



### 多花地宝兰胚囊和胚发育的细胞学研究

裴艳艳, 黄昭戟, 李刚, 叶明琴, 周琼, 宁弋珍

引用本文:

裴艳艳, 黄昭戟, 李刚, 等. 多花地宝兰胚囊和胚发育的细胞学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(3): 248–254.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4137>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 中越带唇兰, 中国带唇兰属(兰科)一新记录种

*Tainia acuminata*, A Newly Recorded Species of Orchidaceae from China

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 245–247 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4168>

#### 尧山国家级自然保护区种子植物区系研究

Floristic Studies of Seed Plants in Yaoshan National Nature Reserve

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 217–226 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4097>

#### 瘤菌根菌对铁皮石斛根系形态的影响及其共生关系的研究

Effect of *Epulorhiza* sp. on Root Morphology of *Dendrobium officinale* and Their Symbiotic Relationship

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 124–130 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4093>

#### 植物营养体胎生研究进展

Research Progress of Vegetative Vivipary in Plants

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 209–216 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4124>

#### 毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

# 多花地宝兰胚囊和胚发育的细胞学研究

裴艳艳, 黄昭戟, 李刚, 叶明琴\*, 周琼\*, 宁弋珍

(广西大学农学院, 广西药用植物园广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530001)

**摘要:** 为探讨多花地宝兰(*Geodorum recurvum*)胚胎发育的系统分类学意义, 采用石蜡制片法对多花地宝兰胚囊和胚的发育进行解剖学观察。结果表明, 在开花前, 多花地宝兰胚珠原基发育缓慢, 开花授粉后胚珠原基快速发育成“树状二杈分枝结构”, 随后在“分枝结构”末端形成孢原细胞, 开始胚囊发育。多花地宝兰的胚囊发育属于单孢蓼型胚囊, 胚珠具有双层珠被。孢原细胞形成后, 经过细胞膨大延长发育形成胚囊母细胞, 胚囊母细胞经过减数分裂形成线性四分体, 在珠孔端形成 1 个功能大孢子, 功能大孢子经过 3 次有丝分裂形成 8 核胚囊。多花地宝兰的胚发育具有藜型和紫菀型两种方式。双受精完成后, 多花地宝兰合子进行一次横裂后形成基细胞和顶细胞; 基细胞经过多次分裂形成细胞团, 细胞团中的细胞向不同方向膨大延长形成多个胚柄细胞; 顶细胞有两种分裂方式, 一种是横裂形成藜型胚, 一种是纵裂形成紫菀型胚。因此, 推测多花地宝兰在兰科植物系统分类学上属于较为原始种。

**关键词:** 多花地宝兰; 大孢子; 胚囊; 胚

doi: 10.11926/jtsb.4137

## Cytology Studies on Embryo Sac and Embryo Development of *Geodorum recurvum*

PEI Yan-yan, HUANG Zhao-ji, LI Gang, YE Ming-qin\*, ZHOU Qiong\*, NING Yi-zhen

(Agricultural College, Guangxi University, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Nanning 530001, China)

**Abstract:** In order to understand the systematical significance of *Geodorum recurvum* in Orchidaceae, the development of both embryo sac and embryo were observed by using paraffin section method. The results showed that ovule primordium of *G. recurvum* developed slowly before blooming, and then developed quickly into “tree-like two-branch branching structure” after pollination, archesporial cells differentiated at the top of branches, and the embryo sac began to develop. The development of embryo sac belonged to polygonum type, ovule had two layers of integument cell. Archesporial cell developed into embryo sac mother cell by expansion and enlongation. The embryo sac mother cell formed linear tetrad by meiosis, and one functional megaspore at micropylar. Functional megaspore divided into 8-nucleu embryo sac by three times division successively. The development of embryo had chenopodium type and asterad type. After double fertilization, the zygote divided into a basal cell and an apical cell by a transverse division. The basal cell formed cell group by division many times, and the cells formed suspensor cells situated through expansion and enlongation along different directions. The apical cell had two division type, one formed quinoa type embryo by transverse division, another did asters type embryo by longitudinal division. Therefore, it was suggested that the evolution of *G. recurvum* belonged to primitive in Orchidaceae.

收稿日期: 2019-08-19 接受日期: 2019-11-04

基金项目: 南宁市科技基地专项(20192082)资助

This work was supported by the Specific Project for Science and Technology Bases in Nanning (Grant No. 20192082).

作者简介: 裴艳艳(1992~), 硕士研究生, 植物发育生物学。E-mail: 1270224108@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: qiong9875@126.cn; E-mail: 780064502@qq.com.

**Key words:** *Geodorum recurvum*; Megaspore; Embryo sac; Embryo

广西是世界上兰科(Orchidaceae)植物九大分布中心之一, 其中地宝兰属(*Geodorum*)的地宝兰(*G. densiflorum*)、多花地宝兰(*G. recurvum*)和贵州地宝兰(*G. eulophioides*)分布于广西雅长兰科植物自然保护区内<sup>[1]</sup>。1999年, 多花地宝兰被列入《国家重点保护野生植物名录》, 是国家二级重点野生保护植物, 具有观赏与药用价值<sup>[2-3]</sup>。由于人为活动破坏及生境斑块化的影响, 多花地宝兰在保护区内的分布仅局限在海拔500 m, 100 m×100 m的坡地内, 生境为疏林下、灌木丛中、草坡等透光处, 同时, 由于资源开发、气候异常等原因, 地宝兰属植物面临灭绝危险, 亟待保护<sup>[4]</sup>。虽然对兰科植物胚胎学发育的研究已有报道, 但对多花地宝兰的研究多集中在离体快繁技术上, 而对胚胎学研究未见报道<sup>[5-8]</sup>。2016年作者在广西大学校园多处绿化带中发现了多花地宝兰, 开始观察其生长发育习性, 并对其大孢子发生、雌配子发育和胚发育进行解剖学观察, 以期地为地宝兰属的种质资源保护和开发利用提供理论依据。

## 1 材料和方法

材料采自广西大学校园绿化带草地上野生的多花地宝兰(*Geodorum recurvum*), 4月中旬采集花序上不同发育时期的花蕾, 每隔7 d采集1次, 至花序上花朵开放。花开后, 每隔5 d采集1次果实, 共采集6次; 此后每隔10 d采集1次果实, 至果实成熟, 共采集3次。材料放入FAA固定液中固定24 h。然后依次浸泡于梯度酒精中进行真空抽气脱水, 再依次浸泡在不同比例的酒精和TO透明剂混合液中使材料透明。加入石蜡在恒温烘箱中透蜡10 d, 用石蜡包埋, 在石蜡切片机上连续切片, 切片厚度为8~15 μm。切片完成后, 依次经过梯度酒精复水, 再用铁矾-苏木精煤法染色, 然后加拿大树胶封存, 制成永久切片, 在Leica DMLB型光学显微镜下观察并拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 大孢子发生

花序抽出后, 随着子房膨大, 腹缝线处的胎座细胞加速分裂形成原始胚珠原基凸起(图1:A)。胚珠

原基顶端两侧细胞快速分裂, 先形成平端凸起, 然后再逐渐形成“二杈指状结构”的胚珠原基(图1:B)。授粉前胚珠原基发育缓慢, 至开花时仅有少量“树状分枝”形成(图1:C), 开花授粉后5 d内可观察到胚珠原基快速发育形成大量的“树状二杈分枝结构”(图1:D), 随着胚珠原基的发育, 在每个“分枝结构”末端表皮细胞内有3~7个细胞分化形成一列整齐排列的珠心细胞。随后, 末端的珠心细胞分化形成细胞核大而明显的孢原细胞(图1:E), 与孢原细胞相连的两个珠心细胞随着胚囊发育逐渐发育(图1:E~I)。孢原细胞不分裂, 直接经过体积膨大形成造孢细胞(图1:F), 细胞核大而明显, 造孢细胞经过细胞延长形成胚囊母细胞(图1:G)。胚囊母细胞经过减数分裂形成四分体, 四分体靠近珠孔端大孢子形成功能大孢子(图1:H), 而合点端的3个大孢子退化。在大孢子发育过程中, 珠被也同时发育, 首先在造孢细胞时期, 内珠被开始发育, 随着孢子的发育, 外珠被逐渐形成, 在四分体时期内珠被完全包裹住珠心组织, 外珠被则显著短于内珠被(图1:F~H)。

### 2.2 雌配子体发生

功能大孢子经过一次横列形成二核胚囊, 二核胚囊的液泡膨大使一个核移向珠孔端, 另一个核移向合点端(图1:I)。之后, 二核胚囊两端的核子分别进一步分裂形成四核胚囊(图1:J), 四核胚囊的核再进一步分裂形成八核胚囊(图1:K~L)。八核胚囊合点端和珠孔端分别各有1个核移向中央, 形成极核, 靠近合点端的3个细胞形成反足细胞, 靠近珠孔端的3个细胞发育形成1个卵细胞和2个助细胞, 胚囊发育成熟(图1:K~L)。因此, 多花地宝兰胚囊发育类型属于单孢子蓼型胚囊。

### 2.3 胚的发育

在胚囊发育成熟时, 精核已经进入到胚囊, 与卵细胞融合形成受精卵(图2:A), 而与极核融合形成初生胚乳核(图2:B)。多花地宝兰授精完成后, 受精卵珠孔点端形成大液泡, 将受精卵核推向合点端(图2:C)。合子经过一次横裂形成二细胞原胚, 靠近合点端的细胞为顶细胞, 靠近珠孔端的细胞为基细胞(图2:D)。基细胞经过多次不定向分裂形成细胞

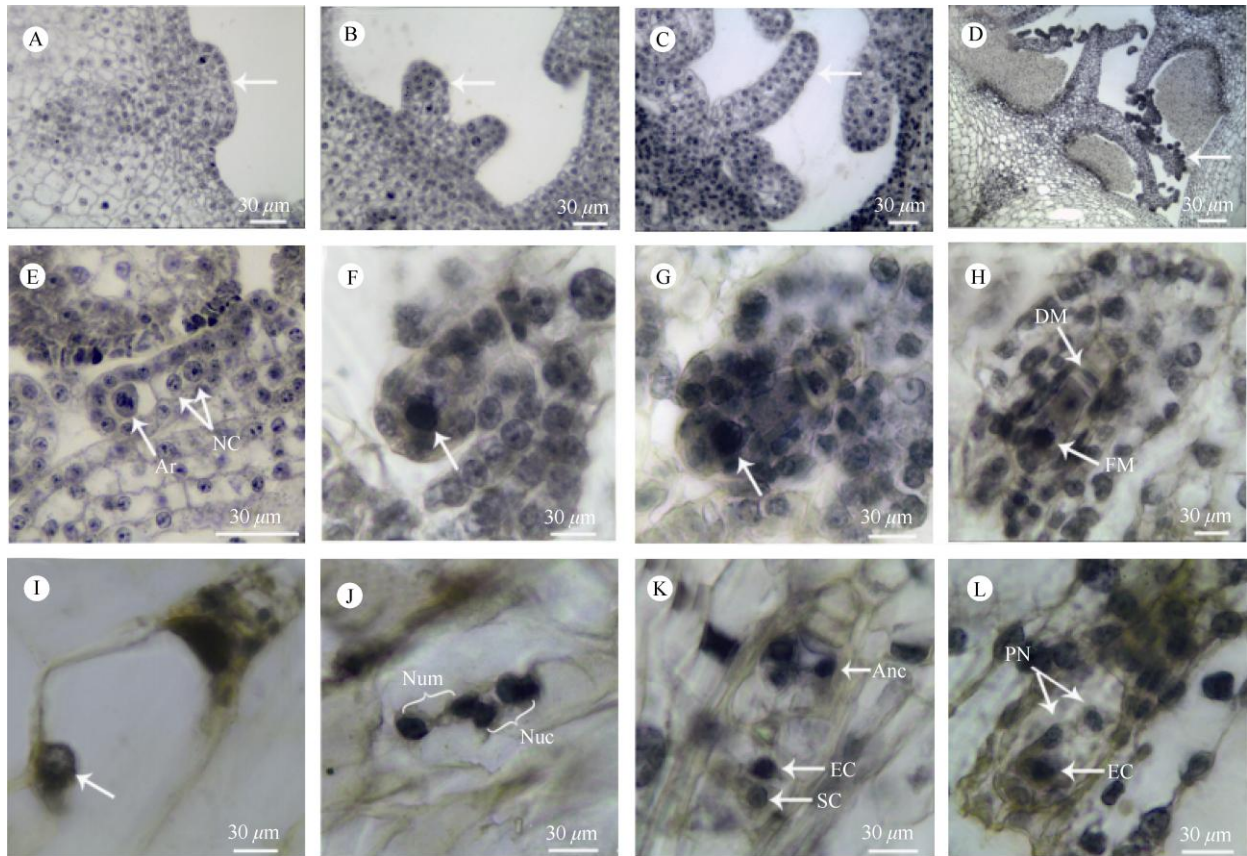


图 1 胚珠与胚囊发育过程。Ar: 孢原细胞; NC: 珠心细胞; DM: 退化大孢子; FM: 功能大孢子; Nuc: 合点端雌配子核; Num: 珠孔端雌配子核; Anc: 反足细胞; EC: 卵细胞; SC: 助细胞; PN: 极核。A: 腹缝线处胎座细胞凸起形成原始胚珠原基(箭头); B: “二权状”胚珠原基(箭头); C: 开花时胚珠原基(箭头); D: 授精 5 d 胚珠原基形成“树状二权分枝结构”(箭头); E: 孢原细胞期; F: 造孢细胞(箭头); G: 胚囊母细胞(箭头); H: 四分体时期珠孔端形成功能大孢子; I: 二核胚囊, 示珠孔端雌配子核(箭头); J: 四核胚囊; K: 八核胚囊期, 3 个反足细胞和 1 个卵细胞、1 个助细胞(连续切片); L: 八核胚囊期, 2 个极核(连续切片)。

Fig. 1 Development of ovule and embryo sac. Ar: Archegonial cell; NC: Nucellar cell; DM: Degenerated megaspore; FM: Functional megaspore; Nuc: Nucleus toward chalaza; Num: Nucleus toward micropyle; Anc: Antipodal cell; EC: Egg cell; SC: Synergid cell; PN: Polar nucleus. A: Initial ovule primordium (arrow); B: Binary ovule primordium (arrow); C: A few branching of ovule primordium in bloom (arrow); D: Branching system 5d after pollination (arrow); E: Archegonial cell; F: Sporogenous cell (arrow); G: Megaspore mother cell (arrow); H: Megaspore in micropylar end develop into functional megaspore; I: Two-nucleate embryo sac, arrow show the nucleus toward micropyle; J: Four-nucleate embryo sac; K: Eight-nucleate embryo sac, 3 antipodal cells, 1 egg cell and 1 synergid cell (serial section); L: Eight-nucleate embryo sac, 2 polar nuclei (serial section).

团, 随后靠近合点端的细胞团细胞向不同方向延长膨大形成多个胚柄细胞, 同时胚柄细胞积累填充物(图 2: E~N)。顶细胞有 2 种分裂方式, 一是顶细胞经过多次横裂先形成 2 个等大的二细胞原球胚(图 2: E), 再形成 5~6 个细胞呈线形排列的原球胚, 然后线形排列原胚细胞合点端的第 2 个细胞体积增大, 核染色加深(图 2: F), 膨大的细胞先进行纵裂, 形成“棒形”原球胚(图 2: G), 此后, 原球胚细胞继续向不同方向分裂增大体积形成球胚(图 2: H~I), 这是藜型胚发育过程; 顶细胞首先与一个来自基细胞

的原胚细胞形成不等体积的二细胞原球胚(图 2: J), 然后顶细胞进行一次纵裂形成“T”形原球胚(图 2: K), 同时原胚细胞经过 2~3 次横裂使“T”形原球胚伸长(图 2: L), 此后这些胚细胞向不同方向分裂形成球形胚(图 2: M~N), 这是紫苑型胚发育过程。在种子成熟期, 两种不同胚发育方式最终形成两种不同的球胚形态(图 2: I, N)。开花后约 30 d, 胚发育停止, 但是种子发育成熟约在开花后 45 d, 种子成熟时胚为球形胚。在胚的发育过程中没有观察到胚乳核的发育。



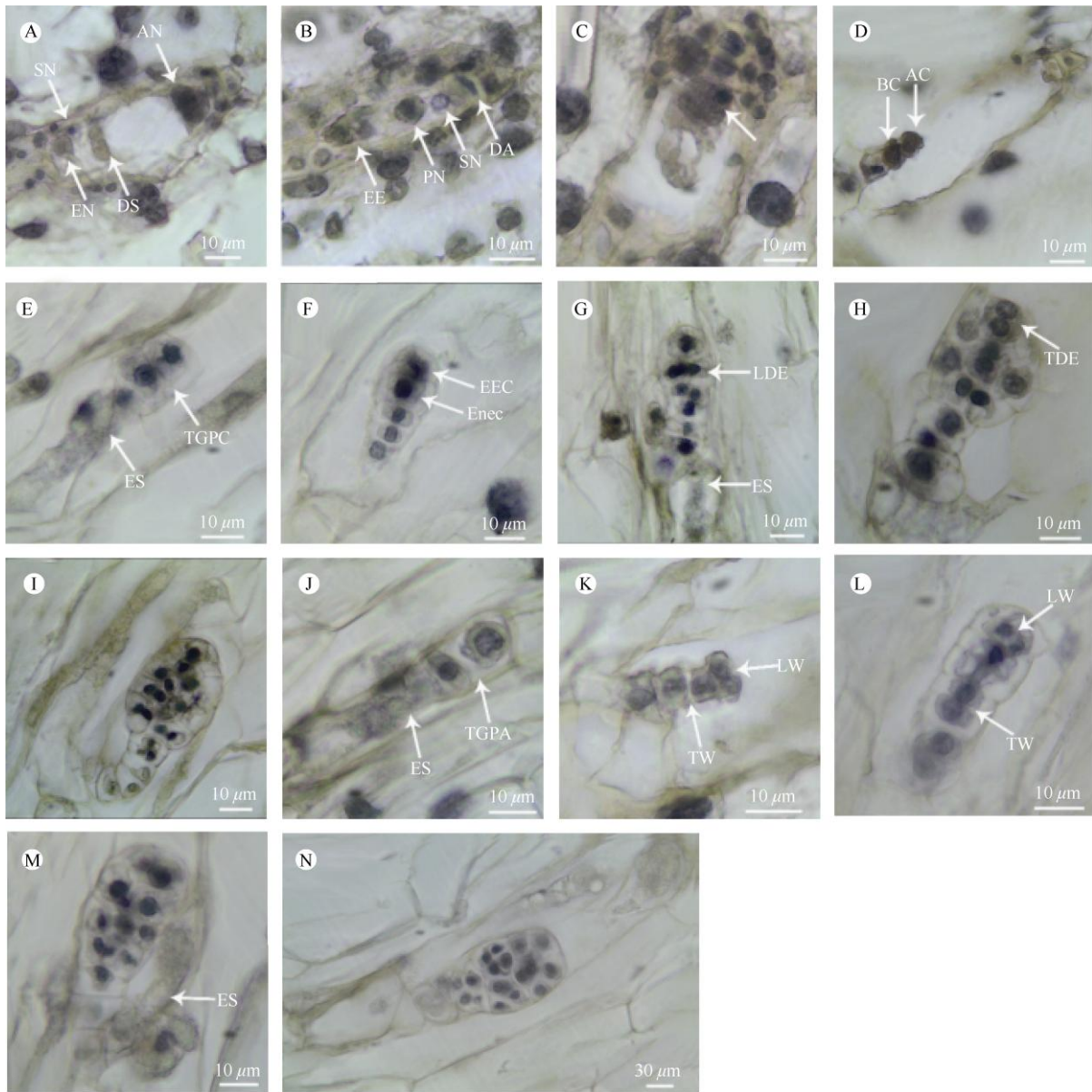


图 2 两种类型胚发育过程。AN: 反足核; DS: 退化助细胞; EN: 卵核; SN: 精核; DA: 退化反足细胞; EE: 卵器; PN: 极核; AC: 顶细胞; BC: 基细胞; ES: 延长胚柄细胞; TGPC: 藜型二细胞原球胚; EEC: 顶端胚细胞; Enec: 膨大胚细胞; LDE: 膨大胚细胞纵向分裂; TDE: 顶端细胞横向分裂; TGPA: 紫苑型二细胞原球胚; TW: 横向壁; LW: 纵向壁。A: 精细胞与卵核融合; B: 精核与极核融合; C: 受精卵(箭头); D: 二细胞原胚; E: 藜型二细胞原球胚, 两个胚细胞等大; F: 多细胞线性原球胚; G: “棒形”原球胚; H: 藜型胚发育中早期球形胚; I: 藜型胚发育中种子成熟期的球形胚; J: 紫苑型二细胞原球胚, 两个胚细胞不等大; K: “T”形原球胚; L: 进一步发育的“T”形原球胚; M: 紫苑型胚发育中早期球形胚; N: 紫苑型胚发育中种子成熟期球形胚。(E~I: 藜型胚发育; J~N: 紫苑型胚发育)

Fig. 2 Development of embryo in two types. AN: Antipodal nucleus; DS: Degenerated synergid; EN: Egg nucleus; SN: sperm nucleus; DA: Degenerated antipodal cell; EE: Egg apparatus; PN: Polar nuclei; AC: Apical cell; BC: Basal cell; ES: Elongated suspensor; TGPC: Two-celled globular proembryo in Chenopodiad type; EEC: End embryo cell; Enec: Enlarged embryo cell; LDE: Longitudinally divisional enlarged-cell; TDE: Transversely divisional end-cell; TGPA: Two-celled globular proembryo in Asters type; TW: Transverse wall; LW: Longitudinal wall. A: Egg nucleus is fertilizing with sperm cell; B: Polar nucleus and sperm cell is melting; C: Zygote (arrow); D: Two-celled proembryo; E: Two-celled globular proembryo in Chenopodiad type, two embryonic cells are similar; F: Filamentous globular proembryo; G: Clavate globular proembryo; H: Early globular proembryo in chenopodiad type; I: Globular embryo of chenopodiad type in the mature seed; J: Two-celled globular proembryo in Asters type that contains two different cells; K: T-shaped proembryo; L: Further developmental T-shaped proembryo; M: Early globular proembryo in asters type; N: Globular embryo of asters type in the mature seed. (E-I: Chenopodiad type; J-N: Asters type)

### 3 结论和讨论

**胚囊发育** 兰科植物胚囊的发育过程具有多样性, 体现在母细胞减数分裂、功能大孢子选择、雌配子形成过程的多样性。减数分裂过程的多样性体现在二分体细胞进行第二次减数分裂的时间和方式, 第一种类型是 2 个二分体细胞同时进行, 形成呈线性排列的四分体; 第二种是珠孔端二分体细胞先进行第二次减数分裂形成 3 细胞的线性胚囊, 然后合点端的二分体细胞再进行第二次减数分裂, 最终形成 4 细胞的线性胚囊; 第三种是珠孔端二分体细胞完成第二次减数分裂形成 3 细胞线性胚囊后, 合点端二分体细胞进行 1 次纵裂, 形成四核“T”形胚囊<sup>[9-11]</sup>。多花地宝兰大孢子形成的方式属于第一种分裂方式。减数分裂完成后, 功能大孢子选择的多样性体现在功能大孢子数目上, 仅形成 1 个功能大孢子为单孢型, 如文心兰(*Oncidium flexuosum*)<sup>[12]</sup>、蕙兰(*Cymbidium faberi*)<sup>[13]</sup>等; 形成 2 个功能大孢子则为双孢型, 如小叶兜兰(*Paphiopedilum barbigerum*)<sup>[14]</sup>。多花地宝兰胚囊在珠孔端形成 1 个功能大孢子, 属于单孢型。功能大孢子发育完成后进行有丝分裂形成雌配子。兰科植物雌配子发育具有显著的多样性, 主要体现在四核胚囊期合点端雌配子核的发育上, 最终成熟胚囊雌配子核数目不同。天麻(*Gastrodia alata*)的 4 核成熟胚囊是在四核胚囊期合点端的雌配子核退化, 珠孔端的 4 个细胞发育成 1 个极核和 3 细胞的卵器, 胚囊中没有反足核<sup>[15]</sup>。火烧(*Epipactis helleborine*)在四核胚囊期, 合点端的 2 个雌配子核不再分裂, 因此由合点端 2 个核和珠孔端的 4 个核发育成 6 核成熟胚囊<sup>[16]</sup>。而美冠兰(*Eulophia graminea*)的 7 核胚囊则是由于在四核胚囊期, 合点端仅有 1 个雌配子核进行分裂, 最终成熟胚囊由合点端 3 个核和珠孔端 4 个核组成<sup>[10]</sup>。8 核胚囊是最为常见的类型, 在四核胚囊期合点端和珠孔端的核均能进行分裂, 各形成 4 个核, 组成 8 核胚囊, 如鹤顶兰(*Phaius tankervilleae*)<sup>[17]</sup>、文心兰(*Oncidium flexuosum*)<sup>[12]</sup>等。多花地宝兰成熟胚囊属于 8 核胚囊, 是大孢子经过 3 次有丝分裂形成 8 个雌配子核; 8 核胚囊进一步发育形成具有 2 个极核、1 个卵细胞、2 个助细胞和 3 个反足细胞的成熟胚囊, 这个发育过程属于蓼型胚囊。植物胚囊发育的多样性, 是植物系统进化过程的自然选择, 同物种可以存在 1 种或多种胚囊的发育方式, 如铃兰(*Conval-*

*laria majalis*)的胚囊发育同时存在单孢蓼型和双孢英地百合型两种类型<sup>[18]</sup>。在植物系统演化中, 一般认为单孢蓼型胚囊是原始类型, 而其他胚囊发育类型均从蓼型胚囊演化而来。多花地宝兰胚囊发育类型是单孢蓼型, 因此, 多花地宝兰的胚囊发育在兰科植物中属于较为原始的类型<sup>[19-21]</sup>。同时根据珠被系统演化特点, 多层珠被为原始性状, 多花地宝兰具有 2 层珠被, 属于较为原始的类型<sup>[19-20, 22]</sup>。因此推测多花地宝兰的进化程度在兰科植物中较为原始。

**胚的发育** 兰科植物花授粉之后, 花粉作为激素源刺激胚珠开始快速发育, 使其完成受精。完成受精后, 目前被子植物受精卵第一次分裂一般为横裂, 形成顶细胞和基细胞。根据顶细胞与基细胞的发育方式, 被子植物的胚发育划分为 5 种类型: 柳叶菜型、紫苑型、茄型、石竹型和藜型<sup>[19-23]</sup>。在柳叶菜型和紫苑型中, 顶细胞进行 1 次纵裂形成“T”形原胚, 柳叶菜型胚的基细胞基本不参与胚的发育, 如无耳沼兰(*Dienia ophrydis*)<sup>[24]</sup>, 而紫苑型胚的基细胞参与胚发育, 如大花杓兰(*Cypripedium macranthos*)<sup>[25]</sup>; 而在茄型、石竹型和藜型胚中, 顶细胞首先进行 1 次横裂形成线性原胚, 茄型、石竹型胚的基细胞基本不参与胚的形成, 藜型胚的基细胞参与胚的形成, 如苞舌兰(*Spathoglottis plicata*)<sup>[26]</sup>; 茄型胚的基细胞经过 1~2 分裂形成少量的胚柄细胞, 目前兰科植物中尚未报道有茄型胚发育类型<sup>[27]</sup>, 而石竹型胚的基细胞不进行分裂, 胚柄细胞由顶细胞衍生而来, 如无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana*)<sup>[28]</sup>、扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum*)<sup>[29]</sup>。布袋兰(*Calypso bulbosa*)同时存在藜型和柳叶菜型两种胚发育类型<sup>[30]</sup>, 而多花地宝兰也同时出现藜型和紫苑型两种胚发育类型, 但是这种胚发育类型的系统学意义尚未明确。有研究表明, 兰科植物胚柄的发育具有多种形态, 如扇脉杓兰<sup>[29]</sup>、文心兰<sup>[12]</sup>胚柄细胞整齐排列, 其中 1 至多个细胞膨大伸长; 鹤顶兰<sup>[22]</sup>、无距虾脊兰<sup>[28]</sup>仅 1 个膨大的胚柄细胞。多花地宝兰胚柄的发育方式与美冠兰<sup>[27]</sup>相似, 基细胞分裂的细胞团向不同方向延长形成多个“绒毛状”胚柄细胞。同时, 在多花地宝兰胚的发育过程中没有观察到胚乳的发育。有研究表明, 兰科植物种子成熟期无胚乳, 多数兰科植物胚发育过程中难以观察到胚乳的发育, 而发达的胚柄细胞代替胚乳细胞在胚的发育过程提供营养<sup>[16]</sup>。因此, 多花地宝兰中胚发育的营养主要来源于“绒毛状”的胚柄细胞。

兰科植物花从授粉到胚发育停止所需时间差异较大, 大花杓兰约 28 d<sup>[25]</sup>、鹤顶兰约需 41 d<sup>[22]</sup>、无距虾脊兰约 51 d<sup>[28]</sup>、小叶兜兰约 135 d<sup>[14]</sup>, 而多花地宝兰则需要约 30 d。

被子植物为了适应不同环境下的传粉效率, 增加受精机会和繁殖系数, 多种科属中存在多胚囊、多胚的现象, 不同植物中胚囊和胚的发育过程也是复杂多变的<sup>[31]</sup>。在植物系统演化上, 兰科植物是较为特化的群体, 其生活环境复杂多样<sup>[32-33]</sup>。兰科植物胚和胚囊发育的多样性可能与生长环境和进化程度有关, 即在进化过程中为了适应不同的环境形成不同的发育方式。

### 参考文献

- [1] STONE R. Home, home outside the range [J]. *Science*, 2010, 329 (5999): 1592–1594. doi: 10.1126/science.329.5999.1592.
- [2] KEERTHIGA M, ANAND S P. A review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological studies of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid [J]. *J Res Biol*, 2014, 4(8): 1543–1548.
- [3] THENG P A, KORPENWAR A N. Analysis of bioactive compounds in *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. pseudobulb using UV-VIS, FTIR and GC-MS techniques [J]. *J Chem Biol Phys Sci*, 2015, 5(2): 2151. doi: 10.1002/jemt.23357.
- [4] SWARTS N D, DIXON K W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(11): 590–598. doi: 10.1016/j.tplants.2009.07.008.
- [5] HU Q M, WANG R X, HUANG Y F. *In vitro* propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. [J]. *Plant Physiol Commun*, 2007, 43(2): 309–310.  
胡琦敏, 王任翔, 黄云峰. 地宝兰的离体快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(2): 309–310.
- [6] SHEELAVANTMATH S S, MURTHY H N, PYATI A N, et al. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2000, 60(2): 151–154. doi: 10.1023/A:1006426905052.
- [7] BHADRA S K, HOSSAIM M M. *In vitro* germination and micro-propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species [J]. *Plant Tiss Cult*, 2003, 13(2): 165–171.
- [8] ARDITTI J. Plenary presentation: history of orchid propagation [J]. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 2010, 18(1): 171–174.
- [9] FRIEDMAN W E. Comparative embryology of basal angiosperms [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(1): 14–20. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00129-1.
- [10] SWAMY B G L. Embryological studies in the Orchidaceae: I. Gametophytes [J]. *Amer Midl Nat*, 1949, 41(1): 184–201. doi: 10.2307/2422025.
- [11] YEUNG E C, LAW S K. Ovule and megagametophyte development in orchids [M]// ARDITTI J, PRIDGEON A M. *Orchid Biology*. Dordrecht: Springer, 1997: 31–73. doi: 10.1007/978-94-017-2498-2\_2.
- [12] MAYER J L S, CARMELLO-GUERREIRO S M, APPEZZATO-DAGLÓRIA B. 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.
- [13] LI F T, BAO J Z, SUN Y, et al. Ovule development and major developmental events distribution in *Cymbidium faberi* [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2015, 29(12): 2300–2306. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.12.2300.  
李凤童, 包建忠, 孙叶, 等. 蕙兰胚珠发育及主要发育事件分布 [J]. *核农学报*, 2015, 29(12): 2300–2306. doi: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.12.2300.
- [14] LIU Y, QI J, WU J G, et al. Fruit growth and female gametophyte development in *Paphiopedilum barbigerrum* Tang et Wang [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2016, 24(1): 14–20. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.002.  
刘岩, 齐霁, 吴记贵, 等. 小叶兜兰的果实生长和雌配子体发育 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24(1): 14–20. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.002.
- [15] LIANG H X. The micro- and mega-sporogenesis and the formation of male and female gametophytes in *Gastrodia elata* Blume [J]. *Acta Bot Sin*, 1981, 23(3): 186–191.  
梁汉兴. 天麻大小孢子的发生和雌雄配子体的形成 [J]. *植物学报*, 1981, 23(3): 186–191.
- [16] 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: 99–108.
- [17] 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, 叶秀旻, 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.
- [18] RAO G Y, PAN K Y, HONG D Y. Embryological studies on *Convallaria majalis* L. [J]. *Acta Bot Sin*, 1995, 37(12): 963–968.  
饶广远, 潘开玉, 洪德元. 铃兰的胚胎学研究 [J]. *植物学报*, 1995, 37(12): 963–968.

- [19] JUDD W S, CAMPBELL C S, KELLOGG E A, et al. LI D Z. translated. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* [M]. 3rd ed. Beijing: High Education Press, 2012: 88–90.
- JUDD W S, CAMPBELL C S, KELLOGG E A, 等. 李德铎, 译. 植物系统学 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 88–90.
- [20] SINGH G, LIU Q R, GUO Y P, YU M, translated. *Plant Systematics: An Integrated Approach* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 115.
- SINGH G 刘全儒, 郭延平, 于明, 译. 植物系统分类学——综合理论及方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 115.
- [21] YAN D, WANG L J, ZHAO C H, et al. Embryology of *Hemerocallis* L. and its systematic significance [J]. *Plant Syst Evol*, 2017, 303(5): 663–673. doi: 10.1007/s00606-017-1398-7.
- [22] LI D M, DUAN Z G, YE X L, et al. The relationship between ovule development and isozymes after pollination in *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. [J]. *Acta Hort Sin*, 2008, 35(5): 721–726.
- 李冬妹, 段中岗, 叶秀姝, 等. 鹤顶兰胚珠发育过程及受精前后同工酶的变化 [J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 721–726.
- [23] HU S Y. *The Embryology of Angiospermis* [M]. Beijing: People Education Press, 1982: 67–79.
- 胡适宜. 被子植物胚胎学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 67–79.
- [24] KOLOMEITSEVA G L, RYABCHENKO A S, BABOSHA A V. Features of the embryonic development of *Dienia ophrydis* (Orchidaceae) [J]. *Cell Tiss Biol*, 2017, 11(4): 314–323. doi: 10.1134/S1990519X17040071.
- [25] ZHANG Y, ZHANG Q X, ZHAO S W, et al. Embryo and integument development of the endangered species *Cypripedium macranthos* Sw [J]. *Acta Hort Sin*, 2010, 37(1): 72–76.
- 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.
- [26] SRIYOT N, THAMMATHAWORN A, THEERAKULPISUT P. Embryology of *Spathoglottis plicata* Blume: A reinvestigation and additional data [J]. *Trop Nat Hist*, 2015, 15(2): 97–115.
- [27] SWAMY B G L. Embryological studies in the Orchidaceae. II. Embryogeny [J]. *Amer Midl Nat*, 1949, 41(1): 212–213.
- [28] 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 Boreali-Occid Sin*, 2013, 33(3): 494–500.
- 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.
- [29] LIU F, TIAN M, WANG C X, et al. Observation on fruit growth dynamics and embryo development process of *Cypripedium japonicum* [J]. *J Plant Resour Environ*, 2012, 21(1): 28–35.
- 刘芬, 田敏, 王彩霞, 等. 扇脉杓兰果实生长动态及胚胎发育过程观察 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(1): 28–35.
- [30] YEUNG E C, LAW S K. Embryology of *Calypso bulbosa*: II. Embryo development [J]. *Can J Bot*, 1992, 70(3): 461–468. doi: 10.1139/b92-061.
- [31] XING S P, CHEN Z R, LU A M. Development of ovules and embryo sacs in *Ostrya virginiana* and its systematic significance [J]. *Acta Phytotaxon Sin*, 1998, 36(5): 428–435.
- 邢树平, 陈之瑞, 路安民. *Ostrya virginiana* 的胚珠和胚囊发育及其系统学意义 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(5): 428–435.
- [32] ZHANG Y B, DU H D, JIN X H, et al. Species diversity and geographic distribution of wild Orchidaceae in China [J]. *Chin Sci Bull*, 2015, 60(2): 179–188.
- 张殷波, 杜昊东, 金效华, 等. 中国野生兰科植物物种多样性与地理分布 [J]. 科学通报, 2015, 60(2): 179–188.
- [33] LIU H, LUO Y B. Protecting orchids in nature reserves: Research and restoration needs [J]. *Bot Rev*, 2010, 76(2): 137–139. doi: 10.1007/s12229-010-9046-8.