

小毛茛雌蕊群的授粉率及花粉管生长途径

李相时, 赵 博, 汪小凡

(武汉大学生命科学学院 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 为探讨毛茛属中是否具有与慈姑属中类似的花粉管再分配现象, 对小毛茛开花后不同时期柱头的授粉率和花粉量进行了统计, 并采用荧光显微术观察了其花粉在雌蕊群中的萌发及花粉管生长过程。该种的每朵花中含有 39.2 ± 9.9 个离生心皮, 开花过程常持续 4 ~ 6 d, 开花 2 d 后, 柱头授粉率就可达到 100%, 平均每柱头的花粉量在 3 d 后达到 17.0 ± 2.4 粒。虽然开花的当天即有少数柱头落置有花粉粒, 但花粉萌发常自开花的次日开始。花粉管先沿各雌蕊之向心一侧的组织中穿行至子房基部后部分花粉管转向胚珠, 由珠孔进入珠心。从花粉粒落置于柱头到花粉管进入珠心大约需要 24 h。尽管毛茛属有着与慈姑属类似的多心皮雌蕊群, 但大量的荧光显微观察表明, 与慈姑属植物中不同的是, 小毛茛的花粉管生长均局限于每一雌蕊中而不能穿过子房向其他雌蕊生长。雌蕊群的比较解剖发现: 野慈姑的子房基部有一条通向花托表面的孔道, 这正是花粉管由一个雌蕊到另一个雌蕊的通路, 但小毛茛的子房基部不存在此孔道。

关键词: 小毛茛; 传粉效率; 花粉管生长; 花粉管的再分配

中图分类号: Q 944.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)03-236-05

Pollination Rate and Pollen Tube Growth in the Gynoecium of *Ranunculus ternatus* (Ranunculaceae)

LI Xiang-Shi, ZHAO Bo, WANG Xiao-Fan^{**}

(College of Life Sciences Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: To detect whether the apocarpous gynoecia of *Ranunculus* exhibits the phenomenon of pollen tube reallocation, which was reported in *Sagittaria potamogetifolia*, the pollination rate and the number of pollen grains deposited on stigmas of *Ranunculus ternatus* were examined at different time after flower opening, the pollen germination and the pollen tube growth in the apocarpous gynoecia were observed with fluorescence microscopy. The number of apocarpous carpels averaged 39.2 ± 9.9 per flower, and the florescence lasted 4 to 6 days. Pollination rate could reach 100% 2 days after flower opening, and the number of pollen grains reached 17.0 ± 2.4 per pistil 3 days after flower opening. Generally, a few of pollen were deposited on stigma in the first day after flower opening, but they germinated next day. Pollen tubes grew through the centripetal tissues to the base of pistils, and then one of them turned towards ovule, and finally entered the nucellus. It would take about 24 hours from pollens loading on pistils to pollen tubes entering ovules. The polycarpous gynoecium of *Ranunculus* is similar to that of *Sagittaria*, however, the observation with fluorescence microscopy indicated that the pollen tube of *R. ternatus* grew restrictedly in each pistil and didn't enter neighboring ovary. A comparative anatomy of the gynoecia showed that there is a hole on the base of each ovary in *S. trifolia*, which is the path of pollen tube reallocation, but the similar canal in the base of ovary was not found in the pistil of *R. ternatus*.

Key words: *Ranunculus ternatus* Thunb.; Pollination efficiency; Pollen tube growth; Pollen tube reallocation

基金项目: 国家自然科学基金 (30470121)

通讯作者: Author for correspondence. E-mail: wang-xiaofan@263.net

收稿日期: 2005-09-12, 2006-02-15 接受发表

作者简介: 李相时 (1978-) 男, 在读硕士生, 研究方向植物生殖遗传学。

花粉在雌性器官的落置、萌发、花粉管生长并到达胚珠是被子植物有性生殖成功的必要条件，传粉效率因此被认为与结实率之间存在着必然的因果关系。Wang 等 (2002) 在小慈姑 (*Sagittaria potamogetifolia* Merr.) 的多心皮雌蕊群中发现花粉管可穿过雌蕊的基部到达花托表层而后进入另一雌蕊中，这种现象被称为“花粉管再分配 (pollen tube reallocation)”，并被认为对多心皮类的生殖保障有重要意义。此前，Williams 等 (1993) 也曾在一角科植物 *Illicium floridanum* 中观察到花粉管在心皮间的生长所形成的“功能性合生心皮”，并把这理解为从离生心皮向合生心皮进化的过渡阶段。事实上，由离生心皮向合生心皮的进化性转变曾独立的发生过 17 次 (Ambruster 等, 2002)，处在被子植物演化的不同分支中的具多心皮雌蕊群的植物的传粉效率和是否具有花粉管再分配机制是值得关注的问题。

小毛茛 (*Ranunculus tematus* Thunb.) 是毛茛科的多年生小草本植物。分布于我国陕西、河南南部及湖北、湖南、江西、广西等省区，日本亦有分布 (王文采, 1995, 1980)。廖亮等 (1991) 曾对其进行过核型分析；张竞男等 (2001) 对其形态变异作过数量分析；汪小凡等 (2001) 用等位酶分析方法研究了该种的居群遗传分化，并认为其居群间的遗传距离与空间距离呈正相关；王金平等 (1999) 的研究认为该种以虫媒传粉为主，花粉萌发启动较迟缓而花粉活力维持时间较长。目前，该种的传粉效率和花粉管生长途径等还未见报道。小毛茛花为两性，但它具有与慈姑属植物相似的离生心皮雌蕊群结构。本研究将统计小毛茛的传粉效率，比较观察该种与慈姑属植物的花粉管生长途径，并探讨具离生心皮雌蕊群的植物的不同的生殖保障机制。

1 材料和方法

1.1 柱头授粉率的观察和统计

供试材料采自武汉大学校园的小毛茛自然居群。从花瓣开始张开时计，按开花后 0.5 d, 1.0 d, 1.5 d, 2.0 d, 3.0 d 和 4.0 d 共分 6 个阶段取材，每阶段约取花 10 朵，在 Olympus SZ-10 体视显微镜下随机观察每朵花雌蕊群上的 20~30 个柱头，统计其上落置的同种花粉粒的数量。计算出每柱头的平均授粉量，并统计每朵花的雌蕊群中已

授粉的雌蕊的比例占全部雌蕊的比例，即授粉率。

1.2 花粉管生长途径的荧光显微观察

取不同开花时期的小毛茛花中的雌蕊群，以卡诺氏固定液固定 1 h 后转入 FAA 固定液固定、保存。花粉管荧光染色方法参照 Kho and Baer (1968)、Guo 等 (1990)、Tangmitcharoen and Owens (1997) 及 Wang 等 (2002)。从固定的雌蕊群中取部分雌蕊，材料经蒸馏水漂洗后，以 5% NaOH 溶液室温下透明处理 2~4 h，漂洗，以 0.1% 水溶性苯胺蓝 (以 1.30 mol/L K_3PO_4 溶液配制) 染色 0.5~1 h；染色好的材料置于载玻片上，以 50% 甘油 (内含 0.05% 水溶性苯胺蓝) 整体装片。在 Olympus X-60 荧光显微镜下，用 390~430 nm 波长的光观察花粉管的生长途径并拍照。取不同开花时期的野慈姑雌蕊群，以相同方法进行荧光染色并观察其花粉管生长路径，作为对比。

1.3 雌蕊群的比较解剖

取已受粉的小毛茛和野慈姑雌蕊群，以卡诺氏固定液固定 1 h 后转入 FAA 固定液固定、保存。采用常规的石蜡切片法制片，将雌蕊纵切，切片厚度为 10 μ m，番红-固绿染色，Olympus X-60 显微镜明场下观察雌蕊群的结构和花粉管通道并拍照。

2 结果

2.1 传粉效率

2.1.1 柱头授粉率 小毛茛每朵花的雌蕊群中平均含离生雌蕊 39.2 ± 9.9 枚，持续开花时间为 4~6 d。小毛茛开花 1 d 内即有约 60% 的柱头有花粉落置，而后，自然授粉率逐渐增高，在正常天气条件下，开花 3 d 后就达到或接近 100% (图 1)。但阴雨天气可能对其授粉率有一定影响。

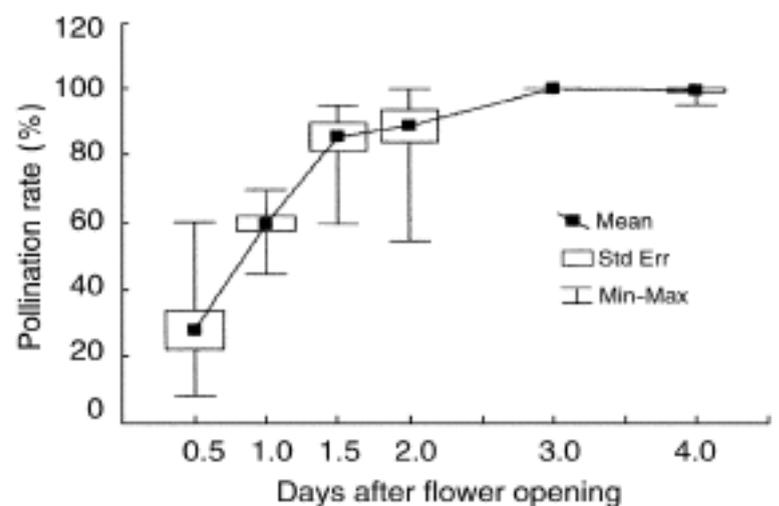


图 1 小毛茛开花后不同时期雌蕊群的授粉率

Fig. 1 Pollination rates in gynoecia of *Ranunculus tematus* in different time after flower opening

2.1.2 落置于柱头的花粉量 从图 2 可以看出，小毛茛开花后的 0.5~1 d 平均每柱头的花粉量并不

高, 在 2 d 后授粉量剧增, 3 d 时达到较高水平, 平均每柱头达 17.0 ± 2.4 粒, 此后授粉量仅略有增加。

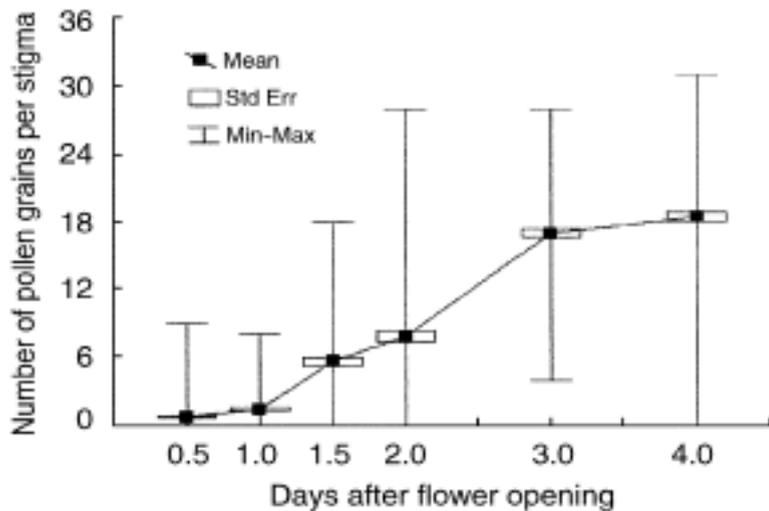


图 2 小毛茛开花后不同时期柱头上的花粉量

Fig. 2 Number of pollen grains deposited on stigmas of *Ranunculus ternatus* in different time after flower opening

2.2 花粉管生长路径

经 0.1% 水溶性苯胺蓝染色后在荧光显微镜下观察, 小毛茛的花粉粒及花粉管均呈现很强的荧光, 可以较为方便地看到花粉粒的落置情况和花粉管的生长路径。在开花后的 1 d 中, 小毛茛柱头上虽已落置有少量花粉粒, 但极少萌发, 开花 2 d 的雌蕊群中才观察到花粉大多已萌发出花粉管。落置在柱头上的花粉萌发后, 所有花粉管沿着柱头一侧进入花柱 (图 3: A), 在雌蕊向心一侧组织中向子房的基部穿行 (图 3: B), 至子房基部后, 其中部分花粉管在胚珠下方绕行至珠孔, 最终有 1 根进入珠心, 以完成受精过程 (图 3: C, D)。花粉从落至柱头, 再到萌发及进入胚珠整个过程约 24 h。

对照野慈姑的花粉管生长存在着与其同属的小慈姑中一样的“花粉管再分配”途径 (Wang 等, 2002): 花粉管可以穿过子房基部到达花托表层, 进而进入其他相邻雌蕊的子房中 (图 3: E)。相比之下, 小毛茛的花粉管不能穿过子房基部, 因而被局限在每一雌蕊内, 不存在花粉管的雌蕊间生长途径 (图 3: D), 其每雌蕊中除 1 根花粉管进入胚珠外, 其余中止生长。事实上, 由于小毛茛具有极高的授粉率, 因此, 其雌蕊群中的每个雌蕊的胚珠都有花粉管进入。

2.3 花粉管生长的通道

小毛茛和野慈姑具有结构相似的离生心皮雌蕊群, 但雌蕊的解剖构造存在着一种重要的差别

(图 3: F, G): 从雌蕊的纵切面上看, 野慈姑子房的下方有一开口, 对比图 E、G 即可知其雌蕊中的花粉管正是经过此孔道从子房基部伸出; 而小毛茛的子房是完全闭合的, 其底部没有任何开口。可以认为, 子房基部是否存在着这一穿孔可能是决定是否存在着花粉管再分配现象的前提条件之一。

3 讨论

3.1 多心皮雌蕊群的授粉率与繁殖保障

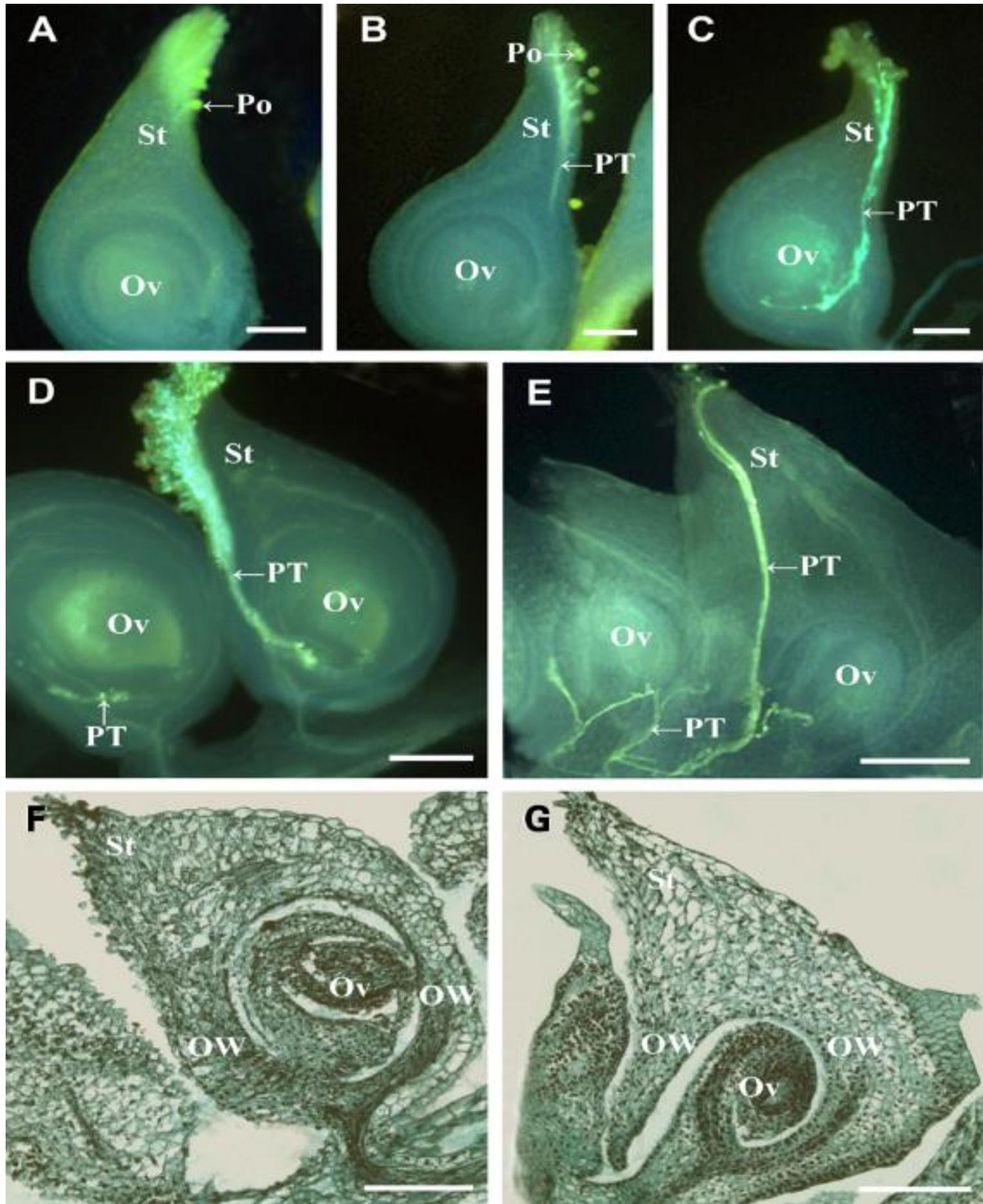
对于一个多心皮雌蕊群而言, 在自然状态下其全部柱头是否能得以授粉以及在授粉率不能保障的情况下如何产生足够多的具有竞争力的子代是值得关注的问题。在双子叶多心皮植物鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) 中的研究表明, 其雌蕊群中的低授粉率直接导致了低结实率 (黄双全等, 1998)。而单子叶多心皮类群泽泻科中, 结实率高于柱头授粉率则是另一种更为值得注意的事实: 自然状态下, 小慈姑的柱头授粉率为 80% ~ 85%, 结实率却接近 100%, 进一步研究发现, “花粉管再分配”作为一种繁殖保障机制在其中起着重要作用 (Wang 等, 2002)。此外, 闭花授粉通常被认为是一种提高传粉效率的机制, 因而是保障有性生殖成功的另一途径 (Lord, 1981; Lloyd and Schoen, 1992)。小毛茛具有多心皮雌蕊群, 但并不具备上述两种生殖保障机制。王金平等 (1999) 的研究表明, 小毛茛兼具风媒和虫媒传粉方式, 而以虫媒传粉为主。本研究发现, 在正常的天气条件下, 该种的授粉率可达到或接近 100%, 说明其传粉机制是有效的。作者认为, 小毛茛的极高授粉率与其较长的单花花期和柱头可授粉期有关, 该种的每一朵花可持续开放 4 ~ 6 d, 这给每一柱头带来更多的接受花粉的机会。相比之下, 小慈姑的柱头可授粉期在 6 h 之内 (Wang 等, 2002)。正是由于小毛茛的雌蕊群具有极高的授粉率, 尽管它并不具有与慈姑属类似的花粉管生长途径, 其结实率依然可得以保障。

3.2 雌蕊结构与花粉管生长途径

花粉管在花柱中的定向生长被认为是受某种信号引导的, 但实质上尚未得到很好的了解 (Malho and Trewavas, 1996)。已有实验表明多种植物的雌蕊中 Ca^{2+} 梯度与花粉管的定向生长有关 (Hepler, 1997; Wilhelmi and Preuss, 1997), 其他相

关因子还包括脂类 (Wolters-Arts 等, 1998)、葡萄糖 (Reger 等, 1992) 甚至水份梯度 (Lush 等, 2000) 等。近些年来, TTS (transmitting tissue-specific glycoprotein) 和 AGPs (Arabinogalactan proteins) 的作用更是倍受关注 (Wu 等, 1995; Mollet 等, 2002)。以往

的研究多集中于某些模式植物, 它们的花粉管只是向着各雌蕊的珠心定向生长。而在慈姑属等的雌蕊群中花粉管可以从一个雌蕊经由花托组织转向另一个的胚珠, 对这种特殊的花粉管生长途径向性机理的探讨是必要的和更有吸引力的。



St: 花柱 (style); Ov: 胚珠 (ovule); OW: 子房壁 (ovary wall); Po: 花粉 (pollen); PT: 花粉管 (pollen tube)

图3 小毛茛和野慈姑的花粉管生长与子房结构: A, B, C. 小毛茛开花 1 d 后, 花粉萌发与花粉管生长途径; D. 小毛茛的花粉管生长局限于各雌蕊内; E. 野慈姑花粉管进入相邻雌蕊; F, G. 雌蕊纵切面, 示野慈姑子房底部的孔道。(标尺 = 500 μm)

Fig. 3 Pollen tube growth and pistillary structure in *Ranunculus tematus* and *Sagittaria trifolia*: A, B, C. Pollen germination and pollen tube growth in *R. tematus*; D. Pollen tubes were limited in each single pistil in *R. tematus*; E. Pollen tubes enter neighboring ovules in *S. trifolia*. routine paraffin embedded sectioning technique; F, G. The longitudinal section of pistil, showing a hole through the base of ovule in *S. trifolia*. (Bar = 500 μm)

本研究的结果则提示,雌蕊本身的结构可能是决定多心皮雌蕊群中花粉管生长途径的另一个至关重要的因素。野慈姑每个子房基部的穿孔,为花粉管生长提供了通道,这至少给花粉管从一个雌蕊生长到另一个雌蕊带来便利。同样,Williams等(1993)在报道八角科植物 *I. floridanum* 的花粉管在雌蕊之间生长这一现象时,也提出其子房基部存在穿孔作为花粉管的通道。而相反,小毛茛的子房则是完全封闭的,这样,不管其相邻雌蕊的柱头是否授粉,都没有观察到其花粉管从一个雌蕊生长到另一个雌蕊中。

Ambruster等(2002)指出,在被子植物进化史上,由离生心皮向合生心皮的进化性转变就至少已独立发生过17次,这种转变带来的可能的好处是来自花柱中的花粉管可以到达不同心皮的胚珠中。在原始的离生心皮植物 *I. floridanum* 中,心皮间花粉管生长所形成的“功能性合生心皮”可以看作是由离生心皮向合生心皮进化过程中的最初阶段(Williams等,1993)。作者推测,子房基部的穿孔是由于心皮边缘的不完全愈合所形成的。有趣的是,这种结构存在于单子叶植物慈姑属和双子叶植物八角茴香属,却并不存在于毛茛属中。对更多的具离生心皮雌蕊群的植物类群的雌蕊结构和花粉管生长途径的研究可能能为探讨被子植物早期演化提高一些有价值的线索。

[参 考 文 献]

- 王文采编, 1980. 中国植物志 (第28卷) [M]. 北京: 科学出版社, 267—302
- Ambruster WS, Debeved EM, Willson MF, 2002. Evolution of syncarpy in angiosperms: theoretical and phylogenetic analysis of the effect of carpel fusion on offspring quantity [J]. *J Evol Biol*, 15: 657—672
- Guo YH, Sperry R, Cook CDK, et al, 1990. The pollination ecology of *Zannichellia palustris* L. (Zannichelliaceae) [J]. *Aquat Bot*, 38: 341—356
- Hepler PK, 1997. Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way [J]. *Trends Plant Sci*, 2: 79—80
- Huang SQ (黄双全), Guo YH (郭友好), Chen JK (陈家宽), 1998. Pollination rates and pollen tube growth in a vulnerable plant, *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. (Magnoliaceae) [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 36: 310—316
- Kho YO, Baer J, 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence [J]. *Euphytica*, 17: 298—302
- LiaoL (廖亮), Xu LL (徐玲玲), Yang DQ (杨涤清), 1991. Studies on the karyotypes of five species in *Ranunculus* from Jiangxi [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 29 (2): 178—183
- Lloyd DG, Schoen DJ, 1992. Self- and cross-fertilization in plants. Functional dimensions [J]. *Intern J Pl Sci*, 153: 358—369
- Lord EM, 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution [J]. *Bot Rev*, 47: 421—449
- Lush WM, Spurck T, Joosten R, 2000. Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant [J]. *Ann Bot*, 85 (supplement A): 39—47
- Malho R, Trewavas AJ, 1996. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation [J]. *Plant Cell*, 8: 1935—1949
- Mollet JC, Kim S, Jauh GY, et al, 2002. Aarbinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside [J]. *Protoplasma*, 219: 89—98
- Reger BJ, Chaubal R, Pressey R, 1992. Chemotropic response of pearl millet pollen tube [J]. *Sex Plant Reprod*, 5: 47—56
- Tangmitcharoen S, Owens JN, 1997. Floral biology, pollination, pistil receptivity, and pollen tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f.) [J]. *Ann Bot*, 79: 227—241
- Wang JP (王金平), Li TY (李天煜), Wang XF (汪小凡), et al, 1999. A primary research on potential of pollen flow in *Ranunculus ternatus* Thunb. [J]. *Guihaia* (广西植物), 19 (3): 225—228
- Wang WT (王文采), 1995. A revision of the genus *Ranunculus* in China (I) [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 15 (2): 137—180
- Wang XF (汪小凡), Liao WJ (廖万金), Song ZP (宋志平), 2001. Genetic differentiation and the relation to spatial isolation among populations of *Ranunculus ternatus* [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), 9 (2): 138—144
- Wang XF, Tao YB, Lu YT, 2002. Pollen tubes enter neighbouring ovules by way of receptacle tissue, resulting in increased fruit-set *Sagittaria potamogetifolia* Merr. [J]. *Ann Bot*, 89 (6): 791—796
- Wilhelmi LK, Preuss D, 1997. Pollen tube guidance in flowering plants [J]. *Plant Physiol*, 113: 307—312
- Williams EG, Sage TL, Thien LB, 1993. Functional syncarpy by intercarpellary growth of pollen tubes in a primitive apocarpous angiosperm, *Illicium floridanum* (Illiciaceae) [J]. *Amer J Bot*, 80: 137—142
- Wolters-Arts M, Luah WM, Mariani C, 1998. Lipids are required for directional pollen tube growth [J]. *Nature*, 392: 818—821
- Wu H, Wang H, Cheung AY, 1995. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein in deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower [J]. *Cell*, 82: 395—403
- Zhang JN (张竞男), Zhou W (周巍), Wang XF (汪小凡), et al, 2001. Primary studies on differentiation of populations in *Ranunculus ternatus* Thunb. (I) —— Inter- intro-population variance of morphological characteristics [J]. *Guihaia* (广西植物), 21 (2): 146—149