

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201409029

方志荣,王胜华,陈放,等. 响应面法优化麻疯树花粉离体萌发培养基的研究[J]. 广西植物, 2016, 36(4):479-485

FANG ZR, WANG SH, CHEN F, et al. Optimal medium for pollen germination of *Jatropha curcas* *in vitro* using response surface methodology[J]. Guihaia, 2016, 36(4):479-485

响应面法优化麻疯树花粉离体萌发培养基的研究

方志荣^{1,2,3}, 王胜华¹, 陈放^{1*}, 刘庆²

(1. 四川大学 生命科学学院, 成都 610064; 2. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; 3. 西昌学院 动物科学学院, 西昌 615000)

摘要: 麻疯树因其种子含油率较高, 种子油提炼的生物柴油可部分替代汽油, 而成为一种极具潜能的能源作物, 但由于产量低, 麻疯树在热带、亚热带的发展受到极大限制。杂交育种是提高产量的重要手段, 杂交亲本花粉生活力的高低直接影响到育种的成效。因此, 寻求麻疯树离体花粉萌发的最适培养基配方, 探明花粉萌发培养基中各主要培养基成分间的交互作用对生产上麻疯树杂交结实率和种子产量的提高具有重要意义。该研究以麻疯树开花初期雄花上花药刚散粉时的成熟花粉粒为材料, 采用 Box-Behnken 设计 (Box-Behnken design, BBD) 的响应面法, 对麻疯树花粉离体萌发培养基中各主要培养基成分的浓度配比及各主要培养基成分的交互作用进行了研究。以花粉萌发率为响应指标, 建立了 4 种营养成分 (蔗糖、硼酸、硝酸钙、硝酸钾) 与花粉萌发率的响应面模型, 并对各主要培养基成分的浓度配比进行了优化。通过 R 软件进行响应面分析的结果表明: 4 因素对花粉萌发率的影响顺序为蔗糖 > 硼酸 > 硝酸钙 > 硝酸钾; 蔗糖与硼酸、蔗糖与硝酸钙、蔗糖与硝酸钾之间的交互作用显著。响应面建模优化后的最佳培养基为 13.77% 蔗糖 + 32.14 mg · L⁻¹ 硼酸 + 22.21 mg · L⁻¹ 硝酸钙 + 19.95 mg · L⁻¹ 硝酸钾 + 200 mg · L⁻¹ 硫酸镁, 在此条件下的理论萌发率为 99.73%。采用此培养基成分配比得到麻疯树花粉离体试验萌发率为 98.97%, 与理论响应值相吻合, 同时也表明利用 BBD 设计的响应面模型进行麻疯树花粉离体萌发培养条件优化方法的有效性。

关键词: 麻疯树, Box-Behnken 设计, 响应面法, 花粉活力, 离体花粉萌发, 传粉生态学

中图分类号: Q813.1+3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)04-0479-07

Optimal medium for pollen germination of *Jatropha curcas* *in vitro* using response surface methodology

FANG Zhi-Rong^{1,2,3}, WANG Sheng-Hua¹, CHEN Fang^{1*}, LIU Qing²

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 3. Animal Science School of Xichang College, Xichang 615013, China)

Abstract: *Jatropha curcas* is likely to become one of the key energy crops in the world because of high oil content in seed which can be refined into high quality biodiesel. *J. curcas* widely distributes and cultivates in many tropics and sub-tropics areas of China. Due to inadequate pollination and very low productivity, *J. curcas* was a wild or semi-wild tree for a long time. Effective pollination is a prerequisite for fruit-set and seed-set of *J. curcas*. Information on the most suitable ingredient concentration ratio of B-K medium which was widely used to pollen culture *in vitro* for pollen germination and inactions among ingredients *in vitro* is required to increase rate of hybrid seed set and seed production. Gathered mature

收稿日期: 2014-11-15 修回日期: 2015-03-31

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD22B08); 四川省科技计划项目(2011HH0006) [Supported by National Key Technology R & D Program of China(2011BAD22B08); Scientific and Technological Plan of Sichuan Province(2011BAD22B08)].

作者简介: 方志荣(1981-), 女, 四川冕宁人, 在读博士, 研究方向为植物生理学, (E-mail) 172580110@qq.com.

*通讯作者: 陈放, 博士, 教授, 研究方向为植物学, (E-mail) cfang@263.net.

pollen grains when petals opened and the anther just began scattering pollen in primary flowering time to do pollen germination test. Ingredient concentration ratio was optimized by response surface methodology (RSM) based on the Box-Behnken design (BBD). The primary variables chosen were sucrose, H_3BO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and KNO_3 . A total number of 30 runs were tested. We constructed a response surface model between the pollen germination rates and four ingredients for the culture medium *in vitro* by R 3.0 software. The effect order of 4 factors to influence germination rate were: sucrose > H_3BO_3 > $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ > KNO_3 . There were significant interactions of pollen germination between sucrose and H_3BO_3 , sucrose and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, sucrose and KNO_3 . The optimal ingredient concentration ratio which supported the germination of pollen and growth of pollen tubes was 13.77% sucrose + 32.14 mg · L⁻¹ H_3BO_3 + 22.21 mg · L⁻¹ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 19.95 mg · L⁻¹ KNO_3 + 200 mg · L⁻¹ $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Under this condition, the germination rate theoretically achieved 99.73%. The verification test were made corresponding to the optimal ingredient concentration ratio, the results of pollen germination experiments showed that pollen germination rates of 98.97%, the proportion matched theoretical response value well. It can also verify the effectiveness of the BBD-based response surface model and analysis technique in obtaining optimal ingredient concentration ratio for pollen germination.

Key words: *Jatropha curcas*, Box-Behnken design, response surface methodology, pollen viability, *in vitro* pollen germination, pollination ecology

麻疯树 (*Jatropha curcas*) 别名羔桐、臭油桐、黄肿树、小桐子、假白榄、假花生, 为大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属 (*Jatropha*) 植物, 多年生落叶灌木或小乔木。麻疯树的种子含油率为 60% ~ 70%, 种子油可以提炼高级生物柴油, 所提炼的生物柴油可部分替代汽油, 是一种极具潜能的能源作物 (Becker & Makkar, 2008)。它具有很强的抗旱、耐贫瘠、生长速度快的特性, 在我国热带、亚热带有较大面积的种植和野生分布, 主要生长在云南、四川、广西、海南 (林娟等, 2004)。然而由于产量低等原因, 现存的麻疯树处于野生或半野生状态, 麻疯树的发展遇到了瓶颈 (Becker & Makkar, 2008)。而杂交育种是提高产量的重要手段, 杂交亲本花粉生活力的高低直接影响到育种的成效。花粉离体萌发是测定花粉活力的有效方法之一, 而探索麻疯树花粉离体萌发的最佳条件, 可为花粉活力测定提供有效方法, 也可为促进杂交结实、制定提高麻疯树产量措施提供理论依据。B-K 试液 (Brewbaker & Kwack, 1963) 被广泛用于花粉的离体培养, 但这一培养基成分并不完全适合麻疯树离体花粉的培养。不同学者对这一培养基进行了优化, 优化后的效果并不十分理想 (Li et al, 2010; Abdelgadir et al, 2012; 刘波洋等, 2013)。因此, 优化培养基成分中蔗糖、硼酸、硝酸钙、硝酸钾等的浓度配比, 对提高麻疯树离体花粉的萌发率具有重要意义。

Box-Behnken 试验设计 (Box-Behnken design, BBD) 是一种三水平的部分因子设计为响应面法 (Response surface methodology, RSM) 的一种; 其最

大的优点是能将多个变量与响应值建立二次多项回归分析模型, 并对模型进行分析, 最终优化该响应值 (Annadurai, 2000)。李淑娟等 (2009) 利用响应面法优化了白蜡属花粉离体萌发培养基, 通过响应面法试验与正交试验的结果比较, 证实利用 BBD 响应面模型是一种行之有效的优化花粉离体萌发培养基的方法。该方法除了能得到花粉离体培养基各营养元素的极值浓度外, 还能确定各因素间的交互作用。本研究以 B-K 试液 (Brewbaker & Kwack, 1963) 为基础培养基, 对影响离体花粉萌发的不同成分进行单因素试验, 试验结果通过 SPSS 软件比较各因素不同浓度下花粉萌发率和花粉管长度, 进而筛选出影响麻疯树花粉离体萌发的主要因素。采用 Box-Behnken 试验设计, 不同培养基成分作为自变量, 以花粉萌发率为响应值将试验结果进行响应面分析和培养基配方的优化; 旨在寻求麻疯树花粉萌发的最适培养基配方, 以期探明花粉萌发培养基中各主要培养基成分的最佳浓度及各主要培养基成分间的交互作用; 提高杂交结实率, 为确定麻疯树科学管理措施提供一定理论依据; 为其它试验中各参数的优化提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

于西昌市黄水乡洼埡村 (海拔为 1 473 m; 27° 32' 51" N, 102° 11' 44" E) 采集带有处于开花初期的麻疯树花苞的枝条 (王洁等, 2013), 置于有冰袋的

冰盒中,带回实验室。在室温下水培,收集刚开裂花药中的成熟花粉粒用于离体花粉的萌发试验(权秋梅等,2007)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 单因素试验作以下设置,其余因子均取 B-K 试液中的最适值(Brewbaker & Kwack, 1963)。蔗糖浓度梯度分别为 0、5%、10%、15%、20%、30%;硼酸(H_3BO_3)浓度梯度分别为 0、5、10、20、30、40、50、100、150 $mg \cdot L^{-1}$,硝酸钙[$(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$]浓度梯度分别为 0、5、10、20、30、40、50、100、200、300 $mg \cdot L^{-1}$;硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)浓度梯度分别为 0、5、10、20、30、40、50、100、200、300 $mg \cdot L^{-1}$;硝酸钾(KNO_3)浓度梯度分别为 0、5、10、20、30、40、50、100、150 mg/L ,记录各处理条件下离体花粉的萌发率和花粉管长度。用 SPSS19.0 软件进行多重比较分析后确定在 pH 值为 5.5、黑暗培养温度为 25 $^{\circ}C$ 的条件下,蔗糖、硼酸、硝酸钙、硝酸钾 4 因素为影响麻疯树花粉萌发率的主要因素。自变量蔗糖(X_1)、硼酸(X_2)、硝酸钙(X_3)、硝酸钾(X_4)的试验水平以-1、1 进行编码,采用 Box-Behnken 方法进行设计,共 30 个试验点。试验因素、水平编码如表 1 所示,Box-Behnken 试验设计方案与结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 试验设计分析因素与水平编码

Table 1 Design factors, corresponding levels and codes for Box-Behnken

因子 Factor	代码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
蔗糖 (%) Sucrose	X_1	10	15	20
硼酸 ($mg \cdot L^{-1}$) Boric acid	X_2	20	30	40
硝酸钙 ($mg \cdot L^{-1}$) Calcium nitrate	X_3	10	20	30
硝酸钾 ($mg \cdot L^{-1}$) Potassium nitrate	X_4	10	20	30

1.2.2 试验方法 用液体培养法培养花粉,液体培养基中 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的浓度参照 BK 试液[10% 蔗糖,100 $mg \cdot L^{-1}$ H_3BO_3 ,300 $mg \cdot L^{-1}$ $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$,200 $mg \cdot L^{-1}$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,100 $mg \cdot L^{-1}$ KNO_3](Brewbaker & Kwack, 1963),其余成分及浓度见表 2,并在液体培养基中加入 2% 的琼脂粉。用玻璃棒蘸取少量预热的培养基,将其滴在盖玻片上,约 1 cm^2 ,要求培养基均匀而平坦地分布在盖玻片上,将少量花粉粒均匀地撒在培养基上。在凹形载

表 2 Box-Behnken 试验方案与结果 (N=3)

Table 2 Design runs and results for Box-Behnken design

执行 顺序 Run order	区组 Block	蔗糖 Sucrose X_1 (%)	硼酸 Boric acid X_2 ($mg \cdot L^{-1}$)	硝酸钙 Calcium nitrate X_3 ($mg \cdot L^{-1}$)	硝酸钾 Potassium nitrate X_4 ($mg \cdot L^{-1}$)	花粉 萌发率 Pollen germination Y (%)
1	1	15	30	20	20	95.5
2	1	20	40	20	20	44.6
3	1	15	30	30	30	84.8
4	1	15	30	20	20	96.5
5	1	10	20	20	20	47.4
6	1	15	30	10	10	80.7
7	1	20	20	20	20	31
8	1	10	40	20	20	70.7
9	1	15	30	10	30	72.3
10	1	15	30	30	10	85.1
11	2	15	30	20	20	97.6
12	2	15	30	20	20	95.5
13	2	20	30	20	30	53.6
14	2	15	20	30	20	57.1
15	2	15	40	10	20	69.9
16	2	20	30	20	10	56.5
17	2	15	40	30	20	79.4
18	2	10	30	20	10	71.1
19	2	10	30	20	30	72.1
20	2	15	20	10	20	50
21	3	15	20	20	10	63.6
22	3	15	20	20	30	60.6
23	3	10	30	10	20	65.7
24	3	15	40	20	30	77.5
25	3	15	40	20	10	74.3
26	3	20	30	10	20	49.7
27	3	10	30	30	20	77.3
28	3	15	30	20	20	97.5
29	3	20	30	30	20	51.9
30	3	15	30	20	20	98.3

玻片中央滴一滴纯水,滴管吸取少量培养基加在凹孔边缘使成一圈,将盖玻片盖在凹孔上(有花粉粒的一面朝下),让凹孔边缘的培养基把盖玻片固定、密封(秦家顺,1994)。将制作好的载玻片放入预先

放在湿润滤纸的有盖培养皿中,于25℃生化培养箱中黑暗培养1h(花粉萌发率和花粉管长度达到最大的最短时间,此后萌发率和花粉管长度不再增加),保持培养皿滤纸湿润。取出载玻片置于显微镜下观察,每块载玻片观察6个以上的视野,以花粉管长度大于或等于花粉直径为花粉萌发的标准,统计每个视野萌发花粉粒数和花粉粒总数。花粉萌发率的计算:花粉萌发率(%)=萌发花粉粒数/花粉总粒数×100%。每处理3次重复,求其平均值作为后面响应面分析和培养基优化的依据。

1.2.3 建模、优化和验证 采用R软件中的lm函数对表2的结果进行二次多项回归拟合和方差分析。利用RSM函数进行响应面的分析和作图。用canonical.path函数对响应面模型进行优化可得到最佳的离体萌发培养基配方。采用此培养基配方进行麻疯树离体萌发试验,得到的结果与响应面法优化所得的理论值进行比较以验证配方的可行性。

2 结果与分析

2.1 模型的建立与分析

基于Box-Behnken试验设计及结果见表2。应用lm函数,将表2的试验数据用R软件进行二次多项回归拟合,分析结果见表3。

回归分析结果表明,回归方程的检验统计量F估计值为128.3,对应的P值为 5.317×10^{-13} ,说明该回归方程是显著的。可决系数 $R^2 = 0.9917$,修正系数的可决系数为 $R_{adj}^2 = 0.984$,说明方程的拟合效果较好。由表3的Pr(>|t|)可知,在显著性水平上常数项(Intercept)、一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 ,二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 表现为差异极显著,交互项 X_1X_2 表现为高度显著,一次项 X_4 表现为差异显著,交互项 X_1X_3 、 X_1X_4 表现为差异显著,交互项 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 表现为差异不显著。因此应去掉交互项 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 以优化回归模型。去掉 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 交互项后,回归方程的检验统计量F的估计值为152.5,对应的p值为 1.99×10^{-15} ,可见去掉交互项 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 后,新方程获得了更好的拟合效果。最后所得的回归方程:

$$Y = 96.82 - 13.09X_1 + 8.32X_2 + 3.69X_3 - 1.7X_4 - 4.15X_1X_2 - 3.10X_1X_3 - 3.48X_1X_4 - 29.75X_2^2 - 22.06X_2^2 - 10.33X_3^2 - 5.92X_4^2$$

该回归方程用于萌发率的理论预测。同时,从表3可以看出,各因素对萌发率的影响

表3 二次多项回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance for quadratic polynomial regression model

项目 Item	估计值 Estimate	标准差 Standard error	t 值 t value	Pr > t
截距 Intercept	96.8167	1.0407	93.028	$<2e^{-16}$ ***
X_1	-13.0917	0.7359	-17.790	$1.71e^{-11}$ ***
X_2	8.3167	0.7359	11.301	$9.77e^{-09}$ ***
X_3	3.6917	0.7359	5.017	0.000153 ***
X_4	-1.7000	0.7359	-2.310	0.035524 *
$I(X_1^2)$	-29.7542	0.9735	-30.564	$6.31e^{-15}$ ***
$I(X_2^2)$	-22.0667	0.9735	-22.667	$5.11e^{-13}$ ***
$I(X_3^2)$	-10.3292	0.9735	-10.610	$2.28e^{-08}$ ***
$I(X_4^2)$	-5.9167	0.9735	-6.078	$2.12e^{-05}$ ***
X_1X_2	-4.1500	1.2746	-3.256	0.005319 **
X_1X_3	-3.1000	1.2746	-2.432	0.028008 *
X_1X_4	-3.4750	1.2746	-2.726	0.015612 *
X_2X_3	0.6000	1.2746	0.471	0.644607
X_2X_4	1.5500	1.2746	1.216	0.242757
X_3X_4	2.0250	1.2746	1.589	0.132977

残差标准误差: 2.549

Residual standard error: 2.549

可决系数 $R^2 = 0.9917$; 修正的可决系数 $R_{adj}^2 = 0.984$

Multiple $R^2 = 0.9917$; Adjusted $R_{adj}^2 = 0.984$

F 值: 128.3; P 值: 5.317×10^{-13}

F-value: 128.3; P-value: 5.317×10^{-13}

注: *** 表示差异显著性水平($P < 0.001$), ** 表示差异显著性水平($0.001 \leq P < 0.01$), * 表示差异显著性水平($0.01 \leq P < 0.05$)。

Note: *** means significant differences at $P < 0.001$, ** means significant differences at $0.001 \leq P < 0.01$, * means significant differences at $0.01 \leq P < 0.05$.

的顺序为蔗糖(X_1)>硼酸(X_2)>>硝酸钙(X_3)>硝酸钾(X_4)。

2.2 花粉萌发影响因素交互作用分析

利用RSM函数,将上述结果用R软件进行分析,并绘制响应面图,以直观的反应在固定两个因素的情况下,另两个因素对麻疯树花粉萌发率的影响。结果见图1。由图1、图2和图3可知,当蔗糖浓度在10%~20%时,麻疯树花粉的萌发率随蔗糖浓度的增加均表现为低-高-低的变化趋势,而且这种趋势不随硼酸、硝酸钙和硝酸钾浓度的变化而改变,可见4个因素中蔗糖对花粉萌发的作用最显著。另一方面,蔗糖与硼酸、蔗糖与硝酸钙、蔗糖与硝酸钾浓度都高或都低时,花粉萌发率较低;但是二者处于中间浓度时却表现出较高萌发率。这表明蔗糖与硼

酸、蔗糖与硝酸钙、蔗糖与硝酸钾之间都存在明显的交互作用,表现为互补效应。由图 4、图 5 可知,当蔗糖浓度一定时,麻疯树离体花粉萌发率随硼酸浓度的增加而增加,但是硼酸与硝酸钙、硼酸与硝酸钾的交互作用不明显,具体表现为,当二者浓度达到最大时,萌发率不会显著下降。这进一步说明硼酸也是决定麻疯树离体花粉萌发率的另一种主要因素。由图 6 可知,当蔗糖和硼酸浓度一定时,硝酸钙与硝酸钾的交互作用不明显,具体表现在二者浓度都高或都低时萌发率不会显著下降。

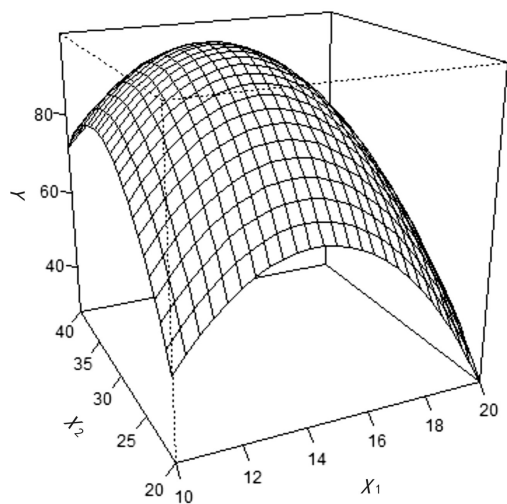


图 1 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面 X_1 : 蔗糖浓度(%); X_2 : 硼酸浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); Y : 花粉萌发率(%). 下同。

Fig. 1 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$

X_1 : Concentration of sucrose(%); X_2 : Concentration of boric acid ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); Y : Percentage of pollen germination(%). The same below.

2.3 反应条件的优化与模型验证

用 canonical.path 函数对上述响应面模型进行优化,得到萌发率最高时的培养基组合为蔗糖 13.77%+硼酸 32.14 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +硝酸钙 22.21 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +硝酸钾 19.95 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +硫酸镁 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在此条件下的理论萌发率为 99.73%。用此培养基配方进行离体花粉培养,重复 3 次,实际测得的 3 次萌发率为 99.3%, 98.7%, 98.9%, 平均萌发率为 98.97%, 试验萌发率与理论萌发率的相对误差 RSD% 为 0.76%, 验证了应用 Box-Behnken 响应面设计优化花粉离体萌发培养基的方法是可行的。

3 讨论与结论

采用优化后的离体花粉培养基获得高的萌发率

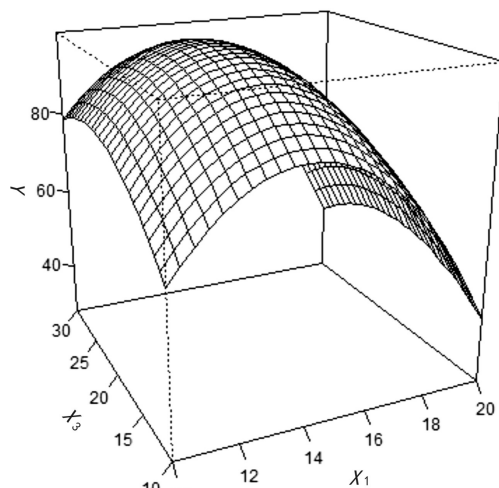


图 2 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面

X_3 : 硝酸钙浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). 下同。

Fig. 2 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$

X_3 : Concentration of calcium nitrate ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The same below.

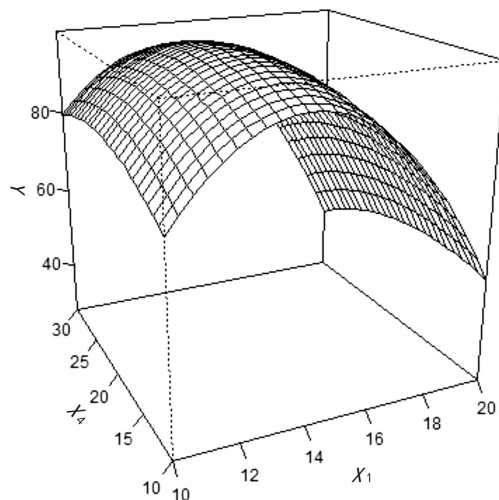
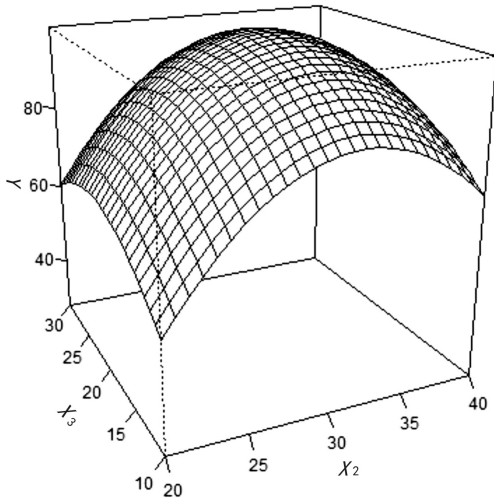
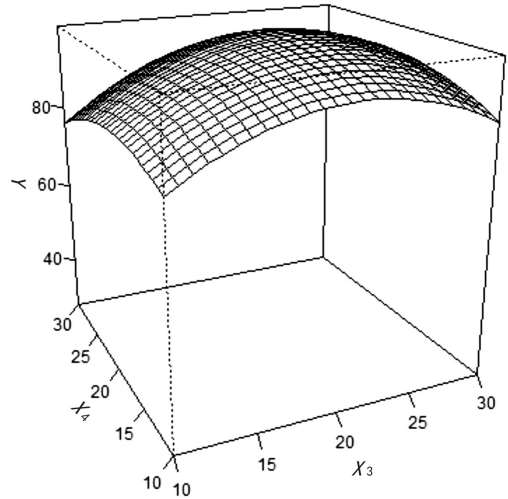
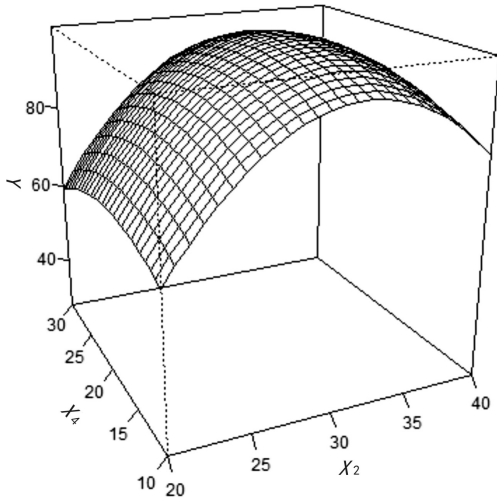


图 3 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面

X_4 : 硝酸钾浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). 下同。

Fig. 3 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$ X_4 : Concentration of potassium nitrate ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The same below.

的前提条件是获得高生活力的花粉。通过 $\text{I}_2\text{-KI}$ 检测法(孙爱芹等, 2010)检测不同发育时期花粉的活力, 结果表明花药刚散粉时的花粉活力最高, 接近 100%。这一结果与李昆等(2007)证实麻疯树雄花的花药刚散粉时花粉活力最高为 54.35% 存在显著差异, 这可能与麻疯树的品种有关。这种花粉萌发率的差异在不同的梨品种中间(杨磊, 2009; 赵纪伟, 2012)和新疆野苹果不同的单株之间也表现出来。西昌市黄水乡处于野生状态的麻疯树较高的离

图4 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面Fig. 4 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$ 图6 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面Fig. 6 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$ 图5 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面Fig. 5 Responsive surfaces of $Y=f(x_1, x_2)$

体花粉萌发率使其可能成为麻疯树杂交育种的优良父本,今后可开展相关的试验研究。

优化后的二次多项回归模型及响应面模型,不仅能显示单因素作用的大小,而且能显示各因素的交互作用。本研究得出各因素对麻疯树离体花粉萌发率影响的顺序为蔗糖>硼酸>>硝酸钙>硝酸钾,而且蔗糖与硼酸、硝酸钙、硝酸钾均表现出显著的交互作用。蔗糖和硼酸是决定麻疯树离体花粉萌发的两种主导因素(权秋梅等,2007),硝酸钙和硝酸钾主要是在蔗糖和硼酸的作用下起辅助作用,而这种辅助作用是花粉管生长所必须的。蔗糖作为一种重要的碳水化合物,参与花粉渗透压的平衡,对花粉的离

体萌发起主导作用,它一方面可以参与花粉管渗透压的平衡,另一方面作为花粉代谢的底物,为花粉萌发和花粉管生长提供营养物质(Johri & Vasil, 1961)。本研究中,当花粉萌发率在蔗糖浓度大于15%时显著下降,这可能是因为高的渗透压导致麻疯树花粉细胞发生质壁分离(Johri & Vasil, 1961),从而抑制花粉萌发和生长。10%~15%的蔗糖能维持花粉渗透压的平衡,使花粉保持较高的活力,保证萌发过程的顺利进行(Johri & Vasil, 1961)。硼可以直接参与果胶酶的合成,因此间接地参与了花粉管细胞膜的合成(杨晓冬,1999)。本研究表明,硼酸浓度在20~35 mg/L时促进花粉萌发,超过35 mg/L反而会抑制花粉萌发。本研究还表明硝酸钙和硝酸钾对麻疯树花粉离体萌发有显著作用。一定浓度的 Ca^{2+} 、 K^{+} 促进花粉萌发效应已在拟南芥、南非醉茄等中得到证实(Fan et al, 2001; Ramanjan & Subrata, 2013)。此外,响应面分析结果表明蔗糖与硼酸、蔗糖与硝酸钙、蔗糖与硝酸钾的交互作用对萌发率也有显著影响,这种交互作用在杨花粉萌发试验中得到体现(杜克兵等,2007)。这可能是蔗糖与硼酸形成的蔗糖-硼酸络合物复合物,钙离子、钾离子与蔗糖形成离子络合物比蔗糖能更好的吸收、运输和代谢(Gauch & Dugger, 1953)。

响应面模型进行优化后得到萌发率最高时的培养基各营养成分的比例为13.77%蔗糖+32.14 mg·L⁻¹硼酸+22.21 mg·L⁻¹硝酸钙+19.95 mg·L⁻¹硝酸钾+200 mg·L⁻¹硫酸镁,采用此培养基得到的花粉

实际萌发率与理论响应值相吻合,同时也表明利用BBD设计的响应面模型进行麻疯树花粉离体萌发培养条件优化方法的有效性。

本研究通过 Box-Behnken 设计的响应面法得到了花粉离体萌发的最佳培养基组合,然而盛花期每朵雄花产生的花粉粒减少,活性花粉数降低;一天中不同时间麻疯树花粉萌发率存在差异(刘波洋, 2013)。本研究相关实验进一步表明 pH 值为 5.0~5.5、温度为 25 ℃、光照为 600 lx 时麻疯树花粉萌发率最高,花粉管生长最好。因此,在麻疯树种植的生产实践中可收集并储藏开花初期的花粉待盛花期时进行人工授粉,并注意选择授粉时间段,以期提高麻疯树的人工授粉率。

参考文献:

ABDELGADIR HA, JOHNSON SD, VAN STADEN J, 2012. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) [J]. S Afr J Bot, 79: 132-139.

ANNADURAI G, 2000. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan [J]. Bioproc Eng, 23: 451-45.

BECKER K, MAKKAR HPS, 2008. *Jatropha curcas*: a potential source for tomorrow's oil and biodiesel [J]. Lipid Technol, 20: 104-107.

BREWBAKER JL, KWACK BH, 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth [J]. Am J Bot, 50:859-865.

DU KB, SHEN BX, XU L, et al, 2007. Changes of viability of stored *Poplar* pollens and its feasibility for cross breeding [J]. J Huazhong Agric Univ, 26(3):385-389. [杜克兵, 沈宝仙, 许林, 等, 2007. 不同贮藏条件下杨树花粉活力变化及隔年杂交授粉应用的可行性研究 [J]. 华中农业大学学报, 26(3): 385-389.]

FAN LM, WANG YF, WANG H, et al, 2001. *In vitro Arabidopsis* pollen germination an characterization of inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts [J]. J Exp Bot, 52 (361), 1 603-1 614.

GAUCH HG, DUGGER WMJR, 1953. The role of boron in the translocation of sucrose [J]. Plant Physiol, 28(3):457-466.

JOHRI BM, VASIL IK, 1961. Physiology of pollen [J]. Bot Rev, 27(3): 318-381.

LI C, YU M, CHEN F, WANG SH, 2010. *In vitro* maturation and germination of *Jatropha curcas* microspores [J]. Int J Agric Biol, 12:541-546.

LI K, YIN WL, LUO CW, 2007. Breeding system and pollination ecology in *Jatropha curcas* [J]. For Res, 20(6):775-781. [李昆, 尹伟伦, 罗长维, 2007. 小桐子繁育系统与传粉生态学 研究 [J]. 林业科学研究, 20(6):775-781.]

LI SJ, ZHAN YG, YANG CP, et al, 2009. Response surface meth-

odology to determine the optimal medium for pollen germination for *Ash* [J]. Chin Bull Bot, 44(2):223-229. [李淑娟, 詹亚光, 杨传平, 等, 2009. 基于响应面法的白蜡属花粉离体萌发培养基优化 [J]. 植物学报, 44(2):223-229.]

LIN J, ZHOU XW, TANG KX, et al, 2004. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* [J]. J Trop & Subtrop Bot, 12 (3):285-290. [林娟, 周选围, 唐克轩, 等, 2004. 麻疯树植物资源研究概况 [J]. 热带亚热带植物学报, 12(3):285-290.]

LIU BY, WU J, TANG L, et al, 2013. Analysis on the conditions of the *Jatropha curcas* L. pollen germination and the establishment of percoll separation system [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 50(1):165-170. [刘波洋, 吴军, 唐琳, 等, 2013. 麻疯树花粉萌发条件分析及 percoll 分离体系的建立 [J]. 四川大学学报·自然科学版, 50(1):165-170.]

QUAN QM, LI YX, WU CM, et al, 2007. Pollen germination and growth of *Epimedium brevicornum* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 27(10):2 002-2 008. [权秋梅, 黎云祥, 吴春梅, 等, 2007. 淫羊藿花粉萌发及花粉管生长研究 [J]. 西北植物学报, 27(10):2 002-2 008.]

QIN JS, 1994. 用凹形载玻片测定花粉管的生长 [J]. Plant Physiol Comm, 2:156. [秦家顺, 1994. 用凹形载玻片测定花粉管的生长 [J]. 植物生理学通讯, 2:156.]

RAMANJAN G, SUBRATA M, 2013. Effect of some nutrients on *in vitro* pollen germination of *Withania Somnifera* (L.) Dunal [J]. Ann Plant Sci, 2(6):182-187.

SUN AQ, CHANG WG, HAN B, et al, 2010. Study on pollen viability and storage methods of different *Chinese jujubes* [J]. Chin Agric Sci Bull, 26(1):166-168. [孙爱芹, 常伟光, 韩斌, 等, 2010. 不同枣品种花粉生活力及贮藏方法研究 [J]. 中国农学通报, 26(1):166-168.]

WANG J, YANG ZL, YANG X, et al, 2013. Pollen germination and pollen tube growth of wild *Magnolia officinalis* as observed [J]. J Eco Rur Environ, 29(1): 53-57. [王洁, 杨志玲, 杨旭, 等, 2013. 野生厚朴花粉萌发及花粉管生长过程观察 [J]. 生态与农村环境学报, 29(1): 53-57.]

Yang L, Liao K, Xu Z, et al, 2009. Primary studies on pollen vitality of *malus sieversii* (Ledeb.) Rome. [J]. Chin Agric Sci Bull, 25 (23):335-338. [杨磊, 廖康, 许正, 等, 2009. 新疆野苹果花粉活力的研究初报 [J]. 中国农学通报, 25(23):335-338.]

YANG XD, SUN SQ, LI YQ, 1999. Boron deficiency causes changes in the distribution of major polysaccharides of pollen tube wall [J]. Acta Bot Sin, 41(11):1 169-1 176. [杨晓冬, 孙素琴, 李一勤, 1999. 硼缺乏导致花粉管细胞壁多糖分布的改变 [J]. 植物学报, 41(11):1 169-1 176.]

YANG Q, PENG DP, DUAN ZB, et al, 2007. Study on pollination biology of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) [J]. S Chin Agric Univ: Nat Sci Ed, 28(3):62-66. [杨清, 彭代平, 段柱标, 等, 2007. 小桐子传粉生物学研究 [J]. 华南农业大学学报·自然科学版, 28(3):62-66.]

ZHAO JW, LI L, PENG JY, 2012. Pollination characteristics and pollen viability test of different pear cultivars [J]. J Plant Genet Resour, 13(1):152-156. [赵纪伟, 李莉, 彭建营, 2012. 梨不同品种花粉生活力测定及授粉特性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 13(1):152-156.]