

黑节草双受精过程及胚胎发育的研究

徐正尧 杨彩云 杨貌仙

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 黑节草从传粉到受精约需 130 d, 精子在花粉管中形成, 胚囊发育属蓼型胚囊, 因反足细胞较早退化, 故受精前胚囊多只由卵器和中央细胞组成。精卵核融合时, 精核染色质进入卵核后凝集成颗粒状, 并在原位与卵核的染色质融合, 雌、雄性核仁一直维持至合子的第一次分裂期前。双受精作用正常, 属于有丝分裂前配子融合类型, 初生胚乳核发生 2-3 次分裂后逐渐退化消失, 胚的发育局限于球形胚阶段。

关键词 黑节草; 双受精; 胚胎发育

STUDIES ON THE DOUBLE FERTILIZATION AND EMBRYOGENY IN *DENDROBIUM CANDIDUM* WALL. EX LINDL.

Xu Zhengyao Yang Caiyun Yang Maoxian

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract The study of the double fertilization and the embryogeny in *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. shows that it takes about 130 days between pollination and fertilization. The generative cell divides and forms two sperms in the pollen tube before it reaches the embryo sac. The embryo sac development is of Polygonum type. Because antipodals are degenerated earlier, the embryo sac is composed of the egg apparatus and the central cell before fertilization. After the sperm nucleus enters the egg cell and fuses with the egg nucleus, the chromatin of the sperm nucleus turns granular, then fuses with that of the egg nucleus. The male and female nucleoli do not fuse until the zygote divides. The double fertilization proceeds normally and belongs to the type of premitotic syngamy. The primary endosperm nucleus degenerates gradually after it divides 2-3 times. The embryogeny stops in the stage of the spherical proembryo.

Key words *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; Double fertilization; Embryogeny

黑节草是一种重要的兰科药用植物, 有生津止渴、润肺止咳的作用, 对治疗声带嘶哑有奇效, 用黑节草为原料制成的名贵中药“西枫斗”在国际市场上, 特别是东南亚市场具有很好的声誉。但是, 由于长期的不合理开发, 致使黑节草野生资源日渐枯竭, 甚至面临绝种的危险, 为保护这一重要资源, 并加以进一步的合理开发和利用, 对其生殖生物学进行研究是很有必要的。目前关于这一方面的工作已有一些报导^[1,2,3], 但对黑节草的双受精过程及胚胎

发育的研究方面，还未见有报导。因此，本研究可为进一步完善该植物的生殖生物学研究提供一些基本资料。

1 材料和方法

黑节草 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 采自云南省广南县。栽培在云南大学生物系温室，一般性管理。每年4月底—5月初开花时，人工传粉，并挂牌记时。从传粉成功后120 d开始固定膨大的子房作为研究材料，用卡诺氏固定液每隔5 d固定一次，连续一个月。常规石蜡切片，厚度为7—10 μm ，以爱氏苏木精染色为主，亮绿复染，OLYMPUS显微镜观察并照相。

2 观察结果

2.1 受精前的雌、雄配子体

成熟花粉为二细胞型花粉，同一药囊内的所有四合花粉 (tetrad) 粘结在一起形成花粉块，传粉后2—4 h，花粉块经柱头的水化作用后，花粉块内各四合花粉间的粘连明显减弱，最终成为较分散的四合花粉^[1]，10 h后在花粉远极面开始萌发出花粉管，每一花粉只长一个花粉管，随着花粉管的伸长，花粉的绝大部分内容物进入花粉管中，多数情况是营养核首先进入花粉管中，紧接着生殖细胞也进入花粉管，生殖细胞初期为圆球形，以后多为纺锤形。生殖细胞后期的这种长的外形被认为可能对它移到花粉管内及在花粉管内移动有利^[4]。精子在花粉管内形成时，仍可见营养核。

雌配子体形成延续时间较长。当开花传粉时，胚珠仍处于分化初期，经过约四个月，雌配子体才分化成熟。胚珠为薄珠心型，整个胚囊仅由一层小型的珠心表皮细胞包围，胚囊较狭长，胚囊的发育为典型的蓼型胚囊^[2]，反足细胞位于合点端或稍靠中央，细胞体积小，有退化趋势。两个极核在受精前多融合形成次生核 (图版 I: 1)。由于胚囊内反足细胞存活时间不长，所以受精作用发生前胚囊往往只能看到卵器及中央细胞。卵细胞具有明显的极性，靠珠孔端为一大液泡占据，核及大部分细胞质位于靠合点端 (图版 I: 1—3)。

2.2 双受精作用

黑节草从传粉到发生受精作用需要较长的时间，一般为130—140 d，花粉管通过退化的助细胞进入胚囊并把两个精子释放在退化的助细胞附近 (图版 I: 3)。此后，两个精子分别与卵核和极核融合，完成双受精过程。大多数情况下配子融合发生于传粉后140—150 d，精核多从卵细胞的珠孔端进入，然后迅速移向卵核，这时雌、雄配子的核仁清晰可见 (图版 I: 5—6)，当精核贴在卵核核膜上不久，精核就由圆球形变成单透镜形 (图版 I: 7)，以后精、卵核贴合处的核膜逐渐融合，精核染色质进入卵核，紧接着精核染色质凝集成颗粒状并在原位与卵核有染色质混合，而逐渐不能彼此区分 (图版 I: 11)，但雌、雄性核仁一直维持至合子的第一次分裂期前 (图版 II: 1)。按胡适宜等的分类法，黑节草的受精作用属于有丝分裂前类型^[5]。形成初期的合子虽有极性，但不明显，进入休眠期以后，在合子的珠孔极液泡化明显增强，最终形成一个大液泡，从而将细胞核、细胞质排挤到合点极，使合子的极性进一步加强 (图版 II: 2—3)。合子大约经过3—5 d的休眠期后就进行第一次分裂，第一次分裂为横分裂形成顶端细胞和基细胞。顶端细胞体积小，具有浓厚的细胞质；基细胞体积大，液泡明

显(图版 I: 3-5)。

另一个精子进入中央细胞后,精核很快靠近次生核,并与之融合成为三倍体的初生胚乳核,次生核与精核的融合速度明显比精、卵核融合的快(图版 I: 6),融合过程与精、卵核的融合基本相似。但是,次生核的核仁极不明显,融合时只看到精核的核仁(图版 I: 6),在初生胚乳核发生第一次分裂前核仁消失(图版 I: 9)。

2.3 胚及胚乳的发育

合子经过 3-5 d 休眠期以后,开始发生分裂,由于这时的合子具有明显的极性,因此第一次分裂是不对称的,形成两个大小不等的细胞(图版 I: 5),其中靠合点端的顶端细胞较小,但细胞质浓厚;而靠珠孔端的基细胞体积较大,细胞内有多个液泡。以后,顶端细胞及基细胞都参与了胚的形成(图版 I: 7-8),但胚的发育只局限于球形胚阶段,以致到果实成熟并于第二年春开裂种子散落时,种子内的胚仍只是呈卵形的未发生形态分化的原胚。此时的原胚大约由 96 个细胞组成^[3]。黑节草虽然双受精作用正常,但由三核融合所形成的初生胚乳核却一般只分裂 2-3 次,形成 4-8 个细胞核,然后就不再发生分裂,且已形成的这 4-8 个细胞核随着胚的发育,约在受精结束后 5-15 d 逐渐解体消失(图版 I: 10-11)。传粉后 60-80 d,种皮细胞逐渐解体,最终只剩下细胞壁,所以成熟种子是由一层半透明的种皮及其包围着的一个卵形原胚两部分构成,结构非常简单。这种种子在自然状态下极难正常萌发形成植株。

3 讨论

关于兰科植物的受精过程有不同的报导^[6]:①正常双受精,如 *Cypripedium insigne* 和 *Dendrobium nobile* 就是正常双受精的例子;②非正常双受精,即精子与卵的融合正常,但缺乏受精作用的第二个环节——精核与极核的融合,故不形成初生胚乳核,如 *Galanthe veitchii* 的受精过程;③单受精,Osamu Terasaka 等报导^[7]*Spiranthes sinensis* 的花粉管中只形成一个精子,故只发生精子与卵融合的单受精。黑节草的受精过程属于正常的双受精,在核的融合过程中,精核在进到卵核之前处于细胞周期的间期,为静止状态,在与卵核融合过程中同时开始合子的分裂。按照 Gerassimova-Nawshchina 的分类法^[4,5],黑节草的受精作用属于中间型,是处于有丝分裂前型和有丝分裂后型之间的过渡类型。然而,我们更主张按胡适宜等的划分法^[5],将其归入有丝分裂前的类型。

关于兰科植物胚的发育类型分类,这是一个比较困难的问题^[6,10]。一方面是兰科种类繁多,生活习性及形态变化范围大,但更主要的是由于该科植物的胚通常分化程度低,一般种子散落时,其中的胚仍是一个球形或卵形原胚。Swamy 曾根据四细胞原胚的结构以及胚柄的发育和结构等特征,将兰科植物的胚划分为五种类型^[8]。通过对黑节草胚胎发生的观察,我们认为,其胚胎发生的类型属于 Swamy 分类体系的第 I 型,即合子第一次分裂为横分裂,产生基细胞和顶端细胞,基细胞第二次横分裂产生靠顶端细胞的中间细胞和靠珠孔的胚柄原始细胞,以后顶端细胞及中间细胞经多次分裂形成胚的主体,而胚柄原始细胞不再发生分裂,而直接发育为胚柄,在发育过程中细胞在纵轴方向上明显伸长,体积增大,且靠珠孔端具有发达的大液泡,胚体发育的营养供应主要依靠此胚柄细胞。随着胚的不断发育,胚柄趋于退化,到胚成熟时,已看不到胚柄结构。黑节草与其它多数兰科植物一样^[9,10],其成熟种子内不具胚乳,只有一个由 90 多个细胞构成的卵形原胚。虽然每个果实内包含有数以万计的种子,但在

自然条件下极难正常萌发形成幼苗，加之不合理的大量采收营养植株，所以现在这一贵重的中药植物的野生资源正日渐枯竭。

参考文献

- 1 徐正尧, 杨貌仙. 黑节草小孢子发生及雄配子体形成的细胞形态学研究. 云南大学学报(自然科学版), 1986, 8(3): 310-318
- 2 徐正尧, 杨彩云, 杨貌仙. 黑节草大孢子发生及雌配子体发育. 云南大学学报(自然科学版), 1994, 16(2): 164-167
- 3 叶秀森, 程式君, 王伏雄等. 黑节草未成熟种子的形态发育及其在离体培养时的表现. 云南植物研究, 1988, 10(3): 285-290
- 4 胡适宜. 被子植物胚胎学. 人民教育出版社, 1983, 103-135
- 5 胡适宜, 朱崑. 高等植物受精作用中雄性核和雌性核的融合. 植物学报, 1979, 21(1): 1-10
- 6 周枚, 杨兴华, 梁汉兴等. 天麻形态学. 科学出版社, 1987, 40-75
- 7 Terasaka O, Tsuneyoshi N, Tanaka R. Single fertilization in *Spiranthes sinensis*. Bot Mag Tokyo, 1979, 92: 56-67
- 8 Swamy B G L. Embryological studies in the Orchidaceae I. Embryogeny. Am Midland Naturalist, 1949, 41(1): 202-232
- 9 梁汉兴. 天麻的受精作用. 植物学报, 1985, 27(6): 589-593
- 10 Winthner O L. The Orchids—A scientific survey. New York: The Ronald Press Company. 1949, 161-180

图版说明

图版 I

1. 受精前的胚囊, 示卵细胞各中央细胞; $\times 1000$
2. 受精前的胚囊, 示卵细胞和一个助细胞; $\times 1000$
3. 花粉管从退化的助细胞进入胚囊后, 释放出两个精子; $\times 1250$
4. 5. 精核进入卵细胞后, 迅速与卵核紧贴; $\times 1000$
6. 精、卵核的核膜开始融合, 雌、雄性核仁明显可见, 另一个精子核与次生核融合, 其融合速度明显快于精卵核融合; $\times 1000$
7. 紧贴于卵核上的精核由圆球形变为单凸透镜形; $\times 1250$
8. 精、卵核核膜部分融合; $\times 1250$
9. 次生核与一个精核的融合结束, 形成初生胚乳核, 此时精卵融合还未完成; $\times 1250$
10. 初生胚乳核即将发生分裂; $\times 1000$
11. 精核进入卵核后, 染色质凝集成颗粒状, 此时仍可见雌、雄性核仁; 1000

图版 I

1. 精、卵核融合的同时, 合子开始进入分裂期; $\times 1000$
2. 合子经过休眠期后即将分裂, 此时可见细胞的极性明显增强; $\times 1000$
3. 合子第一次分裂的前期, 此时初生胚乳核已分裂了1-2次; $\times 1000$
4. 二细胞原胚的基细胞正在分裂; $\times 1000$
5. 二细胞原胚, 靠合点端的小细胞为顶细胞, 靠珠孔端的大细胞为基细胞; $\times 1250$
6. 7. 组成二细胞原胚的顶细胞和基细胞同时分裂
8. 9. 基细胞的分裂多为横分裂; $\times 1000$
10. 初生胚乳核经过2-3次分裂后, 形成4-8个胚乳核, 此时胚多是四细胞时期原胚; $\times 1000$
11. 胚发育到8-16个细胞的球形胚时, 胚乳已经退化消失; $\times 1000$
12. 示球形原胚, 此时胚乳已完全消失. $\times 1000$

Explanation of plates

Plate I

1. A mature embryo sac before fertilization, showing an egg and a central cell; $\times 1000$
2. A mature embryo sac before fertilization, showing an egg and a synergid; $\times 1000$
3. Two sperms discharged from a pollen tube after the pollen tube enters into the embryo sac through degenerated synergid; $\times 1250$
4. 5. One male nucleus contacts with the egg nucleus after entering the egg; $\times 1000$

6. Male and female nucleoli are obvious when the nuclear membranes of sperm and egg nuclei are fusing. The fusion of the other sperm nucleus and the secondary nucleus takes shorter time than that of the sperm and egg nuclei. $\times 1000$
7. The spherical sperm nucleus after contacting with egg nucleus turns convex; $\times 1250$
8. Showing the fusion of nuclear membranes between the sperm and egg nuclei; $\times 1250$
9. Showing the fertilization of secondary nucleus and a sperm nucleus, and formation of the primary endosperm nucleus; $\times 1250$
10. Mitosis of the primary endosperm nucleus is about to occur; $\times 1000$
11. The chromatin of sperm nucleus begins to turn granular after the sperm nucleus enters the egg nucleus. The male and female nucleoli still can be observed; $\times 1000$

Plate I

1. The zygote is in the prophase of mitosis during the fusion of the sperm nucleus and the egg nucleus; $\times 1000$
2. With the strengthening of the zygote polarity, mitosis of the zygote is about to occur after dormancy; $\times 1000$
3. The primary endosperm nucleus underwent division for 1—2 times to form 2—4 cells while the zygote is in the prophase of the first mitosis; $\times 1000$
4. Showing a 2-cell proembryo, the basal cell is dividing; $\times 1000$
5. Showing a 2-cell proembryo, the small apical cell toward the chalaza and the large basal cell toward the micropyle; $\times 1250$
6. 7. The apical cell and basal cell both contribute to the development of embryo; $\times 1250$
8. 9. The basal cell of the 2-cell proembryo divides transversely; $\times 1000$
10. Showing 4-celled proembryo; $\times 1000$
11. The endosperm nuclei are degenerated when the proembryo is of 8—16 cells; $\times 1000$
12. showing a spherical proembryo, the endosperm nuclei are degenerated completely; $\times 1000$