

基于傅里叶变换红外光谱的土传真菌分类研究

柴阿丽, 李宝聚*, 石延霞, 谢学文

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘要 应用 FTIR-ATR 光谱技术与多元统计分析相结合的方法对镰刀菌、立枯丝核菌、核盘菌、瓜果腐霉菌和辣椒疫霉菌等重要的土传致病真菌进行鉴别。对测得的 FTIR 光谱进行了归一化和二阶求导处理, 选择了适合于真菌分类识别的 14 个光谱特征波段。在此基础上, 采用典型判别分析和系统聚类分析对不同菌株进行了识别。结果表明, 不同菌株间识别准确率达到 100%, 而镰刀菌种内不同菌株间识别准确率为 95.56%, 说明傅里叶变换红外光谱技术在植物病原真菌分类识别方面具有较大的应用潜能。

关键词 傅里叶变换红外光谱; 土传真菌; 判别分析; 聚类分析; 鉴别

中图分类号: S642.2 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)08-2094-04

引言

植物病原真菌是引起农作物病害的重要致病菌, 病害的发生经常导致作物大面积减产和品质下降, 快速、准确地对病原菌进行鉴定是有效防治的重要环节。真菌化学组分主要由其本身的细胞结构和生长过程中产生的毒素决定, 真菌细胞主要由蛋白质、碳水化合物、核酸、脂质及其他生物大分子构成, 毒素的化学成分包括蛋白质、萜类、酸类、醇类等大分子^[1]。这些化学组分的敏感波段大多集中在红外波段区域, 因此利用红外光谱法可以定性或定量地测定不同真菌。

20 世纪 50 年代开始出现将红外光谱技术应用于微生物检测方面的报道^[2], 然而直到 1988 年 Naumann 等报道将傅里叶变换红外光谱应用到微生物检测后^[3], 该技术才逐步开始广泛应用。目前, 傅里叶变换红外光谱技术已成功应用于细菌^[4, 5]、真菌^[6, 7]、酵母菌^[8, 9]、放线菌^[10]等微生物的识别, 不仅可以进行不同属的鉴定, 而且可以实现种, 甚至亚种的识别^[11, 12]。

本研究利用衰减全反射傅里叶变换红外光谱技术 (FTIR-ATR) 对镰刀菌、立枯丝核菌、核盘菌、瓜果腐霉菌和辣椒疫霉菌等土传病害的致病真菌进行识别, 选择了适合于真菌分类的光谱特征波段, 用于测试真菌的判别分析和聚类分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

实验选择了五株镰刀菌 (*Fusarium*), 分别为串珠镰刀菌 (*F. moniliforme* BH08050601)、半裸镰刀菌 (*F. semitectum* HG06110903) 和尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum* HG504281) 各一株及茄病镰刀菌 [*F. solani* HG0903150102 (a), HLB08071501(b)] 两株。此外, 还选择了立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* SDHGLK0604)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* HG08032204)、瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum* HG08092201) 和辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* LJ08111501) 等四株土传病害的真菌。以上所有菌株根据形态学特征鉴定到种, 并保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防课题组病菌资源库。

1.2 真菌培养

采用马铃薯葡萄糖培养液 (potato dextrose broth, PDB) 培养真菌。250 mL 三角瓶装入 100 mL 培养液, 接种经活化的菌株, 每个菌株分别接种三瓶, 设为三次重复。在往复式摇床上振荡培养 5~10 天, 往复频率为 120 次·min⁻¹, 培养温度为 (26±1) °C。待菌丝生长充足后, 对马铃薯葡萄糖发酵液进行抽滤, 并用 0.9% 生理盐水洗涤三次, 收获菌丝。收集的菌丝用锡箔纸包好, 真空冷冻干燥 24 h 后, 研磨成粉末, 装入 2 mL EP 管中, 然后置于 4 °C 保藏备用。

1.3 FTIR 光谱测量

收稿日期: 2010-10-09, 修订日期: 2011-02-17

基金项目: 国家 (863 计划) 项目 (2006AA10Z210), 现代农业产业体系建设专项项目和农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目资助

作者简介: 柴阿丽, 女, 1983 年生, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所博士研究生 e-mail: chaiali@163.com

* 通讯联系人 e-mail: Libj@mail.caas.net.cn

光谱测定采用 Perkin-Elmer 公司的 Spectrum 100 傅里叶变换红外光谱仪与衰减全反射 ATR 附件, 中红外检测器。ATR 数据从配有 ZnSe 晶体的变角衰减全反射附件上取得, 光线入射角为 45 °。将研细的样品粉末平铺在 ZnSe 晶体的凹槽中, 压紧, 即可测其红外光谱。光谱测量范围 4 000 ~ 800 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹。扫描信号累加 32 次, 自动平滑处理。扫描时实时扣除水和 CO₂ 的干扰。设不放入任何样本的空扫描作为背景。光谱仪系统由 Spectrum 6.0 软件控制。

1.4 数据分析

将测得的原始光谱数据应用 Spectrum 6.0 软件进行归一化处理和 13 点平滑的二阶导数求导处理, 选择适合于真菌分类的光谱特征波段, 然后利用选择的特征波段对测试真菌进行典型判别分析(Canonical Discriminant Analysis)和聚类分析(Cluster Analysis)。数据分析采用 SAS 9.0 软件。

2 结果与分析

2.1 真菌 FTIR 光谱分析

尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、核盘菌、瓜果腐霉菌和辣椒疫霉菌的傅里叶变换红外光谱图如图 1 所示。由图可见, 不同菌种的红外光谱之间存在较明显的差异。不同属真菌的红外光谱受其细胞组分影响, 在峰型、峰的数量、峰位及特定峰的相对透射强度上存在较大差别。

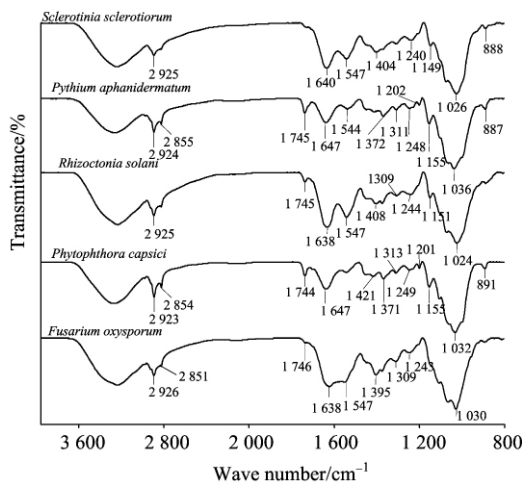


Fig 1 FTIR spectra of five fungal species

镰刀菌种内不同菌株的红外光谱图如图 2 所示, 可以看出, 镰刀菌不同菌株间的红外光谱较为相似, 难以直接从谱图上区分不同的菌株。这里采用二阶求导处理的方法, 使镰刀菌不同菌株原始谱图中的差异放大。图 3 为茄病镰刀菌和串珠镰刀菌的原始谱图及其二阶导数谱图。可以看出, 经二阶求导处理后, FTIR 谱图的差异更容易分辨。如原始谱图中, 茄病镰刀菌和串珠镰刀菌在 1 750 和 1 000 cm⁻¹ 附近存在细微差异, 而经过二阶求导处理后, 1 750 和 1 000 cm⁻¹ 处差异放大, 可以很明显的看出。

2.2 光谱特征波段的选择

对测得的所有菌株原始光谱进行归一化处理和 13 点平

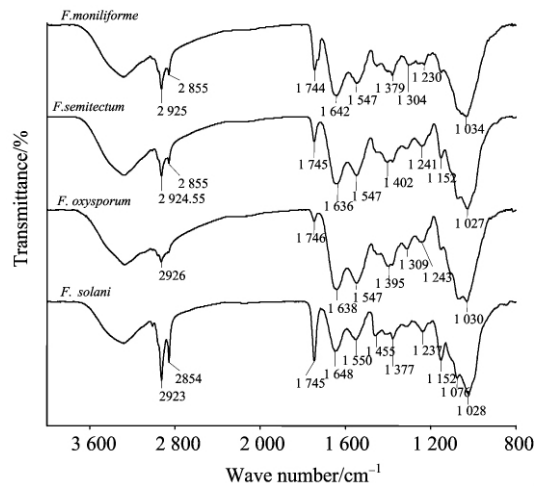


Fig 2 FTIR spectra of different strains of fusarium

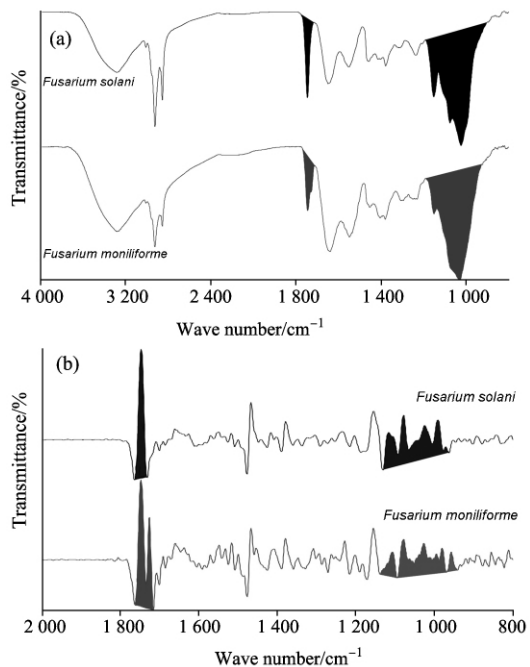


Fig 3 FTIR analysis of fusarium

(a): The original spectrum; (b): The second derivative

滑的二阶导数求导处理, 结合真菌 FTIR 谱图及其二阶导数谱图, 分析谱图峰位、峰型等特征差异, 选择可以识别不同菌株的光谱特征波段。表 1 列出了测试菌株透射峰位置的平均波数值, 取平均得到了 2 924, 2 854, 1 745, 1 641, 1 547, 1 466, 1 406, 1 376, 1 306, 1 240, 1 201, 1 152, 1 109, 1 028 cm⁻¹ 等 14 个 FTIR 光谱特征波段, 用于菌株的识别和分类。

2.3 不同菌种的红外光谱分类

利用选择的 14 个光谱特征波段, 对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、核盘菌、瓜果腐霉菌和辣椒疫霉菌进行典型判别分析, 第一典型变量(Can1)和第二典型变量(Can2)的贡献率分别为 59.40% 和 36.98%, 前两个典型变量的累积贡献率达

Table 1 Wave numbers of the peaks showing greatest variability in the spectra of strains tested

	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14
尖孢镰刀菌	2 926	2 851	1 746	1 638	1 547	1 468	1 395	1 377	1 309	1 243	1 201	1 156	1 110	1 030
串珠镰刀菌	2 924	2 855	1 744	1 642	1 547	1 464	1 403	1 379	1 304	1 230	1 201	1 152	1 110	1 034
半裸镰刀菌	2 924	2 855	1 746	1 636	1 547	1 465	1 402	1 377	1 304	1 241	1 201	1 152	1 110	1 027
茄病镰刀菌(a)	2 923	2 854	1 745	1 648	1 550	1 465	1 401	1 378	1 299	1 237	1 202	1 152	1 110	1 024
茄病镰刀菌(b)	2 924	2 851	1 745	1 635	1 548	1 468	1 410	1 379	1 302	1 228	1 201	1 149	1 106	1 023
立枯丝核菌	2 925	2 854	1 745	1 638	1 547	1 468	1 408	1 375	1 309	1 244	1 202	1 151	1 110	1 024
核盘菌	2 925	2 856	1 746	1 640	1 547	1 466	1 404	1 376	1 308	1 240	1 202	1 149	1 108	1 026
瓜果腐霉菌	2 924	2 855	1 745	1 647	1 544	1 466	1 409	1 372	1 311	1 248	1 202	1 155	1 106	1 036
辣椒疫霉菌	2 923	2 854	1 744	1 647	1 548	1 467	1 421	1 371	1 313	1 249	1 201	1 155	1 109	1 032
均值	2 924	2 854	1 745	1 641	1 547	1 466	1 406	1 376	1 306	1 240	1 201	1 152	1 109	1 028
均方根误差	0.92	1.69	0.74	4.75	1.49	1.42	7.01	2.78	4.37	6.98	0.52	2.41	1.62	4.48

到 96.38%，显示了相当好的分类拟合度，因此这里选择前两个典型分量构建判别函数，对五种真菌的 FTIR 光谱进行分类识别。结果显示，五种真菌的判别准确率达到 100%。图 4 为利用前两个典型变量对五个不同菌种进行分类的结果散点图，说明该方法可用于不同种真菌的鉴别与分类研究。

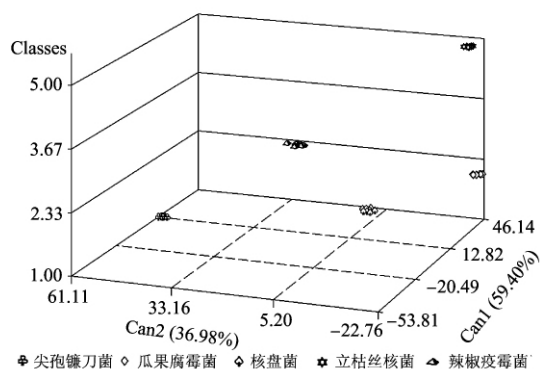


Fig 4 Canonical discriminant analysis for five fungal species

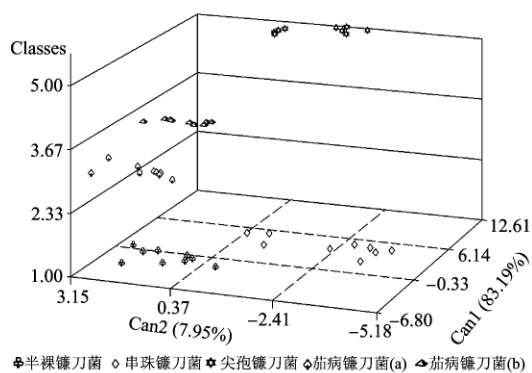


Fig 5 Canonical discriminant analysis for strains of *Fusarium*

2.4 镰刀菌种内不同菌株的光谱分类

利用选择的 14 个光谱特征波段，对串珠镰刀菌、半裸镰刀菌、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌(菌株 a 和 b)进行典型判别分析，前两个典型变量的累积贡献率达到 91.14%(图 5)。利用前两个典型分量构建判别函数，对镰刀菌五个菌株的 FT-IR 光谱进行分类识别，结果见表 2，可以看出，串珠镰刀菌、

半裸镰刀菌和尖孢镰刀菌的判别准确率都达到 100%，除了两个茄病镰刀菌菌株 a 与菌株 b 之间各有一个重复相互判错外，其他菌株均得到正确归类，总体识别准确率为 95.56%。

Table 2 Canonical discriminant results of five *Fusarium* strains

	半裸 镰刀菌	串珠 镰刀菌	茄病镰 刀菌(a)	茄病镰 刀菌(b)	尖孢 镰刀菌	正确率 /%
半裸镰刀菌	9	0	0	0	0	100.00
串珠镰刀菌	0	9	0	0	0	100.00
茄病镰刀菌(a)	0	0	8	1	0	88.89
茄病镰刀菌(b)	0	0	1	8	0	88.89
尖孢镰刀菌	0	0	0	0	9	100.00

上述结果也可从其聚类分析结果图中表现出来，图 6 为所有测试菌株的聚类分析结果图。从图中可以看出，两个茄

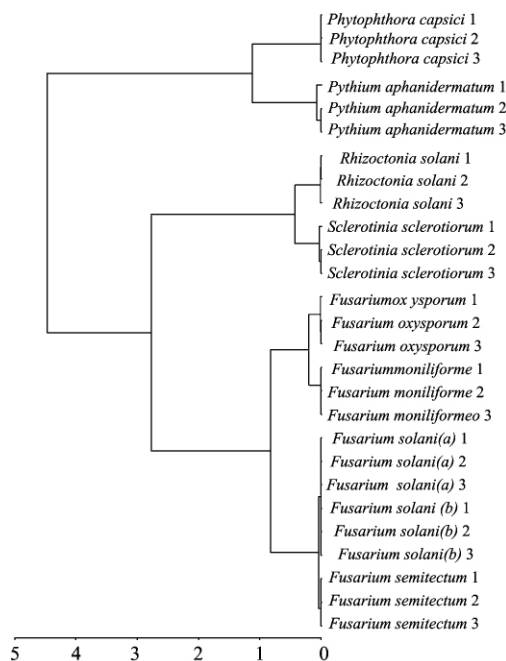


Fig 6 Cluster analysis of FTIR spectra recorded from fungal strains tested

'1', '2', '3' indicate replicates of the same strain

病镰刀菌菌株 *F. solani*(a) 和 *F. solani*(b) 被直接归为一类, 而不是各自成一类后再聚类, 说明这两个菌株的 FTIR 光谱相似, 其化学组分也最为相似。然而, 在此基础上, 所有镰刀菌菌株都被正确地归为一类, 说明镰刀菌种内不同菌株间的光谱差异性小于其与其他菌株间的光谱差异性。另外, 辣椒疫霉菌与瓜果腐霉菌被归为一类, 这与根据形态学分类得到的结果一致, 二者都属于卵菌。从图中还可以明显地看出, 两个不同菌种间的类平均距离远远大于种内不同菌株间的距离, 说明红外光谱结合聚类分析可以较好地完成不同真菌菌种鉴别。

3 结 语

文章利用傅里叶变换红外光谱和多元统计分析方法对五

株镰刀菌和立枯丝核菌、核盘菌、瓜果腐霉菌及辣椒疫霉菌等其他土传病害致病真菌进行分类识别, 得到了 14 个适合土传真菌分类的光谱敏感特征波段。对测试真菌进行判别分析的结果显示, 不同菌种间识别准确率达到 100%, 而镰刀菌种内不同菌株间识别准确率为 95.56%, 说明傅里叶变换红外光谱在真菌菌种分类识别方面存在较好的潜能。

对镰刀菌不同菌株进行判别分析, 结果两个茄病镰刀菌菌株 *F. solani*(a) 和 *F. solani*(b) 相互间发生错判; 进行聚类分析时, 两个茄病镰刀菌菌株也被直接归为一类, 而没有各自首先归为两个亚类, 说明这里选择的方法可以较好地完成不同菌种的鉴别, 而如何利用 FTIR 红外光谱法及其特征波段实现真菌种内、甚至亚种的分类还需要进一步研究。

References

- [1] Sivakesava S, Irudayaraj J, DebRoy C. Transactions of the ASAE, 2004, 7(3): 951.
- [2] Greenstreet J E, Norris K P. Spectrochimica Acta, 1957, 9(3): 177.
- [3] Naumann D, Fijala V, Labischinski H, et al. Journal of Molecular Structure, 1988, 174: 165.
- [4] Li H, Tripp C P. Applied Spectroscopy, 2008, 62(9): 963.
- [5] Samuels A C, Snyder A P, Emge D K, et al. Applied Spectroscopy, 2009, 63(1): 14.
- [6] Fischer G, Braum S, Thissen R, et al. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(1): 63.
- [7] Naumann A. Analyst, 2009, 134(6): 1215.
- [8] Rellini P, Roscini L, Fatichenti F, et al. FEMS Yeast Research, 2009, 9(3): 460.
- [9] Corte L, Rellini P, Roscini L, et al. Analytica Chimica Acta, 2010, 659: 258.
- [10] Haag H, Gremlich H U, Bergmann R, et al. Journal of Microbiological Methods, 1996, 27(2-3): 157.
- [11] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Nature, 1991, 351(6321): 81.
- [12] Garip S, Gozen A, Severcan F. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1301.

Identification of Soil-Borne Fungi Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy

CHAI A-li, LI Bao-ju*, SHI Yan-xia, XIE Xue-wen

Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract Fourier transform infrared (FTIR) attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy was used in combination with multivariate statistic analysis for identification of soil-borne fungi that causes severe economic damage to agriculture; *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora capsici*. The original FTIR spectra were normalized, and the second derivatives were calculated, from which the peak wave numbers showing greatest variability were selected; 2 924, 2 854, 1 745, 1 641, 1 547, 1 466, 1 406, 1 376, 1 306, 1 240, 1 201, 1 152, 1 109 and 1 028 cm^{-1} . To discriminate different fungal strains, canonical discriminant analysis and cluster analysis were performed at these characteristic wave numbers. Results showed that the classification accuracies achieved 100% for different species of fungi, and classification accuracies for different *fusarium* strains achieved 95.56%, demonstrating the high potential of this technique for fungi identification.

Keywords FTIR; Soil-borne fungi; Discriminant analysis; Cluster analysis; Identification

* Corresponding author

(Received Oct. 9, 2010; accepted Feb. 17, 2011)