

王昌陵,曹永强,张立军,等. 响应面法对大豆花粉离体萌发主要影响因子的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):94-98.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.025

# 响应面法对大豆花粉离体萌发主要影响因子的优化

王昌陵,曹永强,张立军,王文斌,闫春娟,孙旭刚,宋书宏

(辽宁省农业科学院作物研究所,辽宁沈阳 110161)

**摘要:**以辽宁省审定的大豆品种辽豆 15 号花粉为材料,探讨大豆花粉在离体培养条件下萌发、生长的主要影响因子。采用单因素试验筛选出大豆花粉萌发培养基最佳碳源为蔗糖,  $\text{Ca}^{2+}$  源为  $\text{CaCl}_2$ ,有效植物生长调节剂为  $\text{GA}_3$ 。通过 Plackett - Burman 设计法对影响大豆花粉管生长的 8 个因素进行了评价,筛选出具有显著效应的 3 个因素:初始 pH 值、蔗糖、 $\text{GA}_3$ 。用最陡爬坡路径逼近花粉管长度响应区域,通过响应面法确定主要影响因素的最佳水平组合。结果表明,大豆花粉离体萌发的各影响因子的最佳水平组合为蔗糖浓度 19.2%、 $\text{GA}_3$  68.9 mg/L、初始 pH 值 6.47、 $\text{H}_3\text{BO}_4$  0.015%、 $\text{CaCl}_2$  0.05%、PEG - 4000 7.5%、温度 25 ℃、时间 3 h。优化后离体培养花粉管长度达 391.95  $\mu\text{m}$ ,比优化前提高 32.68%。

**关键词:**大豆花粉;萌发;Plackett - Burman 设计;响应面法;优化

**中图分类号:** S565.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0094-05

高等植物有性生殖过程中,花粉萌发是极为重要的环节<sup>[1]</sup>。花粉萌发率、花粉管长度是直接反映植物生殖活力的主要标志。在大豆常规育种过程中,对亲本进行选择配制以及开展杂交大豆育种、不育系研究,都涉及到大豆花粉的萌发问题<sup>[2-4]</sup>。花粉萌发时花粉粒吸水膨大,花粉粒内壁沿萌发孔向外突出,最后形成花粉管<sup>[5]</sup>,是极为复杂的生理过程<sup>[6]</sup>。花粉离体萌发需要碳源<sup>[7]</sup>、矿物质元素及生长调节剂<sup>[8]</sup>的参与,只有在培养基中含有足量且合适的营养组分并在适宜的 pH 值、温度等条件下,花粉才能正常萌发生长<sup>[9]</sup>。由于涉及到多个可变因子,如何快速有效地筛选出主要因素并进行优化是该研究领域的关键问题之一。Plackett - Burman (PB) 设计法是一种经济有效的二水平试验设计方法<sup>[10]</sup>,可以利用最少的试验次数,从众多考察因素中快速有效地筛选出主要的影响因素<sup>[11-12]</sup>。响应面法 (response surface methodology, RSM) 是一种优化生物过程的综合技术,可同时对影响生物产量的因子水平及交互作用进行优化与评价<sup>[13]</sup>,快速有效地确定多因子系统的最佳条件,该法已被广泛应用于生物过程优化<sup>[14]</sup>。大豆花粉萌发能力的差异直接影响对大豆有性繁殖能力及育种价值评价结果。前人对于大豆花粉离体培养报道较少。本研究应用 Plackett - Burman (PB) 设计法筛选影响大豆花粉萌发的主要因素,并通过响应面法确定主要影响因素的最佳水平组合,对大豆花粉萌发培养条件进行优化,旨在为大豆杂交育种、亲本配制研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为辽豆 15 号,为笔者所在单位选育的北方春大豆品种,种植于辽宁省农业科学院试验田内。

### 1.2 花粉采集方法

7 月中上旬 R2 时期 (盛花期),于发育正常的植株上选取花蕾,花蕾大小尽量一致,并符合当日可做杂交父本的标准,用镊子取下后置于干净离心管内放于 4 ℃ 冰箱保存,当日使用。

### 1.3 花粉培养方法

采用液体培养基培养花粉<sup>[15]</sup>。按照不同试验处理配制液体培养基,用移液器滴 1 滴在凹形载玻片上。将花蕾的萼片、花瓣剥开,用镊子夹取花药在液滴表面快速轻蘸一下,使花粉在培养基上分散开即可。为保持湿度,将载玻片放在铺有湿滤纸的培养皿中,置于恒温培养箱内 25 ℃ 静置培养 3 h。培养结束后放 4 ℃ 冰箱保存。

### 1.4 花粉发育指标的测定

**1.4.1 萌发率的测定** 培养后使用莱卡 DM750 型显微镜进行观测。当花粉管的长度大于花粉粒的直径时计为萌发。统计萌发、未萌发的花粉粒数,萌发率计算公式如下:萌发率 = 萌发的花粉数 / 总的花粉数  $\times 100\%$ 。每个试验处理随机选取 3 个视野,每个视野所统计的花粉粒不少于 100 粒。

**1.4.2 花粉管长度的测定** 选取已萌发的花粉,用显微镜随机选取 3 个视野拍照,用 Image - Pro Plus 图像分析软件测量花粉管的长度。每个样品至少测定 50 个花粉管,计算平均长度、标准差。

### 1.5 单因素试验

以 30 mmol/L MES 为母液,加入 10% 蔗糖 + 0.05%  $\text{CaCl}_2$  + 0.02%  $\text{H}_3\text{BO}_4$  + 10% PEG - 4000 等成分, pH 值调至 6.0,作为基础培养基。探讨碳源、 $\text{Ca}^{2+}$ 、植物生长调节剂等单因素对大豆花粉萌发率及花粉管长度的影响时,保持基础培

收稿日期:2015-03-02

基金项目:辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划 (编号:2015029)。

作者简介:王昌陵 (1981—),男,硕士,副研究员,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:bp672155@icloud.com。

通信作者:宋书宏,博士,研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:lnsoybean@163.com。

培养基的其他组分不变,只改变探讨因素的种类、浓度,在相同条件下培养并测定花粉发育指标<sup>[16]</sup>。

1.5.1 碳源的选择试验 分别使用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉、山梨醇作为碳源,浓度均为10%。

1.5.2 Ca<sup>2+</sup>源的选择试验 分别使用CaCl<sub>2</sub>、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>作为Ca<sup>2+</sup>来源,Ca<sup>2+</sup>浓度均为0.05%。

1.5.3 植物生长调节剂的选择试验 分别在基础培养基(CK)中加入10 mg/L 萘乙酸(NAA)、100 mg/L 赤霉素(GA<sub>3</sub>)、10 mg/L 2,4-D、50 mg/L 6-BA等植物生长调节剂<sup>[17]</sup>。

1.6 Plackett – Burman(PB)设计<sup>[18]</sup>

根据单因素试验确定的培养基组分及前期研究确定的各组分浓度范围,对影响花粉萌发的8个因素进行考察。按PB设计安排主要影响因素的筛选试验,每个因素选取低浓度和高浓度分别作为PB试验中的低水平“-1”“+1”,响应值为花粉管长度(μm),自变量及其代号编码和水平见表1<sup>[19]</sup>。

表1 Plackett – Burman 设计的因素水平及编码

因素	编码	水平	
		低(-1)	高(+1)
蔗糖	x <sub>1</sub>	5%	10%
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	x <sub>2</sub>	0.01%	0.02%
CaCl <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	0.05%	0.10%
PEG-4000	x <sub>4</sub>	5%	10%
GA <sub>3</sub>	x <sub>5</sub>	20 mg/L	50 mg/L
初始pH值	x <sub>6</sub>	5.5	5.7
温度	x <sub>7</sub>	20℃	30℃
时间	x <sub>8</sub>	2 h	4 h

1.7 最陡爬坡试验

根据PB试验所得的回归模型,由主要影响因素的偏回归系数确定蔗糖、GA<sub>3</sub>、初始pH值的最速增长步长<sup>[20]</sup>,试验设计见表2。

表2 最陡爬坡试验设计

因素	原点	变化区间	Δx	ΔX
蔗糖(%)	7.5	2.5	0.497	1.25
GA <sub>3</sub> (mg/L)	35.0	15	0.212	3.00
初始pH值	5.6	0.1	1.000	0.10

1.8 响应面法(RSM)

通过最陡爬坡试验趋近最优点的临近区域后,采用中心组合设计(central composite design,CCD)构建模型,以响应面法寻找最优培养条件<sup>[21]</sup>。选取花粉管长度为响应值,自变量为主要影响因素的水平。各因素编码水平见表3。

表3 试验因素水平和编码

水平	编码		
	x <sub>1</sub> :蔗糖(%)	x <sub>5</sub> :GA <sub>3</sub> (mg/L)	x <sub>6</sub> :初始pH值
上星号臂水平(1.682)	22.96	87.23	6.67
上水平(1)	21.25	77.00	6.60
零水平(0)	18.75	62.00	6.50
下水平(-1)	16.25	47.00	6.40
下星号臂水平(-1.682)	14.55	36.77	6.33
步长	2.50	15.00	0.10

1.9 数据分析

采用Design – Expert 软件和Microsoft Excel 软件统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 花粉萌发及花粉管生长的单因素选择试验

2.1.1 碳源的选择 由图1可知,几种常见碳源中,蔗糖最易被大豆花粉利用,蔗糖处理下大豆花粉萌发率(68.96 ± 3.01)%及花粉管长度(295.41 ± 26.51) μm 均为最高值;其次为麦芽糖,萌发率为(60.00 ± 4.22)%,花粉管长度为(249.77 ± 15.23) μm;葡萄糖、山梨醇等碳源对大豆花粉萌发的促进作用较小。各碳源对萌发率、花粉管长度的影响达极显著水平。由此确定大豆花粉萌发培养中选择蔗糖作为碳源。

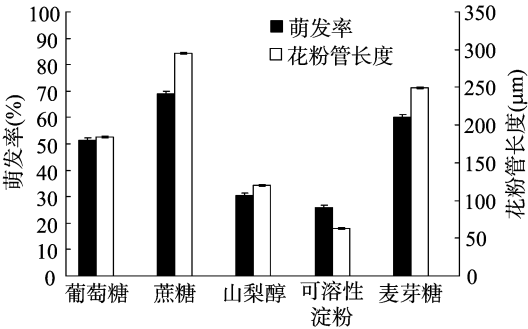


图1 碳源对大豆花粉萌发率及花粉管长度的影响

2.1.2 Ca<sup>2+</sup>源的选择 使用CaCl<sub>2</sub>作为Ca<sup>2+</sup>来源进行培养,大豆花粉萌发率为(68.96 ± 3.01)%,花粉管长度为(295.41 ± 26.51) μm,均高于使用Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>作为Ca<sup>2+</sup>来源的萌发率(57.98 ± 4.93)%和花粉管长度(219.33 ± 29.61) μm。由此确定选择CaCl<sub>2</sub>在大豆花粉萌发培养中作为Ca<sup>2+</sup>来源。

2.1.3 植物生长调节剂的选择 由图2可以看出,不同的植物生长调节剂对大豆花粉萌发影响不同。添加GA<sub>3</sub>后,大豆花粉萌发率、花粉管长度分别为(75.65 ± 2.74)%、(325.19 ± 13.59) μm,均高于对照的萌发率(68.96 ± 3.01)%、花粉管长度(295.41 ± 26.51) μm;添加NAA后,萌发率(72.32 ± 3.74)%比对照略有增加,花粉管长度(277.61 ± 13.81) μm有所降低;添加2,4-D、6-BA均抑制了大豆花粉萌发。因此在培养基中加入合适浓度的GA<sub>3</sub>对大豆花粉萌发有促进作用。

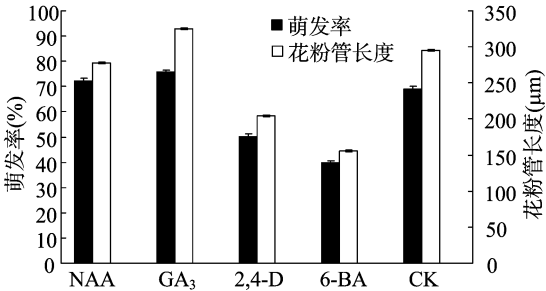


图2 植物生长调节剂对大豆花粉萌发率及花粉管长度的影响

2.2 大豆花粉萌发主要影响因素的确定

利用Design – Expert 软件对Plackett – Burman 试验结果

(表 4) 进行分析,得到响应值(花粉管长度)与各因素间的回归模型:

$$y = 312.93 + 10.78x_1 + 0.40x_2 - 1.75x_3 + 0.66x_4 + 8.35x_5 + 24.90x_6 + 2.12x_7 + 0.21x_8。$$
 (1)

式中: $y$  为花粉管长度的预测值, $x_1、x_2、\cdots、x_8$  为自变量编码值。

由表 5 可知,该模型极显著( $P < 0.01$ );模型的调整确定系数为  $R^2_{Adj} = 0.9614$ ,说明该模型能解释 96.14% 响应值的变化,试验误差小,因而该模型是合适的。 $x_1、x_5、x_6$  为显著影响因素( $P < 0.05$ ),且均为正效应,因此选取这 3 个因素的中心水平为原点进行下步优化。 $x_3$  为负效应,取低水平值;其他因素取中间水平。

2.3 最陡爬坡试验

根据模型(1),得出  $x_1、x_5、x_6$  的最速增长步长,由此形成

表 4 Plackett – Burman 试验设计和结果

试验号	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$	$x_8$	花粉管长度 ( $\mu\text{m}$ )
1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	287.28
2	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	284.16
3	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	349.46
4	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	334.72
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	321.66
6	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	282.14
7	1	-1	-1	1	1	1	1	1	362.24
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	336.84
9	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	314.95
10	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	322.02
11	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	291.44
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	268.19

表 5 Plackett – Burman 试验设计结果方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性排序
模型	9 768.590 9	8	1 221.073 9	35.261 7	0.007 0	
$x_1$	1 393.638 5	1	1 393.638 5	40.245 0	0.007 9	2
$x_2$	1.952 1	1	1.952 1	0.056 4	0.827 6	7
$x_3$	36.680 0	1	36.680 0	1.059 2	0.379 1	5
$x_4$	5.200 8	1	5.200 8	0.150 2	0.724 2	6
$x_5$	837.338 1	1	837.338 1	24.180 4	0.016 1	3
$x_6$	7 439.124 0	1	7 439.124 0	214.824 4	0.000 7	1
$x_7$	54.102 5	1	54.102 5	1.562 4	0.299 9	4
$x_8$	0.554 7	1	0.554 7	0.016 0	0.907 3	8
残差	103.886 6	3	34.628 9			
总离差	9 872.477 5	11				
$R^2 = 0.989 5$				$R^2_{Adj} = 0.961 4$		

12 个试验点的最陡爬坡试验方案,实施结果见表 6。由表 6 可以看出,直到第 10 个试验点响应值都是增加的,以后花粉管长度逐渐减小,说明花粉萌发的最优条件在蔗糖 18.75%、 $\text{GA}_3$  62 mg/L、初始 pH 值为 6.5 附近区域,因此采用 RSM 拟合新的二阶模型进一步优化。

表 6 最陡爬坡试验结果

试验点	$x_1$	$x_5$	$x_6$	花粉管长度 ( $\mu\text{m}$ )
1. 原点	7.50	35	5.6	336.44
2. +1 $\Delta$	8.75	38	5.7	345.66
3. +2 $\Delta$	10.00	41	5.8	351.28
4. +3 $\Delta$	11.25	44	5.9	360.95
5. +4 $\Delta$	12.50	47	6.0	365.14
6. +5 $\Delta$	13.75	50	6.1	367.02
7. +6 $\Delta$	15.00	53	6.2	373.72
8. +7 $\Delta$	16.25	56	6.3	384.84
9. +8 $\Delta$	17.50	59	6.4	391.46
10. +9 $\Delta$	18.75	62	6.5	395.24
11. +10 $\Delta$	20.00	65	6.6	386.35
12. +11 $\Delta$	21.25	68	6.7	372.99

2.4 响应面法优化培养条件

2.4.1 二次回归模型的建立及检验 以最陡爬坡试验的第 10 个试验点为零水平试验点,运用中心组合设计,以花粉管长度为响应值,设计 20 组试验,试验结果见表 7。利用

表 7 中心组合设计及试验结果

试验号	$x_1$	$x_5$	$x_6$	花粉管长度 ( $\mu\text{m}$ )
1	-1	-1	-1	384.28
2	1	-1	-1	387.19
3	-1	1	-1	387.16
4	1	1	-1	390.14
5	-1	-1	1	378.37
6	1	-1	1	381.49
7	-1	1	1	382.63
8	1	1	1	384.43
9	-1.682	0	0	383.66
10	1.682	0	0	386.44
11	0	-1.682	0	387.02
12	0	1.682	0	391.95
13	0	0	-1.682	385.84
14	0	0	1.682	378.07
15	0	0	0	395.41
16	0	0	0	392.53
17	0	0	0	393.37
18	0	0	0	391.25
19	0	0	0	396.29
20	0	0	0	393.44

Design – Expert 软件对表 7 数据进行回归分析,得到二次回归模型:

$y = 393.73 + 1.13x_1 + 1.56x_5 - 2.56x_6 - 0.16x_1x_5 - 0.12x_1x_6 + 0.17x_5x_6 - 3.18x_1^2 - 1.61x_5^2 - 4.27x_6^2$ 。(2)  
式中:  $y$  为花粉管长度预测值;  $x_1$ 、 $x_5$ 、 $x_6$  分别为蔗糖、GA<sub>3</sub>、初始 pH 的编码值。

由方差分析结果(表 8)可见,该模型极显著( $P < 0.01$ ),失拟项在  $\alpha = 0.1$  水平上不显著( $P = 0.967\ 1 > 0.1$ ),且该模型的确定系数为  $R^2 = 96.35\%$ ,表明模型与实际情况拟合很好,证明该模型是合适的。

表 8 中心组合试验模型方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	526.711 8	9	58.523 5	29.365 5	<0.000 1
$x_1$	17.558 7	1	17.558 7	8.810 5	0.014 1
$x_5$	33.287 0	1	33.287 0	16.702 5	0.002 2
$x_6$	89.276 3	1	89.276 3	44.796 4	<0.000 1
$x_1x_5$	0.195 3	1	0.195 3	0.098 0	0.760 7
$x_1x_6$	0.117 6	1	0.117 6	0.059 0	0.813 0
$x_5x_6$	0.234 6	1	0.234 6	0.117 7	0.738 6
$x_1^2$	145.443 0	1	145.443 0	72.979 2	<0.000 1
$x_5^2$	37.301 1	1	37.301 1	18.716 7	0.001 5
$x_6^2$	262.893 1	1	262.893 1	131.912 5	<0.000 1
残差	19.929 4	10	1.992 9		
失拟项	2.750 6	5	0.550 1	0.160 1	0.967 1
纯误差	17.178 8	5	3.435 8		
总离差	546.641 1	19			
$R^2 = 0.963\ 5$			$R^2_{Adj} = 0.930\ 4$		

2.4.2 响应面交互作用分析及优化 RSM 图形是响应值( $y$ )对各试验因素  $x_1$ 、 $x_5$ 、 $x_6$  所构成的三维空间曲面图,从 RSM 分析图上可以找出最佳参数以及各参数之间的相互作用,从 RSM 等高线图上可以直观地反映出各因素对响应值的影响,从而分析各交互作用对花粉管长度的影响。

由图 3、图 4、图 5 可以看出,蔗糖浓度、GA<sub>3</sub> 浓度、初始 pH 值各因素之间存在着明显的交互作用,且在低水平范围内,同时升高各因素可以提高花粉管生长量;提高过大会抑制花粉管生长。通过对模型(2)求导和解逆矩阵,可以得到模型的极值点:蔗糖 19.2%、GA<sub>3</sub> 68.9 mg/L、初始 pH 值 6.47、H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0.015%、CaCl<sub>2</sub> 0.05%、PEG-4000 7.5%、温度 25℃、时间 3 h,此时模型预测的最大响应值为 394.56 μm。采用上述优化条件进行培养验证试验,得到花粉管长度为 391.95 μm,与预测值相近,证明该模型能较好地预测花粉管生长;优化后花粉萌发水平(花粉管长度 391.95 μm)比优化前(花粉管长度 295.41 μm)提高 32.68%。

3 结论与讨论

植物花药中花粉发育过程积累的淀粉是其萌发时重要的能量来源,淀粉积累的程度也可作为衡量花粉成熟的标志之一<sup>[22]</sup>。但在离体培养环境下,只具备内源的能量供给时难以完成花粉萌发和花粉管生长的过程,还需要通过人工技术尽量满足植物激素、pH 值、温度等条件。对于一些自然环境下花粉难以萌发的珍贵物种,要以人工手段模拟甚至超越自然条件才能辅助其完成生殖过程。因此对于花粉离体培养萌发中涉及的各种因素及其重要性,需要进行系统地分析优化。生物过程优化常用单因素法、正交法。单因素法只针对某一

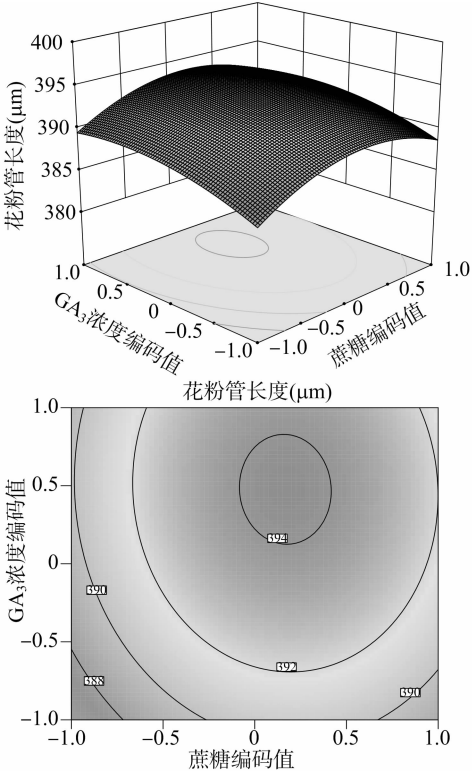


图3 GA<sub>3</sub>与蔗糖交互影响大豆花粉管长度的响应面和等高线

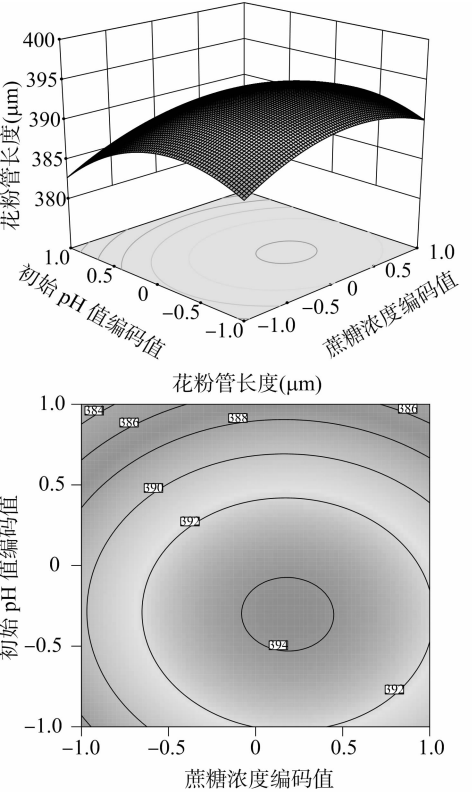


图4 初始 pH 值与蔗糖交互影响大豆花粉管长度的响应面和等高线

因素的影响,常用于确定某一因素的范围,不能反映多因素的综合效应,难以取得优化的最佳结果。正交法研究多因素多水平组合是一种高效率、经济的试验方法,但只能对孤立的试验点进行分析,考虑因素之间的交互作用时,正交试验次数会

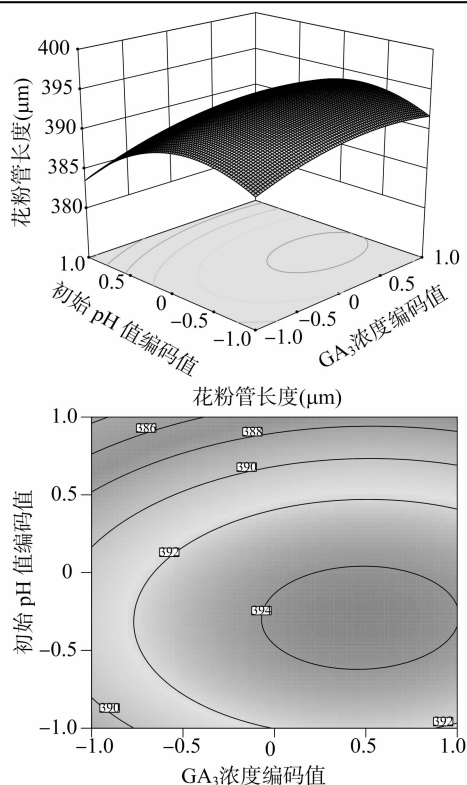


图5 初始 pH 值与 $GA_3$ 交互影响花粉管长度的响应面和等高线

大大增加。单因素试验确定初始培养条件后,采用 Plackett - Burman 设计法,可以用较少的试验次数从众多相关影响因素中筛选出主要影响因素,为进一步的优化试验指明方向。响应面分析法是 1951 年 Box - Wilson 开发的一种用于化学过程因子优化的综合性方法,采用多元二次回归模型的方法,拟合各因素与响应值之间的函数关系,可连续地对试验的各个水平进行分析,能快速对主要影响因素进行优化和评价,用于研究多因子系统中因子交互作用达到最大响应值时所对应的最佳条件<sup>[23]</sup>,是降低开发成本、优化试验条件、提高生产效率、解决实际生产问题的更为有效的方法。近几年,响应面法不仅在化学工业、生物学、医学以及生物制药领域得到广泛应用,而且在食品学、工程学、生态学等方面也得到了应用<sup>[24]</sup>。同时,响应面法不仅用于各行业的优化,还可以用于动力学常数的确定、酶稳定性、动力学研究。本试验采用 Plackett - Burman 设计法、最陡爬坡路径法和响应面分析法(RSM)中的 Central - Composite 设计相结合,对大豆花粉萌发的影响因素进行研究,确定了培养基中添加蔗糖、 $CaCl_2$ 、 $GA_3$  可以促进花粉萌发;并筛选出蔗糖、 $GA_3$ 、初始 pH 值为影响花粉萌发的主要因素,且三者均为正效应。响应面法确定最佳培养条件为:蔗糖浓度 19.2%、 $GA_3$  浓度 68.9 mg/L、初始 pH 值 6.47、 $H_3BO_4$  0.015%、 $CaCl_2$  0.05%、PEG - 4000 7.5%、温度 25℃、时间 3 h,此条件下,花粉管长度达 391.95  $\mu m$ ,比优化前 295.41  $\mu m$  提高 32.68%。

#### 参考文献:

- [1] 赵丽梅,孙 寰,黄 梅,等. 大豆结实率与花粉败育率之间的关系[J]. 大豆科学,2004,23(4):249 - 252.
- [2] 宋淑波,刁艳辉,董金秋. 大豆杂交结实率低的原因及应对措施

- [J]. 现代化农业,2009,31(6):11.
- [3] 董德坤,高 莎,刘乐承,等. 大豆质核互作雄性不育研究进展[J]. 中国农学通报,2012,28(15):5 - 9.
- [4] 孙 寰,赵丽梅,王曙明,等. 大豆花粉育性分类标准的研究[J]. 大豆科学,2006,25(4):339 - 343.
- [5] 刘忠松,官春云,陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 北京:中国农业出版社,2001:12 - 18.
- [6] 孙 颖,孙大业. 花粉萌发和花粉管生长发育的信号转导[J]. 植物学报,2001,43(12):1211 - 1217.
- [7] Zhang H, Liang W, Yang X, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development[J]. The Plant Cell, 2010, 22(3): 672 - 689.
- [8] 程云清,张 奇,刘剑锋,等. 外源乙烯调控大豆花粉育性的研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2014,40(1):25 - 32.
- [9] 张绍玲,陈迪新,康 琅. 培养基组分及 pH 值对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报,2005,25(2):225 - 230.
- [10] Wasser S P. The design of optimum multi factorial experiments[J]. Biometrika, 1946, 33(4): 305 - 325.
- [11] 陈 合,陈世伟,李串娜,等. PB 法筛选保加利亚乳杆菌增殖培养基的研究[J]. 陕西科技大学学报:自然科学版,2014,32(2): 101 - 104.
- [12] Li Y, Liu Z, Cui F, et al. Application of Plackett - Burman experimental design and doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by alternaria Mali ND - 16 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 285 - 291.
- [13] 刘代新,宁喜斌,张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报,2008,35(2):306 - 310.
- [14] Trupkin S, Levin L, Forchiasini F, et al. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2003, 30(12): 682 - 690.
- [15] 金文林,王 媛,濮绍京,等. 小豆花粉生活力的初步观察[J]. 北京农学院学报,2003,18(1):1 - 6.
- [16] 张 璐,乔旭光,刘晓宇,等. 响应面法优化姜脯糖煮活性炭炭脱色工艺[J]. 中国农业科学,2013,46(14):3072 - 3078.
- [17] 薛晓敏,王金政,张安宁,等. 植物生长调节物质对桃花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(4):123 - 127,134.
- [18] 徐向宏,何明珠. 试验设计与 Design - Expert、SPSS 应用[M]. 北京:科学出版社,2010:194 - 203.
- [19] Liu C, Liu Y, Liao W, et al. Application of statistically - based experimental designs for the optimization of nisin production from whey [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(11): 877 - 882.
- [20] 甘 露,崔松松,倪敬田,等. 纳豆固态发酵条件优化[J]. 食品工业科技,2013,34(17):210 - 213.
- [21] 杨文雄,高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2005(2):68 - 71.
- [22] Datta R, Chamusco K C, Chourey P S. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize[J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 1645 - 1656.
- [23] 李 孱,白景华,蔡昭铃,等. 细菌素发酵培养基的优化及动力学初步分析[J]. 生物工程学报,2001,17(2):187 - 192.
- [24] 李春慧,蒲万霞,吴 润,等. 响应面法对啤酒酵母菌制剂培养条件的优化[J]. 中国兽医科学,2014,44(10):1095 - 1100.