

# Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 设计优化促进红松多酚合成诱导条件的研究

刘冉<sup>1</sup>, 王振宇<sup>1,2\*</sup>, 尹红力<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学食品与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

**摘要** [目的] 优化促进红松多酚合成的诱导条件。[方法] 以红松不定芽为试验材料, 通过单因素试验、Plackett-Burman 设计试验和 Box-Behnken Design 设计试验研究 8 种诱导子(苯丙氨酸、肉桂酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、壳聚糖、酵母提取物、铜、钼)对红松不定芽中多酚合成的影响, 并且对促进多酚合成的诱导子组合条件进行优化。[结果] 除了肉桂酸外, 其他 7 种诱导子都能不同程度地提高多酚含量。Plackett-Burman 试验确定了 3 种影响多酚合成的关键因素: 壳聚糖、铜和茉莉酸甲酯。Box-Behnken Design 试验对 3 种关键因素(壳聚糖、铜、茉莉酸甲酯)协同作用的诱导条件进行优化, 优化得到的最佳诱导条件为: 壳聚糖浓度 79.58 mg/L、铜浓度 42.21 μmol/L、茉莉酸甲酯浓度 16.63 μmol/L, 预测多酚含量最高可达到 14.28 mg/g, 实际多酚含量为 13.42 mg/g, 与对照组相比提高了 122.19%。[结论] Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken Design 响应面分析法可以很好地对促进多酚合成的诱导条件进行优化, 3 种诱导子(壳聚糖 + 铜 + 茉莉酸甲酯)协同组合比单一诱导子更有效地提高红松不定芽中多酚含量, 更有利于地促进多酚的合成。

**关键词** 红松; 多酚; 诱导子; 协同作用

中图分类号 S 791.26; Q 946.889 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)27-09269-05

## Optimization of Induction Conditions of Promoting the Synthesis of Polyphenols from *Pinus koraiensis* by Plackett-Burman and Box-Behnken Design

LIU Ran<sup>1</sup>, WANG Zhen-yu<sup>1,2\*</sup>, YIN Hong-li<sup>1</sup> et al (1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090)

**Abstract** [Objective] The research aimed to optimize the induction condition of promoting the synthesis of polyphenols of *Pinus koraiensis*. [Method] The adventitious buds of *Pinus koraiensis* were used to study the effects of 8 inductors on the synthesis of polyphenols by single-factor test, Plackett-Burman design test and Box-Behnken design test. 8 kinds of inductors were phenylalanine, cinnamic acid, methyl jasmonate, salicylic acid, chitosan, yeast extract, lanthanum and europium. The condition of promoting the synthesis of polyphenols inducers combination was optimized. [Result] Besides cinnamic acid, 7 kinds of inductors could improve the content of polyphenols in different degrees. 3 kinds of key factors which influenced the synthesis of polyphenols were established by Plackett-Burman design test: chitosan, lanthanum and methyl jasmonate. The induction conditions with 3 kinds of key factors were optimized by Box-Behnken design test. The optimal induction condition was as follows: chitosan concentration 79.58 mg/L, lanthanum concentration 42.21 μmol/L and methyl jasmonate 16.63 μmol/L. The predicted value of the content of polyphenols was 14.28 mg/g and its experimental value was 13.42 mg/g. Compared with the control group, the content of polyphenols was increased by 122.19%. [Conclusion] The combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design response surface analysis could optimize the induction condition of promoting the synthesis of polyphenols well. The combination of 3 inductors (chitosan + lanthanum + methyl jasmonate) could more effectively improve the content of polyphenols, be more conducive to promote the synthesis of polyphenols than a single inductor in adventitious buds of *Pinus koraiensis*.

**Key words** *Pinus koraiensis*; Polyphenols; Inductor; Synergy

红松(*Pinus koraiensis*)是中国东北地区的优势树种,是一种药用裸子植物,具有极高的经济价值。多酚类物质是从植物中分离出来的一类次生代谢产物。由于其独特的化学结构,它具有显著的生理活性如抗氧化、螯合金属、调节酶的活性、调节细胞增殖等,有助于预防癌症和心脑血管疾病的发生<sup>[1-2]</sup>。红松多酚可以作为一种天然、无毒、高效的抗氧化剂广泛应用于食品、保健品和医药领域,因此如何采取有效的措施提高红松多酚含量具有重要的意义。在植物次生代谢过程中,某些生物诱导子(如酵母提取物、真菌菌丝体和植物细胞壁片断等)或非生物诱导子(如植物激素、稀土元素、紫外线、重金属等)能作为一种特定的信号,诱导特定基因的表达,从而调节植物细胞次生代谢产物的合成<sup>[3]</sup>。诱导子目前被广泛应用于植物细胞培养领域来提高天然产物的产量,有效地促进许多次生代谢产物如萜类、生物碱类、多酚

类等物质的合成<sup>[4-5]</sup>。添加诱导子已被证明是提高植物次生代谢产物的有效方法,而能否利用诱导子之间的相互作用来发掘更大的植物生产次生代谢产物的能力成为新的研究热点<sup>[6]</sup>。笔者首先研究了 8 种诱导子(苯丙氨酸、肉桂酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、壳聚糖、酵母提取物、铜、钼)对红松不定芽多酚中多酚含量的影响,初步筛选有利于多酚合成的诱导子种类和诱导浓度的参考范围。在此基础上,采用 Plackett-Burman 试验筛选影响多酚含量的关键因素,然后利用响应面分析法研究 3 种诱导子的协同作用对红松不定芽中多酚合成的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 成熟的红松种子来源于小兴安岭地区的伊春红松林,采集后保存于 -4 °C 的冰箱中。

**1.2 红松幼苗的培养** 将成熟红松种子灭菌后剥去胚乳,将完整胚作为外植体接种在 DCR 固体培养基上,25 °C 黑暗培养 7 d,将此时诱导生成的红松不定芽作为各种诱导子处理的原材料。

**1.3 诱导子处理** 将苯丙氨酸、肉桂酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、壳聚糖、酵母提取物、硝酸铜、氧化钼 8 种诱导子配制成

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(31170510)。

**作者简介** 刘冉(1989-),女,山东东阿人,博士研究生,研究方向:食用植物资源开发与利用。\* 通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事天然产物分离、功能性食品、生物活性材料方面的研究。

**收稿日期** 2014-08-05

溶液,过滤、灭菌后添加到 DCR 培养基,使得最终培养基中诱导子浓度达到设计的不同浓度梯度,以未添加诱导子作为对照。所有的处理设 3 次重复。每个培养瓶中接种 6 株红松不定芽,25 ℃ 黑暗培养 8 d 后收获,测定鲜重增长率和多酚含量。

**1.4 红松不定芽鲜重增长率的测定** 鲜重增长率 = [(收获重量 - 初始重量) / 初始重量] × 100%

**1.5 多酚提取和含量测定** 多酚提取采用超声波提取法,收集培养 8 d 的新鲜红松不定芽约 1.0 g 进行液氮研磨,加入 20 ml 浓度 60% 乙醇提取液,超声功率 150 W、温度 30 ℃ 提取 2 h 后,在 5 000 r/min 下离心 10 min,定容到 25 ml 容量瓶中,即为多酚提取液。

取 2 ml 多酚提取液,用蒸馏水定容到 10 ml 容量瓶中,作为多酚含量测定样品。具体方法按照参考文献[7]的方法进行。没食子酸作为标准样品,其标准曲线为:

$$y = 0.0111x (R^2 = 0.9992)$$

式中,  $x$  为没食子酸浓度,  $\mu\text{g/ml}$ 。

**1.6 Plackett-Barman 法筛选影响多酚合成的主要因素** 选用试验次数  $N = 7$  的 Plackett-Burman 试验设计,考察了苯丙氨酸、铜、钼、水杨酸、酵母提取物、壳聚糖、茉莉酸甲酯 7 个因素,每个因素取 2 个水平,以多酚含量  $Y(\text{mg/g})$  为响应值。每个因素取 2 个水平:低水平“-1”和高水平“+1”。采用 minitab 15.0 对数据进行回归分析。

**1.7 响应面设计** 根据 Plackett-Barman 试验结果,利用 Minitab15.0 软件,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,设计壳聚糖浓度、铜浓度、茉莉酸甲酯浓度三因素三水平响应面分析试验,优化壳聚糖 + 铜 + 茉莉酸甲酯协同作用的诱导条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 8 种诱导子对红松多酚含量影响的单因素试验

**2.1.1 前体物质对红松多酚合成的影响。** 多酚作为一类重要的次生代谢产物,通过苯丙烷代谢途径合成。苯丙烷代谢途径上的第一步反应是 L-苯丙氨酸在 PAL 催化形成反式肉桂酸,是苯丙烷代谢途径上的第一个反应,因此苯丙氨酸和肉桂酸是松多酚合成重要的前体物质<sup>[8]</sup>。

由图 1 可知,红松不定芽中多酚含量随苯丙氨酸浓度的提高呈现出先增加后降低的趋势。当苯丙氨酸的浓度达到 2.00 mmol/L 时,多酚含量达到最大值,为  $(9.47 \pm 0.47) \text{ mg/g}$ ,与对照组相比提高 56.79%,说明 2.00 mmol/L 最有利于红松不定芽中多酚类物质的合成。高浓度的苯丙氨酸(6.00 mmol/L)处理红松不定芽,多酚含量低于对照组。这是由于高浓度的苯丙氨酸对红松不定芽细胞产生毒害作用,使得细胞活力降低,多酚合成的能力也降低。因此,苯丙氨酸的最佳添加浓度为 2.00 mmol/L。

由图 2 可知,低浓度(0.05 ~ 0.20 mmol/L)的肉桂酸对红松不定芽多酚含量的影响与对照组相比无明显差异,而高浓度(0.50 ~ 2.00 mmol/L)的肉桂酸显著降低了多酚含量。结果表明,前体物质肉桂酸并不能促进红松不定芽中多酚的

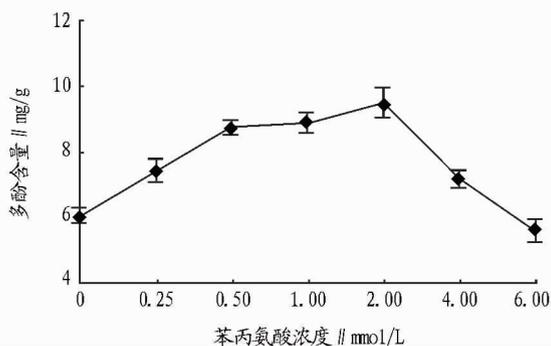


图 1 苯丙氨酸对红松不定芽中多酚含量的影响

合成,反而对多酚的合成起抑制作用。

在植物细胞培养领域,前体物质饲喂是一种常见且有效地提高次生代谢产物合成的手段。郭丽梅等<sup>[9]</sup>研究了前体物质对粉葛(*Pueraria Lobata*)细胞次生代谢的影响,发现低浓度的苯丙氨酸对总黄酮积累有较大的促进作用,而肉桂酸对粉葛细胞中黄酮含量的影响不明显。这与该试验结果基本一致。

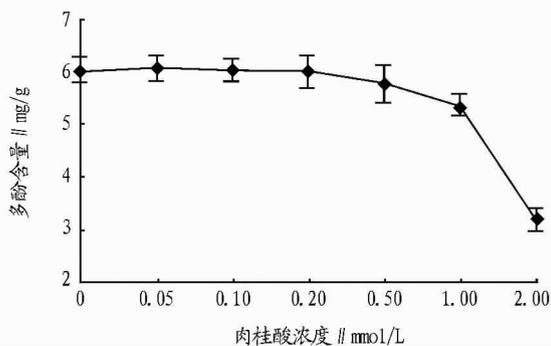


图 2 肉桂酸对红松不定芽中多酚含量的影响

**2.1.2 植物激素对红松多酚合成的影响。** 由图 3 可知,茉莉酸甲酯的浓度在 1 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$  范围内可以显著提高红松不定芽中多酚含量,促进多酚合成,而且 10  $\mu\text{mol/L}$  茉莉酸甲酯提高多酚含量的效果最佳,达到  $(10.88 \pm 0.24) \text{ mg/g}$ ,与对照组相比提高了 80.13%;当茉莉酸甲酯浓度达到 40  $\mu\text{mol/L}$  时,多酚含量与对照组相比降低,抑制了多酚的合成。因此,茉莉酸甲酯的最佳添加浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

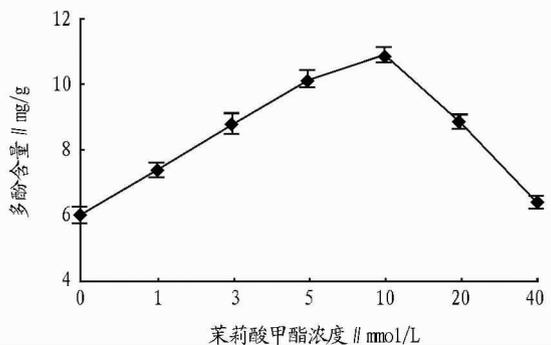


图 3 茉莉酸甲酯对红松不定芽中多酚含量的影响

由图 4 可知,低浓度(10  $\mu\text{mol/L}$ )肉桂酸诱导红松不定芽,红松不定芽中多酚含量无显著差异;高浓度(200

$\mu\text{mol/L}$  肉桂酸诱导红松不定芽, 多酚含量显著降低;  $1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$  水杨酸可以显著提高多酚含量, 促进多酚合成, 其中  $40 \mu\text{mol/L}$  水杨酸诱导多酚合成的效果最佳, 多酚含量达到  $(7.02 \pm 0.24) \text{ mg/g}$ , 与对照组相比提高了 16.22%。水杨酸的最佳添加浓度为  $40 \mu\text{mol/L}$ 。

茉莉酸甲酯和水杨酸是内源性的植物激素, 在植物生长发育和抵抗各种逆境条件时起激素调节和信号传递作用, 还是一类常用的促进细胞次生代谢合成的化学诱导子<sup>[10]</sup>。王琪等<sup>[11]</sup>用茉莉酸甲酯喷雾处理红松, 诱导红松球果多酚类物质如香豆酸、苯乙酸、阿魏酸、苯甲酸、水杨酸和肉桂酸含量的增加。王春丽等<sup>[12]</sup>以丹参幼苗为材料, 研究了茉莉酸甲酯 (MeJA) 和水杨酸 (SA) 根系中酚酸类物质积累的影响, 结果表明根中丹参素、原儿茶酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸以及总酚酸含量均显著增加。该研究也证实了茉莉酸甲酯和水杨酸可以促进红松多酚的合成。

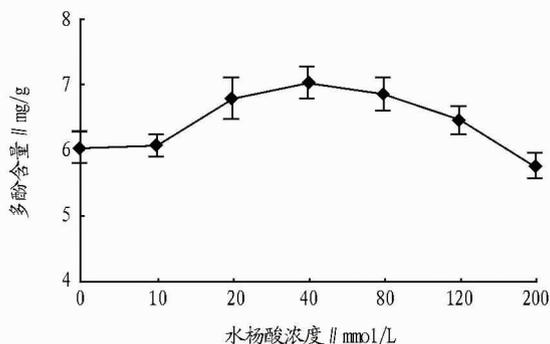


图4 水杨酸对红松不定芽中多酚含量的影响

**2.1.3 生物诱导子对红松多酚合成的影响。**由图5可知, 生物诱导子壳聚糖和酵母提取物对红松不定芽中多酚合成的诱导效果相似, 多酚含量随着诱导子浓度的提高而呈现先增加后降低的趋势, 而且2种生物诱导子最佳的诱导浓度均为  $100 \text{ mg/L}$ 。  $100 \text{ mg/L}$  壳聚糖诱导红松不定芽, 多酚含量达到最大值  $(9.91 \pm 0.38) \text{ mg/g}$ , 与对照组相比提高了 64.07%;  $100 \text{ mg/L}$  酵母提取物诱导红松不定芽, 多酚含量达到最大值  $(7.75 \pm 0.23) \text{ mg/g}$ , 与对照组相比提高了 28.31%。壳聚糖诱导红松不定芽合成多酚的效果优于酵母提取物。

壳聚糖和酵母提取物都属于生物诱导子, 在促进植物次生代谢产物合成领域应用广泛<sup>[13-15]</sup>。Sánchez-Sampedro 等<sup>[16]</sup>研究了生物诱导子对水飞蓟细胞培养促进水飞蓟素合成的影响, 发现壳聚糖并不能提高水飞蓟素的含量, 而  $50 \text{ mg/L}$  酵母提取物可以有效地促进水飞蓟素的合成。而该研究结果表明, 与酵母提取物相比, 壳聚糖在促进红松多酚合成方面具有更好的诱导作用。由此可知, 生物诱导子具有选择特异性, 其诱导效果与植物和次生代谢产物的种类有关。

**2.1.4 稀土元素对红松多酚合成的影响。**稀土元素是一类具有生理活性的元素, 可以对植物产生多种生理效应, 提高种子萌发率, 促进根系发育, 提高生物量, 增强抗逆性等, 因此在农林业上得到广泛的应用。随着研究的不断深入, 稀土元素 (镧、铈、钕、镨等) 的应用已拓展到植物细胞和组织培养

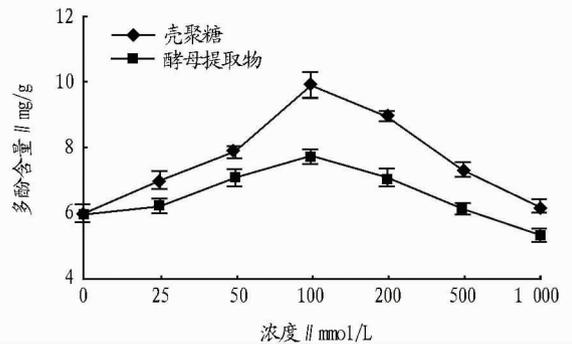


图5 生物诱导子对红松不定芽中多酚含量的影响

领域<sup>[17]</sup>。由图6可知, 低浓度 ( $25 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ ) 镧处理红松幼苗不定芽中多酚含量显著高于高浓度 ( $400 \sim 600 \mu\text{mol/L}$ ) 镧处理, 镧在  $100 \mu\text{mol/L}$  浓度下多酚含量最高, 达到  $(9.37 \pm 0.33) \text{ mg/g}$ , 与对照组相比提高了 55.13%, 镧的最佳添加浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$ 。与镧处理多酚含量的变化趋势相反, 多酚含量随镧浓度的增加而逐渐增大,  $400, 600 \mu\text{mol/L}$  2种高浓度镧处理红松幼苗多酚含量最高, 且两者之间差异不显著, 多酚含量分别为  $(8.53 \pm 0.34)$ 、 $(8.38 \pm 0.25) \text{ mg/g}$ , 与对照组相比分别提高了 41.23% 和 38.74%, 因此镧的最佳添加浓度为  $400 \mu\text{mol/L}$ 。

相关研究表明, 稀土元素镧可以作为诱导子提高红豆杉 (*Taxus spp*) 细胞中紫杉醇含量, 还可以促进雪莲细胞 (*Saussurea medusa Maxim.*) 的生长和黄酮类化合物的积累; 低剂量镧对甘草 (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*) 愈伤组织生物量积累和类黄酮类化合物的生物合成具有明显的促进作用<sup>[18-20]</sup>。

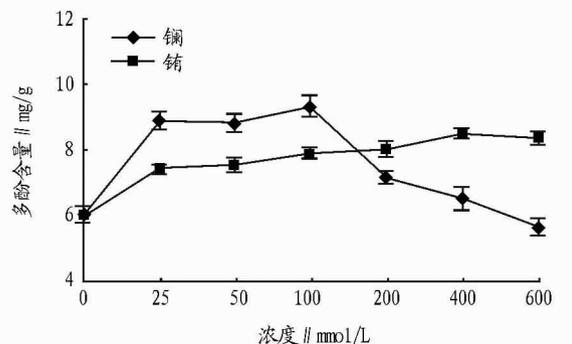


图6 稀土元素对红松不定芽中多酚含量的影响

## 2.2 Plackett-Burman 试验设计确定关键影响因素

**2.2.1 Plackett-Burman 试验设计处理及相应值。**通过8种不同诱导子对红松不定芽中多酚含量的单因素影响试验, 发现除了肉桂酸降低多酚含量, 其他7种诱导子都能在不同程度提高多酚含量, 并且筛选出最佳的诱导浓度。在此基础上, 首先采用 Plackett-Burman 设计法, 筛选7种诱导子因素中影响多酚合成的主要因素。Plackett-Burman 试验设计及相应值见表1。

**2.2.2 关键影响因素的确定。**采用 minitab15 对数据进行回归分析, 以多酚含量为响应值, 最优回归方程为:

$$Y = 6.2923 + 0.1892A - 0.2665B - 0.1580C + 0.0170D + 0.0080E - 0.2965F + 0.2218G$$

表1 Plackett-Burman 试验设计及相应值

试验编号	A(苯丙氨酸) mmol/L	B(镧) μmol/L	C(钨) μmol/L	D(水杨酸) μmol/L	E(酵母提取物) mg/L	F(壳聚糖) mg/L	G(茉莉酸甲酯) μmol/L	多酚含量 mg/g
1	2	50	400	20	50	100	10	7.067
2	2	100	200	40	50	100	5	6.793
3	1	100	400	20	100	100	5	5.559
4	2	50	400	40	50	200	5	5.834
5	2	100	200	40	100	100	10	6.580
6	2	100	400	20	100	200	5	5.715
7	1	100	400	40	50	200	10	5.601
8	1	50	400	40	100	100	10	7.030
9	1	50	200	40	100	200	5	6.018
10	2	50	200	20	100	200	10	6.900
12	1	100	200	20	50	200	10	5.907
13	1	50	200	20	50	100	5	6.504

该回归方程的标准偏差为 0.333 031, 预测误差平方和为 3.992 74, 回归方程的系数 ( $R^2$ ) 为 0.879 3, 调整后  $R^2$  为 0.668 0, 说明该回归模型在整个回归区域拟合度很好, 回归方程显著 ( $P < 0.05$ ), 具有统计学意义 (表 2)。由偏回归系数、显著性检验得到 7 种诱导子因素影响多酚含量的显著性大小, 依次为壳聚糖 > 镧 > 茉莉酸甲酯 > 苯丙氨酸 > 钨 > 水杨酸 > 酵母提取物。确定影响多酚含量的前 3 种关键影响因子为壳聚糖、镧、茉莉酸甲酯。其中, 壳聚糖和镧是负效应, 随着浓度的增加, 多酚含量下降; 茉莉酸甲酯为正效应, 随着浓度的增加, 多酚含量下降, 即适当地降低壳聚糖、镧的浓度和提高茉莉酸甲酯浓度, 可以进一步提高多酚含量。在下一步响应面分析中, 重点研究壳聚糖、镧、茉莉酸甲酯三者的最优水平范围。

表2 偏回归系数及显著性检验

因素	效应	系数	回归相系数 标准差	T 值	P 值	排序
A	0.378 3	0.189 2	0.096 14	1.97	0.120	4
B	-0.533 0	-0.266 5	0.096 14	-2.77	0.050	2
C	-0.316 0	-0.158 0	0.096 14	-1.64	0.176	5
D	0.034 0	0.017 0	0.096 14	0.18	0.868	6
E	0.016 0	0.008 0	0.096 14	0.08	0.938	7
F	-0.593 0	-0.296 5	0.096 14	-3.08	0.037	1
G	0.443 7	0.221 8	0.096 14	2.31	0.082	3
常数项		6.292 3	0.096 14	65.45	0.000	

## 2.3 响应面优化试验

**2.3.1 Box-Behnken 试验设计与分析。**利用 Minitab15 软件, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 在 Plackett-Burman 试验基础上对壳聚糖浓度、镧浓度、茉莉酸甲酯浓度 3 个因素设计三因素三水平响应面分析试验。响应面优化工艺试验中心组合设计及结果如表 3、4 所示。

通过回归拟合, 多酚含量与壳聚糖、镧、茉莉酸甲酯浓度之间的关系可用下列回归方程来表示:

$$Y = 13.991 0 - 0.238 0A + 0.656 4B + 1.433 4C - 3.122 6A^2 - 1.411 9B^2 - 2.177 9C^2 + 0.174 0AB - 0.198 0AC - 0.080 8BC$$

回归  $F$  值为 8.55, 多元相关系数 ( $R^2$ ) 为 93.90%, 调整

表3 Box-Behnken 试验设计及试验数据

序号	壳聚糖 mg/L	镧 μmol/L	茉莉酸甲酯 μmol/L	多酚含量 mg/g
1	70	30	15	9.040
2	90	30	15	8.034
3	70	50	15	10.531
4	90	50	15	10.221
5	70	40	10	7.798
6	90	40	10	7.900
7	70	40	20	9.877
8	90	40	20	9.187
9	80	30	10	7.902
10	80	50	10	8.850
11	80	30	20	12.114
12	80	50	20	12.739
13	80	40	15	13.044
14	80	40	15	14.266
15	80	40	15	14.663

表4 不同诱导子诱导效果的对比

诱导子类型	多酚含量//mg/g	多酚提高率//%
壳聚糖	9.91 ± 0.38	66.07
镧	9.37 ± 0.33	55.13
茉莉酸甲酯	10.88 ± 0.24	80.13
壳聚糖 + 镧 + 茉莉酸甲酯	13.42 ± 0.29	100.19

$R^2$  为 82.91%,  $P$  值为 0.015, 失拟检验  $P = 0.407 > 0.05$ , 不显著, 表明该模型与试验数据高度拟合, 试验方案合理, 因此可用该回归方程对 3 种诱导子促进红松多酚合成的优化组合条件进行预测。对多酚含量的影响达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ):  $C$  (茉莉酸甲酯)、 $A^2$  (壳聚糖二次项)、 $C^2$  (茉莉酸甲酯二次项), 对多酚含量的影响达到显著水平 ( $P < 0.05$ ):  $B^2$  (镧的二次项)。这表明试验因子与响应值之间不是单一的线性关系, 影响因子一次项不及二次项影响显著。3 种因素对多酚含量的影响大小依次为茉莉酸甲酯 > 镧 > 壳聚糖。

由图 7 可知, 茉莉酸甲酯对多酚含量的影响最显著, 曲面坡度较陡峭, 茉莉酸甲酯的最佳浓度在 15 μmol/L 左右; 而壳聚糖浓度和镧浓度对多酚含量的影响次之, 两者最佳浓

度响应值分别在 80 mg/L 和 15  $\mu\text{mol/L}$  左右。

**2.3.2 促进红松多酚合成的最佳工艺条件的确定。**根据回归方程分析得到最优变量值为  $A = -0.0423$ 、 $B = 0.2205$ 、 $C$

$= 0.3269$ , 换算成实际对应的最佳条件为: 壳聚糖浓度 79.58 mg/L、铜浓度 42.21  $\mu\text{mol/L}$ 、茉莉酸甲酯浓度 16.63  $\mu\text{mol/L}$ , 在此条件下回归模型预测多酚含量最高可达 14.28 mg/g。

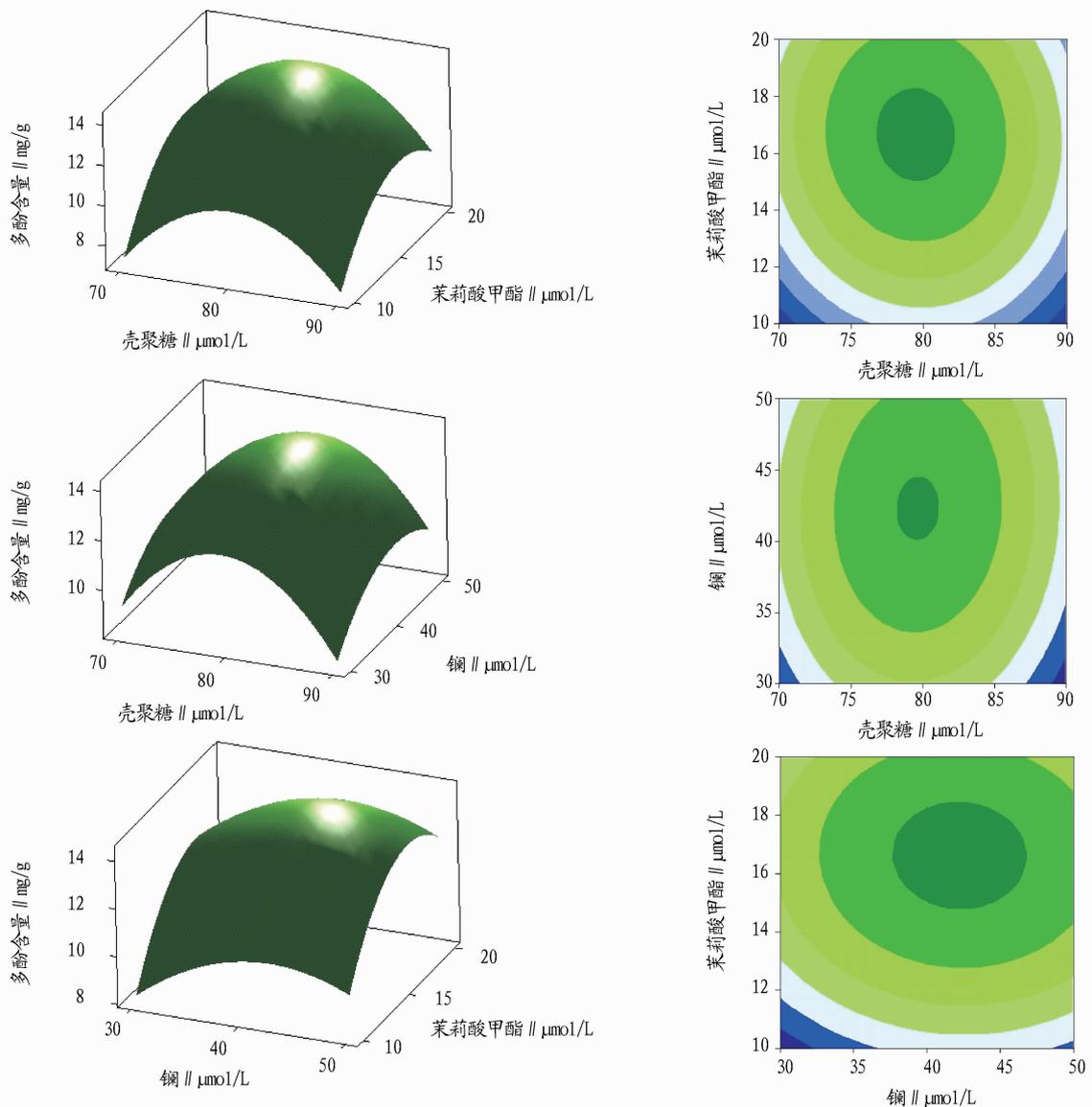


图7 影响多酚含量各因素交互作用影响的响应面图和等值线图

**2.3.3 回归模型的验证。**考虑到实际操作的可行性,将红松多酚合成的优化条件在回归方程得到的理论值基础上修正为壳聚糖浓度 80 mg/L、铜浓度 42  $\mu\text{mol/L}$ 、茉莉酸甲酯浓度 17  $\mu\text{mol/L}$ ,在此条件下进行 3 组平行试验,多酚的平均含量为 13.42 mg/g,相对误差为 6.02%,略低于预测值。通过壳聚糖 + 铜 + 茉莉酸甲酯协同组合,与 3 种单一诱导子的诱导效果进行比较。由表 4 可知,壳聚糖 + 铜 + 茉莉酸甲酯协同作用更有利于红松不定芽中多酚含量的提高,对多酚合成的促进效果最佳。

### 3 结论

该研究选取 8 种诱导子,研究对红松不定芽中多酚合成的影响,其中苯丙氨酸和肉桂酸属于前体物质,茉莉酸甲酯和水杨酸属于植物激素,壳聚糖和酵母提取物属于生物诱导

子,铜和钼属于稀土元素。单因素试验结果表明,除了肉桂酸不能提高红松不定芽中多酚含量以外,其他 7 种诱导子都能在不同程度提高多酚含量,促进多酚合成。Plackett-Burman 试验结果显示,7 种诱导子因素影响多酚含量的显著性大小依次为壳聚糖 > 铜 > 茉莉酸甲酯 > 苯丙氨酸 > 钼 > 水杨酸 > 酵母提取物,确定影响多酚含量的 3 种关键因素为壳聚糖、铜、茉莉酸甲酯。通过对壳聚糖 - 铜 - 茉莉酸甲酯组合诱导条件进行 Box-Behnken Design 响应面优化试验,优化得到的最佳诱导条件为壳聚糖浓度 79.58 mg/L、铜浓度 42.21  $\mu\text{mol/L}$ 、茉莉酸甲酯浓度 16.63  $\mu\text{mol/L}$ ,预测多酚含量最高可达 14.28 mg/g,实际多酚含量为 13.42 mg/g,与对照组相比提高 122.19%。同时,3 种诱导子(壳聚糖 + 铜 +

(下转第 9306 页)

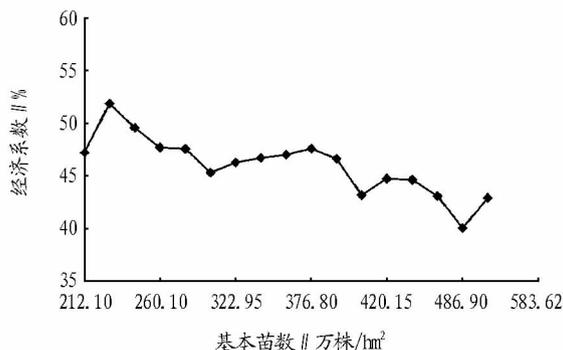


图8 经济系数随基本苗增加的变化情况

工精播,播种量为160.95~214.35 kg/hm<sup>2</sup>时产量较高。大面积晚播小麦因播种质量不高,实际播种量可增加至262.5 kg/hm<sup>2</sup>。从定点的基本苗数看,不同基本苗数处理对小麦产量影响不显著,基本苗数为255万、330万、435万、465万株/hm<sup>2</sup>时,均可实现0.75万 kg/hm<sup>2</sup>以上的产量,但产量构成因素差异较大。基本苗数较低的处理,群体发展缓慢,有效穗数适宜,粒数多、粒重高,易实现高产稳产;基本苗数较高的处理,群体发展迅速,有效穗数偏多,粒数少、粒重低,个体生产潜力得不到有效发挥,高产不稳产,目前大面积晚播小麦就是走的这条栽培途径。基本苗数为260.10万、322.95万株/hm<sup>2</sup>时,高峰苗767.10万、750万株/hm<sup>2</sup>,有效穗数533.55万、481.20万穗/hm<sup>2</sup>,茎蘖成穗率69.6%、64.16%,每

穗结实粒数40.8、39.17粒,千粒重42、44 g,理论产量9 142.5、8 293.5 kg/hm<sup>2</sup>,实际产量7 903.95、7 535.40 kg/hm<sup>2</sup>。基本苗数为436.95万、466.95万株/hm<sup>2</sup>时,高峰苗977.10万、1 067.25万株/hm<sup>2</sup>,有效穗数680.40万、537.00万穗/hm<sup>2</sup>,茎蘖成穗率70.7%、50.3%,每穗结实粒数34.57、37.8粒,千粒重41、42 g,理论产量9 643.80、8 525.40 kg/hm<sup>2</sup>,实际产量8 537.55、9 470.95 kg/hm<sup>2</sup>。基本苗数为343.50、366.90、370.20万株/hm<sup>2</sup>时,有效穗数均达600万穗/hm<sup>2</sup>以上,说明基本苗数不宜超过375万株/hm<sup>2</sup>。综合多方面因素分析,晚播小麦基本苗数以255万~330万株/hm<sup>2</sup>为宜,不得超过375万穗/hm<sup>2</sup>。

#### 参考文献

- [1] 李荣刚,戴其根,皮家欢. 江苏太湖稻麦两熟地区生态、经济施氮量的初步研究[J]. 江苏农业研究,2000(2):30-35.
- [2] 曹志洪,朱永官,廖海秋,等. 苏南稻麦两熟制下土壤养分平衡与培肥的长期试验[J]. 土壤,1995(2):60-63,93.
- [3] 杨敏芳. 不同耕作措施与秸秆还田对稻麦两熟制农田土壤养分、微生物及碳库的影响[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [4] 陈文林. 稻麦两熟制不同耕作栽培方式对稻麦生产力的影响[D]. 扬州:扬州大学,2008.
- [5] 孙永健,周蓉蓉,王长松,等. 稻麦两熟农田土壤速效钾时空变异及原因分析——以江苏省仪征市为例[J]. 中国生态农业学报,2008(3):543-549.
- [6] 汪洪洋,徐宗进,张立智,等. 稻麦两熟农作制结构优化模式初探[J]. 安徽农学通报(上半月刊),2013(5):21-22,40.
- [7] 杨其光,黄义德,黄正来,等. 淮北地区稻麦连作节本高效配套技术研究[J]. 安徽农业科学,1999(6):537-539,542.
- [8] 董百舒,王振忠,许学前,等. 江苏稻麦两熟田稻季的合理耕作及轮耕制[J]. 耕作与栽培,1992(3):6-10.
- [9] gari,2005,53:433-437.
- [11] 王琪,严善春. 外源茉莉酸类化合物系统诱导红松酚酸含量变化[J]. 北京林业大学学报,2012,34(6):98-106.
- [12] 王春丽,梁宗锁,李殿荣,等. 茉莉酸甲酯和水杨酸对丹参幼苗中蔗糖代谢和酚酸类物质积累的影响[J]. 西北植物学报,2011,31(7):1405-1410.
- [13] KANATT S R, CHANDER R, SHARMA A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products[J]. Food Chemistry, 2008, 107:845-852.
- [14] BADAWY M E I, RABEA E I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 51:110-117.
- [15] KIM S K, RAJAPAJSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review[J]. Carbohydr Polym, 2005, 62:357-368.
- [16] SANCHEZ-SAMPEDRO M, FERNANDEZ-TARRAGO J, CORCHETE P. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119(1):60-69.
- [17] CHEN S, ZHAO B, WANG X, et al. Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(1):27-30.
- [18] WU J, WANG C, MEI X. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp* cell cultures by rare earth chemical lanthanum[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 85(1):67-73.
- [19] 袁晓凡,王谦,赵兵,等. 稀土元素对水母雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响[J]. 过程工程学报,2004,4(4):325-329.
- [20] 杨世海,刘晓峰,果德安,等. 稀土元素对甘草愈伤组织生长及黄酮类化合物含量的影响[J]. 中药材,2005,28(7):533-534.

(上接第9273页)

茉莉酸甲酯)协同组合比单一诱导子具有更佳的诱导多酚合成的效果。因此,利用诱导子之间的协同作用是一种有效的提高植物生产次生代谢产物合成能力的途径。

#### 参考文献

- [1] SOONG Y Y, BARLOW P J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds[J]. Food Chemistry, 2004, 88(3):411-417.
- [2] CHEW Y L, LIM Y Y, OMAR M, et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(6):1067-1072.
- [3] 孙立影,于志晶,李海云,等. 植物次生代谢物研究进展[J]. 吉林农业大学学报,2009,34(4):4-10.
- [4] BOSTOCK R M, LAINE R, KUC A. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acid in potato[J]. Plant Physiol, 1982, 70:1417-1424.
- [5] TAMARI G, BOROCHOV A, ATZORM R, et al. Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in petunia corollas: a possible role in wound response[J]. Physiol Plant, 1995, 94:45-50.
- [6] 肖春桥,高洪,池汝安. 诱导子促进植物次生代谢产物生产的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(5):473-476.
- [7] 中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院. GB/T8313-2008, 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [8] 诸姮,胡宏友,卢昌义,等. 植物体内的黄酮类化合物代谢及其调控研究进展[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2007,46(1):136-143.
- [9] 项雷文,郭丽梅. 前体物对粉葛细胞生长及次生代谢的影响[J]. 福建师大福清分校学报,2004(2):50-53.
- [10] HAYAT S, FARIDUDDIN Q, ALI B, et al. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings[J]. Acta Agronomi Hun-