

网络出版时间:2021-12-10 18:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.06.011

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20211209.0917.010.html

郁金香小孢子发育与花粉萌发特性研究

杨延红,宋桂全,李孔栋,姜倩倩,李光耀,孟迎迎

(潍坊学院 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室,山东 潍坊 261000)

【摘要】【目的】探究郁金香(*Tulipa gesneriana*)小孢子发育过程及液体培养基组分对花粉萌发和生长的影响,明确花粉发育过程中的细胞学变化及花粉萌发的适宜培养基组分,为郁金香杂交育种及胚胎学研究奠定基础。【方法】以郁金香品种“阿帕尔顿”种球为材料,用体积分数 0.05%高锰酸钾溶液消毒处理后,剥出种球内大小不同的花芽,利用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行荧光染色,确定小孢子发育时期;将郁金香种球定植于花盆内,按常规方法培养 8 周后取新鲜花粉进行离体培养,以 200 mg/L 磷酸二氢钾+200 mg/L 硫酸镁为基础培养基,分别添加蔗糖(0,50,100,150,200,250 g/L)、硼酸(0,60,80,100,120,140 mg/L)、氯化钙(0,100,300,500,700,900 mg/L),在 1,3,5,7 h 取花粉镜检确定各组分最合适的质量浓度;再在筛选的最佳培养基组分下培养 1,3,5,7 h,确定花粉萌发的最佳培养时间。【结果】郁金香小孢子发育历经四分体时期、单核早中期、单核靠边期和二胞花粉时期,其中以四面体型四分体居多,偶见左右对称型;花粉发育过程中存在发育不同步、异常花粉等现象;蔗糖、硼酸和钙对郁金香花粉萌发和花粉管生长影响显著,最适液体培养基组分为基础培养基(200 mg/L 磷酸二氢钾+200 mg/L 硫酸镁)+150 g/L 蔗糖+100 mg/L 硼酸+500 mg/L 氯化钙,在此条件下培养 5 h,花粉萌发率高达 69.60%,花粉管长度为 439.12 μm 。【结论】郁金香小孢子发育过程中以四面体型四分体居多,偶见左右对称型。在最佳培养条件下,郁金香花粉萌发情况及花粉管生长状态最好。

【关键词】郁金香;小孢子发育;花粉萌发;培养基组分

【中图分类号】S682.2⁺63

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2022)06-0093-08

Characteristics of microspore development and pollen germination of *Tulipa gesneriana* in vitro

YANG Yanhong, SONG Guiquan, LI Kongdong, JIANG Qianqian,
LI Guangyao, MENG Yingying

(Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang University,
Weifang, Shandong 261000, China)

Abstract: 【Objective】This study explored the microspore development process and the effects of liquid medium components on pollen germination and pollen tube growth of *Tulipa gesneriana*, and clarified the cytological changes of pollen development process and the suitable medium components for pollen germination to lay foundation for hybrid breeding and embryology research of *Tulipa gesneriana*. 【Method】The bulbs of *Tulipa gesneriana* ‘Apeldoorn’ were disinfected with potassium permanganate solution at volume fraction of 0.05% and flower buds with different sizes were peeled out. The microspore development period was determined by fluorescence staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). After 8 weeks of culture according to the conventional method, fresh pollen was taken for *in vitro* culture. Basic

【收稿日期】2021-06-09

【基金项目】国家自然科学基金项目(31301733);山东省高等学校科技发展计划项目(J18KA157);潍坊学院博士基金资助项目(2012BS19)

【作者简介】杨延红(1978—),女,山东聊城人,讲师,博士,主要从事植物生殖生物学研究。E-mail:yanhongyang11@163.com

medium was 200 mg/L potassium dihydrogen phosphate and 200 mg/L magnesium sulfate, and sucrose (0, 50, 100, 150, 200 and 250 g/L), boric acid (0, 60, 80, 100, 120 and 140 mg/L) and calcium chloride (0, 100, 300, 500, 700 and 900 mg/L) were added into the basic medium. Pollen was taken for microscopic examination at 1, 3, 5 and 7 hours to determine the most appropriate concentration of each component. Then pollen cultured for 1, 3, 5 and 7 h under optimal medium components was analyzed to determine appropriate culture time for pollen germination. 【Result】 The microspore of *Tulipa gesneriana* ‘Apeldoorn’ developed in four periods of tetrad, early-or mid-uninucleate, late uninucleate and bicellular pollen with most were tetrahedral and occasionally some were isobilateral. In the process of pollen development, there were phenomena such as development asynchrony and abnormal pollen. Sucrose, boric acid and calcium in medium had significant influence on pollen germination and pollen tube growth. The optimum liquid medium components included basic medium (200 mg/L potassium dihydrogen phosphate+200 mg/L magnesium sulfate), 150 g/L sucrose, 100 mg/L H_3BO_3 and 500 mg/L $CaCl_2$. Under these conditions, the pollen germination rate reached 69.60% and the pollen tube length was 439.12 μm after 5 h. 【Conclusion】 In the process of tulip microspore development, most tetrads were tetrahedral and occasionally some were isobilateral. The best pollen germination and pollen tube growth of *Tulipa gesneriana* ‘Apeldoorn’ were obtained under optimal conditions.

Key words: *Tulipa gesneriana*; microspore development; pollen germination; medium component

花粉是高等植物雄性器官,在双受精过程中起着传递父本基因的作用,了解植物小孢子发育的胚胎学进程对于品种改良、新品种繁育意义重大。目前杂交育种中获得单倍体植株的最佳方法为小孢子培养技术,但不是所有发育时期的小孢子均可培养成功,如在黄瓜^[1]、芜菁^[2]等多数植物中仅单核靠边期的的小孢子可培养成功,从而获得所需特性的纯种个体,减少繁殖周期和加速繁育过程。因此研究不同植物小孢子发育时期是成功培养小孢子的前提。

杂交育种中花粉活力的高低与育种成功率密切相关,需选择花粉活力高的品种作为父本,授粉后才可得到较多的杂交种子。目前检测花粉活力最准确的方法是花粉离体萌发,通过选择合适的培养基将花粉体外萌发,找出活力高的品种作为父本,以提高杂交植物的受精率。适宜的培养基组分可促进花粉更好地体外萌发。蔗糖作为花粉培养基基础营养物质,起调节渗透压和提供能源作用^[3]。蔗糖含量太低会导致供能不足,且因影响渗透压会使花粉破裂;蔗糖含量过高则会导致培养基水势下降,致使花粉失水无法萌发。硼可促进花粉萌发及花粉管生长,提高受精率^[4-5],缺硼时植物雌雄蕊形成受到影响,一般表现为开花而不孕。钙离子是组成细胞壁果胶质的结构成分^[6],在多种植物中均发现钙可促进花粉萌发,培养基中无钙或低钙都可能出现花粉管顶管膨大及破裂^[7-9]。

郁金香(*Tulipa gesneriana*)是百合科郁金香属植物,世界著名球根花卉,花开时颜色缤纷,植株挺拔,具有极高的观赏价值,为园林绿化中重要的观赏花卉^[10]。随着我国经济的发展,人们对美景的需求日益增多,郁金香产业也得到快速发展,但我国优良的郁金香品种多从荷兰引进,国内对郁金香研究主要集中在品种引进和栽培上^[11-13],而对郁金香小孢子发育及花粉萌发等生殖方面的研究较少。本试验观察了郁金香小孢子发育过程,探讨了郁金香花粉培养的最适条件,以期对郁金香小孢子培养的时期选择及杂交育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阿帕尔顿(*Tulipa gesneriana* ‘Apeldoorn’)郁金香种球,由潍坊市农业科学研究院提供,低温处理30 d后备用。

1.2 郁金香小孢子发育过程观察

将郁金香种球经体积分数0.05%的高锰酸钾溶液消毒处理后,剥出种球内大小不同的花芽,用镊子摘掉花瓣,取出花药置于载玻片上用镊子挤压,释放出不同时期的花粉细胞后,滴1滴4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液,盖上盖玻片,制成临时装片,于奥林巴斯荧光显微镜下观察、拍照。照片拍摄均为同一视野,一张为明场照片,另一张为暗场DAPI染色的荧光照片。

1.3 郁金香花粉离体培养

将郁金香种球定植于直径 20 cm 花盆内,在室温 20 ℃、阳光充足的温室中培养,常规管理,8 周后开花,于晴天上午 10:00—10:30 取新鲜花粉用于离体培养。

依据前期试验结果,郁金香花粉在含有单一成分蔗糖、硼酸或钙的培养基中基本不萌发,因此本试验以 200 mg/L 硫酸镁+200 mg/L 磷酸二氢钾为基础培养基(调培养基 pH 始终在 5.6~6.0),改变基础培养基中的蔗糖(0, 50, 100, 150, 200, 250 g/L)、硼酸(0, 60, 80, 100, 120, 140 mg/L)、氯化钙(0, 100, 300, 500, 700, 900 mg/L)剂量水平,于 25 ℃下恒温培养,分别在培养 1, 3, 5, 7 h 取花粉,在倒置显微镜下镜检、拍照,并统计花粉萌发数量,计算花粉萌发率,筛选郁金香花粉适宜培养基。萌发标准为花粉管长度大于萌发孔的直径。花粉管长度用

测微尺测量,取平均值。

在以上筛选的最佳培养基组分下培养花粉 1, 3, 5 和 7 h,筛选郁金香花粉离体萌发的最佳时间。

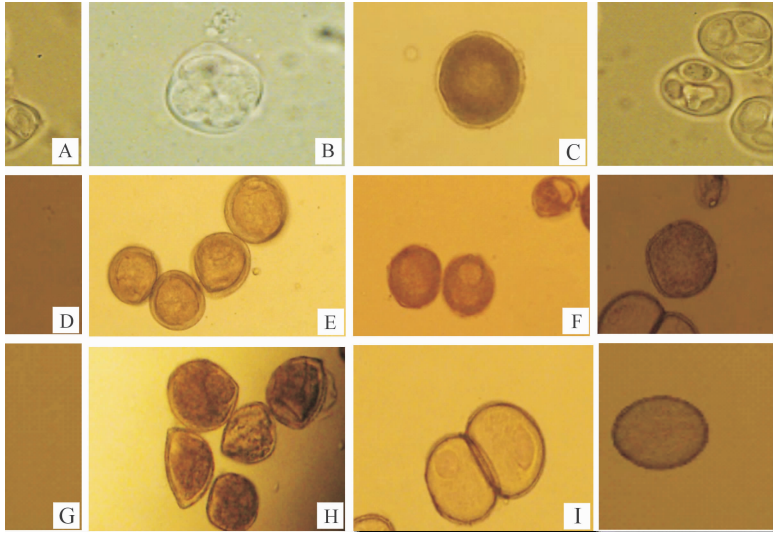
1.4 数据统计分析

试验数据用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 郁金香小孢子的发育时期及细胞学形态特征

2.1.1 四分体时期 郁金香小孢子母细胞完成整个减Ⅰ和减Ⅱ过程后产生 4 个子代细胞,称为四分体(图 1-A,B)。4 个子代细胞外围存在一个胼胝质壁,且各个细胞也有胼胝质分隔,使小孢子处于完全独立的空间中。染色后,核区域蓝色荧光明显(图 2-A,B)。其中多数为四面体型(图 1-A,图 2-A),少数为左右对称型(图 1-B,图 2-B)。



A. 四面体型四分体(40×);B. 左右对称型四分体(100×);C. 单核早中期早期(100×);D. 单核早中期晚期(40×);
E. 单核靠边期(20×);F. 二胞花粉早期(20×);G. 二胞花粉晚期(40×);H. 单核花粉和二胞花粉共存(20×);I. 异常花粉(40×)

A. Tetrad(tetrahedral type)(40×);B. Tetrad(symmetric type)(100×);C. Early uninucleate microspore(100×);
D. Late uninucleate microspore(40×);E. Late uninucleate microspore(20×);F. Early bicellular pollen(20×);
G. Late bicellular pollen(40×);H. Uninucleate microspore and bicellular pollen co-exist(20×);I. Abnormal pollen(40×)

图 1 郁金香小孢子不同发育时期的细胞学形态特征(明视野)

Fig. 1 Cytological characteristics of microspore development stages of *Tulipa gesneriana* (Bright field)

2.1.2 单核早中期 在完成整个减Ⅰ和减Ⅱ过程后,郁金香花粉壁的绒毡层开始产生酶,将四分体外侧的胼胝质壁破坏,单个细胞逐渐从四分体中解离,此时小孢子外壁较薄,细胞内积累的营养物质较少(图 1-C,D);然后绒毡层开始退化,随着发育小孢子细胞质变得更加浓厚,花粉外壁变厚,而细胞核则明显变大,在细胞中央,称为单核早中期(图 2-C,D)。

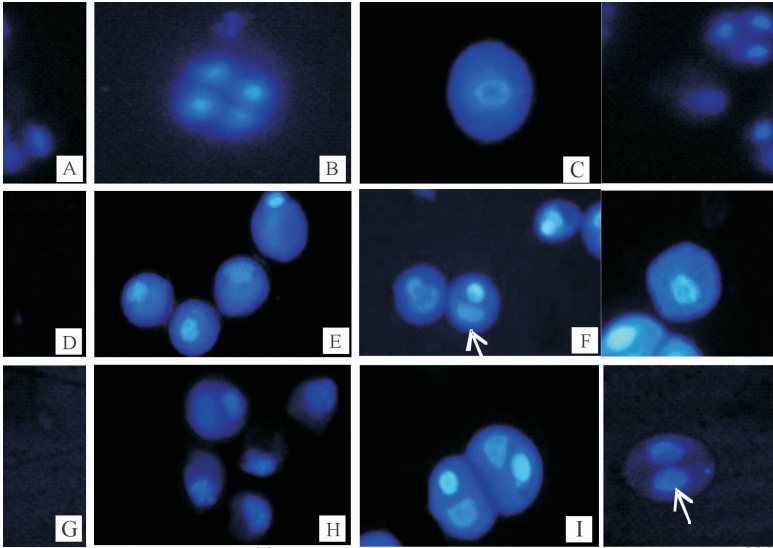
2.1.3 单核靠边期 随着郁金香小孢子的不断成熟,花粉将持续从绒毡层中汲取养料和能量,体积不断增大,最明显的特征是液泡逐渐变大,形成了中央大液泡。液泡在逐渐变大的过程中将小孢子细胞核从中央位置向外围挤压,最终细胞核位于细胞边缘靠近壁的位置(图 2-E),此时花粉外壁已发育完全,壁明显增厚(图 1-E,图 2-E),细胞核位于边缘,故称

为单核靠边期。

2.1.4 二胞花粉时期 郁金香小孢子继续生长,开始一次有丝分裂,产生两个细胞核,其中一个细胞核形态较大,呈半月形贴近大液泡,称为生殖核;另一个较圆的细胞核为营养核,故称该时期为二胞花粉时期。随后,生殖核由梭形(图 1-F,图 2-F)逐渐转变成椭圆形(图 1-G,图 2-G),成为成熟花粉粒,这一时期花粉粒内容物逐渐增多、颜色较深,且细胞壁增厚。

2.1.5 发育时期不同步和其他异常现象 在观察

时发现,同一个视野内存在不同发育时期的小孢子。为了探究这一现象,进行多次取样观察发现,这不是偶然现象,在一个花药制片中可能同时存在二胞花粉和单核花粉,且单核花粉体积明显小于二胞花粉(图 1-H,图 2-H)。因此,郁金香花粉发育是不同步的。郁金香花粉中 2 个二胞花粉紧紧粘连在一起,粘连花粉常在某一朵花的花药中。观察发现粘连花粉均具有正常的营养核和生殖核(图 2-I),但花粉内部细胞质颜色较淡,积累的营养物质明显少于正常花粉(图 1-I)。



A. 四面体型四分体(40×);B. 左右对称型四分体(100×);C. 单核早中期早期(100×);D. 单核早中期晚期(40×);
E. 单核靠边期(20×);F. 二胞花粉早期,箭头所指生殖核为梭形(20×);G. 二胞花粉晚期,箭头所指生殖核变为椭圆形(40×);H. 单核花粉和二胞花粉共存(20×);I. 异常花粉(40×)
A. Tetrad(tetrahedral type)(40×);B. Tetrad(symmetric type)(100×);C. Early uninucleate microspore(100×);
D. Late uninucleate microspore(40×);E. Late uninucleate microspore(20×);F. Early bicellular pollen, the nucleus of generative cell is fusiform(Shown by the arrow)(20×);G. Late bicellular pollen, the nucleus of generative cell becomes ellipase (Shown by the arrow)(40×);H. Uninucleate microspore and bicellular pollen co-exist(20×);I. Abnormal pollen(40×)

图 2 郁金香小孢子不同发育时期的细胞学形态特征(暗视野荧光照片)

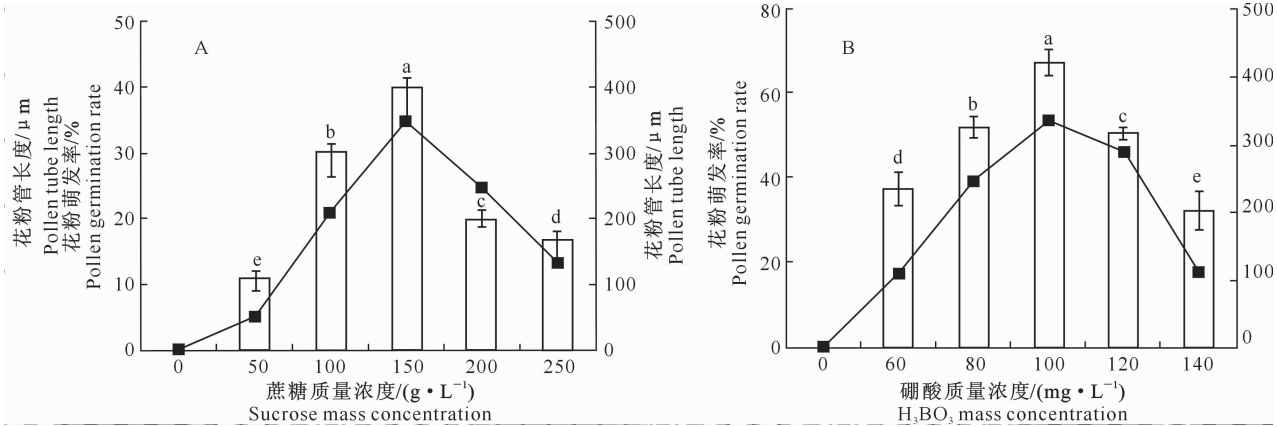
Fig. 2 Cytological characteristics of microspore development stages of *Tulipa gesneriana*
(Dark field fluorescence photograph)

2.2 郁金香花粉的离体培养条件

2.2.1 蔗糖对郁金香花粉萌发和花粉管生长的影响 如图 3-A 所示,郁金香花粉萌发数量与蔗糖质量浓度密切相关。不添加蔗糖时,郁金香花粉基本不萌发;蔗糖质量浓度为 150 g/L 时,郁金香花粉萌发率高达 39.98%;蔗糖质量浓度为 250 g/L 时,郁金香花粉萌发数量明显减少,多数花粉失水无法萌发。蔗糖还影响花粉管生长,其质量浓度低于或高于 150 g/L 时,花粉管生长均明显变慢。综上,郁金香花粉萌发及生长的适宜蔗糖质量浓度为 150

g/L。
2.2.2 硼酸对郁金香花粉萌发和花粉管生长的影响 由图 3-B 可知,郁金香花粉萌发数量随硼酸质量浓度的升高先增后减。不添加硼酸时,郁金香花粉基本不萌发;添加 100 mg/L 硼酸时,郁金香花粉萌发率为 67.45%;添加 140 mg/L 硼酸时,郁金香花粉萌发数量明显降低。在硼酸质量浓度为 100 mg/L 时,郁金香花粉管粗细均匀,生长最好,长度可达 335.47 μm;高于或低于该质量浓度时花粉管长度显著降低。综上,郁金香花粉萌发及生长的适

宜硼酸质量浓度为 100 mg/L。



图柱上标不同小写字母表示差异显著;□, 花粉萌发率,—■, 花粉管长度,下同
Different lowercase letters indicate significant differences;
□, Pollen germination rate,—■, Pollen tube length,the same below
图 3 蔗糖(A)和硼酸(B)对郁金香花粉萌发及花粉管生长的影响

Fig. 3 Effect of sucrose (A) and boric acid (B) on pollen germination rate and pollen tube growth of *Tulipa gesneriana*

2.2.3 钙对郁金香花粉萌发和花粉管生长的影响

由图 4-A 可知,郁金香花粉萌发数量随着钙质量浓度增大先增后减。不添加外源钙时,郁金香花粉基本不萌发,推测可能是由于花粉本身内源钙含量不足所致;添加 500 mg/L 钙时,花粉萌发率为 57.38%;添加 900 mg/L 钙时,萌发的花粉数量极少。钙也影响花粉管生长速度,添加 500 mg/L 钙时,花粉管长度迅速增大,达到 346.21 μm ;过低或过高质量浓度钙均明显不利于花粉管的生长。综上,郁金香花粉萌发及生长的适宜钙质量浓度为 500 mg/L。

2.2.4 培养时间对郁金香花粉萌发和花粉管生长的影响

在最适培养条件(基础培养基+150 g/L

蔗糖+100 mg/L 硼酸+500 mg/L 氯化钙)下,培养 1 h 时郁金香花粉开始少量萌发,萌发率为 20.06%,花粉管长度为 88.80 μm (图 4-B,图 5-A);培养 3 h 时花粉萌发数量增加,萌发率为 37.37%,花粉管生长速度明显加快,长度达 152.80 μm (图 4-B,图 5-B);培养 5 h 时花粉萌发率快速增大,达 69.60%,花粉管长度达 439.12 μm ,长势良好,花粉管粗细均匀(图 4-B,图 5-C);培养 7 h 时花粉萌发率为 70.31%,花粉管生长变缓,长度为 588.23 μm (图 4-B,图 5-D)。因此,郁金香花粉离体培养的最佳时间是 5 h,超过 7 h 花粉管生长变缓,且易发生缠绕现象,不易观察。

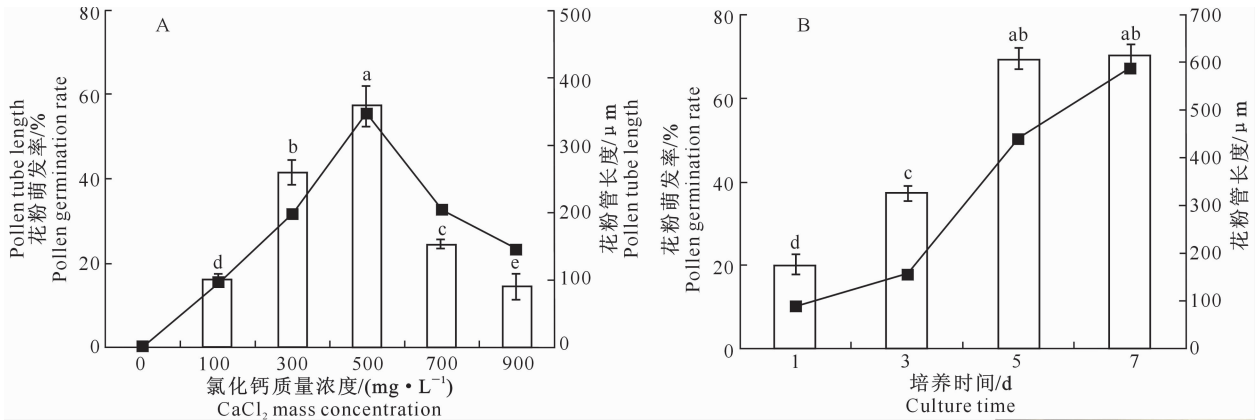
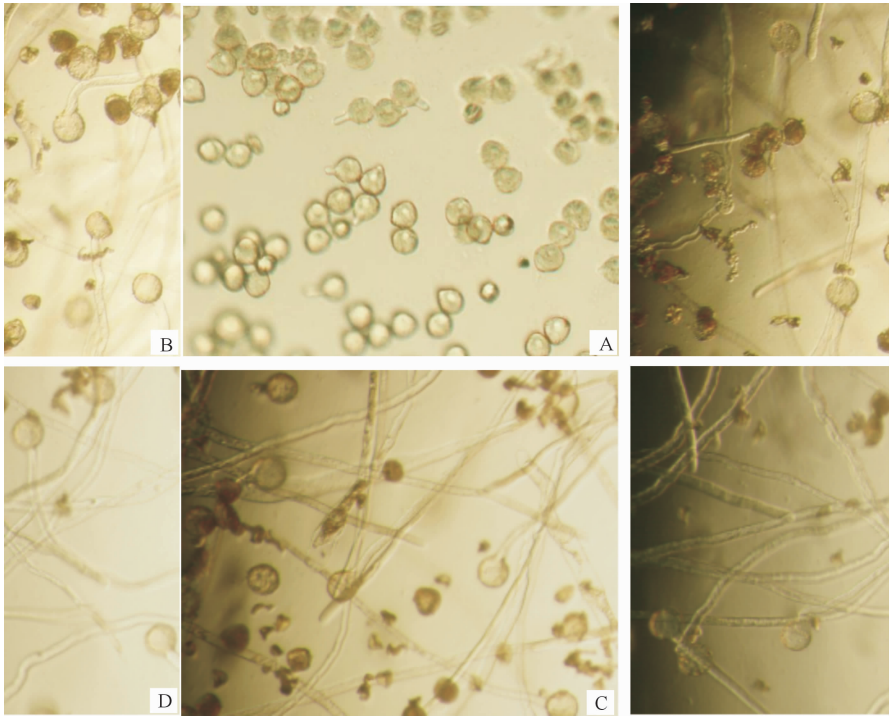


图 4 钙(A)和培养时间(B)对郁金香花粉萌发及花粉管生长的影响
Fig. 4 Effect of calcium (A) and culture time (B) on pollen germination rate and pollen tube growth of *Tulipa gesneriana*



A. 1 h; B. 3 h; C. 5 h; D. 7 h

图 5 在最适培养基中培养不同时间后郁金香花粉的生长情况(10×)

Fig. 5 Pollen tube growth of *Tulipa gesneriana* at different culture times(10×)

3 讨 论

3.1 郁金香小孢子发育特征

McCormick^[14]研究认为,植物小孢子发育从母细胞开始到成熟花粉结束,分为母细胞、四分体、单核花粉、成熟花粉 4 个时期。在百合科植物开口箭^[15]、山麦冬^[16]中发现其四分体全部为左右对称型;而东方百合^[17]四分体则是左右对称型和四面体型同时存在。本试验结果表明,郁金香中两种类型四分体都存在,其中四面体型占多数,偶见左右对称型。

一般情况下,同一科或属的成熟花粉类型是一致的^[18-19]。通常认为三胞花粉比二胞花粉更加进化。在百合科植物中,二胞花粉类型远多于三胞花粉,仅有山麦冬^[16]、玉簪^[20]等少数植物是三胞花粉。本试验发现,郁金香成熟花粉为二胞花粉,未见三胞花粉。说明郁金香可能在百合科植物的系统进化中属于较原始的类群。

小孢子发育时期的不一致性在多种植物^[21-22]中均有发现。多数学者一致认为,花粉发育时期的不同步是植物为抵抗逆境而作出的延长花粉成熟时期、提高受精率的一种策略。本研究发现,郁金香花粉发育过程中也存在不同步现象,相差一两个发育

时期,二胞花粉和单核花粉共存现象较为常见,这可能是郁金香适应环境变化的结果。在郁金香成熟花粉中观察到 2 个成熟花粉紧紧粘连在一起的现象,此类花粉细胞外壁不明显,细胞质稀少,积累的营养物质较少,但花粉内生殖细胞和营养细胞发育正常,染色后可清晰看到营养细胞核和生殖细胞核,推测可能是花粉发育过程中突遇高温或其他环境因素引起的,具体原因有待进一步试验观察。

3.2 郁金香花粉的离体培养

蔗糖是花粉离体萌发所必需的营养物质。在花粉体外培养过程中,蔗糖是花粉萌发的能量来源,同时还参与维持花粉外围环境的渗透压,蔗糖质量浓度过高或过低均不利于花粉萌发及生长,这在睡莲^[23]、茶树^[24]、黄刺玫^[25]等植物中已被证实。本研究中,郁金香花粉萌发及生长的适宜蔗糖质量浓度为 150 g/L。

在植物生殖过程中,糖的吸收、运转及代谢均需要硼元素参与,适量的硼酸可加快植物花粉管壁物质的运输与合成^[1,26],对花粉体外萌发有促进作用。植物花粉本身含硼量较低,在自然受精过程中,柱头及花柱会为花粉提供部分硼,用于花粉萌发及花粉管生长^[24,27]。本试验中,未添加硼酸时郁金香花粉基本不萌发,但随着体外硼酸质量浓度的升高,郁金

香花粉萌发数量明显增多,说明郁金香花粉萌发及生长必须有外源硼的参与。

钙是植物体内最重要的信号分子,大多数植物细胞均含有钙离子以维持正常生理需求。在花粉管顶端的极性生长过程中,钙也起到非常重要的调节作用,在花粉管顶端钙的浓度最高,向下逐步递减,因此多数植物花粉在体外萌发时都需要外源钙的参与^[28-29]。在本试验中,当培养基中不添加钙时,郁金香花粉基本不萌发,推测可能是由于花粉本身内源钙含量不足所致,具体原因有待进一步探究。

4 结 论

郁金香小孢子发育历经四分体时期、单核早中期、单核靠边期和二胞花粉时期,其中,以四面体型四分体为主,偶见左右对称型;花粉发育过程中存在发育不同步、异常花粉等现象。花粉萌发最适培养基组分为基础培养基+150 g/L 蔗糖+100 mg/L 硼酸+500 mg/L 氯化钙,培养最佳时长为 5 h。此结论有助于了解郁金香花粉发育的胚胎学特征以及花粉离体萌发所需要的条件,为郁金香新品种选育过程中父本花粉的选择及花粉萌发能力的提高提供了数据支持。

[参考文献]

[1] 陈芬芬,高 惠,齐海军,等. 黄瓜花蕾大小与花粉发育时期相关性研究 [J]. 延边大学农学报,2016,38(2):134-138.
Chen F F, Gao H, Qi H J, et al. Preliminary studies on the relationship between bud size and pollen development stages of cucumber [J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2016, 38(2): 134-138.

[2] 张 鑫,杜红斌,轩正英. 新疆芜菁小孢子不同发育时期的细胞学和花器官形态特征观察 [J]. 北方园艺,2015(21):1-5.
Zhang X, Du H B, Xuan Z Y. Morphological characteristics of flower organ and cytological observation of microspore in different development stage in Xinjiang turnips [J]. Northern Horticulture, 2015(21): 1-5.

[3] 白 天,解玮佳,李世峰,等. 糖、硼、钙对大喇叭杜鹃四合花粉萌发的影响 [J]. 上海交通大学学报,2013,31(6):48-54.
Bai T, Xie W J, Li S F, et al. Effects of sucrose, boron and calcium on the tetrad pollen of rhododendron on excellens *in vitro* [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2013, 31(6): 48-54.

[4] 姚成义,赵 洁. 钙和硼对蓝猪耳花粉萌发及花粉管生长的影响 [J]. 武汉植物学研究,2004,22(1):1-7.
Yao C Y, Zhao J. Effects of calcium and boron on pollen germination and pollen tube growth of *Torenia fournieri* [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2004, 22(1): 1-7.

[5] 周小利,杨诗怡,陈志芸,等. 蔗糖、硼、钙离子和 γ -氨基丁酸对

烟草花粉萌发的影响 [J]. 生物学杂志,2018,35(3):10-14.
Zhou X L, Yang S Y, Chen Z Y, et al. The influence of sucrose, boron, calcium ion and gamma-aminobutyric acid on tobacco pollen germination [J]. Journal of Biology, 2018, 35(3): 10-14.

[6] 李千惠,姜文龙,徐同乐. 日本海棠花粉最佳离体萌发培养基筛选及萌发过程研究 [J]. 经济林研究,2018,36(2):154-160.
Li Q H, Jiang W L, Xu T L. Selection of pollen *in vitro* germination media and pollen germination process of *Malus floribunda* [J]. Non-wood Forest Research, 2018, 36(2): 154-160.

[7] 贾文庆,张少伟,刘露颖,等. 不同培养基和贮藏方法对矮牡丹花粉萌发的影响 [J]. 西南农业学报,2013,26(1):338-341.
Jia W Q, Zhang S W, Liu L Y, et al. Effects of different culture conditions and storage methods on pollen germination of dwarf peony [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(1): 338-341.

[8] 杨延红,周东升,姜倩倩,等. 海仙花花粉离体萌发和花粉管生长的研究 [J]. 北方园艺,2019(13):109-113.
Yang Y H, Zhou D S, Jiang Q Q, et al. Study on pollen germination and pollen tube growth of *Weigela coraeensis* [J]. Northern Horticulture, 2019(13): 109-113.

[9] 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.
Sun Y, Sun D Y. Signal transduction in pollen germination and tube growth [J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(12): 1211-1217.

[10] 屈连伟,雷家军. 中国郁金香科研现状与存在的问题及发展策略 [J]. 北方园艺,2016(11):188-194.
Qu L W, Lei J J. The present situation, existing problems and development strategies of Chinese tulip research [J]. Northern Horticulture, 2016(11): 188-194.

[11] 邢桂梅,张艳秋,苏君伟,等. 两种野生郁金香在沈阳地区的引种驯化 [J]. 北方园艺,2017(9):75-78.
Xing G M, Zhang Y Q, Su J W, et al. Introduction and domestication of two wild tulip species in Shenyang [J]. Northern Horticulture, 2017(9): 75-78.

[12] 聂小霞,康晓珊,陆 婷. 郁金香引种栽培试验 [J]. 新疆农业大学学报,2014,37(6):441-446.
Nie X X, Kang X S, Lu T. A study on the introduction of *Tulip gesneriana* L. [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2014, 37(6): 441-446.

[13] 张艳秋,邢桂梅,崔玥晗,等. 辽宁地区郁金香多年留地栽培退化研究 [J]. 北方园艺,2021(8):71-78.
Zhang Y Q, Xing G M, Cui Y H, et al. Study degradation of tulip after years of stationary cultivation in field in Liaoning [J]. Northern Horticulture, 2021(8): 71-78.

[14] McCormick S. Male gametophyte development [J]. Plant Cell, 1993, 5(10):1265-1275.

[15] 杨秋琛,赵 桦,张 娜. 开口箭大小孢子发生及雌雄配子体发育 [J]. 西北植物学报,2017,37(4):689-694.
Yang Q C, Zhao H, Zhang N. Megasporogenesis, microsporogenesis and development of female and male gametophyte of *Tulipistra chinesis* baker [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia

Sinica, 2017, 37(4): 689-694.

[16] 陈晓玲, 赵 桦. 山麦冬大小孢子发生及雌雄配子体发育研究 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(11): 2207-2212.

Chen X L, Zhao H. Megasporogenesis, microsporogenesis and development of femal and male gametophy of *Liriope spicata* (Thunb.) Lour [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(11): 2207-2212.

[17] 郑 洁, 王有国, 崔光芬, 等. 东方百合可育品种及其不育突变体花药形成的细胞学观察 [J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1246-1250.

Zheng J, Wang Y G, Cui G F, et al. Cytological observation of anther formation of lilium ‘Oriental Hybrids’ normal line and male sterile mutant line [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(3): 1246-1250.

[18] Fogg G G. Systematic embryology of the angiosperms [J]. Quarterly Review of Biology, 1966, 44(2): 124-126.

[19] 胡适宜. 被子植物学生殖生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 33-34.

Hu S Y. Reproductive biology of angiosperm [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 33-34.

[20] 王金子. 玉簪大小孢子发生及雌雄配子体发育 [J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(3): 295-299.

Wang J Z. The mega-/micro-sporogenesis and female-/male-gametogenesis of *Hosta plantaginea* Ascers [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(3): 295-299.

[21] 王薇薇, 羊杏平, 范淑英, 等. 甜瓜小孢子发育时期与花器形态的关系 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 108-112.

Wang W W, Yang X P, Fan S Y, et al. Correlation between microspore development period and floral organ morphology of *Cucumis melo* L. [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed), 2015, 43(4): 108-112.

[22] 杨延红, 宁源生, 陈军宇, 等. 湖北海棠小孢子发育时期与花器形态的相关性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(12): 72-80.

Yang Y H, Ning Y S, Chen J Y, et al. Correlation of microspore development period and floral organ morphology in *Malus hupehensis* [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2020, 48(12): 72-80.

[23] 毛立彦, 唐毓玮, 谢振兴, 等. ‘保罗兰’睡莲花粉离体萌发及花粉管生长的研究 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(5): 1155-1161.

Mao L Y, Tang Y W, Xie Z X, et al. Pollen germination *in vitro* and tube growth characteristics of *Nymphaea* ‘Paul Stetson’ [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(5): 1155-1161.

[24] 林开勤, 刘声传, 梁思慧, 等. 茶树花粉离体萌发条件优化及活力快速检测 [J]. 种子, 2018, 37(12): 14-18.

Lin K Q, Liu S C, Liang S H, et al. Optimizing conditions of *in vitro* pollen germination and rapid detection of pollen viability for *Camellia sinensis* [J]. Seed, 2018, 37(12): 14-18.

[25] 刘玉艳, 张 锐, 于凤鸣, 等. 黄刺玫花粉离体萌发的特性 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5718-5723.

Liu Y Y, Zhang R, Yu F M, et al. Germination characteristic of *Rosa xanthina* pollen *in vitro* [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5718-5723.

[26] 芦 娟, 苏 瑾, 姜成英, 等. 不同浓度的糖、硼、钙对油橄榄花粉萌发的影响 [J]. 经济林研究, 2017, 35(1): 103-107.

Lu J, Su J, Jiang C Y, et al. Effects of different concentrations of sugar, boron and calcium on pollen germination in *Olea europaea* [J]. Non-wood Forest Research, 2017, 35(1): 103-107.

[27] 聂超仁, 况红玲, 于静亚, 等. 钟花樱花粉离体萌发培养及低温保存技术研究 [J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2018, 38(1): 54-58.

Nie C R, Kuang H L, Yu J Y, et al. Pollen germination *in vitro* culture and cryopreservation technology of *Cerasus campanulata* [J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2018, 38(1): 54-58.

[28] 杜兵帅, 胡海文, 曹庆芹, 等. 钙离子对青杆花粉萌发和花粉管生长的影响 [J]. 电子显微学报, 2018, 37(6): 627-636.

Du B S, Hu H W, Cao Q Q, et al. Effect of Ca^{2+} on pollen germination and tube growth of *Picea wilsoni* [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2018, 37(6): 627-636.

[29] 于晓俊, 曹绍玉, 董玉梅, 等. 钙结合蛋白对花粉生长发育调控研究进展 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(10): 2121-2127.

Yu X J, Cao S Y, Dong Y M, et al. Research progress of calcium binding proteins in pollen growth and development [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(10): 2121-2127.