

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201903030

卢清彪, 朱晓珍, 刘长秋, 等. 狭叶坡垒传粉生物学初探 [J]. 广西植物, 2020, 40(11): 1628–1637.

LU QB, ZHU XZ, LIU CQ, et al. Pollination biology of *Hopea chinensis* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(11): 1628–1637.

狭叶坡垒传粉生物学初探

卢清彪^{1,2}, 朱晓珍^{1,2}, 刘长秋², 胡兴华², 唐文秀², 黄仕训^{2*}

(1. 广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006) 中国科学院

摘要: 狭叶坡垒 (*Hopea chinensis*) 为常绿乔木, 是我国热带季雨林的 대표树种之一。它树型优美, 具有一定的耐寒性, 是我国珍稀濒危保护植物。为阐明其传粉生物学特征和迁地保护的繁殖潜力, 该文在引种地桂林植物园对狭叶坡垒的开花物候、花尺寸和花气味进行了观察和测量, 运用杂交指数 (OCI)、花粉胚珠比 (P/O)、花粉活力、柱头活性检测和人工自交等方法对其繁育系统进行了检测, 观察了访花昆虫并检验了其传粉效率, 通过人工异交检验了繁殖潜力和可能的传粉限制。结果表明: (1) 桂林植物园内狭叶坡垒的花期为7月底到9月底, 持续 60 d 左右, 一个花序花期约 12 d, 单花期约 3 d, 花朵开放时间为 17:00–18:45。(2) 雌雄同熟, 雌蕊空间位置高于雄蕊, 高花粉活力和高柱头可授性出现时间基本一致。(3) OCI 等于 4, P/O 为 10 788±984。(4) 无自动自花授粉能力且自交不亲和, 自然条件下和异交授粉能坐果且坐果率无显著差异。(5) 蕈蚊是狭叶坡垒唯一的传粉者。(6) 主要花香成分为 β -榄香烯、(E)-7, 11-二甲基-3-亚甲基-1, 6, 10-十二碳三烯和 1-石竹烯。综上所述, 狭叶坡垒繁育系统为异交, 在迁地保护地需要蕈蚊作为传粉者, 能坐果并得到成熟种子, 不存在授粉限制。

关键词: 狭叶坡垒, 繁育系统, 传粉生物学, 花气味, 蕈蚊

中图分类号: Q945 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)11-1628-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Pollination biology of *Hopea chinensis*

LU Qingbiao^{1,2}, ZHU Xiaozhen^{1,2}, LIU Changqiu², HU Xinghua²,
TANG Wenxiu², HUANG Shixun^{2*}

(1. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Ministry of Education Guangxi Normal University, College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: *Hopea chinensis* is one of the representative tree species of tropical seasonal rainforests in China. It is an endangered and protected plant with beautiful tree shape and cold tolerance. To clarify its pollination biology, and

收稿日期: 2019-04-27

基金项目: 国家科技基础资源调查专项 (2017FY100100); 国家自然科学基金 (31560068) [Supported by the Special Fund for Science and Technology Survey of China (2017FY100100); the National Natural Science Foundation of China (31560068)].

作者简介: 卢清彪 (1994-), 男, 广东高州人, 硕士研究生, 主要从事植物的传粉生物学研究, (E-mail) 1085652457@qq.com。

*通信作者: 黄仕训, 研究员, 主要从事濒危植物保护研究, (E-mail) hsx@gxib.cn。

breeding system and demonstrate its reproductive potential in Guilin, where this species was introduced for protection, we conducted the following experiments: the observation of flowering phenology, the measurement of floral size and scent, the estimation of the breeding system by out-crossing index (OCI), the pollen-ovule ratio (P/O), pollen viability and the stigma receptivity and self-pollination, the observation of pollinators and the test of their pollination effectiveness, the assessment of reproductive potential and pollination limitation by hand cross-pollination. The results were as follows: (1) The flowering season of *H. chinensis* in Guilin Botanical Garden is from the end of July to the end of September. It lasts about 60 d. An inflorescence flowers for about 12 d, and the anthesis of a single flower lasts about 3 d. The flowers begin opening from 17:00 to 18:45. (2) *H. chinensis* is not dichogamous but herkogamous with stigmas higher than anthers. The period of high pollen vigor and that of high stigma receptivity largely coincide. (3) The outcrossing index (OCI) was four and pollen/ovule ratio (P/O) was $10\ 788 \pm 984$. (4) Neither flowers self-pollinated nor those bagged all the time set any fruit, fruit set did not differ significantly between natural pollination and hand cross-pollination. (5) Fungus gnats were the only flower visitor to the *H. chinensis* in Guilin Botanical Garden and flowers set no fruits with fungus gnat excluded. (6) The floral scent is dominated by β -elemene, (E)-7,11-dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene and 1-caryophyllene. In conclusion, *H. chinensis* breeding system is self-incompatible, and it relies on fungus gnats for fruit production. It can set fruits and produce mature seeds in Guilin. The results can promote the protection and propagation of *H. chinensis*.

Key words: *Hopea chinensis*, breeding system, pollination biology, flower odor, fungus gnat

繁殖是植物自然居群得以更新和延续的前提,所以植物传粉生物学的研究是开展植物育种、资源保护的理论基础。传粉是植物繁殖过程的一个重要环节,指的是花粉粒由传粉媒介(动物、风或水)传送到雌蕊柱头而完成传粉过程。对传粉媒介的适应被认为是植物花特征进化的主要选择压力之一。现如今进化生物学以及生态学研究最为广泛的领域是传粉生物学,主要研究内容包括花的外部特征、花的开放形式、繁育系统、传粉者种类和频率的观察、种群亲和程度(王洁,2012)。过去的一些研究经常揭示出珍稀濒危植物的有性繁殖存在坐果困难、效率低的情况,且其原因在具体植物中也不同。南非的茜草科植物(*Oxyanthus pyriformis* subsp. *pyriformis*)极低的坐果率是由于缺乏传粉者导致,因为人工授粉后坐果率增长了1 000倍以上(Johnson et al., 2004)。蓼科的 *Dedeckera eurekensis*(Wiens et al., 1989)和金缕梅科的 *Hamamelis virginiana*(Anderson & Hill, 2002)即使在人工授粉后坐果率仍然很低,说明是植物自身原因导致低坐果率。中国的药用植物大百部(*Stemona tuberosa*)则是一种更复杂的情况:它虽然不缺乏传粉者,但是长期的采药活动导致此植物

个体间距离很远,往往超过了其蝇类传粉者的活动距离,使得这种自交不亲和植物的传粉效率大大降低(Chen et al., 2018)。因此,了解植物繁殖困难的原因将有助于开展具体的保护措施,同时也是对花的进化和生态认知的拓展。

狭叶坡垒(*Hopea chinensis*)为龙脑香科坡垒属乔木,是中国极小种群植物。狭叶坡垒只分布于中国十万大山和越南的广宁省白土龙国家公园的孤岛上(Trang & Triest, 2016)。由于树干外表存在一圈一圈的纹路,被当地人称为“皇袍树”。素有“万年木”之称的狭叶坡垒木材纹理结构密致、材质坚硬。狭叶坡垒所在的龙脑香科是一个构成亚洲热带的森林生境乔木层的重要科,目前此科中报道过的多种植物均为虫媒而无风媒(Appanah & Chan, 1981),这说明本科植物普遍依赖环境中的昆虫实现繁殖过程。我们在观察桂林植物园引种的狭叶坡垒过程中发现此植物在远离其天然分布地(桂西南)的广西桂林(桂东北)仍能有坐果现象,这无疑对迁地保护工作的开展有重要积极意义,因为这使得大量就地生产种子成为可能。目前国内对狭叶坡垒的种群生态学等方面研究比较多(黄仕训等,2008),繁殖生物学还没有进行过具体

的研究。本研究拟解决的问题包括:(1)狭叶坡垒开花物候的单花开花时间及花特征是什么?(2)狭叶坡垒在迁地保护点的传粉者是什么以及传粉效率如何?(3)狭叶坡垒繁育系统是什么?(4)狭叶坡垒在此地点的坐果潜力如何?(5)狭叶坡垒主要花香气味成分是什么?

1 材料与方 法

1.1 材料与研究地概况

狭叶坡垒(*Hopea chinensis*)采自桂林植物园珍稀濒危植物迁地保护专类园。

桂林植物园的珍稀濒危植物迁地保护专类园(110°17' E, 25°01' N, 海拔 100 m)占地超 2 hm², 属中亚热带季风气候, 年平均气温 19.2 °C, 其中最热天出现在 7 月, 最低温通常在 1 月, 一般最低温都在 0 °C 以上, 年平均湿度 78%, 日照时长最长出现在 8 月, 年平均降雨量 1 800 mm, 以酸性红壤为主(史艳财等, 2015)。

1.2 开花进程及花部综合特征的观察

在 2008 年 7 月—9 月和 2018 年 7 月—9 月对狭叶坡垒进行了群体花期观察; 随机挂牌标记植株进行单花、单花序及单株的开花物候观察; 观察记录居群的花期时间。用直尺测量花直径。盛花期的时候随机选取 30 朵未开放的花苞进行标记、观察花冠打开时刻、花冠形态及柱头颜色等开花特征。

1.3 访花者观察

每一个观察时段 0.5 h, 每个时段选同一棵树上的 20 朵开放的花朵作为对象。观察并记录访花昆虫的种类、数量、访花次数, 同时利用数码摄影机拍摄昆虫访花和飞行过程。用一个时段内每朵花平均被访次数表示访花频率, 昼夜观测从黎明开始, 直至日落后 4 h 为止, 8 月、9 月分别连续进行了 5 d 观察。

1.4 验证传粉昆虫

前期观察发现昆虫的访花时间为 17:30—19:30。为了检验访花昆虫的传粉作用, 在 16:30—20:00 对 3 棵树 5 个花序共 90 个花蕾进行套袋, 其余时间打开袋子使花完全暴露, 直至花序上所有花凋谢为止。果成熟后统计花序的坐果率。

1.5 花粉活力与柱头可授性的检测

将 8 g 蔗糖、0.005 g 硼酸、0.016 g 氯化钙、0.005 g 硝酸钾和 0.011 g 硫酸镁加入 100 mL 蒸馏水中配制成培养液, 接着把花粉抖落在载玻片上滴加 5~6 滴培养液。将湿润的纸巾放在培养皿四周, 把装有花粉的载玻片置于培养皿中央, 加盖后在 25 °C 条件下培养, 5 h 后取 10 μL 于显微镜(Nikon Eclipse E100)下进行观察, 以花粉管突出萌发孔为萌发标准, 花粉活力是指观察视野里萌发的花粉数占总花粉数的百分比(王洁, 2012)。从花蕾开放前一天开始, 直至花瓣掉落, 每天 8:00 和 18:00 各取 4 朵花, 每朵花做 1 个装片, 每个装片随机看 3 个视野。

将 4 mL 1% 联苯胺、11 mL 3% 过氧化氢和 22 mL 蒸馏水混匀配成联苯胺过氧化氢反应液, 采收不同时期的 5 朵花将柱头分离出来, 滴 4~5 滴联苯胺过氧化氢反应液在载玻片上, 接着将柱头浸入联苯胺过氧化氢反应液中, 用显微镜(Nikon Eclipse E100)观察柱头四周反应液的颜色, 记录柱头所吐气泡的数目和快慢(柴弋霞等, 2017)。

1.6 繁育系统测定

1.6.1 花粉胚珠比(P/O) 每 3 棵树随机摘 5 朵花, 用干净的小瓶子装取下的雄蕊, 花粉全散出后加 10 mL 蒸馏水于小瓶子中, 磁力搅拌器下振荡 6 min, 用移液枪滴 1 μL 在载玻片上, 显微镜(Nikon Eclipse E100)下统计花粉数, 每朵花做 3 个重复, 观察的结果再乘以 10⁴, 最后统计数据取平均值。剖开单花子房统计子房室和每子房室的胚珠数。最后求出 P/O 的值, 按 Cruden(1977)的标准区分狭叶坡垒的繁育系统类型。

1.6.2 杂交指数的估算 杂交指数判断繁育系统是通过测量花朵直径、花药开裂时间与柱头可授期之间的时间间隔和柱头与花药的空间位置(Dafni, 1992)。在狭叶坡垒盛花期随机摘取 20 朵花进行观察、测量和统计。

1.6.3 授粉试验 本实验设置 4 个处理:(1)对照, 即自然授粉, 目的是检测自然条件下坐果情况;(2)套袋, 目的是检测是否能自动自花授粉, 袋子在花蕾即将打开时套上, 花谢后取下;(3)人工同株异花授粉, 目的是检测自交是否亲和, 花粉来源



a. 花蕾; b. 花蕾变蓬松; c. 花瓣顶端打开; d. 完全打开的花朵; e. 花瓣变萎焉状态; f. 雄蕊随花瓣整体脱落后子房; g. 盛花。

a. Flower buds; b. Flower buds become fluffy; c. Petal top open; d. Fully open flower; e. Petal stagnation; f. Ovary with stamens falling out of petals; g. Flower.

图 1 狭叶坡垒单花开花物候

Fig. 1 Flowering phenology of *Hopea chinensis*

为同一个体的其他花;(4)人工异株异花授粉,目的是检测充分异花授粉的坐果潜力,花粉来源为其他植株的花。果实成熟后统计坐果率。坐果率=(结实总数/处理个数)×100%。

1.7 花香成分分析

3株狭叶坡垒分别采30朵花装进进样瓶中,萃取前首先将SPME萃取头在气相色谱仪(Agilent 7890A/5975C)进样口280℃活化30min,然后取装有花样品的进样瓶分别在40℃的数显恒温水浴锅中水浴30min后,再把已经活化的固相微萃取纤维头穿过进样瓶的隔膜垫,推出萃取头,让其在进样瓶中顶空萃取30min,最后把萃取头移入GC-MS进样分析(方振名等,2018)。气相色谱检出成分在质

谱仪的标准谱库(NIST 05a.L)进行检索,再结合人工谱图解析,运用离子流峰面积归一化法对3组样品的花香物质相对含量进行统计。

1.8 数据处理

利用Excel2010软件进行统计及图表绘制,用SPSS23.0软件的单因素方差(One-way ANOVA)分析法对花粉活力、坐果率、气泡数进行处理,用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 开花动态

狭叶坡垒的花期为7月底到9月底,8月中旬



图 2 狭叶坡垒访花者蕈蚊

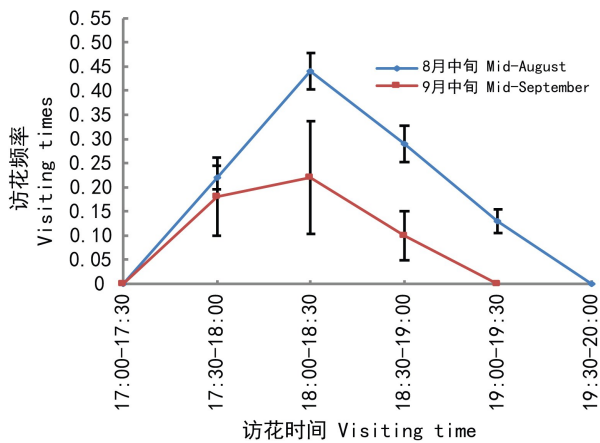
Fig. 2 Fungus gnat from flower visitors on *Hopea chinensis*

图 3 蕈蚊访花频率

Fig. 3 Visiting frequency of fungus gnat

达到盛花期。狭叶坡垒单花开花时间为17:00—18:45,一朵花花期约3 d,一个花序花期约12 d。单花开花状态如图1所示,花蕾期花蕾先逐渐膨

大并且花蕾表面由白色逐渐转变成粉红色(图1:a),接着花蕾慢慢变蓬松(图1:b),然后5片覆瓦状花瓣顶端进一步打开(图1:c),花最终达到盛开状态(图1:d)。接下来3 d花瓣从盛开状态逐渐变萎焉(图1:e),然后5花瓣和雄蕊从花托边缘整体落下,最终只剩下已受精或未成功受精的子房(图1:f)。

2.2 访花昆虫及行为观测

根据观察发现狭叶坡垒在桂林植物园的传粉者为尖眼蕈蚊科(Sciaridae)昆虫(图2),蕈蚊大小为3~4 mm,蕈蚊访花的时间集中在17:30—19:30,其中8月、9月访花频率最高时间段都出现在18:00—18:30。蕈蚊首先飞到花序上或飞到花瓣外围,接着往四周进行爬动,然后爬进花内,停留1~2 min后飞走,走时四肢或身上携带花粉,再飞到另一朵花中接触柱头进行授粉。其中9月中旬19:00以后天就暗,所以蕈蚊在19:00以后就不再出现。蕈蚊

表 1 狭叶坡垒花粉活力和柱头可授性
Table 1 Pollen vigor and stigma receptivity of *Hopea chinensis*

开花状态 Flowering status	花粉活力 Pollen viability (%)	气泡总数 Number of bubbles (number)	柱头可授性 Stigma receptivity
花蕾前 1 天 18:00 18:00 a day before flower bud	/	1.2±1.3g	-
第 1 天 8:00(花蕾) The first day 8:00 (Flower bud)	6.19±4.49e	14.8±4.1ef	+
第 1 天 18:00(开花) The first day 18:00 (Flowering)	31.33±6.90d	23.2±3.2d	++
第 2 天 8:00 The second day 8:00	62.33±7.86b	45.4±4.6a	++++
第 2 天 18:00 The second day 18:00	78.74±10.56a	38.8±5.2b	+++
第 3 天 8:00 The third day 8:00	42.64±8.06c	28.8±5.4c	++
第 3 天 18:00 The third day 18:00	26.36±3.10d	19.0±3.2de	++
第 4 天 8:00 (花瓣已掉) The four day 8:00 (Petals have fallen)	12.95±1.02e	10.2±3.3f	+
第 4 天 18:00 (花瓣已掉) The four day 18:00 (Petals have fallen)	/	0.6±0.8g	-

注：柱头可授性由强至弱的标注为“++++”“+++”“++”“+”。柱头不可授的标注“-”。没检测的标注“/”。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Stigma can be taught from strong to weak are “++++”“+++”“++”“+”. The stigma is not allowed to be marked “-”. The unmarked label “/”. Different letters mean significant differences ($P < 0.05$). The same below.

表 2 狭叶坡垒杂交指数测定结果
Table 2 Results of parameters describing the outcrossing index of *Hopea chinensis*

测定指标 Parameter	结果 Result	数值 Numerical value	繁育系统类型 Breeding system
花朵直径 Flower diameter (mm)	(9.7±1.2) >6	3	部分自交亲和, 异交, 需要传粉者
雌雄成熟时间间隔 Male and female maturity interval	同熟 Same maturity	0	Partially self-compatibility and cross pollination, requires pollinator
柱头与花药的空间位置 Spatial position of stigma and anther	空间分离 Spatial separation	1	
杂交指数 Outcrossing index	4		

8 月的访花频率比 9 月要高(图 3)。

2.3 验证传粉昆虫

定时套袋排除蕈蚊传粉实验最终的坐果数为 0, 结合观察表明狭叶坡垒在广西引种地的传粉昆虫只是蕈蚊。

2.4 花粉活力与柱头可授性

通过培养基法检验发现, 花粉活力在单花期的不同阶段有所不同(表 1)。开花当天早上花蕾的花粉已经开始产生活力, 接着花粉活力开始加强, 并且开花第 2 天 18:00 花粉活力高达 80% 左

表 3 人工授粉实验结果

Table 3 Experimental results of artificial pollination

套袋处理 Bagging treatment	花数量 Number of flowers (flower)	果 Fruit (number)	坐果率 Fruit-setting rate (%)
自然授粉 Natural pollination	50	5	6.54±2.22a
人工异花授粉 Cross-pollination by hand	50	6	9.91±4.40a
套袋,花谢后取下 Bagging, take off after flowering	50	0	0b
人工同株异花授粉 Same-plant cross-pollination by hand	50	0	0b

表 4 三组狭叶坡垒花的气味物质组成

Table 4 Odor composition of three groups of *Hopea chinensis* flowers

编号 Number	显示时间 Display time (min)	花香成分 Floral composition	可信度 Credibility (%)	相对分子质量 Relative molecular mass	相对含量 Relative content (%)
1	4.446	正辛烷 Octane	80	114.23	0.32±0.24
2	19.158	α -蒎烯 α -copaene	93	204.35	2.85±2.79
3	19.576	β -榄香烯 β -elemene	99	204.355	23.76±3.57
4	20.333	1-石竹烯 1-caryophyllene	99	204.35	15.30±1.80
5	21.095	(E)-7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯 (E)-7,11-dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene	98	204.35	25.64±1.60
6	21.441	毕澄茄烯 1H-Cyclopenta [1,3]cyclopropano [1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-	78	204.351 1	0.85±0.05
7	21.741	白菖烯 1H-Cyclopropano [a]naphthalene, 1a, 2, 3, 5, 6, 7, 7a, 7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.,7b.alpha.)]-	80	204.351 06	5.09±1.84
8	22.042	香树烯 1H-Cycloprop [e] azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	89	204.35	7.90±5.75
9	22.249	B-瑟林烯 Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a.alpha.,7.alpha.,8a.beta.)]-	83	0	5.79±5
10	22.862	(1S,8aR)-1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,3,5,6,8a-六氢萘 Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	95	204.351 06	4.34±4.16

右,第4天8:00掉落的花瓣携带的花粉活力已经很低。联苯胺过氧化氢反应液检测发现开花第2天的柱头可授性达到最高值,由表1看出花粉活力和柱头可授性时间基本重叠。

2.5 繁育系统

2.5.1 花粉胚珠比(P/O) 狭叶坡垒单花花粉量较大,为64731±5904($n=15$),子房3室,每室具胚珠

2枚,胚珠总数6($n=15$)枚。平均花粉胚珠比为10788±984(在2108.0~195525.0之间),依据Cruden(1977)的标准,狭叶坡垒为专性异交繁育系统。

2.5.2 杂交指数(OCI) 由表2可以看出,狭叶坡垒的花朵直径为(9.7±1.2)mm($n=30$),花为两性花,雌雄同熟,杂交指数OCI=4。根据Dafni的标

准,狭叶坡垒异交需要传粉者,并且异交为主,也存在部分自交亲和现象。

2.5.3 人工控制性授粉 从表 3 可以看出,自然授粉和人工异花授粉处理的花能坐果,但坐果率低,两者差异不显著($P=0.135>0.05$)。不管是自然条件还是人工异株异花授粉,一个花序结果大多为 1 个或 2 个,都不超过 4 个。自动自花授粉和人工同株异花授粉处理的花没有坐果。

2.6 花香成分分析

运用顶空固相微萃取技术,经 GC-MS 检测,从三份狭叶坡垒花香中鉴定出的气味物质组分完全相同,而且各组分的相对含量也非常接近,均测出 10 种香气成分(表 4),烯炔类 8 种,分别为 α -蒎烯、 β -榄香烯、1-石竹烯、(E)-7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯、毕澄茄烯、白菖烯、香树烯、B-瑟林烯。烷类 1 种,为正辛烷。芳香烯类 1 种,为(1S,8aR)-1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,3,5,6,8a-六氢萘。其中含量最高的成分为 (E)-7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯、 β -榄香烯、1-石竹烯,分别占总含量的(25.64±1.60)%、(23.76±3.57)%、(15.30±1.80)%。三份狭叶坡垒花香中均是烯炔类组分最多,相对含量累计均超 80%。

3 讨论与结论

3.1 狭叶坡垒单花开花时间和开花物候

开花是植物生长的重要时期,能够影响传粉效率。张爱勤等(2011)研究发现结果率下降的原因之一是花期和传粉昆虫活动时期不遇。通常情况下,种群通过集中开花来吸引访花昆虫进行传粉,这样就会使得植株和邻近个体间花粉传递机率增大;相反,种群进行持续性开花不利于吸引传粉昆虫进行传粉,但是通过异交增加获得适合基因型个体的可能性(张文标和金则新,2008)。根据观察发现狭叶坡垒属于持续开花模式,因此,可能不利于大规模吸引传粉者,但是我们的结果显示每朵花平均能够被访问 1.4 次以上。此外,阴雨天气影响传粉昆虫的飞行能力,这样就降低了传粉的可能性,进而降低植物异交的机会(刘芬等,2013)。本研究发现狭叶坡垒的花期为 7 月底至 9 月底,此时是访

花昆虫活跃的季节。蕈蚊出现的时间为 17:30—19:30,单花开放的时间为 17:00—18:45,因此,在引种地桂林植物园不存在花期和访花昆虫不遇的问题。因此开花物候和单花开花时间都不存在不利传粉者访花的问题。另外,通过观察发现桂林植物园狭叶坡垒与树林接触面和林下缺光面枝条既不发芽,也不开花和结果,与光照接触面枝条才发芽、开花和结果。狭叶坡垒野外种群调查也发现类似现象,靠河边接触光照枝条才开花结果,林下和缺光面枝条则不开花和结果,说明狭叶坡垒的花芽发育高度依赖光照。

3.2 狭叶坡垒繁育系统特征和授粉处理

在外部环境条件和内部遗传机制共同作用下植物繁育系统会作相应的调整 and 变化,进而会影响植物繁殖和遗传的方向。OCI、P/O 值和控制授粉是研究植物繁育系统的常用方法。狭叶坡垒的 OCI=4,表示其部分自交亲和、异交、需要传粉者,而 P/O 值和人工授粉实验表明繁育系统为专性异交、需要传粉者,两个指标的结果并不完全一致。由于 OCI 值测定是简单易行,可能缺乏准确性,综合 OCI、P/O 值和控制授粉表明狭叶坡垒是异交并且需要传粉者。Sawyer & Neil(2010)研究濒危植物 *Trillium recurvatum* 结果率过低的主要原因是传粉昆虫少,进而导致其授粉不足。濒危植物巴东木莲也同样出现结果率低的现象,其原因主要是其胚珠败育现象严重(陈发菊等,2007)。宋玉霞等(2008)从花粉活力、柱头可授性两方面对自然条件下濒危植物肉苁蓉的结实率低的原因进行了研究,结果发现影响授粉的主要原因是花粉、柱头共同保持较高活力的时间短。狭叶坡垒的花粉数量多达 $64\ 731\pm 5\ 904$ ($n=15$),因此,不存在花粉数量影响坐果率低。另外,花粉活力和柱头可授性持续时间长,高活力花粉时间和高可授性柱头出现时间基本重叠。但是,访花昆虫蕈蚊只在 17:30—19:30 访花,结合表 1 看出在开花第 2 天 18:00 花粉活力达最高,此时柱头可授性也强,适合传粉昆虫进行异花传粉的重叠时间短,加之传粉昆虫蕈蚊数量少,因此,传粉昆虫限制可能是自然状态下狭叶坡垒结果少的原因之一。

热带森林生境的植物普遍具有自交不亲和性

(Willmer, 2011),这一点也在狭叶坡垒中得到证实,即狭叶坡垒不能进行自动自花授粉且自交不坐果。这说明狭叶坡垒的繁殖完全依赖传粉者的访花行为。异交处理和自然授粉处理结果的无差异表明在我们的研究地点的狭叶坡垒不存在授粉限制,蕈蚊传粉效率高。

3.3 蕈蚊传粉和花气味

绝大多数被子植物的传粉依赖各种传粉动物,促进传粉的发生被认为是植物各种花特征进化的主要动力(Van der niet & Johnson, 2012; Schiestl & Johnson, 2013)。目前在不同物种中报道过的访花者包括蜂类、蝇类、甲虫、鳞翅目、鸟类和蝙蝠等(Willmer, 2011)。可能因为体型小并多于傍晚活动,蕈蚊作为传粉者其重要性一直得不到重视。之前报道的蕈蚊传粉多出现在兰科、天南星科,另外最近发现天门冬科、马兜铃科、蓼科、夹竹桃科、虎耳草科和百合科的一些种也是由蕈蚊传粉,已知的蕈蚊传粉发生在广泛地理范围内的8大科25个属中,包括北美、中美洲、喜马拉雅山脉、东亚、新西兰、澳大利亚和南非(Phillips et al., 2014; Song et al., 2014; Mochizuki & Kawakita, 2017; Suetsugu & Sueyoshi, 2018),这说明蕈蚊传粉可能是一种广泛分布的传粉方式。前人报道的蕈蚊传粉的类群都是草本、藤本或灌木,而本研究第一次发现蕈蚊为高大龙脑香科乔木狭叶坡垒传粉,对了解蕈蚊传粉范围和重要性提供了又一证据。蕈蚊出现在潮湿阴凉的环境中,狭叶坡垒只出现在湿润的沟谷边,与蕈蚊生存环境相吻合。气味吸引机制是自然界最常见的方式之一,特定的花香物质对访花昆虫飞行定位起重要的引导作用。前人研究认为由花释放出的挥发性气体向外扩散,可以吸引数千米以外的传粉者(Andersson & Dobson, 2003),表明花气味对吸引远距离传粉者起重要作用。Vislobokov & Nikolay(2017)认为双翅目传粉者更有可能是被人类无法察觉的气味所吸引。Peakall et al.(2010)研究发现2,5-二烷基环己-1,3-二酮参与传粉昆虫黄蜂的吸引。Makholela & Manning(2006)对瑞香科植物*Struthiola ciliata*分析发现花香物质主要成分为松油醇、乙酸苜酯、5(或6)-三癸烯,与吸引夜蛾传粉有关。狭叶坡垒的花香分析表明 β -榄香烯、(E)-7,

11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯、1-石竹烯含量最高,可能是远距离吸引蕈蚊的主要花香气味。

人类对土地经营导致的生境片段化被认为是威胁一些植物生存繁衍的主要因素,其中传粉可能是受到生境片段化影响的重要环节之一(Johnson et al., 2004; 于华会等, 2010; Skogen et al., 2016)。Trang & Triest(2016)研究表明越南孤岛上的狭叶坡垒下一代杂合性低于预期,说明显著的近亲繁殖会存在近交衰退现象。根据狭叶坡垒野外种群调查发现当前我国野生的狭叶坡垒也呈现出典型的片段化分布,处于片段化生境中的狭叶坡垒种群内个体数目少,可能对访花者的吸引力度不够,从而使片段生境可能影响到访花者的生存,阻断狭叶坡垒与传粉者的关联,进而影响狭叶坡垒授粉过程,导致繁育系统渐渐变化,可能使其生殖成功受到影响。接下来的研究内容应当包括自然居群中狭叶坡垒的传粉方式和坐果情况,传粉者对花气味和其他花特征的识别以及我国片段化的狭叶坡垒居群遗传多样性和种群遗传结构。

参考文献:

- APPANAN S, CHAN HT, 1981. Thrips: The pollinators of some dipterocarps [J]. *Malaysian For*, 44: 234-252.
- ANDERSON GJ, HILL JD, 2002. Many to flower, few to fruit: The reproductive biology of *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae) [J]. *Am J Bot*, 89(1): 67-78.
- ANDERSSON S, DOBSON HE, 2003. Behavioral foraging responses by the butterfly *heliconiuss melpomene* to *Lantana camara* floral scent [J]. *J Chem Ecol*, 29(10): 2303-2318.
- CHAI YX, CAI MY, JIN XL, et al., 2017. Pollination biology of *Michelia crassipes* [J]. *Guihaia*, 37(10): 1322-1329. [柴弋霞,蔡梦颖,金晓玲,等,2017. 紫花含笑传粉生物学初探 [J]. *广西植物*, 37(10): 1322-1329.]
- CHEN FJ, LIANG HW, WANG X, et al., 2007. Seed dormancy and germination characteristics of *Manglietia patungensis*, an endangered plant endemic to China [J]. *Biodivers Sci*, 15(5): 52-59. [陈发菊,梁宏伟,王旭,等,2007. 濒危植物巴东木莲种子休眠与萌发特性的研究 [J]. *生物多样性*, 15(5): 52-59.]
- CHEN G, SUN W, WANG X, et al., 2018. Conserving threatened widespread species: A case study using a traditional medicinal plant in Asia [J]. *Biodivers Conserv*, 28: 213-227.
- CRUDEN RW, 1977. Pollen-ovule: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants [J]. *Evolution*, 35(1): 1-6.

- DAFNI A, 1992. Pollination biology-practical approach [M]. New York: Oxford University Press: 1-57.
- FANG ZM, HU XH, LIU CQ, et al., 2018. A new method for quantitative analysis of flower scent of *Siraitia grosveorii* [J]. *Guihaia*, 38(11): 1505-1511. [方振名, 胡兴华, 刘长秋, 等, 2018. 罗汉果花气味物质质量分析方法研究 [J]. *广西植物*, 38(11): 1505-1511.]
- HUANG SX, CHEN H, PAN B, et al., 2008. Characteristics of *Hopea chinensis* community an endemic and endangered species in Guangxi [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 28(1): 164-170. [黄仕训, 陈泓, 盘波, 等, 2008. 广西特有濒危植物狭叶坡垒群落特征研究 [J]. *西北植物学报*, 28(1): 164-170.]
- JOHNSON SD, NEAL PR, PETER CI, et al., 2004. Fruiting failure and limited recruitment in remnant populations of the hawkmoth-pollinated tree *Oxyanthus pyriformis* subsp. *pyriformis* (Rubiaceae) [J]. *Biol Conserv*, 120(1): 1-39.
- LI QM, 2002. Studies on conservation genetics of two endangered dipterocarps [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences: 1-144. [李巧明, 2002. 龙脑香科两种濒危植物的保护遗传学研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所: 1-144.]
- LI FL, LIANG HW, WANG X, et al., 2007. Study on seed dormancy and germination characteristics of endangered plant *Manglietia patungensis* [J]. *Biodivers Sci*, 15(5): 492-499. [李凤兰, 梁宏伟, 王旭, 等, 2007. 濒危植物巴东木莲种子休眠与萌发特性的研究 [J]. *生物多样性*, 15(5): 492-499.]
- LIU F, LI QJ, WANG CX, 2013. Floral characteristics and breeding systems of an endangered species *Cypripedium japonicum* [J]. *Sci Silv Sin*, 49(1): 53-60. [刘芬, 李全健, 王彩霞, 2013. 濒危植物扇脉杓兰的花部特征与繁育系统 [J]. *林业科学*, 49(1): 53-60.]
- MAKHOLELA T, MANNING JC, 2006. First report of moth pollination in *Struthiola ciliata* (Thymelaeaceae) in southern Africa [J]. *S Afr J Bot*, 72(4): 597-603.
- MOCHIZUKI K, KAWAKITA A, 2017. Pollination by fungus gnats and associated floral characteristics in five families of the Japanese flora [J]. *Ann Bot*, 121(4): 651-633.
- PEAKALL R, EBERTT D, POLDY J, et al., 2010. Pollinator specificity, floral odour chemistry and the phylogeny of Australian sexually deceptive *Chiloglottis orchids*: implications for pollinator-driven speciation [J]. *New Phytol*, 188(2): 437-450.
- PHILLIPS RD, SCACCABAROZZI D, RETTER BA, et al., 2014. Caught in the act: Pollination of sexually deceptive trap-flowers by fungus gnats in *Pterostylis* (Orchidaceae) [J]. *Ann Bot*, 113(4): 629-641.
- SONG YX, GUO SH, NIU DL, et al., 2008. A study on breeding system of the endangered plant *Cistanche deserticola* [J]. *Bull Bot Res*, 28(3): 278-282. [宋玉霞, 郭生虎, 牛东玲, 等, 2008. 濒危植物肉苁蓉繁育系统研究 [J]. *植物研究*, 28(3): 278-282.]
- SAWYER, NEIL W, 2010. Reproductive ecology of *Trillium recurvatum* (Trilliaceae) in Wisconsin [J]. *Am Midl Nat*, 163(1): 146-160.
- SCHIESTL FP, JOHNSON SD, 2013. Pollinator-mediated evolution of floralsignals [J]. *Trends Ecol Evol*, 28(5): 307-315.
- SONG B, CHEN G, STÖCKLIN J, et al., 2014. A new pollinating seed-consuming mutualism between *Rheum nobile* and a fly fungus gnat, *Bradysia* sp., involving pollinator attraction by a specific floral compound [J]. *New Phytol*, 203(4): 1109-1118.
- SHI YC, ZOU R, TANG JM, et al., 2015. Study on the floral biology and breeding system of *Heteroplexis* plants [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35(4): 824-829. [史艳财, 邹蓉, 唐健民, 等, 2015. 广西特有属—异裂菊属开花生物学及繁育系统特征 [J]. *西北植物学报*, 35(4): 824-829.]
- SKOGEN KA, JOGESH T, HILPMAN ET, et al., 2016. Land-use change has no detectable effect on reproduction of a disturbance-adapted, hawkmoth-pollinated plant species [J]. *Am J Bot*, 103(11): 1-14.
- SUETSUGU K, SUEYOSHI M, 2018. Specialized pollination by fungus gnats in the introduced population of *Aspidistra elatior* [J]. *J Plant Res*, 131(3): 497-503.
- TRAGN T, TRIEST L, 2016. Genetic structure of the threatened *Hopea chinensis* in the Quang Ninh Province, Vietnam [J]. *Genet Mol Res*, 15(2): 1-13.
- VAN DER NIET T, JOHNSON SD, 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms [J]. *Trends Ecol Evol*, 27(6): 353-361.
- VISLOBOKOV, NIKOLAY A, 2017. Flowering biology of *Aspidistra* (Asparagaceae): New data on pollination by dipteran insects [J]. *Plant Spec Biol*, 32(4): 412-422.
- WANG J, 2012. Breeding system of *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* and its endangered cause analysis of reproductive biology [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry: 1-96. [王洁, 2012. 凹叶厚朴繁育系统研究及其濒危的生殖生物学原因分析 [D]. 北京: 中国林业科学研究院: 1-96.]
- WIENS D, NICKRENT DL, DAVERN CI, et al., 1989. Developmental failure and loss of reproductive capacity in the rare palaeoendemic shrub *Dedeckera eurekensis* [J]. *Nature*, 338(6210): 65-67.
- WILLMER P, 2011. Pollination and floralecology [M]. USA, Princeton: Princeton University Press.
- YU HH, YANG ZL, LIU RN, et al., 2010. Genetic structure of six *Magnolia officinalis* populations in Sichuan Province [J]. *Chin J Ecol*, 29(11): 2168-2174. [于华会, 杨志玲, 刘若楠, 等, 2010. 四川六个厚朴种群遗传结构 [J]. *生态学杂志*, 29(11): 2168-2174.]
- ZHANG WB, JIN ZX, 2008. Flowering phenology and pollination on success of an endangered plant *Sinocalycanthus chinensis* [J]. *Acta Ecol Sin*, (8): 4037-4046. [张文标, 金则新, 2008. 濒危植物夏蜡梅的开花物候与传粉成功 [J]. *生态学报*, (8): 4037-4046.]
- ZHANG AQ, HE S, MA SJ, 2011. Study on control of flowering time and pollination efficiency of *Alfalfa* [J]. *Chin J Grassl*, 33(2): 7-11. [张爱勤, 何爽, 马生军, 2011. 苜蓿花期调控与传粉效率的研究 [J]. *中国草地学报*, 33(2): 7-11.]