

# 中国特有兰科植物褐花杓兰的繁殖生物学特征及其与西藏杓兰的生殖隔离研究

李 鹏<sup>1</sup> 罗毅波<sup>2\*</sup>

1 (西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010)

2 (中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093)

**摘要:** 作为被子植物中最进化的类群, 兰科植物通常依靠种内特化的传粉者而形成种间物种隔离。褐花杓兰 (*Cypripedium smithii*) 与西藏杓兰 (*C. tibeticum*) 是杓兰属大花亚组中的两个近缘种类, 二者形态特征相似, 分布区也存在明显重叠。在西藏杓兰繁殖生物学特征已知的基础上, 本文对褐花杓兰的繁殖生物学特征进行了研究, 并对褐花杓兰与西藏杓兰进行了外部形态比较。结果表明, 4个居群中普遍存在西藏杓兰和褐花杓兰间的一系列形态过渡类型, 两个物种并没有明确的形态差异。褐花杓兰与西藏杓兰杂交亲和, 传粉观察也表明褐花杓兰由熊蜂 (*Bombus*) 蜂王传粉, 具有与西藏杓兰相同的传粉系统。因此, 在自然条件下, 西藏杓兰与褐花杓兰之间可能会存在较频繁的基因流, 从而产生一系列中间过渡类型。将它们分为两个独立的物种并不是最好的选择, 建议将其合并为一个种。

**关键词:** 兰科植物, 传粉, 生殖隔离, 杂交

## Reproductive biology of an endemic orchid *Cypripedium smithii* in China and reproductive isolation between *C. smithii* and *C. tibeticum*

Peng Li<sup>1</sup>, Yibo Luo<sup>2\*</sup>

1 School of Life Sciences and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010

2 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

**Abstract:** Pollinator specificity has traditionally been considered as the main mechanism of reproductive isolation in orchids. *Cypripedium smithii* and *C. tibeticum* are two closely related species with similar characters and sympatric distributions. With the knowledge of reproductive biology of *C. tibeticum*, we studied the reproductive biology of *C. smithii* and compared the morphological characters between *C. tibeticum* and *C. smithii*. The results showed that a series of intermediate types occurred between typical *C. smithii* and typical *C. tibeticum*, indicating that no distinct taxonomic boundary existed between *C. tibeticum* and *C. smithii*. Pollination experiment showed that both *C. smithii* and *C. tibeticum* were pollinated by bumble queens. The hand-pollination experiments indicated that *C. tibeticum* and *C. smithii* were cross-fertilized, so that they could hybridize in the natural conditions and produced transitional types. It is better to combine them as one identical species rather than separate them as two distinct species.

**Key words:** Orchidaceae, pollination, reproductive isolation, hybridization

生殖隔离一直被认为是物种形成过程中最关键的步骤, 也是物种得以保持完整性和独立性的基础 (Crawford, 1985)。兰科植物是被子植物中的大科之一, 全世界约有 700 属 20,000–35,000 种 (Dressler,

1993; Mabberley, 1997), 广泛分布于全球热带、亚热带和温带地区 (Dressler, 1993)。作为被子植物中最进化的类群, 绝大多数兰科植物花的结构与昆虫传粉高度适应, 并与传粉昆虫形成了相互作用、相互

收稿日期: 2009-03-02; 接受日期: 2009-04-21

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (kzcx2-yw-415) 和西南科技大学校重点项目 (07XJGZB17)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: luoyb@ibcas.ac.cn

依赖的密切关系。因此, 兰科植物的多样性更多被认为是适应于多样化的特化传粉者的结果, 依靠传粉者的特化而形成隔离也成为兰科植物间最主要的隔离机制(Darwin, 1862; van der Pijl & Dodson, 1966; van der Cingel, 1995, 2001; Tremblay *et al.*, 2005; Cozzolino & Widmer, 2005)。尽管最近一系列系统发育(Aceto *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, 2001; Bateman *et al.*, 2003)和生态学上(Cozzolino *et al.*, 2005; Schiestl, 2005)的证据表明, 受精前隔离机制在兰科植物可能被过分地夸大了, 受精后隔离机制对保持兰科植物的生殖隔离与物种的稳定性可能起着更重要的作用。但是, 传粉者隔离仍然是同域兰科植物间最常见的生殖隔离机制(van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1993)。许多不同种甚至不同属的兰科植物人工授粉可以杂交结实, 但在自然界中却极少看到杂交后代, 也证明了传粉者特化在保持兰花物种间界限所起的重要作用(Darwin, 1862; van der Pijl & Dodson, 1966)。所以, 有重叠分布区的兰科植物之间是否存在相异的传粉系统就成为确定物种界限的重要根据(Darwin, 1862; van der Pijl & Dodson, 1966)。

杓兰属(*Cypripedium*)隶属于杓兰亚科, 是兰科植物中比较原始的类群, 全世界约有50种, 分布于东亚、北美、欧洲等温带地区和亚热带山地(Dressler, 1993; Cribb, 1997)。我国是该属植物的主要分布区, 有36个种和1个变种, 其中26种为我国特有(陈心启, 1999)。Cribb (1997)认为杓兰属内的任何两个物种都可以人工杂交成功。杓兰属下不同组物种之间的杂交实验也证实了这一点, 如“钝瓣组”的*C. reginae*与“无苞组”的丽江杓兰(*C. lichiangense*)杂交可以成功结实。迄今为止, 已报道了108个人工杂交种。因此, 杓兰属内物种两两之间可能不存在严格的受精后隔离机制(杂交不亲和、杂种不活和杂种不育等), 它们可以比较容易产生人工杂交种。但在自然情况中, 很少发现有一种杓兰与另一种杓兰的天然杂交种。*Cypripedium alaskanum*被认为是*C. guttatum*与*C. yatabeanum*的自然杂交种(Luer, 1975; Brown, 1995), 但其地位仍需进一步探讨(Cribb, 1997)。Sheviak (1992)认为*Cypripedium colombianum*是*C. montanum*与*C. parviflorum* var. *pubescens*的杂交种, 但*C. parviflorum*种下形态多样, 其本身的分类地位就存在较大的争论(Cribb, 1997)。通过形

态比较和遗传分析, 只有东北杓兰(*Cypripedium ventricosum*)被认为是*C. calceolus*和*C. macranthum*的天然杂交种(陈心启, 1999; Knyasev *et al.*, 2000)。所以, 与其他兰科植物一样, 多数同域杓兰属植物主要也是采用受精前隔离机制来保持物种界限。

褐花杓兰(*C. smithii*)隶属于杓兰属大花亚组, 该组包含10个种(Cribb, 1997), 其中褐花杓兰与西藏杓兰(*C. tibeticum*)是大花亚组中两个较为近缘的种类, 而且两者分布区也存在比较明显的重叠(Cribb, 1997; 陈心启, 1999)。褐花杓兰是中国特有种, 产四川西部和云南西北部。生于海拔2,600–3,900 m的林下、林缘、灌丛中、草坡上或山溪河床旁多石湿润处(陈心启, 1999)。西藏杓兰产于甘肃南部、四川西部、贵州西部、云南西北部和西藏东部至南部, 生于海拔2,300–4,200 m的透光林下、林缘、灌木坡地、草坡或乱石地上。除中国外, 不丹和锡金也有分布(陈心启, 1999)。两者多数分类特征相似, Cribb(1997)认为两者的花均呈深红色或暗紫色, 但褐花杓兰的花色更深一些。除此之外, Cribb(1997)与陈心启(1999)均认为它们的主要形态区别在于褐花杓兰唇瓣的背面具若干质地较薄的透明“窗”, 唇瓣囊口周围不具白色或浅色圈, 而西藏杓兰唇瓣囊的背面无质地较薄的透明“窗”, 囊口周围有白色或浅色的圈。可以看出, 它们的分类学特征差别是非常细微的。考虑到两种杓兰的分类学描述均是依据干标本进行的, 因此, 在野外对褐花杓兰与西藏杓兰进行形态调查和繁殖生物学研究以检测它们之间是否存在严格的外部形态界限及生殖隔离机制是必需的。

我们在四川黄龙寺自然保护区的前期研究表明, 西藏杓兰是自交亲和物种, 但在自然条件下必须依赖传粉者才能成功结实, 它的传粉者为熊蜂(*Bombus*)蜂王(Li *et al.*, 2006)。在已知西藏杓兰繁殖生物学的基础上, 我们在四川黄龙对褐花杓兰的繁殖生物学进行了研究, 并对四川北部和云南西北部同域分布的这两种兰花进行外部形态比较, 以期揭示二者在外部形态和繁殖系统上的异同性, 并探讨它们在分类学上的地位。

## 1 研究方法

参考陈心启(1999)的定义, 将“典型的褐花杓

兰”定义为：花深紫色或紫褐色，唇瓣囊口周围不具白色或浅色圈，唇瓣的背面具若干质地较薄的透明“窗”。而将“典型的西藏杓兰”定义为：花紫色、紫红色或暗栗色，唇瓣囊口周围有白色或浅色的圈(陈心启, 1999)。

### 1.1 研究地点选择

褐花杓兰传粉生物学观察：在四川省黄龙寺自然保护区黄龙沟内进行。时间为2005与2006年的开花季节内(5月底到6月底)。在黄龙沟内，典型的褐花杓兰约有50株，分布于灌木丛缘及草丛中。同时开花的植物主要有杜鹃(*Rhododendron decorum*)、刺黄花(*Berberis polyantha*)、黄花杓兰(*C. flavum*)、西藏杓兰及少花虾脊兰(*Phaius dealvayi*)等。

形态特征观察：为探讨自然条件下褐花杓兰与西藏杓兰的形态区别，2005–2007年，作者对褐花杓兰和西藏杓兰的生长区域进行了考察，地点包括：四川省的黄龙寺自然保护区和王朗自然保护区，云南省的碧塔海自然保护区和玉龙雪山自然保护区。

### 1.2 西藏杓兰与褐花杓兰的花形态特征观察

在考察过程中，记录每一居群中褐花杓兰和西藏杓兰的萼片、花瓣、唇瓣、退化雄蕊、雄蕊、雌蕊等各部分形状及颜色并拍照。因为已有证据表明，褐花杓兰和西藏杓兰的外部形态差异只表现在花色、唇瓣背后的“窗”及唇瓣囊口有无白圈上(Cribb, 1997; 陈心启, 1999)，因此，本文中只对这三方面的特征进行了详细的比较和分析。

### 1.3 褐花杓兰的繁育系统及与西藏杓兰的杂交授粉实验

在褐花杓兰花期内设立以下几种处理进行人工授粉实验，在结实期间记录自然结实率及各种人工授粉植株结实率。(1) 开花前套袋( $n = 5$ )：开花前摘除唇瓣、不去雄，检测是否需要传粉者才能结实，即是否存在自花授粉现象。(2) 人工异交传粉( $n = 10$ )：去唇瓣、去雄，用间隔至少5 m以外的不同植株的花粉进行异花传粉，检测异交是否亲和。(3) 人工自交授粉( $n = 10$ )：去唇瓣、去雄，检测自交是否亲和。(4) 异种杂交授粉( $n = 10$ )：对西藏杓兰与褐花杓兰进行人工杂交授粉，2种杓兰均分别作为父本、母本进行授粉处理。

### 1.4 褐花杓兰访花昆虫种类及传粉昆虫观察

选择褐花杓兰植株数目较多的花丛进行传粉生物学观察。开始几天，从早8:00到晚18:00进行全

天候观察，待确定传粉昆虫及其初步活动规律后，集中在其活动高峰期进行观察。记录所观察花丛中兰花个体的数目，统计单位时间内各种昆虫的访花频率，对每种昆虫的访花行为进行摄影并记录。为探讨花结构与昆虫大小的适应，用游标卡尺对所采昆虫，特别是传粉昆虫进行测量，主要包括体长、体宽、胸高等。

### 1.5 褐花杓兰花功能结构

随机选取10株正在开花的植株，以游标卡尺测量雄蕊到唇瓣底高度(AL)，柱头到唇瓣底高度(SL)，唇瓣入口直径(DL)与唇瓣出口宽度(EL)等指标，其中DL与EL在完整花上测量，AL与SL在切花上进行测量。

### 1.6 褐花杓兰花香气体成分的采集及分析

采用顶空法(Li *et al.*, 2003)采集褐花杓兰花香成分，采样时间为30 min左右。采样结束后，迅速在吸附管两端盖紧聚四氟乙烯帽，待后分析。褐花杓兰的花香成分采集两个样作为重复。在花香采样结束后，于当天采集一份空气对照气体样本。

对挥发物采用热脱附/气相色谱/质谱联用(Thermol-desorption Cold Trap-Gas Chromatograph/Mass Spectrum, TCT-GC / MS)法(Li *et al.*, 2003)分析。所得GC/MS原始图谱—总离子流(TIC)图中，各峰代表的化学信息经计算机检索数据库，并根据保留时间和化学成分，参考相关资料进行确认及筛选。然后对比空气对照气体样本，排除其中包含的相同化学成分，最后得到属于兰花花香的气体成分。

## 2 结果

### 2.1 褐花杓兰与西藏杓兰的花形态特征

图1A示典型的西藏杓兰，花色为紫红色；图1B示典型的褐花杓兰，花色为深紫色。但在实际情况下，它们之间的花色变化并不是这么明显，在所考察的4个保护区的居群中，存在着从浅红到深紫的一系列过渡(图1D)。另外，在云南玉龙雪山自然保护区中还发现一类特殊的西藏杓兰，因其花瓣呈金黄色，被称为“金色西藏杓兰”(golden tibeticum)(图1C)。

此外，西藏杓兰唇瓣囊口的白圈并不是一个稳定的特征，不论是在花色深或浅的杓兰中，它们近似随机分布(图1D)，而且两个种的唇瓣背面几乎均有透明“窗”存在(图1E)。



图1 西藏杓兰、褐花杓兰及其过渡状态。A: 典型的西藏杓兰; B: 典型的褐花杓兰; C: 金色西藏杓兰; D: 花色与唇瓣囊口“白圈”的复杂性; E: 唇瓣背面的透明“窗”。

Fig. 1 Flowers of *Cypripedium tibeticum*, *C. smithii* and their intermediate stages. A, Typical *Cypripedium tibeticum*; B, Typical *C. smithii*; C, Golden *C. tibeticum*; D, Flower colors and white rim to the mouth of labellum; E, Translucent “windows” on the back of labellum.

表1 褐花杓兰的繁育系统及与西藏杓兰的杂交授粉实验

Table 1 Breeding system of *Cypripedium smithii* and hybridization between *C. smithii* and *C. tibeticum*

处理 Treatment	花数 No. of flowers	果数 No. of fruits	结实率 Fruit set (%)
褐花杓兰人工自交授粉 Hand self-pollination in <i>C. smithii</i>	10	9	90
褐花杓兰人工异交授粉 Hand cross-pollination in <i>C. smithii</i>	10	8	80
褐花杓兰开花前套袋 Bagged before flowers in <i>C. smithii</i>	5	0	0
褐花杓兰 ♀ × 西藏杓兰 ♂ <i>C.smithii</i> ♀ × <i>C. tibeticum</i> ♂	10	8	80
褐花杓兰 ♂ × 西藏杓兰 ♀ <i>C.smithii</i> ♂ × <i>C. tibeticum</i> ♀	10	8	80
褐花杓兰自然结实(2005) Natural pollination of <i>C. smithii</i> (2005)	28	14	50
褐花杓兰自然结实(2006) Natural pollination of <i>C. smithii</i> (2006)	33	15	45.5

## 2.2 褐花杓兰的繁育系统及与西藏杓兰的杂交可育性

褐花杓兰的自然结实率可达50%(2005年)及45.5%(2006年)。而摘除唇瓣处理无结实现象,说明褐花杓兰中不存在自动自花传粉现象。但人工自交授粉与异交授粉的结实率高达90%及80%(表1),说

明褐花杓兰是自交亲和的,同时也说明褐花杓兰的结实存在明显的传粉者限制。

另外,在褐花杓兰与西藏杓兰的杂交实验中,不论是以褐花杓兰做为父本或母本,其杂交结实率均可达80%,说明褐花杓兰与西藏杓兰是杂交亲和的。



图2 褐花杓兰的传粉者。A: 熊蜂正在杓兰唇瓣内; B: 传粉熊蜂*Bombus lepidus*, 其背部携带有褐花杓兰的花粉团。  
Fig. 2 Insect pollinators of *Cypripedium smithii*. A, One bumblebee in the labellum of *C. smithii*; B, *Bombus lepidus* with the pollen smear on its thorax back, an insect pollinator of *C. smithii*.

### 2.3 褐花杓兰的传粉昆虫

在两个开花季节共60 h的观察中,发现有膜翅目、双翅目、鳞翅目及直翅目的昆虫访问过褐花杓兰,但只有2种熊蜂蜂王*Bombus lepidus*和*B. hypnorum*, 1种食蚜蝇*Baccha elongae*及1种蚂蚁*Formica* sp.进入过杓兰的唇瓣中。其中食蚜蝇沿着唇瓣的入口爬出,蚂蚁则可以沿着杓兰皱缩的唇瓣自由出入,它们都没有触及到杓兰的花粉团。只有蜂王进入唇瓣后沿着唇瓣的出口爬出,并带走褐花杓兰的花粉团(图2)。

蜂王的访问频率很低,在所观察的60 h里,只观察到4次蜂王落到褐花杓兰唇瓣上。它们在靠近杓兰时飞得较慢,而后直接落到唇瓣上。其中3次落到唇瓣之后主动爬入唇瓣,1次飞走。当蜂王刚进入唇瓣时,通常沿着唇瓣底部转几圈,然后才会往前爬,试图通过柱头和花药而逃离。在此过程中,蜂王一般会发出“嗡嗡”的声音。很明显,它们需要用力才能通过柱头和花药,最后从出口爬出,背上粘着褐花杓兰的花粉(图2B)。

### 2.4 褐花杓兰花功能结构

褐花杓兰的唇瓣入口直径(DL)为 $11.47 \pm 1.57$  mm ( $n = 10$ ),唇瓣出口宽度(EL)为 $8.18 \pm 1.88$  mm ( $n = 10$ ),雄蕊到唇瓣底部的高度(AL)为 $5.12 \pm 0.34$  mm ( $n = 10$ ),而柱头到唇瓣底部的高度(SL)为 $7.11 \pm 0.62$  mm ( $n = 10$ )。

### 2.5 花香成分

将褐花杓兰的TCT-GC-MS图谱与空气空白本底图谱进行对照,各种离子峰均扣除干扰本底进行检索,根据2次重复采样分析结果综合统计确定,没有任何有异于空气空白本底的有效成分。

## 3 讨论

### 3.1 褐花杓兰的传粉机制

将褐花杓兰的花功能结构与已知的熊蜂蜂王和工蜂的体型大小(Li *et al.*, 2006)相比,唇瓣入口和出口的大小保证了熊蜂蜂王和工蜂通过自身的力量可以出入褐花杓兰的唇瓣,但是蜂王的胸高( $7.1 \pm 0.61$  mm,  $n = 4$ )高于AL,但略小于SL,表明

它们在通过花药时,势必会碰及到花粉,当它们背上带有花粉而通过柱头时,花粉很有可能碰触到柱头;而工蜂的胸高( $5.09 \pm 0.77 \text{ mm}$ ,  $n = 17$ )低于AL和SL,表明它们在唇瓣内运动时可能不会碰触到花药和柱头。因此,褐花杓兰的花功能结构测量表明只有体型较大的熊蜂蜂王才可能成为其有效传粉者。观察也表明只有熊蜂蜂王能成功带走褐花杓兰的花粉。因此,将褐花杓兰定义为熊蜂蜂王传粉的种类是合情合理的。

对没有报酬的杓兰属植物来讲,它们的自然结实率通常是比较低的,如*Cypripedium calceolus*的结实率小于15% (Nilsson, 1979),西藏杓兰的结实率只有9.57–13.8% (Li *et al.*, 2006),但褐花杓兰2个开花季节的结实率却分别达45.5%及50%(表1)。作为同域的杓兰属植物,褐花杓兰和西藏杓兰的传粉昆虫都是熊蜂蜂王,两个物种最明显的区别之处在于西藏杓兰形成了一个很大的居群,有上千株(Li *et al.*, 2006),而褐花杓兰只有50株左右。因此,尽管影响植物结实率的因素是多种多样的,但在很多植物中都存在的负频率依赖选择作用(negative frequency-dependent selection) (Gigord *et al.*, 2001)可能对褐花杓兰和西藏杓兰的结实率差别起着一定作用。

大花杓兰(*C. macranthum*)是褐花杓兰的近缘物种(Cribb, 1997),它也是由熊蜂蜂王传粉的(Sugiura *et al.*, 2001)。大花杓兰通过模拟一种有报酬的植物—马先蒿*Pedicularis schistostegia*来吸引蜂王。因为两种植物同域分布、有重叠花期、在蜂王的视觉光谱中有相似的花色,而且在群落中大花杓兰的出现频率比这种马先蒿低得多(Sugiura *et al.*, 2002)。这也是“贝式拟态”机制存在的先决条件(Johnson, 2000)。因此, Sugiura等(2002)认为大花杓兰专一性地模拟马先蒿*P. schistostegia*。而在褐花杓兰所处的群落中,同样有颜色相似的马先蒿*P. recurva*存在,但这种马先蒿8月初开花时,褐花杓兰已开始萎蔫。因此,褐花杓兰与马先蒿*P. recurva*之间不可能形成专一性的拟态关系。与褐花杓兰同期开花的其他植物,如另外一种马先蒿*P. torta*也是在褐花杓兰开始萎蔫时才开花,而开黄色花的刺黄花、白色花的峨眉蔷薇(*Rosa omeiensis*)、白色花的圆穗蓼(*Polygonum macrophyllum*)和粉红色花的鹿蹄草(*Pyrola calliantha*)在群落中的开花时间与褐花杓兰

只有较短的重叠,而且出现频率都比褐花杓兰要低,它们也不太可能成为褐花杓兰的专一模拟植物。所以,尽管是大花杓兰的近缘物种,但褐花杓兰中并不存在“贝式拟态”机制。

在兰科植物中,最常见的吸引传粉者机制是泛化的食源性欺骗(Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Schiestl, 2005; Cozzolino & Widmer, 2005)。杓兰亚科植物尽管传粉昆虫种类不同,但绝大多数也是如此(Nilsson, 1979; Bänziger *et al.*, 2005, 2008; Li *et al.*, 2006, 2008a, b)。褐花杓兰的另外一个近缘种云南杓兰尽管不是由熊蜂传粉,但也是通过泛化的食源性欺骗机制(花色与花香)来吸引多食性的淡脉隧蜂(*Lasioglossum*)前来传粉(Bänziger *et al.*, 2008)。而另外一种熊蜂蜂王传粉的*C. acaule*,其粉红的颜色及甜味的花香对吸引蜂王起到了重要的作用(Stoutamire, 1967; Davis, 1986)。然而,褐花杓兰的花为暗栗色,可能不对熊蜂产生特殊的食源性吸引作用,因为很多研究已经表明熊蜂对各种颜色的花均有访问(Proctor *et al.*, 1996)。另外,褐花杓兰没有任何可检测到的花香成分,而多数熊蜂偏好访问带有芳香气味的物体(Proctor *et al.*, 1996)。总之,褐花杓兰的食源性欺骗信号(花色和花香)不强烈,可能对吸引熊蜂传粉没有多大作用,但这一问题由于缺乏花的色谱分析与传粉者视觉光谱的对比,尚需进一步研究。

相反,在吸引昆虫机制上,褐花杓兰与西藏杓兰存在很大的相似之处。西藏杓兰主要通过“筑巢式欺骗”来吸引其传粉者(Li *et al.*, 2006)。而褐花杓兰与西藏杓兰花形态类似,花均低垂、暗紫色,背萼片遮盖着唇瓣的入口,形成了一个类似的巢穴。当蜂王冬眠之后出来活动时,它必须首先找到1个合适的巢穴,比如地面啮齿动物残留的洞或灌木丛中的小孔(Proctor *et al.*, 1996)。蜂王进入杓兰的唇瓣中就好像进入一个有洞的巢穴一样,因此,传粉观察表明大部分熊蜂蜂王是主动进入杓兰唇瓣的。但是,当蜂王发现杓兰的唇瓣不是一个理想的巢穴而从出口爬出来时,就充当了杓兰的传粉者。这一机制在其他植物中也有报道。如在兰科植物*Serapias vomeracea*中,一些雄性anthophorine蜂会在兰花暗色的唇瓣中过夜,当它们退出时即充当了传粉者(Dafni *et al.*, 1981)。相似的机制在*Oncocycclus irises* (Iridaceae) (Sapir *et al.*, 2005)中也有报道。Nilsson

(1979)也认为杓兰 *C. calceolus* 的“陷阱”状的唇瓣也可能起到了巢穴欺骗的作用, 尽管这一欺骗机制并不是最主要的。因此, 褐花杓兰吸引传粉者的机制是巢穴欺骗机制的可能性非常大。

### 3.2 褐花杓兰与西藏杓兰的生殖隔离及分类学地位探讨

根据作者在四川北部和云南西北部的调查可知, 在典型的西藏杓兰(图1A)和典型的褐花杓兰(图1B)之间花色从浅红到深紫存在一系列的过渡(图1D), 而且这些过渡在四个居群中普遍存在。囊口的白圈并不是一个稳定的特征(图1D)。这两个种的唇瓣背面几乎均有透明“窗”(图1E)。因此, 西藏杓兰与褐花杓兰的形态分析表明, 两个物种并没有一个明确的分类学界限。

生殖隔离是指由于各种机制, 亲缘关系接近的类群之间在自然条件下不受精, 即使能受精也不能产生后代或不能产生可育性后代的隔离机制(Crawford, 1985; Stebbins, 1999)。杂交实验(表1)表明西藏杓兰与褐花杓兰是杂交亲和的, 传粉观察也表明它们均是由相同的熊蜂蜂王传粉。因此, 在野外情况下, 西藏杓兰与褐花杓兰很可能会杂交结实产生杂交种类。所以不难理解在西藏杓兰与褐花杓兰之间存在着一系列过渡类型。将它们分为两个清晰的、独立的物种并不是最好的选择, 建议将其合并为一个种。而将金色西藏杓兰作为其下的一个变种。当然, 这还需要细胞学、分子生物学等证据进一步证明典型的褐花杓兰与典型的西藏杓兰之间的一系列过渡类型是它们的自然杂交后代。

**致谢:** 感谢中国农业大学的徐环李教授对传粉昆虫进行种类鉴定, 感谢北京林业大学陈华君教授在花香成分分析中的指导, 感谢中国科学院植物研究所庾晓红博士、邓银霞女士和黄龙自然保护区管理局 Holger Perner 先生、寇勇先生在野外工作中的帮助。

### 参考文献

Aceto S, Caputo P, Cozzolino S, Gaudio L, Moretti A (1999) Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**, 67–76.

Ackerman JD (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, **1**, 108–113.

Bänziger H, Sun HQ, Luo YB (2005) Pollination of a slippery lady slipper orchid in south-west China: *Cypripedium guttatum* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **148**, 251–264.

Bänziger H, Sun HQ, Luo YB (2008) Pollination of wild lady slipper orchids *Cypripedium yunnanense* and *C. flavum* (Orchidaceae) in south-west China: why are there no hybrids? *Botanical Journal of the Linnean Society*, **156**, 51–64.

Bateman RM, Hollingsworth PM, Preston J, Luo YB, Pridgeon AM, Chase MW (2003) Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **142**, 1–40.

Brown PM (1995) New taxa and taxonomic notes. *North American Native Orchid Journal*, **1**, 255–256.

Chen SC (陈心启) (1999) *Cypripedium*. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, 17 (中国植物志, 第17卷), pp. 20–52. Science Press, Beijing. (in Chinese)

Cozzolino S, Aceto S, Caputo P, Widmer A, Dafni A (2001) Speciation processes in eastern Mediterranean *Orchis* s. l. species: molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel Journal of Plant Sciences*, **49**, 91–103.

Cozzolino S, Widmer A (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, **20**, 487–494.

Crawford DJ (1985) Electrophoretic data and plant speciation. *Systematic Botany*, **10**, 405–416.

Cribb P (1997) *The Genus Cypripedium*. Timber Press, Portland.

Dafni A (1984) Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 259–278.

Dafni A, Ivri Y, Brantjes NBM (1981) Pollination of *Serapias vomeracea* Briq. (Orchidaceae) by imitation of holes for sleeping solitary male bees (Hymenoptera). *Acta Botanica Neerlandica*, **30**, 69–73.

Darwin C (1862) *On the Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids Are Fertilized by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing*. John Murray, London.

Davis RW (1986) The pollination ecology of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Rhodora*, **88**, 445–450.

Dressler RL (1993) *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Cambridge University Press, Cambridge.

Gigord LGB, Macnair MR, Smithson A (2001) Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **98**, 6253–6255.

Johnson SD (2000) Batesian mimicry in the non-rewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequences for pollinator behaviour. *Biological Journal of the Linnean Society*, **71**, 119–132.

Knyasev MS, Kulikov PV, Knyaseva OI, Semerikov VL (2000) On the interspecific hybridization in Eurasian species of *Cypripedium* (Orchidaceae) and taxonomic status of *C. ventricosum*. *Botanicheskii Zhurnal*, **85**, 94–102.

Li JG, Jin YJ, Luo YQ, Xu ZC, Chen HJ (2003) Leaf volatiles

- from host tree *Acer negundo*: diurnal rhythm and behavior responses of *Anoplophora glabripennis* to volatiles in field. *Acta Botanica Sinica*, **45**, 177–182.
- Li P, Luo YB, Bernhardt P, Yang XQ, Kou Y (2006) Deceptive pollination of the lady's slipper *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **262**, 53–63.
- Li P, Luo YB, Bernhardt P, Kou Y, Perner H (2008a) Pollination of *Cypripedium plectrochilum* (Orchidaceae) by *Lasioglossum* spp. (Halictidae): the roles of generalist attractants vs. restrictive floral architecture. *Plant Biology*, **10**, 220–230.
- Li P, Luo YB, Deng YX, Kou Y (2008b) Pollination of the lady's slipper *Cypripedium henryi* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **156**, 491–499.
- Luer C (1975) *The Native Orchids of the United States and Canada*. American Orchid Society, New York.
- Mabberley DJ (1997) *The Plant Book*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nilsson LA (1979) Anthecological studies of the lady's slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Botany Notiser*, **132**, 329–347.
- Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Oregon.
- Sapir Y, Shmida A, Ne'eman G (2005) Pollination of *Oncocyclus irises* (Iris: Iridaceae) by night-sheltering male bees. *Plant Biology*, **7**, 417–424.
- Schiestl FP (2005) On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften*, **92**, 255–264.
- Sheviak C (1992) Natural hybridization between *Cypripedium montanum* and its yellow-lipped relatives. *American Orchid Society Bulletin*, **61**, 558.
- Stebbins GL (1999) A brief summary of my idea on evolution. *American Journal of Botany*, **86**, 1207–1208.
- Stoutamire WP (1967) Flower biology of the lady's slippers (Orchidaceae: *Cypripedium*). *Michigan Botanist*, **3**, 107–119.
- Sugiura N, Taketoshi F, Ken I, Kenji K (2001) Flowering phenology, pollination, and fruit set of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense*, a threatened lady's slipper (Orchidaceae). *Journal of Plant Research*, **114**, 171–178.
- Sugiura N, Goubara M, Kitamura K, Inoue K (2002) Bumblebee pollination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae): a possible case of floral mimicry of *Pedicularis schistostegia* (Orobanchiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **235**, 189–195.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **84**, 1–54.
- van der Cingel NA (1995) *An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids*. Brookfield, A. A. Balkema, Rotterdam.
- van der Cingel NA (2001) *An Atlas of Orchid Pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Brookfield, A. A. Balkema, Rotterdam.
- van der Pijl L, Dodson CH (1966) *Orchid Flowers: Their Pollination and Evolution*. University of Miami Press, Florida.

(责任编辑: 黄双全 责任编辑: 闫文杰)