

玉米小斑病叶片生化变化的红外光谱分析

时有明^{1*}, 李栋玉¹, 易时来², 晏翠琼¹

¹曲靖师范学院物理与电子工程学院, 云南 曲靖 655011;

²中国农业科学院(西南大学)柑桔研究所, 重庆 400712

摘要 利用红外光谱技术分析感染小斑病的玉米叶片, 获取了染病玉米叶片的分子结构信息, 研究结果表明真菌病原体对叶片中的蛋白质结构有一定的影响。二维相关红外光谱分析结果显示, 健康玉米叶片中蛋白质二级结构的 β -折叠构象随着玉米叶片的生长代谢发生变化, 而染病玉米叶片中发生变化的是 β -转角构象。二维相关红外光谱可以揭示真菌病原体入侵时玉米叶片分子结构的变化情况, 为玉米病害的防治提供参考。

关键词 光谱学; 红外光谱; 二维相关红外光谱; 玉米小斑病; 真菌病原体

中图分类号 O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP56.083002

Infrared Spectroscopy Analysis of Biochemical Changes of Corn Leaves Infected by Southern Corn Leaf Blight Disease

Shi Youming^{1*}, Li Dongyu¹, Yi Shilai², Yan Cuiqiong¹

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

² Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences-Southwest University, Chongqing 400712, China

Abstract The infrared spectroscopy method is employed to analyze the corn leaves infected by the southern corn leaf blight disease and the molecular structure information of infected corn leaves is obtained. The research results show that the fungal pathogens have certain effects on the protein structure of the leaves. The two-dimensional correlation infrared spectral analysis indicates that the β -sheet conformation of the protein secondary structure in healthy corn leaves changes with the growth and metabolism of corn leaves, while in the infected corn leaves is the change of the β -turn conformation. Two-dimensional correlation infrared spectroscopy can be used to reveal the change of molecular structures of corn leaves invaded by the fungal pathogens and provide a reference for the prevention and control of corn diseases.

Key words spectroscopy; infrared spectroscopy; two-dimensional correlation infrared spectroscopy; southern corn leaf blight disease; fungal pathogen

OCIS codes 300.6340; 170.6510; 300.6390; 300.1030

1 引言

玉米小斑病又称为南方叶枯病, 是全球各玉米生产区常见的一种严重病害。由致病真菌玉蜀黍双极蠕孢菌引起, 感染该病的玉米品种在首次染病年减产约 10%, 重复发病年减产高达 20%~30%, 该病害对玉米的产量和品质有着重要的影响^[1]。1960 年后, 随着感染玉米小斑病自交系的引进和不

断地推广, 该病在我国快速蔓延, 目前覆盖了全国几乎所有的玉米产区^[2]。该致病真菌侵入玉米叶片时产生大量毒素, 扰乱叶片的正常代谢, 破坏叶片的光合作用, 导致一些酶的活性受到影响, 因而叶片所含的纤维素、粗蛋白质等会发生变化^[3]。研究发生病害时叶片的生化指标变化是目前玉米病害研究领域的一个研究重点。傅里叶变换红外(FTIR)光谱技术具有灵敏、便捷等优点, 可以快速检测混合体系中

收稿日期: 2018-11-08; 修回日期: 2018-11-13; 录用日期: 2018-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(31760341)、云南省应用基础研究项目(2013FZ111)、云南省教育厅科研项目(2015Y425)

* E-mail: sym8295@163.com

相关组分的变化^[4-6]。二维相关红外(2D-IR)光谱技术是基于一定外部扰动条件获得一系列红外光谱,并进行二维相关分析,得出混合体系中相关组分或基团对外部扰动的响应情况。2D-IR 较 FTIR 具有分辨率更高、对重叠峰信息的提取更加准确等优点,已经应用于聚合物研究、中药品质检测、食品安全等方面^[7-9]。目前 FTIR 光谱技术已经应用于植物病害的诊断和鉴别,但采用 2D-IR 光谱技术对植物真菌性病害的研究报道较少^[10-12]。前期本课题组曾经开展过玉米南方锈病的 FTIR 光谱分析^[13],但尚未开展过 2D-IR 光谱在玉米病害中的研究。玉米叶片是一个由叶绿素、纤维素、蛋白质等构成的复杂混合体系,在不同的健康生长时期或感染时期,叶片中各种化学物质有着各自的代谢特征。本研究使用 FTIR 光谱技术获得玉米叶片感染小斑病不同阶段的时间系列光谱,然后通过 2D-IR 光谱技术得到玉米叶片小斑病发病过程的 2D-IR 光谱,同时对比健康玉米叶片的 2D-IR 光谱,揭示玉米小斑病真菌病原体侵染叶片过程中叶片生化指标的变化,为该病害的防治提供参考。

2 实验部分

2.1 样品收集与处理

本研究中的杂交玉米品种为会单 4 号(云南曲辰种业有限公司),大棚中正常种植。在拔节期(展开叶片为 7~8 个)选取长势一致的 38 株玉米,并均分为两组。一组为接种致病真菌实验组,另外一组为健康对照组,两组玉米种植地相距 7 m。两组玉米在相同的土壤、温度、湿度等条件下生长。将玉米小斑病致病真菌孢子配置成悬液,用喷雾器将悬液均匀的喷洒在实验组玉米的叶片上,并用塑料罩保湿 48 h,同时对对照组玉米植株仅喷蒸馏水。接种 5 d 后,染病玉米叶片开始出现零星的病斑,未出现病斑的植株从实验组剔除。接种 7 d 后开始从实验组和对照组的相同叶层(顶部往下第 3 叶层)采集叶片样本,以后每间隔 2 d 均在该叶层采集 1 次染病和健康的叶片样本。采集时将整片玉米叶切下,用蒸馏水多次冲洗待测。采样直到染病叶片 80% 以上的面积枯萎结束,共获得 13 组样品,即健康叶片 13 片,染病叶片 13 片。

2.2 光谱测试与数据处理

采用 Thermo Nicolet 生产的 Avatar FT-IR 360 型光谱仪来获取染病和健康玉米叶片的 FTIR 光谱,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描范围为 $4000\sim$

400 cm^{-1} 。测试时取少量干燥粉碎的玉米叶片放入玛瑙研钵磨细,加入 KBr 研磨均匀,然后压片测定。每个样品重复取样 3 次,分别进行测试,3 次测试的光谱相关系数均大于 0.99,因此用 3 次测试的平均光谱作为该样本的测试光谱。实验过程中利用差谱技术扣除背景干扰。为了避免每次测量时压片的厚度不一致、样品浓度不同等因素的干扰,对所得光谱进行归一化处理。光谱数据预处理使用 Omnic 8.0 软件,二维相关分析计算使用日本关西学院大学 Daisuke Adachi 开发的 Pocha 软件。

3 分析与讨论

3.1 健康玉米叶片与染病玉米叶片的 FTIR 光谱分析

FTIR 光谱技术具有便捷、无损等优点,能快速对玉米叶片所含化学成分进行定性分析。接种中期(接种致病真菌孢子第 15 d),染病和同时期健康玉米叶片的 FTIR 光谱见图 1,由于玉米叶片含有大量的纤维素,因此增加纤维素的 FTIR 光谱作为对照。在 $4000\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 范围内出现的吸收峰归属为 O—H 和 N—H 的混合叠加吸收峰(3380 cm^{-1})、亚甲基非对称伸缩振动(2922 cm^{-1})和对称伸缩振动(2853 cm^{-1})、C=O 伸缩振动(1726 cm^{-1})^[14]。对比健康玉米叶片和感染的玉米叶片吸收光谱发现,两者吸收峰的频率位置和相对吸收强度几乎一致,没有差异。健康玉米叶片和感染玉米叶片在特征区和指纹区,明显出现蛋白质和纤维素的特征吸收峰。 $1646, 1563, 1251\text{ cm}^{-1}$ 分别来源于酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 的振动吸收^[15],它们在健康叶片中均明显呈现,但在感染玉米小斑病的叶片中,没有呈现明显的酰胺 II 肩峰,反而在 1516 cm^{-1} 呈现肩峰。 1387 cm^{-1} 的吸收峰来自甲基的对称伸缩振动^[16], 2959 cm^{-1} 的肩峰也佐证了甲基的对称伸缩振动。 1455 cm^{-1} 的肩峰归属为纤维素中羟基的弯曲振动^[17]。图 1 中,将健康和感染叶片 FTIR 光谱与纤维素的 FTIR 光谱作对比,发现健康和感染叶片的纤维素吸收峰位置基本一致,主要出现在 $1159, 1112, 1061\text{ cm}^{-1}$ 频率位置附近。在甲基、亚甲基和纤维素的特征峰上,健康和染病叶片的光谱没有明显差异,吸收峰位置基本一致,只是相对强度略有不同。整体对比健康叶片和小斑病真菌病原体感染叶片的 FTIR 光谱,差异主要出现在酰胺 I 和酰胺 II 的吸收峰上。由此说明小斑病真菌病原体的侵蚀对玉米叶片中的蛋白质结构有一定影响。

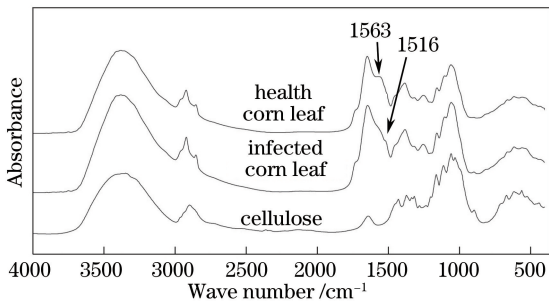


图1 FTIR 光谱

Fig. 1 FTIR spectra

3.2 酰胺 I 带和酰胺 II 带的 2D-IR 光谱研究

小斑病真菌病原体侵蚀玉米叶片所释放的毒素

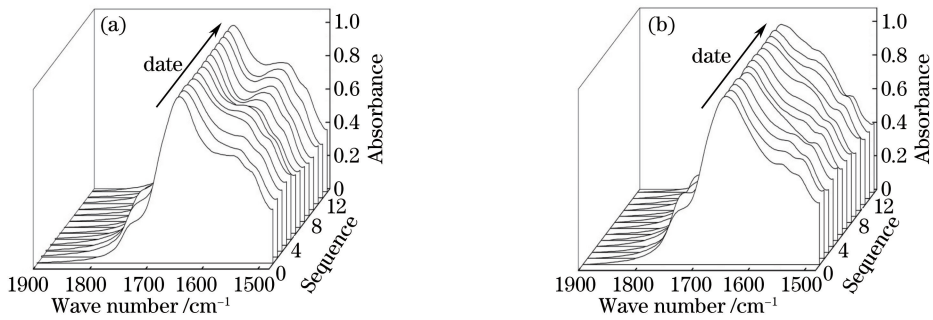


图2 随采样时间变化的 FTIR 光谱。(a)健康玉米叶片;(b)染病玉米叶片

Fig. 2 FTIR spectra under different sample collection time. (a) Normal corn leaf; (b) infected corn leaf

2D-IR 光谱技术雏形最初由 Noda 在 1989 年提出,1993 年 Noda 再次对相关理论进行完善修正,扩展为广义 2D-IR 光谱,2D-IR 光谱的详细理论参见文献[18]。目前获得 2D-IR 光谱常见的外扰方法是采用温度变化进行外扰,但本研究中采用叶片生长代谢引起叶片所含化学物质含量的变化作为外扰,避免温度过高对叶片中生化物质结构的破坏。健康和感染玉米叶片的 2D-IR 光谱分别见图 3 和图 4。底部投影图中,2D-IR 光谱用等高线图表示,阴影区表示呈负相关强度。同步相关谱中对角线上的峰称为自相关峰,反映的是该处吸收峰的强度对外扰有明显的变化。自相关峰越强,说明对外界的响应越激烈。在健康玉米叶片 2D-IR 的同步相关谱中,自相关峰出现在 $1726, 1643, 1612, 1557 \text{ cm}^{-1}$ 处,而染病玉米叶片 2D-IR 的同步相关谱中,却出现在 $1726, 1677, 1641, 1572 \text{ cm}^{-1}$ 处。健康玉米叶片中自相关峰的强度关系为 $A_{1557} > A_{1726} > A_{1643} > A_{1612}$,感染玉米叶片中自相关峰的强度关系为 $A_{1572} > A_{1677} > A_{1726} > A_{1641}$ 。两者同步相关谱中,自相关峰在强度和位置均发生明显变化。 1726 cm^{-1} 处是酯类物质的 C=O 伸缩振动^[14],该自相关峰在

对叶片的影响是一个缓慢的过程,叶片从发现感染到枯死叶片面积占比为 80% 大约需要 30 d。染病玉米叶片 FTIR 光谱中的酰胺 I (1646 cm^{-1}) 和酰胺 II (1563 cm^{-1}) 的吸收峰形状变化可初步反映出:致病真菌释放的毒素导致蛋白质二级结构发生了改变。在酰胺 I 带和酰胺 II 带叠加范围内,染病玉米叶片从出现病斑到 80% 以上面积枯萎这一逐步发病过程的 FTIR 光谱和同时期对照的健康玉米叶片的 FTIR 光谱的变化情况见图 2。为了进一步深入研究蛋白质结构的变化,对酰胺 I 带和酰胺 II 带的叠加范围($1900 \sim 1480 \text{ cm}^{-1}$) 进行二维相关分析,进一步研究感染过程中蛋白质的结构变化。

健康叶片中较强,说明 C=O 随健康植株的生长发生明显变化,见图 3(a)。但在受到感染时,该自相关峰对感染时间的响应变弱,见图 4(a)。这说明玉黍双极蠕孢菌真菌病原体侵入叶片时,对叶片中酯类物质的合成起到了阻碍作用,导致酯类物质含量不随植株的生长而变化。对比图 1 中吸收峰,纤维素在 1642 cm^{-1} 出现吸收峰,在玉米叶片中纤维素的含量远大于粗蛋白,因此健康和染病玉米叶片同步谱中, 1643 cm^{-1} 和 1641 cm^{-1} 附近出现的自相关峰可能来自纤维素,两者强度基本一致。健康玉米叶片在 1612 cm^{-1} 出现蛋白质二级结构中 β -折叠的自相关峰,而感染的玉米叶片在 1677 cm^{-1} 处出现 β -转角振动的自相关峰^[19]。该处自相关峰的出现说明:在健康玉米叶片中随着植株生长时间推移,蛋白质二级结构中 β -折叠结构发生变化;而玉米叶片染病后,随着感染时间的推移,蛋白质二级结构中 β -转角结构发生变化。2D-IR 光谱反映出小斑病真菌病原体侵染玉米叶片时,蛋白质二级结构将发生改变,从而显示出抗真菌活性。目前 2D-IR 光谱对混合体系中的蛋白质二级结构分析已经得到广泛的认可和应用^[20-21],2D-IR 光谱分析得出的这一结论

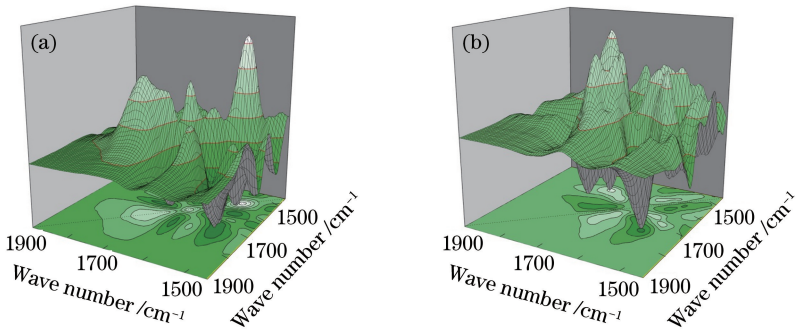


图3 健康玉米叶片的2D-IR光谱。(a)同步相关谱;(b)异步相关谱

Fig. 3 2D-IR spectra of healthy corn leaf. (a) Synchronous correlation spectrum; (b) asynchronous correlation spectrum

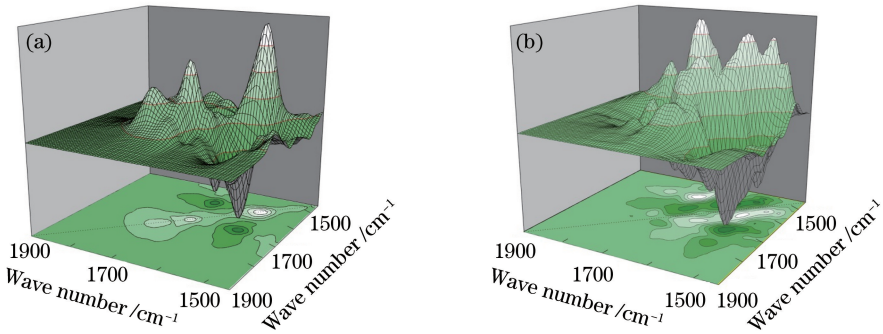


图4 染病玉米叶片的2D-IR光谱。(a)同步相关谱;(b)异步相关谱

Fig. 4 2D-IR spectra of infected corn leaf. (a) Synchronous correlation spectrum; (b) asynchronous correlation spectrum

与国外学者通过基因分析得出玉米小斑病抗病活性蛋白的报道类似^[22]。

健康玉米叶片的2D-IR光谱中,同步相关谱交叉峰峰强度用 $\Phi_1(\nu_1, \nu_2)$ 表示,异步相关谱交叉峰峰强度用 $\Psi_1(\nu_1, \nu_2)$ 表示。感染叶片2D-IR光谱中,同步相关谱交叉峰峰强度用 $\Phi_2(\nu_1, \nu_2)$ 表示,异步相关谱交叉峰峰强度用 $\Psi_2(\nu_1, \nu_2)$ 表示。根据Noda解谱规则^[18], $\Phi_1(1726, 1643) < 0$, $\Phi_1(1726, 1612) > 0$, $\Phi_1(1726, 1557) < 0$, $\Psi_1(1726, 1557) > 0$,表明随着植株的生长,健康叶片的光谱中 1726 cm^{-1} 吸收峰的强度变化与 1643 cm^{-1} 、 1557 cm^{-1} 吸收峰的强度变化呈负相关,与 1612 cm^{-1} 呈正相关。并且在时间顺序上, 1726 cm^{-1} 峰强度的变化晚于 1557 cm^{-1} 峰强度的变化。对于感染叶片的2D-IR光谱,变化较明显的是 $\Phi_2(1677, 1572) < 0$ 、 $\Psi_2(1677, 1572) > 0$,说明在感染期内, 1677 cm^{-1} 峰的强度与 1572 cm^{-1} 峰的强度呈负相关。并且在时间顺序上, 1677 cm^{-1} 峰的变化晚于 1572 cm^{-1} 。 $\Phi_2(1693, 1565) < 0$, $\Psi_2(1693, 1565) > 0$,表明 1693 cm^{-1} 峰的变化晚于 1565 cm^{-1} 峰。对比健康与染病玉米叶片的异步相关谱,进一步表明染病玉米叶片分子结构的变化规律与健康玉米叶片不同。

4 结 论

采用FTIR光谱技术分析健康玉米叶片和小斑病真菌病原体玉黍双极蠕孢菌感染的玉米叶片。在健康玉米叶片的FTIR谱中, 1565 cm^{-1} 处出现酰胺II带吸收的肩峰,但在感染叶片的FTIR谱中,酰胺II带变弱,几乎被酰胺I带重叠覆盖;在 1516 cm^{-1} 位置感染叶片出现肩峰,但在健康叶片中未出现。FTIR的分析表明真菌病原体侵入玉米叶片,对玉米叶片中的蛋白质结构产生影响。对蛋白质的特征吸收带及酰胺I带、酰胺II带($1900\sim 1480\text{ cm}^{-1}$)进行二维相关分析,获得该范围内的2D-IR光谱。健康玉米叶片的2D-IR光谱表明:随着植株的生长代谢,羰基的特征吸收峰的强度与 $1643, 1557\text{ cm}^{-1}$ 峰的强度呈负相关,和蛋白质二级结构 β -折叠吸收峰的强度呈正相关,羰基吸收峰强度的变化晚于 1557 cm^{-1} 峰。但在感染叶片2D-IR光谱的同步相关谱中可以看出,羰基吸收峰在感染时间内变化极缓慢,说明真菌病原体侵入叶片时,对叶片中酯类物质的合成起到了阻碍作用,导致羰基自相关峰较弱。2D-IR光谱还显示蛋白质二级结构中的 β 转角结构对真菌病原体侵染的响应较为明显。通过FTIR结合2D-IR光谱研究玉米小斑病侵染过程中玉米叶

片的生化变化,对玉米病害研究具有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Mubeen S, Rafique M, Munis M F H, *et al.* Study of southern corn leaf blight (SCLB) on maize genotypes and its effect on yield[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2017, 16(3): 210-217.
- [2] Xu X D, Liu Z H. A color atlas of maize diseases and pests Color atlas of maize diseases and pests [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2009: 71-75.
徐秀德, 刘志恒. 玉米病虫害原色图鉴[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 71-75.
- [3] Lu S W, Gillian Turgeon B, Edwards M C. A ToxA-like protein from *Cochliobolus heterostrophus* induces light-dependent leaf necrosis and acts as a virulence factor with host selectivity on maize [J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 81: 12-24.
- [4] Xu T Y, Yang J, Sun X R, *et al.* Mid-infrared spectroscopy analysis combined with support vector machine for rapid discrimination of botanical origin of honey[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2018, 55(6): 063003.
徐天扬, 杨娟, 孙晓荣, 等. 中红外光谱法结合支持向量机快速鉴别蜂蜜品种[J]. 激光与光电子学进展, 2018, 55(6): 063003.
- [5] Zhai Y C, Wang F, Chi Y, *et al.* Calculation and experimental research on infrared spectrum of dioxin molecule [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2018, 55(8): 083001.
翟云楚, 王飞, 池涌, 等. 二噁英分子红外光谱的计算和实验研究[J]. 激光与光电子学进展, 2018, 55(8): 083001.
- [6] Yu S H, Sheng L, Zhang C Y, *et al.* Physiological response of *Arundo donax* to cadmium stress by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 198: 88-91.
- [7] Xu X L, Zheng Y Z, Chen X C, *et al.* Identification of cattail pollen, pine pollen and bee pollen by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. Journal of Molecular Structure, 2018, 1167: 78-81.
- [8] Yan R, Chen J B, Sun S Q, *et al.* Rapid identification of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae Flos* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation analysis[J]. Journal of Molecular Structure, 2016, 1124: 110-116.
- [9] Jiang Q H, Zhang C B, Yang J, *et al.* Investigation on structural changes of isotactic polypropylene mesophase in the heating process by using two-dimensional infrared correlation spectroscopy [J]. Chinese Chemical Letters, 2015, 26(2): 197-199.
- [10] Haq Q M I, Mabood F, Naureen Z, *et al.* Application of reflectance spectroscopies (FTIR-ATR & FT-NIR) coupled with multivariate methods for robust in vivo detection of begomovirus infection in papaya leaves [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 198: 27-32.
- [11] Huleihel M, Shufan E, Tsrer L, *et al.* Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2018, 180: 155-165.
- [12] Sharma N, Khajuria Y, Sharma J, *et al.* Microscopic, elemental and molecular spectroscopic investigations of root-knot nematode infested okra plant roots[J]. Vacuum, 2018, 158: 126-135.
- [13] Shi Y M, Li D Y, Liu G, *et al.* Influence of protein and carbohydrate in maize leaf by infection of maize southern rust using FTIR[J]. Acta Photonica Sinica, 2014, 43(9): 0930003.
时有明, 李栋玉, 刘刚, 等. FTIR 研究南方锈病感染对玉米叶片中蛋白质和碳水化合物的影响[J]. 光子学报, 2014, 43(9): 0930003.
- [14] Gorgulu S T, Dogan M, Severcan F. The characterization and differentiation of higher plants by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(3): 300-308.
- [15] Ahmed J, Ruwaih N, Mulla M, *et al.* Effect of high pressure treatment on functional, rheological and structural properties of kidney bean protein isolate [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 91: 191-197.
- [16] Choong Y K, Lan J, Lee H L, *et al.* Differential identification of mushrooms sclerotia by IR macro-fingerprint method[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 152: 34-42.
- [17] Rana R, Herz K, Bruelheide H, *et al.* Leaf attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) biochemical profile of grassland plant species related to land-use intensity [J]. Ecological

- Indicators, 2018, 84: 803-810.
- [18] Noda I, Ozaki Y. Two-dimensional correlation spectroscopy - Applications in vibrational and optical spectroscopy[M]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- [19] Grewal M K, Huppertz T, Vasiljevic T. FTIR fingerprinting of structural changes of milk proteins induced by heat treatment, deamidation and dephosphorylation[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80: 160-167.
- [20] Wu Y Q, Zhang L P, Jung Y M, *et al.* Two-dimensional correlation spectroscopy in protein science, a summary for past 20 years [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 189: 291-299.
- [21] Noda I. Vibrational two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS) study of proteins [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 187: 119-129.
- [22] Zhang J R, Martin J M, Balint-Kurti P, *et al.* The wheat puroindoline genes confer fungal resistance in transgenic corn [J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159(3): 188-190.