型體分析平台於蔬菜自動外表型分析之應用

林思妤¹ 杜元凱¹ 游舜期¹ 傅月英² 林大鈞^{3,*}

摘要

林思妤、杜元凱、游舜期、傅月英、林大鈞。2021。植物表型體分析平台於蔬菜自動外表型分析之應用。台灣農業研究 70(1):11–23。

隨著基因組定序技術的蓬勃發展，作物育種在基因體分析上已步入高通量、大數據的階段。然而，相對應的外表型分析技術卻尚未跟上基因型分析技術的腳步，成為作物育種發展的瓶頸。所以，高通量自動化植物外表型分析平台的建立，已是作物育種的重要課題。本研究使用自動化三維雷射掃描器進行植物外表型資料的收集及分析，首先針對大豆、小油菜及甜瓜進行掃描參數驗證。結果顯示，傳統手動量測與機器自動掃描所得到的數據，在株高、葉面積及生物量上皆具高度相關性 ($r > 0.85^{***}$)。接著，將三維雷射掃描器應用於2個蔬菜栽培研究試驗中，分別為不同土壤微生物劑對胡瓜生長之影響試驗，以及不同氮含量配方對番茄生長之影響試驗。結果顯示，三維雷射掃描器可達到省工並連續收集外表型資料，有助於判定植株生長差異以及差異出現之時間點。試驗證實，自動化植物表型體設施具有快速、高通量、客觀及非侵入式之優點，將有助於作物育種發展。

關鍵詞：表型體、高通量、三維雷射掃描、作物。

前言

作物育種的核心概念為「植物外表型 (phenotype; P) 受到基因型 (genotype; G)、環境 (environment; E) 及此二者間的動態交互作用 ($G \times E$) 所影響」。隨著次世代定序技術發展完善及成本的降低，大量基因型數據的取得變得容易，使得基因型分析進入大數據時代，且加速了數量性狀基因座定位 (quantitative trait locus mapping) 的效率，並使全基因體關聯性研究 (genome-wide association study; GWAS) 變得容易可行 (Natarajan *et al.* 2016; Xiao *et al.* 2017; Jaganathan *et al.* 2020)。作物的表現 (外表型) 是育種所追求的終極目標，任何育種相關基因型研究或環境研究，皆須對應外表型才具有意義。然而，在基因型分析進入大數據時代的同時，外表型資料仍無法客觀、高通

量且普及性地取得資料，成為基因探勘或作物育種選拔常遭遇的瓶頸之一。傳統外表型數據的取得耗費時間及人力，且結果易受人為主觀的干擾，有時甚至必須破壞植株方能取得資料 (Chen *et al.* 2014)。鑒於上述原因，建立自動化、非破壞性且高通量的植物外表型分析系統，已成為目前育種亟需發展的課題。

目前世界各國的學研單位、私人企業及國際組織紛紛發展各自的自動化表型體分析設施，例如：澳洲植物表型機構 (Australian Plant Phenomics Facility; APPF)、英國國家植物表型體分析中心 (National Plant Phenomics Center)、法國蒙佩利爾植物外表型分析平台 (Montpellier Plant Phenotyping Platform)、印度 Nanaji Deshmukh 植物表型體中心 (Nanaji Deshmukh Plant Phenomics Centre) 及國際半乾旱熱帶作物研究中心 (International Crops Research Institute

投稿日期：2020年8月18日；接受日期：2020年10月26日。

* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

for the Semi-Arid Tropics) 等，以精確且大量地取得植物生長即時外表型數據，進一步釐清重要性狀基因或是加速育種選拔。現今自動化植物表型體分析平台可依照掃描器與植物間移動模式，分為兩大類：一為「植物至感測器」(plant-to-sensor)；另一為「感測器到植物」(sensor-to-plant)。前者為植物經由輸送帶進入一配備各式感測器 (sensor) 之箱子，並在箱子中擷取植物影像。此系統之優點為可將外界干擾因子降到最低，並調整影像擷取環境為最適化狀態，以獲取最佳影像結果。後者則為感測器移動、植物不動的形式，適合進行易受移動干擾的性狀調查，如植物冠層或特定環境條件之研究 (Yang *et al.* 2020)。

在影像收集方面，多種感測器及其影像擷取技術，已漸趨成熟並可應用於農業研究。RGB 分析影像技術 (red-green-blue imagery) 又稱為可見光影像分析技術，由於價格低且容易取得之優點，常用於植物生物量、外觀特性或生長趨勢分析 (Yang *et al.* 2014; Knoch *et al.* 2020)，但缺點為無法有效呈現植株內部生理資訊。高光譜影像 (hyperspectral imaging) 分析技術提供植物影像大量、大範圍的波長資訊，常用於早期發現或量化病蟲害逆境、非生物逆境下的植物反應 (Rumpf *et al.* 2010; Römer *et al.* 2012; Yuan *et al.* 2014; Thomas *et al.* 2018)，惟其價錢高昂且資料分析較繁複。熱影像 (thermal imaging) 分析技術可偵測植物表面溫度變化，其變化會受氣孔導度、蒸散作用等生理或背景環境影響。當植物遭受逆境時，氣孔導度、蒸散作用可能會直接或間接受到影響，所以熱影像分析技術常被應用於探討作物逆境反應的相關研究，尤其與水分密切相關之逆境，如乾旱、淹水、鹽分逆境 (Prashar & Jones 2014; Khorsandi *et al.* 2018; Vaughan *et al.* 2018)。螢光影像 (fluorescent imaging) 分析技術可於黑暗環境中偵測葉綠素和次級代謝物等特定生理訊息，常用於光合作用及植物結構的相關研究 (Tian *et al.* 2004; Rousseau *et al.* 2013; Perez-Sanz *et al.* 2017)。在立體成像分析技術方面，植物的三維影像常由多個影像拼接模擬 (Fang *et al.* 2016)，或由雷射影像技

術所建構 (Paulus *et al.* 2014)，相較於傳統的二維影像，可獲得三維立體結構資料或是更多特定部位之性狀資訊。

行政院農業委員會農業試驗所 (以下簡稱農試所) 長期進行作物育種、栽培、種原繁殖及保存等相關研究，每年需要大量人力進行作物外表型調查，且可能面臨調查紀錄受人為主觀影響之情形。因此，為提升外表型調查之效率及數據客觀性，並降低大量人力需求，農試所於 2017 年開始建置自動化植物表型體設施，包含實驗室、溫室及露地等不同規模之表型體系統，期盼透過此套設施之建置，輔助各項研究進入大數據世代，並節約人力成本。本文使用之自動化表型體系統建置於農試所生物技術組精密溫室，含 3 軸 (X、Y 及 Z 軸) 自動化大型天車系統，搭載 Phenospex 公司 (Heerlen, The Netherlands) PlantEye 三維雷射掃描器及 HortControl version 3.3 分析系統，為國內目前首座表型體分析溫室。

Phenospex 公司的 PlantEye 三維雷射掃描器，是一種具有高解析度的雷射掃描器，屬於前述「感測器到植物」的表型體分析系統。目前已被應用在多種作物上，如油菜、花生、豇豆、小麥、水稻及珍珠粟 (Kjaer & Ottosen 2015; Vadez *et al.* 2015)。但目前已發表系統均建置於 2 軸 (X 軸、Y 軸) 自動化天車系統，本文所用系統為世界首座建置於 3 軸自動化天車系統的表型體分析設施。同時，目前多數表型體設施相關試驗分析標準流程，多為國際私人種子公司所發展，資料取得相當不易。爰此，為評估農試所建立的表型體溫室設施及分析方法的實際應用性，本篇研究先探討此自動化植物表型分析系統與傳統外表型分析方法數據間的相關性，以評估系統取代傳統外表性狀分析方法的可行性。本文研究先利用不同植株大小、生長形式之蔬菜作物為對象，進行自動化與傳統人工量測數據之比較。同時，將系統直接應用在分析胡瓜 (*Cucumis sativus*) 及番茄 (*Solanum lycopersicum*) 作物，分別於不同土壤益生菌製劑及氮含量處理下的表型體分析，以評估該自動化表型體設施的實際應用性。

材料與方法

植物材料

本試驗在第一部分，探討自動化植物表型分析系統與傳統外表型分析方法數據間的相關性，使用的植物材料包含大豆 (*Glycin max*) 品種 'CRWD'、甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 品種「嘉玉」及小油菜 (*Brassica rapa*) 品種「農興 80 天」，三種作物皆於穴盤中以泥炭土 (Jiffy substrates, Johannesburg, South Africa) 進行育苗，於 2019 年 6 月 3 日分別將 2–3 葉齡大豆及甜瓜幼苗定植於盛裝田土的 6 吋盆栽及盛裝泥炭土的 8 吋盆栽；小油菜則於本葉剛冒出時 (同年 9 月 5 日) 定植於盛裝泥炭土的 3 吋盆栽中，並移入具風扇、水牆的玻璃溫室中 (台中霧峰農試所生技園區)，其溫度控制於 25–35°C，而光子流密度最高可達 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。肥培管理則依照慣行栽培法施行。大豆於定植後第 2–7 週每週取 3 株；甜瓜於定植後 2–4 wk 每週取 4 株；小油菜分別於定植後 7、12、15、18 及 27 d 取 4 株進行手動量測與自動掃描。

在本試驗第二部分，自動化植物表型分析系統應用於蔬菜外表型分析，分別使用胡瓜及番茄為植物材料。胡瓜為市售胡瓜苗 ('CU-87')，於 2019 年 11 月定植於裝有前述泥炭土之 6 吋盆中，栽培管理依照慣行栽培法施行。番茄使用品種為「玉女」，以泥炭土進行育苗，於 3 葉齡時定植於盛裝 150 g 珍珠石之 5 吋黑色軟盆中，定植當天移入移入具風扇、水牆的玻璃溫室。

試驗處理

微生物製劑處理

4 款未商品化土壤微生物製劑製品 (A、B、C、D) 分別依推薦稀釋倍數進行稀釋，在定植後澆灌於胡瓜盆栽中，往後每週澆灌一次，對照組則以水替代。試驗採完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，每處理 8 重複。

氮肥處理

氮肥濃度為參考 Mao *et al.* (2014) 養液組成，將其養液設為對照組 (100% 氮處理)，並

將養液中氮濃度分別調整為 0、50 及 200%，進行不同氮肥濃度處理，每週澆灌 5 次。試驗採 CRD，每處理 6 重複。

自動化植物表型體分析方法

本試驗使用三維雷射掃描器 (PlantEye F500, Phenospex, Heerlen, The Netherlands) 進行自動化植物量測，其架設於天車 (移動軸) 上，屬「感測器至植物」的自動化表型體系統。天車可依待測植物高度及數量進行 X、Y、Z 三方向移動，X 軸長 4.5 m，Y 軸長 10.2 m，Z 軸高 1.8 m (圖 1)。自動化植物表型體系統設置於本所玻璃溫室內，該溫室配有風扇、水牆控溫，溫度控制於 25–35°C，最高光子流密度約 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。天車下方以盆栽形式擺放植物，預設以 400 mm × 400 mm 之正方形為 1 單位 (unit)，1 直排含 24 個單位，共 11 直排。

本試驗所使用三維雷射掃描器可投射 4 種波長雷射光於待測植物上，包含紅 (624–634 nm)、綠 (530–555 nm)、藍 (465–485 nm) 及近紅外光 (720–750 nm)，並以 complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) 影像感測器偵測反射光，進而形成三維點雲並自動演算葉面積、葉面曲度、株高、投影葉面積、葉面積指數、光投影深度、數位體積、標準化植被指數 (normalized difference vegetation index; NDVI)、綠度 (greenness)、標準化葉綠素比率指數 (normalized pigments chlorophyll ratio index; NPCI)、植物老化反射指數 (plant senescence reflectance index; PSRI) 及色相 (hue) 等參數。

各項指數之計算方式如下：株高為扣除最高 2% 的點後與盆高之差異，葉面積為掃描點網格化 (mesh) 後的所有網格面積總和，生物量則為總表面積與植物高度之乘積。綠度為 $(2 \times \text{GREEN} - \text{RED} - \text{BLUE}) / (\text{RED} + \text{GREEN} + \text{BLUE})$ ，NDVI 為 $(\text{NIR} - \text{RED}) / (\text{NIR} + \text{RED})$ ，NPCI 為 $(\text{RED} - \text{BLUE}) / (\text{RED} + \text{BLUE})$ ，PSRI 則是 $(\text{RED} - \text{GREEN}) / (\text{NIR})$ 。其成像解析度可達 1 mm，但掃描器距待測植物越遠，解析度下降。

本試驗將各待測植物以盆栽形式放置於天車下方，每日 11–13 時之間進行一次掃描。天車以 30 mm s^{-1} 速度進行掃描，搭載之三維雷

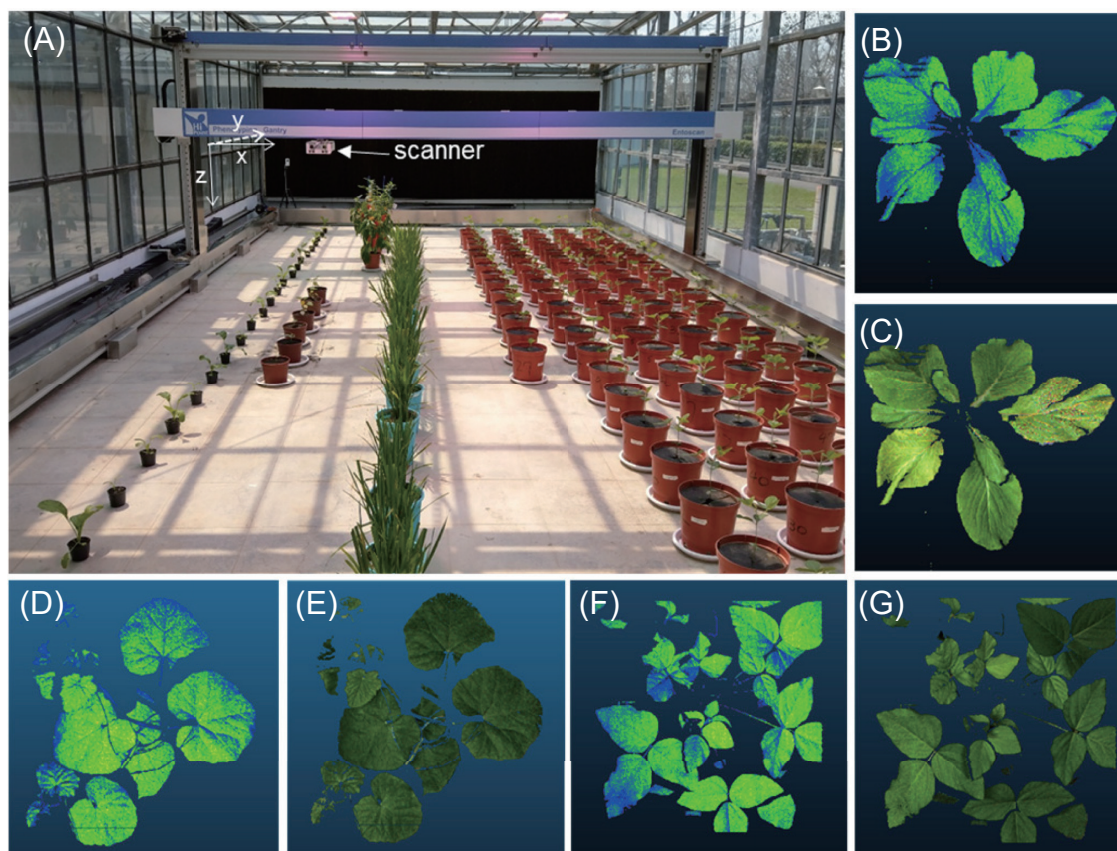


圖 1. (A) 自動化植物表型掃描系統，(C、E、G) 植株彩色 3D 影像及 (B、D、F) 3D 點圖影像；其中，(B)、(C) 為小油菜，(D)、(E) 為甜瓜，(F)、(G) 為大豆。

Fig. 1. (A) Auto-phenotyping system, (C, E, G) 3D color images and (B, D, F) point cloud images of (B, C) rapeseed, (D, E) melon, and (F, G) soybean.

射掃描器隨植物高度調整 Z 軸高度，保持距離植株約 400–500 mm。

傳統外表型量測方法

株高以尺量測植株最高處與盆高之差異，葉面積是將植株每片葉以掃描器 (Epson perfection V37) 掃描並以 Image J 軟體計算葉面積，生物量則以磅秤量測地上部重量。

數據統計分析

本試驗所有統計皆於 R 語言 (version 3.6.2) 及 RStudio (version 1.2.5033) 環境下進行計算，其中相關係數 (correlation coefficient) 及變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 是以 STATS 套件進行分析，散布圖 (scatterplot) 是以 Graphics

套件繪圖，而多重比較法是採 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significance test; LSD test)，以 Agricolae 套件分析。植物 3D 圖是以 CloudCompare (version 2.11 alpha) 讀檔及呈現。

結果與討論

自動化表型體分析與傳統外表型分析間之相關性分析

為驗證三維雷射掃描器得到之生長參數是否與傳統人工量測具相關性，本文針對不同科別及植株型態進行測試，包含葉片互生大小約 10 cm 之大豆 (豆科)、約 20 cm 且快速向上生

長之甜瓜 (葫蘆科) 及葉片輪生且株高矮 (< 20 cm) 之小油菜 (十字花科)。試驗結果顯示，在大豆部分 (表 1 及圖 2)，定植後 2-7 wk 不論在株高、葉面積及生物量等參數，其手動量測與自動掃描結果的相關係數 (r) 皆 > 0.70。其中在第 2-3 週 r 介於 0.70-0.93；第 4-6 週 r 則提升至 0.80-0.96，且為極顯著相關 ($P < 0.001$)；第 7 週 r 較第 6 週下降，為 0.72-0.86。此結果推測可能是因為大豆在不同定植週數的型態變化有關。大豆為羽狀三出複葉，初期僅主蔓向上生長，葉片對生，上方葉可能遮蔽下方葉造成葉面積量測誤差；而在株高部分，最上方未展開新葉與下方已展開複葉距離較遠 (節間長)，而三維雷射掃描器會扣除最高 2% 的點，因而造成定植後 2-3 wk 相關性不高。由此可見，大豆初期因為葉片數量少，些許外觀的變動 (如小部分遮蔽、新芽小等) 即易造成手動量測與自動掃描結果間的 r 降低。在定植後 4-6 wk 後，側芽開始生長，葉片數大幅增加，此時葉片間遮蔽不足以影響兩種檢定方法間的 r ，因此 r 皆達 0.80 以上，且具有極顯著的相關性。定植後 7 wk 後，兩檢定方法在葉面積及生物量上的 r 降低，一方面可能肇因於葉片過於茂密，導致較多的遮蔽所造成；另一方面，則可能是大豆植株側向生長超過三維雷射掃描器被定義的量測方格。

在甜瓜部分，定植後 2-4 wk 後，手動量測與自動掃描之 r 皆達 0.85 ($P < 0.001$)，其中在株高方面 r 達 0.95 以上，葉面積之 r 則隨週數增加而逐漸下降 ($r = 0.99$ 、 0.89 、 0.85)。甜瓜葉的生長型態為單葉互生，葉大且平展，因此自生育初期手動量測與自動掃描即具高度相關性。尤其在株高方面，因新葉與最上方展開葉相近，展開葉面積大且平行地面，因此掃描器即易辨認最上方資料點，造成手動量測與自動掃描間即高之相關性。在甜瓜葉面積方面，手動量測與自動掃描結果間的 r 隨週數增加而逐漸下降，推測可能肇因於甜瓜單葉的面積較大，遮蔽下方葉片所致。本次試驗中，甜瓜自定植第 4 週起，其橫向生長逐漸超出 3D 雷射掃描器之定義量測範圍，故供試甜瓜品種適用之量測期為定植後 4 週內，但隨供試品種不同 (葉

表 1. 不同苗齡 (A) 大豆、(B) 甜瓜及 (C) 小油菜自動掃描與傳統量測之相關係數 (r)。

Table 1. The correlation coefficient (r) of destructive measurement and scanner measurement of plant height, leaf area, and biomass in different ages of (A) soybean, (B) melon and (C) rapeseed.

Weeks after planting	(A) Soybean					(B) Melon			(C) Rapeseed					
	2	3	4	5	6	7	2	3	4	7	12	15	18	27
Plant height	0.77	0.70*	0.84***	0.83***	0.87***	0.86***	0.99***	0.99***	0.95***	0.50	0.91***	0.87***	0.84***	0.86***
Leaf area	0.83*	0.75*	0.80**	0.90***	0.90***	0.72**	0.99***	0.89***	0.85***	0.66	0.97***	0.93***	0.97***	0.91***
Digital biomass	0.93**	0.72*	0.96***	0.87***	0.90***	0.77***	0.99***	0.99***	0.88***	0.62	0.89***	0.88***	0.89***	0.93***

* , ** , *** represent $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 , respectively.

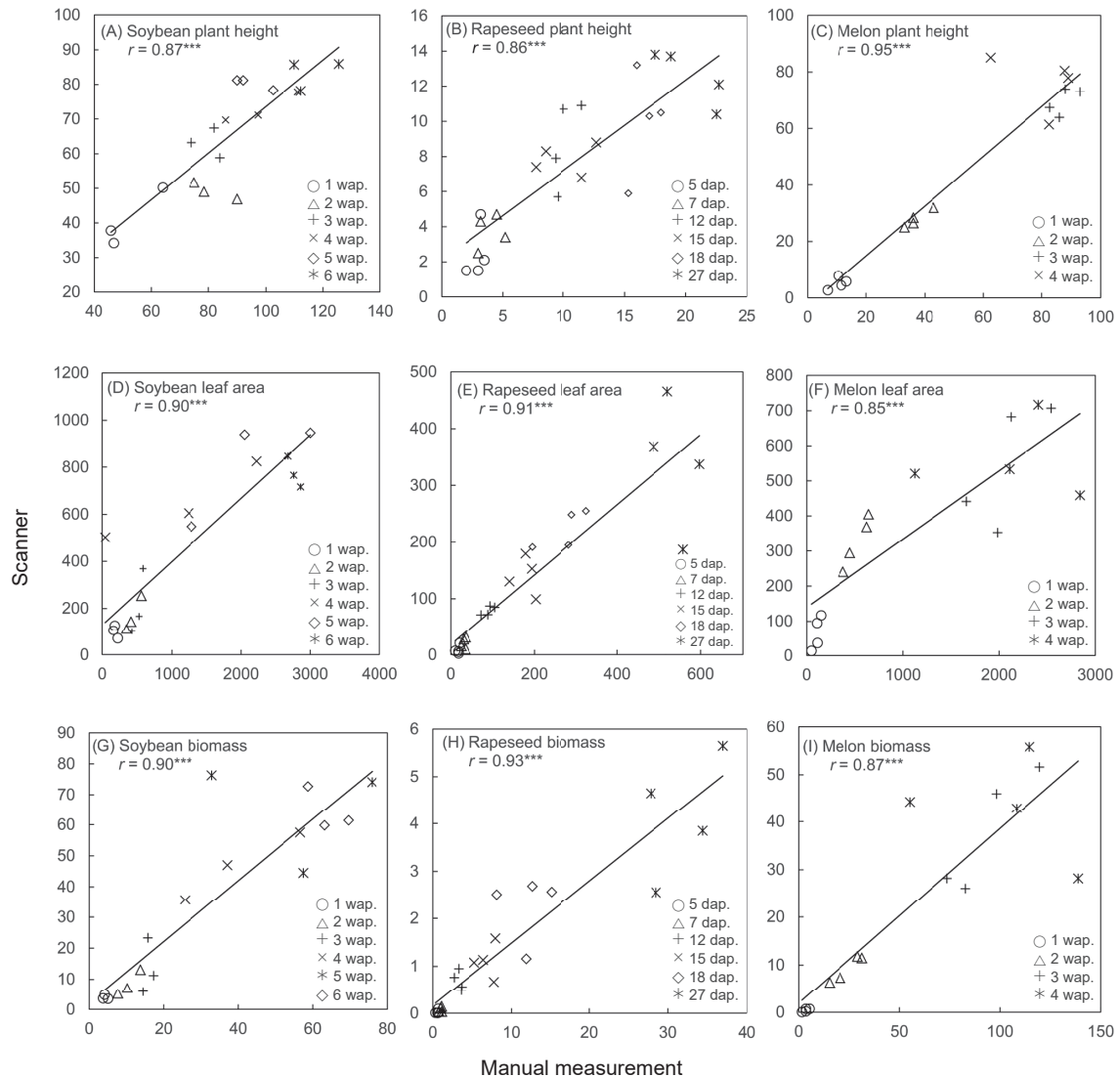


圖 2. 不同作物傳統手動量測與儀器自動掃描之相關性。直行表示不同作物，由左至右分別為大豆、小油菜及甜瓜；橫列表示不同參數，由上至下分別為株高、葉面積及生物量。不同形狀的標點表示定植後不同天數 (days after planting; DAP) 或週數 (weeks after planting; WAP) 收集之資料。左上角標示相關係數 (r)，顯著差異性以星號表示 ($^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$)。

Fig. 2. Correlation between destructive measurement and scanner measurement of plant height, leaf area and biomass in soybean, rapeseed and melon. Different dot types represent the data collected in differential developmental stages. Values of correlation coefficients (r) are shown on the top left of each plot and stars represent the significance of the correlation coefficient ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$).

大小、生長勢不同)、栽培管理方式不同等，亦會影響可用三維雷射掃描器進行量測之作物生長期。

在小油菜相關研究部分，其於定植後 7 d，手動量測與自動掃描間結果的 r 皆低於 0.70，

但定植後 12–27 d，不論在株高、葉面積及生物量方面，兩檢定方法結果的 r 皆大於 0.86 ($P < 0.001$)。進一步觀察小油菜生長型態及不同定植週數之手動量測與自動掃描間 r ，發現由於小油菜為小型作物 (生長橫徑、高度 < 30

cm)，葉輪生，定植初期其橫徑及株高僅約 2–5 cm，自動掃描極易受土壤高度、地面平整性、植株傾斜等因子而干擾掃描的結果。因此，小油菜初期之 r 較低。但定植後 12–27 d，由於葉輪生導致上位葉不易遮蔽下位葉，且葉片大多平行地面，因此在葉面積及株高部分，手動量測與自動掃描之相關係數皆具高度相關性。定植 27 d 以後，植株開始抽苔並開花，抽苔高度大於 60 cm，導致雷射掃描器因對焦範圍的限制，造成下方葉成像的解析度驟降外，花器亦可能遮蔽下方葉片，使得掃描器量測數據不穩定。由此結果可知，此類輪生之小型作物，僅在抽苔前適合以三維雷射掃描器進行自動化外表資料收集。

綜觀上述三個作物，包含葉小而多之中型植物(大豆)、葉大而平且快速生長之中型植物(甜瓜)及葉輪生之小型植物(小油菜)，它們在多數生長階段的手動量測與自動掃描結果 r 皆高於 0.70，生長中期 r 更大於 0.80。顯示三維雷射掃描器確實可替代手動量測，用於進行植株外表型數據之收集。惟須注意植株大小是否超出三維雷射掃描器的對焦範圍，同時植株橫向生長不可超出掃描器定義掃描範圍外(預設為 400 mm × 400 mm 之正方形)。除此之外，亦須注意三維雷射掃描器可能受到環境光線干擾，如水盤、銀黑布及非深色介質等反光，栽培時須盡量去除週邊反光甚至是光線不均勻之處。總而言之，使用三維雷射掃描器進行外表資料收集，只要隨供試植物外觀、生長特性、生長時期調整三維雷射掃描器之高度及掃描範圍，即可用於取代傳統人力調查，除節省大量人力外，亦可快速得到大量、客觀且連續性之資料，將可解決作物育種及種原調查上高通量外表型資料的需求。

自動化植物表型體設施應用於蔬菜栽培研究

雷射三維掃描器，在植物外表型分析上已有廣泛且深入的研究 (Paulus *et al.* 2014; Maphosa *et al.* 2017)。本試驗所用 Phenospex 公司的 PlantEye 三維雷射掃描器更是植物表型體分析慣用的掃描器，番茄表型分析的範例，已公布於其官網 (<https://phenospex.com/products/>

plant-phenotyping/planteye-f500-multispectral-3d-laser-scanner)，而胡瓜的相關應用範例多為種苗公司的分析結果，卻因營業秘密而未被公開。另一方面，植生指數 (vegetative indices; VI) 亦已被廣泛應用在廣泛作物的外表型分析 (Hatfield & Prueger 2010; Hatfield *et al.* 2019; Kokhan & Vostokov 2020)。為了進一步探討本所自動化植物表型體分析平台，是否能偵測出不同栽培處理下，胡瓜及番茄等蔬菜作物生長的外表型差異差異，本試驗以自動化植物表型體設施，每日進行植物各種生物量及 VI 參數的收集。以下以兩個試驗為例。

不同土壤微生物製劑對胡瓜生長之影響

本試驗以三維雷射掃描器記錄胡瓜在施用 4 款不同土壤微生物製劑下的各項植物參數，試驗結果顯示 (圖 3–4)，胡瓜株高在定植後 5 d 內，各種微生物製劑的處理，對胡瓜的生長無顯著差異；但定植 7 d 後，各製劑處理間，開始明顯對胡瓜生長有影響；而定植 10 d 後，對胡瓜的生長影響更為顯著。在葉面積方面，定植後 3 d 時，仍無顯著影響，但定植後 5–7 d，各處理對葉面積的影響即有顯著之差異；定植後 10 d，各處理對葉面積的影響卻又沒有顯著之差異，其可能肇因於這階段各處理的胡瓜植株橫向生長皆超過儀器定義掃描範圍外，以及上位葉片太大遮蔽下方葉片所致。在生理指標方面，綠度、NDVI、PSRI 及 NPCI 處理間並無顯著差異。透過三維雷射掃描器得到的數據，顯示供試 4 款土壤微生物製劑商品對胡瓜之生長皆有促進作用，其中又以 B 微生物製劑商品之效果最佳。此結果顯示，自動化植物表型體設施，可用於快速且客觀評估微生物製劑的商業功能或價值，又透過每日收集外表型資料，可追查差異性變化出現之時期。例如，此試驗過程可發現定植 5 d 時，不同處理導致胡瓜生長葉面積出現差異；定植 7 d 後，不同處理導致胡瓜生長株高出現差異。

不同氮含量處理對蕃茄生長之影響

同樣地，將三維雷射掃描器應用於收集不同氮含量處理下番茄生長的各項參數，包含株高、葉面積、綠度、NDVI、NPCI 及 PSRI

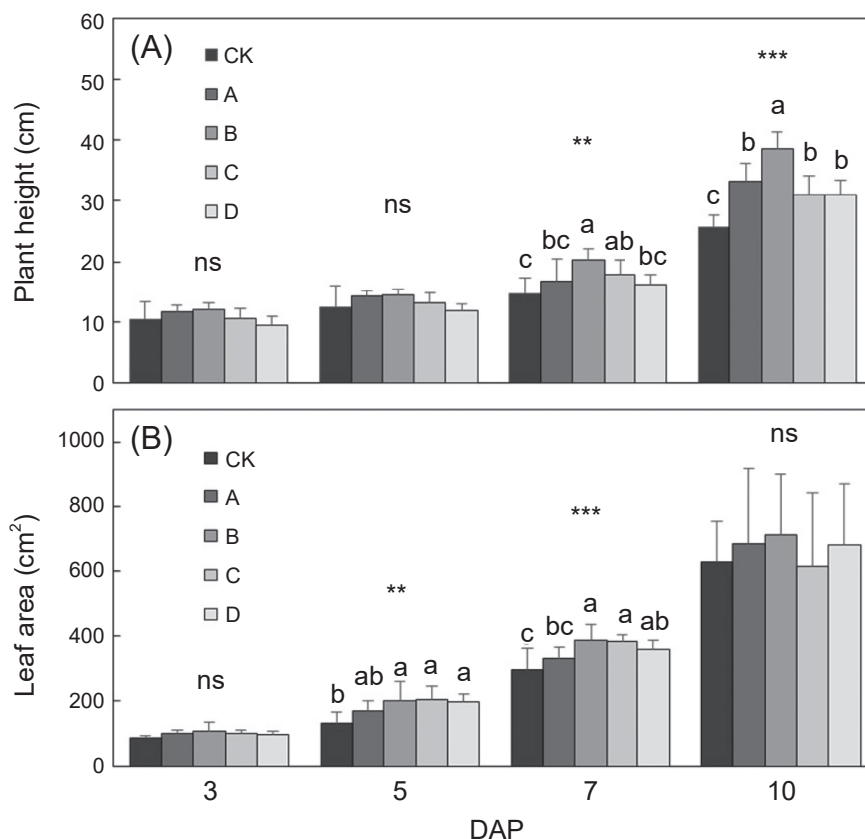


圖 3. 不同土壤益生菌處理 (A、B、C、D) 下胡瓜第 3、5、7、10 天生長情形, (A) 株高、(B) 葉面積。DAP: 定植後天數 (days after planting); 誤差線為平均值標準差 ($N = 8$)。各組平均值上星號及 ns 分別表示 ANOVA 結果顯示平均值間有顯著差異 (*, **, *** $P < 0.05, 0.01, 0.001$) 及不顯著差異 (non-significant), 相同英文字母則表示 5% 水準下經最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗未達顯著差異。

Fig. 3. Cucumber growth parameters, (A) plant height and (B) leaf area, at 3, 5, 7, and 10 d after planting (DAP) under different soil microbe treatments (A, B, C and D). Error bar is the standard deviation of the mean ($N = 8$). Star and ns represent significant and non-significant differences separately by analysis of variance (ANOVA). The same letter means that two treatments are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

(圖 5)。試驗結果顯示, 在生物量相關參數, 如株高及葉面積等, 0% 氮含量處理的成長曲線較為和緩, 試驗組以 100% 氮含量處理株高生長較快, 50% 氮含量處理次之。在植物生理活力指標方面, NDVI 為最常見之植物生長指標, 可間接估計光合作用效能及淨初級產量 (Peñuelas *et al.* 1994); PSRI 偵測胡蘿蔔素與葉綠素含量比例, 可作為葉片老化及果實成熟指標, 數值越高表示葉片老化程度越高 (Merzlyak *et al.* 1999; Das & Seshasai 2015); NPCI 則反應全部色素與葉綠素含量比例, 為植株生理狀況指標, 尤其對氮含量較為敏感

(Peñuelas *et al.* 1994; Bannari *et al.* 2007)。綜合此些指標顯示, 0% 氮含量處理之葉片老化最為明顯, 其餘含氮處理組之生長狀況較亦可看出差異, 尤其以 NPCI 最能反應植株氮含量之差異。NPCI 指標顯示, 定植後第 5 天對照組與實驗組出現差異 (5% 信心水準下 LSD 檢測達顯著差異), 第 6 天試驗組中 50% 氮含量處理與 100% 氮含量、200% 氮含量處理出現差異, 到了定植後第 8 天, 4 個處理間具 LSD 顯著差異。此說明了以 200% 氮含量處理可顯著提升葉片中葉綠素含量, 但在葉面積部分定植後 10 d, 成長曲線趨於平緩, 須注意 200%

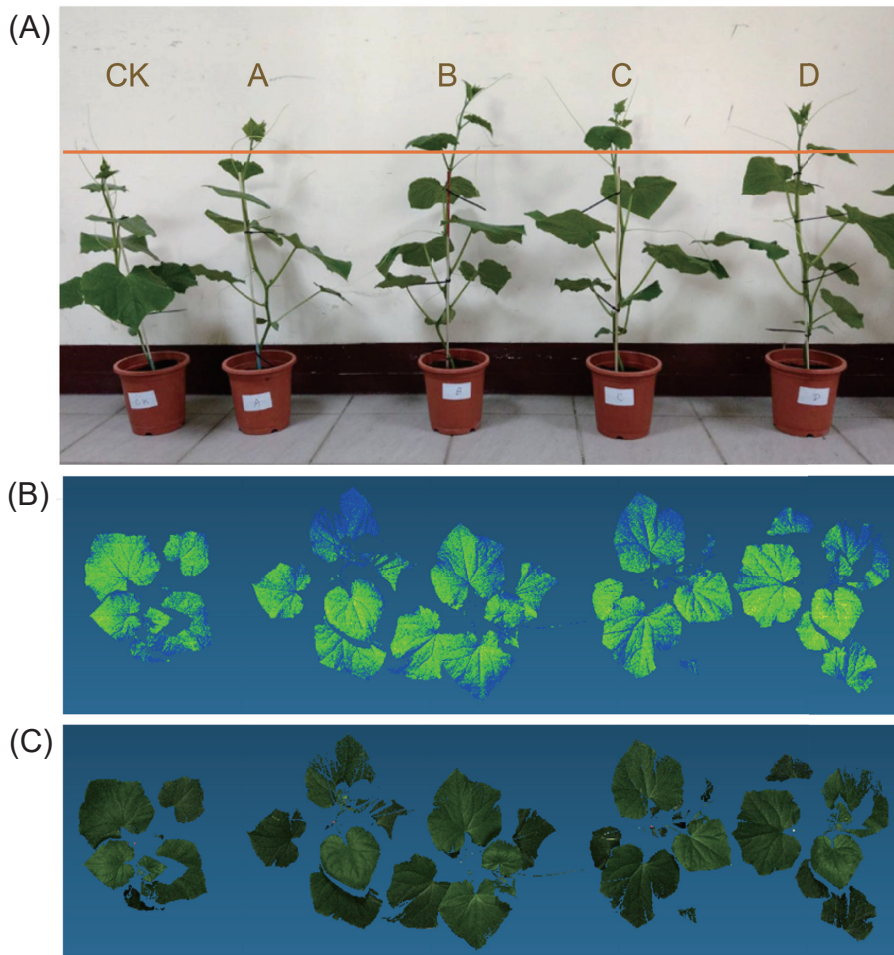


圖4. 不同土壤益生菌處理(A、B、C、D)下,胡瓜(A)定植後13 d植株外觀及(B、C)定植後11 d俯視3D圖。由左至右分別為對照組、A、B、C及D處理。

Fig. 4. Effects of different soil microbes (A, B, C and D) supplied on cucumber. (A) Side-view of cucumbers on the 13th day after planting; and (B, C) the top-view 3D plot on the 11th day after planting.

氮含量處理氮含量對蕃茄定植初期可能過多。部分試驗數據有大幅波動情形,推測為受環境光線影響所致,由於三維雷射掃描器是偵測雷射光反射訊號,會受環境強光或陰影影響反射光接收,進一步造成數據變動,因此在判讀數據時以長期趨勢進行解讀。

透過上述兩個自動化植物表型體設施應用於蔬菜栽培的應用案例,其非破壞式、連續收集外表型資料之優點,有助於判定植株生長差異以及差異出現之時間點。此外,自動化三維雷射掃描器除了收集基本生物量相關參數,亦

可搭配4種光譜波段(紅、綠、藍及近紅外光)偵測多種植物生長指標,進行各株植株大面積生理分析,使植物生理活力變成可量化評估之參數。

結語

本研究結果顯示,傳統人工量測與自動掃描之數據具高度相關性,尤其以甜瓜(葉大而且快速生長之中型植物)最佳,小油菜(葉輪生之小型植物)次之,大豆(葉小而多之中型植物)雖不如前兩者相關性高,但生育中期

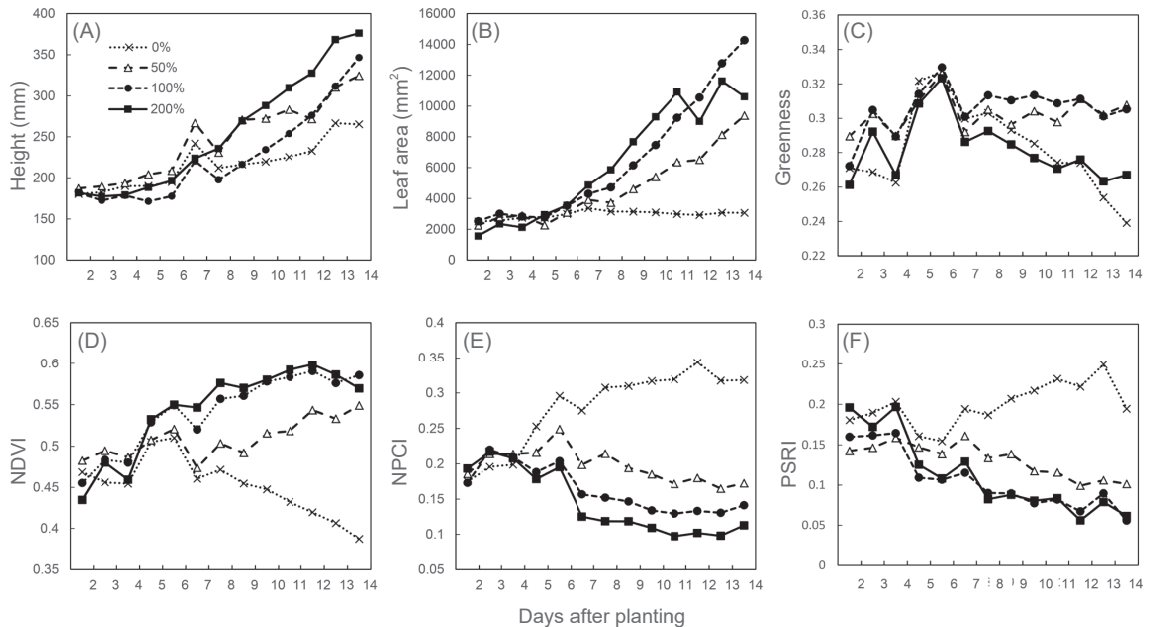


圖 5. 不同氮含量配方對番茄生長之影響。(A) 株高；(B) 葉面積；(C) 綠度；(D) NDVI；(E) NPCI；及 (F) PSRI。

Fig. 5. Growth of tomato under different nitrogen concentration treatments. (A) Plant height; (B) leaf area; (C) greenness; (D) normalized difference vegetation index (NDVI); (E) normalized pigments chlorophyll ratio index (NPCI); and (F) plant senescence reflectance index (PSRI).

相關係數仍達 0.8 以上。綜此顯示，農試所之自動化植物表型體設施可用於進行植物外表型重要參數之收集。此外，經由本研究中連續收集之參數顯示，傳統人工量測與自動掃描數據之相關係數除了與上述物種間差異有關，亦與各作物生長時期相關。以系統預設之量測範圍為例，植株株高 < 5 cm、橫向生長 > 40 cm 以及葉片相互遮蔽將容易導致三維掃描器之量測誤差。因此，未來使用自動化植物表型體設施，需針對待測植物調整量測範圍，本套系統配置之三維掃描器最大量測寬度可達 60 cm，最佳解析度可達 1 mm，將可適用於大多數蔬菜作物栽培及育種研究，亦可協助各式種原進行性狀紀錄。

農試所建置之自動化植物表型體設施，每小時可進行約 200 株植物之掃描及分析，除了得到生物量相關參數（如株高、葉面積等），亦可透過多項生理指標瞭解植物生長狀況。因此，將可使外表型調查試驗更加快速、客觀，且具有非破壞性及連續性偵測之優點。雖然，

本次試驗的胡瓜、番茄等作物相關自動化外表型分析，未配合傳統外表型分析調查結果，但雷射三維掃描器，已在植物外表型分析上有廣泛且深入的研究 (Paulus *et al.* 2014; Maphosa *et al.* 2017)。同時，相關植生指標已被廣泛應用在廣泛作物的外表型分析 (Hatfield & Prueger 2010; Hatfield *et al.* 2019; Kokhan & Vostokov 2020)。爰此，本次試驗分析結果，應具相當可信度。然而，目前雖可進行全株植物多項參數量測，但無法針對特定部位進行量測分析，雷射掃描器提供之資訊也僅限於植株外部資訊。因此，未來將持續擴充多種感測器，如高光譜、熱影像鏡頭等，並由影像分析、育種、植物生理、病蟲害及栽培等專家組成團隊，期盼完善自動化植物表型體設施，使植物外表型分析更快速、省工、精準、自動化。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 107 農科

-20.1.1-農-C3 及 108 農科-19.1.1-農-C2 計畫經費支持，以及本所植病組蘇俊峰博士提供胡瓜苗及土壤微生物製劑，謹致謝忱。

引用文獻

- Bannari, A., K. S. Khurshid, K. Staenz, and J. W. Schwarz. 2007. A comparison of hyperspectral chlorophyll indices for wheat crop chlorophyll content estimation using laboratory reflectance measurements. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 45:3063–3074. doi:10.1109/TGRS.2007.897429
- Chen, D., K. Neumann, S. Friedel, B. Kilian, M. Chen, T. Altmann, and C. Klukas. 2014. Dissecting the phenotypic components of crop plant growth and drought responses based on high-throughput image analysis. *Plant Cell* 26:4636–4655. doi:10.1105/tpc.114.129601
- Das, P. K. and M. V. R. Seshasai. 2015. Multispectral sensor spectral resolution simulations for generation of hyperspectral vegetation indices from Hyperion data. *Geocarto Intl.* 30:686–700. doi:10.1080/10106049.2014.973065
- Fang, W., H. Feng, W. Yang, L. Duan, G. Chen, L. Xiong, and Q. Liu. 2016. High-throughput volumetric reconstruction for 3D wheat plant architecture studies. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 9:1650037. doi:10.1142/S1793545816500371
- Hatfield, J. L. and J. H. Prueger. 2010. Value of using different vegetative indices to quantify agricultural crop characteristics at different growth stages under varying management practices. *Remote Sens.* 2:562–578. doi:10.3390/rs2020562
- Hatfield, J. L., J. H. Prueger, T. J. Sauer, C. Dold, P. O'Brien, and K. Wacha. 2019. Applications of vegetative indices from remote sensing to agriculture: Past and future. *Inventions* 4:71. doi:10.3390/inventions4040071
- Jaganathan, D., A. Bohra, M. Thudi, and R. K. Varshney. 2020. Fine mapping and gene cloning in the post-NGS era: Advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.* 133:1791–1810. doi:10.1007/s00122-020-03560-w
- Khorsandi, A., A. Hemmat, S. A. Mireei, R. Amirfattahi, and P. Ehsanzadeh. 2018. Plant temperature-based indices using infrared thermography for detecting water status in sesame under greenhouse conditions. *Agric. Water Manag.* 204:222–233. doi:10.1016/j.agwat.2018.04.012
- Kjaer, K. H. and C. O. Ottosen. 2015. 3D Laser triangulation for plant phenotyping in challenging environments. *Sensors* 15:13533–13547. doi:10.3390/s150613533
- Knoch, D., A. Abbadi, F. Grandke, R. C. Meyer, B. Samans, C. R. Werner, R. J. Snowdon, and T. Altmann. 2020. Strong temporal dynamics of QTL action on plant growth progression revealed through high-throughput phenotyping in canola. *Plant Biotechnol. J.* 18:68–82. doi:10.1111/pbi.13171
- Kokhan, S. and A. Vostokov. 2020. Using vegetative indices to quantify agricultural crop characteristics. *J. Ecol. Eng.* 21(4):120–127. doi:10.12911/22998993/119808
- Mao, H., W. Zhu, and H. Liu. 2014. Determination of nitrogen and potassium content in greenhouse tomato leaves using a new spectro-goniophotometer. *Crop Pasture Sci.* 65:888–898. doi:10.1071/CP13391
- Maphosa, L., E. Thoday-Kennedy, J. Vakani, A. Phelan, P. Badenhorst, A. Slater, G. Spangenberg, and S. Kant. 2017. Phenotyping wheat under salt stress conditions using a 3D laser scanner. *Isr. J. Plant Sci.* 64(3–4):55–62. doi:10.1080/07929978.2016.1243405
- Merzlyak, M. N., A. A. Gitelson, O. B. Chivkunova, and V. Y. Rakitin. 1999. Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 106:135–141. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106119.x
- Natarajan S., H. T. Kim, S. K. Thamilarasan, K. Veerapan, J. I. Park, and I. S. Nou. 2016. Whole genome re-sequencing and characterization of powdery mildew disease-associated allelic variation in melon. *PLoS One* 11:e0157524. doi:10.1371/journal.pone.0157524
- Paulus, S., H. Schumann, H. Kuhlmann, and J. Léon. 2014. High-precision laser scanning system for capturing 3D plant architecture and analysing growth of cereal plants. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 121:1–11. doi:10.1016/j.biosystemseng.2014.01.010
- Peñuelas, J., J. A. Gamon, A. L. Fredeen, J. Merino, and C. B. Field. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sens. Environ.* 48:135–146. doi:10.1016/0034-4257(94)90136-8
- Perez-Sanz, F., P. J. Navarro, and M. Egea-Cortines. 2017. Plant phenomics: An overview of image acquisition technologies and image data analysis algorithms. *GigaScience* 6:gix092. doi:10.1093/gigascience/gix092
- Prashar, A. and H. G. Jones. 2014. Infra-red thermography as a high-throughput tool for field phenotyping. *Agronomy* 4:397–417. doi:10.3390/agronomy4030397
- Römer, C., M. Wahabzada, A. Ballvora, F. Pinto, M. Rossini, C. Panigada, J. Behmann, J. Léon, C. Thureau, C. Bauchhage, K. Kersting, U. Rascher, and L. Plümer. 2012. Early drought stress detection in cereals:

- Simplex volume maximisation for hyperspectral image analysis. *Funct. Plant Biol.* 39:878–890. doi:10.1071/FP12060
- Rousseau, C., E. Belin, E. Bove, D. Rousseau, F. Fabre, R. Berruyer, J. Guillaumès, C. Manceau, M. A. Jacques, and T. Boureau. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9:17. doi:10.1186/1746-4811-9-17
- Rumpf, T., A. K. Mahlein, U. Steiner, E. C. Oerke, H. W. Dehne, and L. Plümer. 2010. Early detection and classification of plant diseases with support vector machines based on hyperspectral reflectance. *Comput. Electron. Agric.* 74:91–99. doi:10.1016/j.compag.2010.06.009
- Thomas, S., J. Behmann, A. Steier, T. Kraska, O. Muller, U. Rascher, and A. K. Mahlein. 2018. Quantitative assessment of disease severity and rating of barley cultivars based on hyperspectral imaging in a non-invasive, automated phenotyping platform. *Plant Methods* 14:45. doi:10.1186/s13007-018-0313-8
- Tian, G. W., A. Mohanty, S. N. Chary, S. Li, B. Paap, G. Drakakaki, C. D. Kopec, J. Li, D. Ehrhardt, D. Jackson, S. Y. Rhee, N. V. Raikhel, and Vitaly Citovsky. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta. *Plant Physiol.* 135:25–38. doi:10.1104/pp.104.040139
- Vadez, V., J. Kholová, G. Hummel, U. Zhokhavets, S. K. Gupta, and C. T. Hash. 2015. LeasyScan: A novel concept combining 3D imaging and lysimetry for high-throughput phenotyping of traits controlling plant water budget. *J. Exp. Bot.* 66:5581–5593. doi:10.1093/jxb/erv251
- Vaughan, R. G., D. Bergfeld, W. C. Evans, S. Wilkinson, C. Miwa, and M. Diabat. 2018. A baseline thermal infrared survey of ground heating around the Casa Diablo Geothermal Plant, Mammoth Lakes, CA. *Geoth. Res. T.* 42:952–966.
- Xiao, Y., H. Liu, L. Wu, M. Warburton, and J. Yan. 2017. Genome-wide association studies in maize: Praise and stargaze. *Mol. Plant* 10:359–374. doi:10.1016/j.molp.2016.12.008
- Yang, W., Z. Guo, C. Huang, L. Duan, G. Chen, N. Jiang, W. Fang, H. Feng, W. Xie, X. Lian, G. Wang, Q. Luo, Q. Zhang, Q. Liu, and L. Xiong. 2014. Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. *Nat. Commun.* 5:5087. doi:10.1038/ncomms6087
- Yang, W., H. Feng, X. Zhang, J. Zhang, J. H. Doonan, W. D. Batchelor, L. Xiong, and J. Yan. 2020. Crop phenomics and high-throughput phenotyping: Past decades, current challenges and future perspectives. *Mol. Plant* 13:187–214. doi:10.1016/j.molp.2020.01.008
- Yuan, L., Y. Huang, R. W. Loraamm, C. Nie, J. Wang, and J. Zhang. 2014. Spectral analysis of winter wheat leaves for detection and differentiation of diseases and insects. *Field Crops Res.* 156:199–207. doi:10.1016/j.fcr.2013.11.012

Application of Plant Phenomics Platform for Automatic Phenotyping of the Vegetable Crops

Ssu-Yu Lin¹, Yuan-Kai Tu¹, Shuen-Chi You¹, Yue-Ying Fu², and Da-Gin Lin^{3*}

Abstract

Lin, S. Y., Y. K. Tu, S. C. You, Y. Y. Fu, and D. G. Lin. 2021. Application of plant phenomics platform for automatic phenotyping in the vegetable crops. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(1):11–23.

With the vigorous development of genomic sequencing techniques, crop breeding has entered an era of high-throughput and big data in genomic analysis. However, the relative phenotyping techniques did not keep up with the development of genotyping techniques and have become a bottleneck for breeding development. The development of a high-throughput plant auto-phenotyping platform is becoming an important issue in crop breeding. For this purpose, a plant auto-phenotyping platform has been established deploying a 3-dimensional laser scanner. First, the auto-phenotyping parameters of soybean, rapeseed, and melons were validated by comparing them with the analysis of traditional manual phenotyping. The results indicate that the parameters of plant high, leaf area, and biomass all are highly correlated between the auto-phenotyping platform and the traditional one ($r > 0.85^{***}$). Then, this platform has been applied to the phenotyping of the cultivation of the other 2 vegetables. The first case was conducted on the effects of different soil microbial agents for the growth of cucumber, and the second one was conducted on the effects of different nitrogen content formula for the growth of tomato. The results showed that 4 commercially available soil microbial products could improve the growth of cucumber and the formula with different nitrogen contents did significantly affect tomato growth. These results suggest that the established auto-phenotyping platform can save labor and collect continuously phenotyping data. It is applicable and useful for the users to analyze the diversities among plant growth stages as well as treatments. This platform has the advantages of fast, high-throughput, objective and non-invasive for phenotyping analysis, and is helpful for the development of crop breeding.

Key words: Plant phenomics platform, High-throughput phenotyping data, 3-dimensional laser scanner, Crop.

Received: August 18, 2020; Accepted: October 26, 2020.

* Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.