

# 电子鼻技术在快速检测小麦矮腥黑穗病菌中的应用

曹学仁<sup>1</sup>, 詹浩宇<sup>2</sup>, 周益林<sup>1</sup>, 段霞瑜<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室,  
北京 100193; <sup>2</sup> 北京盈盛恒泰科技有限责任公司, 北京 100055

**摘要:** 由小麦矮腥黑穗病菌(TCK)引起的小麦矮腥黑穗病是我国重要的检疫性病害, 为明确电子鼻技术在快速检测小麦矮腥黑穗病菌方面的可行性, 利用电子鼻对含有 TCK 和小麦光腥黑穗病菌(TFL)不同冬孢子数(50 g 小麦种子中冬孢子数分别为  $0$ 、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ ) 的小麦进行了检测, 采用主成分分析法(PCA)和线性判别法(LDA) 进行数据分析。结果发现, 这 2 种分析方法均可将不含 TCK 冬孢子的小麦和含 TCK 冬孢子的小麦区分开来, 而且通过 LDA 分析, 可将 TCK 冬孢子含量为  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$  及  $10^3$  以上的处理区分开来。另外, 通过 PCA 分析, 可将 TCK 与 TFL 区分开来。此结果为电子鼻技术在快速检测小麦矮腥黑穗病菌中的应用奠定了基础。

**关键词:** 电子鼻; 小麦; 矮腥黑穗病菌; 检测

## Rapid detection of *Tilletia controversa* Kühn in wheat grain by electronic nose

Xue-ren CAO<sup>1</sup>, Hao-yu ZHAN<sup>2</sup>, Yi-lin ZHOU<sup>1</sup>, Xia-yu DUAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Beijing Ensoul Technology Ltd., Beijing 100055, China

**Abstract:** Dwarf bunt of wheat, caused by *Tilletia controversa* Kühn (TCK), is an important quarantine disease in China. To determine the feasibility of electronic nose in rapid detection of TCK, wheat grains containing different numbers of TCK or *T. foetia* (Wallr.) Liro (TFL) teliospores ( $0$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  teliospores in 50 g wheat grains, respectively) were testified by using electronic nose. Data were analyzed by principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). The results showed that wheat without TCK teliospores could be distinguished from those with TCK teliospores by using these 2 analysis methods. And it was also possible to distinguish  $0$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  and  $\geq 10^3$  TCK teliospores in 50 g wheat grains by using LDA. Moreover, TCK and TFL could be distinguished by using PCA. Therefore, this study laid a foundation for application of electronic nose in rapid detection of TCK in wheat grain.

**Key words:** electronic nose; wheat; *Tilletia controversa* Kühn; detection

小麦矮腥黑穗病菌 *Tilletia controversa* Kühn (TCK) 是一种重要的世界性检疫病原菌, 由其引起的小麦矮腥黑穗病是麦类黑穗病中危害最大、防治最难的检疫性病害之一。目前, 该病害已在欧洲、美洲、亚洲及非洲等 30 多个国家发生, 美国西北部的小麦染病尤为普遍(崔良刚和程义美, 2003)。TCK 至今仍被我国列为严禁入境的检疫性真菌, 它具有传入和定殖的风险, 因此必须采取严格的检验检疫措施, 防止 TCK 随进口小麦流入我国(陈克等, 2002; 周益林等, 2007)。近年来, 我国口岸检疫机构曾多次在由美国、加拿大及欧盟进口的小麦中

截获 TCK 冬孢子。但小麦网腥黑穗病菌 *T. caries* (DC) Tul(TCT)、TCK 及小麦光腥黑穗病菌 *T. foetia* (Wallr.) Liro (TFL) 的冬孢子形态非常相似, 这给口岸检疫工作带来了很大的障碍。多年来, 国内外一些学者主要从形态学、生物学、分子生物学检测等方面进行了大量有益的研究和探索工作(董薇等, 2007; 林授锴等, 2008; 年四季等, 2009)。但如何快速、准确地检测出 TCK, 一直是广大学者和口岸工作者关注的焦点。

电子鼻(electronic nose) 是一种由具有选择性的化学传感器阵列和适当的模式识别系统组成, 能

识别简单或复杂气味的仪器。近年来,电子鼻技术在谷物霉变、毒素及活性的检测中得到了探索与利用。1997 年,Jonsson *et al.* 利用电子鼻结合人工神经网络识别技术,对不同气味的燕麦、黑麦和大麦以及含有不同麦角固醇和菌落总数的小麦进行了分析。结果显示,神经网络能够准确识别不同霉变程度的燕麦,也可以预测霉变大麦和新鲜大麦、霉变黑麦和新鲜黑麦混合物中霉变谷物的百分比。Olsson *et al.* (2002)利用电子鼻对大麦中的真菌毒素 OA 和 DON 进行了检测,结果表明,电子鼻既能区分赭曲霉素 A 含量大于和小于  $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的大麦,也能预测谷物中 DON 的含量。邹小波和赵杰文(2004)利用电子鼻快速、准确地分析谷物散发的气味,从而判定谷物是否霉变。伟利国等(2010)利用电子鼻技术对小麦的活性进行了检测。由于小麦受 TCK 危害后,植株矮化,分蘖增多,籽粒变为菌癭,具有鱼腥味,这就为利用电子鼻技术来检测小麦中的 TCK 提供了可能。因此,本研究利用电子鼻对含有不同 TCK 冬孢子数的小麦进行检测分析,以期探索出一种能够快速检测 TCK 的新技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与试验处理

供试 TCK 来自于美国农业部小谷物种质资源研究所;TFL 由本实验室提供。

称取 50 g 小麦种子放入 100 mL 的三角瓶中,利用血球计数板在显微镜下用蒸馏水将 TCK 的冬孢子浓度配成  $10^8\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$  并以梯度稀释后,加入三角瓶中,每个三角瓶中加冬孢子悬浮液  $10\text{ }\mu\text{L}$ ,使每 50 g 小麦种子中的冬孢子含量分别为  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  及  $10^0$  个。TFL 冬孢子悬浮液的配制以及每 50 g 小麦种子中的冬孢子含量与 TCK 处理一致。两者均以清水为对照,然后用双层保鲜膜封口,每个处理重复 4 次。试验开始 1 h 前,将处理好的三角瓶置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱中。

### 1.2 主要仪器

本研究采用的是 PEN3 型电子鼻系统(德国 AIR-SENSE 公司),由北京盈盛恒泰科技有限责任公司提供。该电子鼻含有 10 个不同的金属氧化物传感器,组成传感器阵列。各传感器的性能描述见表 1。

表 1 传感器性能描述  
Table 1 Descriptions of sensors

| 阵列序号<br>No. in array | 传感器名称<br>Sensor name | 性能描述<br>Description                                                          | 备注<br>Reference material              |
|----------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1                    | W1C                  | 芳香成分<br>Aromatic compound                                                    | 甲苯 Toluene $10\times10^{-6}$          |
| 2                    | W5S                  | 对氮氧化合物很灵敏<br>Very sensitive to nitrogen oxides                               | $\text{NO}_2$ $10\times10^{-6}$       |
| 3                    | W3C                  | 氨水,对芳香成分灵敏<br>Ammonia, sensitive to aromatic compounds                       | 苯 Benzene $10\times10^{-6}$           |
| 4                    | W6S                  | 主要对氢气有选择性<br>Mainly hydrogen, selectively                                    | $\text{H}_2$ $100\times10^{-6}$       |
| 5                    | W5C                  | 烷烃芳香成分<br>Alkanes, aromatic compounds                                        | 丙烷 Propane $1\times10^{-6}$           |
| 6                    | W1S                  | 对甲烷灵敏<br>Sensitive to methane                                                | $\text{CH}_4$ $100\times10^{-6}$      |
| 7                    | W1W                  | 对硫化物灵敏<br>Sensitive to sulphur compounds                                     | $\text{H}_2\text{S}$ $1\times10^{-6}$ |
| 8                    | W2S                  | 对乙醇灵敏<br>Sensitive to alcohols                                               | $\text{CO}$ $100\times10^{-6}$        |
| 9                    | W2W                  | 芳香成分,对有机硫化物灵敏<br>Aromatics compounds, sensitive to sulphur organic compounds | $\text{H}_2\text{S}$ $1\times10^{-6}$ |
| 10                   | W3S                  | 对烷烃灵敏<br>Sensitive to alkanes                                                | $\text{CH}_4$ $10\times10^{-6}$       |

### 1.3 试验方法

采用直接顶空吸气法,即直接将电子鼻进样针头插入经 1.1 处理的三角烧瓶中进行测定。测定条件:传感器自清洗时间为 100 s,传感器归零时间为 10 s,样品准备时间为 3 s,进样流量为  $300\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,分析采样时间为 60 s。

### 1.4 数据处理

提取 10 个传感器的特征值,采用主成分分析法(principal component analysis,PCA)和线性判别法(linear discriminant analysis,LDA)作为主要分析方法。

PCA 是把多个指标化为少数几个综合指标的一种统计方法,并对少数几个综合指标进行线性分

类,PCA 分析的结果仅显示主要的两维散点图。PC1 和 PC2 分别为 PCA 转换中得到的第一主成分和第二主成分的贡献率,贡献率越大,说明该主成分越能较好地反映原来多指标的信息。

LDA 分析是模式识别的经典算法,将高维的模式样本投影到最佳鉴别矢量空间,以达到抽取分类信息和压缩特征空间维数的效果,投影后保证模式样本在新的子空间有最大的类间距离和最小的类内距离,即模式在该空间中有最佳的可分离性。与 PCA 分析相比,LDA 更侧重于对不同类数据之间的

差别进行建模。

2 结果与分析

2.1 TCK 的电子鼻检测

10 个传感器对健康小麦与添加 TCK 冬孢子后小麦挥发物的响应曲线见图 1。从图中可以看出,不同传感器对健康小麦挥发物的反应不同,其中以 2 号传感器(对氮氧化合物类敏感)的响应值较大。与健康小麦相比,加入冬孢子后,传感器的响应值有明显变化。

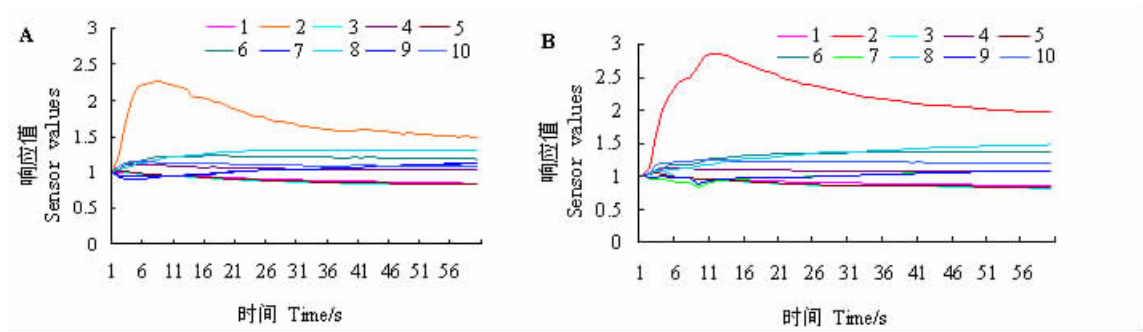


图 1 10 个传感器对健康小麦(A)及加入 TCK 后小麦(B)的响应曲线  
Fig. 1 Curves of 10 sensors responding to wheat (A) and to wheat with TCK teliopores (B)

2.2 PCA 分析

PCA 分析结果显示,在 CORRELATION 相关性矩阵模式下,第一主成分区分贡献率为84.64%,第二主成分区分贡献率为 10.20%,2 个主成分区分贡献率总和为 94.84%,大于 90%,表明这 2 个主成分已经基本代表了样品的主要信息特征(图 2)。同时,从图 2 可以看出,利用 PCA 分析,可以将含 TCK 冬孢子的小麦与不含 TCK 冬孢子的小麦(CK)很好地区分开来,且对含有不同孢子数的小麦也有一定的区分能力,其中,当每 50 g 小麦中的冬孢子数超过  $10^4$  时,可明显与冬孢子数为  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$  及  $10^3$  的处理区分开来。

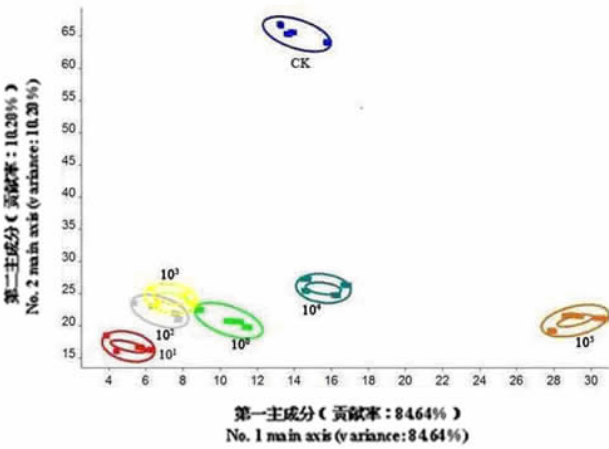


图 2 含不同冬孢子数小麦的 PCA 分析图  
Fig. 2 PCA score plot of wheat grains containing different numbers of TCK teliopores

2.3 LDA 分析

从 LDA 分析结果(图 3)可以看出,线性判别函数 LD1 和 LD2 的贡献率分别为 65.78% 和 19.88%,两者总贡献率达 85.66%。该分析结果表明,利用电子鼻可以将不含 TCK 冬孢子的小麦(CK)和含有不同冬孢子数的小麦区分开来,并且呈现出较好的线性关系。同时还可将 50 g 小麦中含  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$  个冬孢子的处理与冬孢子数大于  $10^3$  的处理区分开来,也能将  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$  个冬孢子的处理彼此区分开来。因此与 PCA 分析结果相比,LDA 分析对不同冬孢子数处理间的区分效果更好,且线性关系明显。

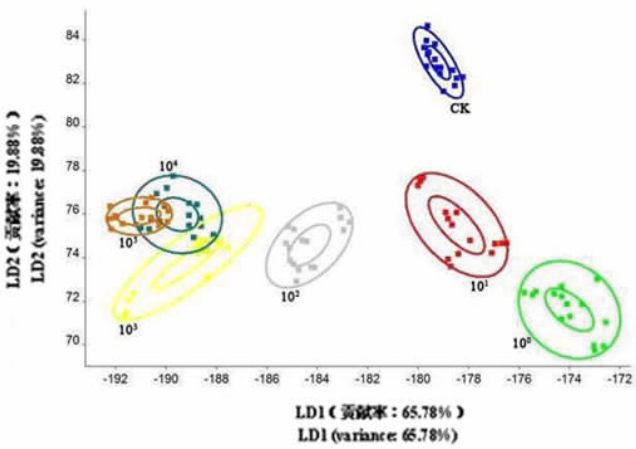


图 3 含不同冬孢子数小麦的 LDA 分析  
Fig. 3 LDA score plot of wheat grains containing different numbers of TCK teliopores

## 2.4 电子鼻检测区分 TCK 和 TFL

利用电子鼻分别对含有 TCK 和 TFL 的小麦进行测定,并利用 PCA 和 LDA 进行数据分析。从 PCA 分析结果(图 4)可以看出,第一主成分和第二主成分区分贡献率总和为 96.99%,且不同 TCK 冬孢子数的处理与不同 TFL 冬孢子数的处理各自分布在一起,两者之间可以很好地区分开来。但是,利用 LDA 分析,两者在图上的分布区域出现重叠(结果未显示),表明该分析方法不能将 TCK 与 TFL 区分开来。

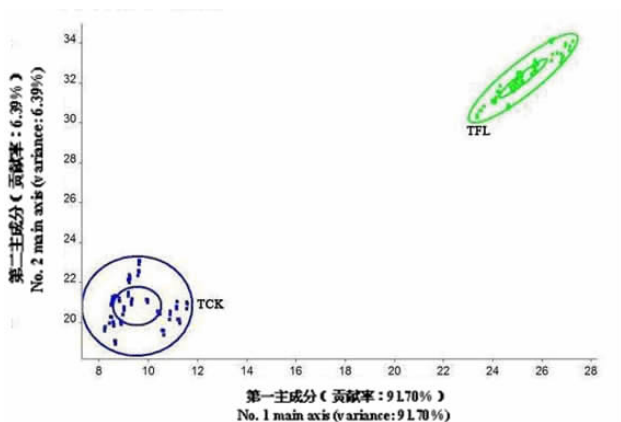


图 4 含不同 TCK 和 TFL 冬孢子数小麦的 PCA 分析图

Fig. 4 PCA score plot of wheat grains containing different numbers of TCK and TFL teliospores

## 3 讨论

“电子鼻”的概念最早是由英国 Warwick 大学的 Persand 和 Dodd 教授于 1982 年模仿哺乳动物嗅觉系统对几种有机挥发气体进行类别分析时提出来的。随着材料科学、制造工艺、计算机与应用数学等相关学科的进步,电子鼻研究迅速发展,在食品、环境监控、医学、农业与公共安全等领域得到了广泛的应用(金翠云等,2010)。本研究利用电子鼻技术对含有不同 TCK 冬孢子数的小麦种子进行了测定,采用 PCA 和 LDA 法对数据进行了分析。结果表明,利用电子鼻可以将不含 TCK 的小麦和含有 TCK 的小麦区分开来,且对含不同冬孢子数的小麦也有一定的区分效果,特别是 TCK 冬孢子含量较大时。与其他检测方法相比,电子鼻技术具有操作简单、测定迅速、无损及结果客观等优点,因此本研究为探索 TCK 快速检测的新方法提供了参考。

本研究还发现,利用电子鼻结合 PCA 分析,可以很好地将同样具有鱼腥味的 TFL 和 TCK 区分开来。但是,对于与 TCK 在形态上更相似且具有鱼腥味的 TCT,能否利用电子鼻技术并结合适当的分析方法区分开来,还需要进一步研究;另外,不同的小麦品种及小麦的不同陈化程度对电子鼻的响应是否有影响,也需要研究来证实。

## 参考文献

- 陈克,姚文国,章正,肖悦岩,严进,徐岩,白章红,陈小凡,包黎明. 2002. 小麦矮腥黑穗病在中国定殖风险分析及区划研究. 植物病理学报,32(4):312-318.
- 崔良刚,程义美. 2003. 小麦矮腥黑穗病的发生及防治. 植物保护,156(2):22-23.
- 董微,陈万权,刘太国. 2007. 小麦矮腥黑粉菌的鉴定及检测方法. 植物保护,33(6):129-131.
- 金翠云,崔瑶,王颖. 2010. 电子鼻及其在各领域的最新研究进展. 传感器世界,(3):6-10.
- 林授锴,王念武,翁瑞泉,周卫川,郭琼霞. 2008. 小麦矮腥黑粉菌检疫鉴定研究进展和展望. 植物检疫,22(5):318-320.
- 年四季,袁青,殷幼平,蔡俊,王中康. 2009. 实时荧光定量 PCR 鉴定小麦矮腥黑穗菌技术研究. 中国农业科学,42(12):4403-4410.
- 伟利国,张小超,赵博,李祖超. 2010. 电子鼻技术及其在小麦活性检测中的应用. 农机化研究,(6):150-152.
- 周益林,段霞瑜,贾文明,陈万权,邱焯. 2007. 小麦矮腥黑穗病(TCK)传入中国及其定殖的风险分析研究进展. 植物保护,33(6):6-10.
- 邹小波,赵杰文. 2004. 电子鼻快速检测谷物霉变的研究. 农业工程学报,12(4):121-124.
- Jonsson A, Winquist F, Schnurer J, Sundgren H and Lundstrom I. 1997. Electronic nose for microbial quality classification of grains. *International Journal of Food Microbiology*, 35:187-193.
- Olsson J, Börjesson T, Lundstedt T and Schnurer J. 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology*, 72:203-214.

(责任编辑:彭露)