

中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

第三名

040713

兵來將擋—鐵砲百合(Lilium longiflorum)柱頭分泌物防
止異種雜交之機制

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者： 高二 林俞廷 高二 林乃慧	指導老師： 呂億真
-------------------------	--------------

關鍵詞：鐵砲百合 異種雜交 萌發

摘要

本研究欲探討異種植物在授粉作用時防止雜交的機制。我們選定鐵砲百合柱頭分泌物及劍蘭花粉作為實驗探討之對象。

研究結果顯示：鐵砲百合柱頭分泌物對劍蘭花粉之萌發有明顯的抑制作用，當溫度超過 50°C 將會破壞柱頭分泌物對花粉萌發之抑制作用。而以不同孔徑分子篩(Microcon)離心柱頭分泌物之實驗結果顯示：柱頭分泌物中，抑制劍蘭花粉萌發的物質其分子量介於 30-50kDa 之間。接著，以 Trypsin 作用柱頭分泌物，發現處理過後的柱頭分泌物對劍蘭花粉的抑制效果明顯降低，表示此抑制物質會被蛋白酶所分解。

綜合以上結論，再經 SDS-PAGE 電泳的結果確認：鐵砲百合柱頭分泌物中，抑制劍蘭花粉萌發的物質為一種蛋白質，其分子量約在 45kDa 左右，且該種抑制蛋白的活性在溫度 50°C-55°C 會被破壞。

將此種蛋白質做蛋白質定序，結果顯示：此種蛋白質為一種 Peroxidase。

壹、研究動機

從小就對百合花的大柱頭和滿滿的花粉留下深刻的印象，也喜歡幫忙把花粉都沾到柱頭的黏液上，記得有一次不小心將別種花的花粉灑到百合花的柱頭上，當下惶恐的我趕緊用棉花棒將這些外來花粉清理掉。現在想來，自然界中這樣的情況應是非常普遍易見，那這些外來的花粉是否能在百合花的柱頭上萌發？倘若能順利萌發，之後的命運為何？若無法萌發，則是否在百合花的柱頭上具有可以抑制異種雜交的物質？該物質成分為何？為解決心中疑惑，並進一步探討植物如何防止異種雜交，於是我們展開以下對鐵砲百合之探討實驗。

貳、研究目的

- 一、探討鐵砲百合柱頭分泌物對劍蘭花粉萌發之影響。
- 二、探討不同方式處理後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發之影響。
 - (一)不同溫度處理之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響。
 - (二)以不同孔徑「分子篩」離心後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響。
 - (三)以蛋白酶作用後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響。
- 三、探討鐵砲百合柱頭分泌物中，影響劍蘭花粉萌發的物質為何。

參、研究設備與器材

一、研究材料

(一)鐵砲百合柱頭分泌物 (取自中研院趙光裕教授實驗室，以下僅以柱頭分泌物代稱)

(二)花粉種類：大花馬齒莧(*Portulaca grandiflorahook*)

劍蘭 (*Gladiolus hybridus*)

野薑花 (*Hedychium coronarium koenig*)

日日春 (*Vinca rosea*)

非洲鳳仙花(*Impatiens walleriana*)

安石榴 (*Punica granatum*)

紫錦草 (*Setcreasea purpurea*)

菊花 (*Chrysanthemum morifolium*)

夏枯草 (*Prunella vulgaris L.*)

二、研究設備

(一)器材

- | | |
|---------------------------------------------|--------------------------|
| 1. 量筒 | 2. 玻璃板 |
| 3. 燒杯 | 4. SDS 電泳槽 |
| 5. 塑膠培養皿 | 6. 磁石 |
| 7. 載玻片 | 8. 玻璃紙 |
| 9. 蓋玻片 | 10. 鑄膠器 |
| 11. 玻璃乳頭滴管 | 12. 樣品槽模板(<i>Comb</i>) |
| 13. 微量吸管 <i>Pipette</i> 200 μ l | 14. 白色氧化鋁板 |
| 15. 微量離心管 | 16. 間隔條(<i>Spacer</i>) |
| 17. 玻璃固定夾 | 18. 濾紙 |
| 19. 塑膠染色盒 | 20. 刀片 |
| 21. 離心超濾裝置(分子篩)Microcon 10kDa, 30kDa, 50kDa | |



Microcon(分子篩)

(二)儀器

1. 數位相機(Nikon E995)
2. 烘箱
3. 光學顯微鏡
(Olympus CH20)
4. 排煙櫃
(CONCEPT. Biotech. inc.)
5. 恆溫水槽
(Lead-Biotech. inc.)
6. 電磁加熱攪拌器
(Corning)
7. pH 儀(Suntex)
8. 看片箱(light box, topbio)
9. 微量電子精密分析天平(METTLER AB54-S/A)
10. 小型乾式恆溫機(Type 17600, Thermolyne)
11. 離心機(Sigma-202MK, Bo Yan. inc.)
12. 震盪器 Reciprocating Shaker (Model 321 Sun Chion.)
13. 電源供電器(EPS3501xL, Amersham Biosciences)
14. 桌上型全自動高壓滅菌器 (EAT-650, 群育 CHEMIST)

(三)藥品

1. 花粉培養液(以下僅以培養液代稱)：

CaCl ₂	6.35 x10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	8.1x10 ⁻⁷
KNO ₃	4.95x10 ⁻⁶
蔗糖	5g
加 dd water 至總體積	50ml

2. Trypsin

3. 10 X Tank Buffer：

Tris	15.14 g
Glycine	72.06 g
SDS	5 g
加 dd water 至總體積	500 ml

4. 1%Bromophenol Blue(BPB)：

BPB	0.1 g
加 dd water 至總體積	100 ml

5. 1.25 M Tris-HCl, pH6.8：

Tris	15.14 g
dd water	80 ml
HCl	pH = 6.8
加 dd water 至總體積	100 ml

6. 30% Acrylamide : Bis-acrylamide (30%, 0.8%) :

Acrylamide	30 g
Bis-acrylamide	0.8 g
加 dd water 至總體積	100 ml

7. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 :

Tris	90.83 g
dd water	400 ml
加 HCl 至	pH = 8.8
加 dd water 至總體積	500 ml

8. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 :

Tris	6.06 g
dd water	80 ml
加 HCl 至	pH = 6.8
加 dd water 至總體積	100 ml

9. 10 % SDS :

SDS	10 g
加 dd water 至總體積	100 ml

10. 10 % Ammonium Persulfate (APS) :

APS	0.5 g
加 dd water 至總體積	5 ml

11. TEMED (keep at room temperature)

12. 4X Sample Buffer:

SDS	0.8 g
2-mercaptoethanol	0.2 ml
0.1 % Bromophenol Blue	1.6 ml
Glycerol	4 ml
1.25 M Tris-HCl, pH 6.8	2 ml
加 dd water 至總體積	10 ml

13. Running Buffer :

10 X Tank Buffer	100 ml
加 dd water 至總體積	1000 ml

14. Stain Solution :

Methanol	500 ml
Acetic acid	100 ml
dd water	400 ml
Coomassie Blue	1.25 g

15. Destain Solution I :

Methanol	500 ml
Acetic acid	100 ml
dd water	400 ml

16. Destain Solution II :

Methanol	50 ml
Acetic acid	70 ml
dd water	880 ml

17. Methonal

肆、研究過程與方法

一、前測實驗：

(一)目的：觀察不同種花粉在純培養液中與含柱頭分泌物培養液的萌發情形，以選取適於探討鐵砲百合防止異種雜交機制的物種。

1. 配製培養液：

(1)配置成分如下之混合溶液：

CaCl ₂	1.27mM
H ₃ BO ₃	0.162mM
KNO ₃	0.99mM

(2)取5ml之混合溶液加入蒸餾水至40ml，再加入5g蔗糖使其完全溶解，最後加入去離子水至50ml。

(3)以KOH調整溶液的pH值到pH=5.2，即為最適鐵砲百合花粉萌發的培養液。

2. 在塑膠培養皿中置入2ml的培養液。

3. 各加入新鮮的花粉〈劍蘭、野薑花、馬齒莧、日日春、非洲鳳仙、安石榴、紫草、夏菇草、菊花〉。

4. 觀察並紀錄花粉萌發情形。

*說明：萌發的定義：以花粉長出花粉管謂之萌發。

5. 結果顯示：

在上述九種植物中，非洲鳳仙、日日春、夏菇草、紫錦草、劍蘭、野薑花等6種花粉可在3小時內萌發。

(二)鐵砲百合柱頭分泌物對不同種花粉萌發的影響：

1. 吸取0.4ml的柱頭分泌物放入塑膠培養皿中，再加入2ml的培養液。

2. 分別加入非洲鳳仙、日日春、夏菇草、紫錦草、劍蘭與野薑花的新鮮花粉，並置於震盪器上使其均勻分布。

3. 於一、三、五小時後觀察並紀錄花粉萌發情形。

4. 結果顯示：

非洲鳳仙花、日日春花粉萌發率不受影響，而夏枯草、劍蘭花粉萌發率明顯下降。

因劍蘭的花粉粒較大而多且易於觀察，又可在短時間內看出影響，故選擇劍蘭作為探討鐵砲百合防止異種雜交實驗的對象。

二、探討鐵砲百合柱頭分泌物對劍蘭花粉萌發的影響

(一) 劍蘭在培養液中的萌發情形：

1. 於培養皿中加入 2ml 培養液，並加入新鮮的劍蘭花粉，將培養皿放置於震盪器上使其混合均勻。
2. 於一、三、五小時後觀察並紀錄劍蘭花粉之萌發率。
3. 說明：

萌發率之計算法：在顯微鏡的視野下任意選取 6 個區塊，分別算出每個區塊的萌發率(萌發數/總數 × 100%)，再求平均值。

(二) 劍蘭在加入柱頭分泌物後之培養液中的萌發情形：

1. 於培養皿中加入 2ml 培養液，並加入新鮮的劍蘭花粉及柱頭分泌物，將培養皿放置於震盪器上使其混合均勻。
2. 於一、三、五小時後觀察並紀錄劍蘭花粉之萌發率。

三、探討不同方式處理後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發之影響

(一) 不同溫度處理之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率的影響。

1. 將 0.4ml 之柱頭分泌物置於微量離心管中，共五管。
2. 將微量離心管分別置於不同溫度(40°C、45°C、50°C、55°C、60°C)恆溫水槽 10 分鐘。
3. 取出上述 5 管後靜置於恆溫水槽(溫度控制在 25°C)24 小時。
4. 於培養皿中加入 2ml 培養液，再加入步驟 3 改變後的柱頭分泌物，以及新鮮的劍蘭花粉，將培養皿放置於震盪器上使其混合均勻。
5. 於一、三、五小時觀察並紀錄劍蘭花粉之萌發率。

(二) 不同孔徑分子篩 離心後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響

1. 實驗一

- (1) 將 0.4ml 之柱頭分泌物置於 Microcon-50 上層。
- (2) 利用離心機將柱頭分泌物離心 12 分鐘(轉速 13000rpm/min)。
- (3) 分別取出上層液及下層液，將其體積以培養液調整至 0.4 ml，置入塑膠培養皿中。
- (4) 加入新鮮的劍蘭花粉及 2ml 培養液。
- (5) 於一、三、五小時觀察並紀錄劍蘭花粉之萌發率。

2. 實驗二

- (1) 將 0.4ml 之柱頭分泌物置於 Microcon-30 上層。
- (2) 重複實驗一步驟(2)~(5)。

3. 實驗三

- (1) 將 0.2ml 之柱頭分泌物置於 Microcon-50 上層，共兩管。
- (2) 利用離心機將柱頭分泌物離心 15 分鐘(轉速 13000rpm/min)。
- (3) 每管加入 0.2ml 培養液作為緩衝液於上層，並離心 25 分鐘(轉速 13000rpm/min)。
- (4) 取出下層液(<50KDa)，將下層液置於 Microcon-30 上層。
- (5) 利用離心機將步驟(4)離心 15 分鐘(轉速 13000rpm/min)。
- (6) 重複步驟(3)後分別取出上層液(30-50kDa)及下層液(<30kDa)，將兩管之上層液集中在一起，並將體積以培養液調整至 0.4ml，置入塑膠培養皿中。
- (7) 重複實驗一步驟(4) ~ (5)。
- (8) 將步驟(6)之下層液，置於 Microcon-10 上層，共兩管。
- (9) 利用離心機將柱頭分泌物離心 35 分鐘(轉速 13000rpm/min)。
- (10) 每管加入 0.2ml 培養液作為緩衝液於上層，並離心 50 分鐘(轉速 13000rpm/min)。

(11) 取出上層液(10-30KDa)，將兩管之上層液集中在一起，並將體積以培養液調整至 0.4ml，置入塑膠培養皿中。

(12) 重複實驗一步驟(4) ~ (5)。

(三)以蛋白酶 Trypsin處理後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率的影響

1. 量取 0.01 克 Trypsin 加入 500ml 的水。
2. 取 0.2ml Trypsin 溶液加入 0.4ml 柱頭分泌物，使其作用 24 小時。
3. 將步驟 2 溶液加入培養皿，並置入新鮮的劍蘭花粉及 2ml 培養液。
4. 於一、三、五小時觀察並紀錄花粉萌發情形。

三、探討鐵砲百合柱頭分泌物中影響花粉萌發的物質為何

(一)離體電泳(SDS-PAGE)：

1. 製作樣品：

- (1) 將 0.4ml 之柱頭分泌物置於微量離心管中，共四管。
- (2) 將微量離心管分別置於不同溫度(25°C(控制組)、40°C、50°C、60°C)恆溫水槽 10 分鐘。
- (3) 取出上述 4 管後，再靜置於恆溫水槽(溫度控制在 25°C)24 小時。
- (4) 以奇異筆在微量離心管上標註樣品內容。

2. 使用離體電泳：

(1) 組合鑄膠器、玻璃板、白色氧化鋁板及間隔條

*在組合之前需使用 70% EtOH 清潔所有器材。

(2) 配置下層膠

(2-1)取 1.5M Tris, pH 8.8 , 2.5ml 加入 50 ml 燒杯。

(2-2)加入 dd water 3.53 ml。

(2-3)加入 30% Acrylamide:Bis 3.84 ml。

(2-4)加入 10% SDS 0.1 ml。

(2-5)加入 10% APS 100 μ l。

(2-6)將整杯溶液放在電磁加熱攪拌器上攪拌使其混合均勻。

(2-7)加入 TEMED 10 μ l 快速攪拌使其均勻後，迅速將其注入玻璃板

間空隙達 5.5 公分左右，再注入去離子水至上緣以隔絕空氣，

靜置到溶液凝結成膠。

(3) 樣品前處理

(3-1)取 15 μ l 的樣品與 5 μ l 4X Sample Buffer 混合置於微量離心管中並標註。

(3-2)取 5 μ l Marker、3 μ l 4X Sample Buffer 與 4 μ l 去離子水混合置於微量離心管中並標註。

(3-3)置於 95°C 乾式恆溫機中約 3 分鐘。

(3-4)以 13,000 轉速離心約三分鐘。

(4) 配置上層膠

(4-1)將鑄膠器上層的水倒掉，以濾紙吸乾水分。

(4-2)取 0.5MTris, pH 6.8 , 1ml 加入 50 ml 燒杯。

(4-3)加入 dd water 2.3 ml。

(4-4)加入 30%Acrylamide:Bis 0.63 ml。

(4-5)加入 10% SDS 40 μ l。

(4-6)加入 10% APS 60 μ l。

(4-7)將整杯溶液放在電磁加熱攪拌器上攪拌使其混合均勻。

(4-8)加入 TEMED 6 μ l 快速攪拌使其均勻後，迅速將其注入玻璃板間空隙至上緣，並插入樣品槽模板，靜置到溶液凝結成膠。

(5) 小心拔出樣品槽模板，上方梳形樣品槽以去離子水清洗，沖走凹槽內的膠體，趕走下貯槽玻璃板縫隙間的氣泡，避免電流不穩定。

(6) 將玻璃自鑄膠器上拿下。

(7) 電泳操作

(7-1)將 running buffer 倒入電泳槽中。

(7-2)分別將處理好的 4 樣品與 Marker 注入孔內。

(7-3)蓋上電泳槽，連接電極線於電源供應器，調整電壓至 200 V，開始跑電泳。

- (7-4)由追蹤染劑觀察蛋白質泳動情形，接近膠體底部時停止電泳。
- (7-5)小心將玻璃片拆開，將上下層膠分離，並在下層膠截角作記號以標示正反面。
- (7-6)將膠片置入塑膠染色盒內，加入 Stain Solution 到液面蓋過膠片為止，將其放置於震盪器上約一小時。
- (7-7)倒掉 Stain Solution，加入 Destain Solution I，並放置於震盪器上約 45 分鐘。
- (7-8)倒掉 Destain Solution I，加入 Destain Solution II，將其放置於震盪器上至膠片背景褪色至透明為止。
- (8) 將膠片置於看片箱上拍照。
- (9) 封膠
- (9-1)選取一片比膠片大的玻璃板。
- (9-2)在玻璃板上鋪滿水。
- (9-3)將玻璃紙泡水軟化，鋪在玻璃板上。
- (9-4)把膠片置於玻璃版中央(玻璃紙上)，再鋪滿水份。
- (9-5)再蓋上一層玻璃紙，以長尾夾夾緊四角。
- (9-6)整個玻璃板拿到排煙櫃風乾。
- (9-7)待玻璃紙變硬後，即可自玻璃板上取下觀察結果。

(二)蛋白質定序

1. 滅菌

- (1)用燒杯取適量的 Methonal。
- (2)將所需的微量離心管及配置藥品所需的 tips 用 Methanol 清洗乾淨。
- (3)置入烘箱烘乾約兩小時。
- (4)將烘乾過的微量離心管及 tips 置入桌上型全自動高壓滅菌器滅菌約兩小時。
- (5)在置入烘箱烘乾約二十四小時。

2. 使用離體電泳

(1)重覆研究過程與方法三之(一)之 2 的步驟(1) ~ (8)。

3. 挖膠

(1)將刀片及玻璃以 EtOH 擦拭乾淨。

(2)於排煙箱中將膠片從塑膠染色盒中取出並至於玻璃上。

(3)以刀片分別挖取 66.0kDa 及 45.0kDa 之蛋白質並放入微量離心管中。

(4)分別加入 200 μ l 滅菌水保存。

4. 送至成功大學蛋白質體核心實驗室作蛋白質定序。

伍、研究結果

一、探討鐵砲百合柱頭分泌物對劍蘭花粉萌發之影響：

(一)比較劍蘭花粉在純培養液與加入柱頭分泌物之培養液中的萌發情形：



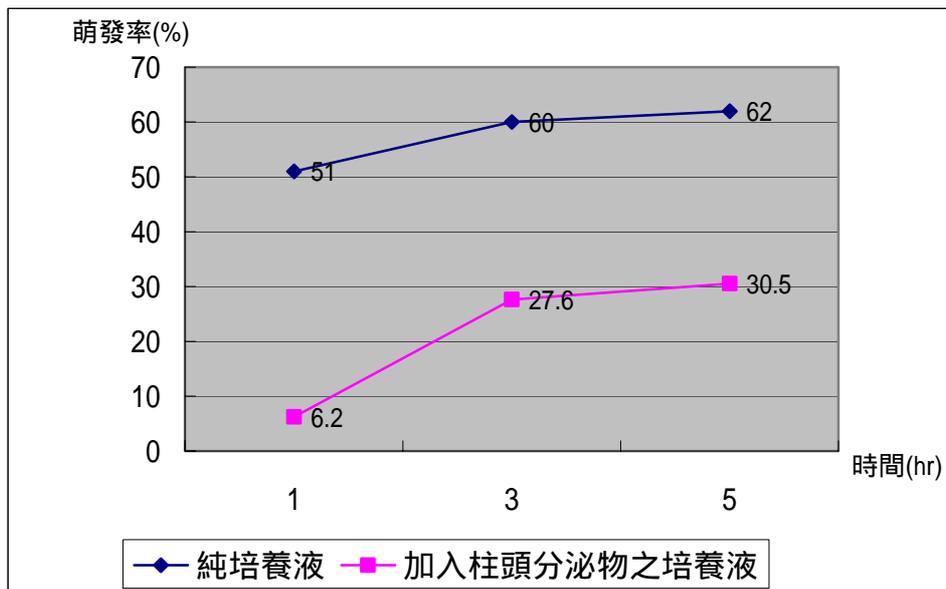
純培養液中 1 小時之萌發情形



加入柱頭分泌物中 1 小時萌發情形

(→ : 萌發 → : 未萌發)

(二)劍蘭花粉在純培養液與加入柱頭分泌物培養液中之萌發率：



〈圖一〉劍蘭花粉在不同成分培養液中之萌發率

根據上圖結果顯示：

1. 不論在純培養液中或柱頭分泌物培養液中，劍蘭花粉萌發率皆在一小時最低，且隨時間增加，萌發率皆有上升之趨勢。
2. 劍蘭花粉在含柱頭分泌物培養液中之萌發率明顯較在純培養液中之萌發率低。

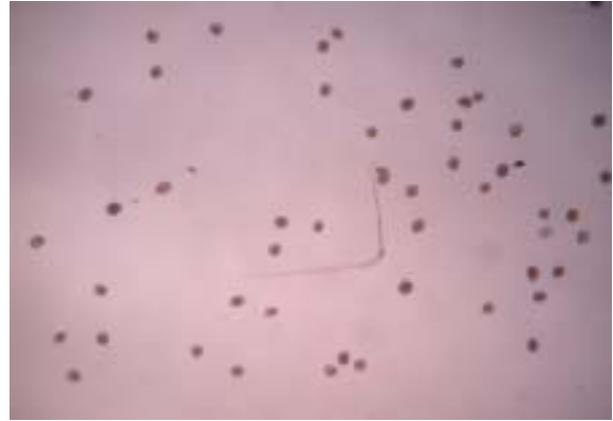
二、探討不同方式處理後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發之影響：

(一)不同溫度處理之柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發之影響：

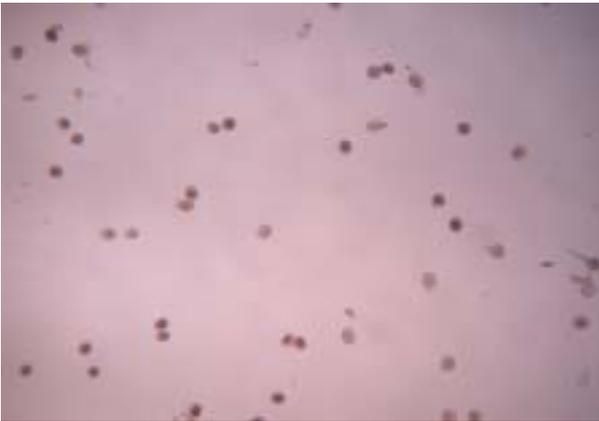
1. 劍蘭花粉在不同溫度作用下的柱頭分泌物培養液中的萌發情形：



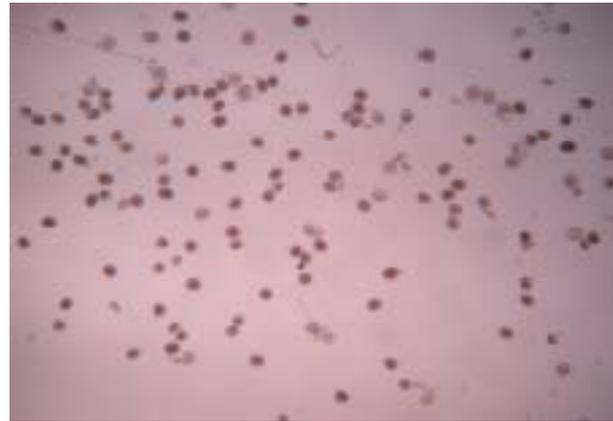
40°C、1 小時之萌發情形



45°C、1 小時之萌發情形



50°C、1 小時之萌發情形

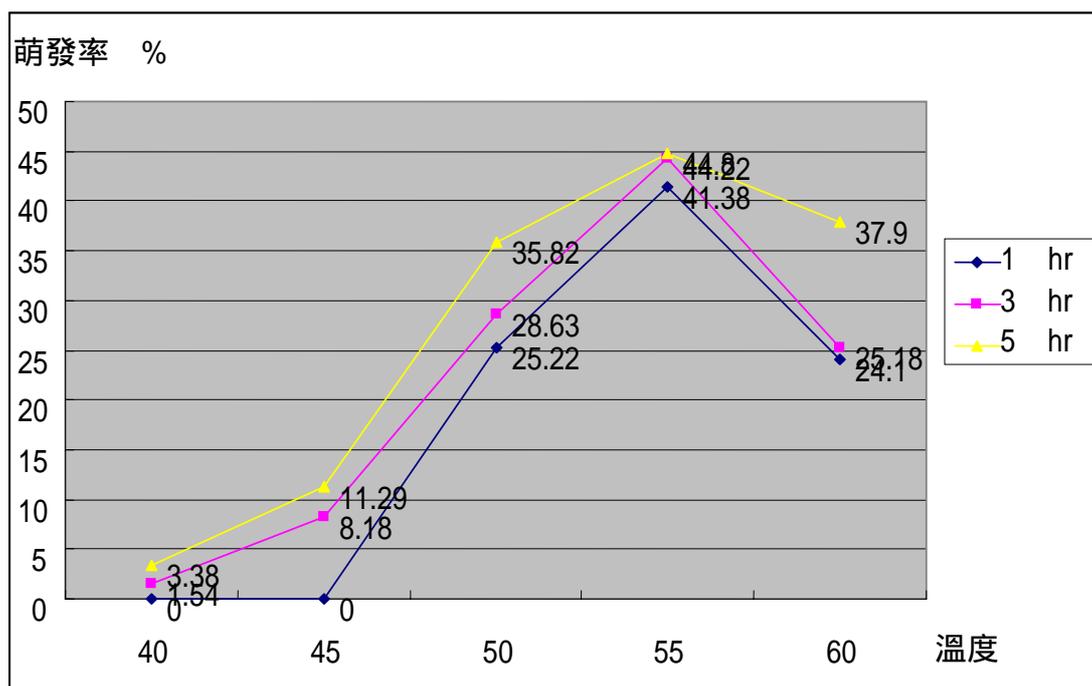


55°C、1 小時之萌發情形



60°C、1 小時之萌發情形

2. 不同溫度處理之柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響：



〈圖二〉不同溫度處理之柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率之影響

根據上圖結果顯示：

- (1) 在 40°C-60°C 的溫度作用下，劍蘭花粉之萌發率皆在 1 小時最低，且隨時間增加，萌發率皆有上升之趨勢。
- (2) 劍蘭花粉在 40°C 與 45°C 加熱過後之柱頭分泌物培養液中，萌發率均甚低；而在 50°C、55°C、60°C 加熱過後之柱頭分泌物培養液中，萌發率均明顯提高；其中又以在 55°C 加熱過後之柱頭分泌物培養液中，劍蘭花粉之萌發率最高。

(二) 不同孔徑分子篩 離心後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發之影響：

實驗一：以 Microcon-50 離心柱頭分泌物後，分別取上層(>50kDa)、下層液體(<50kDa)，進行對劍蘭花粉之影響。

1. 比較劍蘭花粉在離心後之上、下層液體的萌發情形：

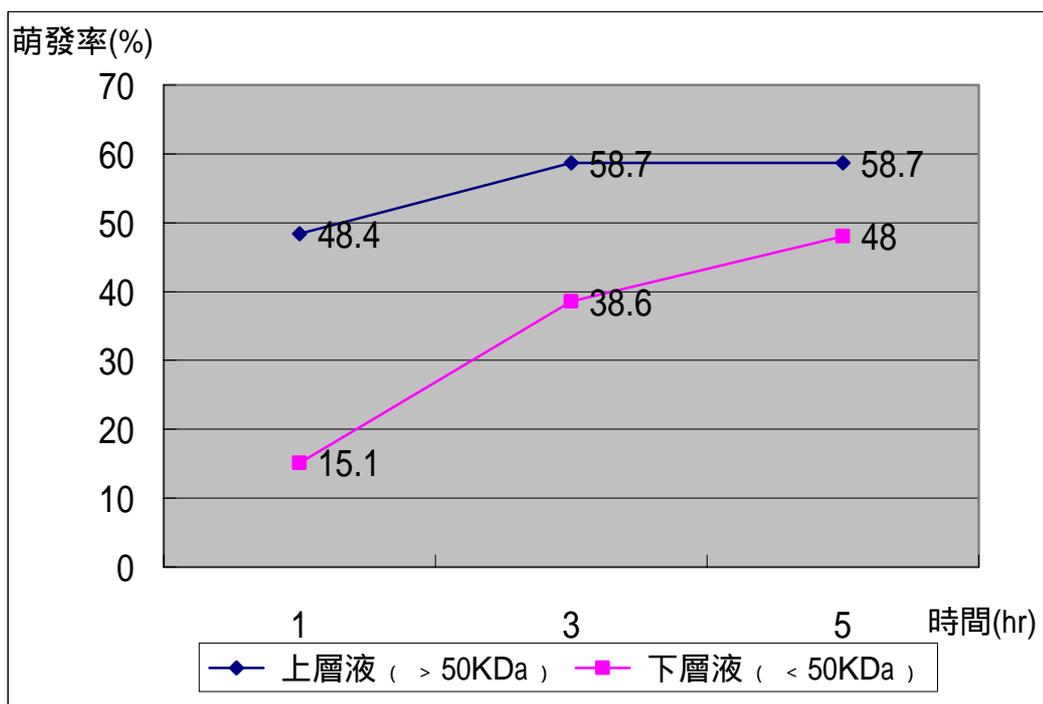


上層液體 (> 50kDa)、1 小時之萌發情形



下層液體 (< 50kDa)、1 小時萌發情形

2. 離心後上、下層液體對劍蘭花粉萌發率之影響：



〈圖三〉柱頭分泌物離心後之上層及下層液對劍蘭花粉萌發率之影響

根據上圖結果顯示：

(1) 不管劍蘭花粉在 Microcon-50 離心後之上層或下層柱頭分泌物中，萌發率在 1 小時內皆最低，且隨時間增加，萌發率皆有上升之趨勢。

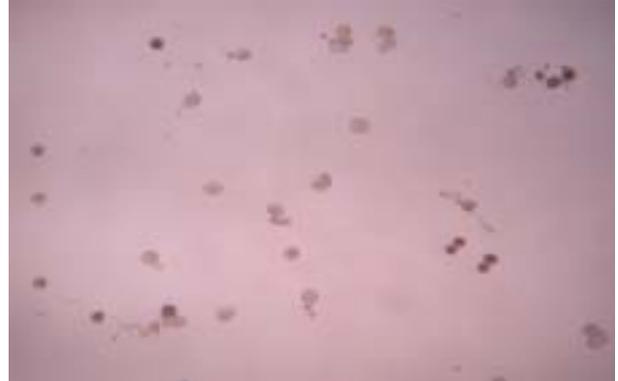
(2) 劍蘭花粉在下層液 (<50kDa) 中之萌發率，明顯較上層液 (>50kDa) 低。

實驗二：以 Microcon-30 離心柱頭分泌物後，分取上層(>30kDa)、下層(<30kDa)液體，進行對劍蘭花粉之影響。

1. 比較劍蘭花粉在離心後之上、下層液體的萌發情形：

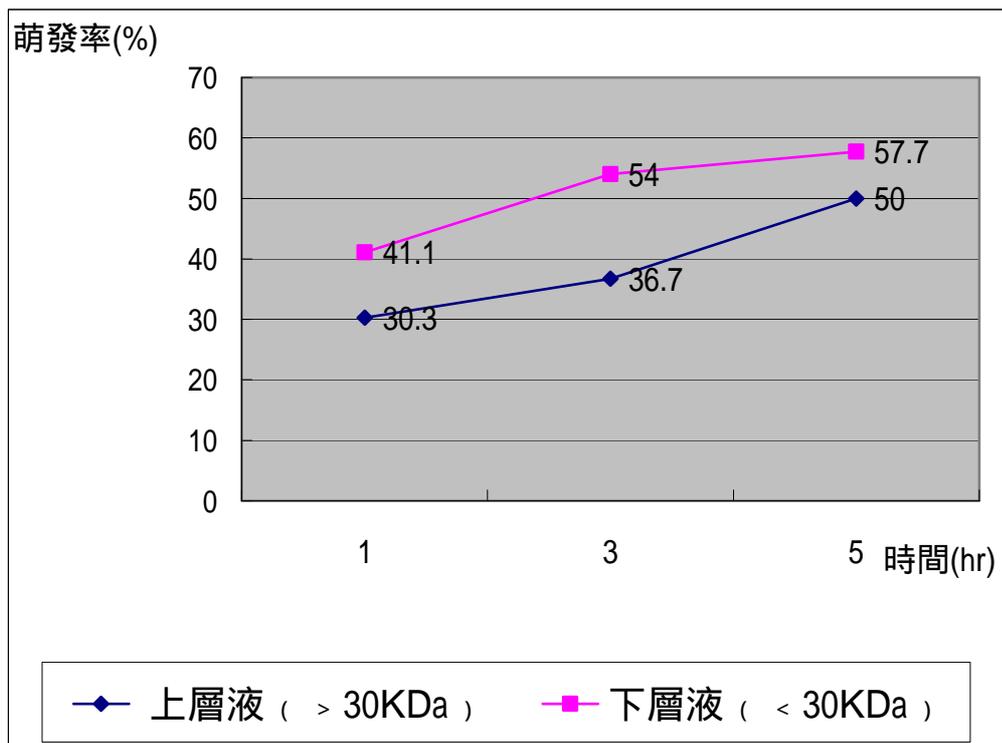


上層液體 (> 30kDa)、1 小時之萌發情形



下層液體 (< 30kDa)、1 小時之萌發情形

2. 離心後上、下層液體對劍蘭花粉萌發率之影響：



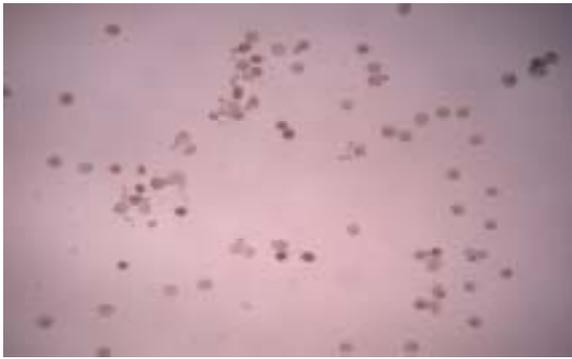
〈圖四〉柱頭分泌物離心後之上層及下層液體對劍蘭花粉萌發率之影響

根據上圖結果顯示：

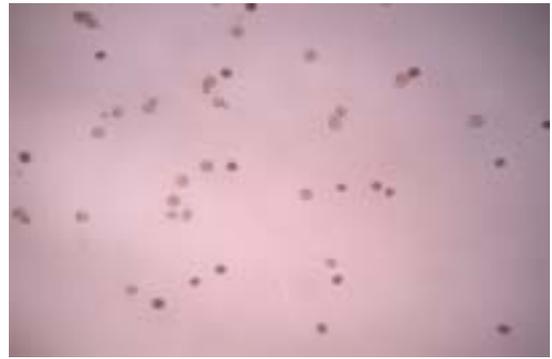
- (1) 劍蘭花粉在 Microcon-30 離心後之上或下層柱頭分泌物中，萌發率在 1 小時內皆最低，且隨時間增加，萌發率皆有上升之趨勢。
- (2) 劍蘭花粉在上層液 (>30kDa) 中之萌發率較下層液 (<30kDa) 低。

實驗三：

1. 比較劍蘭花粉在 30-50kDa 及 10-30kDa 柱頭分泌物中的萌發情形：

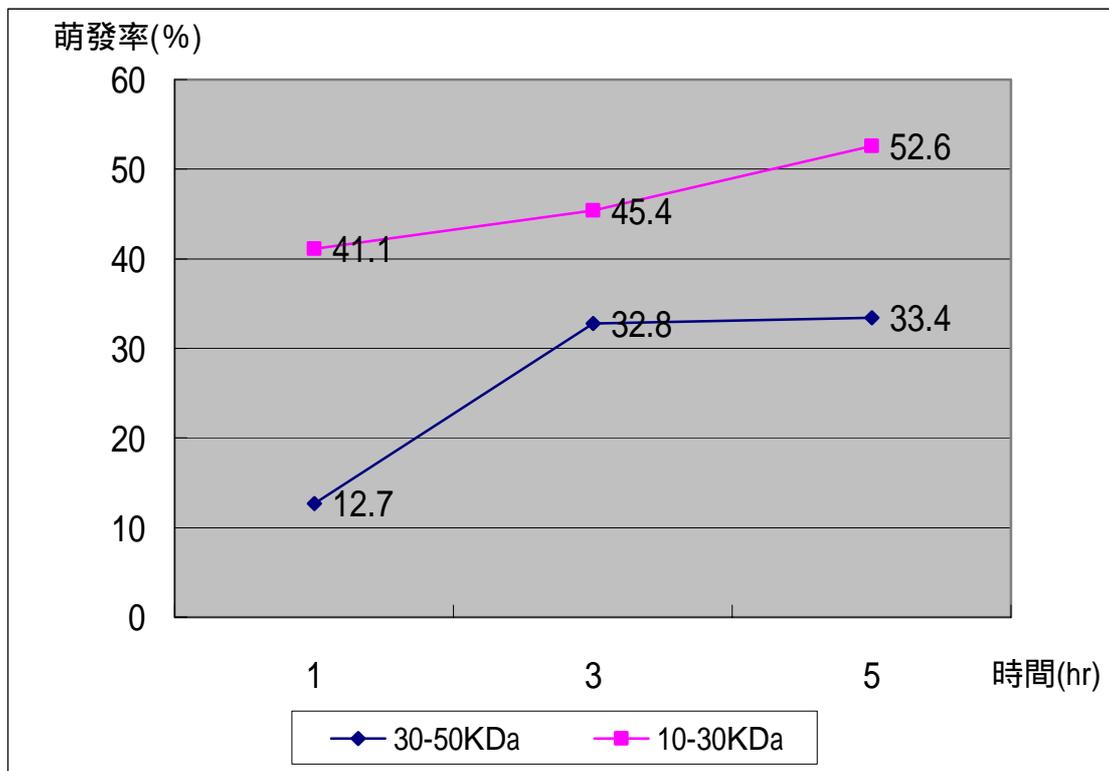


10-30kDa 、1 小時之萌發情形



30-50kDa 、1 小時之萌發情形

2. 劍蘭花粉在 30-50kDa 及 10-30kDa 柱頭分泌物中之萌發率：



〈圖五〉 30-50KDa 及 10-30KDa 柱頭分泌物培養液對劍蘭花粉萌發率之影響

根據上圖結果顯示：

- (1) 劍蘭花粉在 30-50kDa 與 10-30kDa 柱頭分泌物培養液中，萌發率在 1 小時皆最低，且隨時間增加，萌發率皆有上升之趨勢。
- (2) 劍蘭花粉在 30-50kDa 柱頭分泌物培養液中之萌發率較在 10-30kDa 柱頭分泌物培養液中低。

綜合以上實驗結果可知：

1. 鐵砲百合柱頭分泌物在超過 50°C 以上的溫度作用後，對劍蘭花粉萌發率的抑制作用減弱，而其中又以 55°C 處理後的柱頭分泌物抑制作用最佳。
2. 分子量介於 30-50KDa 間之鐵砲百合柱頭分泌物，會抑制劍蘭花粉萌發。

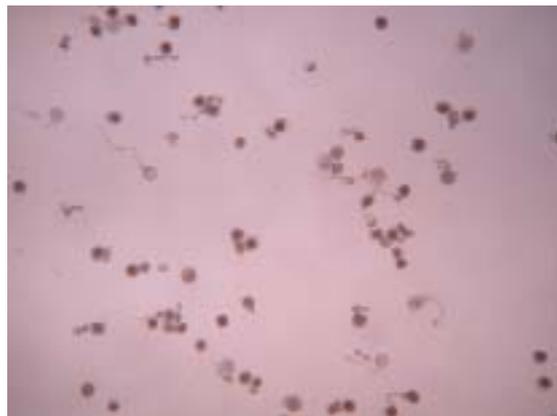
據此，我們推測鐵砲百合柱頭分泌物中抑制劍蘭花粉萌發之物質可能為分子量介於 30-50kDa 之蛋白質，因此我們決定用蛋白酶作用柱頭分泌物，以檢測該抑制物質是否真為蛋白質。

(三) 蛋白酶作用後之鐵砲百合柱頭分泌物，對劍蘭花粉萌發率的影響：

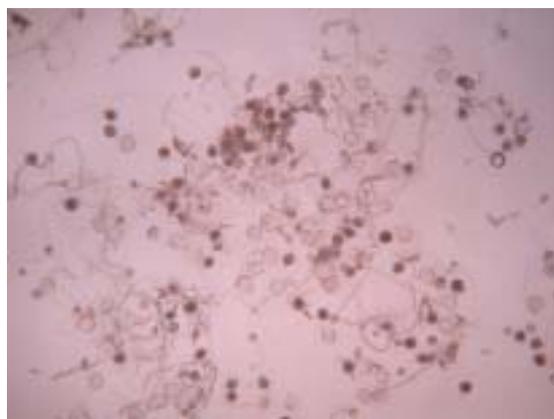
1. 劍蘭花粉在 trypsin 處理原柱頭分泌物培養液中的萌發情形：



1 小時之萌發情形

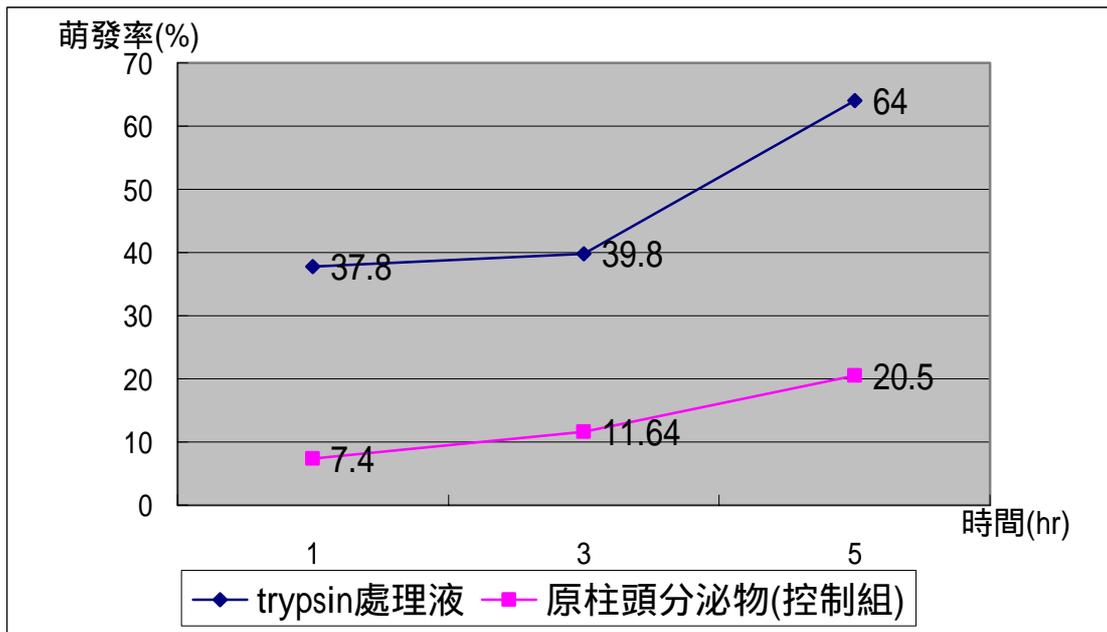


3 小時萌發情形



5 小時萌發情形

2. 劍蘭花粉在 trypsin 處理液與原柱頭分泌物培養液(控制組)中之萌發率：



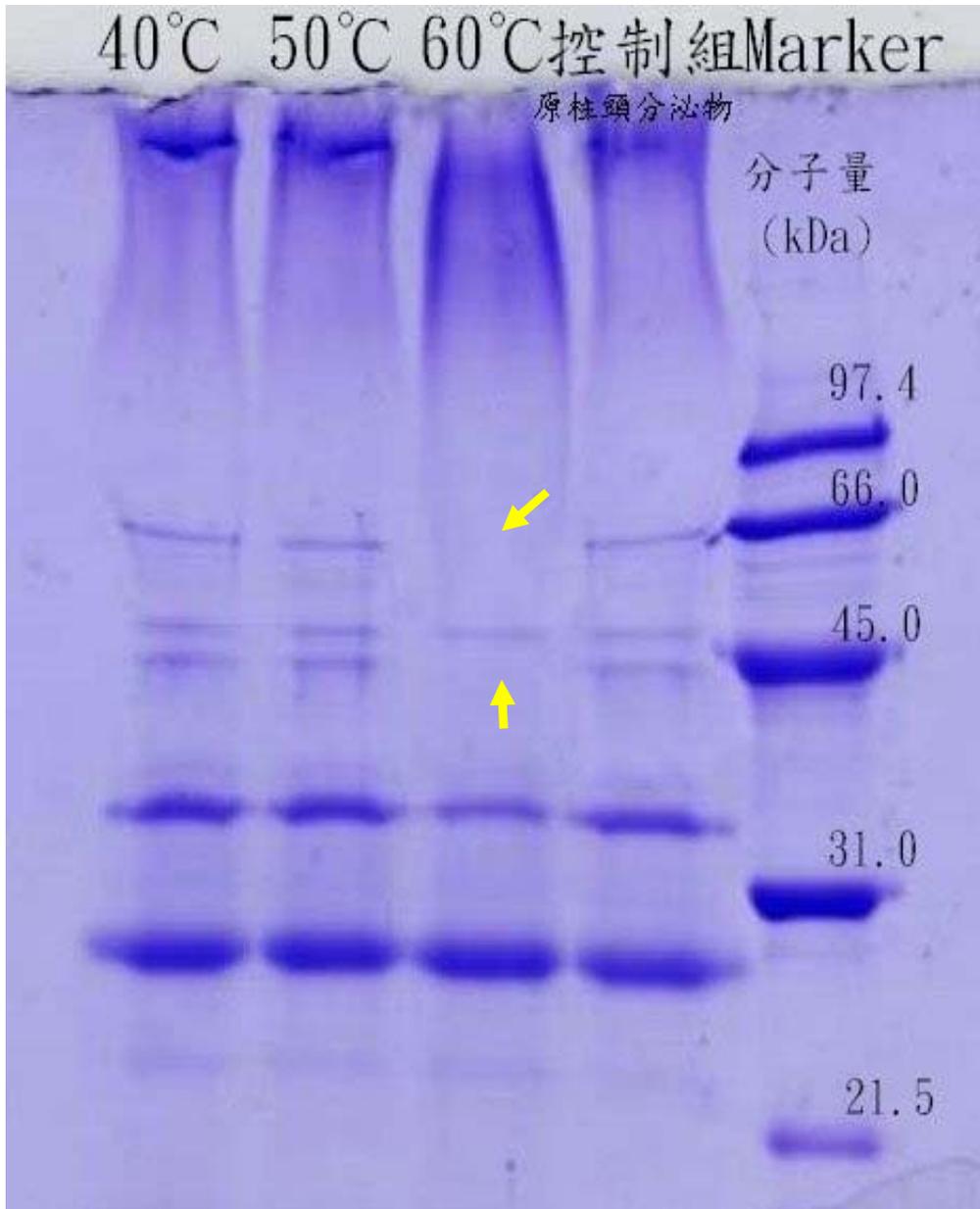
(圖六) 劍蘭花粉在 trypsin 處理液與原柱頭分泌物培養液(控制組)中之萌發率

根據上圖結果顯示：

- (1) 劍蘭花粉在 trypsin 處理液與控制組中之萌發率，於 1 小時皆最低，且隨時間增加，萌發率均有上升之趨勢。
- (2) 劍蘭花粉在 trypsin 處理過之柱頭分泌物培養液中之萌發率明顯較控制組高。

三、探討鐵砲百合柱頭分泌物中影響劍蘭花粉萌發的物質為何：

1. 根據溫度及 trypsin 處理之實驗結果，我們將不同溫度加熱過之柱頭分泌物拿去跑 SDS-PAGE，結果如下：

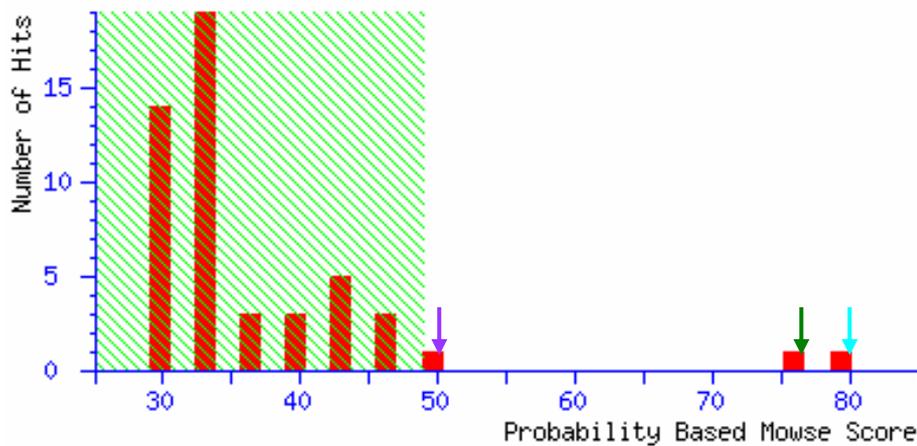


〈圖七〉不同溫度下柱頭分泌物內含蛋白質成分之跑膠圖

根據上圖電泳結果顯示：

- (1) 40°C 作用後的柱頭分泌物與控制組呈現的 band 無異。
- (2) 50°C 作用後的柱頭分泌物與控制組呈現的 band 無異。
- (3) 60°C 作用後的柱頭分泌物所呈現的 band 中，一條分子量約為 66.0kDa 左右的蛋白質 band 與一條分子量約為 45.0kDa 左右的蛋白質 band 均消失。

2. 蛋白質定序：我們將柱頭分泌物經 60°C 溫度處理過後跑 SDS-PAGE 消失且分子量介於 30KDa-50KDa 之蛋白質 band 做蛋白質定序，結果如下：



Protein hits : ■ [gi|5002344](#) peroxidase 3 precursor [Phaseolus vulgaris]

■ [gi|5381253](#) peroxidase [Nicotiana tabacum]

■ [gi|145345412](#) predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]

根據上圖結果顯示：

- (1) peroxidase 3 precursor : score 值 79
- (2) peroxidase : score 值 76
- (3) predicted protein : score 值 51

由於 peroxidase 3 precursor 及 peroxidase 離綠色斜線不顯著區皆很遠，且其 score 值高，表其準確度較高，且 peroxidase 3 precursor 為 peroxidase 之前趨物質，因此我們推測此抑制劍蘭花粉萌發之蛋白質為一種 peroxidase。

陸、討論

一、探討鐵砲百合柱頭分泌物對劍蘭花粉萌發之影響：

由(圖一)的結果可知，鐵砲百合柱頭分泌物會抑制劍蘭花粉萌發，推論其柱頭分泌物中應含有某種物質，會對花粉之萌發率造成影響

由(圖二)的結果可知，放置在 55°C 作用後之鐵砲百合柱頭分泌物的劍蘭花粉，其萌發率最高，50°C 之萌發率次之，顯示此抑制物質可能為蛋白質，且其活性在溫度 50-55°C 時會失去作用。

由(圖三、四、五)的結果可知，劍蘭花粉放置在分子量 30-50kDa 柱頭分泌物之萌發率最低顯示此抑制物質之分子量介於 30-50kDa 之間。

由(圖六)的結果，顯示此抑制物質可被 tyrpsin 抑制而失去活性。

至此，可以確定鐵砲百合柱頭分泌物中，抑制劍蘭花粉萌發的抑制物質成份為蛋白質。

二、探討鐵砲百合柱頭分泌物中影響劍蘭花粉萌發的物質為何：

根據討論一的結果，將不同溫度的鐵砲百合柱頭分泌物拿去跑 SDS-PAGE 電泳，結果得知有兩條蛋白質 band 在 60°C 時訊號完全消失，表示該 2 種蛋白質的活性在 50-60°C 之間被破壞，符合討論一之敘述；再根據分子篩實驗所顯示抑制物質之分子量為 30-50kDa 的結果，則上述 2 條蛋白質 band 中，1 條分子量約為 45kDa 的 band 所代表之蛋白質即為鐵砲百合柱頭分泌物中抑制劍蘭花粉萌發之成份；將其送至成功大學蛋白質體核心實驗室做蛋白質定序，得到此種蛋白質為一種 Peroxidase。

Peroxidase 為許多種過氧化酶的總稱，其作用為催化以化學物質為還原劑將 H_2O_2 還原成 H_2O ，顯示此種抑制花粉萌發的機制可能與此反應有關。

三、其他現象的探討：

我們發現劍蘭花粉在溫度處理與 Microcon 離心後之鐵砲百合柱頭分泌物中，所萌發的花粉管大多呈現嚴重的扭曲型態，但在做 trypsin 實驗時，劍蘭花粉管卻可以生長得很直且完整。根據文獻資料(陳盟松)顯示：鈣離子會影響花粉管的生長，使花粉管不易扭曲，因此我們推測：柱頭分泌物中除了含有上述討論二之抑制蛋白質之外，還具有能螯合鈣離子的物質，使花粉管之生長不正常，而該物質亦會受到 trypsin 的抑制作用。

四、目前我們正在進行的實驗包括：

1. 深入了解 Peroxidase 其功能及其在其他植物間的作用。
2. 找出 Peroxidase 抑制花粉萌發的作用機制。

柒、結論

鐵砲百合柱頭分泌物中含有抑制劍蘭花粉萌發之蛋白質，為一種 Peroxidase，其分子量約為 45kDa，且其活性在 50-55°C 與蛋白酶 trypsin 作用後均會被破壞。

捌、參考資料

1. 施河、呂光洋等(民 94)。高中生命科學下冊第七章(156-157 頁)。台北市：南一書局。
2. 趙光裕(民 94)中央研究院計畫之成果報告，未出版，台北市。
3. Neil A. Campbell (2004) . **Biology**: Seventh Edition p.774-775.
4. 林志豪、鄭淑穎、李坤璋(民 93)大安水蓑衣花粉粒的發育。取自：
<http://www.ntsec.gov.tw/activity/race-1/44/E/040721.pdf>.
5. 陳麗珊、李栴亭、曾怡靜、曾惠真(民92)我的花粉管會轉彎—花粉管萌發方向之探討。
取自：<http://www.ntsec.gov.tw/activity/race-1/43/pdf/e/040709.pdf>.
6. 趙光裕(無日期)植物型態與功能(35-40 頁)。取自：
[http://www.sinica.edu.tw/~hispij/program/doc/95/20061202Jauh Guang-Yuh.pdf](http://www.sinica.edu.tw/~hispij/program/doc/95/20061202Jauh%20Guang-Yuh.pdf).
7. 蔡佩芳、牛文俐、陳麗存、邱怡瑄(民 93)影響花粉萌發因素的探討。取自：
<http://www.ntsec.gov.tw/activity/race-1/44/E/040705.pdf>.
8. Ana Maria Sanchez, Maurice Bosch, Marc Bots, Jeroen Nieuwland, Richard Feron, and Celestina Mariani (2004). Pistil Factors Controlling Pollination, 98-106. Retrived December 12, 2006, from
http://www.plantcell.org/cgi/reprint/16/suppl_1/S98.pdf.
9. Ana Moutinho, Anthony J.Trewavas, and Rui Malho (1998). Relocation of a Ca²⁺-Dependent Protein Kinase Activity during Pollen Tube Reorientation, 1499-1509. Retrived December 12, 2006, from
<http://intl.plantcell.org/cgi/reprint/10/9/1499.pdf>.
10. Art Gallery: Plant Sex: Pollen Tubes Caught in the Act . Retrived September 20, 2006, from http://www.genomenewsnetwork.org/articles/07_03/pollen_art.shtml.
11. Cãirdenas L, Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Hepler PK(2005) Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. Retrived April 1, 2007, from <http://www.medscape.com/medline/abstract/15849722?prt=true>.
12. Carol A.Furness , Paula J.Rudall (2004). Pollen aperture evolution- a crucial factor for eudicot success, 154-158. Retrived December 12, 2006, from
<http://www.sciencedirect.com/science>
13. Cell-Cell Communication and Signal Transduction in Plants. Retrived September 20, 2006, from : <http://www.bmb.psu.edu/faculty/kao/kao.html>.
14. Jorge Muschietti, Yoram Eyal, and Sheila McCormick (1998). Pollen Tube Localization Implies a Role in Pollen-Pistil Interactions for the Tomato Receptor-like Protein Kinases LePRK1 and LePRK2, 319-330. Retrived December 12, 2006, from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=143994&blobtype=pdf>.

15. Karine Mouline, Anne-Aliénor Véry, Frédéric Gaymard, Jossia Boucherez, Guillaume Pilot, Martine Devic, David Bouchez, Jean-Baptiste Thibaud, and Hervé Sentenac (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis, 339-350. Retrived April 1 , 2007, from <http://www.genesdev.org/cgi/reprint/16/3/339>.
16. Norbert Huck, James M. Moore, Michael Federer and Ueli Grossniklaus (2003) The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception, 2149-2159. Retrived April 1, 2007, from <http://dev.biologists.org/cgi/reprint/130/10/2149>.
17. P. Rosell , M. Herrero , V. Galan Sauco (1999) . Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). In vivo characterization and optimization of in vitro germination of in vitro germination, 251-265. Retrived December 12, 2006, from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1918261>.
18. Roy S, Jauh GY, Helper PK, Lord EM (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube, 450-458. Retrived April 1, 2007, from <http://www.springerlink.com/content/wfdt9c9txp69pw6m/fulltext.pdf>.
19. Sareeta Sharma, Veenu Kaul, Rani Magotra, A. K. Koul (2001). Pollen Germination on ovary wall and consequences thereof, 824-826. Retrived December 12, 2006, from <http://www.ias.ac.in/currsci/apr102001/824.pdf>.
20. Thomas Dresselhaus (2005) Cell-cell communication during double fertilization, 41-47. Retrived April 1, 2007, from <http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/fb4a027/dresselhaus%20copb%202006.pdf>
21. Vincenza Pontieri , Tammy Lynn Sage (1999). Evidence for Stigmatic Self-incompatibility, Pollination Induced Ovule Enlargement and Transmitting Tissue Exudates in the Paleoherb, 507-519. Retrived December 12, 2006, from <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/84/4/507>.
22. Will jahren, W. Mary Lush, and Adrienne E. Clarke (1989). Inhibition of in Vitro Pollen Tube Growth by Isolated S-Glycoproteins of *Nicotiana glauca*, 501-510. Retrived December 12, 2006, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=159783&blobtype=pdf>.
23. Zorro Chen , Bowwow Zhuang, Vampire Huang, Gypsophila Zheng and Efc Wu. Retrived December 12, 2006, from http://home.kimo.com.tw/mingtal982/hort2/new_page_12.htm

兵來將擋—鐵砲百合(Lilium longiflorum)柱頭分
【評語】 040713
泌物防止異種雜交之機制

1. 實驗設計及執行能力佳。
2. 表達清晰富團隊精神。
3. 可以繼續發揮將實驗做得更完整。