

基于 PB-CCD 设计的桔梗种子预处理工艺

孙晓春¹, 李晓红², 胡坤霞², 唐志书¹

(1. 陕西中医药大学, 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712083;

2. 陕西中医药大学 药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:以桔梗种子为试材, 采用 Plackett-Burman-Central Composite Design(PB-CCD)设计优化桔梗种子预处理的工艺。以萌发率为指标, 采用 PB 设计试验, 研究浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度、预冻时间和料液比对桔梗种子萌发的影响; 采用 CCD 设计对筛选出的因素进一步优化, 确定桔梗种子预处理的最佳工艺。结果表明: 桔梗种子预处理的最佳工艺条件为浸泡时间 18 h, GA₃ 浓度 3 g · L⁻¹, 浸泡温度 27 ℃。利用该优化方案对桔梗种子进行预处理, 萌发率为 92.3%, 与模型预测基本一致, 表明优化的工艺条件有较高的可靠性。

关键词:桔梗种子; 萌发; Plackett-Burman 设计; Central Composite Design; 预处理

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)23-0153-04

桔梗(*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC)是我国传统常用中药材, 具有降血糖、降血压、抗肿瘤等功能^[1-3]; 由于桔梗腌制咸菜的风味独特, 是消费者非常喜欢的佐餐佳品。因此, 桔梗是一种药食兼用资源植物。环境恶化、人口激增造成了桔梗种质资源不可逆转的流失。如何保持桔梗优良种质资源的传承是目前研究方向之一。桔梗种子没有深度休眠的特性, 但在桔梗种子内部存在较高活性的内源抑制性物质, 影响种子的正常萌发, 因此可以通过引发处理, 使桔梗种子快速萌发^[4]。激素和植物生长调节剂处理种子可以提高种子活力, 促进萌发^[5-7]。该研究以桔梗为试材, 拟选用赤霉素浸种处理, 采用 Plackett-Burman-Central Composite Design (PB-CCD)设计^[8-9], 以萌发率作为考察指标, 优化桔梗种子预处理工艺, 以期提高桔梗种子的萌发率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桔梗种子购自安国中药材市场, 经陕西省中药资源产业化协同创新中心刘世军副教授鉴定为桔梗(*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC)的种子。

第一作者简介:孙晓春(1985-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事药用植物栽培与质量控制等研究工作。E-mail:sunxiaochun08@163.com

责任作者:唐志书(1972-), 男, 博士, 教授, 现主要从事中药高新技术制备研究和中药资源开发与应用等研究工作。E-mail:tzs6565@163.com

基金项目:陕西省教育厅科技研究计划资助项目(320104-203010018)。

收稿日期:2016-09-18

BP211D 电子天平(德国赛多利斯公司), MGC-350HP-2 人工智能培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), 赤霉素(西亚试剂)。

1.2 试验方法

1.2.1 桔梗种子萌发方法 选取籽粒饱满的桔梗种子 100 粒, 用不同浓度赤霉素(GA₃)溶液于一定温度浸泡一定时间, 取出, 在室温下自然晾干。将晾干后的种子接种在铺有双层滤纸的培养皿中进行萌发试验, 滤纸保持充分湿润, 每处理重复 3 次。萌发试验在人工智能培养箱中 25 ℃恒温光照 12 h 进行培养^[7]。于第 10 天统计发芽率。发芽率(%)=第 10 天发芽种子数/供试种子数×100。

1.2.2 Plackett-Burman 试验设计 选择 5 个影响种子萌发的因素, 分别为浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度、预冻时间和料液比, 每个因素设定最低水平和最高水平, Plackett-Burman 设计因素和水平如表 1 所示, 试验设计方案见表 2。根据表 2 设计方案进行种子萌发试验, 统计萌发率。

1.2.3 Central Composite Design 试验设计及结果 在 Plackett-Burman 设计结果的基础上, 以 Central Composite

表 1 因素与水平

影响因素	最低限	最高限
Impact factor	Low level/-1	High level/+1
A: 浸泡时间/h	0	24
B: 浸泡温度/℃	20	40
C: GA ₃ 浓度/(g · L ⁻¹)	0	4
D: 预冻时间/d	0	7
E: 料液比/(g · L ⁻¹)	1	3

表 2 Plackett-Burman 试验设计

Table 2 Plackett-Burman experiment design

序号 Number	A: 浸泡时间 Soak time /h	B: 浸泡温度 Soak temperature /℃	C: GA ₃ 浓度 GA ₃ concentration /(g·L ⁻¹)	D: 预冻时间 Pre-freezing time/d	E: 料液比 Ratio of liquid-solid /(g·L ⁻¹)
1	0	40	4	7	1
2	0	20	0	0	1
3	24	20	4	7	3
4	24	40	0	0	1
5	0	40	4	0	3
6	0	20	0	7	1
7	24	40	4	0	1
8	0	40	0	7	3
9	24	20	4	7	1
10	0	20	4	0	3
11	24	20	0	0	3
12	24	40	0	7	3

Design(CCD)响应曲面法对萌发率具有显著性影响的因素进行寻优,以确定最优的参数设置。

1.3 数据分析

采用 Design-Expert version 8.0.7 统计软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验结果及分析

由表 3 可知,采用 Design-Expert version 8.0.7 统计软件进行 ANOVA 方差分析,由分析结果(表 4)可知,浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度的 *P* 值分别为 0.048 4、0.029 1、0.034 4,均小于 0.05,说明浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度对桔梗种子萌发率的提高具有显著性影响。根据各影响因子对各响应因子的 ANOVA 分析结合最大值运算结果,将影响不显著的影响因子进行最大值预测并结合实际情况作为固定条件,即桔梗种子不作预冻处理,浸种料液比为 1:1 g·L⁻¹。

表 3 Plackett-Burman 响应因子结果

Table 3 Response results from Plackett-Burman design

序号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
萌发率 Germination rate/%	83	82	90	60	80	76	70	83	83	84	76	70

表 4 ANOVA 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance result

变异源 Source	自由度 df	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
模型 Model	5	0.012	5.88	0.026 0
A: 浸泡时间 Soak time	1	0.013	6.11	0.048 4
B: 浸泡温度 Soak temperature	1	0.017	8.13	0.029 1
C: GA ₃ 浓度 GA ₃ concentration	1	0.015	7.43	0.034 4
D: 预冻时间 Pre-freezing time	1	0.009	4.37	0.081 5
E: 料液比 Ratio of liquid-solid	1	0.007	3.38	0.115 7

2.2 Central Composite Design 试验设计及结果

采用 Design-Expert version 8.0.7 软件设计优化试验,CCD 影响因素水平设计如表 5 所示。根据表 5 设计

的三因素五水平安排响应面正交试验,以萌发率作为评价指标。响应面法试验设计及结果如表 6 所示,根据表 6 结果进行效应面图和等高线图的绘制。由图 1 可知,响应面均为开口向下的凸形曲面,说明响应值存在极高值,且最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。图 1 中等高线中的最小椭圆的中心点即是响应面的最高点。此外,等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。由等高线图可知,赤霉素浓度和浸泡温度的交互作用显著,而浸泡温度和浸泡时间以及浸泡时间和赤霉素浓度的交换作用较弱。各影响因素和响应值构成三维空间的曲面图和二维平面上的等高线图能够较为直观地反映出各因素的相互作用及桔梗种子萌发率的影响。

表 5 CCD 影响因子水平设计

Table 5 CCD Elements factors

影响因素 Impact factor	A: 浸泡时间 Soak time /h	B: GA ₃ 浓度 GA ₃ concentration /(g·L ⁻¹)	C: 浸泡温度 Soak temperature /℃
水平 Level/-1.68	1.2	0.0	20
水平 Level/-1	7.0	1.0	25
水平 Level/0	15.5	2.5	33
水平 Level/+1	24.0	4.0	40
水平 Level/+1.68	30.0	5.0	45

表 6 响应面法试验结果

Table 6 Central Composite Design result

序号 Number	A: 浸泡时间 Soak time /h	B: GA ₃ 浓度 GA ₃ concentration /(g·L ⁻¹)	C: 浸泡温度 Soak temperature /℃	萌发率 Germination rate /%
1	7.0	4.0	25	82
2	15.5	2.5	33	85
3	24.0	1.0	40	69
4	24.0	4.0	25	85
5	24.0	1.0	25	75
6	15.5	0.0	33	67
7	7.0	1.0	40	68
8	24.0	4.0	40	65
9	7.0	1.0	25	58
10	7.0	4.0	40	68
11	15.5	2.5	33	86
12	15.5	2.5	33	91
13	15.5	2.5	33	94
14	15.5	2.5	33	92
15	15.5	2.5	33	94
16	15.5	5.0	33	78
17	30.0	2.5	33	84
18	15.5	2.5	20	83
19	15.5	2.5	45	65
20	1.2	2.5	33	67

2.3 回归模型的建立与验证分析

利用 Design-Expert version 8.0.7 统计软件对表 7 数据进行二次多项回归拟合,以浸泡时间 A、赤霉素浓度 B、浸泡温度 C 为自变量,种子萌发率为因变量,获得桔梗种子萌发的回归模型。 $Y = -118.125\ 15 + 4.653\ 96A + 33.661\ 22B + 8.237\ 72C - 0.176\ 47AB - 0.043\ 137AC - 0.422\ 22BC - 0.077\ 725A^2 - 2.967\ 23B^2 - 0.109\ 26C^2$ 。

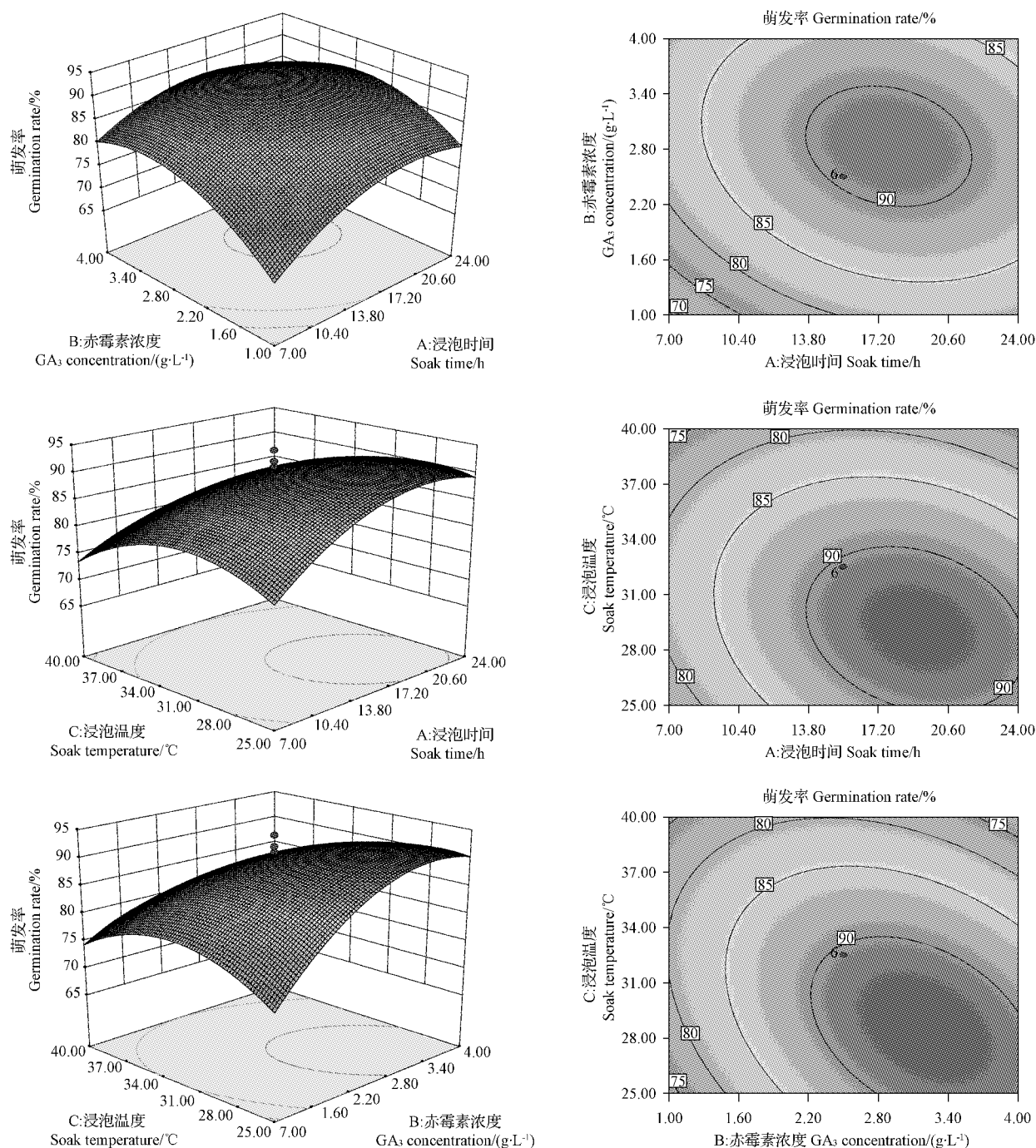


图1 效应面图和等高线图

Fig. 1 Response surface plot (3D surface and contour)

对回归方程进行方差分析,结果如表7所示。回归方程中各变量对响应值的显著性由 F 检验来确定。 $P < 0.05$ 表示具有显著性影响, $P < 0.01$ 表示具有极显著性影响。各因素中, A 、 B 、 C 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对萌发率的影响极显著,交互项中 BC 具有显著性影响, AB 和 AC 无显著性影响($P > 0.05$)。失拟项 P 值为0.622 1,表明失拟项相对于绝对误差是不显著的,说明该回归方程对试验拟合情况较好。

根据CCD响应因子结果及实际情况确定桔梗种子处理条件为浸泡时间18 h, GA_3 浓度 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,浸泡温度 27°C ,萌发率理论值为93.1%。在浸泡时间、 GA_3 浓度、浸泡温度为最佳条件,进行3次重复试验验证结果。3次重复试验桔梗种子萌发率分别为91%、93%和93%,均值为92.3%,预测值为93.1%,相对误差为0.82%,证明了回归模型较为准确可靠,达到了优化桔梗种子预处理条件的目的。

表 7 ANOVA 方差分析结果

Table 7 Analysis of variance result

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
模型 Model	2 250.17	9	250.02	18.52	<0.000 1
A, 浸泡时间 Soak time	158.94	1	158.94	11.77	0.005 4
B ₁ 赤霉素浓度 GA ₃ concentration	172.24	1	172.24	12.76	0.005 1
C, 浸泡温度 Soak temperature	266.00	1	266.00	19.70	0.001 3
AB	40.50	1	40.50	3.00	0.114 0
AC	60.50	1	60.50	4.48	0.060 4
BC	180.50	1	180.50	13.37	0.004 4
A ²	454.46	1	454.46	33.66	0.000 2
B ²	642.35	1	642.35	47.57	<0.000 1
C ²	544.35	1	544.35	40.31	<0.000 1
残差 Residual	135.03	10	13.50		
失拟项 Lack of fit	57.70	5	11.54	0.75	0.622 1
误差项 Pure error	77.33	5	15.47		
总差 Cor total	2 385.20	19			

3 讨论与结论

引发处理在提高种子活力方面的研究有很多,可以显著提高种子的发芽率和幼苗的活力,增强种子萌发过程中的呼吸速率提高种子的田间出苗率及幼苗的抗性能力^[10-11]。赤霉素是植物生长发育过程中的一种重要调节物质,在植物生长发育中起着重要作用,并且具有促进种子萌发的作用^[10],该研究采用赤霉素对桔梗种子进行浸种处理,优化预处理工艺。响应面分析法^[12]是一种较有效的数学统计方法,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,试验次数相对较少,周期较短,求得的回归方程精度较高。该研究采用 PB-CCD 设计,以萌发率作为考察指标,优化桔梗种子前处理工艺。通

过 PB 设计对种子前处理的 5 个因素(浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度、预冻时间和料液比)进行考察,筛选出 3 个对桔梗种子萌发率具有显著影响的因素:浸泡时间、浸泡温度、GA₃ 浓度,通过 CCD 设计对筛选出的因素进行进一步优化,确定桔梗种子前处理的最佳工艺:浸泡时间 18 h,GA₃ 浓度 3 g · L⁻¹,浸泡温度 27 ℃。

参考文献

- [1] ZHANG L, WANG Y L, YANG D W, et al. *Platycodon grandiflorus*: An Ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 147-161.
- [2] 郭丽, 张村, 李丽, 等. 中药桔梗的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(3): 181-185.
- [3] 金欣, 陈勤. 桔梗的药理作用研究新进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2015, 29(2): 79-82.
- [4] 杨美全, 曾维群, 罗建, 等. 桔梗种子生物学特性研究[J]. *基层中医杂志*, 1994, 8(1): 16-17.
- [5] 田洪岭, 胡侃, 郭淑红, 等. 不同预处理对远志种子萌发的影响[J]. *中国现代中药*, 2011, 13(1): 18-20.
- [6] 于玲, 钟原, 王莹, 等. 低温和赤霉素对紫斑牡丹种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(4): 120-126.
- [7] 谭玲玲, 胡正海. 不同处理对桔梗种子萌发特性的影响[J]. *种子*, 2014, 33(7): 15-18.
- [8] 孙晓春, 刘妍如, 黄文静, 等. 基于 PB-CCD 设计的丹参提取工艺的研究及主要成分含量测定[J]. *中南药学*, 2015, 13(12): 1237.
- [9] 徐璐, 汪涛, 郭巧生, 等. 响应面法优化超声辅助法提取昆仑雪菊色素的工艺研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(24): 4792.
- [10] 赵冰. 光照时间和赤霉素浓度对太白杜鹃种子萌发的影响[J]. *北方园艺*, 2014(2): 60-63.
- [11] 张承, 龙友华, 和桂秋, 等. 生长调节剂浸种对桔梗种子萌发及生长的影响[J]. *中药材*, 2015, 38(1): 21-24.
- [12] 刘丹, 何凤军, 刘长龙, 等. 响应面法优选妇科 IV 颗粒一步制粒工艺[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(4): 75-82.

Optimization of Pretreatment Method of *Platycodon grandiflorus* Seeds Based on PB-CCD Design

SUN Xiaochun¹, LI Xiaohong², HU Kunxia², TANG Zhishu¹

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese medicine Foundation Research, Xianyang, Shaanxi 712083; 2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046)

Abstract: *Platycodon grandiflorus* seeds were used as test materials, the pretreatment method was optimized by Plackett-Burman-Central Composite Design(PB-CCD). With the seed germination rate as evaluation indexes, the impact of soak time, soak temperature, GA₃ concentration, pre-reezing time and solid-liquid ratio on germination rate were analyzed by PB design, and the factors which had significant effect on germination were selected for further optimization based on CCD design. The results showed that the optimum condition of pretreatment of *Platycodon grandiflorus* seeds was soak 18 hours at 27 ℃ with 3 g · L⁻¹ GA₃. Seed germination rate was 92.3% at the optimum model, it indicated that the model was highly predictive and reliable.

Keywords: *Platycodon grandiflorus* seeds; germination; Plackett-Burman design; Central Composite Design; pretreatment