

DOI: 10.5846/stxb202006291676

解季明, 丁新颖, 张宇杰, 汪正祥, 戴璨. 野慈姑 (*Sagittaria trifolia*) 人工授粉的有效性: 授粉工具与花粉保存. 生态学报, 2021, 41(13): 5446-5453.
Xie J M, Ding X Y, Zhang Y J, Wang Z X, Dai C. Efficacy of artificial pollination in *Sagittaria trifolia*: pollination tools and pollen preservation. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(13): 5446-5453.

野慈姑 (*Sagittaria trifolia*) 人工授粉的有效性: 授粉工具与花粉保存

解季明¹, 丁新颖¹, 张宇杰², 汪正祥^{1,3}, 戴 璨^{1,3,*}

¹ 湖北大学资源环境学院, 武汉 430062

² 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062

³ 区域开发与环境影响湖北省重点实验室, 武汉 430062

摘要: 人工授粉作为一项关键性技术在生态研究与农业生产领域广泛应用, 但是授粉过程中的工具有效性以及花粉保存尚未受到研究者的关注。以植物野慈姑为试验材料, 研究了人工授粉方式和花粉保存条件对繁殖的影响。两年的结果表明, 相较于直接接触式授粉, 借助毛刷工具授粉显著降低了野慈姑的座果概率和种子数。花粉经过半小时野外高温保存后, 其授粉的座果概率显著高于对照组, 但单果种子数和种子大小保持稳定。综上, 在野慈姑的人工授粉中应避免使用毛刷等工具, 离体花粉可置于野外环境适当保存。在相关应用中, 研究人员应当警惕工具授粉造成的负面影响, 注意比较工具与其他授粉方式的等效性, 保证实验的科学性。

关键词: 人工授粉; 补充授粉; 授粉工具; 花粉保存; 野慈姑

Efficacy of artificial pollination in *Sagittaria trifolia*: pollination tools and pollen preservation

XIE Jiming¹, DING Xinying¹, ZHANG Yujie², WANG Zhengxiang^{1,3}, DAI Can^{1,3,*}

¹ School of Resources and Environmental Science, Hubei University, Wuhan 430062, China

² School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

³ Hubei Key Laboratory of Regional Development and Environmental Response (Hubei University), Wuhan 430062, China

Abstract: Artificial pollination is a key technology with a wide range of applications in the fields of ecological research and agricultural practice. However, the effectiveness of pollination tools and pollen preservation has not received much attention. In this study, we investigated the effects of different artificial pollination methods and pollen storage conditions on the reproductive performance of *Sagittaria trifolia*. Results of two years showed that compared with direct contact pollination, pollination with brush tools significantly reduced fruiting probability and seed number in *S. trifolia*. The conditions of pollen handling also had significant effect on fruiting probability, in which half-hour field temperature storage had an advantage over control, whereas seed number per fruit and seed size remained stable. In summary, to aid artificial pollination in *S. trifolia*, pollination tools such as brushes should be avoided due to their negative effects on seed reproduction, and pollen *in vitro* can be preserved under field condition for an appropriate time. In related applications, researchers should be cautious of pollination tools and pay attention to the equivalence of different pollination methods prior to comparative experiments, in order to ensure scientific validity.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31670232); 湖北省自然科学基金项目 (2019CFA066)

收稿日期: 2020-06-29; **网络出版日期:** 2021-04-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: daican@hubu.edu.cn

Key Words: hand pollination; supplemental pollination; pollination tools; pollen preservation; *Sagittaria trifolia*

人工授粉是一项能够解决诸多农业生产问题以及促进科学研究的关键性技术。一方面,它能够有效提高授粉成功率、座果率以及果实质量,避免不利的自然因素,保证农作物的经济价值^[1-3]。例如蓝莓^[4]、可可^[5]、椰枣^[6]等作物均依赖人工授粉获取较高的产量和经济效益。另一方面,它也为研究人员探究植物繁育特征、交配系统以及传粉互作等科学问题提供了一种行之有效的手段^[7-14]。同时,人工授粉技术还有具有操作便捷的特点:将前期收集的新鲜花粉(花药)置于存储容器中,并通过毛刷、棉签、镊子或特制授粉工具将花粉多次轻柔缓慢地涂抹于柱头之上便可完成授粉。因此,人工授粉技术一经推出,便迅速应用于诸多领域。

虽然人工授粉的方法一直被广泛采用,但是一项综述研究指出该方法背后的基础问题很少被关注,试验验证更是凤毛麟角^[15]。其中之一即为花粉从活体植物取下后授粉前的保存问题,因为花粉的储存环境对于人工授粉而言至关重要,不利的温度以及较长的时间均可能会快速降低花粉活性,进而对试验结果产生干扰。已有部分文献报道了某些物种花粉的长期保存技术与条件,低温保存似乎是一个良好的方式,能够有效维持花粉活性处于较高水平,但具体的储藏温度取决于物种特性。比如,Abreu 和 Oliveira^[16]将猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)花粉置于不同温度下进行储藏,发现-20℃条件下储藏 54 周的花粉活性和萌发率均高于 20℃、-80℃、-196℃处理。Maryam 等^[17]也指出-20℃是椰枣(*Phoenix dactylifera*)花粉的最佳储藏温度。但 Bhat 等^[18]在三种梨属(*Pyrus* spp.)栽培种的储藏试验中发现-196℃下萌发率最高。上述研究均显示出温度对于花粉的活性具有一定的影响。令人遗憾的是,虽然 Stone 等人的综述已经发表了 20 余年,但近些年的人工授粉试验似乎在离体花粉保存条件方面并没有明显的提及^[19-21]。大多数研究仅模糊表述采用“新鲜”花粉,也没有试验验证花粉的储藏条件是否影响花粉的活性、可用性^[22-24]。

为了达到定性或定量授粉的目的,人工授粉时常常借助毛刷等工具混合和涂抹花粉。相较于直接用雄花(花药)接触雌蕊授粉,毛刷授粉还具有授粉均匀、操作便利、标准统一等优势,一直以来被普遍采用^[25-30]。或许是应用广泛且效果良好(座果结籽得到了保证),几乎所有的试验都默认了工具授粉与其他授粉方法的等效性。然而,已经有不少研究发现使用毛刷进行人工授粉后的座果或结实下降的情况。比如,Matsumoto 和 Takakura^[31]用混合花粉对日本本土蒲公英(*Taraxacum japonicum*)进行了人工授粉,其种子数量显著下降。Prokop 和 Neupauerová^[32]报道了田旋花(*Convolvulus arvensis*)的人工授粉试验组全部结实失败,很可能因不当的授粉操作导致可能。上述试验结果表明借助毛刷等工具的人工授粉在操作过程中可能存在诸多不可控因素对花粉或柱头产生干扰,比如机械损伤、组织表面活性物质的变化、花粉粘稠度的破坏等^[33-34]。此外,人工授粉也常常应用于花粉补充以探究植物的繁殖状态^[35],理论上补充后的座果结实应该不低于自然状态,但是积累的证据表明补充授粉在一些物种中反而会降低繁殖表现^[34,36-38],从一个侧面暗示了授粉方法本身的弊端。然而,甚少文献直接关注人工授粉方法对繁殖的影响,如果工具授粉对植物产生了负面作用,相关结论的科学性则会大打折扣。

本文以多年生挺水植物野慈姑(*Sagittaria trifolia*)作为试验材料,通过两年的人工授粉试验,比较了授粉方式、花粉处置以及花粉离体时间对于植物繁殖的影响,试图解决如下问题:(1)借助毛刷工具的人工授粉是否影响野慈姑的结实?(2)花粉的处置温度和离体时间如何影响野慈姑的结实?

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验于湖北省武汉市的中国科学院武汉植物园(114°25'18"E, 30°32'36"N)内进行。在园内选取了一块高约 1m 的露天台地作为同质园区,周围无高大建筑物遮挡。野慈姑植株是 2013 年在湖北省 22 个自然种群采集的球茎克隆后代^[39-40],共计 58 个基因型,258 盆植株。

1.2 试验材料

野慈姑(*Sagittaria trifolia* L.)隶属于泽泻科慈菇属,是一种生长在池塘、沼泽、沟渠、水田等浅水处的多

年生草本植物^[41]。其繁育系统为雌雄异花同株,总状花序,每轮一般三朵花,自下而上顺次开放。花序基部为雌花,开放持续 1—2d,顶部为雄花,开放持续 4—10d,但单花花期均为 1d。雌雄花部结构基本相同,都有三瓣白色花瓣,具花蜜。雌花中央的绿色球状物为心皮,其多心皮离生,在头状花托上紧密分布,每个心皮具一个细小的花柱。雌花在授粉后 20d 左右发育为成熟的球形聚合瘦果。野慈姑依赖虫媒传粉,食蚜蝇、小型蜂类等多种昆虫可为其传粉^[39]。植物花期从 6 月开始,大约持续至 10 月结束(湖北地区的盛花期为 7—8 月)。野慈姑自交亲和、兼有有性繁殖(开花结实)和无性繁殖(地下球茎)。

1.3 试验设计

1.3.1 2018 年试验

为了比较授粉方式是否影响野慈姑结实数量与质量,试验设计了硬毛刷授粉与接触授粉两种授粉方式。人工授粉方面,采用小排笔(美术用)给雌花授粉,花粉来源于整个同质园当日开放的所有雄花,每个植株至多取 2 朵雄花,将花药放入塑料杯中混合均匀,用毛刷蘸取混合花粉,动作轻柔地涂抹在雌花的球形心皮上,直至均匀饱和。接触授粉方面,由于直接用雄花的花药与心皮接触,不易控制授粉量,往往一两朵雄花接触后即达到饱和状态。故授粉时选取与雌花植株种群来源相同或相近的两个基因型的 2 朵雄花进行授粉(模拟自然异交状态)^[42]。为了避免昆虫造成传粉污染,严格在授粉前后对雌花进行套袋处理,并于人工授粉第二日将套袋摘除(雌花已不具备可授性),以免影响果实发育。

该试验于 2018 年 8 月进行,共计完成硬毛刷授粉 38 朵花,接触授粉 52 朵花。为防止果实成熟后散落,于授粉处理 10d 后对已发育的果实进行套袋。待果实成熟后(颜色变为褐色、紧致变为疏松状态),采摘并置于牛皮袋中,每个袋中仅存放一个果实。

1.3.2 2019 年试验

为了细致比较毛刷授粉的副作用,授粉方式相较于 2018 年试验增加至 3 种,即直接接触授粉、软毛刷授粉、硬毛刷授粉。其中硬毛刷授粉与 2018 年相同,采用小排笔,而软毛刷授粉选用软质眼影刷。二者刷毛质地的区别在于当前者接触心皮授粉时,刷毛不会弯曲,而后者授粉时刷毛弯曲。接触授粉方法与 2018 年相同,只是在雄花来源上为了尽量与毛刷授粉保持一致,随机从整个同质园的植株中摘取。毛刷授粉方面,在 2018 年的基础上,也限定了每杯混合花粉授粉雌花的上限,使得平均每朵雌花对应的雄花数量与接触授粉相当。这些授粉细节的改进是为了更严格的控制花粉来源与授粉量,保证直接接触和毛刷介质是几种授粉方式的唯一区别。

本试验还设计了第二个方面的控制,即授粉前的花粉处置。处理分为对照、低温保存、高温保存 3 个水平。低温方面,将收集的雄花或混合花药放入装有冰盒的保温冷藏箱内,储存期间箱内温度维持在 5℃。冰盒沿冷藏箱边缘放置,中间预留足量空间,以避免花粉与冰盒直接接触。高温方面,将收集的雄花或混合花药塑料杯直接置于野外阳光直射处,储存温度随每日天气略有浮动,为 $(43.0 \pm 2.9)^\circ\text{C}$ 。花粉于低温或高温保存 30min 后取出,采用直接接触、软毛刷或硬毛刷授粉。对照是将雄花或花药从活体植物上摘下(混合)后,立即完成相应的授粉。

授粉方法与花粉处置两个因素组合成了阶乘设计,共计 $3 \times 3 = 9$ 种不同的处理。此外,为了进一步探究花粉活性的持续时间,还添加了一种低温处置 90min 后软毛刷授粉的处理。以上共计十种处理,每种处理重复约 50 个样本(基因型)。为了控制母体效应,所有处理尽量在同一花序的不同雌花上完成且位置随机。该试验于 2019 年 8 月进行,花朵的套袋、果实的采集与处理方法与 2018 年相同。

1.3.3 繁殖指标

采用座果概率、单果种子数量、种子大小、萌发率、幼苗芽长 5 个指标衡量野慈姑在不同授粉处理下的繁殖水平。其中,雌花若座果成功记为 1,失败记为 0。果实采集回试验室后,用解剖针与镊子将果实内的所有种子平铺于白色纸板上,保证种子之间不重叠。固定相机(尼康 D7000)位置与焦距,垂直拍摄白色纸板,将图片导入电脑,并使用软件 Image J 统计单果种子数量与种子大小^[37]。

在种子计数完成后,随机从每个果实中选取 100 粒种子置于装有自来水的塑料杯中,放入人工气候箱(MGC-350HP-2,一恒,上海)中进行萌发培养。设定气候箱内的温度为 30℃、相对湿度 20%、光照时间 18h、光照强度设定为最大值(20000lm)。待培养 10d 后,统计萌发率(出芽个数%)并测量最长的幼苗芽长(cm)。因 2018 年的分析显示授粉方式对种子的萌发率、幼苗芽长均无影响(见结果),故 2019 年未进行萌发试验。

1.4 数据处理

2018 年的试验采用单因素的方差分析,分别对座果概率、单果种子数量、种子大小,萌发率和幼苗芽长进行统计,其中座果概率采用二元分布的广义线性模型(proc glimmix, dist = binary),其他变量为混合线性模型(proc mixed),所有模型中的固定因素为授粉方式,随机因素为试验日期,萌发率和幼苗芽长添加了萌发温箱为随机因素。

2019 年的试验采用二因素的方差分析,固定因素为授粉方式与花粉处置,两者的交互作用所有模型均不显著,故删去。响应变量有座果概率、单果种子数与种子大小,其中座果概率采用二元分布的广义线性模型(proc glimmix, dist = binary),其他变量为混合线性模型(proc mixed),所有模型中的随机因素包括试验日期和花朵轮次。此外,对低温保存 90min 处理的结果,由于其采用软毛刷授粉,将所有软毛刷的处理集合,保证单一的授粉方式,单独分析了花粉处置对座果结实的影响,模型同上。

本试验的统计使用 SAS 9.2 软件,在方差分析之前检测了所有连续变量的正态性。其中,2018 年的单果种子数与萌发率正态性较差,对单果种子数进行了开方转换,萌发率进行了开方后反正弦转换,其他变量直接使用原始数据。转换后,所有连续变量的方差同质性均满足。结果和图表中均使用算术平均数±标准误差。

2 结果与分析

2.1 授粉方式对野慈姑繁殖的影响

两年的试验均显示出授粉方式对野慈姑的座果概率和单果种子数量产生了显著影响(图 1、图 2)。与毛刷授粉相比,用雄花直接接触的授粉方式达到了更高的座果(2018 年: $F_{1,80} = 6.22$, $P = 0.015$;2019 年: $F_{2,436} = 10.34$, $P < 0.0001$)和种子数(2018 年: $F_{1,59} = 41.07$, $P < 0.0001$;2019 年: $F_{2,342} = 8.78$, $P = 0.0002$)。不过,软硬两种毛刷质地对座果和种子数的不利影响并没有显著差异。由图 2 和表 1 可知,授粉方式之间的种子大小(2018 年表 1;2019 年: $F_{2,342} = 1.14$, $P = 0.32$)、萌发率以及幼苗芽长均无显著差异,这说明毛刷授粉对野慈姑的种子质量影响不大。

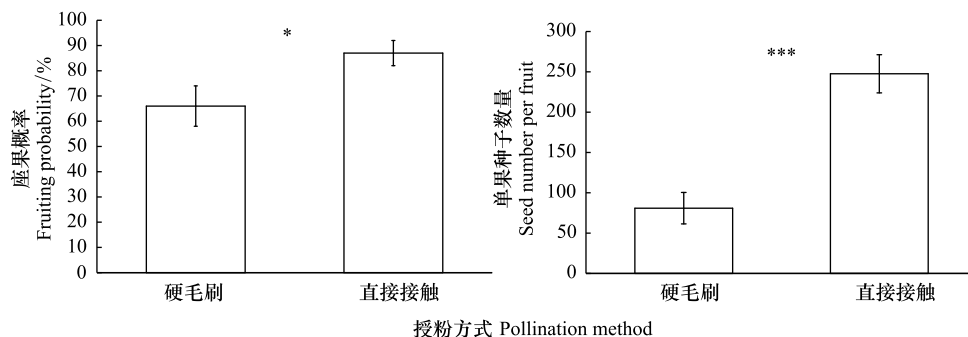


图 1 2018 年野慈姑在两种授粉方式下的结实情况

Fig.1 Fruiting status of *Sagittaria trifolia* under two methods of pollination in 2018

图条上方 * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$, *** 代表 $P < 0.0001$

2.2 花粉处置对野慈姑繁殖的影响

花粉的处置方法对座果概率产生了显著影响($F_{2,436} = 4.59$, $P = 0.011$),其中,经过高温保存的座果概率显著高于对照组(图 2)。不过,处置水平之间的单果种子数量($F_{2,342} = 0.86$, $P = 0.42$;图 2)和种子大小无显

著差异 ($F_{2,342}=0.48$, $P=0.62$;图 2)。此外,低温保存 90min 的花粉授粉后座果概率为 $(71\pm7)\%$,单果种子数为 111.77 ± 11.90 ,种子大小为 $(6.43\pm0.19)\text{ mm}^2$ 。3 个指标均与其他花粉处置条件差异不显著(座果概率: $F_{3,182}=1.63$, $P=0.18$;单果种子数: $F_{3,126}=1.24$, $P=0.30$;种子大小: $F_{3,126}=0.68$, $P=0.56$),暗示 90min 的低温存放不会影响野慈姑的花粉活性。

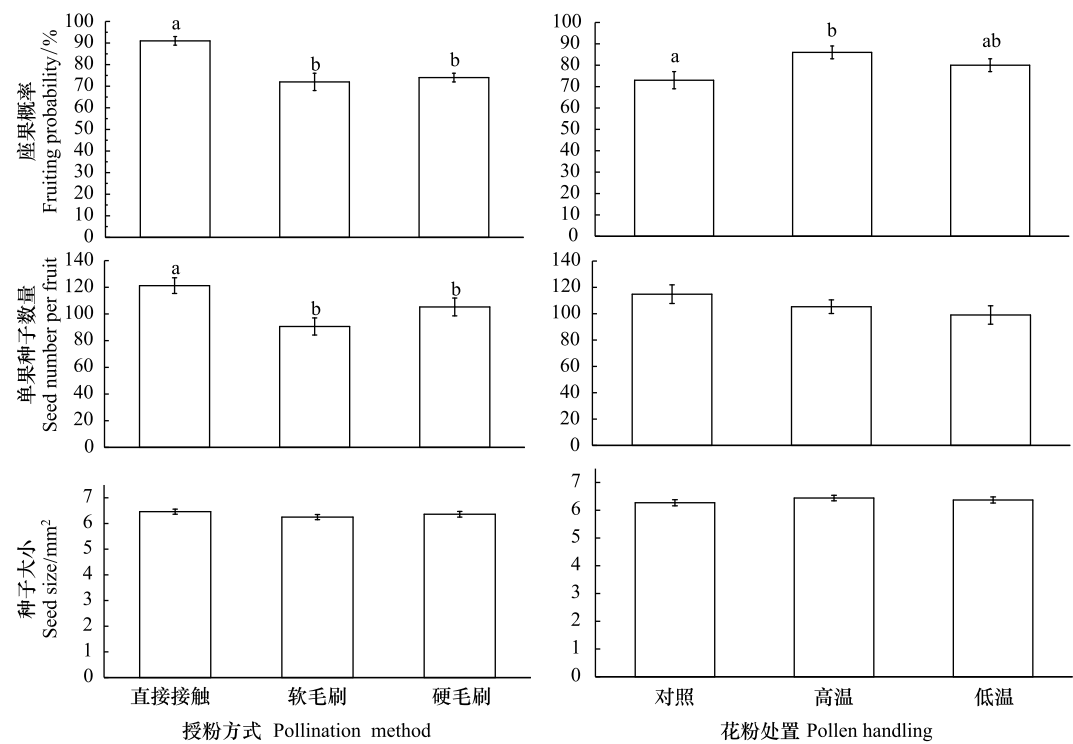


图 2 2019 年野慈姑在不同授粉方式和花粉处置下的繁殖情况

Fig.2 Reproductive performance of *Sagittaria trifolia* under different methods of pollination and pollen handling in 2019

图条上方不同字母表示各处理间差异显著 ($P<0.05$)

表 1 2018 年野慈姑在两种授粉方式下的种子大小与萌发情况

Table 1 Seed performance of <i>Sagittaria trifolia</i> under two methods of pollination in 2018						
变量 Variables	授粉方式 Pollination method		比较 Comparison			
	硬毛刷 Firm brush	直接接触 Direct contact	df	F	P	
种子大小 Seed size/mm ²	5.80±0.26	5.67±0.20	1,59	0.38	0.54	
萌发率 Germination rate/%	6.50±1.80	5.14±0.77	1,56	0.02	0.88	
幼苗芽长 Seedling length/cm	3.12±0.38	3.38±0.22	1,41	0.02	0.90	

3 讨论

根据两年的试验结果,授粉方式均显著影响野慈姑的座果概率和单果种子数量(图 1、图 2),毛刷授粉操作对野慈姑的繁殖产生了负面影响。这一结果虽看似略显意外,特别是考虑到毛刷授粉的广泛采用、对繁殖的负面影响应该很小,但连续两年的独立试验结果非常一致,都指出毛刷作为一种授粉工具确实降低了野慈姑的繁殖水平。相较于接触授粉,硬毛刷授粉使得 2018 年的座果概率和单果种子数量分别下降了 30%和 67%,2019 年的座果概率和单果种子数分别下降了 17%和 13%。可能的一个原因是:相较于花药与柱头的接触,毛刷授粉也许对植株的花粉或柱头造成了物理损伤^[34,37]。考虑到自然状态下,野慈姑的花粉附着在蜜蜂、食蚜蝇等昆虫的腹部或腿部刚毛处,接触可能更加柔和。不过,第二年的试验增加了软毛刷的处理,其结

果显示座果概率和单果种子数分别下降了 19% 和 25%, 这表明无论毛刷质地如何, 毛刷授粉这一操作均对野慈姑的座果结实存在消极影响。软硬两种毛刷质地之间的繁殖表现并无明显差异, 这可能与野慈姑特殊的心皮结构有关, 其多心皮离生, 在头状花托上紧密分布, 每个心皮都会伸出一个花柱, 其柱头细小脆弱, 排列于心皮顶端^[43-44]。相较于其他物种结实有力的大型花柱, 如此敏感短小的花柱更容易因物理摩擦而受到损伤, 不论毛刷的软硬程度。当然, 由于这种心皮结构的存在, 每个小柱头上不均匀的花粉落置也可能导致有些柱头被饱和授粉而有些柱头的花粉缺失, 造成了局部的花粉限制进而导致座果结实的下降^[44]。以上提到的方面在今后的试验中可以通过授粉后立即镜检的方式进一步研究。此外, 毛刷也可能对花粉的授精能力造成了一定的影响, 如花粉从明显黏合在一起的絮状变为打散的颗粒状, 花粉表面的活性物质被毛刷吸附等等。结果还显示, 野慈姑经历不同授粉方式后结实的种子大小、萌发率、幼苗芽长均保持稳定, 表明种子质量不受毛刷的影响。多则研究表明野慈姑的种子大小在不同物理和授粉环境下较为稳定^[39,45], 说明其种子质量不同于数量, 可能更多受到固有发育机制的调控。

不同花粉处置条件下, 野慈姑的座果概率出现了显著差异。高温保存的花粉造成的座果率较高, 这可能与高温促进了花粉活性有关。虽然已有部分研究报道了高温对花粉活性以及后续繁殖表现具有一定的负面影响^[46-50], 但 Bajaj 等^[51]指出经历高温处理的烟草花粉后代表现优于未经历高温处理的, 这与本试验结果基本吻合。极端的试验高温确实会降低花粉活性, 甚至导致花粉的死亡。但本试验的高温处理是在环境高温下增加了花粉在野外的离体时间, 并没有将花粉置于非自然的极端高温。由于野慈姑依赖虫媒传粉, 当花粉附着于昆虫体表时, 便可以认为花粉处于离体状态。考虑到昆虫在花间的飞行很不规律, 短则几分钟之内便可完成授粉, 长则甚至几小时。若花粉活性短时间内快速失活, 那么虫媒传粉的进化意义将大打折扣。因此, 本试验半小时的高温处理证明了野外常规高温并不会对离体的野慈姑花粉活性造成影响。相反, 这样的处置还提高了花粉表现, 这可能因为试验中花粉采摘的时间较早, 温度在一定时间的积累使得野慈姑花粉的酶活性达到一个较高水平^[19,52]。同时, 柱头的可授性也可能因为温度的积累而升高。90min 的低温保存结果暗示野慈姑的花粉活性短时间内不易损失, 这可能与其虫媒传粉的特性有关。本试验结果指出, 野慈姑的人工授粉试验可以在野外温度下常规进行, 其花粉离体后半小时内不需要特殊的处置就能保持甚而促进较高的活性。

4 结论

综上所述, 在进行人工授粉的操作中, 授粉方式和花粉处置均会对野慈姑的繁殖产生影响, 在试验中采下花粉后可直接置于环境温度短时间保存, 授粉时尽量避免使用工具、采用雄花(花药)与柱头直接接触的方法。

虽然人工授粉在诸多领域展现出高度的灵活和可控性, 但研究人员应警惕授粉工具对授粉效果的影响。在控制对比试验前, 应当注意对授粉方式的验证, 以确保工具与其他授粉方式的等效性。尤其对于野慈姑这类柱头细小脆弱的物种, 更应注意授粉工具对繁殖造成的影响, 以保障后续结论的科学有效。同时, 还可根据不同类群植物的花药或柱头特性设计开发特定的授粉工具, 以更好地完善人工授粉技术。不过, 工具授粉也不一定在所有植物中都存在弊端。本试验虽然差异显著, 但毛刷授粉的座果概率维持在 70% 上下, 单果种子数在 80—100 波动, 基本保证了中等偏上的繁殖产出。因此, 在农业园艺等方面的具体实践中, 由于工具授粉的便利高效性十分突出, 建议权衡利弊之后采用。

参考文献(References):

- [1] Silveira M V, Abot A R, Nascimento J N, Rodrigues E T, Rodrigues S R, Puker A. Is manual pollination of yellow passion fruit completely dispensable? *Scientia Horticulturae*, 2012, 146: 99-103.
- [2] Sáez A, Negri P, Viel M, Aizen M A. Pollination efficiency of artificial and bee pollination practices in kiwifruit. *Scientia Horticulturae*, 2019, 246: 1017-1021.
- [3] Sawe T, Nielsen A, Totland Ø, Macrice S, Eldegard K. Inadequate pollination services limit watermelon yields in northern Tanzania. *Basic and*

- Applied Ecology, 2020, 44: 35-45.
- [4] Benjamin F E, Winfree R. Lack of pollinators limits fruit production in commercial blueberry (*Vaccinium corymbosum*). Environmental Entomology, 2014, 43(6): 1574-1583.
- [5] Groeneveld J H, Tscharnke T, Moser G, Clough Y. Experimental evidence for stronger cacao yield limitation by pollination than by plant resources. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2010, 12(3): 183-191.
- [6] Boughediri L, Cerceau-Larrival M T, Doré J C. Significance of freeze-drying in long term storage of date palm pollen. Grana, 1995, 34(6): 408-412.
- [7] Sun S, Gao J Y, Liao W J, Li Q J, Zhang D Y. Adaptive significance of flexistylis in *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): a hand-pollination experiment. Annals of Botany, 2007, 99(4): 661-666.
- [8] 任明迅. 雄蕊合生植物半边莲的花部综合征与繁育系统. 植物生态学报, 2009, 33(2): 361-368.
- [9] Sletvold N, Ågren J. Pollinator-mediated selection on floral display and spur length in the orchid *Gymnadenia conopsea*. International Journal of Plant Sciences, 2010, 171(9): 999-1009.
- [10] Fang Q, Chen Y Z, Huang S Q. Generalist passerine pollination of a winter-flowering fruit tree in central China. Annals of Botany, 2012, 109(2): 379-384.
- [11] Hudewenz A, Pufal G, Bögeholz A L, Klein A M. Cross-pollination benefits differ among oilseed rape varieties. The Journal of Agricultural Science, 2014, 152(5): 770-778.
- [12] 何艳霞, 孔令茜, 陈鹏臻, 苗欣, 尚富德. 雄全异株流苏树的花部特征及繁育系统研究. 生态学报, 2017, 37(24): 8467-8476.
- [13] 万海霞, 邓洪平, 何平, 蒋庆庆, 刘钦. 濒危植物丰都车前的繁育系统与传粉生物学研究. 生态学报, 2018, 38(11): 4018-4026.
- [14] 别鹏飞, 唐婷, 胡进耀, 蒋炜. 珍稀濒危植物距瓣尾囊草 (*Urophysa rochku*) 的开花物候和繁育系统特性. 生态学报, 2018, 38(11): 3899-3908.
- [15] Stone J L, Thomson J D, Dent-Acosta S J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. American Journal of Botany, 1995, 82(9): 1186-1197.
- [16] Abreu I, Oliveira M. Fruit production in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using preserved pollen. Australian Journal of Agricultural Research, 2004, 55(5): 565-569.
- [17] Maryam M, Fatima B, Haider M S, Naqvi S A, Nafees M, Ahmad R, Khan I A. Evaluation of pollen viability in date palm cultivars under different storage temperatures. Pakistan Journal of Botany, 2015, 47(1): 377-381.
- [18] Bhat Z A, Dhillon W S, Shafi R H S, Rather J A, Mir A H, Shafi W, Rashid R, Bhat J A, Rather T R, Wani T A. Influence of storage temperature on viability and *in vitro* germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(11): 128-135.
- [19] Marlin D, Nicolson S W, Sampson J D S, Krüger K. Insights into the pollination requirements of the only African wild tobacco, *Nicotiana africana* (Solanaceae) from the Namib Desert. Journal of Arid Environments, 2016, 125: 64-67.
- [20] Vizzotto G, Driussi E, Pontoni M, Testolin R. Effect of flower pollination on fruit set and cropping in apple. American Journal of Agriculture and Forestry, 2018, 6(5): 156-161.
- [21] Cunningham S A, Evans M J, Neave M, Armstrong J, Barton P S. Pollination and resource limitation as interacting constraints on almond fruit set. Plant Biology, 2020, 22(1): 113-119.
- [22] Lora J, De Oteyza M A P, Fuentetaja P, Hormaza J I. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. Scientia Horticulturae, 2006, 108(1): 91-94.
- [23] Del Vecchio S, Pierce S, Fantinato E, Buffa G. Increasing the germination percentage of a declining native orchid (*Himantoglossum adriaticum*) by pollen transfer and outbreeding between populations. Plant Biology, 2019, 21(5): 935-941.
- [24] Wu Y, Zhang N W, Peng H, Zhang Q, Liu G L. Number of pollinators and its visitation rate incur different intensities of pollen limitation in *Meconopsis integrifolia*. Russian Journal of Ecology, 2019, 50(2): 193-199.
- [25] Kearns C A, Inouye D W. Techniques for Pollination Biologists. Niwot: University Press of Colorado, 1993: 119-122.
- [26] Kalisz S, Vogler D W. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. Ecology, 2003, 84(11): 2928-2942.
- [27] Garratt M P D, Truslove C L, Coston D J, Evans R L, Moss E D, Dodson C, Jenner N, Biesmeijer J C, Potts S G. Pollination deficits in UK apple orchards. Journal of Pollination Ecology, 2014, 12(2): 9-14.
- [28] Petersen J D, Huseth A S, Nault B A. Evaluating pollination deficits in pumpkin production in New York. Environmental Entomology, 2014, 43(5): 1247-1253.
- [29] Adhikari R D, Miyana R. Utilization of hairy footed flower bee *Anthophora plumipes* (Hymenoptera: Apidae) for pollination of greenhouse strawberry. Advances in Entomology, 2015, 4(1): 25-31.
- [30] Wietzke A, Westphal C, Gras P, Kraft M, Pfohl K, Karlovsky P, Pawelzik E, Tscharnke T, Smit I. Insect pollination as a key factor for

- strawberry physiology and marketable fruit quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 258: 197-204.
- [31] Matsumoto T, Takakura K I, Nishida T. Alien pollen grains interfere with the reproductive success of native congener. *Biological Invasions*, 2010, 12(6): 1617-1626.
- [32] Prokop P, Neupauerová D. Flower closure in the field bindweed (*Convolvulus arvensis*): a field test of the pollination hypothesis. *Turkish Journal of Botany*, 2014, 38(5): 877-882.
- [33] Sedgley M, Attanayake D P S T G. The breeding system of rubber (*Hevea brasiliensis*): an evaluation of controlled hand pollination methods. *Euphytica*, 1988, 39(1): 83-91.
- [34] Young H J, Young T P. Alternative outcomes of natural and experimental high pollen loads. *Ecology*, 1992, 73(2): 639-647.
- [35] Ashman T L, Knight T M, Steets J A, Amarasekare P, Burd M, Campbell D R, Dudash M R, Johnston M O, Mazer S J, Mitchell R J, Morgan M T, Wilson W G. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 2004, 85(9): 2408-2421.
- [36] Knight T M, Steets J A, Ashman T L. A quantitative synthesis of pollen supplementation experiments highlights the contribution of resource reallocation to estimates of pollen limitation. *American Journal of Botany*, 2006, 93(2): 271-277.
- [37] 覃道凤, 李婷, 戴璨. 野慈姑花粉限制评估的影响因素. *应用生态学报*, 2015, 26(12): 3865-3870.
- [38] 卢立娜, 贺晓, 李青丰, 易津, 何金军. 华北驼绒藜自然种群结实的花粉和资源限制. *生态学报*, 2015, 35(6): 1706-1712.
- [39] 罗文杰, 金晓芳, 汪正祥, 戴璨. 两种生境下野慈姑繁殖差异及其机制. *生态学报*, 2018, 38(10): 3543-3552.
- [40] 李婷, 覃道凤, 戴璨. 利用 SSR 荧光标记对野慈姑异交率的估测. *植物科学学报*, 2015, 33(4): 554-563.
- [41] 陈家宽. 中国慈姑属的系统与进化植物学研究. 武汉: 武汉大学出版社, 1989: 31-38.
- [42] Dai C, Li L N, Wang Z X, Liao K. Sequential decline in fruit resource allocation within inflorescences of *Sagittaria trifolia*: a test of non-uniform pollination hypothesis. *Plant Species Biology*, 2018, 33(4): 259-267.
- [43] 汪小凡. 中国泽泻科四属的花部综合特征及对传粉方式的适应性. *武汉大学学报: 理学版*, 2001, 47(4): 485-492.
- [44] Huang L J, Wang X F. Gynoecium structure and extra-gynoecial pollen-tube growth in an apocarpous species, *Sagittaria trifolia* (Alismataceae). *Plant Systematics and Evolution*, 2017, 303(2): 259-266.
- [45] Dai C, Luo W J, Gong Y B, Liu F, Wang Z X. Resource reallocation patterns within *Sagittaria trifolia* inflorescences following differential pollination. *American Journal of Botany*, 2018, 105(4): 803-811.
- [46] Matsui T, Omasa K, Horie T. High temperature at flowering inhibits swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 2000, 3(4): 430-434.
- [47] Prasad P V V, Boote K J, Allen Jr L H. Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2006, 139(3/4): 237-251.
- [48] Devasirvatham V, Gaur P M, Mallikarjuna N, Tokachichu R N, Trethowan R M, Tan D K Y. Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology*, 2012, 39(12): 1009-1018.
- [49] Dwivedi S K, Basu S, Kumar S, Kumar G, Prakash V, Kumar S, Mishra J S, Bhatt B P, Malviya N, Singh G P, Arora A. Heat stress induced impairment of starch mobilisation regulates pollen viability and grain yield in wheat: study in eastern Indo-Gangetic Plains. *Field Crops Research*, 2017, 206: 106-114.
- [50] Jiang Y F, Bueckert R A, Warkentin T D, Davis A R. High temperature effects on *in vitro* pollen germination and seed set in field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 2018, 98(1): 71-80.
- [51] Bajaj M, Cresti M, Shivanna K R. Effects of high temperature and humidity stresses on tobacco pollen and their progeny//Ottaviano E, Mulcahy D L, Sari G M, Mulcahy G B, eds. *Angiosperm Pollen and Ovules*. New York: Springer-Verlag, 1992: 349-354.
- [52] Daniel R M, Danson M J. A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35(10): 584-591.