

长萼兰花蕉 (*Orchidantha chinensis* var. *longisepala*) 气味腺结构探究

崔长杰^{1,2}, 邹璞^{1*}, 廖景平¹

(1. 中国科学院华南植物园, 资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 兰花蕉科 (Lowiaceae) 植物开花时, 位于唇瓣的特殊腺体结构——气味腺 (osmophores) 能够产生和释放类似粪便的腐臭气味吸引传粉者。本研究以该科植物长萼兰花蕉 (*Orchidantha chinensis* var. *longisepala*) 为材料, 采用中性红染色法初步确定气味腺的位置, 然后用扫描电镜观察气味腺表皮细胞形态、透射电镜观察分泌细胞的超微结构。结果显示, 散发腐臭气味的气味腺位于长萼兰花蕉唇瓣上端近轴面; 气味腺由多样性的表皮细胞及表皮下 1~2 层分泌细胞构成, 腺体细胞具有细胞核大、细胞质浓、线粒体和内质网丰富等特点; 长萼兰花蕉花气味的释放主要依靠角质小泡的破裂完成, 推测挥发性的小分子有助于花气味的释放。本研究结果有助于揭示兰花蕉科植物与传粉者之间的互作关系, 了解植物的传粉过程。

关键词: 长萼兰花蕉; 气味腺; 超微结构; 花气味

中图分类号: Q944

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)05-0602-06

Structural Analysis of the Osmophores in *Orchidantha chinensis* var. *longisepala*

CUI Chang-Jie^{1, 2}, ZOU Pu^{1*}, LIAO Jing-Ping¹

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Osmophores specialized and defined on the labellum of Lowiaceae plants can produce a strong scent, unpleasant to humans but attractive to pollinators, which mimics the odor of carrion or decaying fruit during anthesis. In the present study, the labellum of *Orchidantha chinensis* var. *longisepala* was stained *in vivo* with neutral red to ascertain the location of osmophores. We used scanning electron microscopy (SEM) to observe the morphology of epidermal cells and transmission electron microscopy (TEM) to explore the ultrastructure of secretory cells. Results showed that osmophores of *O. chinensis* var. *longisepala* were located at adaxial surface of the upper labellum. Diverse epidermal cells and 1–2 layers of secretory cells comprised the osmophores. Cells of the glandular tissue showed enlarged nuclei compared to cells of nearby tissue and a dense cytoplasm. These cells also have more endoplasmic reticulum, mitochondria and plastids, sometimes dictyosomes. The scent substances were mainly from rupturing outer layer of the cuticle, and the diffusion of small molecules may contribute to the release. Research on the osmophores of Lowiaceae is useful to reveal the interactions between plants and pollinators and study the process of pollination.

收稿日期: 2015-05-06, 退修日期: 2015-06-01。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470410, 30900089)。

作者简介: 崔长杰 (1989–), 女, 硕士研究生, 研究方向为传粉生物学及繁殖生物学 (E-mail: cuichangjie2288@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zoupu@scib.ac.cn)。

Key words: *Orchidantha chinensis* var. *longisepala*; Osmophores; Ultrastructure; Scent

自然界中,植物通过花部特征,如花的形态、颜色、气味等吸引某些特定的传粉者在同种植物之间传粉以完成其生殖过程^[1]。花气味作为一种传粉手段,可作为昆虫访花的诱物或报酬^[2],在一定程度上影响传粉昆虫的种类及昆虫访花的频率,在虫媒植物的传粉和交配系统中具有重要作用。产生花气味的结构称为气味腺(osmophore),是植物花器官上特殊的腺体结构,能产生和释放挥发性气味^[3],因此气味腺也是影响植物繁殖的重要性状之一。曾有报道棕榈科植物 *Chamaerops humilis* 叶片中也有气味腺^[4],但其更普遍存在于植物花器官中。根据气味腺存在位置及形态的不同,可分为两大类:(1)典型气味腺(the typical osmophores),具特化的形态特征,常以触角型、杯型、刷型、鞭型、乳头型等附属物的形态局限分布于萼片、花瓣或唇瓣^[5,6]; (2)分散型气味腺(the diffused osmophores),平面分散存在于萼片、花瓣、苞片等花部上^[6-8]。

兰蕉科(Lowiaceae)为多年生草本植物,隶属于姜目,仅有兰花蕉一个属,为单属科,全球已报道20种^[9],主要分布于中国南部、加里曼丹、马来西亚及中印半岛的狭窄区域内。中国有2种1变种,即兰花蕉(*Orchidantha chinensis*)及其变种长萼兰花蕉(*O. chinensis* var. *longisepala*)、海南兰花蕉(*O. insularis*),均分布于华南地区,是我国特有种^[10],其中兰花蕉已被列为中国珍稀濒危植物^[11]。Sakai和Inoue^[12]研究发现,兰蕉科植物 *Orchidantha inouei* 的唇瓣气味腺能释放一种强烈的、类似粪便的气味以吸引蝇蚋类昆虫为其传粉,而兰蕉科植物缺少蜜腺,这种传粉模式并未给传粉者带来任何“酬劳”,属于欺骗性传粉。在整个传粉过程中,气味腺释放的花气味起到了关键作用,一定程度上影响了传粉昆虫的种类及昆虫访花的频率,最终关系到植物繁殖成功与否。因此,研究气味腺如何产生、释放气味并在传粉过程中发挥作用具有重要的意义。目前还未见对兰蕉科植物气味腺的研究,本研究旨在确定长萼兰花蕉气味腺的位置,并在超微水平上探究气味腺的结构特征并推测花气味的释放方式,以期对兰蕉科的传粉

生物学提供相关资料。

1 材料和方法

1.1 材料采集及处理

长萼兰花蕉(*Orchidantha chinensis* var. *longisepala*)采自中国科学院华南植物园菜园温室(原种引自广西十万大山)。采集第一天开放的长萼兰花蕉花朵,其中一部分新鲜花朵材料用于解剖观察;另一部分花朵置于用2.5%戊二醛和2%多聚甲醛配制的固定液中固定,抽气后置于4℃冰箱中保存、备用。

1.2 实验方法

嗅觉实验及光学显微镜观察:取5朵新鲜长萼兰花蕉花朵,逐一解剖,按雌蕊、雄蕊、花萼、子房、侧瓣、唇瓣不同花部分类收集,分别置于干净无味的密封烧杯中采集气味。经过1h气味积累,以人嗅觉辨别气味来自哪一花部^[6]。将新鲜唇瓣及徒手切片唇瓣分别置于中性红溶液(中性红:水=1:1000)染色2h^[6]和20min^[5],取出后流水冲洗,置于光镜下观察染色情况并拍照,确定气味腺的位置。

扫描电镜观察:取经固定的花朵材料,用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗,乙醇逐级梯度脱水,叔丁醇替换乙醇后,用JFD-310冷冻干燥仪干燥、粘台,再用JFC-1600离子溅射仪镀铂金膜,最后于JEOLJSM-6360LV型扫描电镜下观察、拍照。

透射电镜观察:取经固定的花朵材料,用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗,转入1%锇酸固定液(pH7.2)固定1h,再用0.1mol/L磷酸缓冲液漂洗,经各级乙醇梯度脱水,环氧丙烷置换乙醇后,用Epon812树脂渗透包埋,置于烘箱内45℃(12h)、60℃(24~36h)烤干,形成包埋块。用LK-S超薄切片机对包埋块切片(厚度约70nm),用醋酸铀柠檬酸铅染色后在JEOLJEM-1010型透射电镜下观察、拍照。

2 结果分析

嗅觉实验证实,长萼兰花蕉的唇瓣具有腐臭气

味,而其他花部均无腐臭气味释放。长萼兰花蕉的唇瓣气味腺为分散型,存在于唇瓣近轴面。光镜观察发现,染色与未染色的唇瓣相比,染色后的唇瓣近轴面被中性红染为红色(图版 I: A 左图),唇瓣徒手切片经中性红染色后,近轴面表皮细胞着色较深,可清晰观察到表皮下 1~2 层细胞也被染色(图版 I: C),而表皮下薄壁细胞几乎未被着色(图版 I: C);光镜下唇瓣远轴面的整体染色及切片染色几乎未被着色(图版 I: B, C)。

扫描电镜观察可见,长萼兰花蕉唇瓣气味腺近轴面表皮细胞形态呈多样性,有隆起形(bullate)、皱缩形(rugate)、圆锥形突起(conical)(图版 I: D~G)。其中,圆锥形突起细胞可分为 2 类:一类具深褶皱(图版 I: E);一类侧面具破裂的角质层(图版 I: F, G)。此外,圆锥形表皮细胞表面的小泡状分泌物清晰可见(图版 I: F, G)。

透射电镜观察可见,唇瓣气味腺近轴面表皮细胞及表皮下 1~2 层细胞均有分泌细胞的特性,主要体现在:细胞质浓,细胞核大,核仁明显,液泡小而多,形成液泡系,分区较多,内质网发达,质体数目较多,淀粉粒少见(图版 I: H);线粒体发达,细胞内线粒体数量多,聚集在细胞壁周围(图版 I: I);高尔基体清晰可见(图版 I: J);细胞壁厚,近细胞质一侧具细小褶皱且线粒体围绕周围,推测细胞壁与细胞质物质交换密切(图版 I: I)。

3 讨论

3.1 气味腺的位置

中性红是一种弱碱性 pH 指示剂,经中性红染色后细胞质中的成分能够吸附中性红染料或与其发生反应^[13],完整的气味腺组织因其新陈代谢旺盛而被染成红色,并与其他组织区别开来^[14]。经中性红整体染色的长萼兰花蕉近轴面表皮细胞及表皮下 1~2 层细胞均可被染为红色,初步确定了气味腺的位置。兰科植物典型的气味腺以触角型、杯型、刷型等附属物的形式存在于唇瓣或花瓣上^[5],而长萼兰花蕉的气味腺则分散分布于整个唇瓣上部,并无特化的外部形态特征,属于分散型气味腺。

3.2 气味腺的表皮细胞形态及超微结构

有关气味腺解剖及超微结构的研究主要集中在

天南星科^[15,16]及兰科^[5,17-19]植物,研究认为气味腺主要位于近轴面,呈隆起形、多皱形、伞形、锥形和乳头形的表皮细胞与近表皮的几层细胞构成腺体组织,嵌在普通的薄壁细胞周围。与薄壁细胞相比,气味腺腺体细胞的细胞核大、细胞质浓、具有较多的小液泡而非大液泡。有研究发现,透射电镜下,兰科等植物气味腺的分泌细胞内有大量内质网、线粒体、淀粉粒及油滴,偶有高尔基体^[20]。本研究观察发现,长萼兰花蕉气味腺表皮细胞呈乳头状和锥形等形状,这种多样性的表皮细胞形态可能与其承担的分泌任务不同有关,如分泌物种类及分泌物含量不同等^[21]。分泌细胞一般具有细胞质浓、线粒体和内质网丰富、具有气味腺腺体细胞等特性。但是长萼兰花蕉腺体细胞中并未发现有淀粉粒存在,这一现象在 *Gymnadenia*^[22]、*Boucerosia*^[21]两个属中也曾有报道,可能与分泌组织所处的发育阶段有关。

一般认为,挥发性物质由质体合成或由质体与内质网共同合成,然后进入内质网进行修饰,并以小泡的形式转移至原生质膜,小泡与质膜融合,使挥发性物质释放至细胞壁及角质层;在大多数植物的气味腺中,淀粉粒大量聚集,被认为是短时间内为花气味的释放提供能量及碳源^[17,20]。气味腺组织内淀粉类物质的消耗通常在分泌活动消失后停止。线粒体的大量出现及在开花期有规律的分布,说明挥发性物质的合成及分泌均需要大量的能量^[17,20,22]。

3.3 气味的释放方式

在长萼兰花蕉气味腺近轴面表皮细胞处可观察到乳头状突起侧面的小泡状结构及破裂的角质层(图版 I: F, G),推测这种结构在气味释放过程中起到重要的作用。有研究发现,蔷薇科植物 *Rosa hybrida* 近轴面隆起的表皮细胞具泡状分泌物,通过小泡角质层破裂实现挥发性物质的释放^[20]。Pridgeon 和 Stern^[5]观察发现,兰科植物 *Restrepia muscifera* 的背萼片顶端远轴面表皮细胞表面具大量角质气孔,挥发性分泌物在细胞壁与角质层之间的积累导致压力增大,角质层破裂,使挥发性物质释放出来。类似的角质层破裂的分泌模式还有对 *Boucerosia indica* 的气味腺^[21]、*Limodorum*

*abortivum*的蜜腺^[23]、唇形科植物 *Mentha arvensis* 的油腺^[24]的研究等。而长萼兰花蕉气味腺近轴面表皮细胞可观察到乳头状突起侧面的小泡状结构及破裂的角质层(图版 I: F, G), 推测泡状结构内可暂时储存分泌物, 随着分泌物的积累, 压力增大, 小泡状结构破裂使花气味释放出来。

观察发现, 长萼兰花蕉气味腺近轴面表皮细胞的细胞壁厚, 似乎不利于气味的释放, 但花气味挥发物通常是以小分子的形式进行释放(质量范围: 30~300 amu)^[20], 推测这些物质可以穿透细胞壁微纤丝而释放到外界, 这是植物进化发育的一种平衡机制, 在抵御外界环境的同时使花气味得到释放。同时, 隆起细胞及圆锥形细胞表面形成褶皱(图版 I: D, E), 增加了表皮细胞与外界的接触面, 有利于小分子物质的挥发。这种依赖小分子的挥发性分泌模式在豆科两种植物(*Erythostemon gilliesii* 和 *Poincianella pluviosa*) 中均有相关报道^[14]。

综上所述, 长萼兰花蕉气味腺位于唇瓣上部近轴面区域, 分泌细胞分散分布于唇瓣表面, 属于分散型气味腺。表皮细胞及表皮下薄壁细胞负责挥发性物质的合成, 花气味的释放主要经表皮细胞角质小泡的破裂完成, 同时, 分泌物自身具挥发性, 这也可能是花气味释放的另一方式, 以此来吸引传粉昆虫, 进而完成传粉过程。

致谢: 感谢中国科学院华南植物园公共实验室邓汝芳女士和胡晓颖高级工程师在实验上的帮助。

参考文献:

- [1] Effmert U, Große J, Röse USR, Ehrig F, Kägi R, Piechulla B. Volatile composition, emission pattern, and localization of floral scent emission in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae) [J]. *Am J Bot*, 2005, 92(1): 2–12.
- [2] Tan KH, Nishida R. Zingerone in the floral synomone of *Bulbophyllum baileyi* (Orchidaceae) attracts *Bactrocera* fruit flies during pollination [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2007, 35(6): 334–41.
- [3] Vogel S. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung; Über Bau und Funktion der Osmophoren [M]. Wiesbaden: Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur, 1962: 598–763.
- [4] Caissard JC, Meekijjironroj A, Baudino S, Anstett MC. Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae) [J]. *Am J Bot*, 2004, 91(8): 1190–1199.
- [5] Pridgeon AM, Stern WL. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae) [J]. *Am J Bot*, 1983, 70(8): 1233–1243.
- [6] Vogel S. The Role of Scent Glands in Pollination; On the Structure and Function of Osmophores [M]. Washington: Smithsonian Institution Libraries Press, 1990: 1–202.
- [7] Fahn A. Secretory Tissues in Plants [M]. London: Academic Press, 1979: 1–302.
- [8] Vogel S. Ecophysiology of Zoophilic Pollination [M]//Larcher W ed. *Physiological Plant Ecology III*. Berlin: Springer, 1983: 559–624.
- [9] Leong-Škorničková J. *Orchidantha lengguanii* (Lowiaceae), a new species from Peninsular Malaysia, and typification of *O. maxillarioides* [J]. *Gardens' Bulletin Singapore*, 2014, 66(1): 15–25.
- [10] Zou P, Ye YS, Cai XA, Liao JP. Rediscovery and improved description of *Orchidanth ainsularis* (Lowiaceae), a rare species from Hainan, China [J]. *Nord J Bot*, 2014, 32(6): 819–823.
- [11] 傅立国. 中国珍稀濒危植物 [M]. 上海: 上海教育出版社, 1989: 234.
- [12] Sakai S, Inoue T. A new pollination system: dung-beetle pollination discovered in *Orchidantha inoue* (Lowiaceae, Zingiberales) in Sarawak, Malaysia [J]. *Am J Bot*, 1999, 86(1): 56–61.
- [13] Clark G, Kasten FH. History of Staining [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Williams & Wilkins Press, 1983: 1–304.
- [14] Marinho CR, Souza CD, Barros TC, Teixeira SP. Scent glands in legume flowers [J]. *Plant Biol*, 2014, 16(1): 215–226.
- [15] Hadacek F, Weber M. Club-shaped organs as additional osmophores within the *Sauromatum* inflorescence: Odour analysis, ultrastructural changes and pollination aspects [J]. *Plant Biol*, 2002, 4(3): 367–383.
- [16] Skubatz H, Kunkel DD, Patt JM, Howald WN, Hartman TG, Meeuse BJD. Pathway of terpene excretion by the appendix of *Sauromatum guttatum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(22): 10084–10088.
- [17] Pridgeon AM, Stern WL. Osmophores of *Scapho-*

sepalum (Orchidaceae)[J]. *Bot Gaz*, 1985, 146 (1): 115–123.

[18] Curry KJ, McDowell LM, Judd WS, Stern WL. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae)[J]. *Am J Bot*, 1991, 78(5): 610–623.

[19] Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae)[J]. *Plant Syst Evol*, 2010, 286(3–4): 141–151.

[20] Dudareva N, Pichersky E. *Biology of Floral Scent* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2010: 1–346.

[21] Płachno BJ, Świątek P, Szymczak G. Can a stench be beautiful? – Osmophores in stem-succulent stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae-Stapeliinae)[J]. *Flora*, 2010, 205(2): 101–105.

[22] Stpiczyńska M. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae)[J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2001, 70(2): 91–96.

[23] Figueiredo ACS, Pais MS. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae)[J]. *Ann Bot*, 1992, 70(4): 325–331.

[24] Sharma S, Sangwan NS, Sangwan RS. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint[J]. *Curr Sci*, 2003, 84(4): 544–550.

图版说明

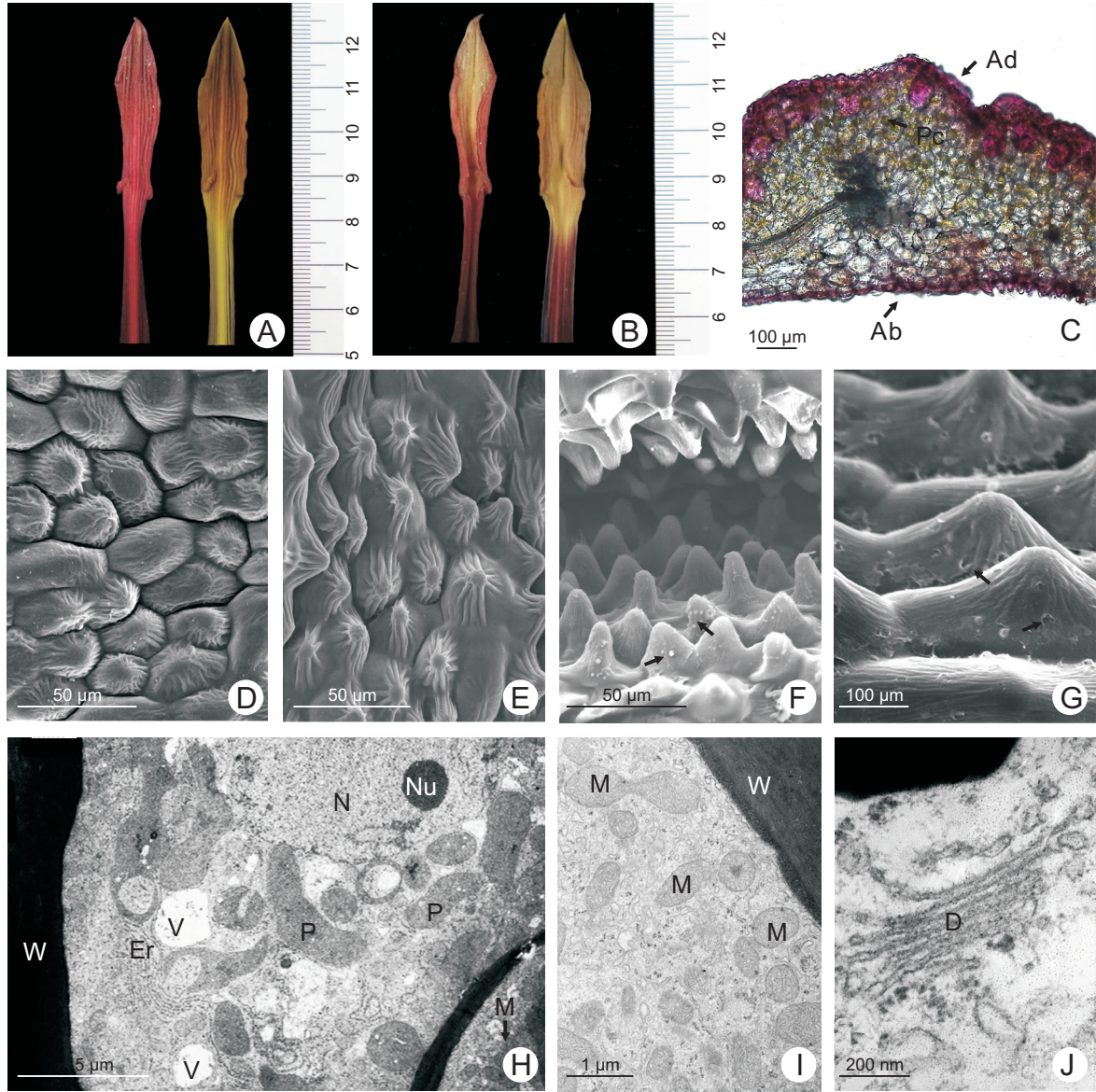
图版 I：光学显微镜下长萼兰花蕉唇瓣中性红染色观察(A~C)。A：唇瓣上端近轴面染色阳性反应(左侧为染色后唇瓣，右侧未染色唇瓣)；B：唇瓣上端远轴面染色阴性反应(左侧为染色后唇瓣，右侧未染色唇瓣)；C：示经中性红染色的徒手切片(Ad 为唇瓣近轴面；Ab 为唇瓣远轴面；Pc 示表皮下未着色薄壁细胞)。扫描电镜下长萼兰花蕉气味腺表皮细胞形态(D~G)。D：隆起型与皱缩型细胞；E：具褶皱的圆锥型细胞；F：具泡状分泌物的圆锥型细胞(箭头示小泡状分泌物)；G：角质层破裂的圆锥形细胞(箭头示破裂的角质层)。透射电镜下长萼兰花蕉分泌细胞的超微结构(H~J)。H：示分泌细胞的细胞质浓、细胞核大、内质网及质体丰富(W 示细胞壁；Er 示内质网；V 示小液泡；P 示质体；N 示细胞核；M 示线粒体；Nu 示核仁)；I：示分泌细胞的线粒体聚集在细胞壁周围(W 示细胞壁；M 示线粒体)；J：示分泌细胞的高尔基体(D 示高尔基体)。

Explanation of plate

Plate I : Labellums of *O. chinensis* var. *longisepala* stained with neutral red under light microscope (A–C). A: Active reaction on the adaxial surface of the labellum (left-stained labellum, right-unstained labellum); B: Inactive reaction on the abaxial surface of the labellum (left-stained labellum, right-unstained labellum); C: Free-hand sections showing active reaction in the epidermis and subjacent 1–2 lays of cells (Ad, adaxial side; Ab, abaxial side; Pc, parenchymal cells). Morphology of osmophores of *O. chinensis* var. *longisepala* under SEM (D–G). D: Bullate to rugate type; E: Conical type with striations; F: Conical type with secretions (arrows indicate secretions); G: Conical type with rupturing cuticle (arrows indicate rupturing cuticle). Ultrastructure of secretory cells of *O. chinensis* var. *longisepala* under TEM (H–J). H: Secretory cells showing dense cytoplasm, enlarged nuclei and obvious nucleolus, well-developed endoplasmic reticulum and mitochondria (W, cell wall; Er, endoplasmic reticulum; V, vacuoles; P, plastids; N, nucleus; M, mitochondria; Nu, nucleolus); I: Secretory cells showing mitochondria gathering around cell wall (W, cell wall; M, mitochondria); J: Secretory cells showing dictyosome (D, Golgi apparatus).

崔长杰等：图版 I

CUI Chang-Jie *et al.*: Plate I



See explanation at the end of text

(责任编辑：张 平)