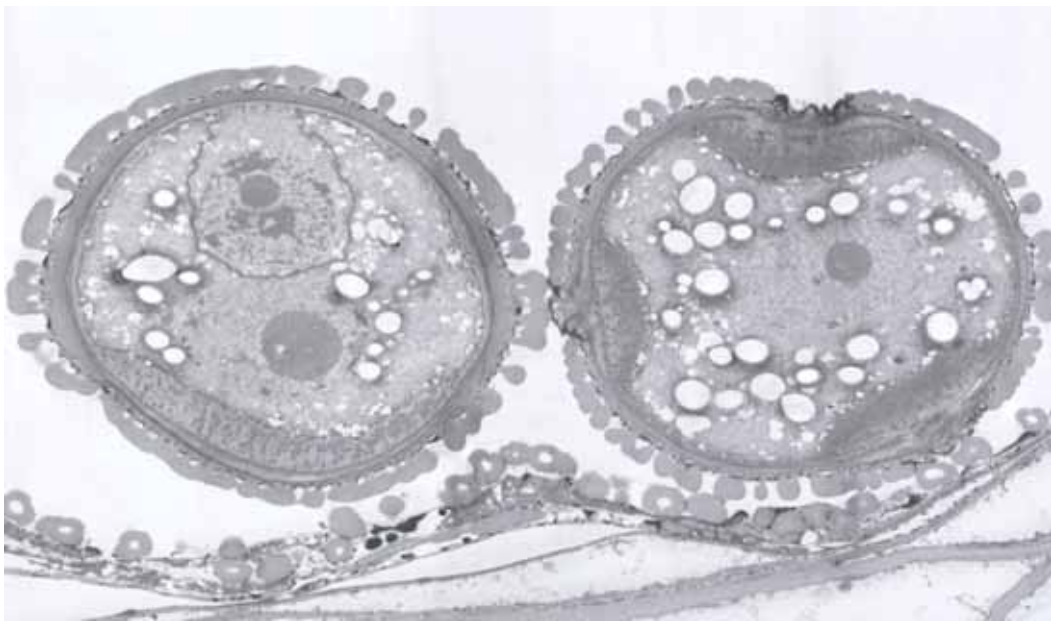


# 國立臺灣博物館計畫報告

孑遺植物昆欄樹小孢子發育微細構造之初探

Brief Results of the microstructure in Microsporogenesis  
of *Trochodendron aralioides* Sieb. & Zucc.



組別：典藏管理組

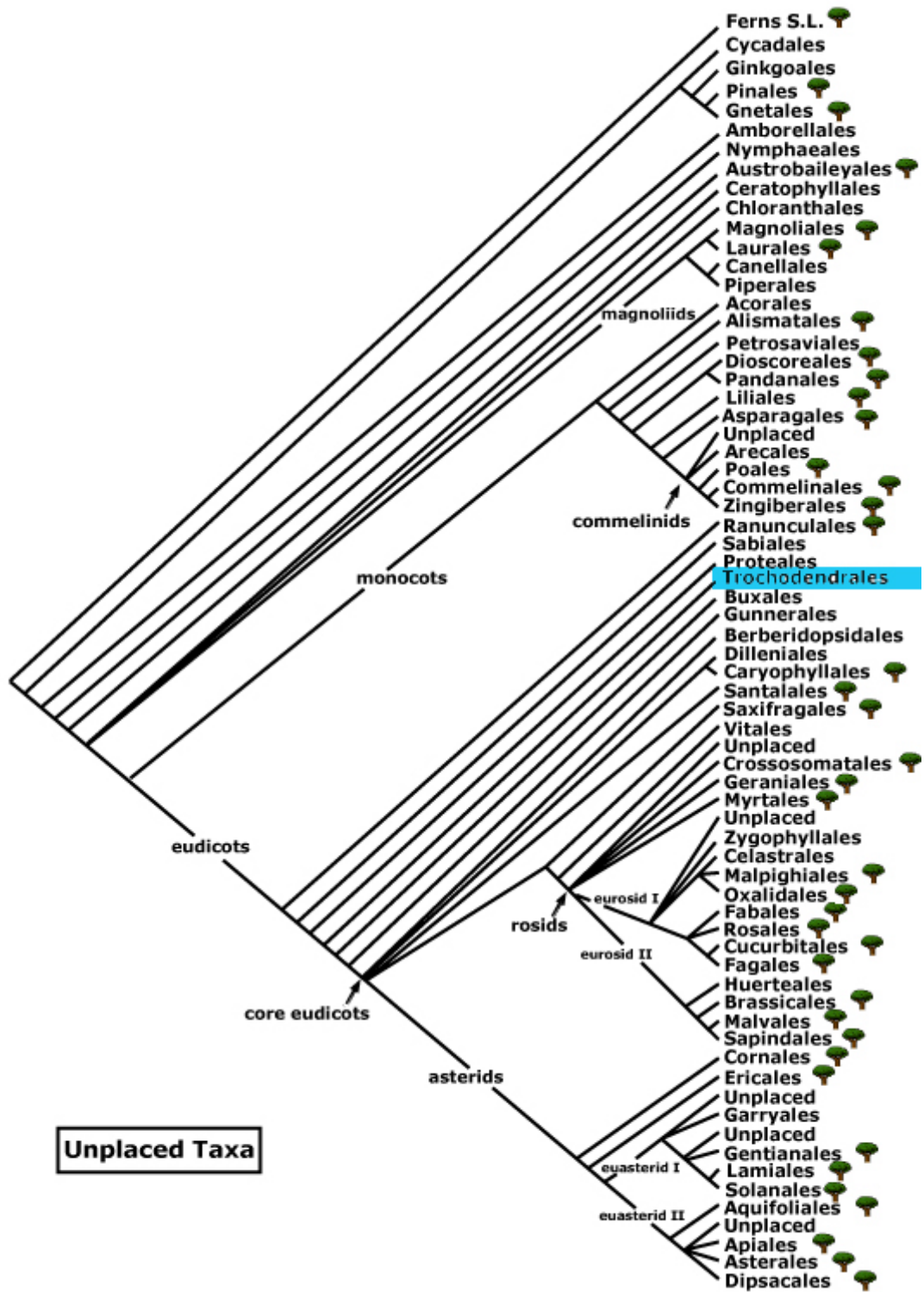
執行人：許毓純 (Yu-Chwen Hsu)

職稱：研究助理

執行期間：民國 96 年 1 月至民國 96 年 12 月

## 前言

昆欄樹的花不具花被片，雄蕊數量頗多，傳輸系統中不具有導管的構造，加上昆欄樹的分佈侷限在日本、琉球群島及臺灣地區，這些特徵都顯示昆欄樹在植物演化的過程中，可能為在一個相當有趣的位置。依 APGII(2003)被子植物分類研究認為昆欄樹所屬的昆欄目 (Trochodendrales)屬於真雙子葉植物，與黃楊目(Buxales，如臺灣黃楊 *Buxus microphylla* Sieb & Zucc var. *intermedia* (Kanehira) L.)及山龍眼目 (Proteales，如蓮花/Lotus/ *Nelumbo nucifera* Gaertner)同位於核心真雙子葉植物之前的數個分支(如圖一)，本計畫主要利用光學顯微鏡及電子顯微鏡觀察此種子遺植物小孢子發育的過程，針對發育過程中花藥腔構造、花粉母細胞的發育、四分孢子形成、花粉壁的發育形式等加以報導及探討。



圖一、Trochodendrales(藍色標記)在 APGII 支序圖的相關位置

## 材料

前往台北縣瑞芳鎮半平山、新店市二格山，及陽明山國家公園觀察紀錄昆欄樹之物候狀況，並採集枝條頂芽，帶回實驗室進行頂芽解剖觀察，以測微尺測量長度後，用鑷子剝除苞片，觀察其頂芽為葉芽或花芽，將花芽以 1% 戊二醛進行前固定，觀察及採集紀錄如表一。

表一、採集紀錄

時間	地點	備註
2006/02/12	瑞芳鎮半平山	
2006/03/04	新店市二格山	
2006/03/05	新店市二格山	
2006/03/19	陽明山國家公園二子坪停車場	已申請採集證
2006/03/30	新店市二格山	
2006/08/06	陽明山國家公園二子坪停車場	已申請採集證
2006/08/09	新店市二格山	
2006/08/12	新店市二格山	
2006/11/05	陽明山國家公園冷水坑	已申請採集證
2006/11/10	新店市二格山	

## 方法

### 塑膠超薄切片及穿透式電子光學顯微鏡檢定

#### (一) 超薄切片材料備製：

取採集後固定於 1% 戊二醛之花序，切下花藥並迅速置入 2.5% 戊二醛固定液中，震盪 4 小時後，以 phosphate buffer 清洗三次，每次 15 分鐘。再以 1% 鉻酸做後固定，震盪 2 小時後，以 phosphate buffer 清洗三次，每次 15 分鐘。經丙酮系列(15%-30%-50%-70%-85%-90%-100%)脫水，再以 Spurr resin 滲膠，開始以 Spurr：丙酮 = 1：3，在室溫下震盪 5 小時；接著進行 Spurr：丙酮 = 1：1 滲膠，在室溫下震盪 5 小時；接著進行 Spurr：丙酮 = 3：1 滲膠，在室溫下震盪 5 小時；接著進行純 Spurr 滲膠，在室溫下震盪 5 小時後，即可進行包埋。包埋後，置入 70 真空烘箱進行聚膠，時間為 8-12 小時。

#### (二) 切片：

##### (A) 後切片確認材料發育時期：

以 Leica Knife Maker II 製刀機製作玻璃刀，配合 Ultratome Super Nova 型超薄切片機將膠塊切程 70nm 的厚切片，以竹籤撈取切片，置於滴上蒸餾水的載玻片上，以氯仿(choloform, CHCl<sub>3</sub>)使切片展平，並將載玻片置於加熱板上，使水分蒸發，切片黏附於玻片。以 1% 甲苯氨藍(1% Toluidine blue in 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(aq), pH=11.1) 染色，再以蒸餾水洗去多於染劑，烘乾後於 Leica 光學顯微鏡觀察並拍照，以確認材料時期。

(B)超薄切片備製：

使用超薄切片機(Reichert Ultracut E)，以玻璃刀將材料切成90nm 黃金色或白銀色的薄片，將薄片撈在50 mesh 或單孔的銅網(grid)上，並進行雙重染色，包括5%醋酸鈾(uranyl acetate)前染色及檸檬酸鉛(lead citrate)後染色。完成後，以穿透式電子顯微鏡(Hitachi H-7100 型)觀察，並拍照紀錄。

## 結果

昆欄樹小孢子發育時期

(一)小孢子母細胞 ( Microspore mother cell )形成時期。

二月中旬為花藥腔發育階段，觀察到小孢子母細胞呈現角型，如圖二 A、B，靠中心位置屬小孢子母細胞群的細胞細胞質濃稠，屬花藥腔的外壁細胞群，可見明顯的外壁(epidermis)、花藥內壁(endothecium)，中介層(middle layer)、營養層(tapetal layer)及小孢子母細胞(microsporocytes)已進行分裂，但是細胞之間的區分並不清楚。

(二)細胞分裂時期

三月中旬為小孢子發育的活躍階段，可在同一花序中觀察到小孢子母細胞、四分體、自由小孢子三時期，如圖二 C 小孢子母細胞內的染色體正在聚集，準備進行減數分裂，花藥細胞壁組成為 1 層外壁(epidermis)、1 層加厚的花藥內壁 (endothecium)，2 層已被擠壓的中介層(middle layer)、1 層營養層(tapetal layer)。

細胞核分裂時期如圖三，2 層中介層已有被擠壓的情況，小孢子母細胞細胞核已進行分裂，部份可見 2 個細胞核，此時營養層細胞內及花藥腔首次看到圓形的顆粒狀構造的烏氏體(Ubisch body)。

四分小孢子初期如圖四，剛減數分裂的 4 個小孢子被 callose 包圍，細胞周圍呈現三角形，部分切面可見 2 或 3 個細胞單位，可見細胞質正在分裂的情形；。圖五中 callose wall 未完整成形，細胞間仍有聯絡通道呈現不連續的情況，推測 callose wall 是由外向內的方向發育。

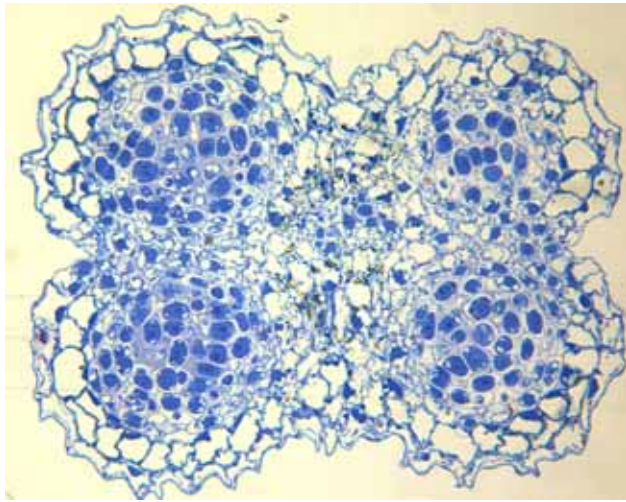
圖六中細胞質分裂已完成，可見同一個小孢子母細胞減數分裂出的 4 個小孢子包覆在同一組 callose wall 中，此時的圓形顆粒狀構烏氏體數量更多，分布的位置主要在營養層細胞中、花藥腔營養層內側

壁及四分孢子周圍，由穿透式電子顯微鏡的觀察，如圖七可見花藥腔的各層構造，外壁的外側有波浪突出的角質，花藥內壁加厚情形依舊，可在其細胞中觀察到電子密度很高的內含物質，四分小孢子所包裹的 callose wall 最外側還有一層 callose coat，其電子密度比較高，此時的小孢子細胞核仍佔據細胞很大的比例，細胞內含物亦相當濃稠；此時的烏氏體在高倍的觀察下，為電子中等物質構成圓形或橢圓形主體，周邊有電子密度較高的物質附著(圖八)。在三月中旬大部分的小孢子發育主要都在四分體時期，但也可見自由小孢子已由 callose wall 完成釋出(如圖九)。

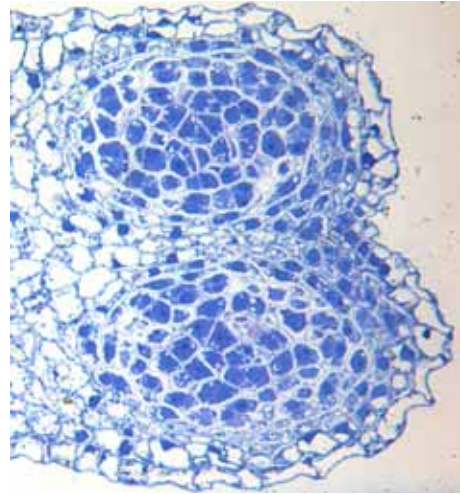
### (三)自由小孢子

三月底花序抽出展開，此時小孢子外壁發育接近完成，四分孢子體周圍的 callose wall 開始瓦解，小孢子由其中釋放出來，可在這時期的不同花藥腔中觀察到具有 1 個細胞核的自由小孢子(如圖十)，及 2 個雙細胞的花粉(如圖十四)，由電子顯微鏡觀察此時的花粉，由圖十一看到下方為溝孔區側面花粉內壁加厚，此切面為兩極的縱切，可清楚分辨其營養核(vegetative nucleus)及較小的生殖核(generative nucleus)；由圖十二可見三個花粉孔區，為接近赤道面的橫切面，此切面僅見一細胞核，應為營養核；細胞質中，散布許多澱粉粒。溝孔區的花粉壁構造與其他區域不同，外壁外層的結構不完全，具有較厚的外壁內層，及約外壁 2 倍厚的內壁。此時期營養層細胞已瓦解(如圖十三 A 及 B)，烏氏體形狀呈現不規則的棉花糖狀，部分烏氏體切面為有圓形空心，烏氏體電子密度與花粉壁的外壁外層類似，也可在正在瓦解的營養層細胞內側發現烏氏體的存在。

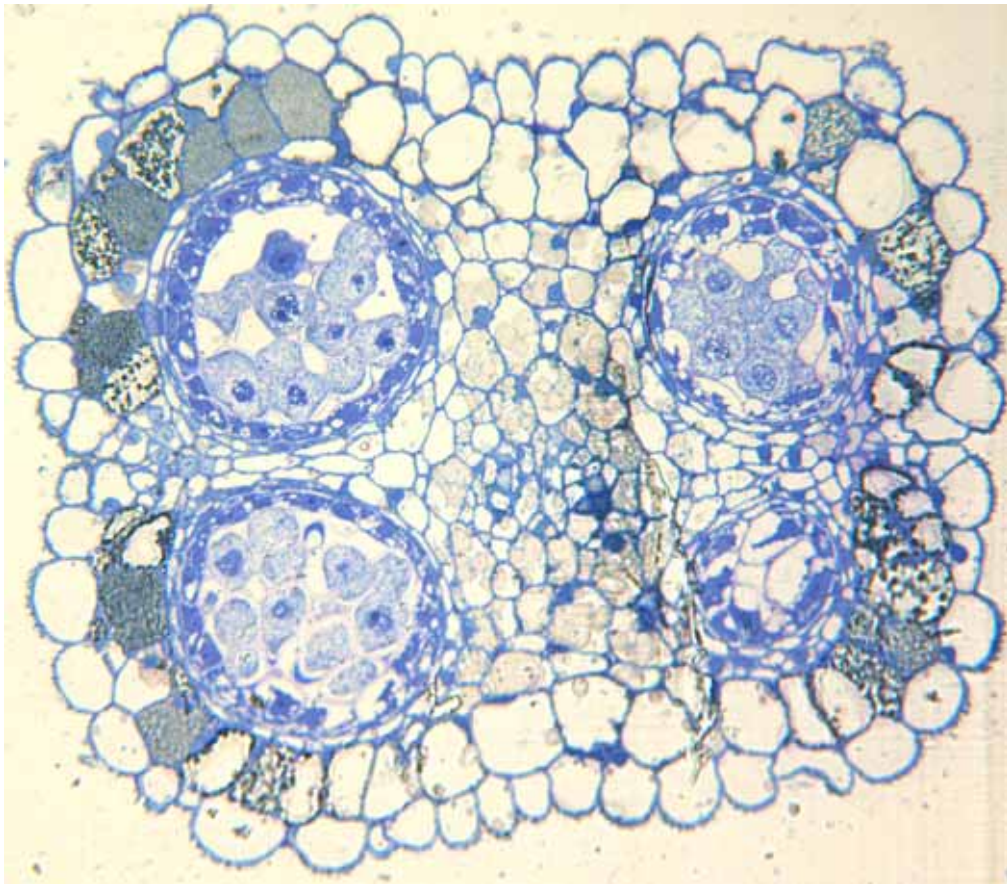




A

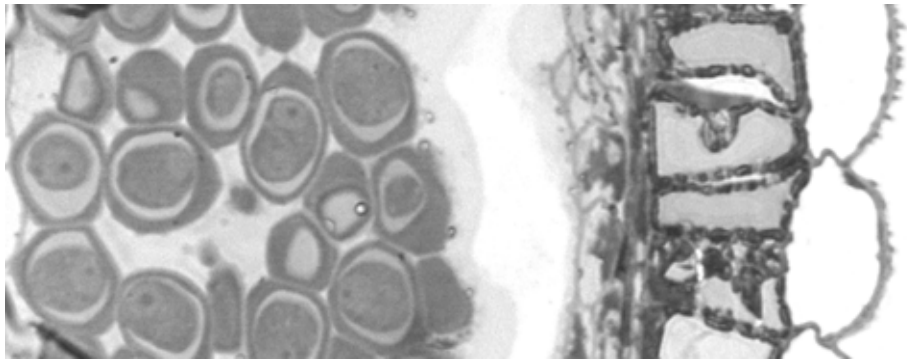


B

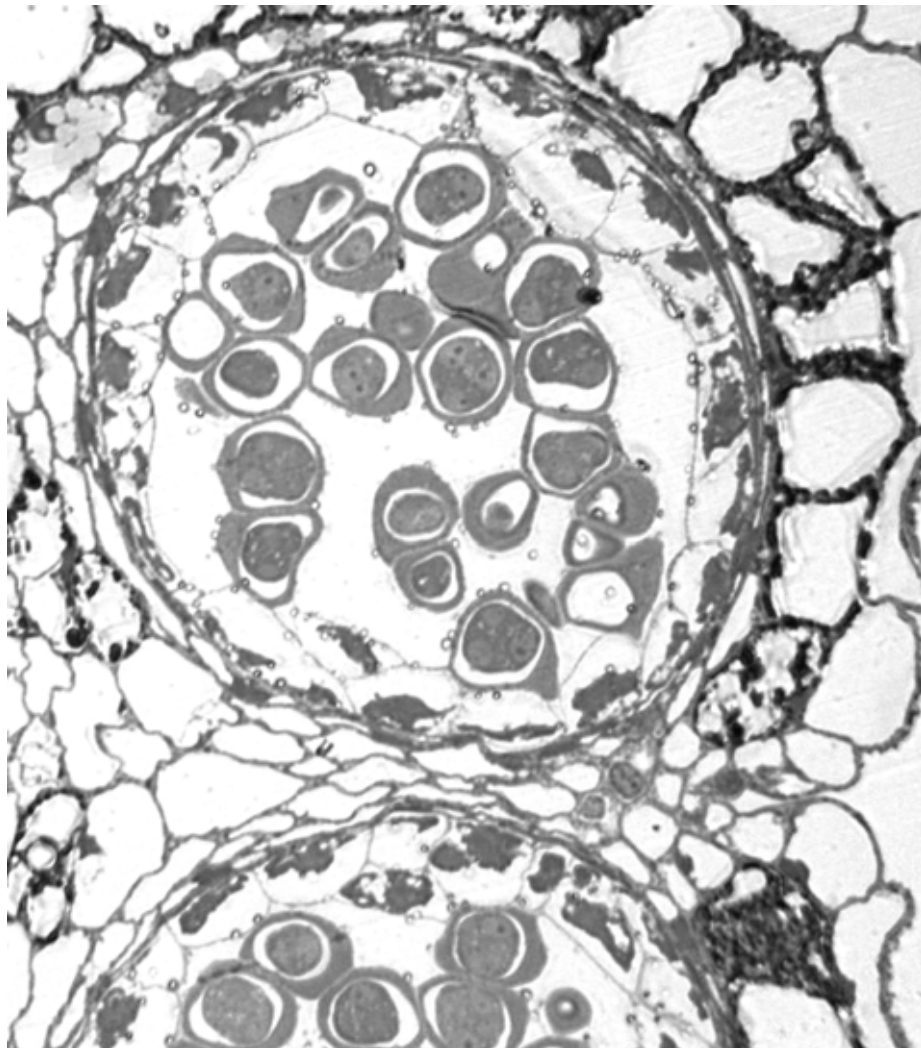


C

圖二、小孢子母細胞(Microspore mother cell)時期(A : 2-B3 , B : 2-C4 , C : 3-B6)

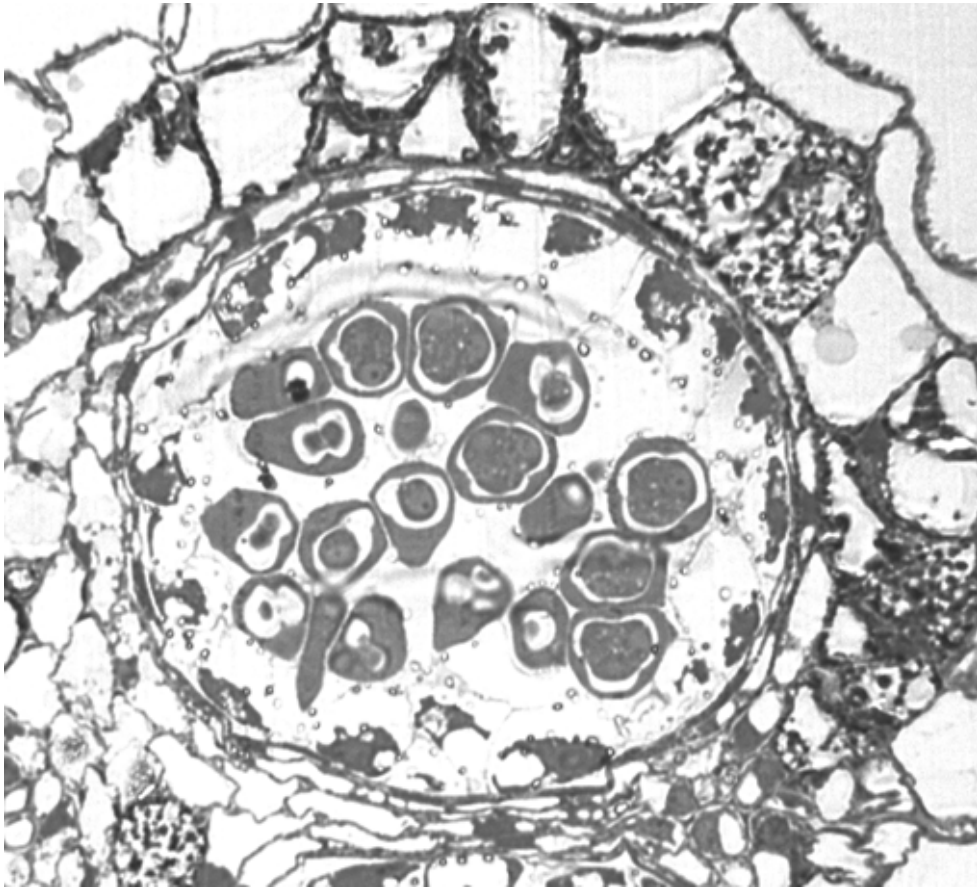


A

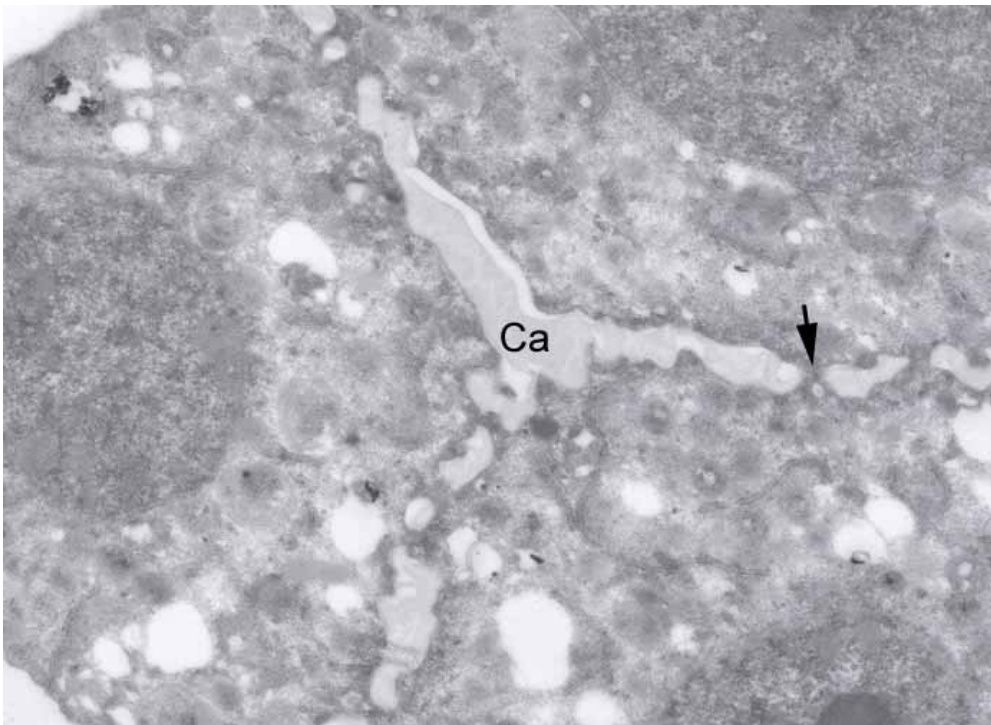


B

圖三、細胞核已分裂之細胞，細胞周圍被 callose wall 包覆(A：3-A5，B：4-B1)。

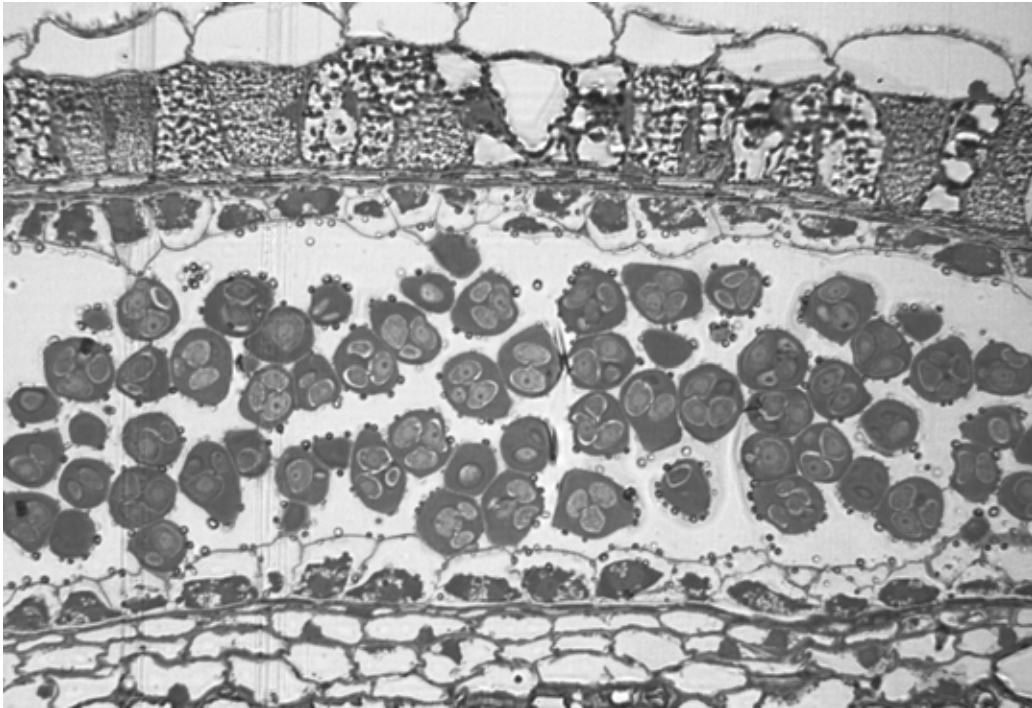


圖四、細胞核已分裂之細胞，細胞周圍被 callose wall 包覆，細胞周圍呈現三角形，部分細胞可切到 2 或 3 個細胞單位，是為形成細胞質分裂的情形(4-C2)

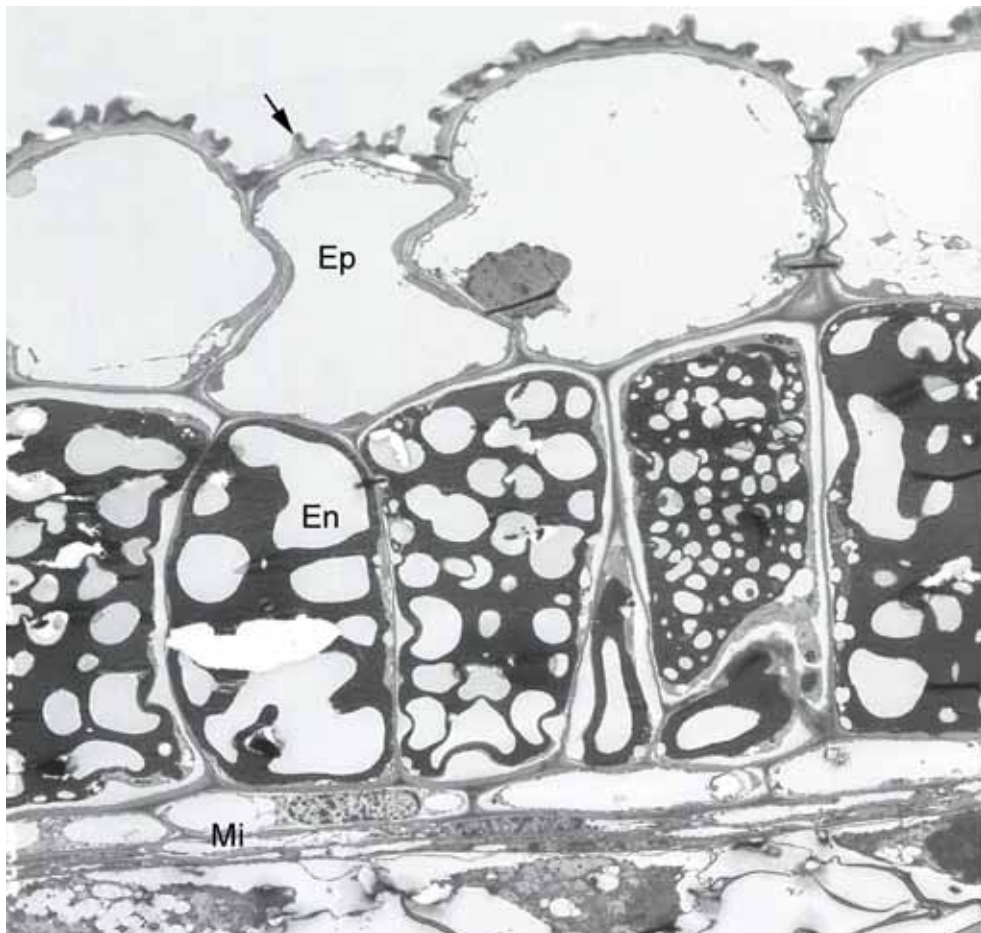


圖五、四分孢子初期 callose wall 尚未完全成行，如箭頭處仍有胞胞聯絡通道。

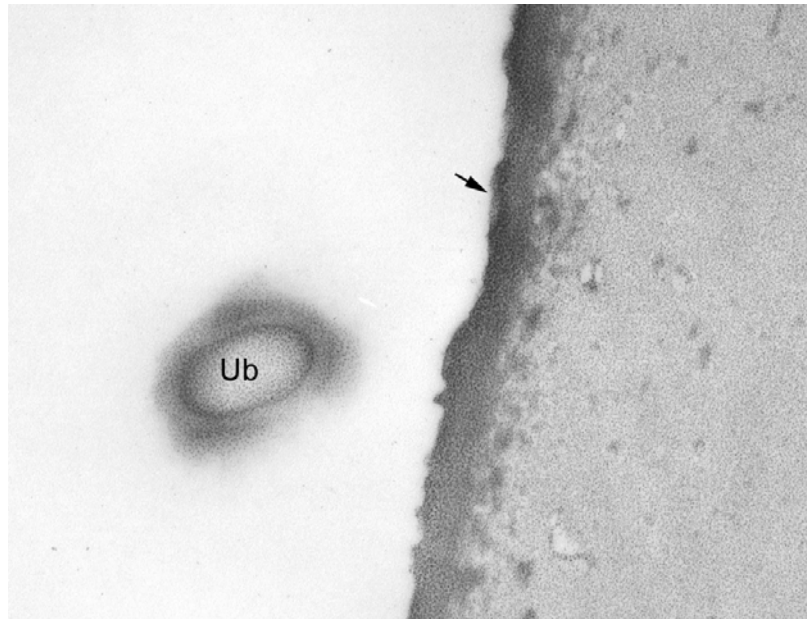
Ca : Callose wall



圖六、細胞核完成分裂之細胞周圍被 callose wall 包覆，細胞質也已完成分裂 (5-C3)

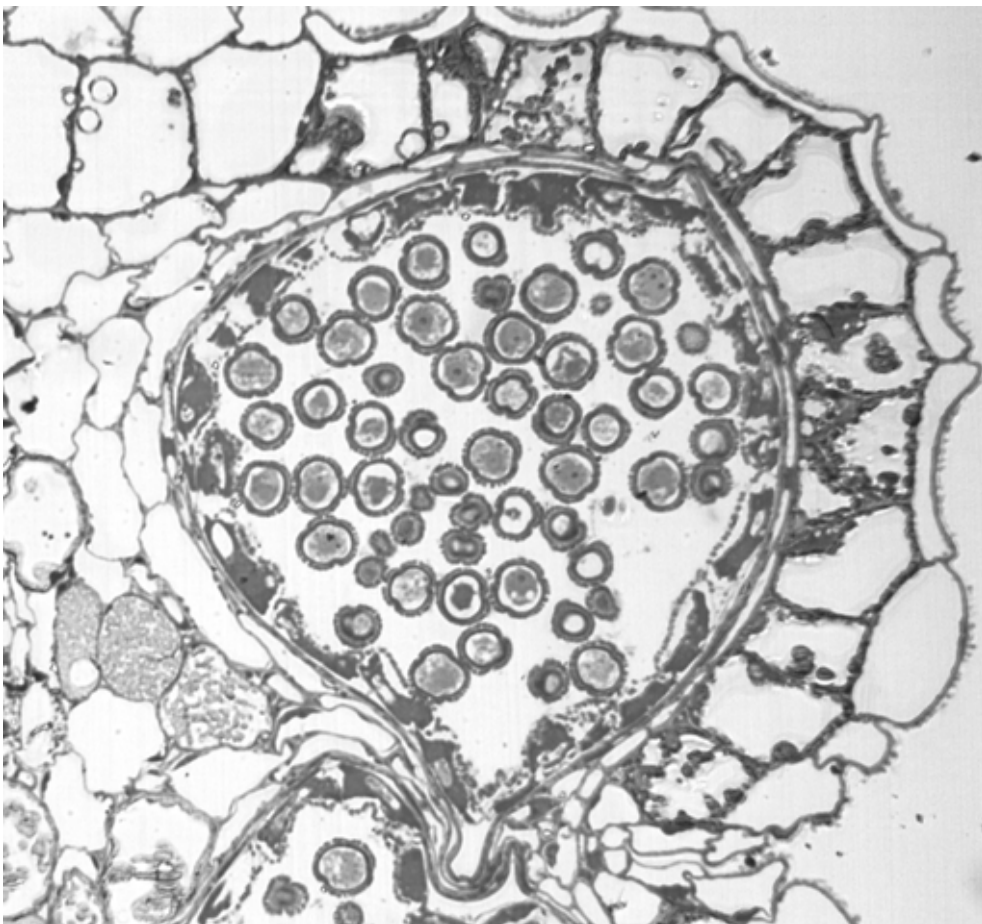


圖七、四分孢子時期的花藥腔細胞壁，箭頭處為加厚角質。Ep : epidermis 外壁，  
En : endothecium 花藥內層，Mi : middle layer 中介層。

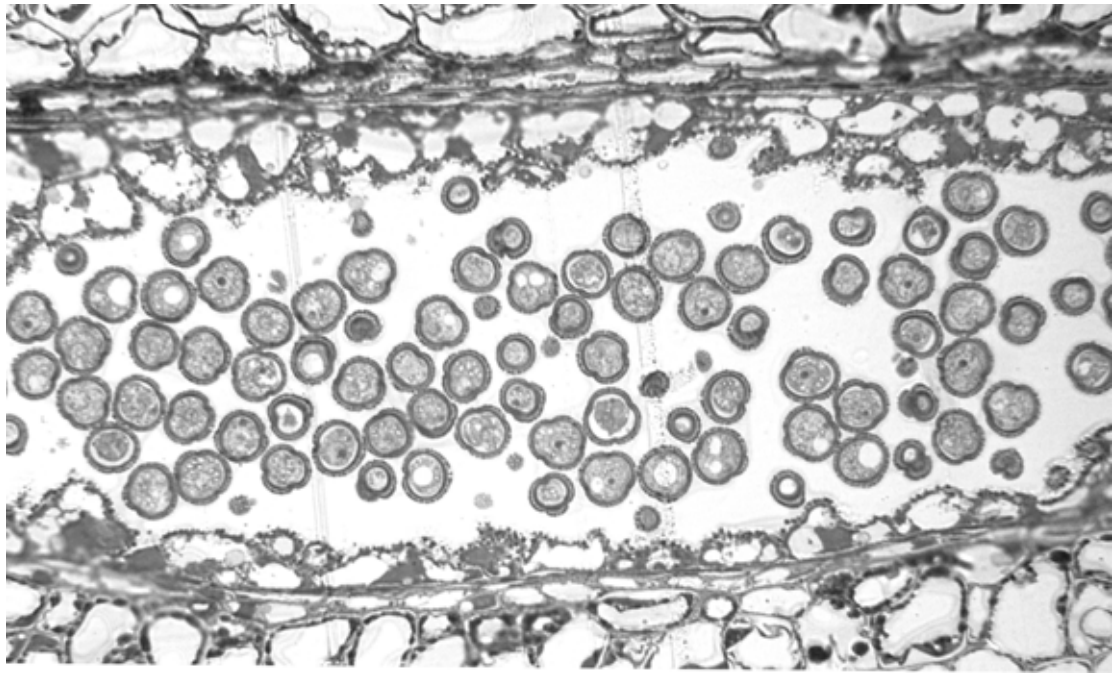


圖八、四分孢子時期的 callose wall 最外側還有一層 callose coat(如箭頭處)。

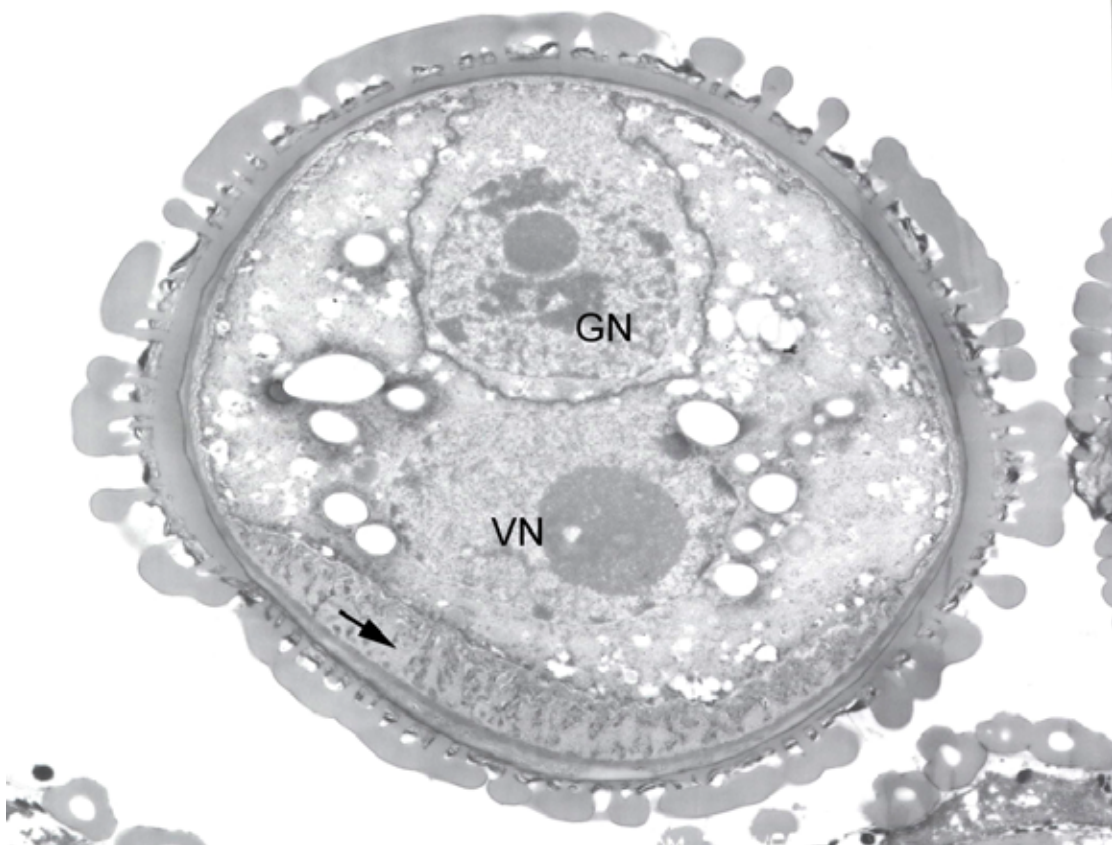
Ub : Ubisch body 烏氏體。



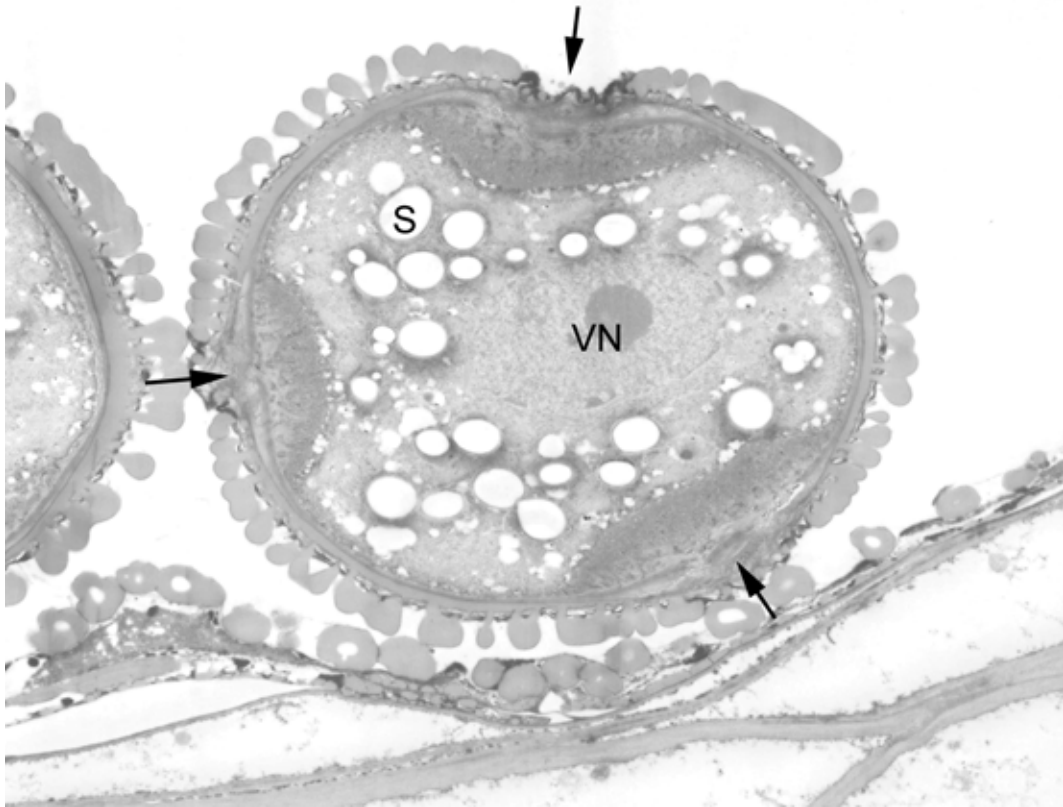
圖九、callose wall 已瓦解，自由小孢子被釋放出來(3-C5)。



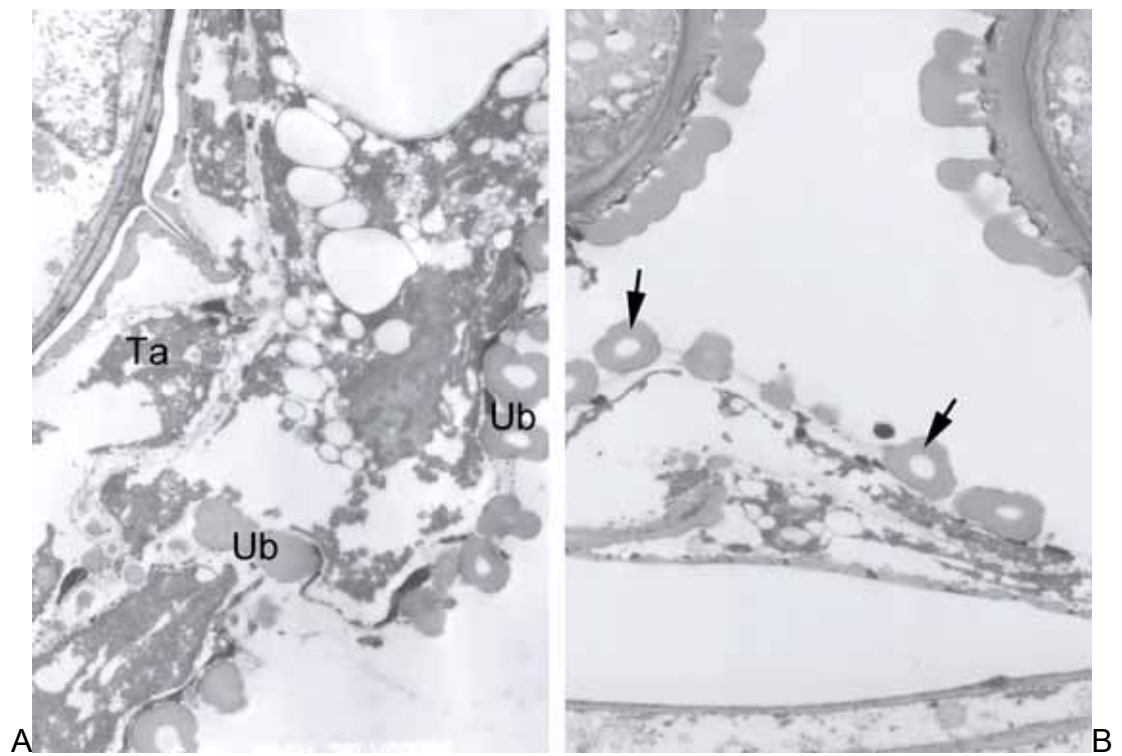
圖十、callose wall 已瓦解，單核自由小孢子被釋放出來(6C-4)。



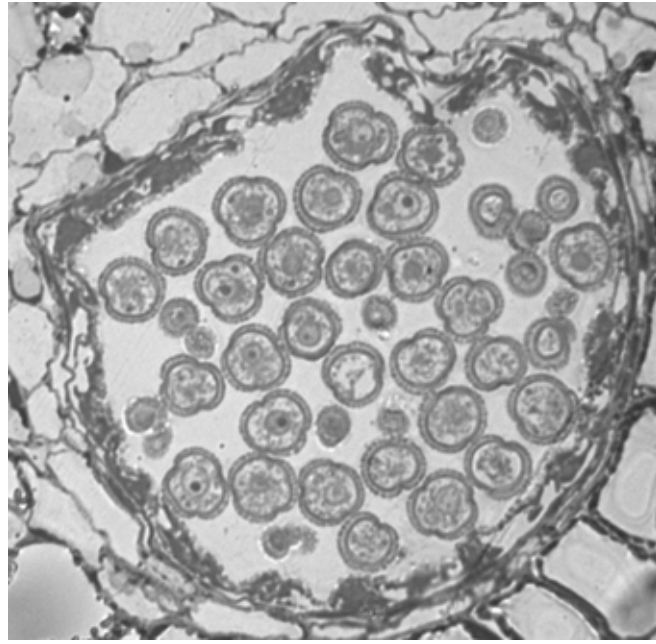
圖十一、自由小孢子時期花粉縱切面，箭頭處為溝孔區的花粉內壁加厚。GN：generative nucleus，VN：vegetative nucleus。



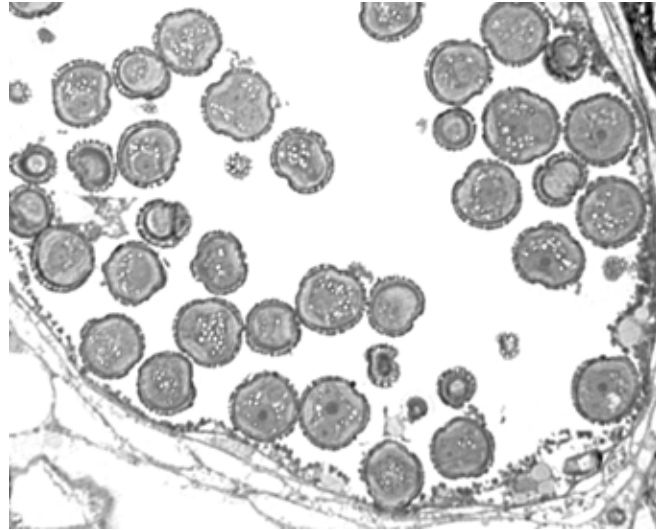
圖十二自由小孢子時期，花粉赤道橫切面，箭頭處為溝孔區的花粉內壁加厚。S：starch grain 澱粉粒，VN：vegetative nucleus 營養核。



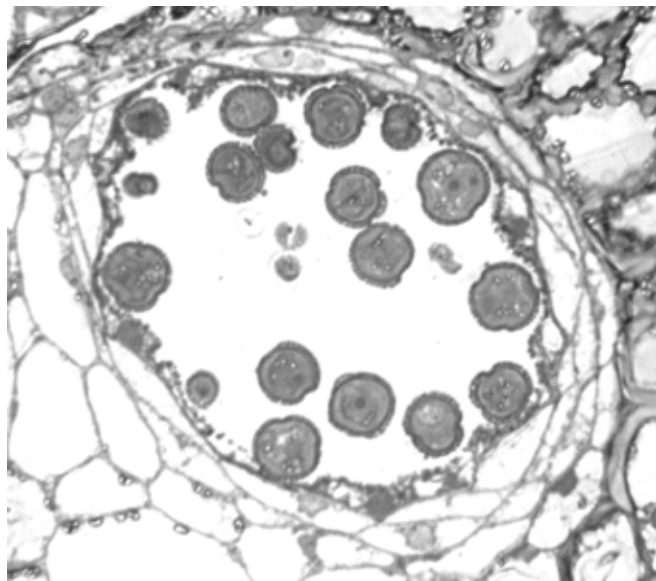
圖十三、自由小孢子時期已營養層瓦解，烏氏體有中空的现象。Ta：tapetal layer 營養層，Ub：Ubisch body 烏氏體



A



B



C

圖十四、小孢子細胞核經有絲分裂形成的雙細胞花粉粒 (A: 6D-4, B、C: 8d-5)。



## 結論

本年度計畫所觀察到昆欄樹小孢子形成的部份時期的微細構造，主要利用塑膠厚切片方法初步觀察到昆欄樹小孢子發育的各個主要時期，包括小孢子母細胞、小孢子母細胞核減數分裂、核減數分裂後的細胞質分裂、自由小孢子、及含有兩個生殖細胞的花粉粒。

再以其各時期包埋材料進行超薄切片，獲得部份時期的微細構造，昆欄樹的小孢子發育過程，在花藥壁的分層上共有四大層，包括1層外壁、1層加厚的花藥內壁，2層已被擠壓的中介層、1層營養層，較近似真雙子葉植物，但由小孢子母細胞開始進行分裂時期，即可明顯觀察到球狀的烏式體；自由小孢子時期烏式體的形態則呈現中空棉花糖狀，此種現象則較常見在裸子植物或是被子植物基群中。

## 參考文獻

- 李宜玲。2003。日本紫花鼠尾草花部發育、小孢子形成和花粉發育之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 林玉琪。1998。絲瓜的雄花發育與花粉發育之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 陳香君。2000。毛西番蓮的花器發育和小孢子形成。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- 黃增泉。1993。植物分類學-台灣維管束植物科誌。南天書局有限公司。
- 劉茂森。1997。金銀花花部發育、小孢子形成與花粉壁發育之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
- Croizat, L. (1947) *Trochodendron*, *Tetracentron*, and Their Meaning in Phylogeny. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 74(1):60-76.
- Endress, P. K.(1986) Floral Structure, Systematics, and Phylogeny in Trochodendrales. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73(2):297-324.
- Foster, A.S.(1945) Origin and Development of Sclereids in the Foliage Leaf of *Trochodendron Aralioides* Sieb. & Zucc.. *American Journal of Botany* 32(8):456-468.
- Furness, C. A. , Rudall P. J.,& Sampson, F. B. (2002) Evolution of Microsporogenesis in Angiosperms. *I. J. of Plant Sci.* 163(2):235-260
- Hermann, P. M. & Palser, B. F. (2000) Stamen development in the Ericaceae. I. Anther wall, microsporogenesis, inversion, and appendages. *American Journal of Botany*.87:934-957
- Huang, S.-F., S.-Y. Hwang, J.-C. Wang and T.-P.Lin (2004) Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography* 31, 1251–1259.
- Shimada, H et al (1971 ) Constituents of leaves of *Trochodendron aralioides* Sieb. et Zucc. *Yakugaku Zasshi*. 91(4):492-3.
- Shimamura , M. et al. (2004)  $\gamma$ -Tubulin in Basal Land Plants: Characterization, Localization, and Implication in the Evolution of Acentriolar Microtubule Organizing Centers. *The Plant Cell* 16:45-59
- Wu, J.-E., S. Huang, J.-C. Wang and W.-F. Tong( 2001) Allozyme Variation and the Genetic Structure of Populations of *Trochodendron aralioides*, a Monotypic and Narrow Geographic Genus. *J. Plant Res.*114: 45-57.