

## 低温对蝴蝶兰胚珠发育的影响

伍成厚 梁承邺 叶秀麟\*

(中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

**摘要:** 低温(12–18℃)处理的蝴蝶兰, 授粉 50 d 开始分化胚珠原基, 60 d 胚囊处于大孢子母细胞时期, 比常温(20–25℃)下的推迟 10–15 d; 授粉 70 d, 常温下的蝴蝶兰植株已完成雌配子体发育和双受精, 而低温处理的蝴蝶兰仍未完成大孢子的发生过程。低温处理的蝴蝶兰, 胚囊发育过程中珠心细胞提前退化, 在大孢子母细胞外围形成较厚的胚囊壁。胚囊只发育到单核胚囊阶段, 没有形成成熟胚囊。

**关键词:** 蝴蝶兰; 低温; 胚珠; 胚囊

中图分类号: Q944.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 02-0129-04

## The Effects of Low Temperature on Ovule Development of *Phalaenopsis*

WU Cheng-hou LIANG Cheng-ye YE Xiu-lin\*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** The differentiation of ovule primordium of a hybrid of *Phalaenopsis* initiated at low temperature (12–18℃) 50 days after pollination, and megasporogenesis appeared 60 days after pollination. The megasporogenesis at normal temperature (20–25℃) was delayed for 10–15 days. Although the megagametophyte formed and even the double fertilization had been finished 70 days after pollination at normal temperature, the megasporogenesis had not yet been finished at low temperature. Nucellar cells degenerated in advance under low temperature, which resulted in thickened embryo sac wall surrounding the megasporocyte. The embryo sac developed into functional megaspores only and no mature embryo sac was generated.

**Key words:** *Phalaenopsis* hybrid; Low temperature; Ovule; Embryo sac

在被子植物的有性生殖过程中, 孢子体向配子体的转化是一个重要的环节, 因此一直是被子植物胚胎学研究的重要内容。蝴蝶兰隶属于兰科 (Orchidaceae) 蝶兰属 (*Phalaenopsis*), 经多年的人工杂交和选择, 培育出数以千计的优良栽培品种, 具有花型美观、花色鲜艳的特点, 深受人们的青睐。由于蝴蝶兰的子房内含有上万个细小、发育基本同步的胚珠, 并且授粉后子房及胚珠才开始发育, 因此是被子植物胚胎学研究的理想材料。蝴蝶兰的胚珠发育前人已有研究<sup>[1,2]</sup>, 但没有报道详细的胚囊发育过程。胚珠在成熟时期的 cDNA 文库已被建立并以

差异杂交法分离出一批胚珠发育特异的 cDNA 克隆<sup>[3]</sup>, 对 cDNA 克隆 O138 在胚珠中的表达特性及其 DNA 序列进行了分析<sup>[4]</sup>, 但外界条件对其胚珠发育的影响未见报道。本文研究了低温对蝴蝶兰杂交种 (*Phalaenopsis* hybrid) 胚珠发育的影响, 为蝴蝶兰的杂交育种提供参考。

### 1 材料和方法

供试材料为中国科学院华南植物园温室培育的蝴蝶兰杂交种 (*Phalaenopsis* hybrid)。当花葶长 25 cm 时, 将蝴蝶兰植株置于 12–18℃ 进行低温处

收稿日期: 2003-03-28 接受日期: 2003-06-17

基金项目: 广东省科技计划资助项目(20304 和 2002A2040801)

\* 通讯作者 Corresponding author

理,对照置于 20–25℃ 的常温下。开花 1 周内进行人工授粉,每一花葶只留基部的 2 朵花授粉。从授粉后 30–70 d,对照材料每天采集子房,低温处理的植株每隔 5 d 采样一次。低温处理和对照材料均取子房的中部用 FAA 固定液固定,爱氏(Ehrlich)苏木精整体染色,常规石蜡切片法制片、切片厚度 8 μm。

## 2 观察结果

### 2.1 常温下胚珠的发育

蝴蝶兰的子房由 3 心皮组成,侧膜胎座,授粉后子房开始膨大。授粉后 30 d,胎座形成许多指状突起,并且不断伸长分枝。各个小分枝的末端由一层表皮细胞包围着 1–4 个细胞组成。

授粉后 40 d,胚珠原基开始分化。首先,胎座指状分枝末端表皮下的一个细胞体积增大,直接分化为孢原细胞(图版 I:1),珠柄在孢原细胞基部以下 4–5 个细胞处开始向一侧弯曲,直至倒转形成倒生胚珠。胚珠有两层珠被,珠被细胞自孢原细胞分化后开始发育,最初孢原细胞下部的表皮细胞开始突起,然后向上生长形成内珠被;内珠被开始分化后,在珠柄对侧的内珠被基部的表皮细胞突起,分化出外珠被(图版 I:2)。内外珠被向上生长,包住珠心,在顶端形成珠孔。

授粉后 44 d,孢原细胞直接发育为大孢子母细胞,细胞的体积迅速增大,细胞质变得很浓,与胚珠的其它细胞区别明显。珠心细胞直接由孢原细胞外面的单层表皮细胞发育而成,随着大孢子母细胞体积的增大,珠心细胞沿平周方向伸长。大孢子母细胞分裂过程中,珠心细胞开始解体,逐渐形成增厚的胚囊壁,但合点端的 3 个排列整齐的珠心细胞不解体(图版 I:3)。

授粉后约 48 d,大孢子母细胞开始进入减数分裂。减数分裂前大孢子母细胞会产生极性分化,细胞核通常位于珠孔端。第一次减数分裂完成时常形成两个大小基本相等的二分体细胞。珠孔端的一个细胞逐渐解体,合点端的一个体积继续增大(图版 I:4),并分裂形成 2 个单倍体的大孢子核。两核分别移向两极,核之间不形成细胞壁,而是以一个大液泡相隔(图版 I:5)。

形成的两个大孢子核位于胚囊的两端,授粉后约 56 d 同时进行一次有丝分裂,形成四核胚囊;四核分别再进行一次有丝分裂,形成八核胚囊,其中

珠孔端的 3 个核分化为卵器,合点端的 3 个核分化为反足器,珠孔与合点端各有一核移向胚囊中央,构成中央细胞的极核,授粉后约 63 d 形成成熟胚囊。胚囊发育为双孢子葱型。

### 2.2 低温处理后蝴蝶兰的胚珠发育

经过低温处理的蝴蝶兰植株,授粉后 40 d 胎座开始形成指状突起。授粉后 50 d,胚珠原基开始分化。胚珠分化方式与常温下相同,但有部分胚珠在分化初期,孢原细胞下面的一个细胞提前退化,细胞呈扁形、体积变小、细胞质消失(图版 I:6),不直接分化为珠心细胞。

大孢子母细胞由孢原细胞直接发育而来,其极性的特点与常温下发育的大孢子母细胞相同。珠心细胞由孢原细胞外面的单层表皮细胞发育而成,在大孢子母细胞尚未进行减数分裂时珠心细胞就解体,合点端的一个珠心细胞也提前解体,使整个大孢子母细胞被一层厚厚的胚囊壁包围着(图版 I:7)。

授粉后 60 d,大部分处于大孢子母细胞时期,小部分大孢子母细胞进行第一次减数分裂形成二分体细胞,珠孔端的细胞逐渐解体;合点端的细胞体积继续增大发育为功能大孢子,即单核胚囊(图版 I:8)。授粉后 70 d 未见功能大孢子发育为二核胚囊,此时的切片中还观察到少量的胚珠仍停留在大孢子母细胞或二分体时期。

在低温条件下的胚珠还观察到胚囊体积增大,细胞质很少、分布在细胞周缘,中央有个大液泡,细胞核靠边的异常现象(图版 I:9)。

## 3 讨论

蝴蝶兰胚囊发育为双孢子葱型,本试验的蝴蝶兰杂交种胚囊发育进程比 Duncan 等<sup>[2]</sup>报道的两个原生种和两个杂交种慢些,约迟 3–5 d。

低温条件下蝴蝶兰胚囊发育不但比常温对照蝴蝶兰缓慢,而且胚囊只发育到单核胚囊阶段,没有成熟胚囊形成,也就是说低温直接影响了雌配子体的正常发育,不能完成有性生殖过程。文献报道兰科植物的胚珠发育过程中,合点端的珠心细胞通常解体较迟<sup>[5,9]</sup>,这个珠心细胞与胚囊合点端之间的胞间连丝是胚囊大孢子发生过程中营养来源的唯一通道<sup>[7]</sup>。从本试验的观察结果看,在低温条件下蝴蝶兰大孢子母细胞时期珠心细胞提前解体,使大孢子母细胞外围形成较厚的胚囊壁,尤其是合点端的

珠心细胞解体,使大孢子发生过程中的营养来源通道受阻,这是雌配子体不能正常发育的主要原因。

有研究表明,被子植物胚囊的发育途径受温度的影响<sup>[8,9]</sup>。Hjelmqvist 和 Grazi<sup>[8]</sup>发现低温处理可使山榆 *Ulmus glabra* 形成较多的五福花型胚囊;而在较高温度条件下,鲁德撒型胚囊的频率显著增加。田惠桥<sup>[9]</sup>发现,低温处理使水稻异常胚囊的频率提高。而在我们的试验中,蝴蝶兰经低温处理后胚囊的发育途径没有改变,仅有个别形态异常的胚囊(图版 I:9),看来低温对不同植物胚囊的发育影响是不同的。

### 参考文献

- [1] Nimoto D H, Sagawa Y. Ovule development in *Phalaenopsis* [J]. *Caryologia*, 1962, 15:89-97.
- [2] Duncan R E, Curtis J T. Intermittent growth of fruits of *Phalaenopsis*. A correlation of the growth phases of an orchid fruit with internal development [J]. *Bull Tor Bot Club*, 1942, 167-183.
- [3] Nadeau J A, Zhang X S, Li J, et al. Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs [J]. *Plant Cell*, 1996, 8:213-239.
- [4] Wang L (王玲), Zhang X S (张宪省), Zhong H W (钟海文), et al. Expression and sequence analysis of a cDNA relative to orchid ovule development [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, 41(3): 276-279. (in Chinese)
- [5] Ren L (任玲), Wang F X (王伏雄). Embryological studies of *Paphiopedium godefroyae* Stein [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1987, 29(1):14-21. (in Chinese).
- [6] Zhang Z J (张振珏), Chen Y (陈裕), Lin K R (林坤瑞). Mega- and microsporogenesis and development of female and male gametophytes in *Anoectochilus roxburghii* (Orchidaceae)[J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 1996, 4(2):14-17. (in Chinese)
- [7] Rodkiewicz B, Bednara J. Cell wall ingrowths and callose distribution in megasporogenesis in some Orchidaceae [J]. *Phytomorphology*, 1976, 276-281.
- [8] Bhojwani S S, Bhatnagar S P. The Embryology of Angiosperms [M]. Delhi: Nu Tech Photolithographers, 1974. 74-75.
- [9] Tian H Q (田惠桥). The abnormal development of embryo sacs during cold treatment and ovary culture in *Oryza sativa* L. [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin (西北植物学报)*, 1983, 3(1):61-64. (in Chinese)

### 图版说明

图版 I

图片均以珠孔端朝下。

1. 常温下,指状分枝末端表皮下的一个细胞体积增大,直接分化为孢原细胞(\*); ×550

2. 常温下,内(\*)、外(†)珠被开始分化; ×550

3. 常温下发育的大孢子母细胞,合点端有3个排列整齐的珠心细胞(∧); ×550

4. 常温下发育的二分体,珠孔端的一个细胞已经退化(†),合点端的一个细胞体积增大,发育为功能大孢子,合点端有3个排列整齐的珠心细胞(∧); ×550

5. 常温下发育的二核胚囊,合点端有3个排列整齐的珠心细胞(∧); ×550

6. 低温下,内外珠被开始分化,孢原细胞下部的一个细胞开始解体(†); ×550

7. 低温下的大孢子母细胞,合点端胚囊壁增厚,合点端剩2个珠心细胞(∧); ×550

8. 低温下的二分体,珠孔端的一个细胞已经退化(†),合点端的一个细胞体积增大,发育为功能大孢子,合点端胚囊壁增厚,合点端剩2个珠心细胞(∧); ×550

9. 低温时的异常胚囊。×550

### Explanation of plate

Plate I

Micropylar end downwards in all figures

1. Finger-like salient divergence develops at normal temperature, showing an enlarged cell under epidermis differentiating into an archesporial cell (\*) at the end of divergence; ×550

2. The inner (\*) and outer (†) integuments begin to differentiate at normal temperature; ×550

3. Megaspore mother cell differentiates at normal temperature, 3 nucellar cells (∧) in a line adjacent to chalazal end; ×550

4. Dyad differentiates at normal temperature, showing the micropylar cell (†) has degenerated and the enlarged chalazal one has differentiated into a functional megaspore, 3 nucellar cells (∧) in a line adjacent to the chalazal end; ×550

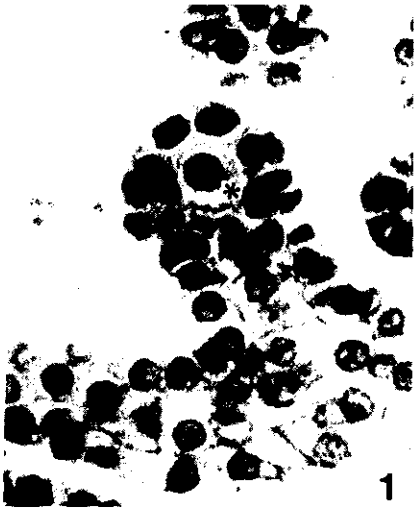
5. Bi-nucleate embryo sac differentiates at normal temperature, 3 nucellar cells (∧) in a line adjacent to the chalazal end; ×550

6. The inner and outer integuments begin to differentiate at low temperature, showing the cell (†) beneath archesporial cell has compressed; ×550

7. Megaspore mother cell differentiates at low temperature, showing that the wall of embryo sac becomes thickened, only 2 nucellar cells (∧) are seen at the chalazal end; ×550

8. The dyad differentiates at low temperature, showing the micropylar cell is degenerated (†) and the enlarged chalazal cell differentiates into a functional megaspore. Only 2 nucellar cells (∧) are seen at chalazal end; ×550

9. An abnormal embryo sac differentiates at low temperature. ×550



伍成厚等：图版 I

WU Chen-hou et al.: Plate I