

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣杉雄配子體發育之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-039-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人：陳淑華

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告  
台灣杉雄配子體發育之研究

The study of male gametogenesis of *Taiwania cryptomerioides* Hayata

計畫編號：NSC 93-2313-B-002-039

主持人：陳淑華 國立台灣大學 生命科學系

一、中文摘要

台灣杉 (*Taiwania cryptomerioides* Hayata)，又名亞杉，屬杉科 (Taxodiaceae) 為台灣原產之針葉樹種。採集台大實驗林溪頭營林區和有水坑營林區之雄毬果之各個發育階段，並於小孢子減數分裂時期分別以醋酸洋紅檢測染色體，發現不孕性的植株在花粉行減數分裂時，開始有不正常的現象出現，應該是造成有水坑花粉不孕的首要因素。正常的細胞具有正常的染色體配對，但不正常的細胞的部份染色體排列於中央，一些未配對的染色體則散落在角落，這些未配對的染色體，會形成一個個較小的細胞核，當減數分裂結束後，這些減數分裂不正常的細胞，多半無法完成細胞質分裂，造成一個細胞中有多個細胞核出現。

在經由 Aniline blue 染色中，正常的四分體有明顯且螢光強烈的胼氈質堆積；不正常的四分體，明顯地表現出胼氈質累積量不足的現象或幾乎沒有胼氈質累積，且細胞質分裂亦未完全，造成其中一個小孢子中有二個細胞核或數個細胞核，且花粉外壁發育不完全，在孢子囊開裂前這些不孕的小孢子會急劇的崩解。由此研究得知有水坑花粉不孕的原因可能為染色體分離不全和胼氈質堆積不全所造成。

關鍵詞：台灣杉、雄不孕、小孢子發

育、雄配子發育、胼氈質壁、減數分裂

Abstract

The study of male gametogenesis on a conifer species endemic to Taiwan, *Taiwania cryptomerioides* Hayata (Taxodiaceae) was done in this article. With the aids of fluorescent and electron microscopic observations, the ontogenic processes in the fertile and sterile microsporangia are compared, using the samples collected from Chitou Experimental Forest and Yeou-Shoei-Keng Clonal Orchard of National Taiwan University, Nantou, Taiwan. Before meiosis, there was no significant difference in ultrastructure between the fertile and sterile microsporangia. Asynchronous pollen development with various tetrad forms may occur in the same microsporangium either of fertile or sterile strobili. As the meiotic steps proceeded, the irregular chromosomal and nuclear behavior was observed in the sterile microsporangia. This included: abnormal chromosome segregation and cytokinesis, and nuclear fusion of the meiotic products. Moreover, a callose wall was observable in the fertile dyad and

tetrad, but not in the sterile one. After dissolution of the callose wall, the fertile microspores were released into the locule, while some sterile microspores still retained as tetrads or dyads with intertwining of exine walls in the proximal faces. As a result, there was no well-developed lamellated endexine, granulate ectexine, or intine in the sterile microspores. Eventually, the intracellular structures in sterile microspores were dramatically collapsed before anthesis. The present study shows that the abortion in pollen development and male gametogenesis is possibly attributed to the abnormal chromosome and the absence of the callose wall.

Keywords: *Taiwania cryptomerioides*, male sterility, microsporogenesis, male gametogenesis, callose wall, meiosis.

## 二、前言與研究目的

台灣杉 (*Taiwania cryptomerioides* Hayata), 又名亞杉, 屬杉科 (Taxodiaceae) 為台灣原產之針葉樹種。主要分佈於本省中央山脈海拔 1,300 至 2,600 公尺之天然林中, 與水杉、銀杏和世界爺同為地質時代第三紀之子遺植物, 故為世界稀有之珍貴樹種。台灣杉之分佈北起太平山、南至大武山, 散生於其他針葉林中, 偶成小面積之純林, 如大安溪右側之南坑溪、台東與屏東交界之大武山、關山事業區等地, 其分佈為圍繞中央山脈之環帶狀 (柳, 1966)。

台灣杉因屬於我國之特有植物, 國人近年曾在南坑溪及台大實驗林內茅埔營林區發現有台灣杉之雄毬果有不正常發育, 致使其無花粉產生之現象, 但原因仍未知。前人有關台灣杉雄毬果發育之研究僅限於利用解剖顯微鏡和光顯微鏡觀察(王等人, 1969; 龔等人, 1969; 蘇, 1986), 其細胞內部之胞器和化學物質的變化皆未知。

由本人之前的計畫發現, 位於有水坑台灣杉植株的花粉在成熟之前突然全部瓦解, 但原因仍未詳盡, 是以本計畫第一年曾以組織化學染色法, 詳細研究台灣杉可孕和不孕花粉在發育過程中各組織和細胞內的化學變化, 並探討造成花粉不孕和花粉崩解之原因。本計劃則探討台灣杉小孢子母細胞進行減數分裂時染色體之分離, 並以螢光顯微鏡觀察胼氈質之堆積, 配合 TEM 之結果, 探討台灣杉雄配子體不孕之原因。

## 三、研究材料與方法

每一或兩星期至台大實驗林溪頭營林區 (海拔 1,150 公尺) 和有水坑種子園 (海拔 750 公尺) 分別採取可孕和不孕的台灣杉雄毬果之芽為材料。將一部份材料固定, 脫水, 包埋, 超薄切片, 染色後使用穿透式電子顯微鏡 (TEM, Hitachi H-600 型、Hitachi H-7100 型或 JEM-1200 EX II 型) 觀察、記錄並拍照。

另一部份的材料經固定後, 採用塗抹法, 分別用醋酸洋紅和 Anilin Blue 染色後, 再分別以光學顯微鏡和螢光顯微鏡觀察拍照。

## 四、結果與討論

在有水坑的台灣杉植株，於花粉發育過程中，有不正常的現象產生。本研究發現在花粉行減數分裂時，開始有不正常的現象出現，應該是造成有水坑花粉不孕的首要因素。在 Prophase I 時，細胞中的染色體散布(圖 1)。於 Metaphase I 時，正常的細胞具有正常的染色體配對，染色體排列於細胞中央(圖 2)，但不正常的細胞的部份染色體排列於中央，一些未配對的染色體則散落在角落(圖 3)，這些未配對的染色體，會形成一個個較小的細胞核(圖 4)，當減數分裂結束後，這些減數分裂不正常的細胞，多半無法完成細胞質分裂，造成一個細胞中有多個細胞核出現(圖 5)，不像正常的四分體(圖 6)，有四個小孢子產生且各有一個細胞核。

這些減數分裂不正常的細胞，亦伴隨著胼氫質不正常累積。在經由 Aniline blue 染色中，發現正常的四分體的螢光反應(圖 7)比不正常(圖 8)強，而且部份不正常者無任何螢光反應(圖 8)，這顯示不正常者的胼氫質累積量明顯地不足。此外，不論正常與否，台灣杉的四分體種類，具有 tetrahedral tetrad (圖 9, 11) 和 tetradgonal tetrad (圖 10, 12)。

正常的四分體被胼氫質包圍，並由胼氫質區隔出四個獨立的小孢子(圖 13)。不正常的四分體幾乎沒有胼氫質累積，且細胞質分裂亦未完全，造成其中一個小孢子中有二個細胞核(圖 14)。正常四分體釋放出來的小孢子，其花粉外壁發育完整且正常(圖 15)，而不正常的四分體釋放出來的小孢子會有數個細胞核，且花粉外壁發育不完全(圖 16)。

裸子植物有關花粉不孕的研究非常稀少，其中地中海瀕臨滅絕的柏屬植物 *Cupressus dupreziana* (Maâtaoui & Pichot, 2001) 以 PAS (染多醣類) 和 DAPI (染 DNA) 染色法研究正常和不孕的小孢子之形成和花粉發育的過程，雄不孕株由於減數分裂時染色體分離和細胞質分裂不正常，導致在同一個小孢子囊內出現單粒、雙粒、三粒、四粒和多粒體的組合，最後產生許多不同大小的花粉粒，有些為 unreduced pollen，有些為 abortive pollen；*Pinus monticola* (Wilson & Owens, 2003) 不孕的雄毬果內的花粉在發育至毬果開裂前開始崩塌瓦解。

## 五、參考文獻

- 王子定 孔繁熙 龔政敏 1969 台灣杉毬花之發育及構造之研究 國立臺灣大學農學院實驗林研究報告 No.68。
- 蘇鴻傑 1986 台灣杉生活史之研究 現代育林 1(2): 1-32。
- 龔政敏 江濤 1969 台灣杉花部形態之研究 國立臺灣大學農學院實驗林研究報告 No. 69。
- Maâtaoui M.E. and Pichot C. 2001. Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus: evidence for meiotic defects yielding Negri V., unreduced and abortive pollen. *Planta* 213: 542-549.
- Wilson V.R. and Owens J.N. 2003. Histology of sterile male and female cones in *Pinus monticola* (western white pine). *Sex. Plant Reprod.* 15: 301-310.

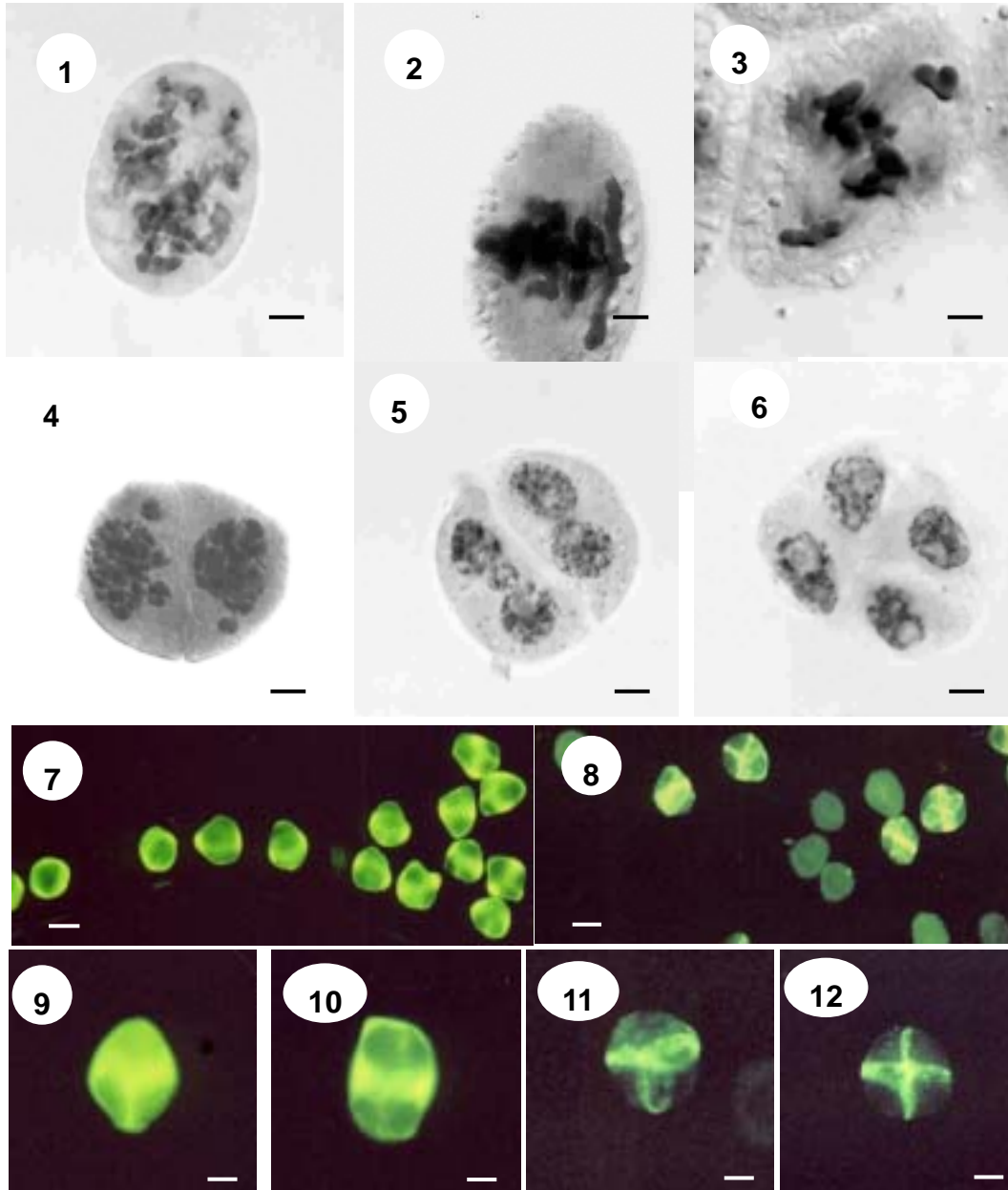


圖1-6 醋酸洋紅染色。

圖1 Prophase I。

圖2 Metaphase I。

圖3 Metaphase I。未配對的染色體 ( )。

圖4 Anaphase I。未配對的染色體獨自形成一個個小細胞核 ( )。

圖5 Telophase II。不完全細胞質分裂的細胞，具有未配對的染色體 ( )。

圖6 Telophase II，正常染色體配對和完全細胞質分裂的細胞。

圖7-12 Aniline Blue染色。

圖7 四分體時期。具有正常胼胝質累積的四分體。

圖8 四分體時期。部份四分體有胼胝質堆積，但堆積量較正常少；部份四分體無胼質 ( )。

圖9 正常胼胝質累積的tetrahedral tetrad。

圖10 正常胼胝質累積的tetragonal tetrad。

圖11 不正常胼胝質累積的tetrahedral tetrad。

圖12 不正常胼胝質累積的tetragonal tetrad。

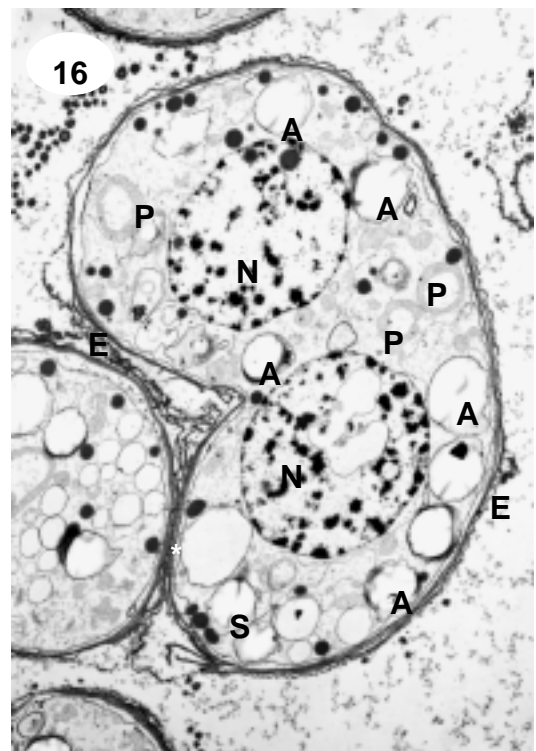
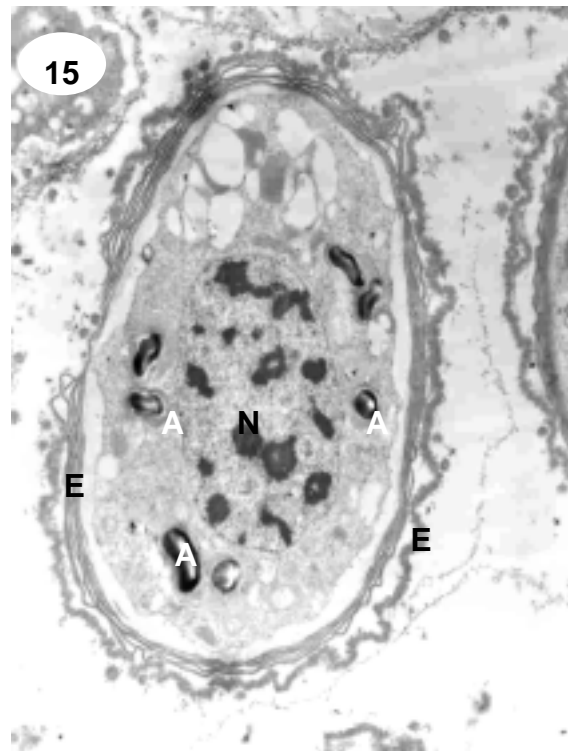
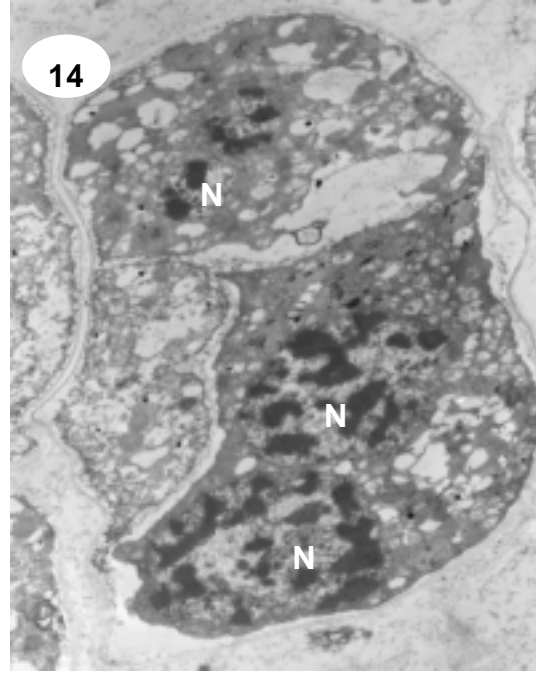
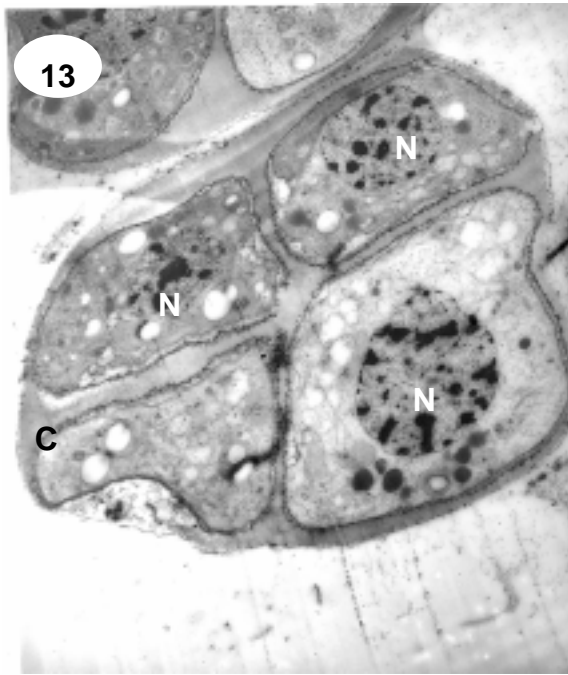


圖13-14 四分體時期。

圖13 正常的四分體。被胼脂質(C)區隔的四個小孢子。

圖14 不正常的四分體。不完全的細胞質分裂，胼脂質累積不正常。

圖15-16 自由小孢子時期。

圖15 正常的小孢子。正常的四分體中釋放出來的小孢子，僅有一個細胞核(N)，花粉外壁(E)發育正常，有澱粉體(A)。

圖16 不正常的小孢子。不正常的四分體中釋放出來的小孢子，有二個細胞核(N)，花粉外壁(E)發育不正常，有澱粉體(A)和質體(P)。