

# 利用红外光谱研究‘凤丹白’牡丹花瓣伸展过程中物质变化

李秀丽<sup>1,\*</sup>, 陈法志<sup>1</sup>, 戢小梅<sup>1</sup>, 陈 镇<sup>1</sup>, 戴志刚<sup>2</sup>, 杨 阳<sup>1</sup>, 王 燕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>武汉市农业科学技术研究院林业果树科学研究所, 武汉 430075; <sup>2</sup>湖北省耕地质量与肥料工作总站, 武汉 430070)

**摘 要:** 为了明确花瓣的伸展机制, 以‘凤丹白’牡丹 (*Paeonia ostii*) 为研究对象, 借助傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transformation Infrared Spectroscopy, FTIR) 及高斯多峰拟合, 分析蕾期、初开期和盛花期花瓣的波谱特征及蛋白质二级结构的差异性。主要结果如下: 随着花朵开放花瓣伸展, 777、1 105、1 155、1 243、1 447、1 651、1 740、2 853 和 2 926  $\text{cm}^{-1}$  处的振动峰振动依次增强, 表明磷脂质、核酸、脂类和蛋白质等代谢物质随花瓣的伸展逐渐增强; 且蕾期 1 030  $\text{cm}^{-1}$  处的振动峰在花开后移至 1 060  $\text{cm}^{-1}$ , 表明蕾期花瓣细胞壁多糖以甘露聚糖为主, 花朵开放后则以阿拉伯糖为主。蛋白质中甲基基团含量 (A 2 951  $\text{cm}^{-1}$ /A 2 858  $\text{cm}^{-1}$ ) 出现平稳下降的趋势, 初开期比蕾期减少 7.97%, 盛花期减少 13.38%; 糖蛋白的变化 (A 1 083  $\text{cm}^{-1}$ /A 1 547  $\text{cm}^{-1}$ ) 也呈现下降趋势, 推测‘凤丹白’牡丹是通过蛋白质糖基化作用调控花瓣的伸展过程。对氨基 I 区域 (1 600 ~ 1 700  $\text{cm}^{-1}$ ) 高斯多峰拟合数据显示, 各阶段花瓣中均含有果胶相连的  $\beta$ -折叠、 $\beta$ -折叠、无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋及环与转角;  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠及无规卷曲所占比例在花瓣伸展过程中呈现增长趋势, 表明蕾期花瓣通过降低  $\alpha$ -螺旋应对缺水造成的生理胁迫, 并可以利用 ATP 合成花瓣生长发育所需的物质; 花瓣通过形成更多功能域较多的蛋白质, 有效调控花瓣伸展时复杂的生物化学过程。

**关键词:** ‘凤丹白’牡丹; 花瓣; 傅里叶变换红外光谱 (FTIR); 高斯多峰拟合; 蛋白质二级结构

**中图分类号:** S 685.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 05-0911-10

## Application of Infrared Spectroscopy to Study on Substance Change in the Process of Petal Extending of *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’

LI Xiuli<sup>1,\*</sup>, CHEN Fazhi<sup>1</sup>, JI Xiaomei<sup>1</sup>, CHEN Zhen<sup>1</sup>, DAI Zhigang<sup>2</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, and WANG Yan<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Wuhan Academy of Agricultural Science and Technology Forestry and Fruit Tree Research Institute, Wuhan 430075, China; <sup>2</sup>Hubei Provincial General Station of Arable Land Quality and Fertilizer, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In order to understand the petal extension mechanism, both FTIR (fourier transformation infrared spectroscopy) and Guassian multi-peak fitting were used to explore spectrum properties and protein secondary structure differences of *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’ petal at the flower-bud, initiating bloom and bloom periods. The main results were as follows: The peak intensity at 777, 1 105, 1 155, 1 243, 1 447, 1 651, 1 740, 2 853 and 2 926  $\text{cm}^{-1}$  were enhanced in sequence with flowering, indicating that the

收稿日期: 2017-01-12; 修回日期: 2017-04-17

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2016M602384)

\* E-mail: lixiuli204@126.com

metabolism products such as phospholipids, nucleic acids, lipids, proteins were increased during the process of flowering. A shift from  $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$  to  $1\ 060\ \text{cm}^{-1}$  was observed in petal at flower-bud period and bloom period, which showed that cell wall polysaccharides of petal were glucomannan and arabinan, respectively. As compared with the petal at flower-bud period, the number of methyl groups in protein ( $A\ 2\ 951\ \text{cm}^{-1}/A\ 2\ 858\ \text{cm}^{-1}$ ) of petal decrease by 7.97% and 13.38% at initiating bloom period and bloom period, respectively. The variation in glycoprotein of the samples ( $A\ 1\ 083\ \text{cm}^{-1}/A\ 1\ 547\ \text{cm}^{-1}$ ) showed a downward trend after flowering, it could speculate out that protein regulate the petal extension by glycosylation in 'Fengdanbai'. The result of Guassian multi-peak fitting for the amide I region ( $1\ 600 - 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ ) indicated that the petal contained  $\beta$ -sheet + side chain + pectin,  $\beta$ -sheet, random coil,  $\alpha$ -helix and loop + turn of secondary protein structure at different stages. And the  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil showed an increase trend after flowering. The result indicated that the presence of low amounts of  $\alpha$ -helix domains in petal at flower-bud period might compensate for reducing protein-water hydrogen band caused by lack of water. And also ATP was modified, which would provide the material base for petal-extension. The protein would regulate the complex biochemical processes in petal extension by forming more functional domains. The research results provided theoretical references for the substance change and the protein regulation on extension mechanism of petal.

**Keywords:** *Paeonia ostii* 'Fengdanbai'; petal; fourier transformation infrared spectroscopy (FTIR); Guassian multi-peak fitting; protein secondary structure

‘凤丹白’牡丹 (*Paeonia ostii* 'Fengdanbai') 因其极具观赏和药用价值而被人们熟知 (成仿云和李嘉珏, 1998)。近几年研究发现 ‘凤丹白’ 牡丹籽粒中含油率较高 (22%以上), 且富含多种营养和不饱和脂肪酸, 尤其是  $\alpha$ -亚麻酸的含量超过 42.35% (刘建华 等, 2006; Li et al., 2015), 已成为一种非传统新植物油资源 (中华人民共和国卫生部 2011 年第 9 号公告)。牡丹花的发育直接关系到牡丹籽油的品质。近年来, 人们开始关注油用牡丹花色和花粉方面的研究, 吴静等 (2016) 利用色差仪对近 500 个紫斑牡丹单株花色表型值进行了分类研究; 李子峰等 (2007) 研究了 ‘凤丹白’ 牡丹的核型和花粉母细胞减数分裂行为, 提出在上海 ‘凤丹白’ 花粉母细胞减数分裂的最佳取材时间为 2 月底—3 月初; 朱富勇等 (2014) 通过克隆紫斑牡丹 *FT* 同源基因, 提出 *PdFT* 可能调控紫牡丹开花。然而, 有关牡丹开花过程中化学物质的积累和变化特点及蛋白质的调控机制并不清晰。本研究中以牡丹花瓣为研究对象, 从光谱学和蛋白质化学角度入手, 解析花瓣伸展过程可能的调控机制。

傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transformation Infrared Spectroscopy, FTIR) 的优势在于可以通过物质不同基团的特征振动峰鉴定物质的类别, 广泛应用于植物油、木材、花粉和叶片的分析等 (Lahlali et al., 2014; Raba et al., 2015; 石江涛和李坚, 2016; Suresh et al., 2016)。此外, 傅里叶变换红外光谱还可研究蛋白质反应的分子机制、蛋白质二级结构变化规律和蛋白质折叠等 (Kauffmann et al., 2001; Zscherp & Barth, 2001; Lahlali et al., 2014)。FTIR 图谱中氨基 I 的振动波数在  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  附近, 主要来源于 C=O 的伸缩振动及少量的 CN 面外弯曲振动、NH 的面内弯曲振动和 CCN 变形振动 (Barth, 2007), 其振动峰强度和峰型与蛋白质的骨架结构密切相关, 即主要取决于蛋白质主链上的二级结构, 而不取决于蛋白质的侧链结构 (Krimm & Bandekar, 1986)。因此, 一般选用氨基 I 区域的振动峰作为蛋白质二级结构的分析对象。

利用 FTIR 评估样品中蛋白质二级结构变化趋势的制样方法简单, 分析结果快速准确。对于小而均一的植物样品, 采用原位测量方法采集 FTIR 图谱, 如 Lahlali 等 (2014) 借助 ATR (attenuated total reflectance) - FTIR 技术发现在热胁迫下豌豆抗热品种的花粉粒中  $\alpha$ -螺旋呈显著下降趋势。研究表明对于大而复杂的样品, 需要置于烘箱内烘干, 研磨至粉末后借助溴化钾 (KBr) 压片法采集 FTIR 图谱, 烘干方法不会影响原样品中蛋白质二级结构的分布特点 (Suresh et al., 2016)。即使天然蛋白发生变性后, 其主链上的二级结构与天然蛋白相比差异较小 (Fitzkee & Rose, 2004)。

借助 FTIR 技术研究‘凤丹白’牡丹花发育过程中花瓣物质成分的差别及变化规律, 并对氨基 I 区域的振动峰进行高斯多峰拟合, 分析花瓣伸展过程中蛋白质二级结构的分布特点及变化趋势, 以期从光谱学和蛋白质化学角度解析牡丹花瓣的伸展机制, 为如何提高牡丹的观赏性奠定基础, 具有重要的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2014—2015 年对山东菏泽的‘凤丹白’牡丹花期进行连续调查, 筛选并标记性状相近的 4 年生实生植株, 于 2015 年 10 月移植于武汉市林业果树研究所牡丹标准化栽培资源圃, 种植密度为  $40\text{ cm} \times 80\text{ cm}$ , 根据生长情况进行浇水、施肥、除草以及病虫害防治管理。

### 1.2 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 表征

分别取蕾期、初开期和盛开期的‘凤丹白’花各 5 朵, 每朵取外层的第 1 片到第 3 片的新鲜花瓣 3 片, 先后用清水和去离子水 ( $> 18\text{ M}\Omega$ ) 清洗, 切碎置于干净的培养皿中,  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干后, 用球磨机磨成粉末 (约  $2\text{ }\mu\text{m}$ )。取  $1\sim 2\text{ mg}$  干燥的样品与  $200\text{ mg}$  干燥的溴化钾置于玛瑙研钵中, 研成均匀细粉 (约  $2\text{ }\mu\text{m}$ )。取少量样品细粉压片, 利用红外光谱仪 (Bruker vertex 70), 以空气为参比, 选用  $4\text{ cm}^{-1}$  的分辨率, 扫描 128 次; 波数范围为  $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$  (Li et al., 2014; Suresh et al., 2016)。

### 1.3 数据分析及拟合

利用 Origin 8.0 统计软件对 FTIR 原始数据作图。为了更详细地分析‘凤丹白’牡丹从蕾期到盛开花瓣上生化物质的变化趋势, 参考 Suresh 等 (2016) 对花生叶片 FTIR 图谱中两个峰位间吸光值的比值 (峰值的比值) 的变化规律与物质积累之间关系的研究, 对 FTIR 图谱中 6 种峰值 (A) 的比值进行了探讨。包括:  $R\text{ I} = A\,2\,951\text{ cm}^{-1}/A\,2\,858\text{ cm}^{-1}$ ,  $R\text{ II} = A\,1\,547\text{ cm}^{-1}/A\,1\,656\text{ cm}^{-1}$ ,  $R\text{ III} = A\,1\,083\text{ cm}^{-1}/A\,1\,547\text{ cm}^{-1}$ ,  $R\text{ IV} = A\,1\,743\text{ cm}^{-1}/A\,1\,458\text{ cm}^{-1}$ ,  $R\text{ V} = A\,1\,743\text{ cm}^{-1}/A\,1\,547\text{ cm}^{-1}$ ,  $R\text{ VI} = A\,1\,458\text{ cm}^{-1}/A\,1\,547\text{ cm}^{-1}$ 。

对氨基 I 区域 ( $1\,600\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ ) 的曲线进行高斯单峰正态分布的曲线拟合, 再依据不同蛋白质二级结构的振动峰位, 再次对拟合曲线进行高斯多峰拟合, 具体分峰数依据结果而定。从分峰拟合结果中得到每种蛋白质二级结构所对应的峰面积, 依据各峰峰面积借助 Excel 2010 计算蛋白质二级结构所占的比例, 借助 Origin 8.0 统计软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 花不同发育时期的界定

为研究‘凤丹白’在开花过程中花瓣化学物质及蛋白质二级结构的变化规律，本研究选定蕾期、初开期和盛花期 3 个阶段（图 1）进行深入探讨。‘凤丹白’花朵以单瓣为主，少数花瓣略有增多，呈荷花形，白色，并具有灰色雌蕊和黄色雄蕊。

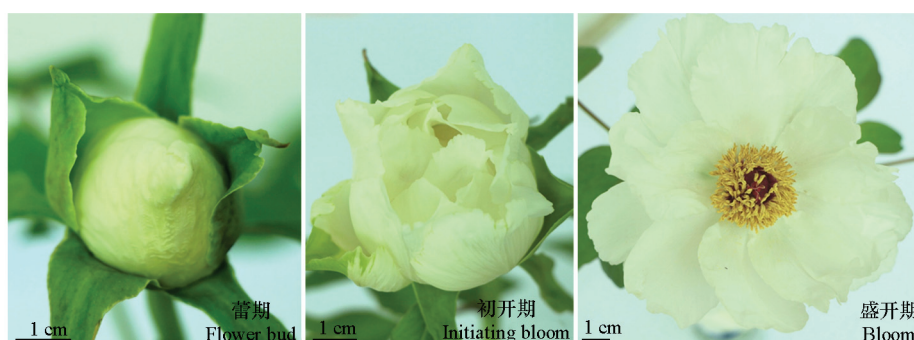


图 1 ‘凤丹白’花不同发育阶段的界定

Fig. 1 The definition of ‘Fengdanbai’ flower with different development

### 2.2 花瓣的 FTIR 光谱特征

图 2 表明，从 400 到 4 000  $\text{cm}^{-1}$  波谱范围内，‘凤丹白’牡丹花瓣蕾期存在 13 个振动峰，初开期和盛花期时各出现 15 个振动峰，从低波数到高数依次用小写英文字母（a~o）表示。振动峰的波数、振动方式和归属详见表 1。

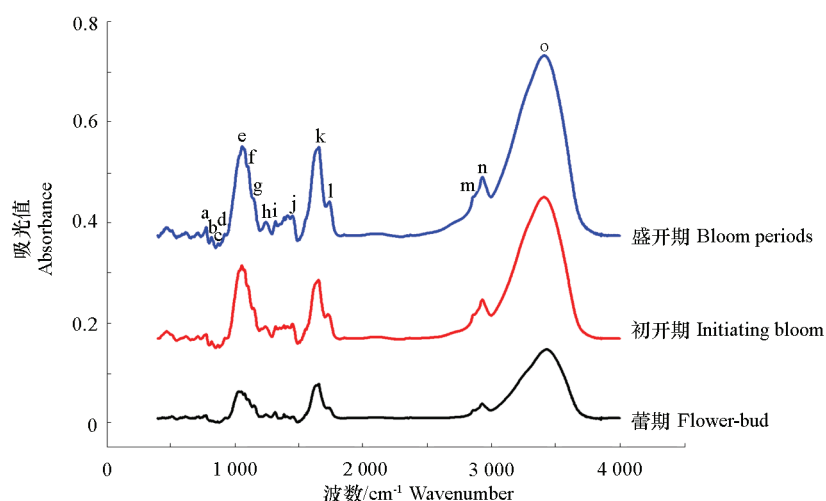


图 2 ‘凤丹白’花瓣 FTIR 图谱的比较

小写字母所标峰位的归属详见表 1。

Fig. 2 Comparative FTIR spectra of ‘Fengdanbai’ petal

Labeled peaks are assigned in Table 1.

表 1 ‘凤丹白’ 花瓣 FTIR 图谱的主要峰位及其归属  
Table 1 Wavenumber and assignment of the main peaks in the FTIR spectrum of ‘Fengdanbai’ petal

峰位	波数/cm <sup>-1</sup>	Wave number	归属	文献	
Peak No.	蕾期 Flower bud	初开期 Initiating bloom	盛开期 Bloom	Assignment Reference	
a	777	777	777	氯乙酸盐的 C–Cl 伸缩振动 C–Cl stretch of chloroacetate	Zhu et al., 2015
b	—	818	818	芳香族化合物的 C–H 面外变形振动 C–H out of plane deformation from aromatics	Thring et al., 1991
c	—	868	868	碳水化合物的 C–H 面外弯曲振动 C–H out of plane bending from carbohydrate	Suresh et al., 2016
d	922	922	922	碳水化合物的 C–H 面外弯曲振动 C–H out of plane bending from carbohydrate	Suresh et al., 2016
e	1 030	1 060	1 060	细胞壁多糖（葡甘露聚糖或阿拉伯聚糖）的 C–OH 变形振动； C–O 伸缩振动 C–OH deformation and C–O stretch of cell wall polysaccharides （glucomannan or arabinan）	Wang, 2012; Malek et al., 2014
f	1 105	1 105	1 105	果胶基质的 C=N 反对称振动 C=N asymmetric of pectic substances	Wang, 2012
g	1 155	1 155	1 155	纤维素的 C–O–C 的不对称伸缩振动 C–O–C asymmetric stretch of cellulose	Wang, 2012
h	1 243	1 243	1 243	磷脂质、核酸的 P=O 的对称伸缩振动 P=O symmetric stretch of phospholipids, nucleic acids	Pallua et al., 2011
i	1 314	1 314	1 314	纤维素的 C–H 对称弯曲振动 C–H symmetric bending of cellulose	Sene et al., 1994
j	1 447	1 447	1 447	蛋白质、脂类和木质素的 CH <sub>3</sub> and CH <sub>2</sub> 的不对称伸缩振动 CH <sub>3</sub> and CH <sub>2</sub> asymmetric stretch of proteins, lipids and lignin	Pallua et al., 2011
k	1 651	1 651	1 651	蛋白质的 C=O 伸缩振动和 N–H 弯曲振动（氨基 I） C=O stretch and N–H bend（amide I）of proteins	Malek et al., 2014
l	1 740	1 740	1 740	脂类和磷脂质的 C=O 伸缩振动 C=O stretch（ester）of lipids and phospholipids	Malek et al., 2014
m	2 853	2 853	2 853	脂类和蛋白的 CH <sub>2</sub> 对称伸缩振动 CH <sub>2</sub> symmetric stretching lipid and protein	Suresh et al., 2016
n	2 926	2 926	2 926	主要为脂类和蛋白质的 CH <sub>2</sub> 反对称伸缩振动 Mainly CH <sub>2</sub> asymmetric stretching of lipid and protein	Suresh et al., 2016
o	3 450	3 410	3 410	醇羟基、酚羟基、羧羟基或氨基 A 的 O–H 或 N–H 的伸缩振动 O–H or N–H stretching vibrations of alcoholic OH, phenolic OH, carboxylic OH or amide A	Marshall et al., 2005; Suresh et al., 2016

在蕾期不存在 818 和 868 cm<sup>-1</sup>（图 2，b 和 c）的振动峰，其中 818 cm<sup>-1</sup> 振动峰对应 C–H 面外变形振动，主要来源于芳香族化合物（Thring et al., 1991）；868 cm<sup>-1</sup> 振动峰则对应 C–H 面外弯曲振动，主要来源于碳水化合物。此外，922 cm<sup>-1</sup> 处振动峰也代表碳水化合物中 C–H 的面外弯曲振动，该峰存在于花期的 3 个阶段，峰强无明显差异。初开期和盛开期的花瓣与蕾期相比，碳水化合物逐渐增多，并开始合成芳香族化合物。同时，有 9 个 3 个阶段共有的振动峰（777、1 105、1 155、1 243、1 447、1 651、1 740、2 853 和 2 926 cm<sup>-1</sup>）峰强随着花瓣的发育而逐渐增强，表明随着花瓣伸展，磷脂质、核酸、蛋白质、脂类和木质素物质不断增多。1 155 cm<sup>-1</sup> 处的振动峰为纤维素上 C–O–C 的不对称伸缩振动（Cárdenas et al., 2004; Wang, 2012），峰强变强，另一振动峰位于 1 314 cm<sup>-1</sup>。1 105 cm<sup>-1</sup> 处振动峰为果胶基质中 C=N 的反对称振动，峰强逐渐增强，表明随着花瓣的伸展，细胞壁的成分果胶和纤维素含量有所增加。蕾期 1 030 cm<sup>-1</sup> 处的振动峰在花开后移至 1 060 cm<sup>-1</sup> 处，它们分

别代表细胞壁多糖 COH 变形振动和 C-O 伸缩振动 (Wang, 2012; Malek et al., 2014), 表明蕾期和花开后花瓣细胞壁多糖分别以葡甘露聚糖和阿拉伯聚糖为主。3 个阶段的花瓣在 3 410 ~ 3 450 cm<sup>-1</sup> 处存在较强的吸收振动峰, 该区域内振动为 O-H 和 N-H 的伸缩振动, 主要源于碳水化合物和氨基 A (Marshall et al., 2005; Suresh et al., 2016)。

2.3 花瓣的峰值强度比值变化规律

RI 表示甲基与亚甲基吸收值之比, RI 随花瓣的发育有所降低, 表明花瓣在发育过程中蛋白质中甲基基团减少的数量高于亚甲基基团。

RII 的变化由总蛋白含量的变化引起, 随着花瓣的发育, RII 有所增加 (图 3), 与蕾期相比, 初开期蛋白质含量增加了 67.16%, 盛花期增加了 80.65%。

RIII 表示糖蛋白的变化, 其随花瓣的发育而降低 (图 3), 初开期比蕾期降低了 4.17%, 盛花期则降低了 26.22%。

RIV 的变化归因于脂类的氧化程度, 出现先大幅降低后小幅增加的趋势 (图 3), 表明蕾期花瓣中脂类的氧化程度较高, 初开期时, 降低了 73.48%, 盛花期时虽有小幅升高, 但仍然比蕾期降低了 72.29%。

RV 呈现逐渐下降趋势 (图 3), 初开期比蕾期下降了 25.59%, 盛花期则下降了 29.81%, 表明花瓣发育时出现脂类降解现象, 该现象由羰基形成所致。

RVI 表示蛋白质乙基数量的变化 (Gupta et al., 2015), 出现先明显增加后平稳下降的趋势 (图 3), 与蕾期相比, 初开期时花瓣的 RVI 增加了 180.62%, 盛花期时也增加了 153.27%, 表明蛋白质中乙基数量随花瓣发育出现迅速增加后平缓下降的趋势。

2.4 花瓣中蛋白质二级结构的特性

蛋白质的二级结构主要影响 FTIR 中氨基 I 区域 (1 600 ~ 1 700 cm<sup>-1</sup>) 图谱的形貌, 每种二级结构分别对应不同的 FTIR 峰位, 详见表 2 (Lahlali et al., 2014; Suresh et al., 2016)。

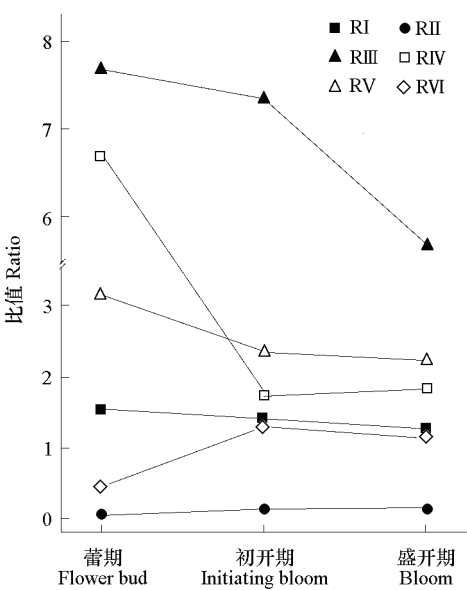


图 3 ‘凤丹白’花瓣的吸光值比值  
Fig. 3 The absorbance ratio of ‘Fengdanbai’ petal

表 2 用于曲线拟合的蛋白质二级结构区域及对应的 FTIR 峰位

Table 2 Selected area are used for curve fitting and protein secondary structure calculation on the basis of FTIR				
代号 Code name	二级结构 Secondary structure	最小值/cm <sup>-1</sup> Minimum value	最大值/cm <sup>-1</sup> Maximum value	平均值/cm <sup>-1</sup> Intermediate value
β + S + P	β - 折叠 + 侧链 + 果胶 β-sheet + side chain + pectin	1 610	1 620	1 615
β	β - 折叠 β-sheet	1 630	1 640	1 635
R	无规卷曲 random coil	—	—	1 648
α	α - 螺旋 α-helix	1 648	1 660	1 654
L + T	环 + 转角 loop + turn	1 662	1 678	1 670
B + T	β - 折叠 + 转角 β-sheet + turn	1 682	1 690	1 686

根据蛋白质二级结构的峰位对  $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$  范围的 FTIR 图谱高斯多峰拟合 (图 4), 明确不同发育时期花瓣中蛋白质二级结构的特征及差异性。首先对原始谱图进行高斯单峰拟合, 然后以蛋白质二级结构的峰位 (表 2) 为分峰位点, 借助 origin 8.0 对拟合单峰曲线进行高斯多峰拟合 (结果详见图 4 虚线所示)。

蕾期的花瓣含有 6 种蛋白质二级结构: 与果胶相连的  $\beta$ -折叠 ( $\beta + S + P$ )、 $\beta$ -折叠 ( $\beta$ )、无规卷曲 (R)、 $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ )、环与转角 (L + T)、 $\beta$ -折叠与转角 ( $\beta + T$ ); 初开期和盛开花瓣含有除  $\beta + T$  之外的其余 5 种蛋白质二级结构 (图 4)。

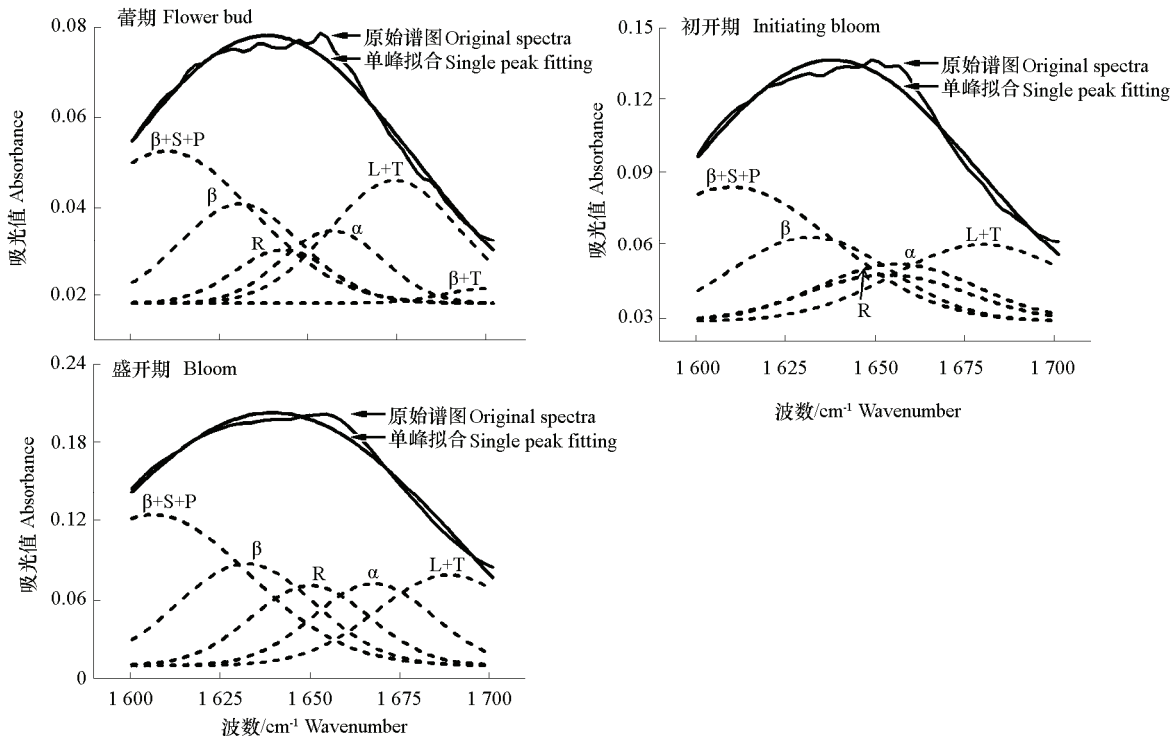


图 4 ‘凤丹白’ 蕾期、初开期和盛开花瓣中氨基 I ( $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ ) 区域的曲线拟合

L、T、R、S、P、 $\alpha$  和  $\beta$  分别代表环、转角、无规卷曲、侧链、果胶、 $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠。

Fig. 4 Curve fitting of the amide I region ( $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ ) of ‘Fengdanbai’ petal at flower-bud, initiating bloom and bloom periods  
L, T, R, S, P,  $\alpha$  and  $\beta$  indicate loop, turn, random coil, side chain, pectin,  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet, respectively.

根据每种蛋白质二级结构所占峰面积计算其所占百分比 (图 5), 将初开期、盛花期与蕾期花瓣的二级结构百分比进行比较, 与果胶相连的  $\beta$ -折叠 ( $\beta + S + P$ ) 所占百分比在花瓣伸展过程中存在小幅下降趋势, 与蕾期相比, 在初开期下降了 0.75%, 盛花期下降了 1.60%; 环与转角 (L + T) 出现平稳下降趋势, 初开期比蕾期下降了 17.07%, 盛花期下降了 21.85%; 无规卷曲 (R) 所占比例在花瓣伸展过程中逐渐增多, 初开期比蕾期增加了 40.26%, 盛花期增加了 64.37%;  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ ) 所占比例在花瓣伸展过程中也存在增长的趋势, 初开期增长了 18.42%, 盛花期增长了 20.19%;  $\beta$ -折叠 ( $\beta$ ) 出现先增加后下降的趋势。



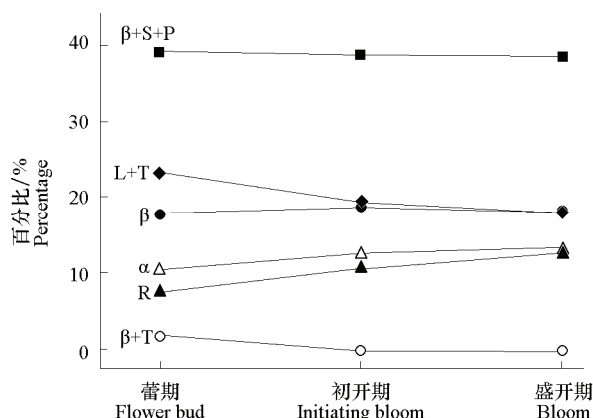


图 5 基于高斯多峰拟合分析‘凤丹白’花瓣内蛋白质二级结构的百分比

Fig. 5 The percentage of protein secondary structure of 'Fengdanbai' petal based on multi-peaks Gaussian fitting

### 3 讨论

FTIR 技术已经普遍应用于植物材料上, Lahlali 等 (2014) 利用 FTIR 光谱技术揭示了热胁迫下豌豆花粉粒中脂质和蛋白质的变化规律; Lakshmi (2015) 利用 FTIR 技术从防风草叶片中鉴定出多种化合物; Chatjigakis 等 (1998) 通过 FTIR 深入研究了桃果实细胞壁上果胶的酯化程度。本研究利用 FTIR 技术发现‘凤丹白’牡丹从蕾期、初开期到盛花期整个发育过程生化物质成分上存在规律性变化。首先, 蕾期花瓣基本上不存在芳香族化合物 ( $818\text{ cm}^{-1}$ ), 随着花朵绽放, 芳香族化合物开始积聚。其次, 与细胞壁组分相关的果胶 ( $1\ 105\text{ cm}^{-1}$ ) 和纤维素的振动峰强度 ( $1\ 155\text{ cm}^{-1}$ ) (Cosgrove, 2005; Wang, 2012) 随花瓣的伸展逐渐增强, 说明细胞扩大生长需要合成更多的果胶和纤维素, 促进细胞壁的有序自组装 (Schopfer, 2006)。再次, 与磷脂质、核酸、脂类和蛋白质相关的振动峰强度也随花瓣的发育逐渐增强。磷脂质是构成细胞膜的主要组成成分 (Mashaghi et al., 2013), 磷脂质成分的增多, 结合细胞壁组分的变化, 进一步表明细胞的扩张生长速度加快, 从而导致其它代谢产物的增加, 如核酸、脂类和蛋白质。

在多种代谢产物中, 蛋白质是植物体重要的组成部分和生命活动的物质基础。蛋白质的翻译后修饰更能有效调控基因转录、基因表达和染色体结构 (Lee et al., 2005)。本研究中发现蛋白质的甲基基团在初开期和盛花期分别比蕾期减少了 7.97% 和 13.38%, 糖蛋白的变异程度 ( $A\ 1\ 083\text{ cm}^{-1}/A\ 1\ 547\text{ cm}^{-1}$ ) 呈现下降趋势, 即糖基化蛋白质变异程度降低, 表示糖蛋白含量在增加, 推测‘凤丹白’有可能是通过蛋白质的糖基化修饰调控花瓣伸展时的信号转导过程。

此外, 蛋白质的二级结构对蛋白质的空间构象和生物活性有着重要影响。本研究显示‘凤丹白’不同时期的花瓣均含有多种不同的蛋白质二级结构。 $\alpha$ -螺旋在花瓣伸展时呈现增加趋势。有研究表明  $\alpha$ -螺旋与蛋白质-水之间氢键的多少有关, 如: 抗高温的豌豆品种在高温胁迫时, 其花粉粒上  $\alpha$ -螺旋降低; 香蒲花粉粒受到高温胁迫时,  $\alpha$ -螺旋也出现下降趋势 (Wolkers & Hoekstra, 1995; Lahlali et al., 2014)。据此推测, 花瓣在蕾期组织中含水量较低, 导致蛋白质-水之间氢键较少, 需要通过降低  $\alpha$ -螺旋来应对缺水造成的生理胁迫, 当花瓣伸展时, 组织吸水能力升高水分增多, 则  $\alpha$ -螺旋也逐渐更多。 $\beta$ -折叠与植物体内 ATP 的存在形式有关, ATP 为游离状态时,  $\beta$ -折叠含



量较高, 当 ATP 被修饰后 (如 ATP 与核酸反应), 影响蛋白质的二级结构, 使  $\beta$ -折叠含量降低 (Liu & Barth, 2003)。本研究中发现蕾期  $\beta$ -折叠含量较低, 可以推测 ATP 被修饰, 为花瓣生长发育合成所需的物质, 而花瓣伸展后, ATP 主要是以游离态存在, 为花瓣生物大分子物质转移提供动力。无规卷曲是蛋白质分子功能实施和构象的重要区域 (Williamson, 1994)。本研究结果显示无规卷曲在 3 个阶段几乎呈现直线增加趋势, 推测在花瓣伸展过程中形成了更多功能域较多的蛋白质, 以有效调控花朵发育复杂的生物化学过程。

## References

- Barth A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767 (9): 1073 – 1101.
- Cárdenas G, Cabrera G, Taboada E, Miranda S P. 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and  $^{13}\text{C}$  cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93 (4): 1876 – 1885.
- Chatjigakis A K, Pappas C, Proxenia N, Kalantzi O, Rodis P, Polissiou M. 1998. FTIR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37 (4): 395 – 408.
- Cheng Fang-yun, Li Jia-jue. 1998. Exportation of Chinese tree peonies (Mudan) and their development in other countries I : cultivated. *Journal of Northwest Normal University (Nature Science)*, 34 (1): 109 – 116. (in Chinese)
- 成仿云, 李嘉珏. 1998. 中国牡丹的输出及其在国外的发展 I : 栽培牡丹. *西北师范大学学报 (自然科学版)*, 34 (1): 109 – 116.
- Cosgrove D J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (11): 850 – 861.
- Fitzkee N C, Rose G D. 2004. Reassessing random-coil statistics in unfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (34): 12497 – 12502.
- Gupta B S, Jelle B P, Gao T. 2015. Application of ATR-FTIR spectroscopy to compare the cell materials of wood decay fungi with wood mould fungi. *International Journal of Spectroscopy*, 7.
- Kauffmann E, Darnton N C, Austin R H, Batt C, Gerwert K. 2001. Life times of intermediates in the  $\beta$ -sheet to  $\alpha$ -helix transitions of  $\beta$ -lactoglobulin by using a diffusional IR mixer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (12): 6646 – 6649.
- Krimm S, Bandekar J. 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 38 (C): 181 – 367.
- Lahlali R, Jiang Y, Kumar S, Karunakaran C, Liu X, Borondics F, Hallin E, Bueckert R. 2014. ATR-FTIR spectroscopy reveals involvement of lipids and proteins of intact pea pollen grains to heat stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 5 (747): 1 – 10.
- Lakshmi P. 2015. Studies on phytochemical and FTIR analysis of *Anisomeles malabarica* (Linn) leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (9): 859 – 868.
- Lee D Y, Teyssier C, Strahl B D, Stallcup M R. 2005. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocrine Reviews*, 26 (2): 147 – 170.
- Li S S, Wang L S, Shu Q Y, Wu J, Chen L G, Shao S, Yin D D. 2015. Fatty acid composition of developing tree peony (*Paeonia*, section Moutan, DC.) seeds and transcriptome analysis during seed development. *Bmc Genomics*, 16 (1): 1 – 14.
- Li X L, Zhang W J, Lu J W, Huang L X, Nan D F, Webb M A, Hillion F, Wang L J. 2014. Templated biomineralization on self-assembled protein nanofibers buried in calcium oxalate raphides of *Musa* spp. *Chemistry of Materials*, 26 (12): 3862 – 3869.
- Li Zi-feng, Wang Jia, Hu Yong-hong, Liu Qing-hua, Qin Jun. 2007. Karyotype analysis and cytology observation on meiosis of *Paeonia ostii* ‘Phoenix White’. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 411 – 416. (in Chinese)
- 李子峰, 王 佳, 胡永红, 刘庆华, 秦 俊. 2007. ‘凤丹白’牡丹核型分析与减数分裂的细胞遗传学观察. *园艺学报*, 34 (2): 411 – 416.
- Liu Jian-hua, Cheng Chuan-ge, Wang Xiao, Jiang Ting, Yuan Jin-peng. 2006. Analysis of fatty acids in *Paeonia suffruticosa* andr. seeds. *Chemical Analysis and Meterage*, 15 (6): 30 – 31. (in Chinese)
- 刘建华, 程传格, 王 晓, 江 婷, 苑金鹏. 2006. 牡丹籽油中脂肪酸的组成分析. *化学分析计量*, 15 (6): 30 – 31.
- Liu M, Barth A. 2003. Mapping interactions between the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and its substrate ATP with infrared spectroscopy. *Journal of Biological*

- Chemistry, 278 (1): 10112 - 10118.
- Malek K, Wood B R, Bambery K R. 2014. Optical spectroscopy and computational methods in biology and medicine. Berlin: Springer Netherlands: 419 - 473.
- Marshall C P, Javaux E J, Knoll A H, Walter M R. 2005. Combined micro-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and micro-Raman spectroscopy of *Proterozoic acritarchs*: a new approach to palaeobiology. *Precambrian Research*, 138 (3 - 4): 208 - 224.
- Mashaghi S, Jadidi T, Koenderink G, Mashaghi A. 2013. Lipid nanotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2): 4242 - 4282.
- Pallua D J, Pezzei C, Huckpezei V, Schonbichler A S, Bittner L K, Bonn K G, Saeed A, Majeed S, Farooq A, Najam-ul-Haq M, Abel G, Popp M, Huck W C. 2011. Advances of infrared spectroscopic imaging and mapping technologies of plant material. *Current Bioactive Compounds*, 7 (12): 106 - 117.
- Raba D N, Poiana M A, Borozan A B, Stef M, Radu F, Popa M V. 2015. Investigation on crude and high-temperature heated coffee oil by ATR-FTIR spectroscopy along with antioxidant and antimicrobial properties. *PLoS ONE*, 10 (9): 1 - 20.
- Schopfer P. 2006. Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany*, 93 (10): 1415 - 1425.
- Sene C F, McCann M C, Wilson R H, Grinter R. 1994. Fourier-transform Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy (an investigation of five higher plant cell walls and their components). *Plant Physiology*, 106 (4): 1623 - 1631.
- Shi Jiang-tao, Li Jian. 2016. Comparative analysis of spectroscopy features of early-stage wood forming tissue in common tree species in northeast, China. *Scientia Silvae Sinicae*, 52 (6): 115 - 121. (in Chinese)
- 石江涛, 李 坚. 2016. 东北常见树种木材形成早期组织波谱特征差异分析. *林业科学*, 52 (6): 115 - 121.
- Suresh S, Karthikeyan S, Jayamoorthy K. 2016. Effect of bulk and nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles on peanut plant leaves studied by Fourier transform infrared spectral studies. *Journal of Advanced Research*, 7 (5): 739 - 747.
- Thring R W, Chornet E, Bouchard J, Vidal P F, Overend R P. 1991. Evidence for the heterogeneity of glycol lignin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 30 (1): 232 - 240.
- Wang Y L. 2012. Application of Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) for quick identification of Chinese herb *Solanum lyratum*. *Plant Omics Journal*, 5 (6): 508 - 513.
- Williamson M P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, 297: 249 - 260.
- Wolkers W F, Hoekstra F A. 1995. Aging of dry desiccation-tolerant pollen does not affect protein secondary structure. *Plant Physiology*, 109 (3): 907 - 915.
- Wu Jing, Cheng Fang-yun, Zhong Yuan. 2016. The numerical classification of flower color phenotype in flare tree peony. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (5): 947 - 956. (in Chinese)
- 吴 静, 成仿云, 钟 原. 2016. 紫斑牡丹花色表型数量分类研究. *园艺学报*, 43 (5): 947 - 956.
- Zhu Fu-yong, Liu Chuan-jiao, Xue Jing-qi, Wang Shun-li, Zhang Ping, Ren Xiu-xia, Zhang Xiu-xin. 2014. Isolation of florigen gene *PdFT* and its effects on flowering of tree peony (*Paeonia delavayi* Franch.). *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (13): 2613 - 2624. (in Chinese)
- 朱富勇, 刘传娇, 薛璟祺, 王顺利, 张 萍, 任秀霞, 张秀新. 2014. 成花素基因 *PdFT* 的克隆及其对牡丹成花的影响. *中国农业科学*, 47 (13): 2613 - 2624.
- Zhu J, Su Y, Zhao X, Li Y, Zhang R, Fan X, Ma Y, Liu Y, Jiang Z. 2015. Constructing a zwitterionic ultrafiltration membrane surface via multisite anchorage for superior long-term antifouling properties. *Rsc Advances*, 5 (50): 40126 - 40134.
- Zscherp C, Barth A. 2001. Reaction-induced infrared difference spectroscopy of the study of protein reaction mechanisms. *Biochemistry*, 40 (7): 1875 - 1883.