

文章编号:1001-7380(2018)04-0001-07

不同柳树花粉离体培养及活力测定方法比较研究

王伟伟^{1,2,3}, 姚玲³, 何开跃³, 王保松^{1,2}, 何旭东^{1,2 *}

(1.江苏省林业科学研究院,江苏 南京 210014; 2.江苏省农业种质资源保护与利用平台,江苏 南京 210014; 3.南京林业大学林学院,江苏 南京 210037)

摘要:以6个不同种柳树亲本及杂交子代个体为试验材料,采集其花粉进行离体培养以确定最佳培养条件,同时比较离体培养法、蓝墨水染色法、 I_2 -KI染色法和TTC染色法4种花粉活力测定方法,以期探索适合柳树不同种个体材料的花粉活力快速检测体系。结果表明:离体培养基中蔗糖、 H_3BO_3 和 $Ca(NO_3)_2$ 的质量浓度配比因柳树个体不同而略有差异;不同培养时间对柳树花粉活力影响显著,适宜培养时间为10—12 h;光照条件对离体培养影响不显著;不同个体最适培养温度均为25℃。4种测定方法均可对柳树花粉进行活力检测,蓝墨水染色法可代替离体培养法对部分柳树个体的花粉活力进行快速测定。该研究揭示了柳树不同种个体间花粉变异特点,为柳树杂交育种工作提供了技术支持。

关键词:柳树;柳属;离体培养;花粉活力;快速检测体系

中图分类号:Q944.42; S792.12

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.04.001

Comparative study on *in vitro* pollen germination and viability evaluation of different willow species

Wang Weiwei^{1,2,3}, Yao Ling³, He Kaiyue³, Wang Baosong^{1,2}, He Xudong^{1,2 *}

(1.Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 2. Willow Nursery of the Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 211153, China; 3.College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The fresh pollens were collected to optimize the *in vitro* germination condition from six willow species of different parents and hybrid progeny individuals which were used as experimental materials. And four methods including *in vitro* culture method, blue ink staining method, I_2 -KI staining method and TTC staining method, were compared to explore the rapid evaluation system of pollen viability suitable for different willow individuals. The results showed that the concentration of sucrose, H_3BO_3 and $Ca(NO_3)_2$ in media had slightly different effects among individuals. The culture time had significant effects on pollen viability, with the suitable time of 10—12 h. However, the light condition had not significant effect on the culture and the optimum culture temperature was 25℃. All of the methods for pollen viability evaluation were effective and the blue ink staining method as a fast examination method could take place of *in vitro* culture method for some willow individuals. This study revealed the characteristics of pollen variation among different willow species, and provided technical support for the willow hybrid breeding.

Key words: Willow; *Salix*; *In vitro* culture; Pollen viability; Rapid determination system

柳树,是指杨柳科(Salicaceae)柳属(*Salix*)所包含的所有树种。全世界共有500余种柳树,主要分布于北半球寒温带潮湿的生境中,通常表现为乔

木和灌木2种形态。灌木柳因其萌蘖快、更新容易、生物量高,在北美及欧洲已作为一种重要的可再生、可持续的生物质能源作物被大面积种植^[1];而

收稿日期:2018-07-12;修回日期:2018-08-15

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目“观赏柳树新品种选育”[cx(14)2024];江苏省“六大人才高峰”资助项目(2016-NY-036);江苏省“333高层次人才培养工程”资助项目(BRA2017518)

作者简介:王伟伟(1986-),女,河南长垣人,助理研究员,硕士。主要从事植物学研究。

* 通信作者:何旭东(1981-),男,江苏句容人,副研究员,博士。主要从事林木遗传育种研究。E-mail:hxd_519@163.com。

乔木柳由于生长快,适应性强,树形优美,在中国主要用于园林景观及木材工业原料^[2]。尽管杨树与柳树同属杨柳科,是进行木本植物遗传学与基因组学研究的模式树种,但其多样性的丰富程度远不及柳树。从表型水平上看,柳树的花型、叶型、树型、花色、花芽、枝条颜色等变异异常丰富^[3];从染色体水平上看,虽然杨树与柳树染色体基数均为 19 条,但杨树大多为 2 倍体,而柳树从 2 倍体到 10 倍体均有存在^[4]。尤为重要的是,一些灌木柳扦插后 1 a 即可开花,容易建立高世代的遗传谱系,可作为林木遗传学研究的理想模式树种^[5]。

花粉作为植物种质的一种形式,包含了父本全部的基因信息,是植物生殖、遗传、进化及育种的重要研究对象。而花粉活力又是花粉存活、生长、萌发及发育的前提,是植物育种成败的关键^[6]。柳树分布广泛、种类繁多,自然条件下花期主要集中于 3 月至 6 月,其种间、杂种间、亲本与杂种间花粉活力差异较大^[7]。柳树花粉活力的保持是解决花期不遇以及远距离杂交困难的关键,而花粉活力的测定,则是开展遗传改良与品种选育工作的首要前提。虽然柳树的生物学地位尤为重要,但柳树花粉相关研究却很少^[7-8]。本研究选取 6 个柳树不同亲本及杂交个体开展花粉离体培养,比较不同花粉活力测定方法,旨在揭示柳树不同个体间花粉变异特点,为柳树杂交育种工作提供技术支持,也为下一步柳树花粉保存与活力维持提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为 4 个亲本个体与 2 个杂交子代个体,包括灌木和乔木 2 种类型(见表 1)。其中银柳、簸箕柳、蒿柳×毛枝柳和簸箕柳×蒿柳采自江苏省林业科学研究院柳树种质资源圃,垂柳和紫柳采自南京市玄武湖公园。3 月初将带有柳树花芽的花枝采回实验室水培,室温保持 20—25 ℃。待雄花盛开后,用毛笔轻蘸收集花粉于 5 mL 的离心管中备用。

表 1 供试材料信息				
序号	编号	学名	拉丁名	类型
1	P102	银柳	<i>S. argyracea</i>	灌木
2	P63	簸箕柳	<i>S. suchowensis</i>	灌木
3	2333	蒿柳×毛枝柳	<i>S. viminalis</i> × <i>S. dasyclados</i>	灌木
4	2383	簸箕柳×蒿柳	<i>S. suchowensis</i> × <i>S. viminalis</i>	灌木
5	-	垂柳	<i>S. babylonica</i>	乔木
6	-	紫柳	<i>S. wilsonii</i>	乔木

1.2 花粉离体培养

1.2.1 最佳培养基筛选 通过前期预实验确定培养基中琼脂质量浓度为 7g/L。试验选取 L₂₅(56)正交表,对蔗糖、H₃BO₃和 Ca(NO₃)₂ 3 个影响因子进行优化(见表 2)。在双孔凹型玻片孔内滴入培养基 0.1 mL,用小毛笔将采取的新鲜花粉均匀散布在培养基上,25 ℃光照培养 12 h,统计花粉萌发率,重复 4 次。

表 2 柳树花粉离体培养基正交试验设计			
水平	因素		
	(A) 蔗糖 (g/L)	(B) H ₃ BO ₃ /(mg/L)	(C) Ca(NO ₃) ₂ /(mg/L)
1	50	100	100
2	100	200	200
3	150	300	300
4	200	400	400
5	250	500	500

1.2.2 光暗条件和最佳观测时间筛选 根据试验确定的最佳培养基,分别在 25 ℃光照培养箱和暗培养箱中培养,于 0.5,1,2,4,6,8,10,12,14,16 h 进行萌发率统计,重复 4 次,以确定花粉萌发是否需要光照及最适观察统计时间。

1.2.3 最佳培养温度的筛选 将花粉分别于 4,15,25,35 ℃培养于最佳培养基上,在试验确定的最佳观测时间进行观察,统计萌发率,重复 4 次。

1.3 花粉活力测定

本试验选取离体培养法、蓝墨水染色法、I₂-KI 染色法和 TTC 染色法 4 种常用的植物花粉活力检测方法进行比较,以确定不同柳树个体的最适宜的花粉测定方法。

1.3.1 离体培养法 在最佳培养条件下培养,显微镜下检测花粉萌发。滴培养基 1 滴于载玻片中央,用毛笔轻蘸少量花粉置于培养基上,并将载玻片放进铺有浸湿滤纸的培养皿中。若花粉管的长度超出花粉的直径则视为花粉萌发。萌发率计算公式为萌发率=萌发的花粉数/检测的花粉总数×100%

1.3.2 蓝墨水染色法 用毛笔轻蘸少量花粉置于载玻片上,用普通蓝墨水(0.05 g/mL)染色 15 min。因活细胞膜具有选择吸收的能力,当加入蓝墨水时,没有活力的花粉会被染色,没有被染色的花粉则有活力。

1.3.3 I₂-KI 染色法 用毛笔轻蘸少量花粉置于载

玻片上,轻轻滴入 1% I₂-KI 溶液 1 滴,盖上盖玻片并置于显微镜下观察。有活力的花粉被染成蓝黑色,没有活力的花粉为无色。

1.3.4 TTC 染色法 用毛笔轻蘸少量花粉置于载玻片上,轻轻滴入 1% TTC 溶液 1 滴,盖上盖玻片后将载玻片放入恒温箱中培养,温度设置为 25 ℃。15 min 后置于显微镜下观察,红色花粉为有活力,无色的花粉则没有活力。

1.4 数据分析

图表处理、方差与极差分析、Duncan 多重对比与相关性分析利用 SPSS 17.0 与 Excel 2007 软件进行。

2 结果与分析

2.1 离体培养条件优化

2.1.1 最佳培养基筛选 不同柳树花粉离体培养

正交试验结果统计见表 3。因培养基中蔗糖、H₃BO₃ 和 Ca(NO₃)₂ 质量浓度与组合不同,6 个柳树亲本及杂交种个体之间花粉萌发率存在显著差异 (P < 0.05)。同时极差分析表明各柳树不同花粉培养基的最佳配比也存在差异(见表 4)。各因素对 P102, P63 和 2383 的花粉萌发率作用大小为 A>C>B,对 2333,垂柳和紫柳的作用大小为 A>B>C。P102 理论最佳培养基组合为 A₃B₂C₁,P63 理论最佳培养基组合为 A₂B₂C₂,2333 和 2383 理论最佳培养基组合为 A₁B₂C₁,垂柳和紫柳理论最佳培养基组合为 A₂B₄C₁。采用本试验确定的最佳理论组合对柳树花粉进行离体培养,P102,P63,2333,2383,垂柳和紫柳的萌发率分别为 80.2%,81.1%,75.6%,66.8%,82.8%和 84.7%,均高于或接近正交试验的最高萌发率,表明各最佳组合稳定合理。

表 3 柳树花粉离体培养正交试验统计

试验号	因素			花粉平均萌发率/%					
	A	B	C	2333	2383	P102	P63	垂柳	紫柳
1	1	1	1	66.5	54.4	0.0	64.6	36.3	62.5
2	1	2	2	72.0	55.9	0.0	76.1	37.5	61.4
3	1	3	3	0.0	12.7	84.3	61.2	7.7	68.8
4	1	4	4	38.1	43.1	39.8	54.5	37.9	76.8
5	1	5	5	51.6	48.7	14.8	10.0	44.2	53.7
6	2	1	2	63.7	40.3	67.0	61.1	56.9	71.3
7	2	2	3	50.1	48.0	52.8	67.4	62.7	70.8
8	2	3	4	0.0	17.9	1.1	21.3	59.0	73.0
9	2	4	5	28.8	26.4	26.3	75.2	65.1	69.1
10	2	5	1	52.2	43.9	64.8	68.8	63.7	71.0
11	3	1	3	3.2	8.0	7.3	56.0	48.8	1.0
12	3	2	4	14.4	2.0	43.3	64.4	44.0	21.1
13	3	3	5	0.0	1.0	28.5	10.0	0.0	1.0
14	3	4	1	43.7	23.5	90.3	51.0	65.9	64.7
15	3	5	2	0.0	20.5	54.9	61.5	68.1	56.6
16	4	1	4	0.0	4.2	0.0	29.8	4.0	0.0
17	4	2	5	0.4	6.7	28.9	45.5	10.3	0.0
18	4	3	1	0.0	15.2	0.0	57.2	20.4	0.0
19	4	4	2	2.7	1.0	18.8	61.5	5.1	0.0
20	4	5	3	4.9	2.0	0.0	48.2	0.0	0.0
21	5	1	5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22	5	2	1	0.0	0.0	70.9	0.0	0.8	0.0
23	5	3	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	5	4	3	0.0	0.0	10.9	0.0	3.8	0.0
25	5	5	4	0.0	0.0	0.0	11.8	2.1	0.0

表 4 柳树花粉正交试验极差分析								
材料	因素	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	R	理论最佳
P102	A	27.8	42.4	44.9	9.5	16.4	35.3	$A_3B_2C_1$
	B	14.9	39.2	22.8	37.2	26.9	16.4	
	C	45.2	28.1	31.1	16.8	19.7	28.4	
P63	A	53.3	58.8	48.6	48.4	2.4	56.4	$A_2B_2C_2$
	B	42.3	50.7	29.9	48.4	40.1	20.7	
	C	48.3	52.0	46.6	36.3	28.1	23.9	
2333	A	45.7	39.0	12.3	1.6	0.0	45.7	$A_1B_2C_1$
	B	26.7	27.4	0.0	22.7	21.7	27.4	
	C	32.5	27.7	11.6	10.5	16.2	22.0	
2383	A	43.0	35.3	11.0	5.8	0.0	42.8	$A_1B_2C_1$
	B	21.4	22.5	9.4	18.8	23.0	13.2	
	C	27.4	23.5	14.1	13.4	16.6	13.3	
垂柳	A	32.7	61.5	45.4	8.0	1.3	60.1	$A_2B_4C_1$
	B	29.2	31.0	17.4	35.6	35.6	18.2	
	C	37.4	33.5	24.6	29.4	23.9	12.8	
紫柳	A	64.6	71.0	28.9	0.0	0.0	70.5	$A_2B_4C_1$
	B	26.9	30.7	28.6	42.1	36.3	15.2	
	C	39.6	37.8	28.1	34.2	24.8	14.9	

2.1.2 光暗条件和最佳观测时间筛选 以选择出的最佳培养基为基础,6 个不同柳树亲本及杂交种个体在光照和黑暗 2 个条件下花粉离体培养的萌发率随着培养时间变化情况如图 1 所示。在光照和黑暗 2 种条件下,培养前期各柳树的花粉离体萌发率均出现快速上升;随着培养时间的持续增加,花粉离体萌发率逐渐趋于平稳。光照和黑暗对花粉的离体萌发率影响不大,在相同的培养时间下差异不显著($P>0.05$)。6 个不同柳树亲本及杂交种个体

花粉离体萌发培养时间以 10—12 h 为宜,其中 P102,P63,2333 和 2383 花粉离体培养最佳时间为 12 h,而垂柳和紫柳则为 10 h。

2.1.3 最佳培养温度筛选 6 个不同柳树亲本及杂交种个体分别用最佳培养基进行花粉离体培养。结果表明:随着培养温度的不断升高,不同柳树个体花粉离体萌发率均呈现出先高后低的变化趋势,且与其他各个温度间有显著差异($P<0.05$),花粉离体萌发的最佳温度均为 25 ℃(见表 5)。

表 5 温度对不同柳树花粉离体培养萌发率的影响						
处理温度/℃	P102	P63	2333	2383	垂柳	紫柳
4	0.0±0.0 c	7.4±2.7 c	8.6±4.0 c	10.8±1.1 c	0.0±0.0 c	0.0±0.0 c
15	56.1±0.2 a	61.4±6.6 b	58.9±8.6 b	52.6±6.1 a	59.4±13.0 ab	67.8±3.3 ab
25	62.4±6.5 a	74.1±8.1 a	77.7±1.7 a	57.4±5.8 a	69.8±12.3 a	76.0±7.5 ab
35	38.9±10.0 b	53.6±1.4 a	64.9±5.0 b	31.4±9.5 b	50.3±7.0 b	59.5±7.5 b

同列数据(平均值±标准误)后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上存在显著性差异

2.2 花粉生活力测定方法比较

通过预试验,确定蓝墨水染色法、 I_2 -KI 染色法和 TTC 染色法均可用于柳树花粉生活力的测定。将离体培养法与 3 种染色法进行比较,结果见图 2。4 种测定方法在 P102,P63 和垂柳上均差异显著($P<0.05$),花粉活力顺序为蓝墨水染色法>离体培养法> I_2 -KI 染色法>TTC 染色法。蓝墨水染色法和离体培养法在杂交子代 2333 上不存在显著差异(P

>0.05),但显著($P<0.05$)高于 I_2 -KI 染色法和 TTC 染色法,花粉活力顺序为蓝墨水染色法=离体培养法>TTC 染色法> I_2 -KI 染色法,且 TTC 染色法仅能将 2333 染色。在 2383 和紫柳中蓝墨水染色法和离体培养法之间不存在显著差异($P>0.05$),但显著($P<0.05$)高于 I_2 -KI 染色法和 TTC 染色法,花粉活力顺序为蓝墨水染色法=离体培养法> I_2 -KI 染色法>TTC 染色法。

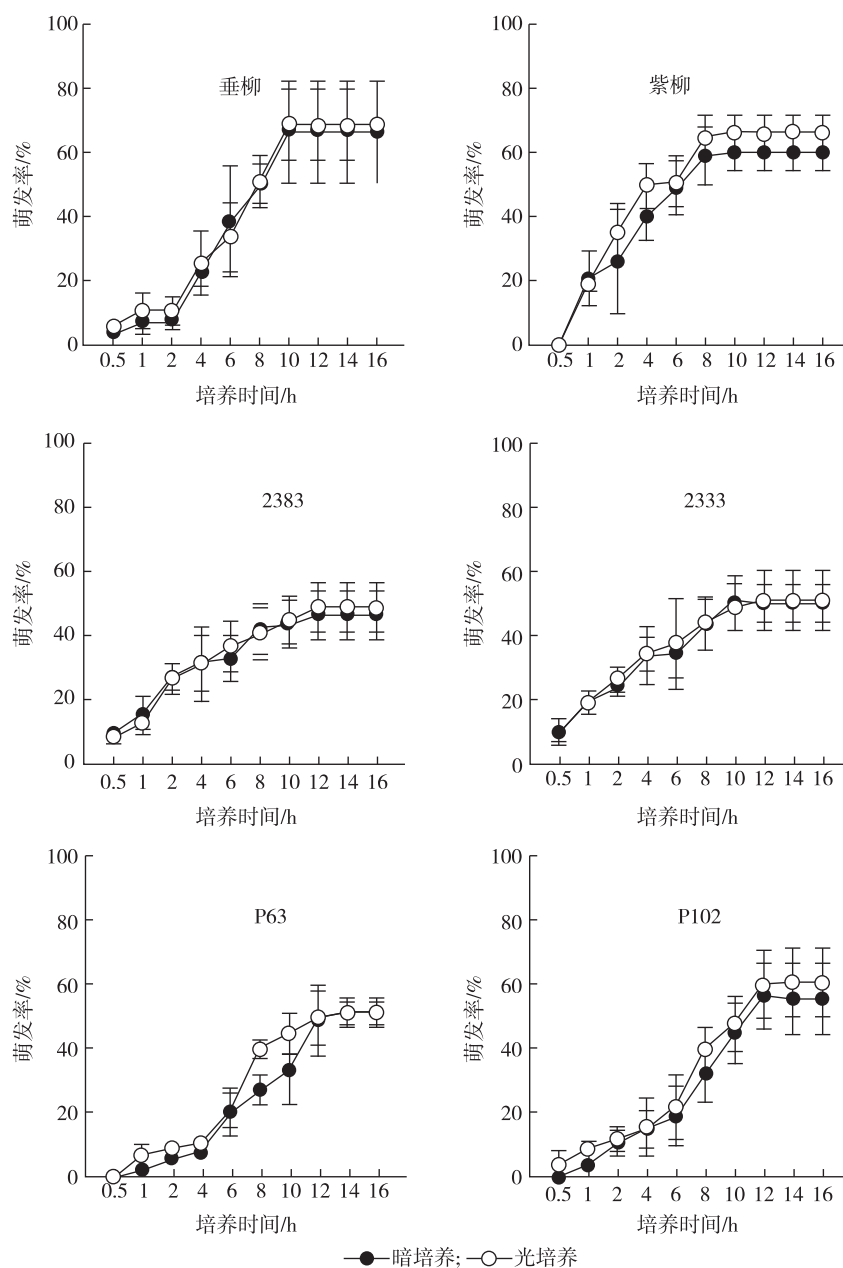


图1 光照及培养时间对柳树花粉离体培养的影响

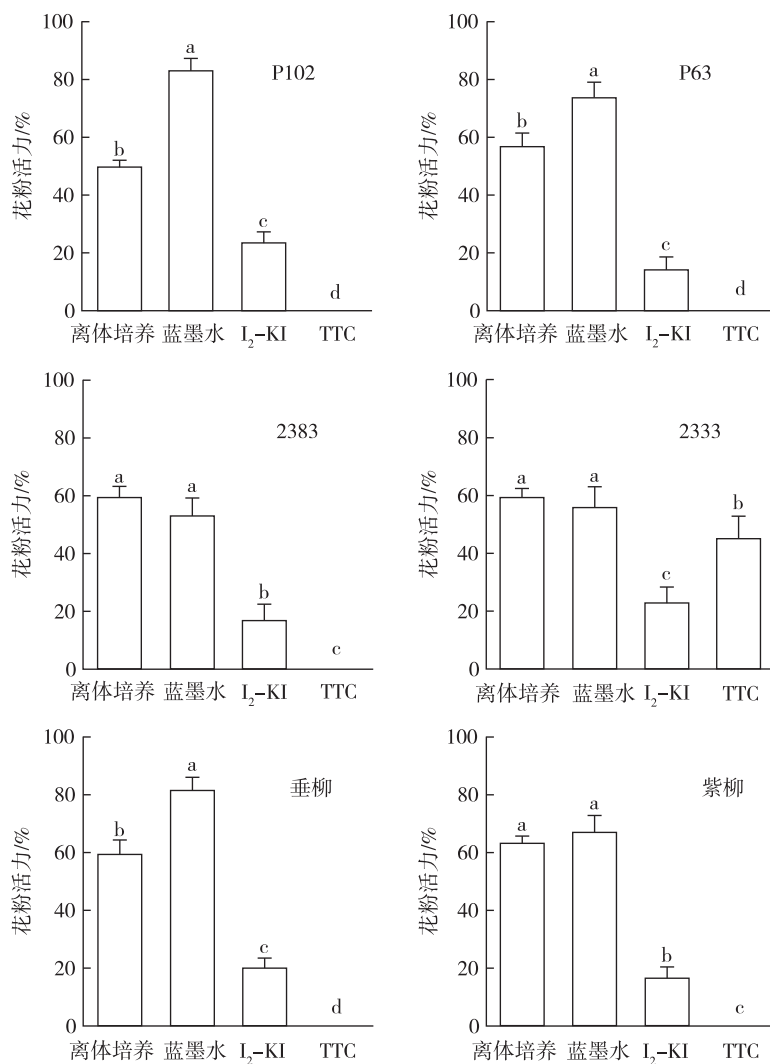
3 结论与讨论

3.1 培养条件对花粉离体培养的影响

在一定的培养条件和温度控制下,花粉活力可根据其离体培养时的萌发率来判定,这种方法的优点在于简单、迅速、合理,并可完全定量^[9]。但花粉萌发条件对离体萌发法测定花粉活力时影响较大,如营养物质、培养温度与时间、矿质元素等^[10-11]。

蔗糖不仅是花粉萌发的主要营养物质,还可以调节萌发环境中的渗透压,适宜的蔗糖质量浓度对

花粉离体萌发有一定的促进作用^[12],但当蔗糖质量浓度过高时,培养基中渗透压增大,会导致花粉失水,产生质壁分离和花粉管破裂等现象,从而抑制花粉离体萌发^[13-15]。最适蔗糖质量浓度因树种不同而存在差异^[16-18]。硼酸参与果胶质的合成和糖分的吸收、转运和代谢等,从而促进花粉的离体萌发^[19-21]。在花粉管的极性、顶端和定向生长中,可通过添加外源 Ca^{2+} 的量来促进花粉管的伸长,但外界 Ca^{2+} 质量浓度过高可导致牵引型的 Ca^{2+} 通道受损,从而抑制花粉管的生长^[22]。而本研究的结果表



每个供试材料图中,不同小写字母表示花粉活力测定值之间存在显著性差异($P < 0.05$)

图2 柳树花粉离体培养法与染色法之间的花粉活力比较

明,不同柳树亲本及杂交种个体对培养基中蔗糖、 H_3BO_3 和 $Ca(NO_3)_2$ 的需求差异较大。

温度对花粉离体培养影响不同,温度过高或过低都不利于花粉的萌发。不同植物的花粉萌发和花粉管生长的最适温度存在差异。如伊朗杏树花粉离体萌发最佳培养平均温度为 $24.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[23];黄连木花粉离体培养的平均最适温度为 $23.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[24],枣树花粉萌发的适宜温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[25],而本研究中不同柳树个体花粉萌发的最适温度均为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

光照对花粉培养也有不同的影响。如马尾松花粉黑光下易于萌发^[26],但东方百合光照条件下的花粉萌发率高于黑暗条件^[27],而光照和黑暗对桂花花粉萌发无显著影响^[28],甚至有研究表明光照对枣树花粉萌发表现出的抑制作用强弱与品种有关^[25]。

本研究中,柳树花粉光照培养萌发率略高于暗培养,但差异不显著。

花粉的萌发过程需要在一定的时间内完成,不同植物的花粉达到萌发最大值所需的时间不同。如石榴“泰山红”花粉最佳培养时间为 3 h ^[29],悬铃木花粉培养 24 h 后萌发率最高^[30]。本研究中,柳树花粉 0.5 h 后开始萌发, $10\text{--}12\text{ h}$ 后萌发率趋于稳定,继续培养则花粉管过长,不利于观察。因此,柳树花粉适宜培养时间为 $10\text{--}12\text{ h}$,其中灌木柳为 12 h ,乔木柳为 10 h 。

3.2 花粉活力测定方法比较

离体萌发测定法数据准确,可直接区分有活力和无活力的花粉,但需要根据不同的树种配制培养基,优化不同的培养时间和温度等条件,时间消耗

相对过长。染色法测定相对简单,可用于花粉活力的快速测定,但由于受花粉自身的特性影响,结果会出现一定程度的偏差^[10]。因此,不同植物所适合的染色法也不尽相同。如金娃娃萱草适宜的染色剂为 TTC^[14];而槐树花粉仅适用于培养基萌发法, I₂-KI 染色法与 TTC 染色法均无法进行测定^[31]。本研究中, TTC 法仅能将杂交子代个体 2333 染色且测定的花粉活力较低,这可能与其它种的个体花粉外壁太厚, TTC 溶液未能进入花粉细胞内有关。 I₂-KI 染色法虽可将花粉染色,测定的花粉活力显著低于离体培养法。蓝墨水染色法在 2383, 2333 和紫柳 3 种柳树花粉活力的测定中与离体培养法间差异不显著,故可代替离体培养法对 2383, 2333 和紫柳等 3 种柳树花粉的生活力进行快速测定。

参考文献:

- [1] SMART L B, CAMERON K D. Genetic improvement of willow (*Salix* spp.) as a dedicated bio-energy crop [M] // Vermerris W. Genetic Improvement of Bio-energy Crops. New York: Springer, 2008: 347-370.
- [2] 涂忠虞. 柳树育种与栽培 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982.
- [3] 施士争. 柳树的园林应用类型与改良 [J]. 西北林学院学报, 2008, 23(4): 200-204.
- [4] SERAPIGLIA M J, GOUKER F E, SMART L B. Early selection of novel triploid hybrids of shrub willow with improved biomass yield relative to diploids [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 74.
- [5] 诸葛强, 张 博, 黄敏仁, 等. 植物近等基因系培育及在林木遗传改良上的应用探讨 [J]. 林业科学研究, 2003, 16(6): 754-759.
- [6] 赵玉芬, 李金霞, 储博彦, 等. 6 个品种大花萱草花粉活力的测定 [J]. 西部林业科学, 2017, 46(2): 15-19, 31.
- [7] 王源秀, 江 聪, 徐立安. 柳树花粉生活力分析 [J]. 林业科技开发, 2007, 21(1): 28-30.
- [8] KOPP R F, MAYNARD C A, NIELLA D P R, et al. Collection and storage of pollen from *Salix* (Salicaceae) [J]. American Journal of Botany, 2002, 89(2): 248-252.
- [9] GUDIN S, ARENE L, PELLEGRINO C. Influence of temperature and hygrometry on rose pollen germination [J]. Advances in Horticultural Science, 1991, 5(3): 96-98.
- [10] 左丹丹, 明 军, 刘 春, 等. 植物花粉生活力检测技术进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16): 4742-4745.
- [11] DAFNI A, FIRMAGE D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications [J]. Plant Systematics and Evolution, 2000, 222: 113-132.
- [12] FEI S, NELSON E. Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bent grass on artificial media [J]. Crop Science, 2003, 43(6): 2177-2181.
- [13] 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): 922-925.
- [14] 王 玲, 祝朋芳, 毛洪玉. 不同培养基及不同贮藏条件对金娃娃萱草花粉生命力的影响 [J]. 西北林学院学报, 2009, 24(3): 95-97.
- [15] DICKINSON D B. Influence of borate and pentaerythritol concentrations on germination and tube growth of *Lilium longiflorum* pollen [J]. Journal-American Society for Horticultural Science, 1978, 103(3): 413-416.
- [16] 朱雪晨, 王改萍, 彭方仁, 等. 不同美国山核桃品种花粉萌发与活力研究 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(4): 1-6.
- [17] 杨尚尚, 苑兆和, 李 云, 等. 石榴‘泰山红’的花粉萌发生物学特性 [J]. 林业科学, 2013, 49(10): 48-53.
- [18] 安晓芹, 廖 康, 殷惠娟, 等. 4 个杏品种花粉离体萌发及花粉管生长动态 [J]. 新疆农业大学学报, 2013, 36(1): 33-37.
- [19] 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): 47-52.
- [20] 加藤幸雄, 志左诚. 植物生殖生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 176-180.
- [21] 郭思佳, 王 倩, 梁隐泉, 等. 几种百合花粉生活力测定及贮藏条件研究 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 205-208.
- [22] 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.
- [23] SORKHEH K, SHIRAN B, ROUHI V, et al. Influence of temperature on the in vitro pollen germination and pollen tube growth of various native Iranian almonds (*Prunus* L. spp.) species [J]. Trees, 2011, 25(5): 809-822.
- [24] ACAR I, KAKANI V G. The effects of temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia* spp [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(4): 569-572.
- [25] 吴 硕, 智福军, 贾彦丽, 等. 温度和光照时间以及贮藏条件对枣花粉萌发的影响 [J]. 河北农业科学, 2017, 21(2): 32-35.
- [26] 徐 进, 陈天华, 王章荣, 等. 不同贮藏方法及光照对马尾松花粉活力的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 1998, 22(3): 71-74.
- [27] 张永平, 乔永旭, 陈 超. 东方百合西伯利亚花粉生活力测定及其主要影响因子 [J]. 江苏农业科学, 2009(1): 145-146.
- [28] 杨尚尚, 苑兆和, 李 云, 等. 石榴‘泰山红’的花粉萌发生物学特性 [J]. 林业科学, 2013, 49(10): 48-53.
- [29] 张洪伟, 段一凡, 李 稚, 等. 不同贮藏方法对桂花花粉活力影响的研究 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(S1): 6-12.
- [30] 李志能, 刘国锋, 罗春丽, 等. 悬铃木花粉生活力及贮藏力的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 54-57.
- [31] 杨 鑫, 张秀省, 穆红梅, 等. 4 种槐树花粉生活力测定方法的比较 [J]. 广东农业科学, 2011(12): 53-54, 77.