

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

台灣杉雄配子體發育之研究(1/2)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC92-2313-B-002-118-

執行期間： 92 年 08 月 01 日至 93 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： 精簡報告

處理方式： 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 6 月 4 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☐ 成果報告
☒ 期中進度報告

台灣杉雄配子體發育之研究

The study of male gametogenesis of *Taiwania cryptomerioides*
Hayata

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2313-B-002-118

執行期間：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳淑華

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學 生命科學系

中 華 民 國 93 年 6 月 4 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告
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 92-2313-B-002-118

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。在第一年的研究計畫中主要以組織化學染色，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。

在發育過程中，可孕和不孕的小孢子和營養層並無區別。於花粉成熟時期，脂質仍能在可孕的花粉粒中發現，但不孕者則無脂質。在四分體時期之前，小孢子囊的花粉腔無脂質。之後，從小孢子時期至花粉成熟時期，不孕的花粉腔中可檢測出大量的脂質，但可孕者則缺乏脂質。

在可孕的小孢子囊中，多醣類在所有的發育階段皆能被測得。反之，在小孢子時期以後，不孕者的多醣類含量較少，且在花粉成熟時期無任何多醣類存在。從造孢時期至二分體時期，不論可孕或不孕的小孢子囊的營養層，皆有多醣類存在。整體而言，可孕和不孕的營養層的多醣類含量並無差異。在不孕的小孢子囊中，花粉腔含有大量的多醣類，然可孕者在所有發育階段中，花粉腔無多醣類的出現。

從造孢時期至小孢子母細胞晚期，營養層中可發現大量的蛋白質。隨後的二個時期 (即二分體時期和四

分體時期)，僅有微量的蛋白質存在。四分體時期之後，由於營養層的瓦解，因此營養層細胞中無蛋白質的反應。可孕和不孕小孢子囊的營養層，其蛋白質含量無明顯的差別。從造孢時期至小孢子母細胞晚期，小孢子含有大量的蛋白質，爾後的時期則蛋白質含量較少。從二分體時期至雙細胞花粉時期，可在不孕小孢子中測得微量的蛋白質。在花粉成熟時期，可孕的小孢子含有豐富的蛋白質，不孕的則無。在小孢子時期之後，不孕者的花粉腔有蛋白質反應。反之，從小孢子母細胞晚期至四分體時期，可孕者的花粉腔有蛋白質反應，爾後的時期則無蛋白質反應。

關鍵詞：台灣杉、雄配子體、雄不孕、花粉發育、組織化學染色

Abstract

The endemic cypress species to Taiwan, *Taiwania cryptomerioides* Hayata was studied with histochemical staining in the first year.

Over these developing stages, both the fertile and sterile microspore did not differ from each other in microspores and tapetum. At mature pollen grain (MPG) stage, lipids were still detectable for fertile PG, but not for sterile one. It was detectable a tremendous amount of

lipid granules from M to PG stages in the locule of sterile microsporangia, while only trace amount of fertile one.

In the fertile microspores, polysaccharides were detectable throughout the entire developmental stages. In the sterile one, in contrast, less polysaccharide was detected after microspore stage and entirely not detected at PG stage. In the tapetum, polysaccharides were detectable from the stage of sporogenous tissue to dyad stage, either in fertile or in sterile microsporangia. As a whole, there is no significant difference between fertile and sterile microsporangia in polysaccharide content in the tapetum. In the sterile microsporangia, tremendous polysaccharides were detected in the locule, while in the fertile one none was detectable throughout the entire developmental stages.

In the tapetum, a great amount of proteins was found from the stage of sporogenous tissue to that of late MMC. At subsequent two stages, namely dyad and tetrad stages, only a trace amount of proteins was detected. Later than tetrad stage, no protein was detected in the tapetum owing to the degradation of tapetum itself. In the protein content, there was not significant difference between fertile and sterile microsporangia.

In microspores, there were also tremendous amount of proteins detectable from the stage of sporogenous tissue to that of late MMC, followed by

less amount of protein content in the subsequent developmental stages. In the sterile microspores, less protein content was detected at the stages from dyad to BPG. At MPG stage, fertile microspores were characterized by plenty of protein contents, while sterile ones none at all. In the sterile one, proteins were detectable after microspore stage. In the fertile one, on the contrary, proteins were detected in the locule from late microspore mother cell stage to tetrad stage, but not at the subsequent stages.

Keywords: *Taiwania cryptomerioides*, male gametogenesis, male sterility, pollen development, histochemical stain

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)。

台灣杉幹形通直高大, 材質優良, 易於加工, 且抗病蟲害和抗腐耐朽力均強, 其精油和抽出成分具有抗菌性及抗腫瘤活性, 為針葉樹種中之貴重材, 因而被大量砍伐, 目前數量已大幅減少, 分佈上也遠不如前。由

於造林成活率高，生長迅速，又無松鼠危害，為台灣中海拔之重要造林樹種，而有大面積的造林。台灣杉自然分佈均在高山，天然林的母樹相當少，且又多位於交通相當不便的地區，加以樹體高大，又毬果多生長於頂梢，致採種不易，又由於結實稀少且發芽率低，實有設置營養系種子園之必要。

台大實驗林於民國 55 年於溪頭營林區 5 林班，設置面積 1.045 公頃之台灣杉營養系種子園，其種源來自宜蘭蘭陽等 15 個地區，地點遍佈全省各地。包含了台灣主要天然種源。利用稼接苗共栽種了 162 株，由於枯死，並陸續補植，目前尚存 150 餘株。生長情形頗為良好，胸徑約在 20-30 公分之間。樹高平均在 20 公尺以下。與種子苗木相較，有明顯矮化的現象。於 87 年間發現有開花結實的現象，然所採的均為空粒，致雌花無法授粉。研究雄花之發育，並促進花粉之產生為解決之道。

台灣杉育種之研究最早有台灣大學實驗林溪頭營林區設置之台灣杉營養系庫，接著有王等人（1969），龔等人（1969）之有關花部發育、形態和花粉貯藏之研究。龔等人（1969）曾研究台灣杉花粉的貯藏和活力的檢定。姚（1970）接著進行關於移植密度對台灣杉苗木生育影響之研究。呂（1973，1975）研究本國五個不同種源之台灣杉種子經育苗後苗木之變異。孔（1974）亦以國內北、中、南六個天然種源之苗木，由其遺傳性選取優良之品種，供育種和造橡之參考，並研究激勃素對台灣杉開花之影響（孔 1974）。林和張（1975）以苗

床庇蔭與否，研究台灣杉苗木之成活與生長，吳（1983）亦研究台灣杉的育苗。台灣杉的生活史（蘇 1986）和生物系統學和分類（蘇 1982）亦已研究。

近代有關台灣杉之研究亦很多，如同功脢（Lin et al. 1993），組織培養或營養芽之生長（魯 1988，吳 1989，鄭 1992，余 1993，陳 2000），族群的遺傳結構（呂 1992，張 1992），育苗菌根（翁 1981，劉，1990），種源和毬果、種子和生理（鍾 1983，郭 1986），開花結實（鍾等人 1998），花芽生長之物候學（徐 1999）等。郭等人（1999）於台灣大學實驗林溪頭營林區營養系種子園進行台灣毬花之生長與樹冠微環境（如：溫度、光量和空氣之相對溼度）之相關研究，廖（1997）研究地理資訊系統在台灣杉造林地選擇上之應用，其他有關台灣杉之木材和應用方面之研究則不勝枚舉（劉等人 1984，張和馬 1985，翟 1985，黃和唐 1986，鄭 1989，王 1994，邱等人 1999）。

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，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，但原因仍詳盡，是以本計畫第一年擬以以組織化學染色法，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。

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。將新鮮材料固定，脫水，包埋，厚切片，Coomassie brilliant blue (O'Brien and McCully, 1981)、PAS (Periodic acid-Schiff's reaction) (O'Brien and McCully, 1981)、Sudan Black (O'Brien and McCully, 1981) 染色後，在光學顯微鏡下觀察。

四、結果與討論

在小孢子和花粉發育的過程中，檢測台灣杉可孕和不孕的小孢囊的脂質、多醣類和蛋白質之變化 (表一)。

脂質含量的變化使用 Sudan Black 來檢測。在小孢子發育的早期，造孢組織中無明顯的脂質。直到小孢子母細胞早期至雙細胞花粉時期，營養層與小孢子才能被偵測出脂質。在發育過程中，可孕和不孕的小孢子並無區別。花粉成熟時期，脂質仍能在可孕的花粉粒中發現，但不孕者則無脂質。

在四分體時期之前，小孢子囊的花粉腔無脂質。之後，從小孢子時期至花粉成熟時期，不孕小孢子囊的花粉腔中可檢測出大量的脂質，但可孕者則缺乏脂質。

小孢子發育的期間，小孢子囊不同的構造中，多醣類的含量呈現多樣的變化。在可孕的小孢子囊中，多醣類在所有的發育階段皆能被測得。反之，在小孢子時期以後，不孕者的多

醣類含量較少，且在花粉成熟時期無任何多醣類存在。從造孢時期至二分體時期，不論可孕或不孕的小孢子囊的營養層，皆有多醣類存在。整體而言，可孕和不孕的營養層的多醣類含量並無差異。

可孕和不孕的小孢子囊，一個明顯的差異是在花粉腔的多醣類含量。在不孕的小孢子囊中，花粉腔含有大量的多醣類，然可孕者在所有發育階段中，花粉腔無多醣類的出現。

蛋白質含量在花粉發育過程中有著顯著的變動。從造孢時期至小孢子母細胞晚期，營養層中可發現大量的蛋白質。隨後的二個時期 (即二分體時期和四分體時期)，僅有微量的蛋白質存在。四分體時期之後，由於營養層的瓦解，因此營養層細胞中無蛋白質的反應。可孕和不孕小孢子囊的營養層，其蛋白質含量無明顯的差別。

從造孢時期至小孢子母細胞晚期，小孢子含有大量的蛋白質，爾後的時期則蛋白質含量較少。從二分體時期至雙細胞花粉時期，可在不孕小孢子中測得微量的蛋白質。在花粉成熟時期，可孕的小孢子含有豐富的蛋白質，不孕的則無。

不孕的小孢子囊與可孕者的不同，可藉由花粉腔的蛋白質含量來區分。在小孢子時期之後，不孕者的花粉腔有蛋白質反應。反之，從小孢子母細胞晚期至四分體時期，可孕者的花粉腔有蛋白質反應，爾後的時期則無蛋白質反應。

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

- 孔繁熙 1974 激勃素對台灣杉嫁接苗促進開花之研究 林務局造林知識。
- 孔繁熙 1974 台灣杉遺傳性改良之研究 台灣省林業試驗所 試驗報告 254 號。
- 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。
- 吳國五 1983 台灣杉之育苗試驗 國立中興大學森林研究所碩士論文。
- 呂錦明 1973 台灣杉不同種源苗木之變異 台灣省林業試驗所 第二四六號。
- 呂錦明 1975 台灣杉不同種源苗木之變異 (II) 台灣省林業試驗所 試驗報告 第 261 號。
- 林維治 張添榮 1975 苗木庇蔭對於台灣杉苗木成活與生長之影響 台灣省林業試驗所 試驗報告 第 275 號。
- 蘇鴻傑 1982 台灣夏之生物系統學研究及杉科系統分類之數示評估 國立臺灣大學森彬研究所博士論文。
- 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., undreduced 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.

Table 1: The changes of cytoplasmic contents of lipid, polysaccharides and protein in the fertile and sterile microsporangia during microsporogenesis and pollen development of *Taiwania*.

Coomassie Blue (protein)		ST	EMMC	MMMC	LMMC	D	T	M	BPG	MPG
Tapetum	F	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+	+	-	-	-
	S	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+	+	-	-	-
Microspore/Pollen Grain	F	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+	+	++	++	+++
	S	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+++ (nuclei)	+	+	+	+	-
Locule	F			-	+	+	+	-	-	-
	S			-	-	-	-	+	+	++
PAS (polysaccharides)		ST	EMMC	MMMC	LMMC	D	T	M	BPG	MPG
Tapetum	F	++ (cell wall)	+	+	+	+	-	-	-	-
	S	++ (cell wall)	+	+	+	+	+	-	-	-
Microspore/Pollen Grain	F	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	++
	S	++	+	+	+++	+++	+++	+	+	-
Locule	F			-	-	+	-	-	-	-
	S			-	-	-	+++	+++	+++	+++
Sunda Black (lipid)		ST	EMMC	MMMC	LMMC	D	T	M	BPG	MPG
Tapetum	F	-	+	+	+	+	+	++	+	
	S	-	+	+	+	+	+	+	+	
Microspore/Pollen Grain	F	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
	S	-	+	++	+++	++	++	++	+++	-
Locule	F			-	-	-	-	+	+	-
	S			-	-	-	-	++	++	++

BPG: Bicellular pollen grain; D: Dyad; EMMC: Early microspore mother cell; F: Fertile microsporangia; LMMC: Late microspore mother cell; M: Microspore; MMC: Middle microspore mother cell; MPG: Mature pollen grain; S: Sterile microsporangia; ST: Sporogenous tissue; T: Tetrad.