

小叶兜兰的果实生长和雌配子体发育

刘岩¹, 齐霁¹, 吴记贵², 蒋万杰², 蒋健², 王丹², 张毓^{3*}, 程瑾^{1*}

(1. 北京林业大学生物学院, 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 北京 100083; 2. 松山国家级自然保护区管理处, 北京 102115; 3. 北京植物园, 北京 100093)

摘要: 为了解濒危兰科植物小叶兜兰(*Paphiopedilum barbigerum* Tang et Wang)胚珠和雌配子体的发育过程, 采用常规石蜡切片技术对其果实的生长动态进行了研究。结果表明, 授粉后 60~75 d 的蒴果内种子数量迅速增加, 到授粉后 120 d 时种子充满整个蒴果。授粉后 40 d 的胎座上分化形成多数由 1 层表皮细胞包被 1 列细胞的胚珠原基; 授粉后 60 d 时位于胎座指状结构末端处紧靠表皮细胞下方的孢原细胞分化为大孢子母细胞。之后, 大孢子母细胞经过减数分裂和有丝分裂最终形成成熟胚囊; 授粉后 135 d 胚囊发育成熟, 附着在胎座上的种子个体分化明显。小叶兜兰胚囊的发育类型为双孢子葱型, 胚珠为倒生胚珠, 薄珠心, 单珠被, 成熟胚囊为 8 核。这为小叶兜兰的生殖生物学及繁殖体系的建立提供理论依据。

关键词: 小叶兜兰; 雌配子体; 胚珠; 发育

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.002

Fruit Growth and Female Gametophyte Development in *Paphiopedilum barbigerum* Tang et Wang

LIU Yan¹, QI Ji¹, WU Ji-gui², JIANG Wan-jie², JIANG Jian², WANG Dan², ZHANG Yu^{3*}, CHENG Jin^{1*}

(1. College of Biological Science and Technology, Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Administration Office of Songshan National Nature Reserve, Beijing 102115, China; 3. Beijing Botanical Garden, Beijing 100093, China)

Abstract: In order to understand the development of ovule and female gametophyte in *Paphiopedilum barbigerum* Tang et Wang, an endangered species in Orchidaceae, the growth dynamic of its capsule was studied by conventional paraffin section method. The results showed that the number of seeds in capsule increased rapidly during 60–75 days after pollination, and its capsule would be full of seeds at 120 days after pollination. The ovule primordium, a row of cells surrounded by a layer of epidermal cell, began to differentiate at 40 days after pollination. The archesporial cell under the epidermal cells at the end of placenta finger structure differentiated into megaspore mother cell at 60 days after pollination. The megaspore mother cell eventually formed the mature embryo sac after meiosis and mitosis. It took about 135 days from pollination to maturation of embryo sac, and seeds attached to placenta had differentiated obviously. The development of embryo sac was *Allium* type. The mature ovule was anatropous with thin nucellus and single integument. The mature embryo sac had 8 nuclei. These would provide theoretical basis for studying in reproductive biology and establishment of reproductive

收稿日期: 2015-04-29

接受日期: 2015-07-13

基金项目: 北京市教育委员会科学研究与研究生培养共建项目(BLCXY201516); 国家自然科学基金项目(J1103516); 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室开放课题(2014BZ0236KF01)资助

This work was supported by the Co-construction Projects for Science and Postgraduate Education of Beijing Education Committee (Grant No. BLCXY201516), the National Natural Sciences Foundation of China (Grant No. J1103516), and the Open Funds for Beijing Key Laboratory of Flower Germplasm Innovation and Molecular Breeding (Grant No. 2014BZ0236KF01).

作者简介: 刘岩, 女, 硕士研究生, 研究方向为兰科植物的繁殖生物学。E-mail: liuyan19890801@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: bjzhang@hotmail.com, chengjin@bjfu.edu.cn

system.

Key words: *Paphiopedilum barbigerrum*; Female gametophyte; Ovule; Development

兜兰属(*Paphiopedilum*)隶属于单子叶植物中的大科——兰科(Orchidaceae), 全世界约有80余种^[1], 主要分布于亚洲的热带和亚热带地区^[2]。中国兜兰属植物资源丰富, 总种类可达27种, 主要分布于云南南部、广西西部和贵州地区^[3]。兜兰属植物的花具有兜状的唇瓣, 因其花形奇特、花色绚丽、花期较长而具有极高的观赏价值, 是国际花卉市场上十分流行的高档花卉, 备受广大花卉爱好者的钟爱^[4]。然而因兜兰为名贵花卉, 具有很高的经济价值, 过度采挖造成野生兜兰的数量急剧减少, 再加上人类活动使其生境逐渐萎缩, 兜兰属中不少种类已濒临灭绝, 《濒危野生动植物种国际贸易公约》把所有兜兰属植物列入其附录 I 的名录中。

小叶兜兰(*Paphiopedilum barbigerrum* Tang et Wang)是我国一级重点保护的珍稀濒危物种, 现已被列入世界自然保护联盟濒危物种红色名录, 等级为濒危(EN), 主要分布于广西北部 and 贵州海拔800~1500 m的石灰岩山丘的荫蔽之地或山岩岩隙中。小叶兜兰叶背面基部有紫色斑点, 花单朵, 直径一般为6~7 cm, 属于花朵较小类型, 其萼片与唇瓣花色多样, 且开花期较长, 野外花期一般为9~10月, 具有一定的观赏价值^[2]。

有性生殖是被子植物生长繁殖的决定性阶段, 也是生殖生物学研究的核心内容。被子植物有性生殖的重要特征是双受精, 而发育成熟的雄配子体(花粉)和雌配子体(成熟胚囊)是双受精发生的前提和基础^[5], 胚囊在胚珠中发育成熟, 整个胚珠在双受精后形成种子。可见, 胚珠是子房最重要的部分, 是授粉后植物生长发育的中心之一^[6], 胚珠的正常发育也是形成种胚和种子发育的先决条件^[7]。目前有关兰科植物果实生长发育的研究主要是利用石蜡切片和显微技术揭示胚珠的发育和种子的形成过程^[8-14], 这些为兰科植物繁殖体系的建立和制定保护策略提供了理论依据和实践经验。

本研究通过对小叶兜兰蒴果进行解剖学观察, 了解果实的生长动态, 探讨胚珠和雌配子体发育特征, 完善其生殖生物学发育资料, 为小叶兜兰这种濒危兰科植物的种苗组培技术体系的构建、商业化生产和资源保护提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

小叶兜兰(*Paphiopedilum barbigerrum* Tang et Wang)植株栽植于北京植物园兰花实验温室。于2012年10月盛花期进行人工同种异株授粉, 授粉后每隔15 d采集3个蒴果, 直至2013年10月。

1.2 蒴果发育观察

用解剖刀纵切蒴果, 观察小叶兜兰胚囊成熟期种子的变化; 横切蒴果观察雌配子体的发育过程, 用相机或体式显微镜(Leica DFC500)拍照。

1.3 石蜡切片制片

用牙刷清洗小叶兜兰蒴果后, 用吸水纸吸干表面水分。用小刀将其分割成小块后用多聚甲醛-戊二醛固定液真空抽气固定, 磷酸缓冲液洗去固定液后, 分别用30%、50%、70%、85%、95%和100%乙醇进行梯度脱水, 后经二甲苯透明、浸蜡和包埋后用石蜡切片机(Leica RM2016)切片, 厚度为8 μm , 番红-固绿染色后粘片、封片, 在光学显微镜(Leica DM2500)下观察并拍照。

2 结果

2.1 胚囊成熟期的种子变化

20 DAP (Days after pollination)时, 小叶兜兰果荚细长, 膨大明显(图1: A), 此时胎座已开始形成毛茸状突起。30 DAP时, 种子开始形成, 紧贴胎座, 色泽透明, 比较湿润(图1: B)。60 DAP时果荚体积迅速增大, 果荚内形成较大空隙, 种子尚未充满空隙, 种子较前期更加密集, 但个体分化尚不明显, 整体色泽依旧透明(图1: C)。种子数量在60~75 DAP时迅速增加, 密集的种子在胎座上形成种子团呈浅乳白色(图1: D)。120 DAP时种子已充满整个果荚, 肉眼可见胎座上种子突起, 种子团整体已呈现乳白色且干燥(图1: E)。135 DAP时种子个体分化明显(图1: F), 显微镜下可见种皮网状纹饰。

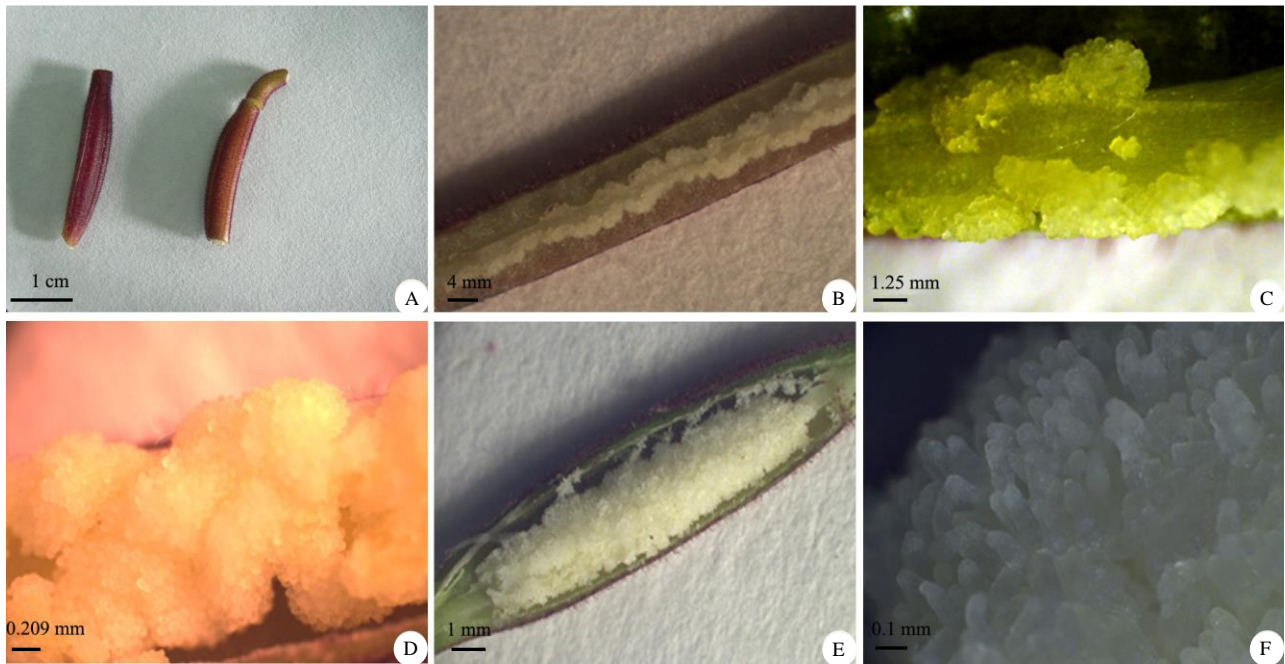


图 1 小叶兜兰蒴果的不同发育时期。A: 20 DAP; B: 30 DAP; C: 60 DAP; D: 75 DAP; E: 120 DAP; F: 135 DAP。

Fig. 1 Capsules of *Paphiopedilum barbigerum* at different development stages. A: 20 DAP; B: 30 DAP; C: 60 DAP; D: 75 DAP; E: 120 DAP; F: 135 DAP.

2.2 雌配子体的发育

小叶兜兰子房由3心皮组成,为侧膜胎座(图2: A)。授粉前胎座已基本发育完全,20 DAP时胎座上形成许多不规则指状突起(图2: B)。授粉后胎座细胞进行快速的分裂和分化,指状突起逐渐增多,形成较多的分支结构。随授粉时间推移,分支结构不断增多并伸长,各个小分支的末端是一层表皮细胞包围着1~4个细胞。40 DAP时胎座逐渐分化出胚珠原基(图2: C),40~50 DAP时胎座指状结构末端处紧靠表皮细胞下方的细胞体积开始增大,分化为孢原细胞(图2: D)。

60 DAP时孢原细胞不经分裂直接发育分化为大孢子母细胞(图2: E),细胞体积迅速增大,细胞质变浓厚,具明显的细胞核,但无明显液泡,明显区别于周围其他细胞。位于大孢子母细胞外面的单层表皮细胞不断分裂与分化,发育为珠心细胞。胚珠具单珠被,由两层细胞组成。伴随着大孢子母细胞体积增大,珠被细胞开始发育,孢原细胞下部1~3个细胞周围的表皮细胞形成突起,指状末端开始向一侧不断分裂与分化,包住珠心,在顶端留有珠孔,形成倒生胚珠(图2: E)。大孢子母细胞减数分裂的过程中,珠心细胞逐渐解体形成胚囊壁,但合点端的珠心细胞不解体,最终形成胚囊营养来源的通道。

大孢子母细胞与珠心顶端间无皮下层细胞层,因此小叶兜兰胚珠属于薄珠心型(图2: F)。

75 DAP时珠心基本已被珠被包被,其内的大孢子母细胞进入分裂前期。大孢子母细胞减数分裂的第一次分裂是有极性的。进入分裂前期后,大孢子母细胞偏于珠孔一端(图2: G),第一次分裂后形成两个大小不均等的二分体细胞(图2: H)。靠近珠孔端的细胞体积较小,以后逐渐退化消失。靠近合点端的细胞体积较大,液泡化程度高(图2: I~J)。

105 DAP时合点端细胞体积继续增大,随即进入减数分裂的第二次分裂。分裂后形成两个单倍体的大孢子核(图2: K),分别移向胚囊两极,核之间无细胞壁,仅以一个大液泡相隔,形成二核胚囊(图2: L)。

减数分裂完成后,二核胚囊内的两个大孢子核位于胚囊的两端。约120 DAP时这两个大孢子核同时进行第一次有丝分裂,形成四核胚囊(图2: M)。135 DAP时四核胚囊中的核再进行一次有丝分裂,形成八核胚囊。其中靠近珠孔端的三核分别形成1个卵细胞和2个助细胞,构成卵器;合点端三核形成反足细胞;珠孔端与合点端各有一核移向胚囊的中央形成极核,构成中央细胞(图2: N~O)。因此,小叶兜兰的胚囊发育类型为双孢子型。

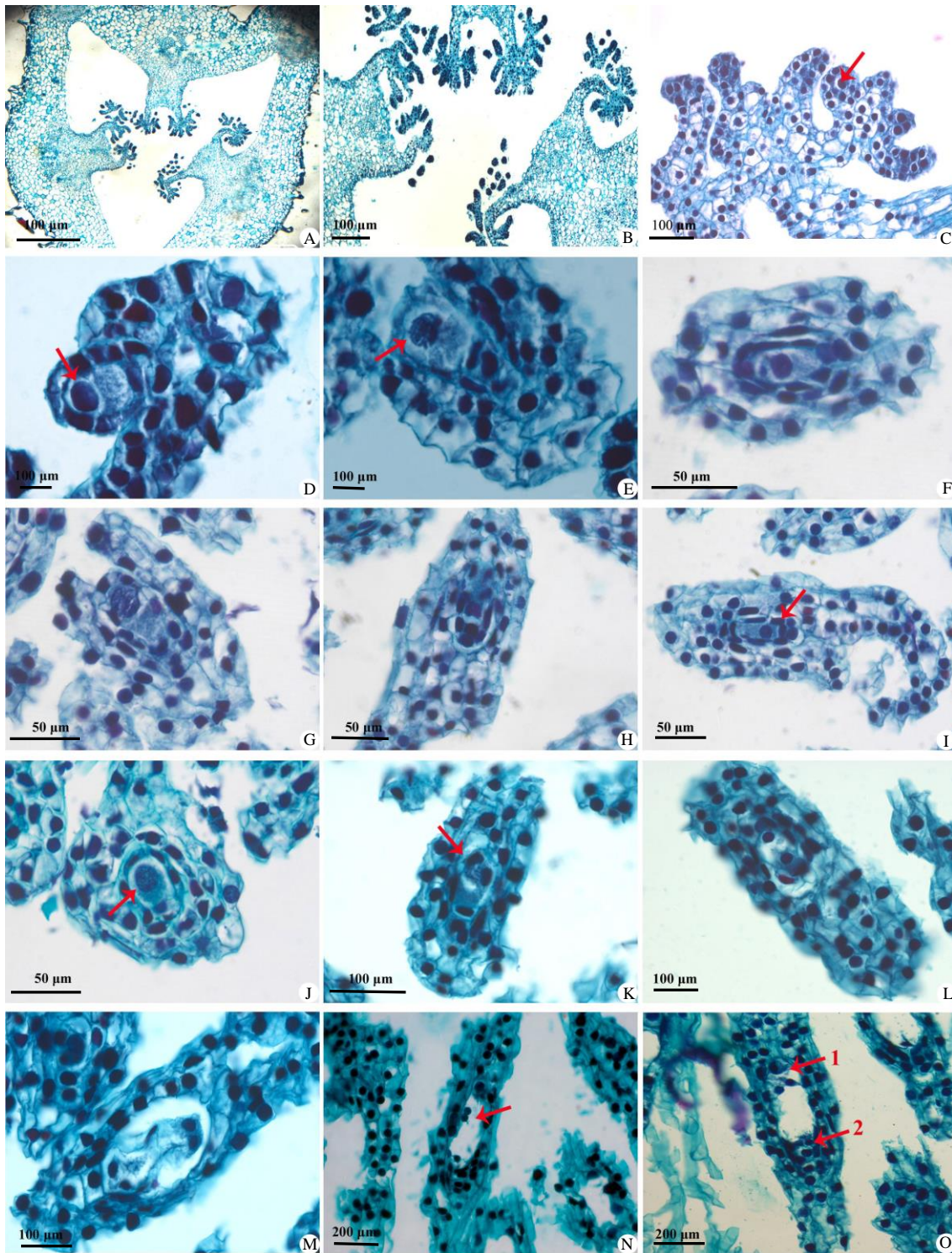


图2 小叶兜兰的雌配子体发育。A: 20 DAP, 示侧膜胎座; B: 20 DAP, 示指状突起; C: 40 DAP, 箭头示胚珠原基; D: 50 DAP, 箭头示孢原细胞; E: 60 DAP, 倒生胚珠, 箭头示大孢子母细胞; F: 75 DAP, 薄珠心型胚珠; G: 75 DAP, 大孢子母细胞减数分裂前期; H: 75 DAP, 二分体; I: 75 DAP, 箭头示二分体珠孔端退化的细胞; J: 105 DAP, 箭头示大孢子母细胞减数分裂的第二次分裂前期; K: 120 DAP, 箭头示大孢子母细胞减数分裂的第二次分裂中期; L: 120 DAP, 示2核胚囊; M: 120 DAP, 示4核胚囊; N: 135 DAP, 箭头示中央细胞; O: 135 DAP, 示卵器(1)和反足细胞(2)。

Fig. 2 Female gametophyte development of *Paphiopedilum barbigerum*. A: 20 DAP, showing parietal placentation; B: 20 DAP, showing placental protuberances; C: 40 DAP, ovule primordium (arrow); D: 50 DAP, archesporial cell (arrow); E: 60 DAP, anatropous ovule, megaspore mother cell (arrow); F: 75 DAP, ovule with thin nucellus; G: 75 DAP, prophase of meiosis of megaspore mother cell; H: 75 DAP, dyad; I: 75 DAP, degenerated micropylar cell (arrow); J: 105 DAP, prophase of meiosis II of megaspore mother cell (arrow); K: 120 DAP, metaphase of meiosis II of megaspore mother cell (arrow); L: 120 DAP, showing two-nucleate embryo sac; M: 120 DAP, showing four-nucleate embryo sac; N: 135 DAP, central cell (arrow); O: 135 DAP, showing egg apparatus (1) and antipodal cell (2).

3 讨论

兰科植物具由3心皮合生的下位子房,胚珠着生于侧膜胎座^[15]。授粉后子房膨大,继而发育形成蒴果,其内一般包含约400万颗体型细小的种子^[16]。由于兰科植物种子在蒴果开裂时胚未发生分化,仅是一团分生组织细胞^[17],不能直接利用自然基质的营养,因此其种子的萌发需依赖共生真菌^[18]。兜兰属植物与其他大多数兰花一样,细小的种子因无胚乳,无法储存养分,在自然条件下很难萌发,只有种子被真菌侵染后方可共生萌发,但萌发率极低。因此,组织培养技术成为解决其繁殖困难和种苗不足的途径之一。兜兰种子数量较多,利用种子无菌播种就成为其最合理的规模化人工繁殖途径,可在科研和商业生产中广泛应用。兜兰属种子发育过程及活力的研究为建立种子无菌萌发体系提供重要参考,有研究表明,采集小叶兜兰授粉后255 d的果荚能获得较为稳定和高产的萌发体系^[19]。

兰科植物的胚囊类型具有多样性。天麻(*Gastrodia elata*)胚囊为双孢子蓼型胚囊,在四核阶段2个合点端的核不再进行分裂而是退化,形成四核胚囊,这是蓼型胚囊的简化形式^[8]。鹤顶兰(*Phaius tankervilleae*)^[9]和无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana*)^[10]为单孢子蓼型胚囊,其功能大孢子经过3次有丝分裂形成由珠孔端卵器、合点端3个反足细胞和2个中央极核组成七细胞八核的典型胚囊。五唇兰(*Doritis pulcherrima*)^[11]、墨兰(*Cymbidium sinensis*)^[12]与蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)^[13]胚囊发育均为双孢子葱型,其合点端的功能大孢子进行连续两次有丝分裂形成八核胚囊,结构与蓼型相似。在兜兰的胚胎学研究中曾观察到一些特殊现象,四核胚囊时期珠孔端二核进行有丝分裂产生四核,合点端二核在有丝分裂中期染色体逐渐靠近,最后聚集在一起形成一个大的纺锤体,此二核分裂产生的不是四个单倍体核,而是两个二倍体核,因而形成六核胚囊:珠孔端4个单倍体核中有3个组成卵器,另1个移向胚囊中央与合点端的二倍体核组成中央细胞,合点端仅有1个二倍体核形成反足细胞^[14]。火烧兰(*Epipactis pubescens*)也属于六核胚囊,但其发育方式与兜兰不同,为单孢子蓼型^[5]。在小叶兜兰的发育过程中,胚囊由二分体中合点端的功能大孢子发育而来,大孢子母细胞经过连续两次有丝分裂形成八核胚囊,最终形成由珠孔端卵器、合点端3个反足细胞和中央细胞的7细胞八核胚囊。在小叶兜兰的胚珠切片中

我们未观察到六核胚囊。

在兰科植物的生殖过程中,授粉除了能够实现受精外,另一重要作用是促进子房的膨大与胚珠的成熟^[20]。大多数的开花植物在开花期间子房已发育成熟,自授粉到受精前形成完整胚珠以备受精^[21]。相比之下,某些开花植物的子房在开花期间并未发育成熟,而是由授粉触发其发育。兰科植物是授粉触发子房与胚珠发育的典型材料,在开花前子房未成熟且缺乏胚珠^[18]。授粉行为能迅速引发胚珠分化、生长和发育,直至胚囊发育成熟。不同兰科植物授粉后,自启动胚珠发育到最终胚囊发育成熟所需时间各不相同,因物种的差异约为7~130 d^[22]。墨兰从授粉到受精需100 d,70 DAP左右胚珠开始发育^[12]。五唇兰从授粉到受精的时间约为45 d,期间胚囊发育成熟^[11]。与大多数兰科植物相似,小叶兜兰的胚珠发育发生在授粉之后,20 DAP时胎座上才可见很多指状突起,60~75 DAP后种子数量呈指数增加,120 DAP时蒴果内部已被种子充满,135 DAP时胚囊成熟,肉眼可见蒴果内种子个体分明。推测小叶兜兰花粉落在柱头以及花粉管在子房的生长过程中可能产生某些物质启动了胚珠发育。前期研究表明,一定浓度的生长素可代替花粉诱导兰科植物授粉后的综合征^[23]。很多情况下生长素的作用都是通过刺激乙烯的产生而间接完成的^[24],如在蝴蝶兰的胚珠和子房的发育过程中,授粉刺激了乙烯的合成,促进了胚珠与子房的发育^[25]。另外,兰科植物的花粉本身就含有高水平的吲哚乙酸^[7],小叶兜兰授粉后,具体是何种激素触发了子房与胚珠的发育以及其触发作用机理还有待研究。

兰科植物多是异花授粉植物,野外一般都是依靠特化的昆虫为其传粉,因其专性传粉系统和独特的欺骗性传粉机制导致兰花的自然结实率较低^[26],因此为提高结实率和获得足够的果实,可对植株进行人工授粉,以提高其结实率。研究表明,若在授粉后用2,4-D处理某些兰科植物,如石斛(*Dendrobium nobile*)的茎秆或果柄,果实会明显增大,种子数量增多,且成熟期提前,座果率提高^[27]。因此,在了解雌配子体及胚珠发育过程的基础上,选择雌配子体发育的不同时间坐标,利用不同激素处理小叶兜兰,检测果实生长状况,可以指导小叶兜兰生产中的人工授粉,对此值得开展进一步深入研究。

参考文献

- [1] LIU Z J, ZHANG J Y, RU Z Z, et al. Conservation biology of

- Paphiopedilum purpuratum* (Orchidaceae) [J]. Biodiv Sci, 2004, 12(5): 509–516. doi: 10.3321/j.issn:1005-0094.2004.05.006.
- 刘仲健, 张建勇, 茹正忠, 等. 兰科紫纹兜兰的保育生物学研究 [J]. 生物多样性, 2004, 12(5): 509–516. doi: 10.3321/j.issn:1005-0094.2004.05.006.
- [2] WANG Z, CONG L, LIU Y. A review of *Paphiopedilum* research [J]. Sci Silv Sin, 2006, 42(7): 113–119. doi: 10.3321/j.issn:1001-7488.2006.07.020.
- 王贞, 丛磊, 刘燕. 兜兰属植物研究现状 [J]. 林业科学, 2006, 42(7): 113–119. doi: 10.3321/j.issn:1001-7488.2006.07.020.
- [3] LIU Z J, CHEN X Q, CHEN L J, et al. The Genus *Paphiopedilum* in China [M]. Beijing: Science Press, 2009: 9–10.
- 刘仲健, 陈心启, 陈利君, 等. 中国兜兰属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 9–10.
- [4] ZENG S J, XIA N H, CHEN Z L, et al. Evaluation of ornamental value of *Paphiopedilum* distributed in China and analysis of utilization prospect in South-China [J]. Chin Wildl Plant Resour, 2011, 30(2): 9–13. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2011.02.003.
- 曾宋君, 夏念和, 陈之林, 等. 国产兜兰属植物观赏价值评价及其在华南地区的应用前景分析 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(2): 9–13. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2011.02.003.
- [5] HU S Y. Reproductive Biology of Angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 1–108.
- 胡适宜. 被子植物生殖生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 1–108.
- [6] CHEN X Q, SUN N, LIU Y Q, et al. Progress on molecular biology of orchid floral development [J]. J Tianjin Agri Coll, 2011, 18(1): 27–31. doi: 10.3969/j.issn.1008-5394.2011.01.008.
- 陈小强, 孙宁, 刘玉芹, 等. 兰花花发育的分子生物学研究 [J]. 天津农学院报, 2011, 18(1): 27–31. doi: 10.3969/j.issn.1008-5394.2011.01.008.
- [7] ARDITTI J, JEFFREY D C, FLICK B H. Post-pollination phenomenon in orchid flowers [J]. New Phytol, 1971, 70(6): 1125–1141. doi: 10.1111/j.1469-8137.1971.tb04595.x.
- [8] LIANG H X. Embryological studies of *Gastrodia elata* Blume [J]. Acta Bot Sin, 1984, 26(5): 466–472.
- 梁汉兴. 天麻胚胎学研究 [J]. 植物学报, 1984, 26(5): 466–472.
- [9] LI D M, WU C H, YE X L, et al. Ultrastructural observation on embryo sac development in *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. [J]. Plant Sci J, 2012, 30(2): 188–192. doi: 10.3724/SP.J.1142.2012.20188.
- 李冬妹, 伍成厚, 叶秀麟, 等. 鹤顶兰胚囊发育的超微结构观察 [J]. 植物科学学报, 2012, 30(2): 188–192. doi: 10.3724/SP.J.1142.2012.20188.
- [10] Lian J J, Qian X, Wang C X, et al. Ovule development and seed formation of *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin, 2013, 33(3): 494–500. doi: 10.3969/j.issn.1000-4025.2013.03.010.
- 连静静, 钱鑫, 王彩霞, 等. 无距虾脊兰胚珠发育及种子形成研究 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(3): 494–500. doi: 10.3969/j.issn.1000-4025.2013.03.010.
- [11] TANG Y J, YE X L, CHEN Z L. The studies of the female gametophyte development and the embryogenesis in *Doritis pulcherrima* Lindl. [J]. J Trop Subtrop Bot, 1998, 6(4): 289–292.
- 唐源江, 叶秀麟, 陈泽谦. 五唇兰雌配子体发育和胚胎发生的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(4): 289–292.
- [12] YE X L, GUO J Y. Female gametophyte development and embryogeny in *Cymbidium sinense* (Andr.) Willd. [J]. J Trop Subtrop Bot, 1995, 3(1): 54–58.
- 叶秀麟, 郭俊彦. 墨兰雌配子体和胚胎发生 [J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(1): 54–58.
- [13] WU C H, LIANG C Y, YE X L. The effects of low temperature on ovule development of *Phalaenopsis* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2004, 12(2): 129–132. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2004.02.005.
- 伍成厚, 梁成邨, 叶秀麟. 低温对蝴蝶兰胚珠发育的影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(2): 129–132. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2004.02.005.
- [14] REN L, WANG F X. Embryological studies of *Paphiopedilum godefroyae* Stein [J]. Acta Bot Sin, 1987, 29(1): 14–22.
- 任玲, 王伏雄. 兜兰胚胎学的研究 [J]. 植物学报, 1987, 29(1): 14–22.
- [15] MAYER J L S, CARMELLO-GUERREIRO S M, APPEZZATO-DA-GLORIA B, et al. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae) [J]. Flora, 2011, 206(6): 601–609. doi: 10.1016/j.flora.2011.01.009.
- [16] ARDITTI J, GHANI A K A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications [J]. New Phytol, 2000, 145(3): 367–421. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x.
- [17] YEUNG E C, ZEE S Y, YE X L. Embryology of *Cymbidium sinense*: Embryo development [J]. Ann Bot, 1996, 78(1): 105–110. doi: 10.1006/anbo.1996.0101.
- [18] WITHNER C L, NELSON P K, WEJKSNORA P J. The anatomy of orchids [M]// WITHNER C L. The Orchids: Scientific Studies. New York: John Wiley and Sons, 1974: 267–347.
- [19] YOU J Y, ZHANG Y, LIU Y, et al. Seed development and asymbiotic germination of *Paphiopedilum barbigerum* Tang et Wang [J]. Plant Physiol J, 2014, 50(3): 275–282.
- 尤佳妍, 张毓, 刘岩, 等. 小叶兜兰的种子发育和无菌萌发 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(3): 275–282.

- [20] ARDITTI J. Fundamentals of Orchid Biology [M]. New York: John Wiley and Sons, 1992: 351–362.
- [21] BOUMAN F. The ovule [M]// JOHRI B M. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer Verlag, 1984: 123–157.
- [22] 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 Torrey Bot Club, 1942, 69(3): 167–183. doi: 10.2307/2481654.
- [23] STRAUSS M S, ARDITTI J. Postpollination phenomena in orchid flowers: X. Transport and fate of auxin [J]. Bot Gaz, 1982, 143(3): 286–293.
- [24] HALL I V, FORSYTH F R. Production of ethylene by flowers following pollination and treatments with water and auxin [J]. Can J Bot, 1967, 45(7): 1163–1166. doi: 10.1139/b67-121.
- [25] ZHANG X S, O'NEILL S D. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination [J]. Plant Cell, 1993, 5(4): 403–418. doi: 10.1105/tpc.5.4.403.
- [26] REN Z X, WANG H, LUO Y B. Deceptive pollination of orchids [J]. Biodiv Sci, 2012, 20(3): 270–279. doi: 10.3724/SPJ.1003.2012.10046.
任宗昕, 王红, 罗毅波. 兰科植物欺骗性传粉 [J]. 生物多样性, 2012, 20(3): 270–279. doi: 10.3724/SPJ.1003.2012.10046.
- [27] ZHANG Y L, RAO Y Q, GUO L R. A preliminary study on the impact of artificial pollination of wild fruit setting rate of *Dendrobium* [J]. Biol Teach, 2008, 33(7): 39–40. doi: 10.3969/j.issn.1004-7549.2008.07.030.
张应利, 饶瑶琼, 郭丽荣. 人工授粉对野生石斛兰坐果率的影响的初步研究 [J]. 生物学教学, 2008, 33(7): 39–40. doi: 10.3969/j.issn.1004-7549.2008.07.030.