

薄壳山核桃花粉离体萌发和花粉管生长特性研究

张 瑞¹, 李 洋¹, 梁有旺¹, 彭方仁^{1*}, 李永荣²

(1 南京林业大学 森林资源与环境学院, 南京 210037; 2 南京绿宙薄壳山核桃科技有限公司, 南京 210014)

摘 要:以 6 年生薄壳山核桃优良品种‘金华’的新鲜花粉为试材, 采用离体培养法, 研究了不同复水时间、不同培养基组分、不同培养温度及培养时间对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响。结果显示: (1) 薄壳山核桃花粉萌发试验前进行 4 h 复水处理可显著提高萌发率, 萌发率可达 51.78%, 为对照(2.51%)的 20.68 倍。(2) 蔗糖、 H_3BO_3 、 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 在一定浓度范围内均具有促进花粉萌发和花粉管生长的作用, 但浓度过高则起抑制作用。(3) 正交试验结果经实验验证表明, 薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的最适培养基为 20% 蔗糖+0.02%~0.03% H_3BO_3 +0.05% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 最佳培养条件为 25 °C 下恒温培养 24 h, 此时的花粉萌发率高达 74.46%, 花粉管平均长度为 258.84 μm 。

关键词:薄壳山核桃; 培养基; 花粉萌发; 花粉管生长; 培养条件

中图分类号: Q813.1

文献标志码: A

in vitro Pollen Germination and Tube Growth Characteristics in Pecan (*Carya illinoensis*)

ZHANG Rui¹, LI Yang¹, LIANG Youwang¹, PENG Fangren^{1*}, LI Yongrong²

(1 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2 Nanjing Green Universe Pecan Science & Technology Co., Ltd, Nanjing 210014, China)

Abstract: The fresh pollens of 6 a ‘Jinhua’ pecan (*Carya illinoensis*) tree were used in this study. The focus was to investigate the regulatory role of sucrose, boric acid, Ca^{2+} , rehydration time and temperature in pecan pollen germination and pollen tube growth by *in vitro* culture. And the results showed that: (1) The rehydration for 4 h before the test is necessary which could improve pollen germination significantly; (2) Sucrose, boric acid and Ca^{2+} could stimulate pollen germination and tube growth, but this function would reverse if overrun certain concentration; (3) The research suggested that the optimum culture medium consist of 20% sucrose, 0.02%~0.03% H_3BO_3 and 0.05% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ and the pollen germination percentage was nearly 74.46% and the average pollen tube length reached 258.84 μm after a 24 h incubation at 25 °C.

Key words: pecan; *in vitro* culture; pollen germination; pollen tube growth; cultural conditions

薄壳山核桃(*Carya illinoensis*)原产于北美, 又名美国山核桃、长山核桃, 为胡桃科(Juglandaceae)山核桃属(*Carya* Nutt.)植物, 是世界著名的干果树种之一。中国对薄壳山核桃的引种栽培已有

100 多年历史, 收集品种 100 多个, 但其产业远不能满足国内市场需求^[1]。薄壳山核桃为雌雄同株异花植物, 掌握不同品种的花粉特性, 是合理配置授粉树、提高坐果率的重要依据。目前已有对薄壳山核

* 收稿日期: 2013-03-23; 修改稿收到日期: 2013-08-19

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201304711); 江苏省农业科技支撑项目(BE2010311); 国家科技推广项目[2011(33)]

作者简介: 张 瑞(1989—), 男, 在读博士研究生, 主要从事经济林栽培与育种研究。E-mail: richyzhang@yahoo.cn

* 通信作者: 彭方仁, 教授, 博士生导师, 主要从事森林培育与经济林栽培的教学与科研工作。E-mail: frpeng@njfu.edu.cn

桃花粉活力的报道,但其研究均局限于 TTC、FCR 等染色法^[2-4],由于染色法只能反映花粉的代谢情况或营养物质含量,且颜色判断误差较大,并不能直接准确地表现花粉的活力^[5]。Stanley 等^[6]认为花粉离体萌发法提供的条件与花粉在柱头萌发的条件更为接近,是检测花粉活力最为可靠的方法。本实验研究了薄壳山核桃花粉离体萌发的最佳培养基及不同温度、不同时间对花粉萌发率和花粉管生长的影响,旨在为科学授粉和杂交育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

试验以南京绿宙薄壳山核桃科技有限公司六合基地 6 年生薄壳山核桃优良品种‘金华’为材料,在花药变黄时及时采摘雄花花序,放入硫酸纸袋中迅速带回实验室,将其摊在硫酸纸上,置避风干燥处,次日花药即可散粉。用 120 目药典筛筛出花粉,装入真空防水密封袋中,放在-20℃冰箱冷藏备用。

1.2 花粉培养法

花粉采用液体培养法^[7]。在凹槽载玻片上滴加 50 μL 液体培养基,用大头针蘸取适量花粉使其均匀地撒在培养基上,将载玻片放入铺有湿润脱脂棉的培养皿内,在黑暗、25℃条件下保湿培养。用 Nikon YS100 光学显微镜观察,每个玻片随机选取 5 个不重复的视野,每个视野花粉数不少于 50 个,以花粉管长度大于花粉粒直径视为萌发,并选取 50 个测定花粉管长度。各试验均重复 3 次。

萌发率=(已萌发花粉数/花粉总数) $\times 100\%$

1.3 试验设计

1.3.1 最佳复水时间的选择 用 K_2SO_4 饱和溶液调节相对湿度(RH),让花粉放在 25℃、相对湿度为 97%的密闭容器中复水,分别放置 0、1、2、3、4、8、12、24 h 后,用 BK 培养基^[8](含 10%蔗糖、0.01% H_3BO_3 、0.03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% KNO_3)测定不同复水时间花粉的萌发率。以下试验则均在复水最佳时间后进行。

1.3.2 单因素试验 以 BK 培养基为基本培养基,在探讨每个影响因子时,以不加该物质为对照,设置不同浓度梯度,其余因子均以 BK 培养基为假设最适值。

蔗糖设 6 个浓度梯度:5%、10%、15%、20%、25%、30%; H_3BO_3 设 7 个浓度梯度:0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.07%、0.09%; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 设 7 个浓度梯度:0.01%、

0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.07%、0.09%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 设 5 个浓度梯度:0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%; KNO_3 设 5 个浓度梯度:0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%。

1.3.3 最适培养基的选择 在单因素试验的基础上,选取对薄壳山核桃花粉萌发影响较大的因子设计正交试验,以确定不同培养基组分的最佳组合。

1.3.4 最佳培养条件的选择 采用最适培养基,设置不同的温度和时间梯度(温度设置为:20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃;时间设置为:3、6、12、24 和 48 h),对薄壳山核桃花粉进行离体培养,以确定其萌发和花粉管生长的最适条件。

1.4 数据分析

试验结果用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 复水时间对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

由图 1 可见,未做复水处理的花粉萌发率很低,仅为 2.51%。通过复水处理后,花粉萌发率显著升高(图 1)。复水 4 h 后,萌发率达最高值 51.78%,为对照的 20.68 倍。复水 4~12 h,萌发率基本不变。不同复水时间后,在相同培养基下,花粉管生长无显著差异。因此,薄壳山核桃品种‘金华’的花粉萌发最佳复水时间为 4 h。

2.2 不同培养基组分对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

2.2.1 蔗糖 从图 2 可看出,蔗糖是薄壳山核桃花粉萌发必不可少的组分,在不含蔗糖的培养基中,花

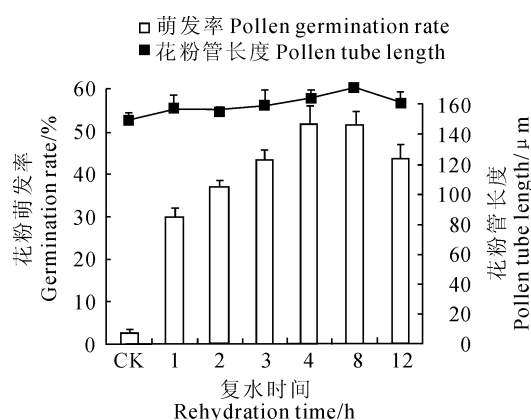


图 1 复水时间对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

CK. 表示未进行复水处理

Fig. 1 The effect of different rehydration time on pollen germination and tube growth
CK. Indicates medium without rehydration

粉均未萌发。随着蔗糖浓度的提高,‘金华’花粉萌发率显著升高,花粉管长度也显著增加。当蔗糖浓度达 15% 时,花粉管长度最大(175.74 μm),但此时萌发率并未达到最高值。当蔗糖浓度达 20% 时,花粉萌发率最高(44.43%),对应的花粉管长度为 154.93 μm 。方差分析结果表明,当蔗糖浓度为 20%、25%、30% 时,花粉萌发率和花粉管长度无显著差异($P>0.05$)。

2.2.2 硼 在一定浓度范围内,‘金华’花粉萌发率和花粉管的生长随硼酸浓度的增加而增加,但超过一定浓度则起抑制作用。当硼酸浓度为 0.03% 时,花粉萌发率最高(69.63%),为对照的 1.57 倍。当硼酸浓度大于 0.04% 时,花粉萌发和花粉管生长受显著抑制。花粉管生长的适宜硼酸浓度范围为 0.02%~0.03%,此时花粉管长度为 225.39~239.71 μm (图 3)。

2.2.3 钙 外源钙对薄壳山核桃花粉萌发的影响趋势与硼相似,在一定浓度范围内对花粉萌发和花粉管生长起促进作用(图 4)。Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度为 0.01%~0.05% 时,花粉萌发率随 Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度的增加显著提高,花粉管长度也有较明显伸长。当 Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度达到 0.05% 时,花粉萌发率最高,即 61.76%,为对照的 1.46 倍,此时的花粉管长度也达到最大值 220.87 μm 。当 Ca²⁺ 浓度大于 0.07% 时,花粉萌发率显著下降,花粉管生长也有相同变化趋势。方差分析结果表明,Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度为 0.04%、0.05% 时与其他浓度存在显著差异,‘金华’花粉萌发的最适

Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度为 0.04%~0.05%。

2.2.4 镁、钾 在试验浓度范围内,Mg²⁺ 和 K⁺ 对‘金华’的花粉萌发和花粉管生长的影响无显著差异($P>0.05$)。

2.3 薄壳山核桃花粉萌发的最适培养基的筛选

由以上单因素试验可知,蔗糖、H₃BO₃、Ca(NO₃)₂·4H₂O 对薄壳山核桃品种‘金华’的花粉萌发影响较大,综合该 3 因子进行正交试验设计(表 1)。对表 1 数据进行方差分析,结果表明差异显著的

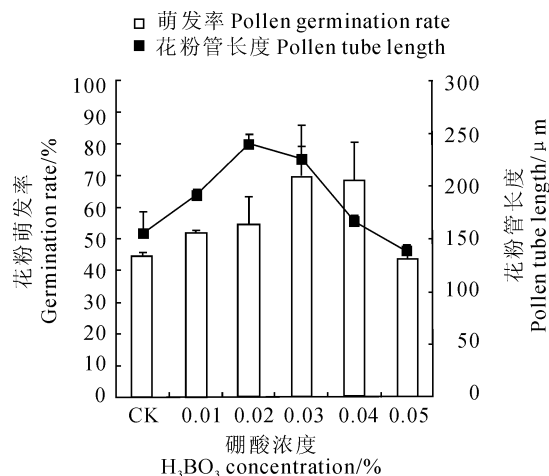


图 3 硼酸浓度对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

CK. 表示未加硼酸

Fig. 3 The effect of different H₃BO₃ concentration on pollen germination and tube growth
CK. Indicates medium without H₃BO₃

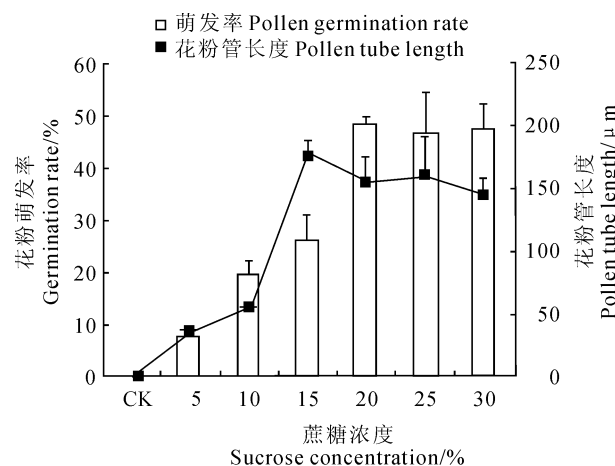


图 2 蔗糖浓度对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响
CK. 表示未加蔗糖

Fig. 2 The effect of different sucrose concentration on pollen germination and tube growth
CK. Indicates medium without sucrose

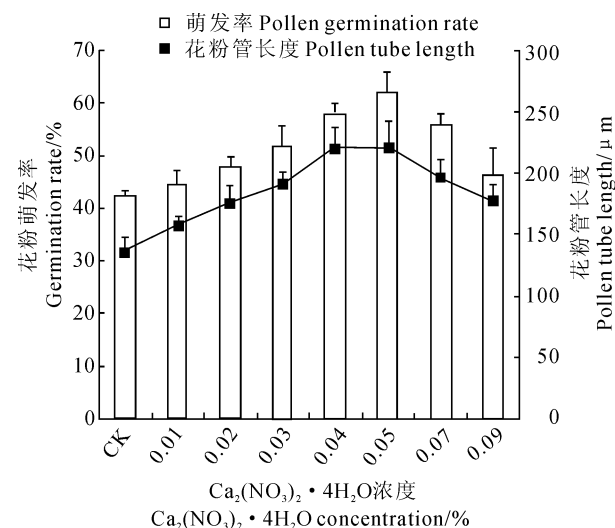


图 4 Ca²⁺ 浓度对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响
CK. 表示未加 Ca(NO₃)₂·4H₂O

Fig. 4 The effect of different Ca²⁺ concentration on pollen germination and tube growth
CK. Indicates medium without Ca(NO₃)₂·4H₂O

因子为蔗糖、 H_3BO_3 ($P<0.05$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 及因素间的交互作用均不显著 ($P>0.05$)。进一步做平方和比较分析,蔗糖各浓度下‘金华’的花粉萌发率及花粉管长度平方和以 20% 最高, H_3BO_3 以 0.03% 最高, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 以 0.05% 最高,故最佳培养基组合为 20% 蔗糖 + 0.03% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。但该组合在正交试验中并未出现,表 1 中最佳组合为 13 号,即 20% 蔗糖 + 0.02% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。为找出最佳培养基组合,用 20% 蔗糖 + 0.03% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的培养基增加一组试验。结果表明,20% 蔗糖 + 0.03% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 与 20% 蔗糖 + 0.02% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的培养基下,无显著差异。因此,薄壳山核桃品种‘金华’的花粉萌发和花粉管生

长的最佳培养基组合均为:20% 蔗糖 + 0.02% ~ 0.03% H_3BO_3 + 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。

2.4 不同培养条件对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

采用正交试验筛选出的最佳培养基,在不同温度下分别培养 3、6、12、24、48 h,比较不同温度下薄壳山核桃花粉的萌发特性。结果表明,当温度较低为 20 ℃ 时,花粉生长较为缓慢(图 6, A), 0~48 h 一直处于增长状态,但萌发率和花粉管长度均较低,48 h 时花粉萌发率为 36.55%,花粉管长度为 135.65 μm 。25 ℃ 培养花粉生长良好,萌发率显著高于其他温度下的萌发率(图 5, A;图 6, B、F),培养 24 h 花粉萌发率趋于稳定,为 62.28%,此时花粉管长度为 249.98 μm ,与 48 h 无显著差异。当温度高于 30 ℃ 时,花粉萌发速率及花粉管生长速率均明显加快,

表 1 薄壳山核桃花粉萌发 $L_{25}(5^3)$ 正交试验结果
Table 1 Pollen germination rate and tube length in $L_{25}(5^3)$ orthogonal designexperiment

编号 Serial number	蔗糖 Sucrose /%	H_3BO_3 /%	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ /%	萌发率 Germination rate/%	花粉管长度 Pollen tube length/ μm
1	0	0	0	0	0
2	0	0.01	20	0	0
3	0	0.02	30	0	0
4	0	0.03	40	0	0
5	0	0.04	50	0	0
6	15	0	0.02	28.52	180.77
7	15	0.01	0.03	34.43	193.05
8	15	0.02	0.04	51.48	215.36
9	15	0.03	0.05	57.81	220.59
10	15	0.04	0	32.04	183.23
11	20	0.0	0.03	50.91	189.72
12	20	0.01	0.04	55.06	195.33
13	20	0.02	0.05	74.46	258.84
14	20	0.03	0	64.63	239.70
15	20	0.04	0.02	59.02	174.93
16	25	0	0.04	49.34	164.05
17	25	0.01	0.05	53.88	190.67
18	25	0.02	0	59.15	202.63
19	25	0.03	0.02	61.64	208.27
20	25	0.04	0.03	51.40	176.69
21	30	0	0.05	52.36	151.25
22	30	0.01	0	49.66	180.93
23	30	0.02	0.02	51.32	203.98
24	30	0.03	0.03	55.73	206.18
25	30	0.04	0.04	48.04	179.35
MS	2 973.25	153.56	62.56		
F	125.74*	6.49*	2.65		

注: * 表示在 0.05 水平下差异极显著。
Note: * represents the significant differences at 0.05 level.

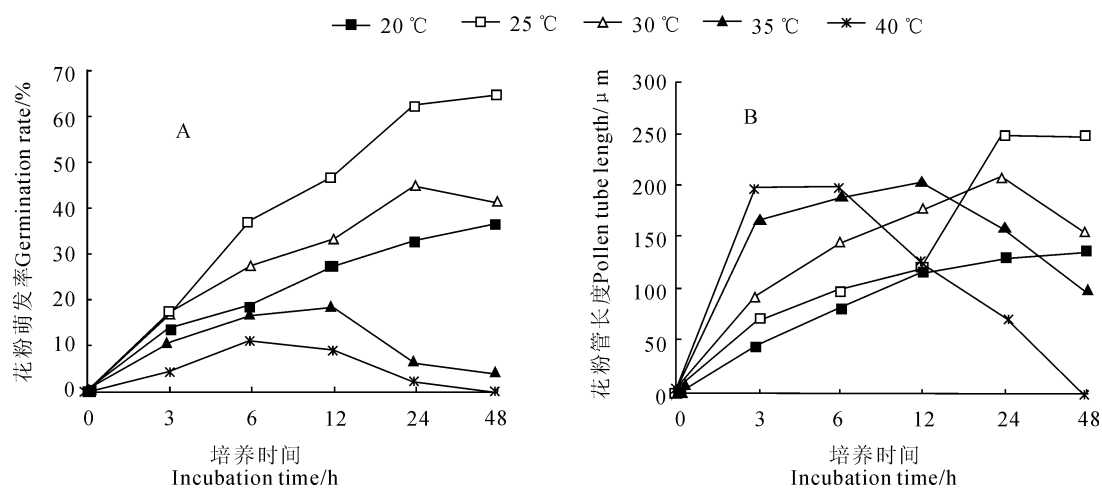


图 5 不同温度及培养时间对薄壳山核桃花粉萌发和花粉管生长的影响

Fig. 5 The effect of different temperature and time on pollen germination and tube growth

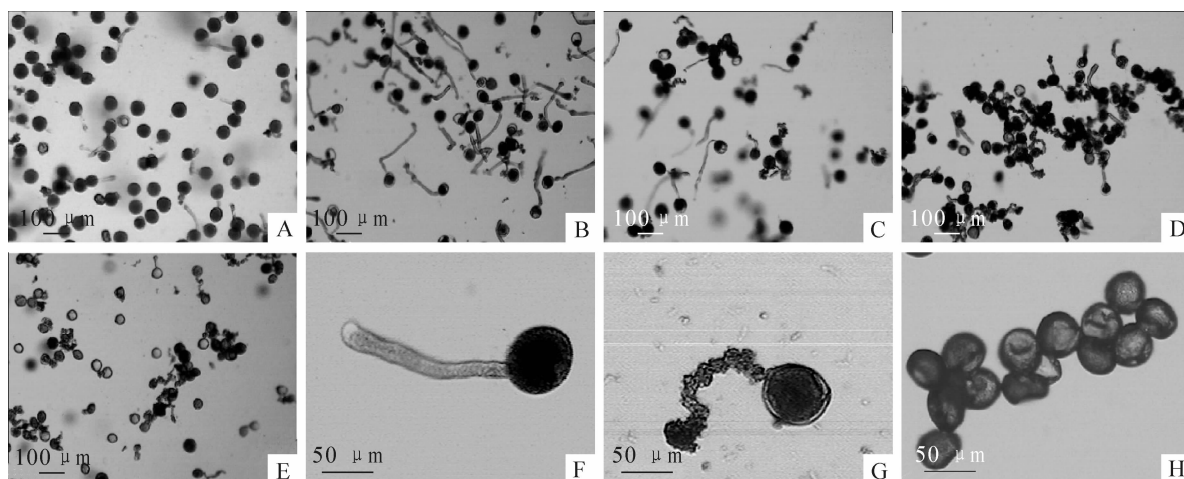


图 6 薄壳山核桃花粉离体萌发状况

A~E. 不同温度下薄壳山核桃花粉的萌发状况: 1. 20 °C; 2. 25 °C; 3. 30 °C; 4. 35 °C; 5. 40 °C;

F. 正常萌发的花粉; G. 高温下花粉管内含物溢出; H. 未复水的花粉粒

Fig. 6 Pecan pollen germination *in vitro*

A~E. Effect of temperature on pecan pollen germination: 1. 20 °C; 2. 25 °C; 3. 30 °C; 4. 35 °C; 5. 40 °C; F. Normal germination of pecan pollen; G. Overflow of pollen inclusions at high temperature; H. Pollen grain without rehydration

但花粉管破裂萎缩也逐渐增多,整体平均萌发率呈现先上升后下降的趋势,且温度越高,萌发速率越快,花粉管破裂也越多(图 6, C~E, G)。30 °C、35 °C 和 40 °C 的花粉萌发的持续时间分别为 24、12、6 h(图 5, A),最高萌发率分别为 45%、18.61%、11.54%;花粉管长度平均最大值分别出现在 24、12 和 6 h(图 5, B),分别为 210.45、205.56 和 199.77 μm。因此,薄壳山核桃品种‘金华’的花粉萌发最佳培养温度为 25 °C,最佳培养时间为 24 h。

3 结论与讨论

薄壳山核桃为风媒花植物,新鲜未经复水处理的花粉粒表面干瘪下凹。Firon 等^[9]认为花粉的水分状况与花粉发育和萌发息息相关。几乎所有种类的虫媒花花粉成熟前经历一系列的脱水过程,如西葫芦花粉在孢子阶段含水量高达 43%,而花粉成熟后脱水大幅下降至 13%。Nepi 等^[10]将花粉分为两类:部分脱水花粉(partially dehydrated pollen, PDP),

即花粉含水量 $<30\%$;部分水合花粉(partially hydrated pollen, PHP),即花粉含水量 $>30\%$ 。本次试验由于样品量有限,未能进行花粉含水量测定,但根据其复水处理后,萌发率大幅增加,可推断其为部分脱水型花粉。Crowe 等^[11]认为若将干燥的花粉直接放在培养基中,由于花粉体积小,对培养基极其敏感,迅速吸胀容易破坏细胞膜的完整性而影响花粉活力。因此,对花粉离体培养前,将其暴露在 RH 较高的环境下进行适当的复水处理,花粉水合过程缓和,细胞骨架松散,膜的相变也降至最低化,有利于花粉的萌发^[12]。本试验表明,将薄壳山核桃花粉在 RH=97%条件下复水处理 4 h,其萌发率可显著提高。

蔗糖对花粉萌发和花粉管生长有明显的促进作用,它既是花粉萌发和花粉管生长的营养物质,同时又是参与花粉代谢和跨膜运输的碳源^[13]。但蔗糖浓度应控制在一定范围内,过低花粉壁易破裂,过高又会造成代谢物堆积抑制萌发。本试验表明,蔗糖浓度为 20%~30%时,薄壳山核桃花粉内外渗透压保持平衡,花粉发育良好。这与其他多数研究^[14-16]结果保持一致。

花粉细胞壁中富含果胶,硼主要与果胶中的鼠李半乳糖醛酸聚糖-II(RG-II)结合形成二聚体(dRG-II-B),缺硼导致果胶甲酯酶活性发生改变,酸性果胶质在顶端大量富集,造成花粉管破裂^[17]。不同植物种类花粉萌发和花粉管生长所需的最适硼浓度是不同的,如蜡梅^[18]为 0.05%,梨^[15]为 0.01%等。本试验表明,0.03%的硼酸有利于薄壳山核

桃品种‘金华’的花粉的萌发,同时促进其花粉管的生长。

Ca^{2+} 是花粉管极性生长不可缺少的物质,目前国内外研究也较为深入。花粉尖端是 Ca^{2+} 集中分布的地方,Ca 放射自显影研究表明,百合花粉管尖端 20 μm 处是 Ca^{2+} 的富集区,这也证明 Ca^{2+} 向花粉管尖端的内流十分活跃^[19]。花粉管的顶端生长需要精确的游离钙($[\text{Ca}^{2+}]$)动态平衡,打破这种平衡就会导致花粉管生长的抑制^[20]。本试验结果表明,0.05%的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度下,薄壳山核桃品种‘金华’的花粉发育状况最佳。这与吴开志等^[21]的研究结果基本一致。

在一定范围内,薄壳山核桃花粉萌发受温度调控非常明显。温度低于 20 $^{\circ}\text{C}$,花粉萌发和花粉管生长缓慢,温度高于 30 $^{\circ}\text{C}$,花粉代谢加快,但花粉管破裂,同样不利于花粉生长。不同植物花粉萌发的最适温度有所差异,拟南芥^[22]为 22 $^{\circ}\text{C}$,棉花^[23]为 32 $^{\circ}\text{C}$,这与不同花粉细胞膜的热稳定性有关。本试验研究梯度下,25 $^{\circ}\text{C}$ 为薄壳山核桃品种‘金华’花粉萌发的最适温度。因此,在实际生产中对薄壳山核桃进行人工辅助授粉,不宜在温度偏低的早晨及温度过高的正午。

总之,本试验结果表明,薄壳山核桃花粉离体萌发前需在 RH=97%的条件下复水 4 h,最佳培养基组合为:20%蔗糖+0.02%~0.03% H_3BO_3 +0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,最适培养条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养 24 h。此时的花粉萌发率为 74.46%,花粉管平均长度为 258.84 μm 。

参考文献:

- [1] PENG F R(彭方仁),LI Y R(李永荣),HAO M ZH(郝明灼),et al. Pecan industry and devolepment strategy in China[J]. *China Forestry Science and Technology*(林业科技开发),2012,**26**(04):1-4(in Chinese).
- [2] LI CH(李 川),GU X R(辜夕容),YAO X H(姚小华),et al. A comparative study on the viability and microstructure of 3 pecans (*Carya illinoensis*) clone pollen[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*(江西农业大学学报),2012,**34**(2):324-328(in Chinese).
- [3] 李 川. 薄壳山核桃主要无性系开花物候及花粉特性研究[D]. 重庆:西南大学,2012.
- [4] LI X(李 雪),XU Y CH(徐迎春),LI Y R(李永荣),et al. Effect of different storage condition on pollen viability of four varieties of *Carya illinoensis*[J]. *China Forestry Science and Technology*(林业科技开发),2011,**25**(1):70-73(in Chinese).
- [5] JIANG X T(姜雪婷),DU Y H(杜玉虎),ZHANG SH L(张绍铃),et al. Pollen viability of 43 pear cultivars and comparison of testing methods[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报),2006,**23**(2):178-181(in Chinese).
- [6] STANLEY R G, LINSKENS H F. Pollen: biology, biochemistry, management[M]. Berlin: Springer-Verlag Illustrations, 1974: 307-308.
- [7] WANG G P(王改萍),YANG H N(杨红宁),NI G G(倪果果),et al. Study on *in vitro* culture conditions of pollens from four tree species

- of *Catalpa* Scop. including *Catalpa bungei*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 2009, **18**(2): 34—42 (in Chinese).
- [8] BREWBAKER J L, KWACK B H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth[J]. *American Journal of Botany*, 1963, **50**(9): 859—865.
- [9] FIRON N, NEPI M, PACINI E. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning[J]. *Annals of Botany*, 2012, **109**(7): 1 201—1 214.
- [10] NEPI M, FRANCHI G G, PADNI E. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies[J]. *Protoplasma*, 2001, **216**(3): 171—180.
- [11] CROWE J H, HOEKSTRA F A, CROWE L M. Anhydrobiosis[J]. *Annual Review of Physiology*, 1992, **54**(1): 579—599.
- [12] PACINI E, GUARNIERI M, NEPI M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review[J]. *Protoplasma*, 2006, **228**(1): 73—77.
- [13] DU J H(杜纪红), YE ZH W(叶正文), SU M SH(苏明申), *et al.* Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of peach *in vitro*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(1): 64—71(in Chinese).
- [14] LI X X(李旭新), ZHANG Y Q(张艳青), FENG X B(冯献宾), *et al.* *In vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia chinensis* Bunge[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(5): 951—956(in Chinese).
- [15] ZHANG SH 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 pyrifolia*)[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(2): 225—230(in Chinese).
- [16] ZHAI X J(翟学杰), DONG F X(董凤祥), ZHANG R Q(张日清), *et al.* Study on the medium components affection pollen germination and pollen tube growth of *Corylus heterophylla* × *C. avellana*[J]. *Forest Research* (林业科学研究), 2009, **22**(6): 753—757(in Chinese).
- [17] ZENG L X(曾丽霞), AI L W(艾应伟). Effect of boron on the biochemical function of pollen[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China* (中国土壤与肥料), 2008, (3): 9—11(in Chinese).
- [18] GONG SH J(龚双姣), MA T W(马陶武), LIU Q(刘 强). Effects of culture medium composition and culture conditions on pollen germination and pollen tube growth of *Chimonanthus praecox*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(6): 1 254—1 260(in Chinese).
- [19] JAFFE L A, WEISENSEEL M H, JAFFE L F. Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1975, **67**(2): 488—492.
- [20] DIGONNET C, ALDON D, LEDUC N, *et al.* First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization[J]. *Development*, 1997, **124**(15): 2 867—2 874.
- [21] WU K ZH(吴开志), XIAO Q W(肖千文), LIAO Y H(廖运洪), *et al.* Study on culture medium for walnut pollen germination *in vitro* [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2008, **25**(6): 941—945(in Chinese).
- [22] BOAVIDA L C, MCCORMICK S. TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2007, **52**(3): 570—582.
- [23] BURKE J J, VELTEN J, OLIVER M J. *In vitro* analysis of cotton pollen germination[J]. *Agronomy Journal*, 2004, **96**(2): 359—368.