

糖、硼、钙对思茅松花粉离体萌发及花粉管生长的影响*

陈伟^{1,2}, 李江^{1,2**}, 孟梦², 陈绍安², 冯弦²

(1. 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南昆明 650201;

2. 云南省林业和草原科学院, 云南昆明 650201)

摘要:【目的】开展思茅松花粉活力研究, 为思茅松杂交育种提供技术保障。【方法】以思茅松花粉为研究对象, 研究了蔗糖、硼酸和氯化钙单因子及正交试验对思茅松花粉萌发和花粉管生长的影响。【结果】培养基内蔗糖、硼酸和氯化钙在一定质量浓度范围内, 对花粉萌发及花粉管生长起促进作用, 花粉生活力测定最适蔗糖、硼酸和氯化钙用量分别为 10%、100 mg/L 和 100 mg/L; 正交试验中蔗糖对思茅松花粉萌发和花粉管生长有显著影响, 最佳配方组合为 10% 蔗糖+30 mg/L 硼酸+100 mg/L 氯化钙。【结论】获得了适宜思茅松花粉活力检测的离体培养基。

关键词: 思茅松; 花粉; 离体萌发; 花粉管生长

中图分类号: S 791.257.04

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 03-0496-06

Effects of Sucrose, Boron and Calcium on the Pollen Germination and Tube Growth of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* in vitro

CHEN Wei^{1,2}, LI Jiang^{1,2}, MENG Meng², CHEN Shao'an², FENG Xian²

(1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants, Kunming 650201 China;

2. Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming 650201 China)

Abstract: [Purpose] The pollen viability was studied in order to provide the technical support for cross breeding of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. [Method] The effects of sucrose, H_3BO_3 and $CaCl_2$ single factor and orthogonal test on the pollen germination and pollen tube growth of *P. kesiya* var. *langbianensis* in vitro were studied. [Results] The pollen germination and pollen tube growth would be enhanced when the concentration of sucrose, H_3BO_3 and $CaCl_2$ of the culture medium were within a certain range. The single suitable concentration of sucrose, H_3BO_3 and $CaCl_2$ for pollen viability test were 10%, 100 mg/L and 100 mg/L, respectively. Sucrose had significant effect on the pollen germination and pollen tube growth in orthogonal test. The optimum culture medium which support the germination and tube growth was 10% sucrose +30 mg/L H_3BO_3 +100 mg/L $CaCl_2$. [Conclusion] The culture medium suitable for detection of pollen viability of *P. kesiya* var. *langbianensis* was obtained.

Keywords: *Pinus kesiya* var. *langbianensis*; pollen; germination in vitro; pollen tube growth

收稿日期: 2018-06-13

修回日期: 2018-07-06

网络首发时间: 2020-06-10 09:55:13

*基金项目: 国家重点研发计划子课题 (2017YFD0600504-3)。

作者简介: 陈伟 (1982—), 男, 云南宁洱人, 硕士, 副研究员, 主要从事森林培育研究。

E-mail: chenwei176@126.com

**通信作者 Corresponding author: 李江 (1972—), 男, 云南昌宁人, 博士, 研究员, 主要从事林业碳汇和森林培育研究。E-mail: lijianglyht@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200609.1102.001.html>



思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis*) 是云南省重要的速生用材及采脂树种, 广泛分布于哀牢山以西的南亚热带山地, 具有生长快、适应性强、材质优良和松脂产量高等特点, 为云南林产业中的重要树种。目前, 对思茅松的研究主要围绕人工林培育^[1]、生态学研究^[2]、碳汇计量^[3]和功能基因克隆与分析^[4]等方面, 良种选育是思茅松研究中较为薄弱的环节, 起步较晚, 已建成种子园, 但长期停滞于无性系初级种子园阶段。杂交育种是培育思茅松良种的一个重要途径, 思茅松控制授粉工作中, 为解决花期不一致和远距离杂交的问题, 需要保存有生活力的花粉, 然而目前关于思茅松花粉生活力的研究尚未见相关报道, 开展思茅松花粉生活力研究对思茅松杂交育种具有重要的现实意义。

花粉具有萌发活力, 这是完成受精的必要条件, 花粉生活力的高低直接影响到育种的成败和成效, 在人工授粉工作中要求花粉生活力旺盛, 在使用花粉前需对其进行生活力测定。花粉生活力检测方法较多, 常见的有 I₂-KI 染色法、TTC 染色法、联苯胺染色法、MTT 染色法和离体萌发法等^[5], 不同物种其适用的方法不一样。多数学者认为离体萌发法是测定花粉生活力最简单、最稳定和最可靠的方法^[6-7], 同时大量研究表明: 蔗糖及硼、钙等微量元素对植物花粉萌发具有不同程度的影响^[8-10], 在培养基中添加该类物质有助于花粉生活力的测定。目前, 离体萌发法已成功应用于马尾松^[11]、云南松^[12]等松属植物花粉生活力的研究中。本试验以思茅松为试验材料, 研究蔗糖、硼酸及氯化钙对思茅松花粉离体萌发及花粉管生长的影响, 探讨思茅松花粉的萌发特点, 旨在寻找一种简单、可靠的测定花粉生活力的方法, 为思茅松种质创新奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用思茅松花粉于 2018 年 2 月采自云南省西双版纳州景洪市普文试验林场思茅松无性系种子园 (N22°25', E101°06'), 海拔 900 m, 采集同一植株中上部 4 个方位枝条上成熟的雄球花装入牛皮纸袋带回实验室, 置于硫酸纸上自然阴干散粉, 花粉干燥后置于放有硅胶的密封瓶中保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

花粉培养采用液体培养法。量取 1 mL 培养液 (不同质量浓度和配比的蔗糖、硼酸和氯化钙溶液) 放入 2 mL 的离心管中, 加入适量花粉 (约 10 mg) 后震荡离心管使花粉粒与培养液充分混合, 将盛有花粉粒和培养液的离心管置于 25 ℃ 的恒温培养箱中暗培养。

1.2.2 单因素试验

通过单因素试验, 确定蔗糖、硼酸和氯化钙对花粉萌发的影响。试验分别设置以下处理, 并以不加该物质为对照。蔗糖质量分数设置 7 个水平, 分别为 1%、2.5%、5%、10%、15%、20% 和 25%; 硼酸质量浓度设置 6 个水平, 分别为 5、10、15、30、50 和 100 mg/L; 氯化钙质量浓度设置 6 个水平, 分别为 5、10、25、50、100 和 200 mg/L。每个处理设 3 次重复。

1.2.3 最适培养基选择

在单因素试验基础上, 采用正交试验设计 L₂₅(5³), 确定适宜思茅松花粉萌发的最佳组合。每个处理设 3 次重复。

1.2.4 花粉萌发测定

单因素试验培养 72 h 后取样制片, 正交试验培养 48 h 后取样制片, 利用显微镜 (Leica DM2500, 德国) 观测统计并用附带的照相系统进行拍照, 每个玻片随机观察 4 个视野, 每个视野中花粉粒数量不少于 50 粒, 花粉管长度超过花粉粒直径视为花粉萌发。利用显微镜成像系统自带的软件对视野中萌发花粉粒的花粉管长度进行测定, 统计和计算平均萌发率和花粉管长度。

花粉萌发率=某视野萌发花粉数/该视野花粉总数×100%。

1.2.5 数据处理

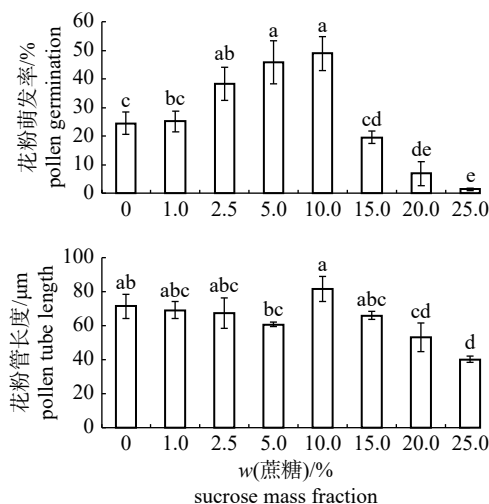
采用 DPS 软件对试验结果进行差异显著性检测, Tukey 法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 蔗糖对思茅松花粉离体培养的影响

思茅松花粉萌发率随着蔗糖质量分数的变化呈现出先升后降的变化趋势 (图 1)。在低质量分数时, 随着培养基蔗糖质量分数的升高, 思茅松花粉萌发率上升, 蔗糖对花粉的萌发呈现出促进作用, 当蔗糖质量分数达到 2.5% 时, 花粉萌发

率与对照(不添加蔗糖)已经具有显著差异,当蔗糖质量分数达到 10% 时,花粉萌发率达到最大值(48.87%),为对照萌发率(24.44%)的 1.99 倍;当蔗糖质量分数超过 10% 时,花粉萌发率迅速降低,蔗糖质量分数 15% 时,其萌发率与对照已无显著差异,蔗糖质量分数超过 20% 时呈现出显著的抑制作用,其萌发率急剧下降到 6.83%,仅为对照的 28%。在花粉管生长方面,蔗糖质量分数在 10% 时花粉管长度最长,达到 81.45 μm ,蔗糖质量分数高于 10% 以后,花粉管长度随着质量分数的升高而降低。方差分析表明:不同质量分数间花粉管生长存在差异 ($P < 0.05$);进一步多重比较表明:1%、2.5%、5%、10% 和 15% 质量分数与对照的花粉管长度无显著差异,20% 和 25% 质量分数的花粉管长度则显著低于对照,呈现出抑制作用。综合萌发率和花粉管长度数据,最适宜用于测定思茅松花粉生活力的蔗糖质量分数为 10%。



注:不同小写字母表示 0.05 水平差异显著;下同。

Note: The different small letters mean significant difference on 0.05 level; the same as below.

图 1 蔗糖对花粉萌发和花粉管生长的影响

Fig. 1 Effect of sucrose on the pollen germination and pollen tube growth

2.2 硼酸对思茅松花粉离体培养的影响

在试验的质量浓度范围内,思茅松花粉萌发率随着培养基硼酸质量浓度的增加而增加(图 2)。硼酸质量浓度为 10 mg/L 时,萌发率高于对照但两者间差异不显著,当硼酸质量浓度大于等于 30 mg/L 时,花粉萌发率显著高于对照,其中质

量浓度为 100 mg/L 时,花粉萌发率最大,达 50.09%,是对照的 2.05 倍。花粉管生长方面,不同质量浓度硼酸培养液都能促进花粉管的生长,其中,硼酸溶液质量浓度为 100 mg/L 时,花粉管的长度最长,达 134.78 μm ,为对照的 1.89 倍;方差分析表明:各处理与对照间存在显著差异 ($P < 0.05$)。一步多重比较表明:经 5~50 mg/L 硼酸溶液处理后的花粉管长度均显著高于对照,与 100 mg/L 硼酸溶液处理也存在显著差异。花粉萌发和花粉管生长的适宜硼酸质量浓度为 100 mg/L。

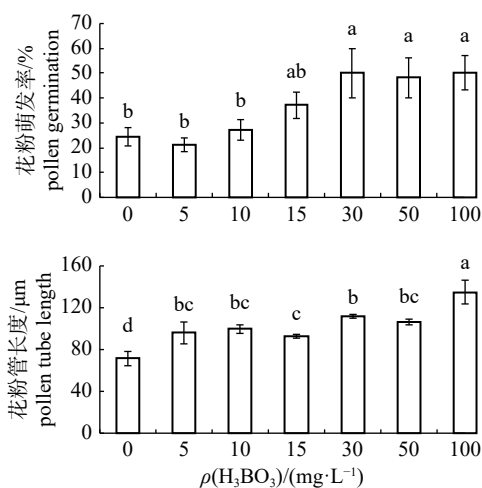


图 2 硼酸对花粉萌发和花粉管生长的影响

Fig. 2 Effect of H_3BO_3 on the pollen germination and pollen tube growth

2.3 氯化钙对思茅松花粉离体培养的影响

钙质量浓度对思茅松花粉萌发率的影响呈现出先升后降的特征(图 3),在 5~100 mg/L 范围内,萌发率随着钙质量浓度的增加而增加,质量浓度为 100 mg/L 时,花粉萌发率最大,达 42.16%,为对照的 1.72 倍;质量浓度 200 mg/L 时,萌发率较 100 mg/L 有所降低。多重比较表明:5、10、25 和 50 mg/L 质量浓度与对照无显著差异,100 和 200 mg/L 质量浓度与对照有显著差异。花粉管生长方面,钙质量浓度在 5~50 mg/L 时与对照有差异但不显著;当质量浓度升高到 100 mg/L 时,花粉管长度与对照具有显著差异;质量浓度为 200 mg/L 时,花粉管平均长度最长,达 106.91 μm ,为对照的 1.50 倍,并且与质量浓度 100 mg/L 处理有显著差异。在试验的质量浓度范围内,综合萌发率与花粉管长度判断,认为适宜用于测定思

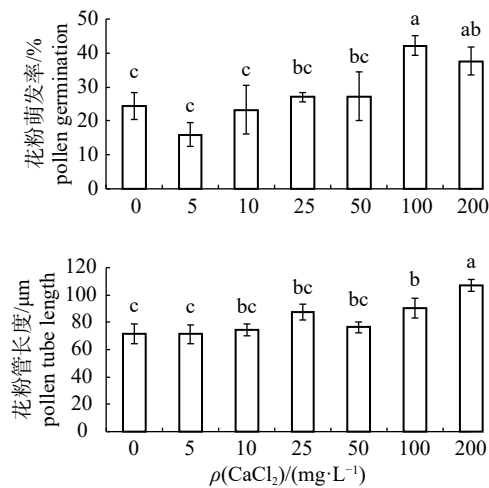


图 3 氯化钙对花粉萌发和花粉管生长的影响
Fig. 3 Effect of CaCl_2 on the pollen germination and pollen tube growth

茅松花粉活力的氯化钙质量浓度为 100 mg/L。

2.4 最佳培养基选择

在单因子试验的基础上,以蔗糖、硼酸和氯化钙为试验因子,采用正交试验设计(表 1),寻找最佳的培养基配方。对表 1 数据极差分析显示:参试的 3 个因素对思茅松花粉萌发率影响的主次顺序为蔗糖>氯化钙>硼酸,对花粉管长度影响的主次关系同样为蔗糖>氯化钙>硼酸,说明 3 因素中蔗糖对思茅松花粉萌发和花粉管生长的影响最大。经直观分析优选出的花粉萌发培养基为 10% 蔗糖+100 mg/L 硼酸+100 mg/L 氯化钙(未出现在试验中),花粉管生长培养基为 10% 蔗糖+30 mg/L 硼酸+100 mg/L 氯化钙(在试验中出现)。进一步方差分析表明:萌发率差异极显著的因子有蔗糖 ($P<0.01$),而硼酸和钙因子在不同组

表 1 思茅松花粉在正交试验中的花粉萌发和花粉管生长
Tab. 1 Pollen germination rate and pollen tube growth of *P. kesiya* var. *langbianensis* in experiments

试验号 No.	蔗糖浓度/% sucrose	$\rho(\text{H}_3\text{BO}_3)/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{CaCl}_2)/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	萌发率/% germination rate	花粉管长度/ μm pollen tube length
1	0	0	0	14.87±2.09	63.38±9.68
2	0	10	10	23.63±2.67	68.58±10.56
3	0	30	30	28.81±3.54	72.45±5.97
4	0	50	50	21.89±4.24	74.89±3.16
5	0	100	100	30.39±5.44	84.75±9.53
6	5	0	10	29.87±2.83	78.73±4.64
7	5	10	30	29.32±7.41	82.19±16.64
8	5	30	50	36.96±8.83	85.19±7.84
9	5	50	100	40.23±5.49	96.82±13.62
10	5	100	0	41.73±3.73	95.47±6.94
11	10	0	30	45.39±6.24	93.96±13.17
12	10	10	50	42.58±6.35	102.63±12.24
13	10	30	100	49.31±6.97	110.74±10.40
14	10	50	0	39.14±7.95	86.93±4.43
15	10	100	10	47.02±9.57	88.12±3.48
16	20	0	50	11.10±1.85	54.78±3.73
17	20	10	100	4.52±0.36	46.94±4.87
18	20	30	0	3.07±1.65	50.82±1.68
19	20	50	10	3.51±0.80	44.27±2.58
20	20	100	30	3.28±1.30	45.00±4.21
21	25	0	100	0.00	0.00
22	25	10	0	0.00	0.00
23	25	30	10	0.00	0.00
24	25	50	30	0.00	0.00
25	25	100	50	0.00	0.00

合中差异不显著 ($P>0.05$), 花粉管长度差异呈极显著的因子也仅有蔗糖 ($P<0.01$), 说明在思茅松花粉最佳萌发培养基选择上应优选考虑蔗糖因子及其水平, 硼酸和氯化钙为次要考虑的因素。综合考虑各因素及水平对思茅松花粉萌发的影响, 筛选出最适宜思茅松花粉离体培养的培养基配方为 10% 蔗糖+30 mg/L 硼酸+100 mg/L 氯化钙。

3 讨论

影响花粉离体萌发的因素较多, 总体可分为内因和外因, 前者有供体植株基因型、发育时期等, 后者包括培养基组分、pH 值和温度等^[13], 只有在一定的外因作用下, 发育成熟的花粉才能正常萌发和生长。不同物种花粉离体萌发最适外部条件不同, 对于单因子培养基, 思茅松与同属的云南松^[12]相比, 花粉萌发最适的蔗糖质量分数高于云南松, 最适的氯化钙质量浓度则与云南松相同; 而对于多因子组合培养基, 思茅松与马尾松^[11]、云南松^[12]均不相同。

蔗糖在花粉离体培养中主要起到提供能源和调节渗透压的作用^[14], 一方面为花粉萌发和花粉管的生长提供营养, 另一方面作为渗透物质能维持外界环境一定的渗透压, 对花粉萌发和生长过程起着重要的作用。本试验培养基中过低或过高的蔗糖质量分数均对思茅松花粉的萌发不利。思茅松花粉萌发率随着质量分数的变化呈现出先升后降的变化趋势, 10% 为变化的转折点, 说明在 2.5%~10% 范围内蔗糖不仅很好地提供了营养物质, 还为花粉萌发提供了适宜的渗透压范围, 表现出促进花粉萌发的作用。当质量分数超过 10% 时, 培养液中的蔗糖质量分数虽然增高, 能够提供的营养物质增多, 但萌发率表现出低于对照的现象, 培养液可能提供了不适宜花粉萌发的外部环境, 开始出现抑制作用, 究其原因可能是较高的蔗糖质量分数破坏了花粉与培养基之间的渗透平衡, 导致花粉管破裂产生质壁分离现象, 造成原生质体脱水, 从而致使花粉不能萌发^[15]。而对于萌发的花粉, 其花粉管生长速度在 15% 质量分数以后才表现出抑制作用, 则说明不同花粉粒内原生质不同组分的含量存在差异, 这种差异可能来自遗传的多样性, 并导致部分花粉在较高的渗透压环境中仍然能萌发和生长, 出现抑制花粉管生长的质量分数也相应升高的现象。

花粉缺硼可以导致花粉管破裂^[16], 在自然条件下, 花粉自身所含的硼是不足的, 这种不足可通过柱头和花柱内较高质量浓度的硼来补偿^[5], 以确保落入柱头的花粉正常萌发并促进花粉管生长。现有的很多研究报道也认为一定质量浓度范围内的硼酸能够促进花粉的萌发和花粉管的生长, 超过这一质量浓度范围反而会起到抑制作用^[17-18]。在开展花粉离体培养时, 在培养基中加入一定量的硼酸被认为是必需和有效的。本研究表明: 30~100 mg/L 范围的硼酸能够显著促进思茅松花粉萌发, 5~100 mg/L 的硼酸能够显著促进萌发的花粉管生长, 这证明了硼对思茅松花粉萌发是有影响的, 但限于试验较窄的硼酸质量浓度范围设置, 抑制思茅松花粉萌发和花粉管生长的硼酸质量浓度还有待进一步试验判断。硼元素能促进果胶质的合成, 利于花粉管壁的建造^[19], 这被认为是硼元素作用花粉管生长的机制, 而这种促进作用可能在较低的硼质量浓度时即可启动, 这可能是促进花粉萌发和促进花粉管生长两者质量浓度存在差异的原因。

Ca^{2+} 的动态变化对启动花粉萌发、调节花粉管伸长等环节具有重要作用^[20]。本试验证明: 外源 Ca^{2+} 对思茅松花粉萌发、调节花粉管伸长均有影响, 质量浓度 100 mg/L 氯化钙对思茅松花粉萌发和花粉管的生长具有显著的促进作用。已有研究表明: 外源 Ca^{2+} 对花粉萌发的作用主要取决于细胞内游离钙含量, 当花粉细胞内游离钙较少时, 补充一定的外源 Ca^{2+} 能有效促进花粉萌发和花粉管生长, 但过高的 Ca^{2+} 会造成细胞 Ca^{2+} 中毒及过高的细胞膨压, 反而会抑制花粉的萌发和花粉管生长^[21]。本研究结果表明: 思茅松花粉细胞内游离钙含量可能相对较少, 在自然条件下, 落入雌球花中的花粉在萌发时是否受外源 Ca^{2+} 影响有待进一步深入探索。

思茅松花粉离体培养正交试验参试的 3 个因素中, 蔗糖对思茅松花粉萌发和花粉管生长有显著影响, 培养基选择上应优选考虑蔗糖因子及其水平, 而硼和钙主要在蔗糖和硼的主导作用下起辅助作用, 然而许多相关的研究^[14,22]表明这种辅助作用是花粉管生长所必需的, 在培养基中添加硼和钙将更有利于花粉活力的检测; 因此, 思茅松花粉活力检测培养基中建议添加部分的硼和钙。

4 结论

通过对思茅松花粉开展离体培养试验,明确了蔗糖、硼和钙在一定用量范围内对思茅松花粉萌发及花粉管生长具有促进作用,初步筛选出花粉生活力测定最适蔗糖、硼酸和氯化钙用量分别为10%、100 mg/L和100 mg/L,正交试验最佳配方组合是10%蔗糖+30 mg/L硼酸+100 mg/L氯化钙,研究选出的培养基可用于思茅松杂交授粉前的花粉活力检测。

[参考文献]

- [1] 刘云彩. 思茅松人工林培育[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2015.
- [2] 黄小波, 李帅锋, 苏建荣, 等. 择伐对思茅松自然种群结构和空间分布格局的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(24): 8241.
- [3] 李江, 孟梦, 朱宏涛, 等. 思茅松中幼人工林的生物量碳计量参数[J]. 云南植物研究, 2010, 32(1): 60. DOI: 10.3724/SP.J.1143.2010.09138.
- [4] 王毅, 周旭, 毕玮, 等. 思茅松 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 基因的克隆及功能分析[J]. 林业科学研究, 2015, 28(6): 833. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1498.2015.06.011.
- [5] 张超仪, 耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 92. DOI: 10.3724/SP.J.1142.2012.10092.
- [6] STENLI R G. Pollen: biology biochemistry management[M]. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1974.
- [7] 贾继文, 王军辉, 张金凤, 等. 梓树属花粉生活力的研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 945. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4025.2009.05.014.
- [8] 田翠婷, 吕洪飞, 王锋, 等. 培养基组分对青杆离体花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(1): 47. DOI: 10.3321/j.issn:1000-1522.2007.01.009.
- [9] 许珂, 古松, 江莎. 金银忍冬花粉离体萌发初探[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(2): 109. DOI: 10.3969/j.issn.1005-3395.2008.02.003.
- [10] 杜玉虎, 张绍铃, 姜雪婷, 等. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长特性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1846. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4025.2006.09.016.
- [11] 赖焕林, 陈天华, 徐进, 等. 马尾松种子园无性系花粉生活力研究[J]. 林业科学研究, 1994, 7(5): 555. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1498.1994.05.018.
- [12] 李梅, 周兰英. 云南松花粉储藏温度及离体萌发条件[J]. 浙江农林大学学报, 2017, 34(1): 63. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.2017.01.010.
- [13] 王钦丽, 卢龙斗, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 365. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.2002.03.017.
- [14] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [15] 权秋梅, 黎云祥, 吴春梅, 等. 淫羊藿花粉萌发及花粉管生长研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(10): 2002. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4025.2007.10.012.
- [16] 曾丽霞, 艾应伟. 硼对花粉生物化学功能影响的研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2008(3): 9. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6257.2008.03.003.
- [17] 年玉欣, 罗凤霞, 张颖, 等. 测定百合花粉生命力的液体培养基研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 922. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.2005.05.037.
- [18] 翟学杰, 董凤祥, 张日清, 等. 影响杂交榛花粉萌发和花粉管生长的培养基组分研究[J]. 林业科学研究, 2009, 22(6): 753. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1498.2009.06.001.
- [19] 杨晓东, 孙素琴, 李一勤. 硼缺乏导致花粉管细胞壁多糖分布的改变[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1169. DOI: 10.3321/j.issn:1672-9072.1999.11.006.
- [20] TIAN H Q, ZHANG Z, RUSSELL S D. Isolation of the male germ unit: organization and function in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18(1): 143. DOI: 10.1077/S00299005050547.
- [21] MALHO R, READ N D, TREWAVAS A J, et al. Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation[J]. The Plant Cell, 1995, 7(8): 1173. DOI: 10.2307/3870093.
- [22] CHEUNG A Y. Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth[J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(2): 45. DOI: 10.1016/S1360-1385(96)80028-8.

责任编辑: 何承刚