

扇脉杓兰果实生长动态及胚胎发育过程观察

刘芬, 田敏^①, 王彩霞, 龚茂江, 李全健

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 对授粉后不同发育阶段扇脉杓兰 (*Cypripedium japonicum* Thunb.) 果实的生长动态进行了观察和分析, 并分别采用 TTC 法和常规石蜡切片法研究了种子生活力及其胚胎发育过程。观察结果显示: 扇脉杓兰果实形态成熟时间约为 110 d, 其中, 授粉后 0~20 d 为第 1 次迅速生长期, 授粉后 20~30 d 为第 1 次缓慢生长期, 授粉后 30~50 d 为第 2 次迅速生长期, 授粉后 50~110 d 为第 2 次缓慢生长期; 果实纵径和横径的生长动态变化过程相似, 但横径的生长动态曲线较纵径平缓, 形态成熟时果实的纵径和横径分别为 48.87 和 13.59 mm。成熟种子由内外 2 层种皮和球形胚构成, 不具胚乳, 内外种皮间具空气腔; 败育种子只具有内种皮和外种皮而无种胚。胚胎发育类型为石竹型, 种胚自受精形成合子到发育为成熟球形胚约需 95 d。种胚发育时合子第 1 次不均横裂形成基细胞和顶细胞; 基细胞发育为胚柄细胞, 胚柄细胞高度液泡化, 在胚胎发育的过程中不进行分裂并逐渐退化消失; 顶细胞不参与胚柄形成, 并且经过有丝分裂最终形成球形胚; 内珠被在种子成熟时发育成为 1 层致密的紧贴胚体的内种皮。种胚纵径和横径的生长动态变化相似, 成熟球形胚的纵径和横径分别为 208.71 和 106.19 μm 。扇脉杓兰种子生活力较高, 有生活力的种子占 56%。根据研究结果推测: 自然状态下扇脉杓兰种子萌发率较低, 可能与致密的种皮、种子中较小的胚体以及无胚乳导致的营养成分不足有关。

关键词: 扇脉杓兰; 果实生长; 胚胎发育; 种子生活力

中图分类号: Q944.46; S682.31 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)01-0028-08

Observation on fruit growth dynamics and embryo development process of *Cypripedium japonicum*

LIU Fen, TIAN Min^①, WANG Cai-xia, GONG Mao-jiang, LI Quan-jian (Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(1): 28-35

Abstract: Fruit growth dynamics of *Cypripedium japonicum* Thunb. at different development stages after pollination were observed and analyzed. And seed viability and embryo development process were also studied by TTC and normal paraffin section methods, respectively. The observation results show that morphological mature time of *C. japonicum* fruit is about 110 d, in which, after pollination, 0-20 d is the first fast growth period, 20-30 d is the first slow growth period, 30-50 d is the second fast growth period and 50-110 d is the second slow growth period. Growth dynamic changes of vertical and horizontal diameters of *C. japonicum* fruit are similar but dynamic growth curve of horizontal diameter is gentler than that of vertical diameter, and fruit vertical and horizontal diameters at morphological mature stage are 48.87 and 13.59 mm, respectively. The mature seeds are consisted of endopleura, exopleura and sphere embryo without endosperm, and air cavity exists between endopleura and exopleura. While, abortive seeds only possess endopleura and exopleura, without sphere embryo. The embryo development type of *C. japonicum* is caryophyllad type, and the time from forming zygote after fertilization to developing the mature sphere embryo is about 95 d. During development stage of seed embryo, the first unequal transverse fissure of zygote forms basal cell and terminal cell. Basal cell develops into suspensor cell with highly vacuolated, which does not further divide and degenerate and disappear gradually. Terminal cell is not involved in suspensor forming and finally forms sphere embryo through mitosis. The inner integument

收稿日期: 2011-05-03

基金项目: 浙江省科技重大攻关项目(2010C02004-2); 中央级公益性科研院所专项资金项目(RISF060925)

作者简介: 刘芬(1986—), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生, 主要从事兰科植物生殖生物学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: tmin115@163.com

develops into one layer of impermeable endopleura clung to embryo at seed mature stage. Dynamic growth changes of vertical and horizontal diameters of seed embryo are similar, and vertical and horizontal diameters of mature sphere embryo are 208.71 and 106.19 μm , respectively. Seed viability of *C. japonicum* is higher with 56% viable seeds. According to these research results, it is conjectured that germination rate of *C. japonicum* seed is low under natural state, which relates to compact seed coat, smaller embryo and nutritional components deficiency due to no endosperm.

Key words: *Cypripedium japonicum* Thunb.; fruit growth; embryo development; seed viability

兰科(Orchidaceae)植物是被子植物中最大的家族之一,约有700属20000多种^[1],是自然环境和生物多样性的的重要组成部分。杓兰属(*Cypripedium* L.)隶属于杓兰亚科(Subfam. Cypripedioideae),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、北美和欧洲等温带地区和亚热带山地。中国是杓兰属植物的主要分布区之一,有30多种,其中不少种类为中国特有种。扇脉杓兰(*C. japonicum* Thunb.)为杓兰属扇脉组[Sect. *Flabellinervia* (Pfitz.) Hennessy ex Cribb]地生兰,分布于中国的陕西、甘肃、安徽、浙江、江西、湖南、湖北、四川和贵州等地^[1,42]。中国是扇脉杓兰的分布中心,境外仅见日本有分布。扇脉杓兰花大而美丽,可栽培供观赏;其根状茎具有活血调经和祛风镇痛的功效,民间用于治疗月经不调、跌打损伤和皮肤瘙痒,具有较高的观赏和药用价值^[2]。近年来,由于生境破坏和过度人工采挖,扇脉杓兰的种群数量急剧下降,迫切需要对扇脉杓兰的野生资源进行保护。

有性生殖是被子植物生长发育中的重要时期。果实是胚珠形成和发育的场所,胚珠的正常发育是种胚和种子发育的先决条件。受精后,胚的发育和胚乳的发育密切相关,此时期的发育将最终决定种子的质量。因此,有必要对扇脉杓兰的生殖生物学进行研究。目前,已有学者对扇脉杓兰的传粉机制进行了研究^[3],但有关扇脉杓兰胚胎发育方面的研究尚未见报道,对该种果实发育过程的动态变化更缺乏系统的观察和研究。

作者通过对扇脉杓兰部分生殖生物学特性的观察和研究,了解其果实生长和胚胎发育特征,对影响扇脉杓兰种子萌发的可能因素进行分析,以期为提高扇脉杓兰的有性生殖能力、研究种子无菌萌发条件提供一定的理论基础,并为丰富杓兰属植物生殖生物学资料,为其濒危机制及保护生物学的研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试扇脉杓兰为野生居群,居群大小约300株。位于浙江省西北部临安市境内的天目山国家级自然保护区内,地理坐标为东经119°25'、北纬30°21',属亚热带季风气候,海拔1120 m,年均降雨量1390~1870 mm,空气相对湿度76%~81%。于2010年5月对开花植株进行人工授粉、标记,授粉后将其唇瓣摘除。

1.2 方法

1.2.1 果实纵横径测量 自5月1日授粉后至10月20日,以10天为1个测量周期,用游标卡尺测量扇脉杓兰蒴果的纵径(果实基部至顶部长度)和横径(果实中部直径)。每次测量30株,共30个蒴果。数值采用平均值法计算。

1.2.2 胚胎发育观察 授粉后采集不同发育阶段的蒴果,横切成4 mm长小段,用FAA固定液固定,爱氏苏木精整体染色3 d,然后用体积分数30%、50%、70%、85%、95%和100%乙醇逐级脱水,经TO透明、浸蜡包埋后切片(切片厚度8 μm),再经过展片、烘干、脱蜡、透明后用番红-固绿复染,最后经过脱水、透明后用中性树胶封片。用OLYMPUS CX41多用途生物显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社)进行观察、测量和拍照。

1.2.3 种子生活力测定 将扇脉杓兰成熟种子放入培养皿中,加入质量体积分数1%的TTC溶液至液面没过种子,置于20℃黑暗条件下染色24 h,然后用去离子水冲洗干净。用OLYMPUS SZ61体视显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社)观察种子染色情况。随机选取3个视野各100粒种子,观察并统计其中的败育种子数量和种胚未着色的种子数量,共设置3次重复。

2 结果和分析

2.1 扇脉杓兰果实发育过程中外部形态及果实纵横径的变化

2.1.1 外部形态变化 野外状态下,不同发育过程中扇脉杓兰果实的外部形态特征见图1-1~8。扇脉杓兰的子房为下位子房,开花时子房呈浅绿色长棒状,被白色表皮毛(图1-3);授粉后,子房不断伸长增粗;在受精过程完成之后花冠逐渐枯萎脱落,只留

下不断发育膨大成果实的子房(图1-4)。在果实发育过程中,蒴果中部的果皮细胞生长较快,使果实中间部分较两端粗、果实呈梭形,近柱头端的部分稍钝(图1-5)。初期果皮为浅绿色,具果棱;随果实的生长,果皮颜色逐渐转为深绿色(图1-6),但此后果实体积基本无变化(图1-7)。果实近成熟时变为浅棕色,并随果皮的栓质化变为褐色(图1-8)。果实成熟时干燥失水,蒴果从顶端开始沿背缝线开裂,种子散出。



1. 扇脉杓兰野生植株 Wild plant of *Cypripedium japonicum* Thunb.; 2. 具花苞的扇脉杓兰植株 *C. japonicum* plant with flower bud; 3. 盛花期,箭头示子房 Full flowering stage, arrow showing ovary; 4. 示授粉后 20 d 的子房 Showing ovary at 20 d after pollination; 5. 示授粉后 60 d 的果实 Showing fruit at 60 d after pollination; 6. 示授粉后 90 d 的果实 Showing fruit at 90 d after pollination; 7. 示授粉后 120 d 的果实 Showing fruit at 120 d after pollination; 8. 示授粉后 150 d 的果实 Showing fruit at 150 d after pollination.

图1 不同发育时期扇脉杓兰果实的外部形态

Fig. 1 External morphology of fruit of *Cypripedium japonicum* Thunb. at different development stages

2.1.2 果实纵横径变化 果实发育过程中扇脉杓兰果实纵径和横径的动态变化见图2。人工授粉后,扇脉杓兰果实纵径和横径的动态变化趋势相似,果实从形成至开花所需时间约为 210 d,其中形态成熟所需时间为 110 d,在这一过程中果实纵径和横径的变化可分为 4 个时期。

第 1 个时期为授粉后的 0~20 d,为第 1 次迅速生长期。扇脉杓兰果实的纵径和横径快速变化,但纵径的生长速率和增长量明显大于横径,纵径和横径的

平均日增长量分别为 1.07 和 0.14 mm。这一时期果实纵径和横径的增长量分别占总增长量的 77.55% 和 26.69%。推测这一时期由于气温升高、叶片已经成熟并向外输出营养,使叶片与果实之间的营养竞争趋缓,细胞分裂加快导致果实迅速膨大。

第 2 个时期为授粉后的 20~30 d,为第 1 次缓慢生长期。这一时期果实纵径和横径的增长缓慢,纵径和横径的平均日增长量分别仅为 0.16 和 0.04 mm,增长量分别占总增长量的 5.78% 和 4.05%。此时果

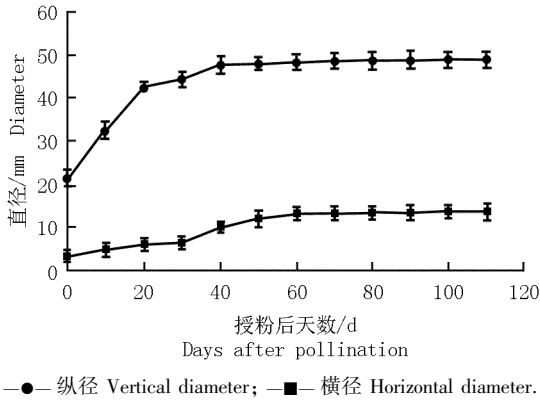
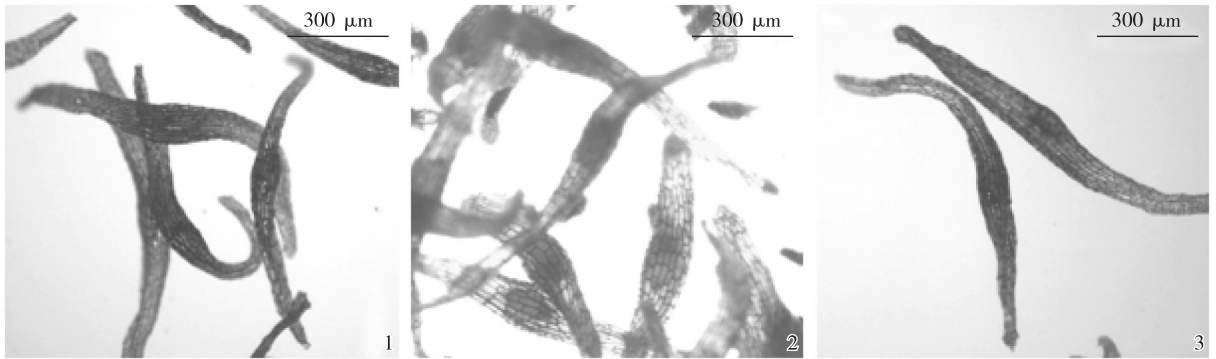


图2 不同发育时期扇脉杓兰果实纵径和横径的动态变化
Fig. 2 Dynamic change of vertical and horizontal diameters of fruit of *Cyripedium japonicum* Thunb. at different development stages

实正值囊胚发育和大孢子体发生时期,需要大量营养供给,以致果实增长缓慢。

第3个时期为授粉后的30~50 d,为第2次迅速生长期。此期扇脉杓兰果实纵径和横径的生长速率再次加快,平均日增长量分别达到0.19和0.28 mm,增长量分别占总增长量的13.66%和54.53%。这一



1. 无生活力种子 Seeds without viability; 2. 有生活力种子 Seeds with viability; 3. 种胚败育种子 Seeds with abortive embryo.

图3 经TTC法处理后扇脉杓兰种子的形态
Fig. 3 Morphology of *Cyripedium japonicum* Thunb. seed treated by TTC method

2.3 受精后不同时期扇脉杓兰胚胎发育过程及特征分析

开花受精后,不同发育时期扇脉杓兰种子胚胎的形态特征见图4-1~8。

2.3.1 不同发育时期胚的特征 授粉后55 d左右,扇脉杓兰种子的胚囊发育成熟,大多数种子的胚珠受精产生合子,胚胎发生即将开始。由图4-1可见:合

时期囊胚发育已结束,营养物质大量积累,使果实细胞迅速生长。

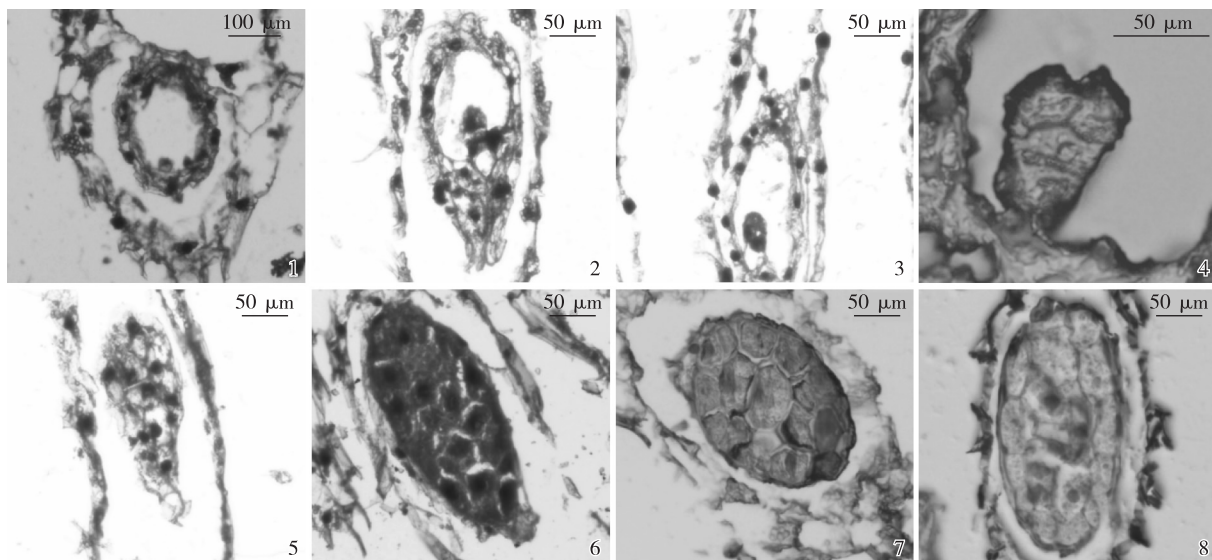
第4个时期为授粉后的50~110 d,为第2次缓慢生长期。这一时期扇脉杓兰果实生长速率减缓,形态成熟基本完成,此时果实呈梭形,纵径和横径分别为48.87和13.59 mm。

2.2 扇脉杓兰种子的形态特征及生活力分析

扇脉杓兰种子颜色为褐色,种子呈两头稍尖的纺锤形,其中一头较尖、另一头较钝;不具胚乳,由内外2层种皮和发育至球形胚阶段的椭圆种胚构成。外种皮为长方形薄壁细胞,褐色,细胞透明,无内容物,细胞壁呈纵横交错的环纹;内种皮仅由1层细胞构成,紧贴胚;内外种皮间具有较大的空气腔,使种子易于随风和水流传播。

经过TTC法处理后,无生活力的扇脉杓兰种子的种胚不着色(图3-1),有活力的种子种胚呈现红色(图3-2),种胚败育的种子也不着色(图3-3)。分析结果显示:有生活力的种子占供试种子总数的56%,无生活力和空粒种子的数量分别占供试种子总数的12%和32%,表明扇脉杓兰种子具有较高的生活力。

子呈现极性,在珠孔端形成1个比较明显的大液泡,约占细胞长度的1/2;同时,细胞核移至合点端,在此处集中了大量的细胞质;胚乳细胞的细胞核位于近珠孔端,随着胚胎的发育,胚乳细胞的细胞核最终分解消失,导致种子成熟时缺失胚乳;卵细胞受精后极性加强,决定合子第1次分裂产生2个功能不同的子细胞。



1. 授粉后 55 d 刚受精的合子 Zygote just fertilized at 55 d after pollination; 2. 授粉后 60 d 形成的双细胞原胚 Two-cell proembryo at 60 d after pollination; 3. 授粉后 70 d 形成的三细胞原胚 Three-cell proembryo at 70 d after pollination; 4. 授粉后 85 d 形成的四细胞 T 形原胚 T-shaped proembryo with four-cells at 85 d after pollination; 5. 授粉后 90 d 形成的早期圆球胚 Early sphere embryo at 90 d after pollination; 6. 授粉后 120 d 的球形胚, 显示胚柄开始退化 Sphere embryo at 120 d after pollination, showing suspensor began to degenerate; 7. 授粉后 150 d, 胚柄退化消失 Suspensor disappearing at 150 d after pollination; 8. 授粉后 205 d 的成熟种子 Mature seed at 205 d after pollination.

图 4 不同发育时期扇脉杓兰种子胚胎的特征

Fig. 4 Embryo characteristics in *Cyripedium japonicum* Thunb. seed at different development stages

胚的发育从合子分裂开始, 经过原胚的发育阶段, 最终达到成熟。授粉后 60 d, 合子横向非均衡分裂形成 2 个叠生的细胞, 即近珠孔端的基细胞和近合点端的顶细胞; 顶细胞体积较小, 基细胞体积较大并具有较大的液泡 (图 4-2)。此时为双细胞原胚阶段, 之后的发育主要是顶细胞进行多次分裂形成胚体、基细胞发育成胚柄。

授粉后 70 d, 合子第 2 次分裂, 顶细胞横裂形成直线型三细胞原胚 (图 4-3)。授粉后 85 d, 三细胞原胚顶端的 1 个细胞纵裂形成 3 层 4 个细胞的 T 形原胚 (图 4-4)。之后, 四细胞 T 形原胚中间部分的细胞进行平周分裂, 生成六细胞胚。

授粉后 90 d, 胚体分裂, 发育形成早期圆球胚, 具有 1 个细胞的胚柄; 胚柄细胞高度液泡化 (图 4-5)。

授粉后 120 d, 胚体发育形成球形胚, 占据了整个胚囊腔, 胚柄开始退化 (图 4-6)。

授粉后 150 d, 胚体保持球形胚, 胚柄完全退化消失 (图 4-7)。

之后, 球形胚的有丝分裂终止, 胚细胞具有浓密的细胞质, 在细胞生长的同时进行物质积累和储存。

直到授粉后 205 d 种子成熟时胚体仍保持球形胚的形态, 未能进入分化阶段。成熟后的胚体约为 8 个细胞长、6 个细胞宽, 紧贴内种皮 (图 4-8)。

2.3.2 不同发育时期种皮 (珠被) 的特征 扇脉杓兰种子的种皮由外种皮和内种皮构成, 分别由外珠被和内珠被发育而来。

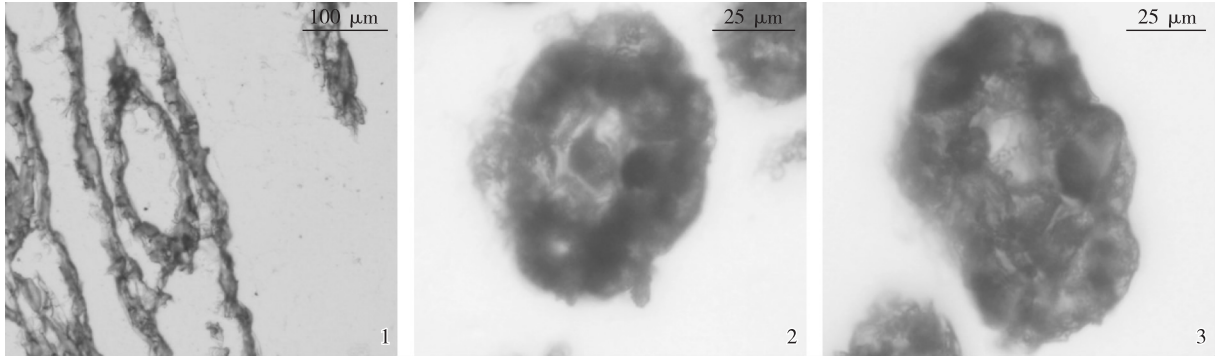
外种皮的特征: 授粉后 55 d, 外珠被由 2 层长方形薄壁细胞构成, 高度液泡化, 厚度约为 96 μm ; 细胞核较大, 整层外珠被细胞染色一致, 外珠被中无微管组织 (图 4-1)。伴随着原胚的发育, 外珠被细胞逐渐失水, 种子成熟时成为薄膜状的外种皮; 种皮细胞的细胞质及细胞器消失, 成为失去生命力的死细胞, 有加厚的环纹。

内种皮的特征: 授粉后 55 d, 内珠被由 1 层细胞构成, 与外珠被细胞相比, 内珠被细胞小且排列整齐、紧密, 细胞核大, 细胞质较浓且着色深 (图 4-1)。在胚发育的整个时期, 内珠被细胞不进行分裂并随着原胚的发育逐渐失水, 内珠被变为更致密更薄的 1 层细胞, 紧贴胚体, 并发育成为内种皮。

授粉后 55 d, 内外珠被间出现空气腔且在原胚发

育过程中一直存在;种子成熟时,内外种皮之间也有明显的空气腔(图4-8)。

2.3.3 胚胎发育中的败育现象 观察结果表明(图5-1~3):在扇脉杓兰种子胚胎的发育过程中存在败育现象,且在胚胎发育的各个时期败育率基本一致。



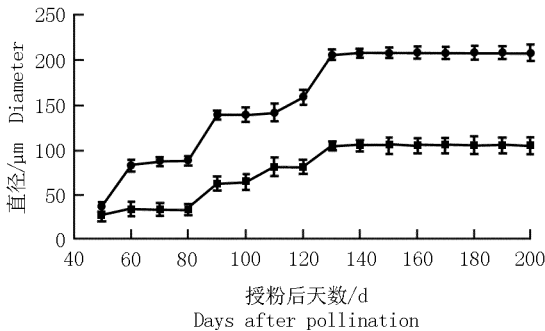
1. 败育的种子 Abortive seed; 2. 正常发育的囊胚 Normally developed blastula; 3. 败育的囊胚 Abortive blastula.

图5 扇脉杓兰败育囊胚与正常囊胚的比较

Fig. 5 Comparison of abortive blastula with normal blastula of *Cypripedium japonicum* Thunb.

2.3.4 种胚生长的动态变化 扇脉杓兰种胚自受精形成合子到发育为成熟球形胚约需95 d。由种胚的生长变化曲线(图6)可知:种胚纵径和横径的生长动态变化趋势相似。

授粉后55 d完成受精过程形成合子,合子的纵径和横径分别为35.71和28.57 μm。授粉后55~60 d,纵径迅速增加,横径增长缓慢,平均日增长量分别为5.11和0.50 μm,纵径生长速率明显大于横径;在此期间,合子横裂生成双细胞原胚,部分合子经历了2次横裂生成三细胞原胚,因此种胚纵径变化明显。



—●— 纵径 Vertical diameter; —■— 横径 Horizontal diameter.

图6 不同发育时期扇脉杓兰种胚纵径和横径的动态变化
Fig. 6 Dynamic change of vertical and horizontal diameters of embryo in *Cypripedium japonicum* Thunb. seed at different development stages

其中,在雌配子体发育过程中,败育的种子囊胚中无内含物(图5-3);当胚胎发育成熟时,败育的种子只有内种皮和外种皮而无种胚(图5-1)。扇脉杓兰种子数量多,部分种子的败育有利于其他发育种子获得足够的营养,发育充实且饱满。

授粉后60~80 d,纵径和横径的增长速率趋缓;此时,原胚处于由三细胞原胚向四细胞T形原胚的过渡期,在体积方面变化不明显。授粉后80~90 d,纵径和横径迅速增加,平均日增长量分别为5.13和2.92 μm;在此期间三细胞原胚近合点端的顶细胞纵裂生成四细胞T形原胚,并有部分四细胞T形原胚进一步分裂形成六细胞胚和早期圆球胚,故种胚的体积迅速增大。授粉后90~110 d,种胚的纵径和横径均有增长,纵径的增长速率趋缓,横径的增长速率较快,该时间段原胚发育为早期圆球胚。授粉后110~130 d,种胚的纵径和横径的生长速率再次加快,平均日增长量分别为3.20和1.21 μm;此时期早期圆球胚的外层细胞进行垂周分裂,形成球形胚。授粉后130~200 d,种胚的纵径和横径基本无变化,体积大小基本恒定,纵径和横径长度分别为208.71和106.19 μm;此时期早期球形胚发育至成熟球形胚,种胚呈椭圆形。

3 讨论和结论

3.1 果实发育过程

扇脉杓兰果实的整个发育过程可分为4个发育时期,与多数被子植物的果实生长曲线相比较^[4-7],扇脉杓兰果实的生长动态曲线较为平缓,由纵径和横径

的变化导致了果实形态的变化。第1个时期(授粉至授粉后20 d)纵径生长速率比横径快,但第3个时期(授粉后30~50 d)横径生长速率明显加快,导致果实的果型指数(L/D)的变化,果实形状由长棒形变成梭形。据分析,授粉后20~30 d正值囊胚发育和大孢子生成时期,是影响扇脉杓兰种子发育的关键时期,如采取相应措施(如增施肥料)以增强植株生长势、促使囊胚得到更好的发育,则有利于提高有活力种子的数量和品质。

3.2 传粉至受精的间隔期

在不同植物间,花粉落到柱头至其内的精核与卵和极核融合完成受精过程所经历的时间有一定差异,大多数种类在10~48 h内完成^[8]。扇脉杓兰的传粉至受精间隔时间为55 d左右,明显比大多数有花植物长。扇脉杓兰开花时子房瘦小,授粉结束后2周内蒴果迅速增大,推测是花粉管在子房中生长的缘故。其内容物可能含有促进胚珠发育和雌配子体成熟的生理调控物质,其中的主要作用物质及作用机制还有待进一步的研究分析。

3.3 胚胎发育过程

合子分裂和分化成胚胎的过程均按照一定的规律进行;被子植物种间胚胎发育的差异主要表现在合子最初几次的分裂^[9]。在扇脉杓兰胚胎发育过程中具有合子第1次横向分裂且顶细胞横裂、基细胞不参与胚体的形成、不分裂形成1个胚柄细胞等特征。参考被子植物胚胎发育类型的划分标准^[10],扇脉杓兰幼胚的发育过程属于石竹型。

兰科植物胚胎发育类型多样,特别是在胚柄的形态发育上更是如此。基于胚柄形态学,有学者将兰科植物的胚柄划分成5种类型^[11]。孟兰(*Lecanorchis japonica* Blume)的胚柄极其退化;玉凤花属(*Habenaria* Willd.)植物的胚柄非常发达,形成吸器状的结构;墨兰[*Cymbidium sinense* (Jackson ex Andr.) Willd.]的胚胎在发育生成四细胞胚结构之后,其中3个近珠孔端的细胞开始液化,最终变为胚柄细胞,顶细胞则继续分裂形成胚体和另一部分胚柄^[11];与扇脉杓兰同属于杓兰亚科的大花杓兰(*Cypripedium macranthum* Sw.)在合子横裂生成基细胞和顶细胞之后顶细胞继续发育形成胚体,基细胞经过1次分裂生成2细胞的狭长胚柄,并在种胚发育的过程中逐渐退化消失^[12]。本研究结果表明:在经过第1次横裂之后扇脉杓兰合子的顶细胞发育为胚体,而位于珠孔端

的基细胞高度液泡化成为胚柄细胞,在胚胎发育过程中不分裂并逐渐退化消失。扇脉杓兰的胚柄发育过程和台湾杓兰(*Cypripedium formosanum* Hayata)的胚柄发育过程一致,且与杓兰属其他植物的胚柄发育特征相比有其独特性^[12]。胚柄在有花植物早期发育中具有重要的作用^[13],与其他兰科植物相比,扇脉杓兰的胚柄不发达,对其胚胎发育过程中营养物质的吸收可能有一定的影响。

兰科植物不同属、种间珠被的发育也存在较大差异,大多数兰科植物在胚胎发育的同时内珠被细胞被吸收,如兜兰属(*Paphiopedilum* Pfitz.)植物在胚胎发育过程中内珠被细胞被吸收,成熟时仅余外层种皮^[14]。而对杓兰属植物的研究结果表明:在胚胎发育过程中一直存在内珠被^[12,15],成熟种子有内外2层种皮,内外种皮间具空气腔,双种皮和空气腔可能是杓兰属植物种子的特征。作者的观察结果表明:在合子形成时扇脉杓兰的内珠被和外珠被之间已产生空气腔,这与杓兰属其他植物有所不同。台湾杓兰和扇脉杓兰亲缘关系十分紧密,二者同属于杓兰属扇脉组,曾有学者将二者归为一个种,二者的胚胎发育过程也比较一致,但台湾杓兰是在胚胎发育至球形胚时期逐渐形成空气腔^[15],故空气腔形成时期的不同可作为区分扇脉杓兰和台湾杓兰的特征之一。

本研究中,扇脉杓兰在大孢子发生与胚胎发育过程中均出现不同程度的败育现象,其中大孢子发育阶段败育率比较低,约12%,属于正常现象,因为大多数植物在此发育阶段的败育率一般为5%~15%^[16]。在扇脉杓兰胚胎发育至成熟种子的过程中,无种胚的种子比例为32%,可能只有部分胚囊能够进行正常的受精而形成合子,或者在胚胎发育过程中存在胚胎停止发育和异常降解现象。所以,要阐明扇脉杓兰种子败育的原因还需要进行小孢子发生、雄配子体发育以及传粉和受精生物学等方面的研究。

3.4 影响种子萌发的因素

兰科植物不同属、种之间种子的大小、形态、结构及颜色等性状差异较大,故种子性状可作为分类、系统演化研究及阐述种子生长模式的依据。曾碧玉等^[17]对虾脊兰(*Calanthe discolor* Lindl.)、羊耳蒜[*Liparis japonica* (Miq.) Maxim.]、石仙桃(*Pholidota chinensis* Lindl.)及密花石斛(*Dendrobium densiflorum* Lindl.)4种野生兰花的果荚、种子和种胚性状进行了初步研究,认为不同种的种子大小和种胚大小间并无

直接相关性。与上述4种兰科植物相比,扇脉杓兰的种子最大、种子中种胚的比例最小。

扇脉杓兰种子的生活力较高,但萌发较困难,表明种子难于萌发不是其生活力低所引起的,而是其他因素导致的。石仙桃和密花石斛种子萌发较快且萌发率高,这与它们的种子结构(具种孔、种胚占种子比例大和种胚浓密等)有关^[17]。而扇脉杓兰的种胚较小,在种子中的比例较小,可能是扇脉杓兰种子萌发慢且萌发率低的原因之一。

扇脉杓兰种子中几乎没有贮藏营养物质,而且在种子中也未观察到贮藏营养物质的组织,这一特征可能与其野生特性有关。一方面保证种子不受外界不良影响,有利于植株的生存;另一方面则导致种子在自然条件下萌发困难。种子是植物生活史周期中最脆弱的阶段,种子质量直接使扇脉杓兰种群的生存和发展受到限制和干扰,这可能是导致扇脉杓兰种群濒危的重要因素之一。

扇脉杓兰种子成熟后其种胚尚未发育完全,可能是造成其种子休眠的原因之一。目前针对植物种子休眠调控机制有“光调控”、“呼吸代谢调控”和“激素调控”等假说,而扇脉杓兰相关方面的研究未见报道。造成植物种子休眠的主要原因有种皮障碍、胚后熟和种子内存在某些抑制物质等因素,而影响扇脉杓兰种子萌发的决定因素究竟是什么尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第十七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志: 第七卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 490.
- [3] 孙海芹. 独花兰和扇脉杓兰的传粉生态学[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2005: 54-75.

- [4] 郝云, 杨途熙, 魏安智, 等. 串枝红杏果实发育动态及品质的研究[J]. 北方园艺, 2009(7): 15-18.
- [5] 方金豹, 黄宏文, 李绍华. CPPU对猕猴桃果实发育过程中糖、酸含量变化的影响[J]. 果树学报, 2002, 19(4): 235-239.
- [6] 李平, 罗松. 番石榴果实发育的初步研究[J]. 福建果树, 2002(3): 1-3.
- [7] 罗华建, 罗诗, 赖永超, 等. 台湾青枣果实生长发育初探[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 436-438.
- [8] 孙辉芳. 传粉至受精的间隔时间[J]. 生物学通报, 1990(10): 8.
- [9] 刘捷平. 被子植物的胚胎发育[J]. 生物学通报, 1984(5): 4-6.
- [10] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 216.
- [11] YEUNG E C, ZEE S Y, YE X L. Embryology of *Cymbidium sinense*: embryo development[J]. Annals of Botany, 1996, 78: 105-110.
- [12] 张毓, 张启翔, 赵世伟, 等. 濒危植物大花杓兰胚与珠被发育的研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 72-76.
- [13] YEUNG E C, MEINKE D W. Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor[J]. Plant Cell, 1993, 5: 1371-1381.
- [14] 任玲, 王伏雄. 兜兰胚胎学的研究[J]. 植物学报, 1987, 29(1): 14-21.
- [15] LEE Y I, LEE N, YEUNG E C, et al. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro* [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130: 752-753.
- [16] TENG N J, CHEN T, JIN B, et al. Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis* (Poaceae) [J]. Flora, 2006, 201: 658-667.
- [17] 曾碧玉, 朱根发, 刘海涛, 等. 4种野生兰花种子特征及离体培养初报[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(3): 31-34.

(责任编辑: 张明霞)