

# 紫花地丁两型花相互转变过程中花部形态结构的变化式样研究

李巧峡\* 黄小霞 陈 纹 王 镛 孙 坤

西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

**摘 要** 紫花地丁(*Viola philippica*)是具典型开放花与闭锁花混合繁育系统的植物, 其两型花的形态差异为花器官发育研究提供了极好的模型。该文以不同光周期下生长的或在不同光周期间调换的紫花地丁植株为研究对象, 基于形态解剖学方法, 研究了过渡闭锁花的形态结构、开放花到完全闭锁花或完全闭锁花到开放花的变化式样, 以及完全闭锁花与过渡闭锁花中不发育雄蕊与花瓣的位置效应。结果显示: 该物种在短日照与中日照下均有开放花与过渡闭锁花形成, 短日照下大多数花芽为开放花, 少数为过渡闭锁花, 中日照下大多数花芽为过渡闭锁花, 少数为开放花; 长日照下全为完全闭锁花。在过渡闭锁花芽中, 存在着一系列雄蕊与花瓣数目不同的过渡类型, 既有偏向开放花的5雄3瓣的过渡类型, 也有偏向完全闭锁花的2雄1瓣的过渡类型。其中, 前一种类型在短日照下的过渡闭锁花芽中所占比例较大, 而后一种类型在中日照下所占比例较大。另外, 过渡闭锁花与完全闭锁花的雄蕊与花瓣发育程度均存在一定的位置效应, 其花芽腹侧的下花瓣(对应于开放花的下花瓣)与相邻的2枚雄蕊普遍发育最好, 而后花瓣(相对于前花瓣)的发育与完全闭锁花的基本一样, 为器官原基状, 与后花瓣相邻的2枚雄蕊也普遍最小, 而且也最容易发育为无小孢子发生的膜质状结构或原基状结构。同时, 将具完全闭锁花的植株置于短日照下或将具开放花的植株置于长日照下一段时间后, 重新诱导的花芽经历一系列过渡闭锁花类型后发生花型的相互转变。因此, 不同光周期对紫花地丁两型花发育的影响是渐进的, 长日照会抑制部分花瓣与雄蕊的发育, 短日照能拮抗并破除长日照对雄蕊与花瓣的抑制。

**关键词** 紫花地丁; 两型花; 过渡闭锁花; 相互转变; 位置效应

**引用格式:** 李巧峡, 黄小霞, 陈纹, 王镛, 孙坤 (2017). 紫花地丁两型花相互转变过程中花部形态结构的变化式样研究. 植物生态学报, 41, 1190–1198. doi: 10.17521/cjpe.2017.0153

## Patterns of flower morphology and structural changes during interconversion between chasmogamous and cleistogamous flowers in *Viola philippica*

LI Qiao-Xia\*, HUANG Xiao-Xia, CHEN Wen, WANG Yong, and SUN Kun

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

### Abstract

**Aims** *Viola philippica* is a species with a typical chasmogamous-cleistogamous (CH-CL) mixed breeding system. It provides a flower model system to investigate floral organs development under different photoperiods. Morphological changes of intermediate cleistogamous (inCL) flowers have been observed, the trends in variation of changes from CH flowers to CL flowers or from CL flowers to CH flowers have been analyzed, the localized effects of poorly developed stamens and petals in CL and inCL flowers have been identified. This research provided morphology and structural changes with implication for the evolutionary significance of the dimorphic flower formation for further study in dimorphic flower development.

**Methods** We used methods of anatomy and structural analysis to observe the morphological structures of flowers under different photoperiods.

**Important findings** Photoperiod played an important role in the development of CH and CL flowers in *V. philippica*. Under short-day light and intermediate-day light, both CH and inCL flowers developed simultaneously. Most of the floral buds were CH flowers under a photoperiod of short-day light, but most of the floral buds were inCL flowers under mid-day light. Complete CL flowers formed under long-day lights. However, there were a series of transitional types in the number and morphology of stamens and petals among inCL flowers, including

收稿日期Received: 2017-06-14 接受日期Accepted: 2017-11-20

\* E-mail: liqiaoxia8024@163.com

five stamens with three petals related to CH flowers and two stamens with one petal related to CL flowers. The former type was dominant under short-day light conditions, and the latter type was dominant under mid-day light. Further more, there were localized effects in stamen and petal development for CL and inCL flowers. The development of ventral lower petal (corresponding to the lower petal with spur of CH flower) and the adjacent two stamens in inCL flowers were best, and the back petal was similar to that of CL flowers, an organ primordium structure. The adjacent stamens with the back petals tended to be poorly developed. In extreme cases, these stamens in inCL flowers had no pollen sac, only a membranous appendage or even a primordium structure. When the plants with CL or CH flowers were placed under short-day light or long-day light, the newly induced flowers all showed a series of inCL flower types, finally the CL flowers transformed into CH flowers, and the CH flowers transformed into CL flowers. This result indicates the gradual effects of different photoperiods on dimorphic flowers development of *V. philippica*. A long photoperiod could inhibit the development of partial stamens and petals, and a short photoperiod could prevent the suppression of long-day light and promote the development of stamens and petals.

**Key words** *Viola philippica*; dimorphic flower; intermediate cleistogamous flower; interconversion; position effect

**Citation:** Li QX, Huang XX, Chen W, Wang Y, Sun K (2017). Patterns of flower morphology and structural changes during interconversion between chasmogamous and cleistogamous flowers in *Viola philippica*. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 41, 1190–1198. doi: 10.17521/cjpe.2017.0153

开花是被子植物有性繁殖过程中的一个关键阶段, 但不是所有的花都能开放来展示其内部结构, 有些植物的花始终不开放, 通过自花受精产生种子, 这种花被称为闭锁花(cleistogamous)。而一些产生闭锁花的植物也能产生开放花(chasmogamous), 能通过远交产生种子。如在禾本科、远志科、凤仙花科、豆科和堇菜科等亲缘关系比较远的开花植物类群中都有闭锁花现象。早在1908年科学家们就描述了30多种植物的开放花与闭锁花形态, 并认为花瓣与雄蕊数量的减少是闭锁花最普遍的特征(Uphof, 1938)。Lord (1981)曾将闭锁花植物分为花前受精闭锁花、假闭花受精闭锁花、完全闭锁花和真正的闭锁花四大类。生物学家与生态学家最感兴趣的是具有两型花的真正闭锁花植物, 即两型的闭花受精植物: 在同一个个体的不同时期或同一时期出现两种形态完全不同的花——开放花与闭锁花。一些生态因子如水分、光强、光周期、土壤营养和温度可能在两型花的形成与发育中起关键作用(Sigrist & Sazima, 2002; Morinaga *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013)。

两型的闭花受精植物由于闭锁花的完全自交以及开放花的部分自交, 可能会降低居群内或居群间的基因流, 导致自交衰退, 使居群的遗传多样性变低(Auge *et al.*, 2001)。而在具闭锁花的*Viola pubescens*中, 开放花虽有较高的自交率, 但居群内具较高的遗传多样性, 且居群间的遗传分化也较小, 说明部分异交的开放花对该物种居群遗传多样性的维持起重要作用, 并防止了居群间的遗传分化(Culley

& Wolfe, 2001); *Impatiens capensis*开放花与闭锁花的比率似乎对遗传结构的影响也不大(Paoletti & Holsinger, 1999); *Ruellia nudiflora*中不同花型对子代的适应性与性能的影响是比较微小的(Munguía-Rosas *et al.*, 2013)。因此, 大多数学者认为, 在不断变化的生态环境中, 两型闭花受精植物的开放花与闭锁花是作为一种两头下注的生殖对策以达到繁育系统的优化: 具潜在远交能力的开放花能提供遗传上可变异的子代(Stebbins, 1957; Beattie, 1976; Solbrig, 1976), 降低自交衰退及由生境改变而引起的灭绝风险(Schemske, 1978; Schoen & Lloyd, 1984); 而闭锁花绝对的自交能在远交不利的环境下为植物提供繁殖保障(Schemske, 1978; Campbell, 1982), 保存有利的基因型(Stebbins, 1957; Beattie, 1976; Solbrig, 1976), 防止有害基因渗入(Waller, 1984), 减少因吸引传粉者所需的能量投入(Solbrig, 1976; Schemske, 1978; Waller, 1979), 并在不利的环境下保护花的生殖器官(Campbell, 1982; Campbell *et al.*, 1983)。

堇菜属(*Viola*)广泛分布在北温带及热带地区的山地森林中(Wahlert *et al.*, 2014), 全球有525–600种, 其中, 80多种具有开放花与闭锁花的混合繁育系统(Culley & Klooster, 2007), 且在一些物种中有形态介于开放花与完全闭锁花之间的过渡闭锁花类型(Lord, 1981; Culley & Klooster, 2007; Li *et al.*, 2016; Malobecki *et al.*, 2016), 个别种类(如*Viola odorata*)中开放花与闭锁花的诱导与光照时间有关(Mayer &

Lord, 1983)。该属植物开放花与闭锁花发育的独特模式已引起了人们的关注(Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016)。为了进一步研究两型花发育的机制, 对其不同类型花的形态结构研究就显得非常必要。

紫花地丁(*Viola philippica*)为堇菜属多年生草本植物, 是一种典型的具有开放花与闭锁花的两型闭花授精植物。光周期是影响紫花地丁两型花形成的主要生态因子, 短日照下发育的花主要为开放花, 长日照(光周期大于14 h)下形成完全闭锁花(Li *et al.*, 2016)。人们对紫花地丁开放花与完全闭锁花的形态结构已有比较清楚的认识(刘绮丽等, 2006; 王镛等, 2017)。但该物种的开放花与完全闭锁花之间还存在着一种过渡闭锁花(intermediate cleistogamous), 其中, 在短日照下有少数花芽为过渡闭锁花, 中日照下大部分花芽为过渡闭锁花(Li *et al.*, 2016)。那么, 其过渡闭锁花的花芽形态解剖结构如何? 有无明显的表型变异? 将短日照下的开放花植株置于长日照下或将长日照下的完全闭锁花植株置于短日照下, 新诱导花芽的形态结构是否存在可逆的变化趋势? 对这些问题的回答将有助于我们理解紫花地丁开放花到完全闭锁花的变化规律或完全闭锁花到开放花的变化规律, 阐明闭锁花芽中不发育雄蕊与花瓣是否存在位置效应, 并为两型花植物的适应性进化及两型花发育的机制研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

紫花地丁种子经消毒处理后, 将其种于灭菌处理的营养土中。待种子萌发并长出4–6片真叶后, 将幼苗移栽于含有营养土与蛭石(体积比2:1)的塑料花盆中。设定10 h、12 h和16 h 3个光周期。植株在设有不同光周期(时控器控制光照时间)的不同培养架上平行生长。培养温度在28 °C左右, 湿度保持在48%左右, 光照强度 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右。大约2个月, 不同光周期下, 植株均被诱导出不同花型的花芽。

### 1.2 实验方法

将不同光周期下诱导的成熟花芽置于OLYMPUS体视显微镜(DP2-BSW-V2.2, Olympus, Tokyo, Japan)下解剖, 并拍照, 得到各种花型的形态结构。不同光周期下, 对开有不同花型(开放花、过渡闭锁花与完全闭锁花芽)的植株数进行统计, 每株摘取

2–3个花芽进行形态解剖。同时, 将10 h光周期下已有开放花芽的植株转移到16 h的光周期下或将16 h光周期下已有完全闭锁花芽的植株转移到10 h的光周期下继续培养, 每隔一段时间对新诱导的花芽进行观察并拍照。与此同时, 对不同花型的花器官进行测量并进行统计。

采用爱氏苏木精整体染色法(华中农学院植物教研室植物显微技术组, 1984)对不同花型的花芽进行横切解剖学研究。其具体过程为: 将整个花芽置于爱氏苏木精染色液中室温整体染色3天左右, 用自来水浸洗花芽使其由紫红色变为深蓝色, 用系列乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡。花芽横切厚度为7  $\mu\text{m}$ 。利用莱卡光学显微镜(DMI4000B, Leica, Wetzlar, Germany)对石蜡切片进行观察与拍照。

### 1.3 数据统计分析

用Excel2007分析误差值并得到柱状图, 不同花型植株所占的百分比以及不同花型花器官大小之间的显著性差异用最小显著差异法进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 过渡闭锁花的形态结构

开放花有5个比较大的紫色花瓣, 同时下花瓣基部向后突出形成距; 5枚雄蕊较大, 花丝很短, 几乎看不清, 每个雄蕊有4个花药室(图1A、1K, 图2A), 最下面的2枚雄蕊背基部有明显的蜜腺体并伸向下花瓣形成的距中(图2A)。完全闭锁花5个花瓣均为原基状; 只有2枚雄蕊(花芽的腹侧), 较小, 花丝明显, 每个雄蕊2个花药室, 其余雄蕊(花芽的侧部与背部)均为原基状; 蜜腺体消失(图1B、1L, 图2M)。

过渡闭锁花的花瓣在1–3之间, 至少下花瓣有一定的发育(图1C–1J、1M–1O)。比较有趣的是, 在过渡闭锁花中, 与发育比较好的雄蕊相邻的花瓣一般有一定的发育, 尤其是在两枚发育最好的雄蕊间的花瓣往往发育最好, 而与发育不良雄蕊(花药室比较小或只有一个花药室或只为膜质状的雄蕊)相邻的花瓣基本不发育, 为器官原基状(图1C–1J, 图2B–2M)。发育较好的花瓣长度或与雄蕊齐高或为雄蕊的一半且没有花青素的累积(图1C–1J)。

在过渡闭锁花芽中, 雄蕊数目与形态的变化比较大, 花丝明显, 蜜腺体消失, 雄蕊2–5枚, 花药室0–4 (图1C–1J、1M–1O), 只有当雄蕊是5枚的时候, 每个雄蕊的花药室才有4个的可能(图2B)。有的花芽

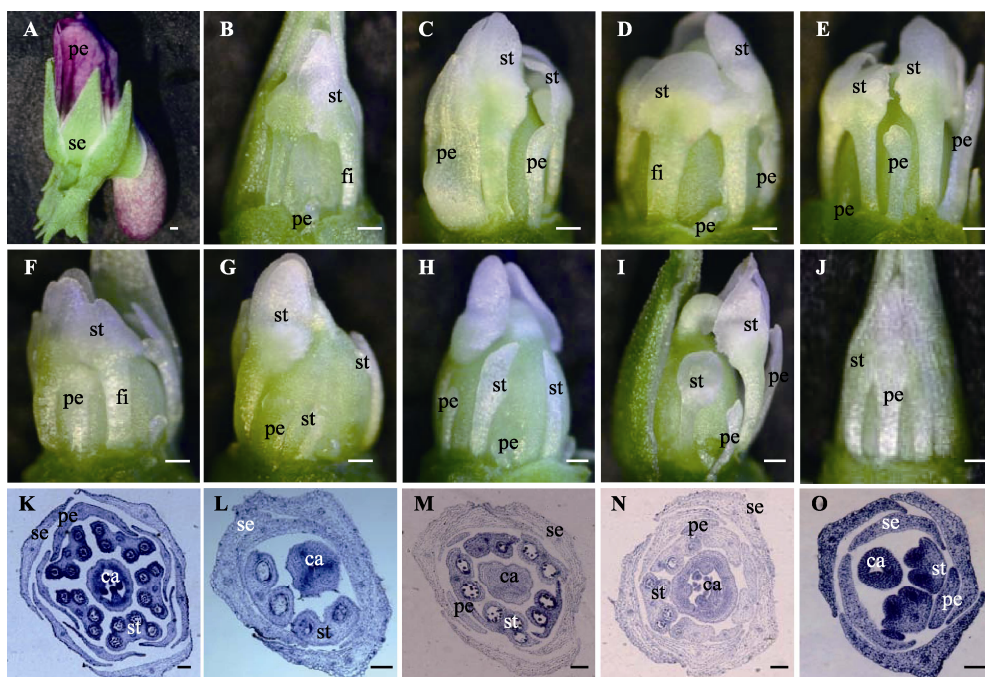


图1 紫花地丁两型花的表型变异。A, 开放花。B, 完全闭锁花。C-J, 过渡闭锁花。K, 开放花花芽的横切面。L, 完全闭锁花花芽的横切面。M-O, 过渡闭锁花花芽的横切面。ca, 心皮; fi, 花丝; pe, 花瓣; se, 花萼; st, 雄蕊。A-J, 比例尺为500 μm; K, 比例尺为200 μm; L-O, 比例尺为100 μm。

**Fig. 1** The phenotypic variation of dimorphic flower in *Viola philippica*. A, Chasmogamous flower. B, Cleistogamous flower. C-J, Intermediate cleistogamous flower. K, The cross section of chasmogamous flower. L, The cross section of cleistogamous flower. M-O, The cross section of intermediate cleistogamous flower. ca, carpel; fi, filament; pe, petal; se, sepal; st, stamen. A-J, bar = 500 μm; K, bar = 200 μm; L-O, bar = 100 μm.

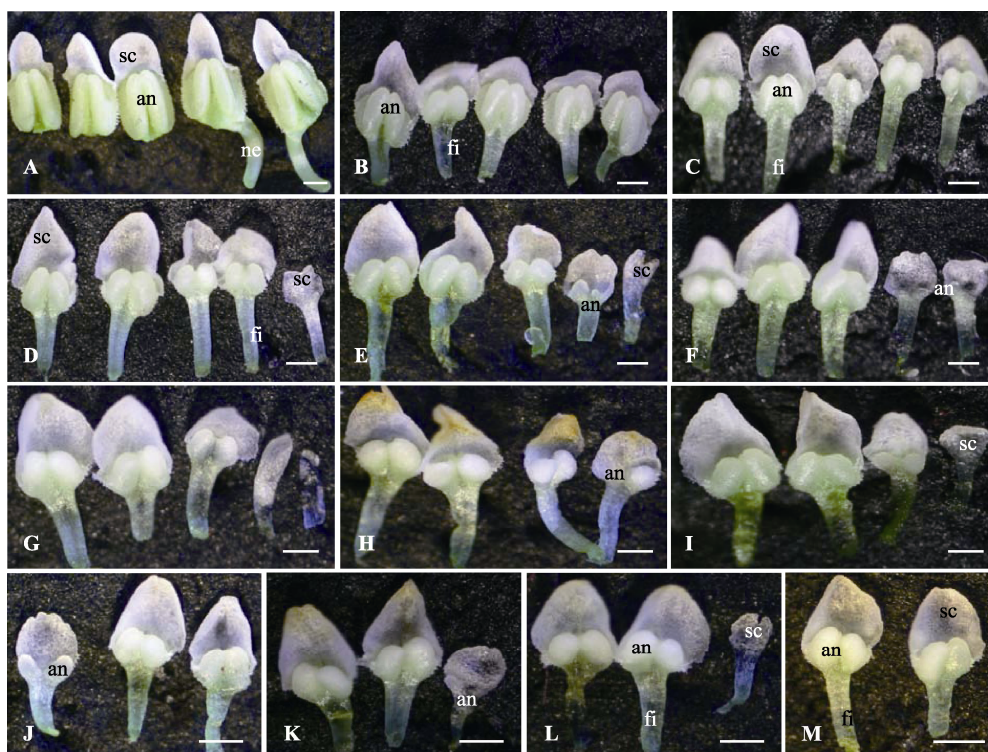


图2 紫花地丁两型花中雄蕊形态与数量的变异。A, 开放花中的5枚雄蕊。B-L, 过渡闭锁花中不同数目的雄蕊。M, 完全闭锁花中的2枚雄蕊。an, 花药; fi, 花丝; sc, 附属结构-雄蕊帽。比例尺为500 μm。

**Fig. 2** The morphological and number variation of stamens in dimorphic flower of *Viola philippica*. A, The five stamens in chasmogamous flower. B-L, The different number of stamens in intermediate cleistogamous flower. M, The two stamens in cleistogamous flower. an, anther; fi, filament; sc, stamen cap, the membranous appendage structure. Bar = 500 μm.



有5枚雄蕊, 但只有2个花药室(图1M, 图2C); 有的花芽虽有5枚可见的雄蕊, 但是部分雄蕊的花药室比较短小, 个别雄蕊只为膜质状结构(图2D–2G); 有的花芽有4枚雄蕊, 个别雄蕊为膜质状结构(图2H、2I); 有的花芽有3枚雄蕊, 个别雄蕊的花药室短小, 或只有一侧有花药室, 个别雄蕊为膜质状结构(图2J–2L); 有的花芽只有2枚雄蕊, 与完全闭锁花的一样(图2M)。因此, 从雄蕊数量上来看, 在过渡闭锁花芽中, 既有接近于开放花的5枚雄蕊, 也有接近于完全闭锁花的2枚雄蕊。

综上, 从过渡闭锁花的形态结构可看出, 与完全闭锁花相似, 雄蕊与花瓣发育的程度似乎有一定的位置效应, 花芽腹侧的下花瓣(对应于开放花有距的下花瓣)与相邻的2枚雄蕊往往发育最好, 而后花瓣(相对于前花瓣)基本与完全闭锁花一样, 为器官原基状, 与后花瓣相邻的2枚雄蕊也发育最小, 而且也最容易发育为无小孢子发生的膜质状结构或原基状结构(图1C–1J, 图2B–2M)。

2.2 不同光周期对过渡闭锁花形态的影响

本次数据与前期研究结果(Li *et al.*, 2016)是一致的, 光周期是紫花地丁两型花形成的主要生态因子。短日照(10 h)下, 大部分植株诱导的花为开放花, 少部分植物诱导的花为过渡闭锁花; 中日照 (12 h)下, 大部分植株开的花为过渡闭锁花, 少部分植株开的花为开放花; 而在长日照(16 h)下, 所有植物诱导的花全为完全闭锁花(表1)。那么, 在短日照与中日照下, 不同类型的过渡闭锁花植株所占的比例有何差异? 我们对短日照与中日照下诱导的不同类型过渡闭锁花植株进行了统计。结果发现, 在10 h光照下, 具5枚或4枚雄蕊且有3个花瓣的过渡闭锁花植株在所有植株中占的比例相对较大, 为6.40%, 而具有2枚雄蕊且只有1个花瓣的植株所占比例最小,

为2.10%; 且后者所占比例明显低于前者所占的比例( $p < 0.05$ )(表1)。12 h光照下, 5枚或4枚雄蕊且有3个花瓣的过渡闭锁花植株在所有植株中占的比例为4.70%, 2枚雄蕊且只有1个花瓣的过渡闭锁花植株所占比例为59.57%; 而且后者所占比例明显高于前者所占的比例( $p < 0.05$ )(表1)。由此可见, 10 h与12 h的光周期下, 虽都有过渡闭锁花形成, 但短日照下的过渡闭锁花其花器官数目大多数更接近于开放花, 而中日照下的过渡闭锁花其花器官数目更接近于完全闭锁花。

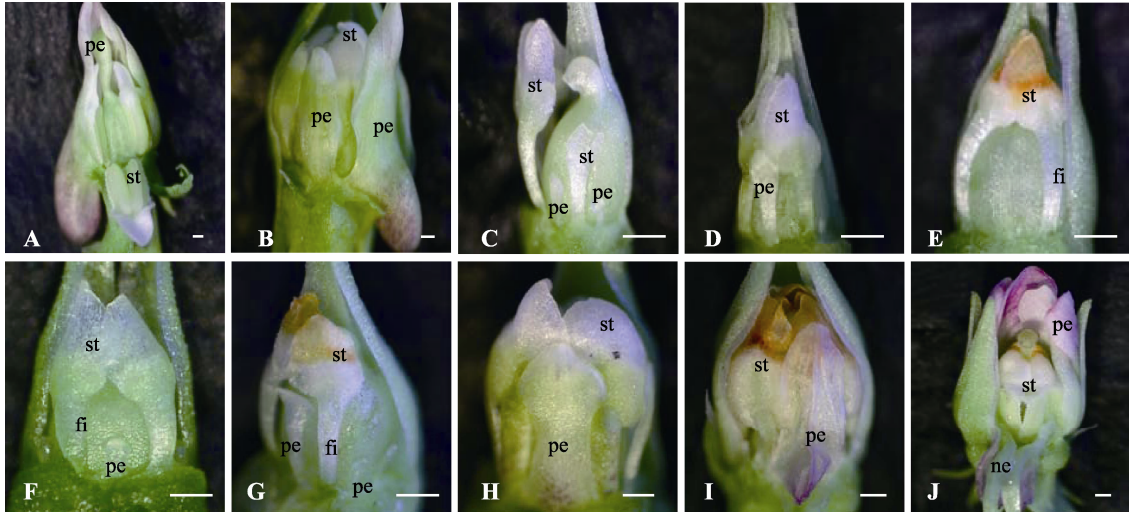
2.3 开放花植株在长日照下花型的变化趋势

将短日照(10 h)下已有开放花芽的植株移到长日照下(16 h), 每隔一段时间对逐渐诱导出的花芽进行观察、拍照, 并测量花器官的大小(图3A–3E, 图4A、4B)。0天的时候, 花芽为开放花的形态结构(图3A)。10天后, 花的结构为: 5个雄蕊, 每个雄蕊有4个花药室, 雄蕊的蜜腺体消失, 雄蕊的花丝伸长, 为整个雄蕊长度的1/5左右, 花药室变短, 为开放花雄蕊长度的2/3左右; 5个花瓣, 但是花瓣变小, 下花瓣的距变小或消失, 稍高或等高于雄蕊; 柱头弯曲明显(图3B)。20天后, 花的结构为: 有2个发育良好的雄蕊, 每个雄蕊只有2个花药室, 花丝较长, 为整个雄蕊长度的1/2左右, 花药室变得更小, 为开放花雄蕊长度的1/3左右, 其余3个雄蕊为膜质状或丝状结构或为原基状结构; 花瓣更短更窄, 只有2个大雄蕊间的下花瓣较大, 为整个雄蕊长度的3/4, 两个侧瓣较短小, 为雄蕊长度的1/5, 两个后花瓣为原基状; 柱头弯曲(图3C)。30天后, 花的结构为: 2个发育良好的雄蕊, 花丝较长, 花药室较小, 其余3个雄蕊为原基状结构; 只有2个发育较好的雄蕊间的下花瓣呈花瓣状, 为整个雄蕊长度的2/3左右, 其余4个花瓣均为原基状结构; 柱头弯曲(图3D)。40天后, 花芽

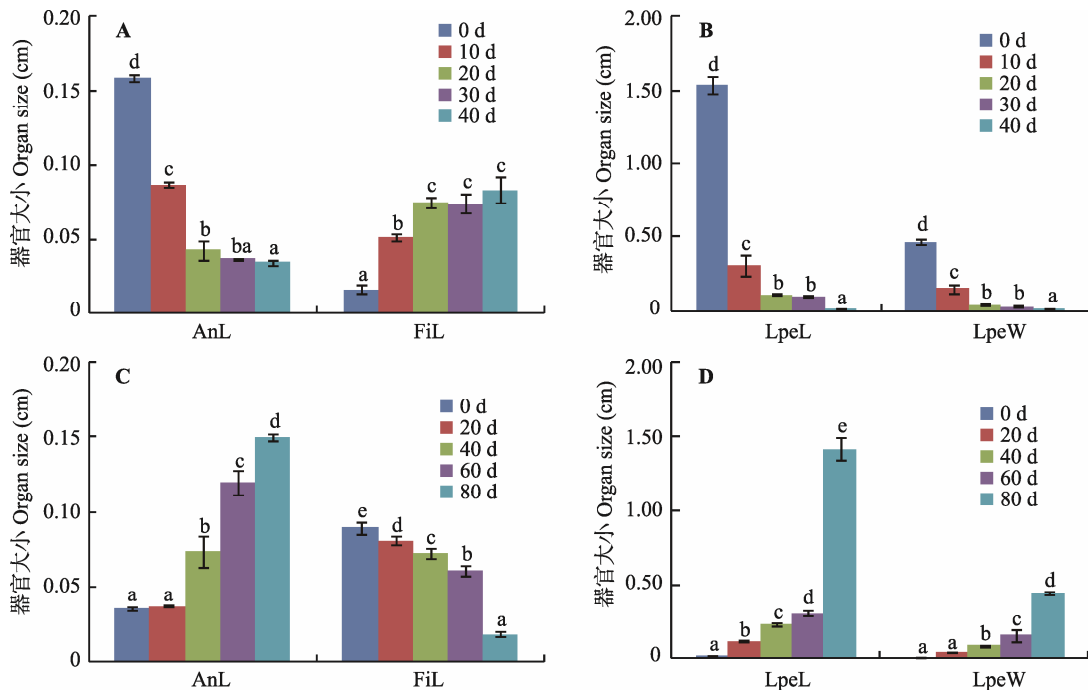
表1 紫花地丁不同光周期对过渡闭锁花形态结构的影响(平均值±标准误差)  
Table 1 The effect of different photoperiod on the morphological structure of intermediate cleistogamous flowers of *Viola philippica* (mean ± SE)

光周期 Photoperiod (light/dark)	开放花植株比率 The ratio of plant with CH flowers (%)	5枚或4枚雄蕊、3个花瓣 过渡闭锁花植株比率 The ratio of plant with inCL flowers of 5 or 4 stamens and 3 petals (%)	3枚雄蕊、3个花瓣过渡 闭锁花植株比率 The ratio of plant with inCL flowers of 3 stamens and 3 petals (%)	2枚雄蕊、3个花瓣过 渡闭锁花植株比率 The ratio of plant with inCL flowers of 2 stamens and 3 petals (%)	2枚雄蕊、1个花瓣过 渡闭锁花植株比率 The ratio of plant with inCL flowers of 2 stamens and 1 petal (%)	完全闭锁花植株 比率 The ratio of plant with CL flowers (%)
10 h/14 h	81.93 ± 0.016 <sup>d</sup>	6.40 ± 0.011 <sup>c</sup>	4.73 ± 0.012 <sup>c</sup>	4.87 ± 0.006 <sup>c</sup>	2.10 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>
12 h/12 h	3.50 ± 0.004 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.014 <sup>b</sup>	9.27 ± 0.009 <sup>c</sup>	23.80 ± 0.032 <sup>d</sup>	59.57 ± 0.008 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>
16 h/8 h	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.000 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.000 <sup>b</sup>

同行不同小写字母表示同一光周期下不同花型植株所占比例之间存在显著性差异( $p < 0.05$ )。  
CH, chasmogamous; CL, cleistogamous; inCL, intermediate cleistogamous. Different lowercase letters in each row indicate significant differences in the ratio of different flower type under the same photoperiod ( $p < 0.05$ ).



**图3** 紫花地丁开放花与完全闭锁花植株在一定光周期下的花型变化趋势。**A–E**, 具有开放花的植株置于16 h光照时间后花芽形态的变化趋势。**A**, 0天时的花芽形态。**B**, 10天时的花芽形态。**C**, 20天时的花芽形态。**D**, 30天时的花芽形态。**E**, 40天时的花芽形态。**F–J**, 具有完全闭锁花的植株置于10 h光照时间后花芽形态的变化趋势。**F**, 0天时的花芽形态。**G**, 20天时的花芽形态。**H**, 40天时的花芽形态。**I**, 60天时的花芽形态。**J**, 80天时的花芽形态。fi, 花丝; ne, 蜜腺体; pe, 花瓣; st, 雄蕊。比例尺500 μm。  
**Fig. 3** The variation trends of flowers type of the plants with chasmogamous or cleistogamous flowers under different photoperiod in *Viola philippica*. **A–E**, The variation trends of flowers type of the plants with chasmogamous flowers under 16 h daylight. **A**, The morphological structure of flowers at 0 days. **B**, The morphological structure of flowers at 10 days. **C**, The morphological structure of flowers at 20 days. **D**, The morphological structure of flowers at 30 days. **E**, The morphological structure of flowers at 40 days. **F–J**, The variation trends of flowers type of the plants with cleistogamous flowers under 10 h daylight. **F**, The morphological structure of flowers at 0 days. **G**, The morphological structure of flowers at 20 days. **H**, The morphological structure of flowers at 40 days. **I**, The morphological structure of flowers at 60 days. **J**, The morphological structure of flowers at 80 days. fi, filament; ne, nectar; pe, petal; st, stamen. Bar = 500 μm.



**图4** 不同光周期下紫花地丁两型花花器官大小的变化趋势。**A, B**, 开放花植株在16 h日照下新诱导花芽花器官大小的变化趋势。**C, D**, 完全闭锁花植株在10 h日照下新诱导花芽花器官大小的变化趋势。AnL, 花药的长度; FiL, 花丝的长度; LpeL, 下花瓣的长度; LpeW, 下花瓣的宽度。不同小写字母表示不同时间段下花器官大小之间存在显著差异( $p < 0.05$ )。

**Fig. 4** The variation trends of floral organ size in dimorphic flowers of *Viola philippica* under different photoperiod. **A, B**, The variation trends of flowers organ size in newly developed floral buds of the plants with chasmogamous flowers under 16 h daylight. **C, D**, the variation trends of flowers organ size in newly developed floral buds of the plants with cleistogamous flowers under 10 h daylight. AnL, the length of anther; FiL, the length of filament; LpeL, the length of lower petal; LpeW, the width of lower petal. The different lowercase letters indicated that there were significant differences in the size of floral organs as the time went on ( $p < 0.05$ ).

doi: 10.17521/cjpe.2017.0153

完全转变为16 h长日照下的完全闭锁花形态结构, 2雄蕊, 花丝较长, 为整个雄蕊长度的1/2左右, 其余3个为原基状; 5个花瓣基本没有发育, 为原基状; 柱头弯曲(图3E)。

在观察花芽形态的同时, 对花器官大小也进行了测量。随着长日照下时间的推移, 雄蕊及花瓣都逐渐变小、变少(图4A、4B)。40天后, 形成了只有2枚雄蕊、花瓣不发育的完全闭锁花(图3E)。

#### 2.4 完全闭锁花植株在短日照下花型的变化趋势

将长日照(16 h)已有完全闭锁花芽的植株移到短日照(10 h)下, 每隔一段时间对逐渐诱导出的花芽进行观察、拍照, 并测量花器官的大小(图3F–3J, 图4C、4D)。0天的时候, 花芽为完全闭锁花的形态结构(图3F)。20天后, 花的结构除下花瓣(比较窄)有一定的发育外, 其余结构与完全闭锁花一致(图3G)。40天后, 花的结构为: 有5个发育良好的雄蕊, 雄蕊有2–4个花药室, 花丝的长度有一定的缩短, 为整个雄蕊长度的1/3左右; 下花瓣有一定的发育, 变的比较宽且有少量花青素的积累(图3H)。60天后, 花的结构为: 5个发育良好的雄蕊, 每个雄蕊都有4个花药室, 花丝进一步缩短, 为整个雄蕊长度的1/4左右, 无蜜腺体; 下花瓣进一步发育, 已有距出现并有花青素的积累; 柱头此时依然弯向2枚大雄蕊(图3I)。80天后, 花芽完全转变为短日照下开放花的形态结构(图3J)。

同样, 随着短日照下时间的延长, 雄蕊及花瓣都逐渐变大变多, 而花丝逐渐变短(图4C、4D)。80天后, 形成了有5个紫色花瓣, 且下花瓣有距, 5枚雄蕊, 2枚大雄蕊重新发育有蜜腺体的开放花芽(图3J)。另外, 从不同光周期下花型相互转变的时间可看出, 长日照对雄蕊和花瓣的抑制作用强于短日照对雄蕊和花瓣发育的促进作用。

### 3 讨论

Li等(2016)的研究表明, 光周期是影响紫花地丁两型花发育的主要生态因子, 短日照下大多数植株被诱导出开放花, 少数植株的花为过渡闭锁花; 中日照下大多数植株的花为过渡闭锁花, 少数为开放花; 长日照下植株被诱导的花全部为完全闭锁花。虽然早在1981年Lord等就描述过*Viola odorata*在一定光照时间内会存在一种过渡闭锁花类型; Malobecki等(2016)也探讨过*Viola uliginosa*存在着过

渡闭锁花的类型, 但这些研究并没有详细地讨论过渡闭锁花的形态结构及其与开放花和完全闭锁花的关系。在我们的研究中, 我们发现紫花地丁过渡闭锁花是开放花到完全闭锁花或完全闭锁花到开放花的过渡类型, 而且, 这种过渡类型就是一系列具有不同雄蕊与花瓣数目的过渡花芽。比如有最接近于开放花的3个花瓣和5枚雄蕊(每个雄蕊4个花药室)的过渡闭锁花芽, 且这种类型的花芽在短日照的过渡闭锁花芽中所占比例最大; 也有最接近于完全闭锁花的1个花瓣和2枚雄蕊(每雄蕊2个花药室)的过渡闭锁花芽, 这种过渡类型在中日照下所占比例最大。同时, 紫花地丁, 开放花或完全闭锁花植株在长日照或短日照下, 其新诱导的花芽要经历一系列过渡闭锁花的不同类型, 最后发生花型的完全转变。因此, 随着光周期的延长, 长日照能逐步抑制部分花瓣和雄蕊的生长发育, 而短日照能拮抗长日照对雄蕊和花瓣的抑制作用, 使得雄蕊和花瓣破除抑制进而充分发育, 但是长日照的这种抑制作用要强于短日照的拮抗作用。

在紫花地丁中, 我们发现完全闭锁花与过渡闭锁花中, 雄蕊与花瓣的发育程度有一定的位置效应, 比如花芽腹侧的雄蕊发育最好, 而背面与侧部的雄蕊发育较弱, 最容易发育为膜质状或原基状结构。Li等(2016)的研究表明, 紫花地丁两型花的形态在花芽发育早期阶段即花器官发生阶段是相似的, 出现差异的时期是在花器官发生以后, 且小孢子发育为产孢细胞后的阶段(王镛等, 2017)。这与一些雌雄异株的植物相似, 如雌雄异体植物*Silene latifolia*和*Rumex acetosa*, 雌雄同株植物*Cucumis sativus*和*Platanus acerifolia*, 在花发育的早期, 都经历一个雌雄同体阶段, 然而在中后期不同的发育阶段, 性器官会经历不同程度的抑制而最终发育为单性花(Hardenack *et al.*, 1994; Ainsworth *et al.*, 1995; Kater *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012)。在紫花地丁中, 两型花的形态差异也出现在花芽发育的中后期, 部分花器官的发育受到了长日照的抑制作用。当然这种抑制作用可能与长日照影响的某些调控因子有一定的关系。

笋瓜(*Cucurbita maxima*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)雌/雄花的雄蕊与雌蕊中均存在赤霉素(GA)含量的不均匀分布, 进而影响雄花或雌花的发育(Lange *et al.*, 2012; Lange & Lange, 2016)。那么, 紫花地丁中,

在完全闭锁花和过渡闭锁花的发育过程中, 雄蕊和花瓣发育的位置效应是否也与某些激素的不对称运输或分布有一定的关系? 研究表明, 在两型花植物中, 一些植物激素确实也会影响到两型花的发育。如在 *Lamium amplexicaule* 和 *Collomia grandiflora* 中, 施加外源 GA 能诱导闭锁花转变为开放花, 但花药的形态特征仍保持闭锁花的特征 (Lord, 1979)。Wang 等 (2013) 研究表明, *VGA20oxidase* 和 *VGA3oxidase* 在 *Viola pubescens* 开放花中的表达量要高于闭锁花中的表达量。此外, 外源施加 ABA 几乎使 *Collomia grandiflora* 产生全部的闭锁花, Minter 和 Lord (1983) 认为在水胁迫条件下, 更多闭锁花的形成是由于产生了更多的内源 ABA。另外, 外源乙烯利能抑制 *Salpiglossis sinuata* 两型花花冠的生长, 在传粉之后, 乙烯在开放花和闭锁花中的含量均增加, 但是在闭锁花芽中释放的乙烯更多 (Lee *et al.*, 1978)。所以, 在紫花地丁中, 不同的光周期可能也会影响一些激素的合成、分布与运输, 进而引起两型花的发育, 不过这个结论还有待进一步的实验证明。

**基金项目** 国家自然科学基金(31560066)。

## 参考文献

- Ainsworth C, Crossley S, Buchanan-Wollaston V, Thangavelu M, Parke J (1995). Male and female flowers of the dioecious plant Sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *The Plant Cell*, 7, 1583–1598.
- Auge H, Neuffer B, Erlinghagen F, Grupe R, Brandl R (2001). Demographic and random amplified polymorphic DNA analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. *Molecular Ecology*, 10, 1811–1819.
- Beattie AJ (1976). Plant dispersion, pollination and gene flow in *Viola*. *Oecologia*, 25, 291–300.
- Campbell CS (1982). Cleistogamy in *Andropogon*. *American Journal of Botany*, 69, 1625–1635.
- Campbell CS, Quinn JA, Cheplick GP, Bell TJ (1983). Cleistogamy in grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14, 411–441.
- Culley TM, Klooster MR (2007). The cleistogamous breeding system: A review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. *Botanical Review*, 73, 1–30.
- Culley TM, Wolfe A (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86, 545–556.
- Hardenack S, Ye D, Saedler H, Grant S (1994). Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell*, 6, 1775–1787.
- Kater MM, Franken J, Carney KJ, Colombo L, Angenent GC (2001). Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *The Plant Cell*, 13, 481–493.
- Lange MJP, Knop N, Lange T (2012). Stamen-derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2681–2691.
- Lange MJP, Lange T (2016). Ovary-derived precursor gibberellin A9 is essential for female flower development in cucumber. *Development*, 143, 4425–4429.
- Lee CW, Erickson HT, Janick J (1978). Chasmogamous and cleistogamous pollination in *Salpiglossis sinuata*. *Physiologia Plantarum*, 43, 225–230.
- Li QX, Huo QD, Wang J, Zhao J, Sun K, He CY (2016). Expression of B-class MADS-box genes in response to variations in photoperiod is associated with chasmogamous and cleistogamous flower development in *Viola philippica*. *BMC Plant Biology*, 16, 151.
- Li Z, Liu G, Zhang J, Lu S, Yi S, Bao M (2012). Cloning and characterization of paleoAP3-like MADS-box gene in London plane tree. *Biologia Plantarum*, 56, 585–589.
- Liu QL, Liu XW, Liu WW, Liao WJ (2006). Comparison between cleistogamy and chasmogamy in perennial herb *Viola philippica* (Violaceae). *Journal of Beijing Normal University (Science Edition)*, 42, 605–609. (in Chinese with English abstract) [刘绮丽, 刘香梅, 刘薇薇, 廖万金 (2006). 紫花地丁开放花和闭锁花繁殖特征的研究. 北京师范大学学报(自然科学版), 42, 606–610.]
- Lord EM (1979). Physiological control on the production of cleistogamous and chasmogamous flowers in *Lamium amplexicaule* L. (Labiatae). *Annals of Botany*, 44, 757–766.
- Lord EM (1981). Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis function and evolution. *Botanical Review*, 47, 421–450.
- Malobecki A, Marcussen T, Bohdanowicz J, Migdalek G, Slomka A, Kuta E (2016). Cleistogamy and phylogenetic position of *Viola uliginosa* (Violaceae) re-examined. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182, 180–194.
- Mayers AM, Lord EM (1983). Comparative flower development in the cleistogamous species *Viola odorata*. I. A growth rate study. *American Journal of Botany*, 70, 1548–1555.
- Minter TC, Lord EM (1983). Effects of water stress, abscisic acid, and gibberellic acid on flower production and differentiation in the cleistogamous species *Collomia grandiflora* Dougl. ex Lindl. (Polemoniaceae). *American Journal of Botany*, 70, 618–624.
- Morinaga SI, Nagano AJ, Miyazaki S, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Sakai S, Hasebe M (2008). Ecogenomics of

doi: 10.17521/cjpe.2017.0153



- cleistogamous and chasmogamous flowering: Genome-wide gene expression patterns from cross-species microarray analysis in *Cardamine kokaiensis* (Brassicaceae). *Journal of Ecology*, 96, 1086–1097.
- Munguía-Rosas MA, Campos-Navarrete MJ, Parra-Tabla V (2013). The effect of pollen source vs. flower type on progeny performance and seed predation under contrasting light environments in a cleistogamous herb. *PLOS ONE*, 8, e80934. doi: 10.1371/journal.pone.0080934.
- Paoletti C, Holsinger E (1999). Spatial patterns of polygenic variation in *Impatiens capensis*, a species with an environmentally controlled mixed mating system. *Journal of Evolutionary Biology*, 12, 689–696.
- Schemske DW (1978). Evolution of reproductive characteristics in *Impatiens* (Balsaminaceae): The significance of cleistogamy and chasmogamy. *Ecology*, 59, 596–613.
- Schoen DJ, Lloyd DG (1984). The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. *Biological Journal of the Linnean Society*, 23, 303–322.
- Sigrist MR, Sazima M (2002). *Ruellia brevifolia* (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): Flowering phenology, pollination biology and reproduction. *Brazilian Journal of Botany*, 25, 35–42.
- Solbrig OT (1976). On the relative advantages of cross- and self-fertilization. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 63, 262–276.
- Stebbins GL (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91, 337–354.
- Teaching and Research Section of Plant Microscopy Set in Huazhong Agricultural College (1984). Love's hematoxylin dyeing as a whole and red-solid double drop staining in the application of paraffin section. *Chinese Bulletin of Botany*, 3, 56. [华中农学院植物教研室植物显微技术组 (1984). 爱氏苏木精整体染色及番红-固绿双重染色滴染法在石蜡切片中的运用. *植物学通报*, 3, 56.]
- Uphof JCT (1938). Cleistogamic flowers. *Botanical Review*, 4, 21–49.
- Wahlert GA, Marcussen T, Paula-Souza JD, Feng M, Ballard HE (2014). A phylogeny of the Violaceae (Malpighiales) inferred from plastid DNA sequences: Implications for generic diversity and intrafamilial classification. *Systematic Botany*, 39, 239–252.
- Waller DM (1979). The relative costs of self- and cross-fertilized seeds in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany*, 66, 313–320.
- Waller DM (1984). Differences in fitness between seedlings derived from cleistogamous and chasmogamous flowers in *Impatiens capensis*. *Evolution*, 38, 427–440.
- Wang Y, Ballard HE, McNally RR, Wyatt SE (2013). Gibberellins are involved but not sufficient to trigger a shift between chasmogamous-cleistogamous flower types in *Viola pubescens*. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 140, 1–8.
- Wang Y, Li QX, Sun K, Chen W (2017). The study on dimorphic flower development and the soluble sugar and starch content in *Viola philippica*. *Acta Horticulturae Sinica*, 44, 323–329. (in Chinese with English abstract) [王镛, 李巧峡, 孙坤, 陈纹 (2017). 紫花地丁开放花与闭锁花的发育及可溶性糖与淀粉含量的研究. *园艺学报*, 44, 323–329.]

特邀编委: 谭敦炎 责任编辑: 李 敏



扫码向作者提问