

梭砂贝母的传粉生物学研究

高永茜¹, 张立轩², 汪明润², 宋波^{3*}

(1. 云南林业职业技术学院 生态与环境工程学院, 云南 昆明 650224;

2. 贵州省林业学校, 贵州 贵阳 550201;

3. 中国科学院 昆明植物研究所 东亚植物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要 为了探明梭砂贝母 *Fritillaria delavayi* 的繁殖特性, 对其传粉生态学进行了观察和实验。结果表明, 梭砂贝母套袋后也能结实(11%), 但远低于自然条件下的结实率(87%), 说明梭砂贝母的传粉过程主要依赖传粉媒介完成。苏氏熊蜂 *Bombus sushikini* 是其主要的传粉昆虫, 访花频率每朵花为 0.003 次/min。整个种群的花期长达 35 d, 单花的花期为 11 d, 花粉活力和柱头可授性均可维持 9 d, 长于已报道的其他贝母属植物。熊蜂传粉和较长的花粉活力与柱头持续能力可能是梭砂贝母在极端恶劣的高山地区维持有性生殖的一个重要原因。

关键词 梭砂贝母; 花粉活力; 柱头可授性; 繁育系统

梭砂贝母 *Fritillaria delavayi* Franch. 系百合科 Liliaceae 贝母属 *Fritillaria* 多年生草本植物, 主要分布在云南西北部、四川西部、青海南部(杂多、囊谦)和西藏(拉萨至亚东)海拔 3 800 ~ 4 700 m 的高山流石滩^[1]。梭砂贝母的鳞茎具有润肺散结, 止咳化痰的功效, 是具有重要价值的藏药植物资源^[2]。近年来, 在经济利益的驱动下, 当地群众对自然条件下的梭砂贝母进行了无序的采挖, 加上全球变化引起流石滩生境片段化^[3], 其种群受到严重威胁。因此, 一方面, 采取措施保护自然资源; 另一方面, 进行人工规模化种植, 满足市场的药用需求, 迫在眉睫。繁殖是研究进化问题的核心, 也是研究生物进化问题的关键, 所以, 弄清楚繁殖特性是开展资源保护与开发、利用的前提。然而, 由于梭砂贝母分布在高海拔地区, 自然条件恶劣和交通不便, 目前关于梭砂贝母的研究主要集中在形态分类^[4]、化学成分与活性^[5]和组织培养^[6]等方面, 其繁殖特性迄今未见报道。本试验重点研究梭砂贝母的传粉生物学, 揭示该植物的繁殖特性, 为今后梭砂贝母的人工规模种植与种质资源保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 研究地点与材料

观察和试验在云南省香格里拉县翁水村瀑勇垭口开展。瀑勇垭口位于青藏高原和横断山的过渡地带(28°24' N—99°55' E, 海拔 4 490 m), 气候主要受亚洲季风和青藏高原带来的高原季风的影响, 年均温 -1.0 °C, 平均最高气温为 4.2 °C, 极端最高气温为 16.2 °C, 平均最低气温 -4.5 °C, 极端低温为 -24.5 °C。年降水量 800 mm 以上, 其中雨季(6 月下旬至 8 月中旬)降水量达 375 ~ 600 mm, 平均风速为 3.4 m · s⁻¹, 其中, 5 ~ 9 月平均风速较小, 为 2.9 ~ 3.1 m · s⁻¹^[7]。

研究材料为野生梭砂贝母 *F. delavayi*。

1.2 花综合特征

1.2.1 开花过程 随机选取并标记 10 朵花蕾进行跟踪观察, 记录每个花蕾的开花时间和雌雄蕊的发育动态及相对位置, 直到花冠完全闭合。

1.2.2 花粉胚珠比例(P/O) 随机摘取 10 个花蕾固定于 FAA 中, 带回实验室。将每朵花的全部花药置于蒸馏水中, 用玻璃棒挤碎并定容于 1 mL 的离心管中, 充分摇匀后用移液枪取出 1 μL 在显微镜下计数, 重复 5 次, 最后计算出每朵花的花粉数目。剖开相同花的子房, 在光学显微镜(Olympus BH-2)下统计胚珠数目。每朵花的 P/O 比用该花的花粉总数除以胚珠数目计算。

1.2.3 花蜜量检测 在梭砂贝母盛花期的晴天, 随

收稿日期 2013-10-30

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(2013Y196); 中国科学院“西部学院”人才培养计划西部博士项目(2014312D11015)

通信作者 * 宋波, 博士, 助理研究员, 主要从事植物资源与进化生态学方面的研究, E-mail: songbo@mail.rib.ac.cn

机选取 5 朵花,分别在 9:00,11:00,13:00,15:00,17:00 测量花蜜量。每次测量时,利用毛细玻璃管吸取每朵花所有蜜腺中的花蜜,用游标卡尺测量毛细管内花蜜的长度,最后计算单花花蜜量。

1.3 花粉活力与柱头可授性检测

花粉活力利用花粉萌发率法检测^[7]。在梭砂贝母的盛花期,每天 9:00 标记刚散粉的花 5 朵并套袋。10 d 后,将所有花的花药分别放置在含有 10% 的蔗糖溶液的离心管中,待 24 h 后在光学显微镜下统计花粉的萌发情况。

柱头可授性利用 MTT 溶液进行检测^[8]。每天中午采集处于不同花期的花朵,将其柱头置于盛有 MTT 溶液的凹面载玻片的凹陷处,若柱头呈现蓝色则表明可授,否则为不可授。

1.4 繁育系统检测

在梭砂贝母的盛花期,随机挑选 40 朵花蕾进行以下 4 种处理(每种处理 10 朵):自然对照,不作任何处理,检测自然条件下的传粉情况;不去雄套袋,检测是否需要传粉者;去雄套袋,检测是否存在无融合生殖;去雄不套袋,检测异花花粉对结实的贡献。果实成熟后带回实验室统计结实率。

1.5 访花昆虫观察

在梭砂贝母的盛花期选择 10 个开花的植株,在整个花期的 9:00—17:00 观察访花昆虫,并记录访花时间和访花行为。观察结束后,捕捉访花昆虫,置于毒瓶内杀死,阴干制成标本,送交浙江农林大学鉴定。

1.6 数据分析

利用 SPSS 18.0 软件包对花粉活力、花蜜分泌量、结实率、传粉昆虫拜访频率进行单因素方差分析和多重比较。

2 结果与分析

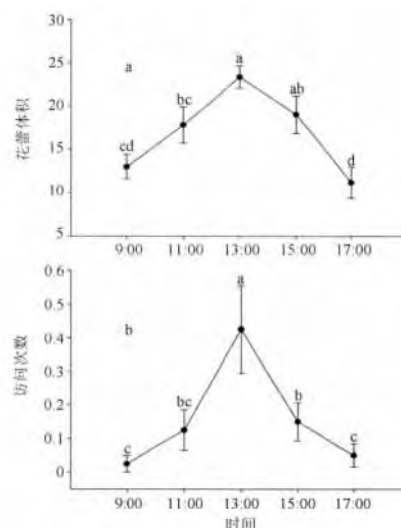
2.1 花综合特征

梭砂贝母每个植株只开 1 朵花,顶生,花冠向下垂。从现蕾到花开放持续约 5~6 d,花蕾顶径与底径接近相等,呈长筒形,6 个花药占据中心位置并包围雌蕊。花开放当天,柱头延长并三裂,长于花药(0.47 ± 0.10) cm,表面出现黏液,而此时花药并未散粉。花开放第 3 天,花药开始散粉,各个花药逐个散粉,散粉方式为纵裂。花开放 6~7 d 后,花冠顶端逐渐收缩,最后闭合形成倒圆锥形直至果实成熟,单花花期持续 11 d。整个种群的开花从 6 月初到 7

月初持续约 35 d。

梭砂贝母的花粉数目为 $68\,731 \pm 8\,076$,胚珠数目为 108 ± 12 ,P/O 为 638 ± 67 ,其繁育系统应该属于兼性异交。

梭砂贝母的花蜜分泌量在不同时间存在显著差异($F_{4,20} = 8.61, P < 0.001$,图 1)。在早上 9:00 产生的花蜜为 $(13.0 \pm 3.2) \mu\text{L}$,随着时间的推移,花蜜量逐渐增加,13:00 时达到最大值(23.3 ± 3.1) μL ,之后又逐渐下降,到 17:00 时为 $(11.2 \pm 4.0) \mu\text{L}$,总的平均花蜜量为 $17.0 \mu\text{L}$ 。



不同的字母表示差异达到显著水平($P < 0.05$), $n = 5$ 。

图 1 梭砂贝母单花花蜜分泌的日变化(a)及苏氏熊蜂在不同时间段内对梭砂贝母的访问频率(b)

Fig. 1 Amount of nectar in a day for a single flower of *Fritillaria delavayi* (a) and visiting times of *Bombus sushikini* on *F. delavayi* at different time(b)

2.2 花粉活力与柱头可授性

花粉萌发试验表明,梭砂贝母的花粉在散粉后 7 d 内均具有较高的活力($> 80\%$),7 d 内没有显著的差异($F_{9,40} = 34.59, P < 0.001$,表 1)。第 8 天开始降低,说明有效的花粉活力可以维持 7 d。花粉活力虽然从第 8 d 开始下降,但是直到第 9 d 后仍然有一定的活力($> 45\%$,表 1)。梭砂贝母的柱头在开花当天至开花第 9 天内均可授,而开花当天至开花第 7 天具有强的可授性,第 8 天开始减弱,第 10 天就完全不可授(表 1)。此外,梭砂贝母的柱头在花药还没有开始散粉时就已经可授,说明梭砂贝母具有雌性先熟的特点(表 1)。

表 1 梭砂贝母的花粉活力与柱头可授性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Pollen viability and stigma receptivity of *Fritillaria delavayi* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

天数/d	花粉活力/%	柱头可授性
开花第 1 天	未散粉	+++
开花第 2 天	未散粉	+++
开花第 3 天	82.7 ± 4.9 ^a	+++
开花第 4 天	85.9 ± 3.3 ^a	+++
开花第 5 天	84.4 ± 4.1 ^a	+++
开花第 6 天	86.7 ± 3.1 ^a	+++
开花第 7 天	85.4 ± 3.3 ^a	+++
开花第 8 天	83.3 ± 4.7 ^a	++
开花第 9 天	84.3 ± 5.4 ^a	+ / -
开花第 10 天	68.9 ± 4.1 ^b	-
开花第 11 天	45.8 ± 8.9 ^c	-

注:不同的字母表示差异达到显著水平, $P < 0.05$ (表 2 同)。

2.3 繁育系统检测

梭砂贝母在人工去雄套袋后坐果率和结实率都为 0,说明梭砂贝母不存在无融合生殖现象。不去雄套袋后,有 50% 的坐果率,结实率为 11%,说明梭砂贝母具有一定的自花传粉能力,但是显著低于自然对照和去雄套袋后的结实率,说明梭砂贝母的授粉过程主要依赖传粉媒介(表 2)。

表 2 梭砂贝母不同传粉处理的坐果率和结实率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Fruit set ratio and seed set of *Fritillaria delavayi* of different pollination treatments ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

处理	坐果率	结实率
自然对照	90	87.22 ± 5.23 ^a
不去雄套袋	50	11.0 ± 2.5 ^b
去雄套袋	0	0 ^d
去雄不套袋	80	73.10 ± 8.27 ^c

2.4 访花昆虫

在连续 8 d 的观察中,苏氏熊蜂 *Bombus sushiki-ni* 是最常见的访花昆虫,除此之外,偶尔有蚂蚁拜访。苏氏熊蜂在访花时,先停留在花冠外壁,由倒挂的钟型花冠口爬入花内取食花蜜,在爬行的过程中,其头部和背部都会碰到柱头和花药,说明它们的访花对传粉是有效的。在整个观察期内,苏氏熊蜂的平均访花频率为每朵花 0.155 次/h,最高的访花频率出现在 13:00 左右,每朵花达到 0.425 次/h (图 1),其活动规律与花蜜分泌规律一致。而蚂蚁身体较小,在花内活动时并不能接触到柱头,说明它们不

是梭砂贝母有效的传粉者,仅仅是盗蜜者。

3 讨论与结论

以往的研究指出,与低海拔地区相比,高山地区的恶劣环境导致昆虫的多样性、丰富度和活动能力较低,因此,高山植物通常存在花粉限制^[9]。然而,在本研究中,梭砂贝母在自然条件下的坐果率和结实率分别达到了 90%,87%,远远高于同域分布的其他高山植物^[10]。一些高山植物为应对高山上传粉昆虫拜访频率较低的限制因素,进化出了以下 3 种补偿机制以实现生殖保障:自动自交,植物通过自动自交的机制(如柱头主动向花药靠拢或花药向柱头运动)实现传粉^[11-12];传粉者转变,植物的传粉者转变为传粉效率更高的熊蜂^[9];花期延长,植物在缺少传粉昆虫的情况下,通过延长花期,增加被昆虫拜访的机率^[13]。梭砂贝母的柱头长于花药 0.47 cm 左右,雌蕊先于雄蕊 2 d 成熟,说明具有雌雄异位和不完全雌雄异熟的特点,应当是促进异交和避免自交的机制^[14];另外,作者在野外观察中发现,梭砂贝母的花在发育过程中缺乏自动自交的机制(如没有花药或柱头的运动)。然而,梭砂贝母不去雄套袋后仍有部分花能够结实(50%),这可能是由于梭砂贝母下垂花冠的特性使得柱头低于花药,由于重力作用或风晃动花冠导致部分花粉落置到柱头上,在一定程度上协助自交。但是,不去雄套袋后的结实率远远低于自然条件下的结实率,说明协助自交并不是梭砂贝母在自然条件下实现高结实率的主要原因。

与很多高山植物一样,梭砂贝母主要的访花昆虫为体型较大的熊蜂^[9]。在单次拜访过程中,体型较大的熊蜂比体型较小的蜜蜂或蝇类能携带更多的花粉量,进而更多的花粉被落置在柱头上,使更多的胚珠受精,花粉传递效率也就更高^[9,15]。因此,苏氏熊蜂传粉在一定程度上弥补了传粉者拜访不足的限制。事实上,苏氏熊蜂拜访梭砂贝母的频率为每朵花 0.003 次/min 远高于其他高山植物,例如,石生风铃草的传粉熊蜂在海拔 3 500 m 处的访花频率为 0.001 次/min^[9]。这一特点可能是由于梭砂贝母为访花昆虫提供了丰厚的花蜜回报(17.0 μL)。梭砂贝母的花蜜分泌日变化规律与苏氏熊蜂拜访频率的日变化规律相一致,说明梭砂贝母的花蜜供给与传粉昆虫的访花活动之间形成了时间上的协同进化,从而保证了相对较高的拜访频率。花的寿命(花粉活力和柱头可授的持续时间)直接影响花粉的有效

移动和接受^[14]。梭砂贝母的单花花期持续约11 d,花粉活力和柱头可授性均可维持9 d,这种花粉活力和柱头可授性的维持时间高于已报道的其他贝母属植物^[17-18]。较长的花持续期和柱头可授能力延长了花粉和柱头的展现时间,避免了因高山上恶劣的天气条件对植物传粉的影响,从而增加了花被昆虫拜访的机率。因此,传粉者为传粉效率更高的熊蜂和延长的花寿命可能是梭砂贝母在环境恶劣的高山上实现较高的坐果率和结实率的重要原因。

本研究说明,梭砂贝母不能进行无融合生殖;在自然条件下,梭砂贝母具有相对较高的坐果率和结实率,但是其自动自交的能力较低,传粉过程主要依赖传粉媒介完成,苏氏熊蜂是其有效的传粉者;尽管梭砂贝母的花期较长,但是最佳授粉时期应该是花开放7 d内。

参考文献

- [1] 欧珠朗杰. 藏药材——梭砂贝母组织培养研究[J]. 西藏科技, 2012, 9: 72.
- [2] 李萍, 季晖, 徐国钧, 等. 贝母类中药的镇咳祛痰作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(6): 360.
- [3] Song B, Stöcklin J, Zhang Z Q, et al. Seed and microsite limitation in *Rheumobile*, a rare and endemic plant from the subnival zone of Sino-Himalaya[J]. Plant Ecol Divers, 2013, 6(3): 509.
- [4] 中国植物志编纂委员会. 中国植物志. 第24卷[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 132.
- [5] 徐惠波, 孙晓波, 温富春, 等. 伊犁贝母和梭砂贝母生理活性的初步比较[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 391.
- [6] 王宇. 山地气候学[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006: 145.
- [7] 侯勤正, 段元文, 司庆文, 等. 青藏高原晚期开花植物线叶龙胆的传粉生态学[J]. 植物生态学报, 2009, 33(6): 1156.
- [8] Rodriguez-Riano T, Dafni A. A new procedure to assess pollen viability[J]. Sex Plant Reprod, 2000, 12: 241.
- [9] Bingham R A, Orthner A R. Efficient pollination of alpine plants[J]. Nature, 1998, 391: 238.
- [10] García-Camacho R, Totland Ø. Pollination limitation in the Alpine: a meta-analysis[J]. Arct Antarct Alp Res, 2009, 41: 103.
- [11] Zhang Z Q, Li Q J. Autonomous selfing provides reproductive assurance in an alpine ginger *Roscoeae schneideriana* (Zingiberaceae)[J]. Am J Bot, 2008, 102: 531.
- [12] Xiong X Z, Fang Q, Huang S Q. Pollinator scarcity drives the shift to delayed selfing in Himalayan mayapple *Podophyllum hexandrum* (Berberidaceae)[J]. AoB Plants, 2013, 5: pii037.
- [13] Primack R B. Longevity of individual flowers[J]. Ann Rev Ecol Syst, 1985, 16: 15.
- [14] Anderson B, Midgley J J, Stewart B A. Facilitated selfing offers reproductive assurance: a mutualism between a hemipteran and carnivorous plant[J]. Am J Bot, 2003, 90: 1009.
- [15] Fishbein M, Venable D L. Diversity and temporal changes in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*[J]. Ecology, 1996, 77: 1061.
- [16] Schoen D J, Ashman T L. The evolution of floral longevity: resource allocation to maintenance vs. construction of repeated parts in modular organisms[J]. Evolution, 1995, 49: 131.
- [17] 张少发, 魏建和, 陈士林, 等. 川贝母开花动态及授粉习性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 27.
- [18] 张晓军, 崔大练, 宗宪春, 等. 平贝母传粉生物学及繁育系统的研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1404.

Pollination biology of *Fritillaria delavayi*

GAO Yong-qian^{1*}, ZHANG Li-xuan², WANG Ming-run², SONG Bo^{3*}

(1. Department of Ecological and Environmental Engineering, Yunnan Forestry Technological College, Kunming 650224, China;

2. Guizhou Forestry School, Guiyang 550201, China; 3. Key Laboratory of Plant Diversity and Biogeography of

East Asian, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

[Abstract] In this study, the processes of pollination ecology of *Fritillaria delavayi* were investigated to document its reproductive characteristics. Some individuals of *F. delavayi* could produce seeds under bagging without emasculation (11%), but the rate was significantly lower than that of the natural control (87%). It is suggesting that pollination of *F. delavayi* largely depends on pollen vectors. *Bombus sushikini* was the only effective pollinator of *F. delavayi* and the visitation frequency was 0.003 time · flower⁻¹ · min⁻¹. Flowering of *F. delavayi* in whole population lasted for 35 d and single flower for 11 d. Pollen viability and stigma receptivity lasted for 9 d and were relatively long compared with other *Fritillaria* genus plants. Consequently, bumblebee pollination and long floral longevity seem to be important for reproductive assurance of *F. delavayi* in harsh alpine environments.

[Key words] *Fritillaria delavayi*; pollen viability; stigma receptivity; reproductive system

doi:10.4268/cjcm20141009

责任编辑 吕冬梅