

3 种豆蔻属植物的异交率检测初报^{*}

陈绪超^{1,2}, 李庆军¹

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 花柱卷曲性机制是一种在姜科(Zingiberaceae)植物中新发现的传粉机制,也是唯一通过花柱运动和异型雌雄异熟相结合而形成的花的二型性.通过垂直直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)等位酶实验方法对姜科豆蔻属(*Amomum*)3种植物的异交率进行了检测、比较,发现具有花柱卷曲性机制的九翅砂仁(*A. maximum*)和腐花豆蔻(*A. putrescens*)的异交率显著高于不具有这一机制的阳春砂仁(*A. villosum*)的异交率;而且在具有花柱卷曲性的2个种中,上举型和下垂型2种表型的异交率存在差异,且上举型的异交率均高于下垂型的异交率,表明花柱卷曲性机制有避免自交促进异交的作用.

关键词: 交配系统; 等位酶; 花柱卷曲性; 姜科; 性别干扰

中图分类号: Q 944.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)05-0531-04

花柱卷曲性(flexistylly)是最近发现的一种植物通过花柱运动和花粉散布而实现不同表型间交配的机制,普遍存在于姜科(Zingiberaceae)豆蔻属(*Amomum*)^[1]和山姜属(*Alpinia*)植物中^[2~4].具有这一机制的植物种类其自然种群中具有2种表现型的个体:花柱上举型和花柱下垂型,在不同的时间内,2种表型的花通过花柱位置的变化来实现花雌、雄功能的转变,同种表现型花柱运动节律严格一致,而且花期仅为1d,避免同种表型花间的相互传粉,促进2种表现型间的交配^[4].

针对花柱卷曲性机制的适应意义,不同的学者提出不同的看法.有的学者认为这种机制避免了由于2性功能冲突(sexual interference)带来的花粉折损(pollen discounting)^[5],张大勇指出花柱卷曲运动机制可以从避免自交和避免雌雄干扰2个方面来理解.基于上举型柱头在上午已经被授粉但花粉囊开裂时依然会离开昆虫拜访通道这样一个现象,张大勇认为上举型(雌先熟)的柱头已经接受了外源花粉,没必要下午时再向上举起,除非后到达的自花花粉有更大的竞争优势,所以他认为花柱卷曲性更倾向于是为了避免干扰自身花粉输出^[5].也

有学者认为这种机制适应意义在于避免自体授粉(包括自花授粉和同株自花授粉),甚至居群内同型个体间的交配以此促进型间交配^[2].我们推测,如果花柱卷曲性机制具有避免自交的作用,那么,具有花柱卷曲性的种类其异交率就要比没有花柱卷曲的种类高;而且在具有花柱卷曲性的种类中,2种表型的异交率可能也有差异,上举型异交率要高于下垂型异交率,因为后者具有一定程度的滞后自交行为^[6].

豆蔻属(*Amomum*)是姜科植物中的一个属,约150余种,分布于亚洲、大洋洲的热带地区,我国有24种,产西南部至东南部^[7].在豆蔻属植物中,有些种类具有花柱卷曲性,例如人工栽培的豆蔻属植物草果(*A. tsaoko*)^[1],以及九翅砂仁^[8]、腐花豆蔻(未发表观测资料)等;有些种类不具有花柱卷曲性(例如阳春砂仁等).因而,豆蔻属是用来研究花柱卷曲性机制适应性的适合材料.本研究采用等位酶分析的手段,分别对豆蔻属中具有花柱卷曲性的2个种和没有花柱卷曲性的1个种的异交率进行检测并比较,以探讨花柱卷曲性的适应意义.

* 收稿日期:2008-02-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170069).

作者简介:陈绪超(1982-),男,湖北人,硕士生,主要从事植物繁殖与进化生态方面的研究.

通讯作者:李庆军(1965-),男,云南人,研究员,博士生导师,主要从事植物繁殖与进化生态学方面的研究, E-mail: qjli@xtbg.

1 材料与方 法

1.1 材料 本研究的对象为豆蔻属的 3 个种: 其中 2 个具有花柱卷曲性机制——九翅砂仁 (*A. maximum*)、腐花豆蔻 (*A. putrescens*), 另外一个不具有花柱卷曲性——阳春砂仁 (*A. villosum*)。九翅砂仁为研究样地区域内的居民在刀耕火种以及开垦橡胶种植园过程中有意识保留下来的野生居群, 2 种表型均自交亲合^[8], 其交配系统属于异交交配系统^[9], 其主要的拜访昆虫为大蜜蜂 (*Apis dorsata* Fabr.) 和中华蜜蜂 (*Apis cerana* Fabr.), 阳春砂仁为 20 世纪 70 年代初自其原产地广东阳春引种至西双版纳遗留抛弃的栽培种群, 其果实为著名中药材, 地下匍匐茎具有强烈的克隆习性, 花柱不运动, 传粉者主要是排蜂 (*Megapis dorsata* Fabricius) 和蓝彩带蜂 (*Nomia chalgata* Smith)^[10]。特别是在传粉者受限的条件下, 阳春砂仁的雄蕊花丝具有在开花后期主动延长使得花柱向下弯曲柱头紧贴花的唇瓣的特性, 从而实现延迟自交(未发表观测资料), 其交配系统属于兼性异交交配系统^[9]。腐花豆蔻为野生居群, 为热带雨林的林下常见种类。

1.2 方法 3 个种中每个种 3 个居群, 共 9 个居群, 根据不同居群可采集到的家系数以及家系内的个体数不等。每个居群 2 个表型各采 15~20 个家系的成熟果实, 取出种子清洗干净并置于通风处晾干, 干燥保存。居群内每个家系随机抽取 3~4 果实, 家系内每个果实随机抽取 4~5 颗种子进行等位酶分析。

采用垂直直板聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 等位酶实验方法, 筛选最具多态性的位点。在本研究中采用标准电泳条件: 取种子加 PVP-Tris-HCl 提取缓冲液 (0.010 g EDTA 4Na, 0.019 g KCl, 0.050 g MgCl₂, 1.25 g 蔗糖, 3.50 g PVP, 25 mL Tris-HCl (0.2 mol/L, pH=7.5), 现加 1.5% 巯基乙醇) 充分研磨, 冷冻, 加样前 12 000 r/min 离心 2 min, 制胶、上样、电泳均选用 Tris-glycine 电泳缓冲液 (pH=8.3), 染色, 恒温 37 °C 温育 0.5 h 显色至胶片上带谱均能清晰可见, 最后仔细记录下酶谱^[11]。

20 世纪 80 年代以来, 异交率估测常用多位点估计法^[12~14]。因此, 我们使用 MLTR (Version 3.0)^[15] 程序来估计每个居群多位点异交率 (t_m), 多位点异交率用基于 Newton-Raphson 迭代法的最大似然法 (maximum-likelihood) 进行估计, 每个

克隆体作为重复抽样 (resampling) 的单元。多位点异交率的标准差 (SD) 是基于 1 000 个自展值 (bootstrap values) 进行计算的。每个居群内不同表型的多位点异交率通过把每个居群内的每种表型作为一个独立的亚种群来进行估计。使用自展值的配对比较法 (pairwise comparison) 分析各异交率差异^[16]。假设异交率高的一组分步异交率值一对一的减去假设异交率低的一组的对应值, 差值 $\Delta t < 0$ 的总数在 1 000 个差值中所占比例, 若低于 5% 视为差异显著, 若低于 1% 视为差异极显著。

2 实验结果与分析

经对 ADH, MNR, AAT, SKD 等共 27 酶进行筛选, 经反复筛选分析, 仅发现 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (PGD) 和谷氨酸脱氢酶 (GDH) 2 个酶系统是酶谱最清楚且稳定的多态位点, 故选择这 2 个酶为遗传标记, 每个多态位点有 2 个等位基因, 共计 2 个多态位点, 其中, PGD 表现为正常二聚体, 但 GDH 则表现有异于常规模式 (王中仁^[11] 建议为四、六、八聚体), 在本研究中表现为单体模式, 这在前人研究中也类似情况^[17]。腐花豆蔻、阳春砂仁、九翅砂仁 3 个种的异交率结果分别见表 1 及图 1。

从表 1 可以看出, 在 3 个种之中, 腐花豆蔻及九翅砂仁的异交率均高于 0.8, 属于异交交配系统, 而阳春砂仁的异交率均低于 0.5 高于 0.2, 属于混合交配系统^[18]。说明在本研究中具有花柱卷曲性的种的异交率高于不具有花柱卷曲性的种的异交率, 即花柱卷曲性有利于促进异交。

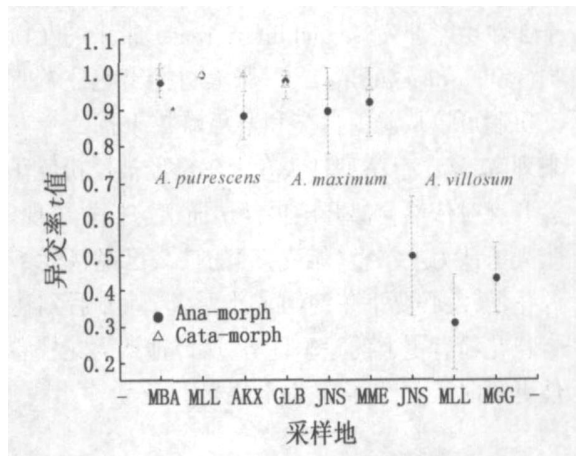


图 1 九翅砂仁 (*A. maximum*)、腐花豆蔻 (*A. putrescens*) 和阳春砂仁 (*A. villosum*) 异交率的比较
Fig. 1 Outcrossing rate of *A. maximum*, *A. putrescens* and *A. villosum*

从图 1 可以看出, 在具有花柱卷曲性的种之中, 尽管多数居群 2 种表型的异交率间不存在显著差异 (仅九翅砂仁橄榄坝居群的上举型异交率

(0.982) 显著高于下垂型异交率 (0.970) ($P = 0.028$)), 但所有居群都具有上举型异交率高于下垂型异交率的趋势。

表 1 3 个种自然居群异交率

Tab 1 Comparison of outcrossing rate between different morph

采样物种名	采样地点	上举型异交率	标准差	下垂型异交率	标准差	P 检验值
<i>A momum. putrescens</i>	MBA(勐仑坝卡)	0.977	0.042	0.993	0.037	0.704
	MLL(勐腊龙林)	1.000	0.000	1.000	0.000	0.993
	AKX(阿克新寨)	0.886	0.066	1.000	0.003	0.192
<i>A momum. maximum</i>	GLB(橄榄坝)	0.982	0.014	0.97	0.04	0.028
	JNS(基诺山)	0.899	0.12	0.975	0.044	0.606
	MME(勐仑曼峨)	0.923	0.096	0.961	0.046	0.248
<i>A momum. villosum</i>	JNS(基诺山)	0.496	0.165			
	MLL(勐腊龙林)	0.313	0.133			
	MGG(沟谷林)	0.435	0.097			

表中的 P 值表示同一居群内 2 种不同表型之间的异交率 t 检验差异显著值。

3 讨论

3.1 花柱卷曲运动机制的适应性意义 研究表明, 具有花柱卷曲性的九翅砂仁和腐花豆蔻的异交率显著高于没有花柱卷曲性的阳春砂仁的异交率 (见图 1)。因此, 我们认为花柱卷曲性机制有效地促进了异交避免了自交, 但这一结果并不与花柱卷曲性机制具有避免雌雄干扰的功能^[19]相矛盾, 因为这 2 种功能可以同时得到发挥。

另外, 在具有花柱卷曲性的种中, 各个居群的上举型异交率均高于下垂型的异交率 (九翅砂仁的一个居群中上举型异交率比下垂型的异交率显著地高 (见表 1 及图 1)), 这说明卷曲性花柱的上举型与下垂型 2 种表型之间可能存在一定的功能分化, 这与 Takano 等人的研究结果相似^[21]。

花柱卷曲性异交机制具有和二型花柱相类似的 2 型花, 具有这一机制的种类, 其自然种群中的个体 2 种表型的比例为 1: 1, 它们通过 2 类个体花柱互为相反的上下运动从而形成 2 类暂时性的形态, 分别在上午和下午各自扮演相反的性别角色, 有效的交配只能发生在两类表型之间, 从其功能上讲相当于具有性别转换能力的雌雄异株^[2, 3], 或称暂时性雌雄异株 (temporal dioecy, 即在两性花或雌雄同株植物个体上表现出的雄蕊和雌蕊在成熟时

间上不同而形成的暂时性雄性功能和雌性功能不重叠的现象)^[22, 23]。

另外, 本研究的目的主要是针对花柱卷曲性的生态适应性意义进行初步的报道, 在本研究中所采用的 3 种材料中, 腐花豆蔻为野生植物, 但九翅砂仁与阳春砂仁均为半野生植物, 人为引种和栽培管理可能对居群的遗传结构造成一定的影响, 因此对我们的推论支持性可能造成一些偏差, 因而下一步的试验计划是对豆蔻属的更多的野生种进行检测, 从而得到更为可靠的结论。

3.2 卷曲性花柱的进化 花柱卷曲性机制是一种新颖的植物交配策略, 研究它的演化对繁育系统的进化有着重要的意义。花柱卷曲运动机制已在姜科山姜属植物中进行了深刻的探讨, Kress 等根据花柱卷曲性在姜科中的分布提出, 这一机制可能起源于山姜族 (*Alpinia tribe*) 的共同祖先或者在这个族内已经独立进化 3~5 次^[24]。目前已观察到的所有山姜属物种都具有花柱卷曲性, 在豆蔻属也同样存在这种机制^[1], 但与山姜属不同的是, 在豆蔻属中有的物种有这个特性, 有的物种没有^[25], 本研究也证实如此。若将这个性状标示在豆蔻属分子系统树上就可以比较清晰地显示出性状的进化路径, 这在山姜属中是做不到的, 豆蔻属相对于山姜属植物无疑是更理想的材料, 为我们研究这种花柱卷曲

性的起源演化提供了良好的材料。

本研究对豆蔻属几种植物的异交率检测仅仅只是一个开头, 还有诸多后续工作。若能通过对豆蔻属植物的形态学观察, 确定豆蔻属各物种花柱卷曲性的有无, 若结合系统发育树给出的信息, 有可能对这种花柱卷曲性的演化趋势做一些探索性的工作。

致谢: 感谢孙杉博士对本研究的试验数据分析的指导帮助, 感谢任盘宇老师及高江云老师对本研究野外试验的大力支持! 同时也对本组其他同学的热情关心和帮助表示由衷地感谢!

参考文献:

- [1] 崔晓龙, 魏蓉城, 黄瑞复. 草果遗传体系的初步研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1995, 17: 290-297.
- [2] LI Q J, XU Z F, KRESS W J, et al. Flexible style that encourages outcrossing [J]. Nature, 2001, 410: 432-432.
- [3] 李庆军, 许再富, KRESS W J, 等. 山姜属植物花柱卷曲性传粉机制的研究 [J]. 植物学报, 2001, 43: 364-369.
- [4] LI Q J, KRESS W J, XU Z F, et al. Mating system and stigmatic behaviour during flowering of *Alpinia kwangsiensis* (Zingiberaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2002, 232: 123-132.
- [5] 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 李庆军. 山姜属植物花柱卷曲性异交机制的研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2002.
- [7] 吴征镒. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [8] REN P Y, LIU M, LI Q J. An example of flexistily in a wild cardamom species (*A momum maximum* (Zingiberaceae)) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2007, 267: 147-154.
- [9] WANG Y Q, ZHANG D X, CHEN Z Y, et al. Pollen Histochemistry and pollen: Ovule ratios in Zingiberaceae [J]. Annals of Botany, 2004, 94: 583-591.
- [10] 张文庆, 杨沛, 陈东, 等. 春砂仁的访花昆虫种类及其访花和筑巢行为 [J]. 昆虫知识, 2006, 43, 678-680.
- [11] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] SHAW D V, KAHLER A L, ALLARD R W. A multi-locus estimator of mating system parameters in plant populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1981, 78: 1298-1302.
- [13] RITLAND K. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient [J]. Evolution, 1990, 44: 1230-1241.
- [14] 何田华, 葛颂. 植物居群交配系统、亲本分析与基因流动研究 [J]. 植物生态学报, 2001, 25: 144-154.
- [15] RITLAND K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n - independent loci [J]. Heredity, 2002, 88: 221-228.
- [16] ECKERT C G, BARRETT S C H. Post - pollination mechanism and the maintenance of outcrossing in self - compatible, tristylous, *Decodon verticillatus* (Lythraceae) [J]. Heredity, 1994, 72: 396-411.
- [17] CHELIAK W M, PITET J A. Genetic control of al- lozyme variants in mature tissues of white spruce trees [J]. The Journal of Heredity, 1984, 75: 34-40.
- [18] SCHEMSKE D W, LANDE R. The evolution of self fertilization and inbreeding depression in plants, II, Empirical observations [J]. Evolution, 1985, 39: 41-52.
- [19] SUN S, GAO J Y, LIAO W J, et al. A adaptive significance of flexistily in *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): A hand- pollination experiment [J]. Annal of Botany, 2007, 99: 661-666.
- [20] ZHANG L, LI Q J, DENG X B, et al. Reproductive biology of *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): another example of flexistily [J]. Plant Systematics and Evolution, 2003, 241: 67-76.
- [21] TAKANO A J, GISIL A J, YUSOFF M, et al. Floral and pollinator behaviour of flexistylous Bornean ginger, *Alpinia nieuwenhuizii* (Zingiberaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2005, 252: 167-173.
- [22] CRUDEN R W. Temporal dioecism: systematic breadth, associated traits, and temporal patterns [J]. Botanical Z Gazette, 1988, 149: 1-15.
- [23] CRUDEN R W, HERMANN- PARKER S M. Temporal dioecism: an alternative to dioecism? [J]. Evolution, 1977, 31: 863-866.
- [24] KRESS W J, LIU A Z, NEWMAN M, et al. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers [J]. American Journal of Botany, 2005, 92: 167-178.
- [25] XIA Y M, KRESS W J, PRINCE L M. Phylogenetic analyses of *A momum* (Alpinoideae: Zingiberaceae) using ITS and matK DNA sequence data [J]. Systematic Botany, 2004, 29: 334-344.

Studies on allelopathy of aquatic macrophytes on *Synahocystis* sp.

WU Cheng, CHANG Xue-xiu, WU Feng, LIU Jun-yan, ZHENG Gui-lai
(School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Allelopathy of culture water from ten kinds of macrophytes on *Synahocystis* sp. was investigated. The results showed that there was slightly stimulation effect for *Ottelia acuminata* culture water on *Synahocystis* sp., while significant inhibition effects of other nine macrophytes on the algae were performed, and their inhibition capability was as following: *M. aquaticum* > *E. crassipes* > *C. demersum* > *P. stratiotes* > *N. peltatum* > *M. spicatum* > *H. verticillata* > *D. sanderiana* > *V. spiralis*, the inhibition ratio of *M. aquaticum* on *Synahocystis* sp. is up to 89.9%. By analyzing the absorption spectral curve and the characteristic peaks of *Synahocystis* sp. cell, it was found that *M. aquaticum*, *Eichhornia crassipes* and *C. demersum* could secrete some allelochemicals, which destroyed the chlorophyll a and phycobiliprotein absorption peak, and disturbing the course of light-harvesting of *Synahocystis* sp.. It probably indicated that allelopathic compounds released by macrophytes restrain the photosynthetic system of algae, which was one of importance ways for macrophytes inhibiting or even killing algae.

Key words: aquatic macrophytes; allelopathy; *Synahocystis* sp.; phycobiliprotein; chlorophyll a

* * * * *

(上接第 534 页)

Outcrossing rates analysis of three *A momum* species in Zingiberaceae

CHEN Xu-Chao^{1,2}, LI Qing-jun¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Flexistylis is a novel flowering strategy occurring in ginger family (Zingiberaceae). It is a unique and “active” floral dimorphism achieved by both changing the position of the stigma and separating the maturation of male and female organs in different times during anthesis. In this research, outcrossing rates of two species (*A momum maximum* and *A. putrescens*) with flexistylis and one species (*A. villosum*) without flexistylis were compared using allozyme experiments. The results show that the outcrossing rates of flexistylous species are significantly higher than that of the species without flexistylis. Moreover, within the natural populations of flexistylous species, outcrossing rates of anaflexistylous morphs are higher than that of cataflexistylous morphs. These findings demonstrate that flexistylis may play an effective role to promoting outcrossing.

Key words: mating system; allozyme; flexistylis; ginger; sexual interference