

文章编号: 1001-1498(2007)02-0224-06

# 黑松花粉体外萌发与花粉管生长的研究

李国平<sup>1,2</sup>, 黄群策<sup>1\*</sup>, 杨鹭生<sup>2</sup>, 秦广雍<sup>1</sup>

(1. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

**摘要:**应用荧光标记和激光扫描共聚焦显微镜术研究了黑松花粉和花粉管的形态结构, 结果表明: 黑松成熟花粉含 2 个退化的原叶细胞、1 个生殖细胞和 1 个管细胞; 花粉水合 12 h 后才开始萌发, 花粉萌发后管细胞核移动进入花粉管内, 而生殖细胞仍留在花粉粒内; 伸长的花粉管可分淀粉粒区和透明区; 花粉管内原生质的流动呈喷泉式; 花粉管壁具纤维素层; 年青的花粉管壁有胼胝质沉积, 而较老的花粉管壁不具胼胝质层, 花粉管内亦不具胼胝质塞; 花粉管易于形成分枝, 培养基中蔗糖浓度与分枝的形成有关; 培养基中高浓度蔗糖可抑制花粉管的伸长。裸子植物在花粉结构、花粉萌发和花粉管的形态结构方面与被子植物存在较大差异。

**关键词:**裸子植物; 黑松; 花粉; 花粉管

中图分类号: S791.256

文献标识码: A

## In Vitro Pollen Germination and Pollen Tube Growth of *Pinus thunbergii*

LI Guo-ping<sup>1,2</sup>, HUANG Qun-ce<sup>1</sup>, YANG Lu-sheng<sup>2</sup>, QIN Guang-yong<sup>1</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He 'nan, China;

2. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

**Abstract:** The organization of pollen and pollen tubes of *Pinus thunbergii* was studied by using a confocal laser scanning microscope after fluorescence labeling. A *Pinus thunbergii* pollen was 4-celled pollen with two degenerated prothallial cells, one generative cell and one tube cell. In culture, pollen germination occurred after approximately 12 h of hydration. During tube growth, the tube cell nucleus moved into the elongating tube, but the generative cells remained within the pollen grain. There are two distinct zones in elongating pollen tubes. One began in the pollen and extended towards the pollen tube tip, containing abounding amyloplasts. The other zone was the clear zone lacking amyloplasts at the elongating pollen tube tip. The cytoplasmic-streaming type in the tube cell was a regular fountain-like pattern, with organelles moving towards the tip in the center of the tube and away from the tip along the cell cortex. Fluorescence microscopy indicated that the pollen tube wall contained cellulose microfibrils and, callose was present in the younger pollen tubes, but disappeared from the older tubes. No callose plug was detected within the pollen tube. The pollen tube generally developed two to six branches. The sucrose concentration in culture medium affected the formation of tube branching and the growth rate of tubes to a great extent. The present study suggested that the development and cellular organization of gymnosperms pollen tubes were considerably different from those of angiosperm pollen tubes.

**Key words:** gymnosperms; *Pinus thunbergii*; pollen; pollen tube

收稿日期: 2006-06-08

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目 (B0610031); 福建省莆田市科技计划项目 (2006N17)

作者简介: 李国平 (1966—), 男, 副教授, 博士生, 主要从事植物生殖生物学与离子束植物生物技术研究。

\* 通讯作者

在植物界中,裸子植物与被子植物均可产生花粉,以花粉管为通道输送精子,完成受精过程<sup>[1,2]</sup>。被子植物的花粉落在柱头上萌发,花粉管穿越花柱到达胚珠,受精作用为双受精;而裸子植物的胚珠裸露,传粉时花粉直达胚珠,花粉在珠孔室内萌发,除买麻藤类外<sup>[3]</sup>,受精作用为单受精。裸子植物的有性生殖过程代表一种较原始的有性生殖方式,研究裸子植物的花粉和花粉管发育对于了解植物界有性生殖方式的这一重要进化阶段和雄配子体发育的多样性具有重要意义。

花粉管的生长与根毛、苔藓及蕨类植物的原丝体、真菌菌丝及动物神经轴突细胞的生长相似,是一种典型的极性顶端生长,即生长部位仅限于花粉管的顶端区域。由于花粉管便于培养和离体操作,一直是研究细胞极性生长、细胞间相互作用以及信号传导等细胞学问题的理想模式系统。关于花粉萌发和花粉管顶端生长的研究已有很多报道,但多数集中在被子植物方面<sup>[4-6]</sup>。裸子植物在进化上较被子植物原始,裸子植物的花粉发育、传粉和受精过程有别于被子植物的<sup>[7]</sup>,目前对于裸子植物花粉萌发和花粉管生长的研究较少。

黑松(*Pinus thunbergii* Parl),别名日本黑松,为松科松属常绿乔木,原产于日本和朝鲜,我国东南沿海、江苏、浙江、安徽、河南及辽东半岛等地均有栽培<sup>[8]</sup>。本研究以黑松花粉为材料,应用荧光染色和激光扫描共聚焦显微镜术研究其花粉管的形态结构和生长特点,并与被子植物的进行比较,为揭示裸子植物花粉管顶端生长机制提供资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 花粉采集与保存

2005年4月中上旬黑松花粉散发期,在河南郑州市滨河公园内人工栽培的成熟黑松树上采集刚开始散粉的雄球花,置室内自然干燥24h,让花粉散出。收集的花粉置-20℃冰箱保存。

### 1.2 花粉与花粉管形态结构的观察

2005年6月,花粉培养于含0.01%硼酸+0.01%氯化钙+0.25%蔗糖的液体培养基中,28℃下振荡培养,定时取样并用配置有Leica DM RE2研究型电动倒置显微镜的Leica TCS-SP2型激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)观察花粉与花粉管形态结构,方法为:萌发花

粉不经固定与染色,直接制成水装片用LSCM的透射光模式观察活体花粉管顶端原生质流动情况;萌发花粉经4%戊二醛固定,10 μg·mL<sup>-1</sup> DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma产品)染色,LSCM下UV激发以显示细胞核移动情况,LSCM下488 nm激发以显示花粉和花粉管的整体形态结构;萌发花粉经4%多聚甲醛固定,PBS(pH值7.2)洗3次,以0.01%荧光增白剂(Fluorescent Brightener 28, Sigma产品)染色,LSCM下UV激发观察细胞壁纤维素分布,以0.05%水溶性苯胺蓝(0.15 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲液配制,pH值8.2)染色,LSCM下UV激发观察细胞壁胼胝质分布。上述实验以不进行荧光染色过程作为对照。

### 1.3 蔗糖浓度对花粉萌发与花粉管生长的影响

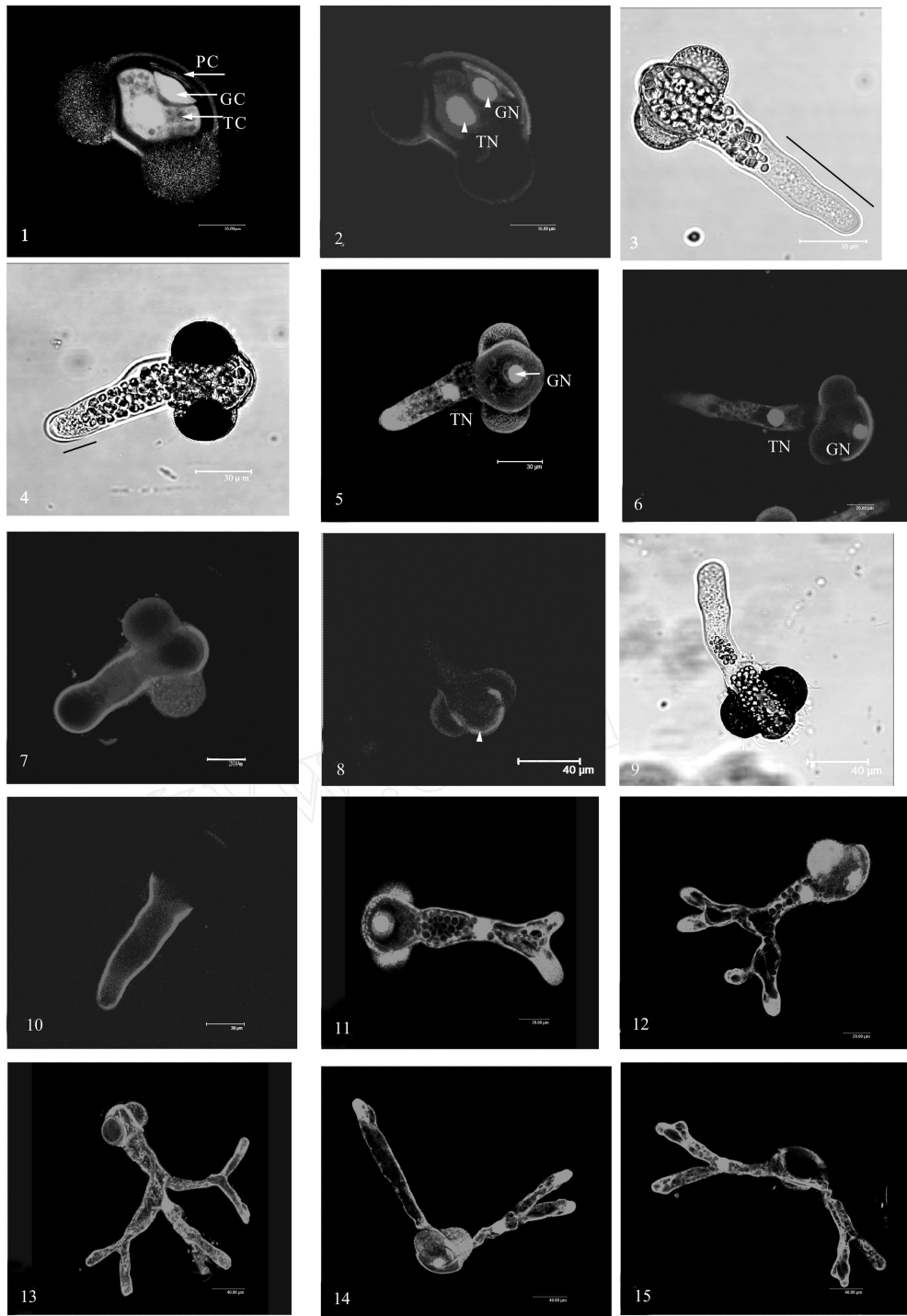
2005年10月,花粉培养于含0.01%硼酸+0.01%氯化钙的液体培养基中,分别附加0.00%、0.10%、0.25%、0.50%、1.00%、5.00%、10.00%蔗糖,28℃下振荡培养,72h后以4%戊二醛固定并检查花粉萌发率、分枝花粉管的百分率、花粉管的长度以及花粉管生长速率,重复3次。检查花粉萌发率时,每处理至少观察5个以上视野,统计花粉总数不少于300个。花粉管长度大于花粉粒体高的被视为萌发花粉。花粉萌发率=萌发花粉数/花粉粒总数×100%。在统计花粉萌发率时,同时统计具分枝花粉管的百分率。检查花粉管的长宽度时,每处理至少随机测量25个花粉管。应用SPSS统计软件对实验结果进行单因素方差分析。

把在含5%蔗糖的培养基中生长的花粉管以DAPI染色,LSCM下488 nm激发以观察花粉管的各分枝情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑松花粉与花粉管的形态结构

黑松成熟花粉为4细胞花粉,包含2个退化原叶细胞、1个生殖细胞和1个管细胞(图版1,1)。在成熟花粉中,管细胞占据花粉粒大部分面积,生殖细胞呈椭圆型,具1个较大的扁圆形细胞核,2个原叶细胞已退化成线状。花粉粒中管细胞核和生殖细胞核见图版1,2。黑松花粉细胞壁由内层和外层组成,细胞壁外层又可分为外壁内层和外壁外层。黑松花粉具2个气囊,气囊由外壁外层向外扩张而成。



图版 黑松花粉与花粉管形态结构的激光扫描共聚焦显微镜观察

图版说明: 1. 黑松成熟花粉含 2 个退化原叶细胞 (PC)、1 个生殖细胞 (GC) 和 1 个管细胞 (TC) (DAPI 染色, 488 nm 激光激发); 2. 花粉管细胞核 (TN) 和生殖细胞核 (GN) (DAP 染色, UV 激光激发); 3~4. 花粉管分淀粉粒区和透明区, 黑线示顶端透明区 (DAP 染色, LSCM 透射光扫描图像); 5~6. 花粉萌发后管细胞核移动进入花粉管内, 而生殖细胞仍留在花粉粒内 (图 5 为 488 nm 激光扫描图像, 图 6 为 UV 激光扫描图像); 7. 萌发后 24 h 花粉管壁具胼胝质 (水溶性苯胺蓝染色, UV 激光激发); 8. 萌发后 36 h 花粉管壁不具胼胝质, 仅与长花粉管相对端的略向外突出的花粉壁仍具胼胝质荧光 (水溶性苯胺蓝染色, UV 激光激发); 9. 为图 8 萌发花粉的 LSCM 透射光扫描图像; 10. 示花粉管壁具纤维素层, 箭头指示花粉管顶端区域的荧光较弱 (荧光增白剂染色, UV 激光激发); 11~15. 花粉管生长过程中出现的几种分枝形式 (DAPI 染色, 488 nm 激光激发)。

黑松花粉在培养基中至少培养 12 h 后才开始萌发。花粉萌发时,花粉内壁突出位于两气囊间的萌发孔并延伸成花粉管。伸长的花粉管可分为 2 个明显的区,即位于花粉管顶端的不含大淀粉粒的透明区和其后的含淀粉粒区(图版 3, 4)。透明区是动态的,长约 15 ~ 45  $\mu\text{m}$ 。处于生长的花粉管透明区内可见原生质流动现象,通过原生质中颗粒的移动路线判断其原生质流动呈喷泉式,即细胞质从花粉管中央流向顶端,然后再从花粉管两侧向后返回。花粉萌发后,管细胞核进入花粉管,而生殖细胞保留在花粉粒内。图版 5, 6 显示萌发花粉中管细胞核和生殖细胞核的位置,管细胞核一般位于透明区和淀粉粒区的交界处。在人工培养条件下,未观察到生殖细胞进入花粉管的现象,也未观察到生殖细胞分裂为体细胞和柄细胞的过程。

水溶性苯胺蓝染色结果表明,年青的花粉管壁上具有胼胝质分布(图版 7),而随着花粉管的生长,老花粉管壁上的胼胝质层消失(图版 8, 9)。花粉管中未发现与被子植物相似的胼胝质塞。

荧光增白剂染色结果表明,伸长的花粉管壁具发达的纤维素层,花粉管顶端的纤维素荧光比其余部分的弱,而花粉壁不具纤维素荧光或荧光较弱(图版 10)。

## 2.2 蔗糖浓度对花粉萌发与花粉管生长的影响

黑松花粉在不同蔗糖浓度的培养基中萌发和生

长的结果见表 1。蔗糖浓度对黑松花粉萌发和花粉管生长的影响突出表现在:(1)黑松花粉可在无蔗糖的培养基中萌发,但萌发率较低,显著低于其它添加蔗糖的处理( $P < 0.05$ )。在预备实验中发现,黑松花粉在蒸馏水中也能萌发。可见,黑松花粉易于人工培养。(2)蔗糖浓度从 0.10% 提高到 0.50%,花粉萌发率和花粉管伸长速率显著提高;但随着蔗糖浓度从 0.50% 提高到 10.00%,花粉萌发率无差异,而花粉管长度和伸长速率递减,特别是在 10% 蔗糖培养基中的花粉管长度显著低于其它处理。可见,高浓度的蔗糖(10%)不影响花粉的萌发,但抑制了花粉管的生长。(3)培养黑松花粉的适宜蔗糖浓度为 0.50% ~ 1.00%。(4)蔗糖浓度对花粉管的分枝形成有较大影响。在无蔗糖或蔗糖浓度较低时,黑松花粉管几乎不形成分枝;随着蔗糖浓度从 0.25% 提高到 5.00%,具分枝花粉管的频率也递增;可见,在一定范围内,培养基中蔗糖浓度促进黑松花粉管形成分枝;但是,在 10.00% 蔗糖的培养基中不见分枝花粉管;可见,高浓度的蔗糖(10%)不仅抑制了花粉管的伸长,也抑制了花粉管分枝的形成。

易于形成分枝花粉管是黑松区别于被子植物花粉管生长的一个显著特征,图版 11 ~ 15 显示了在 5.00% 蔗糖的培养基中观察到的几种花粉管分枝类型。

表 1 蔗糖浓度对黑松花粉萌发与花粉管生长的影响

蔗糖浓度 / %	萌发率 / %	花粉管长 / $\mu\text{m}$	花粉管生长速率 / ( $\mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ )	分枝花粉管 / %
0.00	21.68 $\pm$ 3.99 c	74.38 $\pm$ 14.24 cd	1.24 $\pm$ 0.06 cd	0.00
0.10	38.36 $\pm$ 6.52 b	85.45 $\pm$ 33.38 c	1.42 $\pm$ 0.46 c	0.39 $\pm$ 0.07 d
0.25	42.33 $\pm$ 7.26 b	88.70 $\pm$ 34.68 c	1.48 $\pm$ 0.48 c	2.70 $\pm$ 0.85 c
0.50	69.72 $\pm$ 9.16 a	139.11 $\pm$ 44.32 a	2.32 $\pm$ 0.62 a	11.70 $\pm$ 0.90 b
1.00	79.12 $\pm$ 1.73 a	132.10 $\pm$ 39.68 ab	2.20 $\pm$ 0.13 ab	17.05 $\pm$ 2.92 b
5.00	76.98 $\pm$ 6.68 a	115.17 $\pm$ 38.70 b	1.92 $\pm$ 0.53 b	30.87 $\pm$ 4.17 a
10.00	76.38 $\pm$ 10.37 a	64.81 $\pm$ 24.72 d	1.08 $\pm$ 0.34 d	0.00

注:同列数据后面字母不相同者,表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

应用激光扫描共聚焦显微镜术研究黑松花粉体外萌发和花粉管生长特征,结果表明:黑松在花粉结构、萌发过程和花粉管生长等方面与被子植物有较大的差异。

黑松成熟花粉含有 4 个细胞,松杉类植物中油杉属(*Keteleeria* Carr)<sup>[9]</sup>、雪松属(*Cedrus* Trew)<sup>[10]</sup>的成熟花粉含有 5 个细胞,但松科银杉属(*Cathaya*

*Chun et Kuang*) 在 3 细胞阶段传粉<sup>[11]</sup>。被子植物的成熟花粉为 2 细胞或 3 细胞。实际上,黑松成熟花粉中也仅含 2 个完整细胞,2 个原叶细胞退化仅留痕迹。吕世友<sup>[12]</sup>研究表明,云杉(*Picea asperata* Mast)和油松(*Pinus tabulaeformis* Carr)花粉发育过程中,2 个原叶细胞的退化是一种典型的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD),并认为具原叶细胞的松杉类植物花粉是研究植物 PCD 较为理想的天然模式系统。作者认为,黑松花粉发育过程

中 2 个原叶细胞的退化也是细胞程序性死亡的结果。

黑松花粉水合 12 h 后萌发,花粉管生长速率  $1.1 \sim 2.3 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ 。花粉萌发慢、花粉管伸长慢是裸子植物花粉管生长的普遍特征<sup>[13~15]</sup>。松属植物从传粉至受精作用完成要经历 1 年多时间<sup>[17]</sup>。裸子植物花粉管生长慢可能与下列因素有关:花粉含水量低,花粉粒中缺乏多聚核糖体,花粉萌发时需要由珠孔、珠心或雌配子体分泌的促进因子,花粉管壁存在酸性果胶质和胼胝质层以及花粉管伸长时对一些蛋白质合成的依赖<sup>[16]</sup>。被子植物花粉萌发与花粉管生长均较快,如玉米花粉在其丝状花柱上 5 min 后即可萌发,花粉管以  $1 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$  的速度伸长<sup>[17]</sup>。

黑松花粉管顶端为透明区,其后为淀粉粒区,这种分区结构也在其它裸子植物花粉管中观察到<sup>[13~16]</sup>。被子植物典型的花粉管结构分成 5 个区:即顶端生长区、光滑内质网区、粗糙内质网区、液泡区和退化区<sup>[18]</sup>。

黑松花粉管原生质流动呈喷泉式,观察结果与欧洲赤松 (*Pinus sylvestris* Linn) 和欧洲云杉 (*Picea abies* (L.) Karst) 的类似<sup>[13,19]</sup>。在被子植物花粉管中细胞质呈典型的回喷泉式流动状态,即细胞质从花粉管两侧流向顶端,然后再从中央向后返回<sup>[20,21]</sup>。

通过荧光增白剂染色鉴定,黑松花粉管壁具纤维素层。欧洲赤松和欧洲云杉花粉管壁中也存在纤维素,纤维素微纤丝的沉积方向与被子植物的类似,但是其顶端的纤维素微纤丝密度比被子植物的高<sup>[22,23]</sup>。裸子植物花粉管顶端具较发达的纤维素层可能对花粉管的顶端生长有限制作用,同时也加强了细胞壁的保护作用,这个结构特点与裸子植物花粉管停留在珠孔室较长时间、花粉管生长缓慢的特性相适应。

通过苯胺蓝鉴定,可观察到黑松新生的花粉管壁顶端有胼胝质沉积现象,相对较老的花粉管则无胼胝质;未观察到与被子植物相似的胼胝质塞。裸子植物花粉管缺乏胼胝质塞与其花粉萌发后生殖细胞未进入花粉管的现象相吻合。欧洲赤松花粉管壁的胼胝质沉积现象与黑松的相似<sup>[22]</sup>。通常被子植物花粉管壁可分为两层结构,即外层以果胶、纤维素为主,内层则以胼胝质为主<sup>[2,5]</sup>。在被子植物花粉管生长过程中还有胼胝质塞的形成,并几乎以相等的间距产生<sup>[24]</sup>。

黑松花粉离体培养中易于形成分枝花粉管,分枝的形成与蔗糖浓度有关,其有关机理有待进一步研究。形成分枝花粉管是裸子植物的一个普遍特征,分枝花粉管可能在花粉管伸长过程中起到营养吸收和铆钉花粉管的作用<sup>[14,16]</sup>。被子植物的花粉管一般为单管或不出现分枝,但在锦葵科、葫芦科和桔梗科等的一些植物花粉,可长出多条花粉管,另有一些植物的花粉管可以分枝,如菠菜<sup>[25]</sup>。

黑松花粉粒中贮存有淀粉粒,可在无蔗糖的培养基中萌发,添加适当浓度的蔗糖有利于花粉萌发和花粉管生长,但高浓度蔗糖抑制花粉管的伸长。花粉管的脉冲式生长是由膨压决定的<sup>[26]</sup>,培养基中蔗糖浓度可能与花粉管中的膨压大小有关,从而影响花粉管的伸长,对此,尚需进一步研究。

总之,裸子植物的花粉管发育过程具有一些独特的特征,可能代表着一种有别于被子植物的顶端生长模式。关于裸子植物花粉管顶端生长机制的研究报道相对有限,且主要来自美国 Charleston 学院生物系的 Lazzaro 实验室以欧洲云杉为模式材料进行了初步研究。当前,这领域的研究刚刚开始,涉及的对象有限,有必要对更多的裸子植物进行研究,以便揭示其普遍规律。黑松花粉易于人工培养,花粉量大,耐贮存,是研究裸子植物花粉管顶端生长机制的理想实验系统。

## 参考文献:

- [1] Bedinger P. The remarkable biology of pollen[J]. *Plant Cell*, 1992, 4(8): 879~887
- [2] Taylor L P, Hepler P K. Pollen germination and tube growth[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 461~491
- [3] Carmichael J S, Friedman W E. Double fertilization in Gnetales (Gnetaceae): Its bearing on the evolution of sexual reproduction within the Gnetales and the Anthophyte Clade[J]. *Am J of Bot*, 1996, 83(6): 767~780
- [4] Derksen J. Pollen tubes: a model system for plant cell growth[J]. *Bot Acta*, 1996, 109: 341~345
- [5] Mascarenhas J P. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 303~314
- [6] Monteiro D, Liu Q, Lisboa S, et al. Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of  $[\text{Ca}^{2+}]$  and membrane secretion[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 1665~1674
- [7] Singh H. Embryology of gymnosperms[A]. In: Zimmermann W, Carlquist S, Ozenda P, et al. *Handbuch der Pflanzenanatomie*: vol 10, part 2[C]. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1978
- [8] 林来官. 福建植物志 [第一卷·修订本] [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1991: 282~292

- [9] 李国平,黄群策. 油杉 (*Keteleeria fortunei*) 花粉个体发育与传粉过程 [J]. 林业科学, 2006, 42 (5): 42 ~ 47
- [10] 李国平,黄群策,秦广雍. 用激光扫描共聚焦显微镜观察雪松花粉和花粉管 [J]. 激光生物学报, 2006, 15 (1): 1 ~ 8
- [11] 曹玉芳,许方,姚敦义. 松杉类植物雌雄配子体的发育与胚胎发生 [J]. 莱阳农学院学报, 1995, 12 (3): 206 ~ 212
- [12] 吕世友. 云杉和油松花粉发育及其原叶细胞程序化死亡的研究 [D]. 中国人民解放军军需大学, 2001: 31 ~ 48
- [13] de Win A H N, Knuiman B, Pierson E S, *et al* Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes [J]. Sex Plant Reprod, 1996, 9: 93 ~ 101
- [14] Dawkins M D, Owens J N. In vitro and in vivo pollen hydration, germination, and pollen tube growth in white spruce, *Picea glauca* (Moench) voss [J]. Int J Plant Sci, 1993, 164: 506 ~ 521
- [15] Anderson E D, Owens J N. Microsporogenesis, pollination, pollen germination and male gametophyte development in *Taxus brevifolia* [J]. Ann Bot, 2000, 86: 1033 ~ 1044
- [16] Fernando D D, Long S M, Sniezko R A. Growth and development of conifer pollen tubes [J]. Sex Plant Reprod, 2005, 18: 149 ~ 162
- [17] Bamabas B, Fridvaizky L. Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma [J]. Acta Bot Hungar, 1984, 30: 329 ~ 332
- [18] Uwate W J, Lin J. Cytological zonation of *Pinus savium* L. pollen tube in vivo [J]. J Ultrastruct Res, 1980, 71: 173 ~ 184
- [19] Justus C D, Anderhag P, Goins J L, *et al* Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips [J]. Planta, 2004, 219: 103 ~ 109
- [20] Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Wilson K L, *et al* Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes [J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2005, 61: 112 ~ 127
- [21] Pierson E S, Cresti M. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes [J]. Int Rev of Cytol, 1992, 140: 73 ~ 125
- [22] Derksen J, Li Y Q, Knuiman B, *et al* The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes [J]. Protoplasma, 1999, 208: 26 ~ 36
- [23] Lazzaro M D, Donohue J M, Soodavar F M. Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes [J]. Protoplasma, 2003, 220: 201 ~ 207
- [24] Vervaeke I, Londers E, Piot G, *et al* The division of the generative nucleus and the formation of callose plugs in pollen tubes of *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) cultured in vitro [J]. Sex Plant Reprod, 2005, 18 (1): 9 ~ 19
- [25] 邢树平. 花粉管生长调控的研究进展 [J]. 广西植物, 1998, 18 (1): 82 ~ 88
- [26] Pierson E S, Li Y Q, Zhang H Q, *et al* Pulsatory growth of pollen tubes: investigation of a possible relationship with the periodic distribution of cell wall components [J]. Acta Bot Neerl, 1995, 44 (2): 121 ~ 128