



Micro-CT 技术及其在植物学研究中的应用

苏 益, 周梓杰, 马立英

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要: 微 CT 技术已成为医学和生物等领域重要的研究手段,但在植物和农林科学领域的应用才刚刚起步。为了让植物和农林领域研究人员能更充分、灵活地运用微 CT 技术,提高仪器应用效果,拓展仪器使用需求,该文介绍了微 CT 技术基本原理、样品制备和分析流程。最后以稻谷为例,应用 Mimics 软件分析断层图,并开展三维重组和结构分析。该文可为科研工作者利用微 CT 技术分析植物样本提供参考,以便更好地服务于教学和科研工作。

关键词: 微 CT; 植物; 断层图; 结构分析; 三维重组

中图分类号: Q31

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20210096](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20210096)

Micro-CT and Its Application in Plant Research

SU Yi, ZHOU Zijie, MA Liying

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Micro computed tomography (micro-CT) has become a crucial research tool in the medical and biological fields, but it is just starting to be applied in the area of plant, agriculture and forestry science. In order to enable micro-CT method more fully and flexibly application in the area of plant, agriculture and forestry science, as well as improve the application performance and develop the potential demands of the instrument, this article introduces the fundamental principle, sample preparation and analysis procedures during micro-CT application. Finally, by using the rice grain as an example, cross-section image analysis, 3D reconstruction and structure analysis of rice grain were carried out in Mimics software. This paper can provide a reference for researchers to analyze plant samples by using micro-CT technology, so as to better serve the teaching and scientific research work.

Key words: micro computed tomography; plant; cross-section image; structure analysis; 3D reconstruction

X 射线由德国物理学家伦琴 (Wilhelm C. Roentgen) 首次发现,是一种波长短、频率高的电磁波,对生物和非生物均具有很高的穿透性。当 X 射线透过生物/非生物样本时,由于样本中不同部位物质组成、密度和厚度等方面存在差异,其透过率亦不同,利用 X 射线检查设备和成像技术可实现这些差异的可视化。根据这一原理,英国工程师 Godfrey N.Hounsfield 成功发明了第一台 CT(computed tomography)设备应用于固体物扫描,通过三维重建获得较好的分辨率^[1]。随后 CT 技术不断发展并逐步应用于医药学、材料学、工业及考古等多个领域^[2],并在疾病诊断、医学研究方面大放异彩。

初期的 CT 技术采用平移式笔形线束计算机断

层扫描,速度慢效率低、分辨率亦不高,改进后的螺旋扫描 CT(helical scanning CT)、定量 CT(quantitative CT, QCT)、64 排容积 CT(CT-Brilliance, CT 64)等在空间分辨率(spatial resolution)、时间分辨率(temporal resolution)和密度分辨率(density resolution)方面有了巨大提升,极大地推动了临床诊断和医学研究的发展。目前,临床 CT 的分辨率一般为毫米级,为解决科学研究中小动物/样本对象需要更高精准度成像的问题,空间分辨率为微米级的微 CT(micro-CT, μ CT)应运而生^[3-4]。区别于临床 CT 的是 micro-CT 的 X 射线发射管为微焦点 X 射线管,可在 1~100 μ m 分辨率水平实现小/微体积样本的成像。微米级分辨率的 micro-CT 具有良好的“显微”作用,可应用于显示小样本中精

收稿日期: 2021-02-27; 修回日期: 2021-04-17

基金项目: 湖南省学位与研究生教育改革研究项目(2019JGYB127)。

作者简介: 苏益(1979-),男,博士,高级实验师,主要从事植物学研究方法方面的研究。E-mail: yisu@hunau.edu.cn

细结构差异^[5-6]。在医学、生物、地质等领域, micro-CT 结合三维重组技术可获取测试样本的清晰精确的三维解剖结构图像^[7-10]。micro-CT 是公认的研究骨骼显微结构、空间容量和结构变化的首选方案。micro-CT 是一种无损的 3D 成像技术, 能够在不破坏供试样本内部结构的情况下采集到高清三维图像信息, 可更加准确地了解和研究对象的内部形态结构。此外, micro-CT 电压低、功耗小、X 射线辐照强度较低, 亦适用于活体生物样本的测试分析。

近年来, 随着前沿生物技术的发展及大型精密仪器的引入, 植物和农林科学领域取得了许多突破性重大成果。micro-CT 技术兼具 X 射线成像技术和显微成像技术的优势, 在植物科学和农林研究领域显示了巨大的应用潜力, 有望为植物/作物表型组研究提供重要技术支撑。然而, 遗憾的是 micro-CT 技术还很少应用于植物和农林科学领域的相关研究。本文介绍了 micro-CT 技术基本原理和植物样品分析的流程(包括样品准备、参数设置、3D 重组和结构分析软件使用), 并以稻谷为例开展了实际样品测试和结构分析。旨在为植物科学和农林科学研究人员提供样本测试参考, 并为相关科研与教学提供强有力的技术支持。

1 micro-CT 技术

1.1 X 射线透射原理

X 射线波长很短, 介于紫外线和伽马射线之间, 能穿透普通光线所不能穿过的致密物体, 是一种依赖于物质电子空间分布并与物质发生相互作用的电磁辐射。X 射线与物质可以发生多种复杂的相互作用, 从而引起不同的衰减, 主要作用包括康普顿效应、光电效应、电子对效应和瑞利散射。当 X 射线照射物体时, 一部分被物体吸收转化, 一部分被散射而发生偏离, 引起入射方向上 X 射线强度的衰减。X 射线穿过物体后的衰减遵循指数衰减规律, 即 $I = I_0 e^{-\mu d}$ 。其中, I_0 初始 X 射线强度; I 为透过物体的 X 射线强度; d 为物体的厚度; μ 为线性吸收系数或衰减系数, 由 X 射线的波长、物体的原子序数和电子密度等决定。通常情况下, X 射线透过物体后, 检测器所接收信号的强度与物体截面内物质密度呈负相关。高密度物质对 X 线的衰减较大, 检测器接收的射线强度弱, 获取图像灰度值较大; 反之, 图

像灰度较小, 因此 X 射线可广泛应用于物体内部结构信息的检测。

1.2 micro-CT 成像原理

CT 成像是基于 X 射线透射原理开发的分析物体结构的仪器设备。CT 扫描算法实际解决的是物体对 X 射线的衰减系数, CT 成像过程需要确定每个单元与物体密度相关的衰减系数。X 射线从不同方向照射物体, 采集一系列的数据来构建方程组, 解出不同部位的衰减系数。通常情况下待测物体内部结构并不均匀, 通过某一直线路径 L 的衰减后 X 射线强度可表示为: $\int_L \mu(\vec{ad}) = \ln(I_0/I)$ 。其中, $\mu(\vec{ad})$ 是物体内空间点 $\vec{ad}$ 的线性衰减系数, 即射线投影。micro-CT 成像就是基于不同角度的投影来推导出被积函数 μ , 从而获得投影图像。

micro-CT 采用微焦点 X 射线球管和锥束成像系统, 放射剂量低、数据采集速度快, 可在微米级别下实现样本的自动、无损、准确的分析。micro-CT 成像系统主要包括电源控制系统、X 射线源、电控样品旋转台、检测探测器和计算机软件系统等。当进行样本检测时, 通过计算机软件设置电压、电流和扫描范围等参数, 扫描完成后对检测器采集的数据进行处理。

2 micro-CT 技术应用于植物的基本流程

基于 X 射线的透射原理, 设计 micro-CT 的初衷是在不破坏样本的情况下揭示隐藏在样本内部的结构信息。对植物而言, micro-CT 可用于分析植物的组织器官(根、茎、叶、花、果实/种子等)的形状和结构, 且可以检测正在生长的植物材料, 用于监控比较不同植物、不同植物生长阶段/状况下的组织器官形状/结构特性。应用 micro-CT 系统分析植物样本, 一般包括样本准备、micro-CT 仪器参数设置、植物样本扫描、样本断层图获取及样本的三维重组及其结构分析等流程(如图 1 所示)。其中, 仪器的扫描分辨率设置是决定重组样本质量的关键, 重组分析软件的使用是获取样本结构信息的重点。

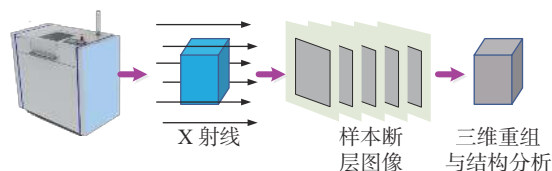


图 1 micro-CT 检测样本的一般流程

2.1 植物样品准备

植物组织器官包括根、茎、叶、花、果实/种子。各组织器官的形态、大小、硬度/密度差异巨大, 因此, 在样品准备时必须考虑样本的这些特性。通常情况下, micro-CT 系统可检测样本的最大尺寸在 10 cm 左右, 如果植物样本尺寸过大, 则需要对样本进行分割并分开扫描。对于高木质化的根茎、较厚硬的叶片和成熟种子, 可以直接装入 micro-CT 样品室进行扫描。相反, 植物的幼嫩组织纤维素和木质素含量低、含水量高, 将离体材料直接放入 micro-CT 样品室进行扫描会产生失水萎蔫, 样本扫描和结构分析的准确度显著降低。因此, 为了解决失水萎蔫的问题, 针对离体植物幼嫩组织需要建立对应的固定和包埋技术, 且要求包埋剂与样品的 X 射线吸收系数具有显著差异, 以便于后期图像处理时分割包埋剂和样品区域。对于小型植物或植物幼苗, 还可以利用 micro-CT 直接进行活体扫描和分析。

2.2 植物样品扫描

植物样品载入样品台, 在电脑软件中设置 micro-CT 电压、电流和扫描分辨率等参数后开始运行 micro-CT 扫描程序。其中, 电流和电压决定了 X 射线的强度, 根据植物材料的硬度、大小酌情调整电流和电压。通常情况下, 电压在 30~80 kV、电流在 100~150 μ A 条件下进行植物样本的 micro-CT 扫描, 且在这一范围内 X 射线的强度不会对植物造成损伤, 测试后的植物能正常生长、种子能正常发芽。micro-CT 分辨率指的是样品中两个检测点间的最短距离(单位: μ m), 数字越小分辨率越高。micro-CT 分辨率决定断层图和 3D 重组图的精细度, 但是由于焦距的变化, 分辨率越高 micro-CT 单次可检测的最大样品尺寸会越小, 如在 12.5 μ m 分辨率下单次可扫描 50 粒大米(约 2 cm $\times$ 2 cm $\times$ 2 cm), 在 2.5 μ m 分辨率下一次则最多只能扫描 1 粒大米。因此, 在设置分辨率时, 应综合考虑精度和样品大小、数量间的平衡。此外, 分辨率逐步提高, 同一样本所产生的数据会急剧增大, 如 1 粒大米在 5 μ m 分辨率下的图像数据(DICOM 格式, digital imaging and communications in medicine)约为 10 G 左右, 在 2.5 μ m 分辨率下则达到 50 G 以上。扫描图像数据太大对电脑配置要求高, 后期图像重组和数据分析的难度也相应

增大。

2.3 三维重组

micro-CT 系统获得的原始数据格式为 ISQ, ISQ 文件包含头文件和各个角度的投影图像。为了便于后续图像处理, micro-CT 断层图像数据会导出为 DICOM 文件格式。DICOM 是医学图像和相关信息的国际标准(ISO 12052), 其定义了质量能满足临床需要的可用于数据交换的医学图像格式, 包含了样本的原始尺寸等关键信息。此外, micro-CT 系统也可以将图像导出为 BMP、JPEG 和 TIFF 等通用图像格式, 但其缺点是丢失诸如样本尺寸等一些关键信息, 分辨率也有所降低。

样本扫描获得样本断层数据后, micro-CT 系统配套软件可以进行 3D 重组、预览和简单的分析。但在更多的情况下, 为了能更好地服务于医学诊断和科学研究, 需要更加专业的软件对断层图像进行处理并对样本结构信息进行深入解析。其中, MIMICS(materialise's interactive medical image control system)是一款优秀的交互式影像处理软件。MIMICS 图像处理软件由比利时 Materialise 公司开发, 可将二维断层影像与三维工程学相结合, 是分析样本形态结构信息的强大工具。MIMICS 兼容多种图像格式, 不仅支持从 X 射线、CT、核磁共振和超声等设备获取的 DICOM 格式数据, 还可以导入 BMP、JPEG 和 TIFF 等格式的断层/切片图像。断层图导入 MIMICS 后, 在横断、冠状和矢状界面分别显示样本某个位置的三个方向的截面图, 3D 重组后可在三维可视化界面显示样本立体结构, 并可对重组模型进行缩放、平移、旋转、切割和透明等操作。MIMICS 包含了图像处理、区域分割、尺寸测量和立体结构等方面的多种操作工具。利用灰度阈值分割、区域生长、形态学操作、布尔运算、动态区域生长和磁性套索等操作可方便提取感兴趣区域。软件支持灰度值、长度、周长和 3D 模型体积及其密度等方面的精确测量。此外, MIMICS 中生成的三维模型, 亦可以输出适用于 Ansys、CAD、FEA 和 RP 等软件的格式, 为后续扩展的结构力学分析奠定基础。

3 应用实例

为了能更加直观地了解如何利用 micro-CT 分

析植物样本, 本文以稻谷和拟南芥花蕾为材料, 利用瑞士 Scanco μ CT 100 系统扫描样本并应用 MIMICS 19.0 开展样品结构分析。

3.1 稻谷的 micro-CT 扫描

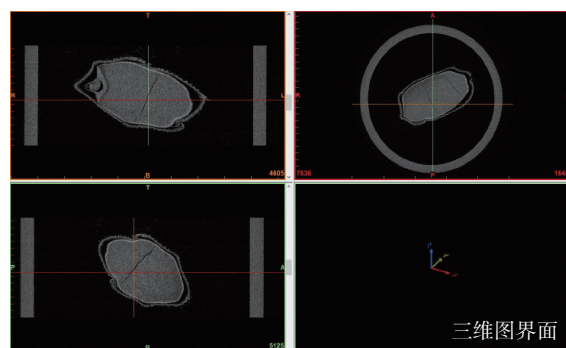
由于成熟稻谷硬度较高, 因此直接将稻谷装入专用试管中并置于样品台。在电脑配套软件系统(瑞士 Scanco μ CT 100)中设置扫描参数, 参数分别为: 电压 55 kV, 电流 150 μ A, 分辨率 5 μ m, 扫描时间 300 ms。程序运行完毕后, μ CT 100 配套软件自动生成 ISQ 文件, 形成密度不等的二维断层图片, 在原始扫描图中可以看到种子的密度变化, 从密度不等的二维图中可以预览种子密度分布并可调节阈值, 重构 3D 图后亦可初步判断扫描效果。尽管从软件系统中可以输出 BMP、JPEG 和 TIFF 等格式的断层图像并可显著减小图像数据大小, 但每张图仅展示了一个维度的样本截面, 从而导致结构信息丢失和分辨率下降, 建议扫描后优先将数据导出为 DICOM 格式的图像数据。本测试中获得 1 粒稻谷的 720 张 DICOM 格式的断层图(每张图包含了三个维度的结构信息), 图像数据总大小为 8.3 G。

3.2 稻谷的二维结构分析

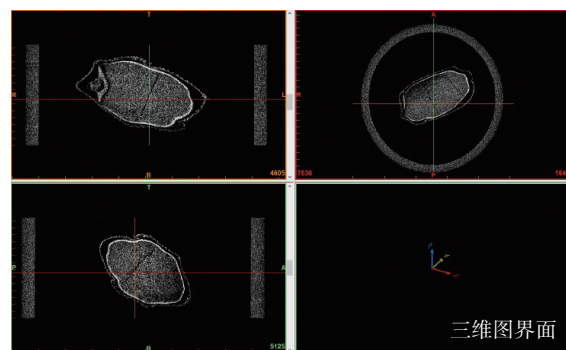
将 DICOM 格式的图像数据导入 MIMICS 软件, 可以显示某一位置三个方向上的断层图和三维重组图, 如图 2(a)所示。二维界面周边为装载容器(试管), 中间部位为稻谷。每个界面右边有滚动条, 拉动滚动条可以显示不同位置的断层图。如果将 micro-CT 系统生成的 BMP、JPEG 和 TIFF 等格式的断层图像导入 MIMICS 软件, 则只会在某一个二维界面有图像数据。由图 2(a)可以清楚分辨出稻谷颖壳、大米及胚等部分, 也可以发现稻米中有两条明显的裂痕, 这样的稻谷去壳后会成为碎米。此外, 通过调节对比度(contract)可进一步分析稻米的结构, 图 2(b)结果表明, 稻米的糊粉层白色像素点更密集, 说明其结构更加致密; 胚和胚乳间有一条明显暗带, 该区域结构非常疏松; 此外, 在胚乳中也发现了显著变暗的区域, 说明该区域的淀粉粒积累存在较多空隙, 即形成了稻米垩白(现实中肉眼观察为稻米中白色不透明部分)。垩白是衡量稻米品质的主要指标之一, 与稻米质量呈负相关, 因此, micro-CT 方法可在稻谷不去皮的情况下直接评判稻米品质。

3.3 稻谷 3D 重组分析

稻谷及稻谷中的各种结构(如颖壳、胚、胚乳、糊粉层和垩白等)均为立体结构, 其中许多内部结构形状亦很不规则, 因此需要对稻谷的结构进行 3D 重组分析。不同结构 3D 重组分析的关键就是结构分割(segment)。如图 3(a)所示, 首先将装样本的试管(稻谷外围的圆环和长方形)与稻米分开, 利用阈值(thresholding)设定区域, 利用区域增长(region growing)可生成一个新的蒙版(mask), 将试管与稻谷分开, 新蒙版中用不同颜色显示稻谷, 点击 Calculate 3D 即可获得稻谷的三维重组图。对三维图进行旋转/翻转、缩放可以详细分析稻谷形状及其表面的毛刺状结构。利用 MIMICS 中的测量工具可以在空间范围内测定两点间的距离和选定区域面积, 此外, 通过 3D 物体属性(3D Properties)可直接读取稻谷的尺寸和体积, 如图 3(b)所示。最后, 依次利用 Thresholding 进行阈值设定, Morphology Operation 中的 Erode 进行像素点削弱, Region Growing 选定垩白区域, Morphology Operation 中的 Dilate 进行像素点扩展, 点击 Calculate 3D 即可获得垩白的 3D 图像, 如图 3(c)所示, 同样通过 3D Properties 亦可直接显示垩白结构的定量数据, 如图 3(d)所示。

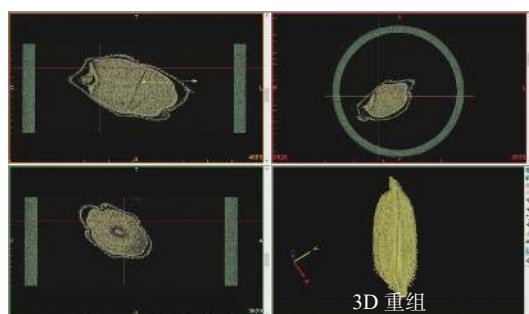


(a) DICOM 格式的图像导入 MIMICS

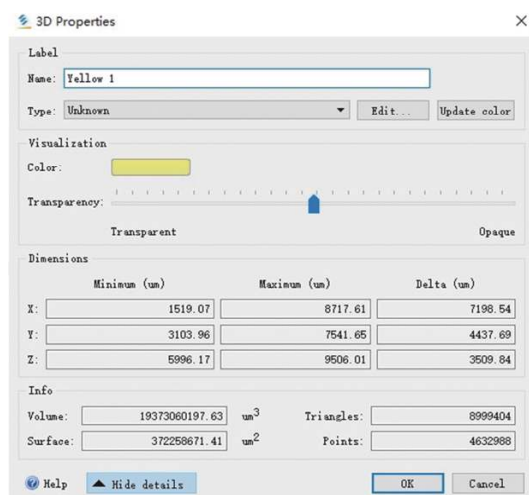


(b) 调整对比度后的稻谷断层图

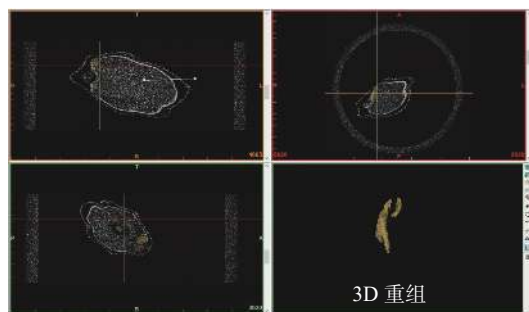
图 2 MIMICS 中显示的稻谷断层图



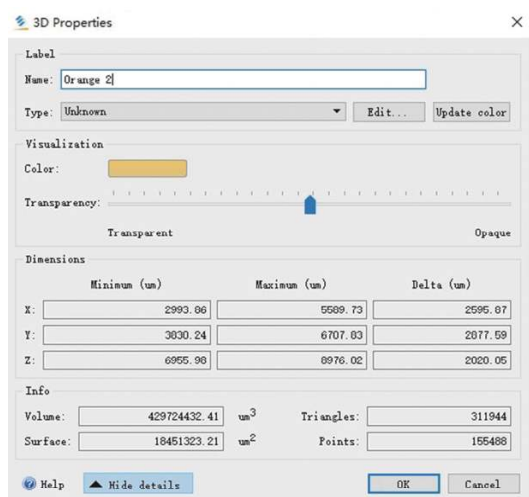
(a) 稻谷分割与 3D 重组



(b) 稻谷的 3D 参数



(c) 稻米垩白的分割与 3D 重组



(d) 稻米垩白的 3D 参数

图3 稻谷及稻米垩白的 3D 重组分析

3.4 拟南芥花蕾的扫描和重组分析

以拟南芥花蕾为幼嫩组织的代表进行的 micro-CT 扫描并开展了 3D 重组分析。如图 4 所示, 可以分辨花蕾内部的基本轮廓和结构, 获得了高分辨率的 3D 重组图像。鉴于拟南芥花较小, 且幼嫩组织含水量高、各部分的密度相近, 花蕾中的细微机构分割相对困难, 需要耗时的逐层分割。建议在扫描较小的幼嫩组织材料时用 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下的分辨率进行扫描, 且在应用时需密切结合具体的植物表型和科学问题进行合理的结构分割和 3D 重组。



(a) 花蕾断层图



(b) 花蕾的 3D 重组图

图4 拟南芥花蕾的扫描和重组

4 结束语

micro-CT 是一种微米级别的、无损的 3D 成像技术, 能够在不破坏供试样本内部结构的情况下实现研究对象的内部形态结构的可视化。目前, micro-CT 技术已比较成熟, 已经广泛应用于医学诊断及动物学研究, 并在工程及农林领域显示了巨大应用潜力。micro-CT 系统电压低、功耗小、X 射线辐射低, 亦适用于活体生物样本的测试分析。从可视范围考虑, 传统解剖切片一般在细胞层次观察植物组织, 可视的范围较小, 而 micro-CT 成像范围介于肉眼和传统解剖切片之间, 能可视化肉眼和组织切片均无法辨别的植物微观结构。此外, 组织切片技术具有破坏性, 操作后的样本失去了生物活性, 而 micro-CT 则可以进行活体扫描, 因此, micro-CT 技术在植物突变体筛选方面具有巨大的应用潜力。最近, 植物学家逐步认识到 micro-CT 技术的重要性, 并开展了一些有益探索, 如用于初步展示植物组织器官结构^[9,11-16]。本文通过对 micro-CT 技术原理、植物样品制备、样品扫描、三维重组等方面的介绍, 促进植物领域科研人员对 micro-CT 技术的了解。同

时,为了给植物科学和农林科学研究人员提供样本测试参考,本文以稻谷为例开展了实际样品测试和结构分析。利用 micro-CT 技术并结合 MIMICS 软件,可以在二维和三维层面展示稻谷及其颖壳、胚、胚乳、糊粉层和垩白等精细结构。DICOM 格式图像包含三个方向的结构信息并保留了样本原始尺寸信息,因此本测试中显示的是稻谷及其内部结构的准确大小,如果采用 BMP、JPEG 和 TIFF 等格式的断层图,获得的大小则为相对值。此外,尽管通过 micro-CT 配套软件可以获得 BMP、JPEG 和 TIFF 等格式的断层图像,且其图像数据显著减小,但每张图仅展示了一个维度的样本截面,从而导致结构信息丢失和分辨率下降,建议扫描后优先将数据导出为 DICOM 格式的图像数据。总之, micro-CT 技术是一个高效强大的样本结构可视化技术,可以为植物学和农林科学研究提供强有力的技术支撑。

参考文献

- [1] HOUNSFIELD G N. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part I. Description of system[J]. *The British Journal of Radiology*, 1973, 46(552): 1016–1022.
- [2] PASTOUREAU P, CHOMEL A. Methods for cartilage and subchondral bone histomorphometry[J]. *Methods in Molecular Medicine*, 2004, 101: 165–188.
- [3] FIGUEROA D, FIGUEROA F, CALVO R. Patellar tendinopathy: Diagnosis and treatment[J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2016, 24(12): e184–e192.
- [4] JONSSON P, ALFREDSON H. Superior results with eccentric compared to concentric quadriceps training in patients with jumper's knee: a prospective randomised study[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2005, 39(11): 847–50.
- [5] MADUKA S O, OSIM E E, NNELI R O, et al. Effect of occupational exposure to local powdered tobacco (snuff) on pulmonary function in south eastern Nigerians[J]. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 2009, 24(2): 195–202.
- [6] SRAVYA T, RAO G, KUMARI M, et al. Evaluation of biosafe alternatives as xylene substitutes in hematoxylin and eosin staining procedure: a comparative pilot study[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2018, 22(1): 148–149.
- [7] 李志鹏, 刘远翔, 黄若萱, 等. 氟化猪骨羟基磷灰石修复犬植体周骨缺损的显微CT与组织形态学评价[J]. *中华口腔医学杂志*, 2020, 55(11): 908–914.
- [8] STAROSOLSKI Z, VILLAMIZAR C A, RENDON D, et al. Ultra high-resolution in vivo computed tomography imaging of mouse cerebrovasculature using a long circulating blood pool contrast agent[J]. *Scientific Reports*, 2015(5): 10178.
- [9] SU Y, XIAO L T. 3D visualization and volume based quantification of rice chalkiness in vivo by using high resolution micro-CT[J]. *Rice*, 2020, 13(69): 1–12.
- [10] 柳昭星, 董书宁, 南生辉, 等. 邯邢矿区中奥灰顶部空隙特征显微CT分析[J]. *采矿与安全工程学报*, 2021, 38(2): 1–11.
- [11] STAEDLER Y M, KREISBERGER T, MANAFZADEH S, et al. Novel computed tomography-based tools reliably quantify plant reproductive investment[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(3): 525–535.
- [12] KNIPFER T, FEI J, GAMBETTA G A, et al. Water transport properties of the grape pedicel during fruit development: insights into xylem anatomy and function using microtomography[J]. *Plant Physiology*, 2015, 168(4): 1590–1602.
- [13] CUNEO I, KNIPFER T, BRODERSEN C, et al. Mechanical failure of fine root cortical cells initiates plant hydraulic decline during drought[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(3): 1669–1678.
- [14] DHONDT S, VANHAEREN H, VAN LOO D, et al. Plant structure visualization by high-resolution X-ray computed tomography[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(8): 419–422.
- [15] HU W, ZHANG C, JIANG Y, et al. Nondestructive 3D image analysis pipeline to extract rice grain traits using X-ray computed tomography[J]. *Plant Phenomics*, 2020(3): 1–12.
- [16] WU D, GUO Z, YE J, et al. Combining high-throughput micro-CT-RGB phenotyping and genome-wide association study to dissect the genetic architecture of tiller growth in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(2): 545–561.

编辑 张俊