

琼花生殖器官结构及传粉昆虫的观察

^{1,2}金 飏* ¹李 娜 ³贾 妮 ⁴周武忠 ¹王 莉 ²向其柏

¹(扬州大学园艺与植物保护学院 扬州 225009)

²(南京林业大学森林资源环境学院 南京 210037)

³(中国科学院植物研究所植物园 北京 100093)

⁴(东南大学旅游系 南京 210096)

Observations on the anatomy of reproductive organs and the pollinators of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* (Caprifoliaceae)

^{1,2}JIN Biao* ¹LI Na ³JIA Ni ⁴ZHOU Wu-Zhong ¹WANG Li ²SHANG Chih-Bei

¹(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

²(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

³(Botanical Garden, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

⁴(Department of Tourism, Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract To a better understanding of the evolutionary mechanism between reproductive organs and pollinators in *Viburnum*, this paper reports reproductive characteristics of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*, including floral characteristics, anatomical features of reproductive organs, pollen viability, pollen/ovule ratio (P/O), pollinators, pollen tube growth path, breeding system, and fertilization. This species possesses a compound umbel including fertile and infertile flowers. The fertile flower has one pistil and five stamens; each pistil has a dry stigma and an ovary that contains one anatropous ovule. The stamens and pistils of the infertile flower are normal initially but degenerate later during flowering; degenerated stamens are mainly characterized by disappearance of stamens, short filaments, absence of filaments, or different size of anthers, whereas degenerated pistils have smaller or ruptured stigmas; occasionally, pistils and stamens become petal-like. Pollen viability of individual flowers declined significantly 4–5 d after pollen dissemination. Within population, pollen viability of all flowers rapidly decreased at the end of April. Pollen/ovule ratio (P/O) was 12800–18700. Pollinators for this species include bees, flies, butterflies and beetles, but bees and butterflies are the main ones. Artificial pollination treatments demonstrated that this species was self-incompatible and seed production depended on pollinator visits. Pollen dissemination of fertile flowers mainly occurred during 9:00 am–4:00 pm, and the peak of pollinator visits was 11:00 am–3:00 pm. Pollen grains usually germinated within 1 h after pollination and pollen tubes penetrated the stigma through the papilla clearance and then continued to grow along the transmitting tissue in center of style. Some pollen tubes reached the ovary 18 h later and grew into the ovule through micropyle within 20 h after pollination. In addition, formation of sterile flowers, adaptive floral structures, low production of fruits, and growth characteristics of pollen tubes were discussed.

2006-02-06 收稿, 2007-01-24 收修改稿。

基金项目: 江苏省农业三项工程资助(SX(2000)045)(Supported by the Three Agricultural Projects of Jiangsu, Grant No. SX(2000)045)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: jinbiao@sina.com)。

Key words *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*, reproductive organs, anatomical structure, breeding system, pollination biology, pollen tube development.

摘要 为了探讨影响琼花 *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* 有性生殖的因素, 对其生殖生物学和传粉生物学进行了研究。研究内容主要包括琼花花部特征、生殖器官解剖结构、花粉活力、花粉胚珠比(P/O)、繁育系统、传粉形式、传粉昆虫和花粉管生长路径等。结果表明: (1) 琼花聚伞花序由大型不孕花和小型可孕花组成, 可孕花雌雄蕊发育正常, 雄蕊5枚, 雌蕊1枚, 干型柱头, 单子宫, 倒生胚珠; 不孕花的雌雄蕊在发育早期正常, 而在花期时退化。雄蕊退化表现为雄蕊消失、花丝缩短或消失或花药大小不一; 而雌蕊退化表现为雌蕊缩小或柱头开裂; 有时雌雄蕊也存在瓣化现象。(2) 自然条件下, 单花花粉活性在散粉4–5 d后明显下降, 居群花粉活力在4月25日–28日开始显著下降。(3) 花粉胚珠比P/O值为12800–18700, 属专性异交型; 繁育系统为异株异花授粉, 属虫媒传粉植物。(4) 可孕花大量散粉时间为9:00–16:00, 昆虫访花高峰时段为11:00–15:00, 访花昆虫中以蝶类和蜂类为主, 蝶类访花频率最高。(5) 落置柱头的花粉萌发率较高, 花粉粒授粉后1 h左右开始萌发, 花粉管从柱头乳突细胞的间隙穿入花柱, 沿花柱中央引导组织生长, 18 h左右进入子房, 20 h左右从珠孔进入胚囊。讨论了琼花的不孕花形成、花部结构适应、花型演化趋势、低结实率和花粉管生长特点。

关键词 琼花; 生殖器官; 解剖结构; 繁育系统; 传粉生物学; 花粉管生长

荚蒾属 *Viburnum* L. 是忍冬科 *Caprifoliaceae* 中最大的属, 包括175种木本植物, 广布于北半球, 东亚和北美为其主要分布中心(Morton, 1933; Donoghue, 1983; Hara, 1983), 少量种延伸分布于东南亚(Kern, 1951)和南美的山区(Killip & Smith, 1931)。更多的证据支持荚蒾属应放在五福花科 *Adoxaceae* (Donoghue et al., 2004; Winkworth & Donoghue, 2004)。荚蒾属植物的花序有一个明显的演化趋势, 即花序由全部可孕花(如荚蒾 *V. dilatatum* Thunb. 和地中海荚蒾 *V. tinus* L.) 演化为边花不孕而中部花可孕(如合轴荚蒾 *V. sympodiale* Graebn.、鸡树条荚蒾 *V. sargentii* Koehne.), 甚至全部为不孕花(如欧洲绣球 *V. opulus* L. ‘Roseum’、绣球荚蒾 *V. macrocephalum* Fort.) (Donoghue, 1982; 徐炳声, 1988; Donoghue et al., 2003)。花作为被子植物的繁殖器官, 具有高度的多样性(Darwin, 1877; Richards, 1997; Huang & Guo, 2000; Barrett, 2002), 这种多样性常被认为是物种在长期进化过程中为实现繁殖而获得的(Barrett, 2002), 其中传粉系统的选择作用被认为是花部进化的重要动力(Grant & Grant, 1965; Bawa & Beach, 1981; Barrett, 2002)。因此, 研究荚蒾属的花部结构和传粉系统对于探讨其花部进化过程和机制有着重要的科学意义。

琼花 *Viburnum macrocephalum* Fort. f. *keteleeri* (Carr.) Rehd. 为荚蒾属半常绿灌木, 其花序为由周围8朵大型不孕花和中间无数小型可孕花组成的伞房花序(徐炳声, 1988), 花形奇异, 果实鲜红, 树形优美, 有极高的观赏价值。琼花自然分布于江苏南部、浙江、安徽西部、江西西北部等地(徐炳声, 1988)。长期以来, 琼花在自然条件下有性繁殖十分困难, 导致琼花资源稀缺(金飏等, 2005)。研究植物生殖器官结构和传粉过程不仅能揭示物种生存策略和生态适应机制(Haring et al., 1990; 黄双全等, 1999; Li et al., 2001), 同时还能为珍稀植物的保育提供有益信息(罗毅波等, 2003; Sun et al., 2003)。本研究的目的就是: 1) 从花部结构、传粉过程以及传粉效率等方面来探讨授粉前影响琼花有性生殖成功的因素; 2) 从花粉活力、花粉萌发以及花粉管生长等方面来探讨授粉后影响琼花有性生殖的因素。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料采自扬州大学农学院琼花资源圃内7–8年的生长旺盛、每年开花稳定的琼花成年植株。野外观察传粉昆虫的植株, 树龄20–30年不等, 位于扬州蜀冈国家级生态风景区内(119°30' E, 32°20' N)。

1.2 外部形态学观察

将琼花盛花期的可孕花与不孕花新鲜样品置于Leica体视显微镜下观察并摄影, 观察两者在花部形态结构上的差异, 研究不孕花雌、雄蕊退化结构的特征。

1.3 解剖学观察

取开花前后的不孕花与可孕花, 固定在FAA溶液中, 在4 °C条件下保存(Teng et al., 2005)。经爱氏苏木精整体染色12 h, 常规石蜡切片法制片, 切片厚度8–10 μm , 中性树脂封片, 在Olympus BH-2型光学显微镜下观察摄影, 研究比较异型花(可孕花和不孕花)的花部结构特点, 观察雄蕊的花药、花丝和雌蕊的柱头、子房室、胚珠的形态及组织解剖结构。

1.4 花粉生活力的测定(TTC法)与花粉/胚珠比(P/O)估算

2005年4月18日至5月2日期间: (1) 4月18日选同一朵花从散粉到衰败时定期(1 h、2 h、3 h、4 h、8 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、10 d)取花粉测定, 计10朵; (2) 每天中午(11:30–12:30)随机选居群内不同植株不同部位花朵的花粉测定, 计5朵。花粉样品置于载玻片上, 加1–2滴0.5% TTC蔗糖溶液, 加盖玻片后置于35 °C恒温箱中15 min, 低倍镜观察。每个制片观察5个视野, 统计100粒左右, 染成深红色、红色的花粉计为有活力, 浅红色、无色和黄色的计为不具活力, 计算花粉的活力百分率。重复3次, 取平均值。

从20株植株上随机选取即将开放的花蕾(花药未开裂) 20朵(每株只采1朵), 固定于FAA中备用。从每朵花上取1个花蕾, 剥开花瓣切下所有花药(5个), 用1.0 mL/L HCl软化花药壁, 解剖花药, 将全部花粉移入一个有刻度的离心管, 仔细清洗花药壁、镊子和刀片, 清洗液也移入离心管, 定容至2 mL, 振荡器下振荡60 s, 制成花粉粒悬浮液, 用微量进样器取2 μL 花粉液于载玻片上, 在显微镜下观察并统计花粉数, 重复3次, 取其平均值乘以1000算出每个单花蕾的花粉粒总数(王英强等, 2005)。接着将该花蕾的子房置于载玻片上于解剖镜下解剖剥离, 统计胚珠数。每一朵花的花粉胚珠比(pollen ovule ratio, P/O)用其单花中的花粉量除以其单花子房中的胚珠数的方法统计。

1.5 野外访花昆虫观察与繁育系统检测

2004年4月8日–30日及2005年4月6日–5月10日在扬州蜀冈国家级生态风景区内选5个样地(50×50 m)共10个琼花居群(每个样地2个居群)挂牌标记, 观察琼花开花特性及其传粉昆虫, 该区生态环境处于半自然状态, 植被茂盛, 能够反映自然状态下昆虫的授粉规律。繁育系统研究中, 进行以下试验: (1) 去雄套袋, (2) 不去雄套袋, (3) 同株异花人工授粉, (4) 异株异花人工授粉, (5) 自然授粉。每个处理随机选择10朵花。用白色硫酸纸纸袋套袋, 期间经常检查套袋花朵, 防止花朵霉坏。

1.6 扫描电镜观察柱头表面花粉管生长

取琼花可孕花授粉前后的雌蕊、不孕花雌蕊, 样品用2.5%戊二醛和1%锇酸双固定, 经0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗、丙酮梯度(50%–70%–80%–90%–95%–100%)脱水、醋酸异戊酯置换、临界点干燥、粘样和喷金后, 置于XL30ESEM环境扫描电镜下, 观察样品的表面及纵切面结构并摄影, 以探明花粉管进入柱头的途径。

1.7 荧光显微镜观察花粉粒萌发和花粉管生长路径

选即将开放的可孕花花蕾, 人工去雄后进行套袋隔离, 从其他植株可孕花中采取新鲜花药进行人工授粉。按可孕花雌蕊授粉后1 h、2 h、4 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h、26 h、2 d、3 d共15个阶段定期取样, 每次取30个, 去除花瓣及萼片, FAA固定后置于4 °C保存待测。观察时对每阶段随机取20个样品, 用0.1%脱色水溶性苯胺蓝染色, 经整体压片或纵剖压片后置于350–400 nm紫外光下, 荧光显微观察并摄影, 观察花粉粒的萌发、花粉管在花柱及子房中的生长路径以及花粉管进入胚珠的时间(Kandasamy et al., 1994; 黄双全等, 1998; Teng et al., 2005, 2006)。

2 结果和分析

2.1 琼花的花部特征

琼花在4月初绽蕾, 为大型聚伞花序, 花两性, 有淡香。外围大型不孕花最先开放, 中部可孕花4月中旬大量开放至5月初凋萎。花冠轮状白色, 不孕花与可孕花均着生于第3级花梗上, 合瓣5裂, 每花序上不孕花常8朵, 可孕花为125–190朵(图1); 花萼筒具5齿; 雄蕊5枚, 着生于花冠筒内, 与花冠裂片互生(图2), 花药宽椭圆形(图3), 开放时伸出花冠; 雌蕊1枚, 花柱粗短, 柱头中央向内凹陷, 3–4浅沟, 授粉前后表面无黏液分泌, 柱头颜色以红色为主(图2, 4, 6), 少数为绿色, 且同一植株的柱头只表现一种颜色。

观察发现, 不孕花的雌雄蕊绝大多数发生退化。雄蕊退化表现为: 花丝完全消失(图4), 或花丝缩短、长短不一、粗细不均(图6); 雄蕊数量减少、消失或瓣化(图5); 花药皱缩且大小不一(图6)。雌蕊退化表现为雌蕊缩小或柱头开裂(图6, 7), 少数不孕花雌雄蕊均瓣化为畸形(图8)或重瓣, 花冠2–3轮(图9); 这些雌雄蕊退化形态与可孕花的雌雄蕊正常形态相比, 区别明显。也有极少数不孕花开花时, 具外观正常的雌雄蕊, 但无论人工授粉和自然授粉, 均不能结实, 表明不孕花已演化为不直接繁育后代的附属结构。

2.2 花部器官解剖结构

2.2.1 可孕花雄蕊解剖结构 对开放前不同时期可孕花进行横向切片可观察到, 其雄蕊群包含5枚花药, 每一花药含4个花粉囊和1个药隔(图10, 11)。早期花药壁由4层结构组成, 最外层为表皮, 中间为药室内壁和中层, 最内层为体积较大的绒毡层(图11, 12); 后期表皮细胞逐渐扩展呈扁长形, 具明显的角质层, 在药室内壁的细胞壁上有带状不均匀加厚, 成为纤维层, 绒毡层细胞开始退化, 与其他几层发生分离; 成熟花药的绒毡层细胞全部退化, 中层多数退化, 部分保留一层扁平细胞(图13); 相邻花粉囊交接处的外侧裂口先断开, 花粉粒散出。药隔由药隔维管束和薄壁细胞组成。花丝结构较简单, 最外一层表皮, 内为薄壁细胞, 中央有一个维管束(图14)。

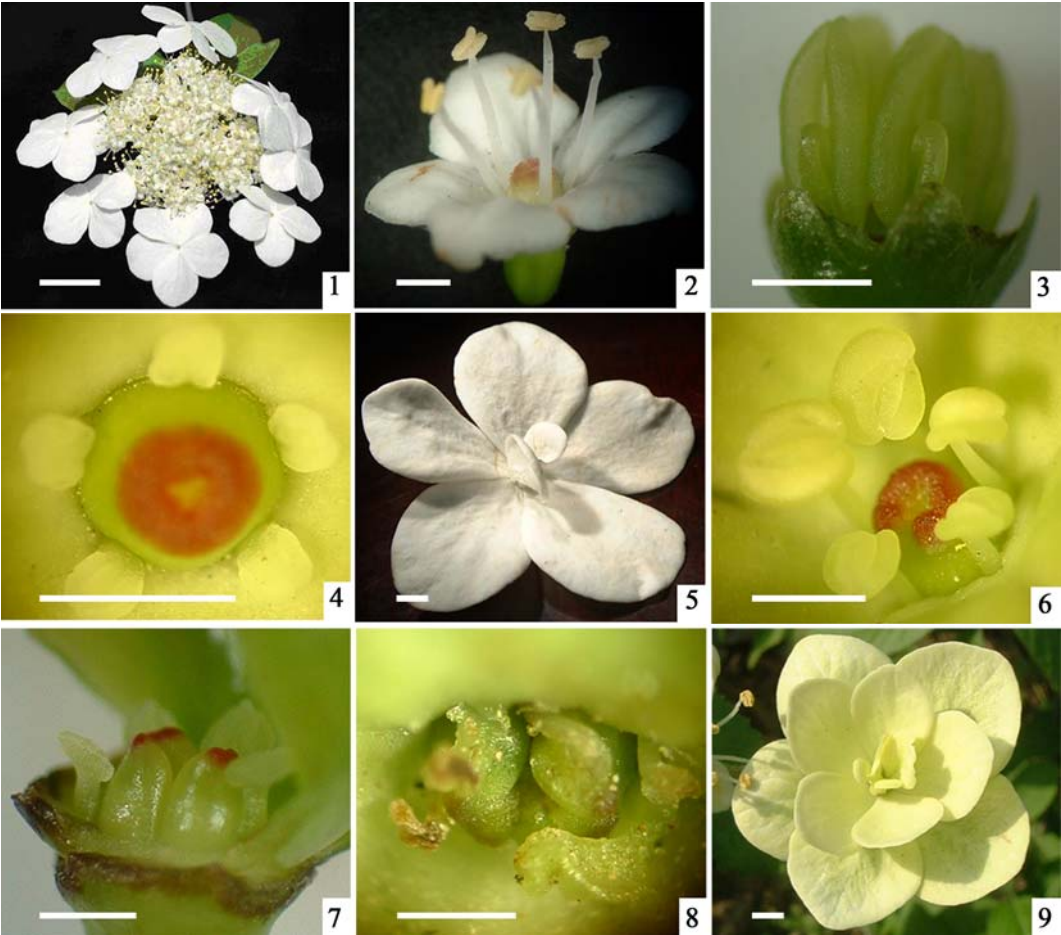


图1-9 琼花可孕花与不孕花形态 1. 完整花序。2. 可孕花形态。3. 可孕花花药与花丝。4-9. 不孕花。4. 花丝消失。5. 雄蕊瓣化。6. 花药大小不等。6, 7. 柱头开裂。8. 雌雄蕊畸形。9. 重瓣现象。
Figs. 1-9. The morphology of fertile and infertile flowers of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*. 1. A complete inflorescence. 2. The morphology of a fertile flower. 3. The anthers and filaments of a fertile flower. 4-9. Infertile flowers. 4. Stamens without filaments. 5. Petal-like stamens. 6. Anthers of different sizes in stature. 6, 7. A pistil with ruptured stigmas. 8. Abnormal shapes of pistils and stamens. 9. Flowers with multiple-whorled petals.
Scale bars: 1, 3 cm; 2-4, 6-8, 0.5 mm; 5, 9, 3 mm.

2.2.2 可孕花雌蕊解剖结构 可孕花雌蕊纵向切片(图15)显示, 柱头表面的乳突细胞较短, 与空气接触的部分细胞壁增厚。表皮下无裂生腔、分泌区等构造, 在体视镜下也从未发现有黏液分泌, 由此判断琼花可孕花柱头为干型。花柱组织中无中空花柱道, 为闭合型(实心)花柱。花柱中央区域的细胞较为特殊, 正中央的细胞纵向紧密排列, 近圆形, 细胞壁加厚、细胞质浓厚, 周围细胞纵向伸长(图16)。这些特殊细胞外围是维管束; 横向切片同样可观察到这一特殊区域, 具浓厚细胞质的细胞呈放射状排列, 周围是维管束(图17), 这些形态特征均表明花柱中央的特殊细胞为引导组织。根据雌蕊发育早期的横向切片, 胚珠原基只分化出一层珠被(图18)。珠心组织中有一大型孢原细胞, 细胞质浓厚, 与胚珠表皮之间有数层细胞隔开, 为厚珠心(图19)。雌蕊的纵向切片显示, 琼花具有单子房、单

胚珠, 子房室大而长, 胚珠自子房顶端下垂, 珠孔紧邻珠柄, 为倒生胚珠, 珠孔朝上(图 20)。

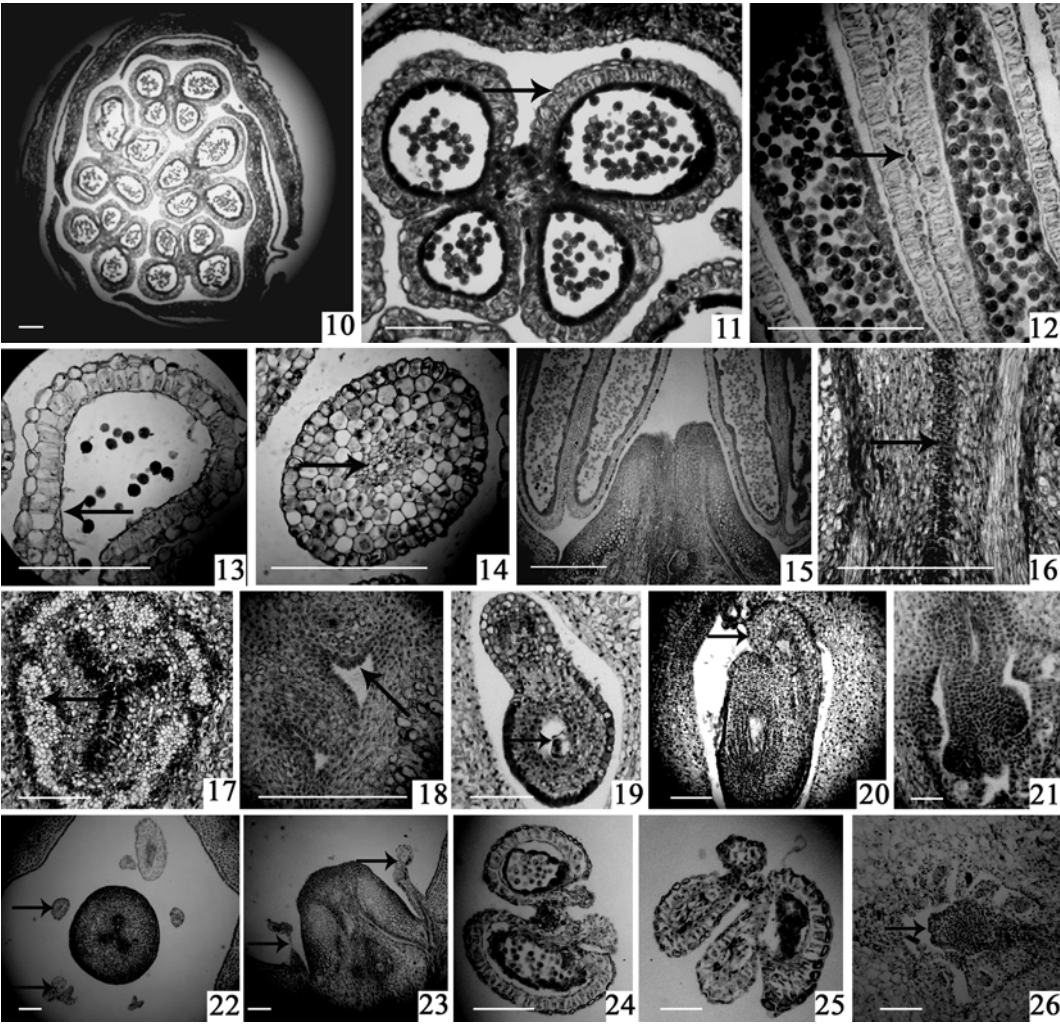


图10-26 琼花生殖器官解剖结构 10-20. 可孕花. 21-26. 不孕花. 10. 可孕花花蕾横切面. 11. 未成熟花药横切面. 箭示花药壁. 12. 未成熟花药纵切面. 箭示花药壁. 13. 绒毡层已退化. 箭示残留的中层细胞. 14. 花丝横切面. 箭示维管束. 15. 可孕花花蕾纵切面. 16. 花柱纵切面. 箭示引导组织. 17. 花柱横切面, 中央为引导组织. 箭示维管束. 18. 胚珠原基. 箭示珠被. 19. 胚珠. 箭示抱原细胞. 20. 成熟的倒生胚珠. 箭示珠柄. 21. 不孕花的畸形胚珠. 22, 23. 雄蕊退化. 箭示不规则的雄蕊. 24, 25. 畸形花药, 花粉囊退化. 26. 胚珠败育, 子房室小. 箭示胚珠.

Figs. 10-26. The anatomical structure of reproductive organs of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*. 10-20. Fertile flowers. 21-26. Infertile flowers. 10. The transverse section of a fertile flower bud. 11. The transverse section of an immature anther. Arrow indicates an anther wall. 12. The longitudinal section of an immature anther. Arrow indicates an anther wall. 13. Degenerated tapetum. Arrow indicates a remnant middle layer. 14. The transverse section of a filament. Arrow indicates a vascular bundle. 15. The longitudinal section of a fertile flower bud. 16. The longitudinal section of a style. Arrow indicates the transmitting tissue. 17. The transverse section of a style. Arrow indicates the vascular bundle. 18. Ovule primordium. Arrow indicates the integument. 19. Ovule. Arrow indicates the archesporial primordium. 20. Mature anatropous ovule. Arrow indicates the funiculus. 21. The abnormal ovule of an infertile flower. 22, 23. Degenerated stamens. Arrows indicate abnormal stamens. 24, 25. The abnormal anthers with degenerated pollen sacs. 26. The abortive ovule with small locules. Arrow indicates the ovule.

Scale bars: 10-18, 22, 23, 0.2 mm; 19-21, 24-26, 0.1 mm.

2.2.3 不孕花解剖结构 从开花前后不孕花切片可看到各种雌雄蕊退化现象, 与体视镜下所观察到的退化形态相符合。雄蕊退化表现为雄蕊消失、花丝短缩、粗细不均, 花药皱缩、畸形(图22–25)且大小不等, 花粉粒少; 雌蕊退化表现为花柱短缩、子房室较小、胚珠畸形败育(图21, 26)。少数(20%–30%)早期(11–12月)的不孕花雌雄蕊解剖结构基本分化正常, 药室内有花粉, 且柱头中央也有引导组织, 只是接近花期时, 才开始逐渐退化。

2.3 开花过程中花粉活力的动态变化与花粉胚珠比(P/O)

由表1可知, 单花花粉活力在散粉初期(1–8 h)无明显变化, 在2天内都保持在82%以上, 到第3天才开始下降, 第4–5天后明显下降, 7–8天后完全失去活力; 居群内大部分花朵的花粉活力在4月18日–24日前能维持在80%以上, 随后花粉活力明显下降, 至5月初时绝大部分花粉失去活力。这一结果与琼花盛花期的时间相符, 本试验的琼花种群自25日之后, 几乎没有新的可孕花继续开放。

表1 琼花花粉活力变化

Table 1 Temporal variation of pollen viability in *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*

同一朵花散粉后不同时间的花粉活力 Pollen viability in the same flower at different time after pollen dissemination		不同时期花的花粉活力 Pollen viability at different flowering dates	
散粉后时间 Time after pollen dissemination	活力百分率 (%) Pollen viability (%)	日期 Date	活力百分率 (%) Pollen viability (%)
1 h	91.1	18 April	92.3
2 h	93.5	19 April	93.6
3 h	92.2	20 April	91.0
4 h	92.4	21 April	92.8
8 h	91.2	22 April	87.5
1 d	86.5	23 April	81.3
2 d	82.6	24 April	80.8
3 d	67.9	25 April	62.4
4 d	54.1	26 April	51.0
5 d	26.3	27 April	42.8
6 d	12.1	28 April	27.1
7 d	7.9	29 April	19.4
8 d	2.3	30 April	13.0
9 d	0	1 May	8.7
10 d	0	2 May	6.3

每朵单花的花粉数P值范围为12800–18700, 因每朵单花子房均为单室、单胚珠, 每朵单花的胚珠数O值为1。因此, 琼花的花粉胚珠比P/O值为12800–18700。

2.4 琼花的繁育系统、传粉昆虫和昆虫传粉行为

由表2可知, 琼花去雄套袋、不去雄套袋和同株异花人工授粉处理, 结实率均为0, 且着生可孕花的花梗最终全部脱落, 发生完全败育现象, 表明琼花不存在自花授粉现象和无融合生殖现象; 而异株异花人工授粉的结实率为24.2%, 这一结果证实了导致结实的花粉来自异株的花朵, 而异株异花人工授粉结实率稍高于自然授粉的结实率(17.9%), 进一步表明琼花繁育系统属完全的异花传粉植物, 这也与其P/O值相符合。

琼花外围不孕花大而醒目, 中部可孕花的花粉量大, 花粉粒具有较大黏性。琼花花开时散发的浓郁香气也可吸引昆虫访花。在自然条件下, 由于花序具有较多伸出花冠的雄

表2 琼花不同处理的结实率

Table 2 The seed set of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* under different treatments

处理 Treatments	每花序中可孕小花 平均数量 The average number of fertile flowers per inflorescence	每花序中结实 平均数量 The average number of seeds per inflorescence	每花序结实率 (%) The seed set per inflorescence (%)
去雄套袋 Isolation after emasculation	20.1	0	0
不去雄套袋 Isolation without emasculation	156.3	0	0
同株异花人工授粉 Artificial geitonogamy	50.0	0	0
异株异花人工授粉 Artificial xenogamy	153.2	37.1	24.2
自然授粉 Natural pollination	144.8	25.9	17.9

蕊、较大的花粉量和突起的柱头，多数昆虫在花上停留很容易接触到花药和柱头(图27–35)。

可孕花大量散粉时间为9:00–16:00，大部分传粉昆虫访花高峰时段为11:00–15:00。经过连续两年的观察和鉴定，琼花主要的访花昆虫有15种，隶属5目12科(表3)。其中传粉昆虫有8科12种，即蜜蜂科、熊蜂科、凤蝶科、麻蝇科、果蝇科、食蚜蝇科、叶甲科、缘蝽科。

表3 琼花主要访花昆虫名录

Table 3 The main visiting insects of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*

膜翅目 Hymenoptera 蜜蜂科 Apidae 蜜蜂 <i>Apis mellifica</i> L. 熊蜂科 Bombidae 熊蜂 <i>Bombus festvus</i> Smith 蚁科 Formicidae 家蚁 <i>Monomorium minimum</i> Buckley 鳞翅目 Lepidoptera 凤蝶科 Papilionidae 玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i> L. 麝凤蝶 <i>Byasa alcinous</i> Klug 青凤蝶 <i>Graphium sarpedon</i> L. 中华翠凤蝶 <i>Achillides bianor</i> Cramer 弄蝶科 Hesperidae 直纹稻弄蝶 <i>Parnara guttata</i> Bremer & Gray	双翅目 Diptera 麻蝇科 Sarcophagidae 麻蝇 <i>Sarcophaga peregrine</i> Robineau 果蝇科 Drosophilidae 果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen 食蚜蝇科 Syrphidae 食蚜蝇类 <i>Episyrphus</i> sp. 摇蚊科 Chironomidae 摇蚊类 <i>Chironomus</i> sp. 鞘翅目 Coleoptera 叶甲科 Chrysomelidae 柳圆叶甲 <i>Plagiodera versicolora</i> Laicharting 花金龟科 Cetoniidae 斑青花金龟 <i>Oxycetonia bealiae</i> Gory & Percheron 半翅目 Hemiptera 缘蝽科 Coreidae 蝽类 <i>Cletus</i> sp.
--	---

因部分昆虫种类访花频率过低，且在不同天数不同时间段表现不同，其访花频率和停留时间未形成量化可用的统计数据，本研究中仅作记录性报道。在晴天条件下，访花昆虫中以蝶类和蜂类较常见，它们在一个花序上停留的时间虽然很短，通常只有几秒或十几秒，但由于在不同植株、不同花序上访花频繁，从而使有效传粉和远交程度上升。观察过程中发现尤其以蝶类多见(图29–32)。

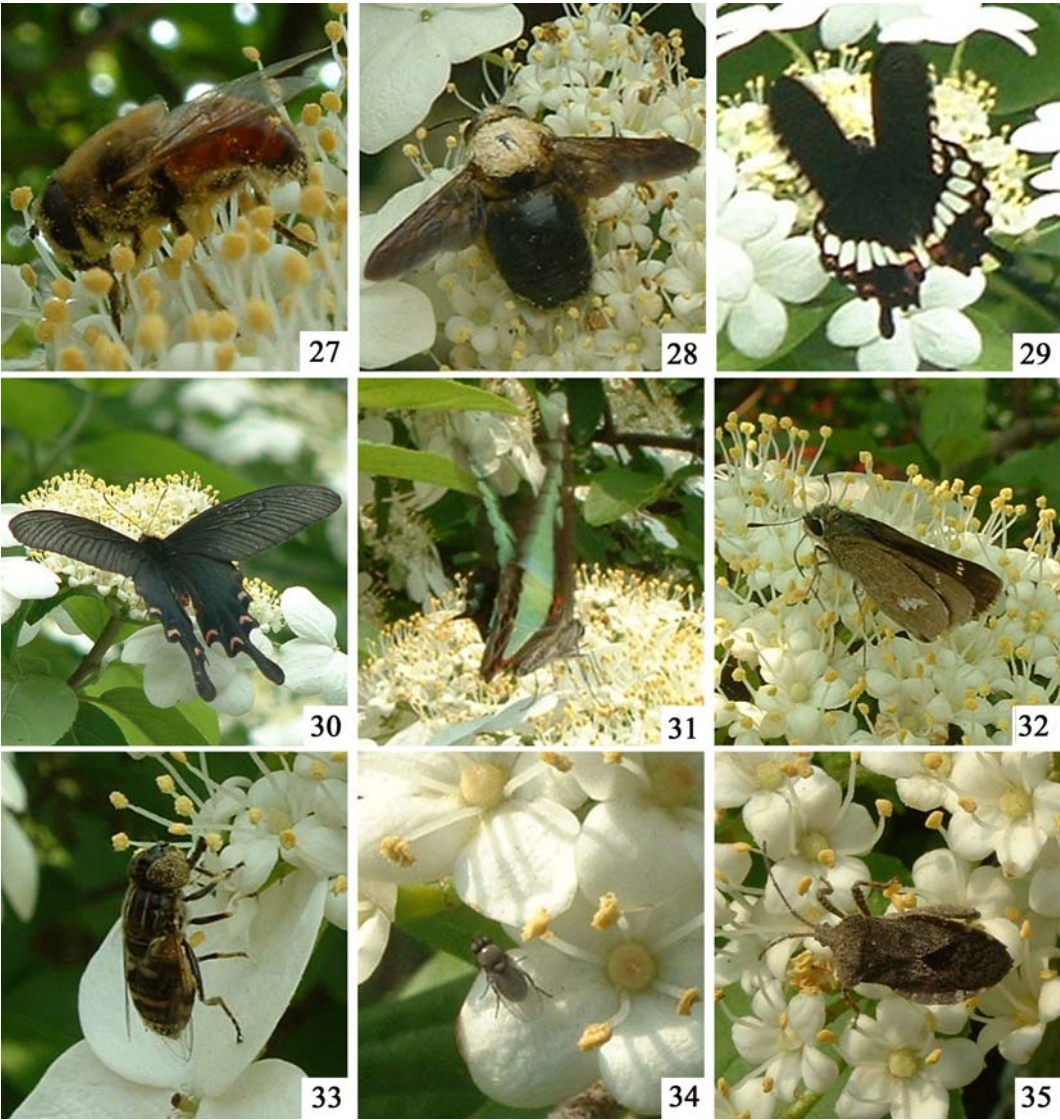


图27–35 琼花的主要传粉昆虫 27. 蜜蜂。28. 熊蜂。29. 玉带凤蝶。30. 麝凤蝶。31. 中华翠凤蝶。32. 直纹稻弄蝶。33. 食芽蝇。34. 果蝇。35. 蜚。Figs. 27–35. The main visiting insects of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*. 27. *Apis mellifica*. 28. *Bombus festivus*. 29. *Papilio polytes*. 30. *Byasa alcinous*. 31. *Achillides bianor*. 32. *Parnara guttata*. 33. *Episyrphus* sp. 34. *Drosophila melanogaster*. 35. *Cletus* sp.

2.5 花粉萌发和花粉管的生长情况

2.5.1 花粉粒在柱头表面的萌发和花粉管生长路径 琼花雌蕊授粉前(图36, 37)和人工授粉后22 h、3 d (图38, 39)的扫描电镜图片显示, 柱头授粉前和人工授粉后的形态差异不明显。柱头具3浅沟, 极面观呈近圆形, 表面布满环形乳突细胞, 无黏液分泌(图37)。琼花的花粉粒赤道面观近圆形或长圆形, 极面观为三裂圆形, 外壁具明显的网状雕纹, 网眼形状不规则, 大小不一, 具三条萌发沟, 沟较宽, 长达近两极, 末端稍尖, 沟中央有萌发

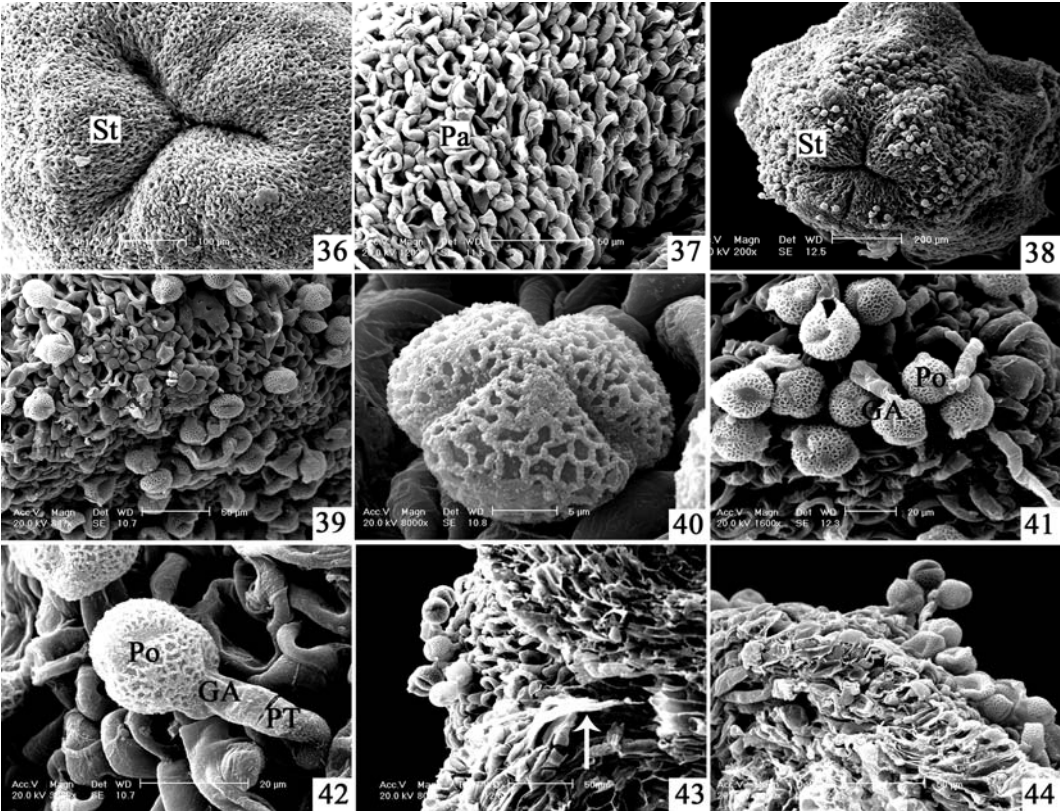


图36-44 琼花柱头及花粉粒扫描电镜显微照片 36. 授粉前的柱头形态(中央3浅裂)。37. 柱头表面乳突细胞。38, 39. 授粉后的柱头形态和表面。40. 花粉粒极面观。41. 花粉粒形态及花粉管从萌发处长出。42. 花粉管从乳突细胞间隙进入柱头。43. 柱头中央凹陷处的花粉粒萌发后紧贴柱头表皮细胞进入引导组织。箭头示花粉管。44. 花粉管进入柱头后, 在薄壁细胞中横向生长。箭头示花粉管。
GA, 萌发孔; Pa, 乳突细胞; Po, 花粉粒; PT, 花粉管; St, 柱头。

Figs. 36-44. The stigma and pollen grains of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* viewed with a scanning electronic microscope. 36. The morphology of a stigma before pollination (3 shallow split in the center). 37. The papillae on the surface of a stigma. 38, 39. The morphology of a stigma after pollination. 40. The polar view of a pollen grain. 41. The morphology of pollen grains and pollen tubes growing out from germination apertures. 42. Pollen tubes penetrated the stigma through the space among the papillae. 43. Pollen tubes at the sunken center of a stigma entered into the transmitting tissue along the epidermis of a stigma after germination. Arrow indicates a pollen tube. 44. Pollen tubes penetrated the surface of a stigma and then grew transversely toward the center of the stigma along the parenchyma cells. Arrow indicates a pollen tube.
GA, germination aperture; Pa, papilla; Po, pollen grain; PT, pollen tube; St, stigma.
Scale bars: 36, 100 μm ; 37, 39, 43, 44, 50 μm ; 38, 200 μm ; 40, 5 μm ; 41, 42, 20 μm .

孔(图40, 41)。萌发时花粉管自萌发孔伸出, 从乳突细胞的间隔进入柱头(图42), 后经柱头薄壁细胞区的细胞间隙进入引导组织。柱头中央的花粉粒萌发后产生的花粉管沿乳突细胞间凹陷处直接向引导组织生长(图43), 而柱头边缘的花粉粒, 其萌发的花粉管先在表皮下方组织的细胞间隙中横向生长至花柱引导组织, 然后再沿引导组织向下生长(图44)。

2.5.2 花粉管生长的荧光显微观察 琼花的花粉粒及花粉管经过0.1%水溶性苯胺蓝染色后, 在紫外荧光显微镜下可观察到很强的荧光, 花粉粒为橘黄色, 花粉管为亮蓝色, 花粉管的生长过程可以清晰显示出来。本实验所观察到的大量材料中, 柱头上花粉萌发率

均较高(图45), 但授粉后1 h的柱头表面, 仅见极少量花粉粒萌发, 且长出的花粉管较短, 未能在柱头表面深入, 加上材料经过80 °C水浴软化, 花粉粒易从柱头脱落, 仅在表面留下一些荧光点(图46)。授粉后2 h花粉粒大量萌发, 较为整齐, 多数花粉管已经穿入柱头表面, 花粉管先端较尖(图47), 但仍有部分花粉粒脱落。此后花粉管生长较快, 授粉4 h时, 大约80%样品花粉管到达花柱1/3处左右(图48), 6 h时大约75%样品已达花柱长度的3/4(图49), 此后花粉管生长速度明显减缓(图50)。授粉18 h时大约60%样品花粉管到达子房顶部, 且已有少量花粉管到达珠柄。授粉20 h时, 观察到少数样品花粉管从胚珠的珠孔处进入, 但大部分花粉管停留在子房顶部, 只有少数生长较慢者仍在花柱中行进(图51, 52)。此外, 本实验观察到有2条花粉管进入胚珠(图57, 58)的特殊情况。

经染色的花粉管胼胝质在紫外光激发诱导下能产生较强荧光(Teng et al., 2005), 在花粉管长到一定长度后, 外壁荧光减弱, 管中可以看到大量间断出现明亮的胼胝质塞(图53, 54, 56)。授粉18 h时, 延伸的花粉管顶部胼胝体含量相对较少, 荧光较弱, 顶端膨大, 颜色较暗。此后花柱内部花粉管在延伸过程中管壁增粗, 顶部积累大量胼胝体, 荧光强烈, 表明已失去活性, 或生长受到抑制(图54), 这样的花粉管在花柱的上半部分出现得较多(图51)。

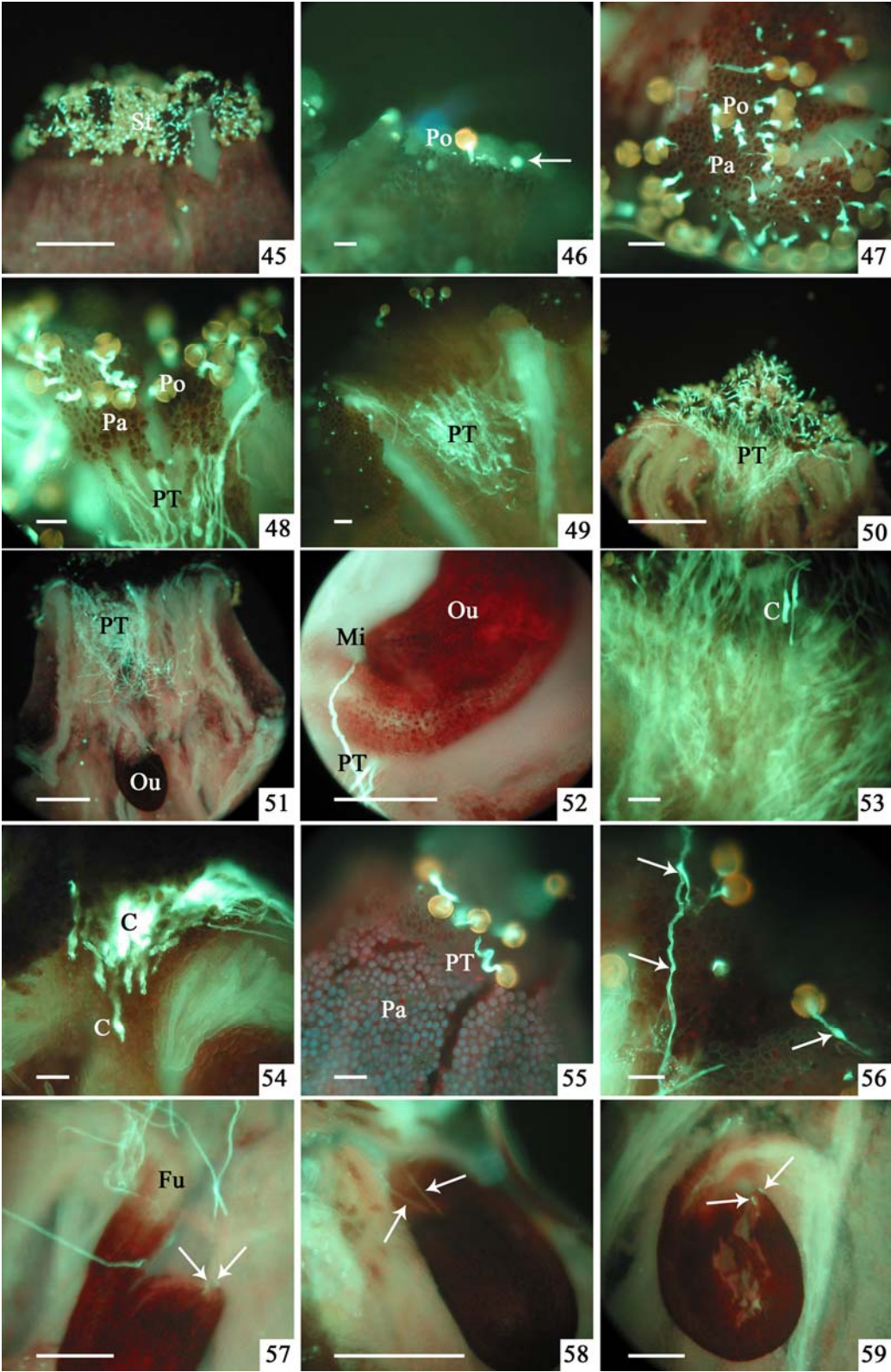
虽然花粉粒在柱头上萌发较多, 但有些异常的花粉管不定向生长、花粉管盘绕(图55)、扭曲、顶端膨大等, 通常无法伸入柱头内部。当花粉管接近或到达子房与花柱交界处时, 绝大多数花粉管停止生长, 只有极少部分能长至珠柄处(图51)。最终只观察到1–2条花粉管能从珠孔处进入(图52), 随后大多数花粉管停止生长。授粉后期的胚珠在珠孔处可观察到花粉管进入留下的亮点(图59)。

3 讨论

3.1 琼花不孕花的形成

花部的综合特征影响着传粉者的觅食行为, 传粉者的访花行为又影响着植物的繁育系统(Stebbins, 1974; 黄双全等, 1999; Huang & Guo, 2000), 而花的多样性也是朝着适应传粉媒介的多样性而进化(Real, 1983; Huang & Guo, 2000)。琼花花序中部可孕花较小, 香味较淡, 花冠无鲜艳的色泽, 不足以吸引昆虫的停驻。因视觉的敏感性, 远处的访花昆虫先被大型不孕花吸引过来, 可孕花大量的花粉则作为昆虫访花成功的酬物, 这样两种花型的默契分工促成更多高质量的传粉, 这点类似于双子叶植物纲中最进化类群菊科植物的头状花序的功能(Mani & Saravanan, 1999), 使得整个花序在传粉过程中形成一个整体。因此, 琼花不孕花的出现, 花在开放样式上更加醒目, 从而增强了对传粉者的吸引, 使传粉者的数量和访花频率得到增加。在这种情况下, 居群内异株异花授粉概率也随之增加, 由于物种杂交和异交的后代适应性明显高于自交(Darwin, 1862, 1876), 使得琼花生殖的完成不需要依赖于自花授粉甚至同株异花授粉, 而朝着完全异花传粉的繁育系统类型进化, 本试验检测的完全异花传粉和专性异交型的结果也说明了这点, 其较高的P/O值也显示其远交程度的上升(Crudén, 1977)。

植株对大量不孕花花部生长所需物质和能量的投资, 受到总量资源的限制, 为了最



大程度地提高植株生殖过程的投入产出比, 琼花不孕花雌雄蕊的败育很大程度上与这种总量资源平衡有关。正如Brown (2002)指出的那样, 花其实是一个折中结构(compromise structure), 是在进化历程中对各种因素趋利避害的妥协结果。本实验结果显示, 发育初期的不孕花雌雄蕊的形态特征和解剖结构基本正常, 与可孕花相似, 只是在开花前后才迅速分化, 这与菊科的雌花两性花在花器官发生前期没有显著区别(Hams et al., 1991; Harris, 1995; 卢洋, 黄双全, 2006)的特征相类似, 由此表明琼花的不孕花是由可孕花演化而来, 可能在长期进化的过程中受传粉者的选择压力和资源限制的影响, 由结实器官逐渐演变为不结实的生殖辅助结构。

3.2 琼花花部结构的适应意义与莢蒾属的花型演化

由于不孕花的出现吸引了更多的传粉者, 琼花形成了拥有多种不同传粉者类型的泛化传粉系统(generalized pollination system)。相对于专化传粉体系植物性器官投资小的特征(Waser et al., 1996), 琼花对性器官做了较大的投资, 如花序大, 可孕小花数量繁多等特征。琼花为干型柱头, 不分泌花蜜, 为了使昆虫所获得的食物能量能够补偿访花所付出的能量(Heinrich & Raven, 1972), 采取了提高花粉输出的策略。这与琼花花粉量大、吸引以花粉为觅食对象的蜜蜂等观察结果相符。扫描电镜下可以看到柱头表面大量的凸凹不平的环形乳突细胞, 这种结构对落置的花粉粒可起到嵌合附着作用, 以弥补干柱头无分泌物而缺少对花粉的黏附能力的缺陷。

花部结构的醒目程度, 还可因其在伞房花序上辐射状排列而得到很大加强(Wyatt, 1982; Moller & Eriksson, 1995), 琼花的聚伞房花序组成了浓密而显著的丛簇, 周围的边花可明显增进花序的形态效果, 这类放射对称的挺起的花朵, 也容易吸引蝶类访花(Pijl, 1960)。当琼花可孕花的花药散粉时, 花中部变成黄色并散发较浓郁的气味, 香气和色彩又吸引了对气味和色彩敏感的昆虫访花。因此, 琼花花部结构不应是对某一种或一类传

图45-59 琼花花粉粒在柱头萌发和花粉管在雌蕊中生长 45. 授粉后的柱头。46. 授粉1 h后的柱头表面, 花粉粒和一些残留的亮点。箭示亮点。47. 授粉后2 h, 花粉管具较尖的先端。48. 授粉后4 h的花粉管, 进入花柱1/3处。49. 授粉后6 h的花粉管, 进入花柱3/4处。50. 授粉后8 h, 花粉管在花柱中的生长情况。51. 授粉后20 h, 大量花粉管停留在花柱与子房的交界处。52. 授粉后20 h, 1条花粉管从珠孔进入。53, 54. 花柱上部少量花粉管出现胼胝质积累, 花粉管生长受抑制。55. 授粉后6 h, 部分花粉管盘绕生长现象。56.花粉管中的胼胝质塞。箭示胼胝质塞。57. 授粉后2 d, 2条花粉管进入胚珠。箭示2花粉管。58. 授粉后3 d, 2条花粉管进入胚珠内部的路径。箭示2花粉管。59. 授粉后期的胚珠。箭示花粉管进入残留的亮点。

C, 胼胝质; Fu, 珠柄; Mi, 珠孔; Ou, 胚珠; Pa, 乳突细胞; Po, 花粉粒; PT, 花粉管; St, 柱头。
Figs. 45-59. Pollen grains germinated on the stigmas and pollen tubes grew in the pistils of *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri*. 45. The stigma after pollination. 46. A pollen grain and some remanent bright points on the surface of a stigma at an hour after pollination. Arrow indicates the bright point. 47. Many pollen tubes had a sharp top at 2 hours after pollination. 48. Many pollen tubes reached 1/3 of the style length at 4 hours after pollination. 49. Many pollen tubes reached 3/4 of the style length at 6 hours after pollination. 50. The morphology of pollen tubes in the style at 8 hours after pollination. 51. Many pollen tubes rested on the boundary between the style and the ovary at 20 hours after pollination. 52. One pollen tube grew into an ovule through the micropyle at 20 hours after pollination. 53, 54. Callose was deposited in pollen tubes in the upside of style and the pollen tube growth was arrested. 55. Some pollen grains developed into spiral tubes at 6 hours after pollination. 56. Callose plugs in pollen tubes. Arrow indicates a callose plug. 57. Two pollen tubes penetrated the same ovule at 2 days after pollination. Arrows indicate two pollen tubes. 58. Two pollen tubes penetrated the same ovule at 3 days after pollination. Arrows indicate two pollen tubes. 59. The ovule at the later stage after pollination. Arrows indicate the remanent bright points of pollen tubes.
C, callose; Fu, funiculus; Mi, micropyle; Ou, ovule; Pa, papilla; Po, pollen grain; PT, pollen tube; St, stigma.
Scale bars: 45, 50, 51, 100 μm ; 46-49, 52-59, 20 μm .

粉者适应的结果,而应该是多种类型的有效传粉者综合作用形成的选择合力下的进化适应表现。可以预示,这种花部特征在确保授粉质量又不增加花粉数量投入的前提下,为吸引更多传粉者能演化出更多醒目的不孕花,如莢蒾属中的蝴蝶戏珠花 *V. plicatum* Thunb. f. *tomentosum* (Thunb.) Miq.、合轴莢蒾、天目琼花 *V. sargentii* Koehne var. *calvescens* Rehd. 等花序比琼花具有更多的不孕花就是上述情况的例证(Donoghue, 1982, 1983)。

3.3 琼花的结实率

在自然状态下,琼花的花型能吸引众多的访问者,一般无传粉者不足的现象,且传粉者实现成功传粉的可能性较大,但琼花自然授粉的结实率仍然相对较低,平均为17.9%。部分原因可能是琼花不具有忠实专一的传粉者,主要的访花者如蝶类和蜂类不加以选择地觅食可以将琼花的花粉传送到其他物种的花上,降低了到达同种异株植物花上的数量。同时可孕花的结构如较短的雄蕊、较大的花粉量和突起的柱头等,昆虫访花和重力影响均容易造成自花授粉,由于自交不亲和,自身花粉即使不能成功结实也能通过堵塞柱头表面等方式干扰外来花粉的生殖成功(Bertin & Kerwin, 1998; Bertin & Gwisc, 2002),不同种植物享有同种传粉者能降低花粉散布的距离和杂交比例以及后代质量(Campbell, 1985; 黄双全等, 1999),本实验人工授粉能提高结实率的结果也说明了结实率受到了这种花粉限制(pollen limitation)的影响。其次,可孕小花数量众多,一方面部分小花可能没有被传递上足够的花粉量,使得这部分小花未能成功受精,从而最终不能结实(Teng et al., 2006);另一方面小花的数量并不能完全代表植物在性功能上的总投入,还应该包括胚、种子发育所需的资源投入,因为受资源限制和营养竞争,植物可以通过改变结实率来调节资源配置(Bertin & Kerwin, 1998; Bertin & Gwisc, 2002),琼花授粉后的花序中也可能受资源限制存在着类似的败育现象。

3.4 花粉管在柱头和花柱中生长的途径和特点

琼花为干柱头类型,在电镜下可观察到不同时期花粉粒的固定和萌发情况,先是通过柱头表面粗糙的乳突细胞与花粉粒表面凸凹的网状雕纹先产生物理接触吸附,再以花粉壁和柱头表面的脂类物质亲和后开始水合,花粉管开始自萌发孔中伸出,经过乳突细胞间隙进入柱头(图42)。花粉管穿过花柱后,接近或到达子房与花柱交界处时,绝大多数花粉管生长变缓或停止,即在此处发生了障碍。此时花粉管端产生大量的胼胝质,沿管壁不规则沉积,进而形成胼胝质塞,因此胼胝质塞与花粉管的生长停滞密切相关(Teng et al., 2005, 2006)。极少部分花粉管能长至珠柄处,最终只有1-2条花粉管能从珠孔处进入胚囊,随后大多数花粉管就停止生长,其原因可能是滞后生长的花粉管失去了实现生殖成功的意义(黄双全等, 1998),停止生长可以减少不必要的物质和能量浪费。

琼花是完全的异花传粉植物,醒目的花部构造吸引着大量的传粉者访花,同时也可以给柱头带来大量的花粉,使柱头上花粉落置比例较高。本实验观察到琼花花粉在柱头上吸附、水合、萌发和花粉管的生长行为均正常,但最终仅有1-2条到达珠孔,这暗示着花粉间存在着激烈的竞争,竞争的强度可能受传粉的时间和数量影响,而最终的生殖成功则取决于花柱内部花粉管生长竞争的结果。本研究结果显示,大量花粉管经过子房与花柱交界处时明显受到了有效的阻挡和筛选,最终只有极少数花粉管从珠孔处进入胚囊。此外,很多研究表明长的花柱有利于促进花粉管竞争从而提高雌性适合度(Lankinen

& Skogsmyr, 2001), 而琼花的花柱较短, 花粉管竞争则通过花柱中阻碍区得以增强, 这可能是防止多精入卵的一种有效手段, 也可能起到降低结实率来调节资源配置的作用, 子房与花柱交界处的这部分特殊区域对花粉管生长阻碍的作用机制有待进一步深入研究。

综上所述, 本研究将琼花生殖器官结构、访花行为、繁育系统和花粉管生长等密切联系起来进行相关传粉机制分析更有助于系统合理揭示有性生殖、传粉与其特殊花部进化的关系, 同时也将为琼花的繁育、新品种的培育提供一定的理论指导, 并为莢蒾属的系统进化研究提供资料。

致谢 本文得到了南京农业大学园艺学院滕年军博士的指导和帮助, 扬州大学生物技术学院陈刚副教授、中心实验室周卫东教授参加了部分工作, 美国State University of New York植物科学系的Zhongchun JIANG教授对英文摘要进行了修改, 特此致谢。

参 考 文 献

- Barrett S C H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274–284.
- Bawa K, Beach J. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254–274.
- Bertin R I, Kerwin M A. 1998. Floral sex ratios and gynomonoeacy in *Aster* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 85: 235–244.
- Bertin R I, Gwise G M. 2002. Floral sex ratios and gynomonoeacy in *Solidago* (Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 77: 413–422.
- Brown K. 2002. Floral evolution: A compromise on floral traits. *Science* 298: 45–46.
- Campbell D R. 1985. Pollen and gene dispersal: the influences of competition for pollination. *Evolution* 39: 418–431.
- Cruden R W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32–46.
- Darwin C. 1862. On the Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids Are Fertilized by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing. London: Murray.
- Darwin C. 1876. The Effects of Cross and Self Fertilization in the Vegetable Kingdom. London: Murray.
- Darwin C. 1877. The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species. London: John Murray.
- Donoghue M J. 1982. Systematic Studies in the Genus *Viburnum*. Ph.D. Dissertation. Cambridge, MA: Harvard University.
- Donoghue M J. 1983. A preliminary analysis of phylogenetic relationships in *Viburnum* (Caprifoliaceae s.l.). *Systematic Botany* 8: 45–58.
- Donoghue M J, Bell C D, Winkworth R C. 2003. The evolution of reproductive characters in *Dipsacales*. *International Journal of Plant Sciences* 164 (Suppl.): 453–464.
- Donoghue M J, Baldwin B G, Li J, Winkworth R C. 2004. *Viburnum* phylogeny based on chloroplast *trnK* intron and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Systematic Botany* 29: 188–198.
- Grant V, Grant K A. 1965. Flower Pollination in the Phlox Family. New York: Columbia University Press.
- Hams E M, Tucker S C, Urbatsch L E. 1991. Floral initiation and early development in *Erigeron philadelphicus* L. (Asteraceae: Astereae). *American Journal of Botany* 78: 108–121.
- Hara H. 1983. A revision of the Caprifoliaceae of Japan with reference to allied plants in other districts and the Adoxaceae. *Ginkgoana* 5: 230–269.
- Haring V, Gray J E, McClure B A. 1990. Self incompatibility: a self recognition system in plants. *Science* 250: 937–941.
- Harris E M. 1995. Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: A synthesis of historical and current concepts. *The Botanical Review* 61: 93–278.
- Heinrich B, Raven P H. 1972. Energetics and pollination ecology. *Science* 176: 597–602.
- Huang S-Q (黄双全), Guo Y-H (郭友好), Chen J-K (陈家宽). 1998. Pollination rates and pollen tube growth in a vulnerable plant, *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. (Magnoliaceae). *Acta Phytotaxonomica*

- Sinica (植物分类学报) 36: 310–316.
- Huang S-Q (黄双全), Guo Y-H (郭友好), Pan M-Q (潘明清), Chen J-K (陈家宽). 1999. Floral syndrome and insect pollination of *Liriodendron chinense*. Acta Botanica Sinica (植物学报) 41: 241–248.
- Huang S-Q, Guo Y-H. 2000. New advances in pollination biology and the studies in China. Chinese Science Bulletin 45: 1441–1447.
- Jin B (金飏), Chen Y (陈宇), Wang L (王莉). 2005. The factors influencing seed dormancy of *Viburnum macrocephalum*. Plant Physiology Communications (植物生理学通讯) 41: 610–613.
- Kandasamy M K, Nasrallah J B, Nasrallah M E. 1994. Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. Development 120: 3405–3418.
- Kern J H. 1951. The genus *Viburnum* (Caprifoliaceae) in Malaysia. Reinwardtia 1: 107–170.
- Killip E P, Smith A C. 1931. The South American species of *Viburnum*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 57: 245–258.
- Lankinen A, Skogsmyr I. 2001. Evolution of pistil length as a choice mechanism for pollen quality. Oikos 92: 81–90.
- Li Q-J, Xu Z-F, Kress W J, Xia Y-M, Zhang L, Deng X-B, Gao J-Y. 2001. Flexible style that encourages outcrossing. Nature 410: 432.
- Lu Y (卢洋), Huang S-Q (黄双全). 2006. Adaptive advantages of gynomonoeious species. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 44: 231–239.
- Luo Y-B (罗毅波), Jia J-S (贾建生), Wang C-L (王春玲). 2003. A general review of the conservation status of Chinese orchids. Biodiversity Science (生物多样性) 11: 70–77.
- Mani M S, Saravanan J M. 1999. Pollination Ecology and Evolution in Compositae (Asteraceae). New Hampshire: Science Publishers.
- Moller A P, Eriksson M. 1995. Pollinator preference for symmetrical flowers and sexual selection in plants. Oikos 73: 15–22.
- Morton C V. 1933. The Mexican and Central American species of *Viburnum*. Contributions of the U.S. National Herbarium 26: 339–366.
- Pijl L. 1960. Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. Evolution 14: 403–416.
- Richards A J. 1997. Plant Breeding Systems. 2nd ed. London: Chapman & Hall.
- Real L. 1983. Pollination Biology. Florida: Academic Press.
- Sun H-Q (孙海芹), Luo Y-B (罗毅波), Ge S (葛颂). 2003. A preliminary study on pollination biology of an endangered orchid, *Changnienia amoena*, in Shennongjia. Acta Botanica Sinica (植物学报) 45: 1019–1023.
- Stebbins G L. 1974. Flowering Plants: Evolution Above the Species Level. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Teng N-J, Huang Z-H, Mu X-J, Jin B, Hu Y-X, Lin J-X. 2005. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. Flora 200: 256–263.
- Teng N-J, Chen T, Jin B, Wu X-Q, Huang Z-H, Li X-G, Wang Y-H, Mu X-J, Lin J-X. 2006. Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis* (Poaceae). Flora 201: 658–667.
- Wang Y-Q (王英强), Zhang D-X (张奠湘), Chen Z-Y (陈忠毅). 2005. Pollination biology of *Alpinia hainanensis* (Zingiberaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 43: 37–49.
- Waser N M, Chittka L, Price M V, Williams N M, Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. Ecology 77: 1043–1060.
- Winkworth R C, Donoghue M J. 2004. *Viburnum* phylogeny: evidence from the duplicated nuclear gene GBSSI. Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 109–126.
- Wyatt R. 1982. Inflorescence architecture: How flower number, arrangement, and phenology affect pollination and fruit set. American Journal of Botany 69: 585–594.
- Xu B-S (徐炳声). 1988. *Viburnum* L. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 72: 24–25.