

基于 LA-ICP-MS 的文旦柚果实养分原位可视化与半定量分析新方法

王寒雪, 陈昊, 洪佳伟, 陈玥勤, 廖红*

福建农林大学资源与环境学院, 根系生物学研究中心, 福州 350000

摘要 原位可视化果实养分浓度, 有助于解析果实养分分配及需求规律, 为果树科学合理施肥提供理论依据。本研究建立了一种基于激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)、原位可视化文旦柚果实养分浓度的新方法。该方法使用石蜡切片方法进行前期处理避免由于果实柔软、多汁等导致组织破损的问题; 使用飞秒激光器, 以研究对象的空间分辨率为主要, 通过不同组织离子强度展示各养分的具体分布, 并且使用外标法进行基体校正并提供柑橘属中养分元素的相对含量, 原位半定量并可可视化分析了文旦柚果实不同部位不同组织的养分浓度。结果表明, 文旦柚果实中, 钾、氮、钙、镁和磷浓度较高, 主要集于黄皮层的角质层、白皮层的维管束类组织及汁胞的表皮组织。其中, 钙相对平均浓度在黄皮层高达 $516.21 \pm 387.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 锌相对平均浓度在黄皮层的角质层上可达 $410.22 \pm 279.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 二者在汁胞中表皮细胞相对浓度最高, 暗示钙和锌在文旦柚果实中具有重要的营养作用。

关键词 原位可视化, 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱法, 半定量方法, 养分分布

果实在人类的日常饮食中有着重要作用, 是多种维生素和矿物质的重要来源, 其品质和产量受果实中的养分元素分布与含量直接影响(徐浩等, 2022; Cao et al., 2024)。传统的养分分析方法通常需要对样品进行预处理, 如使用消解等方法精确的量化整个果实中不同养分含量和浓度(赵文志等, 2023)。然而, 果实包含多个组织结构, 简单的定量方法无法精确了解各组织结构上养分分布。因此, 发展一种能够原位、可视化地分析果实中养分浓度的新方法具有重要意义。激光剥蚀电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)作为一种先进的微区分析技术, 为实现这一目标提供了可能(Becker et al., 2008; Becker et al., 2009; Becker et al., 2014; Limbeck et al., 2015)。

LA-ICP-MS 结合了激光剥蚀技术和电感耦合等离子体质谱技术的优点, 能够对固体样品进行直接分析, 无需复杂的样品预处理过程(Sussulini et al., 2015; Limbeck et al., 2015)。其基本原理是利用高能激光束聚焦于样品表面, 将样品烧蚀成微小颗粒, 然后通过载气将这些颗粒运输到电感耦合等离子体(ICP)中, 在高温下电离成离子, 最后通过质谱仪检测离子的质荷比, 从而确定样品的元素组成和含量(Becker et al., 2009; Becker et al., 2014; Limbeck et al., 2015; 张海鸥等, 2021; Kukusamude et al., 2024)。LA-ICP-MS 具有灵敏度高、分析速度快、空间分辨率高、可进行多元素同时分析等优点, 已广泛应用于地质学、材料

收稿日期: 2025-06-19; 接受日期: 2025-10-11

基金项目: 校创基金(No.105-KFB24130A)

* 通讯作者。E-mail: hliao@fafu.edu.cn

科学、环境科学、生物医学等领域。

在植物科学领域, LA-ICP-MS 已被成功应用于多种植物组织中养分元素的空间分布分析(Wu et al., 2009; Yang et al., 2014; Diniz et al., 2019; Cui et al., 2023)。Wu 等利用 LA-ICP-MS 对植物叶片中的钾、镁、锰、铜、磷、硫和硼等营养元素进行了定量成像分析, 获得了元素在叶片中的分布图(Wu et al., 2009)。此外, LA-ICP-MS 还被用于研究植物体内元素的吸收、运输和积累机制(Becker et al., 2009; Yang et al., 2014; Yamaji and Jian Fengma, 2019)。Hanc 使用 LA-ICP-MS 技术探明了铅在豌豆根部中的分布, 揭示了铅在豌豆根叶间的远距离运输(Hanc et al., 2008); 王宇等使用 LA-ICP-MS 技术发现 TiO₂ 有效地增强了营养物质在黄瓜幼苗叶片中的分布, 导致叶柄和叶脉中营养物质浓度较高(Wang et al., 2025)。

目前 LA-ICP-MS 的使用集中在粮食作物或者根系叶片等组织中部分元素分布, 但植物不同组织、不同细胞类型以及元素含量差异很大(Papaslioti et al., 2019)。柑橘类果实不同部位各组织之间区分并不明显, 消解定量方法无法区分不同组织结构养分差异, 并且在果实中将养分可视化的案例几乎空白。度尾文旦柚 (*Citrus maxima* (Burm.) Merr. cv. "Duweiwendan") 属于芸香科柑橘属, 福建省地方特色品种(卢锦澜, 2020), 与大部分柚类一样, 包括黄皮层、白皮层、囊衣和汁胞等组织结构(赖长鸿等, 2024)。相较于大部分柚类, 文旦果汁胞和囊衣易于分离, 在试验过程中能更好的获取完整材料。基于此, 本研究以度尾文旦柚为研究对象, 通过使用 LA-ICP-MS (激光剥蚀电感耦合等离子质谱) 技术, 原位可视化果实中养分浓度, 以期为果实的科学种植、品质调控和营养评价提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 果实材料

试验点位于福建省莆田市仙游县度尾镇(25.416°E, 118.578°N), 果园主要施用有机肥, 每年每株施氮 0.9–1.8 kg, 施磷 1.05–2.1 kg, 施钾 1.05–2.1 kg。试验树树龄约 20 年, 砧木为酸柚或苦柚, 树高 3–5 m, 冠幅 4–6 m。土壤为红壤土, 0–20 cm 基本土壤理化性质如为 pH 值 6.33±0.57, 有机质 2.54±0.33 g·kg⁻¹, 碱解氮 88.32±17.65 mg·kg⁻¹, 有效磷 184.56±44.21 mg·kg⁻¹; 20–40 cm 土壤理化性质为 pH 值 5.14±0.57, 有机质 1.22±0.34 g·kg⁻¹, 碱解氮 41.32±11.41 mg·kg⁻¹, 有效磷 105.25±40.08 mg·kg⁻¹。选取具有代表性的成熟期文旦柚果实样品 8–10 个, 将果实使用一级水清洗表面后, 参考赖长鸿等对柚类果实不同部位取样方法, 将果实分为黄皮层(Flavedo)、白皮层(Albedo)、囊衣(Segment Membrane)和汁胞(Juice sac)4 个部位(图 1A)(赖长鸿等, 2024)。

1.2 样品制备

参考龙健梅和郭文武进行组织切片。取黄皮层、白皮层和汁胞组织样品, 根据 Agilent Technologies 8900 ICP-MS 仪器可用范围, 每个部位取样品 3–5 mm × 3–5 mm, 囊衣组织宽度很窄, 无法进行样品切片。其他组织样品使用 FAA 固定液将样品固定于青霉素小瓶中, 抽真空过夜后, 使用 30%、50%、75%、85%、95%乙醇和无水乙醇分别脱水 1.5 小时; 脱水后依次使用 1:4、2:3、3:2、4:1 比例二甲苯-无水乙醇和纯二甲苯进行脱色至透明; 加入石蜡透蜡后包埋, 使用 Leica RM2235 轮转式切片机制片, 由于植物

组织硬度较小,需将样品厚度控制在 LA-ICP-MS 的可使用厚度 20–100 μm 之间,完成切片后在 Leica HI1210 摊片机上过夜烤干,次日将载玻片转移至 T0 型生物制片透明剂中透蜡即可(龙健梅和郭文武, 2018)。

1.3 LA-ICP-MS 使用原理

仪器使用上海凯莱仪器有限公司提供 Genesis GEO 与 ICP TOF R 进行测定。激光剥蚀系统采用飞秒激光器(波长 343 nm)使用高能量聚焦激光束按行扫描果实样品及标样压片,使样品局部气化后形成气溶胶。灼烧后的样品物质由载气 Ar 送入 ICP,在高温等离子体中发生电离,产生离子通过质谱分析仪进行质量分离和检测,从而检测 P^{31} 、 K^{39} 、 Ca^{44} 、 Mg^{24} 、 Fe^{57} 、 Mn^{55} 、 Cu^{63} 、 Zn^{66} 、 S^{34} 、 Al^{27} 、 Cr^{52} 、 Mo^{95} 、 Pb^{208} 、 Sr^{88} 和 Rb^{85} 的离子强度。

1.4 LA-ICP-MS 参数优化

LA-ICP-MS 包分为激光和质谱两部分参数。激光参数(LA)包括激光波长、激光器能量、剥蚀频率、像素大小和衰减速度等。激光波长通常选择紫外激光,本研究使用飞秒激光器,波长为 343 nm,因为紫外激光具有较高的能量和较小的光斑尺寸,能够实现高空间分辨率的分析。激光器能量需要根据样品的性质进行优化,过高的能量密度可能导致样品烧蚀过度,产生基体效应,影响分析的准确性;过低的能量密度则可能导致信号强度不足,降低分析的灵敏度。像素大小的选择需要在空间分辨率和信号强度之间进行权衡。本研究主要以研究对象空间分辨率为主,通过不同组织离子强度显示各养分的具体分布。

质谱(ICP-MS)参数包括射频功率(RF)、雾化器流量、等离子体气体流量等。射频功率影响等离子体的温度和电离效率,需要优化以获得最佳的离子信号强度。雾化器流量影响气溶胶的传输效率和等离子体的稳定性,需要调整以获得最佳的信噪比。等离子体气流量通常指辅助气流量和冷却气流量,影响仪器灵敏度、基体效应和干扰水平(Aghaei et al., 2014)。

文旦柚果实各部位样品区别于其他植物样品,具有柔软、多汁等特点,测定时需进行优化。优化后 LA-ICP-MS 检测参数见表 1。

表 1 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)基本参数

Table 1 Basic parameters of laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)

Parameters of laser ablation system		Parameters of ICP-MS	
Wavelength of laser (nm)	343	Nebulizer gas flow (L/min)	1.08
Chamber He (mL/min)	150	Plasma gas flow (L/min)	14
Sniffer He (mL/min)	200	RF power (W)	1400
Ablation frequency (Hz)	50	Detector	MCP
Scan rate ($\mu\text{m/s}$)	500	Reaction gas type	No gas
Laser energy (W)	10		
Attenuation (%)	10		
Spot size (μm)	10		

1.5 LA-ICP-MS 数据采集与处理

数据采集模式: LA-ICP-MS 数据采集模式有点分析、线扫描和面扫描等(Hennekam et al., 2015)。点分析适用于分析样品中特定点的元素含量;线扫描适用于分析样品中沿某一方向元素分布;面扫描则可以获得样品整个表面的元素分布图像。本研中,为探究文旦柚果实各个部位养分具体分布,使用面扫描采集模式,便于获取整个部位不同组织的元素分布。

数据校正: LA-ICP-MS 数据需要进行多种校正,包括背景扣除、漂移校正和基体效应校正等。背景扣除是为了消除仪器背景信号的干扰;漂移校正为了消除由于仪器灵敏度随时间变化引起的信号漂移;基体效应校正则是为了消除由于样品基体不同引起的分析误差(Cui et al., 2023)。在仪器背景与仪器灵敏度完好的前提下,使用基体效应校正,使用外标 GBW10020 GSB-11 (柑橘叶片成份标准物质)进行校正处理。

半定量分析: LA-ICP-MS 定量分析通常采用外标法或内标法。外标法是使用一系列已知浓度的标准物质建立校正曲线,然后将样品信号与校正曲线进行比较,从而得到元素的含量(Zhu et al., 2020)。内标法是向样品中加入一种已知浓度的内标元素,然后将待测元素信号与内标元素信号进行比较,从而消除基体效应的影响(Hrdlicka et al., 2022)。由于文旦柚果实中具体元素浓度并无准确依据,因此本研究采用外标法对各个部位养分浓度进行半定量。外标标准物为柑橘叶片成分标准物质 GBW10020 GSB-11。使用标准物质可以有效减少基体效应对数据造成的影响。本研究主要目的为探究文旦柚各个部位养分分布,半定量可以快速生成元素分布图,进一步研究元素在空间上的关系。除此之外,半定量方法能够快速提供样品中各元素的相对含量信息,与简单的样品制备方法相结合,可进一步提高分析效率。

1.6 果实不同部位定量养分测定

果实黄皮层、白皮层、囊衣、汁胞中氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Fe)、镁(Mg)、锰(Mn)、锌(Zn)、硼(B)

等元素测定使用干样测定。其中, 黄皮层、白皮层、囊衣和汁胞部位氮、磷和钾参考赖长鸿等 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消解法(赖长鸿等, 2024), 消解过滤后定容, 氮和磷采用流动分析仪(Skalar San++, 荷兰)测定, 全钾采用火焰分光光度法测定。中微量元素参考赵文志等描述的方法, 使用 HNO_3 进行高温消解, 消解过滤后定容, 采用 ICP-MS 7900 (安捷伦)测定(赵文志等, 2023)。

1.7 数据处理

定量数据分析使用 SPSS Statistics 27 软件进行统计分析, 采用多变量进行双因素方差分析。Graph Pad Prism10.1.2 绘制柱状图, Excel 绘制半定量元素相对浓度峰形图。

2 结果与讨论

2.1 文旦柚果实结构及不同部位养分浓度定量分析

果树吸收养分之后, 向果实, 以及果实内不同部位进行再分配, 养分分配对果实产量和品质十分重要(丁宁等, 2012, 2016; 刘小曼等, 2021)。对文旦柚果实不同部位养分进行定量分析发现, 各部位浓度最高的养分是钾元素, 其次是氮元素和钙, 镁和磷, 其他微量元素浓度均在 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下(图 1B)。氮、磷和钾含量在汁胞中占比最高, 分别为 59.92%、75.05%和 60.31%; 其次是黄皮层、白皮层和囊衣(图 1C)。表明柚果中不同部位组织结构存在差异并且各部位养分浓度差异明显; 氮、磷、钾、钙和镁为果实中的大量养分, 铁、锌、硼和锰为微量元素。

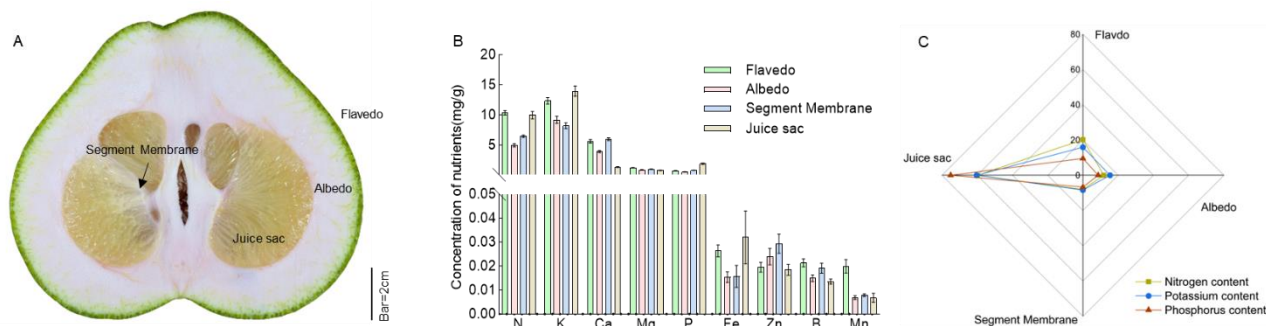


图 1 成熟期文旦柚果实各部位示意图与各部位养分分析

(A) 果实样品各个部位示意图; (B) 果实各部位养分浓度; (C) 果实各部位氮磷钾含量占比。

Figure1 The schematic diagram of each part of Wendan pomelo fruit at mature stage and nutrient analysis of each part

(A) Schematic diagram of each part of the fruit sample; (B) Nutrient concentration in different parts of fruit; (C) The proportion of nitrogen, phosphorus and potassium content in each part of the fruit.

2.2 黄皮层不同组织结构养分原位可视化

柑橘果实果皮通常由外果皮(Flavedo)、中果皮(Albedo)和内果皮(Segment Membrane)组成。其中外果皮也就是黄皮层, 直接暴露于环境中, 也是果实抵御外界伤害最主要的屏障(Macnee et al., 2020; Jentsch et al., 2024)。黄皮层包括角质层(Cuticle)、致密海绵组织(Sponge tissue)和油腺(Oil

gland) (图 2A) (Lufu et al., 2021)。在黄皮层上, 浓度最高的元素为钙, 其次是锌、钾和磷; 钙离子平均浓度为 $516.21 \pm 387.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2AI); 锌离子平均浓度 $410.22 \pm 279.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著高于钾离子 ($174.36 \pm 75.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和磷离子 ($73.25 \pm 66.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (图 2AII, III, IV); 角质层上元素浓度最高, 尤其是钙离子浓度, 最高可达 $2302.764 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其次是锌离子浓度, 磷离子和钾离子较低; 致密海绵组织元素浓度同样是钙离子最高, 锌离子次之, 然后是钾离子和磷离子较低; 油腺中各元素离子浓度均相对很低(图 2BI, II, III, IV)。结果表明, 较多元素分布在细胞排列致密角质层区域, 这可能与元素易在细胞壁吸附沉积相关。

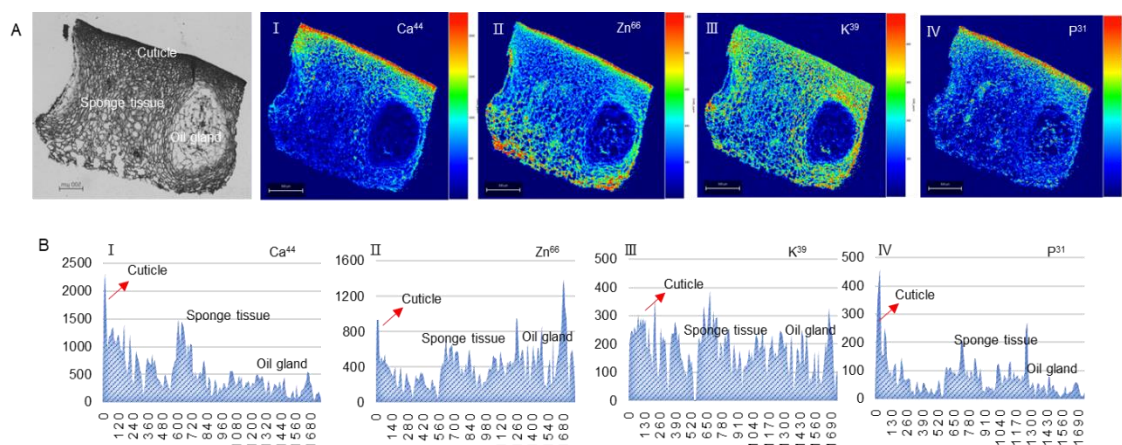


图 2 成熟期文旦柚果实黄皮层养分成像分布与相对浓度图谱

(A) 黄皮层不同组织示意图与养分分布成像; (B) 黄皮层纵向不同组织结构养分相对浓度图谱分析。I-IV: 钙元素, 锌元素, 钾元素和磷元素分布成像及图谱。

Figure 2 Nutrient imaging distribution and relative concentration map of Flavedo of Wendan pomelo fruit at mature stage

(A) Different tissue schematics and nutrient distribution imaging of Flavedo; (B) Analysis of relative concentration map of nutrients in different longitudinal tissue structures of Flavedo. I-IV: Distribution imaging and spectra of calcium, zinc, potassium and phosphorus elements.

2.3 白皮层不同组织结构养分原位可视化

果实的中果皮即白皮层, 目前并无文献对白皮层组织结构进行区分。但通过观察发现, 在白皮层上除存在大量的类似于海绵的海绵组织(Sponge tissue)外, 还包括部分类似维管束的维管组织(Vascular tissue)分布(图 3A)。白皮层中浓度最高的元素是锌元素, 平均浓度为 $404.26 \pm 561.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 其次是钙元素, 平均浓度为 $127.28 \pm 194.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 钾元素平均浓度为 $111.64 \pm 170.79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 磷元素平均浓度较低, 为 $25.02 \pm 53.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 3AI, II, III, IV)。维管组织各元素相对浓度明显高于海绵组织, 锌、钙和钾均在维管束中心处浓度很高, 并且在维管束最外围浓度较高, 形成一个环, 这可能与该组织结构相关。磷在整个维管组织中相对浓度很高, 但是在海绵组织中几乎不存在(图 3BI, II, III, IV)。推测在果实中, 磷属于双向运输的元素, 既从其他部位向果实中运输, 也从果实向其他部位运输。

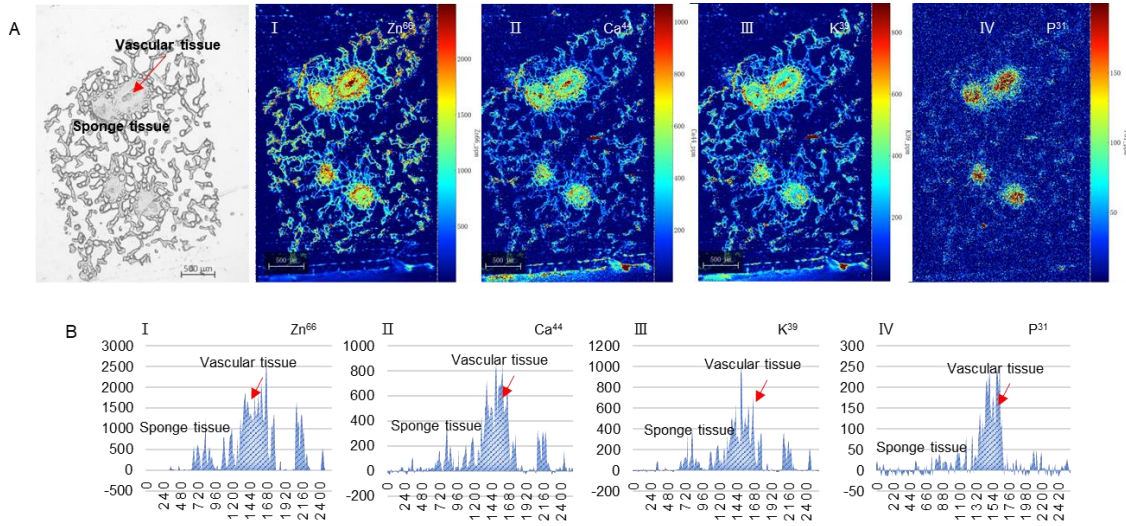


图 3 成熟期文旦柚果实白皮层养分成像分布与相对浓度图谱

(A) 白皮层不同组织示意图与养分分布成像; (B) 白皮层横向不同组织结构养分相对浓度图谱。I-IV: 锌元素, 钙元素, 钾元素, 磷元素分布成像及图谱。

Figure 3 Nutrient imaging distribution and relative concentration map of Albedo of Wendan pomelo fruit at mature stage (A) Different tissue schematics and nutrient distribution imaging of Albedo; (B) Analysis of relative concentration map of nutrients in different longitudinal tissue structures of Albedo. I-IV: Distribution imaging and spectra of calcium, zinc, potassium and phosphorus elements.

2.4 汁胞不同组织结构养分原位可视化

汁胞组织包括表皮细胞(epidermal cells, E)、下表皮细胞(subepidermal cells, SE)和果汁细胞(juice cells, JC)结构(Shomer, 1988)。汁胞中, 钙元素浓度最高, 平均 $240.29 \pm 264.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最高可达 $1021.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4AI); 其次是锌元素浓度较高, 平均 $156.76 \pm 133.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4AII); 钾和磷元素平均浓度为 $39.09 \pm 65.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $51.10 \pm 67.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4AIII, IV)。表皮细胞上钙元素最高, 其次依次为锌元素、钾元素和磷元素; 表皮下细胞上元素浓度高低依次为钙元素, 锌元素, 磷元素和钾元素相对一致; 果汁细胞中元素浓度均很低(图 4BI, II, III, IV)。进一步表明, 细胞致密是元素在汁胞外围沉积的主要原因; 同样, 钙和锌的相对高浓度暗示了二者在文旦柚果实中具有重要的营养作用。

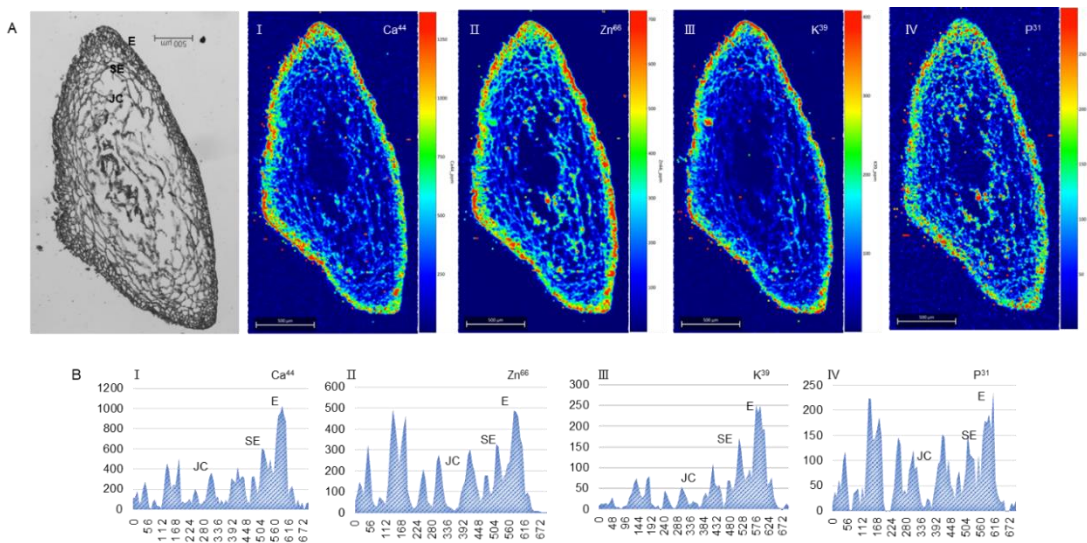


图 4 成熟期文旦柚果实汁胞养分成像分布与相对浓度图谱

(A) 汁胞不同组织示意图与养分分布成像; (B) 汁胞横向不同组织结构养分相对浓度分析图谱。I-IV: 钙元素, 锌元素, 钾元素, 磷元素分布成像及图谱。

Figure 4 Nutrient imaging distribution and relative concentration map of Juice sac of Wendan pomelo fruit at mature stage (A) Different tissue schematics and nutrient distribution imaging of Juice sac; (B) Analysis of relative concentration map of nutrients in different longitudinal tissue structures of Juice sac. I-IV: Distribution imaging and spectra of calcium, zinc, potassium and phosphorus elements.

3 讨论

矿质养分定量分析能够精确测定柚果中各种矿质元素的含量。在文旦柚果实中, 氮、磷、钾、钙、镁为大量元素, 铁、锌、硼和锰元素浓度较低, 为微量元素(图 1B), 氮磷钾均在汁胞中占比最大(图 1C)。然而, 果实各个部位组织之间结构差异显著, 使用定量分析等传统方法无法对不同组织结构的养分进行精细化区分。目前, 除了量化养分元素含量外, 使用化学染色法、同位素示踪技术和机器学习与图像处理等技术均可以将元素可视化区分, 但是其含量或者浓度却无法确定。因此, 使用离子剥蚀-电感耦合等离子质谱法将果实中元素可视化以及半定量分析不同组织结构元素在各部位的分布尤为重要。

LA-ICP-MS 是一种原位分析技术, 可以直接对植物不同组织进行原位定量或半定量分析(Cui et al., 2023)。Yamaji 等人使用 LA-ICP-MS 技术发现在水稻突变体中, 单一节上不同元素在不同组织中表达量差异明显(Yamaji et al., 2019)。在玉米中, 锌元素主要集中在种子胚芽和种皮中(Gaiss et al., 2019)。在文旦柚果实中, 各个部位高亮位置主要集中在细胞致密位置, 如黄皮层的角质层位置、白皮层的维管位置和汁胞的表皮细胞位置, 这可能与细胞壁对金属离子的吸附与沉积相关。但不同组织结构差异导致各不同元素相对浓度存在差异。而 LA-ICP-MS 能够同时测定多种元素, 从而全面了解植物体中元素的组成与分布(Wu et al., 2009; 徐世伟等, 2016)。本研究中, LA-ICP-MS 可以同时检测出 P^{31} 、 K^{39} 、 Ca^{44} 、 Zn^{66} 等 15 种元素。不同元素在各部位发挥着不同作用, Sheldon 等人研究发现在不同大麦品种中, 盐胁迫下大麦根系中钠离子浓度为对照组 5.7–6.6 倍, 尤其是在根尖和根系生长区高亮, 以此为提高根尖和根系生长区的耐盐性提供依据(Shelden et al., 2019); 同样在高污染区域的成熟期小麦籽粒中, 铅在种皮中高积累, 这为高污染区域小麦加工提供了理论依据(Zhang et al., 2022)。本研究中发现, 黄皮层中, 钙元素在角质层浓度较高, 可能是由于钙离子容易在细胞壁之间被果胶固定而形成果胶钙, 提高细胞的耐压力与延展性, 并且降低果实裂果发生(图 2AI, 2BI)(叶盛等, 2000)。锌元素在黄皮层相对浓度仅次于钙元素, 同样也在角质层上高亮。钾元素在黄皮层各组织中分布均匀(图 2AIII, BIII), 这主要与钾离子属于水溶性, 在植物体内以离子态存在, 具有移动性强的特点(王毅等, 2009; 郝艳淑等, 2011; 陈益芳等, 2025)。磷元素同样主要集中在角质层上, 可能是由于农事管理时喷洒磷酸二氢钾等叶面肥导致(图 2AIV, BIV); 建议在养分充分的情况下, 不施用叶面肥, 可减少成熟期果实养分并保证果实品质。同样, 这也表明黄皮层对抵御外界伤害, 保护果实汁胞免受农药危害有着重要作用, 并且在很大程度上降低了农药对人体的危害。

LA-ICP-MS 在实现原位分析的同时, 还具有较高的空间分辨率。不仅能对不同组织结构进行养分半定量分析, 还能够对植物体内不同区域养分进行精细化分析, 甚至精细到细胞水平, 这对于了解养分在植物生长发育过程中的迁移和积累至关重要(Thyssen et al., 2017)。养分依靠根系从土壤中吸收, 再由木质部和韧皮部等组织运输到其他部位(严小龙等, 2000; Uchida, 2000; Khan et al., 2023)。Yamaji 等人使用 LA-ICP-MS 对水稻突变体进行分析发现, 与对照相比, 突变体材料中硅元素在木质部区域沉积支持硅转运蛋

白在水稻内部维管束转运(Yamaji et al., 2019); 并且在耐盐性突变体材料 *OsHAK4* 中, LA-ICP-MS 结果表明, Na^+ 主要积累在突变体韧皮部区域(Che et al., 2024)。本研究发现, 白皮层中类似维管束组织区域锌、钙、钾和镁等移动性弱的元素除了在髓处高亮外, 还在维管束外围形成一个圆(图 3AI, II, III)。由于韧皮部汁液中含有较多螯合溶质, 可以螯合多种金属离子(王衍安, 2007; Gupta et al., 2016), 推测可能在该组织发挥着与韧皮部相似的养分运输功能。而磷元素在类似维管束组织组织中各区域均高亮(图 3IV), 表明磷作为大量元素, 在果实白皮层和其他部位之间双向移动, 移动方向可能与组织发育不同阶段相关。汁胞切片后组织结构区分明显, 各元素均在表皮细胞高亮(图 4I, II, III, IV), 进一步表明细胞壁对各元素的吸附与沉积作用。已有研究表明, 柚子中维生素 C、酚类物质和黄酮类物质可能与锌产生协同作用, 增强其对人体健康的益处(Rahman et al., 2018; Yin et al., 2023); 文旦柚汁胞中钙和锌离子相对浓度和绝对浓度较高, 推测钙和锌元素在文旦柚上具有重要的营养作用, 并且对人体健康具有一定的积极作用。

综上, 本研究利用激光离子剥蚀电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)方法建立分析成熟柚果中不同部位组织上养分元素的分布方法并且建立空间联系, 填补了对果实养分分布可视化的空白。并使用此方法半定量分析不同元素在各组织部位的相对浓度, 为后续指导文旦柚农事措施提供科学理论。

作者贡献声明

王寒雪: 设计并完成主要试验, 分析数据及撰写论文初稿; 陈昊: 参与切片和养分定量测定试验, 部分数据分析和论文修改; 洪佳伟, 陈玥勤: 参与试验切片及论文修改; 廖红: 指导实验设计、数据分析及修改论文。

参考文献

- Aghaei M, Flamigni L, Lindner H, Günther D, Hennekam ABR, Jilbert T, Mason PRD, Lange GDL, Reichart GJ (2015). High-resolution line-scan analysis of resin-embedded sediments using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Chem Geol* 403, 42-51.
- Becker J, Zoriy M, Dressler V, Wu B, Becker J (2008). Imaging of metals and metal-containing species in biological tissues and on gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): A new analytical strategy for applications in life sciences. *Pure Appl Chem* 80(12), 2643-2655.
- Becker JS, Zoriy M, Matusch A, Wu B, Salber D, Palm C (2010). Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass Spectrom Rev* 29(1), 156-75.
- Becker JS, Matusch A, Wu B (2014). Bioimaging mass spectrometry of trace elements - recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Anal Chim Acta* 835, 1-18.
- Cao S, Zeng B, Zhou X, Deng S, Zhang W, Luo S, Ouyang M, Yang S (2024). Multivariate Analysis and Optimization Scheme of the Relationship between Leaf Nutrients and Fruit Quality in 'Bingtang' Sweet Orange Orchards. *Horticulturae* 10(9), 976.
- Che J, Yamaji N, Wang SF, Xia Y, Yang SY, Su YH, Shen RF, Ma JF (2024). *OsHAK4* functions in retrieving sodium from the phloem at the reproductive stage of rice. *Plant J* 120(1), 76-90.
- Chen YF, Wang Y, Wu WH (2025). Progress of potassium and phosphorus transport and signaling in plants. *Chin. Sci. Bull.* 1-13.
- 陈益芳, 王毅, 武维华 (2025). 植物钾、磷养分吸收利用机制的研究进展. *科学通报* 1-13.
- Cui ZW, He M, Chen BB, Hu B (2023). In-situ elemental quantitative imaging in plant leaves by LA-ICP-MS with matrix-matching external calibration. *Anal Chim Acta* 1275, 341588.

- Diniz AP, Kozovits AR, Lana CDC, Abreu ATD, Leite MGP** (2019). Quantitative analysis of plant leaf elements using the LA-ICP-MS technique. *Int. J. Mass Specrom* 435, 251-258.
- Ding N, Jiang MY, Peng FT, Wei SC, Chen R, Chen Q** (2012). Studies on leaf senescence and ¹⁵N-urea absorption and utilization of 'Fuji' apple in response to topdressing nitrogen application. *Plant Nutr. Fert. Sci.* 18(03), 758-764.
- 丁宁, 姜远茂, 彭福田, 魏绍冲, 陈汝, 陈倩 (2012). 分次追施氮肥对红富士苹果叶片衰老及 ¹⁵N 吸收、利用的影响. *植物营养与肥料学报* 18(03), 758-764.
- Ding N, Peng L, An X, Chen Q, Jiang H, Jiang MY** (2016). Absorption, distribution and utilization of dwarf apple trees to ¹⁵N applied in different growth stages. *Plant Nutr Fert Sci* 22(02), 572-578.
- 丁宁, 彭玲, 安欣, 陈倩, 姜翰, 姜远茂 (2016). 不同时期施氮矮化苹果对 ¹⁵N 的吸收、分配及利用. *植物营养与肥料学报* 22(02), 572-578.
- Gaiss S, Amarasiriwardena D, Alexander D, Wu F** (2019). Tissue level distribution of toxic and essential elements during the germination stage of corn seeds (*Zea mays* L.) using LA-ICP-MS. *Environ Pollut* 252(Pt A), 657-665.
- Gupta N, Ram H, Kumar B** (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15, 89-109.
- Hanć A, Baralkiewicz D, Piechalak A, Tomaszewska B, Wagner B, Bulska E** (2009). An analysis of long-distance root to leaf transport of lead in *Pisum sativum* plants by laser ablation-ICP-MS. *Int J Environ Anal Chem* 89(8-12), 651-659.
- Hennekam R, Jilbert T, Mason PRD, Lange GJD, Reichart GJ** (2015). High-resolution line-scan analysis of resin-embedded sediments using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Chemical Geology* 403, 42-51.
- Hrdlička A, Hegrová J, Bucková M, Prochazka D, Holá M, Novotný K, Pořízka P, Kanický V, Kaiser J** (2022). Feasibility of direct analysis of algae contamination with chromium and copper on the filter with laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B. Atomic Spectroscopy* 195, 106488.
- Hao YS, Jiang CC, Xia Y, Wang XL, Chen F, Lu JW** (2011). A Review on the Mechanism of Potassium Uptake and Regulation in Plants. *Chin. Agric. Sci. Bull.* 27 (1), 6-10.
- 郝艳淑, 姜存仓, 夏颖, 王晓丽, 陈防, 鲁剑巍 (2011). 植物钾的吸收及其调控机制研究进展. *中国农学通报* 27 (1), 6-10.
- Jentsch M., Albiez V, Kardamakis TC, Speck T** (2024). Analysis of the peel structure of different *Citrus spp.* via light microscopy, SEM and μ CT with manual and automatic segmentation. *Soft Matter* 20(12), 2804-2811.
- Khan MIR, Nazir F, Maheshwari C, Chopra P, Chhillar H, Sreenivasulu N** (2023). Mineral nutrients in plants under changing environments: A road to future food and nutrition security. *The Plant Genome* 16, e20362.
- Kukusamude C, Kongsri S, Tamklang R, Taebunpakul S** (2024). Feasibility of Matrix-Matched Material for Determining Elements in Rice Flour by SN-ICP-MS and LA-ICP-MS. *Foods* 13(11), 1604.
- Lai CH, Hu YC, Li PJ, Xu YJ, Wang HM, Wang HX, Liao H** (2024). Nutrient allocation regulation in pomelo fruits and its relationship with the quality of juice sac. *South China Fruits.* 53 (3), 66-72.
- 赖长鸿, 胡逸宸, 李培杰, 许艺嘉, 王浩民, 王寒雪, 廖红 (2024). 蜜柚果实养分分配规律及与汁胞品质的关系. *中国南方果树* 53 (3), 66-72.
- Liu XM, Liu XD, Liu WD, Tan QL, Hu CX, Li JX** (2021). Nutritional status of different citrus trees and the recommended dosages of N, P and K for citrus production in China. *Plant Nutr. Fert. Sci.* 27(04), 565-574.
- 刘小曼, 刘晓东, 刘伟栋, 谭启玲, 胡承孝, 李进学 (2021). 我国不同种类柑橘养分状况及氮磷钾推荐用量研究. *植物营养与肥料学报* 27(04), 565-574.
- Limbeck A, Galler P, Bonta M, Bauer G, Nischkauer W, Vanhaecke F** (2015). Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Anal Bioanal Chem* 407(22), 6593-617.

- Long JM, Guo WW** (2018). Paraffin embedding citrus tissues and sectioning. *Bio-101* e1010196.
- 龙健梅, 郭文武 (2018). 柑橘石蜡切片. *Bio-101* e1010196.
- Lufu R, Ambaw A, Opara UL** (2021). Functional characterisation of lenticels, micro-cracks, wax patterns, peel tissue fractions and water loss of pomegranate fruit (cv. Wonderful) during storage. *Postharvest Biol Tec* 178, 111539.
- Lu JL** (2020). Chemical constituents of pomelo peel from 10 households in China and biological activity study. Master 's thesis. Beijing : Minzu University of China. pp. 1-145.
- 卢锦澜 (2020). 中国 10 产地文旦柚果皮化学成分及生物活性研究. 硕士学位论文, 北京: 中央民族大学. pp. 1-145.
- Macnee NC, Rebstock R, Hallett IC, Schaffer RJ, Bulley SM** (2020). A review of current knowledge about the formation of native peridermal exocarp in fruit. *Functional Plant Biology* 47(12), 1019.
- Papaslioti EM, Parviainen A, Alpiste RMJ, Marchesi C, Garrido CJ** (2019). Quantification of potentially toxic elements in food material by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) via pressed pellets. *Food Chemistry* 274, 726–732.
- Rahman, NFA, Shamsudin R, Ismail A, Shah NNAK, Varith J** (2018). Effects of drying methods on total phenolic contents and antioxidant capacity of the pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Innov Food Sci Emerg Technol* 50, 217-225.
- Sussulini A, Becke JS, Becker JS** (2017). Laser ablation ICP-MS: Application in biomedical research. *Mass Spec Rev.* 36, 47-57.
- Shelden MC, Gilbert SE, Tyerman SD** (2019). A laser ablation technique maps differences in elemental composition in roots of two barley cultivars subjected to salinity stress. *Plant J* 101(6), 1462–1473.
- Shomer I** (1988). Protein self - encapsulation: A mechanism involved with colloidal flocculation in citrus fruit extracts. *J Sci Food Agr* 42(1), 55–66.
- Thyssen GM, Holtkamp M, Kaulfürst SH, Wehe CA, Sperling M, Schawen V** (2017). Elemental bioimaging by means of LA-ICP-OES: investigation of the calcium, sodium and potassium distribution in tobacco plant stems and leaf petioles. *Metallomics* 9(6), 676-84.
- Uchida R** (2000). Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture J. A. Silva and R. Uchida, eds. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa. *Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptoms*. pp.31-55.
- Wang YA** (2007). Studies on the transportation and distribution of zinc in apple trees and the effect of zinc deficiency on its physiological characteristics. Shan Dong: Shandong Agricultural University. pp. 1-161.
- 王衍安 (2007). 苹果树锌运转分配及缺锌对其生理特性影响的研究. 山东:山东农业大学. pp. 1-161.
- Wang Y, Wu WH** (2009). Molecular Genetic Mechanism of High Efficient Potassium Uptake in Plants. *Chin. Bull. Bot.* 44, 27-36.
- 王毅, 武维华 (2009). 植物钾营养高效分子遗传机制. 植物学报 44, 27-36.
- Wang Y, Liu Q, Shao Z, Wang XS, Chen YF, Bai JJ, Chen ML, Wang JH** (2025). Investigation on effects of TiO₂ on cucumber seedlings using ICP-OES and LA-ICP-MS. *Anal Chim Acta* 1352, 343917.
- Wu B, Zoriy M, Chen Y, Becker JS** (2009). Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* 78(1), 132–137.
- Zhang XY, Geng LP, Gao PP, Dong JW, Zhou C, Li HB, Chen MM, Xue PY, Liu WJ** (2022). Bioimaging of Pb by LA-ICP-MS and Pb isotopic compositions reveal distributions and origins of Pb in wheat grain. *Sci. Total Environ* 802, 149729.
- Xu SW, Xu R, Sun YX, Xu WM, Xu CF, Wang T** (2016). Analysis of trace elements content in chrysanthemum teas and their dissolution characteristics by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Food Saf. Qual.* 7(12), 4946-4954.
- 徐世伟, 徐蓉, 孙雨茜, 徐为民, 徐寸发, 王同 (2016). 电感耦合等离子体质谱法分析菊花茶中微量元素含量及其溶出特性. 食品安全质量检测学报 7(12), 4946-4954.

- Xu H, Wang YW, Luo ZW, Hu WL, Liao WQ, Chen LS, Li Y, Guo JX** (2023). Optimized nutrients management improved citrus yield and fruit quality in China: A meta-analysis. *Chin. J. Appl. Ecol.* 35(5), 1301-1311.
- 徐浩, 王玉雯, 罗自威, 胡文朗, 廖文强, 陈立松, 李延, 郭九信 (2023). 养分优化管理提高我国柑橘产量和品质的整合分析. *应用生态学报* 35(5), 1301-1311.
- Yan XL, Liao H, Ge ZY, Luo XW** (2000). Root Architectural Characteristics and Phosphorus Acquisition Efficiency in Plants. *Chin. Bull. Bot.* 17, 511-519.
- 严小龙, 廖红, 戈振扬, 罗锡文 (2000). 植物根构型特性与磷吸收效率. *植物学报* 17, 511-519.
- Yamaji N, Ma JF** (2019). Bioimaging of multiple elements by high-resolution LA-ICP-MS reveals altered distribution of mineral elements in the nodes of rice mutants. *Plant J* 99(6), 1254–1263.
- Yang HX, Zhao LH, Gao JX, Liu W, Li B** (2014). Bioimaging and Distribution of Cd, P, S, K, Ca, Cu and Zn Elements in *Indian Mustard Stem*. *Chin J Anal Chem* 42, 355-359.
- Yin JJ, Hu XD, Hou YL, Liu ST, Jia SG, Gan CF, Ou YL, Zhang XH** (2023). Comparative analysis of chemical compositions and antioxidant activities of different pomelo varieties from China. *Food Chem Adv* 2, 100180.
- Zhu Y B, Jhanis J. Gonzalez, Yang XY, Chan C G Y, He X, Kostecki R, Mao X L, Russo R E, Zorba V** (2020). Calcium fluoride as a dominating matrix for quantitative analysis by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS): A feasibility study. *Anal Chim Acta* 1129, 24-30.
- Ye S, Wang DF, Ding LZ, Cheng YX** (2000). Research Progress on the Forms of Calcium in Plants (Review). *J. Anhui Agric. Univ.* 27(4),417-421.
- 叶盛, 汪东风, 丁凌志, 程玉祥 (2000). 植物体内钙的存在形式研究进展(综述). *安徽农业大学学报* 27(4),417-421.
- Zhao WZ, Zhang TH, Zhang Y, Yang Y, Lu B** (2023). A pretreatment process for determination of multiple elements in plant samples based on ICP-OES. *Geol. Resour.* 32(4), 505-511, 516.
- 赵文志, 张填昊, 张元, 杨园, 卢兵 (2023). 基于电感耦合等离子体发射光谱法测定植物样品中多元素的前处理方法研究. *地质与资源* 32(4), 505-511, 516.

Visualization and Semi-quantitative Analysis of *in-situ* Distribution of Nutrients in Wendan Pomelo Fruit Based on LA-ICP-MS

Hanxue Wang, Hao Chen, Jiawei Hong, Yueqin Chen, Hong Liao*

Root Biology Center, College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

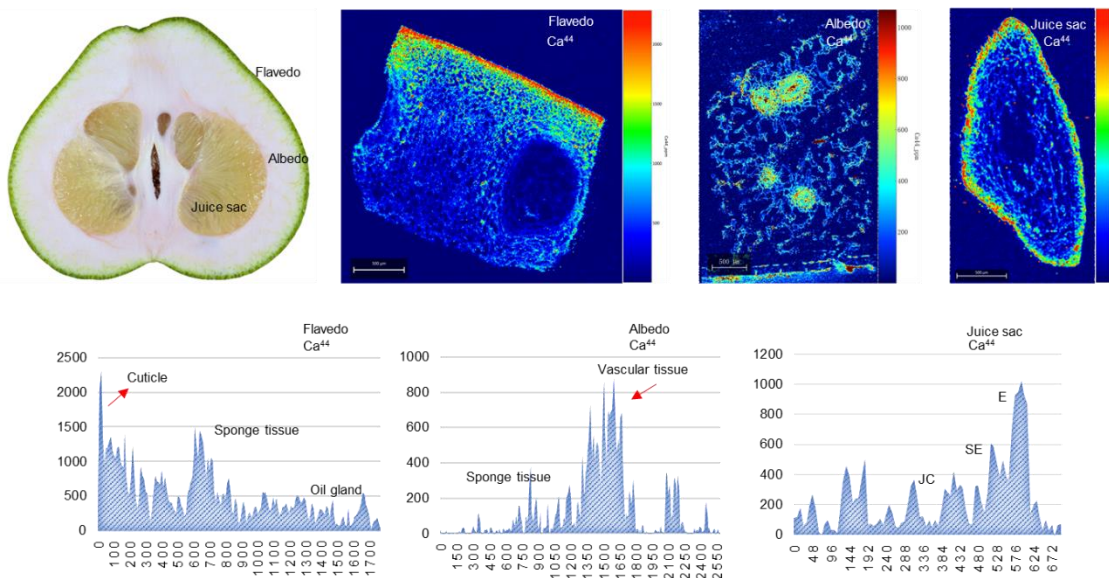
INTRODUCTION: The distribution and concentration of nutrient elements within fruits directly influence their yield and quality. Conventional analytical methods primarily rely on digestion to quantify nutrient content in different fruit tissues. However, as fruits comprise multiple tissue structures, basic quantification techniques fail to precisely resolve nutrient distribution across these microstructural compartments. Consequently, establishing an *in-situ* method enabling visualization of spatial nutrient concentration profiles in fruit tissues is imperative.

RATIONALE: Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS), as an advanced micro-analytical technique, enables effective visualization of *in situ* elemental distribution within plant tissues. LA-ICP-MS uses a femtosecond laser (wave-length 343nm) to scan the fruit sample and the standard sample according to the line of the laser beam during the measurement of the femtosecond laser (wave-length 343nm). The burned sample material is sent to the ICP with the carrier gas Ar, and the ionic strength of P³¹, K³⁹, Ca⁴⁴, Mg²⁴, Fe⁵⁷, Mn⁵⁵, Cu⁶³, Zn⁶⁶, S³⁴, Al²⁷, Cr⁵², Mo⁹⁵, Pb²⁰⁸, Sr⁸⁸ and Rb⁸⁵ in different parts of the fruit is detected. Visualize the nutrient distribution between different tissues.

RESULTS: Through LA-ICP-MS analysis, we performed *in situ*, spatially-resolved and semi-quantitative analysis of

nutritional element distributions across distinct tissue structures in pomelo fruit during maturation. Significant tissue-specific heterogeneity was observed in elemental distributions among fruit compartments. Three structures demonstrated consistent nutrient enrichment: cuticle of flavedo, vascular bundle-like structures in albedo, epidermal cells of juice sacs. The concentrations of potassium, nitrogen, calcium, magnesium and phosphorus were higher in the fruit of Wendan pomelo, which were mainly concentrated in the cuticle of flavedo, vascular bundle tissue of albedo and epidermal tissue of juice sac. Among them, the relative average concentration of calcium in the yellow cortex was as high as $516.21 \pm 387.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the relative average concentration of zinc in the cuticle of the yellow cortex was $410.22 \pm 279.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative concentration of the two in the epidermal cells of the juice sac was the highest, suggesting that calcium and zinc play an important nutritional role in the fruit of Wendan pomelo.

CONCLUSION: This study established a novel LA-ICP-MS methodology for in-situ, visual and semi-quantitative analysis for nutrient distribution in different tissue structures of fruits, was used to establish the spatial relationship of nutrient distribution, which filled the gap in the visualization of fruit nutrient distribution. The relative concentration of different elements in each tissue was analyzed, which provided scientific theory for the subsequent guidance of Wendan pomelo farming measures.



LA-ICP-MS in situ visualization and semi-quantitative calcium concentration in various parts of fruit. The *in situ* distribution of calcium element in the flavedo, albedo and juice sac and the concentration of tissue structure were analyzed.

Keywords *In-situ* visualization, laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry, semi-quantitative method, nutrient distribution

通讯作者简介

廖红 福建农林大学教授、根系生物学研究中心主任、博士生导师、农业部农业科研杰出人才，获得国家杰出青年科学基金资助；入选国家“百千万人才工程”、国家高层次人才特殊支持计划领军人才、第五批福建省“百人计划”（创新人才）和第三批福建省特支“双百计划”科技创新人才，主持“十三五”、“十四五”国家重点研发计划项目等。主要从事植物营养学、作物养分高效遗传改良、酸性土壤等研究工作。同时创建了茶树优质高效生态栽培模式，入选 2021 年农业部十项绿色发展技术，在解决科学问题的同时，促进解决农业农村绿色发展问题。