

• 研究报告 •

风筝果镜像花的雌雄异位变化及传粉生态型的形成

钱贞娜^{1,2} 孟千万^{1,2} 任明迅^{1,2*}

1 (海南大学海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

2 (海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 亚洲特有植物风筝果(*Hiptage benghalensis*)镜像花(mirror-image flowers)的雌雄异位变化极大, 柱头与可育花药的空间距离在海南岛与云南西双版纳种群仅有2–4 mm, 而在贵州及云南东南部种群可达10–12 mm。为验证“镜像花雌雄异位的变化是各个地理种群受到传粉昆虫体型大小选择的结果”假说, 本文开展了传粉生态学与分子生物学研究, 探讨风筝果不同地理种群的雌雄异位变化是否与当地传粉者体型相关, 是否有着遗传基础, 以及是否形成了“传粉生态型”(pollination ecotype)。结果表明, 雌雄异位程度大的贵州种群和云南东南部种群, 其传粉者也是体型较大的木蜂(*Xylocopa nasalis*)和熊蜂一种(*Bombus* sp.); 雌雄异位程度小的海南岛种群和云南西双版纳种群的传粉者则是体型较小的大蜜蜂(*Apis dorsata*)、西方蜜蜂(*A. mellifera*)。除了雌雄异位的明显分化($F = 53.69, P < 0.01$)之外, 花柱长度也在这两类种群之间差异显著($F = 12.5, P < 0.05$), 与传粉昆虫身体长度密切相关。通过叶绿体 $ycf1b$ 、 $rbcL$ 和细胞核ITS 3个DNA片段的序列分析, 由大型蜂传粉的雌雄异位程度较大的3个种群(贵州和云南东南部种群)遗传关系极近, 与小型蜂传粉种群(雌雄异位较小的海南岛种群和云南西双版纳种群)存在明显的遗传分化。这些结果显示, 风筝果不同地理种群的镜像花雌雄异位程度的变化可能是适应局域不同体型大小的传粉昆虫的选择结果, 而且种群间出现了基因流的隔断, 可能与大型蜂、小型蜂传粉的两种生态型有关。镜像花通过雌雄异位的变化适应不同地域的传粉者而形成传粉生态型, 这种传粉生态型及其传粉隔离机制可能是风筝果属物种形成与维持的一个重要原因。

关键词: 适应进化; 传粉效率; 繁殖隔离; 遗传距离; $ycf1b$; $rbcL$; ITS

Pollination ecotypes and herkogamy variation of *Hiptage benghalensis* (Malpighiaceae) with mirror-image flowers

Zhenna Qian^{1,2}, Qianwan Meng^{1,2}, Mingxun Ren^{1,2*}

1 Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228

2 Faculty of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228

Abstract: Herkogamy, the spatial separation of sexual organs within flowers, has long been thought to be a floral adaptation of reducing self pollination in hermaphrodites. Herkogamy of mirror-image flowers in the Asian endemic *Hiptage benghalensis* (Malpighiaceae) varies greatly between populations on Hainan Island (smaller than 4 mm) and Guizhou Province (larger than 10 mm). Such divergence in herkogamy could be adaptive to pollinator body size, which relates to pollen placement and stigma contact position. Recipient selection between local pollinators and plants may facilitate pollinator assembly in isolated populations, even forming pollination ecotypes. Pollinators were investigated in six geographic populations of *H. benghalensis* to study whether variations in herkogamy correspond to pollinator size. Molecular markers with nuclear ITS 1/4, chloroplast $ycf1b$ and $rbcL$ were also used to detect genetic differentiation between populations with large or small herkogamy. Our data showed small herkogamy in two populations from Hainan Island and one population from Xishuangbanna (southern Yunnan Province) as they were pollinated by small bees including *Apis dorsata* and *Apis mellifera*, with an abdomen width varying from 2 to 4 mm. Two populations from Guizhou Province and one population from Southeast Yunnan with larger herkogamy were pollinated by

收稿日期: 2016-09-05; 接受日期: 2016-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(31670230)和海南大学科研启动经费项目(kyqd1501)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: renmx@hainu.edu.cn

carpenter bees *Xylocopa nasalis* and bumble bees (*Bombus* sp.), with an obvious larger body size with a mean abdomen width of 11 mm. The style length ($F = 12.5$, $P < 0.05$) was also significantly different between large versus small herkogamous populations. Genetic data based on nuclear (ITS 1/4) and chloroplast (*rbcL* and *ycf1*) DNA also supported the differentiation between small and large herkogamous populations. These results indicated associations between flower and pollinator size, suggesting pollination ecotypes in *H. benghalensis*. This study indicated that the pollination ecotype in mirror-image flowers was associated with variations in herkogamy.

Key words: adaptive evolution; pollination efficiency; reproductive isolation; genetic distance; *ycf1b*; *rbcL*; ITS

由于环境因子与资源的斑块状分布, 同种植物的不同地理种群往往处于水热条件与伴生生物大不相同的微生境中。在局域不同环境条件的选择下, 不同地理种群可能在个体形态与结构、遗传背景方面都呈现出显著的不同, 形成不同的“生态型”(ecotype)。生态型是植物同一种内表现出的具有遗传基础的生态分化(Parisod & Joost, 2010), 是物种形成的一个初级阶段(Johnson & Steiner, 1997; Whittall & Hodges, 2007)。对于以异交传粉为主的植物而言, 不同地理种群还可能面临不同的传粉者类群与组成, 特别是异交物种拓殖到一个新分布区的先锋种群必然经历着适应局域“更有效传粉者”的强烈选择(Grant & Grant, 1965; Stebbins, 1970; Johnson & Steiner, 1997; Fortuna et al, 2008)。为适应最有效传粉者、促进繁殖成功, 不同地理种群的个体可能出现适应局域传粉者的花部特征调整(Robertson & Wyatt, 1990), 形成在形态特征与遗传背景都出现分化的“传粉生态型”(pollination ecotype) (Johnson, 1997; Johnson & Steiner, 1997, 2000, 2003; Anderson et al, 2009; Van der Niet et al, 2014)。与其他类型的生态型相比, 传粉生态型可直接影响到传粉隔离从而更易导致物种分化(Grant & Grant, 1965), 是认识植物物种形成、花-传粉昆虫交互选择的一个重要方面。

金虎尾科风筝果属(*Hiptage*)是亚洲特有属, 遍布整个亚洲热带地区, 特别是广布种风筝果(*H. benghalensis*)从南亚印度河流域、东南亚、中国南部(含云南、贵州、广西、广东、海南岛、台湾以及福建南部)等地都有大量分布, 分布区北缘可达贵州南部的南盘江-红水河流域(陈书坤, 1977; Ren, 2015)。风筝果属具有极其特化的传粉系统——镜像花(mirror-image flowers) (Sirirugsa, 1991; Ren et al, 2013)。镜像花是通过偏向一侧的花柱与偏向另一侧的可育雄蕊分别接触昆虫腹部两侧来进行传粉的

一种异交机制(Todd, 1882; Jesson & Barrett, 2002, 2003; 任明迅和张大勇, 2004; 林玉和谭敦炎, 2007; Tang & Huang, 2007)。侧偏的花柱与可育雄蕊的距离(雌雄异位, herkogamy) (Webb & Lloyd, 1986; 任明迅和张大勇, 2004)需与传粉者体型特别是腹部宽度相适应, 才有利于镜像花柱头与花药接触到传粉昆虫腹部两侧, 成功实现传粉(Barrett et al, 2000; Ren et al, 2013)。

我们的野外研究发现, 风筝果不同地理种群的镜像花在雌雄异位程度上表现出了极大的变化, 位于物种分布区北缘(南盘江-红水河流域)种群的雌雄异位程度可达云南西双版纳与海南种群的3倍之多。这种巨大的种内差异是由于分布区北缘缺乏合适传粉者而发生的松弛选择的结果, 还是对当地局域分布的较大体型传粉者的一种适应呢? 如果是后者, 这种适应性分化是不是已经造成了分布区北缘种群与其他地理种群间的遗传分化? 这是否又可能是风筝果属狭域特有种形成与维持的一种机制呢? 对这些问题的回答, 将极大促进人们对传粉生态型与物种形成、镜像花特化传粉系统的适应进化等的深入认识。

1 材料与方法

1.1 研究物种

风筝果是多年生木质藤本植物, 主要分布于亚洲热带地区的森林林缘、河谷滩地或石灰岩裸岩, 常攀爬于高大树木, 或铺散于石上。花期3-4月, 总状花序, 每花序约有花20朵。花大, 极芳香, 花瓣5枚、白色且向后方反折, 最上方的旗瓣基部具黄色斑点(图1)。风筝果除了具有特化的传粉系统“镜像花”之外, 雄蕊还分化成1大9小的异型雄蕊(陈书坤, 1977; Ren et al, 2013) (图1), 较大的1枚雄蕊可育、花粉活性高, 而9枚小雄蕊的花粉活性极低, 可能是提供花粉诱物吸引传粉昆虫的不育雄蕊(Ren et al,

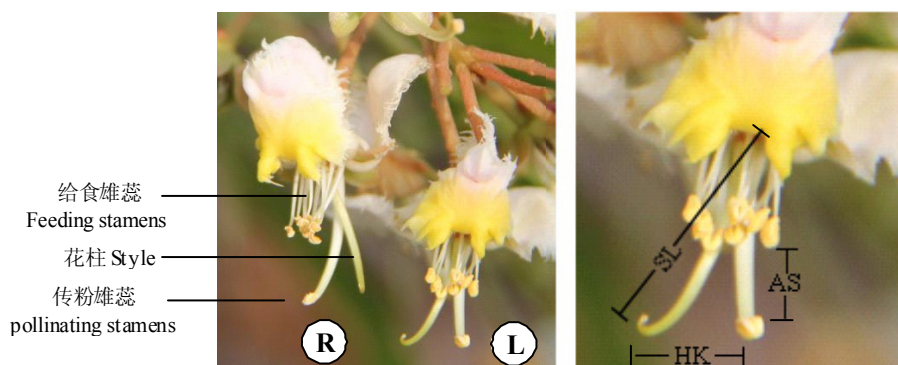


图1 风筝果的镜像花及花部关键性状的测量。R: 右偏花柱型; L: 左偏花柱型; HK: 雌雄异位; SL: 花柱长; AS: 花药分离。
Fig. 1 Mirror-image flowers and measurements of key floral traits in *Hiptage benghalensis*. R, Right-styled flower; L, Left-styled flower; HK, Herkogamy; SL, Style length; AS, Anther separation.

2013)。萼片5, 上方1枚具一分泌花蜜的大腺体(Ren et al, 2013)。果实是典型的翅果, 具窄翅3。叶对生、革质, 幼叶呈现闪亮的红色。风筝果适应性较强, 花、果、叶均有较高的观赏价值, 已在国内外一些植物园和庭院引种(Vitelli et al, 2009; 任明迅, 个人观察)。

风筝果的自然分布范围几乎遍布亚洲整个热带地区, 且在季风气候作用下得以沿着红河、右江与红水河等河谷向北迁移至贵州南部、滇东南等地河谷与石灰岩山坡(Ren, 2015; 钱贞娜和任明迅, 2016), 使得贵州南部的南盘江—红水河流域成为风筝果以及整个风筝果属的分布区北缘(Ren, 2015)。

1.2 实验地点

选择风筝果分布区北缘的贵州南部(雌雄异位程度大)、海南岛(雌雄异位程度较小)、云南(雌雄异位程度变化较大)等3个地理区域, 每个区域选择2个地理种群。贵州南部的2个地理种群位于望谟县的乐康村(GZ-LK)和蔗香乡(GZ-ZX); 海南岛的2个种群位于海南岛西部的霸王岭(HN-BW)和东部的吊罗山(HN-DL); 云南省的2个种群分别是西双版纳热带植物园(YN-BN)和元江县的羊街村(YN-YJ)。各地理种群的基本信息见表1。

野外观察与实验时间是在2015年3月(贵州种群)、2015年和2016年的4月(海南岛种群)以及2016年4月(云南种群)。

1.3 花部关键性状

盛花期时每个种群随机选取15个开花植株, 测量每个植株所有可测量到的完全开放的花。如种群处于花期末期, 花数量较少, 则测量整个种群所有可测量到的花。用精度1 mm的直尺测量3个花部关

键性状(图1): 雌雄异位(柱头与可育花药的水平距离。可育花药指与花柱呈相反侧偏方向的大型可育雄蕊的花药)、花柱长(花柱基部到柱头的距离)、花药分离(可育雄蕊的花药与其余9个较小雄蕊花药之间的最小距离)。具体测量方法见图1所示。使用 χ^2 分析, 对花柱左偏、花柱右偏的两种花型的数量比率进行统计分析, 看是否偏离理论预测的1:1的比率(Jesson & Barrett, 2002, 2003)。

1.4 访花昆虫及行为

每个种群的观察时间从9:00至17:00, 昆虫访花频率与次数观测时间为11:00—14:00、15:00—17:00。在每种群内随机标记10个花序进行访花昆虫的观察和拍照。特别注意访花昆虫身体与花内各部位的接触情况, 及其与3个关键花部性状的关系。将访花时能够接触到花药和柱头的昆虫视为传粉昆虫。记录传粉者种类、拍摄传粉昆虫的访花路径。

用2个电蚊拍夹击(Huang & Shi, 2013), 捕捉访花频率较高的传粉昆虫。将捕获的昆虫放入样品瓶, 带回室内测量昆虫的体长、腹部宽度, 以及花粉粘附部位。测量完成后将昆虫制成标本并鉴定。

1.5 种群遗传关系

每个种群随机选取覆盖整个种群分布范围的15个植株, 采集幼叶, 用变色硅胶干燥。使用改良的CTAB法提取叶片总DNA(Doley & Doley, 1987)。选取变异程度大的2个叶绿体片段 $rbcL$ 、 $ycf1b$ 和1个核基因ITS, 确定风筝果不同地理种群的遗传关系。引物序列及文献来源见表2。

PCR反应体积为25 μ L: ddH₂O 17 μ L; 10 \times Buffer 5 μ L; 10 mM dNTPs 1 μ L; 50 μ M前后引物各0.5 μ L; 5 U *Taq*酶0.25 μ L; DNA模板1 μ L。PCR反应

表1 风筝果6个种群的地理位置与花柱右偏、左偏两种花型的比率
Table 1 Geographic locations and ratio of right- and left-styled flowers of *Hiptage benghalensis* populations

地点 Location	居群 Population	经纬度 Latitude/longitude	海拔 Altitude (m)	种群两种花型比率 Right/Left-styled flowers	χ^2	<i>P</i>
贵州 Guizhou	GZ-LK	25°05'24" N, 106°12'59" E	466	1:1 (21/21)	0	1
	GZ-ZX	24°58'29" N, 106°08'09" E	442	1:1 (18/18)	0	1
云南 Yunnan	YN-YJ	23°20'17" N, 102°11'52" E	1,758	1:1.18 (11/13)	0.75	0.68
	YN-BN	21°52'16" N, 101°19'27" E	570	1:1 (32/32)	0	1
海南 Hainan	HN-BW	19°06'18" N, 109°06'18" E	223	1:1.50 (36/41)	1.2	0.27
	HN-DL	18°43'19" N, 109°52'24" E	332	1:1.33 (28/39)	0.28	0.59

表2 确定风筝果地理种群遗传关系的DNA片段及其引物
Table 2 DNA fragments and the primers used for genetic studies of *Hiptage benghalensis* populations

DNA片段	引物序列 Sequence	片段大小 Fragment size	参考文献 Reference
核基因 ITS 1/4	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	651 bp	White et al, 1990
叶绿体 <i>rbcL</i>	1F: ATGTCACCACAAACAGAAAC 724R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC	715 bp	Davis & Anderson, 2010
叶绿体 <i>ycf1b</i>	F: TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT R: ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA	926 bp	Dong et al, 2015

程序, ITS为: 预变性94℃ 4 min, 变性94℃ 1 min, 退火55℃ 1 min, 延伸72℃ 1 min; *rbcL*: 预变性94℃ 4 min, 变性94℃ 30 s, 退火54℃ 1 min, 延伸72℃ 1 min; *ycf1b*: 预变性94℃ 4 min, 变性94℃ 30 s, 退火52℃ 40 s, 延伸72℃ 1 min。以上变性、退火、延伸三步均为35个循环, 最终在72℃延伸10 min。所获得的PCR产物送华大基因公司测序。

1.6 数据分析

花部关键性状的数据用SPSS 13.0 for Windows 统计软件分析, 与传粉昆虫体宽的关系采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。对不同地理种群DNA 测序结果用MEGA 6.0 (Tamura et al, 2013)自行比对, 将叶绿体基因序列和核基因序列用Sequence Matrix (Vaidya et al, 2011)合并, 再使用MEGA 6.0 的邻接法(neighbor-joining method)对6个地理种群进行遗传关系的聚类分析, 并将种群遗传关系与雌雄异位程度的关系进行比对, 判断雌雄异位程度相差较大的种群是否也有着较远的遗传关系。使用GenAlEx 6.501 (Excoffier et al, 1992)对遗传结构进行AMOVA分析, 区分种群间与种群内的遗传变异相对比例。

2 结果

2.1 花部关键性状

各个地理种群的左偏花柱花型/右偏花柱花型的比率几乎都呈1:1 (表1)。贵州GZ-LK、GZ-ZX种

群和云南元江YN-YJ种群的雌雄异位都大于10 mm, 而海南HN-BW、HN-DL种群和云南YN-BN种群雌雄异位均小于5 mm (图2A), 两者的差异极显著($F = 53.69, P < 0.01$)。雌雄异位较大的贵州2个种群、云南YN-YJ种群之间的雌雄异位程度则差异不显著($P > 0.05$), 雌雄异位较小的海南2个种群和云南YN-BN种群之间的雌雄异位也相差无几($P > 0.05$)。因此, 可以把贵州2个种群和云南的YN-YJ种群归为“大雌雄异位种群”, 海南岛2个种群及云南的YN-BN种群则为“小雌雄异位种群”。

花柱长方面, 大雌雄异位种群(GZ-LK、GZ-ZX、YN-YJ)的花柱也明显较长, 基本都在16 mm以上, 而小雌雄异位种群(HN-BW、HN-DL、YN-BN)花柱长也较小, 平均值在12 mm左右(图2B), 差异显著($F = 12.5, P < 0.05$)。

花药分离程度在不同地理种群之间没有出现明显差异($P > 0.05$) (图2C)。但是, 从图2C可以看出, 大雌雄异位种群有着略大的花药分离程度(> 6 mm), 小雌雄异位种群的花药分离程度较小(~ 5 mm)。

2.2 传粉昆虫及访花行为

大雌雄异位种群的有效传粉者是竹木蜂(*Xylocopa nasalis*)、和熊蜂一种(*Bombus* sp.)等大型昆虫(图3), 这些昆虫的腹部宽度均可达10 mm左右。在访花过程中, 竹木蜂与熊蜂都在反折的花柱与可育雄蕊之间降落, 腹部两侧可轻易触碰到柱头与可育雄蕊的花药(图3A, B, C)。每个种群平均每天

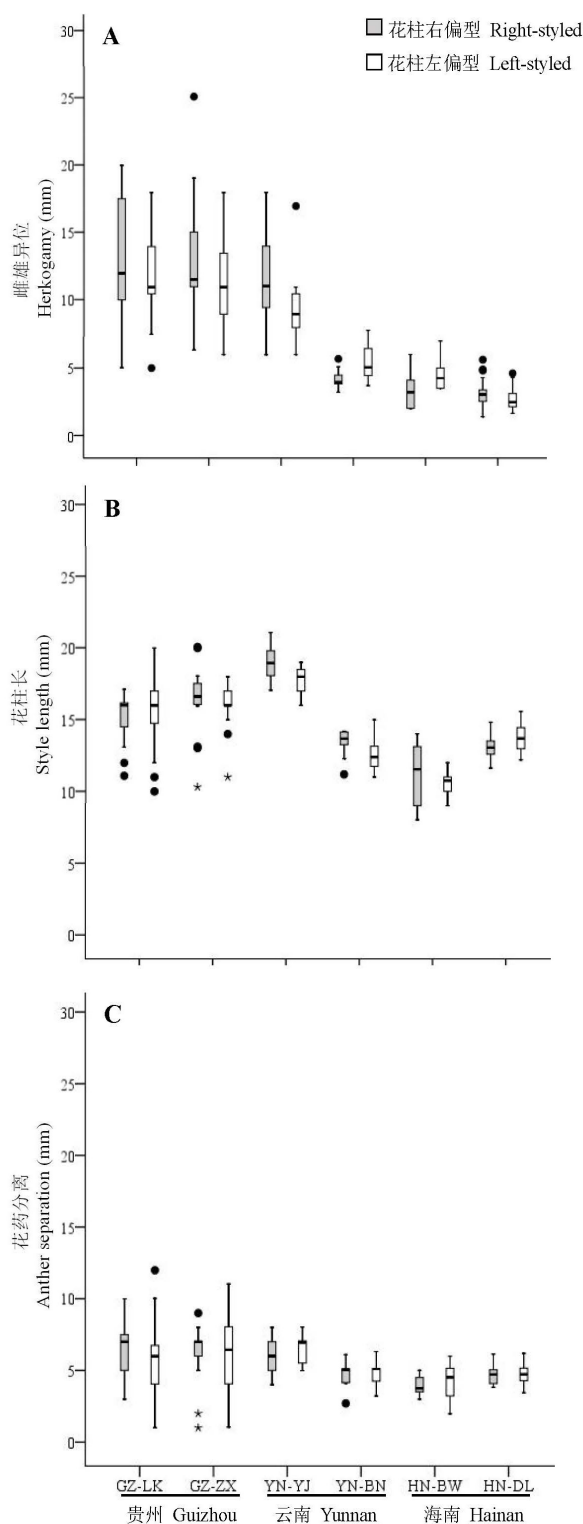


图2 不同地理种群的风筝果镜像花的雌雄异位(A)、花柱长(B)、花药分离(C)情况

Fig. 2 Boxplot of variations in herkogamy (A), style length (B) and anther separation (C) of mirror-image flowers among *Hiptage benghalensis* populations

5 h的观测时间内, 竹木蜂与熊蜂访花次数共460次, 其中竹木蜂315次(68.5%)、熊蜂145次(31.5%)。竹木蜂访花频率为 6.857 ± 0.89 次·朵⁻¹·h⁻¹、熊蜂访花频率为 2.60 ± 1.94 次·朵⁻¹·h⁻¹。偶见极少数的蝇类或食蚜蝇来访, 但访问频率低, 仅在9个小雄蕊上快速采集花粉, 停留时间往往少于3 s, 未见接触柱头及可育雄蕊的花药。

小雌雄异位种群的传粉者体型较小, 主要是腹部宽度在3–5 mm之间的大蜜蜂(*Apis dorsata*)和西方蜜蜂(*A. mellifera*) (图3E, F)。大蜜蜂和西方蜜蜂访花频率分别为 2.217 ± 0.55 次·朵⁻¹·h⁻¹、 5.725 ± 1.35 次·朵⁻¹·h⁻¹, 大蜜蜂为主要的有效传粉者。根据雌雄异位程度与传粉者体型大小(腹部宽度)的相关性来看, 传粉者体型与雌雄异位程度呈现出非常明显的对应变化关系(图4)。

竹木蜂与熊蜂访花时, 大多降落在花柱之上, 或花柱与大型可育雄蕊之间(图3), 取食9个小雄蕊上的花粉或扒开雄蕊群通过花瓣间的缝隙吸取旗瓣后方的萼片腺体分泌物。在这个过程中, 昆虫胸部紧压9个小雄蕊花药, 而腹部两侧接触到柱头与可育花药, 携带上可育花粉或给柱头授粉。竹木蜂和熊蜂偶尔会伸长喙吸食萼片腺体的分泌物, 但由于花瓣的强烈反折且旗瓣紧抱花萼, 这些体型巨大的昆虫难以钻进花瓣间隙(图3), 身体在花内的移动空间不大, 往往都是头部顶在旗瓣之下、身体腹部两侧仍位于反折的花柱或可育雄蕊之上(图3)。对捕捉到的传粉昆虫体表进行观察(图3D), 发现其胸部携带大量花粉, 应为来自小雄蕊花药的花粉, 而腹部侧面附有来自可育花药的少量花粉。由此可判断竹木蜂与熊蜂确实是可以实现镜像花传粉机制的“合法的”传粉者。大蜜蜂访花行为与前二者类似, 几乎完全采集花粉, 极少取食萼片腺体分泌物(图3)。

2.3 不同地理种群间遗传关系

基于ycf1b、rbcL、ITS基因片段序列变异的AMOVA分析发现, 风筝果种群86%的遗传变异出现在种群间, 仅有14%的遗传变异出现在种群内。这表明, 风筝果地理种群之间存在着较大的遗传分化, 种群间的基因流强度较低。

根据种群遗传关系的聚类分析, 地理距离较远的种群也有着较远的遗传距离(图4)。特别值得注意的是, 大雌雄异位种群(贵州GZ-ZX、GZ-LK种群和云南YN-YJ种群)相互间的遗传距离较近, 而它们

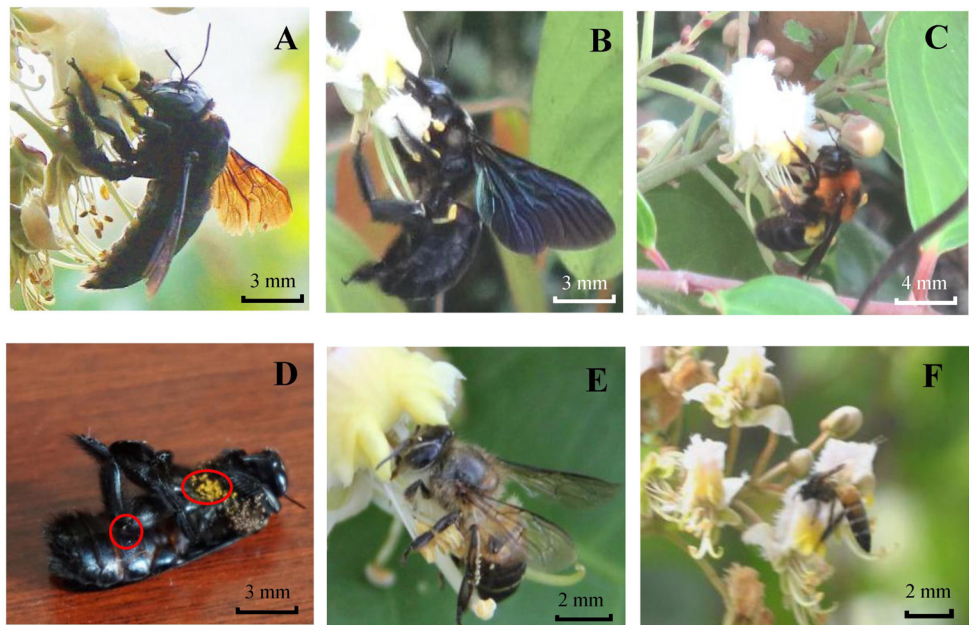


图3 风筝果不同地理种群的传粉者。(A)竹木蜂(贵州GZ-LK种群); (B)竹木蜂(贵州GZ-ZX种群); (C)熊蜂(云南YN-YJ种群); (D)花粉粘附在竹木蜂胸部与腹部(红色圆圈处); (E)西方蜜蜂(云南YN-BN种群); (F)大蜜蜂(海南HN-BW种群)。
Fig. 3 Pollinators in different geographic populations of *Hiptage benghalensis*. (A) and (B), *Xylocopa nasalis* visiting GZ-LK and GZ-ZX populations in Guizhou Province; (C) *Bombus* sp. visiting YN-YJ Population in Yunnan Province; (D) Pollen grains (red circles) on the thorax and abdomen of a carpenter bee; (E) *Apis mellifera* in YN-BN Population in Yunnan Province; (F) *Apis dorsata* in HN-BW Population on Hainan Island.

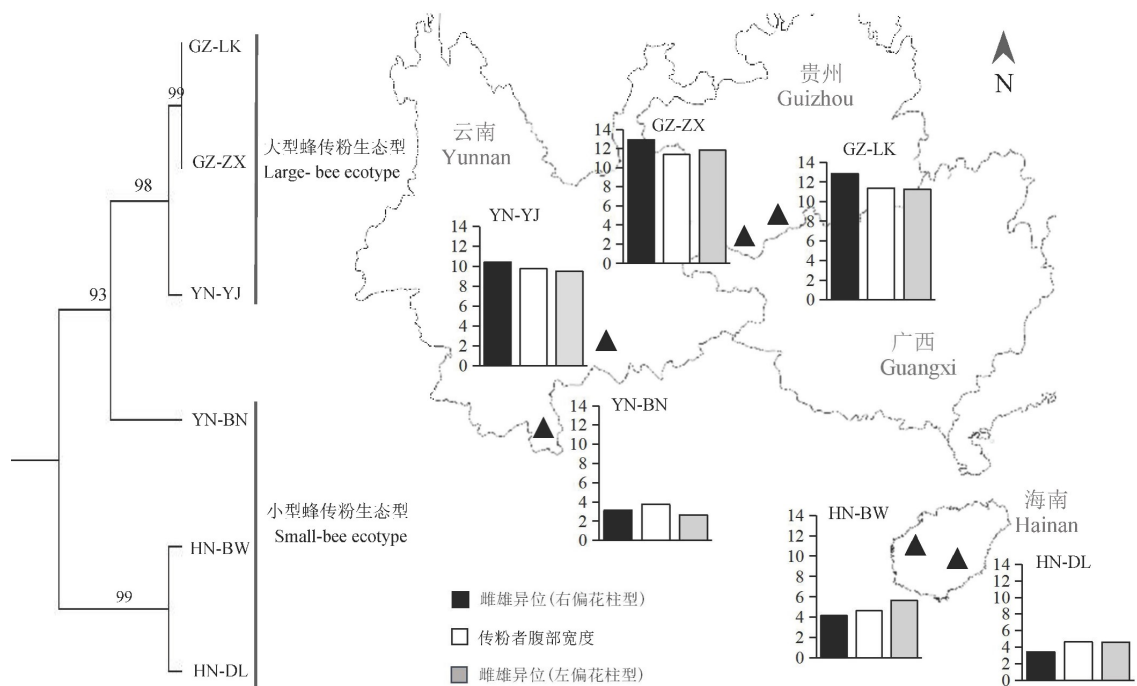


图4 风筝果的传粉生态型。种群遗传关系树使用邻接法(分支上的数字代表支持率), 数据来源于1个核基因片段(ITS 1/4)及2个叶绿体基因片段(*rbcL*和*ycf1b*)。柱状图为雌雄异位程度与传粉昆虫腹部宽度的平均值, 纵坐标单位为mm。
Fig. 4 Pollination ecotypes of *Hiptage benghalensis*. Neighbor-joining phylogenetic tree was drawn based on ITS1/4 and chloroplast (*rbcL* and *ycf1b*) DNA sequences. The histograms on the map refer to the mean values of herkogamy, and the unit of ordinate is millimeter (mm). ■ Herkogamy (right-styled flower); □ Pollinator abdomen width; ▒ Herkogamy (left-styled flower).

与小雌雄异位种群HN-BW和HN-DL有着明显的遗传隔离,而小雌雄异位种群YN-BN种群则位于两者之间(图4)。

3 讨论

3.1 风筝果镜像花的传粉生态型

本文通过野外传粉生态学实验证实风筝果的小雌雄异位种群(海南HN-BW、HN-DL和云南YN-BN种群)传粉者是体型较小的大蜜蜂和西方蜜蜂,大雌雄异位种群(贵州GZ-LK、GZ-ZX和云南YN-YJ种群)的传粉者则为体型较大的木蜂与熊蜂(图3),并通过分子生物学研究证实了两类种群间存在着明显的基因流阻隔(图4)。这两方面的结论一致证实,风筝果的地理种群可能存在着“小蜂传粉生态型”和“大蜂传粉生态型”(图4)。

由于镜像花特殊的传粉机制,雌雄异位是风筝果2个传粉生态型的关键花部性状(图1, 2, 4)。镜像花依赖左偏花柱和右偏花柱两种花型的花柱与可育雄蕊分别接触传粉者身体的左右两侧来实现花型间的异交传粉。因此,柱头与可育花药之间的空间距离(雌雄异位)只有与传粉者体型大小相对应,才有利于花粉的准确传递。对于一个特定的传粉者,雌雄异位程度如果过大,可能导致柱头和/或花药无法触碰到传粉者;而雌雄异位程度如果过小,则花药与柱头在传粉者身体上接触部位过于靠近而易导致自交或雌雄干扰。因此,风筝果分布区北缘(南盘江-红水河流域)的贵州种群与海南岛和西双版纳种群在面临体型(腹部宽度)相差2-3倍的传粉昆虫(图3)的时候,雌雄异位程度受到了适应局域“更有效传粉者”的强烈的歧化选择,这成为导致传粉生态型出现的关键因素(图2, 4)。

传粉生态型在兰科、杜鹃花科、鸢尾科等植物中已有报道,往往也与花部关键性状如花距长、花冠管长的适应性变化息息相关。Robertson和Wyatt (1990)发现,高海拔地区和低海拔地区分布的兰科植物*Platantha ciliaris*具有不同的矩长,吸引不同吻长的蝴蝶为其传粉。南非开普敦地区的兰科植物*Satyrium hallackii*与鸢尾科植物*Gladiolus longicollis*的种群间也出现了不同长度花冠管适应不同吻长蝇类传粉者的传粉生态型(Johnson, 1997; Anderson et al, 2009)。杜鹃花科的*Erica plukenetii*也在适应鸟媒和蛾媒传粉者的过程中出现了3种传粉生态型,

花冠管长度与形态在其中扮演着关键的角色(Vander Niet et al, 2014)。风筝果的情况与此类似,镜像花的雌雄异位作为关键性状在适应不同体型传粉者的过程中分化出传粉生态型,也证实了镜像花这类特化传粉系统对传粉环境变化有着一定的适应灵活性。

虽然镜像花一直被认为是一种非常特化、复杂的传粉机制,但大多数研究也发现镜像花的访花昆虫专一性并不特别强,体型大小与访花行为近似的多种昆虫都可以是其有效的传粉者(Jesson & Barrett, 2003; Gao et al, 2006; Ren et al, 2013)。本文发现的风筝果镜像花出现了适应不同类型传粉者的两种生态型这一现象,进一步证实了镜像花这类特化传粉系统可能具有较多样的传粉者。风筝果大蜂传粉生态型的传粉昆虫包括了体型较大的木蜂和熊蜂,这类传粉昆虫有着体型大、动作粗暴、以花粉和花蜜为回报物的共同特点(吴燕如, 2000)。小蜂传粉生态型的传粉者则是以体型较小的西方蜜蜂与大蜜蜂为主,这类蜜蜂属典型的热带分布昆虫,体型偏小、访花时间较短,对花气味有超强的记忆识别能力(卿卓等, 2014),回报物也是花蜜与花粉(Ren et al, 2013)。

3.2 风筝果传粉生态型的形成与维持

风筝果及其整个属的地理分布范围集中在亚洲的热带区域,特别是南亚、中南半岛、东南亚群岛(Sirirugsa, 1991; Chen & Funston, 2008)。海南岛和云南的西双版纳地区(小蜂传粉生态型)邻近上述地域,气候与环境条件相差不大;而大蜂传粉生态型所处的南盘江-红水河流域属于风筝果地理分布区的北缘,是因为东南季风沿着纵向河谷带来的暖湿气流使得风筝果等热带植物北迁至此。此外,小蜂传粉生态型的主要传粉者大蜜蜂的地理分布范围与风筝果绝大部分地理分布区域几乎完全重叠(Cao & Hu, 2012),显示出两者可能有着长期的协同进化历史(Thomas et al, 2009; Ren et al, 2013)。由此推测,雌雄异位程度较小的小蜂传粉生态型更有可能是风筝果的原始状态。

在我国,大蜜蜂主要分布于海南岛、云南南部、广西与越南交界处(吴燕如, 2000),恰恰没有分布在大蜂传粉生态型所在的滇黔桂交界区的南盘江-红水河流域。当风筝果在东南季风作用下扩散至南盘江-红水河流域一带后,缺乏与之长期协同进化的

小型蜜蜂, 而面临的大多是体型大、访花行为粗鲁的大型昆虫如木蜂与熊蜂。这些大型访花昆虫给风筝果的镜像花造成了至少两方面的影响: (1) 大型昆虫较大的腹部宽度使得柱头与可育花药都接触到昆虫腹部下方, 由于位置靠近, 可能造成自交与雌雄功能干扰; (2) 由于风筝果花瓣反折(图1)、传粉昆虫来访都是降落在长长探出的花柱与可育雄蕊之上(图3), 大型昆虫对花柱造成的压力和物理损伤将远远高于小型蜂。Dulberger (1981) 认为, 镜像花(侧偏花柱)进化的一个主要选择压力就是避免昆虫对花柱的损害。因此, 当访花昆虫转为大体型昆虫的时候, 风筝果镜像花较大的雌雄异位程度将受到选择, 并逐渐形成了适应于大型蜂的传粉生态型。

地理环境可能是风筝果传粉生态型出现和维持的另一个重要原因。风筝果分布北缘南盘江—红水河流域位于生境隔离程度大的滇黔桂交界区石灰岩集中分布地域, 与风筝果分布区中心(中南半岛、东南亚地区)和海南岛种群之间的种子扩散(基因流)有限。这些位于分布区边缘的“先锋种群”(Duffy et al, 2009; Parisod & Joost, 2010)发生的变异性状容易被选择固定, 逐渐积累遗传分化并最终导致生态型的形成(图4)。

3.3 风筝果传粉生态型与物种形成的关系

风筝果大蜂传粉生态型形成的地方(南盘江—红水河流域)既是该物种的分布区北缘, 也是该属6个狭域特有种集中分布的地区(陈书坤, 1977; Chen & Funston, 2008; Ren, 2015)。这些特有种的形成可能与早期的传粉生态型导致的传粉隔离有关。

我们的野外研究发现, 南盘江—红水河流域一带的狭域特有种如多花风筝果(*Hiptage multiflora*)、小花风筝果(*H. minor*)、田阳风筝果(*H. tianyangensis*)的雌雄异位程度和花柱长度差异较明显。这些物种可能利用不同的传粉昆虫进行传粉, 也可能通过长度不同的花柱与可育雄蕊利用同一传粉昆虫体侧的不同部位实现传粉隔离(Ren, 2015)。雌雄异位与花柱长度的不同显然是这些物种传粉隔离与物种分化与维持的一个主要原因, 这与风筝果种内雌雄异位程度的变化导致传粉生态型形成的情况类似。

由于风筝果的地理分布范围极广, 本文的研究区域还不能代表风筝果大部分种群的情况, 不排除在其他区域可能出现另一类传粉生态型的可能。今

后的研究可以对更多的相距较远的地理种群特别是风筝果分布区西界(印度河流域)、东端(台湾岛与菲律宾)、南沿(印度尼西亚)等地进行传粉生物学和分子生物学研究, 进一步全面确认风筝果镜像花的传粉生态型, 解释风筝果属的物种形成机制, 揭示镜像花特化传粉系统的进化。

致谢: 云南大学李庆军教授、高江云教授、中国科学院西双版纳热带植物园黄健博士在野外采样与实验中给予了大力支持; 中国农业大学徐环李教授帮助鉴定访花昆虫。特此致谢。

参考文献

- Anderson B, Alexandersson R, Johnson SD (2009) Evolution and coexistence of pollination ecotypes in an African *Gladiolus* (Iridaceae). *Evolution*, 64, 960–972.
- Barrett SCH, Jesson LK, Baker AM (2000) The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany*, 85, 253–265.
- Cao LF, Hu FL (2012) Biological characters of *Apis dorsata* from China. *Journal of Bee*, 32, 1–2.
- Chen SK (1977) *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, Tomus 43, p.119. Science Press, Beijing. (in Chinese) [陈书坤 (1977) 中国植物志, 43卷, 119页. 科学出版社, 北京.]
- Chen S, Funston AM (2008) Malpighiaceae. In: *Flora of China* (eds Wu ZY, Raven PH, Hong DY), pp. 132–138. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Davis CC, Anderson WR (2010) A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *American Journal of Botany*, 97, 2031–2048.
- Doley JJ, Doley JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Dong WP, Chao X, Li CH, Sun JH, Zuo YJ, Shi S, Cheng T, Guo JJ, Zhou SL (2015) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, 5, 8348.
- Duffy KJ, Scopece G, Cozzolino S, Fay MF, Smith RJ, Stout JC (2009) Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. *Annals of Botany*, 104, 507–516.
- Dulberger R (1981) The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany*, 68, 1350–1360.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Fortuna MA, García C, Guimarães PR Jr, Bascompte J (2008) Spatial mating networks in insect-pollinated plants. *Ecology Letters*, 11, 490–498.
- Gao JY, Ren PY, Yang ZH, Li QJ (2006) The pollination ecol-

- ogy of *Paraboea rufescens* (Gesneriaceae), a buzz-pollinated tropical herb with mirror-image flowers. *Annals of Botany*, 97, 371–376.
- Grant V, Grant KA (1965) Flower Pollination in the Phlox Family. Columbia University Press, New York.
- Huang SQ, Shi XQ (2013) Floral isolation in *Pedicularis*: how do congeners with shared pollinators minimize reproductive interference? *New Phytologist*, 199, 858–865.
- Jesson LK, Barrett SCH (2002) Solving the puzzle of mirror-image flowers. *Nature*, 417, 707.
- Jesson LK, Barrett SCH (2003) The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Plant Sciences*, 164, 237–249.
- Johnson SD (1997) Pollination ecotypes of *Satyrium hallackii* (Orchidaceae) in South Africa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 123, 225–235.
- Johnson SD, Steiner KE (1997) Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* Complex (Orchidaceae). *Evolution*, 51, 45–53.
- Johnson SD, Steiner KE (2000) Generalization vs. specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 140–143.
- Johnson SD, Steiner KE (2003) Specialized pollination systems in southern Africa. *South African Journal of Science*, 99, 345–348.
- Lin Y, Tan DY (2007) Enantiostyly in angiosperms and its evolutionary significance. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 45, 901–916. (in Chinese with English abstract) [林玉, 谭敦炎 (2007) 被子植物镜像花柱及其进化意义. *植物分类学报*, 45, 901–916.]
- Parisod C, Joost S (2010) Divergent selection in trailing-versus leading-edge populations of *Biscutella laevigata*. *Annals of Botany*, 105, 655–660.
- Qian ZN, Ren MX (2016) Floral evolution and pollination shifts of the “Malpighiaceae route” taxa, a classical model for biogeographical study. *Biodiversity Science*, 24, 95–101. (in Chinese with English abstract) [钱贞娜, 任明迅 (2016) “金虎尾路线”植物的花进化与传粉转变. *生物多样性*, 24, 95–101.]
- Qing Z, Su R, Dong K, Shao Y (2014) Research progress on nectar compositions and their ecological functions. *Chinese Journal of Ecology*, 33, 825–836. (in Chinese with English abstract) [卿卓, 苏睿, 董坤, 绍禹 (2014) 花蜜化学成分及其生态功能研究进展. *生态学杂志*, 33, 825–836.]
- Ren MX (2015) The upper reaches of the largest river in Southern China as an ‘evolutionary front’ of tropical plants: evidences from Asia-endemic genus *Hiptage* (Malpighiaceae). *Collectanea Botanica*, 34, e003.
- Ren MX, Zhang DY (2004) Herkogamy. In: *Plant Life-History Evolution and Reproductive Ecology* (ed. Zhang DY), pp. 303–320. Science Press, Beijing. (in Chinese) [任明迅, 张大勇 (2004) 雌雄异位. 见: *植物生活史进化与繁殖生态学* (张大勇主编), 303–320页. 科学出版社, 北京.]
- Ren MX, Zhong YF, Song XQ (2013) Mirror-image flowers without buzz pollination in the Asia-endemic *Hiptage benghalensis* (Malpighiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173, 764–774.
- Robertson JL, Wyatt R (1990) Evidence for pollination ecotypes in the yellow fringed orchid, *Platanthera ciliaris*. *Evolution*, 44, 121–133.
- Siriruga P (1991) Malpighiaceae. In: *Flora of Thailand* (eds Smitinand T, Larsen K), pp. 272–299. The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok.
- Stebbins GL (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1, 307–326.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1–5.
- Tang LL, Huang SQ (2007) Evidence for reductions in floral attractants with increased selfing rates in two heterandrous species. *New Phytologist*, 175, 588–595.
- Thomas SG, Rehel SM, Varghese A, Davidar P, Potts SG (2009) Social bees and food plant associations in the Nilgiri Biosphere Reserve, India. *Tropical Ecology*, 50, 79–88.
- Todd JE (1882) On the flowers of *Solanum rostratum* and *Cassia chamaecrista*. *The American Naturalist*, 16, 281–287.
- Van der Niet T, Pirie MD, Shuttleworth A, Johnson SD, Midgley JJ (2014) Do pollinator distributions underlie the evolution of pollination ecotypes in the Cape shrub *Erica plukenetii*? *Annals of Botany*, 113, 301–315.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R (2011) Sequence Matrix, concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27, 171–180.
- Vitelli JS, Madigan BA, Van Haaren PE, Setter S, Logan P (2009) Control of the invasive liana, *Hiptage benghalensis*. *Weed Biology and Management*, 9, 54–62.
- Webb CJ, Lloyd DG (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24, 163–178.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315–322. Academic Press, New York.
- Whittall JB, Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447, 706–709.
- Wu YR (2000) *Fauna Sinica. Insecta, Vol. 20. Hymenoptera: Melittidae, Apidae*, pp. 21–30, 123–130. Science Press, Beijing. (in Chinese) [吴燕如 (2000) 中国动物志: 昆虫纲, (第二十卷): 膜翅目, 准蜂科, 蜜蜂科, 21–30, 123–130页. 科学出版社, 北京.]

(责任编辑: 黄双全 责任编辑: 时意专)