

FTIR 结合主成分分析鉴别残留包衣剂的玉米幼苗

李栋玉¹, 时有明^{1*}, 刘刚²

1. 曲靖师范学院物理与电子工程学院, 云南 曲靖 655011

2. 云南师范大学物理与电子信息学院, 云南 昆明 650500

摘要 为了鉴别残留包衣剂农药的玉米幼苗, 使用傅里叶变换红外光谱结合主成分分析研究了玉米幼苗的根和叶片。包衣剂包裹的玉米种子和未经过包衣剂包裹的玉米种子在相同条件下种植, 并测试它们幼苗根和叶片的红外光谱, 进行平行对照试验。同时测试纤维素和包衣剂的红外光谱用于参考。包衣剂包裹种子的幼苗根和叶片的红外光谱在 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现 C—H 的弯曲振动吸收峰, 而未经过包衣剂包裹种子的幼苗根和叶片的红外光谱中 C—H 的弯曲振动特征吸收峰出现在 $1\ 375\ \text{cm}^{-1}$ 附近。参考纤维素和包衣剂的红外光谱, 可以确定 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰源自包衣剂残留的吸收。在根的红外光谱中, $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 的包衣剂农药残留吸收峰尤为明显, 与 $1\ 375\ \text{cm}^{-1}$ 的峰形对比, 较为尖锐。随着玉米植株的生长, 根中 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 的特征峰相对强度有减弱的趋势, 这是由于包衣剂农药残留被不断输送到植株的地上器官, 导致根中的农药残留浓度降低。在经过包衣剂包裹种子的幼苗叶片的红外光谱中, 除了 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 的农药残留特征峰外, 酰胺 II 带的吸收峰呈现明显的肩峰, 而这一肩峰在种子没有被包衣剂包裹的幼苗叶片中未被观察到。光谱分析显示一些农药残留的特征吸收峰被较强的纤维素吸收峰所掩盖, 而纤维素的一系列特征吸收峰又造成了光谱信息的重叠和数据冗余, 因此主成分分析被用于挖掘光谱中的特征信息。在根的主成分 1 和主成分 2 得分图中, 含农药残留的样本和未含农药残留的样本被聚为两类, 两类样本散点没有重叠, 正确识别率为 100%。在叶片的主成分 1 和主成分 2 得分图中, 含农药残留的样本和未含农药残留的样本虽然也分为两类, 但是少量样本散点存在重叠, 正确识别率为 93%。结果表明, 傅里叶变换红外光谱结合主成分分析可以作为一种客观、便捷的方法鉴别含有包衣剂农药残留的玉米幼苗。

关键词 傅里叶变换红外光谱; 玉米幼苗; 农药残留; 主成分分析; 种子包衣剂

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1554-05

引言

土传病害是玉米种植中常见的病害, 也是影响玉米产量最严重的病害。玉米播种后, 土壤中的致病真菌、细菌病原体在种子萌发时侵入玉米胚芽, 最终对植株造成严重的影响^[1]。为了解决土传病虫害对玉米种植的威胁, 目前常采用玉米种子包衣技术来应对。在播种前利用包衣剂农药涂于玉米种子表面, 对种子进行包裹。包衣剂通常由杀菌剂和杀虫剂混合而成^[2]。虽然包衣剂阻断了病原体和害虫对玉米种子的侵蚀, 但是随着玉米种子的萌发和生长, 包衣剂将逐渐被玉米根系吸收, 进入玉米茎叶, 造成农药在植株内的残留^[3]。目前农药残留的检测主要通过对样品进行萃取后使用

超高效液相色谱、质谱等进行分析。这些检测方法需要对样品进行提取、净化等复杂程序, 耗时且检测费用高^[4]。近年也有开展表面增强拉曼光谱在农药残留检测中的研究报道, 检测灵敏度高, 但光谱测试时需制作金纳米棒等增强基底, 测试过程也显得复杂^[5]。使用傅里叶变换红外光谱(FTIR)定性检测植物中某些农药残留与色谱、质谱和表面增强拉曼光谱相比具有快速、便捷等优点, 测试时无需对样品进行特殊处理。Xiao 等^[6]利用 FTIR 成功鉴别 1:1 000 稀释后的毒死蜱农药在苹果皮中的残留。Sharma 等^[7]利用 FTIR 对重金属污染的玉米幼苗进行研究, 发现铜使得玉米幼苗的果胶、氨基酸等含量增加。Sharma 等^[8]利用 FTIR 对线虫侵染的秋葵根进行研究, 得到淀粉、蛋白质等营养物质的变化规律。FTIR 研究植物样品时无需对样品进行萃取等过程, 在定性

收稿日期: 2019-04-02, 修订日期: 2019-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760341)和云南省教育厅科研项目(2015Y425)资助

作者简介: 李栋玉, 女, 1983 年生, 曲靖师范学院物理与电子工程学院讲师 e-mail: ldy8304@163.com

* 通讯联系人 e-mail: sym8295@163.com

分析方面具有经济、快速和便捷等优点。因此利用 FTIR 结合主成分分析鉴别残留包衣剂农药的玉米幼苗。

1 实验部分

1.1 样品采集与测试

选用同一杂交玉米品种(乐玉 1 号, 四川丰大种业有限公司), 经过包衣剂包裹的玉米种子作为实验组, 未进行包衣剂包裹的玉米种子作为对照组。两组玉米种子在相同土壤、气候、湿度条件下播种, 进行平行对照试验。播种 15 天后选取长势一致的实验组和对照组玉米幼苗(整株含根部器官)各 5 株, 此后每隔 10 d 收取实验组和对照组整株玉米苗各 5 株。实验组和对照组分别获得生长期为 15、25 和 35 d 三个时间段的 15 株玉米幼苗样品。玉米幼苗采集后清洗干净, 在 27 °C 下进行干燥处理。干燥后剪取每株玉米幼苗的胚根和下层叶片分别研磨为粉末, 用电子天平按 3 : 300 mg 比例称量样品粉末和溴化钾混合, 研磨均匀后压片测试。测试的红外光谱仪为美国 Thermo Nicolet 公司的 Avatar FTIR 360 光谱仪(扫描次数: 32 次, 分辨率: 2 cm^{-1} , 扫描范围: 4 000~400 cm^{-1})。实验组和对照组各自获得叶片光谱 15 条和根光谱 15 条。

1.2 数据预处理

光谱测试时通过差谱技术处理, 扣除背景吸收光谱。采用 Omnic 8.0 软件进行吸光度归一化处理和基线校正。实验组(对照组)在同一生长期收获的 5 株样品相当于 5 次重复性实验。使用 SPSS 22.0 软件对玉米叶片(根)的 5 次重复性实验的光谱进行偏相关分析, 偏相关系数均大于 0.99, 表明 5 次重复测量的光谱几乎一致, 实验具有重复性。

2 结果与讨论

2.1 纤维素和玉米种子包衣剂农药的傅里叶变换红外光谱特征

玉米叶片和根的主要成分是纤维素, 它们的红外光谱在特征区呈现出纤维素的强吸收。为了便于对比研究含与不含包衣剂残留的叶、根的光谱, 测试了纤维素和包衣剂农药的红外光谱, 见图 1。纤维素的光谱在 3 348 cm^{-1} 附近出现羟

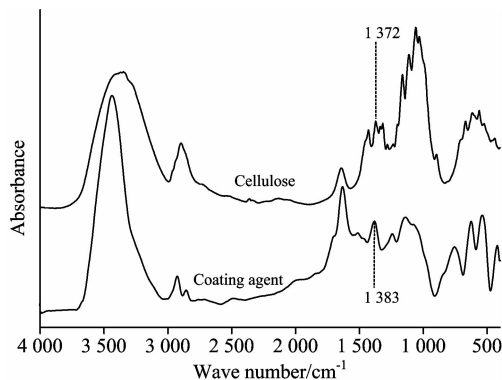


图 1 玉米种子包衣剂和纤维素的傅里叶变换红外光谱
Fig. 1 FTIR spectra of maize seed coating agent and cellulose

基的特征吸收峰, 包衣剂农药的光谱则在 3 437 cm^{-1} 附近出现以氨基为主的强吸收, 该峰可能还含有羟基吸收的叠加。羟基和氨基的吸收峰差异明显, 羟基的吸收峰较宽, 而氨基的吸收峰则较为尖锐^[9]。3 000~2 800 cm^{-1} 范围内两者的吸收带主要是甲基和亚甲基的吸收叠加峰。在纤维素的光谱中, 1 372 cm^{-1} 附近出现了 C—H 的弯曲振动, 但在包衣剂农药的光谱中 C—H 的弯曲振动吸收出现在 1 383 cm^{-1} 处^[10]。纤维素最为明显的特征峰出现在 1 162, 1 114, 1 060 和 1 030 cm^{-1} 附近, 主要源于 C—O 键的振动吸收, 并且这四个特征峰叠加后形成了纤维素特有的叠加带峰形。

2.2 包衣剂农药在玉米根中残留情况的傅里叶变换红外光谱分析

经过包衣剂包裹和未包裹的玉米种子种植后, 三个生长时期的幼苗根的红外光谱见图 2。三个生长阶段的对照组(种子未经包衣剂包裹)和实验组(种子经过包衣剂包裹)的 6 条光谱在 3 404, 2 922 和 1 732 cm^{-1} 附近的三个吸收峰的峰形基本一致, 波数位置相互偏差小于 3 cm^{-1} 。玉米根光谱中 3 404 cm^{-1} 的吸收峰不仅包含了羟基的吸收峰, 还包含了氨基的吸收峰。2 922 cm^{-1} 吸收峰来源于亚甲基的非对称伸缩振动吸收, 1 732 cm^{-1} 附近的吸收峰来源于羰基^[11]。1 200~800 cm^{-1} 范围内, 实验组和对照组的光谱均在 1 157, 1 103 和 1 050 cm^{-1} 附近出现纤维素的特征吸收峰, 峰形上呈现三级递增形状, 与图 1 中纤维素在该范围内的峰形一致。纤维素的红外光谱中(见图 1), 在 1 060 和 1 030 cm^{-1} 位置存在吸收峰, 但在玉米根的红外光谱中, 这两个吸收峰相互叠加, 导致叠加峰的中心频率移至 1 050 cm^{-1} 。根的红外光谱中低于 900 cm^{-1} 的吸收带较弱且叠加严重, 不能直接分辨出特征峰。

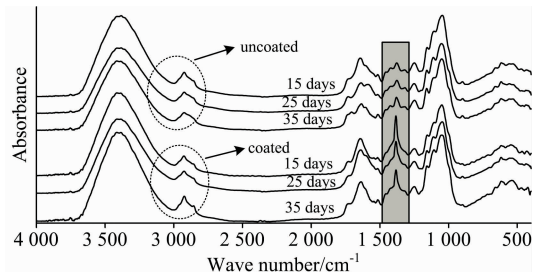


图 2 种子经过包衣剂包裹和未包裹的玉米幼苗根的红外光谱

Fig. 2 FTIR spectra of maize seedling roots with and without coating agent

对比试验组和对照组玉米幼苗根的光谱, 两者最大的差异处于 1 488~1 295 cm^{-1} 吸收带(图 2 阴影带范围), 无需对光谱进行处理就可以明显分辨出两者的差异。在该范围内对照组的相对吸收强度比实验组弱。实验组在 1 384 cm^{-1} 附近的吸收峰较为尖锐, 从吸收带的形状上可区别于对照组。三个生长阶段, 实验组在该范围内的吸收峰都出现在 1 384 cm^{-1} 位置, 而对照组分别出现在 1 375, 1 375 和 1 372 cm^{-1} 位置。在纤维素和包衣剂农药的红外光谱中, 纤维素 C—H 的弯曲振动在 1 375 cm^{-1} , 包衣剂农药 C—H 弯曲振动在 1 384 cm^{-1} 。通过对比可以确定实验组根的红外光谱中 1 384

cm^{-1} 尖锐的吸收峰是由于玉米包衣剂农药的残留引起。该峰可以作为包衣剂农药残留检验的目标对象。光谱经过纵坐标归一化后, 对照组 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰的相对强度随着植株生长有增强的趋势, 说明随着植株生长纤维素含量在增加。而实验组 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰的相对强度随着植株生长逐渐减弱, 这是由于农药残留由根运输进入玉米地上器官, 导致根中的农药残留浓度逐渐降低。

2.3 包衣剂农药在玉米叶片中残留情况的傅里叶变换红外光谱分析

对照组和实验组幼苗的三个生长时期叶片的红外光谱见图 3。对比对照组和实验组的光谱, 两者差异最大的吸收峰在 $1\,565\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 II 带和 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 附近的 C—H 弯曲振动吸收带。实验组玉米幼苗叶片光谱中在酰胺 II 带位置均出现明显的肩峰, 而在对照组玉米幼苗叶片光谱中该肩峰则未能观察到。经过包衣剂农药包裹种子的幼苗叶片, 随着植株的生长, 酰胺 II 带呈现减弱的趋势, 肩峰逐渐消失。未经过包衣剂农药包裹种子的幼苗叶片光谱中, 酰胺 II 带位置均没有出现肩峰。对照组玉米幼苗光谱 C—H 的弯曲振动吸收峰均出现在 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 附近, 而实验组的玉米幼苗均出现在 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 附近。结合图 1, 可以再次确定 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰主要来自于纤维素, $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰主要来源于玉米包衣剂农药的残留。

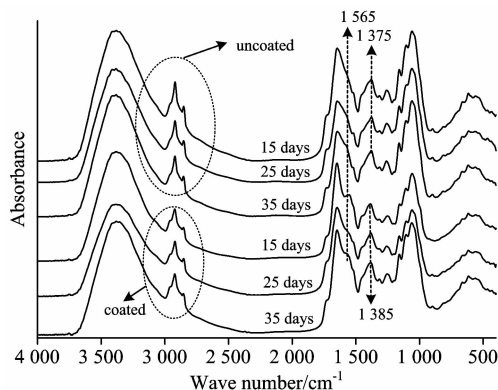


图 3 种子经过包衣剂包裹和未包裹的玉米幼苗叶片的红外光谱

Fig. 3 FTIR spectra of maize seedling leaves of seeds with and without coating agent

在含有包衣剂农药残留的叶片光谱中, 导致 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰没有被观察到的原因是 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带强于 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带, 两者相互叠加, 导致 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰被掩盖, 最终呈现 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰。对残留包衣剂叶片光谱的 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 叠加带进行傅里叶自去卷积(Fourier self-deconvolution, FSD), 见图 4, 可剥离出 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 的吸收子峰, 进一步证实了上述的分析。

2.4 玉米幼苗根和叶红外光谱的主成分分析

为了便于清楚地对比含农药残留和未含农药残留的玉米叶片、根部器官的光谱规律, 对其傅里叶变换红外光谱中的主要吸收带进行统计和归属^[12-15], 见表 1。

红外光谱可视为高维度数据, 往往存在一定的数据冗

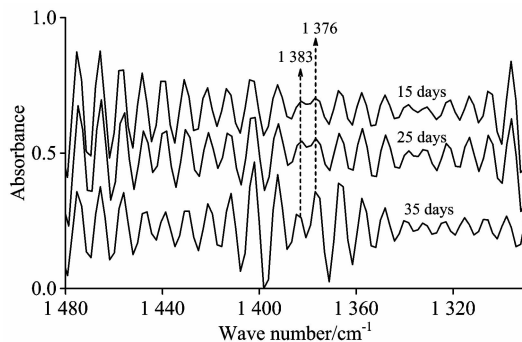


图 4 种子经过包衣剂包裹的玉米幼苗叶片的傅里叶自去卷积红外光谱

Fig. 4 FSD infrared spectra of maize seedling leaves of seeds with coating agent

余, 冗余数据会干扰有用信息的获取。为了快速区别包衣剂农药残留的玉米植株, 主成分分析(principal component analysis, PCA)方法用于对根、叶的红外光谱进行降维处理。考虑到基线漂移的影响和提高光谱叠加带的分辨率, 先对红外光谱进行二阶导数处理, 再使用二阶导数光谱进行降维运算。分别对叶、根的 30 个样本的二阶导数光谱进行单因素方差分析, 显著性(p 值)小于 0.01, 表明样品的光谱具有显著的统计意义。实验组和对照组玉米幼苗根的二阶导数光谱进行主成分分析降维后, 提取的前两个主成分累计已经包含了 92% 的光谱信息。同样的处理方法对实验组和对照组玉米幼苗叶片的二阶导数光谱进行降维, 前两个主成分累计已经包含了 96% 的光谱信息。根、叶的二阶导数光谱前两个主成分的得分图见图 5(g1—g15 是根对照组样本, a1—a15 是根实验组样本; y1—y15 是叶片对照组样本, b1—b15 是叶片实验组样本)。从图 5 可看出, 根的实验组和对照组的聚类图中样本散点没有重叠, 表明实验组和对照组玉米幼苗根的光谱存在差异, 通过光谱可以将两者区分开。叶片实验组和对照组虽然也分为两类, 但类间距离较近, y13 和 b14 两个样品不能准确判定, 鉴别准确率为 93%。随着幼苗生长时间的增加, 包衣剂农药在叶片内的残留逐渐降低, 导致 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰的强度减弱, 光谱中主要以 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰呈现出来, 在 FSD 光谱中也证实了该变化规律。b14 属于生长时间为 35 d 的样本, 包衣剂残留相对生长前期浓度降低, $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰强度减弱, 导致 b14 和 y13 之间的类间距离减小, 出现散点的交叉, 而未能准确鉴别。

3 结论

通过傅里叶变换红外光谱对包衣剂包裹种子的玉米幼苗进行研究, 并与未经过包衣剂包裹种子的玉米幼苗的光谱进行对比。发现经过包衣剂包裹种子的玉米幼苗, 其根和叶片的红外光谱中均在 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 附近出现 C—H 弯曲振动的特征吸收峰, 而未经过包衣剂包裹种子的玉米幼苗的根和叶的红外光谱中 C—H 弯曲振动吸收峰均出现在 $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 附近。对比包衣剂的红外光谱, 证实 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 的特征峰来自

表 1 玉米幼苗叶片和根的傅里叶变换红外光谱主要吸收带归属
Table 1 General band assignments of the FTIR spectra of maize seedling root and leaf

No.	No pesticide residues		Pesticide residues		Spectral assignments and possible compounds
	root	leaf	root	leaf	
1	3 400	3 384	3 400	3 380	O—H and N—H stretching; carbohydrates, protein
2	2 925	2 920	2 923	2 920	C—H asymmetric stretching (CH ₂)
3		2 850		2 850	C—H symmetric stretching (CH ₂)
4	1 729	1 730	1 730	1 729	C=O stretching; phospholipids, cholesterol esters
5	1 637	1 646	1 639	1 646	amide I band (C=O stretching); mainly proteins
6				1 565	amide II band (N—H bending and C—H stretching); mainly proteins
7	1 456	1 451	1 458	1 453	C—H asymmetrical deformation (CH ₃ , CH ₂); cell wall polysaccharides
8	1 375	1 376	1 384	1 384	C—H bending; polysaccharides and coating agent
9	1 250	1 256	1 249	1 256	C—O—C stretching; pectic substances
10	1 158	1 159	1 158	1 158	C—O—C stretching; cellulose (β-1, 4-glucan)
11	1 110	1 106	1 109	1 108	C—OH stretching; cellulose
12		1 060		1 060	C—O stretching; cellulose
13	1 050		1 049		C—O—C symmetrical stretching and C—OH symmetrical deformation; cellulose
14	898	898	899	899	β-glycosidic bonds bending; galactan

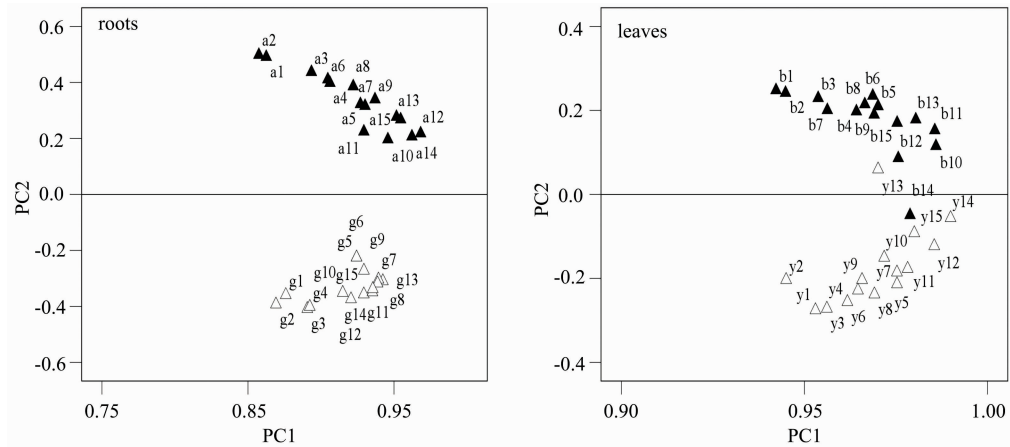


图 5 玉米幼苗根和叶片二阶导数光谱的主成分分析

Fig. 5 PCA of secondary derivative spectra from corn seedling roots and leaves

农药残留的吸收。尤其在根的红外光谱中，农药残留在 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 的特征峰较为尖锐，特征明显。因此 $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 吸收带可作为玉米幼苗植株中包衣剂残留检测的目标对象。对玉米幼苗根和叶片的二阶导数光谱进行主成分分析后，前两个主成分的得分图显示含农药残留和不含农药残留的根样品散点图没有重合，含农药残留和未含农药残留的根被全部鉴别出

来，正确识别率为 100%。但含农药残留和不含农药残留的叶片样品散点有交叉，正确识别率为 93%。傅里叶变换红外光谱技术具有便捷、快速等优点，结合主成分分析可有效识别含有包衣剂农药残留的玉米幼苗植株。该研究为农作物植株内农药残留的鉴别提供一种便捷方法。

References

[1] Tej R, Rodríguez-Mallol C, Rodríguez-Arcos R, et al. European Journal of Plant Pathology, 2018, 152(1): 249.
 [2] Zeng D, Fan Z, Tian X, et al. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(8): 2889.
 [3] Rundlöf M, Andersson Georg K S, Bommarco R, et al. Nature, 2015, 521: 77.
 [4] Chen H, Li M, Xue J, et al. Food Analytical Methods, 2018, 11(12): 3396.
 [5] HUANG Lin-sheng, WANG Fang, WENG Shi-zhuang, et al(黄林生, 王芳, 翁士壮, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(9): 2782.
 [6] Xiao G, Dong D, Liao T, et al. Food Analytical Methods, 2015, 8(5): 1341.
 [7] Sharma S, Uttam K N. Journal of Applied Spectroscopy, 2018, 85(4): 771.

- [8] Sharma N, Khajuria Y, Sharma J, et al. *Vacuum*, 2018, 158: 126.
- [9] Yu S, Sheng L, Zhang C, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 198: 88.
- [10] Bounaas K, Bouzidi N, Daghbouche Y, et al. *Microchemical Journal*, 2018, 139(2): 347.
- [11] Cisem A U, Ipek S, Nadide K. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1174: 127.
- [12] Paulina M, Aleksandra W B, Maria L, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 189: 405.
- [13] Yiing Y C, Adeline S Y T. *Fungal Ecology*, 2019, 37: 38.
- [14] Rumana R, Katharina H, Helge B, et al. *Ecological Indicators*, 2018, 84: 803.
- [15] Suresh S, Karthikeyan S, Jayamoorthy K. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2016, 1(3): 343.

Discrimination of Maize Seedlings Containing Residual Coating Agent by FTIR Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis

LI Dong-yu¹, SHI You-ming^{1*}, LIU Gang²

1. College of Physics and Electronic Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655011, China

2. College of Physics and Electronic Information, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract In order to identify the maize seedlings which contain pesticide residues of coating agent, the roots and leaves of maize seedlings were studied by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with principal component analysis (PCA). The uncoated and coated maize seeds were planted with the same conditions, and the infrared spectra of roots and leaves of these seedlings were tested for parallel control experiments. At the same time, the infrared spectra of coating agent and cellulose were tested for reference. The infrared spectra of roots and leaves of the seedlings whose seeds were coated by coating agent showed a peak of C—H bending vibration near at $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$, but the C—H bending vibration in the infrared spectra of roots and leaves of seedlings without coatings appeared near at $1\ 375\ \text{cm}^{-1}$. Referring to the infrared spectra of cellulose and coating agent, it can be determined that $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ originated from the coating agent. At the infrared spectra of roots, the absorption peaks of pesticide residues at $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ are particularly evident, which are sharper than that at $1\ 375\ \text{cm}^{-1}$. With the growth of maize plants, the relative intensity of the characteristic peak at $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ in roots tend to decrease, which is due to the continuous transport of pesticide residues to the above-ground organs of seedling, resulting in the reduction of pesticide residues in roots. Besides the characteristic peaks at $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ of pesticide residues, the amide II band also shows obvious shoulder peak at the infrared spectra of seedling leaves whose seeds are coated by the pesticide, and this shoulder peak is not observed in seedling leaves whose seeds are uncoated. The spectral analysis showed that the characteristic absorption peaks of pesticide residues are covered up by the strong absorption peaks of cellulose, and the characteristic absorption peaks of cellulose result in overlapping of spectral information and redundancy of data. Therefore, the PCA was used to mine the characteristic information in the spectra. In the score plot of principal component 1 (PC 1) and principal component 2 (PC 2) of the roots, the samples containing pesticide residues and those without pesticide residues are clustered into two groups respectively, the scatter points of the two types of samples do not overlap, and the correct recognition rate is 100%. Although the leaves containing pesticide residues and those without pesticide residues are also divided into two groups in the score plot of PC 1 and PC 2, a small number of samples are overlapped, and the correct recognition rate is 93%. The results demonstrated the feasibility of utilizing FTIR spectroscopy combined with PCA, as an objective and rapid method for identification of the maize seedlings containing residual coating agent.

Keywords Fourier transform infrared spectroscopy; Maize seedling; Pesticide residues; Principal component analysis; Seeds coating agent

(Received Apr. 2, 2019; accepted Aug. 8, 2019)

* Corresponding author