

授粉方式对流苏石斛结实率及种子活力的影响^{*}

王晓静^{1,2}, 余 乐³, 殷寿华¹

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 勐仑 666303 2 中国科学院 研究生院, 北京 100039

3 西南大学, 重庆 400715)

摘要: 选择流苏石斛 (*Dendrobium finlayianum*) 这一有重要药用价值的濒危物种进行不同方式的人工授粉实验, 检测了其种子的活力和萌发率。结果表明, 流苏石斛自交部分不亲和, 自交表现出近交衰退。异交 (居群内和居群间) 的结实率、有活力胚种子的比率及种子的萌发率均显著高于自交的, 居群间异交有活力胚种子的比率显著高于居群内异交的。对流苏石斛实施保护, 要注意加强居群间的基因交流, 居群间人工异交授粉可能是一种比较好的方法。

关键词: 流苏石斛; 结实率; 种子活力; 近交衰退; 保护

中图分类号: Q 944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2009)S1-0374-04

流苏石斛 (*Dendrobium finlayianum* Hook.), 又名马鞭石斛、旱马鞭、草石斛等, 兰科 (Orchidaceae) 石斛属多年生植物, 附生于海拔 600~1700m 的阴湿岩石上或密林中树上, 在我国产于广西、云南和贵州, 印度、锡金、不丹、缅甸、越南、泰国也有分布^[1]。流苏石斛是《中华人民共和国药典》收载的 5 种药用石斛属植物之一, 含有多药成分, 具有很高的药用价值^[2]。由于其生长缓慢、繁殖率低, 性喜湿润且通风良好的环境, 对生境要求严格等生物、生态学特性, 加之受到生境严重片断化以及人们过度采挖等因素所带来的干扰, 流苏石斛的野外资源破坏严重, 有的地区甚至临近枯竭^[3], 因此对其实施保护已成为当务之急。

2008 年 4 月, 我们在西双版纳热带植物园的苗圃温室中对流苏石斛进行了不同方式的人工授粉实验, 评估不同授粉方式对流苏石斛的结实率、有活力胚种子的比率以及种子萌发率的影响, 了解该植物的繁殖方面的特点, 以期为该物种的有效保护提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料 流苏石斛花期 4~6 月, 总状花序通常下垂, 生于无叶的茎上部结上, 其上通常疏生 6~12 朵花。花橙黄色, 唇瓣上有暗紫色斑块, 唇瓣凹陷, 边缘具流苏状髯毛, 上面密布短柔毛; 花有距, 内有少量花蜜。黄色花粉团 4 个, 成 2 对。

用于实验的流苏石斛于 2007 年 11 月从西双版纳州景洪市银厂 (21°58' N, 101°13' E, 1170 m) 石灰岩山地林中按照均匀分布、随机采样的原则引种 30 株, 移植到植物园苗圃温室中, 栽在基质为椰壳纤维和少量瓦砾的盆中, 定期适量浇水。其生长状况良好, 2008 年 4 月中旬开花。

1.2 方法

1.2.1 授粉实验 选择长势相近的植株, 在开花前用尼龙袋对花序进行套袋, 在盛花期随机选取正在开放的花, 进行以下几种人工授粉实验处理后重新套袋: ① 自花授粉 (Autogamy): 花粉来源于自身; ② 同株异花授粉 (Geitonogamy): 花粉块来自同

* 收稿日期: 2009-03-09

基金项目: 省院省校合作重大专项资助 (2000WK-07)。

作者简介: 王晓静 (1983-), 女, 山东人, 硕士生, 主要从事保护生物学方面的研究。

通讯作者: 殷寿华, 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事保护生物学方面的研究, E-mail: ysl@xibg.org.cn

一基株不同分株花序的花; ③同居群内异交 (Crossing within-population): 花粉块取自同一居群不同的植株; ④居群间异交 (Crossing between-population): 花粉块来自另一居群。为了不使植株的生长受到影响, 授粉的花朵数不超过该花序上花朵数的三分之一。授粉 1 个月后, 统计各操控处理的结实数量。用 χ^2 检验 (SPSS ver 16.0) 检测不同处理间结实率是否有显著性差异。

1.2.2 种子活力和萌发率检测 授粉 8 个月后, 果实成熟, 采集果实, 经 0.1% 生汞溶液表面消毒处理后切开, 取种子分别进行 TTC 染色处理法和无菌培养, 以检测种子活力和萌发情况。

TTC 法: 用 pH 值 6.5, 1% 的 TTC 溶液浸泡种子, 置于 30℃ 的暗室中染色 24 h 后, 用蒸馏水冲洗种子, 进行镜检。在显微镜下随机数 5 个视野, 统计染色种子和全部种子的数量, 重复多次, 二者比值的平均值作为有活力胚种子的比率。

种子萌发检测: 培养基配方是 KC+ 6-BA 2 mg/L+ NAA 0.2 mg/L+ 3% 蔗糖+ 0.7% 琼脂, pH 值 5.8±0.1, 培养条件是 (25±1)℃, 光照强度为 1500~2000 lx, 光照周期为 12 h/d。培养 30 d 后, 每瓶 5 点取样, 在显微镜下随机数 5 个视野, 统计萌发种子和全部种子的数量, 二者比值的平均值即为种子的萌发率。每个果实 3 瓶重复。有胚种子的萌发率=种子的萌发率/有活力胚种子的比率。

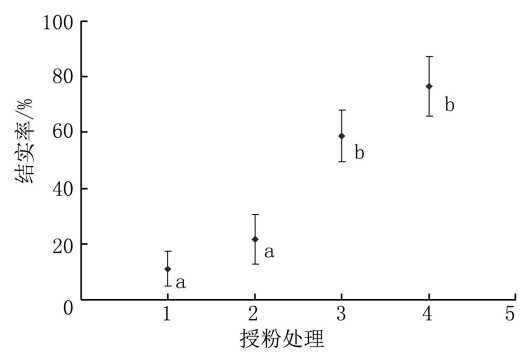
将各授粉处理的有活力胚种子的比率进行单因素方差分析 (one-way ANOVA, SPSS ver 16.0), 数据分析前先进行反正弦转换。

2 实验结果

2.1 授粉与结实情况 接收花粉块后, 第 2 天流苏石斛的花就开始萎蔫, 唇瓣纵向向合蕊柱收拢。没有果实产生的花通常在授粉后的 2~4 d 内脱落。

自交结实率低, 其中自花授粉结实率仅为 11.11% ($n=27$), 同株异花授粉为 21.74% ($n=23$); 居群间异交的结果率最高 (76.47%, $n=17$), 居群内异交次之 (58.62%, $n=29$)。自花授粉和同株异花授粉间没有显著差异 ($\chi^2=2.05$, $P>0.05$), 居群内和居群间异交间没有显著差异 ($\chi^2=1.51$, $P>0.05$)。自交 (自花和同株异花授粉) 与

异交 (居群内和居群间) 间存在明显的差异 ($\chi^2=8.30$, $P<0.05$)。



1: 自花授粉 ($n=27$); 2 同株异花授粉 ($n=23$); 3 居群内异交 ($n=29$); 4 居群间异交 ($n=17$)。用相同字母标注的处理间表示差异不显著, 不同字母标注的处理间表示差异显著。

图 1 流苏石斛不同授粉处理的结实率 (mean±SE)

Fig 1 The effect of pollination treatments on fruit set of *D. fimbriatum* (mean±SE). 1: Autogamy ($n=27$); 2 Geitonogamy ($n=23$); 3 Crossing-pollination within population ($n=29$); 4 Crossing-pollination between populations ($n=17$). Treatments with the same letter are not significantly different from each other

2.2 种子活力和萌发率 授粉 8 个月后, 果实内的种子呈金黄色, 粉尘状, 数量巨大。TTC 检测种子活力, 发现自交和异交的种子质量差别很大。自交授粉所得果实中, 无胚和胚发育不完整种子的比率约占总数的 2/3 仅有 1/3 左右的种子的胚被染成红色, 自花和同株异花授粉之间的差异不显著 ($P>0.05$)。异交所得的果实中, 有活力胚种子所占的比率大大增加, 均极显著高于自花授粉的 ($P<0.001$); 居群间异交所得的有活力胚种子的比率 (96.70%) 显著高于居群内异交的 (70.03%) ($P<0.05$)。

无菌培养 15 d 左右, 肉眼可辨接种异交种子的培养基表面出现淡绿色, 说明此时种子已萌发, 接种自交种子的无明显变化。有胚种子的萌发率, 自花授粉的为 77.42%, 同株异花授粉的为 72.73%, 种群内异交和种群间异交的分别为 98.50%, 92.17%。这些结果表明, 异交的种子萌发优于自交的 (见表 1)。

表 1 TTC检测及萌发实验结果
Tab 1 The results ofTTC and germination test

授粉方式	有活力胚种子的比率 %	种子萌发的比率 (有胚种子的萌发率) %
自花授粉	34.67	26.84 (77.42)
同株异花授粉	36.12	26.27 (72.73)
居群内异株异花授粉	70.05	69.66 (98.50)
居群间异交	96.70	89.12 (92.17)

3 讨 论

多数兰科植物是自交亲和的,但通常有授粉前防止自交的机制^[4],也有些兰科植物通过基因阻隔(如自交不亲和)来避免自交,自交不亲和在多个类群中有报道^[5].石斛属大部分种类是自交不亲和的,通常表现为自交授粉花的脱落^[6].流苏石斛自交授粉的花大多脱落,仅有少数能生成果实,这表明流苏石斛并不是完全自交不亲和,但自交不亲和的程度高.自交所产生的果实中,接近 2/3 的种子无胚或胚不完整,这种早期发育阶段的近交衰退(胚败育)在几种兰科植物中都有报道^[7~9].此外,自交所得的有活力胚种子的萌发率低于异交的,也表现出近交衰退.近交衰退对后代适合度的影响体现在生活史的各个阶段,流苏石斛在结实率、种子质量以及种子萌发的阶段均有表现.

繁育系统被认为是植物保持遗传多样性的最重要的因子之一,我们认为流苏石斛的部分自交不亲和及近交衰退都是为了保持其高的遗传多样性.马佳梅对西双版纳地区几个流苏石斛居群的遗传多样性研究发现,版纳地区流苏石斛居群间的遗传分化高于居群内,遗传变异主要存在于居群间^[10].从我们的实验结果上看,在结实率、有活力胚种子的比率以及可萌发种子的比率上,居群间授粉的均高于居群内授粉的,间接说明居群间的遗传多样性要高于居群内的,这与马佳梅的研究结果相符.

生境破坏和片断化易造成传粉限制和近交程度的增强,在这种情况下,对有近交衰退效应的植物实现保护的措施之一便是人工基因流(Artificial gene flow)的方法,例如不同居群的个体或花粉的引入^[11 12].人工异交授粉可以减少片断化居群的异交种潜在的近交^[13],增强异交种后代的优势,由于长距离的异交而产生的杂种优势在兰科植物 *Liparis lilifolia* 就有发现^[14].此类居群间异交也曾被用来获

得兰科植物 *Cypripedium calceolous* var *pubescens* 有活力胚种子^[15].我们的实验结果显示,流苏石斛有通过居群间异交授粉来获得最高比率的有活力种子的可能性.因而,在流苏石斛野外分布零散,居群间基因交流少的情况下,人工异交授粉增加居群间的基因交流便是一种比较好的保护方法.但也不能一味地认为远交就能增强后代的生活力,因为远交有可能带来远交衰退问题,尤其是在分布范围有限,居群间遗传分化高的情况下^[16].Holmes 等人对稀有灌木、自交不亲和的 *Grevillea repens* (Proteaceae) 进行居群间异交授粉的研究发现,有的居群间远交可以增加该物种的繁殖成功率,有的则由于增加了遗传距离,结实率和结籽率降低,出现了远交衰退现象^[17].流苏石斛居群间的遗传分化程度高,潜在远交衰退的可能,其居群间异交有没有类似 *Grevillea repens* 的情况,目前我们还不得而知.

近交衰退普遍降低了后代的适合度,但它的重要性和具体影响是高度可变的^[18],环境胁迫愈严重近交衰退程度愈高^[19].流苏石斛其它居群的近交衰退程度如何、是否存在远交衰退等问题还是未知,这需要下一阶段选择多个居群,进行大量的重复实验,并结合传粉生物学观察,以全面了解片断化生境中流苏石斛的繁育特性.

参考文献:

[1] 陈心启,吉占和.中国兰花全书[M].北京:中国林业出版社,1998
[2] 包雪声,顺庆生,陈立钻.中国药用石斛[M].上海:上海医科大学出版社,复旦大学出版社,2001.
[3] 刘强,殷寿华,黄文,等.流苏石斛濒危原因及其野生资源保护[J].亚热带植物科学研究,2007,36(4): 45-47
[4] van der Pijl DODSON C H. Orchid flowers their pollination and evolution[M]. Coral Gables University of Miami Press, 1966
[5] TREMBLAY R L, ACKEMAN J D, ZMMERMAN J K, et

- al Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification [J]. *Biological Journal of the Linnean Society* 2005, 84(1): 1-54.
- [6] JOHNSON B O. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* 1990, 103(2): 165-196.
- [7] CATLING P M. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae) [J]. *Canadian Journal of Botany* 1982, 60(12): 3 017-3 039.
- [8] BORBA E L, SEM R J, SHEPHERD G J. Self incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five *Brazilian pleurothallis* (Orchidaceae) [J]. *Annals of Botany* 2001, 88(1): 89-99.
- [9] FERDY B, LORDT S, SANDMEIER M, et al. Inbreeding depression in a rare deceptive orchid [J]. *Canadian Journal of Botany* 2001, 79(10): 1 181 - 1 188.
- [10] 马佳梅. 西双版纳地区流苏石斛遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *云南植物研究*, 2009, 31(1): 35-41.
- [11] Oostenmeijer JGB, A ltenburg RGM, Den Nijs HCM. Effects of outcrossing distance and selfing on fitness components in the rare *Gentiana penumonanthe* (Gentianaceae) [J]. *Acta Botanica Netherlands* 1995, 44(33): 257-268.
- [12] SHERIDAN P M, KAROWE D N. Inbreeding, outbreeding and heterosis in the yellow pitcher plant *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae), in Virginia [J]. *American Journal of Botany* 2000, 87(11): 1 628 - 1 633.
- [13] RICHARDS C M. Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation [J]. *American Naturalist* 2000, 155(3): 383-394.
- [14] WHIGHAM D E, O' NEILL J. The dynamics of flowering and fruit production in two eastern North American orchids *Tipularia discolor* and *Liparis lilifolia* [M] // TCE J H Willems. *Population Ecology of Terrestrial Orchids*. Netherlands: The Hague: SPB Academic Publishing, 1991.
- [15] LIGHT M H S, MacConaill M. Factors affecting geminal seed yield in *Cypripedium calceolus* var *pubescens* (Willd) Correll and *Epipactis helleborine* (L) Crantz (Orchidaceae) [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* 1998, 126(1-2): 3-26.
- [16] STORFER A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited [J]. *Biological Conservation* 1999, 87(2): 173 - 180.
- [17] HOLMES G D, JAMES E A, HOFMANN A A. Limitations to reproductive output and genetic rescue in populations of the rare shrub *Grevillea repens* (Proteaceae) [J]. *Annals of Botany* 2008, 102(6): 1 031-1 041.
- [18] PHILLIP W H. Inbreeding depression in conservation biology [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2000, 31: 139-162.
- [19] DUDASH M R, FENSTER C B. The role of breeding system and inbreeding depression in the maintenance of an outcrossing mating strategy in *Silene virginica* (Caryophyllaceae) [J]. *American Journal of Botany* 2001, 88(11): 1 953-1 959.

Pollination modes effects on fruit set and seed viability of *Dendrobium finbriatum* (Orchidaceae)

WANG Xiao-Jing^{1,2}, YU Le³, YN Shou-hua¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Menglin 666303, China

2. Graduate School Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3. Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract We conducted experimental pollination and seed viability and germination tests with *Dendrobium finbriatum*, an endangered medicinal epiphytic orchid species for which propagation and restoration are important conservation needs. The results showed that *D. finbriatum* was partially self-incompatible and inbreeding depression. Fruit set, the percentage of viable seeds and seed germination following cross-pollination (both within-population and between populations) were significantly higher than following self-pollination. Outcrossing between populations produced a higher percentage of viable seeds than did within population. Based on the results, we recommend artificially increasing gene flow among isolated populations to conserve *D. finbriatum*. Therefore, hand cross-pollination inter-population maybe a good method.

Key words *Dendrobium finbriatum*; fruit set; seed viability; breeding depression; conservation