

doi:10.3788/gzxb20144309.0930003

# FTIR 研究南方锈病侵染对玉米叶片中蛋白质和碳水化合物的影响

时有明<sup>1</sup>, 李栋玉<sup>1</sup>, 刘刚<sup>2</sup>, 易时来<sup>3</sup>

(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, 昆明 650500)

(3 西南大学—中国农业科学院 柑桔研究所, 重庆 400712)

**摘 要:**为深入研究南方锈病侵染玉米叶片时叶片的生化指标变化,使用傅里叶变换红外光谱仪分别获取感染和未感染玉米叶片的光谱,选用光谱中的特征区和指纹区吸收带分析玉米叶片中蛋白质和碳水化合物的变化情况.玉米叶片被感染后,其光谱的酰胺带发生变化,碳水化合物的主要吸收带变化不明显.通过对波数范围在 1 800~1 480 内的吸收带进行曲线拟合分析,发现感染后的叶片中折叠和螺旋结构在蛋白质二级结构中的含量比例降低;感染前期蛋白质二级结构中转角结构含量比例增大;感染后期玉米叶片中蛋白质二级结构的自由卷曲结构含量比例急剧增大,该结构在感染前期和健康叶片中均未出现.研究表明傅里叶变换红外光谱结合曲线拟合分析技术可用于探索玉米叶片被南方锈病侵染时所含化学物质的变化,为玉米抗病性研究提供重要依据.

**关键词:**光谱学;傅里叶变换红外光谱;曲线拟合;蛋白质二级结构;南方锈病

中图分类号:O433.4

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2014)09-0930003-5

## Influence of Protein and Carbohydrate in Maize Leaf by Infection of Maize Southern Rust Using FTIR

SHI You-ming<sup>1</sup>, LI Dong-yu<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>2</sup>, YI Shi-lai<sup>3</sup>

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

(2 College of Physics and Electronic information, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

(3 Citrus Research Institute, Southwest University-Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** In order to study biochemical parameters of maize leaf, which infected by maize southern rust, Fourier transform infrared spectroscopy was applied to obtain the spectra of infection and normal maize leaves. The characteristic region and fingerprint region at spectrum were selected to study the change of protein and carbohydrate in maize leaf. Compared infection with normal leaf spectrum, amide bands had diversification obviously, the change of absorption band of carbohydrate was not prominence. It showed that the protein secondary structures had changed, and the diversification of carbohydrate in infection leaf was not obviously. Curve-fitting analysis of wave number at 1 800~1 480 presented the sheet and helix in protein secondary structures was decrease in infected leaf, and the turn structure was increase at the infected initial stage. The random coil structure was increase rapidly at infected end stage, this structure was absent at infected initial stage and normal maize leaves. The results show that Fourier transform infrared spectroscopy combine with curve-fitting analysis can be used to explore the change of biochemical parameters in infection maize leaf, which provides evidence for studying the disease resistance of maize.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30960179)和云南省应用基础研究项目(No. 2013FZ111)资助

第一作者:时有明(1982-),男,副教授,硕士,主要研究方向为生物光谱学. Email:sym8295@163.com

收稿日期:2014-01-24;录用日期:2014-05-22

<http://www.photon.ac.cn>

**Key words:** Spectroscopy; Fourier transform infrared spectroscopy; Curve-fitting; Protein secondary structure; Southern rust

**OCIS Codes:** 300.6170; 170.6510; 300.6300; 300.6340

## 0 引言

真菌是一个庞大的群体,目前研究所知植物真菌病原体达八千多种,约占整个植物病原体微生物种类的80%<sup>[1]</sup>.在我国玉米生产中,能造成严重减产的真菌侵染性病害有10余种,且每年均有发生.玉米真菌病原体可以侵染玉米植株的各个器官部位,从而引起复杂多样的病害症状,从根腐、叶斑到矮化等.南方锈病是玉米生产过程中严重威胁产量的一种真菌性病害,发病后叶片上出现大量孢子堆,病原真菌从叶片中汲取营养,影响植株的正常生长,导致严重减产.1974年在美国大规模爆发,造成产量下降达45%,目前在我国该病害主要威胁西南玉米产区<sup>[2]</sup>.

南方锈病致病真菌侵入玉米叶片时,叶片会产生主动保护反应.保护反应是复杂新陈代谢的结果,导致叶片内一系列的生化变化.因此研究玉米叶片被南方锈病真菌病原体侵染后的生化指标变化对探究在抗病反应中起到抗病作用的特殊物质有一定的帮助,并利用这些物质来提高玉米的抗病性,为新一代的玉米抗病育种研究提供依据.目前在研究南方锈病侵染玉米时主要方法有利用分子检测技术核糖体内转录序列(Internal Transcribed Spacer, ITS)对病原菌进行检测诊断<sup>[3]</sup>、利用曲利苯兰透明染色法研究侵染过程的组织学特征、利用紫外分光光度计测量可溶性蛋白等<sup>[4]</sup>.傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)属于分子光谱,利用不同频率的红外光与样品的分子键发生作用,导致一些频率的光被选择性吸收,从而通过光谱的吸收情况来推断样品中分子键的相关参量.它具有快速、无损和便捷等特点,已经广泛用于植物组织成分的定性分析,结合数据挖掘方法可以对蛋白质二级结构变化情况进行半定量研究<sup>[5-7]</sup>.本文将利用FTIR结合曲线拟合技术对南方锈病真菌感染的玉米叶片进行快速无损分析,深入研究叶片被侵染后蛋白质二级结构和碳水化合物的变化规律.

## 1 实验部分

### 1.1 样品采集与制备

南方锈病侵染的玉米叶片采集于云南曲靖玉米种植区.玉米品种为曲辰九号杂交种(云南曲辰种业有限公司研发).采集的侵染植株处于吐丝期(雌穗丝状花柱从苞叶长出3cm左右),同时选取该植株附近未发生病害的植株作为参照.在南方锈病感染初期(叶片上出现稀疏的黄色凸起斑点)和感染后期(大量黄色孢子堆

出现在叶片,叶片70%以上面积被孢子堆覆盖)分别采集感染植株叶片和参照植株对应叶层位置的正常叶片,初期和后期采集时间间隔15天.采集时剪取叶片上相应位置5cm×5cm大小部分,用蒸馏水反复冲洗多次,去除叶片凸起的黄色孢子堆,然后放入干燥箱中干燥24h.干燥后的样品放入玛瑙研钵磨为粉末,在加入KBr研磨均匀压片测试.每个感染阶段的样本及参考样本均重复采样3次,对采样获得的FTIR进行偏相关分析,相关度均在0.98以上,较为相似,因此取三次测试光谱的平均值作为该感染阶段的FTIR的样本.

### 1.2 光谱仪参量与数据分析软件

采用Thermo Nicolet公司的Avatar FT-IR 360光谱仪体为获取样品的FTIR.扫描次数设定为32次,分辨率为2cm<sup>-1</sup>,扫描范围为4000~400cm<sup>-1</sup>.获得的光谱采用Omnice 8.0软件进行预处理和傅里叶自去卷积运算.通过傅里叶自去卷积确定拟合带中子峰的个数和预估位置,然后对酰胺I带和II带叠加峰进行曲线拟合运算.偏相关分析使用SPSS 17.0软件.

### 1.3 曲线拟合子峰模型及相关参量

FTIR通常由多个吸收带叠加组成,整体上呈现高斯峰型,而单一的子峰则更接近洛伦兹峰型.因此拟合子峰时采用Voigt函数模型

$$y = y_0 + A \frac{2 \ln 2 \omega_L}{\pi^{3/2} \omega_G^2} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{\left(\sqrt{\ln 2} \frac{\omega_L}{\omega_G}\right)^2 + \left(\sqrt{4 \ln 2} \frac{x - x_c}{\omega_G} - t\right)^2} dt \quad (1)$$

式中 $y$ 是吸光度, $x$ 是波数, $A$ 是峰高, $y_0$ 是光谱的基线, $x_c$ 是子峰中心位置, $\omega_L$ 是洛伦兹峰宽, $\omega_G$ 是高斯峰宽.该函数的优点是包含高斯峰型和洛伦兹峰型的特征,拟合时自动调整带宽因子可以获得两种峰型在整体中的权重,以达到残差平方和最小的效果.利用红外光谱处理软件Omnice 8.0对初期正常叶片、初期感染叶片、后期正常叶片、后期感染叶片的光谱分别进行拟合,重复迭代次数均大于320次.拟合完成后对拟合结果和原始光谱进行偏相关分析和残差分析,其偏相关系数均大于0.999.归一化后拟合带峰高为1,残差绝对值均小于0.001.偏相关分析和残差分析表明拟合模型可靠,拟合效果较好.

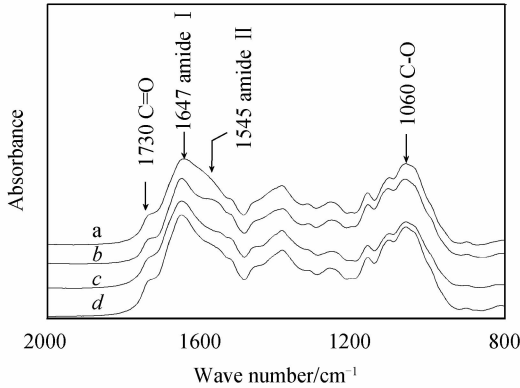
## 2 结果与讨论

### 2.1 玉米叶片在蛋白质和碳水化合物吸收带的FTIR

玉米叶片的FTIR在4000~2000cm<sup>-1</sup>主要是—OH、—NH<sub>2</sub>、—CH<sub>2</sub>、—CH<sub>3</sub>的氢键振动吸收,不能

用于确定分析对象的组成成分<sup>[8]</sup>. 2 000~800 cm<sup>-1</sup> 的吸收带由特征区和指纹区组成,该范围内的吸收峰具有一定的指纹特征. 叶片中的蛋白质和碳水化合物在该范围内均有明显的特征吸收,蛋白质主要吸收峰是酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带,其中以酰胺 I 带吸收最为强烈. 碳水化合物的主要特征吸收峰为 1 060 cm<sup>-1</sup> 附近的 C-O 振动吸收. 玉米叶片在感染南

方锈病后其生化指标会发生变化,但随着生长时间变化,健康叶片的生化指标也会发生变化,所以在感染前期和感染后期分别采集健康玉米植株相同位置的玉米叶片作为对照. 感染初期、后期的叶片和健康叶片在特征区和指纹区的 FTIR 见图 1. 在图 1 中感染叶片的酰胺 I 带和 II 带的叠加峰发生明显变化. 特别是在感染后期,酰胺 I 带变强,几乎覆盖了酰胺 II 带的吸收峰.



a: infected leaf spectrum(end stage), b: normal leaf spectrum(end stage), c: infected leaf spectrum(initial stage), d: normal leaf spectrum(initial stage)

## 2.2 玉米叶片中蛋白质二级结构变化

蛋白质的 FTIR 吸收具有一定的特异性,主要表现为酰胺带的特征吸收. 酰胺带的吸收来源于 C=O 和 N-H 的伸缩振动及 O-C-N 的弯曲振动,同时还伴有 C-N 的伸缩振动. 目前研究确定的酰胺带共有九个,酰胺 A 带、酰胺 B 带和酰胺 I 至 VII 带<sup>[9]</sup>. 酰胺 A 带、酰胺 B 带受羟基的叠加影响较为严重,酰胺 III、IV、V、VI、VII 带吸收稍弱,因此在分析蛋白质时重点落在了酰胺 I 和 II 带上<sup>[10-12]</sup>. 在玉米叶片的光谱中可见酰胺 I 和 II 带叠加,酰胺 II 带以肩峰的形式出现. 感染南方锈病前期和后期的叶片与同时期的健康叶片相比,酰胺 I 和 II 带的吸收峰形状发生了明显变化,表明南方锈病致病真菌侵染玉米叶片时蛋白质发生改变. 为了进一步研究该病害真菌侵染玉米叶片时蛋白质二级结构的变化,分别对感染病害叶片与正常叶片光谱中酰胺 I 和 II 带叠加峰进行曲线拟合精确运算,拟合结果见图 2.

图 1 南方锈病侵染玉米叶片和正常叶片在蛋白质、碳水化合物吸收区的 FTIR 光谱

Fig. 1 FTIR spectra of maize leaf which infected by southern rust, the band is contributed of protein and carbohydrate

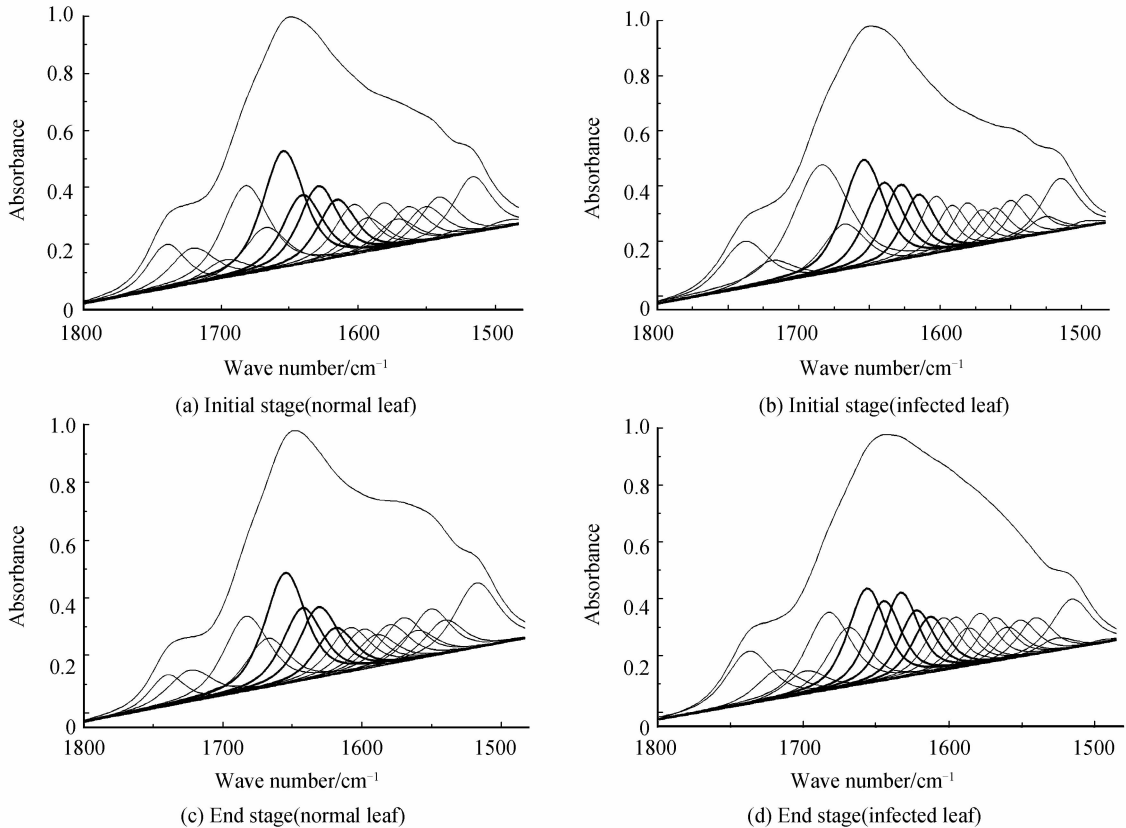


图 2 玉米叶片在感染初期和后期的 FTIR 的曲线拟合分峰研究

Fig. 2 Curve-fitting analysis of FTIR spectra of corn leaf at initial and end stage in infection process

酰胺 I 带吸收范围在 1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ , 但受酰胺 II 带叠加峰影响, 最终在 1 800~1 480  $\text{cm}^{-1}$  范围内形成一个大的叠加峰. 为了客观分析酰胺 I 带, 曲线拟合时

选取 1 800~1 480  $\text{cm}^{-1}$  范围, 但在计算酰胺 I 带中蛋白质二级结构含量比例时只分析 1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$  范围内的子峰. 表 1 反映出玉米叶片感染南方锈病时蛋

表 1 曲线拟合分析感染和未感染玉米叶片中蛋白质二级结构的变化

Table 1 The diversification of protein secondary structure in infection and normal maize leaf by study of curve-fitting analysis

No.	Normal leaf (initial stage)		Infection leaf (initial stage)		Normal leaf (end stage)		Infection leaf (end stage)		Assignment
	$\nu$	Area%	$\nu$	Area%	$\nu$	Area%	$\nu$	Area%	
1	1 603	8.93	1 603	8.24	1 608	8.98	1 603	8.25	side chain
2	1 615	10.37	1615	9.27 ↓	1612	11.19	1 619	7.76 ↓	$\beta$ -sheet
3	1 628	13.76	1627	12.04 ↓	1628	14.15	1 622	10.11 ↓	$\beta$ -sheet
4	1 640	13.05	1636	13.87	1640	12.92	1 632	13.41	$\beta$ -sheet
5	---	---	---	---	---	---	1 644	12.69 ↑	random coil
6	654	22.76	1 654	16.46 ↓	1 655	22.19	1 656	16.09 ↓	$\alpha$ -helix
7	1 667	8.55	1 667	8.92	1 667	10.56	1 669	10.81	turn
8	1 681	19.08	1 684	27.86 ↓	1 683	16.03	1 682	16.62	turn
9	1 696	3.46	1 697	3.31	1 699	3.95	1 698	4.24	turn

Area% is the ratio of individual derivative band area and amide I band area, ↑ and ↓ showed the increase and decrease of Area% obviously at infected leaf.  $\nu$  is the wave number of absorption peak.

白质二级结构的变化. 主要变化情况是: 1)  $\beta$ -折叠结构的含量比例在玉米叶片感染的初期和后期与健康叶片相比均降低; 2) 感染前期转角结构含量比例增大; 3) 感染后期玉米叶片蛋白质二级结构中的自由卷曲结构(也称为无序结构)含量比例增大, 该结构在感染前期和健康叶片中均未出现; 4) 叶片感染过程中  $\alpha$ -螺旋结构呈下降趋势.

感染过程是真菌孢子释放毒素不断侵蚀的过程, 在该过程中玉米叶片本身表现出一定的抗病性. 该抗病过程中玉米叶片的蛋白质分解生成游离氨基酸, 然后继续降解成酚类等抗病物质, 从而抵御真菌病原的入侵<sup>[13]</sup>. 表 1 中感染前期与感染后期相比较,  $\beta$ -折叠、 $\alpha$ -螺旋及转角结构均减少, 说明蛋白质发生分解; 同时自由卷曲结构增多, 表明大量的蛋白质向降解为氨基酸等物质的方向发展. 红外光谱技术分析的结果和其他生物化学方法分析的结果基本一致<sup>[14]</sup>.

### 2.3 碳水化合物红外光谱的主要吸收带变化

玉米叶片干燥后大约 80% 的成分是碳水化合物, 主要包括纤维素和糖类物质等, 它们的 FTIR 特征吸

收带主要出现在 1 300~800  $\text{cm}^{-1}$  范围内<sup>[15]</sup>. 该范围内碳水化合物的吸收峰相互叠加, 一些吸收峰在原始图谱中不能直观显现出来. 为了详细比较病害侵染初期和后期叶片及相应时期健康叶片的光谱特征, 对 1 300~800  $\text{cm}^{-1}$  范围内的光谱进行傅里叶自去卷积, 确定因叠加而被掩盖的吸收峰波数位置, 从而可以清楚地看到纤维素和一些糖类物质的特征吸收峰. 傅里叶自去卷积后玉米叶片中碳水化合物的红外光谱主要特征吸收带统计见表 2. 表 2 中给出葡萄糖、蔗糖和纤维素的红外光谱特征吸收带作为参考(葡萄糖、蔗糖和纤维素的吸收带归属参照文献[16-17]), 便于与玉米叶片红外光谱中碳水化合物的特征吸收带进行对比. 通过表 2 的统计可以看出, 在整个南方锈病侵染的过程中, 玉米叶片中碳水化合物的红外光谱特征吸收带的频率位置基本没有发生变化. 对比图 1, 感染叶片和未感染叶片在该范围内的光谱形状较为相似, 对它们在该范围内的光谱进行偏相关分析, 相关系数均大于 0.96, 表明在南方锈病侵染过程中对玉米叶片中碳水化合物的结构影响不明显.

表 2 玉米叶片中碳水化合物的傅里叶变换红外光谱主要吸收带

Table 2 Major FTIR bands of carbohydrate in maize leaf

Carbohydrates	Reference wave number/ $\text{cm}^{-1}$	Infection leaf (initial stage)/ $\text{cm}^{-1}$	Normal leaf (initial stage)/ $\text{cm}^{-1}$	Infection leaf (end stage)/ $\text{cm}^{-1}$	Normal leaf (end stage)/ $\text{cm}^{-1}$
$\alpha$ -D-glucose	1 030, 930, 836	1 029, 927, 832	1 027, 928, 832	1 027, 930, 833	1 029, 928, 831
$\beta$ -D-glucose	1 075, 1 040, 895	1 071, 1 041, 890	1 072, 1 040, 891	1 071, 1 040, 892	1 070, 1 045, 894
$\beta$ -D-sucrose	869, 850	870, 846	873, 848	868, 846	868, 844
Cellulose	1 160, 1 130, 1 060	1 159, 1 128, 1 056	1 161, 1 127, 1 058	1 158, 1 128, 1 056	1 159, 1 128, 1 053

## 3 结论

玉米叶片受到南方锈病真菌病原体侵染后, 叶片

作出自我保护的反应, 表现为自主抗病性. 抗病过程中玉米叶片的生化指标会发生变化. FTIR 结合曲线拟合研究发现南方锈病侵染玉米叶片后, 叶片中蛋白质二

级结构的 $\beta$ -折叠结构、 $\alpha$ -螺旋结构、转角结构和无序结构均发生了不同程度的变化,揭示了蛋白质的降解过程.FTIR技术具有快速、无损和灵敏等优点,逐渐被应用于植物样品的研究.在用于发生病害玉米叶片的研究时具有独特的优势,可以快速、准确地反映出发生病害玉米叶片中的生化变化.

#### 参考文献

- [1] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health [J]. *Nature*, 2012, **484**(7393): 186-194.
- [2] 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: 162.
- [3] QUEIROZ O C M, KIM S C, ADESOGAN A T. Effect of treatment with a mixture of bacteria and fibrolytic enzymes on the quality and safety of corn silage infested with different levels of rust[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, **95**(9): 5285-5291.
- [4] 于凯. 玉米南方锈病的分子检测与玉米抗病性机制的研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2010, 29-30.
- [5] ZHANG G C, LIN H L, LIN S Y, *et al.* Thermal analysis and FTIR spectral curve-fitting investigation of formation mechanism and stability of indomethacin-saccharin cocrystals via solid-state grinding process[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, **66**(7): 162-160.
- [6] KHOURY Y E, HIELSCHER R, VOICESCU M, *et al.* On the specificity of the amide VI band for the secondary structure of proteins[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2011, **55**(2): 258-266.
- [7] YANG Ren-jie, LIU Rong, XU Ke-xin, *et al.* Discrimination of adulterated milk using NPLS-DA combined with two-dimensional correlation near-infrared spectroscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2013, **42**(5): 580-585.  
杨仁杰, 刘蓉, 徐可欣, 等. 二维相关近红外谱结合 NPLS-DA 判别掺杂牛奶的研究[J]. 光子学报, 2013, **42**(5): 580-585.
- [8] SUN D W. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control[M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2009: 112.
- [9] KATHLEEN M G, LSAN T, MARZENA Z K, *et al.* Theoretical and experimental considerations for interpretation of amide I bands in tissue [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2011, **53**(1): 71-76.
- [10] ZENG H Y, CAI L H, CAI X L, *et al.* Structure characterization of protein fractions from lotus (*Nelumbo nucifera*) seed [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2011, **1001**(1): 139-144.
- [11] CHEN X Y, YI R, CHEN F L, *et al.* FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, **31**(2): 435-437.
- [12] PIETER S, DIETER V N, GUSTAAF S, *et al.* Quality and statistical classification of Brazilian vegetable oils using mid-infrared and Raman spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 2012, **66**(5): 552-565.
- [13] TIAN Yao-jia, ZHAO Shou-guang, ZHANG Jing, *et al.* Research progress on corn rust in China [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, **30**(4): 226-231.  
田耀加, 赵守光, 张晶, 等. 中国玉米锈病研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, **30**(4): 226-231.
- [14] HUANG Fei-yan, YU Kai, LI Wan-chen, *et al.* Relationship of biochemical parameters of corn inbred lines and their resistance to southern corn rust [J]. *Journal of maize science*, 2012, **20**(2): 138-143.  
黄飞燕, 于凯, 李晚忱, 等. 玉米对南方锈病抗性的生化基础研究 [J]. 玉米科学, 2012, **20**(2): 138-143.
- [15] HARTWIG S, MALGORZATA B. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2007, **43**(1): 13-25.
- [16] MICHAEL F, PASCALE C. Quantitative determination of cellulose dissolved in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate using partial least squares regression on FTIR spectra [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, **87**(2): 1124-1130.
- [17] WANG J, MICHAEL M K, JUN S J, *et al.* Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose, and maltose in honeys from different geographic regions using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis [J]. *Journal of Food Science*, 2010, **75**(2): 208-214.