

桑细菌性萎蔫病及其病原的红外光谱鉴别

罗金燕¹, 杨春兰², 陈磊¹, 王丽², 毛胜凤³, 李斌²

(1. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058;
3. 浙江农林大学 林业与生物技术学院 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 为快速有效鉴别桑细菌性萎蔫病, 比较了桑细菌性萎蔫病菌 *Enterobacter mori* 和引起相似田间发病症状的桑青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 的红外光谱。结果显示: 在 4 000.00~500.00 cm⁻¹ 范围内, 2 种重要桑细菌病原存在 5 个共有峰, 其中 3 个强度有显著性差异。此外, 桑萎蔫病菌的红外光谱有 1 399.10 和 1 079.45 cm⁻¹ 2 个特征峰, 桑青枯病菌的红外光谱有 2 973.49, 1 724.42, 1 380.60, 1 278.67, 1 185.12, 1 132.03, 1 100.51 和 979.31 cm⁻¹ 等 8 个特征峰。进一步分析和比较感染桑萎蔫病的桑枝和健康桑枝的红外光谱发现, 感病枝和健康枝有 5 个相同的峰, 其中 4 个强度有显著差异; 此外, 感病枝有 1 到 643.92 和 1 407.31 cm⁻¹ 2 个特征峰, 健康枝中有 1 635.83, 1 506.36, 1 423.59, 1 374.97, 1 328.57 和 1 108.82 cm⁻¹ 6 个特征峰。为利用傅里叶红外光谱技术简便、直观和快速地鉴别桑细菌性萎蔫病及其病原提供了新的思路。图 2 表 3 参 19

关键词: 植物保护学; 桑树; 萎蔫病菌; 青枯病菌; 特征峰; 傅里叶变换红外光谱

中图分类号: S763.1; S888.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2015)04-0578-07

Detection and identification of mulberry bacterial wilt and its pathogen using Fourier transform infrared spectra

LUO Jinyan¹, YANG Chunlan², CHEN Lei¹, WANG Li², MAO Shengfeng³, LI Bin²

(1. Shanghai Extension and Service Center of Agriculture Technique, Shanghai 201103, China; 2. Agricultural and Biotechnological College, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 3. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To rapidly identify a newly emerging mulberry wilt disease in Zhejiang Province, this study compared Fourier transform infrared (FTIR) spectra of *Enterobacter mori* and *Ralstonia solanacearum*, which cause similar disease symptoms on mulberry. First, FTIR spectra were taken on *E. mori* and *R. solanacearum*, and then a comparison of mulberry branches infected with and without *E. mori* was performed based on FTIR spectra. Results for *E. mori* and *R. solanacearum* in the 4 000.00 – 500.00 cm⁻¹ region showed 5 similar peaks with 3 of the similar peaks differing in intensity. Peaks at 1 399.10 and 1 079.45 were specific to *E. mori*; whereas, peaks at 2 973.49, 1 724.42, 1 380.60, 1 278.67, 1 185.12, 1 132.03, 1 100.51, and 979.31 cm⁻¹ were specific to *R. solanacearum*. The FTIR spectra for healthy and infected mulberry branches showed 5 similar peaks in the 4 000.00 – 500.00 cm⁻¹ region with 4 of the similar peaks differing in intensity. Peaks at 1 643.92 and 1 407.31 cm⁻¹ were specific to infected branches; whereas, peaks at 1 635.83, 1 506.36, 1 423.59, 1 374.97, 1 328.57, and 1 108.82 cm⁻¹ were specific to healthy branches. This study indicated that

收稿日期: 2014-10-16; 修回日期: 2014-12-01

基金项目: 上海市农业基础性研究项目[沪农科基字(2014)第 2-7 号]; 国家自然科学基金资助项目(31371904); 浙江省自然科学基金资助项目(R13C140001, LY14C140005); 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2014C32010)

作者简介: 罗金燕, 从事植物检疫研究。E-mail: toyanzi@126.com。通信作者: 李斌, 副教授, 博士, 博士生导师, 从事植物细菌学研究。E-mail: libin0571@zju.edu.cn

Fourier transform infrared spectra could provide a simple, intuitive, and fast technology for rapid detection and identification of mulberry bacterial wilt. [Ch, 2 fig. 3 tab. 19 ref.]

Key words: plant protection; mulberry; *Enterobacter mori*; *Ralstonia solanacearum*; specific weak; FTIR

桑树 *Morus alba* 属桑科 Moraceae 桑属 *Morus*, 为落叶乔木, 其叶片更是桑蚕 *Bombyx mori* 的主食, 极具生态和经济价值, 广泛分布于亚洲、非洲和欧洲^[1-2]。然而, 2004 年以来, 在浙江各地桑园陆续出现了一种国内外尚未报道过的桑树新病害, 持续时间长, 发病面积广, 给农户造成了重大的损失, 严重威胁浙江省蚕桑产业的生产^[2-3]。浙江大学生物技术研究所植物病原细菌实验室前期研究表明: 该病害由肠杆菌属 *Enterobacter* 细菌引起, 并将它命名为 *Enterobacter mori*, 将该病害定名为桑细菌性萎蔫病^[4-6]。值得注意的是其田间症状与由 *Ralstonia solanacearum* 引起的桑细菌性青枯病相似, 两者同属于桑树细菌性维管束病害, 不易区分^[7-10]。传统的细菌分类及鉴别方法主要是根据细菌的菌落形态、生理生化特征及血清学检测等, 虽然有效, 但操作复杂, 费时费力。以聚合酶链式反应(PCR)为基础的各种现代分子生物学技术虽然极大地加快了细菌鉴定的效率, 但严重依赖昂贵的仪器和试剂, 且经常受到植物组织的干扰^[11-12]。而傅里叶变换红外光谱技术(FTIR)分辨率高, 对样品的需求量小, 不仅能提供分子基团特征的振动吸收谱带, 而且能敏锐地探测分子基团及其周围环境的变化, 通过测定完整细胞的 FTIR 图谱可获得微生物细胞的组成及其生物大分子结构的信息^[13-15]。近年来, FTIR 图谱中某些功能基团的差异已被用来区分和鉴定不同的微生物种甚至亚种^[16-18]。本研究通过测定和比较桑萎蔫病菌和桑青枯病菌以及感染桑萎蔫病的枝条和健康枝条的红外图谱, 并通过分离鉴定验证了红外光谱的检测结果, 提出了利用 FTIR 直接检测桑细菌性萎蔫病的可行性。

1 材料与方法

1.1 桑细菌菌株

本研究使用的桑细菌性萎蔫病菌菌株 *Enterobacter mori* R18-2 和桑细菌性青枯病菌菌株 *Ralstonia solanacearum* ZJUM19981 由浙江大学生物技术研究所植物细菌实验室保存提供。

1.2 病原菌红外检测样本制备

将保存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的桑细菌性萎蔫病菌菌株 *E. mori* R18-2 和桑细菌性青枯病菌菌株 *R. solanacearum* ZJUM19981 活化划线于 Luria-Bertani(LB)固体培养基和酵母膏胰蛋白胨葡萄糖琼脂(YPGA)固体培养基, 分别挑取单菌落接种于 5.00 mL 的 LB 液体培养基和 YPGA 液体培养基, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h。在 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 弃上清液, 并用双蒸水洗 2 次后低温干燥, 送样。

1.3 桑枝条检测样本制备

离体桑枝注射接种方法参照徐丽慧等^[9]。从桑园剪取长 15 cm 左右并顶部带有 3 张桑叶的无病枝条, 插入已灭菌的 50.00 mL 双蒸水的三角瓶中, 并用消毒棉花塞住瓶口来固定枝条。将比例为 $10^{11}\text{ cfu}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 *E. mori* R18-2 菌悬液用灭菌的小号针筒针刺接种在离体枝条的近水基部, 注射 0.01 至 0.03 mL·枝条⁻¹, 重复 3 次, 使用无菌水和标准桑青枯病菌作为对照。在人工气候箱中(设定温度为 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 湿度 100%)培养 15 d, 接种 3 d 后每天观察病状。取发病的桑枝和健康的桑枝, 在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮冰冻干燥条件下, 置于研钵中用研杵研磨成粒径小于 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的粉末, 送样。

1.4 FTIR 检测

将桑细菌或桑枝条于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻干燥后, 置于研钵中, 用研杵研磨成粒径小于 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的粉末。按照 $m(\text{复合材}):m(\text{溴化钾})=1:100$ 的比例混合磨碎压片 8 min($100\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, $1\,200\times 0.006\,895\text{ MPa}$), 将它们压成薄片, 用于红外光谱测定(红外光谱仪为美国热电公司 Nicolet 5700; 测试条件: 光谱分辨率为 4.00 cm^{-1} , 测量范围 $4\,000.00\sim 500.00\text{ cm}^{-1}$, 扫描信号累加 100 动平滑处理, 自动基线校正, 扫描时实时扣除水和二氧化碳的干扰, 设不放入样品的空背景作为背景, 测 1 个样品扫描背景 1 次)。重复 5 次·样品⁻¹, 取波谱的平均值, 用 OMNIC 8.0 软件分析光谱数据^[18-19]。

1.5 桑萎蔫病菌的分离与鉴定

用于 FTIR 检测的 20 份桑枝条样品, 同时利用经典的植物病原细菌学研究方法开展桑萎蔫病菌的分

离与鉴定,以验证 FTIR 的检测结果。桑萎蔫病菌的具体分离根据朱勃等^[3]的方法进行,每份样品挑取代表性菌株开展烟草 *Nicotiana tabacum* 过敏反应、Biolog 生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析等^[3,11-12]。

1.6 统计分析

各处理间的显著水平($P<0.05$)用统计分析软件 STATGRAPHICS Plus, 版本 4.0 (Copyright Manugistics Inc., Rockville, Md., USA)进行分析。

2 结果与分析

2.1 FTIR 鉴别桑萎蔫和青枯病菌

由图 1 和表 1 可知:在 4 000.00~500.00 cm^{-1} 的光谱范围之内,桑细菌性萎蔫病菌菌株 R18-2 和桑细菌性青枯病菌菌株 ZJUM19981 共有 5 个峰位相同,分别是 1 237.25 cm^{-1} (1 227.86 cm^{-1}), 1 453.67 cm^{-1} , 1 538.22 cm^{-1} , 1 650.74 cm^{-1} 和 2 925.13 cm^{-1} 。其中 1 237.25 cm^{-1} (1 227.86 cm^{-1}), 1 453.67 cm^{-1} 和 2 925.13 cm^{-1} 的峰强度差异显著($P<0.05$)。吸收谱带的归属如下:1 237.25 cm^{-1} (1 227.86 cm^{-1})附近的吸收带归属于核酸分子内磷酸二酯基团的反对称 P=O 伸缩振动峰;1 453.67 cm^{-1} 归属于蛋白质分子中甲基的反对称 C—H 弯曲振动峰;1 538.22 cm^{-1} 来自 N—H 的弯曲振动和 C—N 伸缩振动,主要来自于蛋白质酰胺 II;1 650.74 cm^{-1} 归属于 C=O 的伸缩振动,主要来自于蛋白质酰胺 I;2 925.13 cm^{-1} 来自蛋白质的 C—H 伸缩振动吸收带^[14-17]。

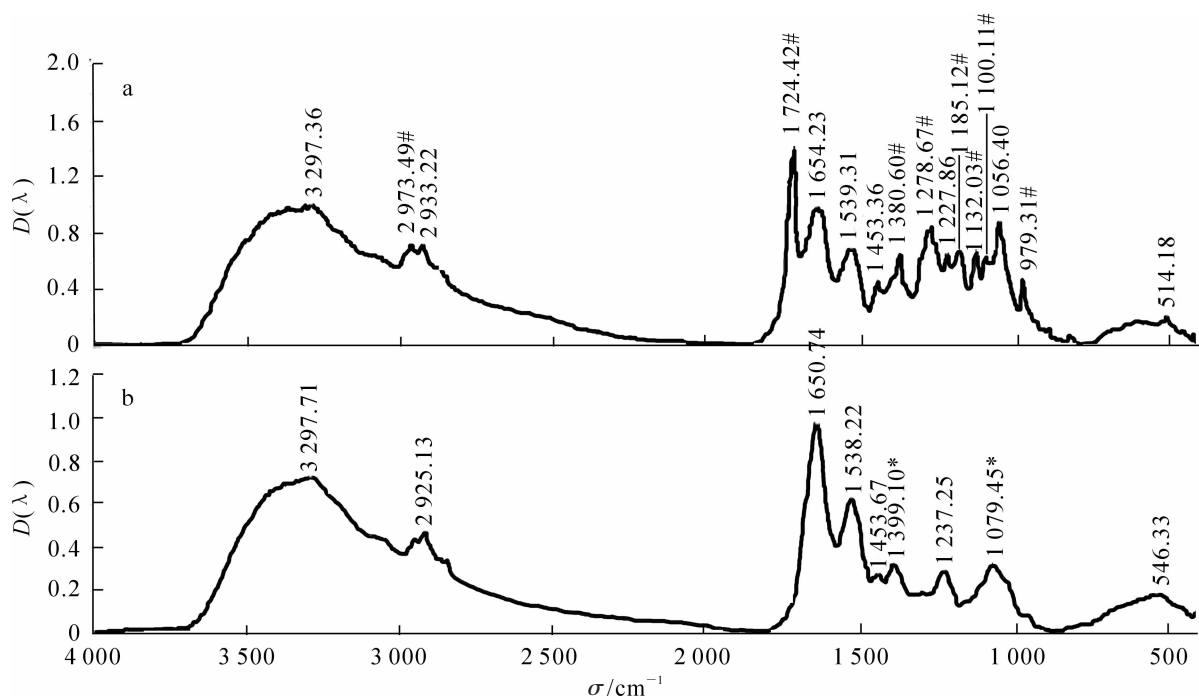


图 1 桑青枯病菌 ZJUM19981(a)和桑萎蔫病菌 R18-2(b)在 4 000.00~500.00 cm^{-1} 波段范围的红外光谱图

Figure 1 FTIR spectra in 4 000.00~500.00 cm^{-1} (a) *Enterobacter mori* R18-2 and (b) *Ralstonia solanacearum* ZJUM19981

桑细菌性萎蔫病菌菌株 R18-2 有 1 399.10 cm^{-1} 和 1 079.45 cm^{-1} 这 2 个特有的峰位,分别属于 COO—的对称伸缩振动和来自于磷脂的 C—O 伸缩振动。桑青枯病菌菌株 ZJUM19981 有 2 973.49 cm^{-1} , 1 724.42 cm^{-1} , 1 380.60 cm^{-1} , 1 278.67 cm^{-1} , 1 185.12 cm^{-1} , 1 132.03 cm^{-1} , 1 100.51 cm^{-1} 和 979.31 cm^{-1} 等 8 个特有的峰位。这些主要吸收谱带的归属如下:2 973.49 cm^{-1} 的谱峰来自脂类的 C—H 伸缩振动吸收带,反映脂肪酸、各种膜和细胞壁组分的亲水脂分子的信息;1 724.42 cm^{-1} 归属于 C=O 的伸缩振动,主要来自于甘油三酯;1 380.60 cm^{-1} 归属于 C—H 的弯曲振动,1 278.67 cm^{-1} 归属于 C—O 的伸缩振动,主要来自于芳香族的甲氧基;1 185.12 cm^{-1} 处的吸收谱带主要来自于细胞壁的主要成分碳水化合物中多聚糖中的 C—O(H)伸缩振动;1 132.03 cm^{-1} 归属于 C—O 伸缩振动,主要来自于 DNA 和 RNA 骨架,糖原和核酸等;1 100.51 cm^{-1} 归属于 C—O 的伸缩振动;979.31 cm^{-1} 归属于磷酸化蛋白和核

酸中磷酸单酯二价阴离子-PO₄²⁻基团的对称伸缩振动^[14-15]。

表 1 桑萎蔫病菌菌株 R18-2 与桑青枯病菌菌株 ZJUM19981 的红外光谱主要吸收峰比较

Table 1 Comparison of FTIR spectra between *Enterobacter mori* R18-2 and *Ralstonia solanacearum* ZJUM19981

序号	基团	振动类型	峰位/cm ⁻¹		峰强 A	
			<i>E. mori</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. mori</i>	<i>R. solanacearum</i>
1	P O	ν	1 237.25 ± 0.72	1 227.86 ± 0.27	0.29 ± 0.03 a	0.65 ± 0.09 b
2	C—H	δ	1 453.67 ± 0.58	1 453.67 ± 0.56	0.27 ± 0.01 a	0.47 ± 0.01 b
3	N—H, C—N	δ, ν	1 538.22 ± 0.19	1 538.22 ± 0.23	0.62 ± 0.05 a	0.69 ± 0.06 a
4	C—O	ν, δ	1 650.74 ± 0.06	1 650.74 ± 0.74	0.97 ± 0.04 a	0.98 ± 0.08 a
5	C—H	ν	2 925.13 ± 0.12	2 925.13 ± 0.63	0.47 ± 0.12 a	0.69 ± 0.11 b
6	C O	ν	1 399.10 ± 0.96		0.31 ± 0.01	
7	C—O	ν	1 079.45 ± 1.17		0.31 ± 0.04	
8	P O	ν		979.31 ± 0.13		0.46 ± 0.04
9	C—O	ν		1 100.11 ± 0.06		0.63 ± 0.07
10	C—O	ν		1 132.03 ± 1.75		0.66 ± 0.01
11	C—O(H)	ν		1 185.12 ± 0.38		0.67 ± 0.02
12	C—O	ν		1 278.67 ± 0.44		0.84 ± 0.04
13	C—H	δ		1 380.60 ± 0.11		0.65 ± 0.02
14	C=O	ν		1 724.42 ± 0.36		1.43 ± 0.11
15	C—H	ν		2 973.49 ± 0.81		0.72 ± 0.06

说明：A 表示吸光度，ν 表示伸缩振动，δ 表示弯曲振动；a, b 小写字母表示不同样品的峰强度间的显著水平($P<0.05$)。

2.2 FTIR 鉴别健康和感病桑枝条

由图 2 和表 2 可知：在 4 000.00~500.00 cm⁻¹ 范围内，感染桑细菌性萎蔫病的桑枝和健康桑枝有 5 个相同峰位，分别是 2 927.05 cm⁻¹(2 928.84 cm⁻¹)，1 732.63 cm⁻¹(1 735.81 cm⁻¹)，1 248.00 cm⁻¹(1 246.82 cm⁻¹)，1 160.17 cm⁻¹(1 159.15 cm⁻¹)和 1 053.70 cm⁻¹(1 054.66 cm⁻¹)，除 1 160.17 cm⁻¹(1 159.15 cm⁻¹)外，其他 4 个峰在强度上差异显著。这表明：桑组织内的木质素、纤维素和半纤维素等已被桑萎蔫病菌选择性的消耗。吸收谱带归属如下：2 927.05 cm⁻¹(2 928.84 cm⁻¹)归属于 C—H 的伸缩振动，主要来自于脂类，

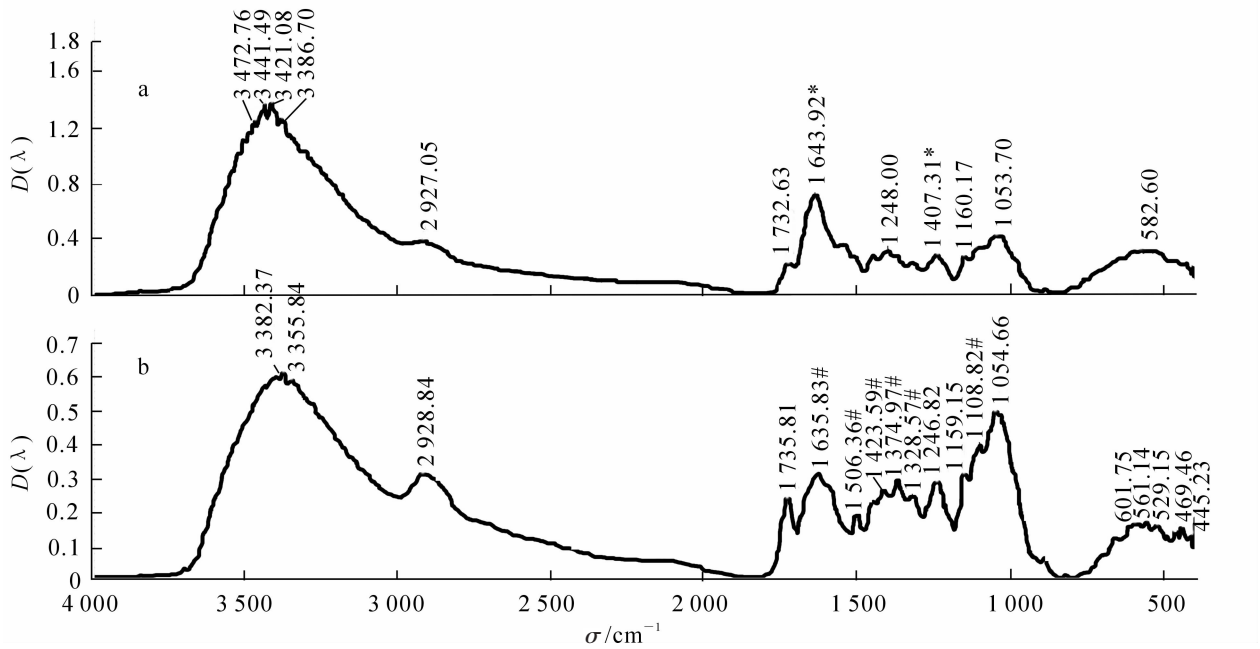


图 2 感染桑细菌性萎蔫病的桑枝(a)和健康桑枝(b)和在 4 000.00~500.00 cm⁻¹ 波段范围的红外光谱图
Figure 2 FTIR spectra in 4 000.00~500.00 cm⁻¹ (a) the healthy mulberry branches and (b) the mulberry branches infected with *Enterobacter mori* R18-2

少量来自于蛋白、碳水化合物和核酸；1 732.63 cm⁻¹(1 735.81 cm⁻¹)主要来自于木聚糖(半纤维素)中的非共轭 C=O 伸缩振动；1 248.00 cm⁻¹(1 246.82 cm⁻¹)主要来自于木质素和木聚糖中的 C—O 伸缩振动和紫丁香基环；1 160.17 cm⁻¹(1 159.15 cm⁻¹)主要来自于纤维素和半纤维素中的 C—O—C 振动；1 053.70 cm⁻¹(1 054.66 cm⁻¹)主要来自于纤维素和半纤维素中的 C—O 振动^[14-16]。

桑健康枝中有 1 635.83, 1 506.36, 1 423.59, 1 374.97, 1 328.57 和 1 108.82 cm⁻¹ 等 6 个特征峰。由于桑是双子叶硬木植物，其木质素主要含愈创木基-紫丁香基木质素(G-S)，这个结果显示健康桑枝的红外吸收光谱图与其他的木质素光谱图相似。在 1 635.83 cm⁻¹ 和 1 506.36 cm⁻¹ 处，有明显的芳香核振动峰，这是木质素最具特征的红外吸收带。此外，1 423.59 cm⁻¹ 主要来自于木质素和糖类的 C—H 振动；1 374.97 cm⁻¹ 主要来自于纤维素和半纤维素中的 C—H 振动；1 328.57 cm⁻¹ 主要来自于纤维素中的 C—H 的弯曲振动和紫丁香基丙烷衍生物中的 C1—O 的伸缩振动；1 108.82 cm⁻¹ 主要来自于紫丁香核 C—H 面内弯曲振动^[14-17]。此外，被细菌性萎蔫病感染的病桑红外光谱图中具有 1 643.92 cm⁻¹ 和 1 407.31 cm⁻¹ 这 2 处特征峰，分别属于蛋白质酰胺 I 中的 C=O 伸缩振动和 COO—的对称伸缩振动。在光谱分辨率为 4.00 cm⁻¹ 条件下，1 407.31 cm⁻¹ 与萎蔫病菌红外图谱中的 1 399.10 cm⁻¹ 属于同一特征峰，可作为检测桑细菌性萎蔫病的依据。相对于桑健康枝，感病枝中缺乏 1 635.83, 1 506.36, 1 423.59, 1 374.97, 1 328.57 和 1 108.82 cm⁻¹ 等 6 个特征峰。1 506.36 cm⁻¹ 处木质素特征峰的消失和 1 643.92 cm⁻¹ 处特征峰出现，显示了相对于糖类而言，萎蔫病菌更偏好降解消耗木质素，这也解释了萎蔫病菌大量定殖于植物根茎维管束组织，堵塞导管，引起叶片和植株上层水分的缺乏，造成萎蔫症状的原因之一，与王国芬等^[2]的桑萎蔫病标记菌株 R18-gfp-1 实验结果相一致。由于发病组织和健康组织的结构组分存在一定程度上的差异，通过对比两者的傅立叶红外光谱图的峰型、峰位、峰高等，为快速鉴别桑萎蔫病提供了更加简便、直观、快速的技术手段。

表 2 桑细菌性萎蔫病菌菌株 R18-2 接种发病桑枝和健康桑枝的红外光谱主要吸收峰比较
Table 2 Comparison of FTIR spectra between the mulberry branches infected with and without *Enterobacter mori* R18-2

序号	基团	振动类型	峰位/cm ⁻¹		峰强 A	
			病桑	健康桑	病桑	健康桑
1	C—H	ν	2 927.05 ± 0.22	2 928.84 ± 0.11	0.071 ± 0.007 a	0.082 ± 0.004 b
2	C=O	ν	1 732.63 ± 0.08	1 735.81 ± 0.32	0.090 ± 0.003 a	0.134 ± 0.003 b
3	C—O	ν	1 248.00 ± 0.25	1 246.82 ± 0.23	0.142 ± 0.004 a	0.112 ± 0.011 b
4	C—O—C	ν	1 160.17 ± 0.34	1 159.15 ± 0.48	0.065 ± 0.003 a	0.062 ± 0.003 a
5	C—O	ν	1 053.70 ± 0.47	1 054.86 ± 0.25	0.030 ± 0.004 a	0.043 ± 0.002 b
6	C=O	ν		1 635.83 ± 0.18		0.173 ± 0.014
7	C=C	ν		1 506.36 ± 0.03		0.054 ± 0.004
8	C—H	δ		1 423.59 ± 0.06		0.035 ± 0.001
9	C—H	δ		1 374.97 ± 0.03		0.057 ± 0.002
10	C—H, C _i —O	δ, ν		1 328.57 ± 0.01		0.029 ± 0.001
11	C—H	δ		1 108.82 ± 0.07		0.043 ± 0.005
12	C=O	ν	1 643.92 ± 0.05		0.446 ± 0.015	
13	C=O	ν	1 407.31 ± 0.11		0.063 ± 0.003	

说明：A 表示吸光度，ν 表示伸缩振动，δ 表示弯曲振动；a, b 小写字母表示不同样品的峰强度间的显著水平(P<0.05)。

2.3 FTIR 检测的分离验证

FTIR 检测为健康的 10 份桑枝条上分离到的细菌均无烟草过敏反应，挑取代表性菌株进行 16S rDNA 测定与分析，证实都不是桑萎蔫病菌。FTIR 检测为疑似桑萎蔫病菌感染的 10 份桑枝条，除 1 份样品未分离到烟草过敏反应阳性的菌株外，其他 9 份样品的代表性菌株烟草过敏反应呈阳性。经过 Biolog 鉴定，与桑萎蔫病菌相似度为 0.61~0.76；16S rDNA 序列相似度为 97%~98%，证实了这些样品都有桑萎蔫病菌的感染。

3 结论与讨论

桑细菌性萎蔫病作为近年来浙江乃至全国新出现的一种桑树新病害，目前对其病害的流行规律，传播途径以及病原菌的致病机制都研究甚少，给中国的蚕桑产业带有了很大的潜在风险。特别值得重视的是，从浙江省临安市、桐庐县等地桑树的田间发病情况以及我们的室内离体桑枝注射接种实验来看，由桑萎蔫病菌引起的病桑外部表现与桑细菌性青枯病大致相似：老叶枯黄、新叶萎蔫，直至全株枯萎，植株长势衰弱；解剖发病植株根茎维管束，可观察到植株茎干木质部褐变^[10]。相似的发病症状使得桑细菌性萎蔫病在田间常被误诊为桑细菌性青枯病，导致了错误的防治对策。

早期的诊断与检测无疑是有有效预防植物病害发生与危害的有效方法，然而，由于传统的植物病原细菌的分离鉴定不仅需要有一定的经验和技能，也需要较长的时间，特别是由于桑树作为一种木本植物，病原细菌的分离和致病性检测都不易进行，周期更是比一般草本植物长，使得难以快速、准确地早期检测诊断桑细菌性萎蔫病的发生。而红外光谱技术能够克服传统植物病害诊断与检测方法的各种弊端，加上具有操作简单，诊断时间短的优点，对植物细菌病害的检测与诊断将是一个极好的补充。

本研究显示桑萎蔫病菌和桑青枯病菌这 2 种桑树重要病原细菌有不同的红外吸收光谱，5 个共同峰中的 3 个在峰强度上有显著差异，桑萎蔫病菌和桑青枯病菌分别有 2 个和 8 个特征峰，特别是桑萎蔫病菌具有 1 399.10 cm⁻¹ 和 1 079.45 cm⁻¹ 这 2 个特有的峰位，为利用 FTIR 快速鉴定引起桑树相似病害的桑萎蔫病菌和桑青枯病菌提供了依据。同时发现萎蔫病菌感染的桑枝条和健康枝条也有不同的红外光谱图谱，5 个共同峰中的 4 个在峰强度上有显著差异，特别是萎蔫病菌感染的桑病枝具有 1 643.92 cm⁻¹ 和 1 407.31 cm⁻¹ 这 2 个特征峰，为利用红外光谱技术直接无损伤鉴别桑树是否感染萎蔫病提供了可能。

FTIR 检测为健康的 10 份桑枝条上分离到的代表性菌株经过鉴定，证实都不是桑萎蔫病菌，FTIR 检测为疑似桑萎蔫感染的 10 份桑枝条有 9 份的代表性菌株经过烟草过敏反应、Biolog 鉴定和 16S rDNA 序列分析鉴定为桑萎蔫病菌，证实了这些样品应该都有桑萎蔫病菌的感染，其中 1 份红外检测为萎蔫病菌感染的样品没有分离到桑萎蔫病菌。这一方面可能是由于病菌刚开始感染，数量较少，加上是木本植物样品，造成难以分离到；另一方面，由于本实验涉及到的主要是桑病原细菌，在实际操作过程中，还要考虑桑枝条上可能有和桑萎蔫病菌相似红外成份的环境细菌的干扰，造成红外检测的假阳性。

本研究利用红外光谱技术比较了能引起桑树相似病症的桑萎蔫病菌和桑青枯病菌，以及萎蔫病菌感染的桑枝条和健康枝条的红外光谱图谱，发现它们在峰型、峰的数量、峰位及特定峰的吸收强度上都存在较大差别，同时通过分离鉴定的方法对红外检测的桑枝条进行了验证，整体上发现利用这些傅里叶红外光谱上的特征峰可以作为萎蔫病菌的生物标记，用于快速鉴别桑细菌性萎蔫病。但桑树上可能有相似红外图谱的环境微生物，需要增加更多样品测试来选取更加特异的峰作为标记，避免其他微生物的干扰。

4 致谢

感谢浙江大学植物保护系田文效先生在红外光谱样品准备中的帮助。

5 参考文献

[1] 王国芬, 谢关林, 徐福寿, 等. 桑青枯病描述及研究中的几个问题探讨[J]. 蚕业科学, 2007, 33(2): 321 – 324. WANG Guofen, XIE Guanlin, XU Fushou, *et al.* Description and discussion on some research issues in mulberry bacterial wilt [J]. *Acta Sericol Sin*, 2007, 33(2): 321 – 324.

表 3 桑细菌性萎蔫病红外光谱检测的分离验证

Table 3 Confirm of FTIR spectra detection based on the isolation and identification of *Enterobacter mori*

桑枝条	FTIR	过敏反应	Biolog 相似性	16S rDNA 相似性/%
样品 1	+	+	0.63	97
样品 2	+	+	0.65	97
样品 3	+	+	0.61	98
样品 4	+	+	0.69	98
样品 5	+	+	0.66	97
样品 6	+	+	0.62	98
样品 7	+	+	0.71	98
样品 8	+	+	0.66	97
样品 9	+	+	0.76	97
样品 10	+	-	-	-

说明：“+” 阳性反应；“-” 无反应或无相似性。

- [2] 王国芬. 桑细菌性枯萎病病原学及其致病机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
WANG Guofen. *Study on Mulberry Wilt Pathogen and Its Pathogeneses* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009.
- [3] ZHU Bo, WANG Guofeng, XIE Guanlin, *et al.* Enterobacter spp.: a new evidence causing bacterial wilt on mulberry [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 292 – 300.
- [4] 朱勃. 桑细菌性枯萎病病原的定名、分子检测及肠杆菌基因水平转移的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
ZHU Bo. *Molecular Detection about Bacterial Wilt in Mulberry and Horizontal Gene Transfer Analysis in Enterobacter* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [5] ZHU Bo, ZHANG Guoqin, LOU Miaomiao, *et al.* Genome sequence of *Enterobacter mori* type strain LMG 25706, a pathogenic bacterium of *Morus alba* L. [J]. *J Bacteriol*, 2011, **193**(14): 3670 – 3671.
- [6] ZHU Bo, LOU Miaomiao, XIE Guanlin, *et al.* *Enterobacter mori* sp. nov., a novel *Enterobacter* species associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, **61**(11): 2769 – 2774.
- [7] 蒯元璋. 桑树病原原核生物及其病害的研究进展 (I) [J]. 蚕业科学, 2012, **38**(1): 152 – 164.
KUAI Yuanzhang. Research progress in mulberry pathogenic prokaryotes and their diseases (I) [J]. *Acta Sericol Sin*, 2012, **38**(1): 152 – 164.
- [8] 蒯元璋. 桑树病原原核生物及其病害的研究进展 (II) [J]. 蚕业科学, 2012, **38**(5): 898 – 913.
KUAI Yuanzhang. Research progress in mulberry pathogenic prokaryotes and their diseases (II) [J]. *Acta Sericol Sin*, 2012, **38**(5): 898 – 913.
- [9] 徐丽慧, 徐福寿, 李芳, 等. 桑细菌性青枯病病原及其生化型鉴定[J]. 植物保护学报, 2007, **4**(2): 141 – 146.
XU Lihui, XU Fushou, LI Fang, *et al.* Identification of the causal organism of bacterial wilt of mulberry and its biovars [J]. *Acta Phytology Sin*, 2007, **4**(2): 141 – 146.
- [10] 王芳. 桑树细菌性萎蔫病菌与青枯菌的致病性差异比较及其检测技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
WANG Fang. *Comparison of Pathogenicity and Detection Between Mulberry Enterobacter Wilt and Ralstonia Wilt* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [11] LI Bin, LIU Baoping, YU Rongrong, *et al.* Bacterial brown stripe of rice in soil-less culture system caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in China [J]. *J Gen Plant Pathol*, 2011, **77**(1): 64 – 67.
- [12] LI Bin, XU Lihui, LOU Miaomiao, *et al.* Isolation and characterization of antagonistic bacteria against bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, **46**(4): 450 – 455.
- [13] TOYRAN N, LASCH P, NAUMANN D, *et al.* Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study [J]. *Biochem J*, 2006, **397**(3): 427 – 436.
- [14] GARIP S, BOZOGLU F, SEVERCAN F. Differentiation of mesophilic and thermophilic bacteria with Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Appl Spectrosc*, 2007, **61**(2): 186 – 192.
- [15] GARIP S, CETIN G A, SEVERCAN F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates [J]. *Food Chem*, 2009, **113**(4): 1301 – 1307.
- [16] LAU N-S, TSUGE T, SUDESH K. Formation of new polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer in *Burkholderia* sp. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**(5): 1599 – 1609.
- [17] WANG Yanli, ZHOU Qing, LI Bin, *et al.* Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR spectra between two closely related species *Acidovorax oryzae* and *Acidovorax citrulli* [J]. *BMC Microbiol*, 2012, **12**: 182. doi: 10.1186/1471-2180-12-182.
- [17] LI Bin, SHAN Chanlin, QIU Hui, *et al.* Characterization of Chinese cabbage clubroot by Fourier transform infrared spectra [J]. *Asia J Chem*, 2013, **25**(15): 8460 – 8462.
- [18] FANG Yuan, LI Bin, WANG Yanli, *et al.* Rapid comparative analysis of *Burkholderia seminalis* from apricot, water and rice rhizosphere by FTIR [J]. *Asian J Chem*, 2013, **25**(18): 10165 – 10168.
- [19] GE Mengyu, LI Bin, WANG Li, *et al.* Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR spectra between two pathovars of *Xanthomonas oryzae* [J]. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, **133**(6): 730 – 734.