

金银忍冬花粉离体萌发初探

许珂, 古松*, 江莎*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:以金银忍冬 [*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.] 为试材, 研究了不同种类糖、硼酸、钙离子、pH 值、光照等单因子对花粉萌发的影响。结果表明, 培养基中分别含有 25% 的蔗糖、0.01% 的硼离子、0.02% ~ 0.05% 的钙离子以及 pH 6.7 时较适合金银忍冬的花粉萌发, 萌发率分别为 85.63%、59.23%、78.12% 和 75.27%; 培养基中不同种类的糖对花粉萌发的影响不同, 以乳糖最适宜, 其次是葡萄糖、蔗糖和果糖; 在光照 ($0.5625 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 与黑暗下培养, 金银忍冬花粉的萌发率没有明显的变化, 但黑暗条件更利于花粉管的生长。金银忍冬花粉在含有 25% 蔗糖、0.01% 硼离子、0.02% 钙离子、pH 为 6.7 的培养基上光照培养 3 d, 其花粉萌发率均达到 80% 以上, 最高的萌发率可达 88.1%。

关键词: 金银忍冬; 花粉; 萌发率; 生活力

中图分类号: Q944.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)02-0109-07

A Preliminary Study of Pollen Germination *in vitro* of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.

XU Ke, GU Song*, JIANG Sha*

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The effects of sucrose, boric acid, calcium, pH, and illumination on the fresh pollen germination of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. were studied. The results shown that the pollen germination rate were 85.63%, 59.23%, and 78.12%, when medium supplied with 25% sucrose, 0.01% boric acid, 0.02% ~ 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, respectively, and the germination rate got 75.27% cultured under pH 6.7. The effects of carbohydrates on pollen germination rate in order were sucrose > glucose > lactose > fructose. There was not significant difference of pollen germination rate under illumination ($0.5625 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark, but the length of pollen tube was longer under the dark than under the illumination. The optimal medium for pollen germination consist of 25% sucrose, 0.01% boric acid, 0.02% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ at pH 6.7 and under illumination, in which the pollen germination rate reached 88.1%.

Key words: *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.; Pollen; Germination rate; Pollen vigor

花粉是许多植物有性生殖途径中进行遗传物质传递的载体, 其活力的有无直接影响遗传物质传递的成败^[1]。一般是通过测定花粉萌发率来反映花粉的活力。花粉萌发率由两个因素决定: 一是花粉本身的活力, 二是花粉萌发的条件。在离体条件

下, 必须提供花粉萌发一个最适的条件^[2]。

大多数植物花粉培养基一般由琼脂、蔗糖和硼酸组成^[1]。车代弟^[1]认为硼酸作为微量元素虽对花粉的萌发具有促进作用, 但不是越多越好。有研究表明花粉管体外生长通常受钙、葡萄糖和水分的影

收稿日期: 2007-06-04

接受日期: 2007-12-04

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目; 南开大学科研启动基金项目; 国家林业局 948 项目(2006-4-02); 天津市自然科学基金项目(07JCYBJC12400, 07JCYBJC12500)资助

* 通讯作者 Corresponding author

响^[3-4]。张颖等^[5]的研究表明,硼、钙、镁、钾对矮牵牛(*Petunia hybrida*)的花粉萌发均有一定的促进作用,其中硼处理后花粉萌发率最高,花粉管伸长最长。pH 值在花粉萌发和花粉管生长中起重要的作用^[6],离体培养实验表明花粉能在广泛的 pH 范围内正常萌发^[7-8]。张绍玲^[9]的研究表明培养基内各组分在一定浓度范围内对花粉萌发及花粉管生长起促进作用,但超过一定浓度时起抑制作用。不同植物的花粉萌发条件是不相同的,通常认为 20 ~ 30℃ 是适宜的温度范围、含有硼^[10]、钙以及碳源的培养基适于花粉萌发^[11-12]。

金银忍冬 [*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.] 是忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 (*Lonicera* L.) 植物,具有较高的观赏、园林绿化价值,是一种具有开发前景的药用植物。通过对金银忍冬花粉体外萌发的生物学特性的研究,将为金银忍冬花粉的生殖生物学研究、植物的品种改良与育种操作、种质库保存提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 花粉的采集

2006 年金银忍冬开花期采集盛开的花朵,用干净毛笔收集花粉,进行金银忍冬花粉萌发的最适单因子培养基的研究。2007 年开花前标记即将开放的花朵,之后每天上午 8:00 从一定数目已标记的花朵上收集花粉,用于研究金银忍冬花粉萌发率随花朵开放的日进程的动态变化。

1.2 花粉培养及花粉生活力测定

采用离体培养花粉测定萌发率,以花粉萌发率作为花粉生活力研究的指标,以花粉管的生长长度作为生长状况的指标。

参照胡适宜^[13]方法。选择有凹槽的载玻片,把配制好的培养基滴在载玻片的凹槽内,待培养基冷却后,用毛笔均匀撒播适量的花粉,然后将凹槽载玻片放在衬有湿滤纸或湿纱布的培养皿中,加盖,置于 25℃ 恒温培养箱中进行培养,每隔 30 min 观察一次花粉萌发和花粉管生长情况,在光学显微镜下观察培养 2 h 和 6 h 的花粉萌发情况并照相。

每个处理重复 3 次,每个重复观察 4 ~ 10 个视野,分别统计萌发率和花粉管的长度,计算平均值。花粉萌发以其花粉管伸长超过花粉直径为标准。利用 Olympus BX-51 型显微镜配合 Optics Image Analysis Institute (USA 中文 6.0 版)显微分析系统测

量花粉管长度,以 10 个花粉管平均长度作为该萌发条件下花粉管的长度。

花粉发芽率的计算公式:花粉发芽率(%) = [发芽花粉(粒)数/总花粉(粒)数] × 100%

1.3 培养基设置

基本培养基:0.5% 的琼脂,15% 的蔗糖,0.01% 的硼酸,0.05% 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 温度 25℃, 光照。

单因子实验设置:进行单因子实验时只改变基本培养基中某一因子,其它条件不变。

(1) 蔗糖浓度:10%、15%、20%、25%、30%、35% 6 个水平。

(2) 硼酸浓度:0、0.001%、0.005%、0.01%、0.02%、0.05% 6 个水平。

(3) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度:0、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.5% 6 个水平。

(4) pH:3.9、5.0、6.0、6.7、7.3、8.0 6 个水平。

(5) 糖:15% 蔗糖、15% 葡萄糖、15% 乳糖、15% 果糖。虽然花粉离体培养中多采用蔗糖作为培养基的碳源,但是,不同的糖种类对花粉萌发的影响有所不同^[8],为此,我们又设计了四种碳源对花粉萌发的影响实验。

(6) 光照的影响:光照($0.5625 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)和黑暗条件下培养。

1.3 数据分析

利用 SPSS 软件对所取得的实验数据进行统计分析,找出影响花粉萌发的主要因子。

2 结果和讨论

2.1 糖对花粉萌发和生长的影响

蔗糖对金银忍冬花粉萌发率的影响表现为单峰曲线。由图 1 可以看出,蔗糖浓度在 10% ~ 25% 之间,随蔗糖浓度的增加,花粉萌发率呈递增趋势。当蔗糖浓度为 25% 时,花粉的萌发率最高,可达 $(85.63 \pm 11.28)\%$,与其它浓度相比差异显著;当蔗糖浓度达 30% 时,花粉萌发率下降;当蔗糖浓度为 35% 时,花粉不再萌发。

蔗糖对花粉管生长也有影响,在 10% ~ 20% 浓度范围内,花粉管的长度为 $398.30 \pm 52.62 \sim 436.31 \pm 19.54 \mu\text{m}$ 。10% 时为最大值,且花粉管形态较直,每个花粉多从一个萌发孔处萌发出花粉管。当达到 25% 以上时,花粉管生长受到抑制;蔗糖浓度升至 30% 时,花粉能够萌发,但是花粉管膨

大,多从2~3个萌发孔处萌发出花粉管,花粉管的生长受到了抑制,花粉管的长度没有明显的变化。当蔗糖浓度达到35%时,花粉不能萌发,在萌发孔处膨大呈球状。由此看出,蔗糖浓度对于花粉萌发与花粉管生长的最佳浓度有所不同,对于金银忍冬来说,15%~20%是花粉萌发的最佳浓度,而10%是花粉管生长的最佳浓度。

糖类物质是植物花粉萌发及花粉管生长的重要营养成分,绝大多数研究都是以蔗糖作为培养基的成分之一。也有用葡萄糖作为培养基进行花粉萌发实验,花粉萌发效果也较好,较蔗糖而言,易被细胞吸收^[14]。一般植物花粉萌发的蔗糖质量浓度为10%~20%,蔗糖在花粉萌发过程中,除了能够为花粉提供能源外,还能够起着维持花粉与培养液之间渗透平衡的作用,以避免花粉及花粉管的破裂,同时也作为营养物质和能量来源,供给花粉管生长之用^[14]。蔗糖浓度适宜,可以在一定程度上缓解花粉破裂,但若浓度过高,则造成原生质体脱水,抑制花粉萌发^[15]。我们的研究结果也证实了10%~20%的蔗糖使金银忍冬花粉的萌发率高,而且利于花粉管的生长。

不同种类的糖对花粉萌发及花粉管生长的影响不同。由于金银忍冬开花期短,实验过程中受到时间上的限制,因此在本实验中,4种糖均采用了15%的浓度。结果表明,4种糖对金银忍冬花粉萌发的影响依次是:乳糖>葡萄糖>蔗糖>果糖,且

它们对金银忍冬花粉萌发率的影响差异显著,其中果糖对花粉管的生长具有明显的抑制作用(表1)。虽然蔗糖对金银忍冬花粉萌发率并不是最高,但是,由于蔗糖在花粉体外萌发时是一个被广泛使用的糖类,因此,本实验采用蔗糖。

张绍铃等^[9]研究了蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和乳糖对梨(*Pyrus pirifolia*)花粉萌发和花粉管生长的影响,认为4种糖类在适宜的浓度下对花粉萌发与花粉管生长均有促进作用,但是适宜于梨花粉萌发和花粉管生长的浓度有差异。蔗糖和葡萄糖的浓度以10%为宜,且蔗糖优于葡萄糖。桥詰等^[8]研究了糖类对日本泡桐(*Paulownia tomentosa*)花粉萌发的影响,认为适于花粉萌发与花粉管生长的糖类物质由高到低的顺序是乳糖、蔗糖、果糖、葡萄糖。我们的实验结果与他们的研究有所不同。

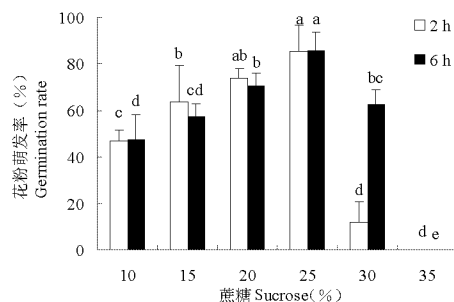


图1 蔗糖对金银忍冬花粉萌发率的影响

Fig. 1 The effects of sucrose concentration on the pollen germination rate of *L. maackii*

表1 糖种类对花粉萌发率及花粉管长度的影响

Table 1 The effects of kinds of sugar on pollen germination rate and length of pollen tube

| | 培养时间 | 蔗糖 | 葡萄糖 | 乳糖 | 果糖 |
|-----------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Culture time (h) | Sucrose | Glucose | Lactose | Fructose |
| 花粉萌发率 Pollen germination rate (%) | 2 | 47.75 ± 9.85b | 71.72 ± 5.37a | 63.61 ± 4.25a | 24.70 ± 3.83c |
| | 6 | 53.00 ± 9.67c | 71.70 ± 8.20b | 83.10 ± 4.18a | 28.00 ± 5.30d |
| 花粉管长度 Length of pollen tube (μm) | 2 | 170.18 ± 29.94ab | 141.48 ± 23.67b | 199.97 ± 7.41a | 110.36 ± 9.18c |
| | 6 | 184.33 ± 7.97b | 257.80 ± 18.95a | 296.50 ± 48.99a | 109.60 ± 26.77c |

2.2 硼对花粉萌发和生长的影响

硼离子对花粉萌发及花粉管生长具有一定的影响^[6]。由图2可以看出,金银忍冬花粉萌发率在处理浓度范围内呈一单峰曲线,峰值出现在0.01%水平上,萌发率达(59.23 ± 5.83)%,明显高于其它处理;当硼酸浓度达到0.02%时,花粉萌发率下降到(36.34 ± 1.40)%。与对照相比,随硼酸浓度的增加,

花粉管生长受到抑制,说明硼离子浓度对花粉萌发和花粉管生长的影响不同。

有研究认为硼可以促进糖的吸收与代谢,硼与糖的结合能极大地提高供试花粉的萌发率,这可能是由于硼能够与蔗糖形成络合物,易于在组织中运输和参与果胶物质的合成,以利于花粉管的建造,从而促进了花粉的萌发与花粉管的生长^[16]。外源

硼可以刺激花粉萌发和花粉管的生长。

姚成义^[6]认为,硼可以影响花粉萌发和花粉管生长,在一定浓度范围内花粉萌发率和花粉管生长随培养基内硼酸浓度的增加而增加,但超过一定浓度时硼酸对花粉萌发和花粉管生长起抑制作用,且适宜于花粉萌发和花粉管生长的浓度略有不同。本实验结果表明,在一定范围内硼酸对花粉萌发有一定的促进作用,证实了金银忍冬的花粉具有嗜硼的特点;在硼酸浓度高于某一程度时,萌发率则受到一定程度的抑制。金银忍冬花粉萌发和花粉管生长的最佳硼酸浓度存在一定的差别,可能是由于花粉的萌发和花粉管的生长对硼酸的敏感性存在一定差别的原因,因此,花粉萌发和花粉管生长所需的最适硼酸浓度不同。硼与糖的结合,能极大提高供试百合花粉的萌发率,这可能是由于硼离子能与蔗糖形成络合物,使糖易于通过质膜在组织中运输,从而促进了糖的吸收与代谢,加之硼能参与果胶物质的合成,利于花粉管壁的建造^[17]。年玉欣^[15]对百合(Lily ‘Sorbonne’)花粉研究结果表明,20 mg L⁻¹的 H₃BO₃浓度为百合花粉萌发的适宜浓度,高于 David^[18]报道的 10 mg L⁻¹,但低于其它报道^[1,19]。我们的研究结果与 David 结果一致。

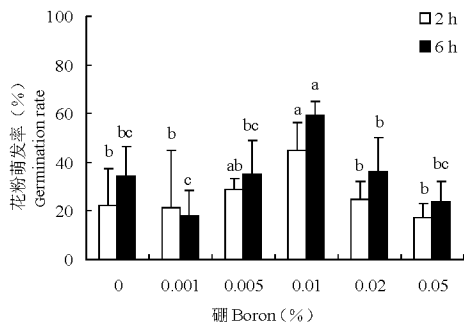


图2 硼对金银忍冬花粉萌发率的影响

Fig. 2 The effects of boric on the pollen germination rate of *L. maackii*

2.3 钙离子对花粉萌发和生长的影响

钙离子在花粉萌发过程中对花粉管的伸长及花粉管的定向生长都具有很大的促进作用^[6]。由图3可以看出,当钙离子浓度为0.01%~0.1%范围内,花粉萌发率都显著高于对照,为(55.79 ± 11.71)% ~ (75.97 ± 10.61)%。当钙离子浓度为0.02%时,萌发率最高,可达78.12%,花粉管长度达最大值,为515.73 ± 63.65 μm,是对照的两倍;当钙离子浓度达到0.5%时,花粉萌发率几乎为零,

说明较低浓度的钙离子对金银忍冬花粉的萌发与花粉管生长有促进作用,而较高的钙离子浓度则具有毒害作用。

花粉萌发和花粉管生长是植物有性生殖的重要生理过程,而钙在这一过程中起着重要的作用^[20],钙不仅是作为一种重要的营养元素,更重要的是钙可作为第二信使偶联胞外与胞内生理生化反应。外源钙可以替代花粉萌发时的群体效应^[21]。Ca²⁺是花粉萌发和花粉管生长的关键因子^[1,22],可能起胞内信使、调节细胞内酶的活性、促进细胞壁合成和调节细胞膨压等多方面的作用。一般认为胞外钙离子或者通过质膜钙通道进入花粉内起作用,或者通过胞外钙调素促进花粉萌发和花粉管的生长^[6]。花粉的离体萌发和花粉管生长需要适当的钙离子浓度:低钙或无钙的培养液中,花粉管顶端膨大,容易破裂;高钙会使花粉管停止生长^[23]。本实验中,培养基中含有适当的钙离子有助于金银忍冬花粉的萌发,但较高的钙离子浓度抑制了花粉的萌发。本研究结果证实了Ca²⁺在金银忍冬花粉萌发和花粉管生长中具有重要作用。

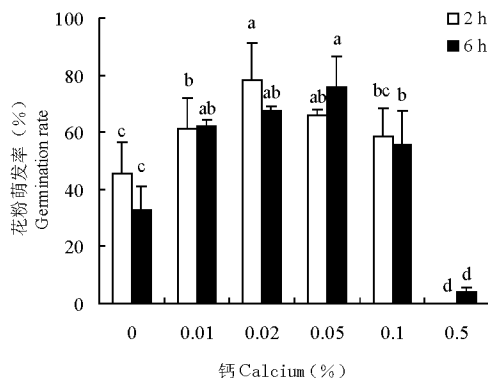


图3 钙离子对金银忍冬花粉萌发率的影响

Fig. 3 The effects of calcium concentration on the pollen germination rate of *L. maackii*

2.4 pH对花粉萌发和生长的影响

由图4、5可以看出,培养基pH值对花粉的萌发率影响不大。在pH为3.9~7.3的范围内,花粉的萌发率为(64.00 ± 9.49)% ~ (972.90 ± 10.30)%,与对照没有明显差异;pH值为6.7时,花粉萌发6h的花粉管长度最大,为519.33 μm,比其它处理的生长状况良好。当pH值达到8.0时,花粉几乎不萌发。这说明酸性条件有利于金银忍冬花粉的萌发,碱性条件下花粉的萌发率显著下降。因此,金银忍

冬花粉萌发培养基的最适条件应该为中性略偏酸性。

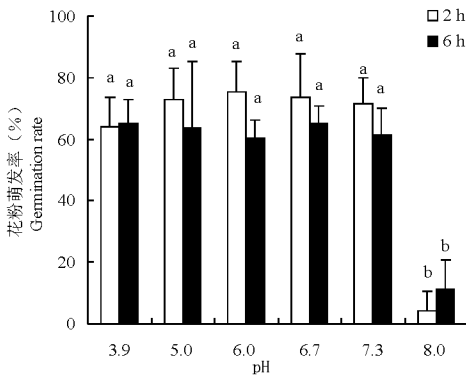


图 4 pH 值对金银忍冬花粉萌发率的影响

Fig. 4 The effects of pH on the pollen germination rate of *L. maackii*

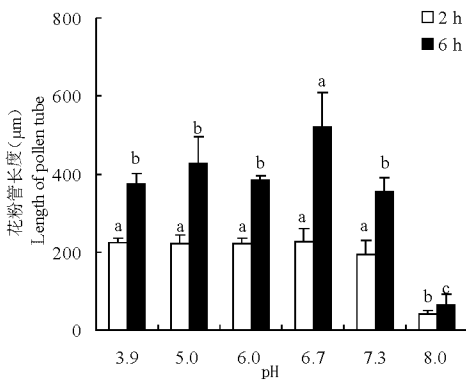


图 5 pH 值对金银忍冬花粉管生长的影响

Fig. 5 The effects of pH on the length of pollen tube of *L. maackii*

关于 pH 对花粉萌发的影响报道相对较少。有研究认为人工培养基的 pH 值对花粉萌发有影响^[8-9]。也有研究认为适合花粉萌发的 pH 值较广

泛^[23],如苹果属(*Malus*)植物的花粉在 pH 4 ~ 9 之间都能够正常的萌发^[7]。Holdaway-Clarke 等^[24]的研究也表明一定范围内的 pH 变化并不显著影响百合花粉管的生长速率。沈玉英^[25]报道,培养基 pH 值为 5.5 时,适于兔眼越橘(*Vaccinium ashei*)的花粉萌发。张绍玲^[9]认为 pH 为 6.5 时,梨(*Pyrus pirifolia*)花粉萌发率与花粉管生长最佳。橋詰等^[8]报道适于日本泡桐的花粉培养基 pH 为 7.0,但是 pH 在 4 ~ 9 的范围内萌发率均可达 80% 以上。培养基的酸碱度不同能够改善花粉内壁的透水性,在适宜的 pH 值条件下,花粉内壁质地会变软,可以增加花粉的透水性,有利于花粉的萌发^[6]。我们的研究结果与 Shivanna^[7]及橋詰等^[8]的结果是一致的。因此,我们认为,pH 对花粉萌发有影响,尽管对于一些植物而言 pH 有一个较广泛的适合范围。所以,对于不同的植物来说,pH 值的影响可能有所不同,可能有些植物花粉萌发适宜的 pH 值的范围较宽,而另一些植物则较窄,但是,适宜的 pH 值可以促进花粉萌发和花粉管生长。

2.5 光照对花粉萌发的影响

从表 2 可以看出,在光照或黑暗下培养金银忍冬花粉,花粉的萌发率及花粉管长度有差异。黑暗下的花粉萌发率及花粉管长度都比光照下大,但是邓肯检验证明二者差异不显著。说明光照与黑暗对金银忍冬花粉萌发的影响差异不显著。然而,黑暗下培养的花粉,花粉管的生长较光照培养的好,花粉管的长度也长一些,这正符合了花粉在花柱内萌发的条件。

表 2 光照与黑暗对花粉萌发率及花粉管长度的影响

Table 2 The effects of illumination and dark on pollen germination rate and pollen tube growth

| | | 培养时间 Culture time | | | | | |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | 20 min | 40 min | 1 h | 1.5 h | 2 h | 3 h |
| 光照 Illumination | 花粉萌发率 Pollen germination rate (%) | 4.39 ± 0.28c | 33.87 ± 4.70b | 43.33 ± 12.95ab | 56.29 ± 3.57a | 47.75 ± 9.85ab | 53.33 ± 9.69a |
| | 花粉管长度 Length of pollen tube (μm) | 56.38 ± 5.87d | 87.91 ± 5.08c | 110.46 ± 14.93c | 151.67 ± 5.73b | 170.18 ± 29.94ab | 184.33 ± 7.97a |
| 黑暗 Dark | 花粉萌发率 Pollen germination rate (%) | 18.37 ± 16.68c | 27.64 ± 5.66bc | 45.37 ± 8.55ab | 45.43 ± 14.49ab | 50.52 ± 5.81a | 53.67 ± 3.29a |
| | 花粉管长度 Length of pollen tube (μm) | 71.86 ± 8.69a | 164.41 ± 5.47c | 241.32 ± 13.20bc | 251.36 ± 10.87b | 297.18 ± 60.54ab | 368.66 ± 76.83a |

赵宏波^[26]对菊属几种植物的花粉离体萌发特性进行了研究,认为南京野菊(*Dendranthema indicum*)和毛华菊(*D. vestitum*)在黑暗和光照下的花粉萌发率差异不显著。徐进等^[27]报道马尾松(*Pinus massoniana*)花粉在黑暗下的花粉萌发率较光照下的高,但差异不显著;在黑暗下,花粉管的长度显著大于光照。本实验同徐进等^[27]的研究结果一致。说明花粉萌发的初始诱导阶段,光照与否对萌发率影响不大。但黑暗更利于花粉管的生长,这符合了花粉在花柱内生长的体内条件。

2.7 最适培养条件下花粉萌发率日进程的动态变化

标记的金银忍冬花朵在开花的前两天可以收集到大量的花粉;开花第三天时花朵已逐渐变黄,仍能收集到部分花粉;第四天时花朵颜色更加变黄,花粉已完全散落。开花过程中,花的大小及张开度没有变化,在花瓣颜色上有变化。

开花期能收集花粉的 4 d 中(4 月 31 日~5 月 3 日),花粉的萌发率都较高,均达到 80% 以上,没有明显的差异,最高的萌发率可达 88.1%,发生在 4 月 31 日。说明整个的花期内,在花粉散落之前花粉的活力都较高。

闫立英等^[28]研究了番茄(*Lycopersicon esculentum*)不同发育时期花蕾的花粉的生活力变化情况,随着番茄花的发育,花粉的生活力基本呈正态分布。在较小蕾、标准蕾时期,花粉几乎没有生活力,较大蕾时期花粉的生活力也较低;而大蕾期花粉的生活力为 76.99%,与盛开时花粉生活力无显著差异,花后花粉生活力迅速下降。罗素兰等^[29]认为花粉的成熟度及其生活力受花龄的影响,随着花蕾花瓣逐渐展开,花粉逐渐成熟,活力增强,并具有授粉能力;随花瓣萎缩,花粉活力逐渐减弱并丧失。

本实验对金银忍冬开花后的花粉萌发率日进程的动态变化过程进行了研究。开花后直到完全散粉,花粉的萌发率没有明显差异,即在整个盛花期中花粉的萌发率都较高。有研究认为有些植物的花粉萌发率的日进程动态变化过程呈现出正态分布趋势^[28],而本研究中没有得到这样的结果,我们认为可能的原因是:(1)目前我们的研究主要集中于开花期的花粉萌发率,而花蕾期的花粉萌发率我们没有进行研究;(2)金银忍冬花期短,只有 4~5 d 时间,花药开裂后花粉在花药上附着的时间也较短,大约只有 2~3 d 时间。因此只有在这较短的散粉时间内花粉都保持较高的活力,才能保证柱头

上得到足够的有效花粉数量,这可能也是金银忍冬的一种繁殖策略。

综上所述,我们认为金银忍冬花粉萌发的最适培养基为 25% 蔗糖 + 0.01% 硼离子 + 0.02% 钙离子,在光照($0.5625 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)下和 pH 为 6.7,萌发率可达 88.1%。

参考文献

- [1] Che D D(车代弟), Fan J P(樊金萍), Wang J G(王金刚). Study on optimization of the culture medium for oriental hybrids pollen germination [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2003, 23 (2): 178-181. (in Chinese)
- [2] 王仲礼, 孔冬瑞, 周美红. 影响被子植物花粉管萌发的因素—关于“影响被子植物花粉管萌发因素的探究”一文的补充 [J]. 生物学通报, 2005, 4(11): 24.
- [3] Mascarenhas J P. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation [J]. Plant Cell, 1993, 5: 1303-1314.
- [4] Lush W M, Grieser F, Wolters-Arts M. Directional guidance of *Nicotiana glauca* pollen tubes *in vitro* and on the stigma [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 733-741.
- [5] Zhang Y(张颖), Luo F X(罗凤霞), Nian Y X(年玉欣), et al. Studies on determination method of petunia's pollen viability [J]. Seed (种子), 2005, 24(8): 26-28. (in Chinese)
- [6] Yao C Y(姚成义), Zhao J(赵洁). Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Torenia fournieri* [J]. (武汉植物学研究), 2004, 22(1): 1-7. (in Chinese)
- [7] Shivanna. *In vitro* pollen germination and pollen tube growth [M]// Shivanna. Pollen Biology and Biotechnology. Enfield, (NH) USA: Science Publishers NC, 2003: 61-76.
- [8] 橋詰隼人, 江莎. キリの生殖に関する研究 III, 一花粉の形成と発芽— [M]. 1996: 101-104. (in Japanese)
- [9] Zhang S L(张绍铃), Chen D X(陈迪新), Kang L(康琅), et al. Effects of medium components and pH on pollen germination and tube growth in pear (*Pyrus pirifolia*) [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 2005, 25(2): 225-230. (in Chinese)
- [10] Vasil I K. Pollen germination in some Gramineae: *Pennisetum typhoides* [J]. Nature, 1960, 187: 1134-1135.
- [11] Stanley R G, Linskens H F. Pollen: Biology, Biochemistry and Management [M]. Heidelberg: Springer Verlag, 1974.
- [12] Cheng C, McComb J A. *In vitro* germination of wheat pollen on raffinose medium [J]. New Phytologist, 1992, 120: 459-462.
- [13] Hu S Y(胡适宜). Embryology of Angiosperm [M]. Beijing: Higher Education Press, 1982: 56-58. (in Chinese)
- [14] Yin J L(尹佳蕾), Zhao H E(赵惠恩). Summary of influential factors on pollen viability and its preservation methods [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2005, 21(4): 110-113. (in Chinese)
- [15] Nian Y X(年玉欣), Luo F X(罗凤霞), Zhang Y(张颖), et al. Studies on the culture solution for lily pollen vitality test [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(5): 922-925. (in Chinese)
- [16] Cui X L(崔晓龙), Wei R C(魏蓉城), Huang R(黄瑞复). Studies

- on the pollen viability of *Amomum tsao-ko* [J]. *J Yunnan Univ*(云南大学学报), 1995, 17(3): 284–289.(in Chinese)
- [17] 加藤幸雄, 志佐诚, 周永春, 刘瑞征, 译. 植物繁殖生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 176–180.
- [18] Dickinson D B. Influence of borate and pentaerythritol concentration on germination and tube growth of *Lilium longiflorum* pollen [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1978, 103(3): 413–416.
- [19] Xiong L B, Sekiya J, Shimose N. Stimulation of *Lilium* pollen germination by pyrroloquinoline quinine [J]. *Agri Biol Chem*, 1988, 52(4): 1065–1066.
- [20] Guan J F(关军锋), Ma Z H(马智宏), Zhang X M(张晓敏), et al. Ca^{2+} in relation to germination and tube growth of apple pollen [J]. (果树学报), 1999, 6(3): 176–179.(in Chinese)
- [21] 李文雄, 桂明珠, 赵妮珊, 等. 小麦大面积不结实原因的研究 [J]. 东北农学院学报, 1978(3): 1–19.
- [22] Brewbaker J L, Kwack B H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth [J]. *Amer J Bot*, 1963, 50: 859–865.
- [23] Malhor T J. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation [J]. *Plant Cell*, 1996, 81: 1935–1949.
- [24] Holdaway-Clarke T L, Weddle N M, Kim S, et al. Effect of extra cellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(380): 65–72.
- [25] She Y Y(沈玉英), Lü J L(吕家龙). Effects of chemical and physical factors on characteristics of germination and tube growth of pollen in *Vaccinium ashei* [J]. *J Jilin Agri Univ*(吉林农业大学学报), 2006, 28(2): 173–176.(in Chinese)
- [26] Zhao H B(赵宏波), Chen F L(陈发棣), Fang W M(房伟民). Pollen germination *in vitro* of chrysanthemum cultivars with small inflorescences and several species of *Dendranthema* [J]. *J Nanjing Agri Univ*(南京农业大学学报), 2005, 28(2): 22–27.(in Chinese)
- [27] Xu J(徐进), Chne T H(陈天华), Wang Z R(王章荣), et al. Effects of storage way and light on pollen viability of *Pinus massoniana* [J]. *J Nanjing For Univ*(南京林业大学学报), 1998, 22(3): 71–74.(in Chinese)
- [28] Yan L Y(闫立英), Feng Z H(冯志红), Zhang S H(张慎好), et al. Studies on the pollen viability of tomato [J]. *Seed*(种子), 2005, 24(6): 23–26.(in Chinese)
- [29] Luo S L(罗素兰), Fu L(符列), Fu C X(符传秀), et al. Identification for the pollen viability of six tomato germplasms [J]. *J Hainan Univ*(海南大学学报), 2002, 20(3): 243–246.(in Chinese)