

花粉管萌芽的生理機轉和對外力的感受

國中組生物科第二名

臺北市立金華國民中學

作者：陳宗佑、韋韶明、江奕賢、陳威誌

指導教師：張秋虹、陳義益

一、研究動機

花粉研究的兩大問題(a)花季影響花粉的有無，(b)花粉的個別差異，開始研究長期貯存花粉活性的方法，一般貯存動物細胞或植物無壁細胞cell wall-free protoplast的DMSO/Deep Freeze方式對花粉傷害極大，貯存細菌和黴菌的50%甘油/Freeze方法也保存不住花粉活性[2]。我們發現薑花和百合花花粉在自然界環境未授粉前含大量精油，竟因此找到可以用植物油和低溫來長期保存花粉活力的最好方法。

本研究中設計玻瓶代替洋菜，用倒相式顯微鏡觀察玻瓶底油水界面花粉管生長，改善以前培養基的限制。由於可以一次大規模的檢驗許多不同的條件，我們發展可以讓薑花、百合花粉長出全長花粉管（30mm以上），並達到高發芽率（95%）的C98培養液，一方面花粉萌管的全程變化可以在C98培養液中被仔細觀察，一方面是選用材料百合花粉粒有粗大的花粉管。我們發現花粉管在長超過花粉體十至十五倍以後就出現非常清楚的細胞質流(plasma flow)，由於這流動遵循花粉管長軸做非常有固定方向的旋轉循環，我們把它稱為細胞質對向流(counterflow)。花粉管除了本身增長的運動外，細胞質流的速度可以在倒相式顯微鏡下目視測定。

二、研究目的和問題

- （一）探討顯花植物花粉管萌生的生理機轉。
- （二）探討顯花植物花粉在異常物理化學狀態的變化。
- （三）研討利用花粉萌管生物分析法DDPG，來快速鑑定幾種臺灣常見已知及未知生物毒素的方法。

三、研究設備器材

設備器材：倒相式顯微鏡Olympus IX70 model/Toshiba CCD Color Camera/CreTe Notebook Computer (with PCMCIA typeII Card) /工業用X光機。Rikoh RIX-310N,Max.Output:5mA,310KV./電子顯微鏡。

材料：花：葵百合，香水百合，咸豐草，薑花，天鵝絨／糖：麥芽糖，海藻糖，果糖，蔗糖，葡萄糖，乳糖，半乳糖／瓊菜，硼酸 H_3BO_3 ，硝酸鉀 KNO_3 ，硫酸鎂 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，鎔酸鈣 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ／大豆沙拉油／細胞抑殖藥：mitomycin/清潔劑／細胞膜通孔（小蛋白質分子）：valinomycin,gramicidin/植物荷爾蒙：IAA,indol-3-Acetic Acid/IBA,indol-3-Butyric Acid/GA,Gibberellic Acid(Gibberellin A)/Kinetin/河魴毒素Tetradotoxin(TTX)/Bacillus paralytic Toxin(BPT)。

四、研究方法

培育液實驗—油滴花粉萌管實驗的操作：

Droplet Drafted Pollen Germination Test(DDPG test)。

DDPG Test培育液封閉型實驗的操作（圖1）。

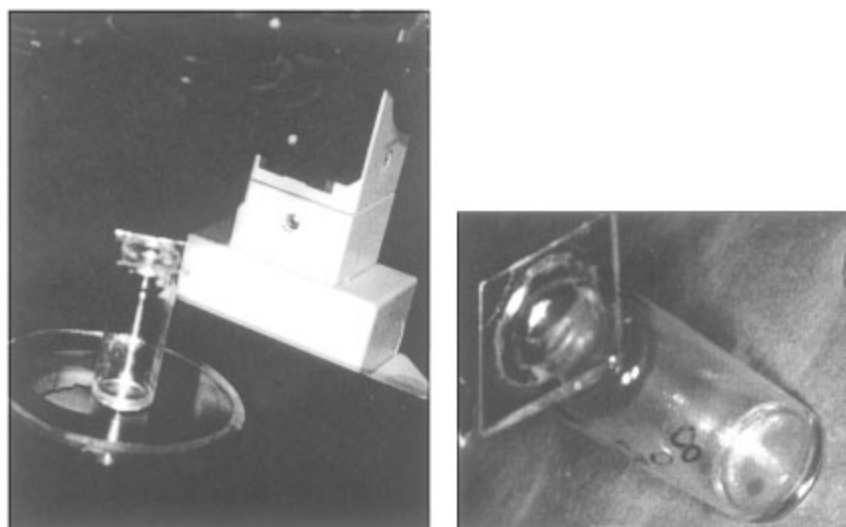


圖1 DDPG Test培育液封閉型實驗的操作

步驟1 在10c.c.的透明玻璃瓶內加入400-600 μ l的培育液C98。

步驟2 花粉用少量沙拉油懸浮後，用Gilson 20P吸取約3 μ l連同花粉加入上述培育液液面，輕輕旋轉撞擊液面使油滴呈小浮滴狀。

步驟3 用凡士林塗瓶口，再用小玻片蓋口，達成一封閉系統。

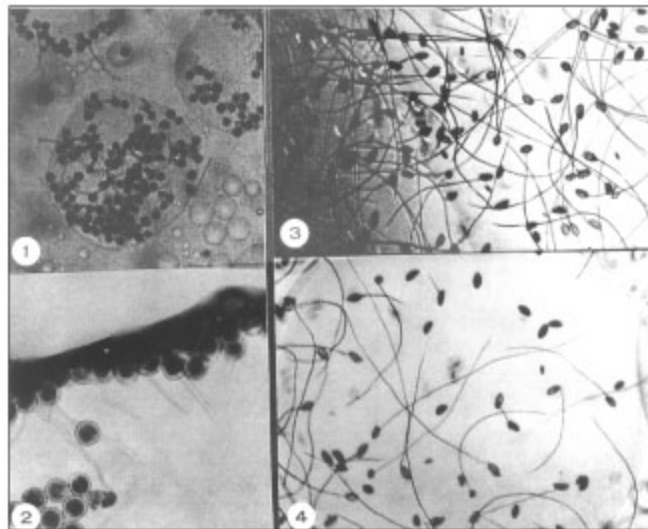
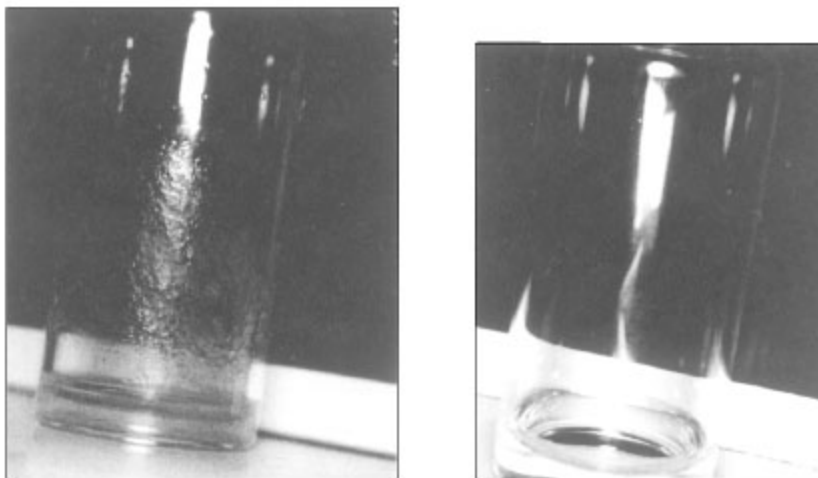


圖 2 薑花和百合花粉在DDPG test的萌芽
(左1&2：薑花，右3&4：百合花，花粉於DDPG 50min.)。

圖 3 肉眼亦可辨視花粉管的生長



左：伸長的百合花粉管（在室溫，MC98培育液中1-2天）。

糾纏宛若沾溼的棉花球。

右：對照組，不長花粉管的花粉細粒落入液中，無此現象。

五、研究結果

花粉管萌生的培育基及培育液：

實驗Medium C98 Agar:

Medium C98 Stock Solutions Potassium nitrate 500X:500mg in 10c.c.300ul for 150ml.MC98.

Magnesium sulfate500X:500mg in 5c.c.300ul for 150ml.MC98.

Calcium nitrate 500X: 710mg in 5c.c.300ul for 150ml.MC98.

Boric acid 600X:150mg in 5c.c.EtOH. 250ul for 150ml.MC98.

Taita No.5 regarded as 300 X. 500ul for 150ml.MC98.

Fructose 4.25gm, agar 2.5mg used for 150 ml MC 98.

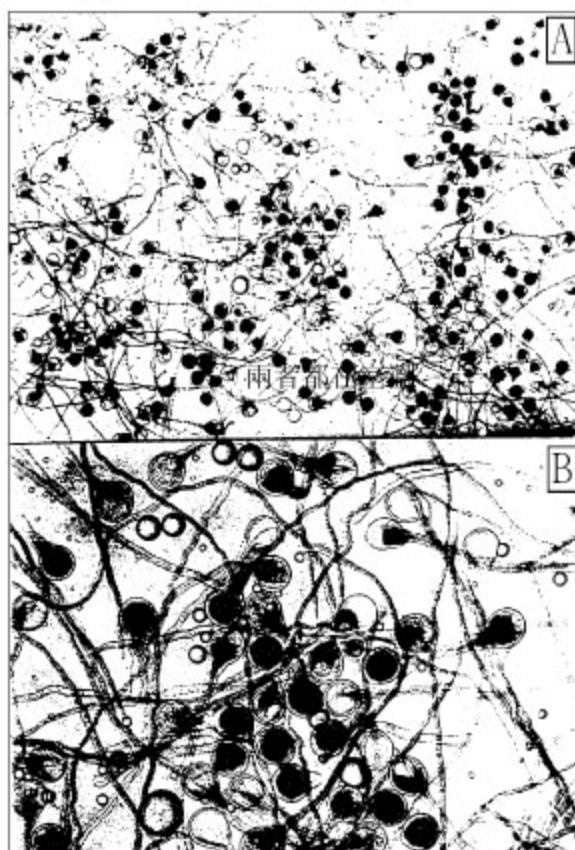


圖4 Medium C98中，低密度薑花花粉萌管

薑花以低密度（每平方毫米少於20個花粉粒）撒布（圖14）

下培育二小時，A:40X,B:100X。

培育中，花粉管形狀構造及長度：

不同時期花粉管的電顯構造：

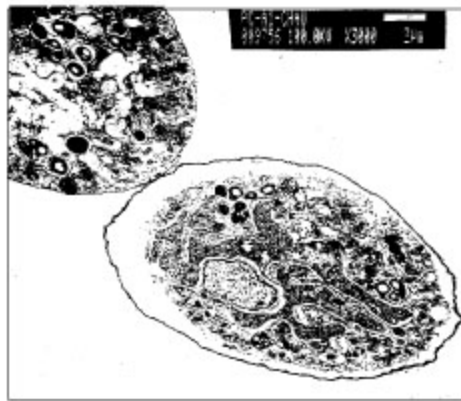


圖 5 Medium C98中百合花花粉管橫切面

右上角白線標示:2 μm 。左上花粉管為空泡期，右下為實心增長期。

很明顯地增長期有較厚細胞壁，較多粒線體。

顯露出許多的細胞內空泡被線粒體密集圍繞，許多澱粉細粒也分解。

各種細胞貯存溶劑下花粉粒的耐受性：

實驗天然油能保護百合花花粉免受冰固傷害？

實驗能長時間受冰固貯存？

結果低凝固油可以保護lily casablanca 花粉不受-80°C凍結傷害（圖六略）。

花粉受植物荷爾蒙的影響：

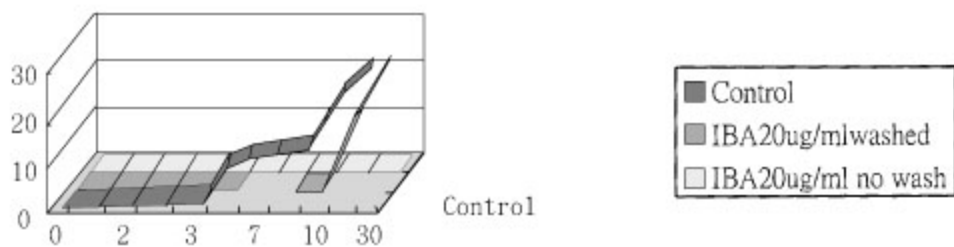


圖 7 IBA抑制萌管的可逆性（縱軸：花粉管長mm，橫軸：時間hr）

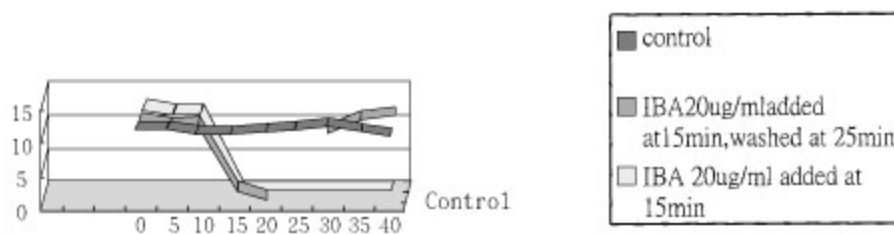


圖 8 IBA抑制細胞內質流的可逆性

(縱軸：細胞質流〔長／寬比〕，橫軸：時間min)

生物毒素對花粉萌管的影響：

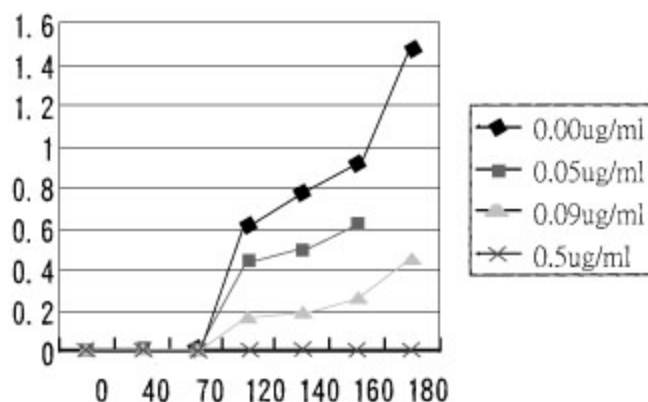


圖 9 河魴毒素對百合花粉管長度的抑制 (縱軸：花粉管長：mm橫軸：時間min)。

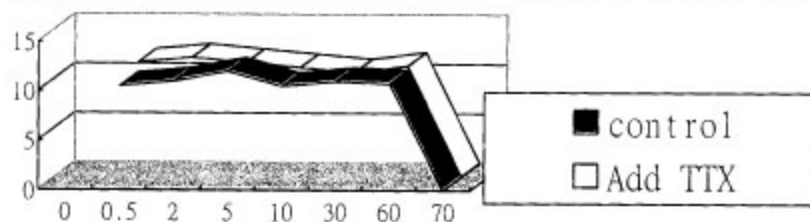


圖 10 花粉管細胞質對流不受TTX抑制

(縱軸：細胞質流〔長／寬比〕，橫軸：時間min)。

我們在白色組 (實驗組) 加入TTX至 $0.08 \mu\text{g/ml}$ ；黑色組為對照組則不加藥，兩組都在觀察後70分鐘時加入EtOH直到花粉管受固定而死亡。

黴菌及葷類毒素對花粉的影響：

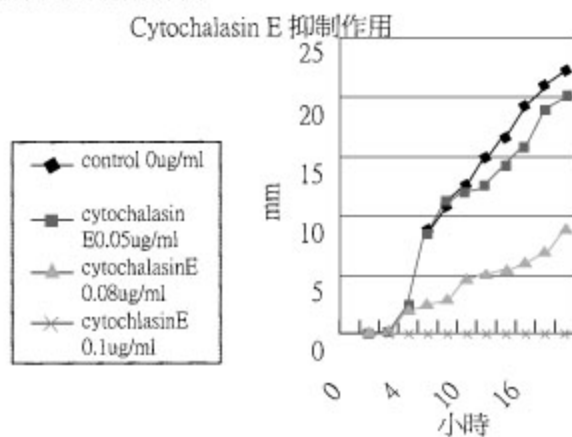


圖 1 1 花粉對Cytochalasin E毒素非常敏感

黴菌的毒素在我們DDPG test系統，所能測定的最低濃度是 $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。這個Cytochalasin E濃度和TTX濃度 $0.05\text{--}0.09\text{ }\mu\text{g/ml}$ 非常接近。

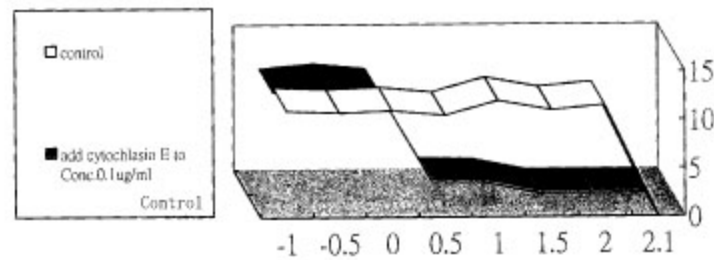


圖 1 2 cytochalasin E 徹底的停止這個細胞質流

(縱軸：細胞質流 [長/寬比]，橫軸：時間min)。

花粉管先發芽至 1.5mm ，細胞內質流在黑色組，時間0時加入cytochalasin E至 $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，白色組則不加。30分鐘內所有加了黴毒的粉管，全部停止內質流。在2小時後各組加入EtOH至50%。

實驗香煙煙霧對花粉功能有何作用？

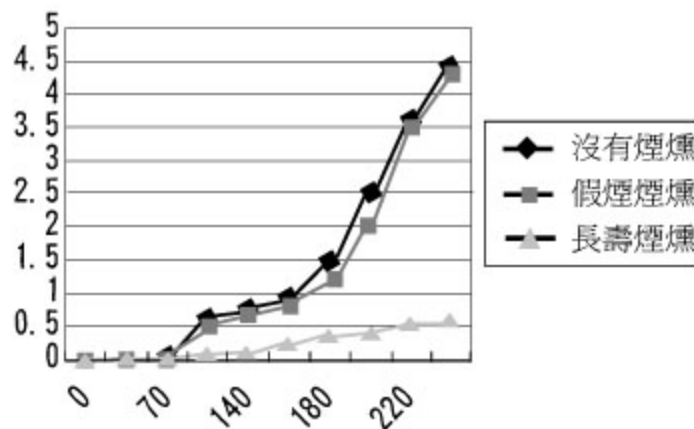


圖 1 3 香煙煙霧對百合花花粉管生長的影響 (縱軸：mm，橫軸：分鐘)

發現非常特別的而且奇怪的薑花花粉花粉管行爲，薑花花粉一粒出現兩個對立方向的生長管而且管尖端變大圓胖。

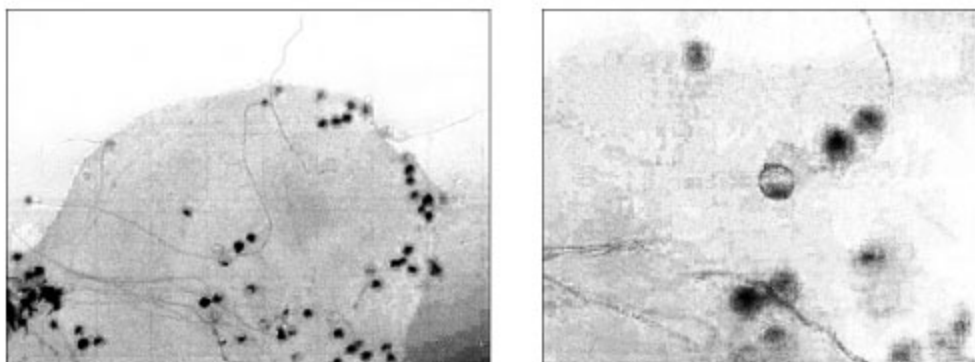


圖 1-4 香煙煙霧作用在薑花花粉管行為
(左圖中一薑花粉粒生出兩個相反方向花粉管，右圖放大)。

六、結論

1. 薑花花粉在5%的蔗糖比20%的蔗糖溶液生長較好 (參閱實驗一)。
2. 7%至8%的蔗糖，花粉萌芽效率仍不高 (參閱原實驗二)。
3. 我們發現果糖對花粉萌芽有最好的結果 (參閱原實驗三)。
4. 含2.83%果糖為最佳的培育液，加上1.67% agar 洋菜就成為最佳培育基 (參閱原實驗四)。
5. 洋菜膠的失水問題，室溫25°C下兩小時內可以失水達總重量1/3以上 (參閱原實驗五)。
6. 使用倒相式顯微鏡和小玻璃瓶取代洋菜和載玻片，無論是高低密度的花粉培育，花粉管長度幾乎達到生理長度 (參閱原實驗六)。
7. C98培育液對花粉萌管的效用較佳 (參閱原實驗七)。
8. C98培育液前八小時花粉的萌長速度：薑花花粉要一天，百合要四天才能遇到子房的胚珠，這時間恰好是花朵開放到凋謝的時間 (參閱原實驗八)。
9. 單個百合花粉在Medium C98 裡發育非常好且可長到充分的長度 (參閱原實驗九)。
10. 熱休克及冷休克的效應，單純的冰凍造成各種花花粉的立即死亡 (參閱原實驗十)。
11. 百合花的花粉最好的培育溫度在22-30°C之間 (參閱原實驗十一)。
12. 在冰箱裡，百合花粉也以每天5-10%的損耗逐漸老化，故須用適當的溶劑來貯存 (參閱原實驗十二)。

13. 百合和薑花花粉的最好滲透濃度是在250mM 0sm 到300mM 0sm 之間（參閱原實驗十三）。
14. 花粉管尖較脆弱，有更多容易允許水滲透的特性（參閱原實驗十四）。
15. 大豆沙拉油，精油和合成維他命E油，都顯示非同尋常的保護花粉活動力目的（參閱原實驗十五）。
16. 經過-80℃冰固，大豆沙拉油油浸百合花花粉，全部都顯示非同尋常的花粉活動力（參閱原實驗十六）。
17. 未成熟的花粉和成熟的花粉最大的差別是具有極長的前置期，在伸長期和空泡期沒有太大的差別（參閱原實驗十七）。
18. 花粉被IAA，IBA和NAA抑制，但是不受到ABA，GA和kinetin影響。
19. 河魴毒素對百合花粉的抑制有兩大特色：濃度超過0.5 $\mu\text{g/ml}$ 時，全部花粉粒都死亡；濃度在0.05-0.08 $\mu\text{g/ml}$ 之間，TTX有部份抑制現象（參閱原實驗十九）。
20. cytochalasin E 抑制花粉生長但是phalloidin沒有抑制（參閱原實驗二十）。
21. 沒有氧沒有花粉成長（參閱原實驗二十一）。
22. 在早期花粉萌芽不需要新蛋白質合成，但是一小時以後需要（參閱原實驗二十二）。
23. 半口香煙煙霧抑制90%花粉生長（參閱原實驗二十三）。
24. 質流唯一的，僅受IAA和cytochalasin抑制，IAA的抑制作用是完全的（參閱原實驗二十四）。
25. 花粉對工業蒸氣非常敏感，我們發展DDPGVE檢查方法（參閱原實驗二十五）。

七、參考資料及其它

1. 陳義益，張秋虹，新桿菌毒素蛋白BPT的發現，金華國中國際科展(88)。
2. 洪怡軒等十名，鴨趾草花粉管萌芽實驗方法的改良研究，第二十一屆全國國中組生物第一名。
3. 黃正華，台灣花會彩色圖鑑“序”，行政院農委會出版，民76年8月。
4. Agricultural Status and Policy Development in ROC on Taiwan (1996), Agriculture World Wide。
Web.(<http://www.coa.gov.tw/y87/globe.htm>)

5. 高景輝，植物生長與演化，國立編輯館出版，茂昌發行，民68
Chapter17:pp.587-592。

評語

這是一份非常嚴謹且完整的作品，最大的特色並不在於實驗過程中所使用的各種精密儀器及複雜的生化藥品，而在於作者能有巧思，利用很簡單的植物油配方，提升花粉的存活率在未來農業的育種上有很好的貢獻，另外作者也能利用很簡單的花粉管萌芽作為環境毒物偵測的指標，整體而言，具有很好的應用價值，深值嘉許。

