•研究报告•

青篱柴通过促进亲和花粉生长而提高传粉精确性

胡德美^{1,2,3}, 姚仁秀^{1,2,3}, 陈燕^{1,2,3}, 游贤松³, 王顺雨³, 汤晓辛^{1,3}, 王晓月^{ID 1,3*}

1. 贵州师范大学西南喀斯特山地生物多样性保护国家林业和草原局重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州师范大学贵州省植物生理与发育调控重点实验室, 贵阳 550025; 3. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550025

摘要: 异型花柱植物的适应意义在于提高亲和花粉的传递, 从而促进异交, 但是有不少研究发现柱头上落置了大量不亲和花粉。目前, 很少有人研究柱头是否有利于亲和花粉的萌发和花粉管伸长, 以及通过去雄处理排除花内和植株内不亲和花粉干扰从而验证二型花柱植物是否可以促进异交。本研究以亚麻科青篱柴属(*Tirpitzia*)的二型花柱植物青篱柴(*T. sinensis*)为研究对象, 分居群调查了青篱柴长、短柱型的植株数量, 测量不同柱型的花粉与柱头大小以及观察其表面纹饰, 测定不同开花时间长、短柱型的柱头活性与花粉活力, 统计自然状态下柱头上落置的不同表型花粉比例, 进一步统计花内、株内去雄和自然对照下柱头上落置的不同表型花粉比例, 计算型间、型内和混合授粉花粉管长度和花粉萌发率, 人工授粉检测其是否型内异交不亲和与自交不亲和。结果表明, 自然居群中长、短柱型青篱柴植株数量没有显著性差异; 短柱型青篱柴花粉体积显著大于长柱型, 且二者花粉表面纹饰不同, 但不同柱型的柱头表面积与表面纹饰无差异; 青篱柴开花第一天的花粉活力显著高于开花第二天, 而柱头活性在开花前两天无显著性差异; 自然状态下柱头上落置的不亲和花粉比例显著高于亲和花粉; 在长柱型青篱柴中, 花内和株内去雄显著提高了柱头上亲和花粉的落置比例; 柱头上授型内花粉, 其花粉萌发率和花粉管的长度都显著低于授型间花粉; 授粉结果表明青篱柴为型内异交不亲和与自交不亲和。二型花柱植物通过促进亲和花粉的萌发和花粉管的伸长而有利于型间授粉, 从而显著提高其传粉精确性。

关键词: 异型花柱植物; 青篱柴; 传粉精确性; 萌发率; 花粉管长度

胡德美, 姚仁秀, 陈燕, 游贤松, 王顺雨, 汤晓辛, 王晓月 (2021) 青篱柴通过促进亲和花粉生长而提高传粉精确性. 生物多样性, 29, 887–896. doi: 10.17520/biods.2020444.

Hu DM, Yao RX, Chen Y, You XS, Wang SY, Tang XX, Wang XY (2021) *Tirpitzia sinensis* improves pollination accuracy by promoting the compatible pollen growth. Biodiversity Science, 29, 887–896. doi: 10.17520/biods.2020444.

Tirpitzia sinensis improves pollination accuracy by promoting the compatible pollen growth

Demei Hu^{1,2,3}, Renxiu Yao^{1,2,3}, Yan Chen^{1,2,3}, Xiansong You³, Shunyu Wang³, Xiaoxin Tang^{1,3}, Xiaoyue Wang^{ID 1,3*}

1 Key Laboratory of Southwest Karst Mountain Biodiversity Conservation of National Forestry and Grassland Administration, Guizhou Normal University, Guiyang 550025

2 Key Laboratory of Plant Physiology and Development of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang 550025

3 College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025

ABSTRACT

Aims: The adaptive significance of heterostyly is to improve the transfer of compatible pollen, so as to promote outcrossing. Nevertheless, many studies have found that a large number of incompatible pollens are deposited on the stigmas. At present, few studies have focused on whether the stigmas promote the compatible pollen germination and pollen tube elongation and provide evidences for the pollination accuracy hypothesis by emasculating intraflower and intraplant pollen.

Methods: *Tirpitzia sinensis* (Linaceae) was taken as materials, and the number of long-styled morph (L-morph) and short-styled morph (S-morph) of *T. sinensis* were investigated in the separate populations. The pollens and stigmas size of different morphs were measured and their surface ornamentations were observed. The viability of stigma and pollen

收稿日期: 2020-11-29; 接受日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金(31901208)、国家自然科学基金委员会贵州省人民政府喀斯特科学研究中心项目(U1812401)、贵州省科学技术基金(2019/1237)和贵州师范大学博士科研启动项目(2017/22)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wang.xiaoyue1989@163.com

of different flowering phases were measured. The percentage of different phenotypic pollens on the stigma were calculated. The percentage of compatible and incompatible pollens on the stigma were further calculated under intraflower, intraplant emasculation and natural control treatments. The pollen tube length and pollen germination rate of inter-morph, intra-morph and mixture pollination were measured. The heteromorphic self-incompatibility system was detected by artificial pollination treatments.

Results: There was no significant difference in the number of L-morph and S-morph of *T. sinensis* in the natural populations. The pollen volume of S-morph was significantly larger than that of L-morph, and the pollen surface ornamentations of the two morphs were different, but there were no significant difference in the stigma surface areas and surface ornamentations of the two morphs. The pollen viability of the first flowering day was significantly higher than that of the second day, while the stigma viability had no significant difference in the first and second day of flowering. The percentage of incompatible pollen on stigma was significantly higher than that of compatible pollen in natural state. The intraflower and intraplant emasculation treatments significantly increased the percentage of compatible pollen deposition compared with the natural control in the L-morph of *T. sinensis*. Compared with inter-morph pollination treatment, the intra-morph pollination treatment could significantly reduce pollen germination rate and pollen tube length. Pollination treatments showed that *T. sinensis* was self- and intramorphic pollination incompatible.

Conclusions: These results indicate that the distyly improves pollination accuracy by promoting the compatible pollen germination and pollen tube elongation.

Key words: heterostylous plants; *Tirpitzia sinensis*; pollination accuracy; germination rate; pollen tube length

异型花柱是同种被子植物中的两性花, 雄蕊和柱头的位置在不同个体上出现交互的雌雄异位。达尔文曾在《同种植物的不同花型》一书中对异型花柱的特征及其可能的适应意义进行了广泛研究, 并对报春花属(*Primula*)等异型花柱植物进行大量人工授粉, 发现表型间授粉的可育性往往显著高于同型内的授粉, 提出异型花柱的适应意义在于促进表型间授粉(Darwin, 1892)。后来科学家们又做了大量的人工授粉实验, 表明异型花柱往往伴随着自交不亲和, 即同型内或同型不同个体间的授粉不育, 最直接的遗传标记证据也表明异型花柱互补的雌雄异位结构促进非选型交配(disassortative mating), 进而提出异型花柱的适应意义在于通过提高传粉的精确性, 从而促进异交(Charlesworth & Charlesworth, 1979; Ganders, 1979; Barrett, 1992, 2019; Zhou et al, 2015)。

二型花柱(distyly)是一类两性花植物中有两种不同花型的个体, 长花柱类型柱头的位置高、花药的位置低; 而短花柱类型柱头的位置低、花药的位置高; 两种花型的雌雄蕊位置呈现为交互的雌雄异位。此外, 其雄蕊结构(花粉粒大小、外壁纹饰, 花药大小)等也存在差异, 雌性结构(柱头的裂片长度、突起的高度等)也表现为多样性, 这些被称为附属多态性(ancillary polymorphism) (Gander, 1979; Dulberger, 1992; Ree, 1997; Naiki & Nagamasu, 2003; Massinga et al, 2005)。通常情况下长花柱型的花粉

粒体积要比短花柱型的花粉粒体积更小(Dulberger, 1992), 例如荞麦属甜荞(*Fagopyrum esculentum*) (Wu et al, 2017)。根据花粉粒体积可以确定柱头上落置的每一粒花粉是哪一种表型(Darwin, 1892; Ganders, 1976; Costa et al, 2017)。长柱型柱头可授表面积通常大于短柱型(Ornduff, 1970)。

二型花柱植物提高传粉精确性的假说一直以来受到进化生物学家们的广泛关注, 并从宏观生态学的角度开展了大量实验(Wolfe et al, 2009; Keller et al, 2014; Wu et al, 2018; Barrett, 2019)。Wolfe等(2009)对南美草地多年生二型花柱植物*Sebaea grandis* (龙胆科小黄管属*Sebaea* Gentianaceae)的研究发现柱头上大约80%的花粉是型间花粉, 型内授粉不结实, 型间授粉的结籽率大约是70%; 并且显微观察发现型内授粉花粉不能生长出柱头表面, 或者在花柱道中终止生长, 而型间授粉花粉能在柱头上萌发, 通过花柱道进入子房。但是有一些研究, 尤其是对报春花属的探究, 发现异型花柱植物的柱头上落置了大量型内的花粉(Ornduff, 1970, Nishihira et al, 2000, Liu et al, 2016)。不过, 对报春花属植物的研究大多混淆了自动自花授粉以及同株异花授粉的情况, Wu等(2018)对荞麦属(*Fagopyrum*)花柱同型的苦荞麦(*F. tataricum*)和花柱二型的甜荞个体的一朵花去雄(排除花内花粉的干扰)和整个植株进行去雄(排除花内和植株内花粉的干扰)处理, 发现甜荞柱头上型内花粉数量显著下

降, 而型间花粉数量显著增加, 证明二型花柱植物可以明显提高传粉精确性。目前, 很少有研究结合型内、型间、混合授粉(型内和型间花粉混合)处理比较柱头上不同表型花粉的萌发率和花粉管的长度, 不同去雄处理检验柱头上亲和花粉的比例是否会提高(上述两者属于微观方面), 以及人工授粉检验植物是否自交亲和(宏观方面)验证二型花柱植物是否促进型间的授粉。

为了同时从微观和宏观角度探究二型花柱植物是否促进型间授粉, 我们以亚麻科青篱柴属的二型花柱植物青篱柴(*Tirpitzia sinensis*)为研究对象, 探讨以下问题: (1)长、短柱型青篱柴植株在自然居群中分布的数量是否有显著性差异; (2)长、短柱型青篱柴的花粉体积、表面纹饰、花粉活力以及柱头活性是否存在差异; (3)自然状态下, 长、短柱型青篱柴柱头上落置的花粉种类和比例是否有差异; (4)比较花内去雄、株内去雄和自然对照下, 长、短柱型青篱柴柱头上落置的亲和花粉和不亲和花粉比例是否存在显著性差异; (5)比较型间授粉、型内授粉和混合授粉, 长、短柱型青篱柴的花粉萌发率和花粉管长度是否有差异; (6)探究青篱柴是否型内异交不亲和与自交不亲和。

1 材料与方法

1.1 研究材料与地点

青篱柴是亚麻科青篱柴属二型花柱植物(附录1A), 一般为灌木或小乔木, 聚伞形花序、白色花瓣; 雄蕊数5、花丝基部合生成筒状, 子房4室、每室胚珠2枚, 花柱4枚; 蒴果长椭圆形或卵形、种子具膜质翅; 花期5–8月、果期8–12月或至翌年3月; 生于海拔340–2,000 m的路旁、山坡等; 主要分布于贵州和云南等地(Liu, 2008)。

研究于2019年6月底至2020年8月中旬进行, 实验地点位于云南省麻栗坡老山省级自然保护区(104°49' E, 23°9' N, 海拔1,714 m)。

1.2 实验方法

1.2.1 群落样本量的调查

为了比较自然状态下长、短柱型青篱柴植株数量的比例, 在老山自然保护区青篱柴分布的区域, 选择5个不同的居群统计长、短柱青篱柴的植株数量, 测定每个居群的海拔和经纬度。

1.2.2 花粉与柱头大小测量及表面纹饰观察

随机选择不同柱型的青篱柴植株各30株, 每个植株上选择1个即将开放的花苞用纱袋套起来以隔绝访花者的干扰。待花苞完全开放时, 将柱头和花药取下分别置于装有75%酒精的0.5 mL离心管中(每个柱型样本各30个)。在实验室将花药用镊子轻轻捣碎, 取2 μ L花粉悬浊液置于载玻片上, 先在荧光显微镜下观察长、短柱型青篱柴的花粉表面纹饰结构, 待完全能区分两种柱型的花粉后, 两种花粉各取2 μ L悬浊液于载玻片上, 在荧光显微镜下找到两种柱型花粉的视野, 用荧光显微镜自带的相机进行花粉图片采集。取花粉悬浊液2 μ L置于载玻片上, 在荧光显微镜下选择一粒视野清晰的花粉进行拍照。在图像分析软件Digimizer Version 4.6.0中测量花粉直径(d), 将花粉的形状近似看成球形, 用球体体积计算公式($V = 4\pi(d/2)^3/3$)计算花粉体积。在实验室随机选择1枚柱头在荧光显微镜下进行表面纹饰拍照和柱头图像采集, 然后在图像分析软件Digimizer Version 4.6.0中测量柱头长和宽。为了更直观表示柱头的大小, 将柱头表面形状近似看成椭圆形, 用椭圆面积计算公式 $S = \pi ab$ (S 表示柱头面积, a 表示1/2柱头长, b 表示1/2柱头宽)计算柱头表面积。

1.2.3 长、短柱型花粉的活力、柱头活性测定

野外观察发现, 青篱柴单花寿命为1天, 在开花第2天基本凋谢。为了比较长、短柱青篱柴在盛开第1天和第2天其花粉活力和柱头活性是否存在差异, 随机选择长、短柱型的植株各30株, 每株上选择同花期的花苞进行套袋。花苞完全开放的第1天, 每朵花取下2个柱头和2个花药, 将柱头置于滴有1滴 H_2O_2 溶液(有效含量为3.0%–3.6%)的载玻片上, 1 min后观察柱头上产生的气泡个数。1–3个气泡表示柱头活性低, 4–6个气泡表示柱头活性较低, 7–9个气泡表示柱头活性强, 10–12个气泡表示柱头活性极强(Dafni, 1992)。将MTT溶液(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)滴在干净载玻片上, 放入花粉, 染色15 min后在显微镜下观察。有活力的花粉被染成深紫色(Rodriguez-Riano & Dafni, 2000)。记录花粉的染色情况。

蔗糖溶液测定花粉活力的方法为: 先配置5%、10%、15%、20%、25%、30%的蔗糖溶液, 每个浓度测定每种柱型的花各10朵。室温下萌发3 h后在显

显微镜下观察花粉萌发情况, 萌发率最高的蔗糖溶液浓度为最适花粉萌发的糖浓度。预实验发现25%是最适的花粉萌发糖浓度。将花粉置于25%蔗糖水中, 室温下萌发3 h, 在显微镜下统计萌发花粉数和处理花粉总数, 计算花粉萌发率。

开花第二天的柱头活性测定和花粉活力测定方法同第一天。

1.2.4 自然状态下柱头上落置的不同类型花粉比

在晴朗的天气随机选择长、短柱型青篱柴各50株, 每个植株上随机选择1朵花, 并采集其柱头置于装有75%酒精的0.5 mL离心管中。在实验室用镊子将柱头轻轻捣碎呈均匀的悬浊液, 用移液枪吸取悬浊液, 在显微镜(Nikon E100)下统计花粉的数量(其中异型花粉为亲和花粉, 同型花粉为不亲和花粉)。每吸取完花粉悬浊液后, 取适量蒸馏水清洗离心管3次, 保证离心管中的花粉完全统计。

1.2.5 花内、株内去雄和自然柱头上花粉比例

选择3个分离的居群, 每个居群长、短柱型分别随机选择30个植株, 分别进行以下处理: (1)居群一, 花苞刚开放时, 将1个植株上1朵花未开裂的花药去除, 估计同株异花和株间花粉落置的程度(排除花内花粉的干扰)。(2)居群二, 一株上所有花都去雄, 估计植株间的传粉(排除花内和株内花粉的干扰)。(3)居群三, 自然授粉为对照组。所有的处理均用不同颜色的尼龙线捆绑作为标记, 并在24 h后收集去雄以后的柱头。长、短柱型的3种处理样本分别来自不同个体的30个柱头。柱头收集后保存在装有75%酒精的0.5 mL离心管中, 在实验室中分别统计柱头上长、短柱花粉落置的数量。

1.2.6 型间、型内和混合授粉花粉管的生长情况

为了比较型内、型间和混合授粉(模拟自然状态柱头上花粉落置情况)是否会影响花粉管的生长, 长、短柱型青篱柴植株分别随机选择30个, 每个个体随机标记3个花苞(以不同颜色的尼龙线加以区分), 进行去雄套袋处理, 直至柱头成熟。然后进行型内、型间和混合授粉处理。从距离受体植株至少30 m以外的其他植株上选择新鲜开裂的花药, 分别收集长、短柱型花粉作为花粉源。选择晴朗的天气用镊子进行授粉, 将每个雌期的柱头涂满花粉, 然后重新套袋。长柱型为母本时, 每个植株上进行3种处理: (1)型内授粉(授以长柱型花粉); (2)型间授粉(授以短柱型花粉); (3)混合授粉(长、短柱型花粉

混合)。短柱型为母本时, 每个植株上进行以下3种处理: (1)型内授粉(授以短柱型花粉); (2)型间授粉(授以长柱型花粉); (3)混合授粉(长、短柱型花粉混合)。6 h后收集雌蕊, 储存在装有FAA固定液(福尔马林、冰醋酸和酒精的体积比为: 5:5:90)的2 mL离心管中。在实验室中, 雌蕊先在蒸馏水中清洗3次, 于室温在8 mol/L的NaOH溶液中软化4 h。然后再置于蒸馏水中漂洗3次, 再在苯胺蓝溶液(0.1%质量浓度)中染色3 h。用荧光显微镜观察柱头, 统计柱头上花粉的总数量以及萌发的花粉数量, 计算花粉萌发率。花粉管先用荧光显微镜自带的软件拍照, 然后再用图像分析软件Digimizer Version 4.6.0测量花粉管的长度(Wang et al, 2018)。

1.2.7 授粉处理

为了检测青篱柴是否型内异交不亲和与自交不亲和, 分别对长、短柱型青篱柴进行型间异交授粉、型内异交授粉、自交授粉和自然对照处理。长、短柱型青篱柴分别随机选择30个植株, 每个植株随机标记4个花苞并套袋, 等到花朵完全开放时, 进行以下授粉处理: (1)型间异交授粉: 在距离实验区域30 m外的居群分别收集长、短柱青篱柴的花粉, 置于离心管中混合作为花粉源, 以长柱型花粉为父本, 授于短柱型花朵柱头上; 以短柱型花粉为父本, 授于长柱型花朵柱头上, 然后套袋; (2)型内异交授粉: 在距离实验区域30 m外的地方分别收集长、短柱型的花粉, 置于离心管中混合作为花粉源, 以长柱型花粉作为父本, 授于长柱型花朵的柱头上; 以短柱型花粉作为父本, 授于短柱型花朵的柱头上, 然后套袋; (3)自交: 将同一朵花的花粉授到其柱头上, 然后套袋; (4)自然对照: 长、短柱型青篱柴分别随机选择30个植株, 每个植株随机选择2个花苞绑线标记, 不套袋。2个月后, 收集4种授粉处理的青篱柴果实, 统计果实中饱满和败育种子数。单个果实的结籽率计算方法为饱满种子数除以饱满种子数与败育种子数之和。

1.3 数据分析

拟合优度(G-test of goodness-of-fit)用来检验自然居群中长、短柱型青篱柴的植株数量是否偏离1:1。利用广义线性模型(generalized linear model, GLM)中正态分布模型恒定函数比较长、短柱型花粉体积和柱头面积是否有显著性差异, 花粉体积、柱头表面积分别作为因变量, 不同柱型作为自变

量。采用二项式分布Logistic关联函数分析自然状态下柱头上落置的不同柱型花粉比例、不同去雄处理柱头上落置的亲和花粉与不亲和花粉比例、不同授粉处理花粉萌发率和结籽率, 其中不同柱型的花粉数量、亲和花粉数量与不亲和花粉数量、萌发的花粉数、饱满的种子数量作为因变量, 花粉总数、种子总数作为一次实验中总的变量, 不同柱型、不同去雄处理、不同授粉处理作为自变量。

所有数据分析在SPSS 20.0 (IBM Inc., New York, NY)软件中进行。

2 结果

2.1 群落样本量的调查

对5个自然居群中长、短柱型青篱柴的植株数量调查, G-test分析发现, 长、短柱型的植株数量没有偏离1:1 (表1)。

2.2 花粉与柱头大小及表面纹饰观察

广义线性模型分析结果表明, 短柱型青篱柴的花粉体积($173,619.61 \pm 6,991.70 \mu\text{m}^3$)极显著大于长柱型($51,155.61 \pm 1,721.89 \mu\text{m}^3$) (Wald $\chi^2 = 289.254$, $df = 1$, $P < 0.001$)。同时, 长、短柱型青篱柴花粉表面纹饰也不同, 短柱型青篱柴花粉表面纹饰的凸起比长柱型青篱柴明显(附录1B); 短柱型青篱柴的柱头面积($219,032.92 \pm 9,017.28 \mu\text{m}^2$)与长柱型($204,598.19 \pm 10,602.26 \mu\text{m}^2$)间无显著性差异(Wald $\chi^2 = 1.076$, $df = 1$, $P = 0.300$), 且柱头表面纹饰无明显不同(见附录1C, D)。

2.3 长、短柱型青篱柴花粉活力、柱头活性测定

在25%的蔗糖溶液中, 长、短柱型青篱柴的花粉萌发率相对较高, 因此将25%蔗糖溶液作为测定青篱柴花粉萌发率的统一糖浓度。广义线性模型分析结果表明, 整体上, 25%蔗糖溶液和MTT溶液处理长、短柱型青篱柴的花粉活力变化趋势一样。25%

蔗糖溶液处理, 第一天短柱型的花粉活力显著高于长柱型(Wald $\chi^2 = 37.699$, $df = 1$, $P < 0.001$), 第二天长、短柱型的花粉活力没有显著差异(Wald $\chi^2 = 1.157$, $df = 1$, $P = 0.282$); 5% MTT溶液处理, 第一天短柱型的花粉活力极显著高于长柱型(Wald $\chi^2 = 120.974$, $df = 1$, $P < 0.001$), 第二天长、短柱型青篱柴的花粉活力没有显著差异(Wald $\chi^2 = 0.012$, $df = 1$, $P = 0.913$)。

柱头活性的分析结果表明, 开花第一天短柱型气泡数为 7.21 ± 1.10 、长柱型气泡数为 8.09 ± 0.86 , 开花第二天短柱型气泡数为 7.08 ± 0.68 、长柱型气泡数为 7.04 ± 1.16 , 即开花第一天和第二天青篱柴的柱头活性都较强。

2.4 自然状态下柱头上落置的不同类型的花粉比例

无论是长柱型青篱柴还是短柱型青篱柴, 它们柱头上落置的不亲和花粉比例均显著高于亲和花粉比例(图1A)。具体地, 在短柱型青篱柴柱头上, 落置的短柱型花粉(不亲和花粉)比例($64.29 \pm 3.32\%$)显著高于长柱型花粉(亲和花粉) ($30.08 \pm 2.87\%$) (Wald $\chi^2 = 82.635$, $df = 1$, $P < 0.001$); 在长柱型青篱柴柱头上, 落置的长柱型花粉比例(不亲和花粉) ($82.07 \pm 2.29\%$)显著高于短柱型花粉(亲和花粉)比例($15.33 \pm 1.72\%$) (Wald $\chi^2 = 1,082.495$, $df = 1$, $P < 0.001$)。

2.5 花内、株内去雄和自然对照柱头上的总花粉数量与亲和花粉比例

整体上, 花内去雄和株内去雄与自然对照相比, 柱头上落置总的花粉数量呈下降趋势。具体表现为在长柱型青篱柴中, 自然对照柱头上落置的总花粉数量(95.31 ± 12.47)极显著高于(Wald $\chi^2 = 34.883$, $df = 2$, $P < 0.001$)花内去雄处理(26.21 ± 4.25)和株内去雄处理(48.16 ± 7.52), 株内去雄处理柱头上落置的总花粉数量显著高于(Wald $\chi^2 = 7.751$, $df = 1$, $P =$

表1 G检验比较不同居群青篱柴长、短柱型植株数量

Table 1 The comparison of the number of L-morph and S-morph of *Tirpitzia sinensis* in five populations by G-test of goodness-of-fit

居群 Population	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	短柱型 (株) S-morph (ind.)	长柱型 (株) L-morph (ind.)	G-test	P
1	1,714 ± 3.0	104°49'	23°94'	55	43	1.237	0.266
2	1,315 ± 3.0	104°84'	23°17'	52	44	0.511	0.475
3	1,130 ± 3.0	104°85'	23°17'	46	41	0.184	0.668
4	1,286 ± 3.0	104°84'	23°17'	55	50	0.152	0.696
5	1,413 ± 3.0	104°80'	23°17'	48	50	0.010	0.92

图1 青篱柴自然状态下与不同去雄处理花粉比例。(A)自然状态下青篱柴长、短柱型柱头上落置的不同类型花粉的比例的比较; (B)不同去雄处理青篱柴长、短柱型柱头上亲和花粉比例。不同字母表示不同的处理间有显著性差异。

Fig. 1 The ratio of pollens in natural state and different emasculate treatments (A) Comparison of the proportion of different morphs of pollens deposited on the stigma of *Tirpitzia sinensis* in the natural state; (B) The ratio of compatible pollens on the stigma of *Tirpitzia sinensis* treated by different emasculate treatments. Different letters indicate significant difference among treatments.

0.005)花内去雄处理;在短柱型青篱柴中,自然对照(7.92 ± 2.11)柱头上落置的总花粉数量与花内去雄处理(7.04 ± 3.13)没有显著性差异(Wald $\chi^2 = 0.106$, $df = 1$, $P = 0.745$),且花内去雄处理柱头上落置的总花粉数量与株内去雄处理(3.63 ± 0.72)没有显著性差异(Wald $\chi^2 = 2.830$, $df = 1$, $P = 0.092$),但是自然对照柱头上落置的总花粉数量显著高于株内去雄处理(Wald $\chi^2 = 6.393$, $df = 1$, $P < 0.05$)。

整体上,花内去雄、株内去雄处理与自然对照相比,柱头上亲和花粉落置的比例显著提高。花内去雄处理中,柱头上亲和花粉落置的比例($29.66 \pm 5.14\%$)极显著高于(Wald $\chi^2 = 40.119$, $df = 1$, $P < 0.001$)自然对照($1.56 \pm 0.55\%$);株内去雄处理中,柱头上亲和花粉落置的比例($35.75 \pm 6.36\%$)显著高于(Wald $\chi^2 = 9.877$, $df = 1$, $P = 0.002$)自然对照($1.56 \pm 0.55\%$)。

单独分析发现,在短柱型青篱柴中,自然对照柱头上亲和花粉比例($52.31 \pm 6.48\%$)与花内去雄处理($51.36 \pm 9.43\%$)、株内去雄($65.64 \pm 8.83\%$)处理间无显著性差异(Wald $\chi^2 = 0.973$, $df = 2$, $P = 0.615$);在长柱型青篱柴中,花内去雄亲和花粉比例($12.46 \pm 2.65\%$)极显著高于株内去雄处理($6.97 \pm 2.10\%$)和自然对照($1.56 \pm 0.55\%$) (Wald $\chi^2 = 32.121$, $df = 2$, $P < 0.001$) (图1B)。对短柱型而言,株内去雄处理亲和花粉的比例($65.64 \pm 8.83\%$)显著高于(Wald $\chi^2 = 4.358$, $df = 1$, $P = 0.037$)不亲和花粉比例($34.36 \pm 8.83\%$)。

2.6 型间、型内和混合授粉花粉管的生长情况和花粉萌发率

广义线性分析结果表明,相较于型间授粉处理,型内授粉处理能显著地降低花粉萌发率和花粉管的长度。就花粉管长度而言,在短柱型青篱柴中,型间授粉处理花粉管长度(268.03 ± 2.82 , 单位: μm ,下同)极显著长于(Wald $\chi^2 = 21.118$, $df = 1$, $P < 0.001$)型内授粉处理(141.85 ± 2.95),混合授粉处理型间花粉的花粉管长度(183.36 ± 11.18)极显著长于(Wald $\chi^2 = 27.526$, $df = 1$, $P < 0.001$)型内花粉(76.48 ± 7.42)。在长柱型青篱柴中,同样也是型间授粉处理的花粉管长度(312.05 ± 18.67)极显著长于(Wald $\chi^2 = 112.257$, $df = 1$, $P < 0.001$)型内授粉处理(105.10 ± 6.91),混合授粉处理型间花粉的花粉管长度(188.11 ± 11.71)极显著长于(Wald $\chi^2 = 15.871$, $df = 1$, $P < 0.001$)型内花粉(88.36 ± 5.38) (图2A)。

对于不同授粉处理长、短柱型青篱柴的花粉萌发率而言,在短柱型青篱柴中,型间授粉花粉的萌发率($85.34 \pm 2.97\%$)极显著高于(Wald $\chi^2 = 657.313$, $df = 1$, $P < 0.001$)型内授粉花粉($1.62 \pm 0.49\%$),混合型间授粉的花粉萌发率($96.91 \pm 1.55\%$)极显著高于(Wald $\chi^2 = 75.015$, $df = 1$, $P < 0.001$)混合型内授粉($56.01 \pm 5.39\%$)。在长柱型青篱柴中,型间授粉处理($84.63 \pm 4.23\%$)与型内授粉处理($69.94 \pm 4.39\%$)的花粉萌发率无显著性差异(Wald $\chi^2 = 3.649$, $df = 1$, $P = 0.056$),混合型间授粉的花粉萌发率($91.05 \pm 2.67\%$)极显著高于(Wald $\chi^2 = 41.007$, $df = 1$, $P < 0.001$)。

图2 不同授粉处理青篱柴花粉管长度(A)和花粉萌发率(B)的比较。不同字母表示不同的授粉处理间有显著性差异。

Fig. 2 Comparison of pollen tube length (A) and pollen germination rate (B) of *Tirpitzia sinensis* with different pollination treatments. Different letters indicate significant difference among treatments.

0.001)混合型内授粉($46.97 \pm 5.55\%$) (图2B)。

2.7 授粉处理

广义线性分析结果表明, 青篱柴的繁育系统为型内异交与自交不亲和系统。在短柱型青篱柴中, 型间授粉处理结籽率($86.84 \pm 3.38\%$)极显著高于自然授粉处理($49.00 \pm 7.74\%$)、型内处理($0.00 \pm 0.00\%$)、自交处理($0.00 \pm 0.00\%$) (所有的 $P < 0.001$); 在长柱型青篱柴中, 自然授粉处理结籽率($51.62 \pm 4.77\%$)与型间授粉处理($67.65 \pm 8.24\%$)没有显著性差异(Wald $\chi^2 = 2.894$, $df = 1$, $P = 0.089$), 均极显著高于型内授粉处理($0.00 \pm 0.00\%$)和自交授粉处理($0.00 \pm 0.00\%$) (所有的 $P < 0.001$) (图3)。

图3 不同授粉处理青篱柴结籽率的比较(型内异交和自交结籽率为零, 不同字母表示不同的授粉处理间差异显著)

Fig. 3 Comparison of the seed set of *Tirpitzia sinensis* with different pollination treatments. The seed set ratio of intra-morph outcrossing and selfing were zero, different letters indicate significant difference among treatments.

3 讨论

本研究发现二型花柱植物青篱柴短柱型的花粉体积显著大于长柱型的花粉体积, 长、短柱型柱头表面积没有显著性差异, 自交与型内异交不亲和。尽管自然状态下柱头上落置的不亲和花粉比例显著高于亲和花粉, 但是通过花内和株内去雄, 排除自花花粉与同株异花花粉的干扰, 柱头上落置的亲和花粉比例显著提高。显微观察发现, 型间授粉柱头上花粉的萌发率和花粉管伸长的长度显著高于型内授粉。

短柱型青篱柴的花粉体积显著大于长柱型青篱柴花粉, 这与大部分前人对异型花柱植物的研究结果一致(Darwin, 1892; Vuilleumier, 1967;

Dulberger, 1974, 1992; Ganders, 1976; Costa et al, 2017; Wu et al, 2017)。且长、短柱型青篱柴花粉表面纹饰也存在差异, 短柱型青篱柴花粉表面纹饰为疣状凸起, 长柱型青篱柴的花粉表面纹饰无疣状凸起结构。异型花柱植物不同型态间在柱头形状、大小、以及柱头表面纹饰等方面都有很大不同, 在一些报春花属植物中, 长柱型的柱头是半球状的, 而短柱型的柱头是平整的(Liu, 2014), 但是我们的研究结果显示在柱头表面积和柱头表面纹饰上, 长、短柱型青篱柴之间没有明显差异。

在有性生殖植物中,柱头的可授性直接决定了受精过程能否完成,传粉能否成功受花粉活力和柱头可授性双重影响(Wang et al, 2015)。不同开花时间长、短柱青篱柴的花粉活力和柱头活性分析结果表明,在开花第一天长、短柱型青篱柴的花粉活力都较第二天高,但是柱头活性在开花第一天和开花第二天无显著性差异,这有可能与青篱柴较短的开花时间相适应,因为维持较长的开花时间需要消耗一定的资源,但是开放后的花大部分会被访花者访问,花粉总量会下降,为了实现最大的繁殖成功率,植物将资源分配给还未开放的花;而柱头活性在开花前后两天都没有差异,可能是因为没有授粉的原因,植物为了实现生殖成功继续保持较强柱头活性。

长、短柱型青篱柴的柱头在自然状态下普遍受到不亲和花粉的干扰,不亲和花粉的比例显著高于亲和花粉的比例。柱头上落置大量不亲和花粉可能与植株的开花式样和花序以及传粉者的访问行为有关(Ganders, 1974, 1976, 1979; Lloyd & Webb, 1992, Brys et al, 2008; Liu, 2014)。金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)柱头落置与繁殖成功在居群间的变异研究表明,居群中不同型比会影响柱头上亲和花粉落置与繁殖成功,当居群型比为1:1时,落置在长、短柱上的亲和花粉与不亲和花粉比例无显著性差异,但是当居群型比偏离1:1时,居群物种数量多的柱型将会提高另一柱型的亲和花粉比例(Wu, 2017)。因此自然状态下长、短柱型落置在柱头上的亲和花粉比例与不亲和花粉比例存在差异,可能是由于居群型比的差异,造成传粉者贡献的亲和花粉比例不同。青篱柴的头状花序和一次开放较多短寿命的花,使得传粉者在同一植株上访问时停留的时间较长,使得更多的同株异花不亲和花粉落置在柱头上,但是株内去雄排除同株异花干扰后,亲和花粉比例显著提高。

在自交不亲和的物种中,自花花粉或同型花粉落置在柱头上可能会导致柱头表面堵塞,与亲和花粉竞争柱头表面和花柱道,从而影响亲和花粉的萌发率和花粉管的生长(Lloyd & Yates, 1982; Kohn & Barrett, 1992; Fetscher, 2001)。对青篱柴进行混合授粉(型内和型间花粉混合)、型间授粉和型内授粉处理的结果表明,混合型间花粉的萌发率和花粉管的

长度都显著高于混合型内,型间花粉的萌发率和花粉管的长度都显著高于型内,说明在自然状态下,型内的花粉在柱头上不能有效地萌发,而萌发出的花粉管在花柱道中伸长受到抑制,从而促进异交。

几乎所有的异型花柱植物都是自交不亲和的,且在同一个种中长、短柱自交不亲和的程度也不一样(Ornduff & Perry, 1964; Ornduff, 1970; Barrett, 1977)。我们的授粉处理结果表明,青篱柴的繁育系统为型内异交与自交不亲和,这与大部分的异型花柱植物促进异交的结果一致(Ree, 1997; Keller et al, 2014),但是也并不是所有的异型花柱植物都是自交不亲和的,也广泛存在自交亲和的现象(Ganders, 1976; 常芳芳, 2017^①)。说明在异型花柱植物中,可能由于传粉者的丰富度差异、花部特征差异、花期物候不同等原因,使异型花柱植物在漫长的进化与适应中演化出了不同的繁育系统。

近来研究者从传粉者的角度,以*Palicourea rigida*的3个种群为研究对象,开发了一种模拟蜂鸟访花的方法,验证不同柱型花粉在传粉者身体不同部位的分布,从而促进亲和花粉的传递,实验结果证明了二型花柱的生态学功能是促进亲和花粉的传递(Raup et al, 2020)。随着分子生物学技术的发展,近年来进化生物学家们运用系统发育和分子遗传手段验证了异型花柱多态选择理论模型的一些特征和异型花柱的起源与进化问题,为异型花柱的深入研究奠定了基础(Barrett, 2019; Costa et al, 2019)。近来已有一些研究证实次级代谢物的种类和含量、激素代谢相关基因的表达在异型花柱的不同表型中是不一致的,且在避免性干扰上不同柱型的植株采取的策略也不一样(Barranco et al, 2019; Zhao et al, 2019; Hu et al, 2020)。本研究经显微观察发现去雄操作排除同花和同株异花的花粉干扰提高了青篱柴柱头上落置的亲和花粉比例(即型间花粉),青篱柴的柱头有利于亲和花粉的萌发和花粉管的延长,宏观方面验证了青篱柴的繁育系统是典型的型内异交与自交不亲和。综上,青篱柴能促进异交,提高传粉精确性。将来的研究可能要在不同表型的基因差异性,以及次级代谢物成分和含量等方面进行深入的研究。

① 常芳芳 (2017) 探索二型花柱的演化: 以甜荞和苦荞为例. 硕士学位论文, 华中师范大学, 武汉.

致谢: 感谢中国科学院广西植物所刘长秋副研究员、云南省文山州麻栗坡县郭喜兵先生、贵州师范大学生命科学学院硕士生唐汉青、相孟达对野外实验的协助。感谢贵州师范大学生命科学学院本科生陈丹对室内实验的帮助。

ORCID

王晓月 <https://orcid.org/0000-0002-8369-1606>

参考文献

- Armbruster WS, Pérez-Barrales R, Arroyo J, Edwards ME, Vargas P (2006) Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): A new twist on heterostyly. *New Phytologist*, 171, 581–590.
- Barranco D, Arroyo J, Santos-Gally R (2019) Avoiding sexual interference: Herkogamy and dichogamy in style dimorphic flowers of *Narcissus broussonetii* (Amaryllidaceae). *AOB PLANTS*, 11, 038.
- Barrett SCH (1977) The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist*, 78, 209–220.
- Barrett SCH (2019) ‘A most complex marriage arrangement’: Recent advances on heterostyly and unresolved questions. *New Phytologist*, 224, 1051–1067.
- Barrett SCH, Glover DE (1985) On the Darwinian Hypothesis of the adaptive significance of tristylous. *Evolution*, 39, 766–774.
- Barrett SCH (1992) Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. In: *Evolution and Function of Heterostyly*, pp.1–29, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Brys R, Jacquemyn H, Hermy M, Beeckman T (2008) Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 273, 1–12.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1979) A model for the evolution of distyly. *The American Naturalist*, 114, 467–498.
- Costa J, Castro S, Loureiro J, Barrett SCH (2017) Experimental insights on Darwin’s cross-promotion hypothesis in tristylous purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *American Journal of Botany*, 104, 616–626.
- Costa J, Torices R, Barrett SCH (2019) Evolutionary history of the buildup and breakdown of the heterostylous syndrome in Plumbaginaceae. *New Phytologist*, 224, 1278–1289.
- Dafni A (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Darwin C (1892) *The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species*. John Murray, London.
- Dulberger R (1974) Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous *Linum* species. *American Journal of Botany*, 61, 238–243.
- Dulberger R (1992) Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: *Evolution and Function of Heterostyly* (ed. Barrett SCH), pp. 41–84. Springer, Berlin.
- Fetscher AE (2001) Resolution of male-female conflict in a hermaphroditic flower. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268, 525–529.
- Ganders FR (1974) Disassortative pollination in the distylous plant *Jepsonia heterandra*. *Canadian Journal of Botany*, 52, 2401–2406.
- Ganders FR (1976) Pollen flow in distylous populations of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany*, 54, 2530–2535.
- Ganders FR (1979) The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, 17, 607–635.
- Hu D, Gao SP, Li WJ, Lei T, Liu YQ, Li Q, Li JN, Jiang MY (2020) Dissecting the distyly response to pollination using metabolite profiling in heteromorphic incompatibility system interactions of *Plumbago auriculata* Lam. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1–6.
- Keller B, Thomson JD, Conti E (2014) Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin’s primroses: Evidence from experimental studies. *Functional Ecology*, 28, 1413–1425.
- Kohn JR, Barrett SCH (1992) Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution*, 46, 43–55.
- Liu QR, Zhou LH (2008) *Linaceae*. In: *Flora of China*, Vol. 11 (eds Wu ZY, Raven PH, Hong DY), Missouri Botanical Garden, St. Lewis & Science Press, Beijing.
- Liu SJ (2014) *A Study of Adaptive Significance of Distyly in Primula species*. PhD dissertation, Wuhan University, Wuhan. (in Chinese with English abstract) [刘淑娟 (2014) 报春花属植物二型花柱的适应意义研究. 博士学位论文, 武汉大学, 武汉.]
- Liu SJ, Wu LY, Huang SQ (2016) Shortened anther–stigma distance reduces compatible pollination in two distylous *Primula* species. *Journal of Plant Ecology*, 9, 224–232.
- Lloyd DG, Webb CJ (1992) The selection of heterostyly. In: *Evolution and Function of Heterostyly* (ed. Barrett SCH), pp. 179–207. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lloyd DG, Yates JMA (1982) Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). *Evolution*, 36, 903–913.
- Massinga PH, Johnson SD, Harder LD (2005) Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentstemon* species (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 95, 389–399.
- Naiki A, Nagamasu H (2003) Distyly and pollen dimorphism in *Damnacanthus* (Rubiaceae). *Journal of Plant Research*, 116, 105–113.

- Nicholls MS (1985) Pollen flow, population composition, and the adaptive significance of distyly in *Linum tenuifolium* L. (Linaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 25, 235–242.
- Nishihiro J, Washitani I, Thomson JD, Thomson BA (2000) Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant *Primula sieboldii*. *Functional Ecology*, 14, 502–512.
- Ornduff R (1966) The breeding system of *Pontederia cordata* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 93, 407–416.
- Ornduff R (1970) Incompatibility and the pollen economy of *Jepsonia parryi*. *American Journal of Botany*, 57, 1036–1041.
- Ornduff R (1970) The systematics and breeding system of *Gelsemium* (Loganiaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 51, 1–17.
- Ornduff R, Perry JD (1964) Reproductive biology of *Piriqueta caroliniana* (Turneraceae). *Rhodora*, 66, 100–109.
- Piper J, Charlesworth B (1986) The evolution of distyly in *Primula vulgaris*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 29, 123–137.
- Raupp PP, Matias R, Furtado MT, Consolaro H (2020) The role of distyly in pollen flow of the hummingbird-pollinated *Palicourea rigida* (Rubiaceae). *Flora*, 271, 151681.
- Ree RH (1997) Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica*, 29, 298–308.
- Rodriguez-Riano T, Dafni A (2000) A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12, 241–244.
- Vuilleumier BS (1967) The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution*, 21, 210–226.
- Wang W, Yang SP, Cui GL, Zhang X, Liu Y, Chen Y (2015) Pollen viability and stigma receptivity of *Artemisia annua* L. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 37(2), 1–7. (in Chinese with English abstract) [王卫, 杨水平, 崔广林, 张雪, 刘芸, 陈阳 (2015) 青蒿花粉活力及柱头可授性研究. 西南大学学报(自然科学版), 37(2), 1–7.]
- Wang XY, Quan QM, Wang B, Li YX, Huang SQ (2018) Pollen competition between morphs in a pollen-color dimorphic herb and the loss of phenotypic polymorphism within populations. *Evolution*, 72, 785–797.
- Wolfe LM, Massinga PH, Johnson SD (2009) A quantitative evaluation of the distylous syndrome in *Sebaea grandis* (Gentianaceae). *South African Journal of Botany*, 75, 785–790.
- Wu LY (2017) A Study of Evolution and Adaptive Significance of Distyly in *Fagopyrum* Species. PhD dissertation, Wuhan University, Wuhan. (in Chinese with English abstract) [吴凌云 (2017) 荞麦属植物二型花柱的进化及适应性意义研究. 博士学位论文, 武汉大学, 武汉.]
- Wu LY, Chang FF, Liu SJ, Scott Armbruster W, Huang SQ (2018) Heterostyly promotes compatible pollination in buckwheats: Comparisons of intraflower, intraplant, and interplant pollen flow in distylous and homostylous *Fagopyrum*. *American Journal of Botany*, 105, 108–116.
- Wu LY, Wang B, Schoen DJ, Huang SQ (2017) Transitions from distyly to homostyly are associated with floral evolution in the buckwheat genus (*Fagopyrum*). *American Journal of Botany*, 104, 1232–1240.
- Zhao ZT, Luo ZL, Yuan S, Mei LN, Zhang DX (2019) Global transcriptome and gene co-expression network analyses on the development of distyly in *Primula oreodoxa*. *Heredity*, 123, 784–794.
- Zhou W, Barrett SCH, Wang H, Li DZ (2015) Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist*, 206, 1503–1512.

(责任编辑: 黄双全 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附录1 青蒿柴的单花、花粉和柱头形态特征

Appended 1 The single flowers, pollens and stigma of *Tirpitzia sinensis*

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2020444-1.pdf>

附录1 青篱柴的单花、花粉和柱头形态特征。(A)长、短柱型青篱柴单花; (B)长、短柱型青篱柴花粉; (C)长柱型柱头; (D)短柱型柱头。

Appended 1 The single flowers, pollens and stigma of *Tirpitzia sinensis*. (A) Flowers of long morph (L-morph) and short morph (S-morph); (B) Pollens of L-morph and S-morph; (C) Stigma of L-morph; (D) Stigma of S-morph.