不同蒴齿类型藓类植物的 FTIR 光谱分析及系统学意义初探

徐晟,曹同*,聂明

上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘 要 采用傅里叶变换红外光谱技术(FTIR)研究了分属不同蒴齿类型的 23 种藓类植物的红外光谱。通 过比较光谱特征典型的 5 个代表藓种间红外光谱图的差异,确定了 1 790~1 330 cm⁻¹, 1 200~960 cm⁻¹, 895~830 cm⁻¹和 725~655 cm⁻¹四个光谱特征区间。23 种藓类植物在该四个特征区间的光谱数据分析结果 表明,基于二阶导数红外光谱结合分级聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)和主成分分析法(principal component analysis, PCA)能很好地区分出五大藓类植物类型: 泥炭藓类、线齿类、顶蒴单齿类、顶蒴双 齿类、侧蒴双齿类,与以蒴齿结构作为最基本特征的传统藓纲分类系统相一致。因此,FTIR 光谱结合多元 分析方法可作为一种实用的工具运用于苔藓植物系统学研究中。

关键词 红外光谱; 藓类; 系统学; 分级聚类分析; 主成分分析 中图分类号: 0657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000 0593(2007) 09-1710 05

引 言

苔藓植物是绿色植物界由水生向陆生过渡的一个独特的 高等植物类群,它的构造相对简单而化学组成成分却十分复 杂^[1]。其中藓类植物是苔藓植物中最大的一个纲,全世界约 有 119科,901 个属,12 800 多种^[2]。藓纲(Musei) 一般沿用 Fleischer(1923)和 Brotherus(1924 25)等提出的以蒴齿结构 作为藓类最基本特征的分类系统,分为 3 个亚纲,泥炭藓亚 纲(Sphagnidae)、黑藓亚纲(Andreaeidae)和真藓亚纲(Bryidae)。其中真藓亚纲根据蒴齿的来源和层次分为蒴齿由细胞 发育而来的线齿类(Nematodontae)和蒴齿由细胞壁部分融合 而成的节齿类(Arthrodontae);节齿类又根据孢蒴着生位置 和蒴齿的层数分为顶蒴单齿类(Acrocarpi Haplolepideae)、 顶蒴双齿类(Acrocarpi Diplolepideae)、侧蒴双齿类(Pleurocarpi Diplolepideae)^[1-5]。中国藓类植物属志^{6,7]}采用的就是 上述系统。

利用傅里叶变换红外光谱技术(FTIR)对生物材料的研 究于近年来开始兴起,通过光谱可以反映整个细胞的化学组 成,包括多糖(纤维素、半纤维素)、蛋白质、核酸、脂类及许 多生物大分子的振动特征,因此可以综合反映生化信息上的 差别,即通过"指纹特征"区分不同的物种和类群^[8,9]。目前 应用领域主要集中在微生物(细菌^[10]、真菌^[11])、藻类^[12]、 中药材^[13]、苗间作物^[8,14]和杂草^[14]等的种间分类和鉴定, 而在生物系统学领域内,包括科、目及其以上类群的区分方 面研究较少^[15]。苔藓植物学方面郭水良等曾初步报道了用 FTIR 光谱结合除趋势对应分析鉴别不同的药用苔藓植 物^[16]。本文采用傅里叶变换红外光谱技术对藓纲中分属不 同类群的 23 种藓类植物进行了测定,并应用分级聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)和主成分分析法(principal component analysis, PCA)对4个光谱特征区间的数据进 行分析,结果与以蒴齿结构作为最基本特征的传统藓纲分类 系统相一致,初步探索和证明了 FT IR 光谱技术在苔藓植物 系统学研究中的可行性。特将结果予以报道。

1 实验部分

1.1 研究材料

选取分属于五类不同蒴齿结构的藓类植物为研究材料, 包括: 泥炭藓亚纲的泥炭藓类三种, 真藓亚纲的线齿类四种, 真藓亚纲节齿类中的顶蒴单齿类四种, 顶蒴双齿类五种 和侧蒴双齿类七种, 共计 11 科, 16 属, 23 种。样品分别采集 自上海师范大学生命与环境科学学院苔藓植物研究室标本 馆, 并经过实验室鉴定(见表 1)。

12 样品预处理

取待测藓类植物成熟配子体叶片,在蒸馏水中洗净,40 ℃下真空干燥 2 h 后于玛瑙研钵中研磨成粉,取1 mg 粉末 与 KBr 按 1:20(☉)研匀后压片。

作者简介: 徐晟 , 1981 年生, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生 * 通讯联系人 e mail: caotong@shnu edu cn © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

收稿日期: 2006 05-28, 修订日期: 2006 08-28

基金项目:国家自然科学基金项目(30370111)和上海高校科学发展重点基金项目(02D247)资助

1.3 仪器和参数

第9期

Nicolet Avatar 370 型傅里叶变换红外光谱仪(美国热电

公司),光谱测量范围为4 000~400 cm⁻¹,光谱分辨率为4 cm⁻¹,信号扫描累加 64 次。

样品号	种名	凭证标本	类型
1	尖叶泥炭藓 Sphagnum capillifolium(Ehrh) Hedw.	黑龙江阿尔山:曹同,040431	海岸故亚纲
2	中位泥炭藓 Sphagnum magellanicum Brid	黑龙江阿尔山: 曹同, 040438	北灰鲜业 纲 沿岩苹素
3	粗叶泥炭藓 Sphagnum squarrosum Crome	黑龙江阿尔山:曹同,040416	泥灰 鲜尖
4	小金发藓 Pogonatum aloides (Hedw) P. Beau v	吉林长白山: 曹同, 040485	
5	金发藓 Polytrichum commune Hedw.	吉林长白山:曹同,0406506	真藓亚纲
6	波叶仙鹤藓 Atrichum undulatum (Hedw.) P. Beauv	吉林长白山:曹同,04058	线齿类
7	小仙鹤藓 Atrichum crispulum Schimp ex Besch	江苏无锡三茅峰:张震,0135	
8	糙叶白发藓 Leucobryum boninense Sull & Lesq	江苏无锡鼋头渚:张震,1040	古茲亚纲
9	桧叶白发藓 Leucobryum juniperoideum (Brid) C. Muell	江苏无锡鼋头渚:张震,1080	具 鲜业 纲
10	小凤尾藓 Fissidens bryoides Hedw	江苏无锡蠡园:张震,0891	下 因 尖 西 茹 芭 止 米
11	大凤尾藓 Fissidens nobilis Griff.	江苏南京灵谷景区:徐晟 ,031	<u> </u>
12	长蒴丝瓜藓 Pohlia elongata Hedw.	江苏无锡龙头渚:张震,0033	
13	密叶匍灯藓 Plagiomnium confertidens(Lindb & Arn) T. Kop	黑龙江小兴安岭五营: 曹同,040124	真藓亚纲
14	偏叶提灯藓 Mnium thom sonii Schimp	吉林长白山: 曹同, 040676	节齿类
15	直叶珠藓 Bartramia ithyphylla Brid	黑龙江小兴安岭五营: 曹同,040711	顶蒴双齿类
16	短月藓 Brachymenium nepalense Hook.	四川峨眉山仙降寺: 曹同, 031106	
17	暗绿多枝藓 Haplohymenium triste (Ces) Kindb	黑龙汀小兴安岭五营: 曹同, 040189	
18	东亚小羽藓 Haplocladium strictulum (Card.) Reim	江苏无锡蠡园:张震. 0657	
19	狭叶麻羽藓 Claopodium aciculum (Broth) Broth	江苏南京紫金山:徐晟 034	真藓亚纲
20	大灰藓 Hypnum plumaeforme Wilson	江苏无锡蠡园:张震,0535	节齿类
21	钝叶绢藓 Entodon obtusatus Broth	江苏南京紫金山:徐晟 004	侧蒴双齿类
22	狭叶绢藓 Entodon macropodus(Hedw) C Muell	江苏南京灵谷景区:徐晟 ,034	
23	阔叶棉藓 Plagiothecium platy phyllum Moenk	江苏无锡鼋头渚:张震,1276	

Table 1 List of 23 moss species and voucher specimens

1.4 数据分析

通过 OM NIC6 2 软件对原始光谱进行二阶导数转换, 选取 655~725 cm⁻¹, 830~895 cm⁻¹, 960~1 200 cm⁻¹, 1 330~1 790 cm⁻¹四段作为特征区间,构建数据矩阵,导入 M V SP 3 13i 软件进行数据统计分析,通过使用最小变量 (Wards)算法的分级聚类分析(H CA)和主成分分析法(PCA) 比较结果。

2 结果与分析

2.1 五种藓类 FTIR 光谱 分析和特征区间的确定

为了更直观地比较藓类植物 FTIR 光谱并找出其特征区 间,从23 种藓类植物光谱中选出五种具典型性光谱特征、分 属不同蒴齿类型的代表藓种进行分析。它们是:(1)中位泥 炭藓(泥炭藓类),(2)金发藓(线齿类),(3) 桧叶白发藓(顶蒴 单齿类),(4) 密叶匍灯藓(顶蒴双齿类),(5) 钝叶绢藓(侧蒴 双齿类)。通过该五种光谱可以基本反映23 种藓类在光谱特 征上的差别。五种藓类的 FTIR 光谱如图1所示。

上述光谱是纤维素、半纤维素、蛋白质、碳水化合物、 核酸、脂类及许多生物大分子在藓类植物配子体叶片内的综 合表达,可反映上述聚合物分子在叶细胞内的含量、构型、 构象及其所发生的变化,每个特征峰都有相应的化学成分归 属。根据相关文献,在光谱上,(1)2920和2849 cm⁻¹附近



Fig 1 FTIR spectra of five representative moss species

的吸收峰为甲基 C-H 和亚甲基 C-H 的对称和反对称伸缩 震振动,反映脂 肪酸 和各种 膜以及 细胞 壁的成 分^[9,12]; (2) 1 736 cm⁻¹ 附近的吸收峰主要来自脂肪酸的 C=O 的伸 缩振动^[9,12];(3) 1 640 和1 455 cm⁻¹ 附近的吸收峰是缔合态 的蛋白质酰胺 I 带和蛋白质酰胺 II 带^[8,11];(4) 1 390 到 1 310 cm⁻¹ 附近谱峰为蛋白质受氧、氮原子影响的甲基和亚 甲基对称弯曲振动区^[9,12];(5) 1 250 和1 065 cm⁻¹ 附近的吸 收峰来自磷酸二酯基团的对 称和反对 称伸缩振动^[8,12];

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

及多糖分子中醚键(C-O-C)和 C-O 的对称伸缩振动^[8,9];(7)900到650 cm⁻¹间的吸收峰主要由碳水化合物的糖环伸缩振动,脂肪胺的-N-H 吸收等产生的,并且还反映了芳香环结构的特征吸收带,该区域谱峰多而弱且相对较杂,属于光谱指纹区,目前还不能被逐个识别,但可以确定每一种化合物在此区域都有自己唯一的谱带对应^[8,12,17]。

放大比较所选取的五种藓类植物谱图(见图 2),发现它 们的波峰在形状、多少、波数上都不相同。主要特征和差别 谱峰表现为:在 2 920,2 849,1 736 cm⁻¹处,密叶匍灯藓、 钝叶绢藓和金发藓有吸收峰且较强,说明这三种藓类植物含 脂肪类的化合物比另两种藓类相对较多。在蛋白质酰胺 I 带 上,中位泥炭藓的吸收峰在 1 651 cm⁻¹波数处;金发藓在 1 624 cm⁻¹处;而其余三种藓类的吸收峰都位于 1 638 cm⁻¹ 附近。在蛋白质酰胺 II 带上,中位泥炭藓的吸收峰在 1 472 cm⁻¹处,且峰值极弱;金发藓和桧叶白发藓位于 1 458 cm⁻¹ 附近;密叶匍灯藓和钝叶绢藓位于 1 452 cm⁻¹附近。酰胺 I 带和酰胺 II 带的差异表明中位泥炭藓和金发藓在两带上氨基 酸多肽类的种类和含量与其余三种藓类显著不同。在 890~ 930 cm⁻¹和 655~725 cm⁻¹指纹区波数范围内,因代表类型 不同呈现出不同的谱带,如在 883 和 879 cm⁻¹附近,密叶匍 灯藓、钝叶绢藓和桧叶白发藓呈较强的双峰,在 848 cm⁻¹处 表现为波谷,在 840 和 837 cm⁻¹处又呈双峰,与中位泥炭藓 和金发藓在以上数个波数上的波形差别极大。比较研究发 现,五种藓类植物的差异主要集中在以 1 790~1 330 cm⁻¹, 1 200~960 cm⁻¹, 895~830 cm⁻¹和 725~655 cm⁻¹四段波 数为代表的光谱指纹区内,根据该四段光谱内各吸收峰波数 及特定峰的相对吸收强度的差异并结合多元统计方法,可对 23 种藓类植物做进一步分析。



Fig 2 Comparison of five representative moss species in enlargement of FTIR spectra

(a): Spectral ranges of 1 790~ 1 330 cm⁻¹ and 1 200~ 960 cm⁻¹; (b): 895~ 830 cm⁻¹ and 725~ 655 cm⁻¹
 1: Sphagnum magellanicum; 2: Polytrichum; 3: Leucobryum juniperoideum;

4: Plagiomnium confertidens; 5: Entodon obtusatus





2.2 23 种藓类 FTIR 光谱 HCA 和 PCA 分析

使用导数对原始波谱数据进行处理可最大限度地减少因 取样过程及机械平滑(Baseline)的干扰所带来的误差,并能 将相叠加波峰的差异放大而使不同波谱间某些不明显的结构 信息差别显著化^[10, 12, 18]。本文选取 1 790~1 330 cm⁻¹, 1 200~960 cm⁻¹, 895~ 830 cm⁻¹, 725 655 cm⁻¹四段差异 较大的特征区间进行二阶导数转换,构建数据矩阵。并通过

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publis 都會的想要。目標指示的表彰教徒, 微語 然源极快的 花卉

使用最小变量算法(Ward's Algorithm)的分级聚类分析 (HCA)和主成分分析法(PCA)进行数据处理^[19, 20],得到23 种苔藓植物的分级聚类图和PCA 三维散点排序图(见图3和 图4)。

从图 3 中可以看出,由于配子体叶片内化学构成成分的 不同,在欧式距离系数 0 5E-5 处,聚类图可明显区分五种蒴 齿类型的藓类植物。结果分为六组:组一,泥炭藓亚纲泥炭 藓科的尖叶泥炭藓、中位泥炭藓和粗叶泥炭藓三种;组二, 真藓亚纲线齿类金发藓科的小金发藓、金发藓、波叶仙鹤藓 和小仙鹤藓四种;组三,真藓亚纲节齿类顶蒴单齿类白发藓 科的糙叶白发藓、桧叶白发藓,凤尾藓科的小凤尾藓和大凤 尾藓四种;组四,真藓亚纲节齿类顶蒴双齿类真藓科的长蒴 丝瓜藓和短月藓、提灯藓科的密叶匍灯藓和偏叶提灯藓、珠 藓科的直叶珠藓五种;组五,真藓亚纲节齿类侧蒴双齿类灰 藓目薄罗藓亚目中羽藓科的暗绿多枝藓、东亚小羽藓、狭叶 麻羽藓三种;组六,真藓亚纲节齿类侧蒴双齿类灰藓目灰藓 亚目中灰藓科的大灰藓、绢藓科的钝叶绢藓、狭叶绢藓,棉 藓科的阔叶棉藓四种。在该距离系数处,五种蒴齿结构的藓 类都能被很好地区分开来,其中组五、组六中的侧蒴双齿类 藓类由于分属灰藓目两个亚目而被划分为相邻且独立的两 组。此聚类结果与以蒴齿结构作为最基本特征的 Fleischer (1923)和 Brotherus(1924-25) 藓纲分类系统相一致。

PCA 算得 PC1 的可信度为 70 629%, PC2 为 11 848%, PC3 为 7. 558%, 主成分可信度累积值达 90 035%, 说明使 用前三个主成分可以很好地还原二阶导数红外光谱中的信 息。三维散点排序图(见图 4)与分级聚类分析(HCA)的结果 完全一致。



Fig 4 Pseudo 3D PCA plot based on FTIR data showing the relationship between the 23 moss species

3 讨 论

(1) 苔藓植物与其他高等植物相比,虽然组织结构比较简单,如无维管束结构;叶片为单细胞或少数几层细胞组成;只有单细胞排列的假根等,但其化学组成成分却比较复杂。由于多数的苔藓植物生长在相对恶劣的环境中,因而往往会产生出特别丰富的次生代谢物质^[21],仅分离得到的就有生物碱、黄酮、萜类、木脂体、酚性化合物以及脂类等^[22],因此,又被称作"一个生物活性天然产物的源泉"^[23]。也正由于不同种类苔藓植物在化学组成成分上的复杂性及存在的差异能在FTIR光谱上得到表征反映,使将红外光谱技术引入苔藓植物研究领域成为可能。

(2)本文使用傅里叶变换红外光谱技术研究了分属不同 系统地位的 23 种藓类植物,使用二阶导数转换结合 H CA 和 PCA 对 1 790~1 330 cm⁻¹,1 200~960 cm⁻¹,895~830 cm⁻¹和 725~655 cm⁻¹四段光谱特征区间数据聚类分析,得 出的结果与以蒴齿结构作为基本特征的传统藓纲分类系统相 一致。初步表明红外光谱结合多元统计方法在苔藓植物系统 学研究方面有一定的应用前景。

(3) 本文仅是 FTIR 光谱技术在苔藓植物系统学研究中 的初探。相信如能采集更多不同类型的样本做进一步研究分 析,将会得到更有说服力的结果。同时,如果对分类系统中 有争议的类群使用 FTIR 光谱技术分析鉴别,也可能会为一 些系统学疑难问题的解决提供新的佐证。

参考文献

- [1] WU Peng-cheng(吴鹏程). Bryological Biology, Introduction and Diverse Branches(苔藓植物生物学). Beijing: Science Press(北京:科学出版社), 1998.
- [2] Crosby M R, Magill R E, Allen B, et al. A Checklist of the Mosses. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1999.
 © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- [3] Fleischer M. Die Musci Flora von Buitenzong. Vol. 4. Leiden: Brill E J, 1923.
- [4] Brotherus V F. Musci In Engler A(edi), Die Naturlichen Pflanzenfanilien ed. 2, Band 10, 11. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1924-1925.
- [5] HU Rerr liang(胡人亮). Bryology(苔藓植物学). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1987.
- [6] CHEN Bang jie(陈邦杰). Genera Muscorum Sinicorum 1. (中国藓类植物属志・上册). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1963.
- [7] CHEN Bang jie(陈邦杰). Genera Muscorum Sinicorum 2. (中国 藓类植物属志・下册). Beijing: Science Press(北京:科学出版社), 1978.
- [8] ZHAO Huarrong, WANG Xiao yan, CHEN Guan hua, et al(赵花荣, 王晓燕, 陈冠华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学 与光谱分析), 2004, 24(11): 1338.
- [9] Wenning M, Seiler H, Scherer S. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4717.
- [10] Mariey L, Signolle J P, Amiel C. Travert Vibrational Spectroscopy, 2001, 26: 151.
- [11] Oust A, Moretro T, Kirschner C, et al. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59: 149.
- [12] Kansiza M, Herauda P, Wooda B, et al. Phytochemistry, 1999, 52: 407.
- [13] ZHAO Huarong, WEN Shurmin, WANG Xiao yan, et al(赵花容, 温树敏, 王晓燕, 等). Spectros copy and Spectral Analysis(光谱学与 光谱分析), 2005, 25(5): 705.
- [14] MAO Werr hua, WANG Yuerqing, WANG Yiming, et al(毛文华,王月青,王一鸣,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与 光谱分析), 2005, 25(6): 984.
- [15] Ngo-Thi N A, Kirschner C, Naumann D. Journal of Molecular Structure, 2003, 661: 371.
- [16] GUO Shur liang, CAO Tong, CHENG Curr gui(郭水良, 曹 同, 程存归). Spectros copy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 525.
- [17] Lambert J B, et al. Organic Structural Spectroscopy. New Jersey: Prentice Hall Inc, 1998.
- [18] Helm D, Labischinski H, Naumann D. Journal of Microbilolgical Methods, 1991, 14: 127.
- [19] Schuster K C, Goodacre R, Gapes J R, et al. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2001, 27: 314.
- [20] Defernez M, Kemsley E K. Trends in Analytical Chemistry, 1997, 16(4): 216.
- [21] ZHU Rui liang, WANG Your fang, XIONG Lihu(朱瑞良, 王幼芳, 熊李虎). Acta Botanica Boreali Occident Sinica(西北植物学报), 2002, 22(2): 444.
- [22] WANG Qing, LUO Xuan(汪 庆,罗 宣). Guizhou Science(贵州科学), 2001, 19(4): 93.
- [23] Zinsmeister H D, Beeker H, Eicher T. Angewandte Chemie, 1991, 30(2): 130.

FTIR Spectroscopy Analysis of Mosses with Different Kinds of Peristomes and Its Systematic Significance

XU Sheng-chong, CAO $T\,ong^*$, NIE Ming

College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract The spectra of 23 species of mosses belonging to different kinds of peristomes were determined by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Based on comparing the differences in the spectra of five representative species, four ranges of 1 790 1 330 cm⁻¹, 1 200 960 cm⁻¹, 895 830 cm⁻¹ and 725 655 cm⁻¹ were selected as the characteristic spectra for analysis. The results show that hierarchical cluster analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) using the second derivatives FTIR spectra can effectively identify five kinds of mosses: Sphagnidæ, Nematodontae, Acrocarpi Haplolepideae, Acrocarpi Diplolepideae, which are well suited for the known moss systems based on peristome structure. Therefore, FTIR spectra combined with chemometrics can be used as a useful tool in systematic research on bryophytes.

Keywords Infrared spectrum; Moss; Systematic; HCA; PCA

(Received May 28, 2006; accepted Aug. 28, 2006)

* Corresponding author