

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高職組 農業及生物科技科

最佳創意獎

091403

「鈣」是奇才-探討鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長的影響

學校名稱：高雄市私立樹德家商

作者：	指導老師：
職二 黃誼欣	李冠徵
職二 黃 蓉	陳樺亭
職二 王苓侃	

關鍵詞： 鈣離子、花粉管、細胞骨骼

「鈣」是奇才 - 探討鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長之影響

壹、摘要

花粉管在生長過程中，需即時且持續地調節其內部細胞骨骼結構，展現快速地、極性地生長方式。我們經由探索微絲所相關的功能，追尋鈣離子在這萌發過程的角色，以普遍用來觀察花粉萌發的非洲鳳仙花為實驗對象。實驗結果顯示（一）花粉內原有的鈣充足且為萌發所必須（二）外源鈣離子的作用著重在促進花粉管後期的延伸而非在萌發初期，且以 1mM 的鈣離子對於花粉管延伸有最佳的促進效果（三小時提升約 2 倍花粉管長度）（三）若在花粉萌發時抑制鈣離子通道，則會造成花粉生長困難（四）在硝酸與鹽酸所造成的酸化環境中，外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長有明顯改善（五）外源鈣離子的使用對於較低溫度所造成的抑制花粉生長現象也有所改善。

貳、研究動機

花粉管生長是一個十分快速且具有特殊的極性生長方式。在教科書內容(高職基礎生物 B 第二章第三節「植物的生殖」)中，我們知道花粉在經授粉到達柱頭後，花粉會在極短時間萌發，並朝向胚珠所在之處生長。但是，要能造成花粉管往特定方向延伸，顯然需要花粉管細胞不斷進行誘導訊息的接收與動態的調整其細胞骨架，才能往正確的方向延伸。那麼，究竟是什麼樣的因子造就此誘導作用與花粉管延伸的促進？這便是我們所好奇的問題了。

在查閱文獻之後，發現植物細胞和動物細胞一樣，內部存在一個由微絲、微管和中間纖維組成的細胞骨架系統。這三種成分靠眾多的連接蛋白相互連接形成緊密的三維網架結構，把細胞質中的胞器和各種膜結構組織起來。對於維持細胞的形狀，以及對於細胞內的運輸功能扮演重要的角色。在花粉管相關研究中，也已經證明微絲和微管是花粉管細胞骨架的主要組成成分。而花粉管微絲的主要構成分子-「肌動蛋白」，其分子結構與動物肌細胞的肌動蛋白十分類似，為負責細胞形狀變化（如肌肉收縮、偽足延伸）的重要結構之一。而鈣離子正是調節動物肌細胞內的微絲系統、影響肌細胞收縮運動的要角。

根據以上，我們假設花粉展現極性且快速延伸的過程中，其細胞內微絲的功能可能與動物肌細胞的微絲系統有相類似之處，而鈣離子居中調節之。且分析百合花粉管的報告也指出，花粉管細胞內存在一鈣離子濃度梯度，若干擾此鈣離子梯度則會導致花粉管的延伸受阻。暗示花粉之「內源鈣離子」對於花粉極性生長有極大影響。

此外，根據其它報告指出，百合花的雌蕊柱頭到子房之間存在一鈣離子梯度，破壞此梯度對於花粉管的延伸方向有所影響；其它相關的離體實驗中，添加外源鈣離子對於菊科以及其它某些植物之花粉萌發率有顯著提升，但對於日日春則沒有明顯的萌發率提升。綜合以上諸多資料，對於某些植物而言，存在於柱頭的「外源鈣離子」可以做為花粉萌發的促進物以及花粉管極性生長的誘導物；而對其他某些植物則否。

色彩繽紛的非洲鳳仙花，由於其花粉生長快速且容易取得，一向是觀察花粉管生長的熱門植物。因此我們設計系列實驗，觀察外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉萌發與花粉管延伸等不同層面的影響，探討「外源鈣離子是否為非洲鳳仙花粉生長必須？」或是「外源鈣離子能否促進非洲鳳仙花粉生長？」等問題。並使用鈣離子螯合劑（ethylene glycol tetraacetic acid，簡稱 EGTA）以及兩種鈣離子通道阻截劑來處理花粉。第一種鈣離子通道阻截劑為 Verapamil（用來治療心絞痛及高血壓的常見用藥，可抑制心肌及血管平滑肌之鈣離子通道興奮作用）。第二種鈣離子通道阻截劑為亞鈷離子(Co^{2+})。藉以觀察非洲鳳仙花粉在缺乏內源鈣離子或內源鈣離子流動受到抑制時，其生長時的樣態，以探討「內源鈣離子對於花粉生長的影響及必須性。」

除了原理的探討之外，我們也想到現今酸雨污染與秋冬寒害導致許多農作物結果機率降低、收成不佳。若外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長能有促進效果，那是否也對於上述現象會有逆轉情形呢？所以我們也設計此部分相關實驗，探索此篇研究結果應用於實際逆境農作生產的可能性。

參、研究目的

- 一、觀察非洲鳳仙花花粉在不同外源鈣離子濃度時的生長，並尋找可能促進生長的最佳濃度。
- 二、觀察 EGTA 對於非洲鳳仙花花粉生長的影響，探討花粉內源鈣離子之可能角色。
- 三、觀察鈣離子通道阻截劑對於非洲鳳仙花花粉生長的影響，探討花粉內鈣離子作用模式。
- 四、觀察不同 pH 值時(仿酸雨逆境)，外源鈣離子對於可能促進非洲鳳仙花花粉生長的情形。
- 五、觀察不同溫度時(仿低溫逆境)，外源鈣離子對於可能促進非洲鳳仙花花粉生長的情形。

肆、研究設備與材料

一、實驗材料與藥品：蔗糖、氯化鈣、硝酸亞鉛、EGTA、硝酸、硫酸、鹽酸、廣用試紙(以上藥品廠牌皆為日本藥品株式會社)、Verapamil (sigma-aldrich)、蒸餾水、非洲鳳仙花。

二、實驗器材：燒杯、試管、滴管、秤量紙、藥匙、量筒(德國 EM)、複式顯微鏡(Olympus)、數位相機(Nikon)、微量天平(Solo)。



圖一、實驗器材與藥品



圖二、非洲鳳仙花

伍、研究方法

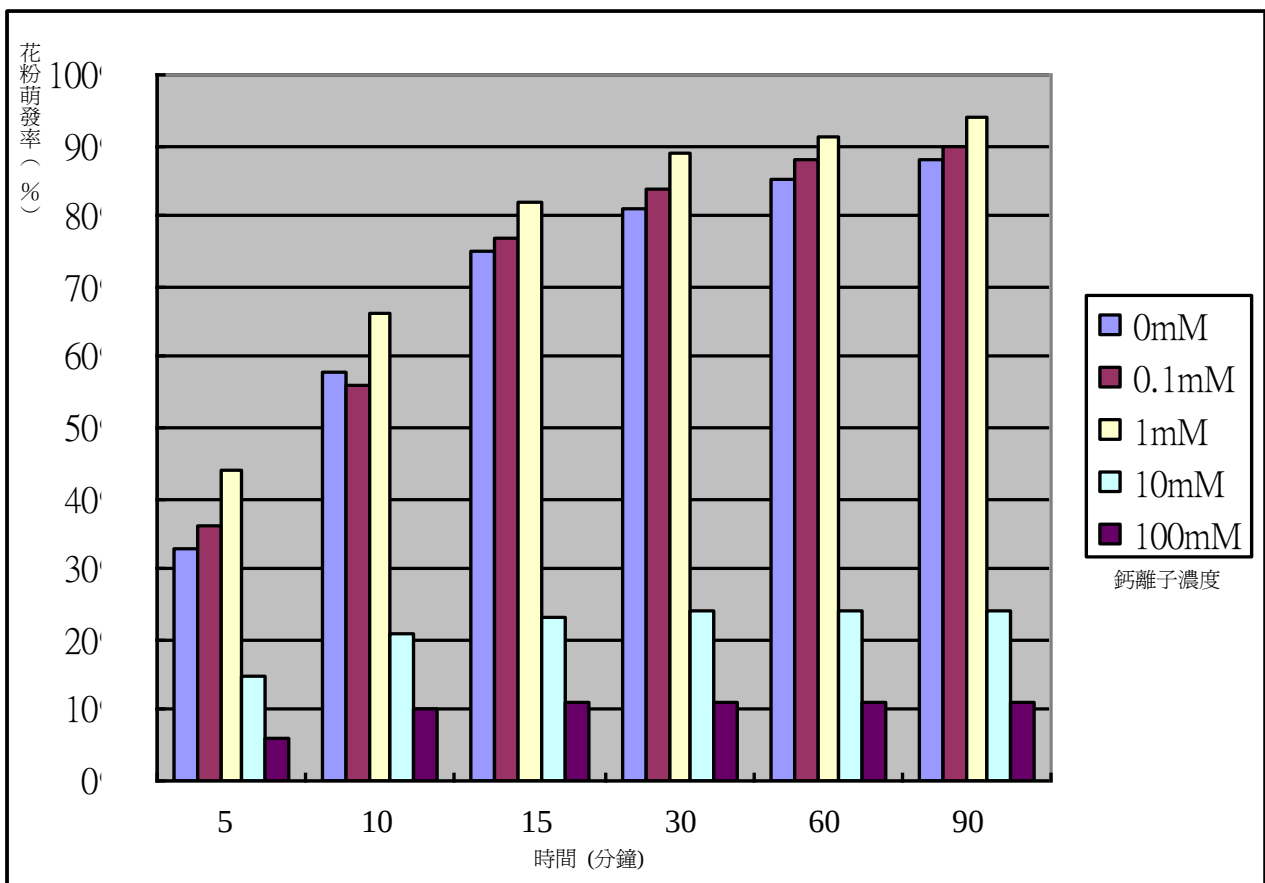
- 一、以牙籤刮取適量成熟非洲鳳仙花之花粉置於載玻片上，將各組處理溶液滴在蓋玻片上，反向蓋上去載玻片上，使溶液可以完全包住花粉後，在蓋玻片邊緣塗上凡士林封口以防止水分蒸散影響蔗糖濃度。
- 二、開始計時，並於各時間點以光學顯微鏡觀察並以數位相機照相，每次照相均依載玻片之上、下、左、右、中區域各拍一張記錄。
- 三、利用電腦整理照片，並以人工統計花粉萌發率以及計算花粉管延伸的長度等。在報告中所描述之專有名詞和計算方法，我們定義如下：
 - (一)萌發：花粉管達到花粉直徑的兩倍長（含以上）即認定為萌發。
 - (二)平均萌發率：計算 5 個不同的視野(100X)下之已萌發花粉數目的相對比例。
$$(\text{平均萌發率} = \text{萌發花粉數量} / \text{全部觀測花粉總數} \times 100\%)$$
 - (三)平均萌發長度：利用非洲鳳仙花粉粒(45 μm)為比例尺，推算已萌發的花粉管長度並求其平均值。
- 四、將以上數據紀錄，並以 Excel 作進一步圖表化分析。

陸、研究過程與結果

一、觀察非洲鳳仙花花粉在不同外源鈣離子濃度時的生長，並尋找可能促進生長的最佳濃度

(一) 低濃度 (0.1~1mM) 外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉萌發率有些微提升

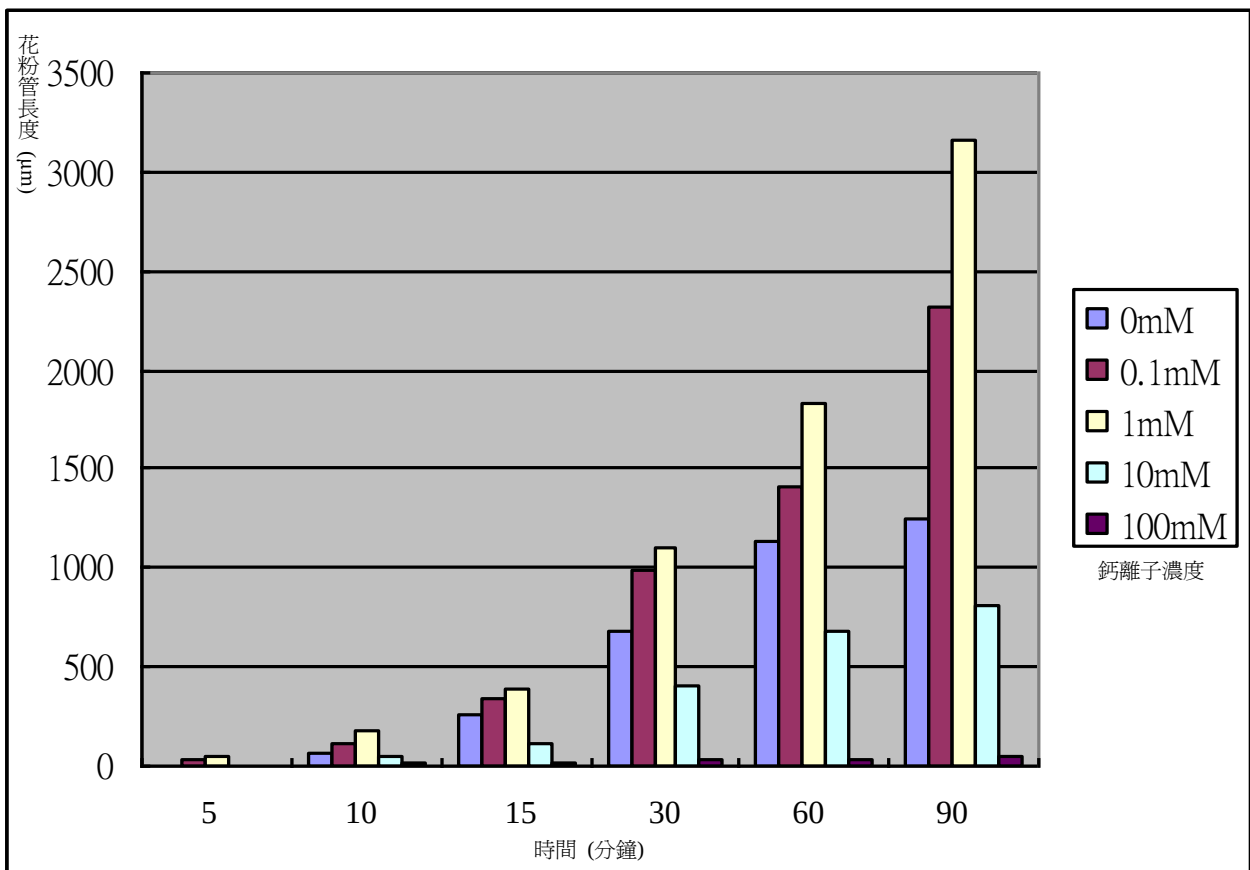
觀察非洲鳳仙花花粉在不同外源鈣離子濃度時的萌發率(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23℃)。發現低濃度的鈣離子 (0.1~1mM) 對於非洲鳳仙花粉的萌發速率與比率僅有些微的提升作用。其中以 1mM 的鈣離子濃度對於非洲鳳仙花粉的萌發率提升較為顯著，在萌發早期 (5~10 分鐘)，大約提升了 10% 的花粉萌發率。但是高濃度的鈣離子 (10~100mM) 則明顯的抑制非洲鳳仙花粉萌發，並隨著鈣離子濃度增加而呈現更強烈的抑制非洲鳳仙花粉萌發作用。(結果見圖三)



圖三、外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

(二) 1mM 外源鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉管的延伸速率

觀察非洲鳳仙花花粉在不同外源鈣離子濃度時的平均花粉管長度(溶液條件: 7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23°C)。發現低濃度的鈣離子 (0.1~1mM) 對於非洲鳳仙花粉管延伸有明顯的促進效果 (尤其在 30 分鐘之後)。對照組在 60 分鐘之後花粉管延伸速率趨緩，而 0.1 與 1mM 鈣離子處理組則明顯地維持花粉管延伸在相對快速的狀態。但是高濃度的鈣離子 (10~100mM) 則明顯的抑制非洲鳳仙花粉管延伸，並隨著鈣離子濃度增加而呈現更強烈地抑制非洲鳳仙花粉管延伸。(結果見圖四)

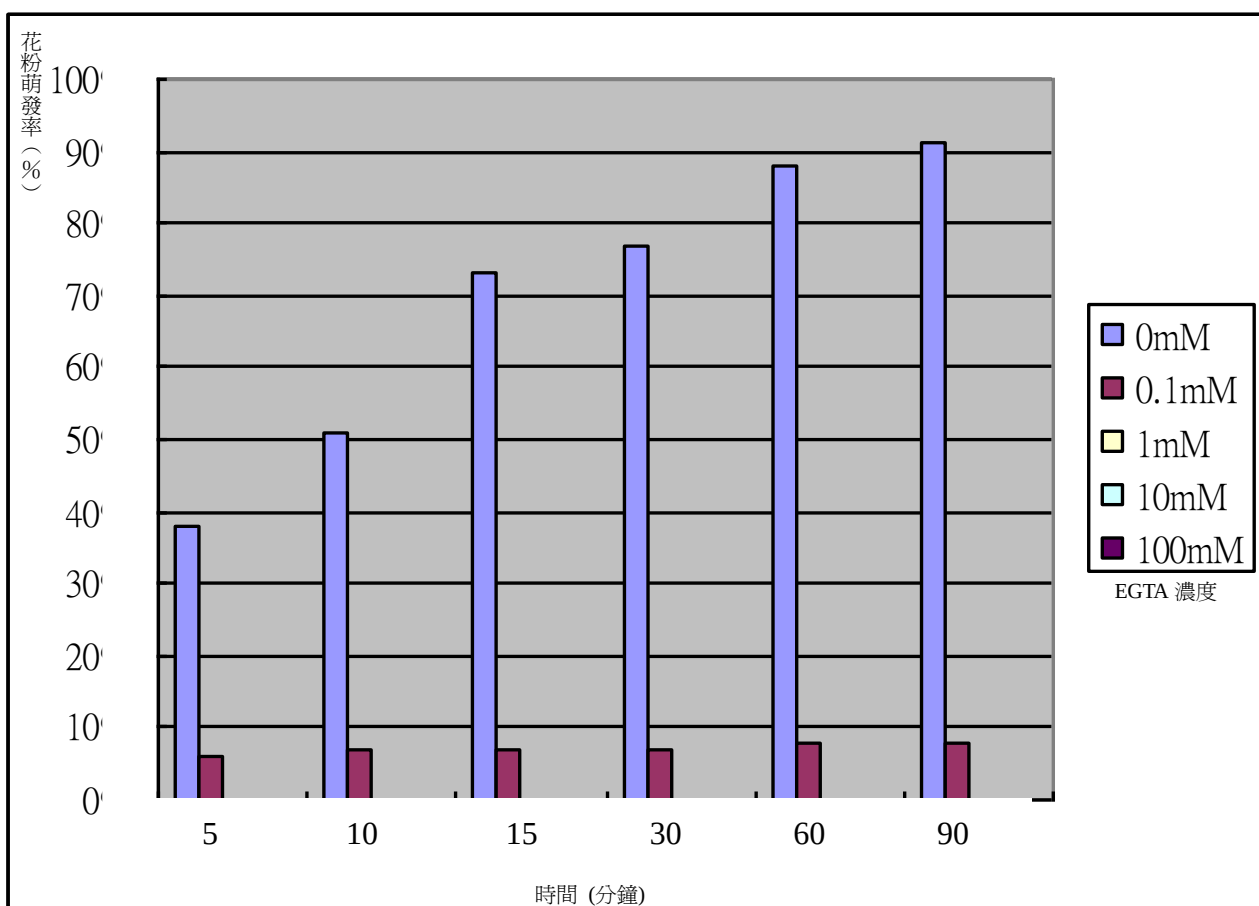


圖四、外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

二、觀察 EGTA 對於非洲鳳仙花花粉生長的影響，探討花粉內源鈣離子之可能角色

(一)非洲鳳仙花粉之內源鈣離子為花粉萌發所必須

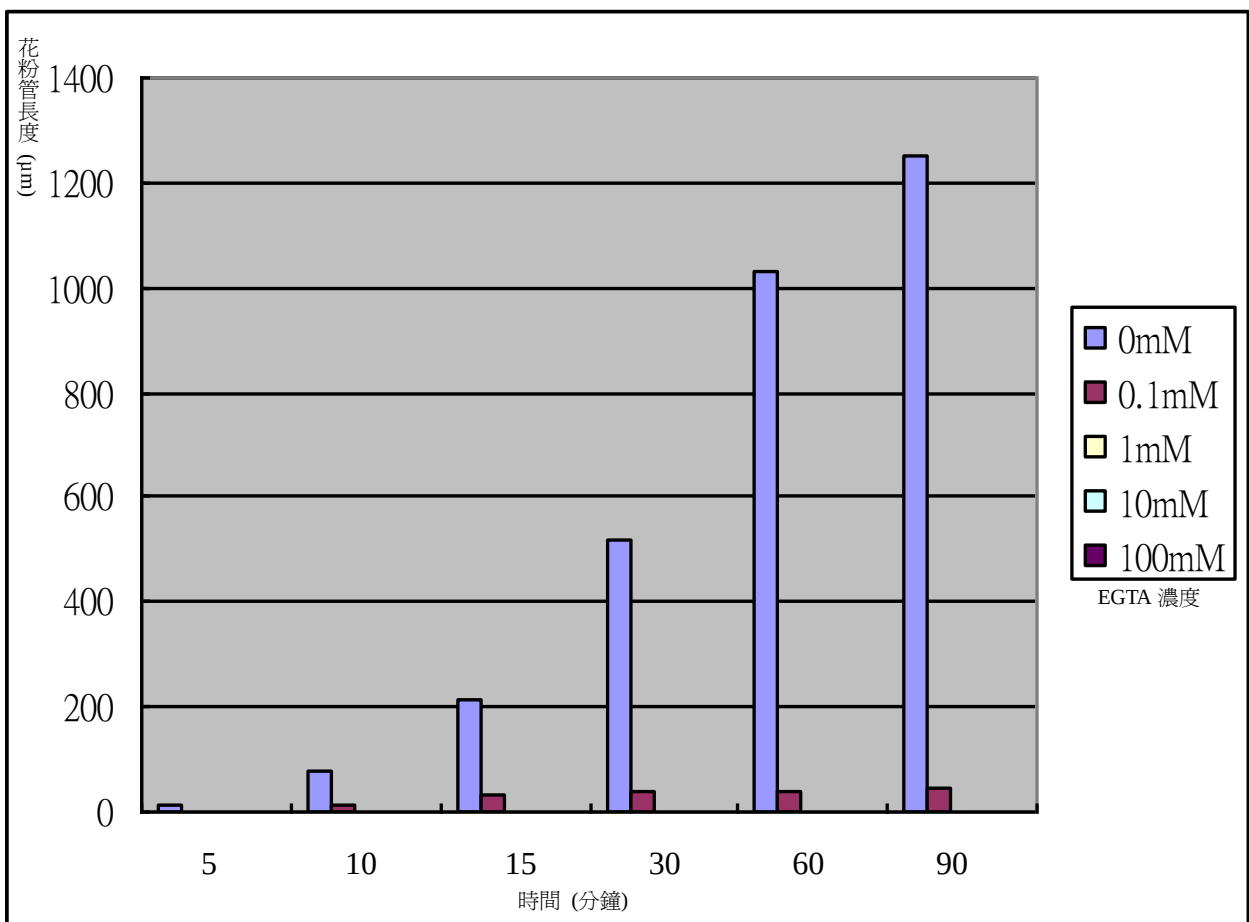
觀察 EGTA（鈣離子螯合劑）對於非洲鳳仙花粉萌發的影響（溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23°C）。發現低濃度的 EGTA（0.1mM）即對鳳仙花粉萌發有強烈的抑制作用，1mM 的 EGTA 即完全抑制花粉萌發。而對照組不需添加外源鈣離子即能有頗高花粉萌發率，此現象暗示非洲鳳仙花粉內有供給萌發所需的鈣離子，在不給予外源鈣離子仍可進行萌發動作，且由 EGTA 的處理組可以看出花粉之內源鈣離子的確為鳳仙花粉萌發所必需。（結果見圖五）



圖五、EGTA 對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

(二)非洲鳳仙花粉之內源鈣離子為花粉管正常延伸所必須

觀察 EGTA（鈣離子螯合劑）對於非洲鳳仙花粉管延伸速率的影響（溶液條件：7.5% 蔗糖溶液、pH6.8、23℃）。發現低濃度的 EGTA（0.1mM）即對非洲鳳仙花粉管延伸有強烈的抑制作用，1mM 的 EGTA 即完全抑制花粉管的延伸。顯示在非洲鳳仙花粉管延伸的過程，需要花粉內源鈣離子參與調控。（結果見圖六）

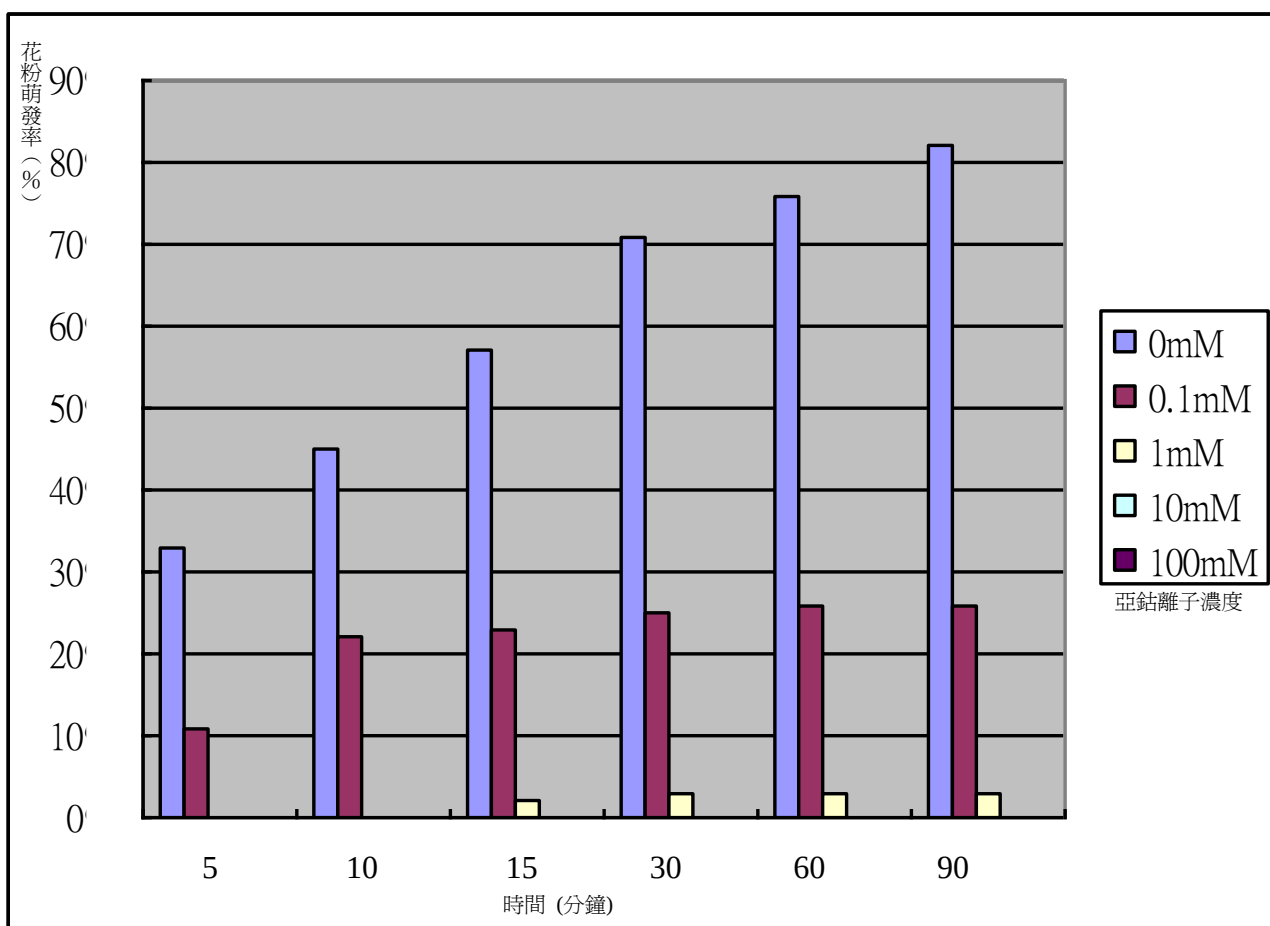


圖六、EGTA 對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

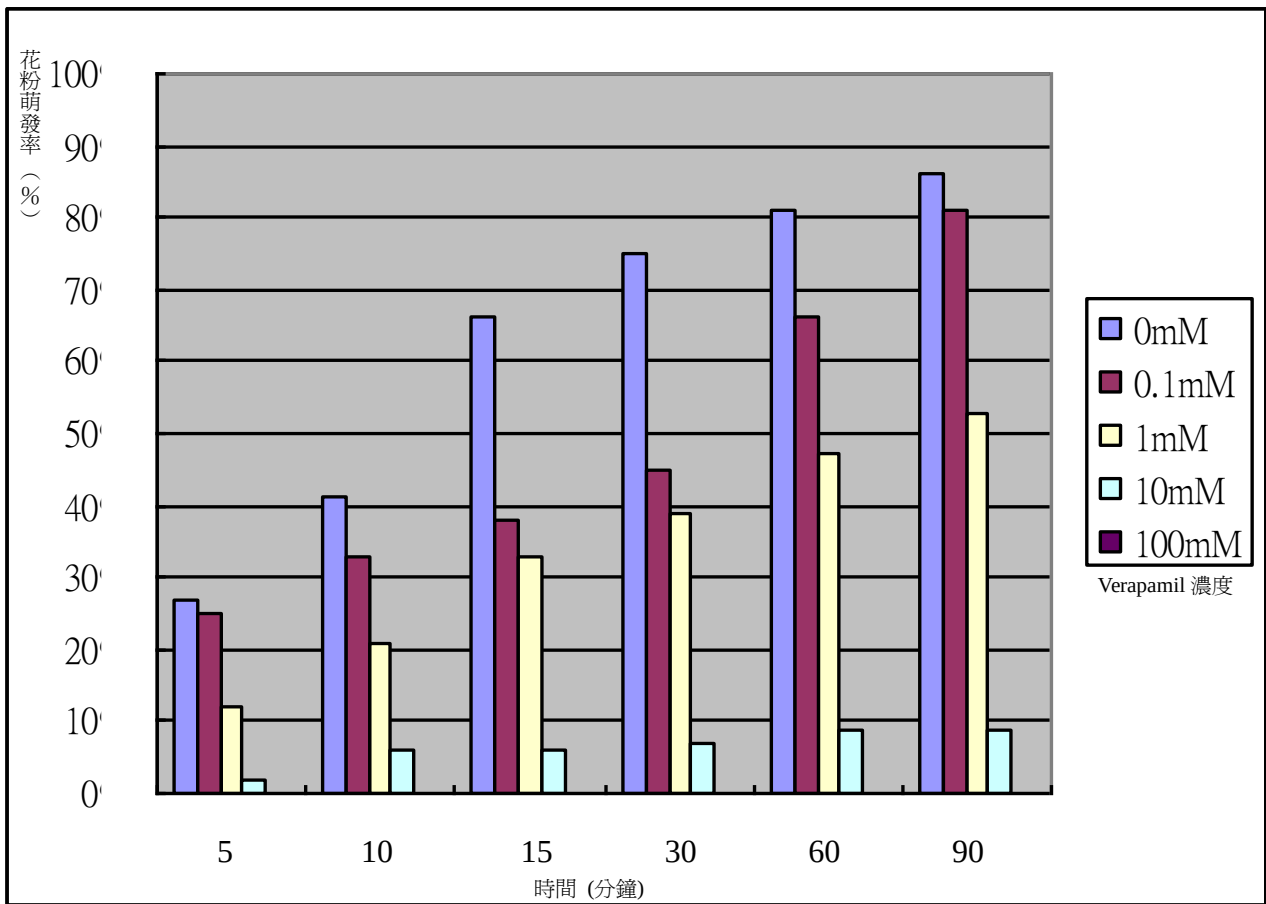
三、觀察鈣離子通道阻截劑對於非洲鳳仙花花粉生長的影響，探討花粉內鈣離子作用模式

(一)非洲鳳仙花粉內鈣離子通道的正常運作是調節萌發所必須

觀察亞鈷離子（鈣離子通道阻截劑）對於非洲鳳仙花粉萌發的影響（溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23℃）。發現隨著亞鈷離子濃度的增加，鳳仙花粉萌發率也隨之下降。1mM 鈷離子已呈現強烈的抑制作用。暗示鈣離子在細胞內藉由鈣離子通道流動是調節非洲鳳仙花粉萌發所需要的（結果見圖七）。爲了避免亞鈷離子可能非專一性的結合於其他酵素而造成實驗設計的誤差。小組成員另外使用專一性較高的 Verapamil（鈣離子通道阻截劑），發現隨著 Verapamil 濃度之提升，非洲鳳仙花粉萌發比率也明顯下降。此結果進一步確認非洲鳳仙花粉萌發過程中，鈣離子藉由胞器上或是細胞膜上的通道流動爲花粉萌發所必須（結果見圖八）。



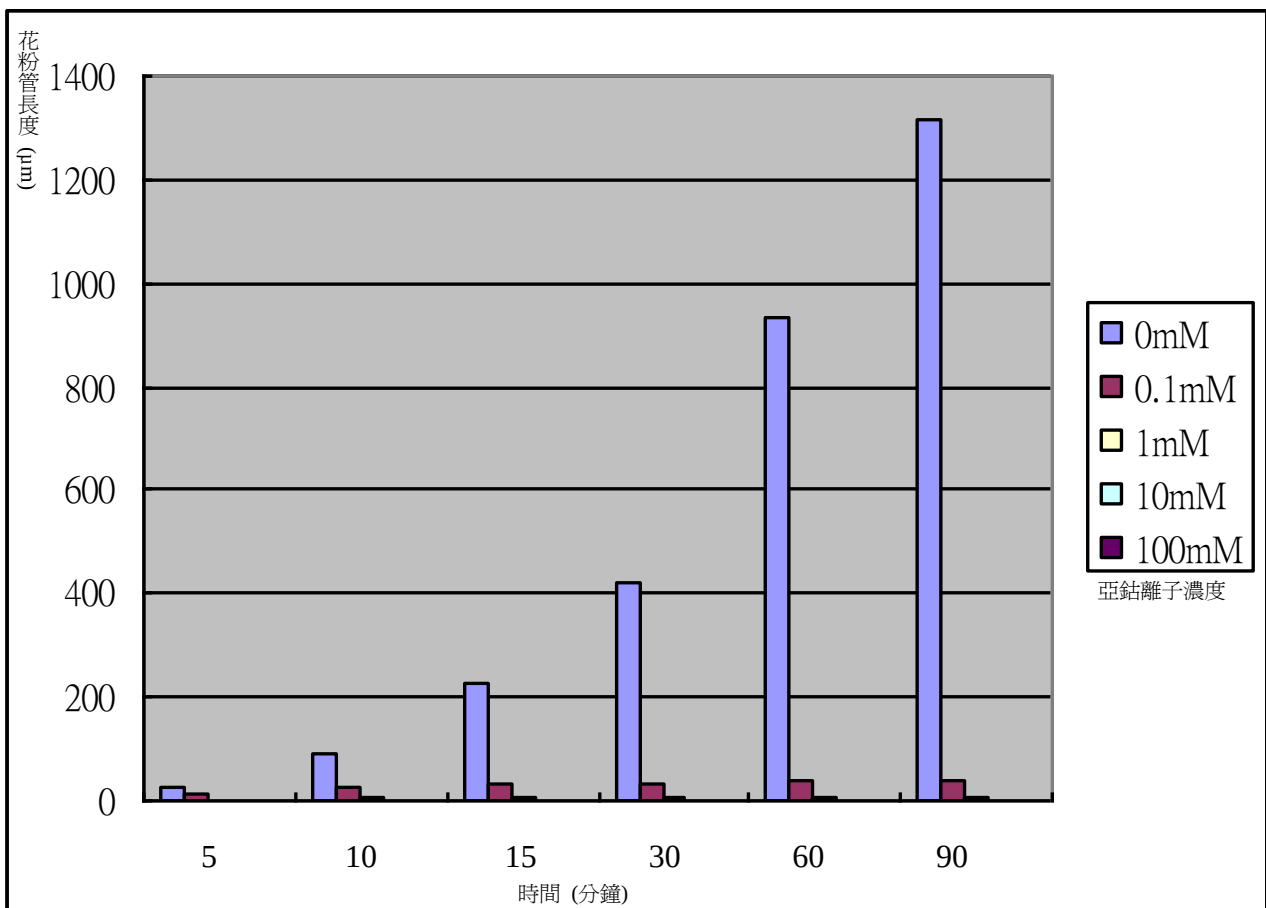
圖七、亞鈷離子對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



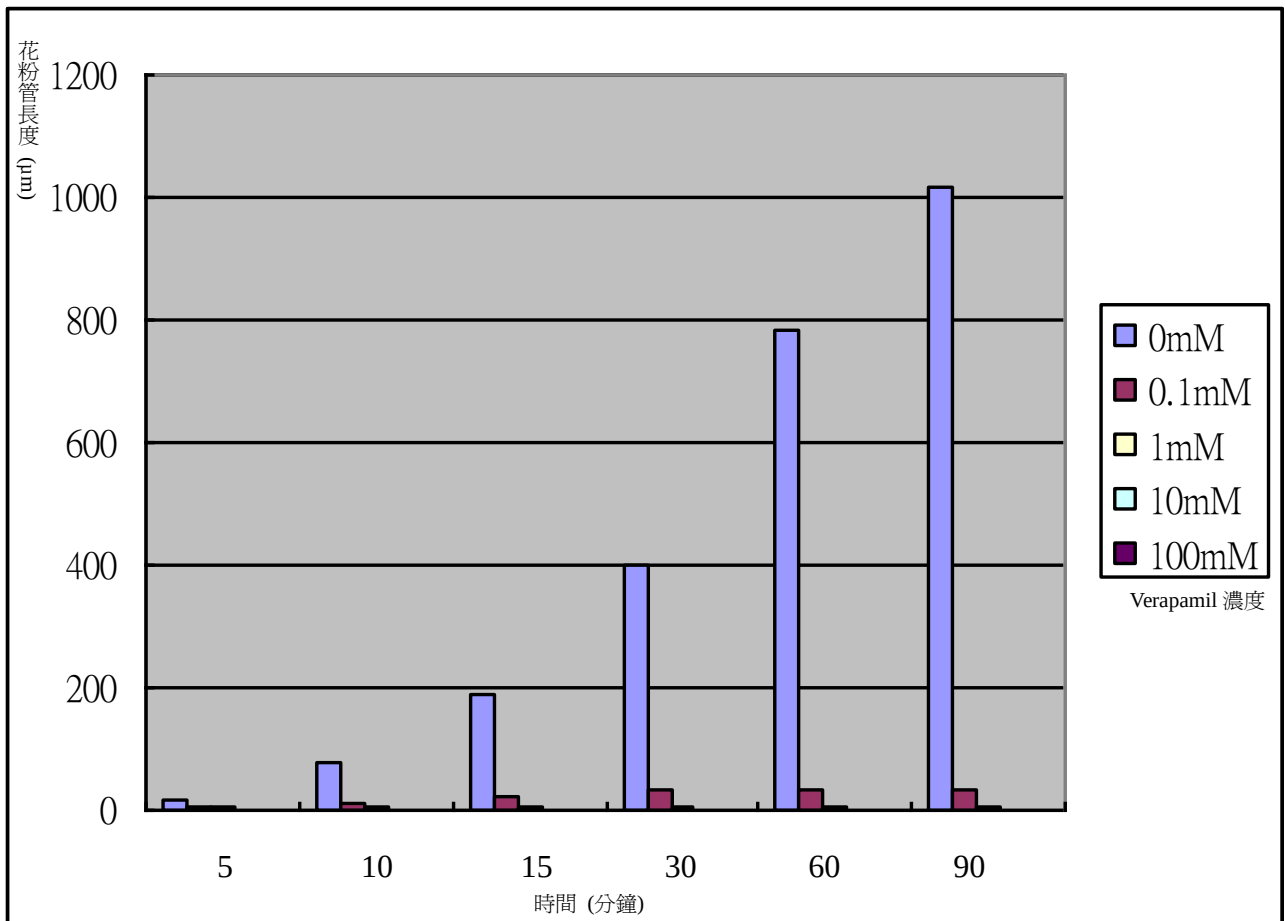
圖八、Verapamil 對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

(二)非洲鳳仙花粉內鈣離子通道的正常運作是花粉管延伸所必須

觀察亞鈷離子對於非洲鳳仙花粉管延伸速率的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23℃)。發現低濃度亞鈷離子的使用即對鳳仙花粉管的延伸產生強烈抑制。雖然0.1mM 亞鈷離子濃度的處理造成鳳仙花粉仍有 25%的萌發率，但是這些萌發的花粉管並無法在此濃度下延伸，而在萌發孔處形成一球型的花粉管並停滯生長(結果見圖九)。暗示鈣離子通道的正常動作是花粉管生長的必備條件。另外使用專一性較高的 Verapamil (鈣離子通道阻截劑)，發現低濃度之 Verapamil 即有強烈抑制花粉管延伸的現象(結果見圖十)。相較於花粉萌發率而言，Verapamil 對於花粉管延伸的抑制作用更為顯著。總合以上結果，暗示花粉管延伸過程中，鈣離子通道的正常運作是更為必須的。



圖九、亞鈷離子對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

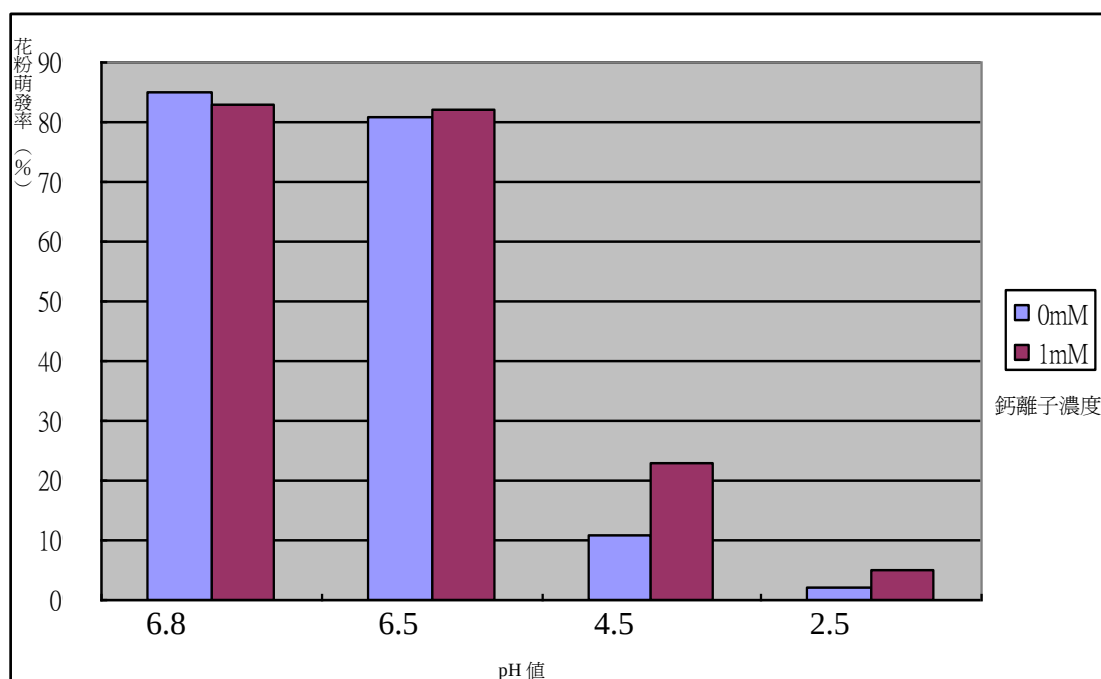


圖十、Verapamil 對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

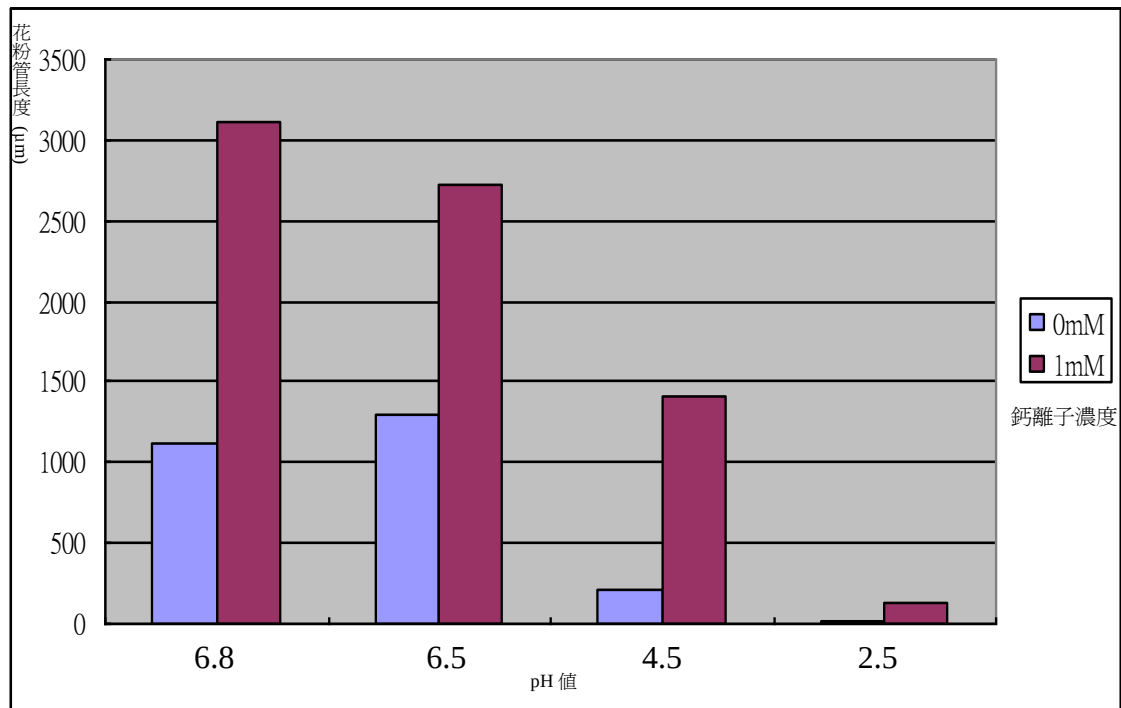
四、觀察不同 pH 值時(仿酸雨逆境)，外源鈣離子對於可能促進非洲鳳仙花花粉生長的情形

(一)外源鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉在硝酸溶液(pH=4.5，仿酸雨酸度)中的生長

觀察硝酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、23℃)。發現隨著硝酸酸度增加，非洲鳳仙花粉萌發率也隨之下降。而在 pH=4.5 時，1mM 鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉萌發率提升。但在 pH=2.5 時，此促進的作用便不明顯了(結果見圖十一)。另外，觀察硝酸對於非洲鳳仙花粉管延伸的影響。發現在 pH=4.5 時，未加鈣離子的對照組花粉管延伸明顯受到抑制，但 1mM 鈣離子實驗組明顯促進非洲鳳仙花粉管生長速率。上述結果暗示在硝酸所造成的酸化逆境(pH=4.5，仿酸雨酸度)中，添加 1mM 鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長有明顯的促進作用(結果見圖十二)。



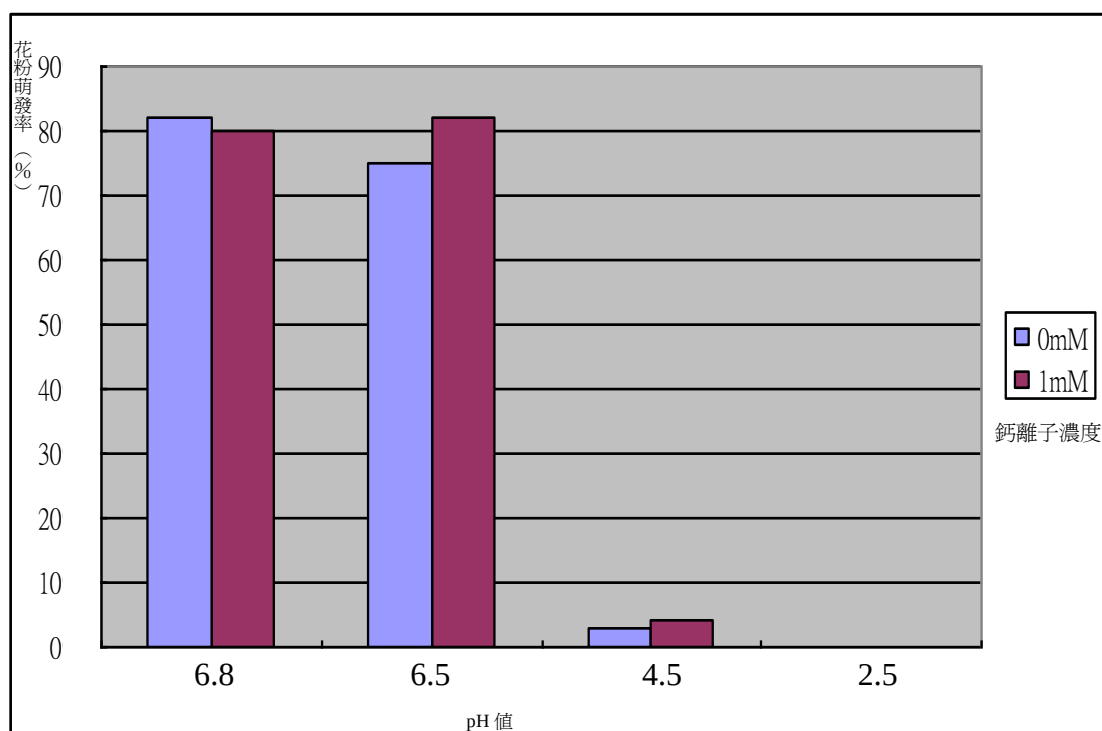
圖十一、硝酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



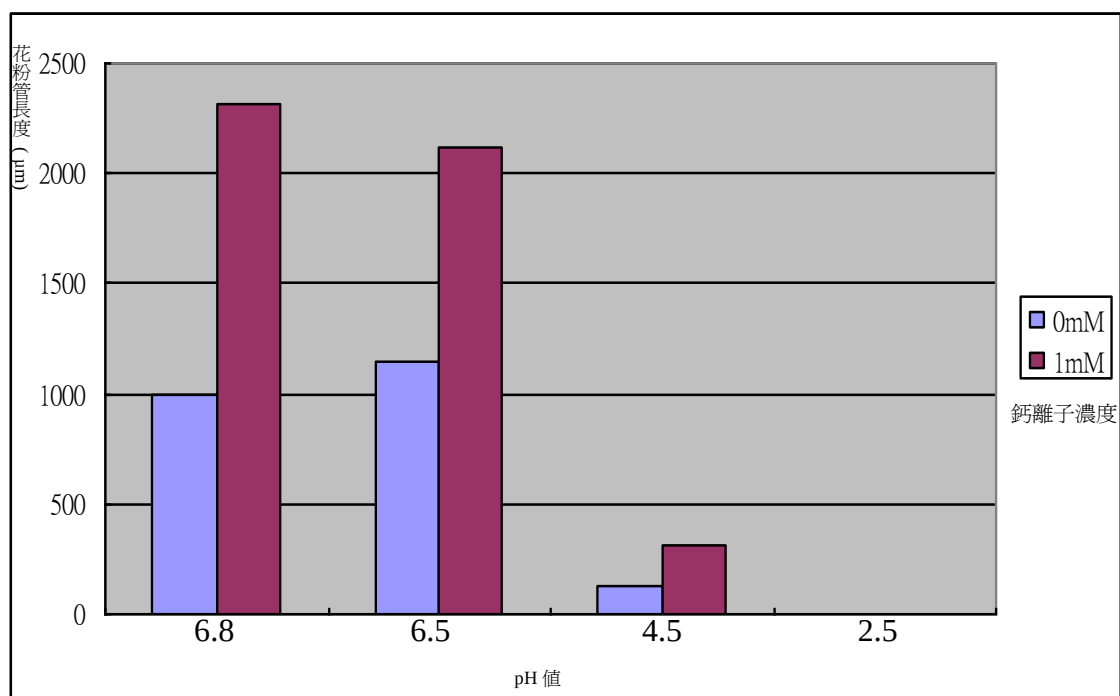
圖十二、硝酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

(二) 外源鈣離子促進非洲鳳仙花粉管在鹽酸溶液(pH=4.5，仿酸雨酸度)中的延伸作用

觀察鹽酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、23℃)。隨著鹽酸酸度增加，各組非洲鳳仙花粉萌發率也隨之下降。在 pH=4.5 以下的酸性環境，加入 1mM 鈣離子並無法有明顯的提升鳳仙花粉萌發率。pH=2.5 時則完全沒有萌發(結果見圖十三)。但在觀察鹽酸對於非洲鳳仙花粉管生長速率的影響時。發現隨著鹽酸酸度增加，非洲鳳仙花粉管生長速率隨之下降。而在 pH=4.5 時，1mM 鈣離子有明顯促進花粉管延伸(結果見圖十四)。上述結果暗示在鹽酸所造成的酸化逆境(pH=4.5，仿酸雨酸度)中，添加 1mM 外源鈣離子無法促進非洲鳳仙花粉的萌發，但卻可以促進已萌發之花粉管的延伸作用。



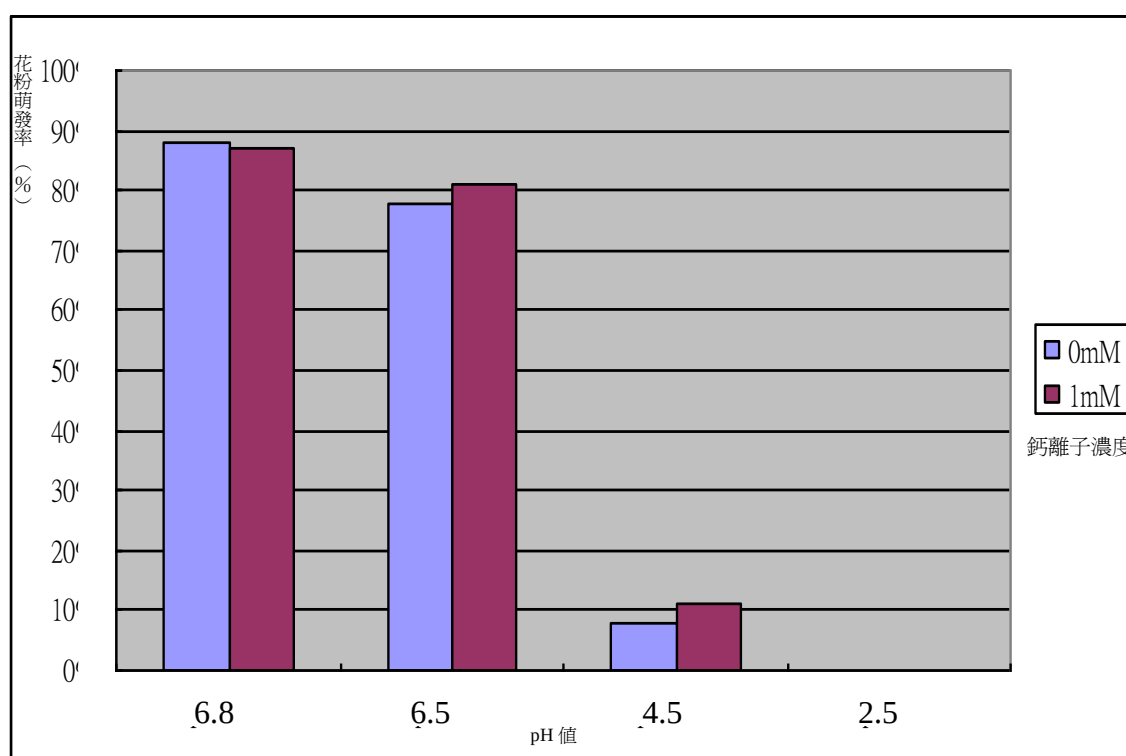
圖十三、鹽酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



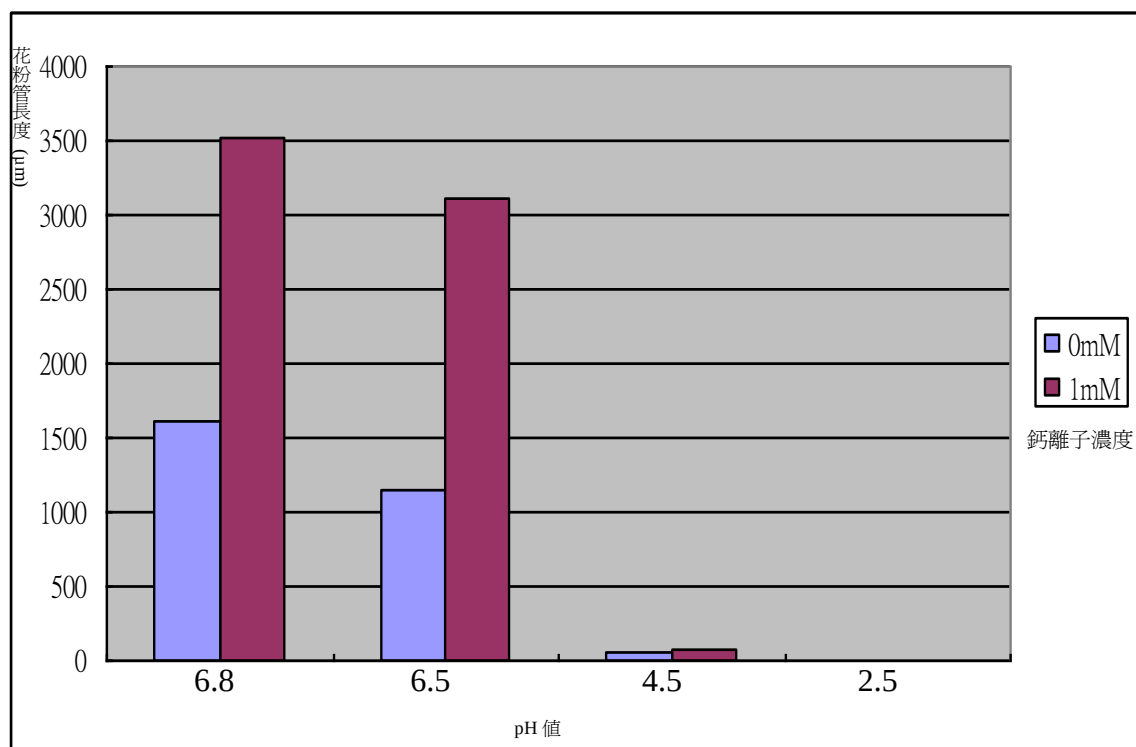
圖十四、鹽酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

(三) 外源鈣離子無法明顯促進非洲鳳仙花粉在硫酸溶液(pH=4.5，仿酸雨酸度)中的生長

觀察硫酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、23℃)。發現隨著硫酸酸度增加，鳳仙花粉萌發率也隨之下降。在本實驗中，任何硫酸所造成的酸化環境，加入 1mM 鈣離子並無法有明顯的提升非洲鳳仙花粉萌發率(結果見圖十五)。而觀察硫酸對於非洲鳳仙花粉管延伸的影響時。發現隨著硫酸酸度增加，各組非洲鳳仙花粉管延伸狀況隨之受抑制。而在 pH=4.5 時，添加 1mM 鈣離子對於非洲鳳仙花粉管延伸的促進作用，比起硝酸與鹽酸的處理組則是相當有限。綜合以上結果，我們推論 1mM 之外源鈣離子無法明顯促進非洲鳳仙花粉在硫酸溶液中的生長(結果見圖十六)。



圖十五、硫酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

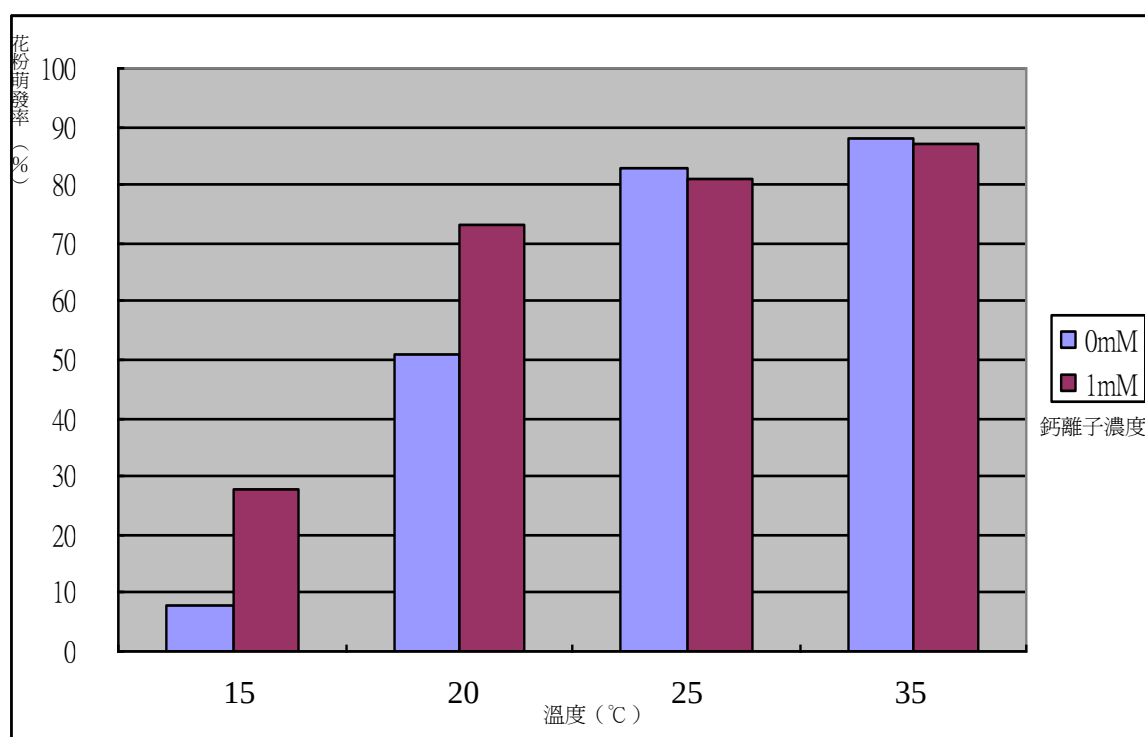


圖十六、硫酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

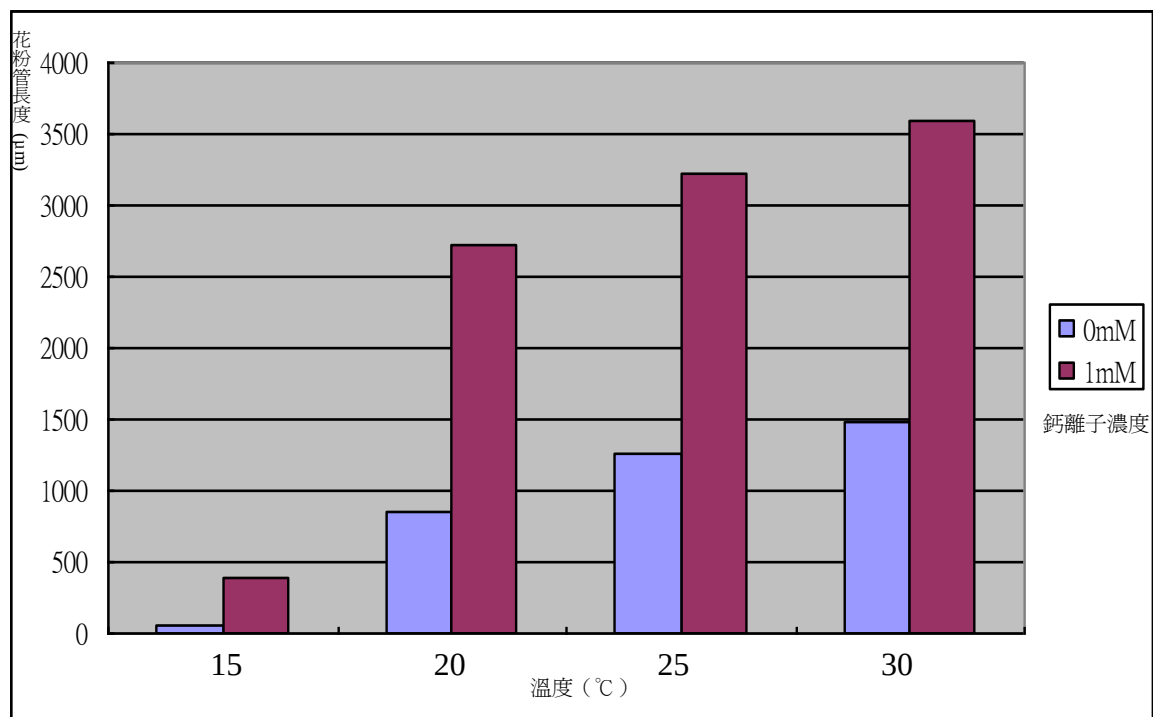
四、觀察不同溫度時(仿低溫逆境)，外源鈣離子對於可能促進非洲鳳仙花花粉生長的情形

(一) 外源鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉管在低溫中的生長

觀察不同溫度對於鳳仙花粉萌發率的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8)。在 15℃時，各組鳳仙花粉萌發率受到顯著的抑制，但在 1mM 的鈣離子實驗組，非洲鳳仙花粉萌發率相對於未使用鈣離子的對照組而言，有明顯提升(結果見圖十七)。此外，觀察不同溫度對於鳳仙花粉管延伸的影響。各組花粉管延伸狀況隨溫度下降而受抑制。而在 15℃時，相對於未使用鈣離子的對照組而言，添加 1mM 的外源鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉管的延伸(結果見圖十八)。在這系列實驗中，我們得知在 15℃時，非洲鳳仙花粉的生長即會受到明顯抑制。但若添加 1mM 之外源鈣離子，則可以有效促進非洲鳳仙花粉的生長情形。



圖十七、溫度對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



圖十八、溫度對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

柒、討論

根據實驗結果顯示，室溫下（23℃），外源的鈣離子在適當的濃度（0.1mM~1mM）對於非洲鳳仙花粉萌發率僅有些許提升，而 10mM 與 100mM 鈣離子反而會抑制花粉萌發。但是在花粉萌發後，花粉管延長的過程中，0.1mM~1mM 鈣離子有明顯的促進作用，其中以 1mM 鈣離子的促進效果最好。根據各時間點的紀錄，未加鈣離子的組別裡，花粉管的延伸速率在萌發一小時後便逐漸趨緩，而 1mM 鈣離子的實驗組則使花粉管延伸速率維持在相對快速的狀態。此結果暗示適量（0.1mM~1mM）外源鈣離子對於花粉管而言，其影響是在於促進花粉管的延伸而非萌發階段。10mM 與 100mM 鈣離子不論在花粉萌發或是花粉管延伸的過程，皆會造成抑制。

許多文獻中記載，植物細胞和動物細胞一樣，內部存在一個由微絲和微管、中間纖維組成的細胞骨架系統。在花粉管相關研究中，也已經證明微絲和微管是花粉管細胞骨架的主要組成成分。而花粉管微絲的主要構成分子-「肌動蛋白」，其分子結構與動物肌細胞的肌動蛋白十分類似，為負責細胞形狀變化（如肌肉收縮、偽足延伸）與細胞質流的重要結構之一。而鈣離子正是調節動物肌細胞收縮運動的要角。顯然地，在我們實驗結果中，適量外源鈣離子的使用對於非洲鳳仙花粉管延伸確實有很好的促進效果。當然，為了進一步釐清鈣離子是否透過調節微絲系統而影響花粉管的延伸，還需要有許多實驗佐證。我們也試圖使用鬆胞劑 B 等藥品來影響微絲系統，觀察微絲系統的變動與鈣離子促進花粉管延伸二者之間的關係。此部分實驗尚在進行中。

為了進一步釐清內源與外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長的影響，我們使用 EGTA（鈣離子螯合劑）來處理花粉，發現僅需 0.1mM 之 EGTA 就會造成花粉萌發與花粉管延伸受到強烈抑制，1mM 以上的 EGTA 濃度更是完全抑制花粉萌發。鈣離子的缺乏導致花粉萌發受抑制，此結果暗示花粉內源鈣離子對於萌發這一階段是必須的。相較外源鈣離子無法明顯提升萌發率的結果來看，我們可以推測非洲鳳仙花粉之內源鈣離子是花粉萌發所必須，且其含量足以提供萌發時期所需。因此添加外源鈣離子並無法明顯提升花粉萌發率。

一般而言，細胞外的訊號藉由細胞膜上的受器接收後，會將此外來訊號轉化為細胞內的訊號繼續傳遞下去。其中一類的訊號會使用鈣離子做為向下傳遞的第二信使。花粉在經過授粉達到雌蕊柱頭時，雌蕊柱頭上的水分使花粉萌發孔處的質膜擴張，同時雌蕊上頭的誘導物質透過鈣離子或其他途徑向花粉細胞內傳遞訊息，快速啟動許多激酶與酵素進而造成萌發的動作。部分植物證實需要外源的鈣來促進花粉萌發，但在非洲鳳仙花，我們依據實驗結果推測花粉內原有的鈣充足且為萌發所必須，外源鈣離子的作用著重在促進花粉萌發後的延伸時期。

觀察亞鈣離子（鈣離子通道阻截劑）對於鳳仙花粉萌發的影響。隨著亞鈣離子濃度的增加，非洲鳳仙花粉萌發率也隨之下降。1mM 亞鈣離子已呈現強烈的抑制作用。暗示鈣離子在細胞內藉由鈣離子通道流動是調節非洲鳳仙花粉萌發所需要的。在花粉管的延伸方面，低濃度亞鈣離子的使用即對鳳仙花粉管的延伸產生強烈抑制。雖然 0.1mM 亞鈣離子濃度的處理造成非洲鳳仙花粉仍有 25% 的萌發率，但是這些萌發的花粉管並無法在此濃度下延伸，而在萌發孔處形成一球型的花粉管並停滯生長。暗示鈣離子通道的正常動作是花粉管延長的必備條件。為了更確認鈣離子流動對於非洲鳳仙花粉生長的重要性，我們另外使用專一性較高的 Verapamil（鈣離子通道阻截劑），發現隨著 Verapamil 濃度之提升，非洲鳳仙花粉萌發比率也明顯下降。此結果暗示在花粉萌發過程中，鈣離子藉由胞器上或是細胞膜上的通道流動為花粉正常生長所必須。相較於花粉萌發率而言，Verapamil 對於花粉管延伸的抑制作用更為顯著。

曾有文獻指出，百合花粉管內存在一鈣離子梯度，可誘導花粉管朝一特定方向生長。花粉管末端的鈣離子濃度較高，並由花粉管末端向基部急遽遞減。對於末端高鈣離子的濃度由來，一般有兩種說法：一種說法是胞外鈣離子通過細胞膜上的鈣離子通道進來，而只有在花粉管末端才具有高度活化的鈣離子通道，因而造成末端流入細胞內的鈣離子較多，形成上述的濃度梯度分佈；另一種說法是花粉細胞內存在一鈣庫，可能將鈣貯存於內質網等胞器內，藉由細胞內的運輸或是擴散作用達成此一濃度梯度的分佈。不管是以上哪一種模式，鈣離子濃度梯度的形成皆需要有鈣離子通道的參與，將鈣送過細胞膜或是胞器的膜等結構。因此我們在使用亞鈣離子或 Verapamil 抑制非洲鳳仙花粉內的鈣離子通道時，花粉管生長情形亦受到明顯抑制。這意味在非洲鳳仙花粉，由鈣離子通道調節花粉細胞內的鈣離子流動，對於花粉的生長極具重要性。

探討了許多原理部分之後，我們想知道是否鈣離子促進花粉生長作用可以應用實際農作生產上。近年來，不時在新聞報導中看到，酸雨（ $\text{pH} < 5.6$ ，在台灣甚至常達到 $\text{pH} = 4.1 \sim 4.9$ ）致使農作收成差、結果率低已是常發生的問題。是故，我們嘗試使用硝酸、鹽酸、硫酸等酸雨分子處理非洲鳳仙花粉，結果顯示在 $\text{pH} = 4.5$ 時，1mM 鈣離子對於硝酸所處理過的非洲鳳仙花粉，其萌發與花粉管延伸速率均有明顯促進。而同樣在 $\text{pH} = 4.5$ 時，1mM 鈣離子對於鹽酸所處理過的非洲鳳仙花粉，其萌發率無明顯提升但花粉管延伸速率則仍有相當明顯的促進。分析硝酸與鹽酸的結果差異，可能原因為鹽酸中氯離子的影響。由於有其他報告指出在花粉管萌發與生長過程，氯離子伴隨著花粉管生長有震盪式的外流情形，且此震盪式的氯離子外流是花粉管正常生長所必要，阻礙其流動或改變外在氯離子濃度皆可能導致進一步的花粉管生長困難。

至於在 $\text{pH} = 4.5$ 時，1mM 鈣離子對於硫酸所處理過的非洲鳳仙花粉，其萌發率與花粉管延伸速率並無明顯促進，探究其原因可能是因為鈣離子與硫酸根分子結合成硫酸鈣沉澱，致使鈣離子有效濃度降低，因而其促進作用無法展現。所以我們也嘗試使用較高濃度的鈣離子，看是否可以對此一現象作改善，但還目前尚未完成此部分的測量。

綜合以上三種酸雨分子處理非洲鳳仙花粉的結果顯示，在硝酸與鹽酸所造成的仿酸雨酸化環境中，添加鈣離子對於離體非洲鳳仙花粉生長有明顯助益。但此結果仍有待運用於整體植株栽培，以實際觀測其結果率是否增加。

在探討應用的部分，我們也嘗試探討較低溫的環境時，外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長是否有提升作用。實驗結果顯示，在 15℃ 時，非洲鳳仙花粉萌發率與花粉管生長速率即受到顯著的抑制；而添加 1mM 的外源鈣離子，花粉萌發率與花粉管延伸情況相對於未使用鈣離子的對照組而言，皆有明顯提升。顯示外源鈣離子的使用對於溫度所造成的抑制花粉生長作用有所改善。許多諸如非洲鳳仙花等具有經濟價值的植物，在氣候合宜的台灣四季開花，但是往往在秋冬時期便因低溫而減少其結果機率。未來我們希望可以將上述實驗結果應用於其他物種，進行整體植株栽培的實驗而非僅是離體花粉實驗，以更進一步往實際應用邁進，期待能延長經濟作物結果時機、提升結果率與增加產量。

捌、結論

根據過往文獻記載，適量外源鈣與硼離子對於花粉萌發率有所提升。但是對於我們一般常用來觀察花粉萌發的花種，似乎不需要外源的鈣離子即能發育良好。因此我們便以非洲鳳仙花為對象作為一探討對象，釐清鈣離子在非洲鳳仙花粉生長時所扮演的角色與其相關功能，未來也期待能將離體花粉萌發的實驗結果應用於實際栽植。茲將實驗結果歸結如下：

- 一、在非洲鳳仙花，我們依據實驗結果推測花粉內源鈣離子充足且為萌發所必須，外源鈣離子的作用著重在促進花粉管的延伸而非在萌發初期。以 1mM 的鈣離子對於花粉管延伸有最好的促進效果，過高濃度反而造成抑制。
- 二、在非洲鳳仙花粉，由鈣離子通道調節花粉細胞內的鈣離子流，對於花粉的生長極具重要性。若抑制鈣離子通道，則造成花粉生長困難。
- 三、外源鈣離子在硝酸與鹽酸所造成的酸化環境（pH=4.5）中，對於非洲鳳仙花粉生長有明顯改善。在相同酸鹼值時，1mM 鈣離子濃度則對於硫酸所造成的抑制作用較不具有改善。
- 四、外源鈣離子的使用對於低溫所造成的抑制花粉生長作用有所改善。隨著溫度下降，非洲鳳仙花粉萌發與花粉管延伸速率也均下降。添加外源鈣離子後，花粉萌發率與花粉管延伸速率相對於未使用鈣離子的對照組而言，皆明顯提升。

玖、參考資料

- 一、吳沛宇、張顥騰、陳彥廷、陳譽仁（1995）。「花粉萌發因素的探討—龍吐珠花粉最適萌發環境之發現」。中華民國第34屆高中組生物科科展作品。
- 二、林學聖、彭淑媛（1995）。「精卵的鵲橋—花粉管之研究」。中華民國第34屆國中組生物科科展作品。
- 三、王月雲（1982）。漫談花粉生理。科學教育月刊，51 期，73~81
- 四、Bush, D. S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **46**, 95 –122
- 五、Callewaert, G., Gleeman, L., and Monad, M. (1989). Caffeine-induced Ca^{2+} extrusion via Na^{+} – Ca^{2+} exchanger in cardiac myoplasmic. *Am. J. Physiol.* **257**, C147–C152
- 六、Cosgrove, D. J., and Hedrich, R. (1991). Stretch-activated chloride and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**, 143– 153.
- 七、Endo, M. (1977). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* **57**, 71– 108.
- 八、Evans, D. E. (1994). Calmodulin-stimulated calcium pumping ATPases located at higher plant intracellular membranes: A significant divergence from other eukaryotes? *Physiol. Plant.* **90**, 420–426.
- 九、Feijo´, J. A., Malho´, R., and Obermeyer, G. (1995). Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. *Protoplasma* **187**, 155– 167.

【評語】 091403

1. 實驗設計及測驗方法具創新性。
2. 建議對實驗背景及資料，宜再深入了解。
3. 建議實驗數據，應進行統計分析。