

基于花粉粒扫描电镜特征的柴松分类地位研究

刘志红, 解 庆, 李周岐*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:通过扫描电镜观测了松属 6 个树种的花粉形态,运用数据统计和图片分析的方法对花粉形态进行对比研究。结果表明:松属 6 个树种的花粉大小变动范围为 48.22~55.05 μm ,均属于两气囊松型花粉;花粉体近极面与气囊过渡明显,形成帽沿;萌发沟位于花粉体远极面两气囊之间,呈现沟痕的形式。聚类分析结果显示柴松应被归为油松变种的范畴。根据花粉体表面纹饰和疣状颗粒的分布情况,松属 6 个树种进化演替规律是油松、黑皮油松、扫帚油松、柴松→马尾松→巴山松。

关键词:柴松;松属;花粉形态;扫描电镜

中图分类号:S791.240.1

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2013)02-0061-05

Taxonomical Status of *Pinus tabulaeformis* f. *shekannesis* Yao et Hsü Based on Morphological Characteristics of Pollen Grain under SEM

LIU Zhi-hong, XIE Qing, LI Zhou-qi*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Morphological characteristics of the pollen grains of 6 *Pinus* species were examined and compared by using the scanning electron microscope (SEM) and statistical method. The mean values of pollen size of 6 species ranged from 48.22 to 55.05 μm , belonging to disaccate pollens. Transition was distinct between proximal face and the bladder. Germinal furrow formed clear striate between two bladders. Cluster analysis indicated that the *P. tabulaeformis* f. *shekannesis* Yao et Hsü could be a variety of *P. tabulaeformis* Carr. Based on the magnitude of grains in the corpus surface, the evolutionary order in 6 *Pinus* species was *P. tabulaeformis* Carr, *P. tabulaeformis* var. *mukdensis* Uyeki, *P. tabulaeformis* f. *shekannesis* Yao et Hsü→*P. massoniana* Lamb→*P. henryi* Mast.

Key words: *Pinus tabulaeformis* f. *shekannesis* Yao et Hs; *Pinus* species; pollen morphology; scanning electron microscope

松属(*Pinus*)植物作为裸子植物的最大类群,是北半球森林的主要建群物种,因其重要的经济、生态、医药等价值而广受关注,成为林学、生态学、植物遗传育种学等领域重要的研究对象。然而由于相同的进化历史并伴随广泛基因交流,加之近缘物种间的短期隔离不足所产生的基因库的显著分化^[1-2],致使松属内许多物种间的系统学关系模糊不清。

柴松仅分布于陕西富县桥北林业局和尚源林场大麦秸沟,总面积约 337.3 hm^2 。与油松相比,柴松

具有生长快、树皮光滑、树体高大、树干通直、天然整枝好、材质较软、单株及林分高、径、蓄积生长量均较高等特点,被誉为黄土高原上的珍贵遗传资源,国家林业局“西北地区珍贵树种保护与林业非木质资源高效栽培”项目已将其作为主要保护对象。关于柴松的分类归属问题,乐天宇^[3]认为它是油松的变型,并首次将其命名为 *Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsü;朱志诚^[4]从生态学角度出发,对柴松的形成进行了分析,认为其属于油松在黄土区

收稿日期:2012-09-12 修回日期:2012-10-19

基金项目:国家自然科学基金项目(30972382)。

作者简介:刘志红,女,博士研究生,主要研究方向:林木遗传育种研究。

* 通信作者:李周岐,男,教授,博士生导师,研究方向:林木遗传育种。E-mail:Lzhouqi@yahoo.com.cn

的生态型;但在《中国植物志》^[5]、《中国树木志》^[6]、《黄土高原植物志》^[7]及《陕西树木志》^[8]等权威性著作中均无有关柴松的记载。关于柴松的分类地位问题在学术界尚有争议。植物的花粉形态特征是在长期的进化过程中不断演化和发展形成的,带有大量的演化信息,加之其受环境条件的影响较小且分析方法较简便,已在植物分类、系统发育、起源与演化等方面得到了广泛的应用^[9-14]。以柴松、油松、油松的 2 个变种(黑皮油松和扫帚油松)及油松的 2 个近缘种(巴山松和马尾松)共 6 个树种的花粉为研究材料,通过扫描电子显微镜对各花粉的形态特征进行观察,分析比较其大小、形态、萌发器官和外壁纹饰等特征,以寻求其规律性,为其亲缘关系和系统演化方式及柴松的分类地位的确定提供孢粉学依据。

表 1 松属植物花粉取材登记

Table 1 Records of pollen collection of 6 *Pinus* species

物种	采样地	采样时间	株数
柴松 <i>P. tabulaeformis</i> f. <i>Shekannesis</i> Yao et Hsü	陕西富县	2011-05-15	10
油松 <i>P. tabulaeformis</i> Carr	陕西黄龙	2011-05-17	10
扫帚油松 <i>P. tabulaeformis</i> Carr. var. <i>umbraculifera</i> Liou	辽宁鞍山	2011-05-28	2
黑皮油松 <i>P. tabulaeformis</i> var. <i>mukdensis</i> Uyeki	辽宁鞍山	2011-05-28	10
巴山松 <i>P. henryi</i> Mast	陕西南郑	2011-05-20	10
马尾松 <i>P. massoniana</i> Lamb	陕西洋县	2011-04-22	10

1.2 试验方法

将干燥后各物种的供试花粉分单株分别均匀涂布于粘有双面胶带的样品台上,于 JEOL, JUC-5000 粒子溅射仪中喷金,然后置于 JEOL, JSM-6300 扫描电子显微镜下观察记录。选取有代表性的视野分 1 800×(远极面)、1 800×(近极面)、1 800×(赤道面)、10 000×(纹饰)进行拍照,应用 SmileView 软件测量花粉的全长、体长、体宽、帽高、全高、气囊长、气囊宽,并据此计算体长/体宽、帽高/全高和气囊长/气囊宽。观察记录花粉的远极面观、近极面、赤道面观的形状,萌发器官及外壁纹饰的特点,每单株花粉测量 20 粒。根据上述结果,选择其

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取柴松、油松、油松的 2 个变种(黑皮油松和扫帚油松)及油松的 2 个近缘种(巴山松和马尾松)各一个较大的自然居群进行采样(表 1)。

2011 年当各树种雄球花由绿开始转黄时,在各居群中随机选取 10 株(扫帚油松仅有 2 株)为采样树,要求生长正常,无明显缺陷,株间距离 100 m 以上,以保证取样的均匀性;每单株树冠中部选取 10 个侧枝,每侧枝上带新梢采集一簇着生在一起的雄球果,于着生的中部位置采集 3 个雄球果,按单株分别装入事先备好的硫酸纸袋中,带回实验室在背风向阳处晾晒,等花粉完全散出后破碎过 100 目筛,制备的花粉样品放入干燥容器中于 2~5 ℃储藏备用。

中 10 个数值性状,即全长、体长、体宽、帽高、全高、气囊长、气囊宽、体长/体宽、帽高/全高和气囊长/气囊宽^[15-17],把数值输入计算机,然后利用 SPSS17.0 软件经过 Z-score 标准化后,用欧式距离作聚类距离,采用类平均法(UPGMA)作聚类分析。

2 结果与分析

2.1 花粉粒的大小

花粉大小用花粉全长估算。6 种松属树种花粉大小均值的变动范围为 48.22~55.05 μm,柴松花粉最小,油松花粉最大,其他 4 个树种花粉大小顺序排列为黑皮油松>巴山松>扫帚油松>马尾松(表 2)。

表 2 6 种松属树种花粉大小均值统计(均值±标准差)

Table 2 Mean value statistics of pollen size in 6 *Pinus* species(mean±std. deviation)

物种	全长/μm	体长/μm	体宽/μm	帽高/μm	全高/μm	气囊长/μm	气囊宽/μm	体长/体宽	帽高/全高	气囊长/气囊宽
柴松	48.22±2.37	39.08±1.25	41.21±3.47	17.96±2.98	36.77±1.77	34.48±1.64	22.11±1.02	0.95±0.04	0.49±0.08	1.56±0.12
油松	55.05±3.72	41.79±1.87	44.38±2.20	18.35±2.87	40.48±2.63	39.71±1.73	24.54±2.07	0.94±0.05	0.45±0.06	1.62±0.14
黑皮油松	51.77±3.74	38.57±4.06	43.61±2.43	17.79±2.34	38.99±2.75	38.10±2.02	23.22±2.00	0.88±1.70	0.46±0.05	1.64±0.13
扫帚油松	50.01±3.78	41.27±1.29	45.38±3.82	18.44±3.34	39.43±1.83	39.00±1.76	22.32±1.04	0.91±0.05	0.47±0.08	1.74±0.10
马尾松	49.40±5.12	40.06±2.39	47.64±5.05	16.90±1.73	35.65±2.84	35.88±2.51	20.93±1.90	0.84±0.10	0.47±0.05	1.71±0.15
巴山松	50.17±3.66	40.89±2.78	46.08±2.50	15.75±2.87	37.52±2.08	36.60±4.11	22.66±2.47	0.89±0.07	0.42±0.07	2.11±0.15

2.2 花粉粒的外部形态

各树种花粉由本体与气囊组成的轮廓形态基本

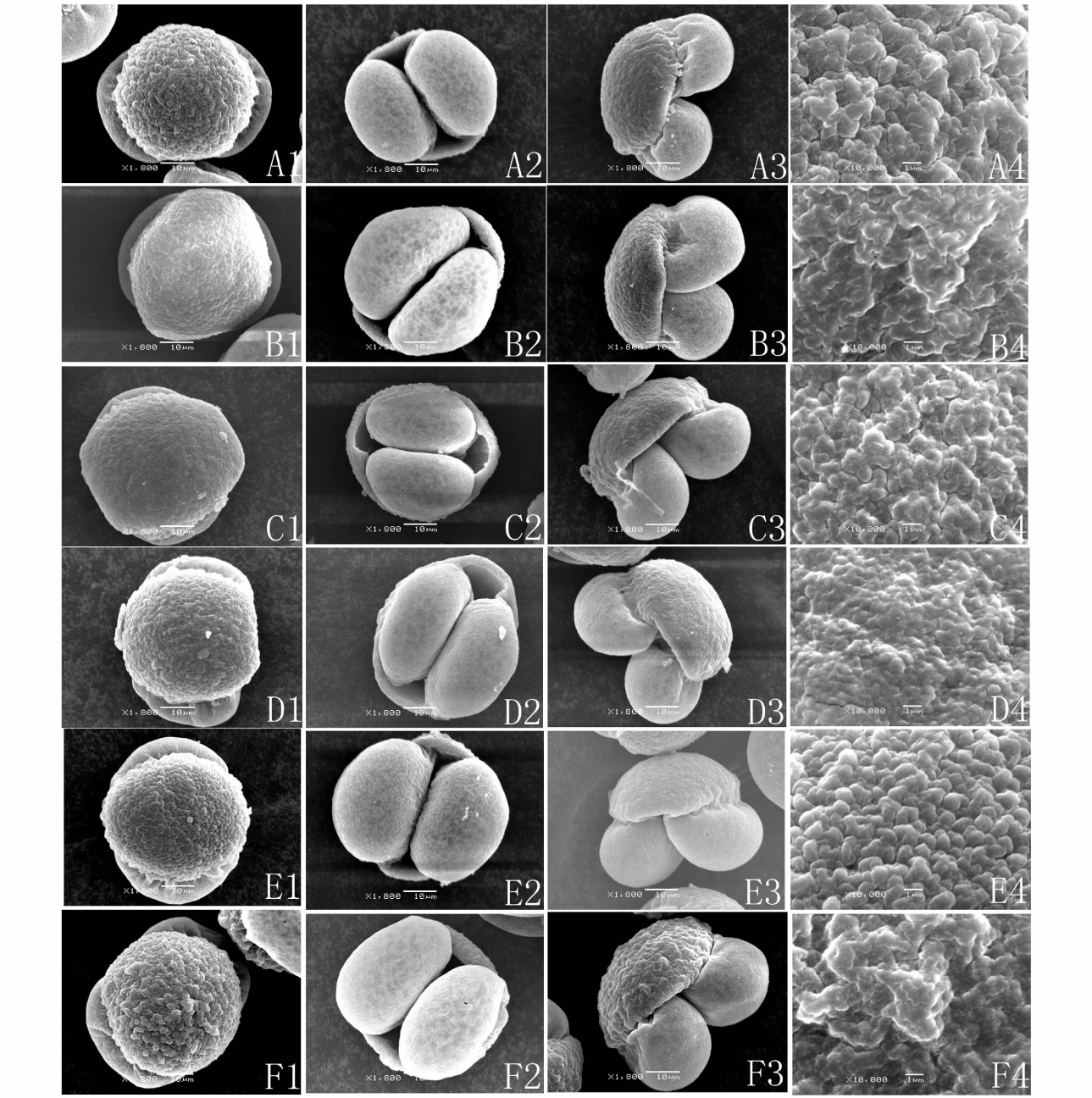
一致,是属于具气囊的“松型”花粉类型^[18]。从近极面观各树种花粉呈近圆形(油松、黑皮油松)、椭圆形

(柴松、扫帚油松、马尾松、巴山松);从远极面观呈近圆形(柴松、黑皮油松)、方形(巴山松)、椭圆形(油松、扫帚油松、马尾松);从侧面观气囊与帽在近极基形成一个不深的凹角(图 1)。

2.3 花粉粒的表面纹饰

6 种松属树种花粉在体近极面表面纹理上变化显著,根据表面雕纹趋势可分成两大类(图 1,A4~F4):第 1 类为龟裂状雕纹,有巴山松,表面均无疣

状颗粒分布,雕纹堆积形成波浪状。第 2 类为团块状突起雕纹,有油松、柴松、黑皮油松、扫帚油松、马尾松。在这一类型中根据表面疣状颗粒分布状况又可再分成 2 种类型:第 1 类是有少量疣状颗粒分布,如油松、柴松、黑皮油松和扫帚油松,雕纹相互堆积形成微波状;第 2 类分布致密的疣状颗粒,如马尾松,雕纹平铺。



A1~A4 为柴松;B1~B4 为油松;C1~C4 为黑皮油松;D1~D4 为扫帚油松;E1~E4 为马尾松;F1~F4 为巴山松。A1~F1 为近极面观($\times 1\,800$);A2~F2 为远极面观($\times 1\,800$);A3~F3 为赤道面观($\times 1\,800$);A4~F4 为近极面表面纹理($\times 10\,000$)。

图 1 6 种松属树种花粉形态的扫描电镜观察

Fig. 1 SEM pictures of pollens of 6 *Pinus* species

2.4 聚类分析结果

从表 3 可以看出 6 个树种间欧氏距离的平方的

变幅从 5.753 到 32.825,平均为 18.000。2 个变种黑皮油松与扫帚油松与油松之间的欧氏距离的平方

分别为 11.812 和 5.753,平均为 8.783;2 个近缘种巴山松与马尾松与油松之间的欧氏距离的平方分别为 25.129 和 32.825,平均为 28.977;柴松与油松之间的欧氏距离的平方为 24.452,表明柴松与油松之间的欧氏距离大于变种与油松间的欧式距离而小于近缘种与油松间的欧式距离,说明柴松已经可以被归为油松变种的范畴。

从聚类图 2 可以看出,油松与 2 个变种扫帚油松和黑皮油松首先聚成一类,柴松随之与之相聚,2 个近缘种巴山松和马尾松先聚成一类,然后再与前 4 个物种相聚。聚类结果亦表明柴松可以被归为油松的变种。

表 3 相似性矩阵
Table 3 Proximity matrix

Case	Squared Euclidean Distance					
	柴松	黑皮油松	扫帚油松	巴山松	马尾松	油松
柴松	0.000	11.580	16.778	31.965	20.237	24.452
黑皮油松	11.580	0.000	7.282	18.738	14.972	11.812
扫帚油松	16.778	7.282	0.000	17.677	15.173	5.753
巴山松	31.965	18.738	17.677	0.000	15.626	25.129
马尾松	20.237	14.972	15.173	15.626	0.000	32.825
油松	24.452	11.812	5.753	25.129	32.825	0.000

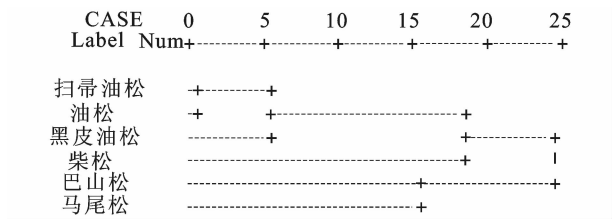


图 2 柴松及其近缘种或变种的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of 6 collections based on pollen characteristics

3 结论与讨论

裸子植物的花粉多种多样,根据气囊的有无,萌发孔的形状和结构,以及外壁的构造等特征,可分为松型、苏铁型、杉型、柏型、麻黄型 5 种类型^[18],柴松等 6 个松属树种花粉形态类型为松型,轮廓形态特征基本一致。花粉粒结构主要由本体与气囊两部分组成。本体为实体,上部为帽,外壁表面具各式雕纹;腹面为 2 个相对称的半圆形气囊,2 个气囊中间呈缝隙状为远极沟(萌发沟)。

有研究表明,花粉表面纹饰一般由原始种群的简单光滑向进化种群的复杂粗糙演化,演化趋势大致为从光滑到小穴、小沟,到颗粒状突起,再到棒状、刺状、鼓槌状,最后演化成网状、皱波状、条纹状^[19-20]。根据松属花粉的表面纹饰其进化趋势为具少量疣状颗粒→分布有致密的疣状颗粒→龟裂,深度皱波状纹理,即油松、黑皮油松、扫帚油松、柴松

→马尾松→巴山松进化的趋势。

松属植物花粉形态,在种内变异相对稳定,种间变异显著,可将其作为划分种的依据之一,这一观点在花粉形态聚类分析的研究中得到了印证。

本研究首次将松属花粉放大到 1 万倍,观察到花粉表面精细的纹理结构和附属物疣状颗粒的分布,发现松属花粉纹理和疣状颗粒在种内具有保守性,种间存在特异性,所以可作为该属分类和系统演替进化关系研究的重要孢粉学指标。此外花粉大小及花粉体和萌发区的形态在种间的变异也相对稳定,可作为该属分类的辅助孢粉指标。

参考文献:

[1] BUCCI G, ANZIDEI M, MADAGHIELE A. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers[J]. Molecular Ecology, 1998, 7: 1633-1643.

[2] 陆素娟, 李乡旺. 松属的起源演化及扩散[J]. 西北林学院学报, 1999, 14(3): 1-5.

LU S J, LI X W. Origin, phylogeny and spreading of *Pinus*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 1999, 14(3): 1-5. (in Chinese)

[3] 乐天宇. 陕甘宁盆地植物志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1957: 59.

[4] 朱志诚. 柴松—少脂油松生态型形成的初步分析[J]. 陕西林业科技, 1987(4): 1-2.

ZHU Z C. Preliminary analysis on the formation of a less-resin ecotype of *Pinus tabulaeformis* Carr[J]. Shaanxi Forestry Science, 1987(4): 1-2. (in Chinese)

[5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第七卷)[M]. 北京: 中国科学出版社, 1978: 251-253.

[6] 郑万钧. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 286-289.

[7] 西北植物研究所. 黄土高原植物志(第一卷)[M]. 北京: 中国科学出版社, 2000: 17.

[8] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 20-21.

[9] HUYSMANS S, DESSEIN S, SMETS E, et al. Pollen morphology of NW European representatives confirms monophyly of *Rubieae* (*Rubiaceae*)[J]. Review of Palaeobotany and Palynology, 2003, 127: 219-240.

[10] 赵杨, 陈晓阳, 骈瑞琪, 等. 胡枝子属研究进展[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(2): 71-75.

ZHAO Y, CHEN X Y, PIAN R Q, et al. Research advances of *Lespedeza* Michx[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006(2): 71-75. (in Chinese)

[11] LIU J X, LI J Y, ZHANG Y L, et al. Pollen morphology of the tribe *Lithospermeae* of boraginoidae in China and its taxonomic significance[J]. Plant Syst Evol, 2010(29): 75-83.

[12] 何玉友, 秦国峰, 高爱新, 等. 马尾松等松属树种花粉形态研究[J]. 林业科学研究, 2008, 21(4): 456-463.

HE Y Y, QIN G F, GAO A X, et al. Study on the pollen morphology of masson pine and other pine species and varieties

Forest Research,2008,21(4):456-463. (in Chinese)

[13] PEHLIVAN S,BASER B,CABI E. Pollen morphology of 10 taxa belonging to taxa belonging to Prangos Lindl. and one of Ekimia H. Duman & M. F. Watson (Umbelliferae) from Turkey and and its taxonomic significanc[J]. Bangladesh J. Plant Taxon,2009,16(2):165-174.

[14] YASMIN G,KHAN M A,SHAHEEN N. Pollen morphology of selected *Polygonum* L. species (Polygonaceae) from Pakistan and its taxonomic significance[J]. Pak. J. Bot. ,2010,42(6):3693-3703.

[15] 孙京田. 松属花粉形态研究及其分类学意义[J]. 山东科学,2002,15. (4):35-40.

SUN J T. Study on pollen morphology characteristics of *Pinus* and its taxonomic significance[J]. Shandong Science,2002,15(4):35-40. (in Chinese)

[16] 虞泓,杨彩云,徐正尧. 云南松居群花粉形态多态性[J]. 云南大学学报:自然科学版,1999,21(2):86- 89.

YU H,YANG C Y,XU Z Y. Study on polymorphism of pollen morphology in populations of *Pinus yunnanensis* Franch [J]. Journal of Yunnan University,1999,21(2):86-89. (in Chinese)

[17] NAKAGAWA T,EDOUARD J L,BEAULIEU J L. A scanning electron microscopy (SEM) study of sediments from Lake Cristol, southern French Alps, with special reference to the identification of *Pinus cembra* and other alpine *Pinus* species based on SEM pollen morphology[J]. Review of Palaeobotany and Palynology,2000,108:1-15.

[18] 王伏雄. 中国植物花粉形态[M]. 北京:科学出版社,1995,17-37.

[19] WALKER J W. Evolution of exine struction in the pollen of primitive angiosperms[J]. American Journal Boanyt,1974,61:891-902.

[20] CHIH H T. The classification and evolution of pollen types of *Planchonioideae* (*Lec ythidaceae*) [J]. Syst. Evol. ,1994,189:15-27.

(上接第 41 页)

参考文献:

[1] 陈伟,兰国玉,陈秋波,等. 海南岛青皮林生态系统服务功能及保护对策[J]. 西北林学院学报,2007,22(5):207-210.

CHEN W,LAN G Y,CHEN Q B,*et al.* Ecosystem service function s and protect ion countermeasures of the *Vitica mangachapoi* forest in Hainan[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(5):207-210. (in Chinese)

[2] 陈伟,蒋菊生,兰国玉. 海南青梅林生态系统的分布规律、存在问题与管理对策[J]. 热带农业科学,2006,26(6):67-70.

CHEN W,JIANG J S,LAN G Y. Distribution regularities, problems and its management countermeasure of *Vitica mangachapoi* forest ecosystem in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2006,26(6):67-70. (in Chinese)

[3] 吴志祥,谢贵水,陶忠良. 中国天然橡胶可持续发展思路探讨[J]. 世界农业,2009(2):47-49.

WU Z X,XIE G S,TAO Z L. Probe into the sustainable development of Chinese natural rubber[J]. World Agriculture,2009(2):47-49.

[4] 吴志祥,谢贵水,杨川,等. 橡胶林生态系统干季微气候特征和通量的初步观测[J]. 热带作物学报,2010(12):2081-2090.

WU Z X,XIE G S,YANG C,*et al.* Characteristics of microclimate and flux of a rubber plantation ecosystem in dry season of Hainan Island, South Chinese[J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2010(12):2081-2090. (in Chinese)

[5] 刘红梅. 胶林生物多样性服务功能及其价值评价[D]. 广州:华南热带农业大学,2003.

[6] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京:科学出版社,2001.

[7] 陈焕镛. 海南植物志(1-4 卷) [M]. 北京:科学出版社,1965.

[8] 陈封环. 广东植物志(1-4 卷) [M]. 广州:广东科学技术出版社,1994.

[9] 吴征镒,周浙昆,孙航,等. 种子植物分布去类型及其起源和分化[M]. 昆明:云南科技出版社,2006.

[10] 吴征镒,周浙昆,李德铎,等. 世界种子植物科的分布区类型系统[J]. 云南植物研究,2003,25:245-257.

WU Z Y,ZHOU Z K,LI D Z. The area-type of the word families of seed plants[J]. Acta Botanica Yunnanica,2003,25:245-257. (in Chinese)

[11] 吴征镒,周浙昆,李德铎,等. 世界种子植物科的分布区类型系统修订[J]. 云南植物研究,2003,25:535-538.

[12] 李景文. 森林生态学[M]. 2 版. 北京:中国林业出版社,1922.

[13] 陈征,朱华. 西双版纳热带雨林草本植物区系初步分析[J]. 西北林学院学报,2009,24(1):11-15.

CHEN Z,ZHU H. Investigation on the flora of herbaceous plants under the tropical rain forest of Xishuangbanna[J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(1):11-15. (in Chinese)

[14] 兰国玉,胡跃华,曹敏,等. 西双版纳热带森林动态监测样地一树种组成与空间分布格局[J]. 植物生态学报,2008,32(2):287-298.

LAN G Y,HU Y H,CAO M,*et al.* Establishment of xishuangbanna tropical forest dynamics plot: species compositions and spatial distribution patterns[J]. Chinese Journal of Plant Ecology,2008,32(2):287-298. (in Chinese)

[15] 吴征镒. 中国种子植物分布区属的分布区类型[J]. 云南植物研究,1991,15(增刊 IV):136-139.

WU Z Y. The area-type of Chinese genera of seed plants[J]. Acta Botanica Yunnanica,1991,15(Supp. IV):136-139. (in Chinese)