

杜仲花粉离体萌发特征及花粉管微丝骨架分布

游韩莉^{1,3}, 贾婷婷^{1,3}, 田菊³, 王君^{1,2*}, 康向阳^{1,2}

(1 北京林业大学 林木育种国家工程实验室/林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; 2 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 3 北京林业大学 林学院, 北京 100083)

摘要:以干燥的杜仲成熟花粉为材料,对杜仲花粉离体萌发的适宜液体培养基配方进行了筛选,并对花粉萌发特征及花粉管微丝骨架分布规律进行了研究。结果表明:(1)适宜杜仲花粉离体萌发的液体培养基组成为 200 g/L 蔗糖+30 mg/L 硼酸+10 mg/L Ca(NO₃)₂,于 26 °C 条件下离体培养 18 h 的花粉萌发率可达 46.29%±3.75%。(2)在适宜液体培养条件下,杜仲花粉萌发率在培养 6 h 内急剧增长,随后趋于平稳;而花粉管在培养 8 h 内伸长较快,之后有放缓趋势,至培养 48 h 时,花粉管长度可达 363.14±30.51 μm。(3)杜仲花粉属于 2 胞花粉,花粉萌发过程中,营养核和生殖核的移动存在一定的时序性,通常营养核先于生殖核进入到花粉管;杜仲花粉生殖核的有丝分裂发生在花粉管中,离体培养 12 h 可逐渐观察到有丝分裂行为。(4)花粉萌发过程,微丝骨架形成束状,与花粉管伸长方向平行排布,与较为稀疏的网状微丝阵列组成连续系统,引导细胞核的运动。

关键词:杜仲;离体;液体培养基;花粉萌发;微丝骨架

中图分类号:Q813.1;Q245

文献标志码:A

Characteristics of *in vitro* Pollen Germination and Microfilament Distribution of Pollen Tubes of *Eucommia ulmoides* Oliv.

YOU Hanli^{1,3}, JIA Tingting^{1,3}, TIAN Ju³, WANG Jun^{1,2*}, KANG Xiangyang^{1,2}

(1 National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3 The Academy of Forestry of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, the optimal component of liquid medium for *in vitro* germination of dried mature pollen of *Eucommia ulmoides* Oliv. was screened and the characteristics of pollen germination and microfilament distribution of pollen tube were investigated. The results were as follows: (1) The optimal liquid medium for pollen germination contained 200 g/L sucrose, 30 mg/L boron acid and 10 mg/L calcium nitrate. The germination rate reached 46.29%±3.75% after incubating at 26 °C for 18 hours. (2) Under the optimal culture condition, germination rate increased sharply within 6 hours, and then stably. The tubes grew very fast within 8 hours, and then decreased the speed of elongation. After 48 h culturing, the length of tubes could reach 363.14±30.51 μm. (3) The pollen grains of *E. ulmoides* were two-celled. During the germination, the vegetative nucleus usually enters into the tube ahead of the generative nucleus. The mitosis of generative nucleus took place in the pollen tube, and the mitotic behavior can be observed gradually after 12 hours incubation in the liquid medium. (4) Microfilament bundles which formed during pollen germination paralleled to the direction of tube elongation. The bundled microfilaments formed a continuous system together with arrays of microfilament networks to move the nuclei in the tube.

收稿日期: 2013-12-21; 修改稿收到日期: 2014-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(31000306, J1103516)

作者简介: 游韩莉(1992-), 女, 在读本科生, 林学专业。E-mail: 624987831@qq.com

* 通信作者: 王君, 博士, 副教授, 主要从事林木倍性育种与细胞遗传学研究。E-mail: wangjun@bjfu.edu.cn

Key words: *Eucommia ulmoides*; *in vitro*; liquid medium; pollen germination; microfilament cytoskeleton

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 属杜仲科 (Eucommiaceae) 杜仲属 (*Eucommia*), 是中国特有植物种, 也是国家二级重点保护植物^[1]。其用途广泛, 经济价值显著, 在城乡绿化、用材、医药、食品以及制胶工业等方面具有巨大的开发潜力^[2-4]。围绕杜仲的开发利用、遗传改良等已有较多研究。其中, 杜红岩等^[5]采用选择育种方法选育出杜仲药用良种‘华仲 1 号’, 具有速生、杜仲皮产量高、雄花量大、适应性强等特点。

由于杜仲为单科单属单种存在, 单纯依靠优树选择、种内杂交等途径所能带来的遗传增益是有限的, 因此, 高鹏等^[6-7]曾尝试开展杜仲花粉染色体加倍技术研究, 试图通过多倍体育种途径突破杜仲遗传改良瓶颈。尽管通过秋水仙碱和高温等处理方式获得了较高比例的杜仲 2n 花粉, 甚至最高可达 70.2%, 却并未通过授粉获得三倍体后代^[7]。其原因尚不明确, 据推测, 可能是由于 2n 花粉参与受精过程中存在萌发迟缓、萌发异常等问题, 导致不能优先于正常雄配子与卵细胞结合^[8]。目前, 有关杜仲花粉的萌发特征及 2n 花粉萌发迟缓的机制尚不清楚, 仅贾小明等^[9]对杜仲正常花粉的贮藏条件和花粉萌发固体培养基进行了初步筛选。本研究对杜仲正常花粉离体萌发的适宜液体培养基成分、萌发特征, 以及萌发过程微丝骨架的分布规律等进行了探讨, 以便为进一步开展不同倍性花粉萌发特征比较及 2n 花粉萌发迟缓的细胞学机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

花粉采集于北京林业大学校园内生长健壮的杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 雄株, 待其处于散粉期时, 采集刚开始散粉的雄花, 置于室内自然干燥, 收集花粉, -20 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 花粉培养及各处理梯度 采用液体培养法, 称取 5 mg 杜仲花粉置于 2 mL 培养基中, 26 °C 100 r/min 振荡光照培养。首先采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对蔗糖、硼酸和 Ca^{2+} 浓度进行了初步研究, 各处理培养基组成见表 1, 每处理重复 3 次。基于正交试验结果, 固定 Ca^{2+} 浓度为 10 mg/L, 进一步利用双因素试验对蔗糖和硼酸浓度进行了筛选, 蔗糖浓度梯度为 200、250 和 300 g/L, 硼酸浓度梯度为

20、25、30 和 35 mg/L。通过统计培养 18 h 的花粉萌发率分析最适培养基组成。

1.2.2 花粉萌发率统计 对不同培养条件的花粉分别取样, 每重复随机观察 5 个视野, 统计花粉总数不少于 300 粒。

花粉萌发率 = (萌发花粉数/花粉粒总数) × 100%

1.2.3 花粉管长度测量 对不同培养时间的花粉分别取样, 经 4% 多聚甲醛固定后, 随机选取已萌发的花粉用显微测微尺测量花粉管长度, 每样品随机测量 50 个花粉管。

1.2.4 微丝骨架及细胞核荧光定位 参照尚峰男等^[10]的方法, 将不同萌发时间的杜仲花粉管进行微丝骨架荧光定位。具体操作: 采用 4% 多聚甲醛 (50 mmol · L⁻¹ Pipes 配制) 固定 1 h, 经相应缓冲液清洗后, 用 PBS 配制的 1% Triton X-100 抽提 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 15 min, 然后用 Rhodamine-Phalloidin 染色 2 h, 相应缓冲液洗涤后用含 DAPI 的甘油封片。所有制片均采用 Leica TCS-SP5 型激光共聚焦扫描显微镜进行观察和照相。

1.2.5 统计分析

数据统计及方差分析采用 DPS v7.05 软件, 其中百分率数据经反正弦平方根转换后进行方差分析, 多重比较采用 LSD 法; 数据管理和图表绘制采用 SigmaPlot 12.0 软件。

2 结果与分析

2.1 杜仲花粉离体萌发液体培养基筛选

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对杜仲花粉离体萌发液体培养基中蔗糖、硼酸和 Ca^{2+} 浓度组合进行了筛选 (表 1)。由极差分析 (R 值) 可以看出, 蔗糖浓度的 R 值最大, 为 24.81, 表明蔗糖浓度是对杜仲花粉离体萌发率最重要的液体培养基组分; 而 Ca^{2+} 浓度 R 值最小, 仅为 1.35, 表明 Ca^{2+} 浓度对杜仲花粉液体萌发率的影响最小。通过极差分析各液体培养基成分对杜仲花粉离体萌发率的影响顺序为: 蔗糖浓度 > 硼酸浓度 > Ca^{2+} 浓度, 并且初步分析出 200 g/L 蔗糖 + 20 mg/L 硼酸 + 10 mg/L $Ca(NO_3)_2$ 为该正交试验所筛选出的最优组合。

进一步通过方差分析 (表 2) 表明, 蔗糖浓度各水平间存在极显著差异 ($P < 0.01$), 其中蔗糖浓度为 200 g/L 时, 杜仲花粉离体萌发率极显著高于其

表 1 杜仲花粉离体萌发液体培养基组成 $L_{16}(4^5)$ 正交设计及萌发率极差分析Table 1 Orthogonal design and range analysis of germination rate for component screening of liquid medium for pollen germination of *E. ulmoides in vitro*

试验号 Treatment	因素 Factor			萌发率 Frequency of germination/%			平均值±标准误差 Mean±SE
	蔗糖 Sucrose/(g/L)	硼酸 H ₃ BO ₃ /(mg/L)	硝酸钙 Ca(NO ₃) ₂ /(mg/L)	I	II	III	
1	1(0)	1(0)	1(0)	3.48	3.08	2.02	2.86±0.44
2	1(0)	2(10)	2(10)	8.35	3.75	6.09	6.06±1.33
3	1(0)	3(15)	3(15)	4.91	6.83	7.57	6.44±0.79
4	1(0)	4(20)	4(20)	8.46	8.75	5.16	7.46±1.51
5	2(100)	1(0)	2(10)	19.29	21.93	15.91	19.04±1.74
6	2(100)	2(10)	1(0)	18.12	26.67	26.87	23.88±2.88
7	2(100)	3(15)	4(20)	23.64	26.06	22.12	23.94±1.15
8	2(100)	4(20)	3(15)	24.85	30.10	19.48	24.81±3.07
9	3(150)	1(0)	3(15)	22.21	24.19	18.85	21.75±1.56
10	3(150)	2(10)	4(20)	24.64	22.85	20.84	22.78±1.10
11	3(150)	3(15)	1(0)	24.55	30.16	23.19	25.97±2.13
12	3(150)	4(20)	2(10)	29.63	34.12	33.11	32.29±1.36
13	4(200)	1(0)	4(20)	28.53	31.09	26.22	28.61±1.41
14	4(200)	2(10)	3(15)	24.54	31.31	32.63	29.50±2.51
15	4(200)	3(15)	2(10)	31.04	29.17	31.29	30.50±0.67
16	4(200)	4(20)	1(0)	32.96	29.01	38.27	33.41±2.68
\bar{x}_1	5.70	18.07	21.53				
\bar{x}_2	22.92	20.56	21.97				
\bar{x}_3	25.70	21.71	20.62				
\bar{x}_4	30.51	24.49	20.70				
R	24.81	6.42	1.35				

他各浓度水平;在无蔗糖的液体培养基中,杜仲花粉也表现出一定程度的萌发能力,但是其萌发率极显著低于含有蔗糖的培养基。硼酸各浓度水平间也存在极显著差异($P < 0.01$),其中硼酸浓度为 20 mg/L时,杜仲花粉离体萌发率显著高于其他各浓度水平;而 Ca^{2+} 浓度各水平间差异不显著($P > 0.05$)。由于通过正交试验筛选出的蔗糖最优浓度和硼酸最优浓度均为设计中的最大浓度水平,因此,有必要进一步对其浓度水平进行筛选。

进一步对蔗糖和硼酸进行双因素试验发现(表 3),蔗糖浓度的 3 个不同处理间差异达极显著水平($P < 0.01$),当蔗糖浓度超过 200 g/L 后,花粉萌发率呈显著下降趋势,200 g/L 蔗糖浓度的花粉萌发率极显著高于其他浓度水平,表明 200 g/L 为杜仲花粉离体萌发液体培养基的最佳蔗糖浓度。硼酸的 4 个不同浓度水平间差异极显著($P < 0.01$),硼酸浓度为 30 mg/L 时,杜仲花粉离体萌发率显著高于其他浓度水平,而浓度为 20 mg/L 和 25 mg/L 之间差异不显著,表明 30 mg/L 为杜仲花粉离体萌发液体培养基的最佳硼酸浓度。

表 2 各因素不同水平对萌发率影响差异显著性及多重比较

Table 2 Multiple comparison of pollen germination rate with different factors in the orthogonal design

因素水平 Factors level	萌发率 Frequency of germination/%	
蔗糖浓度 Concentration of sucrose/(g/L)	200	30.51 aA
	150	25.70 bB
	100	22.92 cB
	0	5.70 dC
硼酸浓度 Concentration of H ₃ BO ₃ /(mg/L)	20	24.49 aA
	15	21.71 bAB
	10	20.56 bBC
硝酸钙浓度 Concentration of Ca(NO ₃) ₂ /(mg/L)	0	18.07 cC
	10	21.97 aA
	0	21.53 aA
	20	20.70 aA
	15	20.62 aA

注:不同小写字母表示差异显著($\alpha=0.05$),不同大写字母表示差异极显著($\alpha=0.01$)。下同。

Note: Different small letters represent statistically significant differences at $\alpha=0.05$; different capital letters represent statistically highly significant differences at $\alpha=0.01$. The same as below.

综上所述,杜仲花粉离体萌发液体培养基的最佳组成为 200 g/L 蔗糖+30 mg/L 硼酸+10 mg/L Ca(NO₃)₂。用该培养基于 26 °C 条件下对杜仲花粉离体培养 18 h 的花粉萌发率可达 46.29%±3.75%。

2.2 杜仲离体萌发花粉管生长规律

在最适液体培养条件下,培养 2 h 即可观察到杜仲花粉萌发。随着培养时间的延长,萌发率逐渐升高(图 1, A)。在培养 2~6 h 之间,萌发率从 17.50%±0.82%急剧增长至 37.93%±1.47%,而在培养 6~48 h 之间,萌发率的增长趋于平稳,仅由 37.93%±1.47%增长至 48.59%±2.18%,表明离体培养条件下,杜仲花粉的大量萌发主要集中于培养 6 h 以内。培养 32~48 h 之间,花粉萌发率差异不显著,表明此时具备萌发能力的花粉均已完成萌发。

对不同培养时间花粉管长度进行测量,发现杜仲花粉管平均长度随着培养时间的延长总体呈现增加趋势(图 1, B)。在培养 2~8 h 之间,花粉管生长速度较快,平均生长速度为 22.46 μm·h⁻¹;随后花

粉管的生长速度趋于稳定,平均在 4.59 μm·h⁻¹,至培养 48 h 时,花粉管长度达 363.14±30.51 μm。

2.3 杜仲花粉细胞核行为及花粉管内微丝骨架的分布

杜仲花粉属于 2 胞花粉,在成熟花粉中,生殖核尚未发生有丝分裂(图 2, A)。离体萌发过程中,可观察到营养核和生殖核陆续进入到花粉管内,通常情况下营养核先于生殖核进入到花粉管中(图 2, B)。杜仲花粉离体萌发过程,营养核和生殖核的移动存在一定时序性(表 4)。培养 2 h 时,在 8.20% 的萌发花粉中可观察到营养核已进入花粉管,而 4.92% 的生殖核也进入到花粉管内。在培养 2~4 h 间,营养核和生殖核进入到花粉管中的比例剧增,4 h 时,已有 94.03% 的花粉管中可观察到营养核,85.96% 的花粉管中可观察到生殖核。培养 18 h 后,

表 4 不同培养时间花粉细胞核的位置及生殖核有丝分裂进程

Table 4 Position of nuclei and process of generative nucleus mitosis in different culturing time

培养时间 Culturing time/h	营养核进入 花粉管比例 Frequency of vegetative nucleus entered tube/%	生殖核进入 花粉管比例 Frequency of generative nucleus entered tube/%	生殖核正在进行和 已完成有丝分裂比例 Frequency of generative nucleus undergoing and complete mitosis/%
2	8.20	4.92	0.00
4	94.03	85.96	0.00
6	94.03	92.78	0.00
8	94.74	94.74	0.00
12	96.49	95.45	35.62
18	100.00	95.88	52.50
24	100.00	98.63	54.05
32	100.00	97.30	60.88
40	100.00	100.00	64.18
48	100.00	100.00	65.04

表 3 蔗糖和硼酸双因素试验花粉萌发率结果及多重比较

Table 3 Results and multiple comparison of pollen germination rate in the two-factor test between concentrations of sucrose and H₃BO₃

因素水平 Factors level	萌发率 Frequency of germination/%	
蔗糖浓度 Concentration of sucrose/(g/L)	200	35.81 aA
	250	29.60 bB
	300	14.38 cC
硼酸浓度 Concentration of H ₃ BO ₃ /(mg/L)	30	33.77 aA
	35	30.19 bA
	20	21.56 cB
	25	20.87 cB

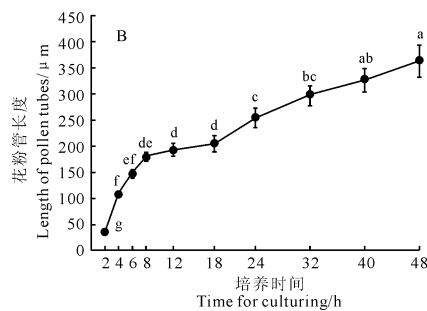
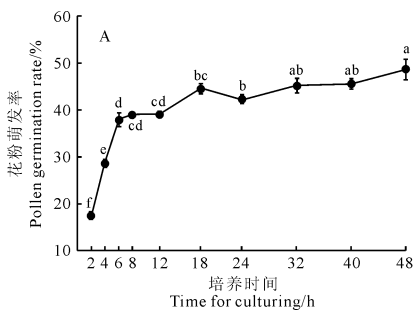


图 1 最适液体培养条件下杜仲花粉萌发特征

A. 花粉萌发率随培养时间的变化; B. 花粉管长度随培养时间的变化

Fig. 1 Characteristics of the pollen germination of *E. ulmoides* under optimal condition

A. The pollen germination rate changing with culturing time; B. The pollen tube length changing with culturing time

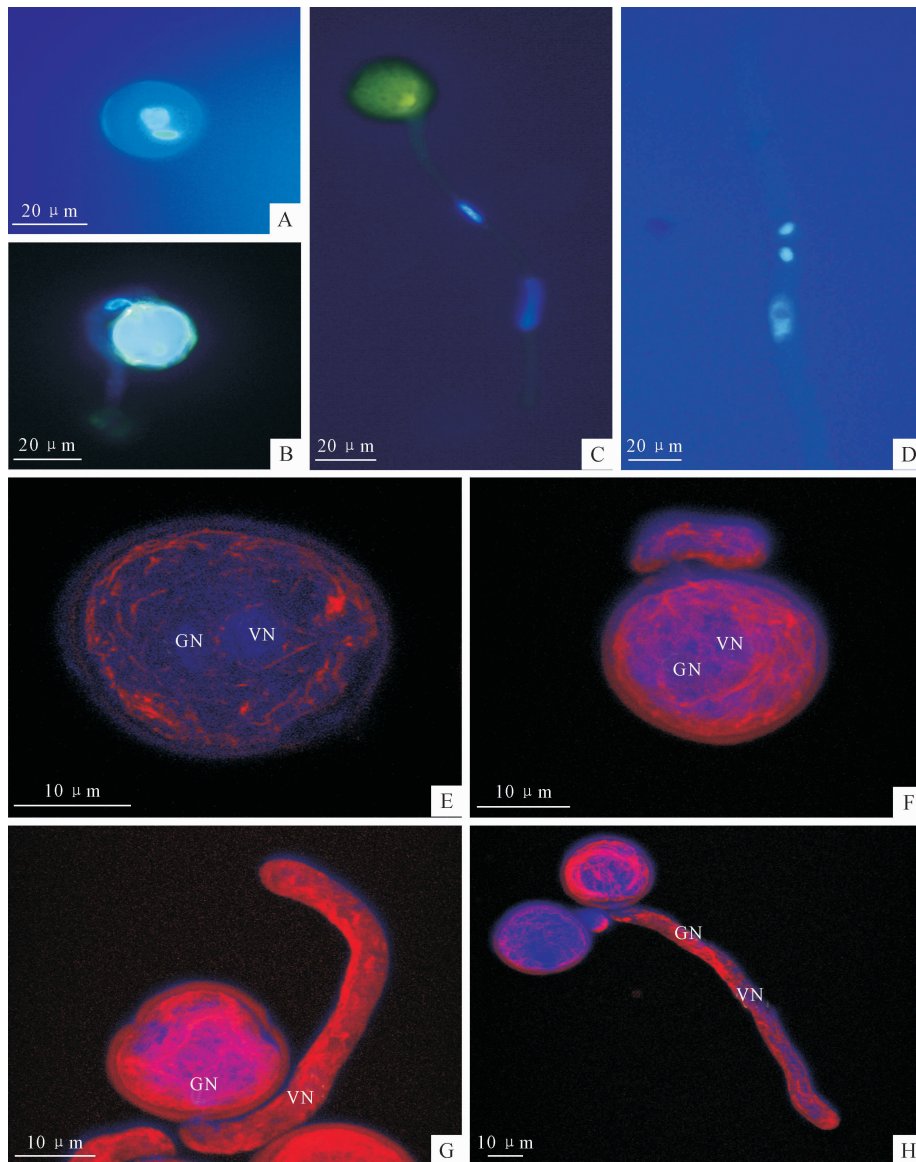


图 2 杜仲花粉离体萌发过程细胞核行为及微丝排布

- A. 杜仲水合 2 胞花粉; B. 花粉萌发早期营养核进入花粉管内, 而生殖核仍在花粉中; C. 营养核与生殖核均进入到花粉管内;
D. 生殖核完成有丝分裂形成 2 个精细胞; E. 网状微丝骨架分布于水合杜仲成熟花粉细胞质中; F. 花粉萌发初期微丝骨架聚集成束;
G. 花粉内微丝束推动生殖核进入花粉管内; H. 花粉管内微丝束与花粉管伸长方向平行, 与网状微丝阵列一起推动花粉核在管内移动. VN 表示营养核位置, GN 表示生殖核位置

Fig. 3 Behaviors of vegetative and generative nuclei and microfilament arrangement during pollen germination of *E. ulmoides*

- A. Two-celled pollen grain of *E. ulmoides*; B. Vegetative nucleus enters into the pollen tube, but generative nucleus still stays in the pollen in the early germination; C. Both vegetative and generative nuclei are in tube; D. Formation of two sperms after mitosis of generative nucleus; E. Microfilament network distributed in the cytoplasm of hydrated mature pollen grain; F. Formation of bundled microfilaments during early pollen germination; G. Microfilament bundles drive the generative nucleus entering the tube; H. Microfilament bundles paralleled to the direction of tube elongation move the nuclei in tube together with arrays of microfilament networks. VN represents position of vegetative nucleus; GN represents position of generative nucleus

全部萌发花粉粒中的营养核都进入花粉管, 而尚有 4.12% 的生殖核停留在花粉粒内。直至培养 40 h, 所有萌发花粉中的生殖核才全部移入花粉管中(图 2, C)。

杜仲花粉生殖核的有丝分裂发生在花粉管中, 最终形成 2 个球形精核(图 2, D)。培养初期, 尽管大量生殖核进入到花粉管内, 但是并未发生有丝分裂。直至培养 12 h, 才在 35.62% 的花粉管内观察

到生殖核有丝分裂行为。随着培养时间的增加,生殖核进行或完成有丝分裂的比例逐渐增加,至培养 40 h 后趋于稳定,在 65% 左右。

通过 Rhodamine-Phalloidin 荧光定位,观察到在杜仲花粉离体培养过程中微丝骨架排列与花粉核的移动存在一定关系。在尚未开始萌发的水合杜仲花粉中,微丝骨架呈网状分布于细胞质内(图 2,E)。随着花粉的萌发,微丝骨架逐渐聚集呈束状,推动营养核和生殖核向花粉管内移动(图 2,F 和 G)。在花粉管伸长过程中,微丝束主要与花粉管伸长方向平行排布,同时还存在一些微丝骨架较为稀疏、具网状分布的阵列区域,而营养核和生殖核往往悬浮在这些区域中(图 2,H),推测花粉管中核的移动可能是由于微丝束与网状微丝阵列所组成的连续系统的运动所致。

3 讨 论

花粉离体萌发是花粉生命力测定的重要方法。贾小明等^[9]曾对杜仲花粉离体萌发的固体培养基中的琼脂和蔗糖最适浓度进行了研究,发现琼脂和蔗糖浓度对干燥花粉萌发率影响均较大,以 5 g/L 琼脂+200 g/L 蔗糖为最佳。然而,该研究并未对花粉离体萌发常添加的硼酸和 Ca^{2+} 进行探讨。本研究在与贾小明等^[9]取得蔗糖最适浓度为 200 g/L 的同样结论基础上,更深入探讨了硼酸和 Ca^{2+} 浓度对杜仲花粉离体萌发的影响,是对前人研究的补充和丰富。

在花粉萌发过程中,硼酸具有增加糖的吸收、转运和代谢,帮助形成胞外 Ca^{2+} 梯度,促进花粉萌发和花粉管生长等作用^[11], Ca^{2+} 对花粉管极性生长及生长方向具有重要的调控作用^[12-13]。本研究在培养 2 h 即观察到 $17.50\% \pm 0.82\%$ 的花粉萌发,而贾小明等^[9]则在培养 6 h 才观察到花粉萌发,且萌发率最高仅为 5.3%。由于本研究发现液体培养基中 Ca^{2+} 浓度对杜仲花粉离体萌发率影响不显著,因此,推测硼酸的添加在促进杜仲花粉萌发方面起到了关键作用。但是,硼酸对花粉萌发影响与其浓度关系显著,过高的硼酸浓度往往抑制花粉的萌发^[11,14]。本研究当硼酸浓度超过 30 mg/L 时,花粉萌发率出现了显著的下降,符合前人的研究规律。

适用于花粉离体萌发的培养基类型,通常可分

为固体和液体 2 类。其中,固定培养基被认为具有透气性好、便于观察等优点,在植物花粉生活力测定研究中普遍采用^[15-16]。然而,由于固体培养基必须使用琼脂作为支撑物,花粉在萌发过程中可能穿入到琼脂中进行生长,在进行免疫荧光定位等细胞生物学研究中,不利于荧光染料、抗体等试剂的渗入,而且伸长的花粉管往往不在同一焦平面内,不利于显微观察、摄像。因此,在有关花粉管细胞骨架定位等研究中,通常采用液体培养基作为花粉离体萌发的介质^[10,17-20]。本研究明确了杜仲花粉离体萌发的适宜液体培养基成分配比,为开展杜仲花粉管细胞骨架定位等细胞生物学研究奠定了基础,并且已在花粉管微丝骨架分布研究方面取得了较为理想的结果。

微丝骨架对花粉管的极性生长以及管内细胞质和细胞器的运动均具有重要作用^[13,21-24]。Liu 等^[25]研究发现,银杏(*Ginkgo biloba*)花粉管萌发过程中微丝网络紧密环绕细胞核排列,管核周围存在明显的辐射状微丝,与管核载花粉管内的运动及转向等有关。挪威云杉(*Picea abies*)花粉萌发过程中,管内存在平行于花粉管伸长方向的连续的网状微丝束,这些微丝束阵列紧密包裹着造粉体和管核,使其悬浮在花粉管中,并推动其向顶部移动^[26-27]。而在毛白杨(*Populus tomentosa*)^[20]及本研究的杜仲等被子植物花粉管中,微丝主要呈束状与花粉管伸长方向平行,细胞核悬浮在管内,仅有少量网状微丝围绕细胞核存在。因此,微丝骨架对被子植物和裸子植物花粉管内细胞核运动的控制方式可能存在一定差异。

在利用 2n 花粉杂交进行林木多倍体育种研究过程中,人工诱导的 2n 花粉往往存在萌发迟缓、竞争力差等问题,导致子代中多倍体得率低下,甚至不能获得多倍体后代^[8]。然而,有关人工诱导 2n 花粉在萌发过程中萌发迟缓、竞争力差的机制尚不清楚,有必要引入细胞骨架定位、 Ca^{2+} 浓度梯度分布研究等细胞生物学相关技术方法加以探讨。本研究在明确了适宜杜仲花粉离体萌发的液体培养基的基础上,分析了正常花粉离体萌发特征和花粉管内细胞核行为及微丝骨架分布规律,为进一步探讨上述机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 周政贤. 中国杜仲[M]. 贵州: 科技出版社, 1993.
- [2] ZHANG K J(张康健), WANG L(王 蓝), MA X H(马希汉). Advances and prospects of the comprehensive exploitation of *Eucommia ulmoides*[J]. *J. Northwest For. Univ.* (西北林学院学报), 1996, **11**(2): 75–79(in Chinese).
- [3] DU H Y(杜红岩), ZHAO G(赵 戈), LU X K(卢绪奎). The development tendency of the industrialization and culture techniques of *Eucommia ulmoides* in China[J]. *For. Res.* (林业科学研究), 2000, **13**(5): 554–561(in Chinese).
- [4] SUN Z, LI F, DU H, *et al.* A novel silvicultural model for increasing biopolymer production from *Eucommia ulmoides* Oliver trees[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, **42**: 216–222.
- [5] DU H Y(杜红岩), DU L Y(杜兰英), WU Y T N(乌云塔娜), *et al.* An elite variety for medicinal use: *Eucommia ulmoides* ‘Huazhong 1’ [J]. *Sci. Silvae Sin.* (林业科学), 2013, **49**(11): 195(in Chinese).
- [6] GAO P(高 鹏), LIN W(林 威), KANG X Y(康向阳). Pollen chromosome doubling of *Eucommia ulmoides* induced by colchicines[J]. *J. Beijing For. Univ.* (北京林业大学学报), 2004, **26**(4): 39–42(in Chinese).
- [7] 高 鹏. 杜仲配子与合子染色体加倍技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [8] KANG X Y(康向阳), ZHU ZH T(朱之梯). A study on the 2n pollen vitality and germinant characteristics of white poplars[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1997, **19**(4): 402–406(in Chinese).
- [9] JIA X M(贾小明), LI J H(李俊红), LI ZH Q(李周岐). Study on pollen form and preservation and germination quality of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *J. Northwest A&F Univ.* (西北农林科技大学学报), 2008, **36**(7): 149–153(in Chinese).
- [10] SHANG F N(尚峰男), SONG SH Y(宋少宇), TIAN J(田 菊), *et al.* *In vitro* pollen tube growth and distribution of microfilaments in pollen tube of *Pinus tabulaeformis*[J]. *Sci. Silvae Sin.* (林业科学), 2013, **49**(4): 34–38(in Chinese).
- [11] WANG Q, LU L, WU X, *et al.* Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*[J]. *Tree Physiol.* , 2003, **23**(5): 345–351.
- [12] MALHÓ R, READ N D, PAIS M S, *et al.* Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth[J]. *Plant J.* , 1994, **5**(3): 331–341.
- [13] HEPLER P K, VIDALI L, CHEUNG A Y. Polarized cell growth in higher plants[J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* , 2001, **17**(1): 159–187.
- [14] ZHANG R(张 瑞), LI Y(李 洋), LIANG Y W(梁有旺), *et al.* *In vitro* pollen germination and tube growth characteristics in pecan (*Carya illinoensis*) [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(9): 1 916–1 922(in Chinese).
- [15] HU J Y(胡君艳), LI Y(李 云), SUN Y H(孙宇涵), *et al.* Optimization of the pollen vitality identification and storage methods of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin. Agri. Sci. Bul.* (中国农学通报), 2008, **24**(5): 148–153(in Chinese).
- [16] JIA J W(贾继文), WANG J H(王军辉), ZHANG J F(张金凤), *et al.* Pollen vitality of *Catalpa scop*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(5): 867–873(in Chinese).
- [17] LI Y(李 岩), YAN L F(阎隆飞), XU SH X(徐是雄). Distribution of F-actin and microtubules in pollen and pollen tube of *Lilium davidii*[J]. *Acta Bot. Sin.* (植物学报), 1998, **40**(10): 890–894(in Chinese).
- [18] GAN G F(甘国峰), XU J(徐 进), LU Y(陆 叶), *et al.* Microfilament skeleton in the pollen and pollen tube of *Cunninghamia lanceolata* [J]. *Sci. Silvae Sin.* (林业科学), 2011, **47**(3): 175–177(in Chinese).
- [19] GAN G F(甘国峰), LU Y(陆 叶), XU J(徐 进), *et al.* Microtubule organization in pollen and pollen tube of *Cunninghamia lanceolata* [J]. *Sci. Silvae Sin.* (林业科学), 2012, **48**(7): 39–44(in Chinese).
- [20] CAO Y, HAO R, LIU M, *et al.* Distribution of nuclei and microfilaments during pollen germination in *Populus tomentosa* Carr. [J]. *Afr. J. Agri. Res.* , 2012, **7**(17): 2 679–2 682.
- [21] TAYLOR L P, HEPLER P K. Pollen germination and tube growth[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* , 1997, **48**: 461–491.
- [22] VOLKMANN D, BALUŠKA F. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks[J]. *Microsc. Res. Techniq.* , 1999, **47**(2): 135–154.
- [23] VIDALI L, HEPLER P K. Actin and pollen tube growth[J]. *Protoplasma*, 2001, **215**(1): 64–76.
- [24] LIU ZH Q(刘珠琴), ZHANG SH L(张绍铃), XU G H(徐国华). Composition of microfilament skeleton and its regulatory effects on polar growth of pollen tubes[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(11): 2 356–2 362(in Chinese).
- [25] LIU J M, ZHANG H, LI Y. Cytoskeleton in pollen and pollen tubes of *Ginkgo biloba* L. [J]. *J. Integ. Plant Biol.* , 2005, **47**(8): 952–958.
- [26] LAZZARO M D. The actin microfilament network within elongating pollen tubes of the gymnosperm *Picea abies* (Norway spruce)[J]. *Protoplasma*, 1996, **194**(3): 186–194.
- [27] ANDERHAG P, HEPLER P K, LAZZARO M D. Microtubules and microfilaments are both responsible for pollen tube elongation in the conifer *Picea abies* (Norway spruce)[J]. *Protoplasma*, 2000, **214**(3): 141–157.