

濒危植物缙云卫矛繁育系统研究

张仁波¹, 窦全丽^{1,2}, 何平^{1*}, 肖宜安^{1,3}, 刘云¹, 胡世俊¹

(1. 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715; 2. 吉林师范大学图书馆, 吉林四平 136000; 3. 井冈山师范学院生命科学系, 江西吉安 343009)

摘要: 运用花粉萌发、联苯胺—过氧化氢法、花粉—胚珠比、杂交指数和套袋实验等方法, 对缙云卫矛 (*Euonymus chloranthoides* Yang) 花粉活力、柱头可授性及繁育系统进行了研究。结果表明: 缙云卫矛花粉—胚珠比为 764~1340, 杂交指数等于 3, 结合人工授粉和套袋实验结果可以确定该物种的繁育系统属于自交亲和, 有时需要传粉者。根据套袋实验及实地观察可以推测该物种以风媒传粉为主。其花粉活力较高, 持续时间较长, 花粉质量可能不是导致该物种濒危的主要原因。其雌雄性功能表达具一定的重叠期, 提高了同株异花授粉的几率, 雌雄性功能表达在时间上的差异不是影响其结实率的主要原因。气候条件对传粉过程的限制可能是导致该物种濒危的原因之一。

关键词: 缙云卫矛; 繁育系统; 花粉活力; 柱头可授性; 花粉—胚珠比; 杂交指数; 人工授粉

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0308-05

Study on the breeding system of the endangered plant *Euonymus chloranthoides* Yang

ZHANG Ren-bo¹, DOU Quan-li^{1,2}, HE Ping^{1*},
XIAO Yi-an^{1,3}, LIU Yun¹, Hu Shi-jun¹

(1. College of Life Sciences, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China;
2. Department of Library, Jilin Normal University, Siping 136000, China; 3. Department
of Life Sciences, Jinggangshan Normal College, Ji'an 343009, China)

Abstract: Breeding system is theoretically considered as a significant factor which has the most apparent effects on population genetic structure. It is practically useful in plant breeding and conservation of endangered species. *Euonymus chloranthoides* Yang is an endangered plant species which is endemic to Chongqing. This paper, presents pollen viability, stigma receptivity, pollen-ovule ratio, out-crossing index, and fruit set under a serious pollination treatments of *E. chloranthoides* Yang. From these experiments, the pollen-ovule ratio (P/O) is about 764~1340, and its out-crossing index=3. Combining with the result of emasculation, bagging and artificial pollination, the breeding system of this species was determined to be self-compatible and needs pollinators sometimes. In 1 to 3 days after its anther crazed, there were above 50% of pollen has viability, the most was 97% of pollen has viability, so its pollen quality may not be the major factor leading to the endangered status of this species. The expression period of sexual function is overlapped to a high degree (the mean synchronies of two populations are 0.797 and 0.788), and it increased the probability of geitonogamy. Therefore, the difference between the expression of sexual function is not the major factor which influences the ratio of seed-setting of *E. chloranthoides* Yang. The limit of climate to pollination may be an influencing factor to the en-

收稿日期: 2005-04-16 修回日期: 2005-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070080)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070080)]

作者简介: 张仁波((1977-), 男, 贵州桐梓人, 硕士研究生, 主要从事濒危植物保护研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: heping@swnu.edu.cn)

dangered status of *E. chloranthoides* Yang.

Key words: *E. chloranthoides* Yang; breeding system; pollen viability; stigma receptivity; pollen-ovule ratio; out-crossing index; artificial pollination

繁育系统通常的定义是代表直接影响后代遗传组成的所有有性特征, 主要包括花综合特征、花各性器官的寿命、花开放式样、自交亲和程度和交配系统, 它们结合传粉者和传粉行为是影响生殖后代遗传组成和适合度的主要因素(何亚平等, 2003)。其在决定植物的进化路线和表征变异上起着重要作用, 是种群有性生殖的纽带(Grant, 1981; 肖宜安等, 2004)。植物繁育系统已成为一个以“生殖”为核心, 以探讨物种多样性发生历史、维持机理和保护策略为最终目的的综合交叉研究(何亚平等, 2003)。濒危植物繁育系统的研究, 对于繁育生物学和生物多样性保护和管理具有重要意义(王崇云, 1998)。

缙云卫矛(*Euonymus chloranthoides* Yang) 隶属于卫矛科卫矛属, 为重庆特有植物, 亦属国家二级保护植物(王诗云等, 1995)。仅分布于重庆市北碚区缙云山北温泉后山、鸡公山及渝北区统景镇的东温泉内。本文采用花粉活力及柱头可授性检测、花粉-胚珠比估算、杂交指数的估算以及套袋实验等方法, 探讨其繁育系统特征, 为揭示该物种的濒危机制及制定合理的保护措施提供依据。

1 研究地点及其自然概况

研究样地位于重庆市北碚区(106°26' E, 29°50' N) 所处区域位于缙云山脉系, 地处中亚热带, 具有典型的亚热带季风气候特点。年平均温度 18.2 °C, 无霜期平均 334 d, 年平均降水量 1 143 mm, 年平均相对湿度 80%, 全年日照 1 288.1 h, 夏热多雨, 冬季多雾。土壤主要为酸性黄壤, 植被为地带性的中亚热带东部湿润性常绿阔叶林、次生性针叶林及处于不同演替阶段的混交林(周莉等, 1994; 刘玉成等, 1996)。

2 研究方法

2.1 花部形态特征的观测

随机取正开放的花序 30 个, 测量花序直径、花柄长度、花朵直径、花盘直径、花萼长、花萼宽、花瓣长、花瓣宽、雄蕊长、柱头长等花部形态指标。

2.2 花粉活力检测

花药散粉后, 每天收集花粉, 检测其活力。具体方法为: 25 °C 条件下, 分别在 0、1%、2.5%、5%、10% 的蔗糖溶液中做花粉萌发对比实验, 确定体外花粉萌发的适宜条件(1%)。然后在此条件下做花粉萌发实验, 每时期重复 3 次, 统计花粉萌发率, 并以此衡量花粉活力。

2.3 柱头可授性检测

依据 Dafni(1992) 的方法, 用联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性。具体方法是: 在盛花期, 每天中午采开花后不同时间的花朵, 将其柱头浸入凹面载片中含有联苯胺-过氧化氢反应液(1% 联苯胺: 3% 过氧化氢: 水=4: 11: 22; 体积比) 的凹陷处。若柱头具可授性, 则柱头周围的反应液呈现蓝色并有气泡出现。

2.4 花粉量与胚珠比(P/O)的估算

随机取刚开放而花药尚未开裂的花 20 朵固定于 FAA 中, 取单花的全部花药挤碎于含有 0.5% 亚甲蓝染液和去垢剂的乙醇溶液, 定容至 1 mL, 摇匀后用微量注射器取 5 μL 悬浮液在显微镜下统计花粉量, 计算单花花粉总量。重复 6 次, 计算出单个花朵的平均花粉粒数。接着用刀片横切子房, 在解剖镜下记录胚珠数目。每朵花的 P/O 比用该花的花粉总量除以胚珠数目得到。依据 Cruden(1977) 的标准: P/O 为 18.1~39.0 时, 繁育系统为专性自交(Obligate autogamy); P/O 为 31.9~396.0 时, 繁育系统为兼性自交(Facultative autogamy); P/O 为 244.7~2 588.0 时, 繁育系统为兼性异交(Facultative xenogamy); P/O 为 2 108.0~195 525.0 时, 繁育系统为专性异交(Obligate xenogamy); 亦即, P/O 值的降低意味着近交程度的升高, P/O 值的升高伴随着远交程度的上升。

2.5 杂交指数(Outcrossing index, OCI)的估算

按照 Dafni(1992) 的标准进行花序直径、花朵大小及开花行为的测量及繁育系统的评判。具体方法是: (1) 花朵或花序直径 < 1 mm 记为 0; 1~2 mm 记为 1; 2~6 mm 记为 2; > 6 mm 记为 3。(2) 花药开裂时间与柱头可授期之间的时间间隔, 同时雌蕊先熟记为 0; 雄蕊先熟记为 1。(3) 柱头与花药的空间

位置,同一高度记为0;空间分离记为1。三者之和为OCI值。评判标准为,OCI=0时,繁育系统为闭花受精(Cleistogamy);OCI=1时,繁育系统为专性自交(Obligate autogamy);OCI=2时,繁育系统为兼性自交(Facultative autogamy);OCI=3时,繁育系统为自交亲和,有时需要传粉者;OCI=4时,繁育系统为部分自交亲和,异交,需要传粉者。

2.6 套袋实验

用套袋、去雄及人工授粉实验:依Dafni(1992)描述的方法进行下述处理:①对照:不套袋,不去雄,自由传粉,用于检测自然条件下的传粉情况;②开花前套袋,不去雄,检测是否需要传粉者;③同株异花授粉,去雄,套袋,同株异花之间人工授粉,检测是否受精结实;④人工异株异花授粉,套袋、去雄、用不同植株的花粉进行异花授粉,检测杂交是否亲和;⑤自然条件下的异花传粉,不套袋、去雄、自由传粉,与①和④的结果比较,检测座果状况是否受采粉者限制。⑥去雄,套网袋,检测风媒传粉的效果。⑦去雄,套袋,检测是否有无融合生殖。

3 结果与分析

3.1 花部形态特征

缙云卫矛花期7~10月,花序为聚伞花序(直径 2.36 ± 0.059 cm),对生或互生于叶腋或新生枝上,每序3~7朵花同期开放。花两性(直径 1.13 ± 0.022 cm),紫红色,花瓣倒卵形(长 0.49 ± 0.013 cm,宽 0.42 ± 0.0007 cm),边缘具缺刻,花萼与花瓣同数相间隔排列,多为5瓣,偶见4瓣或6瓣,正常花的花瓣、雄蕊及子房室数同数,花瓣离生,花瓣从外向内依次展开,花瓣展开后边缘逐渐向外翻卷,最后成筒状。雄蕊(长 0.085 ± 0.002 cm)与花瓣同数互生,有雄蕊退化现象;花药4室,底着药,黄色,花丝极短,花药散粉期雄蕊始终高于柱头。雌蕊1,子房上位,与花盘联合,子房室数与雄蕊同数,一般5室,少4室或6室,胚珠7~10枚,每室1~2胚珠,多为2胚珠,偶见3胚珠;中轴胎座。花盘肉质,蜜腺位于雄蕊周围略突起,呈半透明状。开花即有

表1 缙云卫矛的花粉活力

Table 1 Pollen viability of *Euonymus chloranthoides* Yang

项目 Items	散粉后时间 Time after anther dehiscence										
	1h	4h	8h	12h	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
检测花粉数 Pollen number of test	604	816	545	856	400	511	453	499	472	486	514
萌发花粉数 Germinated pollen number	545	796	531	834	330	391	249	126	90	36	7
萌发率(%) Germination ratio	90.23	97.55	97.43	97.43	82.50	76.52	54.97	25.25	19.07	7.41	1.36

花蜜分泌,花蜜味甜,量少,无香味,散粉结束后仍有花蜜存在。

3.2 花粉活力检测结果

由表1可知,花粉刚散出时具有较高活力,散粉后4~12h花粉活力均达97%以上。散粉1d后花粉活力有所下降,但仍有82.5%,此后花粉活力逐渐下降,至散粉后7d,花粉活力降至1.36%。由表1还可看出,缙云卫矛的花粉活力在散粉后1~3d均在50%以上,最高可达97%以上,说明其花粉质量不存在严重缺陷,花粉质量可能不是导致该物种濒危的主要原因。

3.3 柱头可授性检测结果

用联苯胺一过氧化氢法检测缙云卫矛柱头可授性结果见表2。表2表明,缙云卫矛开花后1~7h(散粉前期和初期)柱头不具可授性;10~12h(散粉盛期)有少量柱头具可授性,但可授性很弱;开花后1天(散粉末期),花丝向外侧倒伏,柱头可授性增强;开花后2天(散粉完毕),花丝完全倒伏,柱头可

授性最强;此后可授性减弱;至开花后5天,柱头不再具可授性。此时受精成功的花子房凸出花盘,果实初现。

3.4 花粉一胚珠比(P/O)

经检测,缙云卫矛每朵正常花的花粉量为6875~10719,胚珠数8~10枚,P/O约764~1340。依据Cruden(1977)的标准,其繁育系统为兼性异交类型。

3.5 杂交指数(Out-crossing index, OCI)

按照Dafni(1992)的方法对缙云卫矛进行杂交指数的测量,其结果见表3。缙云卫矛花直径为1~2mm;该种虽属两性花,但开花时柱头与花药分离,直到花药散粉盛期,柱头位置仍比花药低;且花药散粉初期雌蕊尚未成熟。因此可以认为其雌、雄器官在空间和时间上是分离的。其杂交指数(OCI)为3,根据Dafni(1992)的标准其繁育系统为自交亲和,有时需要传粉者。这与P/O值检测的结果相一致。

3.6 套袋实验

套袋和人工授粉等实验结果(表4)表明,缙云

卫矛不存在无融合生殖现象, 自然条件下结实率为 13.51%; 自花授粉结实率则偏低(6.25%); 人工异株异花授粉结实率最高, 达 78.95%; 人工同株异花授粉次之, 而自然条件下异花授粉结实率与去雄套网袋处理下的结实率较接近。上述结果表明, 缙云卫矛的繁育系统为自交亲和, 但也需要传粉者, 与杂交指数等检测的结果一致。

由表 4 还可以看出, 去雄套网袋、去雄不套袋自然条件下的结实率与自然条件下自由传粉的结实率三者相近, 且在整个观察过程中(7~10 月), 未见固

定昆虫传粉。偶在晴好天气的中午(10:30~15:00)见极少蝶类或蜂类在植株间飞行, 阴天时偶见蝇类飞行, 但其访花频率低, 且在花部停留时间及飞行距离均较短, 未见昆虫花朵间飞行及同一朵花被重复访问情况, 这可能与花色泽不鲜艳、花蜜分泌量少、无香味, 从而不能吸引昆虫有关。观察过程中也发现, 在连续几天风力较大的天气中所开的花, 其结实率较无风的天气下开的花结实率明显要高, 且在连续阴雨、风力小的天气下所开的花, 其结实率几乎为零。由此推测该物种主要可能以风媒传粉为主。

表 2 缙云卫矛柱头可授性检测结果

Table 2 Test for stigma receptivity of *Euonymus chloranthoides* Yang

开花后时间 Time after blooming	1h	4h	7h	10~12h	1d	2d	3d	4d	5d
可授性结果 Results of test	-	-	-	-/+	++	+++	+	-/+	-

注: - 示柱头不具可授性; -/+ 指部分柱头具可授性, 部分柱头不具可授性; + 示柱头具可授性; ++ 示柱头可授性较强; +++ 示柱头可授性最强。

Note: - means no stigma reception; -/+ means some stigmas have receptivity, some haven't; + means stigmas have receptivity; ++ means stigmas have high receptivity; +++ means stigma have the highest receptivity.

表 3 缙云卫矛杂交指数观测结果

Table 3 The out-crossing index of *Euonymus chloranthoides* Yang

观测项目 Items of observation	花朵直径 Diameter of flower	花药散粉与柱头可授期时间间隔 Temporal separation of anther dehiscence and stigma receptivity	柱头与花药空间间隔 Spatial positioning of stigma and anthers	OCI 值 OCI value	繁育系统类型 Type of breeding system
结果 Results	1~2 mm=1	雄蕊先熟=1 Protandry=1	空间分离=1 Spatially separation=1	3	自交亲和, 有时需要传粉者 Self-compatible, needs pollinators sometimes

表 4 缙云卫矛去雄、套袋及人工授粉试验的结果

Table 4 The test results of emasculation of *Euonymus chloranthoides* Yang

处理方法 Treatment	处理花数 No. of flowers	结果数 No. of fruit set	结实率(%) Fruit set ratio
不去雄, 不套袋, 自然条件下自由传粉 Unemasulation, unbagged, free pollination	63.91±41.20	8.64±6.71	13.51±5.28
不去雄, 开花前套袋 Unemasulation, Bagged before blooming	48.40±5.86	3.33±2.07	6.25±3.67
去雄, 套袋, 人工同株异花授粉 Emasculation, bagged, hand geitonogamy	40.38±7.07	10.21±2.00	25.00±2.20
去雄, 套袋, 人工异株异花授粉 Emasculation, bagged, hand cross-pollination	56.67±9.34	45.37±13.09	78.95±10.38
去雄, 不套袋, 自然条件下异花授粉 Emasculation, unbagged, free pollination	41.41±8.08	3.87±1.95	9.76±3.55
去雄, 套网袋 Emasculation, bagged with net	48.76±7.16	4.12±2.30	8.16±3.27
去雄, 套袋 Emasculation, bagged	26.13±4.95	0	0

4 讨论

长期以来, 植物繁育系统的多样性引起了许多生物学家的兴趣。对植物花的结构和繁育系统的了解是认识植物生活史的前提, 也是其他相关研究所必需依赖的基本背景知识。许多情况下, 花的性别系统与两性花模式有所不同, 从而表现出各式各样

的繁育系统类型(刘林德等, 2002)。

被子植物中与繁育系统密切相关的一个重要因素是雌雄性功能表达在时间上的差异, 即雌雄异熟(dichogamy)(Bertin 等, 1993; 奇文清等, 1998)。缙云卫矛单花水平上属雌雄异熟, 表现为花药散粉时, 雌蕊柱头还未成熟, 不具可授性; 散粉盛期, 柱头可授性弱; 散粉末期, 花丝向外侧倒伏, 柱头可授性才开始增强; 待散粉完毕时柱头可授性才达到最强。

单花雌性功能表达时间主要在散粉盛期后的2天。缙云卫矛花粉活力检测结果表明,花药开始散粉花粉活力就较高,持续时间较长,且2个种群的缙云卫矛平均花期同步指数均较高(北温泉种群:0.797,鸡公山种群:0.788),从而使植株在盛花期雌雄性功能表达具有一定的重叠期,提高了其同株异花授粉(geitonogamy)的几率。因此,雌雄性功能表达在时间上的差异可能不是影响其结实率的主要原因。

花粉-胚珠比和杂交指数作为植物繁育系统的指示参数曾受到怀疑,但是在两性植物繁育系统研究中,仍被许多研究者使用(刘林德等,2002;肖宜安等,2004)。本文也使用这两个参数对缙云卫矛的繁育系统进行检测。2种方法与套袋实验结果基本一致,说明花粉-胚珠比和杂交指数可以简便检测显花植物的繁育系统,这也与刘林德等(2002)、肖宜安等(2004)的研究结果相一致。

人工授粉可显著提高结实率,表明自然条件下传粉者数量不足或传粉效率低(Bierzychudek, 1981; Janzen, 1980; 王仲礼等, 1997)。套袋实验结果表明,缙云卫矛人工异花授粉尤其是异株异花授粉结实率较高,而自然条件下自由授粉结实率相对较低,说明缙云卫矛自然条件下传粉过程受到某些因素的限制。套袋实验结果分析及实地观察结果还显示缙云卫矛的传粉媒介是以风媒为主,因此其传粉受气候影响较大,而缙云卫矛的盛花期(9月),其分布地阴雨天气较多,风力较小,不利于风媒传粉,进而影响缙云卫矛的受精和结实。这可能是缙云卫矛结实率低,从而导致该物种濒危在生殖方面的主要原因之一。缙云卫矛的繁育系统为自交亲和,有时需要传粉者类型,套袋实验结果显示其自交结实率为6.25%左右,这也能说明该物种的一些适应特征。当虫媒传粉匮乏、风媒传粉受到阻碍导致异交失败时,缙云卫矛可通过自交来保证其生殖成功,这可以看作该物种的一种进化适应对策,但自交虽可提高物种的当前适合度,却能降低物种的进化潜力,也就是出现近交衰退,这一点在该物种的保护上应引起注意。其它可能影响缙云卫矛结实的环境、气候等因素正在进一步研究中。

参考文献:

王诗云,赵子恩,彭辅松,等. 1995. 华中珍稀濒危植物及其保护(第1册)[M]. 北京:科学出版社.
Bertin R I, Newman C M. 1993. Dichogamy in angiosperms [J]. *Annual Review of Botany*, 59:113-152.

Bierzychudek P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort[J]. *American Nature*, 117:838-840.
Cruden R W. 1977. Pollen-ovule ration; a conservative indicator of breeding systems in flowering plants[J]. *Evolution*, 35:1-6.
Dafni A. 1992. *Pollination ecology*[M]. New York: Oxford Univ Press:1-57.
Grant V. 1981. *Plant speciation*[M]. 2nd ed. New York: Columbia University Press.
He YP(何亚平), Liu JQ(刘建全). 2003. A review on recent rdvances in the studies of plant breeding system(植物繁育系统研究的最新进展和评述)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 27(2):151-163.
Janzen DH. 1980. Self-andcross-pollination of *Encycliacordigers*(Orchidaceae) in Santa Rosa National Park, Costa Rica [J]. *Biotropica*, 12:72-74.
Liu LD(刘林德), Zhu N(祝宁), Shen JH(申家恒). 2002. Comparative studies on floral dynamics and breeding system between *Eleutherococcus senticosus* and *E. sessiliflorus*(刺五加、短梗五加的开花动态及繁育系统的比较研究)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 22(7):1041-1049.
Liu YC(刘玉成), Li YX(黎云祥), Su J(苏杰). 1996. Multivariate analysis of the ecological factors and the modular structure of *Gordonia acumenata* Young tree population in mountain Jinyun, Sichuan, China(缙云山大头茶幼苗种群构件结构及与环境因子的多元分析)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 20(4):338-347.
Qi WQ(奇文清), You RL(尤瑞麟), Chen XL(陈晓麟). 1998. Pollination biology in *Cimicifuga nanchunaensis*, an endangered species(Ranunculaceae)(濒危植物南川升麻传粉生物学的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 40(8):668-694.
Wang CY(王崇云). 1998. Plant mating system in relation to strategies for the conservation and breeding of endangered species(植物的交配系统与濒危植物的保护繁育策略)[J]. *Chinese Biodiversity*(生物多样性), 6(4):298-303.
Wang ZL(王仲礼), Liu LD(刘林德), Tian GW(田国伟). 1997. Flowering and pollination biology of *Eleutherococcus brachypus*(短梗五加开花及传粉生物学研究)[J]. *Chinese Biodiversity*(生物多样性), 5(4):251-256.
Xiao YA(肖宜安), He P(何平), Li XH(李小红). 2004. Floral syndrome and breeding system of the endangered plant *Disanthus cercidifolius* Maxim. var. *longipes*(濒危植物长柄双花木的花部综合特征与繁育系统)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 28(3):333-340.
Zhou L(周莉), Zhong ZC(钟章成). 1994. A study on the photosynthetic ecophysiology of young *Castanopsis fargesii* in the evergreen broad-leaved forest of Jinyun Mountain(四川缙云山常绿阔叶林幼龄栲树光合生理生态研究)[J]. *J Southwest China Normal Univ*(西南师范大学学报), 19(2):187-193.