

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會

作者說明書

高中組生物(生命科學)科

040721

國立內壢高級中學

指導老師姓名

施小玲

作者姓名

林志豪

鄭淑穎

李坤璋

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會
作品說明書

科 別：生物科

組 別：高中組

作品名稱：大安水蓼衣花粉粒的發育

關 鍵 詞：大安水蓼衣、花粉粒

編 號：

目錄

壹、摘要.....	1
貳、研究動機.....	2
參、研究目的.....	2
肆、研究項目.....	2
伍、研究材料.....	2
陸、研究方法.....	2
柒、研究結果.....	4
捌、討論.....	5
玖、結論.....	6
拾、未來研究方向.....	6
拾壹、參考資料.....	7
拾貳、表.....	8
拾參、圖.....	13
拾肆、附圖.....	21

壹、摘要

一、本次活動觀察大安水蓼衣大安族群與清水族群的小孢子發育，發現：

(一)兩族群小孢子發育，都有不同步的情形，大安族群中有 23% 花藥中小孢子發育不同步，清水族群有 8% 花藥中小孢子發育不同步。

(二)兩族群的成熟花粉粒都有不正常的花粉粒，大安族群產生成熟花粉粒中有 40% 不正常花粉粒，清水族群產生成熟花粉粒中有 55% 不正常花粉粒。

(三)結合上述觀察結果計算一個花藥在開裂時，大安族群釋出成熟且正常的花粉粒機率為 46%，清水族群釋出成熟且正常的花粉粒機率為 41%。

二、根據本活動觀察，我們推論：

(一) 大安水蓼衣有性生殖障礙發生在授粉之前。

(二) 大安水蓼衣小孢子發育在小孢子四分體期(II)是花粉粒敗育(不稔性)發生的關鍵時期。

貳、研究動機

在某堂生物課，由老師口中得知大安水蓼衣(*Hygrophila pogonocalyx* Hayata)是台灣特有植物，雖然開花茂盛，但是結實率很低，因此，想要探討其不結實的機制。

教材相關單元：生命科學(上)第四章 植物的生殖、生長和發育
生物(上)第二章 探討活動 1-2 顯微測量技術。

參、研究目的 了解大安水蓼衣花粉粒發育過程與不稔性的相關性

肆、研究項目 大安水蓼衣花粉粒發育過程

伍、研究材料

植物：從台中縣大安鄉(大安族群)及清水鎮(清水族群)採集大安水蓼衣枝條，在校園內扦插(圖 1)，於開花期採取各發育階段的花藥。

藥品：酒精(久島製藥 試藥壹級)、冰醋酸(久島製藥 試藥壹級)、蒸餾水、Carminc (久島製藥 試藥壹級)。

器材：玻璃瓶、滴管、載玻片，蓋玻片、酒精燈、打火機、濾紙、測微尺、游標尺、廣口瓶、簽字筆、標片盤、鑷子、解剖針、刀片、拭鏡紙、單眼複式光學顯微鏡(PoToPLllooA)、複式生物顯微鏡(PoToP PB-3000)、數位顯微攝影機(Leica Dc300F)台大植病系劉瑞芬教授提供、數位相機(Canon 10D)

陸、研究方法

一、花藥採集固定：

(一)利用修枝剪採取大安水蓼衣開花枝條，大安族群與清水族群分別處理。

(二)去除花被片，保留雌雄花蕊，立即放置在酒精和冰醋酸 3：1 之玻璃瓶中固定於 4°C 冰箱中過夜。

(三)24 小時之內以 70%酒精換洗三次，每次 2—3 分鐘，最後保存於 70%酒精，於冰箱冷凍層備用。

二、染劑製備：Acetocarmine 為 45%醋酸中之飽和溶液，其配製法為 Carminc 0.5g、45%冰醋酸 100ml，兩者混合，一面攪拌，一面慢慢加熱至沸騰約 5 分鐘。在室溫下自然冷卻，過濾後使用。

三、玻片標本製備：

(一)從冰箱取出花藥，放置在載玻片上，用游標尺測量長、寬，並記錄之。

(二)將花藥橫切成一半，用解剖針和鑷子自切口處輕輕擠壓出花粉粒。

- (三)加一滴 Acetocarmine，用解剖針輕輕攪拌並將花藥壁組織移去。
- (四)蓋上蓋玻片，以酒精燈微火加熱讓多餘水分蒸發。
- (五)在複式光學顯微鏡 400X 底下觀察。
- (六)每一樣本以測微尺量測不同發育階段細胞的大小，並分別紀錄之。

四、顯微鏡攝影：

- (一)將製備好的玻片標本置於光學顯微鏡下觀察。
- (二)用 10×40X 或 10×10X 倍率找出合適細胞。
- (三)切換至顯微鏡攝影機，調節適當速度、焦距，按下快門。

五、花粉粒發育分期：因本校沒有螢光顯微鏡，花粉粒發育觀察採用 acetocarmine 染色後，以光學顯微鏡檢視。

- (一)在複式光學顯微鏡下用 10×40X 倍率觀察各細胞。

花藥內的小孢子依發育過程分期紀錄：

分期	說明
I	小孢子母細胞
II	小孢子四分體
III	花粉粒

- (二)量測細胞大小(圖 2)：

1. 先將接目鏡向左旋轉，卸下透鏡後，放入目鏡測微器。
2. 在載物台上置一載物台測微器。該測微器為一長方形玻片，其上刻有一段畫分為 100 個小格的 1mm 直線，即載物台測微器每一小格的寬度為 0.01mm(10 μ m)。
3. 使用左眼檢視，移動載物台測微器之一端刻度與目鏡測微器重疊成一線，再檢視另一端刻度重疊，則目鏡測微器一小格之大小則可計算如下：

$$\begin{aligned} & \text{目鏡測微器每一小格的大小}(\mu\text{m}) \\ & = 10\mu\text{m} \times \text{載物台測微器之格數} / \text{目鏡測微器之格數} \end{aligned}$$

- (三)花粉粒觀察：經 acetocarmine 染色後，在 10×40X 光學顯微鏡視野下觀察

1. 正常(有活性)花粉粒：細胞質(cytoplasma)紅色且飽滿、花粉外壁(exine)界線明確。
2. 不正常花粉粒：細胞質不飽滿，與花粉外壁之間有明顯未染色的空間。

柒、研究結果

一、花的外部型態

大安水蓼衣花(圖 3)淡藍紫色，無柄，叢生葉腋，花冠筒狀約 2.5cm，瓣緣二唇形，上唇瓣直立，二淺裂，下唇瓣三深裂，表面有深色斑點形成蜜源標誌，並被覆有短毛；雄蕊(圖 4)四枚，二長二短爪字藥，雌蕊花柱全緣，在花中排列雌蕊較雄蕊高。

二、花粉粒發育

本校沒有螢光顯微鏡，花粉粒發育過程及活性是根據 acetocarmine 染色後，在光學顯微鏡下觀察記錄，根據本活動觀察將大安水蓼衣花粉粒發育分為三個時期，依發生先後次序分為小孢子母細胞期(I)、小孢子四分體期(II)、花粉粒期(III)。

大安水蓼衣大安族群(圖 5)與清水族群(圖 6)的小孢子母細胞外形呈圓形，經染色後，可以清晰看到紅色細胞質及透明無色胼胝質(callose)。小孢子四分體是小孢子母細胞經減數分裂形成，小孢子四分體排列在一平面上或排列呈四分錐體型。大安水蓼衣的成熟正常花粉粒極面呈圓形，有 4 個萌發孔，經染色後，可以觀察到透明外壁及紅色的細胞質。

在大安水蓼衣花粉粒發育過程(表一)中，小孢子母細胞內徑約 $67 \mu\text{m}$ (大安族群)、 $63 \mu\text{m}$ (清水族群)，經減數分裂產生小孢子四分體內徑約 $47 \mu\text{m}$ (大安族群)、 $39 \mu\text{m}$ (清水族群)，發育為成熟花粉粒時內徑 $50 \mu\text{m}$ (大安族群)、 $54 \mu\text{m}$ (清水族群)，細胞內容物體積有逐漸增加的現象。

觀察大安水蓼衣大安族群 13 朵花(表二)，共 52 個花藥，其中有 25 個(約 48%)花藥中出現不正常花粉粒(圖 7)，在全部觀察 2605 個花粉粒中，有 1570 個正常有活性花粉粒，不正常花粉粒有 1035 個，即大安水蓼衣大安族群成熟花粉粒，約有 60%(表四、圖 8)是正常有活性的花粉粒，不正常花粉粒約佔 40%。

觀察大安水蓼衣清水族群 13 朵花(表三)，共 52 個花藥，其中有 27 個花藥(約 52%)中出現不正常花粉粒(圖 9)，在全部觀察的 2613 個成熟花粉粒中，有 1179 個正常有活性花粉粒，不正常花粉粒為 1434 個，即大安水蓼衣清水族群成熟花粉粒中約有 45%(表四、圖 8)是正常有活性花粉粒，不正常花粉粒約佔 55%。

三、不同步花粉粒發育

在觀察大安水蓼衣大安族群 13 朵花(表二)，有 3 朵花(約 23%、表四、圖 10)的 4 個花藥中，小孢子發育不同步，即在同一個花藥中，有一個以上小孢子發育期正在進行；有 10 朵花約 77%的 4 個花藥，小孢子發育是同步，即在同一朵花中，各花藥中小孢子發育是屬於同一發育期。

在觀察大安水蓼衣清水族群 13 朵花中(表三)，有 1 朵花(約 8%、表四、圖 10)的 4 個花藥中，小孢子發育不同步，即在一個花藥中，可以發現同時有三個小孢子發育期正在進行；有 12 朵花(約 92%)的 4 個花藥中，小孢子發育是同步，2 朵正處於小孢子母細胞期，3 朵處於小孢子四分體期。

捌、討論

大安水蓼衣是台灣特有種植物，四十年前台中縣臨海鄉鎮溝渠濕地數量很多，但是經濟發展對土地需求增加，大安水蓼衣棲地減少，加上競爭力不足，野外族群估計僅餘 1000 株，目前僅見於台中縣大安鄉，清水鎮，龍井鄉及在宜蘭頭城新發現的疑似大安水蓼衣的族群，但是特有生物中心分別在南庄村、烏石坑扦插已復育成功，本次科展在本校校園成功扦插繁殖約有 100 盆，顯示大安水蓼衣在台中縣以外的地區也能適應良好，在我們搜尋特有生物中心公告的保育物種名單中，沒有看到大安水蓼衣列名其中。

根據特有生物中心調查記錄，大安水蓼衣僅在大安鄉有結實，其他地點尚無結實記錄。根據本活動觀察，大安水蓼衣花雌蕊高於雄蕊的排列方式(圖 3、圖 4)，有利於異花授粉，花瓣下唇有蜜源標誌(圖 3)，且提供降落平台可協助授粉者停留，花期長達 3 個月左右，花期中也有授粉者蜜蜂進出(圖 11)，均為有利於有性生殖發生的條件，但是在自然界中的族群卻普遍表現出有性生殖障礙，結實率低或不結實，因此，我們推論，大安水蓼衣有性生殖障礙應該發生在授粉之前，或是與花粉粒的活力、壽命有關。

本校沒有螢光顯微鏡進行花粉粒活性檢定，因此利用 acetocarmine 染色檢定花粉粒可孕性 (sterility) 作為活性追蹤觀察。花粉粒發育過程在小孢子四分體期，主要是碳水化合物醣類的堆積，醣類與花粉的活性及壽命有關，小孢子四分

體也需經過一次有絲分裂，形成生殖細胞以及營養細胞，供將來受精作用之用。已有研究報告指出許多木本植物花粉中，因缺乏各種碳水化合物的累積，花粉因而失去活性，造成不稔性。在文心蘭的研究也發現，文心蘭在開花時，原已分裂完成的生殖細胞和營養細胞卻快速萎縮，造成小孢子敗育。根據本活動的觀察，大安水蓼衣花粉粒發育過程(表二、表三)，發現小孢子母細胞期(I)及小孢子四分體期(II)均無異常的記錄，進入花粉粒期(III)之後，成熟花粉粒中即出現為數不少的不正常花粉粒，因此，我們推論，小孢子四分體期是大安水蓼衣花粉粒發育發生雄不稔性(male sterility)的關鍵階段。

根據本活動的觀察，大安族群和清水族群的花藥均有不同步發育的情形，成熟花粉粒中也有相當比例不正常花粉粒(表四)，由此推算每個花藥開裂釋出的花粉粒中，大安族群產生成熟且正常的可孕性花粉粒約佔全部釋出花粉粒 46%(圖 12)。清水族群產生成熟且正常的可孕性花粉粒約佔全部釋出花粉粒的 41%。因此我們推論大安水蓼衣生產成熟且正常可孕性的花粉粒的比率低，是自然族群大安水蓼衣有性生殖障礙不結實的原因之一。

玖、結論

根據本活動的觀察，大安水蓼衣已經演化出異花授粉的機制，應可發揮授粉功能，但是大安水蓼衣自然族群普遍結實率低，顯示有性生殖障礙存在於自然族群中，大安水蓼衣小孢子發育在小孢子四分體期(II)是花粉粒敗育(不稔性)發生的關鍵時期。我們推論大安水蓼衣釋出成熟且正常的可孕性花粉粒機率低，應該是大安水蓼衣自然族群結實率低的原因之一。

拾、未來研究方向

- 一、探討大安水蓼衣小孢子四分體至成熟花粉粒發育期中，醣類、蛋白質、脂質的變化
- 二、探討大安水蓼衣花粉粒的萌發率、壽命、活性
- 三、探討大安水蓼衣經人工授粉，是否可以提高結實率

拾壹、參考資料

1. 黃增泉 1972 台灣植物花粉圖誌 台灣大學植物系出版。
2. 蔡淑華 1975 植物組織切片技術綱要 茂昌圖書有限公司 台北。
3. 劉茂森 1997 金銀花花部發育 小孢子形成與花粉壁之研究 國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
4. 林鴻仁 2001 文心蘭花粉稔實之研究 國立高雄師範大學 生物科學研究所碩士論文。
5. 林淑婷 2002 有水坑台灣杉種子園內種木之生殖障礙 國立台灣大學森林學研究所碩士論文。
6. 賴聲欣、潘善耀、吳承穎、姜怡慧 2002 豔紫荊的不孕性探討 第42屆中小學科學展覽會作品說明書。
7. 李宜玲 2003 日本紫花鼠尾草花部發育 小孢子形成和花粉管發育之研究 國立台灣大學植物學研究所碩士論文。
8. 高級中學生命科學上冊 南一書局企業股份有限公司。
9. 高級中學生物上冊 南一書局企業股份有限公司。
10. K. R. Shivanna 2003 Pollen Biology and Biotechnology Science Publishes Inc. USA Printed in India.

表一：大安水蓼衣花粉粒發育過程之外徑內徑(單位 μm)

分期	大安族群		清水族群	
	外徑	內徑	外徑	內徑
I*	89.76±6.52	67.12±8.04	86.12±7.72	62.56±7.52
II	105.20±12.20	46.88±7.92	83.20±11.16	39.12±15.88
III	66.24±8.16	50.36±17.6	70.76±10.96	53.92±11.24

※：I：小孢子母細胞
 II：小孢子四分體
 III：花粉粒

表二：大安水蓼衣大安族群花粉粒在花藥中發育情形

花	花藥	花藥大小(mm)		I ^A	II	III	細胞總數
		長	寬				
1	1	1.20	0.75	81	-	-	81
	2	1.40	0.75	100	-	-	100
	3	1.20	0.55	-	29	2/1 ^B	32
	4	1.10	0.85	85	-	-	85
2	1	2.10	1.00	-	-	86/115	201
	2	1.80	1.00	28	8	5/3	44
	3	1.75	1.10	-	-	78/22	100
	4	1.70	0.80	-	100	0/4	104
3	1	2.65	0.80	1	33	4/3	41
	2	1.60	1.00	-	-	89/11	100
	3	2.30	1.00	-	-	7/93	100
	4	1.75	1.00	62	-	-	62
4	1	1.60	0.70	-	-	-	-
	2	1.55	0.85	62	-	-	62
	3	1.35	0.75	100	-	-	100
	4	1.40	0.70	88	-	-	88
5	1	1.40	0.85	-	66	-	66
	2	1.60	0.85	-	61	-	61
	3	1.45	0.75	-	42	-	42
	4	1.50	0.80	-	78	-	78
6	1	1.55	0.65	-	69	-	69
	2	1.60	0.70	-	75	-	75
	3	1.75	0.75	-	76	-	76
	4	1.50	0.60	-	84	-	84
7	1	1.45	0.75	-	62	-	62
	2	1.45	0.75	-	53	-	53
	3	1.85	0.55	-	62	-	62
	4	1.80	0.85	-	72	-	72
8	1	1.85	1.00	-	-	13/87	100
	2	2.15	1.00	-	-	2/102	104
	3	1.80	0.75	-	-	18/54	72
	4	1.75	0.90	-	-	0/73	73

表二：大安水蓼衣大安族群花粉粒在花藥中發育情形(續)

花	花藥	花藥大小(mm)		I ^A	II	III	細胞總數
		長	寬				
9	1	1.95	0.90	-	-	47/0 ^B	47
	2	2.00	1.00	-	-	100/0	100
	3	1.70	0.90	-	-	60/0	60
	4	2.10	0.95	-	-	54/46	100
10	1	2.10	1.00	-	-	62/38	100
	2	2.00	1.10	-	-	82/18	100
	3	2.00	1.10	-	-	87/13	100
	4	2.20	1.20	-	-	72/28	100
11	1	2.05	0.95	-	-	75/0	75
	2	2.45	1.05	-	-	74/2	76
	3	2.05	1.05	-	-	80/20	100
	4	2.35	1.10	-	-	50/30	80
12	1	2.45	1.15	-	-	62/0	62
	2	2.25	1.00	-	-	85/15	100
	3	2.20	1.10	-	-	49/0	49
	4	2.00	0.90	-	-	67/0	67
13	1	2.37	1.00	-	-	18/94	112
	2	3.00	1.10	-	-	71/34	105
	3	2.45	1.20	-	-	25/75	100
	4	3.00	1.00	-	-	46/54	100
						1570/1035	4182

A：細胞分期

I：小孢子母細胞

II：小孢子四分體

III：花粉粒

B：正常花粉粒數目/不正常花粉粒數目

-：沒有觀測值

表三：大安水蓼衣清水族群花粉粒在花藥中發育情形

花	花藥	花藥大小(mm)		I ^A	II	III	細胞總數
		長	寬				
1	1	2.00	1.00	20	50	17/0 ^B	87
	2	2.05	1.60	21	48	12/0	81
	3	1.80	1.00	18	31	16/0	65
	4	1.75	1.05	17	39	19/0	75
2	1	1.30	0.50	89	-	-	89
	2	1.10	0.45	87	-	-	87
	3	0.95	0.50	84	-	-	84
	4	1.20	0.35	77	-	-	77
3	1	1.95	0.75	92	-	-	92
	2	1.7	1	96	-	-	96
	3	1.65	0.75	100	-	-	100
	4	1.8	1	100	-	-	100
4	1	1.90	0.80	-	52	-	52
	2	1.50	0.75	-	39	-	39
	3	1.45	0.75	-	46	-	46
	4	1.75	0.80	-	38	-	38
5	1	1.7	1	-	55	-	55
	2	2	0.85	-	50	-	50
	3	1.5	0.85	-	55	-	55
	4	1.65	1.4	-	45	-	45
6	1	1.6	1	-	43	-	43
	2	2	1	-	56	-	56
	3	1.8	0.75	-	43	-	43
	4	1.6	1	-	54	-	54
7	1	1.75	0.80	-	-	89/11	100
	2	2.00	0.85	-	-	95/5	100
	3	2.00	0.95	-	-	64/0	64
	4	2.00	0.90	-	-	67/13	80
8	1	2.35	1.00	-	-	36/59	95
	2	2.00	0.85	-	-	47/39	86
	3	2.05	0.95	-	-	48/36	84
	4	2.30	0.95	-	-	49/51	100

表三：大安水蓑衣清水族群花粉粒在花藥中發育情形(續)

花	花藥	花藥大小(mm)		I ^A	II	III	細胞總數
		長	寬				
9	1	2.45	1.10	-	-	12/88 ^B	100
	2	2.50	1.00	-	-	14/86	100
	3	2.30	1.00	-	-	12/88	100
	4	2.40	1.05	-	-	17/83	100
10	1	2.55	1.80	-	-	63/21	84
	2	2.40	1.80	-	-	74/11	85
	3	2.50	1.75	-	-	69/12	81
	4	2.35	1.00	-	-	51/20	71
11	1	3.50	2.00	-	-	39/41	80
	2	2.00	0.80	-	-	51/39	90
	3	2.00	0.90	-	-	42/37	79
	4	3.40	2.10	-	-	39/31	70
12	1	2.50	1.00	-	-	15/85	100
	2	2.40	1.25	-	-	13/87	100
	3	3.00	1.35	-	-	19/81	100
	4	2.65	1.60	-	-	14/86	100
13	1	2.60	1.00	-	-	22/78	100
	2	2.65	1.60	-	-	14/86	100
	3	2.60	1.65	-	-	17/83	100
	4	2.75	1.70	-	-	23/77	100
						1179/1434	4158

A：細胞分期

I：小孢子母細胞

II：小孢子四分體

III：花粉粒

B：正常花粉粒數目/不正常花粉粒數目

-：沒有觀測值

表四：大安水蓼衣大安族群與清水族群花粉粒發育比較(%)

族群	小孢子發育		花粉粒		AxB*
	同步(A)	不同步	正常(B)	不正常	
大安	77	23	60	40	46
清水	92	8	45	55	41

*：AxB：一個花藥開裂釋出正常且成熟的花粉粒機率



圖 1：校園內的大安水蓼衣扦插苗

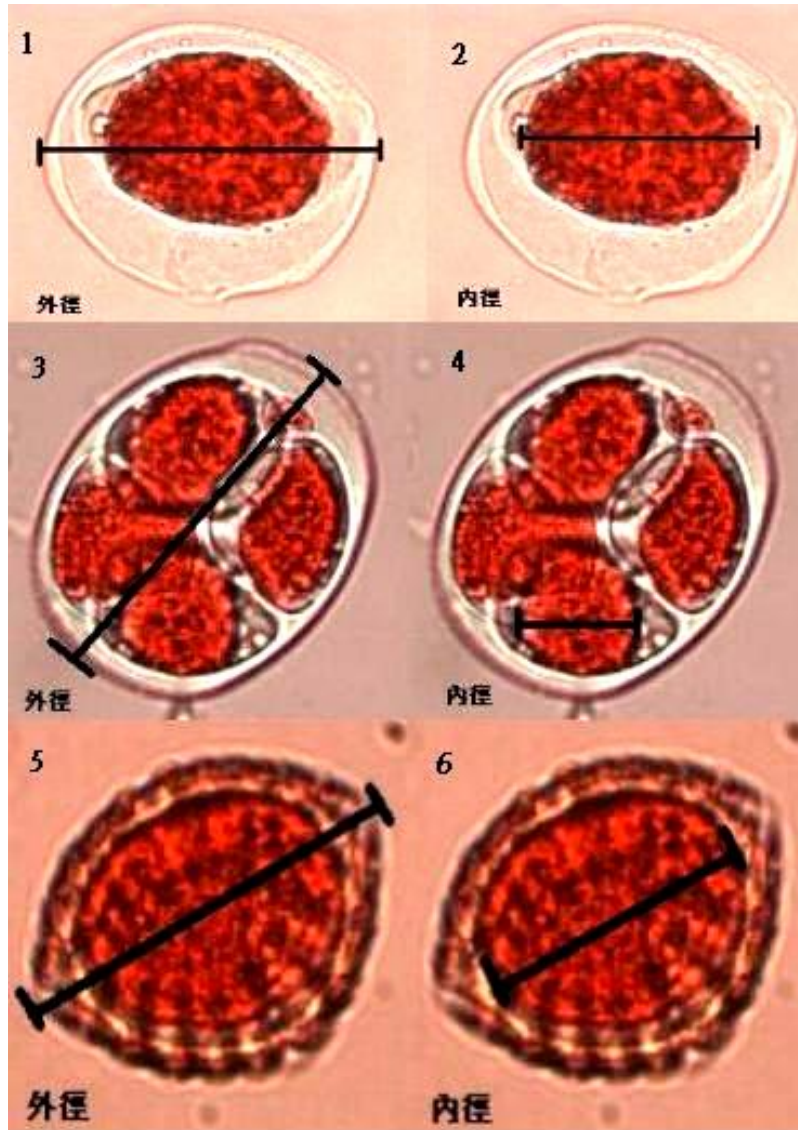


圖 2：小孢子的測量



圖 3：大安水蓼花的外型



圖 4：大安水蓼雌蕊與雄蕊排列方式

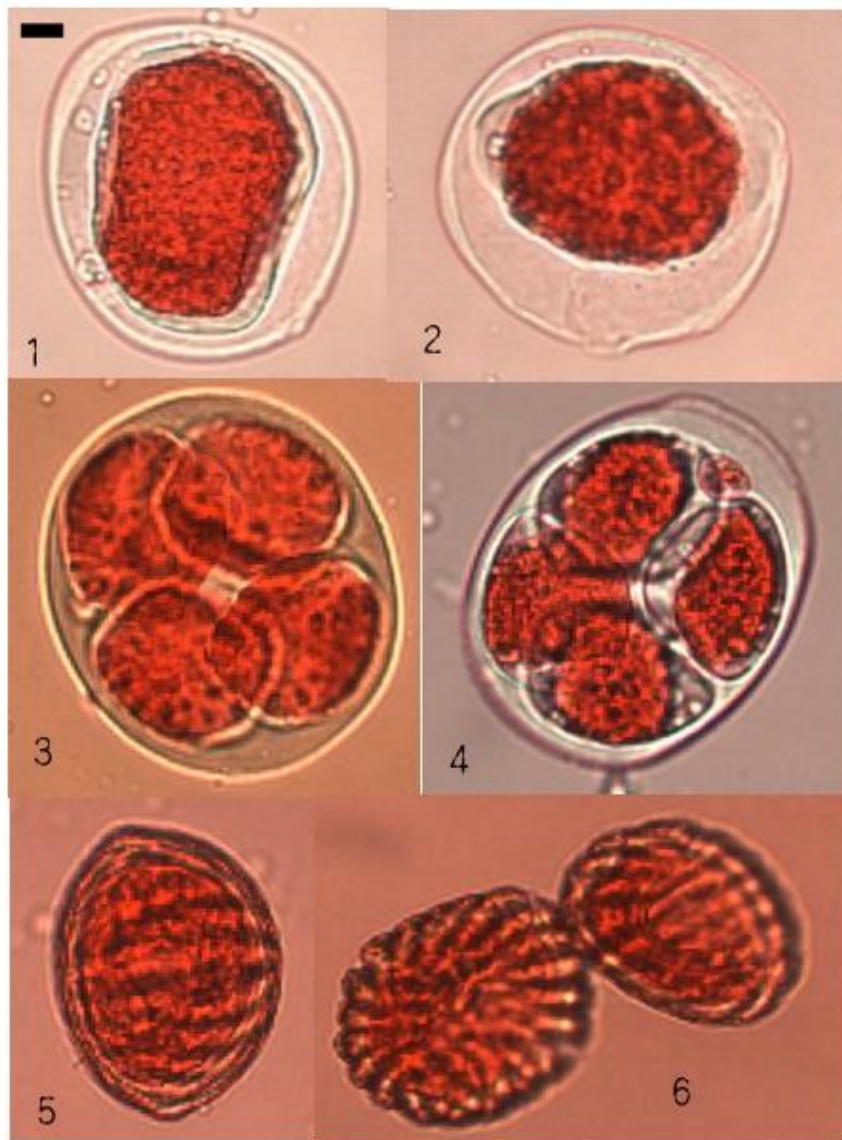


圖 5：大安水蕨衣大安族群花粉粒發育

1、2：小孢子母細胞(I)

3、4：小孢子四分體(II)

5、6：花粉粒(III)

bar=10 μ m

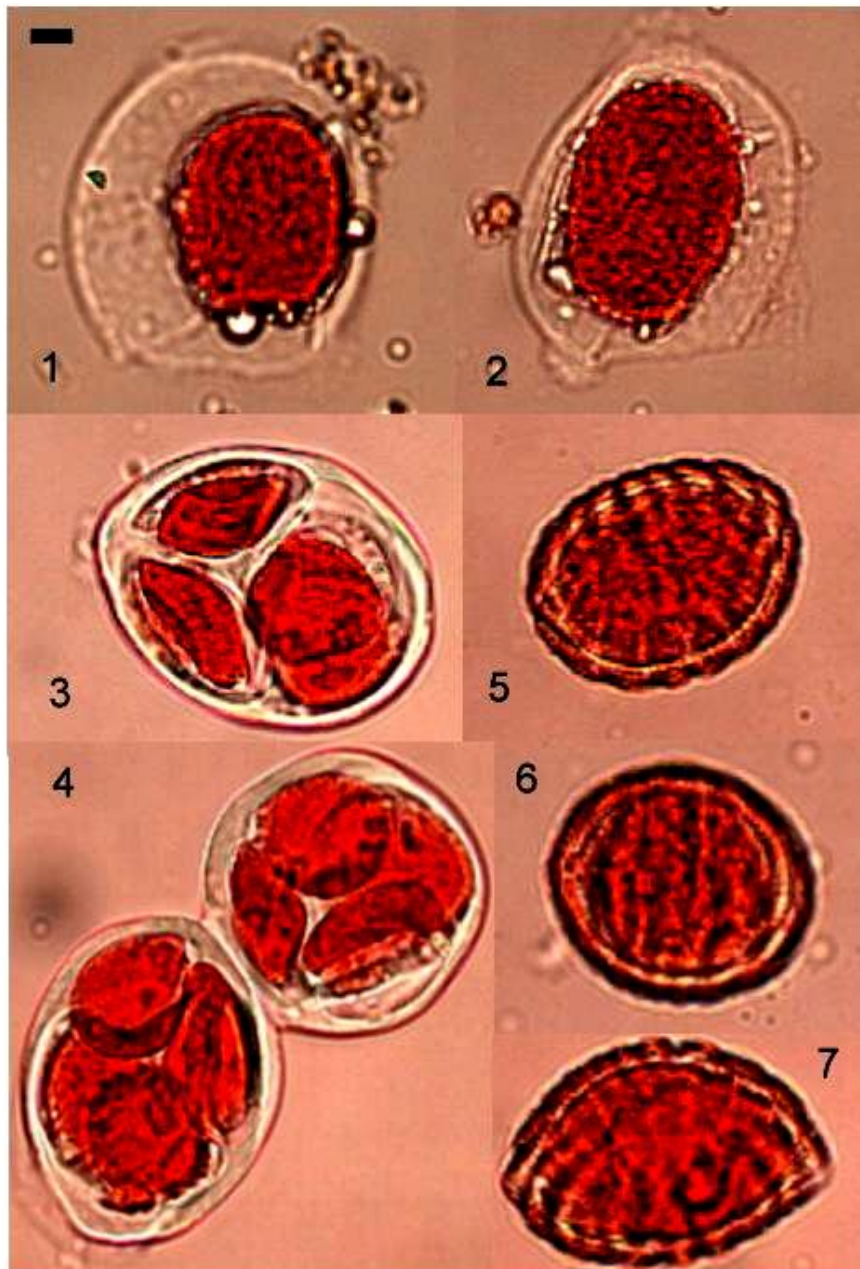


圖 6：大安水蓑衣清水族群花粉粒發育

1、2：小孢子母細胞(I)

3：小孢子四分體 (四分錐體型)(II)，4：小孢子四分體 (平面型)(II)

5、6、7：花粉粒(III)

bar=10 μ m

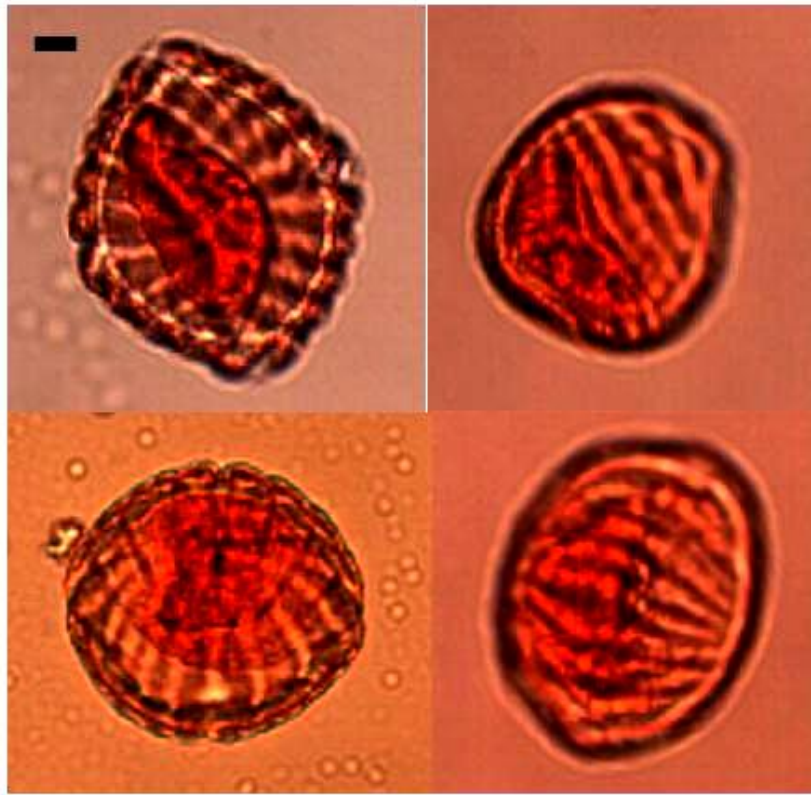


圖 7：大安水蓼衣大安族群不正常花粉粒
bar=10 μ m

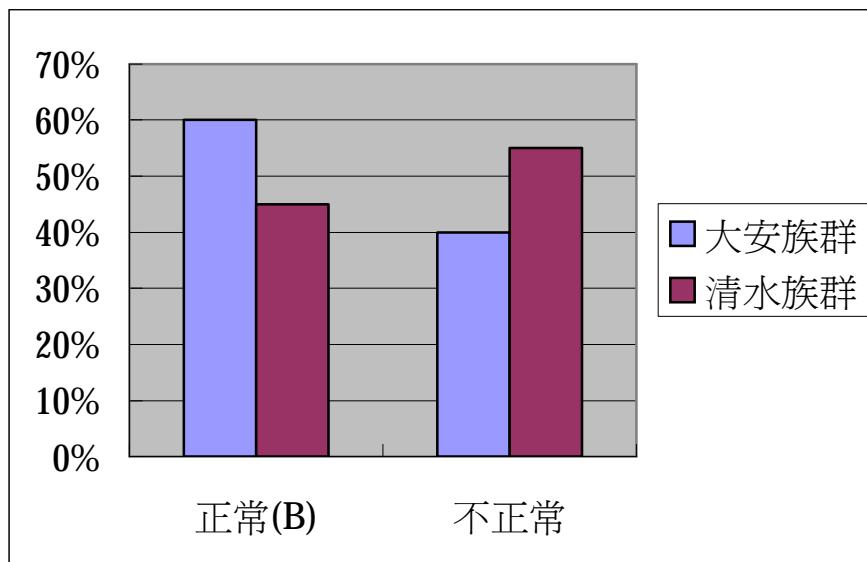


圖 8：大安水蓼衣成熟花粉粒比較

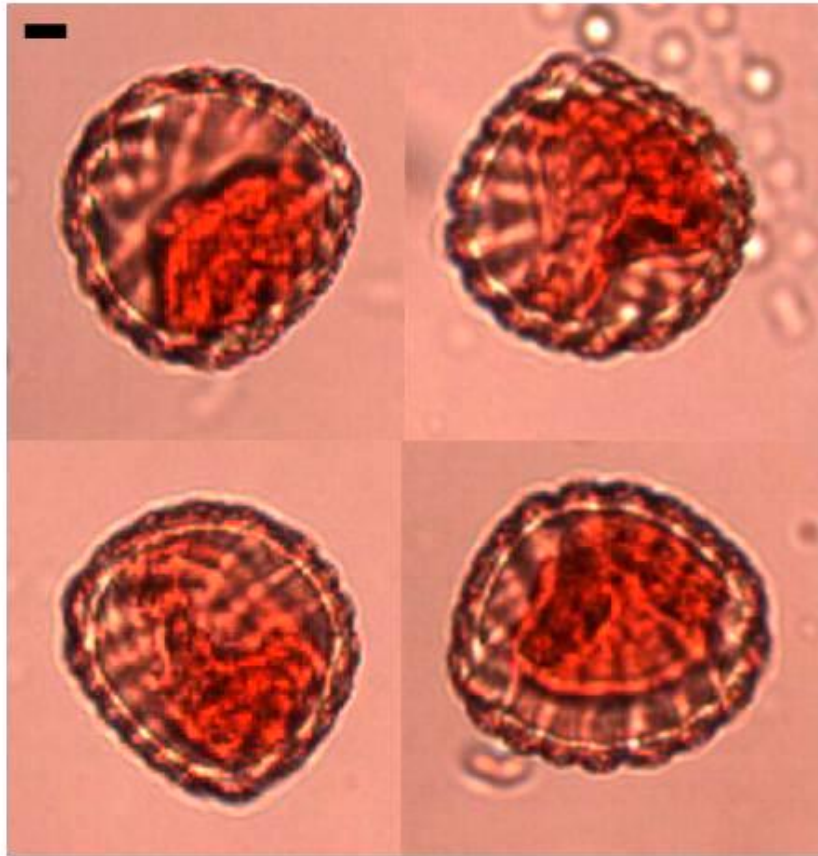


圖 9：大安水蕨衣清水族群不正常花粉粒
bar=10 μ m

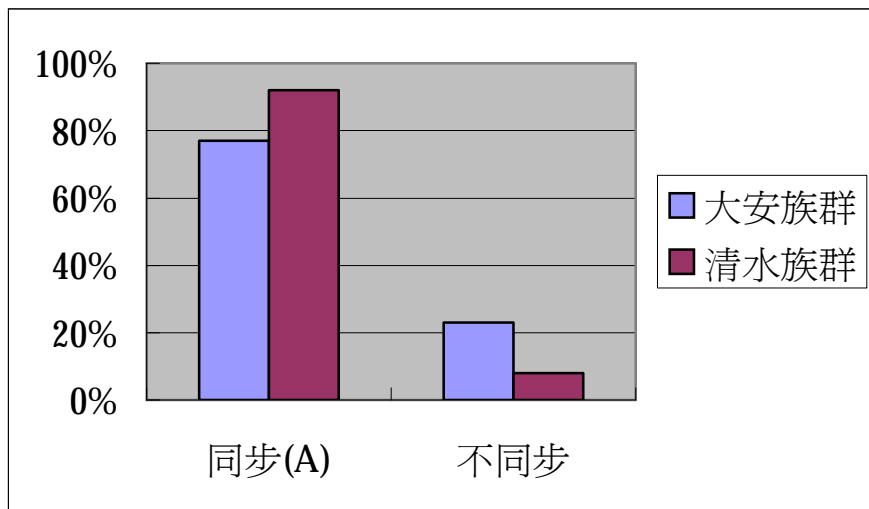


圖 10：大安水蕨衣花藥小孢子發育比較



圖 11：蜜蜂體表沾滿花粉粒，大安水蓼衣雌蕊柱頭已沾粘數顆花粉粒

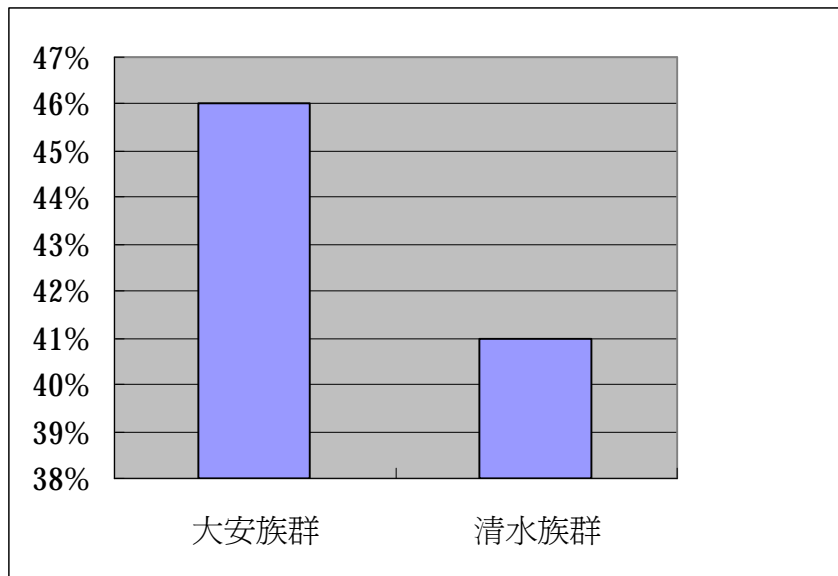


圖 12：大安水蓼衣釋出正常成熟可孕性花粉粒比率，
根據表四 AxB 製作

附圖：實驗步驟



圖一：從 70%酒精溶液中取出花
加少量 70%酒精



圖二：摘下花藥置於載玻片上，



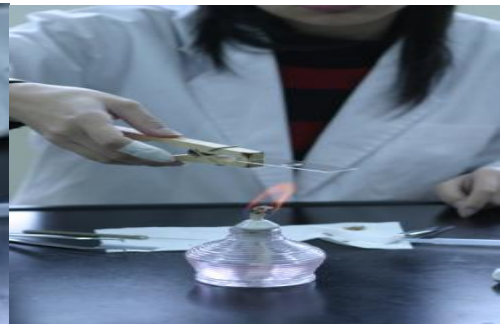
圖三：使用游標尺測量花藥長度、
寬度，並紀錄



圖四：用刀片將花藥切半



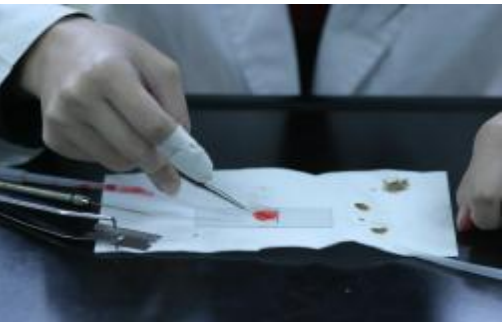
圖五：用解剖針將花粉粒慢慢擠出



圖六：過火蒸發多餘的水



圖七：加一滴 Acetocarmine、輕輕
攪拌使染劑勻分布



圖八：蓋上蓋玻片、用衛生紙將
多餘的吸掉

評語

040721 高中組生物科 最佳(鄉土)教材獎

大安水蓼花粉粒的發育

1. 能使用科學方法分析比較本土植物。
2. 能運用簡潔方法分析花粉之發育差異。