

4 种榕树的授粉方式及其花粉特征^{*}

刘明新^{1,2}, 杨培¹, 杨大荣¹, 彭艳琼^{1**}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 定量花粉是植物繁殖生物学中的一个重要环节, 榕属 (*Ficus*) 植物花粉粒小、数量多, 难于定量, 一直用花药—胚珠比 (anther-to-ovule ratio, A/O) 来判断榕树属于主动还是被动授粉方式。本研究选择 4 种雌雄同株榕树, 通过比较榕树 A/O, 榕小蜂的授粉结构、行为来确定它们的授粉方式; 同时测量了它们的花粉粒大小和数量, 并研究授粉方式及其花粉特征的关系。结果表明: 菩提树、高榕和垂叶榕的 A/O 小于 0.16, 并且它们的榕小蜂有发达的授粉结构和主动授粉行为, 属于主动授粉方式。而钝叶榕 A/O 高 (0.85), 其榕小蜂的传粉结构、行为消失, 是被动授粉的方式。4 种榕树的花粉粒大小各有差异, 每朵雄花产生的花粉量种间差异显著, 而且每种果内的雄花数量也不相同, 以至于单个果生产的花粉总量种间有显著差异, 变异范围从 11 ~ 4 000 多万粒, 最大相差 340 倍, 而且花粉数量与花粉粒大小之间存在权衡关系。主动授粉的榕树雄花少、生产的花粉粒大、花粉量少; 而被动授粉的榕树雄花多、花粉量大、花粉粒小。表明榕—蜂互惠系统中榕树的授粉方式、花粉的特征与榕小蜂的授粉结构已协同演化和匹配。4 种榕树的花粉胚珠比 (pollen-to-ovule ratio, P/O) 种间差异也大, 且 P/O 高的种类 A/O 不一定高, 进一步用 P/O 替换 A/O 可完善榕树传粉生物学研究。用 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪计数花粉, 高效、准确地自动输出结果, 可批量研究该属更多种类的花粉量, 并对应计数它们专一传粉榕小蜂携带的花粉量, 有利于揭示榕树在雌雄繁殖功能上的分配策略, 以及榕—蜂互惠繁殖系统的协同演化的机制。

关键词: 榕树; 授粉方式; 花粉粒大小; 花粉数量

中图分类号: Q 969.97; S 722 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2017) 02-0294-09

Pollination Mode of Four *Ficus* species and Pollen Characteristics

LIU Mingxin^{1,2}, YANG Pei¹, YANG Darong¹, PENG Yanqiong¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 650223, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Quantifying pollen is very important in the reproductive biology of plants. The pollen of *Ficus* species is quite tiny and abundant so that it is difficult to count pollen grains. So the anther-to-ovule ratio (A/O) is used to determine the pollination mode which are active and passive pollination. In this study, four monoecious *Ficus* species were selected to investigate their A/O ratios, and the pollination structures and behaviors of species-specific pollinating fig wasps were observed in order to determine the pollination mode. At the same time, the pollen sizes and numbers were measured, and studied the relationship between pollination mode and pollen characteristics. The results showed that the A/O ratios of *Ficus religiosa*, *Ficus altissima* and *Ficus benjamina* were less than 0.16, and the

收稿日期: 2016-01-04

修回日期: 2016-03-03

网络出版时间: 2017-03-31 22:42:07

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31372253, 31672373)。

作者简介: 刘明新 (1990—), 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要从事传粉生物学研究。

E-mail: liumingxin@xtbg.ac.cn

^{**} 通信作者 Corresponding author: 彭艳琼 (1974—), 女, 云南宜良人, 研究员, 主要从事动植物协同进化研究。

E-mail: pengyq@xtbg.ac.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20170331.2242.015.html>

pollinating fig wasps had developed pollination structures and active behavior, which three *Ficus* species belonged to active pollination. However, *Ficus curtipes* had a high A/O ratio (0.85), and the coxal combs disappeared and pollen pockets degenerated, which was a characteristic of passive pollination. So *F. curtipes* was passive pollination. Pollen sizes of four *Ficus* species had significant variation. The numbers of pollen produced by a male flower were significant difference, and the figs had different numbers of male flowers so that the total numbers of pollen grains produced by a fig were significant difference among four *Ficus* species, which the range varied from 0.11 to 40 millions of grains per fig. The largest difference was 340 multiples between species. There was the trade-off relationship between the number of pollen and pollen sizes. *Ficus* species who was actively pollinated had few male flowers, produced large pollen grains and few pollen, while *Ficus* species belonging to passive pollination had more male flowers, produced small pollen grain and a lot of pollen. This suggests that the pollen characteristic and pollination structures of fig-pollinating wasps have evolved and matched with pollination mode in fig-fig wasp mutualism. The P/O ratios of four *Ficus* species were different, and the species that had a high P/O value did not represent to have a high A/O value. Using P/O ratio rather than A/O ratio can improve the research on pollination biology of *Ficus* species. Elzone II 5390 Particle Size Analyzer efficiently and exactly counts pollen grains, and automatically outputs data. This provides the possibility for quantifying pollen of more *Ficus* species, and counting the pollen grains that carried by their species-specific pollinating fig wasps too. In this way, it will be advantage to discover the reproductive allocation on female and male function of *Ficus* species, and help us to understand the coevolutionary mechanism of fig-fig wasp mutualism.

Keywords: *Ficus*; pollination mode; pollen sizes; number of pollen grains

榕树(榕属 *Ficus* 植物的总称)具有特殊的隐头花序结构,体长只有2~3 mm的榕小蜂能进入其花序传粉,通常每种榕树依赖专一的传粉榕小蜂,同时也为传粉榕小蜂提供产卵、繁殖后代的场所,两者互惠共存,互不可缺,至今已协同演化了约7 500万年^[1-2]。自然界中主动授粉是少见的,往往只发生于互惠共生的系统中^[3]。在榕树及其传粉榕小蜂互惠系统中,既存在主动授粉方式,也有被动授粉方式,榕树方面通常主动授粉的种类,其果内雄花数量较少,成熟花粉囊不会自行破裂,而被动授粉的榕树果内雄花较多,花粉囊成熟时破裂,大量花粉散于果腔中。当榕树的花药胚珠比(anther-to-ovule, A/O),即雄花与雌花之比,小于0.16时,榕树属于主动授粉种类,而A/O大于0.21的榕树是被动授粉的种类^[4]。通过对25种榕树花粉形态进行电镜扫描,发现主动授粉的榕树花粉粒均为椭球体,两端尖,表面光滑;被动授粉榕树的花粉粒则为球体或圆柱体,两端钝,表面皱纹状;榕树的花粉形态、结构与其授粉方式已适应性演化^[5]。传粉榕小蜂方面则是前足基节上花粉刷的有无是判断其授粉

方式的重要依据,主动授粉的榕小蜂有发达的授粉结构,即前足基节上有一排花粉刷,中胸腹面有一对花粉筐,并且榕小蜂有主动收集花粉的行为;而被动授粉的榕小蜂花粉刷缺失、花粉筐退化,也没有主动采粉行为,花粉黏附于传粉榕小蜂的体壁上,小蜂进榕果后,花粉掉落在花柱上,进行被动授粉^[4, 6-7]。

在开花植物中,花粉是一个重要的繁殖特性,植物生产的花粉量代表其雄性繁殖功能的高低,定量花粉是研究繁殖生物学一个重要的环节^[8]。在植物授粉方式的研究中,花粉胚珠比(P/O)被认为是衡量授粉效率的一个指标,花粉转移的效率越高,P/O值则越低^[9-10],且P/O与授粉方式和生活型有很强的相关性^[11]。榕树的花粉非常细小,极轴(polarial axis)约4~8 μm ,赤道轴(equatorial axis)长约6~12 μm ,属微小粒花粉,因此,观察、计数榕树的花粉非常困难^[12]。全球已知榕树约800种,至今只有*Ficus natalensis lepriouri*一种榕树,用血球计数板法在显微镜下数过其花粉量,该种榕树每朵雄花的平均花粉量有(9 698 $\pm$ 3 995)粒,一个隐头果内生产的花粉量有160 017 ~ 330 702粒^[13]。由于

榕树花粉量数据的匮乏, 还未触及研究传粉模式与 P/O 之间关系, 以至于难于跟其他的传粉系统进行比较。

计数花粉的方法有直接观察和血球计数法, 这两种方法简便易行, 但耗时、费力, 并且存在较大的人为误差^[14]; 后来发展出拍照、借助图像处理软件分析、有效地计数花粉数量的方法^[15]。Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪采用电阻法技术, 能够测量不同光学性质、密度、颜色和形状的样品, 这种有效的颗粒粒度表征技术可迅速、精确地检测精细小颗粒材料的尺寸、数目、浓度以及质量, 已被广泛应用于检测工业、生物、地质等领域内粒度大于 0.4 μm 的颗粒, 具有极高的准确度和高清的分辨率, 且操作简便。国外研究人员已用该仪器统计植物花粉数量^[16], 国内目前北京师范大学购置了 1 台 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪, 专门用于花粉统计, 但还未见任何相关的文章报道。本研究利用这一设备, 针对花粉量巨大的榕树植物, 统计其花粉粒数量。因此, 本研选择 4 种雌雄同株的榕树, 首先确定它们的传粉方式, 然后, 采用 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪, 成功摸索一套有效统计榕树花粉量的方法, 并比较种间花粉粒大小及花粉量多少, 探讨授粉方式与花粉特征的关系。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究涉及 4 种雌雄同株的榕树种类: 菩提树 (*Ficus religiosa*)、高榕 (*Ficus altissima*)、垂叶榕 (*Ficus benjamina*) 和钝叶榕 (*Ficus curtipes*), 这 4 种榕树均隶属于榕亚属 (*Urostigma*) 植物。这 4 种榕树在西双版纳热带地区分布较为常见, 中等至大乔木, 种群内全年结果, 每种依赖专一的榕小蜂传粉获得有性繁殖。

研究样地位于云南省西双版纳州勐腊县勐仑镇, 中国科学院西双版纳热带植物园 (东经 101°16′、北纬 21°55′, 海拔约 570 m)。地处热带北缘, 受热带季风性气候控制, 干湿季分明, 雨季 (6—10 月) 和干季 (11 至次年 5 月)。年平均气温 21.4~22.6℃, 年均降水量 1556.8 mm, 主要集中在雨季, 相对湿度 86%。

Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪的使用是在北京师范大学生命科学院进化生物学实验

室进行。

1.2 研究方法

1.2.1 采摘雄花期榕果

当榕果发育到种子接近成熟时, 雄花才开放, 此时榕小蜂也发育到成虫期开始羽化, 并在果腔内寻找配偶交配, 交配后的雌性传粉榕小蜂采集、携带花粉寻找正在开放雌花的榕果传粉, 开始新的生活循环。本研究挑选雄花即将成熟的果, 此期榕果顶生苞片口和果壁上没有出蜂孔, 剖开果腔内偶见爬动的雄性传粉榕小蜂。在 4 种榕树上大量采摘该期榕果, 带回实验室, 分三部分处理:

第 1 部分, 果直接用于统计果内雄花和雌花的数量, 最终, 菩提树、高榕、垂叶榕和钝叶榕用于计数雌雄花数量的果分别有 30 果、30 果、26 果及 67 果。

第 2 部分, 剖开部分雄果, 选择雌蜂完成交配, 正离开瘿花的雄果, 跟踪、观察雌蜂采集花粉的行为。

第 3 部分, 用于取果内雄花, 这部分果必须保证花粉成熟, 但花粉囊未破裂, 用尖镊子从雄花梗基部取下, 不能有花粉损失或污染, 直接放入 2 mL 离心管内、每管放置一朵雄花, 用移液器取 0.5 mL 75% 酒精至离心管内保存。每种榕树每个榕果内随机取 6 朵雄花, 从 6 个果内共取 36 朵雄花, 以便后续统计花粉粒之用。

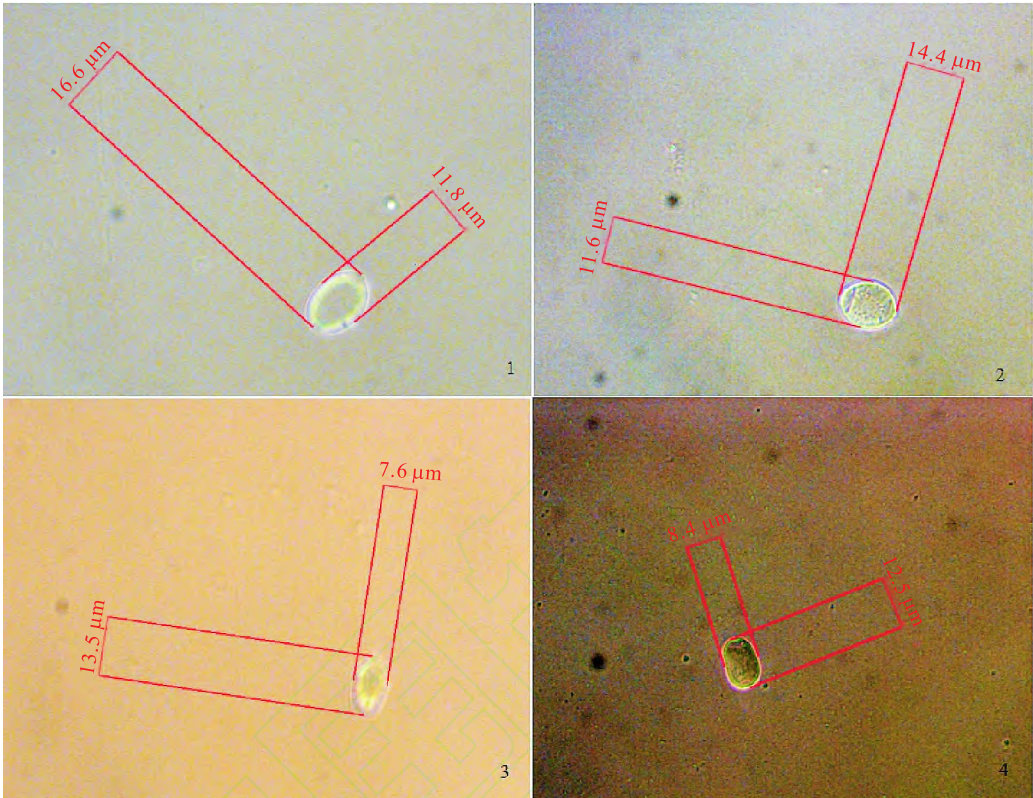
1.2.2 4 种榕树传粉榕小蜂传粉结构的电镜扫描

从 4 种榕树雄花期果内收集自然羽化出来的传粉榕小蜂雌蜂, 挑选形态完好的雌蜂置于 2% 戊二醛固定液中, 放 4℃ 冰箱中保存。用时从冰箱内取出置于室温下自然解冻, 用上海科导超声仪器有限公司生产的超声波清洗器 (SK1200H) 清洗 30~60 s, 再用磷酸缓冲液洗涤 3 次, 然后经过 50%、75%、95% 和 100% 乙醇逐级脱水, 最后用瑞士 BAL-TEC 公司生产的临界点干燥仪 (CPD-303) 干燥。处理完毕的样品, 在高倍显微镜下解剖, 去掉头部和腹部, 并摘除胸部上的足, 仅保留 1 只前足的基节, 最终让着生花粉筐和花粉刷的位置显露出来, 然后将整理好姿态的样品粘到样品台上, 之后整个样品台放入 PECS-682 镀膜仪中进行镀金, 最后用荷兰飞利浦公司生产的 Philip XL-30 扫描电子显微镜观察, 拍照记录有花粉筐和花粉刷的部位。

1.2.3 4 种榕树花粉粒大小测量

先前采集保存的雄花，每果取 1 朵，连同保存的离心管置于超声波清洗机 SB 5200 中振荡 60 s，使花药中花粉粒完全被振荡出来，并使花粉粒单个悬浮在溶液中。用 200 μ L 移液枪吸取少量花粉粒悬浮

液于载玻片上，盖上盖玻片，借助 Axioskop2 plus 显微镜在 400 倍下观察震出的花粉粒的形态，通过外接 AxioCam MRc5 图像系统自动测量花粉粒的大小，花粉粒测量包括测赤道轴和极轴（图 1）。每朵雄花测量 5 个花粉粒，每种 6 朵雄花共测量 30 粒花粉。



注：1.菩提树花粉粒；2.高榕花粉粒；3.垂叶榕花粉粒；4.钝叶榕花粉粒。
Note:1. Pollen grain of *F. religiosa*; 2. Pollen grain of *F. altissima*; 3. Pollen grain of *F. benjamina*;
4. Pollen grain of *F. curtipes*.

图 1 测量4种榕树花粉粒大小（30粒/种）
Fig. 1 Measuring pollen sizes of four *Ficus* species (30 grains per specie).

1.2.4 4 种榕树单朵雄花生产的花粉量

称取 20 g 氯化钠溶液溶于 1 000 g 水中，滤泵抽滤过滤掉溶液中的杂质，制成 2% 的氯化钠溶液备用。然后，取 20 mL 2% 氯化钠溶液于样品管中，用移液枪将离心管中的花粉悬浮液完全转移至样品管中，颠倒摇晃使花粉均匀散布。

参照之前测量的花粉粒径范围，在 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪上设置花粉粒径范围，以赤道轴最大测量值为最大值，以极轴最小值为最小值。然后，抽取花粉溶液，菩提树、高榕和垂叶榕花粉溶液实际进样 5. 148 mL，钝叶榕由于花粉量大实际进样 2. 137 mL，测量样品溶液中花粉的密度，数据可以输出以花粉粒直径为横轴，花粉粒出现频次为纵轴的频数分布图，并直接显示出每毫

升溶液中花粉粒数量，以及进样溶液中总的花粉粒数量。此外，数据也可直接保存成 Excel 文档，文档中显示出实际进样量，及所检测到的每粒花粉及其粒径。再根据样品管中溶液的总体积 20. 5 mL，最后换算得出每朵雄花花药中的花粉量。再结合已统计的单果内的平均雄花数量，计算出 4 种榕树每个榕果内生产的花粉量。

1.2.5 数据分析

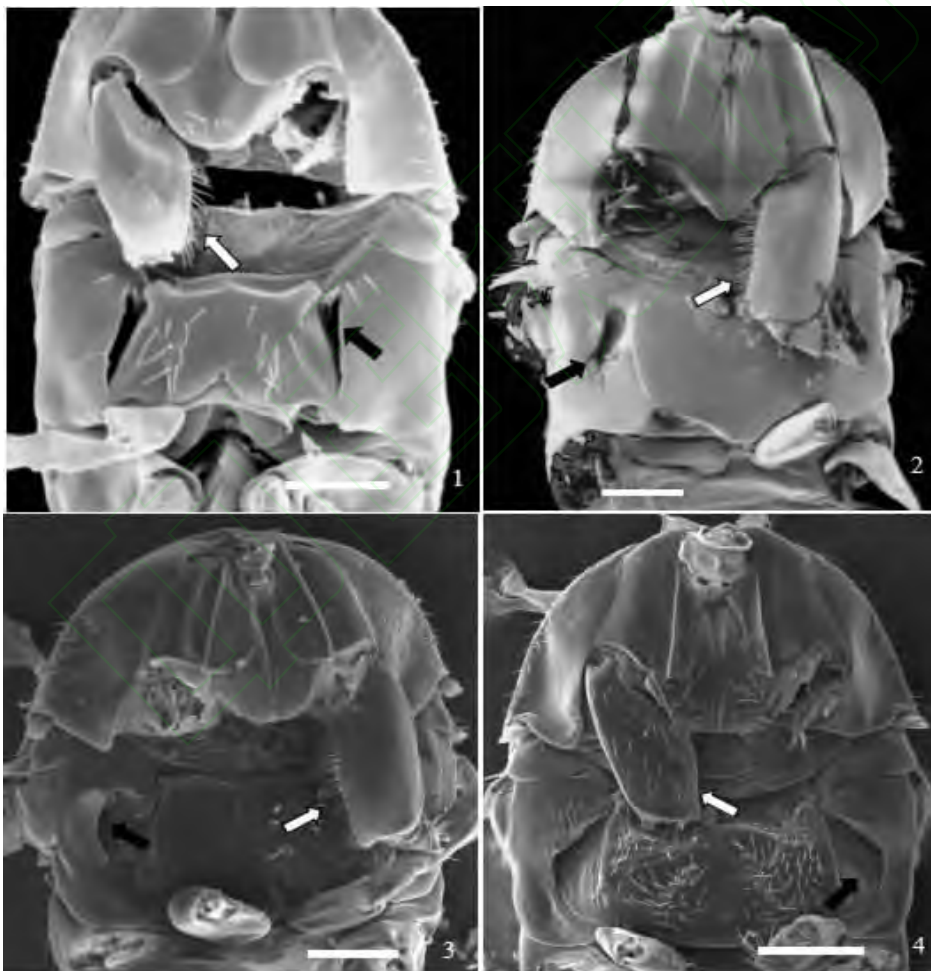
本研究运用 Excel 计算了雌雄花数量、花粉粒数量等平均数（mean）和标准误（SE），并运用 SPSS 软件，在单因素方差分析中，选用 LSD（方差齐）和 Tamhane’ s T2（方差不齐），对 4 种榕树的雌雄花数量、花粉粒大小、花药胚珠比及每毫升花粉粒数量进行多重比较，比较种间差异。

2 结果与分析

2.1 4 种榕树的授粉方式

通过统计 4 种榕树雄花期果内的雌雄花数量,结果显示:雌花最多的是垂叶榕,次之是高榕,然后是菩提树,最少的是钝叶榕,4 种榕树果内的雌花数量存在显著的种间差异 ($P < 0.01$)。单果内钝叶榕雄花平均数量最多,垂叶榕雄花数量次之,高榕雄花数量较少,菩提树果内的雄花数量最少,雄花数量种间也存在显著差异 ($P < 0.01$)。榕果内统计的雄花数即花药数,雌花数即胚珠数,经计算花药胚珠 (A/O) 比,菩提树、高榕、垂叶榕和钝叶榕的 A/O 比分别是 0.037、0.09、0.10 和 0.85,种间

有明显差异 (表 1)。因此,依据 A/O 比判断菩提树、高榕、垂叶榕属于主动授粉的方式,而钝叶榕是被动授粉的种类。再通过电镜扫描这 4 种榕树的传粉榕小蜂的传粉结构,从图 1 可以看出:菩提树、高榕、垂叶榕的传粉榕小蜂,前足基节上均有花粉刷,及胸部有发达的花粉筐,但钝叶榕传粉榕小蜂已无花粉刷,且花粉筐退化,胸部多毛区 (图 2)。根据雌蜂前足基节上花粉刷的有无,以及雌蜂收集花粉的行为,可判断菩提树、高榕和垂叶榕的传粉榕小蜂是主动授粉的种类,而钝叶榕传粉榕小蜂是被动授粉种类。综合榕树及其传粉榕小蜂的授粉特征,可以确定菩提树、高榕和垂叶榕是主动授粉方式,钝叶榕是被动授粉方式 (表 1)。



注: 比例尺: 100 μm , 白色箭头指向花粉刷, 黑色箭头指向花粉筐. 1. 菩提树传粉榕小蜂; 2. 高榕传粉榕小蜂; 3. 垂叶榕传粉榕小蜂; 4. 钝叶榕传粉榕小蜂。

Note: The scale is 100 μm . White arrows indicate the coxal combs and black arrows indicate the pollen pockets. 1-4 represent the pollinating fig wasps of *F. religiosa*, *F. altissima*, *F. benjamina* and *F. curtipes* separately.

图 2 4种榕树传粉榕小蜂的传粉结构

Fig. 2 Pollination structures of pollinating fig wasps from four *Ficus* species

表 1 4 种榕树的授粉方式 (mean ± SE)
Tab. 1 Pollination modes of four *Ficus* species

榕树种类 <i>Ficus</i> species	榕果数量 number of figs	雌花数量 number of female flowers	雄花数量 number of male flowers	花药胚珠比 A/O ratio	传粉榕小蜂花粉刷 coxal combs of fig-pollinating wasps	授粉方式 pollination mode
菩提树 <i>F. religiosa</i>	30	361.03 ± 7.55b	13.27 ± 0.63 a	0.037 ± 0.002 a	有	主动授粉
高榕 <i>F. altissima</i>	30	610.67 ± 13.16 c	57.37 ± 2.36 b	0.09 ± 0.003 b	有	主动授粉
垂叶榕 <i>F. benjamina</i>	26	1 332.81 ± 46.69 d	132.62 ± 6.16 c	0.10 ± 0.004 b	有	主动授粉
钝叶榕 <i>F. curtipes</i>	67	290.90 ± 3.02 a	246.18 ± 2.94 d	0.85 ± 0.01 c	无	被动授粉

注：不同字母代表平均数间有显著差异 ($P < 0.05$)，下同。
Note: Different letters represent a significant difference between means at the 0.05 level, the same as below.

2.2 4 种榕树花粉粒形态及大小

在 400 倍显微镜下观察，4 种榕树的花粉粒基本上呈椭圆形形状，略有差异之处是高榕和菩提树的花粉粒偏圆，垂叶榕的花粉粒两端略尖，而钝叶榕的花粉粒两端钝。4 种榕树花粉粒极轴和赤道轴长种间变异较大，4.8 ~ 21.4 μm ，属于微小粒花粉。平均值显示：菩提树的花粉粒最大，

钝叶榕的花粉粒最小，因此这两种榕树的花粉粒也分别有最大和最小的表面积。花粉粒居中间大小的高榕表现为极轴长而赤道轴短，相比较垂叶榕的极轴短而赤道轴长，换算成表面积，高榕的花粉粒比垂叶榕花粉粒大。多重比较结果是：4 种榕树花粉粒大小，无论赤道轴、极轴，还是表面积种间均有显著差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 2 4 种榕树花粉粒的大小 (30 粒/种)
Tab. 2 The pollen sizes of four *Ficus* species (sample sizes: 30 grains per specie)

榕树种类 <i>Ficus</i> species	花粉粒极轴/ μm polarial axis of pollen grains		花粉粒赤道轴/ μm equatorial axis of pollen grains		花粉粒表面积/ μm^2 areas of pollen grains
	范围 ranges	平均值 (mean ± SE)	范围 ranges	平均值 (mean ± SE)	
菩提树 <i>F. religiosa</i>	9.2 ~ 14.3	11.47 ± 0.19 d	12.7 ~ 21.4	15.34 ± 0.31 c	251.56 ± 8.17 d
高榕 <i>F. altissima</i>	8.0 ~ 12.0	10.05 ± 0.15 c	11.2 ~ 16.5	12.93 ± 0.19 b	200.00 ± 7.33 c
垂叶榕 <i>F. benjamian</i>	7.6 ~ 10.0	8.87 ± 0.12 b	13.0 ~ 16.4	14.76 ± 0.16 c	138.48 ± 3.96 b
钝叶榕 <i>F. curtipes</i>	4.8 ~ 8.6	6.98 ± 0.18 a	9.0 ~ 12.7	11.19 ± 0.15 a	88.64 ± 4.81 a

注：花粉粒表面积按椭圆体计算，面积 = $\pi x [x - (x^2 - y^2)^{1/2}]$ (x 代表赤道轴， y 代表极轴)。
Note: All pollen grains were thought to be ellipsoid. Area = $\pi x [x - (x^2 - y^2)^{1/2}]$ (x is the equatorial axis and y is the polarial axis).

2.3 4 种榕树单朵雄花及单果生产的花粉量

在 4 种榕树果内，雄花散生于果腔内壁上，每朵雄花均有一个花药两个肾型的花粉囊。经 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪统计，直接给出每毫升进样溶液中花粉粒数量，菩提树、高榕、垂叶榕和钝叶榕的平均花粉粒数量种间有显著差异，从 437 变异至 8 040 粒。经计算获得每朵雄花生产的花粉量，钝叶榕的花粉量最高，平均达 164 822 粒之多；高榕的花粉量次之，约 32 985 粒；垂叶榕的花粉量约 24 807 粒，菩提树的花粉量最少，仅 8 954 粒，与钝叶榕的花粉量相比，

少了 18 倍。4 种榕树单朵雄花生产的花粉量种间呈现差异显著 ($P < 0.01$)。再结合上面对 4 种榕树单果内雄花数量的统计，计算出单果生产的花粉总量，结果表明：钝叶榕单果生产的花粉量最多，平均每果高达 40 576 109 粒，一个垂叶榕果生产的花粉量有 3 289 979 粒，一个高榕果生产的花粉量 1 892 370 粒，花粉量最少的菩提树也有 118 825 粒，最多与最少之间相差约 340 倍。虽然垂叶榕单朵雄花含有的花粉粒比高榕的少，但每果着生的雄花数较多，导致垂叶榕最终单果生产的花粉量超过了高榕 (表 3)。

表 3 4 种榕树单朵雄花及单个果生产的花粉量 (30 朵雄花/种) (mean $\pm$ SE)

Tab. 3 The numbers of pollen grains produced by single male flowers and figs of four *Ficus* species
(sample sizes: 30 male flowers per specie)

榕树种类 <i>Ficus</i> species	花粉粒数量/mL number of pollen grains	花粉粒数量/雄花 number of pollen grains per male flower	总花粉量/果 total number of pollen grains per fig
菩提树 <i>F. religiosa</i>	436.80 $\pm$ 28.81 a	8 954.40 $\pm$ 590.50 a	118 824.89
高榕 <i>F. altissima</i>	1 609.04 $\pm$ 70.04 c	32 985.35 $\pm$ 1 435.89 c	1 892 369.53
垂叶榕 <i>F. benjamina</i>	1 210.13 $\pm$ 94.54 b	24 807.56 $\pm$ 1938.06 b	3 289 978.61
钝叶榕 <i>F. curtipes</i>	8 040.14 $\pm$ 562.96 d	164 822.93 $\pm$ 11 540.67 d	40 576 108.91

注: 每果平均雄花数量见表 1。

Note: The average numbers of male flowers per figs were showed in Tab. 1.

2.4 4 种榕树授粉方式与花粉特征的关系

综合上面的研究结果可以看出: 榕果生产的花粉粒大小与花粉量之间存在权衡关系, 即单果有较大花粉粒的种类, 往往生产较少的花粉量。反之生产花粉量大的种类, 其花粉粒较小。因此, 榕树的授粉方式不但与雄花数量有关, 还与花粉粒大小和数量有关, 表现为主动授粉的榕树雄花少, 花粉粒大, 花粉量少; 相比之下, 被动授粉的钝叶榕雄花数量最多、生产的花粉量最多, 但花粉粒最小。通过计数花粉量, 可以把 A/O 换成传粉生物学中常用的花粉胚珠比 (pollen-to-ovule ratio, P/O), 结果显示: 钝叶榕的 P/O 最高 (139 484.74), 次之是高榕 (3 098.84), 之后是垂叶榕 (2 468.45), 最小的是菩提树 (329.13)。高榕和垂叶榕相比, 两者的 A/O 和 P/O 的大小顺序颠倒, 这说明 A/O 高, P/O 不一定也高, 如果进一步增加研究种类, 像 A/O 那样, 在榕树上也能找到其授粉方式与 P/O 之间的关系。

3 讨论

本研究中隶属于榕亚属的 4 种榕树, 存在主动授粉和被动授粉的两种模式, 其中传粉榕小蜂 *Eupristina* 属是已知 20 属传粉榕小蜂中, 少数同时具有主动授粉和被动授粉方式的属种^[4]。通过利用 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪, 成功摸索出一套有效统计榕树花粉量的方法, 并完成了 4 种榕树花粉量的统计。该方法操作简单, 精确度高, 自动输出结果显示了检测到的不同直径颗粒的浓度, 直观、精确地反映花粉量, 为研究大花粉量的植物提供了途径, 也为批量、系统研究一个科、一个属的植物花粉量提供了可能。此

外, 榕树生产的花粉粒大小与数量之间存在权衡关系, 并且与授粉方式有关, 主动授粉的榕树雄花少, 花粉粒大, 花粉量少; 相比之下, 被动授粉榕树雄花数量多、生产的花粉量大, 但花粉粒小。花粉粒大小、形态上呈现出来的种间差异与传粉榕小蜂传粉结构有一个吻合和匹配, 如钝叶榕花粉粒小、表面皱纹状, 有利于花粉粒黏附在榕小蜂体表面的毛区或褶皱处, 被携带授粉, 而菩提树、高榕和垂叶榕 3 种主动授粉的榕树, 花粉粒大、表面光滑, 可能有利于传粉榕小蜂主动采集花粉和授粉。

全球已知约 800 种榕树, 其花粉粒小、花粉量大, 一直难于计数, 目前仅 *F. natalensis leprieuri* 一种榕树通过血球计数板法统计了其花粉量, 该种榕树每个雄花有花粉 9 698 粒, 一个果生产花粉量 160 017 ~ 330 702 粒^[13]。本研究在国内第一次报道用 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪计数花粉数量, 菩提树、高榕、垂叶榕和钝叶榕每朵雄花的花粉量变异 8 945 ~ 164 823 粒, 每个果内生产的花粉量约 11 ~ 4 000 万, 花粉量之多、种间变异之大 (达 340 倍) 是首次被展示。特别是被动传粉的钝叶榕, 其单果生产 4 000 多万的花粉量基本能代表榕树种花粉量较高的种类。虽然 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪计数花粉粒实现了仪器自动计数, 减少了人为误差, 并提高了效率。但该方法采用的测孔管所测粒径范围为 1 ~ 100 μm , 对通过仪器的花粉悬浮液的纯度有高的要求, 若悬浮液中有较大杂质, 容易堵塞测孔管, 导致花粉粒无法通过仪器, 因此对花粉采集、处理过程的精细度要求也高。本研究所测量的花粉粒极轴 (4.8 ~ 14.3 μm) 和赤道

轴 (9.0~21.4 μm), 比已报道的极轴 (4~8 μm) 和赤道轴 (6~12 μm) 范围比大^[12], 估计是种间差异造成的。

P/O 值是被子植物之花粉数与胚珠数的比值, 植物的繁殖系统与 P/O 值的大小具有直接关系, 不同繁殖系统的 P/O 值具有显著差异, 自花授粉植物的平均 P/O 值 4.7 ± 0.7 , 异花授粉植物的平均 P/O 值达 $5\,859.2 \pm 936.5$ ^[12,17]。榕树由于花粉数难于统计, 一致以 A/O 值来代替 P/O 值^[4], 本研究第一次计算了 4 种榕树的 P/O 值, 种间变异范围特别大, 在 329~139 582 之间。4 种榕树的 P/O 值除了与花粉数目有关外, 也与花粉粒的大小有关, 关键还与雄花数量有关, 因此 A/O 值大的种类, 不一定 P/O 值也大。因此, 在仍用 A/O 的榕树上, 换用 P/O 研究与授粉方式的关系有待深入研究。

榕树的繁殖系统有雌雄同株和雌雄异株之分, 雌雄同株被认为是原始的类型, 而雌雄异株是较为进化的类型, 在雌雄同株的隐头果内, 雄花较多, 散生于果腔内壁上, 传粉榕小蜂需找寻采粉; 相比之下, 雌雄异株果内, 雄花数量少, 多集中生于苞片口周围, 方便传粉榕小蜂采粉^[18]。目前研究的种类是雌雄同株的种类, 借助 Elzone II 5390 颗粒计数与粒度分析仪, 及现已摸索成熟的方法, 有利于计数更多榕树种类的花粉量, 也值得向雌雄异株的榕树上推进, 使从花粉生产情况、P/O 比上进一步探讨榕树繁殖系统、传粉系统的演化提供了可能的途径。此外, 在植物与传粉者互作的研究中, 统计传粉者携带的花粉量也是至关重要^[19]。已知分布于热带非洲的 *F. natalensis leprieuri* 每果生产花粉量 160 017 ~ 330 702 粒, 其单只传粉榕小蜂携带花粉 649 粒花粉, 只有不到 10% 的花粉被榕小蜂采集、携带着去传粉, 导致绝大多数的花粉被浪费掉^[13]。进一步的研究也需要不仅计数榕树生产的花粉量, 还要计数其传粉榕小蜂携带的花粉量, 如此可更客观地理解榕树在雌雄繁殖功能上的分配策略, 以及榕—蜂互惠繁殖系统的演化。

[参考文献]

[1] CRUAUD A, RØNSTED N, CHANTARASUWAN B, et al. An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps [J]. Systematic Biology, 2012, 61 (6): 1029. DOI: 10.1093/sysbio/sys068.

[2] 王宪芳, 彭艳琼, 杨大荣. 对叶榕及其传粉榕小蜂的繁殖特点研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20 (5): 632.

[3] COOK J M, BEAN D, POWER S A, et al. Evolution of a complex coevolved trait: active pollination in a genus of fig wasps [J]. Journal of Evolutionary Biology, 2004, 17 (2): 238. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2003.00683.x.

[4] KJELLBERG F, JOUSSELIN E, BRONSTEIN J L, et al. Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits [J]. Proceedings of the Royal Society / Biological Sciences, 2001, 268 (1472): 1113. DOI: 10.1098/rspb.2001.1633.

[5] WANGG, CHEN J, LI Z B, et al. Has pollination mode shaped the evolution of *Ficus* pollen? [J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86231. DOI:10.1371/journal.pone.0086231.

[6] FRANK S A. The behavior and morphology of the fig wasps, *Pegoscapus assuetus* and *P. jimenszi*: descriptions and suggested behavioral characters for phylogenetic studies [J]. Psyche, 1984, 91: 289.

[7] GALIL J, NEEMAN G. Pollen transfer and pollination in the common fig (*Ficus carica* L.) [J]. New Phytologist, 1977, 79 (1): 163.

[8] HU S S, DILCHER D L, JARZEN D M, et al. Early steps of angiosperm pollinator coevolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105 (1): 240. DOI: 10.1073/pnas.0707989105.

[9] CRUDEN R W, MILLERWARD S. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator-an hypothesis [J]. Evolution, 1981, 35 (5): 964.

[10] HARDER L D, JOHNSON S D. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms [J]. International Journal of Plant Sciences, 2008, 169 (1): 59.

[11] MICHALSKI S G, DURKA W. Pollination mode and Life form strongly affect the relation between mating system and pollen to ovule ratios [J]. The New Phytologist, 2009, 183 (2): 470. DOI:10.1111/j.1469-8137.2009.02861.x.

[12] 曾喜育, 吕福原, 欧辰雄, 等. 花粉-胚珠比与花药-胚珠比: 被子植物繁殖系统的参考指标 [J]. 中华林学季刊, 2008, 41 (2): 265.

[13] MICHALOUD G, BOSSU-DUPRIEZ N, CHEVOLOT M, et al. Pollen waste and unrelated traits in a fig-fig wasp symbiosis: a new behaviour suggesting a host shift [J]. Comptes Rendus Biologies, 2005, 328 (1): 81.

- DOI:10.1016/j.crv.2004.11.002.
- [14] KANNELY A. Preparation and quantification of entomophilous pollen using sonication and an area – counting technique [J]. *Madroño*, 2005, 52 (4): 267.
- [15] COSTA C M, YANG S. Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software [J]. *Annals of Botany*, 2009, 104 (5): 1005. DOI:10.1093/aob/mcp186.
- [16] BISHOP E J, SPIGLER R B, ASHMAN T L. Sex – allocation plasticity in hermaphrodites of sexually dimorphic *Fragaria virginiana* (Rosaceae) [J]. *Botany*, 2010, 88 (3): 231. DOI:10.1139/B10-005.
- [17] CRUDEN R W. Pollen – ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants [J]. *Evolution*, 1977, 31: 32.
- [18] JANZEN D H. How to be a fig [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1979, 10: 13. DOI: 10.1146/annurev.es.10.110179.000305.
- [19] ADLER L S, IRWIN R E. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye [J]. *Annals of Botany*, 2006, 97 (1): 141. DOI:10.1093/aob/mcj012.