

重金属铜胁迫苹果砧木根系的显微拉曼光谱诊断研究

李俊猛¹, 翟雪东¹, 杨子涵¹, 赵艳茹^{1, 2, 3}, 余克强^{1, 2, 3*}

1. 西北农林科技大学机械与电子工程学院, 陕西 杨凌 712100
2. 农业农村部农业物联网重点实验室, 陕西 杨凌 712100
3. 陕西省农业信息感知与智能服务重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要 重金属污染会影响农作物的正常生长, 如何快速准确的实现对农作物中重金属的检测已成为亟待解决的问题之一。传统植物中重金属检测依赖于化学方法, 虽然可以实现重金属含量的精准检测, 然而其操作过程繁琐, 并且无法实现批量样本的检测, 更无法实现重金属胁迫下植物组织的原位微观检测。拉曼光谱具备无损探测固体、液体和气体状态的分子振动信息、光谱分辨率高和对水分不敏感等优势, 因此利用拉曼光谱技术检测农作物中重金属含量具有可行性。苹果砧木是苹果树幼苗嫁接的基础, 能够保障后期的苹果树体健康以及苹果果品品质与产量, 而苹果砧木根系受到重金属污染, 阻碍其健康生长并影响苹果树幼苗的抗逆性, 因此探明重金属与苹果砧木根系互作机理十分必要。该研究以5组不同浓度 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液胁迫下的苹果砧木为研究对象, 首先采集不同铜离子(Cu^{2+})胁迫梯度下苹果砧木根系的拉曼散射光谱, 利用自适应迭代重加权惩罚最小二乘法(Air-PLS)和S-G平滑方法对所获得的拉曼光谱数据进行预处理, 去除荧光影响以及进行基线校正; 其次建立偏最小二乘判别分析(PLS-DA)模型和支持向量机(SVM)判别模型, 结果表明: 基于显微拉曼光谱和SVM, PLS-DA判别模型对苹果砧木根系的铜离子胁迫进行判别, SVM模型准确率可达100%, PLS-DA模型准确率为96%, 能够较好的预测出苹果砧木受重金属铜的胁迫程度; 最后基于特征拉曼光谱峰1096, 1329, 1605和2937 cm^{-1} 进行苹果砧木根系横截面的化学成像可视化研究。研究结果表明, 拉曼光谱技术结合Air-PLS和S-G平滑建立的SVM模型和PLS-DA模型可以快速、有效地进行苹果砧木根系受重金属胁迫程度的诊断, 为重金属胁迫农作物检测提供新的思路, 对农作物的重金属逆境胁迫互作机理诊断具有理论指导意义。

关键词 拉曼光谱技术; 苹果砧木; 根系; 重金属胁迫

中图分类号: S123 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)09-2890-06

引言

重金属污染对生态环境危害已引起广泛关注^[1]。其中, 铜是最常见的重金属污染元素, 也是最容易积累且不易降解的污染元素。重金属铜元素会破坏农作物的组织结构, 然而其内部结构人眼无法看见, 并且根系是重金属胁迫农作物的直接对象, 易被植物根部吸收。过量的铜离子一旦进入根细胞, 会改变代谢物水平, 进而影响农作物产量^[2]。因此亟须寻找一种对农作物体内重金属快速、准确的检测方法, 有利于探明农作物的重金属逆境胁迫响应机制。

重金属物质的传统检测方法主要是借助化学分析法来完

成的, 如电化学方法和原子光谱法等^[3], 这些方法虽然检测灵敏度高, 但也存在所用化学试剂易形成二次污染, 难以大批量快速检测等缺点。拉曼光谱技术通常具有更高的选择性, 提供了更窄的光谱带, 能够提供丰富和高分辨率的化学信息^[4]。目前, 一些学者采用拉曼光谱技术进行农作物中重金属含量的检测。王海阳等^[5]基于拉曼光谱技术评估香根草根内部铅离子的含量, 其检测模型的预测相关系数高于0.85, 其误差小于5.7%, 结果表明拉曼光谱技术可用于测定植物根部重金属的含量。Tomas等^[6]利用拉曼光谱技术比较了四种植物金属硫蛋白亚型, 表达其锌团簇和蛋白质构象的见解, 并做进一步分析得出, 拉曼光谱技术可以分析植物体内的金属盐和络合物。Barimah等^[7]提出一种无标记的氧

收稿日期: 2021-07-13, 修订日期: 2021-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901403), 陕西省自然科学基金项目(2020JQ-267)和中国博士后科学基金项目(2018M641023)资助

作者简介: 李俊猛, 1997年生, 西北农林科技大学机械与电子工程学院硕士研究生 e-mail: 2671558540@qq.com

* 通讯作者 e-mail: yuke406336022@163.com

化亚铜/银($\text{Cu}_2\text{O}/\text{Ag}$)表面增强拉曼散射(SERS)纳米探针来检测茶中的总砷含量,开发的 $\text{Cu}_2\text{O}/\text{Ag}$ 耦合化学计量学SERS方法可用于有效地确定、量化和预测茶叶中的砷含量。虽然运用拉曼光谱技术监测重金属胁迫下农作物的响应已有一定成果,但对于重金属胁迫下苹果砧木根系微观诊断尚需要深入研究。

苹果砧木是苹果树生长(或改良)的基础,对控制树体生长势、增强苹果树抗逆性及抗病能力、扩大果树品种适应范围都具有重要意义。本研究利用拉曼光谱技术进行苹果砧木根系 Cu^{2+} 的胁迫检测,可对苹果砧木根系进行精准有效的治理提供方法依据,进而提高苹果树幼苗的抗逆性以及幼苗存活率,而且对农作物在重金属污染评价和作物对重金属胁迫的应答机制方面研究有重要指导意义。

1 实验部分

1.1 样本

实验所采用的苹果砧木为“八棱海棠”(Malus × robusta (CarriSre) Rehder)。它具有与果树嫁接亲和力强,对低平原、滨海和内陆盐碱地区有较强的适应能力等特性,是一种优良的苹果砧木,广泛用于苹果树的嫁接。八棱海棠播种于2020年11月底,为防止重金属的污染,均在不含重金属的有机质土壤中进行育苗。在土壤中加入重金属难免会由于搅

拌不均等因素造成实验误差,然而水培方法具有浓度均匀,植物吸收快速,条件单一等优势。因此本实验采用水培方法进行试验。2021年4月30日,将苹果砧木幼苗在清水里培育2周后进行重金属铜的胁迫实验,在营养液中分别添加铜离子(Cu^{2+})含量为0, 6, 12, 18和24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液,每个梯度有6株幼苗,共30株苹果砧木进行本次实验。2021年5月13日将处理过的苹果砧木置于昼夜温度均为23℃、相对湿度85%的植物培养箱中进行培育7d,7d之后观察各个浓度胁迫下的苹果砧木并无明显差异。

1.2 拉曼光谱数据采集

将不同铜离子浓度胁迫的苹果砧木根系用振动切片机(ZQP-86,上海之信仪器有限公司,中国)沿横截面进行切片,将切好的样本组织置于载玻片上以备拉曼光谱的采集。拉曼光谱仪使用Thermo Scientific™ DXR™ 3xi显微拉曼光谱仪(DXR 3xi,赛默飞世尔科技,美国),激光器选用波长为532 nm的固体激光器、显微镜放大倍率10倍,光谱仪具体参数和拉曼数据采集相关参数如表1所示。将携有样本的载玻片置于载物台,聚焦并找到中心位置,然后完成苹果砧木根系的拉曼光谱数据采集。对每个样品分别进行光谱测试,每类样本苹果砧木植株共6株,每个横截面积采集5条拉曼光谱,共采集30组拉曼光谱,5类样本共获得150条拉曼光谱曲线。

表1 苹果砧木根系采集拉曼光谱仪主要参数

Table 1 The main parameters of Raman spectrometer for collecting spectral data

Parameters	Spectral resolution/ cm^{-1}	Spectral region/ cm^{-1}	Maximum of laser power/mW	Laser power research/mW	Exposure time/s	Scanning times	Microscope magnification
Values	1	50~3 000	30	27.1	0.1	2	10

1.3 苹果砧木根系拉曼光谱图像采集

通过对苹果砧木根系横截面区域扫描,进行重金属胁迫后根系横截面组织组成和结构的变化研究。图1是苹果砧木根系横截面在放大倍率10倍下的白光图,共扫描1 015个点。本实验根据特征指纹峰进行苹果砧木根系组织处单波段

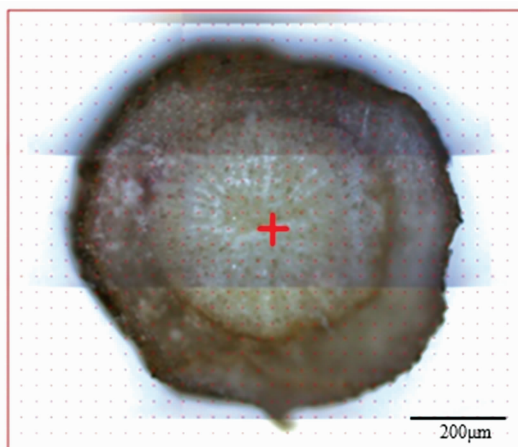


图1 苹果砧木根系显微截面图

Fig. 1 Microsection of root in apple stock

处的伪彩图成像,进而研究重金属铜对苹果砧木根系的影响。

1.4 苹果砧木根系拉曼光谱数据处理方法

采集苹果砧木根系拉曼光谱数据时会受到外界噪声,光线以及荧光背景信息的干扰,影响拉曼光谱质量,因此在拉曼光谱分析时需要对获得的原始拉曼光谱数据进行预处理。S-G平滑是一种较为简单的数据处理方法,通过平滑处理能够有效地处理白噪声,处理在光谱测量中的一些由光学因素产生的影响^[8]。自适应迭代重加权惩罚最小二乘法(adaptive iterative reweighting partial least squares, Air-PLS)是基于PLS方法不断优化的一种数据处理的方法,自动消除部分无用拉曼光谱峰并保留基线部分,同时完成基线校正^[9],用此方法来扣除光谱的荧光等背景信号。

偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)是一种被广泛运用的多元数据判别方法^[10],可以应用于光谱化学分析中的类型判别和模式识别等方面。PLS-DA计算过程是先对训练集进行建模,之后对预测数据进行预测,通过对比实际值与预测值可以得到模型的准确率并能够有效地解决多变量之间相关性的复杂问题^[11]。支持向量机(support vector machine, SVM)是被人们

广泛应用的并且具有神经网络所不具有的易收敛、稳定性较好等优点的一种建模方法。

2 结果与讨论

2.1 苹果砧木根系样本拉曼光谱特征分析

图 2 为五种浓度重金属铜胁迫下苹果砧木根系的平均光谱, 拉曼光谱的主要特点是具有拉曼光谱指纹峰特性, 从图中可以看出拉曼光谱指纹峰主要集中在 $1\ 096$, $1\ 329$, $1\ 460$, $1\ 605$ 和 $2\ 937\ \text{cm}^{-1}$ 处。其中纤维素中 C—H 伸缩的振动属于拉曼光谱峰 $2\ 897\ \text{cm}^{-1}$, 环 (C=C) 不对称伸缩振动属于 $1\ 152\ \text{cm}^{-1}$, CH_2 弯曲振动属于 $1\ 386\ \text{cm}^{-1}$ 。通过纤维素标准品的拉曼光谱线^[12]与图 2 对比可知: $1\ 096$, $1\ 329$ 和 $2\ 937\ \text{cm}^{-1}$ 波数下, 分别与纤维素标准品的 $1\ 152$, $1\ 386$ 和 $2\ 897\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼光谱指纹峰相一致。从木质素标准品的光谱曲线^[13]可以得到: 拉曼峰位于 $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 左右, 属于芳香环振动峰和 C=C 振动峰, 研究结果表明激光激发了植物木质素的拉曼光谱^[14]。通过木质素标准品的拉曼光谱曲线与图 2 对比可知, $1\ 605\ \text{cm}^{-1}$ 波数下与木质素标准品 $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 波数下拉曼光谱指纹峰相一致。细胞壁是苹果砧木根系的主要组成部分, 而纤维素是植物细胞壁的主要构成成分, 另外木质素也是构成植物细胞壁的成分之一, 具有使细胞相连的作用。此研究表明重金属胁迫会对砧木根系中细胞壁产生一定的影响, 进而影响苹果砧木根系。接下来, 将研究不同浓度重金属胁迫下的苹果砧木根系的拉曼光谱特性。

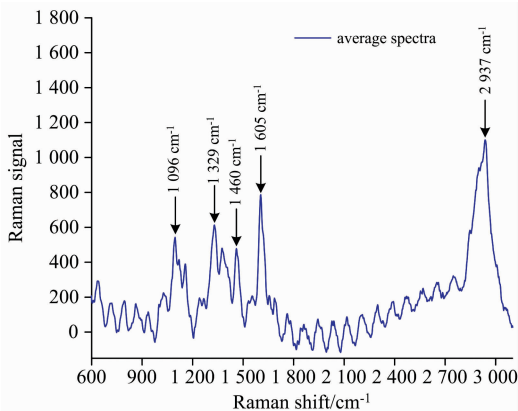


图 2 拉曼光谱平均曲线图

Fig. 2 Raman spectrum average graph

图 3(a) 是浓度为 0 , 6 , 12 , 18 和 $24\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 胁迫苹果砧木样品所获取的各个浓度下 30 组拉曼光谱的平均光谱图。图 3(b) 是经过先 Air-PLS 基线校正处理, 再经过 S-G 平滑处理后的五种浓度胁迫下样本的平均拉曼光谱图。图 3(b) 相较于图 3(a) 消除光谱的荧光等背景信号, 同时完成基线校正。从图 3 中可以看出随着重金属胁迫浓度的升高, 部分拉曼信号强度增加, 但是也有些随胁迫浓度的增加而降低, 这可能是由于植物体内物质受胁迫的特性关系。

图 4 表示五种浓度下 $1\ 096$, $1\ 329$, $1\ 605$ 和 $2\ 937\ \text{cm}^{-1}$

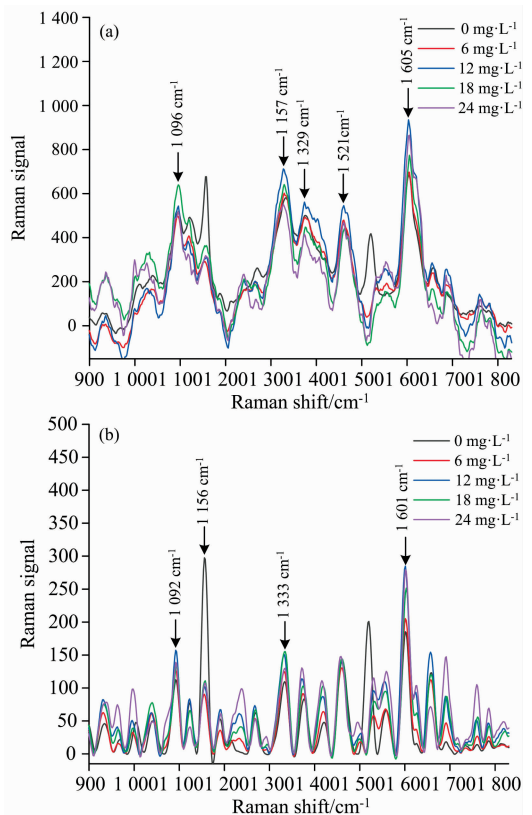


图 3 (a) 平均拉曼光谱图; (b) 预处理后的平均拉曼光谱图
Fig. 3 (a) Mean Raman spectrum; (b) preprocessed image of mean Raman spectrum

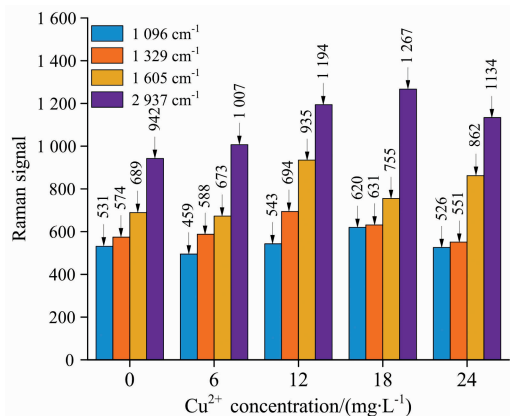


图 4 四种波段下拉曼信号强度图

Fig. 4 Intensity map of Raman signal in four kinds of band

波段的拉曼信号强度值。植物体内重金属亚细胞的分布对重金属的积累, 迁移和解毒至关重要^[15-16]。细胞壁作为阻止重金属 Cu 进入细胞的第一道屏障, 由纤维素, 半纤维素, 果胶和蛋白质组成, 能够络合重金属, 减少重金属向细胞运输^[17]。其中在重金属铜少量时, 对苹果砧木生长具有促进作用, 过量时对植物产生毒害。从图 4 中得出四种波段下随着重金属胁迫浓度的增加拉曼光谱峰强度呈现先增强后减弱的趋势, 结合拉曼指纹峰特性可以得出随着浓度的增加植物体

内纤维素、木质素的含量也随之增加但是当浓度超过 18 mg · L⁻¹，可能此时铜胁迫会对苹果砧木产生毒害作用，此时纤维素、木质素的含量也随着降低。通过扫描重金属胁迫下苹果砧木根系以单波段 1 096, 1 329, 1 605 和 2 937 cm⁻¹ 拉曼峰成像所得到的伪彩色图像如图 5 所示，图中不同的颜

色表示拉曼光谱信号的强度。

图 5 在相同测量条件下，不同浓度胁迫和不同波段下的拉曼光谱成像可视化图。对比可以发现相同浓度胁迫不同波数的伪彩图差异不大，但是不同浓度胁迫下相同波数的伪彩图差异较大。浓度为 0, 6, 12 和 18 mg · L⁻¹ 的拉曼光谱成像可视化图基本符合图 4 中的结果。然而在 24 mg · L⁻¹ 胁迫浓度下出现异常，影响拉曼光谱成像的因素有很多，造成结果可能与在做切片时其根系的粗细不同且我们切片时的横截面厚度较厚和不统一有关，也可能受到光照的因素影响拉曼光谱技术的成像功能。可见，化学成像的可视化表达为拉曼光谱在重金属胁迫检测中提供了新的研究方向。

2.2 苹果砧木根系中 Cu²⁺ 含量判别模型的建立和对比分析

2.2.1 PLS-DA 模型结果与分析

在进行光谱预处理后，用全部光谱进行建模，相比与拉曼光谱成像可视化表达，建立数学模型可将实际问题简单化，节省判别时间。对快速检测苹果砧木根系是否受到重金属铜胁迫具有重要意义。运用样本分类 kennard-stone(K-S) 算法对 150 组样本数据挑选进入训练集，从训练集中挑选 100 组数据进行 PLS-DA 建模，再挑选 50 组进行预测处理。运用 Matlab R2018b(The Math Works, Natick, MA, USA) 平台进行建模分析，PLS-DA 模型判别结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出，PLS-DA 模型准确率为 96%(48/50)，能够较好的判别出苹果砧木是否受到胁迫。

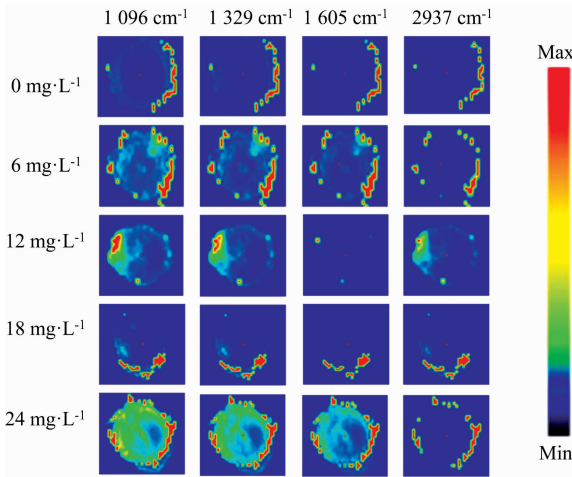


图 5 苹果砧木根系组织处的单波段拉曼峰成像
Fig. 5 Single-band Raman peak imaging at root tissue of apple rootstock

表 2 PLS-DA 判别结果混淆矩阵

Table 2 PLS-DA discriminant result confusion matrix

Contents	0 mg · L ⁻¹	6 mg · L ⁻¹	12 mg · L ⁻¹	18 mg · L ⁻¹	24 mg · L ⁻¹
0 mg · L ⁻¹	13	0	0	0	0
6 mg · L ⁻¹	0	16	1	0	0
12 mg · L ⁻¹	0	0	5	0	0
18 mg · L ⁻¹	0	0	1	7	0
24 mg · L ⁻¹	0	0	0	0	7

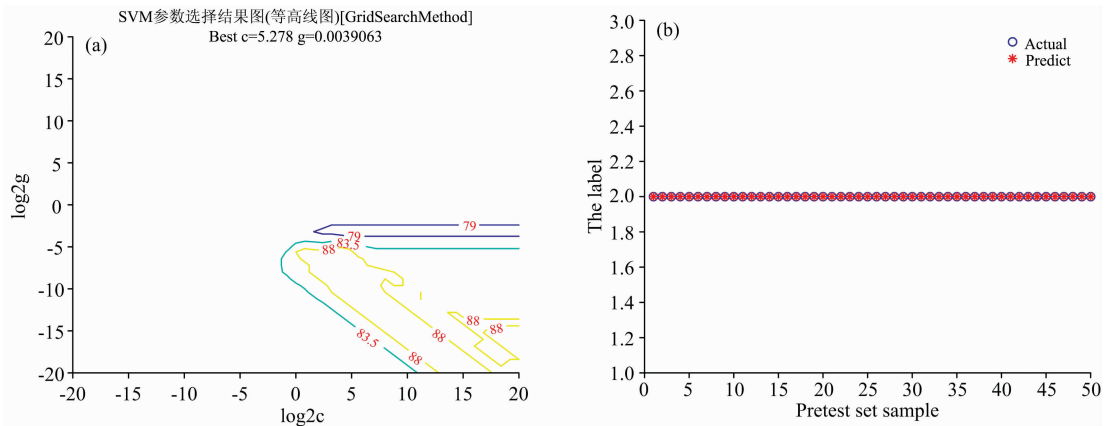


图 6 (a)SVM 寻优参数; (b)SVM 模型

Fig. 6 (a) SVM Optimization parameters; (b) SVM model

2.2.2 SVM 模型结果与分析

使用 SVM 方法对全部光谱进行建模，可以得到 SVM

最佳惩罚系数 c=5.278, g=0.003 906 3 如图 6(a)所示。首先运用 K-means 算法对每类样本的 30 组数据依次进行训

练, 随机选取 20 组进行建模, 剩余的 10 组进行预测。建立的 SVM 模型图如图 6(b) 所示, 从实际和预测结果来看模型的准确率为 100%, 模型效果较好。这一结果也验证了使用显微拉曼光谱技术检测苹果砧木是否受到重金属胁迫具有可行性。

3 结 论

利用拉曼光谱技术结合化学计量学方法, 对不同浓度重金属铜离子胁迫下苹果砧木根系进行了判别分析研究。主要有以下结论: (1) 通过四个特征峰 1 096, 1 329, 1 605 和

2 937 cm^{-1} 进行单波段的拉曼光谱成像, 可得出在同一浓度下拉曼波数与拉曼信号强度成正相关, 而且同一波段下随着胁迫浓度的增加拉曼信号呈先增后减的趋势。另外, 对图像进行可视化表达之后, 可以清晰地看出不同浓度胁迫拉曼成像有着一定的差距; (2) 建立的 PLS-DA 模型预测准确率为 96%, SVM 模型预测的准确率达到 100%, 因此, 两类模型都具有优越性, 能够较好的预测出苹果砧木根系是否受到胁迫, 为研究重金属胁迫农作物及其产品提供了新的技术思路。在今后的研究中, 需要进行根系中重金属铜含量的定量检测, 进一步扩大样本范围和重金属浓度梯度以确定该模型的稳定性和适用性。

References

- [1] ZOU Ri, SHEN Di, BO Xin-fu, et al(邹 日, 沈 颖, 柏新富, 等). Chinese Vegetables(中国蔬菜), 2011, (4): 1.
- [2] Wan Huixue, Yang Fengying, Zhang Xiaolei, et al. Environmental Pollution, 2021, 287: 117610.
- [3] Liu Cuicui, He Shaoyuan, Shen Kun, et al. Food Analytical Methods, 2015, 8(7): 1785.
- [4] Aguilera A M, Aguilera-Morillo M C, Preda C. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2016, 154: 80.
- [5] WANG Hai-yang, WU Zhi-jing, JING Li-xia, et al(王海阳, 吴至境, 江丽霞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2017, 37(5): 1418.
- [6] Tomas M, Tinti A, Bofill R, et al. Journal of Inorganic Biochemistry, 2016, 156: 55.
- [7] Barimah A O, Guo Z, Agyekum A A, et al. Food Control, 2021, 130: 108341.
- [8] Chen Huazhou, Pan Tao, Chen Jiemei, et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2011, 107(1): 139.
- [9] Xu Xiangchun, Huo Xinming, Qian Xiang, et al. Analytica Chimica Acta, 2021, 1157: 338386.
- [10] Zontov Y V, Rodionova O Y, Kucheryavskiy S V, et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2020, 203: 104064.
- [11] Vieira L S, Assis C, de Queiroz M E L R, et al. Food Chemistry, 2021, 345: 128866.
- [12] Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M. Nature Protocols, 2012, 7(9): 1694.
- [13] JIN Ke-xia, WANG Kun, CUI He-shuai, et al(金克霞, 王 坤, 崔贺帅, 等). Scientia Silvae Sinicae(林业科学), 2018, 54(3): 144.
- [14] Meyer M W, Lupoi J S, Smith E A. Analytica Chimica Acta, 2011, 706(1): 164.
- [15] Wang Quanying, Zhou Dongmei, Cang Long. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(7): 1504.
- [16] Wang Q Y, Liu J S, Hu B. Environmental & Experimental Botany, 2016, 123: 125.
- [17] Fu X, Dou C, Chen Y, et al. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 103.

Microscopic Raman Spectroscopy for Diagnosing Roots in Apple Rootstock Under Heavy Metal Copper Stress

LI Jun-meng¹, ZHAI Xue-dong¹, YANG Zi-han¹, ZHAO Yan-ru^{1, 2, 3}, YU Ke-qiang^{1, 2, 3*}

1. College of Mechanical and Electronic Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2. Key Laboratory of Agricultural Internet of Things, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangling 712100, China

3. Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Information Perception and Intelligent Service, Yangling 712100, China

Abstract Heavy metal pollution will affect the normal growth of crops, and quickly detecting the content of heavy metals in crops has become a problem to be investigated. The traditional detection of heavy metals in plants depends on chemical methods. Although it can realize the high accurate detection of heavy metal content, its operation process is laborious, and it cannot meet the requirements of the high throughput detection, let alone the in-situ micro detection of plant tissues under heavy metal stress. Raman spectroscopy has the advantages of non-destructive detection of molecular vibration information of solid, liquid and gas species, high spectral resolution and insensitive to water. Therefore, it is feasible to monitor the content of heavy metals in crops by Raman spectroscopy. Apple rootstock is the basis of apple seedling grafting, which can ensure the health of the apple tree and apple quality and yield in the later stage. The root of apple rootstock is polluted by heavy metals directly, which hinders its healthy growth and affects the stress resistance of apple seedlings. Therefore, studying the interaction mechanism between heavy metals and apple rootstock root is necessary. In this study, five groups of apple rootstocks under the stress of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution with different concentrations were investigated. Firstly, the Raman scattering spectra of apple rootstocks under different copper ion (Cu^{2+}) stress gradients were collected, and the adaptive iterative reweighting partial least squares (air-PLS) and S-G smoothing method were applied to preprocess the obtained raw Raman spectrum data for removing the fluorescence effect and correcting the baseline. Secondly, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and support vector machine (SVM) discriminant models were established to estimate the different heavy metal stress concentrations. Results showed that the accuracy of the SVM model and PLS-DA model could reach 100% and 96%, respectively, which is promising for predicting apple rootstocks' heavy metal Cu stress situation; finally, the chemical imaging was mapped based on the characteristic Raman spectrum peaks at 1 096, 1 329, 1 605 and 2 937 cm^{-1} . It was illustrated that the Raman signal intensity increased first and then decreased with the increase of stress concentration in the exact wavenumber. These findings demonstrated the potential of micro-Raman scattering for measuring apple rootstock heavy stress, which provides anovel method for detecting heavy metal stress of crops.

Keywords Raman spectroscopy; Apple stock; Roots; Heavy metal stress

(Received Jul. 13, 2021; accepted Oct. 15, 2021)

* Corresponding author