

濒危植物大花杓兰胚与珠被发育的研究

张 毓^{1,2,3}, 张启翔^{1,3*}, 赵世伟², 凌春英^{1,3}

(¹北京林业大学园林学院, 北京 100083; ²北京市植物园, 北京 100093; ³国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘 要: 为了解濒危兰科植物大花杓兰 (*Cypripedium macranthos* Sw.) 的胚与珠被的发育过程, 采集北京地区大花杓兰野生居群不同发育阶段的蒴果, 在显微镜下观察石蜡切片。发现大花杓兰的种胚在授粉后第 6 周就发育至球形胚阶段, 后期发育中不再有进一步的分化, 直至种子成熟仍保留球形胚形态。与一些产自热带和亚热带地区的兰科植物不同, 大花杓兰在受精后胚的整个发育进程中内珠被一直存在, 并在种子成熟时发育成为一层致密的内种皮包围胚体, 这应该是大花杓兰在严酷的自然环境中进行自我保护的适应性进化表现, 在人工无菌萌发时却可能因为阻止了水分和营养物质进入胚体而导致发育成熟的种子萌发困难。

关键词: 兰科; 大花杓兰; 胚; 珠被; 发育

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2010) 01-0072-05

Embryo and Integument Development of the Endangered Species *Cypripedium macranthos* Sw.

ZHANG Yu^{1,2,3}, ZHANG Qi-xiang^{1,3*}, ZHAO Shi-wei², and LING Chun-ying^{1,3}

(¹Department of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Beijing Botanic Gardens, Beijing 100093, China; ³National Engineering Research Center for Horticulture, Beijing 100083, China)

Abstract: In this paper, the embryo and integuments development of *Cypripedium macranthos*, an endangered species in orchidaceae were studied. The anatomical features during embryo development of this species were observed under a Nikon bright field microscope in paraffin-section method. Different from that of some tropical orchids, after fertilization, the inner integument of this species remains during the whole process of seed development and a layer of impermeable endothelium is formed. It encloses the embryo tightly and possibly prevents water and nutrition from entering the embryo, thus preventing mature seeds from germinating *in vitro*.

Key words: Orchidaceae; *Cypripedium macranthos* Sw.; embryo; integument; development

杓兰属 (*Cypripedium* L.) 植物全世界约有 45 种, 主要分布于东亚、北美和欧洲等温带地区和亚热带高山, 是世界植物保育研究的热点类群 (Cribb, 1997)。我国有 32 种, 是杓兰属植物的世界分布中心之一, 主要分布于华北和东北地区 (陈心启和吉占和, 1998; 陈心启, 1999)。由于过度采集, 目前处于严重濒危状态。如果能进行人工繁殖栽培, 对于大花杓兰的保育研究和将来的合理开发利用都有着十分重要的意义。

非共生无菌萌发是兰科植物种子繁殖的常规方式, 但以杓兰属为代表的温带地生兰种子萌发十分困难 (Arditti & Emst, 1993)。它们的未成熟绿荚种子存在一个对萌发有利的最佳采集播种时期, 晚于这个时期的未成熟和成熟种子会因为发育后期次生抑制因子生成而难以萌发 (de Pauw & Rem-

收稿日期: 2009 - 03 - 12; 修回日期: 2009 - 09 - 23

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (6072014)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zqx@bjfu.edu.cn)

phrey, 1993; de Pauw et al, 1995)。在植物胚培养研究中, 从球形胚或更后期胚的离体培养成功率相对高一些, 早期的幼胚培养对培养基和培养条件等的要求更复杂, 而且容易死亡 (胡适宜, 1982)。因此, 为了进行濒危植物大花杓兰的未成熟种子离体培养萌发研究, 需要了解其种子从受精到成熟各时期的发育进程, 以期寻找到最佳采集播种时机, 即胚体发育到球形胚而抑制因子还未能起作用之前的阶段。

台湾杓兰和大花杓兰从系统发育的分类地位、生态分布和生殖成熟等方面都差异巨大 (陈心启, 1999)。台湾杓兰属于杓兰属扇脉组, 自然生境为热带高海拔地区。每年 2 月地上部分开始萌发, 3 月开花, 一年中地上部分的生存时间总共有 10 个月, 从授粉到种子成熟需要 8 个月时间 (Lee et al, 2005); 大花杓兰属于杓兰属杓兰组, 自然生长于亚热带高海拔山区和温带中低海拔地区, 每年 5 月地上部分开始萌发, 6 月开花, 一年中地上部分的生存时间总共仅有 5 个月, 从授粉到种子成熟仅需要 3 个月时间 (张毓等, 2005)。

本研究中对大花杓兰和台湾杓兰的种子发育进程, 初步探询杓兰种子发育过程内珠被的存在和消失与其生态适应性的关系, 为大花杓兰种子离体萌发研究寻找最佳采种期。

1 材料与方法

2007 年 6 月对北京百花山 (海拔 1 700 m 左右) 大花杓兰 (*Cypripedium macranthos* Sw.) 居群进行人工授粉, 选择发育正常、中萼片与唇瓣刚分开的初花期花朵, 授粉后为避免昆虫再次传粉, 将唇瓣摘除。授粉后第 4~12 周, 每周 1 次, 采集不同成熟度的子房 (蒴果)。

采用 FAA 固定液真空抽气固定 24 h 后, 转至 70% 酒精常温室内存。常规石蜡切片法制片, 尼康显微镜下观察, CCD 拍照。

2 结果与分析

2.1 受精后胚的发育

大花杓兰具有内外双层珠被, 外珠被由 2 层细胞构成, 内珠被由 1 层细胞构成, 胚囊周围有 1~2 层珠心细胞。在授粉后 28 d 左右是胚珠发育分化十分旺盛的时期, 胚囊发育成熟处于受精前后的临界状态; 在同一个子房内的成千上万个胚珠中有多个相邻发育进程混合出现; 较多的卵细胞已经受精产生合子 (受精卵)。伴随合子的形成, 助细胞逐渐退化, 合子极性加强, 细胞核位于合点端, 核大, 有一个大核仁; 珠孔端为一个大液泡 (图 1, A)。

授粉后 35 d, 合子横向非均衡分裂发育成一个 2-细胞胚, 形成一个较小的顶细胞和一个具大液泡的基细胞 (图 1, B)。极核受精后成为初生胚乳核, 而后移向胚囊的合点端, 在胚开始发育的极早期就迅速退化, 导致种子成熟时胚乳的缺失。顶细胞发育形成胚体, 基细胞发育形成胚柄。顶细胞经一次横向分裂后, 其顶端的一个细胞再经过一次纵向分裂形成 3 个细胞, 加上珠孔端的基细胞, 形成 T 形 4-细胞胚 (图 1, C)。

授粉后 42 d, 胚体继续分裂, 细胞数量增加, 体积逐渐填充胚囊腔, 发育形成多细胞的早期圆球胚; 基细胞经一次分裂, 发育成为 2-细胞狭长状的胚柄, 位于内珠孔的位置 (图 1, D)。授粉后 49 d, 胚体细胞数量继续增加, 基本填满胚囊腔, 形成球形胚, 胚柄续存, 但不再继续分裂, 外珠被细胞为高度液泡化的长形细胞 (图 1, E)。

授粉后 56 d, 胚体仍然保持球形胚, 完全充满胚囊腔, 胚柄退化消失 (图 1, F)。胚体直到授粉后 90 d 种子成熟, 仍保留球形胚的形态 (图 1, J), 处于原胚时期而未能进入分化阶段。

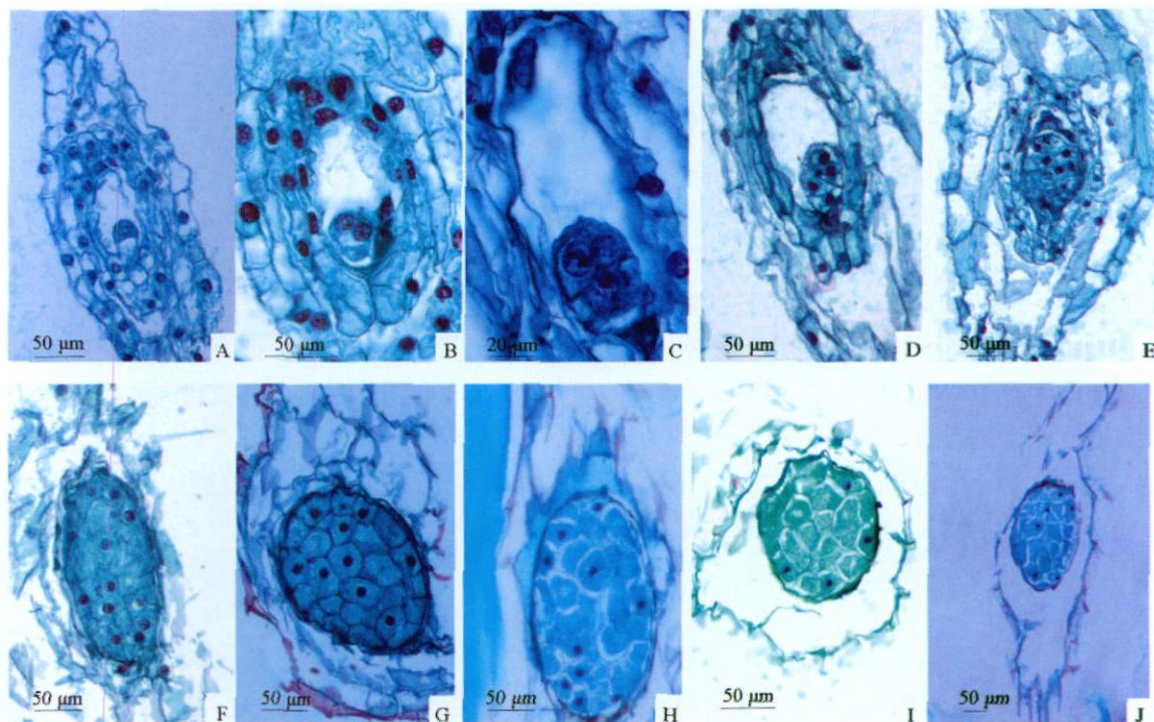


图 1 大花杓兰胚与珠被的发育过程图

- A: 授粉后 28 d, 刚受精的胚囊和合子; B: 授粉后 35 d, 合子发育成一个的 2-细胞胚;
 C: 授粉后 35 d, 合子发育成 T形 4-细胞胚; D: 授粉后 42 d, 胚体发育为早期圆球胚, 基细胞发育为狭长状的胚柄;
 E: 授粉后 49 d, 胚发育至球型胚阶段, 内外珠被明显; F: 授粉后 56 d, 胚仍保持球形胚形态, 胚柄退化消失;
 G: 授粉后 70 d, 种胚接近成熟, 仍保持球形胚形态, 内珠被发育成内种皮紧贴胚体; H: 授粉后 90 d的成熟种子纵切面特写,
 示紧贴胚体生长的内种皮和未分化的球形胚; I: 授粉后 90 d, 成熟种子横切面, 示内外种皮和空气腔;
 J: 授粉后 90 d, 成熟种子纵切面, 示内外种皮和空气腔。

Fig 1 The embryo and integument development process of *C. macranthos*

- A: A just fertilized zygote and megaspore DAP =28; B: A two-celled embryo DAP =35;
 C: A T-shaped, four-celled embryo DAP =35; D: An early globular embryo with a two-celled elongated suspensor
 DAP =42; E: A globular embryo covered by outer and inner integuments DAP =49; F: A globular embryo at the stage of
 suspensor degeneration DAP =56; G: A globular embryo covered by endopleura in a near mature seed
 DAP =70; H: Globular embryo tightly covered by endopleura in a mature seed DAP =90;
 I: Air cavity and endopleura and epispem in a transverse section of mature seed DAP =90; J: Air cavity and
 endopleura and epispem in a longitudinal section in a mature seed DAP =90.

2.2 内外种皮（珠被）的发育

在胚的发育早期, 内外珠被相互靠近, 外珠被细胞高度液泡化, 内珠被由两层细胞构成 (图 1, A)。授粉后 56 d, 随着胚的发育, 胚体逐渐增大, 填满胚囊腔, 珠心细胞逐渐退化吸收, 内珠被细胞紧贴胚体 (图 1, F)。授粉后 70 d, 种子接近成熟, 珠被细胞逐渐脱水, 内珠被变薄, 缩为一薄层致密细胞, 紧紧包围胚体, 发育成为内种皮。由外珠被发育而来的外种皮逐渐形成次生壁 (图 1, G)。

2.3 成熟的种子结构

种子成熟时结构简单, 仅有双层种皮和胚体, 没有胚乳。内珠被最终发育成一层能被番红染为红色的致密的干膜质内种皮 (图 1, H、I)。外种皮细胞的次生壁, 支撑起外种皮纺锤形的狭长轮廓,

内外种皮间是巨大的空气腔 (图 1, I J)。

2.4 大花杓兰与台湾杓兰授粉后种子发育进程比较

大花杓兰从授粉到种子成熟时间需 90 d, 台湾杓兰需要 210 d (Lee et al, 2005; 张毓等, 2005)。从表 1 可以看出, 两者种子成熟时间虽然相差一倍以上, 但各个阶段的发育节奏是十分相似的。在授粉后 90 ~ 105 d 之间采集的台湾杓兰的未成熟绿荚种子是最适合用于无菌离体培养的材料来源 (Lee et al, 2005), 其对应的胚胎发育时期是在种子开始球形胚阶段。根据本研究的结果, 大花杓兰的子房大约在授粉后 42 d 发育成多细胞早期球形胚, 到第 56 天继续发育成晚期球形胚阶段, 内珠被已经变成一薄层紧贴胚体的细胞, 也属于种子脱水前的球形胚阶段。

表 1 大花杓兰和台湾杓兰授粉后种子不同发育阶段所需时间比较

Table 1 The comparing of the embryo development process between *C. macranthos* and *C. formosanum*

发育进程 Development	授粉后天数 /d Days after pollination	
	大花杓兰 <i>Cypripedium macranthos</i>	台湾杓兰 <i>Cypripedium formosanum</i> (Lee, 2005)
合子形成 Zygote	28	60
早期 T 形幼胚阶段 T-shape proembryo	35	75
球形胚阶段 (早期) Early globular embryo	42	90
球形胚阶段 Globular embryo	49	105
球形胚阶段 (晚期) Late globular embryo	56	120
种子脱水 Seed desiccation	70	180
种子成熟 Mature seed	90	210
蒴果成熟开裂 Fruit ripe and split	100	240

3 讨论

兰科植物不同属、种之间内珠被的发育存在较大差异。据伍成厚等 (2004) 报道, 生长于热带低海拔地区的附生兰五唇兰 (*Doritis pulcherrima* Lindl.) 在授粉后 38 d, 雌配子体尚未发育完全, 还未受精时, 内珠被细胞就开始退化, 进入程序死亡过程, 外珠被细胞保持完好, 种子成熟时仅有单层外种皮。与大花杓兰同属于兰科杓兰亚科生长于亚热带低海拔地区的云南兜兰 (*Paphiopedilum godefroniae*), 在胚发育过程中内珠被细胞被吸收, 成熟时仅有单层外种皮 (任玲和王伏雄, 1987)。叶秀姝和郭俊彦 (1995) 在墨兰 (*Cymbidium sinense*) 胚发育研究中也发现内珠被细胞退化消失。

本研究中大花杓兰种子不同发育时期的切片观察中发现大花杓兰的成熟种子均具有内外双层 (珠被) 种皮, 内珠被在胚的整个发育过程中一直存在, 并在种子发育成熟时形成一层致密的干膜质内种皮结构紧贴于胚。生长于亚热带高海拔地区的台湾杓兰 (*Cypripedium formosanum* Hayata) 胚发育过程中, 内珠被不退化消失, 而且内珠被发育成的内种皮被认为是导致台湾杓兰成熟种子萌发困难的原因 (Lee et al, 2005)。

兜兰、墨兰和五唇兰等均生长于较为温暖的热带或亚热带中低海拔地区, 属于兰科植物中常绿的热带附生兰或亚热带地生兰种类, 而杓兰属植物则是生于亚热带高海拔或温带高纬度寒冷地区温带兰科植物的典型代表。大花杓兰生长期较短, 一年中的大部分时间都在休眠以躲避寒冷的环境。当大花杓兰种子成熟时, 植株地上部分也同时凋亡, 进入休眠期, 外界环境迅速进入寒冷的冬季, 种子当年不能萌发。在自然界中, 杓兰要在种子成熟散布后在第 2 年甚至更长时间以后, 遇到特殊共生真菌, 由真菌侵染穿透种皮, 提供营养来帮助其种子萌发。但是在种子无菌萌发试验中, 虽然人为地提供了大量的糖类等营养物质, 但由于致密的膜质内种皮在一定时期内阻隔了水分和营养进入胚内, 胚体难以获得无菌萌发所必需的物质条件, 从而导致成熟种子的萌发困难。具有内外双种皮的结构, 应该是

该物种对恶劣自然环境的一种保护性适应,它可以在一段较长的休眠期内保护幼胚并抑制种胚的萌发,避免种子过早萌发而受到严酷外界条件的伤害而死亡,这对植物本身是有利的特性,但在人工繁殖时变成障碍。由此,根据台湾杓兰与大花杓兰种子发育节奏的相似性,可以推测百花山的大花杓兰无菌萌发研究最佳采种期应该是授粉后6~7周的时期。考虑到大花杓兰自然分布广,生长于不同区域的居群物候期和发育节律的变化、年际波动和一些偶然因素的影响,采种时距离授粉的具体天数可能有所不同;但理论上,当胚体已发育至具有萌发潜力的球形胚阶段,但内珠被还未发育成致密干膜质内种皮的时期应该是种子无菌萌发优先选择的采种时期。

因为目前仅有少量杓兰属植物的研究报道,双种皮是否是杓兰属植物,或甚至是多数温带兰科植物的共有结构,以及它们对种子无菌萌发的具体影响效应有待进一步研究。

References

- Arditti J, Emst R. 1993. *Micropropagation of orchids*. New York: Wiley.
- Chen Sing-chi. 1999. *Cypripedium* L. Lang Kai-yong, Chen Sing-chi, Luo Yi-bo, Zhu Guang-hua. *Flora of China* Vol. 17. Beijing: Science Press. 34. (in Chinese)
- 陈心启. 1999. 杓兰属 郎楷永, 陈心启, 罗毅波, 朱光华. 中国植物志. (17). 北京: 科学出版社: 34.
- Chen Sing-chi, Tsi Zhan-hou. 1998. *The comprehensive orchid book of China*. Beijing: China Forestry Publishing House: 103 - 113. (in Chinese)
- 陈心启, 吉占和. 1998. 中国兰花全书. 北京: 中国林业出版社: 103 - 113.
- Cribb P J. 1997. *The genus Cypripedium*. Portland: Timber Press. 27 - 36.
- de Pauw M A, Remphrey W R. 1993. *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media and cold treatment. *Can J Bot*, 71: 879 - 885.
- de Pauw M A, Remphrey W R, Palmer C E. 1995. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Ann Bot*, 75: 267 - 275.
- Hu Shi-yi. 1982. *The embryology of angiosperm*. Beijing: People Education Press. 103 - 113. (in Chinese)
- 胡适宜. 1982. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社: 103 - 113.
- Lee Y I, Lee N, Yeung E, Chung M C. 2005. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*. *J Amer Soc Hort Sci*, 130 (5): 752 - 753.
- Ren Ling, Wang Fu-xiong. 1987. Studies on embryology of *Paphiopedilum*. *Acta Botanica Sinica*, 29 (1): 14 - 21. (in Chinese)
- 任玲, 王伏雄. 1987. 兜兰胚胎学的研究. 植物学报, 29 (1): 14 - 21.
- Wu Cheng-hou, Li Dong-mei, Liang Cheng-ye, Ye Xiu-lin. 2004. Ultrastructural observation on integument cells of *Doritis pulcherrima*. *Subtropical Plant Science*, 33 (3): 4 - 6. (in Chinese)
- 伍成厚, 李冬妹, 梁承邺, 叶秀琳. 2004. 五唇兰珠被细胞的超微结构观察. 亚热带植物科学, 33 (3): 4 - 6.
- Ye Xiu-lin, Guo Jun-yan. 1995. Studies on the development of female gametophyte embryo of *Cymbidium sinense*. *Subtropical Plant Science*, 3 (1): 54 - 58. (in Chinese)
- 叶秀琳, 郭俊彦. 1995. 墨兰雌配子体和胚胎发生. 热带亚热带植物学报, 3 (1): 54 - 58.
- Zhang Yu, Zhao Shi-wei, Zhang Qi-xiang, Luo Yi-bo. 2005. The resource and population biology of *Cypripedium macranthos* in Beijing region. Zhang Qi-xiang. *Advances in ornamental horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House: 92 - 95. (in Chinese)
- 张毓, 赵世伟, 张启翔, 罗毅波. 2005. 北京地区大花杓兰资源调查与生物学特性研究. 张启翔. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社: 92 - 95.