



Views & Comments

基于图像的拟南芥抗性检测自动化工作台的构建

Goldi Makhija^{a,c}, Dinesh S. Pujara^b, In-Hyouk Song^a, Byoung Hee You^a, Hong-Gu Kang^b^a Department of Engineering Technology, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA^b Department of Biology, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA^c Caresoft Global Inc., Burr Ridge, IL 60527, USA

1. 引言

由于气候不断变化和人口不断增加,作物改良对粮食安全变得至关重要[1]。植物病害的防治是影响粮食安全的重要因素之一。例如,小麦作为一种主要农作物,在过去一直受到周期性的破坏。在最近一个事件中,当一种新的小麦茎锈病从东非蔓延到中东时,小麦价格大幅上涨,并威胁到发展中国家的生计[2]。这个例子强调了学习植物如何抵御潜在的病原体和害虫以确保粮食资源的重要性。

抗性性状的鉴定一直是植物病害防治的主要手段之一[3]。例如,一长串有效对抗植物疾病的 R (抗性)基因已经被定性并用于作物保护[4]。这些 R 基因会引发强烈的防御反应,以应对来自各种病原体和害虫的感染,底层信令网络虽然高度复杂,但似乎涉及许多常见的参与者。例如,拟南芥(*Arabidopsis*)的病程相关基因非表达子1(*NPR1*)被证明是水杨酸(SA)的受体,水杨酸是一种众所周知的防御激素[5],并且是大多数 R 基因介导的抗性机制所必需的[6]。因此,缺乏*NPR1*会导致不同植物物种对病原体的易感性[7]。拟南芥中的许多防御信号成分在作物植物中也起着重要的作用,这强调了详细描述拟南芥抗性信号通路的重要性[8]。遗憾的是,随着这些防御成分数量的增加,由于缺乏价格合

理的植物抗性分析的物候学工具,描述所有必要的遗传学背景变得越来越难。

越来越多的遗传学资源,包括自然和人工变异,为识别重要的农业性状提供了宝贵的机会[9]。尽管由于测序技术的进步,大规模基因分型现在成为了常规应用,但高通量基因分型检测还不是常规应用,因为没有固定的程序和方法,并且很少有价格合理的物候学工具[10]。在高通量设置中,植物中的抗性检测更具挑战性,因为抗性性状大多是通过劳动密集型步骤定量感染病原体和害虫来评估。为了克服这些障碍,我们设计了一株携带发光报告基因的丁香假单胞菌(*P.syringae*),并将其用于感染叶片的无创成像,以定量植物的抗性[11]。该报告菌株对100多个拟南芥生态型进行评估,从而鉴定出两个与拟南芥基本细菌抗性变异相关的数量性状位点[11]。

自动化是高通量表型的一个关键要素,通常由自动化工作台完成。Phenoscope和PHENOPSIS[12,13]是两个被用于大规模表型的商业自动化工作台。然而,由于成本较高,这种类型的自动化工具无法被用于传统实验室,从而使大规模研究面临重大挑战。为了克服这一障碍,我们建立了与摄像机同步的、价格合理的自动化工作台,用于大规模基于图像的电阻分析,这表明自动化在植物物候学领域中的优势。

2. 研究方法

2.1. 自动化工作台的部件

自动化工作台是使用表1和表2中列出的部件组装的。在研究成果部分描述了一个逐步组装的过程。

2.2. 电子倍增电荷耦合设备相机同步自动化工作台的编程代码

附录A中的Supplementary data提供了一种用C++编写的编程代码，用于将自动化工作台与电子倍增电荷耦合设备（EMCCD）相机同步。

2.3. 植物生长、细菌感染和细菌生长定量

拟南芥植物在22 °C 以及相对湿度60%的土壤中生长，光照时间为16 h。通过使用无针注射器在指示接种物（在10 mmol·L⁻¹ MgCl₂中）上注射丁香假单胞菌，4周龄的植物被浸润，所述接种物在28 °C 下在具有适当抗生素的金氏B培养基中生长2 d。在给定的时间点采集接种的叶片，然后用于细菌效价测定，如前文所述[14]。

2.4. In planta NanoLuc 报告分析

使用由HCImageLive软件（Hamamatsu, Japan）运行的EMCCD相机（C9100-23B, Hamamatsu, Japan）捕获受感染植物的化学发光。外部边缘触发模式功能被用于同步自动化工作台。在成像之前，植物被放置在黑暗中30 min，以减少背景发光。用NanoGlo试剂（Promega, USA）对感染的叶片进行喷涂，并拍摄图像；将相机设置为4倍binning，灵敏度增益为297，光子成像模式（PIM）在1处激活，曝光时间为1 min。

3. 自动化工作台的组装和运行示例

我们的自动化工作台是为了移动传统的拟南芥平面，也被称为1020温室托盘，它能容纳18盆拟南芥植

物。我们将自动化工作台的组装分为两个部分：① 机械部分；② 电子部分。

3.1. 自动化工作台的组装——机械部分

为了支撑和移动18盆植物的重量，高刚度和高推力是自动化工作台的必要方面。为了持续地捕捉图像，精度也至关重要。为了达到这些要求，一个预先设计好的套件——V-Slot[®] NEMA 23线性执行器束（丝杠），其SKU编号为1170批和UPC编号为819368022902——被用于提供沿x轴的自动化工作台的平移。如图1(a)所示，该套件有一个步进电机、一个丝杠、螺母、垫片、轴承和一个V-Slot[®]龙门板。运动由丝杠驱动，其动作由步进电机控制。

表1 用于制造x轴组件的机械部件

Part name	UPC	Quantity
Nylon insert hex locknut-M5	819368021110	3
Aluminum spacer (6 mm)	819368021349	2
Aluminum spacer (40 mm)	819368021325	3
Low profile screws M5 (40 mm)	819368022063	4
1/4" × 8 mm flexible coupling	819368020915	1
Aluminum spacer (3 mm)	819368021349	4
Eccentric spacer (6 mm)	819368021011	2
Xtreme solid V wheel kit	819368020809	4
Spacer block	819368021691	2
V-Slot [®] gantry plate universal	81936802530	1
Self-tapping screw	819368021134	4
Low-profile screws M5 (55 mm)	819368021820	3
Ball bearing 688Z 8 mm × 16 mm × 5 mm	819368021028	2
Shim-12 mm × 8 mm × 1 mm	819368020700	2
Lock collar (8 mm)	819368020991	2
Threaded rod plate NEMA 23 stepper motor	819368021769	2
Low-profile screws M5 (15 mm)	819368021820	6
Anti-backlash nut block for 8 mm metric acme lead screw	819368021806	1
NEMA 23 stepper motor	819368021271	1
V-Slot [®] 20 × 60 linear rail (1000 mm)	819368020434	1
8 mm metric acme lead screw (290 mm)	819368020342	1

表2 用于控制自动化工作台的电子部件

Part type	Part brand and model	Quantity
Power supply	Eagwell 24 V 15 A DC universal regulated switching power supply	1
Stepper motor driver	SainSmart CNC router single 1 axis 3.5 A TB6560 stepper stepping motor driver board	2
Arduino controller	Arduino mega 2560 REV3	1
LCD control	SunFounder IIC I2C TWI 1602 serial LCD module display for Arduino uno R3 mega 2560 16 × 2	1

CNC: computer numerical control; DC: direct current; LCD: liquid crystal display.

平面上的每个植物都位于相机的正下方，以捕捉其图像。这种定位需要工作台沿 x 方向和 y 方向平移运动。先前描述的线性执行器束的副本被反向放置在 x 轴的顶部。用每个轴的V-Slot[®]龙门板组装 x 轴和 y 轴，如图1(b)所示。不能将拟南芥托盘直接放置在图1(b)中所示的设计组件上，因为它本身的重量会导致相机和植物之间的偏移。因此，如图1(c)所示，两个V-Slot[®]线性轨道被安装在组件的顶部，从而保持拟南芥托盘在运动过程中的稳定和平衡。

图1(d)展示了支撑18个拟南芥盆栽的自动化工作台的三维实体模型。尽管土壤和水的重量相当大(见附录A中的Supplementary video)，这个工作台仍能够顺利地驱动植物。使用一个通用的照相台来固定相机，其高度可以手动调整[图1(e)]。自动化工作台被放置在相机下面。

3.2. 自动化工作台的组装——电子部分

采用两台NEMA 23步进电机驱动自动化工作台的 x 轴和 y 轴。一种微控制器——SainSmart计算机数控(CNC)路由器单轴3.5 A TB6560步进电机驱动板——被用于向电机提供电脉冲，且脉冲利用直流(DC)电源进行放大。液晶显示器(LCD)被用于指示植物在平

面上的实时位置。所有组件都是电气连接的，如图2所示。Arduino控制器存储操作的整个逻辑过程，用于图像捕获，并相应地向步进电机提供必要的电脉冲序列。它还在必要的时候触发相机并控制LCD显示工作台的位置。

3.3. 由自动化工作台推进的基于图像的抗药性分析

我们最近开发了一种丁香假单胞菌菌株(手稿正在准备中)，其携带一种最亮的发光标记NanoLuc萤光素酶[15]，用于植物中基于图像的抗性检测。为了测试自动化工作台是否能促进这种基于图像的检测，我们用发光的丁香假单胞菌对拟南芥植株进行感染，并在它们被自动化工作台调动时对它们进行成像。一台EMCCD相机连续9次不间断地对这些受感染的植物进行成像。值得注意的是，对已经感染发光的丁香假单胞菌1 d、2 d和3 d的拟南芥植株进行成像(图3)。图3(b)中展示了每个不同时间的具有代表性的图片。为了确保这种基于图像的抗性分析与常规方法一样定量，我们绘制了两种方法的值，如图3(b)所示，这些值显示出很强的线性相关性。这些结果表明，由自动化工作台辅助的基于图像的分析可以以最小的手动输入产生高度定量的数据。

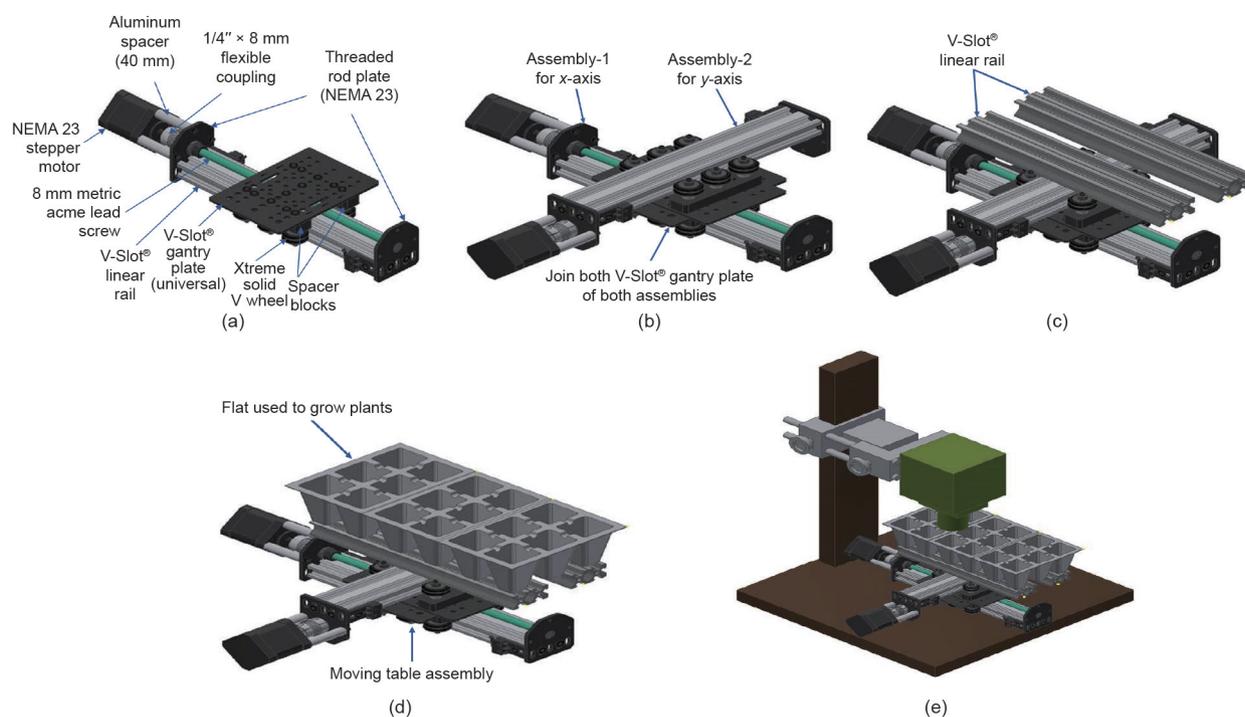


图1. 带有相机及其支架的自动化工作台组件。放置由两个电机控制的钢轨来控制二维运动。组装第一根钢轨(a)后，第二根钢轨被放置在顶部(b)。安装轨道用于支撑(c)植物生长平面(d)。(e) 组装好的工作台被放置在EMCCD相机下。

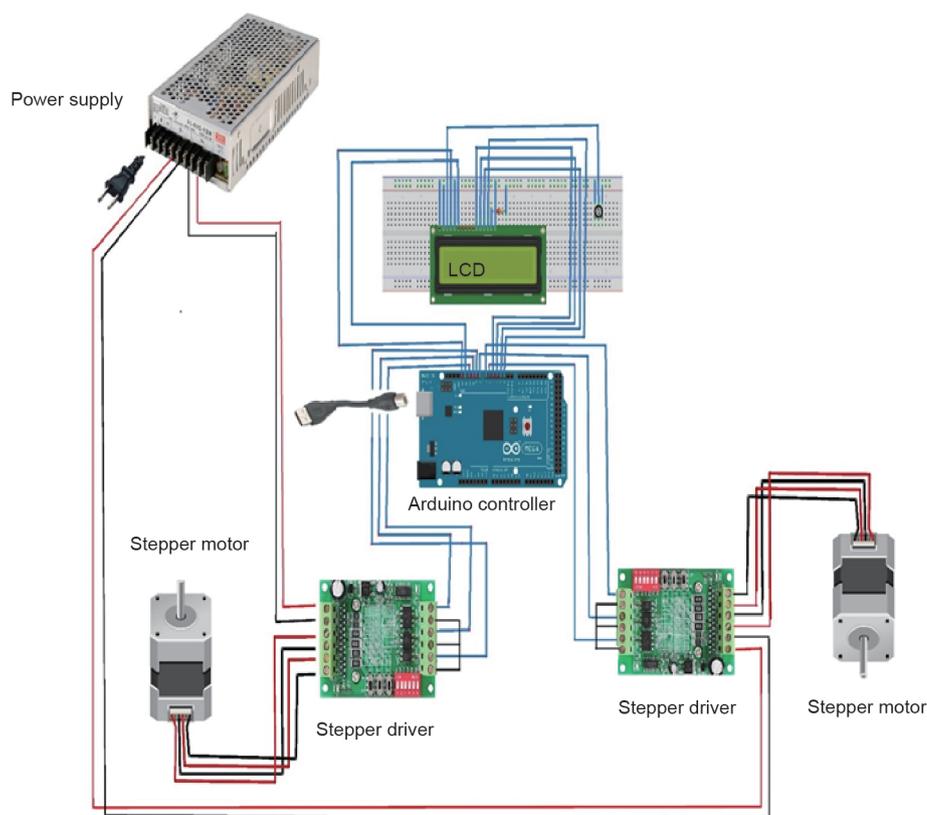


图2. 移动组件所涉及各个电子元件的物理连接。

4. 结论和观点

我们开发了一个可定制的自动化工作台，能够促进高通量的耐药性分析。该工作台有两个电机控制的T型槽金属棒。运动与EMCCD相机同步，允许不间断地对植物进行成像。结合最近开发的发光丁香假单胞菌菌株，这种自动化工具能够在不到10 min内对30多个受感染的拟南芥植株进行抗性分析。如果手动进行，同样的抗性分析通常需要几个小时，因为它涉及几个劳动密集型步骤。

我们基于图像的植物电阻分析使用了一个EMCCD相机，它能在昏暗的亮度下捕捉图像。当与自动化工作台结合时，这种高通量友好的方法是目前为止能在最短时间（不到几分钟，而不是几小时）内进行植物抗性分析的一种方法。除了增强高通量，这种较高的速度还为配备高灵敏度成像传感器的EMCCD相机提供了额外的优势，即用于放大非常微弱的光信号。在被称为增益老化的过程中，EMCCD相机的灵敏度随着时间的推移而降低，从而导致传感器灵敏度差[16]。严重的增益老化会使EMCCD相机无法被用于基于图像的电势测试，且根据我们的经验，修复这个老化问题是非常昂

贵的。使用自动化工作台进行无中断成像，除了减少由于偶尔的用户错误而造成的不必要曝光之外，还提供了最短的运行时间，因而有助于保持相机更长时间的高灵敏度。

植物免疫信号已得到深入研究，从而确定了许多明确的信号通路[17]。随着越来越多的免疫成分被表征，分析更大一组植物的需求在持续生长。然而，传统的耐药检测依赖于对病原体的手动计数，通常不利于高通量的实验设置。因此，个别研究的重点是少数遗传背景下抗性的变化。出于同样的原因，在基因同质系内的抗性性状分布很少被测量。越来越明显的是，真核生物基因组是高度动态的，尤其是在压力下[18,19]。这种动态性的促成因素之一是转座因子活性的增加，其可以改变基因组[20]。因此，我们设想，一旦大规模的抗性研究成为植物病理学领域的规范，免疫信号因子之间的相互作用，甚至在同源遗传背景下的抗性变异都会被发现。

本研究提出的自动化工作台容纳了一个传统的拟南芥托盘。该工作台可以被很容易地通过替换具有足够容量的棒和电机来扩展。当涉及大规模植物成像时，大多数实验室对自动化的选择是有限的。虽然先进的自动化

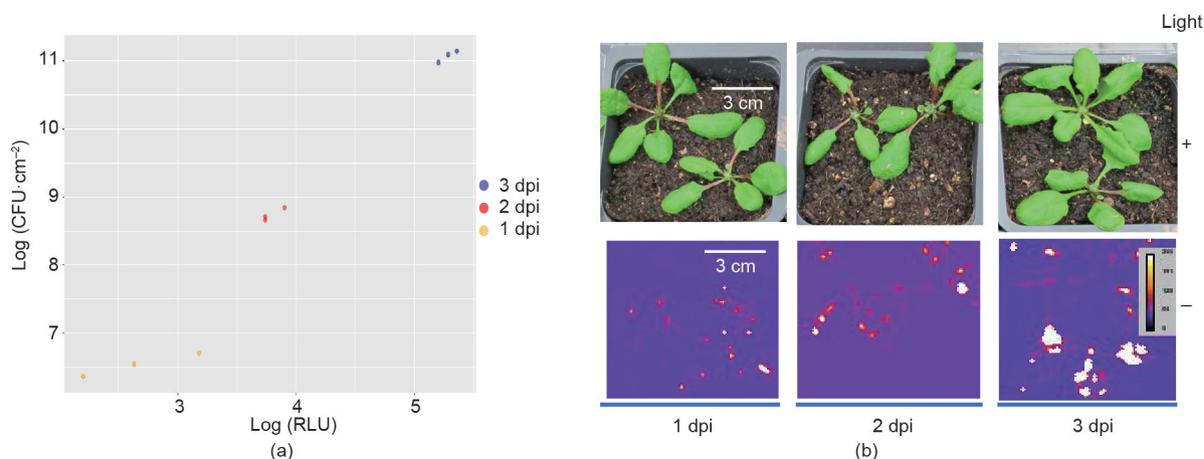


图3. 基于图像的电阻分析与自动化工作台相结合, 产生了与传统分析相媲美的定量数据。(a) 基于图像 (x 轴) 检测和传统 (y 轴) 检测之间的相关性。对3.5周龄的拟南芥植株进行注射器渗透, 渗透 10^5 CFU·mL⁻¹发光的丁香假单胞菌。在指定的感染后的一天 (dpi), 用NanoGlo底物对被感染的植物进行喷射, 并使用EMCCD相机成像, 如 x 轴所示。同样被感染的叶片接受常规的叶片研磨试验, 并测量其细菌滴度, 如 y 轴所示。(b) 有光和无光的代表性图片。受感染植物的发光是在没有光的情况下拍摄的, 并以伪彩色显示, 以便于更好地分化。CFU: 菌落形成单位; RLU: 相对光单位。

工具在提高表型能力方面有很大潜力, 但低成本和 (或) 自制 (DIY) 表型的解决方案, 如本研究提出的自动化工作台将减少进入壁垒[21], 并将进一步推广高通量方法。因此, 我们希望价格合理的自动化工作台将鼓励更多的实验室致力于大规模的抗性检测, 以便更好地描述日益复杂的植物防御信号。

Acknowledgments

We thank Angela Kang for critical comments on this manuscript and John Word for feedback/help on designing the automation table. This work is supported by the National Science Foundation (IOS-1553613 to Hong-Gu Kong).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.09.009>.

References

- [1] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 2010;327(5967):818–22. doi:10.1126/science.1183700. PMID:20150489
- [2] Soko T, Bender CM, Prins R, Pretorius ZA. Yield loss associated with different levels of stem rust resistance in bread wheat. *Plant Dis* 2018;102(12):2531–8. PMID:30332332.
- [3] Bent AF, Mackey D. Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 2007;45:399–436. PMID:17506648.
- [4] Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:23–61. PMID:14502984.
- [5] Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, et al. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep* 2012;1(6):639–47. PMID:22813739.
- [6] Withers J, Dong X. Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathog* 2016;12(8):e1005707.doi:10.1371/journal.ppat.1005707. PMID:27513560
- [7] Fu ZQ, Dong X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 2013;64:839–63. PMID:23373699.
- [8] Piquerez SJ, Harvey SE, Beynon JL, Ntoukakis V. Improving crop disease resistance: lessons from research on *Arabidopsis* and tomato. *Front Plant Sci* 2014;5:671.doi:10.3389/fpls.2014.00671. PMID:25520730
- [9] Unamba CI, Nag A, Sharma RK. Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Front Plant Sci* 2015;6:1074. PMID:26734016.
- [10] Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nat Rev Genet* 2010;11(12):855–66. PMID:21085204.
- [11] Fan J, Crooks C, Lamb C. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photorhabdus luminescens luxCDABE*. *Plant J* 2008;53(2):393–9. PMID:17971037.
- [12] Tisné S, Serrand Y, Bach L, Gilbault E, Ben Ameer R, Balasse H, et al. Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant J* 2013;74(3):534–44. PMID:23452317.
- [13] Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, et al. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* 2006;169(3):623–35. PMID:16411964.
- [14] Kang HG, Kuhl JC, Kachroo P, Klessig DF. CRT1, an *Arabidopsis* ATPase that interacts with diverse resistance proteins and modulates disease resistance to turnip crinkle virus. *Cell Host Microbe* 2008;3(1):48–57. PMID:18191794.
- [15] Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* 2012;7(11):1848–57. PMID:22894855.
- [16] Dunford A, Stefanov K, Holland A. Ageing and proton irradiation damage of a low voltage EMCCD in a CMOS process. *J Instrum* 2018;13:c02059.
- [17] Ramirez-Prado JS, Abulfaraj AA, Rayapuram N, Benhamed M, Hirt H. Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends Plant Sci* 2018;23(9):833–44. PMID:29970339.
- [18] Bordiya Y, Zheng Y, Nam JC, Bonnard AC, Choi HW, Lee BK, et al. Pathogen infection and MORC proteins affect chromatin accessibility of transposable elements and expression of their proximal genes in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2016;29(9):674–87. PMID:27482822.
- [19] Lapp HE, Hunter RG. The dynamic genome: transposons and environmental adaptation in the nervous system. *Epigenomics* 2016;8(2):237–49. PMID:26791965.
- [20] Huang CR, Burns KH, Boeke JD. Active transposition in genomes. *Annu Rev Genet* 2012;46:651–75. PMID:23145912.
- [21] Roitsch T, Cabrera-Bosquet L, Fournier A, Ghamkhar K, Jiménez-Berni J, Pinto F, et al. Review: new sensors and data-driven approaches—a path to next generation phenomics. *Plant Sci* 2019;282:2–10. PMID:31003608.