

# 马尾松种子园无性系花粉生活力研究\*

赖焕林 陈天华 徐进 姜广奎

**摘要** 借助7种培养液对采自马尾松无性系种子园27个无性系花粉生活力进行了测定。结果表明:不同无性系、不同培养基、无性系×培养基对花粉萌发率的作用均达到极显著水平;无性系间花粉粒大小差异极显著,并与发芽率间存在显著相关;通过主分量分析将不同无性系花粉按生活力高低分为三类:高生活力花粉、中生活力花粉、低生活力花粉。在使用的7种培养基中以5%蔗糖+50ppm或30ppm硼酸的组合培养效果最好。同时本文还就花粉生活力相关的问题进行了讨论。

**关键词** 马尾松、无性系、花粉、生活力、液体培养

种子园在林木育种体系中的重要作用已毋庸置疑<sup>[1,2]</sup>。提高林木种子园种子产量是目前科研、生产上面临的主要问题之一,花粉管理是其中的一个重要方面。“种子园花粉管理,就是利用花粉去进行稀释,隔离和运用,以达到增进种子园种子产量和遗传品质的操作实践”<sup>[3]</sup>。SMP(人工辅助授粉)是花粉管理的重要内容,已被证明是目前防止或减少种子园花粉污染最有效的手段<sup>[4]</sup>,而花粉生活力测定是进行SMP的一项基础。从理论研究角度来说,交配设计中控制授粉所使用的花粉也有必要事先测定其生活力,以利于结果分析,避免工作失误,特别是林木交配系统中亲本对子代的花粉贡献率与花粉生活力密切相关<sup>[5]</sup>,所以花粉生活力的测定既有实践意义又有重要的理论意义。

尽管关于马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)花粉生活力已有不少研究<sup>[6~9]</sup>,但是这些研究都缺乏对花粉生活力的综合评估,而且在研究材料方面非常有限。基于种子园花粉管理与交配研究的需要,笔者选择了广西一马尾松种子园27个无性系的花粉进行培养分析,以期更客观地评估不同无性系花粉生活力的差异,也为种子园交配系统研究提供参考,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 花粉来源

试验分析27个无性系的花粉,这些花粉均于1993年3月,采自广西贵港市覃塘林场马尾松无性系种子园的第五大区,取样是随机的(被取样的无性系原株(优树)均分布于广西境内),取回后即过筛去杂并置于干燥器中,然后放入冰箱贮藏,温度为0~4℃。

### 1.2 培养方法

采用的是液体培养法,培养液的配制方法如表1,其中第七组合为蒸馏水,作为对照。上述

1994-02-22 收稿。

赖焕林,陈天华,徐进,姜广奎(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037)。

\* 本文承王章荣教授悉心指导。徐立安先生帮助进行数据分析并提出了宝贵意见。试验材料的采集过程中得到广西林科院杨章旗先生的热心帮助。覃塘林场场长黄世学,副场长韦善浪、梁建孟等为取样工作提供了很多方便。在此一并致谢!

培养液配制好后倒入 2.5 mL 的小培养杯内,在液面上均匀撒上花粉,然后将这些小培养杯放在大培养皿中,培养皿底和盖均铺放一张湿润的滤纸,以保持培养皿内湿度,后置于 25.3 ℃ 的培养箱中恒温培养。

### 1.3 观测方法

分别在花粉培养到 24、36、44、48、52 和 72 h 时取样统计其发芽率,每次取样观察 3 个玻片,每个玻片观察 4 个视野。花粉以花粉管长度大于或等于花粉粒短轴时即为发芽。在培养之前测量了花粉粒的大小,指标有 2 个,一个为花粉粒的长度(图 1 中的  $X_1$ ),另一个为气囊的高度(图 1 中的  $X_2$ ),每个无性系观测 4 个玻片,每个玻片测量 10 粒花粉。

表 1 花粉培养液配方

培养液代号	培养液成分
I	5%蔗糖
II	5%蔗糖+30ppm 硼酸
III	5%蔗糖+50ppm 硼酸
IV	10%蔗糖
V	10%蔗糖+30ppm 硼酸
VI	10%蔗糖+50ppm 硼酸
VII	蒸馏水

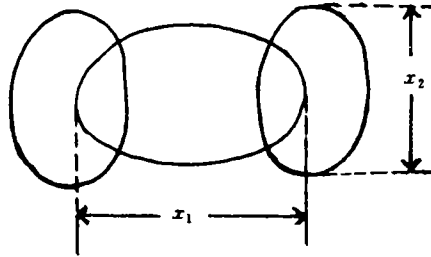


图 1 马尾松花粉形态示意

$X_1$ :花粉粒长度  $X_2$ :气囊高度

## 2 结果与分析

### 2.1 不同无性系花粉生活力的差异

2.1.1 方差分析结果 从表 2 可以看出在观测的 6 个时间,不同无性系(A),不同培养基(B)以及它们的交互作用( $A \times B$ ,  $A \times C$ ,  $A \times B \times C$ )对花粉发芽率的影响均达到极显著水平,而观测玻片(C)尽管在第 1,3,6 个时刻达到了显著水平,但总的来说其影响并不是太大的,而  $B \times C$  也因此仅在第 3,5,6 个时刻的影响达到显著水平,这说明不同无性系花粉的生活力具显著差别,而培养液则同样会显著影响花粉发芽率。

表 2 花粉发芽率方差分析结果汇总

误差来源	自由度	不同培养时间(h)的 F 值					
		24	36	44	48	52	72
A(无性系)	26	355.95**	481.63**	518.51**	514.37**	498.69**	463.57**
B(培养液)	6	405.38**	229.62**	307.06**	463.48**	527.93**	532.08**
C(玻片)	2	4.83*	1.19	6.07**	0.11	2.59	4.21*
$A \times B$	156	29.85**	12.48**	11.06**	16.78**	18.60**	21.46**
$A \times C$	52	2.08**	1.43*	1.54**	1.47**	1.68**	2.37**
$B \times C$	12	1.36	1.76	2.62**	1.27	1.77*	4.19**
$A \times B \times C$	312	1.50**	1.49**	1.83**	1.88**	1.71**	1.99**
机 误	1 701						

\*\* 表示差异达极显著水平( $P < 0.01$ ), \* 表示达显著水平( $P < 0.05$ )。

2.1.2 无性系间花粉在不同培养时间发芽率的差异 为了比较不同无性系花粉生活力的大小,测定无性系花粉在 7 种培养基中 6 个培养时间的累计发芽率(图略),发现花粉在不同培养

基中发芽的趋势基本一致,为方便现取代表发芽率高、中、低的几个无性系花粉在七种培养液中的平均发芽率为纵坐标,以培养时间为横坐标作得图 2。从图 2 看各无性系间花粉活力具有较大差异,无性系间的差异达极显著水平(表 2)。根据图 2,花粉活力大小的顺序一般地说波动很小,因此“早期选择”将很有效。

### 2.2 不同无性系花粉生活力归类

以不同无性系在 7 种培养液(含对照)中 6 个培养时间的平均发芽率为指标进行稳健主分量分析<sup>[10]</sup>,将这 6 个性状变量降维。主分量的贡献率及累计贡献率见表 3。

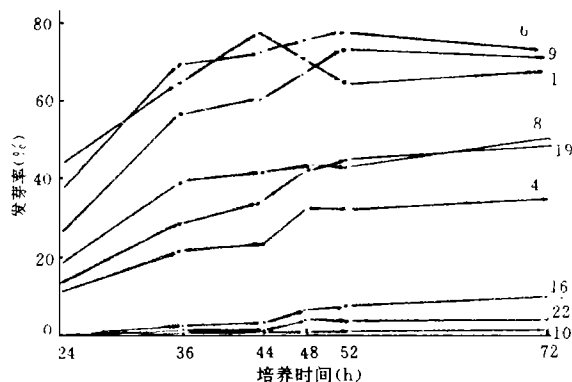


图 2 不同无性系花粉发芽率比较  
(图中编号为无性系号)

表 3 主分量贡献率

主分量	I	II	III	IV	V	VI
贡献率(%)	96.093 4	2.704 1	0.529 6	0.349 2	0.261 7	0.061 9
累计贡献率(%)	96.093 4	98.797 5	99.327 2	99.676 3	99.938 1	100.000 0

由于第一主分量的贡献率已达 96.09%,足以代表原有综合信息,所以取第一主分量进行排序。27 个无性系花粉按其第一主分量大小结合花粉发芽率高低进行归类,结果见表 4。根据图 2 及表 4 可以把所培养的花粉按其发芽率的高低分为 3 大类。第一类为高生活力的花粉,包括无性系 1、5、6、9,此类花粉发芽快(24 h 即达 20%以上),而且达到稳定发芽率的时间短(约 40 h),最终发芽率高(60%~80%)。第二类为中等生活力花粉,分属 4、8、13、14、17、19、21、23 无性系,此类花粉培养 24 h 发芽率在 10%左右,44~48 h 后发芽率趋向稳定,最终发芽率在 20%~50%之间。第三类为低生活力花粉,分属 2、3、7、10、11、12、15、16、18、20、22、24、25、26、

表 4 不同无性系花粉第一主分量及归类

序号	无性系号	第一主分量值	类型	类型特征	序号	无性系号	第一主分量值	类型	类型特征		
1	6	-1.095	高生活力	萌发快、整齐,萌发率高	13	7	0.135	低生活力	萌发慢、不整齐,萌发率低		
2	1	-1.061			14	24	0.201				
3	9	-0.875			15	2	0.212				
4	5	-0.616			16	3	0.284				
			中生生活力	萌发快、整齐,萌发率中等	17	15	0.285				
5	8	-0.403			18	12	0.300				
6	19	-0.299			19	18	0.318				
7	21	-0.246			20	26	0.347				
8	14	-0.231			21	27	0.359				
9	13	-0.135			22	16	0.415				
10	4	-0.079			23	11	0.431				
11	17	-0.045			24	22	0.431				
12	23	0.018			25	25	0.434				
					26	20	0.461				
					27	10	0.520				

27 共 15 个无性系,此类花粉发芽很慢(24 h 时大部分还没发芽),48 h 后发芽率也趋于稳定,但其最终发芽率很低(在 20% 以下),而其中 10、11、16、20、22 和 25 号无性系的花粉最终发芽率在 5% 左右,生活力微弱,如果采用这些花粉进行 SMP 或控制授粉将严重影响工作效果,并对交配试验结果起干扰作用。

2.3 培养液对花粉发芽的影响

根据方差分析结果已经知道,培养液对花粉萌发具有极显著的影响,但至于花粉在何种培养基中萌发较好却不得而知,为此将某一时刻所有无性系花粉在某培养液中的发芽率取平均数,对培养液进行比较作得图 3。其中 I、II、III、IV、V、VI、VII 与表 1 中的培养液编号相对应。图中实线表示培养液中蔗糖浓度为 5%,虚线表示蔗糖浓度为 10%,VII 代表蒸馏水,作为对照。

从图 3 可以看出在含 5% 蔗糖的 I、II、III 号培养液中,花粉发芽率明显比在含 10% 蔗糖的 IV、V、VI 号培养液中来得高,而 I ~ VI 号培养液都比对照的培养效果更好。如对 I、II、III 号培养液进行比较可以看出 II 号培养液含 30ppm 硼酸,III 号则含 50ppm 硼酸,可以说硼酸有力地促进了花粉的萌发,尽管 II、III 号培养液在后期的培养效果基本重叠,但是它们在初期存在明显差别:III 号培养液中花粉萌发率明显高于 II 号培养液。这说明 50ppm 的硼酸比 30ppm 更有利于花粉萌发。换句话说,在这个浓度范围内随着硼酸浓度的增加,花粉发芽率上升。很显然 III 号培养液中萌发的花粉总数要比 II 号培养液来得更多。花粉萌发数量的增加,无疑有利于雄配子的竞争。然而必须说明的是硼酸的促进作用在 IV、V、VI 号培养液中却不甚明显,是否由于 10% 的蔗糖浓度过高而削弱或干扰了硼酸的促进作用还不能肯定。

2.4 花粉粒大小与花粉发芽率的相关性

对花粉粒大小的 2 个性状( $X_1, X_2$ )进行方差分析表明:花粉粒大小在不同无性系间差异达到极显著水平( $P < 0.01; X_1, X_2$  的  $F$  值分别为 36.14, 9.70; 自由度为 26,  $F_{0.01} = 1.76$ )。鉴

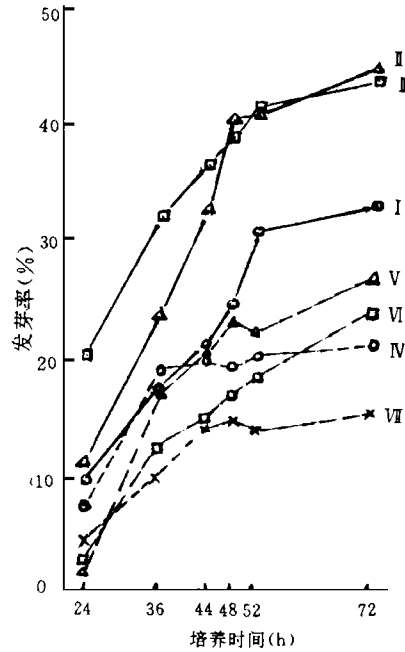


图 3 花粉在不同培养液中的发芽率比较 (图中培养液编号内容详见表 1)

表 5 马尾松花粉粒大小与其发芽率的相关矩阵

	第 4 次	第 5 次	第 6 次	$X_1$	$X_2$	$X_1 \times X_2$
第 4 次	1.000					
第 5 次	0.992	1.000				
第 6 次	0.971	0.974	1.000			
$X_1$	0.418*	0.448*	0.448*	1.000		
$X_2$	0.514**	0.528**	0.590**	0.758	1.000	
$X_1 \times X_2$	0.531	0.510*	0.567**	0.918	0.954	1.000

\*\* 表示 1% 的差异显著水平, \* 表示 5% 的差异显著水平。

于不同无性系间花粉发芽率存在显著差异(表 2),我们试图分析花粉粒大小与其发芽率间的相关性。表 2 分析还知花粉发芽率在 48、52、72 h 观测时刻趋向稳定,所以相关分析采用的是这 3 个时刻的花粉发芽率(分别用第 4、5、6 次代表)。另外还增加了一个花粉大小的指标  $X_1 \times X_2$ 。相关分析结果见表 5。

从表 5 看, $X_1, X_2, X_1 \times X_2$  与第 4、5、6 次时刻花粉发芽率的相关性均达到显著水平以上,为此进行了花粉粒大小的排序(数据略),结果发现与花粉发芽率的次序相差较远,说明尽管花粉粒大小与其发芽率存在数学上的相关性,但还没有充分的证据把花粉粒大小作为花粉生活力的直接指标。需要指出的是,由于花粉粒大小测量工作量很大,测定误差的影响也可能存在。

## 3 讨 论

### 3.1 花粉生活力选择

由于无性系间花粉生活力存在显著差异,因此在进行种子园无性系选择,控制授粉时父本选择,SMP 花粉树的选择时必须把花粉活力考虑进去。通过本次研究表明:无性系间花粉生活力高低的次序在不同培养时间基本上保持一致,所以进行无性系花粉活力选择时培养很短的时间(如 36 h)即可,这样便可以大大缩短观测时间,提高效率。

### 3.2 花粉生活力指标

周坚,蔡炳峰<sup>[9]</sup>曾用 Logistic 曲线对花粉萌发过程进行拟合而后得到三个指标  $T, D, K$ , 分别用以评估花粉萌发速度,最高萌发率和萌发整齐度,这确实能较全面地反映花粉生活力大小,但如果仅仅用  $T, D, K$  来作为花粉生活力指标恐怕还不能达到试验的最终目的。分析花粉生活力归根结底是为了探讨各无性系间花粉受精能力的大小,从配子竞争角度来说,一个无性系如果产生的花粉量很少,即使花粉生活力很高,其总体的竞争能力还是较低,所以在分析不同无性系花粉生活力时,如能兼顾到花粉萌发总数则更能反映无性系间的差别,因而更有实际意义。

### 3.3 花粉生活力与林木交配系统研究

树木交配系统概括地分为两个层次,个体水平与群体水平。个体水平交配系统研究中很主要的一个方面便是“父本性”(Paternity)研究,涉及到亲本对形成子代合子的雄配子库的贡献率大小<sup>[5]</sup>。贡献率大小仅仅从花粉角度出发,则主要的影响因素有:花粉传播的能力、花粉数量、花粉受精能力。花粉生活力主要反映了其受精能力。而事实上花粉到达柱头后,那些花粉管萌发得快,受精成功的可能性便大,这便涉及到花粉管生长速度问题。张卓文<sup>[7]</sup>、何业华<sup>[8]</sup>均研究了这一问题,但没有从此角度进行分析。建议在分析花粉萌发率的同时研究其花粉管生长速度。

由于马尾松为风媒授粉树木、花粉粒大小是影响花粉传播能力的一个主要因素。Webber & Yeh<sup>[11]</sup>就曾发现先到达柱头的花粉受精优于后到达的。另外将无性系花粉生活力与花粉产量相结合进行分析也是十分必要的,廖明,黄启强<sup>[12]</sup>的研究结果表明,马尾松种子园 1/4 的无性系对子代的贡献率达 40% 以上。

总而言之,花粉研究是交配系统研究的重要方面,为使研究更有意义,建议从下述几个方面综合分析:花粉粒大小、花粉量多少、花粉萌发率、花粉管生长速度。

## 参 考 文 献

- 1 沈熙环. 种子园建设和林木多世代育种. 见: 游应天, 薛申伯, 管长岭, 等编. 林木良种繁育策略. 成都: 四川科技出版社, 1992. 1~6.
- 2 王章荣. 提高种子园产量与多世代育种技术. 见: 游应天, 薛申伯, 管长岭, 等编. 林木良种繁育策略. 成都: 四川科技出版社, 1992. 7~14.
- 3 Denison N P, Franklin E C. Pollen Management. In: Faulkner R(ed.); Seed Orchards. Forestry Commission Bulletin 54. London, 1975, 92~100.
- 4 Di-Giovanni F, Kevan P G. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination : a review. Can . J. For. Res. . 1991, 21: 1155~1170.
- 5 Brown A H D, Burdon J T, Jarosz A M. Isozyme analysis of plant mating systems. In: Soltis D E, and Soltis P S (eds); Isozyme in plant biology. London, Chapman and Hall, 1989. 73~86.
- 6 陈天华, 陈瑾. 四唑对树木花粉生命力测定的初步试验. 南京林产工业学院学报, 1981, (4): 116~119.
- 7 张卓文. 有关马尾松花粉研究初报. 福建林学院学报, 1985, 增刊: 43~51.
- 8 何业华. 马尾松花粉萌发试验研究初报. 林业科技通讯, 1987, (2): 12~14.
- 9 周坚, 蔡炳峰. 马尾松无性系花粉萌发试验. 见: 王章荣, 秦国峰, 陈天华, 编马尾松种子园建立技术论文集. 北京: 学术书刊出版社, 1990. 120~125.
- 10 叶志宏, SPQG 基本原理及使用指南. 天津: 南开大学出版社, 1992.
- 11 Webber J E, Yeh F C H. Test of the first-on first-in pollination hypothesis in coastal Douglas-fir. Can. J. For. Res. . 1987, 7: 63~68.
- 12 廖明, 黄启强. 马尾松种子园无性系开花习性的研究. 见: 王章荣, 秦国峰, 陈天华, 编马尾松种子园建立技术论文集. 北京: 学术书刊出版社, 1990. 144~154.

## Study on Pollen Viability of Clones from a Masson Pine Seed Orchard

*Lai Huanlin    Chen Tianhua    Xu Jin    Jiang Guangkui*

**Abstract** Study on the pollen germination rate (PGR) of 27 clones from a clonal seed orchard of *Pinus massoniana* was reported in this paper. Seven solution media were used for the culture to evaluate the effects of different clones (A), incubating media (B) and their interaction (A×B) on pollen viability. In addition, the correlation between pollen size and PGR was analyzed. The results are as follows: (1) the influences of A, B and A×B on PGR were all at the level of extreme significance ( $P < 0.01$ ); (2) there was significant correlation between the pollen size and its germination rate, but not enough evidence has been found to regard pollen size as an equivalent parameter of PGR; (3) the pollens studied could be divided into three types based on their PGR through robust principle component analysis; (4) the solutions containing 5% glucose and 30~50 ppm boric acid allowed the pollens to germinate best. Some problems on pollen viability test were also discussed with some suggestions.

**Key words** *Pinus massoniana*, clone, pollen viability, solution incubation