

两种姜科花柱卷曲性植物柱头的位置与其可授性的关系

刘 敏^{1,2} 孙 杉¹ 李庆军^{1*}

1 (中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 花柱卷曲性是一种见于姜科山姜属(*Alpinia*)和砂仁属(*Amomum*)植物中的独特的性二态现象, 具有这一性系统的植物, 其居群包括上举型和下垂型两种表型, 所有个体的雌雄性别功能在时间和空间上分离。本研究通过操控授粉和花粉管生长两项实验, 探讨花柱卷曲性植物个体两性功能的隔离方式及其适应意义。云南草蔻(*Alpinia blepharocalyx*)操控授粉实验表明, 自花花粉对其异交率影响不显著($P > 0.05$), 但可能由于自花花粉沉降导致胚珠贴现进而引起近交衰退, 操控条件下每果结籽数显著减少($P < 0.01$)。云南草蔻和红豆蔻(*Alpinia galanga*)花粉管生长实验都显示无论对两种表型进行怎样的授粉处理, 花粉粒萌发和花粉管生长的速率仅在柱头处于可授位置时表现出最大值, 与自交和异交授粉方式无关; 上举型植株上午花粉囊虽未裂但其内花粉已成熟。研究结果表明即使不考虑花柱运动, 山姜属植物也具有异型雌雄异熟的特性。这一结果证实了花柱卷曲运动机制是通过互补式雌雄异位和异型雌雄异熟相结合形成的花部二态性, 异型雌雄异熟促进了异交, 而花柱运动的功能可能在于避免雌雄干扰。

关键词: *Alpinia*, 近交衰退, 雌雄功能冲突, 异交率, 花粉管生长, 异型雌雄异熟, 互补式雌雄异位

The relation between stigma position and receptivity in two flexistylous gingers

Min Liu^{1,2}, Shan Sun¹, Qing-jun Li^{1*}

1 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303

2 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Abstract: Flexistylous is a unique sexual dimorphic system found in *Amomum* and *Alpinia* species of the ginger family (Zingiberaceae). The populations of flexistylous species have two phenotypes, named an anaflexistylous morph and a cataflexistylous morph, and all individuals of both morphs separate their male and female functions spatio-temporally. We conducted manipulated pollinations and pollen tube growth experiments on *Alpinia blepharocalyx* and *A. galanga* to detect the manner of separation of male and female functions within the individual and its adaptive significance. The results showed that the outcrossing rates of manipulated and natural pollination in the cata-morph did not differ significantly ($P > 0.05$). However, the number of seeds per fruit of manipulated cata-morphs was significantly lower ($P < 0.01$) than that of control individuals, perhaps due to the inbreeding depression caused by ovule discounting. Pollen tube growth experiments showed that, when stigma were located at the receptive position (ana-morph in AM, cata-morph in PM), stigma provided appropriate conditions (had stigmatic secretion) for pollen grain germination, and pollen tubes penetrated into the style within 2 hours after pollination, regardless treatment of selfing or outcrossing. However, when stigma were beyond the anther (ana-morph in PM, cata-morph in AM, without stigmatic secretion), it usually took 6–10 hours for pollen germination and pollen tube penetration. Pollen tubes, however, could reach the ovary within 24 hours under both treatments. Hand-pollination also showed

收稿日期: 2007-08-16; 接受日期: 2007-10-11

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30225007)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: qjli@xtbg.ac.cn

that pollen grains of anaflexistylous flowers have matured before the dehiscence of pollen sacs. Our research suggests that flexistylis is a floral dimorphism comprising reciprocal mobile herkogamy and heterodichogamy. Heterodichogamy encourages outcrossing, meanwhile reciprocal curvatures of stigmas play a role of reducing interference between male and female functions.

Key words: *Alpinia*, inbreeding depression, sexual interference, outcrossing rate, pollen tube growth, heterodichogamy, reciprocal herkogamy

花柱卷曲性(flexistylis)是植物界一种独特的性二态现象(sexual dimorphism),具这种性表达机制的植物其居群内包括两种表型的个体,在开花过程中这两种表型的花柱运动方向相反。在一种表型中,刚开花时柱头位于花药之上而后向下运动,称为花柱下垂型(cataflexistylis);另一种表型则相反,刚开花时柱头下垂,随后向上运动,称为花柱上举型(anaflexistylis) (Li *et al.*, 2001)。花药在整个花期保持同一位置,但只在柱头位于其上方时才散粉。通过柱头位置的变化和花粉散布时间的差异,每一朵两性花的雌、雄功能在时间和空间上隔离;而在居群水平上,任意时刻总是一半个体为“雄性”,另外一半个体为“雌性”。这种性二态现象在姜科豆蔻属的栽培植物草果(*Amomum tsao-ko*) (崔晓龙等, 1995)及山姜属(*Alpinia*)植物中(崔晓龙等, 1995; Li *et al.*, 2001; 李庆军, 2002)被发现。目前花柱卷曲性已在24种姜科植物中确切记载(Kress *et al.*, 2005), Renner (2001)将这种性二态现象纳入异型雌雄异熟(heterodichogamy)交配对策的范畴,但也有学者将其作为动态式雌雄异位(movement herkogamy)的一个例子(任明迅和张大勇, 2004)。

此前对花柱卷曲性的研究主要集中在传粉生物学的观察和描述,而对其适应意义及进化的研究还基本没有涉及。这种动态性二态现象可能的进化生物学意义包括促进远交(Li *et al.*, 2001)和避免雌雄性别功能干扰(Sun *et al.*, 2007)。花柱卷曲性实际上包括了雌雄异熟(dichogamy)和雌雄异位(herkogamy)两个方面的特征,而且,一个居群中既有雄性先熟(下垂型个体),又有雌性先熟(上举型个体);雌雄异位也是动态的,即具有两种柱头位置互为相反且相对运动的个体。但是,两种表型柱头位置与柱头可授性之间关系及对自花花粉萌发和生长的影响缺乏量化的信息。为此,本研究拟通过花粉管生长和操控授粉两项实验探讨以下问题: (1)同一表型柱头位于不同位置时的可授性; (2)自花花粉对异交率(outcrossing rate)和每果结籽数(number

of seeds per fruit)的影响。通过这一研究,初步探讨花柱卷曲性在促进远交和避免性别干扰方面的作用,为进一步研究花柱卷曲性的适应意义及进化途径打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与地点

本研究以具有花柱卷曲性的2种姜科山姜属多年生草本植物云南草蔻(*Alpinia blepharocalyx*)和红豆蔻(*A. galanga*)为实验材料。云南草蔻花期3–5月,果期6–7月;红豆蔻花期5–7月,果期9–11月(吴德邻和陈升振, 1981);株高均1–3 m,主要分布于热带和亚热带森林下层。两种植物单花寿命都是1 d,每一种的各个居群内两种表型同时开花,自交亲和(李庆军, 2002; Zhang *et al.*, 2003)。

云南草蔻花粉管生长和操控实验分别于2004年4月及2006年3月在云南省思茅市菜阳河自然保护区(22°30' N, 101°22' E, 1,200 m)进行。红豆蔻花粉管生长实验于2006年5月在中国科学院西双版纳热带植物园园区内进行(21°45' N, 101°02' E, 580 m)。

1.2 操控授粉实验

选择相隔较远的30株下垂型个体,每个个体选择一个花序,在其花期内每天上午(柱头未进入可授位置,花粉散出)套袋处理,以保证花粉不会在其自身柱头不可授的时候被访花昆虫带走,下午(柱头进入可授位置后)解开网袋,接受昆虫的传粉,在这种操控处理下,柱头可同时获得自花花粉和外源异交花粉,相当于没有花柱卷曲性的雌雄同熟植株;自然对照组的30个植株则自始至终不套袋,每天上午和下午都能够接受传粉昆虫的访问,绝大多数自身花粉在上午柱头还处在不可授位置时已经被访花昆虫取走,下午柱头接收到的花粉多为外源异交花粉。操控授粉实验连续进行3 d,标记每天处理的花朵,实验结束后将每个花序上未开放的花摘除。

待果实成熟, 分别采集操控处理和自然对照的果实, 统计每果结籽数。两种处理每果结籽数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 统计分析软件使用SPSS for Windows (13.0)。

用醋酸纤维板凝胶电泳(cellulose acetate gel electrophoresis)等位酶方法检测异交率。等位酶电泳分析使用Tris-glycine(TG, pH=8.5)电泳缓冲液下ADH (alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1)和PGM (phosphoglucumutase, EC 5.4.2.2)两个酶系统染色, 共获得3个变异位点。实验数据使用MLTR for Windows (Ritland, 2002)估计多位点异交率(t_m , multilocus outcrossing rate)及方差。将操控和自然状态的下垂型分别作为两个不同的居群, 各自导入MLTR运算1,000步。通过把两组异交率的自展值(bootstrap values)进行配对比较(pairwise comparison), 视其差值与0是否存在显著差异(Eckert & Barrett, 1994)来检验两种处理的异交率之间差异显著与否。

1.3 花粉管生长实验

对云南草蔻和红豆蔻的两种表型的花分别进行以下4类人工授粉处理: (1)上午自花授粉; (2)上午型间异交(inter-morph crossing)授粉: 花粉来自相反表型; (3)下午自花授粉; (4)下午型间异交授粉。授粉实验所用植株在花开前套袋, 并在唇瓣张开后立即去除花粉囊。人工授粉在上午6:00和下午15:00分别进行, 人工授粉完毕立即套袋。当用上举型植株上午未散粉的花作花粉供体时, 人为剥开花粉囊取出花粉。两种表型每种授粉方式各处理45朵花, 分别于授粉2 h, 4 h, 6 h, 10 h和24 h后采下花柱(连同子房)固定于FAA(甲醛 醋酸 乙醇=1 3 9)中。每次每种处理固定9个。固定24 h后将花柱转移至70%的乙醇中, 并放入4℃冰箱保存过夜。乙醇浸泡后的花柱放入8 M NaOH溶液软化12 h, 然后流水冲洗1 h, 再用浓度为0.1%的苯胺兰溶液(由苯胺兰溶于0.1 M醋酸钾溶液配制而成)染色4 h, 最后将染色完毕的花柱压片, 用荧光显微镜观察花粉管生长情况(染色后的花粉管呈现出明显的蓝绿色), 并测量其长度(Dafni, 1992)。

2 结果

2.1 操控授粉实验

莱阳河自然保护区云南草蔻下垂型操控授粉

条件下的异交率(t_m)为 0.554 ± 0.216 (Mean \pm SD, $n=205$), 自然状态下垂型的异交率(t_m)为 0.778 ± 0.080 (Mean \pm SD, $n=293$), 进行统计比较后, 两种处理的异交率不存在显著差异($df=1$, $P>0.05$), 表明柱头位于可授位置时自花花粉的沉降对异交率有一定的影响, 但差异不显著。

自然状态平均每果结籽数为 33 ± 1.32 (Mean \pm SE, $n=36$), 操控条件下平均每果结籽数为 26 ± 2.27 (Mean \pm SE, $n=31$), 单因素方差分析表明自然状态下的每果结籽数显著高于操控条件下的结籽数($F_{1,65}=10.845$, $df=1$, $P<0.01$)。

2.2 不同授粉条件下的花粉管生长

云南草蔻和红豆蔻花粉管经染色后在荧光显微镜下的图像极为相似, 花粉管生长的不同阶段都能被清晰地观察到。两个种在不同授粉条件下检测出的花粉管长度均有以下两方面的共同特征(图1): 首先, 花粉管生长的速率取决于柱头的位置, 而与授粉条件无关。其中红豆蔻上举型和下垂型都表现为只要柱头进入可授位置, 对其授自交花粉或异交花粉, 花粉管均能在2 h内萌发, 4 h伸入花柱, 10 h接近花柱末端, 24 h伸入子房, 且自交和异交花粉管的生长速度没有显著差异(斜率相同); 云南草蔻花粉的萌发和生长相对较慢, 但仍然表现出与红豆蔻相同的萌发和生长格局, 即如果柱头位于可授位置时, 授粉6 h即萌发和生长, 而柱头不在可授位置时授粉, 无论是自交还是异交, 花粉的萌发和花粉管生长速率都明显减慢, 但24 h后也能够伸入子房。其次, 从上午尚未散发花粉的上举型花剥开花粉囊作为花粉供体的实验结果可以看出, 该表型的花粉在上午已生理成熟, 能够进行授粉, 但由于花粉囊尚未打开, 此时的上举型植株雄性功能表现为未熟。

3 讨论

3.1 柱头运动的适应意义

正常情况下, 花柱卷曲性植物的下垂型个体, 上午散发花粉, 但柱头位于不可授位置, 下午柱头进入可授位置后花粉已经在上午被传粉者携走。在本操控授粉实验中, 上午套袋的下垂型花的花粉散出后没被传粉者带走, 下午柱头进入可授位置后, 花药上仍然留存有自花花粉, 可以和外源异交花粉(上举型植株提供的异型花粉)一起同时被传粉者传

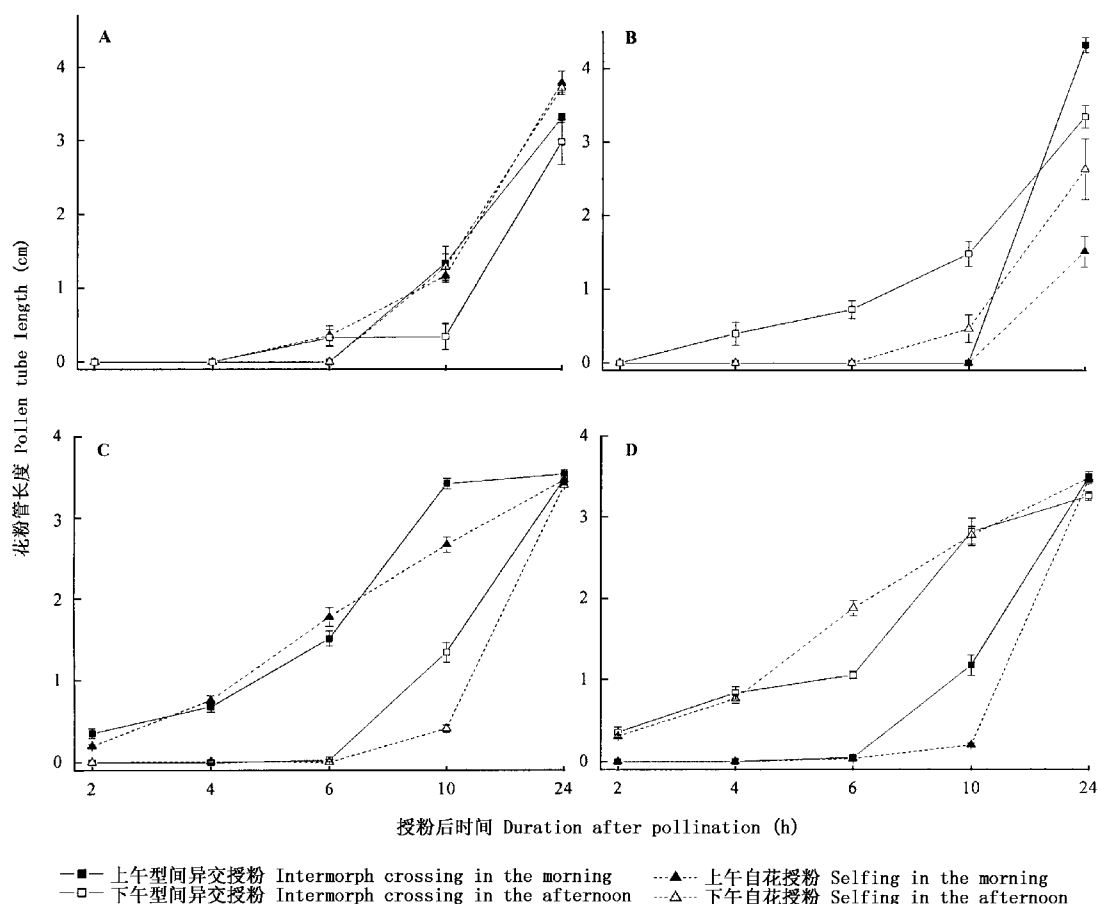


图1 云南草蔻和红豆蔻两种表型不同授粉条件下花粉管在花柱中的生长格局

A: 云南草蔻上举型; B: 云南草蔻下垂型; C: 红豆蔻上举型; D: 红豆蔻下垂型。误差线为标准差。

Fig. 1 The pollen tube growth patterns in the styles after different hand-pollination treatments in each morph of *Alpinia blepharocalyx* and *A. galanga*. A, Ana-morph of *A. blepharocalyx*; B, Cata-morph of *A. blepharocalyx*; C, Ana-morph of *A. galanga*; D, Cata-morph of *A. galanga*. Error bar: Standard deviation.

授到下垂型花的柱头上, 而自然状态的下垂型花在很大程度上只能接受到外源异交花粉。结果表明, 尽管操控实验条件下异交率低于自然状态异交率, 但是这种差异在统计上并不显著, 表明花柱卷曲性机制中的花柱运动(柱头在花粉散布时离开可授位置)在促进异交方面的作用并不显著, 这可能与外源异交花粉具有较强的竞争优势, 在与自花花粉同时授粉(柱头在花粉散布时位于可授位置, 即没有花柱运动)的情况下, 也能够保证具有较高的异交率。Sun等(2007)对云南草蔻进行了花粉竞争实验, 并用等位酶标记的方法, 检测了子代的亲本来源, 从分子生物学角度也说明了外源异交花粉比自交

花粉有更大的竞争优势。这些结果都暗示了花柱运动的功能除了一定程度上能够避免自交以外, 可能还有其他更重要的作用, 例如避免雌雄干扰(sexual interference)。

操控授粉下的每果结籽数显著低于自然授粉的结籽率, 也从另外一个方面证明了花柱卷曲性机制中的柱头运动能够在很大程度上避免雌雄功能的相互干扰。如果没有柱头的运动, 传粉昆虫的访问能够同时把自花花粉和外源异交花粉带到处于可授位置的柱头上, 自花花粉的竞争使得外源异交花粉在柱头上的沉降和萌发的机会减少进而导致胚珠贴现(ovule discounting), 而由自花花粉受精所

产生的自交可能导致近交衰退(inbreeding depression), 主要表现为种子产量(seed production)的减少及后代适合度的降低。云南草蔻人工授粉实验(Sun *et al.*, 2007)以及通过Ritland (1990)的方法估算, 都表明在该物种种子形成过程中存在近交衰退。

以上研究结果说明要区分卷曲性花柱运动的功能是避免自交还是避免雌雄干扰并不容易, 因为它们都涉及了同一个过程: 自体授粉。如果一个性状使得植物有效地避免了自体授粉, 那么我们可以说该性状的功能是避免了自交, 但也不能排除是避免性别干扰的需要(Barrett, 2002)。因此, 如何评估二者的相对重要性是当前植物繁殖生态学研究的一个重要议题。

3.2 花柱运动与雌雄异熟

对于长柄山姜(*Alpinia kwangsiensis*)及云南草蔻花粉管生长的研究表明柱头位于花药上方时, 花粉的萌发及花粉管的生长速率明显滞后于柱头位于花药下方时的速率(李庆军, 2002; Zhang *et al.*, 2003), 即柱头只有处于可被传粉者触及到的位置时花粉管生长的速度才最快, 本研究在红豆蔻中也发现了相同的花粉管生长格局。这种现象可能与柱头生理状态有关: 上举型柱头在花刚开放时就出现了萌发液(germination fluid), 由于午后温度升高, 上举型柱头表面的萌发液很快就蒸发了, 而下垂型柱头却要等到中午才出现萌发液(个人观察)。另外, 红豆蔻、云南草蔻不同授粉条件下花粉管生长的数据都表明无论花粉囊是否开裂, 其中的花粉都已成熟且具备了授粉的能力。因此, 山姜属植物的花药和柱头分别具有不同的异熟策略。根据开花后花药开裂的时间和柱头可授性, 我们可以认为花药的异熟体现在功能上(花粉囊开裂与否), 而柱头的异熟却是生理上的(是否具备适合花粉萌发的生理状态)。这两种不同的异熟策略精确且互补地结合在一起。所以, 花柱卷曲性可明确地区分为两个组分: 异型雌雄异熟和由花柱运动所形成的互补式雌雄异位。

Renner (2001)认为, 从整个居群形态和性别功能上看, 上午上举型个体扮演雌株, 下垂型个体扮演雄株, 午后两种表型再进行性别角色互换, 将花

柱卷曲机制纳入异型雌雄异熟的范畴。但却忽略了另外一个可能性的存在: 即使不考虑柱头的运动情况, 两种表型的柱头依然存在生理异熟。雌雄异熟功能的发挥依赖于拜访者的访花频次(frequency of visit)和觅食行为(Griffin *et al.*, 2000)。在山姜属和豆蔻属具花柱卷曲性的植物中, 传粉者的拜访频次呈现双峰模式(bimodal pattern), 正好与花部行为相吻合(李庆军等, 2001; Takano *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2007), 所以, 假设花柱卷曲运动不出现, 从生理和功能的角度看, 整个居群很可能仍然呈现异型雌雄异熟的局面。那么异型雌雄异熟和花柱运动是怎样精妙地结合在一起, 成为一种同时发挥作用的交配策略呢? 这需要我们结合姜科的系统发生树与各物种性状利用统计推断的方法来揭示雌雄异熟与花柱运动的进化相关性。

许多物种雌雄异熟和异位同时存在可能是在避免自交的同时还避免由于两性器官位置相近导致的雌雄干扰(Webb & Lloyd, 1986)。花柱卷曲性机制实际上包含着雌雄器官在时间和空间两个层次上的隔离。其中雌雄异熟机制可有效地避免自交已被实验所证实(Sun *et al.*, 2007), 而对于花柱运动的功能意义还需要利用直接操控花柱运动的实验加以探究。花粉管生长的结论启发了我们从动态式雌雄异位和异型雌雄异熟两个层面来理解花柱卷曲运动机制。花柱卷曲性功能分析的研究有待进一步量化, 这需要多态性更高的分子标记并结合人工摆放实验, 估算型间(intermorph)和型内(intramorph)的异交率。

致谢: 本实验的野外工作得到了任盘宇先生、杨自辉先生及林向前先生的帮助, 在此致以衷心感谢!

参考文献

- Barrett SCH (2002) Sexual interference of the floral kind. *Heredity*, **88**, 154–159.
- Cui XL (崔晓龙), Wei RC (魏蓉城), Huang RF (黄瑞复) (1995) A preliminary study on the genetic system of *Amomum tsao-ko*. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)* (云南大学学报(自然科学版)), **17**, 290–297. (in Chinese with English abstract)
- Dafni A (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Eckert CG, Barrett SCH (1994) Post-pollination mechanism and the maintenance of outcrossing in self-compatible, tristylous, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Heredity*,

刘敏 (2007) 山姜属植物花柱卷曲运动机制适应性的研究. 硕士学位论文, 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明.

- 72, 396–411.
- Griffin SR, Mavraganis K, Eckert CG (2000) Experimental analysis of protogyny in *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, **87**, 1246–1256.
- Kress WJ, Liu AZ, Newman M, Li QJ (2005) The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers. *American Journal of Botany*, **92**, 167–178.
- Li QJ (李庆军) (2002) *Study on the Flexistyle Outcrossing Mechanism in Alpinia Plants (Zingiberaceae)* (山姜属植物花柱卷曲性异交机制的研究). PhD dissertation, Kunming Institute of Botany of the Chinese Academy of Sciences, Kunming. (in Chinese with English abstract)
- Li QJ, Xu ZF, Kress WJ, Xia YM, Zhang L, Deng XB, Gao JY, Bai ZL (2001) Flexible style that encourages outcrossing. *Nature*, **410**, 432.
- Li QJ (李庆军), Xu ZF (许再富), Xia YM (夏永梅), Zhang L (张玲), Deng XB (邓晓保), Gao JY (高江云) (2001) Study on the flexistyle pollination mechanism in *Alpinia* plants (Zingiberaceae). *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **43**, 364–369. (in Chinese with English abstract)
- Ren MX (任明迅), Zhang DY (张大勇) (2004) Herkogamy. In: *Plant Life-history Evolution and Reproductive Ecology* (植物生活史进化与繁殖生态学) (ed. Zhang DY (张大勇)), pp. 302–321. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Ren PY, Liu M, Li QJ (2007) An example of flexistyle in a wild cardamom species (*Amomum maximum* (Zingiberaceae)). *Plant Systematics and Evolution*, **267**, 147–154.
- Renner SS (2001) How common is heterodichogamy? *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 595–597.
- Ritland K (1990) Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution*, **44**, 1230–1241.
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, **88**, 221–228.
- Sun S, Gao JY, Liao WJ, Li QJ, Zhang DY (2007) Adaptive significance of flexistyle in *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): a hand-pollination experiment. *Annals of Botany*, **99**, 661–666.
- Takano A, Gisil J, Yusoff M, Tachi T (2005) Floral and pollinator behaviour of flexistylous Bornean ginger, *Alpinia nieuwenhuizii* (Zingiberaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **252**, 167–173.
- 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.
- Wu TL (吴德邻), Chen SZ (陈升振) (1981) Zingiberaceae. In: *Florae Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志), Tomus, 16(2). Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Zhang L, Li QJ, Deng XB, Ren PY, Gao JY (2003) Reproductive biology of *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): another example of flexistyle. *Plant Systematics and Evolution*, **241**, 67–76.

(责任编辑: 黄双全 责任编辑: 闫文杰)