

不同激素及微量元素处理对斑兰叶组培苗增香的影响

李有丽^{1,5}, 吉训志^{1,2,3,4}, 秦晓威^{1,2,3,4*}, 鱼欢^{1,2,3}, 张昂^{1,2,3}, 宗迎^{1,2,3},
贺书珍^{1,2,3}

1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 2. 农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533; 3. 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 571533; 4. 海南省 Sim Soonliang 院士工作站, 海南万宁 571533; 5. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665000

摘要: 以斑兰叶组培苗为材料, 为探明最适宜斑兰叶增香的施肥配方, 研究不同激素、微量元素对斑兰叶组培苗增香的影响。采用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 对斑兰叶的挥发性香气成分进行鉴定分析, 并对结果进行主成分分析及聚类热图分析。结果显示: 7 个不同处理的斑兰叶组培苗挥发性成分种类组成无显著差异, 但挥发性成分含量差异显著 ($P < 0.05$)。共分析鉴定出 21 种化合物, 主要由醇类、吡咯类、酯类、酮类、呋喃类、呋喃酮类、酸类、烯烃类、酚类组成, 其中角鲨烯、叶绿醇、2-乙酰-1-吡咯啉 (2AP)、新植二烯、3-甲基-2-(5H)-呋喃酮、2,3-二氢苯并呋喃为主要香气挥发性成分。斑兰叶组培苗特征香气成分 2AP 平均含量为 $(48.07 \pm 13.14) \mu\text{g/g}$, 其中处理 6 (锌+组合肥) 的 2AP 含量最高, 为 $72.03 \mu\text{g/g}$; 处理 1 (IBA+锌+组合肥) 2AP 含量最低, 为 $31.96 \mu\text{g/g}$, 表明处理 6 能显著提高特征性物质 2AP 的含量。主成分分析表明, 施用组合肥 (碳酸氢铵+过磷酸钙+氯化钾) 与施用清水存在较大差异, 并且处理 2、处理 6 中主要挥发性成分为叶绿醇、2AP、3-甲基-2(5H)-呋喃酮、2,3-二氢苯并呋喃、新植二烯; 处理 1、处理 5 中挥发性成分主要以油酸乙酯为主的酯类、2,4-叔丁基苯酚为主的酚类、丙酮醇为主的酮类等化合物; 处理 3、处理 4、处理 7 中挥发性物质主要以角鲨烯为主。通过聚类分析发现, 处理 6 (锌+组合肥) 中斑兰叶组培苗的挥发性香气成分均有较高的积累; 而处理 1 (IBA+锌+组合肥) 中挥发性物质含量较少; 其余处理对斑兰叶组培苗主要挥发性香气成分的影响较小。研究表明: 采用硫酸锌浸泡和配施碳酸氢铵+过磷酸钙+氯化钾溶液优于其他处理组, 有较好的增香效果。

关键词: 斑兰叶; 挥发性成分; 2-乙酰-1-吡咯啉; 激素; 微量元素

中图分类号: S573.9 文献标识码: A

Effects of Different Hormones and Trace Elements on Increasing Aroma of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. Plantlets *in vitro*

LI Youli^{1,5}, JI Xunzhi^{1,2,3,4}, QIN Xiaowei^{1,2,3,4*}, YU Huan^{1,2,3}, ZHANG Ang^{1,2,3}, ZONG Ying^{1,2,3}, HE Shuzhen^{1,2,3}

1. Spice and Beverage of Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 2. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China; 3. Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 571533, China; 4. Hainan Provincial Sim Soonliang Academician Workstation, Wanning, Hainan 571533, China; 5. Tropical Crop College, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665000, China

Abstract: In this experiment, *Pandanus amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro* were used as detected material. In order to investigate the most suitable fertilization formula for increasing aroma of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro*. And the volatile components of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro* were separated and identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the results were analyzed by principal component analysis (PCA) and

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-08-31

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 322QN403); 科技部、财政部国家科技资源共享服务平台 (No. NPGRC 2022-014)。

作者简介 李有丽(2000—), 女, 本科生, 研究方向: 热带作物组织培养。*通信作者 (Corresponding author): 秦晓威 (QIN Xiaowei), E-mail: qin_xiaowei@163.com。

cluster heatmap analysis. The results showed that the volatile components were similar in seven different treatments, but their volatile contents were different greatly ($P < 0.05$). A total of 21 volatile components were detected, including alcohols, pyrroles, esters, ketones, furans, furans, acids, olefins and phenols, and squalene, phytol. Among them 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), neophytadiene, 3-methyl-2-(5H)-furanone, 2,3-dihydrobenzofuran were the main volatile components. The average content of the characteristic aroma component 2AP were $(48.07 \pm 13.14) \mu\text{g/g}$ of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro*, and the treatment 6 (zinc+fertilizer combinations) was highest to $72.03 \mu\text{g/g}$; however the treatment 1 (IBA+zinc+fertilizer combinations) was the lowest to $31.96 \mu\text{g/g}$, and the treatment 6 could significantly increase the content of the characteristic aroma component 2AP. The results of principal component analysis showed significant difference between the fertilizer combinations treatment (ammonium bicarbonate + calcium superphosphate+potassium chloride) and the water treatment, and the main volatile components of the treatment 2 and the treatment 6 were phytol, 2AP, 3-methyl-2-(5H)-furanone, 2,3-dihydrobenzofuran, neophytadiene; and the main volatile components of the treatment 1 and the treatment 5 were ethyl oleate-based esters, 2,4-di-tert-butylphenol-based phenols, acetol-based ketones. The volatile components were mainly squalene in the treatment 3, treatment 4 and treatment 7. Cluster analysis showed that higher volatile component in the treatment 6 (zinc+fertilizer combinations), and the volatile component were significantly lower in the treatment 1 (IBA+zinc+fertilizer combinations). There were no obviously differences in other treated groups. The conclusion indicated that zinc sulfate immersion and ammonium bicarbonate+calcium superphosphate+potassium chloride fertilizer can improve aroma than other groups.

Keywords: *Pandanus amaryllifolius* Roxb.; volatile components; 2-acetyl-1-pyrroline; hormones; trace elements

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.010

斑兰叶, 学名香露兜 (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), 别称香兰叶、板兰叶、七兰叶、碧血树等, 是露兜树科 (Pandanaceae) 露兜属 (*Pandanus*) 的一种多年生热带园艺作物^[1], 也是露兜树科中唯一叶片带有芳香气味的植物, 被誉为“东方人的香草”, 其叶片中主要特征挥发性物质为 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-acetyl-1-pyrroline, 2AP), 能散发出一种特殊香气——粽香^[2-4]。近年来, 斑兰叶作为一种新兴农业逐渐走入大众视野, 在海南是一种能与槟榔、椰子、橡胶“三棵树”林下复合种植的优势作物^[5]。斑兰叶叶片中含有的较多角鲨烯、叶绿醇、亚油酸、草蒿脑等活性物质, 具有降低血压血脂、杀菌、退热、抗抑郁、驱虫、增强细胞的活力及免疫力等作用^[6-7], 在市场上有很大的利用价值与开发前景。

斑兰叶的繁殖主要通过茎蔓扦插繁育和根蘖繁殖, 其中根蘖苗繁殖具有简单易行、繁育速度快、繁殖系数大、保持优良性状等优点^[8]。但是组培苗炼苗移栽作为斑兰叶组织培养最后的关键环节, 该时期内, 组培苗对环境格外敏感, 移栽苗质量和栽培管理措施对后期植株的成活及产量产生直接影响, 因此提高组培苗质量至关重要。激素在植物生长发育和胁迫反应中发挥着重要作用。据相关研究表明, NAA 和 IBA 被广泛应用并且在培养基中添加可以促进植物壮苗生根^[9-10]。同时, 鱼欢等^[11]、谭明欣等^[12]也进一步表明适宜

的 IBA 浓度和处理时间可以促进根蘖苗生根及干物质积累。此外, 微量元素对香稻香气浓度有直接影响, 其中锌作为一些酶的组成成分, 是影响香稻香气形成的重要元素^[13]。镧作为稀土元素之一, 对生命活动有重要的调节作用。黄锦霞等^[14]研究表明, 基施锌肥能显著增加不同品种香稻籽粒 2-AP 含量。在基肥施用氯化锌、氯化镧或齐穗期喷施氯化锌能显著或极显著地提高香稻培杂软香和桂香占糙米的香气含量^[15]。并且施用碳酸氢铵+过磷酸钙+氯化钾能显著提高香稻籽粒 2AP 含量^[16]。以上研究主要针对香稻。然而目前有关斑兰叶的研究主要集中于斑兰叶组培快繁技术、挥发性成分的分析鉴定与评价等方面^[17-22], 有关栽培管理措施对斑兰叶香气品质影响等方面的研究较少。因此为探究不同激素和微量元素处理对斑兰叶移栽成活率和香气的影响, 本研究在培育斑兰叶组培苗的基础上, 通过施用不同类型的肥料, 初步探讨 NAA、IBA、锌元素、镧元素、复合肥 (碳酸氢铵+过磷酸钙+氯化钾) 与斑兰叶组培移栽苗挥发性香气成分之间的变化趋势, 并筛选出最佳的施肥配方, 以期对斑兰叶组培苗的大规模炼苗移栽和增香提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所选试验材料由中国热

带农业科学院香料饮料研究所组织培养室提供，所选取的斑兰叶培养条件、形状大小基本一致，具有 6~10 cm 完整根系和 2~6 片开展叶。

1.1.2 试剂 无水乙醇、无水硫酸钠为分析纯，购自西陇科学股份有限公司；硫酸锌、氯化镧、碳酸氢铵、过磷酸钙、氯化钾购自西陇科学股份有限公司；2AP、叶绿醇、角鲨烯标准品购自上海源叶生物科技有限公司；C₇~C₄₀正构烷烃混标标准品为色谱纯，购自上海安谱实验科技有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备 Aglient-7890B/5977B 气相色谱-质谱联用仪（美国安捷伦公司）；S600 超声波清洗机（东莞市墨洁超声波设备有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验地点位于中国热带农业科学院香料饮料研究所 3 号大棚（18°15'N，110°13'E）。采用盆栽试验，共设 7 个处理，每处理重复 10 次。将组培苗根部按不同试验设计方案（表 1）浸泡 1 d 后，用喷壶保证叶片湿润，置于 25~28 °C 温度下炼苗，炼苗完成后移栽至装有基质的花盆中，保证基质湿度在 80%~85% 之间，待基质湿度降低时，浇灌不同处理的溶液保持基质湿度在 70%~80% 之间，培养 2 个月后，待测。

表 1 斑兰叶组培苗不同激素及微量元素处理

Tab. 1 Different hormone and trace element treatments of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro*

处理 Treatment	浸泡溶液 Soaking solution	浇灌溶液 Irrigation solution
T ₁	10 mg/L IBA+50 mg/L 硫酸锌	1%碳酸氢铵+0.5%过磷酸钙+1%氯化钾
T ₂	纯净水	1%碳酸氢铵+0.5%过磷酸钙+1%氯化钾
T ₃	10 mg/L NAA+50 mg/L 氯化镧	1%碳酸氢铵+0.5%过磷酸钙+1%氯化钾
T ₄	10 mg/L IBA +50 mg/L 硫酸锌	水
T ₅	10 mg/L IBA	1%碳酸氢铵+0.5%过磷酸钙+1%氯化钾
T ₆	50 mg/L 硫酸锌	1%碳酸氢铵+0.5%过磷酸钙+1%氯化钾
T ₇	纯净水	水

1.2.2 样品预处理 采摘不同处理的斑兰叶后，用浸湿无水乙醇的纱布擦净叶面杂质，分别称取 4 g 剪碎的斑兰叶于 50 mL 的离心管中，加入 12 mL 的无水乙醇并用玻璃棒使样品浸没，在 400 W、40 KHz、50 °C 下超声萃取 60 min，吸取萃取液，无水硫酸钠干燥后，经 0.22 μm 有机相

针式过滤器（尼龙）过滤至进样瓶中，于 4 °C 冰箱保存待测。

1.2.3 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 测定 色谱条件：DB-WAX（30 m×0.25 mm×0.25 μm）弹性石英毛细管柱，进样口温度 250 °C，初始温度 50 °C，保持 2 min，以 5 °C/min 升温至 100 °C，然后以 6 °C/min 升温至 250 °C，保持 5 min，载气为高纯氦气（99.999%），流量 1 mL/min，不分流进样。质谱条件：离子源为 EI；电离能量 70 eV；离子源温度 230 °C；四极杆温度 150 °C，进样口温度 250 °C，扫描质量范围 30~450 amu。

1.2.4 挥发性成分定性分析 结合质谱和保留指数 (retention index, RI) 对斑兰叶挥发性香气成分进行定性，其中质谱分析结果在 NIST2017 谱库进行检索，比对定性；并且使用 C₇~C₄₀ 正构烷烃混标，以相同条件进行 GC-MS 分析，利用其保留时间按照线性方程计算各挥发性成分的保留指数 (RI) [23]，参照文献定性分析。

1.2.5 挥发性成分定量分析 精密吸取 2-乙酰-1-吡咯啉标准品、叶绿醇标准品、角鲨烯标准品以及甲醇按照 50、100、150、300、500 μg/mL 的溶液浓度梯度分别进行配置，按照样品的色谱条件，标准品梯度浓度由低到高的顺序依次进样，每个浓度进样 3 次，以各组分梯度浓度为横坐标，3 次测定峰面积的平均值为纵坐标，得到各组分的定量线性关系。利用峰面积按照线性方程计算 2AP、叶绿醇、角鲨烯含量，同时再根据 2AP 含量对其他香气物质进行半定量 [24]。计算公式：

$$X_i = (A_i/A_s) \times C_s$$

式中，X_i 为待测物质含量；A_i 为待测物的峰面积；A_s 为 2AP 的峰面积；C_s 为样品中 2AP 含量。

1.3 数据处理

每个处理进行 3 次重复，采用 Excel 软件对挥发性成分相对含量进行计算统计整理，数据以平均值 ± 标准差的形式展示。使用 SPSS 软件单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行不同处理挥发性成分的差异性分析，采用 Origin、R 语言作图。

2 结果与分析

2.1 斑兰叶组培苗挥发性成分种类分析

不同激素和微量元素处理下的斑兰叶组培苗挥发性成分定性与半定量结果如图 1、表 2 所示，共检测鉴定出挥发性物质 21 种，包括醇类 (6 种)、

吡咯类 (1 种)、酯类 (6 种)、酮类 (1 种)、呋喃类 (2 种)、呋喃酮类 (1 种)、酸类 (1 种)、烯烃类 (2 种)、酚类 (1 种) 9 类。烯烃类所占比例最高 (占总含量的 56.26%), 其次为呋喃酮类 (占 14.00%), 醇类 (占 13.77%), 吡咯类 (占 6.74%), 呋喃类 (占 3.66%), 酯类 (占 3.22%), 其余酮类、酸类、酚类所占总含量均低于 2%。对于不同肥效处理下的斑兰叶组培苗, 其挥发性成分种类组成无显著差异, 但挥发性成分相对含量差异显著 ($P < 0.05$), 挥发性成分含量由高到低依次为: 烯烃类 > 呋喃酮类 > 醇类 > 吡咯类 > 呋喃类 > 酯类 > 酮类 > 酸类 > 酚类, 其中, 角鲨烯、3-甲基-2-(5H)-呋喃酮、叶绿醇、2-乙酰-1-吡咯啉、新植二烯、2,3-二氢苯并呋喃在不同处理下挥发性香气成分含量均有较高的积累, 构成了斑兰叶的主要香气物质。

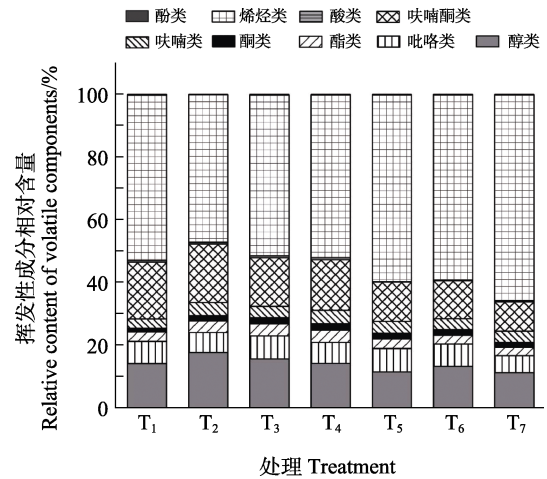


图 1 斑兰叶组培苗不同激素和微量元素处理下的挥发性成分种类及相对含量

Fig. 1 The kinds and relative content of volatile components of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro* under different hormone and trace element treatments

表 2 斑兰叶组培苗不同激素和微量元素处理下的挥发性成分含量

Tab. 2 Content of volatile components in different hormone and trace element treatments of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro*

保留时间 RT	保留指数 RI	化合物 Compound	含量 Content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
			T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
8.62	1036	丙醇	0.73±0.07 ^c	0.94±0.03 ^b	0.90±0.09 ^b	0.89±0.03 ^b	0.90±0.02 ^b	1.17±0.04 ^a	0.96±0.03 ^b
8.91	1092	异丁醇	0.13±0.01 ^a	0.14±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a	0.17±0.04 ^a	0.18±0.04 ^a	0.23±0.04 ^a	0.18±0.02 ^a
10.07	1208	2-甲基丁醇	0.03±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a
10.15	1209	异戊醇	0.14±0.01 ^c	0.20±0.01 ^b	0.19±0.02 ^b	0.19±0.01 ^b	0.18±0.01 ^b	0.22±0.01 ^a	0.23±0.03 ^a
27.10	2116	植物醇	14.23±0.24 ^b	19.66±0.66 ^a	17.81±0.91 ^{ab}	18.68±4.50 ^{ab}	20.60±1.09 ^a	22.01±1.44 ^a	18.38±5.15 ^{ab}
36.74	2622	叶绿醇	49.83±1.55 ^d	86.80±7.46 ^b	76.68±3.39 ^{bc}	78.07±9.84 ^b	67.11±1.67 ^c	111.08±6.37 ^a	76.84±2.91 ^{bc}
11.96	1330	2-乙酰-1-吡咯啉	31.96±12.76 ^c	38.31±3.79 ^c	44.83±2.23 ^{bc}	45.71±0.01 ^{bc}	57.39±10.53 ^{ab}	72.03±12.42 ^a	46.26±10.37 ^{bc}
12.73	1349	L-乳酸乙酯(-)	1.34±0.17 ^c	1.86±0.38 ^b	2.31±0.19 ^b	3.07±0.13 ^a	2.15±0.48 ^b	1.90±0.17 ^b	3.39±0.18 ^a
30.30	2142	(±)- α -羟基- γ -丁内酯	2.20±0.43 ^c	4.55±0.64 ^c	3.86±0.09 ^d	5.80±0.03 ^b	5.48±0.18 ^b	7.04±0.44 ^a	6.07±0.09 ^b
31.87	2251	棕榈酸乙酯	2.37±0.45 ^b	3.68±0.78 ^{ab}	3.78±0.66 ^{ab}	3.76±0.43 ^{ab}	5.05±1.43 ^a	4.94±0.71 ^a	3.15±0.64 ^b
35.12	2471	油酸乙酯	2.13±0.49 ^b	1.92±0.58 ^b	1.85±0.06 ^b	3.23±0.45 ^a	3.07±0.61 ^a	3.52±0.35 ^a	2.08±0.20 ^b
35.68	2521	亚油酸乙酯	3.54±0.35 ^c	5.39±0.15 ^b	4.90±0.20 ^b	5.35±0.64 ^b	4.88±0.14 ^b	7.02±0.23 ^a	3.83±0.52 ^c
36.55	2570	亚麻酸乙酯	2.28±0.75 ^b	4.07±2.44 ^{ab}	4.77±0.89 ^a	5.57±1.15 ^a	3.80±0.50 ^{ab}	5.35±1.13 ^a	4.16±0.57 ^{ab}
13.06	1303	丙酮醇	5.39±1.09 ^d	10.54±1.40 ^c	12.14±1.12 ^{bc}	14.3±1.07 ^b	14.02±2.15 ^b	17.87±1.26 ^a	14.42±2.41 ^b
15.12	1461	糠醛	1.53±0.24 ^d	2.07±0.17 ^{ab}	1.62±0.03 ^{cd}	1.95±0.19 ^{bc}	2.00±0.30 ^{abc}	2.34±0.17 ^a	1.88±0.21 ^{bcd}
33.61	2389	2,3-二氢苯并呋喃	11.76±1.52 ^e	22.87±1.33 ^c	19.34±0.64 ^d	26.75±0.73 ^b	27.85±0.79 ^b	33.05±0.20 ^a	27.70±1.31 ^b
22.04	1713	3-甲基-2-(5H)-呋喃酮	82.27±1.08 ^d	113.17±5.49 ^b	94.54±1.55 ^c	95.78±1.80 ^c	110.60±2.63 ^b	122.30±3.36 ^a	80.08±7.80 ^d
38.73	2954	9-十六烯酸	2.37±1.07 ^c	3.18±0.42 ^d	3.63±0.15 ^b	4.65±1.41 ^a	1.17±0.30 ^g	1.69±2.53 ^f	3.49±0.49 ^c
26.55	1922	新植二烯	34.64±1.14 ^f	48.72±1.88 ^{bc}	44.24±3.19 ^{cd}	39.82±3.56 ^{dc}	53.01±2.43 ^b	61.05±4.05 ^a	39.24±0.68 ^{ef}
42.73	2865	角鲨烯	205.92±4.32 ^f	236.75±9.43 ^c	417.99±4.69 ^b	535.76±21.05 ^a	267.89±1.90 ^d	302.38±6.08 ^c	520.12±2.66 ^a
32.42	2318	2,4-二叔丁基苯酚	1.09±1.89 ^a	0.66±1.15 ^a	1.22±2.11 ^a	0.92±1.59 ^a	1.37±2.37 ^a	1.41±2.44 ^a	1.32±2.29 ^a

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.2 斑兰叶组培苗挥发性成分组成分析

如图 2A 所示,不同处理下斑兰叶组培苗的角鲨烯、叶绿醇、2AP 均存在显著差异。在 T_6 处理下,2-乙酰-1-吡咯啉、叶绿醇含量为最高,而 T_1 处理 3 种物质含量均为最低。此外,不同处理下的 2AP 平均含量为 $48.07 \mu\text{g/g}$, T_6 处理最高,2AP 含量为 $72.03 \mu\text{g/g}$,与 T_7 相比,提高了 55.71%;其余处理方式无显著差异。不同处理下斑兰叶组培苗中的叶绿醇含量为 $49.83\sim 111.08 \mu\text{g/g}$, T_6 能

显著提高叶绿醇的含量,与 T_7 相比,提高了 44.55%;而 T_1 显著降低了叶绿醇的含量,其余处理无显著性差异。斑兰叶组培苗中角鲨烯等烯烴类物质含量最高,占总含量的 56.26%,不同激素和微量元素处理下的斑兰叶组培苗中的角鲨烯含量具有差异,就显著性而言,不同处理下角鲨烯均有显著差异,其中 T_4 、 T_7 角鲨烯显著高于其他处理。就含量而言, T_4 的角鲨烯含量最高为 $535.76 \mu\text{g/g}$,其次为 T_7 、 T_3 、 T_6 、 T_5 、 T_2 ,而 T_1 的角鲨烯含量最低,仅为 $205.92 \mu\text{g/g}$ 。

由图 2B 可知,不同处理方式对斑兰叶组培苗叶片中 3-甲基-2(5H)-呋喃酮含量均有显著影响。与常规处理相比, T_1 至 T_6 中的 3-甲基-2(5H)-呋喃酮含量均高于 T_7 ,其中 T_1 最低, T_6 含量最高,与 T_7 相比,提高了 52.71%。

由图 2C 可以看出,不同激素和微量元素处理下斑兰叶组培苗中的新植二烯差异显著,并且变化规律与 3-甲基-2(5H)-呋喃酮相似。 T_6 、 T_5 、 T_2 、 T_3 中新植二烯最高为 $61.05 \mu\text{g/g}$,比 T_7 提高了 55.61%。

2.3 斑兰叶组培苗挥发性物质主成分分析

本研究对不同物质处理下的斑兰叶组培苗中 9 类挥发性香气种类和 21 种挥发性香气含量进行 PCA 分析,由图 3 可知,9 类挥发性香气种类对主成分 1 (PC1) 的方差贡献率为 98.7%,对主成分 2 (PC2) 的方差贡献率为 1.1%,累计贡献率达 99.8% (图 3A); 21 种挥发性香气含量对主成分 1 (PC1) 方差贡献率达 98.1%,对主成分 2 (PC2) 达 1.7%,总方差贡献率达 99.8% (图 3B),说明 PCA 分析可以解释不同激素和微量元素处理下斑兰叶组培苗之间的变异信息。从图 3 可以看出,不同处理变量的挥发性种类和挥发性含量变化相似,并且不同肥效处理下挥发性香气成分差异较大。总体上可以分为 3 类, T_2 、 T_6 属于 I 类; T_1 、 T_5 属于 II 类; T_3 、 T_4 、 T_7 属于 III 类。其中 T_2 和 T_7 之间间隔最远,说明施加碳酸氢铵+过磷酸钙+氯化钾组合肥的处理与常规清水处理之间差异明显。此外,不同处理变量在 PC1 的载荷系数大,同时载荷系数符号都为正,因此不同处理变量与 PC1 正向都有较大的关系,得分均为正。其中 I 类中挥发性成分主要以 3-甲基-2(5H)-呋喃酮为主的呋喃类、叶绿醇为主的醇类、2AP 为主的吡咯类等化合物相关; II 类中含有较高含量的角鲨烯、2AP、2,3-二氢苯并呋喃、丙醇、异丁醇、L-乳酸

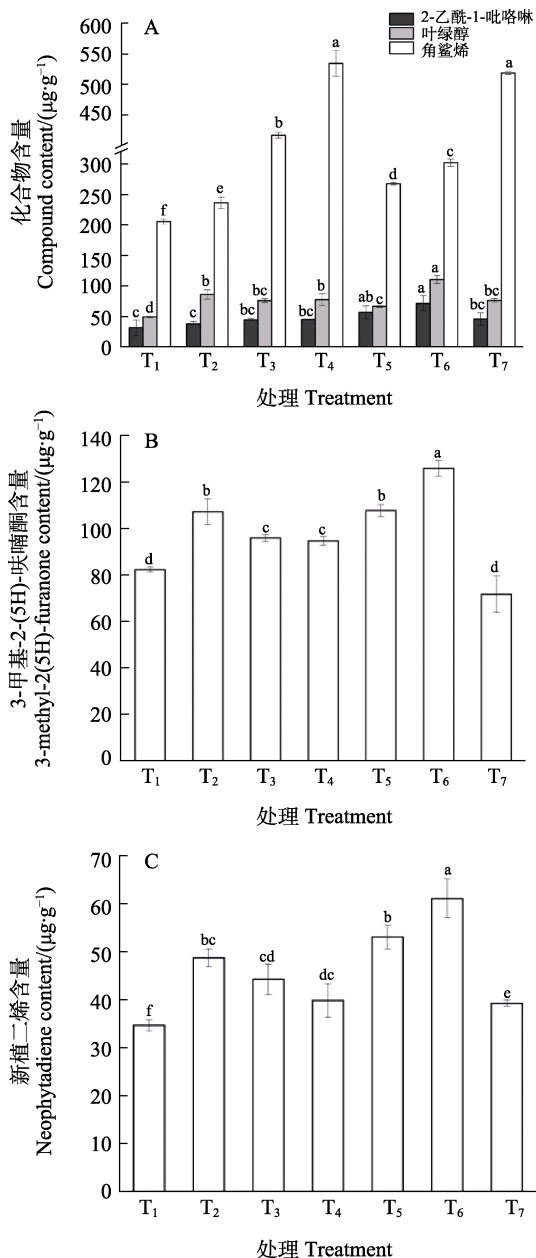


图 2 斑兰叶组培苗不同激素和微量元素处理下的主要挥发性成分含量

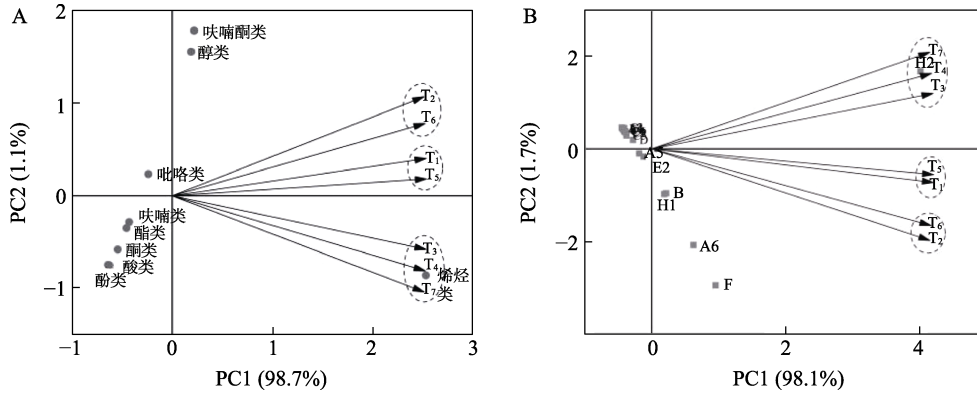
Fig. 2 Content of main volatile components in different hormone and trace element treatments of *P. amaryllifolius* Roxb.

乙酯、(±)- α -羟基- γ -丁内酯、棕榈酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯、亚麻酸乙酯、丙酮醇等物质；III类的特征性挥发性物质主要以角鲨烯为主。

2.4 斑兰叶组培苗挥发性成分差异分析

聚类热图显示不同肥效处理下的挥发性成分含量差异较大(图4),这与PCA所得结论一致。

不同颜色代表不同处理的挥发性物质含量平均值,通过颜色深浅可以直观看出不同处理下斑兰叶组培苗挥发性成分含量的差异。由图4可知,烯烴类、呋喃酮类、醇类、吡咯类、呋喃类对斑兰叶组培苗的挥发性成分有较大的贡献。结合聚类分析展示不同处理间的相似性,可大致分为三



A: 挥发性成分种类; B: 挥发性成分含量。

A: Types of volatile components; B: Volatile component content.

图 3 斑兰叶组培苗不同激素和微量元素处理下挥发性成分的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of volatile components in different hormone and trace element treatments of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets *in vitro*

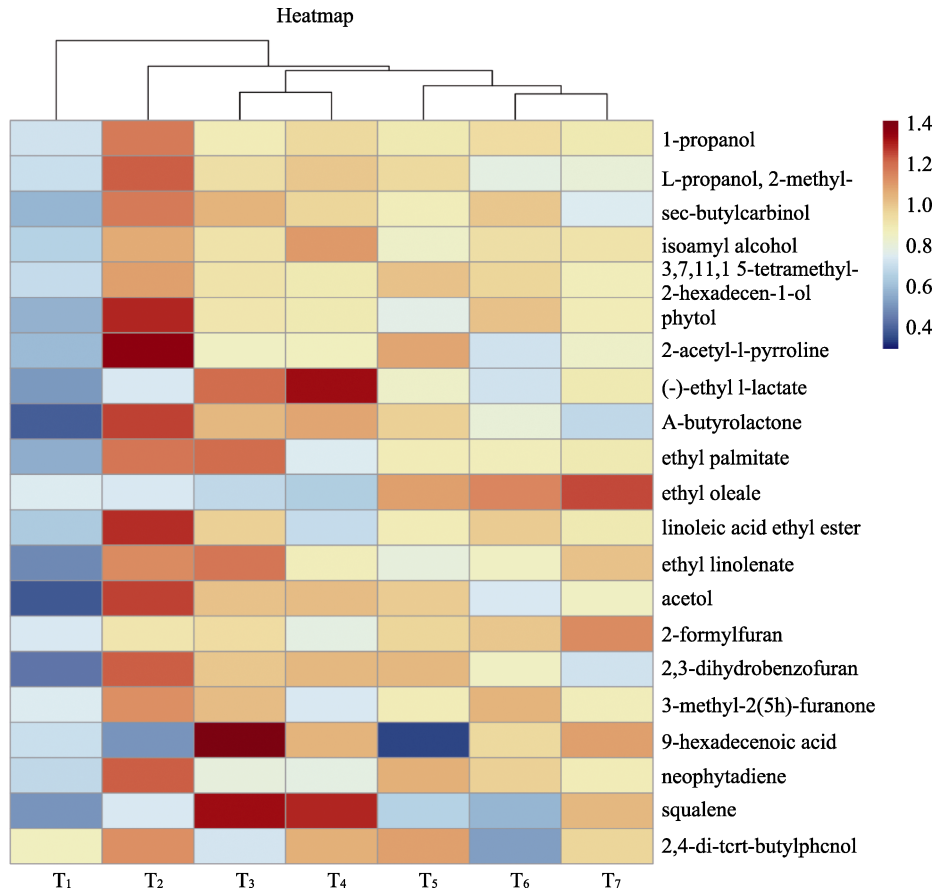


图 4 斑兰叶组培苗不同激素和微量元素处理下挥发性成分聚类热图

Fig. 4 Cluster Heatmap of volatile components in different hormone and trace element treatments of *P. amaryllifolius* Roxb. plantlets

大类, T_1 聚为一类; T_6 聚为一类; 其余处理归为第三类。其中 T_6 中的 2AP、新植二烯、叶绿醇、3-甲基-2-(5H)呋喃酮、2,3-二氢苯并呋喃、丙醇、2,4-二叔丁基苯酚、棕榈酸乙酯、亚麻酸乙酯、(\pm)- α -羟基- γ -丁内酯、亚油酸乙酯含量较高; T_1 中的颜色均较浅, 挥发性香气成分都比较少。因此通过聚类热图可直观看不同生长激素和微量元素会对其挥发性成分含量产生影响, 并且在斑兰叶组培苗生长过程中, 通过采用 T_6 处理可促进斑兰叶组培苗挥发性成分的积累, 而在 T_1 处理下的斑兰叶组培苗挥发性成分含量积累均较少。

3 讨论

本研究通过对不同激素及微量元素处理下的斑兰叶组培苗挥发性香气成分进行分析测定, 共鉴定出 21 种挥发性物质, 包括醇类化合物 6 种、酯类化合物 6 种、呋喃类化合物 2 种及其余化合物 1 种。这与郭培培等^[25]的研究结果类似。本研究检测到斑兰叶组培移栽苗中含有较高含量的角鲨烯、叶绿醇、2-乙酰-1-吡咯啉、新植二烯、3-甲基-2-(5H)呋喃酮、2,3-二氢苯并呋喃等功能性物质, 为斑兰叶组培苗主要的挥发性成分。前人研究表明, 植物中角鲨烯来源丰富, 具有促进血液循环、抗肿瘤、提高免疫力等功效的作用^[26]。本研究中, 斑兰叶组培苗的角鲨烯平均含量为 $(355.26 \pm 7.16) \mu\text{g/g}$, 高于花生油^[27]、葵花籽油^[28]、油茶籽油^[29]中角鲨烯含量。此外, 叶绿醇在植物代谢途径中具有重要作用, 可以促进糖脂代谢、脂肪细胞分化, 对畜牧产品中的功能性物质含量具有直接影响^[30], 在本研究中叶绿醇含量为 $49.83 \sim 111.08 \mu\text{g/g}$ 。2AP 作为斑兰叶特征性风味的重要来源, 其 2AP 含量是香稻的 10 倍以上, 非香稻的 100 倍^[31]。本研究检测到的 2AP 平均含量为 $48.07 \mu\text{g/g}$, 并且在锌+组合肥处理下显著提高特征性物质 2AP 的含量, 与其他处理相比, 提高了 25.53%~125.42%, 该结果与大多数学者研究结果一致。

此外, 相关文献显示, 与常规施肥(尿素+过磷酸钙+氯化钾)相比, 组合肥(碳酸氢钙+过磷酸钙+氯化钾)具有肥效长、利用率高、更加方便的优点^[32], 但本研究结果能否达到节约高效的目的有待进一步深入研究。本研究的热图和聚类分析说明, 不同激素及微量元素处理下的斑兰叶

组培苗挥发性成分均存在差异, 经比较分析发现, T_6 处理能显著提高特征性物质 2AP 的含量, 同时该处理下斑兰叶组培苗中叶绿醇、2AP、2,3-二氢苯并呋喃、3-甲基-2-(5H)呋喃酮、新植二烯等挥发性成分含量均为最高。因此, 采用锌+组合肥的施肥配方能促进挥发性香气的积累, 为最佳处理方法。而所谓“最佳配方”只是作为参考, 后期应结合施肥方式、施肥量、施肥时期以及其他自然因素等诸多因素来进一步研究。本研究结果中有关栽培方式的内容也对斑兰叶组培苗炼苗栽培及增香方面具有指导意义, 可以为斑兰叶的扩大种植及增香提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 8 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 23.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China: Vol. 8[M]. Beijing: Science Press, 1992: 23. (in Chinese)
- [2] ZANAN R, PAWAR K, NADAF A, PATHAN H M. Dye sensitized solar cell based on TiO_2 nanoparticles and chlorophyll from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaves[J]. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2016, 27(12): 12452-12458.
- [3] 胡宏友, 陈琳琳. 板兰香的引种及其资源开发评价[J]. 香料香精化妆品, 2001(6): 20-22.
HU H Y, CHEN L L. Introduction and evaluation on the resource exploitation of *Pandanus amaryllifolius*[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2001(6): 20-22. (in Chinese)
- [4] YAHYA F, LU T, SANTOS R C D, FRYER P J, BAKALIS S. Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline from pandan leaf the effect of pre-treatment[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2010, 55(1): 25-32.
- [5] 唐瑾暄, 秦晓威, 鱼欢, 吉训志, 邓文明, 张昂, 宗迎. 槟榔间作香露兜对土壤养分和养分吸收的影响[J]. 热带作物学报, 2021, 42(9): 2571-2578.
TANG J X, QIN X W, YU H, JI X Z, DENG W M, ZHANG A, ZONG Y. Effect of arecanut and pandan intercropping on soil nutrient and absorption[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(9): 2571-2578. (in Chinese)
- [6] 任竹君, 王道平, 罗亚男, 陶晨. 香兰叶挥发性成分分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(36): 22307-22308.
REN Z J, WANG D P, LUO Y N, TAO C. Analysis on volatile constituent in pandan leaves[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(36): 22307-22308. (in Chinese)

- [7] 彭丽华, 成金乐, 詹若挺, 李继仁. 露兜树属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(4): 640-643.
PENG L H, CHENG J L, ZHAN R T, LI J R. The progress of pandanus l. on chemical composition and pharmacological activity[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(4): 640-643. (in Chinese)
- [8] 罗明将, 吉训志, 秦晓威, 鱼欢, 宗迎, 郝朝运, 贺书珍. 香露兜繁育技术及影响香气成分研究进展[J]. 中国热带农业, 2020(6): 46-51.
LUO M J, JI X Z, QIN X W, YU H, ZONG Y, HAO C Y, HE S Z. Research progress in breeding technology and influence of aroma components of *Pandanus amaryllifolius* Roxb.[J]. China Tropical Agriculture, 2020(6): 46-51. (in Chinese)
- [9] 李青林, 邹永田, 刘广林, 黄晓光. 木本观赏植物组织培养技术[J]. 河北农业科学, 2010, 14(6): 38-41.
LI Q L, ZOU Y T, LIU G L, HUANG X G. Tissue culture technology of woody ornamental plants[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2010, 14(6): 38-41. (in Chinese)
- [10] 彭峰, 陈嫣嫣, 郝日明, 夏冰. 彩色马蹄莲组培苗壮苗生根及移栽措施研究[J]. 江苏农业科学, 2008(1): 126-128.
PENG F, CHEN Y Y, HAO R M, XIA B. Study on techniques of rooting and transplantation of tissue culture seedling of *Zantedeschia hybrida*[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2008(1): 126-128. (in Chinese)
- [11] 鱼欢, 殷诚美, 秦晓威, 宗迎, 郝朝运, 邢诒彰, 白亭玉. 吲哚丁酸对斑兰叶根系生长的影响[J]. 中国热带农业, 2019(1): 50-53.
YU H, YIN C M, QIN X W, ZONG Y, HAO C Y, XING Y Z, BAI T Y. Different concentrations of indolebutyric acid on root growth of pandan[J]. China Tropical Agriculture, 2019(1): 50-53. (in Chinese)
- [12] 谭明欣, 秦晓威, 李倩松, 鱼欢, 宗迎, 郝朝运, 邓文明. IBA 不同处理时间对斑兰叶根系生长的影响[J]. 中国热带农业, 2019(4): 60-63.
TAN M X, QIN X W, LI Q S, Y H, ZONG Y, HAO C Y, DENG W M. Different soaking time of indoleacetic acid on root growth of pandan[J]. China Tropical Agriculture, 2019(4): 60-63. (in Chinese)
- [13] 胡树林, 徐庆国, 黄启为. 香米品质与微量元素含量特征关系的研究[J]. 作物研究, 2001, 15(4): 12-15.
HU S L, XU Q G, HUANG Q W. Relationship of sweet rice quality with the contents of microelements[J]. Crop Research, 2001, 15(4): 12-15. (in Chinese)
- [14] 黄锦霞, 肖迪, 唐湘如. 施锌对香稻产量、香气和品质的影响[J]. 耕作与栽培, 2010(3): 5-7.
HUANG J X, XIAO D, TANG X R. Effects of zinc application on yield, aroma and quality of fragrant rice[J]. Tillage and Cultivation, 2010(3): 5-7. (in Chinese)
- [15] 唐湘如, 吴密. 施用锌、铁、硼肥对香稻糙米香气和剑叶脯氨酸含量的影响[J]. 杂交水稻, 2006, 21(6): 69-72.
TANG X R, WU M. Effects of application of zinc, iron and lanthanum on contents of aronla in brown rice and proline in flag leaf of aromatic rice[J]. Hybrid Rice, 2006, 21(6): 69-72. (in Chinese)
- [16] 莫钊文, 范平珊, 潘圣刚, 王在满, 田华, 段美洋, 唐湘如. 肥料类型及施用方式对香稻香气 2-乙酰-1-吡咯啉含量的影响[J]. 华北农学报, 2016, 31(5): 152-158.
MO Z W, FAN P S, PAN S G, WANG Z M, TIAN H, DUAN M Y, TANG X R. Effect of fertilizer types and fertilization methods on 2-acetyl-1-pyrroline content in aromatic rice[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(5): 152-158. (in Chinese)
- [17] 梁文旭, 靳志丽, 李振武. 烤烟复合型叶面肥对烟叶降碱增香提质的作用研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(30): 14695-14697.
LIANG W X, JIN Z L, LI Z W. Study on effects of compound foliar fertilizer on reducing nicotine content, improving aroma and quality of flue-cured tobacco (*Nicotiana glauca* L.)[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2012, 40(30): 14695-14697. (in Chinese)
- [18] THIMMARAJU R, BHAGYALAKSHMI N, NARAYAN M S, VENKATACHALAM L, RAVISHANKAR G A. In vitro culture of *Pandanus amaryllifolius* and enhancement of 2-acetyl-1-pyrroline, the major flavouring compound of aromatic rice, by precursor feeding of L-proline[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(15): 2527-2534.
- [19] 王景飞, 潘梅, 黄赛, 吕德任, 戚华沙. 香露兜组织培养及植株再生技术的研究[J]. 中国园艺文摘, 2016, 32(11): 22-24, 79.
WANG J F, PAN M, HUANG S, LYU D R, QI H S. Study on tissue culture and plantlet regeneration of *Pandanus amaryllifolius* Roxb.[J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2016, 32(11): 22-24, 79. (in Chinese)
- [20] BUTTERY R G, JULIANO B O, LING L C. Identification of rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline in pandan leaves[J]. Chemistry And Industry, 1983: 478.
- [21] JIANG J. Volatile composition of pandan leaves (*Pandanus amaryllifolius*)[M]. Flavor Chemistry of Ethnic Foods. Springer Boston, 1999: 105-109.
- [22] 黄艳丽, 陈思平, 郭培培, 吉训志, 郝朝运, 鱼欢, 秦晓威. 7 种不同提取方式对香露兜挥发性成分的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1582-1591.
HUANG Y L, CHEN S P, GUO P P, JI X Z, HAO C Y, YU H, QIN X W. Effect of seven different extraction methods on

- volatile composition of *Pandanus amaryllifolius* Roxb.[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(9): 1582-1591. (in Chinese)
- [23] GIOVANNI V, ENRICO B, NICOLA S, LUCIANO C, MARCO B, FRANCESCO B, MATTIA T, ALESSANDRO L, VALERIO S, GIOVANNI F, VELTRI, ANDREA V, MAURO F F. Semi-quantification of pneumothorax volume by lung ultrasound[J]. Intensive Care Medicine, 2014, 40(10): 1460-1467.
- [24] LOH S K, CHE MAN Y B, TAN C P, OSMAN A, HAMID N S A. Process optimisation of encapsulated pandan (*Pandanus amaryllifolius*) powder using spray-drying method[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(12): 1999-2004.
- [25] 郭培培, 黄志, 秦晓威, 陈思平, 鱼欢, 宗迎, 贺书珍. 香露兜不同叶位挥发性成分差异性分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(12): 2517-2525.
- GUO P P, HUANG Z, QIN X W, CHEN S P, YU H, ZONG Y, HE S Z. Comparative analysis of the volatile components in different leaf position of *Pandanus amaryllifolius* Roxb.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(12): 2517-2525. (in Chinese)
- [26] 李颂, 刘洋, 王春玲. 角鲨烯的健康功效及应用[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(14): 206-209.
- LI S, LIU Y, WANG C L. The health benefits and application of squalene[J]. Food Research and Development, 2016, 37(14): 206-209. (in Chinese)
- [27] 朱琳, 薛雅琳, 刘晓辉, 张东, 张东生. 气相色谱内标法测定植物油中角鲨烯含量[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(12): 117-120.
- ZHU L, XUE Y L, LIU X H, ZHANG D, ZHANG D S. De-termination of squalene in vegetable oils by gas chromatography with an internal standard[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(12): 117-120. (in Chinese)
- [28] 毛多斌, 贾春晓, 孙晓丽, 杨公明. 几种功能性植物油中角鲨烯和维生素 E 分析[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(2): 79-82.
- MAO D B, JIA C X, SUN X L, YANG G M. Analysis of squalene and vitamin e in functional vegetable oils[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22(2): 79-82. (in Chinese)
- [29] CAO Y, XIE Y, REN H. Fatty acid composition and tocopherol, sitosterol, squalene components of camellia reticulata oil[J]. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2018, 13(4): 403-406.
- [30] DEWHURST R J, SCOLLAN N D, LEE M R F, OUGHAM H J, HUMPHREYS M O. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2003, 62(2): 329-336.
- [31] YAHYA F, LU T, SANTOS R C D, FRYER P J, BAKALIS S. Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline from pandan leaf: the effect of pretreatment[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2010, 55(1): 200-207.
- [32] 刘霞, 孙建民, 朱振土. 长效碳铵肥效试验[J]. 化肥工业, 2002, 29(2): 26-27.
- LIU X, SUN J M, ZHU Z T. Experiment on fertilizer efficiency of long-lasting ammonium-bicarbonate[J]. Fertilizer Industry, 2002, 29(2): 26-27. (in Chinese)