

紅檜與扁柏花粉形態觀察與發芽條件之探討

林讚標 王維洋 劉哲政

摘 要

紅檜與扁柏均具有圓球形單溝型的花粉粒。花粉粒的表面滿佈細小粒狀附屬物。體積上扁柏花粉粒較紅檜為大，其平均長寬軸分別為 $33.8 \mu\text{m} \times 35.1 \mu\text{m}$ 與 $30.7 \mu\text{m} \times 31.8 \mu\text{m}$ 。花粉粒在接觸水液後，花粉粒外壁不久即因內壁之大為膨脹而開裂並釋出含內壁之花粉粒來。在適當之條件下，花粉細胞即自其一端長出花粉管來，並經由內壁之特定孔口伸出囊外進行花粉管之延伸。

培養基內蔗糖存在與否與紅檜扁柏之花粉發芽沒有關係，以5%至30%的醣溶液試測，均不能促使花粉有效發芽。但花粉發芽則與鹽類的存在有絕對關係。以Brewbaker與Kwack (1963)的四種無機鹽分別試之，發現僅 Ca^{2+} 存在時可獲得較高之發芽率，但僅有在 B^{3+} 存在時，花粉管的生長較為正常， K^{1+} 與 Mg^{2+} 未見任何效果。當有二種或二種鹽類以上的組合做為培養基時，發現只有 Ca^{2+} 與 B^{3+} 同時存在下花粉發芽與花粉管生長始完全正常。培養基的最初pH值對發芽亦大有影響，在有四種無機鹽存在下，紅檜之最適pH值在pH5.0—6.0間，而扁柏則在pH5.5—6.0。而且紅檜花粉發芽之pH範圍較扁柏來得寬廣。發芽的環境條件，如溫度與光照對花粉發芽的影響也被加以探究。紅檜以 20°C 為佳，而扁柏似以 $20-25^\circ\text{C}$ 間為佳。高溫則抑制了花粉發芽。光照與否對二者花粉發芽並無顯著差異。

關鍵詞：紅檜、扁柏、花粉形態、花粉發芽

林讚標、王維洋、劉哲政 1991. 紅檜與扁柏花粉形態觀察與發芽條件之探討。
林業試驗所研究報告季刊 6(2):119-132,1991

Morphological Observation and Investigation of Germination on the Pollen Grains of *Chamaecyparis formosensis* and *C. taiwanensis*

Tsan-piao Lin, Wei-young Wang and Che-cheng Liu

[Summary]

Chamaecyparis formosensis and *C. taiwanensis* both have globose monotreme pollen grains. The surface of the pollen grains is covered with tiny granules. With respect to the volume, *C. taiwanensis* is larger than *C. formosensis*, the measures are $33.8 \mu\text{m} \times 35.1 \mu\text{m}$, and $30.7 \mu\text{m} \times 31.8 \mu\text{m}$, respectively. Not long after the contact of pollen grains with water, exine abruptly breaks after accumulating the pressure of expansion of intine. Intine swells after being released from the extine. In the optimum condition, the germination of pollen cell can be observed by the emergence from one end of pollen and then the extending pollen tube goes through the specific hole of

1990年10月送審

1991年 2月通過

intine.

Germination of pollen of *C. formosensis* and *C. taiwanensis* is not related to sucrose concentration in the growth medium. Five to thirty percent of sucrose solution didn't show any effect on pollen germination. The mineral nutrient of Brewbaker and Kwack (1963) was found effective, therefore the four species of mineral nutrient were tested individually. Calcium gave high germination percentage, boron gave rather normal pollen tube growth. Potassium and magnesium showed no evident effect. When the combination of 2 minerals or 3 were tested, only the medium containing calcium and boron gave high germination percentage and normal pollen tube growth. The initial pH of growth medium also showed differential effect on pollen germination. At the presence of mineral nutrients, the optimum pH is 5.0-6.0 for *C. formosensis*, and pH 5.5-6.0 for *C. taiwanensis*. Generally speaking, the pH range for pollen germination is wider for *C. formosensis* than for *C. taiwanensis*. Environmental factors, temperature and light were also investigated. The optimum temperature is 20°C for *C. formosensis*, and 20-25°C for *C. taiwanensis*. High temperature can effectively inhibit the germination of pollen. Both species didn't show significant difference of pollen germination under light or without light.

Key words: *Chamaecyparis formosensis*, *Chamaecyparis taiwanensis*, pollen morphology, pollen germination

Lin Tsan-piao, Wei-young Wang and Chin-chen Liu. 1991. Morphological Observation and Investigation of Germination on the Pollen Grains of *Chamaecyperis formosensis* and *C. taiwanensis*. Bull. Taiwan For. Res. Inst. New Series.6(2):119-132,1991

一、緒 言

關於扁柏屬植物花粉形態之觀察曾有 Yamazaki and Takeoka (1958,1962) 對日本扁柏 (*Chamaecyparis obtusa*) 之研究，而對其花粉發芽條件亦曾有過報導 (Fukuhara et al., 1971)。其最適宜條件是在 10—15% sucrose, pH 5.5—7.0 之情況下達成的。至於省產扁柏屬植物花粉粒之形態也曾在文獻中出現過 (王仁禮, 1966)。

進行此一研究之主要目的是在確定一個適當的花粉發芽方法，以便了解在儲藏過程中花粉發芽能力之變化。這對於將來紅檜扁柏之育種，尤其是雜交種之育成很有助益。因為扁柏要 4—7 年才有一次豐年，欠年的時候連雄花亦極少見，因此為了雜交育種，花粉儲藏是絕對必需的。

二、材料與方法

(一) 母樹的狀況與花粉收集方法

紅檜花粉採自南投林區之人倫工作站 (1500m) 之紅檜營養系庫。其原來接穗則來自丹

大之天然紅檜族群。該營養系設於 1975 年元月，並於 1982 年開始開花結實。扁柏花粉則採自棲蘭山 130 林道 (鴛鴦湖附近)，海拔 1100m，該母樹主幹通直，高約 20m，直徑 35cm。1989 與 1990 年為扁柏之欠年，在棲蘭山山區之扁柏林中僅在 1989 年得此一株母樹之花粉。因此由此母樹所獲取之花粉資料是否有所偏頗，尚待日後觀察。

於 1989 年元月 23 日採得即將開裂之紅檜雄毬花，包於 PE 袋內攜回實驗室後便插入水中，平置桌面，花粉因室溫較高 (20°C 左右) 便很快散落，三天後收集花粉，以 60 mesh 濾網篩除雜質，花粉即裝入小玻璃瓶再轉而置於一內裝有矽膠之血清瓶內，暫置 4°C 內保存。新鮮乾燥花粉其含水率在 15%，扁柏花粉之收集同前所述。

(二) 光學顯微鏡之使用

花粉以毛筆散佈於載玻片上，或以吸管取微量溶液置載玻片，不經任何染色處理，直接置於 Olympus 光學顯微鏡，使用微分干涉位相差 (Nomarski differential interference contrast) 的方法來觀察花粉的形態。

(三)掃描電子顯微鏡的使用

花粉以 2.5 % glutaldehyde 之 Sorenson's phosphate 緩衝液, pH7.0, 固定2—3天(4°C), 再以相關緩衝液換洗3—4次, 每次15min, 再以 2 % osmium tetroxide 進行固定3—4小時至樣品變黑, 再以緩衝液沖洗3次(各15min), 經丙酮系列(30%, 50%, 75%, 85%, 95%, 100%, 100%) 進行脫水, 均各15min, 再經 CO₂ 進行臨界點(critical-point drying)乾燥, 最後花粉固著於鋁台上, 以離子覆膜機鍍上金膜, 於掃描電子顯微鏡下觀察(Hitachi S-520 SEM 於20Kv加速壓力下)。

(四)花粉培養基調製

在本文內, 所用的培養基有下面三大類。①蔗糖調配為5%、15%與30%, 並以蒸餾水做為對照組。②以不同蔗糖濃度與Brewbaker and Kwack (1963)之四種無機鹽組合成各種培養基。③僅以四種無機鹽組合成15種培養基來檢測花粉發芽之反應。四種無機鹽分別為Ca(NO₃)₂ · 4H₂O (代號C)、H₃BO₃(B)、KNO₃(K)與MgSO₄ · 7H₂O (代號M), 十五種組合分別為C、B、K、M、CB、CK、CM、BK、BM、KM、CBK、CBM、CKM、BKM與CBKM。四種鹽類在溶液中濃度分別為C、H、K、M:300mg/l、100mg/l、100mg/l、200mg/l, 其pH值均調為6.0, 其中C、B、M三種無機鹽分別通過裝有Amberlite之管柱, 以便除去溶液中任何微量之硼離子。Amberlite可重複使用, 洗淨方法是以2N HCl洗30min, 再以大量蒸餾水沖洗至流出液為pH7.0, 再以2N NaOH洗30min及蒸餾水沖洗至pH7.0。C、K、M溶液在通過Amberlite之後, 溶液之pH均升至pH9.0以上, 因此必需以HCl滴定回pH6.0。

(五)培養方法

培養盤即為96 Well之塑膠盤。在無菌台上操作, 培養基先注入凹槽內, 再播入花粉。適當的花粉密度是每ml培養基內含有0.15mg乾燥花粉, 96凹槽之四周凹槽均填加蒸餾水而不做花粉發芽之用, 以維持所有凹槽內濕度之均衡。於盤蓋密封後置於24°C生長箱內。檢驗培養基之不同pH值對花粉發芽之效應, 可在同一培養盤內完成, 每一種pH處理使用六個小槽(即六重複sample replication)。而不同培養溫度則由五部生長控制箱調為不同定溫後, 同時進行溫度試驗, 每一溫度亦有六重複。光度試驗則由二部生長箱設定相同條件, 僅具光線與否之差異, 每處理亦具六重複(repeat)。

(六)花粉發芽檢查

於播種之後2—3日花粉開始發芽, 7日時開始進行花粉發芽率與花粉管長度檢測。每一凹槽內在倒立式光學顯微鏡(inverted Olympus IMT-2 microscope)下逢機計數百粒花粉之發芽率。在量取花粉管長度時, 每一凹槽(即每一重複)即擇取10粒以測微尺(micrometer)量取花粉管最長者三粒、最長者三粒, 另逢機量取四粒。

花粉發芽率與花粉管之生長曲線則是使用電腦軟體Sigma-Plot version 3.10 (1988)繪出。

三、結果與討論

紅檜與扁柏花粉形態之觀察

紅檜與扁柏之花粉粒均為圓球形, 屬於單溝型(monotreme)(圖一, 上; Li, 1975)。但二者大小則有些微差異, 一般而言, 紅檜的花粉粒較扁柏為小(表一)。此一觀察與王仁禮(1966)的觀察略相同, 而日本扁柏的花粉似乎更小些

表1. 紅檜與扁柏花粉粒大小比較

		紅 檜	扁 柏
		花 粉 粒	
範 圍	平 均	24-38 × 26-40 μm 30.7 × 31.8 μm	28-40 × 30-40 μm 33.8 × 35.1 μm
		擴張後之內壁	
範 圍	平 均	42-56 μm 46.2 μm	50-57 μm 59.7 μm
		花 粉 細 胞	
範 圍	平 均	20-28 × 22-30 μm 23.4 × 26.0 μm	20-30 × 24-36 μm 26.0 × 28.8 μm

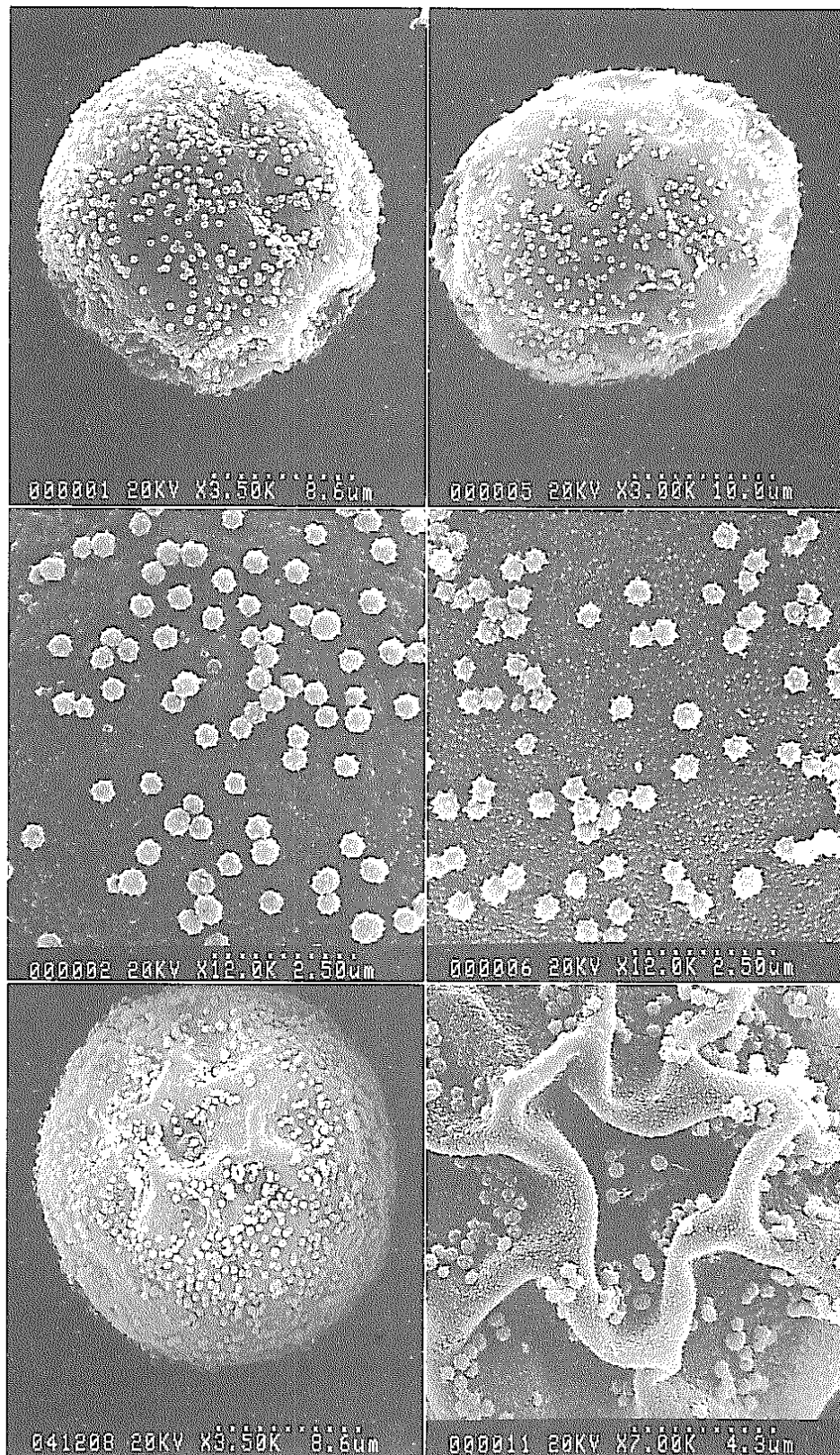


圖1. 紅檜與扁柏之花粉粒之掃描電子顯微影像。各圖右下角顯示圖片之比例尺寸。上，紅檜（右）與扁柏（左）之花粉粒。中，同上但增加放大倍數以顯現花粉粒表面之粒狀附屬物。下，紅檜花粉粒之孔口（左）與孔口之放大（右）。

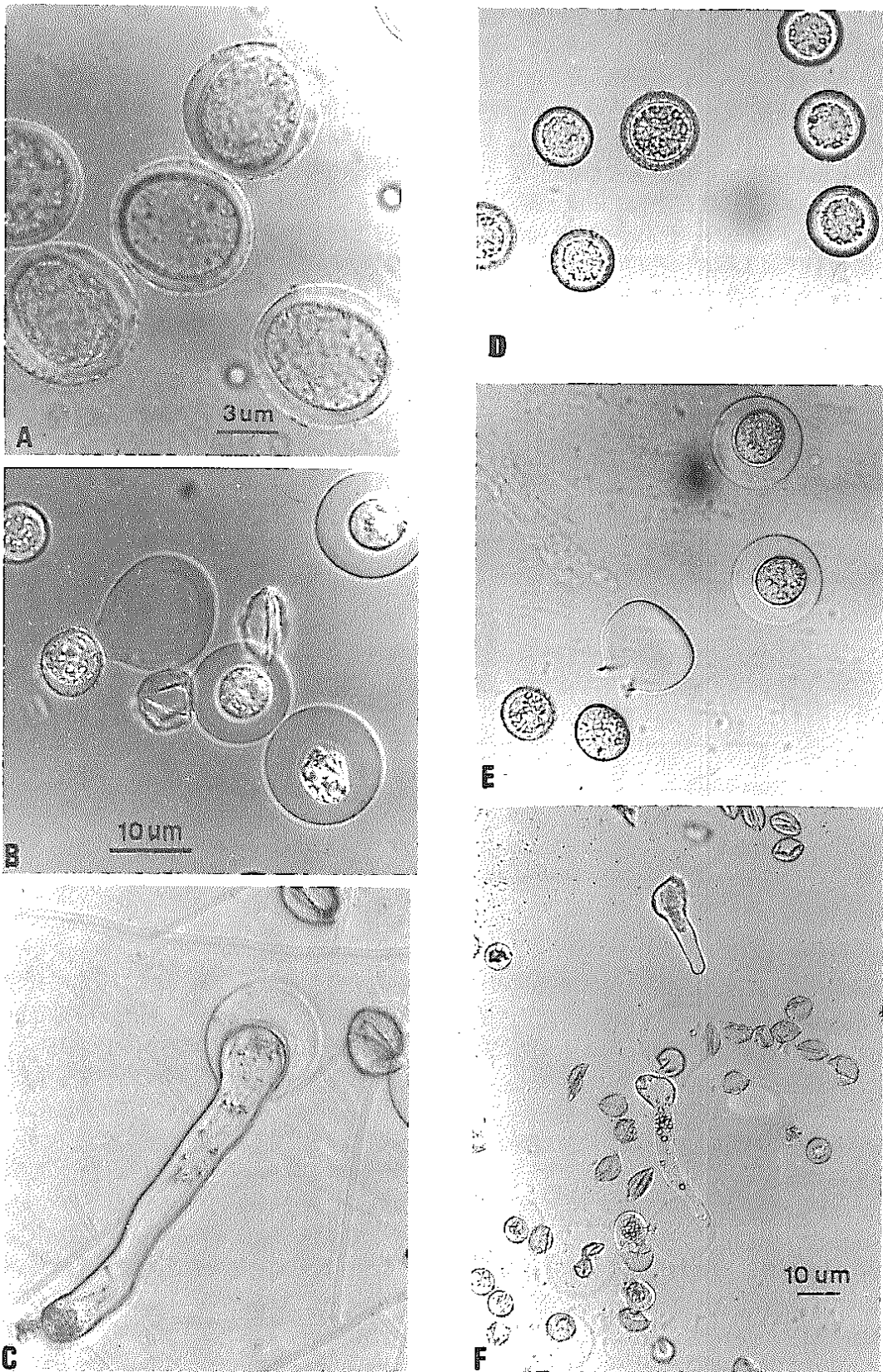


圖2. 紅檜(A、B、C)與扁柏(D、E、F)之花粉發芽過程，其中B、C、D與E為同一放大倍數。

(Yamazaki and Takeoka, 1962)。二者花粉粒之表面則滿佈細小顆粒狀的附屬物(圖一,中)。花粉粒一端具有一孔口,即發芽孔(圖一,下),此與日本扁柏是一樣的(Yamazaki and Takeoka, 1958)。

紅檜與扁柏的花粉發芽過程

紅檜與扁柏之花粉粒在接觸到溶液(圖二, A與D)後,其外壁(exine)不久即因內壁(intine)之大為膨脹而開裂,釋放出花粉粒來(圖二, B與E)。此一擴張後之內壁直徑為原花粉粒直徑之1.5倍或以上。花粉細胞在適當條件下,即自其一端長出花粉管來(圖二, C與F)。在人為的水液下觀察,亦可見有許多內壁會由一端開裂形成一孔口,讓其內的花粉細胞釋放出來(圖二, B和E)。若花粉細胞不釋放出來,則內壁之孔口將成為花粉管伸出內壁之通道。有些針葉樹,如柏科、杉科與紅豆杉科,花粉水化(hydration)過程中會有突然而且內壁大為擴張的現象,以致造成了外壁的打開與破裂(Muller-Stoll, 1948 ;

Duhoux, 1982)。這一類的花粉在其表面上均具有一孔口(Yamasaki and Takeoka, 1962)。其功能可能是在與水接觸後,水可滲到整個內壁,而造成內壁的膨脹與外壁之爆裂(Duhoux, 1982)。

紅檜與扁柏的發芽條件

(一)對醣的需求

最初在進行花粉發芽試驗前,我們得知日本扁柏花粉發芽在10—15%蔗糖溶液下可達最佳的發芽率(福原檜勝等, 1971)。因此我們據此而配製數種不同之sucrose溶液,紅檜與扁柏花粉發芽結果列如表二。只有蒸餾水的情況下沒有花粉進行發芽(資料未列出)。

表二的結果顯示sucrose與紅檜扁柏的花粉發芽沒有關係。此一結果與福原檜勝等人的結果大為不同,何以如此目前仍不甚清楚。由文獻上得知,有些針葉樹種sucrose並不能刺激花粉發芽,而且還會抑制花粉管的生長(Hoand Sziklai, 1970)。

表2. 不同蔗糖濃度對紅檜與扁柏花粉發芽之影響。蔗糖溶於蒸餾水中,花粉播於96 well凹槽內,即置於25°C生長箱,經七日後觀察其結果。

	紅 檜			扁 柏		
SUCROSE 濃度(%)	5	15	30	5	15	30
發芽率(%)	0	0	0	3.0	2.8	1.3

(二)對無機鹽的需求

許多報告指出花粉發芽是需要無機鹽的存在的,而Brewbaker and Kwack (1963)的配方是廣被使用的一種花粉發芽培養基(表三)。我們以此一配方來試測其對紅檜與扁柏花粉發芽之有效性,其結果列如表四。此一結果再度肯定sucrose對紅檜與扁柏花粉發芽並無助益,而無機鹽的存在則是絕對需要的。

(三)四種無機鹽對花粉發芽之差異性效應(differential effect)

表四結果已顯示無機鹽的存在對花粉發芽之重要性。但四種鹽類是否均缺一不可,則有必要進一步去探討。於是我們將四種鹽類做了15種的組合,並以之來檢查紅檜花粉之發芽的情形。其結果詳見表五。

以單一離子試之, Ca²⁺ 給出最大的發芽率,

但花粉管生長畸形(圖三之C)。僅有B³⁺離子時則能有較為正常的花粉管生長(圖三之B)。當二種離子組合之培養基中,發現只有Ca²⁺ + B³⁺之組合給出正常的發芽率與正常的花粉管生長(圖三之BC),而K⁺與Mg²⁺均未能對花粉發芽有所助益。Ca²⁺對發芽有明顯的促進作用, B³⁺存在時對花粉發芽亦具促進作用,特別是花粉管生長得免於畸型之發生(圖三之BC、BM與BK)。當有三種或四種鹽類之組合下,凡含有Ca²⁺與B³⁺者始終具有高發芽率與正常花粉管生長(圖三與表五)。因此此一試驗獲致一項結論, Ca²⁺與B³⁺是紅檜花粉發芽生長不可或缺的要害,而K⁺與Mg²⁺則非重要因子。我們也以同一方法來檢查扁柏花粉發芽,而所獲得的結果與紅檜相同,即Ca²⁺與B³⁺是扁柏花粉發芽與生長所不可或缺的。

表3. Brewbacker & Kwack (1963)的花粉發芽營養液配方

Ca(NO ₃) · 4H ₂ O	300ppm
H ₃ BO ₃	100ppm
KNO ₃	100ppm
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200ppm

表4. B & K (1963)四種無機鹽對紅檜與扁柏花粉發芽的影響。所有處理均含表三所列無機鹽與其濃度。發芽方法參見表二說明

	紅 檜				扁 柏			
	0	5	15	30	0	5	15	30
SUCROSE濃度(%)	0	5	15	30	0	5	15	30
發芽率(%)	82	11	3.7	0	77	68	60	3.5

表5. B & K (1963)之四種無機鹽類不同組合對紅檜花粉發芽之效應。花粉管與發芽率均在播種七日之後測其生長資料。發芽方法參見表二說明

	鹽 類 組 合															
	Ca	B	K	Mg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
發芽率, %	0	38	6	0	7	77	28	11	12	44	40	81	84	19	37	79
花粉管長度, μm	-	78	84	0	64	17	79	64	102	112	85	11	114	89	88	108
畸型花粉管, X	-	X		X	X	X				X		X		X		

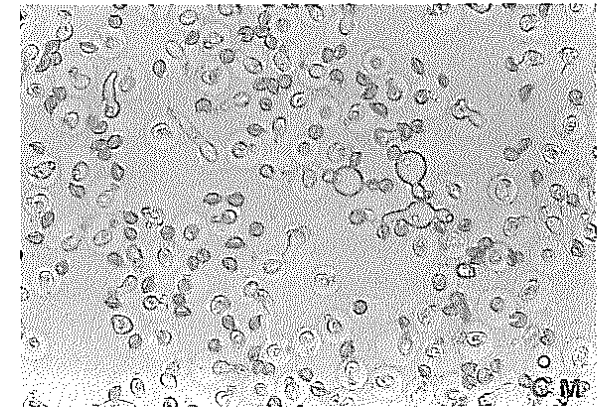
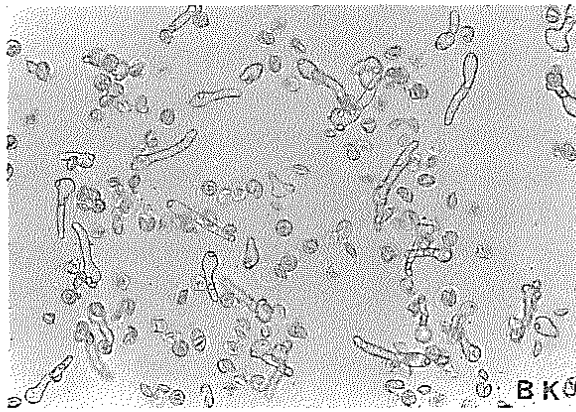
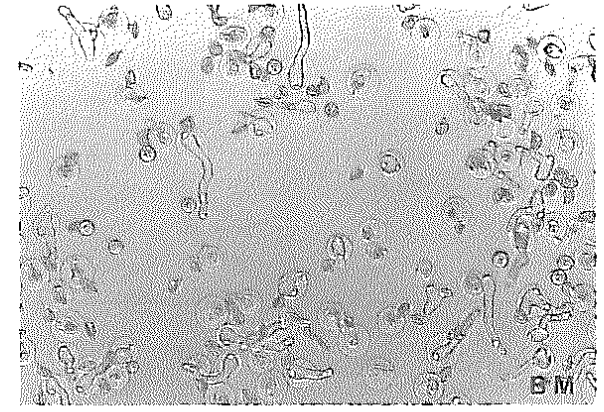
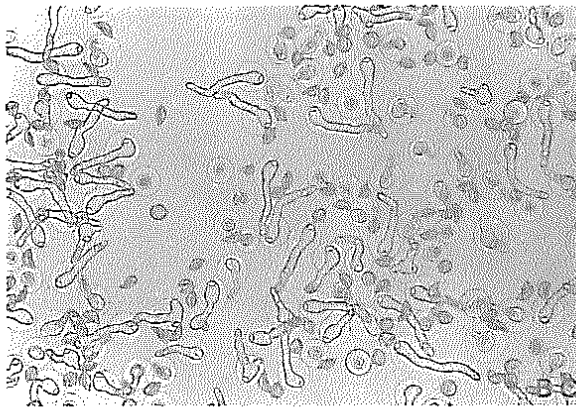
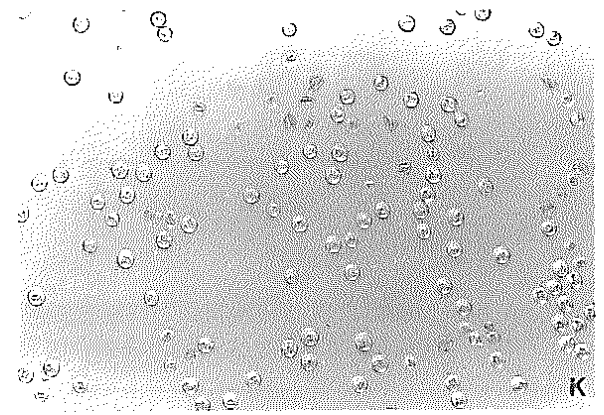
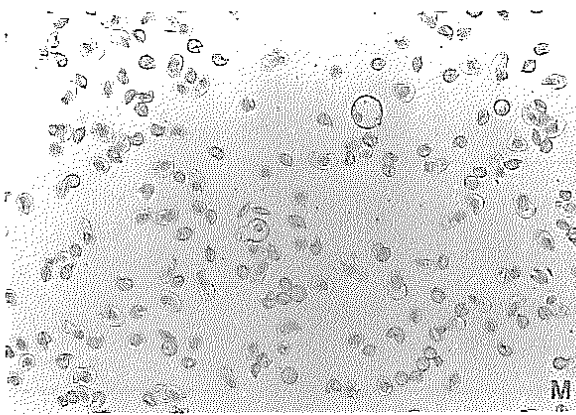
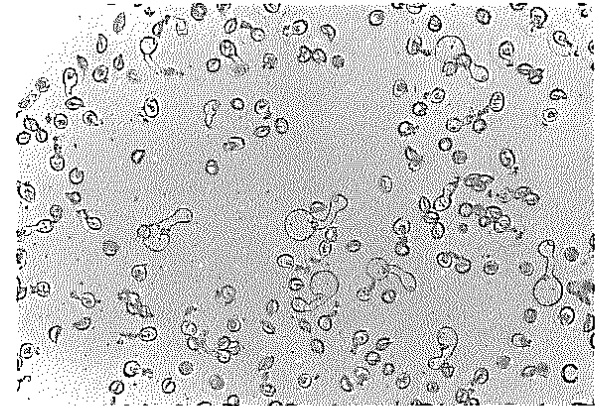
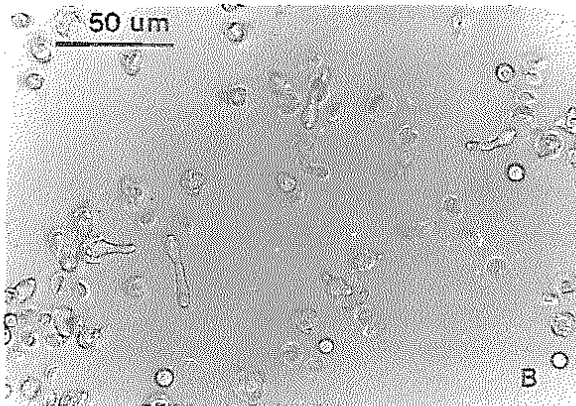
* 在蒸餾水為培養液的情況下

硼的缺乏較其他微量元素而言是更為廣泛的，影響到世界上許多植物的生長(Gupta, 1979)，儘管對硼的研究已超過了半個世紀，其在生化上的角色仍不甚清楚。可能參與DNA的合成(Krueger *et al.*,1987)，細胞膜的功能(Pollard *et al.*,1977)，纖維素的合成(Dugger and Palmer, 1985)，木質素的合成(Lewis,1980)，與細胞的延長(Birnbaum *et al.*,1974)。本試驗中可看出硼對單一細胞(花粉管)有促進其生長延長的作用。

至於鈣的作用在文獻上亦多有討論，其對於花粉發芽之作用，可能是因鈣在1,3-β-glucan合成方面有其角色(Kaus, 1987)，二者間之交互作用使得花粉發芽與花粉管生長得以正常。

接著我們即以B與K的無機鹽來檢驗發芽溫度、營養液pH值與光照之有無對紅檜與扁柏發芽之影響。

(四)培養基pH值對花粉發芽之效應



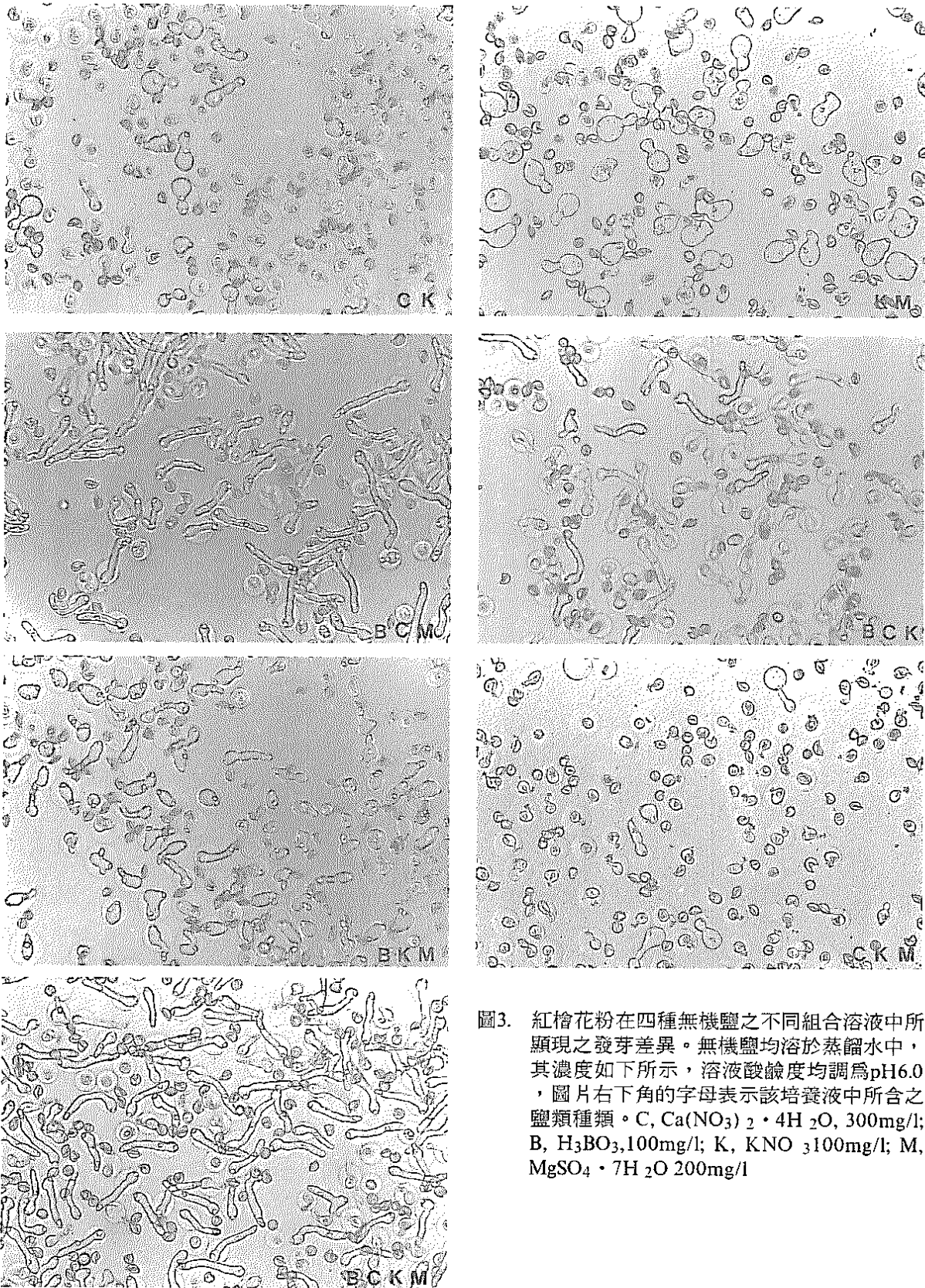


圖3. 紅檜花粉在四種無機鹽之不同組合溶液中所顯現之發芽差異。無機鹽均溶於蒸餾水中，其濃度如下所示，溶液酸鹼度均調為pH6.0，圖片右下角的字母表示該培養液中所含之鹽類種類。C, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300mg/l; B, H_3BO_3 , 100mg/l; K, KNO_3 100mg/l; M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200mg/l

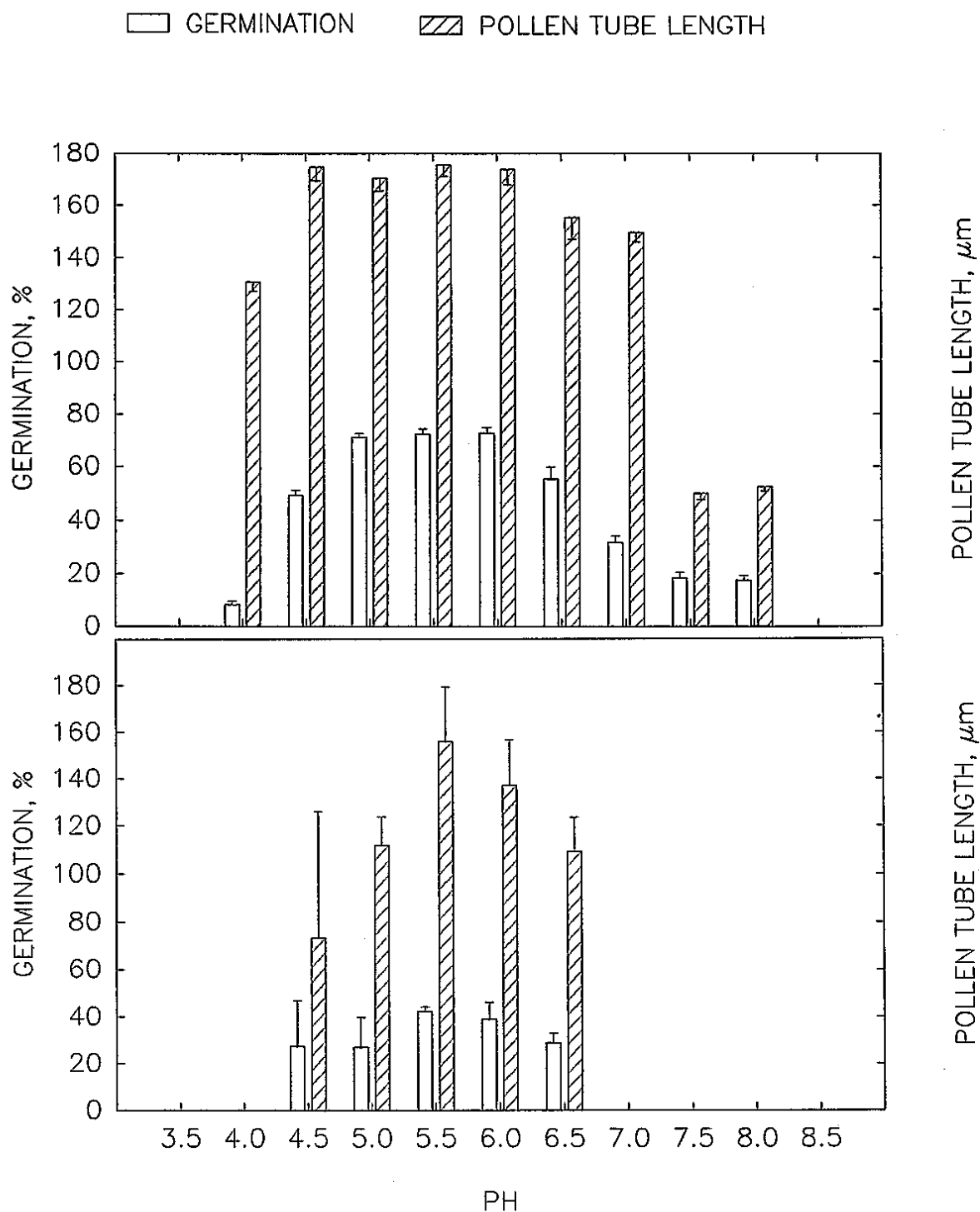


圖4. 溶液pH值對紅檜(上)與扁柏(下)花粉發芽之效應。培養液含Brewbaker and Kwack (1963)之四種無機鹽(如表三),其pH值以HCl或NaOH調整之。試驗進行7日後計算不同pH值培養液中花粉發芽率與花粉管長度。光照強度約在 $100 \mu E \cdot m^{-2} sec^{-1}$ 。圖中T字型表示標準誤差。

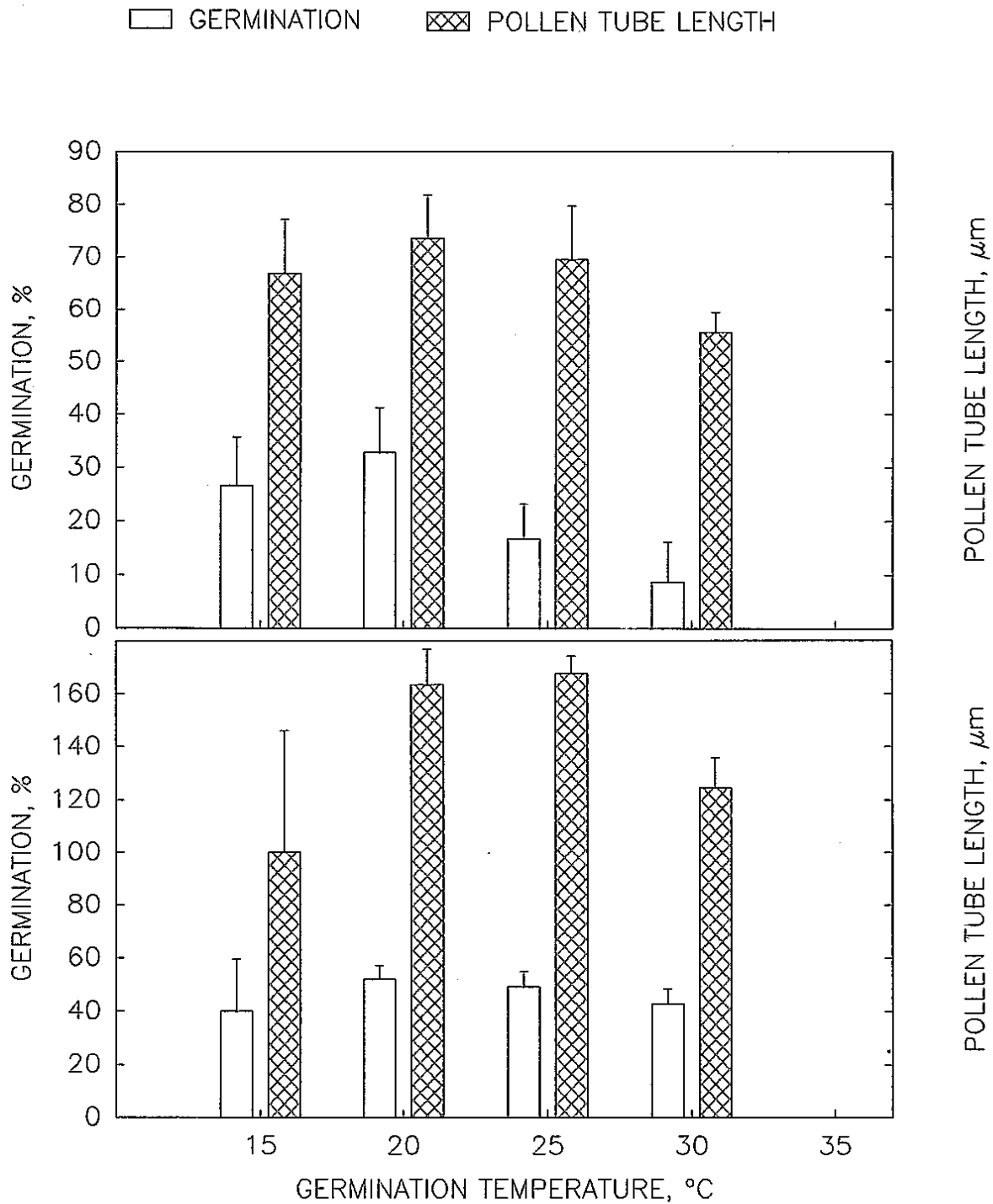


圖5. 培養液溫度對紅檜(上)與扁柏(下)花粉發芽之效應。培養液含表三之無機鹽, 培養液最初pH值均調為6.0, 光照強度為 $100 \mu E \cdot m^{-2} sec^{-1}$ 。進行7日後計算不同溫度下花粉發芽率與花粉管長度。

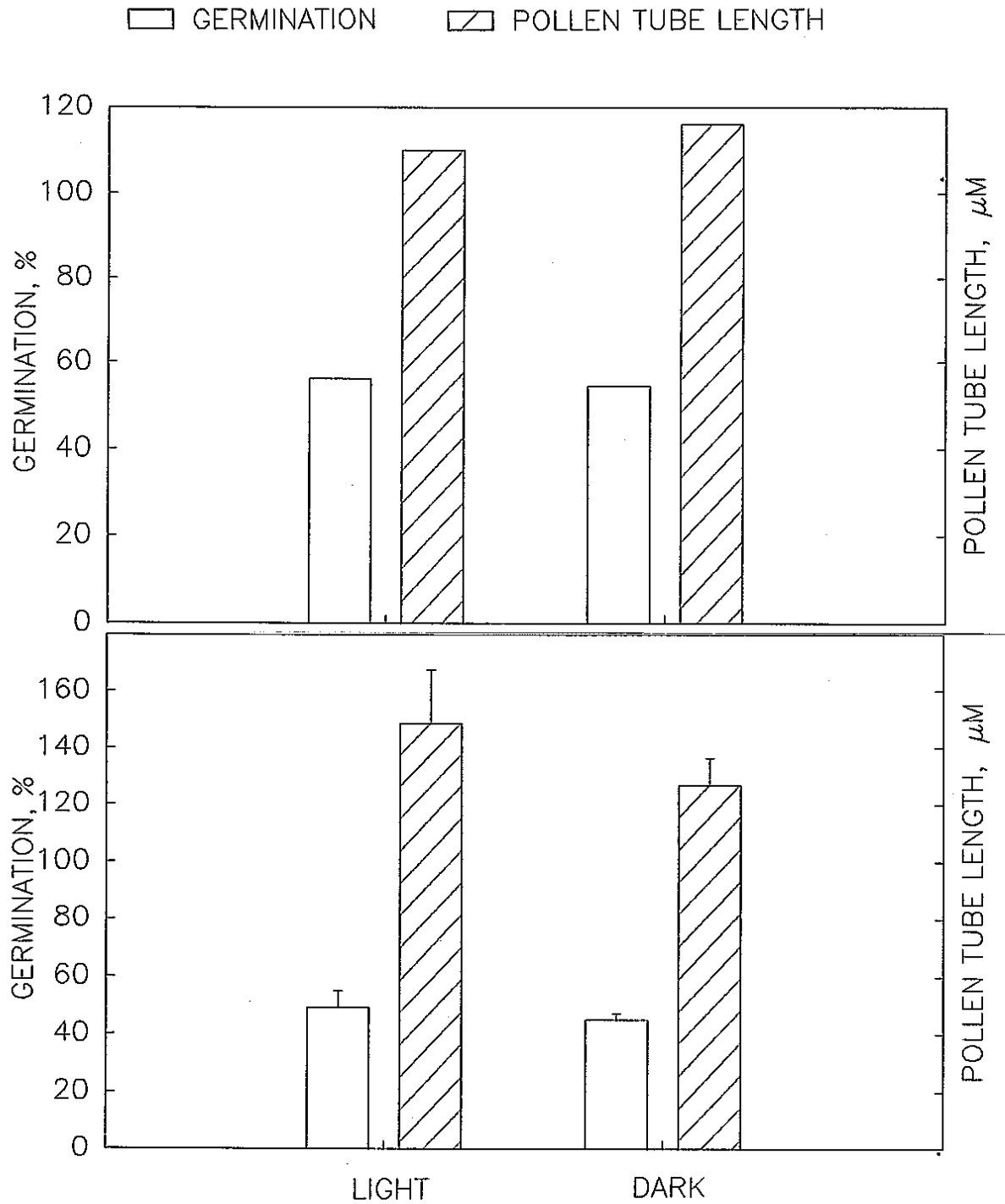


圖6. 光照與否對紅檜(上)與扁柏(下)花粉發芽之效應。培養液含表三之無機鹽，pH值6.0，光照強度 $100 \mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$ 。試驗進行7日後計算花粉發芽率與花粉管長度。

我們曾爲了穩定培養液之pH值而使用過phosphate緩衝液，結果雖培養液pH值可以維持一星期穩定，但卻對發芽有明顯的抑制作用，發芽率則大爲下降。而其他可用之緩衝液可以緩衝之pH值範圍有其限度，不適合做自pH3至pH9全程使用。於是我們以水取代緩衝液，並以NaOH與HCl將培養液調到所需要的pH值，花粉自播後2—3天即開始發芽，一星期內結束發芽試驗，此時再檢測培養液之pH值，發現pH值已略有改變。最初低pH值的溶液最後pH值提高了，而最初高pH溶液最後pH值較原設定爲低，設定於pH6.0的溶液則未見有明顯的變化。紅檜花粉在不同pH值培養液中之發芽率與花粉管生長（7天之間）結果參見圖四上。pH5.0—6.0可視爲最適發芽pH值，而且花粉管長度亦無差異。扁柏所獲的結果參見圖四之下，在pH5.5—6.0有較高的發芽率與較長之花粉管生長。即二者均在弱酸的環境下最適於花粉生長。日本扁柏之最適發芽pH值則在pH5.5—7.0之間（福原檜勝等，1971）。此外由圖四紅檜扁柏相互比較，紅檜花粉可以發芽的範圍較扁柏爲廣，紅檜自pH4至8均可，而扁柏只在pH4.5至6.5間可見發芽。

(五)發芽溫度對花粉發芽的影響

數個設定不同溫度（15、20、25、30與35℃）之生長箱，並調其光度在 $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 左右，紅檜花粉發芽在15—20℃爲適當（圖五上），扁柏則在20—25℃爲適當（圖五下）。實際二者之絕對最高值均在20℃，高溫（35℃）很明顯地會造成花粉發芽之抑制作用。

(六)光照與否對花粉發芽之效應

此一試驗之結果顯示，紅檜與扁柏之花粉發芽與光照有否沒有關係（圖六）。

四、結 論

紅檜與扁柏花粉粒在形態上極爲相似，惟扁柏之花粉粒較紅檜者略大一些。它們在表面上具有單一的發芽孔，遇水時外壁極易破裂，而內壁則吸水漲大。

經由本研究已規範出紅檜與扁柏二種相近植物花粉發芽之最適條件：①以培養液之組成來說，必需含有 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (300ppm)與 H_3BO_3 (100ppm)溶於蒸餾水中，並調其最初pH值至5.5。②以花粉培養的環境而言，溫度以20℃爲佳，並給予光照強度大約在 $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 。在這樣的條件下，花粉經2—3天即可開始正常發芽，

並於一星期內完成發芽。此外花粉播於培養液中需調其密度，不能太稀也不能過密，大約是每ml培養液中含有花粉0.15mg爲適，播種操作時也當注意清潔以免污染。

誌 謝

本所育林系，沈慈安先生協助Sigma-plot軟體使用，又育林系王涼綢小姐協助發芽試驗，特此致謝。

參考文獻

- 王仁禮. 1966. 臺灣產針葉樹花粉粒形態之分類。臺灣科學. 20(1):21—28。
- Brewbaker, J.L. and B.H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 50:859—865.
- Birnbaum, E.H., C.A. Beasley, and W. M. Dugger. 1974. Boron deficiency in unfertilized cotton (*Gossypium hirsutum*) ovules cultured *in vitro*. Plant physiol. 59:1034—1038.
- Dugger, W.M. and R.L. Palmer. 1985. Effect of boron on the incorporation of glucose by cotton fibers grown *in vitro*. J. Plant Nutr. 8: 311—325.
- Duhoux, E. 1982. Mechanism of exine rupture in hydrated taxoid type of Pollen. Grana 21:1—7.
- Duhoux, E. 1975. L'aperture dans l'exine et dans l'intine externe du Pollen du *Juniperus chinensis* L. et de *Juniperus communis* L. Pollen Spores 17:191—201.
- Fukuhara, N., M. Saito, C. Yamamoto, M. Qoter, A. Okazaki and Y. Tooboo. 1971. Some investigation of pollen of *Cryptomeria* and Hinoki cypress. J. Jap. Forest. Soc. 53(4):98—102.
- Gupta, U.C. 1979. Boron nutrition of crops. Adv. Agron. 31:273—307.
- Ho, R. H. and O. Sziklai. 1970. Germination and development of lodgepole pine pollen *in vitro*. Canadian J. Forest. Research 1:12—19.
- Kaus, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Ann. Rev.

- Plant Physiol. 38:47—72.
- Krueger, R.W., C. J. Lovatt, L.S. Albert.** 1987. Metabolic requirement of *Cucurbita pepo* for boron. Plant physiol. 83:254—258.
- Lewis, D.H.** 1980. Boron, lignification and the origin of vascular plants —a unified hypothesis. New phytol. 84:209—229.
- Li, Siao-Jong.** 1975. Reproductive biology of *Chamaecyparis*, II. pollen development and pollination mechanism. Taiwania 20(2):139—146.
- Muller-Stoll, W.R.** 1948. Zytomorphologische Studien am Pollen von *Taxus baccata* L. und anderen Koniferen. Planta 35:601—641.
- Pollard, A.S., A.J. Parr, and B.C. Loughman.** 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. J. Exp. Bot. 28:831—841.
- Yamazaki, T. and M. Takeoka.** 1958. Electron-microscope investigations on the surface of the pollen membrane, based on the carbon replica method. J. Jap. Forest Soc. 40:7—11, 154—159.
- Yamazaki, T. and M. Takeoka.** 1962. Electron-microscope investigations of the fine details of the pollen grain surface in Japanese gymnosperms. Grana Palynologica 3:3—12.