植物营养与肥料学报 2013,19(4):1012-1017
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2013.0430

小白菜的中红外光谱特征及其在氮营养诊断中的应用

杨家宝,杜昌文*,申亚珍,周健民
(中国科学院南京土壤研究所,土壤与农业可持续发展国家重点实验室,南京 210008)

摘要: 采用不同中红外光谱(漫反射光谱、衰减全反射光谱和光声光谱)对不同氮处理的小白菜进行表征。结果表明,小白菜不同的红外光谱具有明显不同的光谱特征,主要表现于峰形、峰位以及相对峰强度;中红外漫反射光谱的主要吸收峰分别为2800～3800 cm^{-1}、2200～2500 cm^{-1}、1500～1700 cm^{-1}和1000～1500 cm^{-1},衰减全反射光谱由于水的强烈干扰可用的吸收峰主要在1200～1500 cm^{-1},而中红外光声光谱的主要吸收峰分别为2800～3800 cm^{-1}、1500～1700 cm^{-1}、1200～1500 cm^{-1}和1000～1200 cm^{-1}。漫反射光谱、衰减全反射光谱和光声光谱的主成分分析表明,不同氮处理主成分分布特征明显不同,且第一主成分(PCA1)均与施氮量显著相关,相关系数(r)分别为0.9103、0.8527和0.9366。这三种光谱利用主成分分布均可实现小白菜氮营养快速诊断,且光声光谱由于其独特的原位逐层扫描功能而表现出更好的诊断效果,在植物营养诊断中表现出较强的应用潜力。

关键词: 小白菜;营养诊断;红外光谱;主成分
中图分类号: S123;S634.3.601 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2013)04-1012-06

Diagnosis of Chinese cabbage nitrogen nutrition using mid-infrared spectroscopy

YANG Jia-bao, DU Chang-wen*, SHEN Ya-zhen, ZHOU Jian-min
(*The State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture/Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

Abstract: Chinese cabbage was rapidly characterized using techniques of mid-infrared spectroscopy (diffusion reflectance spectroscopy, attenuated total reflectance spectroscopy and photoacoustic spectroscopy). The results show that the characteristics of different infrared spectra of Chinese cabbage are significantly different, which are demonstrated by the appearance, position and relative intensity of absorption bands. For the mid-infrared diffusion spectra, the main absorption bands are 2800-3800 cm^{-1}, 2200-2500 cm^{-1}, 1500-1700 cm^{-1} and 1000-1500 cm^{-1}, for the attenuated total reflectance spectra there is only useful wavenumber region of 1200-1500 cm^{-1} due to the strong interference of water, and for the photoacoustic spectra the main absorption bands are 2800-3800 cm^{-1}, 1500-1700 cm^{-1}, 1200-1500 cm^{-1} and 1000-1200 cm^{-1}. The principal components analysis of infrared spectra indicates the principal component distributions are related to the nitrogen application rate, and there are linearly correlations between the first principal component and the nitrogen application rate, the regression coefficients (R) for diffusion reflectance spectra, attenuated total reflectance spectra and photoacoustic spectra are 0.9103、0.852 and 0.9366, respectively. Therefore, these three infrared techniques can be used in the rapid diagnosis of nitrogen nutrition of Chinese cabbage combining principal component analysis, and photoacoustic spectroscopy is more promising in the diagnosis of plant nutrition due to the convenient in situ measurement as well as depth-profiling function.

收稿日期: 2012-09-29 **接受日期:** 2013-04-08
基金项目: 中国科学院知识创新重要方向性项目(KZCX2-YW-QN411)资助。
作者简介: 杨家宝(1986—),男,福建泉州人,博士研究生,主要从事蔬菜氮素营养研究。E-mail: jbyang@issas.ac.cn
* 通信作者 Tel: 025-86881565, E-mail: chwdu@issas.ac.cn

Key words: Chinese cabbage; nutrition diagnosis; infrared spectroscopy; principal component

蔬菜多为喜肥作物,尤其叶菜类更是喜氮素肥料,所以生产上为了追求高产,常常过量施用氮肥导致氮的奢侈吸收,并累积大量的硝酸盐[1]。虽然硝酸盐对人体没有直接的毒害作用,但进入人体后,会还原成有毒的亚硝酸盐,它可与人体血红蛋白反应,使之失去载氧功能,造成高铁血红蛋白症;另一方面,亚硝酸盐还可在胃腔中形成强致癌物—亚硝胺[2]。因此,控制蔬菜中硝酸盐的含量受到广大研究者的关注。目前我国蔬菜生产中存在着严重的过量施肥问题,这不仅导致肥料利用率降低和生产成本增加,而且还会引起土壤质量下降、农产品品质变劣、水体污染等一系列严重问题[3]。

小白菜是人们喜爱的大众化叶菜类蔬菜,现占长江中下游大中城市蔬菜复种面积的30%～40%,而且北方也大量引种栽培。然而小白菜过量施肥(尤其是氮肥)导致硝酸盐超标问题广泛为人们所关注[4]。如何有效快速地判断小白菜的氮肥供应状况无疑对保障小白菜的产量以及质量具有重要意义。传统氮营养诊断主要依赖化学分析的方法[5],但化学分析方法需要对样品进行预处理,耗时长,不适应于叶菜的快速质量监控和养分管理,而仪器分析方法为快速营养诊断提供了可能。在仪器分析方法中,红外光谱分析技术由于其分析速度快且分析成本低,因而在农产品品质分析中得到广泛应用,但其主要应用于糖类、油脂、蛋白质、纤维素等的分析测定[6-9],而植物中的糖类、油脂、蛋白质、纤维素等组成与结构可与氮关联,因此红外光谱为蔬菜氮营养诊断提供了新的方法和思路。

本研究以小白菜为试验材料,采用三种类型的红外光谱(红外光声光谱、红外漫反射光谱和红外衰减全反射)获取小白菜叶片红外光谱特征,并应用于小白菜的氮营养诊断,以期为快速的植物营养诊断提供思路和方法。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试小白菜品种为上海青(抗热605),供试土壤为菜园土,采自南京市浦口区蔬菜基地0—15 cm耕层土壤,其基本养分状况为有机质含量36.8 g/kg、碱解氮78.9 mg/kg、速效磷46.2 mg/kg、速效钾297.5 mg/kg、pH 4.50。土样去除石子及根茎杂物后室温风干,过2 mm筛。

1.2　试验设计

试验为盆栽试验,试验用盆直径为28 cm,高12 cm,每盆装土5 kg。设置4个施氮水平,分别为N 0、0.15、0.3、0.6 g/kg,表示为CK、N1、N2、N3,每个处理重复4次;磷、钾肥用量相同,施P_2O_5 0.15 g/kg, K_2O 0.10 g/kg;氮肥用尿素,磷肥为磷酸二铵,钾肥为氯化钾。磷、钾肥均一次性基施,氮肥60%基施,40%在四叶一心时追施。肥料均以水溶液施入。

将小白菜种子用滤纸包裹,加去离子水,浸种,置于25℃培养箱48 h后播种,每盆播种40株,出苗后2叶1心时间苗,每盆定8株。试验期间各处理管理一致,种植40 d后采样进行光谱测定。

1.3　红外光谱的测定

采用傅里叶变换红外光声光谱仪(Nicolet 6700,美国);光声附件采用Model 300(METC,美国),漫反射附件采用上置式漫反射附件(Bruker,德国),衰减全反射附件采用45℃ ZnSe ATR(Bruker,德国)进行测定。

将新鲜叶片样品置于铝质样品池(直径10 mm、高5 mm),氮气吹扫10 s,以碳黑为参照,测定红外光声光谱[10-11];直接将新鲜叶片置于附件样品仓,测定漫反射光谱;测定衰减全反射光谱时,将新鲜叶片用研钵磨成浆状,然后置于ATR样品池。以上光谱扫描均为中红外区域(1000～4000 cm^{-1}),连续进行32次扫描重复,扫描间隔为2 cm^{-1},动镜速率为0.32 cm/s。

1.4　光谱数据处理

将获得的叶片红外光谱均进行高斯滤波和标准化前处理[12],利用主成分分析(principal component analysis, PCA)对不同红外光谱方法进行定性比较。一个样本的红外光谱大约包括1500个观测数据点,光谱的主成分分析是利用数学转换的方法将这约1500个观测数据转成几个潜变量(主成分),且这几个潜变量包含了足够多的原数据点中的变异信息;主成分分析结果通常用主成分得分(component scores)表征样本[13-14]。分别以氮肥用量和主成分为自变量和因变量进行线性回归分析,即主成分回归(principal component regression,PCR),从而表征光谱对施氮量的响应。

以上光谱数据均采用Matlab2009软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 小白菜的中红外漫反射光谱

不同氮水平下小白菜叶片的中红外漫反射光谱如图1，在1000～4000 cm^{-1}波区有5个强吸收带。3100～3800 cm^{-1}主要是N－H和O－H的伸缩振动吸收区；2800～3000 cm^{-1}主要是脂肪族C－H的伸缩振动吸收区；2200～2500 cm^{-1}为空气中二氧化碳的干扰吸收；1500～1700 cm^{-1}主要为C＝C、C＝O和C＝N等伸缩振动以及N－H弯曲振动等；1200～1500 cm^{-1}主要为C－H、N－H的变形振动以及N－O、N＝O等伸缩振动吸收区[6]。

不同氮处理小白菜的光谱形状基本上一致，尽管不同处理样品各个吸收峰的相对强度以及相对应的波数发生了明显改变，但是从光谱图上无法看出正常氮或过量氮处理间的差别。这主要是因为氮供应量的不同使得叶片的结构与组成发生复杂的变化，因此中红外区的主要分子键的振动都直接或间接地受到氮供应的影响，分子键发生改变但存在较强的相互干扰。因此，需要对光谱作进一步数学处理，以提取与氮供应有关联的信息。

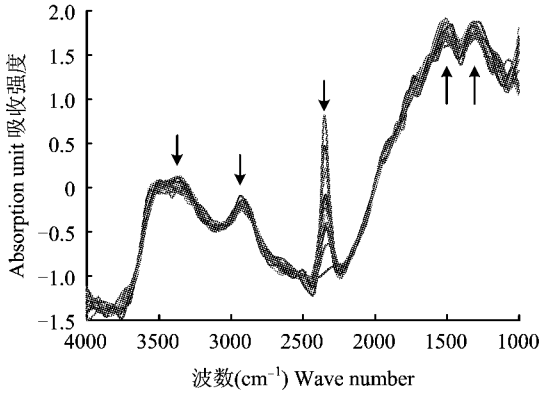

图1 不同氮水平下小白菜叶片的中红外漫反射光谱（n＝16）

Fig. 1 Mid-infrared diffusion spectra of leaves of Chinese cabbage under different N rates（n＝16）

图1中的红外光谱涉及到大量数据，而单个数据携带的信息量有限，很难对样本信息进行直观地表征，因此，有必要对光谱数据进行降维，而主成分分析则为光谱降维提供了强有力的手段。通过对16条光谱数据的主成分分析表明，第一主成分（PCA1）和第二主成分（PCA2）携带的变异信息为50.72%和28.96%，即PCA1和PCA2携带约原光谱变异信息的80%，因此可以用这两个主成分作为新的变量对样本进行表征。两个主成分的分布见图2。从图2可以看出，不同氮处理的差异主要隐含在PCA1，随着氮水平的增加，PCA1的数值增大。将PCA1与施氮量进行线性回归（图3），结果表明，施氮量和PCA1间呈显著的线性相关关系，相关系数（r）达0.9103。同时，根据主成分分布（图2），样品可以分成两大类，第一类（左边虚线框）包括CK和N1处理，第二类（右边虚线框）包括N2和N3处理；CK和N1处理以及N2和N3处理均有一定的交叉。

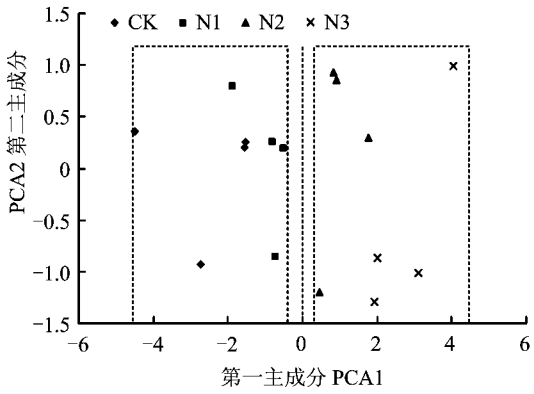

图2 不同氮水平下小白菜叶片的中红外漫反射光谱主成分分布（n＝16）

Fig. 2 The principal component distribution based on mid-infrared diffusion reflectance spectra of leaves of Chinese cabbage（n＝16）

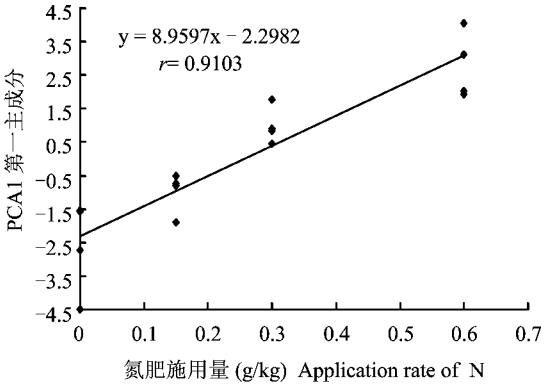

图3 中红外漫反射光谱第一主成分与施氮量的线性回归（n＝16）

Fig. 3 The linear regression between nitrogen application rate and the first principal component of mid-infrared diffusion reflectance spectra（n＝16）

不同处理小白菜生长状况如图4所示，由此看出，CK和N1处理小白菜的生长较为正常，CK处理的生长状况略好于N1；N2和N3处理的小白菜生长

图 4　不同氮水平下小白菜的生长状况

Fig. 4　The growth status of Chinese cabbage under different nitrogen application rates

已因氮的过量施用而明显受到抑制。小白菜的生长状况与图 2 中的主成分分布相吻合，表明中红外漫反射光谱可以表征小白菜的生长状况，可用于小白菜的氮营养诊断。

2.2　小白菜的中红外衰减全反射光谱

小白菜叶片的中红外衰减全反射光谱见图 5。由于水分的红外吸收很强，而小白菜叶片中的水分更易与衰减全反射晶体接触，因此，叶片的中红外衰减全反射光谱中水分的吸收很强，主要表现在 2800 ~ 3800 cm^{-1}（O－H 伸缩振动）和 1500 ~ 1800 cm^{-1}（O－H 弯曲振动）两处。显然，这两处水分的强吸收严重地干扰了 1000 ~ 4000 cm^{-1} 叶片组分的吸收，从而使得该波区难以应用。尽管如此，在 1000 ~ 1500 cm^{-1} 处吸收干扰很小，且不同处理样品间存在明显变异（图 5），因此衰减全反射光谱依然可能用于叶片的氮营养诊断。

同样对衰减全反射光谱进行主成分降维分析，PCA1 和 PCA2 包含的变异信息分别为 73.32% 和 21.06%，包含的总变异达 94.38%，因此这两个主成分也能很好地代表全谱信息。

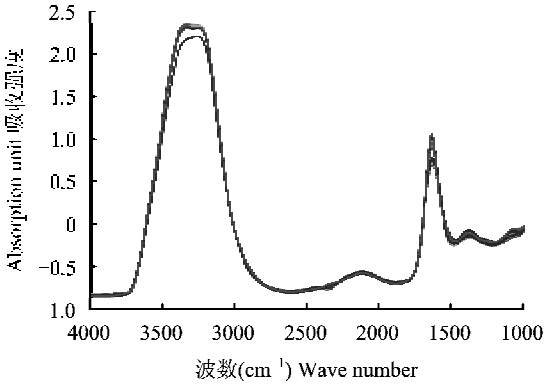

图 5　小白菜叶片的中红外衰减全反射光谱（n =16）

Fig. 5　Mid-infrared attenuated total reflectance spectra of leaves of Chinese cabbage（n =16）

主成分分析（图 6）表明，氮的施用量也与 PCA1 相关，施氮量增加时 PCA1 数值减少，呈负相关关系，与漫反射光谱的正相关关系相反。施氮量和 PCA1 间的线性相关关系显著，相关系数（r）达 0.8527（图 7）。不同处理也可以分为两类，与漫反射光谱的结果类似，即 CK 和 N1 处理为一类，N2 和 N3 处理为一类（图 6）。这表明衰减全反射光谱也可以用于小白菜的氮营养诊断，且两大类之间的差别更为明显，即与小白菜的实际生长状况更为吻合，这与两种光谱信号的获取方式相关。漫反射光谱是获取叶片表面的信息，尽管叶片表面的结构与组成也与氮的供应相关，但叶片表面的变化无法代表全面叶片的变化，而衰减全反射光谱在采集样品时需要将样品磨碎混匀，能更好地反映叶片整体的变化。

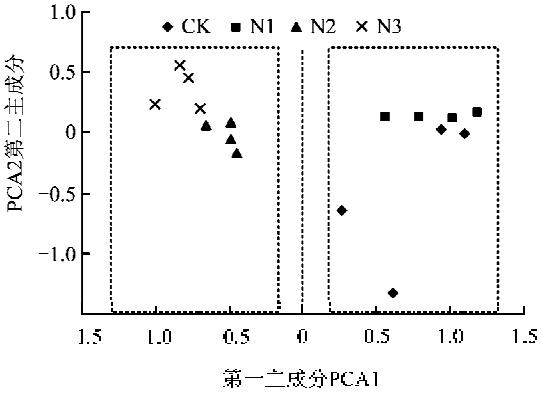

图 6　不同氮水平下小白菜叶片的中红外衰减全反射光谱主成分分布（n =16）

Fig. 6　The principal component distribution based on mid-infrared attenuated total reflectance spectra of leaves of Chinese cabbage（n =16）

2.3　小白菜的中红外光声光谱

小白菜叶片的中红外光声光谱的吸收峰与红外漫反射光谱大体类似，但峰形存在明显不同（图 8）。首先，中红外光声光谱也有 5 个明显的强吸收峰，分

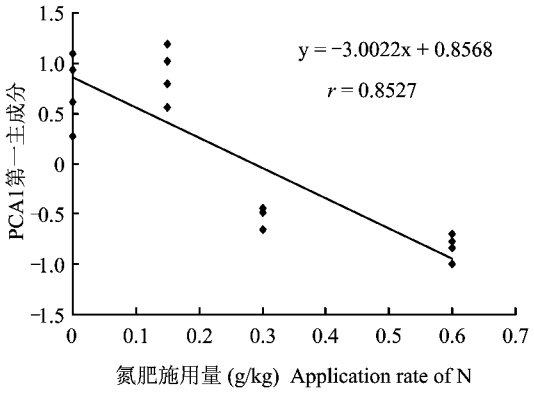

图7 中红外衰减全反射光谱第一主成分与施氮量的线性回归（$n=16$）

Fig. 7 The linear regression between nitrogen application rate and the first principal component of mid-infrared attenuated total reflectance spectra（$n=16$）

别为3000～3800 cm^{-1}、2800～3000 cm^{-1}、1500～1700 cm^{-1}、1200～1500 cm^{-1}和1000～1200 cm^{-1}，各个吸收峰较漫反射光谱的吸收峰尖锐。其次，2200～2500 cm^{-1}二氧化碳的吸收峰基本消失，这主要是因为漫反射光谱的样品是处于开放的环境中，而光声光谱是处于密封环境且通过氦气吹扫驱除了样品环境中的二氧化碳；在1000～1200 cm^{-1}增加了一个吸收峰，这可能由于漫反射光谱带宽大，使得1200～1500 cm^{-1}和1000～1200 cm^{-1}区域的吸收兼并成了一个峰，而光声光谱带宽小，因而不容易发生兼并。另外，光声光谱在1000～1700 cm^{-1}区域的各个特征峰之间相对独立，而漫反射红外光谱在这个区域类似肩峰，相互间的交叉重叠更多；同时，相对强度也发生明显改变，中红外光声光谱在1000～1200 cm^{-1}区域吸收峰的相对强度明显高于该区域中红外漫反射光谱的上强度，如含氮氧振动吸收的1200～1500 cm^{-1}区域，中红外光声光谱的峰形与中红外漫反射光谱明显不一样，中红外光声光谱的主吸收峰偏左，在1400 cm^{-1}左右，而中红外漫反射光谱的主吸收峰偏右，在1300 cm^{-1}左右。

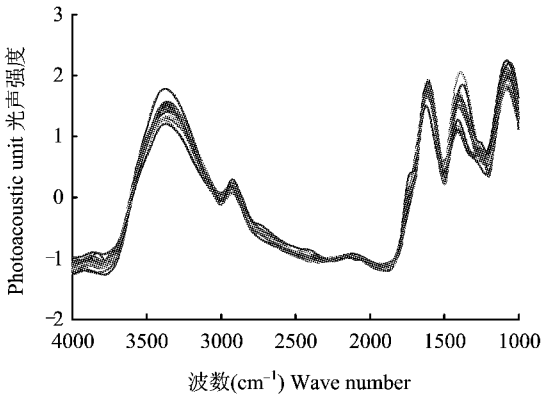

图8 小白菜叶片的中红外光声光谱（$n=16$）

Fig. 8 Mid-infrared photoacoustic spectra of leaves of Chinese cabbage（$n=16$）

对红外光声光谱进行主成分分析。PCA1和PCA2包含的变异信息分别为55.03%和23.36%，总变异达78.39%，因此这两个主成分可以表征叶片全谱信息。主成分分析表明，氮的施用量也与PCA1相关（图9），施氮量增加时PCA1数值增加，呈正相关关系，与漫反射光谱的正相关关系一致，但与衰减全反射的结果相反。施氮量和PCA1间呈显著线性相关关系，相关系数（r）为0.9366（图10）。不同处理也可以分成两类，与漫反射光谱的结果类似，即CK和N1处理为一类，N2和N3处理为一类（图9）。因此，中红外光声光谱也可用于小白菜的氮营养诊断，且第一主成分与氮用量表现出更好的相关性。

中红外漫反射光谱、中红外衰减全反射光谱以及中红外光声光谱均可以用于小白菜的氮营养诊断，诊断的结果具有一定的相似性且均与实际情况吻合。三种光谱的主成分分布表明，正常氮和过量氮供应的小白菜均能被区分，且区分的临界点均为PCA1值为0时，漫反射光谱与光声光谱表明，PCA1大于0时为氮过量，小于0时为正常（或不足），而衰减全反射光谱与之相反。漫反射光谱是原位获取叶片样品表面的信息，反映的是样品表面的组成与结构；衰减全反射代表的是整体样品信息，主要代表

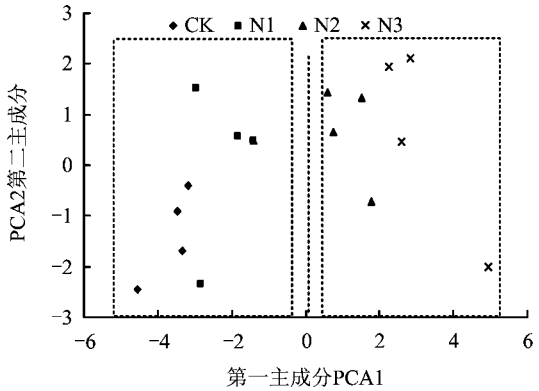

图9 不同氮水平下小白菜叶片的中红外光声光谱主成分分布（$n=16$）

Fig. 9 The principal component distribution based on mid-infrared photoacoustic spectra of leaves of Chinese cabbage（$n=16$）

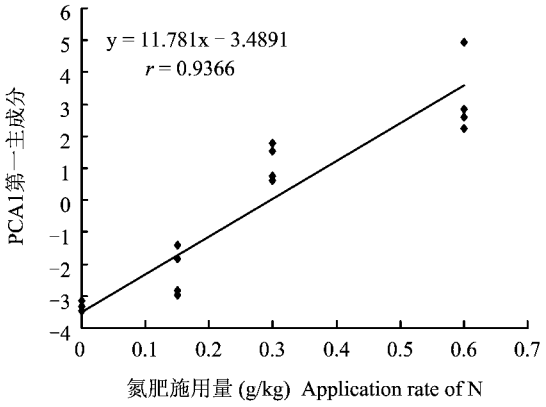

图 10　中红外光声光谱第一主成分与施氮量的线性回归（n =16）

Fig. 10　The linear regression between nitrogen application rate and the first principal component of mid-infrared photoacoustic spectra（n =16）

样品中可溶性物质（包括可溶性小分子蛋白质、糖类以及阴离子等）[15]；光声光谱具有逐层扫描的功能，它是原位获取叶片样品自表面以下若干厚度（约几十个微米）的样品信息，即可反映表面层组成与结构信息[16]。因此，三种方法特点各异，均能实现氮营养诊断的目的，同时均有超前性，即在植物生长出现症状之前就可以诊断，为保障产量和质量提供了强有力的手段。同时，三种光谱方法中，光声光谱由于原位性和更好的代表性，诊断效果更好，在植物营养诊断中具有广阔的应用空间。

3　结论

不同氮处理的小白菜具有明显不同的中红外光谱特征，漫反射光谱、衰减全反射光谱以及光声光谱均能表征小白菜的氮营养状况，并能通过主成分回归分析进行氮营养诊断，且这种诊断方法具有超前性，即在植物表现出症状之前就可以进行，从而能更好地指导施肥并保证作物的稳产和优质。这三种光谱方法在获取叶片信息中存在明显差异，其中光声光谱能原位获取叶片表面层的信息，代表性更好，因而诊断效果更好，在植物营养诊断中具有较强的应用潜力，但基于红外光谱的定性和定量的诊断体系还需要通过进一步系统的试验和分析来构建。

参 考 文 献：

[1] 王正银，李会合，李宝珍，等. 氮肥、土壤肥力和采收期对小白菜体内硝酸盐含量的影响[J]. 中国农业科学，2003，36(9)：1057-1064.
Wang Z Y, Li H H, Li B Z *et al.* Influence of nitrogen rates, soil fertility and harvest time on nitrate in Chinese cabbage[J]. Sci. Agric. Sin., 2003, 36(9): 1057-1064.

[2] 郭丽娜，刘秀珍，赵兴杰. 施肥及环境因素对蔬菜硝酸盐积累影响的研究进展[J]. 山西农业大学学报，2005，25(4)：416-419.
Guo L N, Liu X Z, Zhao X J. Effects of fertilization and environmental factors on nitrate accumulation in vegetables[J]. J. Shanxi Agric. Univ., 2005, 25(4): 416-419.

[3] Zhu J H, Li X L, Christie P, Li J L. Environmental implications of low nitrogen use efficiency in excessively fertilized hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) cropping systems[J]. Agric. Ecosys. Environ., 2005, 111: 70-80.

[4] 侯喜林. 不结球白菜育种研究新进展[J]. 南京农业大学学报，2003，26 (4)：111-115.
Hou X L. Advances in breeding of non-heading Chinese cabbage [J]. J. Nanjing Agric. Univ., 2003, 26 (4): 111-115.

[5] 王小丽，杨丹妮，黄丹枫. 氮素形态对小白菜生长和碳氮积累的影响[J]. 应用生态学报，2012，23(4)：1042-1048.
Wang X L, Yang D N, Huang D F. Effects of different applied nitrogen forms on pakchoi (*Brassica chinensis*) growth and its carbon and nitrogen accumulation[J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2012, 23(4): 1042-1048.

[6] Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman D I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues[J]. Appl. Spectrosc. Rev., 2008, 43: 134-179.

[7] Vaknin Y, Ghanim M, Samra S *et al.* Predicting Jatropha curcas seed-oil content, oil composition and protein content using near-infrared spectroscopy-A quick and non-destructive method[J]. Ind. Crops Prod., 2011, 34: 1029-1034.

[8] Tamas S, Jozsef L, Mihaly D, Sandor T. Protein content determination in Brassica oleracea species using FT - NIR technique and PLS regression[J]. Intern. J. Food Sci. Techn., 2012, 47: 436-440.

[9] Brandao L F P, Braga J W B, Suarez P A Z. Determination of vegetable oils and fats adulterants in diesel oil by high performance liquid chromatography and multivariate methods [J]. J. Chromatogr., 2012, 1225: 150-157.

[10] McClelland J F, Jones R W, Bajic S J. Photoacoustic spectroscopy[A]. Chalmers J M, Griffiths, P R. Handbook of vibrational spectroscopy (Vol. II)[M]. USA, New York: Wiley & Sons, 2001.

[11] Du C, Zhou J, Wang H *et al.* Determination of soil properties using Fourier transform mid-infrared photoacoustic spectroscopy [J]. Vibrat. Spectrosc., 2009, 49: 32-37.

[12] Savitzky A, Golay M J E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures[J]. Anal. Chem., 1964, 36: 1627-1639.

[13] Abdi H, Williams L J. Principal component analysis[J]. Wiley Interdiscipl. Rev.: Comput. Stat., 2010, 2: 433-459.

[14] Martens H, Martens M. Multivariate analysis of quality: An introduction [M]. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2001.

[15] Du C W, Zhou J M. Evaluation of soil fertility using infrared spectroscopy: a review[J]. Environ. Chem. Lett., 2009, 7: 97-113.

[16] Du C W, Zhou J M, Wang H Y. Depth profiling of clay-xanthan complexes using step-scan mid-infrared photoacoustic spectroscopy[J]. J. Soils Sedim., 2010, 10: 852-855.