

國立屏東大學應用化學系研究所

National Pingtung University

Department of Applied Chemistry

碩士論文

鐵砲百合柱頭分泌物內促進萌發因子之分離與

活性分析



**Separation and activity analysis of germination
promoting factors within lily stigma exudates**

指導教授：黃鐘慶博士 (Dr.Jong-Chin Huang)

研究生：傅小娟 (Siao-Jyuan Fu)

中華民國一百零四年一月

Jan,2015

國立屏東大學應用化學系碩士班
碩士論文

研究生：傅小娟

論文題目

鐵砲百合柱頭分泌物內促進萌發因子之分離與活
性分析

本論文經審查及口試合格特此證明

論文口試委員會主席

陳皇州

委員

江佩倫

委員

黃鐘慶

指導教授：黃鐘慶博士

黃鐘慶

系主任：張愛惠博士

張愛惠

中華民國

105

年

1

月

11

日

謝誌

我要畢業了！很開心自己完成了碩士學位，也非常感謝口試委員對我的認可。在研究所的這段日子裡。曾經在這一路上跌倒、茫然、迷失過，還好身邊總是有鼓勵、支持著我的研究所同學，以及實驗室學弟、妹們的加油打氣，讓我靠著堅定的意志力有信心的打完了一場勝仗。

首先，誠摯的感謝我的指導教授黃鐘慶博士，老師總是悉心的指導，在遇到實驗上的問題時給了我許多建議和研究方法，不時的討論並指點我正確的方向，讓我在研究所學習期間獲益匪淺。老師對學問的嚴謹更是我學習的典範。再來感謝研究所同學們，秀琴、小曼、洋成、佑誠、宜暄，很開心能與你們當同學，大家彼此照顧，互相鼓勵，各個都順利完成碩士學位，邁向人生的下一個階段。謝謝實驗室的學弟建豪、駿青、仲丞、安凱，總是在我最需要的時候伸出援手，實驗上也幫了我許多，互相討論切磋，找出問題並解惑，覺得你們很棒，讓身為學姊的我很感動。也謝謝還在研究所生涯中奮鬥的學弟妹家瑜、皓瑀、金璋、家愷、理晶，謝謝你/妳們帶給我的歡樂，生活中常常發生很多趣事，現在想起來都還會會心一笑呢！也祝福你們順利畢業，加油唷！還有謝謝系辦如珊姊姊，常常有公務要忙碌，但總是會提醒著我們大大小小要注意的事，受了妳很多的照顧。最後，謝謝一起順利通過口考，即將要畢業的哲慶，在研究所這段日子裡，常常互相督促，對於實驗上的經驗分享，也讓彼此受益良多，雖然有時候意見分歧，但我們還是會互相包容、體諒，我們是好朋友，也是好夥伴。

在我求學期間，真的很感謝我的家人，這麼支持我讓我無憂無慮的專心於學業上，遇到挫折的時候，家人是我的最好的避風港，讓我感到溫暖。如今我就要畢業了，真的很感謝爸爸傅傳鵬、媽媽鍾美珍、哥哥傅宗駿、妹妹傅小茹、弟弟傅宗正，有你/妳們的成為我強大的後盾，讓我在築夢的過程中可以很勇敢，願這份榮耀與你們分享。

中文摘要

在開花植物之生殖過程中，花粉發育與花粉管的生長過程皆扮演著相當重要的角色。當百合花粉成熟觸碰到柱頭並開始啟動了花粉管萌發與生長，此時，百合花粉必會接觸柱頭/花柱分泌物。在前人研究中，確定了百合的柱頭分泌物會對花粉萌發造成影響。若於體外萌發百合花粉時加入百合花柱分泌物會加速花粉萌發速率，對此本實驗室認為花柱分泌物中應有存在於可促進花粉管萌發的有效物質，故在本實驗中將分離花柱分泌物中的促花粉萌發有效物質。本研究利用外源性處理的方式推斷花粉的有效物質，如加熱滅菌或 proteinase K 處理花柱分泌物，發現處理過後並不會影響促進花粉萌發之活性，但卻造成花粉管長度的縮減。在使用 10 kDa 分子篩分離花柱分泌物的實驗中，間接證明了花柱分泌物中促進花粉萌發的有效物質並非單一物質。在測試可溶性溶劑(甲醇、乙醇)萃取花柱分泌物時，發現其實驗結果與加熱滅菌及 proteinase K 處理相近。最後我們使用高效能液相層析儀對花柱分泌物進行分離，並針對不同時間點的濾液進行萌發率測試，並發現分離時間 20~40 分鐘之分離濾液促進花粉萌發速率能力優於其他時段，而在各個分離時段的分離液其促進花粉萌發速率能力皆低於一倍萌發液。

關鍵詞：花粉管萌發，柱頭分泌物，加熱滅菌，proteinase K，高效能液相層析儀

Abstract

In the reproductive process of flowering plants, both pollen development and pollen tube growth play important roles. After landing on the stigmatic surface, dehydrated pollen grains receive female signals to trigger pollen hydration, activation and pollen tube emergence. Previous studies showed that stigma exudates of lily affected pollen germination. Lily stigma exudates can accelerate pollen germination rate if lily pollen germination was conducted in vitro. We propose some materials effective on pollen germination in the stigma exudates. Therefore, we isolate the active materials that accelerate pollen germination from stigma exudates. In this study, we use exogenous methods, such as heat sterilization, or proteinase K (for the treatment of stigma exudates), to analyse the active materials. We discovered that both methods wouldn't affect the activity of accelerating pollen germination in the exudates, shorten pollen tubes were observed when pollen germinated in the treated exudates. We used 10 kDa molecular sieves to isolate active materials of the stigma exudates. The result proved that the active materials accelerating pollen germination in stigma exudates weren't single substance. In the test of soluble solvent extraction of the stigma exudates, we found the result is similar to the result of heat sterilization and proteinase K. At last, the stigma exudates were isolated by HPLC. We conducted the germination rate test by adding different timing filtrate into the medium. We found that when we added the 20-40 mins filtrate into the medium pollen germination rate is better than the rate of other time sections. We also found that pollen germination rate in the control medium was better than the rate in the filtrate-adding medium.

Key word : pollen tube germination, stigma exudates, heat sterilization, proteinase K, High-performance liquid chromatography (HPLC)

目錄

壹、 謝誌	I
貳、 中文摘要	II
參、 英文摘要	III
肆、 研究背景	1
伍、 研究目的	4
陸、 材料方法	5
柒、 結果	9
捌、 討論	13
玖、 圖表	16
參考文獻	26
附錄	28
附圖一、雌/雄配子體發育	29
附圖二、花粉發育過程	30

研究背景

花粉發育及花粉管生長

開花植物的發育可劃分為三個階段，分別為(一)種子初萌發的胚胎時期(embryonic phase)、(二)進行光合作用獲取能量來源的營養時期(vegetative phase)、(三)繁衍後代而進行的生殖時期(reproductive phase)(Barrett 2010)。在生殖時期中，花是最主要的生殖器官之一，其發育受到水分多寡、日照時間、溫度變化與自體的基因所調控，因此，不同物種的花型皆有所差異。一朵完整的花，需具備以下花器：(1)雄蕊(stamens)由花藥(anthers)與花絲(filament)所組成；(2)雌蕊(carpel)由花柱/柱頭(style/stigma)與子房(ovary)所構成；(3)花被(tepal)分別由花萼、花瓣、花托所共同構成(Borg, Brownfield et al. 2009)。

開花植物的生殖過程，花粉(pollen)扮演極為重要的角色，因為一個成熟的花粉中含有兩個單套(haploid)精細胞(sperm cell)、一個營養細胞(vegetative cell)，以完成雙重受精的繁衍重任。而雄(stamens)主要由花絲及花藥(anthers)構成，花粉發育的開始會先由孢原組織在花藥中轉變為花粉母細胞，花粉母細胞(pollen mother cells)經過減數分裂後會形成四分子體(tetrad)。在小孢子發育時，花藥內的絨氈層(tapetum)細胞會分泌創痕糖分解酵素(callase)(Tang, Zhang et al. 2010)，以分解小孢子周圍的創痕糖。當周圍的糖層分解後，及釋放成熟的小孢子至花藥囊腔中(McCormick 2004)。成熟的小孢子開始進行不對稱的有絲分裂(Mitotic division)(Twell 2011)，形成一個較大的營養細胞，與一個被包裹於其中的生殖細胞，此時植物體會累積大量的物質於營養細胞中。由花粉

的第二次有絲分裂時間，又可區分為雙細胞型、三細胞型。雙細胞型花粉植物會在花粉管朝向胚珠延伸時，開始進行的二次有絲分裂，形成兩個精細胞，而百合花就是常見雙細胞型花粉植物之一 (Borg, Brownfield et al. 2009)。部分植物為三細胞型，會在花粉未萌發前，完成第二次有絲分裂，形成兩個精細胞，例如阿拉伯芥 (McCormick 2004)。花粉會在成熟前自行脫水，並進入休眠狀態，成熟的花粉會從花藥中釋放出來，等待合適的環境萌發。

開花植物的繁衍需藉由風、昆蟲等媒介傳送花粉，並附著於柱頭，以啟動授粉過程。雌蕊柱頭可分為乾、濕兩型，乾柱頭以阿拉伯芥為例，其薄膜上富含蛋白質及角質層(Hiscock and Allen 2008)。而百合為濕柱頭，濕柱頭與乾燥的花粉會進行水合作用 (hydractin)，促使花粉由非極化細胞轉變為極化細胞(Edlund, Swanson et al. 2004)。花粉管會自花粉內壁(intine) 萌發孔穿出開始萌發(germinate)，此時花粉管會開始分泌酵素以突破柱頭表皮細胞，這些酵素以知包含酸性的磷酸酶(acid phosphatase)、核酸酶(ribonuclease)、脂化酶(esterase)、澱粉酶(amylase)及蛋白酶(protease) (Knox and Heslop-Harrison 1970)。花粉管沿著花柱朝著胚囊(embryo sac)生長，經由輔細胞(synergid cell) 引導至珠孔(micropyle) 進入胚囊內，精細胞與卵細胞結合產生雙套體 (diploid) 的接合 (zygote)，另一精細胞與中央細胞的兩個極核(polar nuclei)，發育成三套體(triploid) 的胚乳(endosperm)，完成雙重授精(Chen, Lei et al. 2009)。

在顯微鏡下觀察花粉管的生長，花粉管尖端(apical) 囊泡聚集的形狀是類似倒圓錐形，囊泡經由肌動蛋白絲(actin) 傳送至尖端使細胞壁擴張；花粉管的次根尖(subapical) 區域為胞器主要分布區域，包含了粒線體(mitochondria)、高爾

基體(dictyosome,/等)；核區 nuclear zone) 具有兩個精細胞及營養核(vegetative nucleus)，其次為大液泡(vacuolization) 區域及胼胝質栓塞(callose plug) 區(如附錄1.) (Bedinger, Hardeman et al. 1994)。花粉管生長的調控相當複雜，其中包括肌動蛋白絲的調控、鈣離子的平衡及醣蛋白的修飾等，皆對花粉管之生長發育具有一定的影響力 (Du, Simpson et al. 1996, Kost, Spielhofer et al. 1998, Hepler, Vidali et al. 2001, Reddy 2001, Jasavala, Martinez et al. 2007, Zonia 2010)。

研究目的

如同前文探討，花粉與花粉管萌發有著密不可分的關係，且對於生長過程中基因之調控具有相當的重要性。花粉在體內萌發中，其花粉管具有快速生長與極性之特性，而體外萌發則否。因此我們推測，花柱上的分泌物可能會加速花粉萌發，雌蕊內亦有十分複雜的調控，而造成體內、體外花粉管萌發差異。在前人的研究中發現柱頭分泌物會加速萌發速率，將分泌物以滅菌加熱仍具有活性。前人碩士班古家齊學姊曾使用水、乙酸乙酯萃取柱頭分泌物，發現使用乙酸乙酯萃取花柱分泌物後其萃取液的促花粉萌發活性較原花柱分泌物高，並利用核磁共振光譜、氣相層析質譜儀、液相層析質譜儀、二維電泳進行成分分析。其中有部分鑑定出但還未研究過的化合物，也仍未對這些化合物做進一步的物質成分分析。本次研究將使用不同的分析方法對花柱分泌物進行成分鑑定與分析，並測試其活性，探討何種物質可促進花粉萌發，並建立於未來探討其分子機制之可能性。

材料方法

本次實驗中使用鐵砲百合 (*Lilium longiflorum* Thunb.cv Avita)之分泌物作為研究材料，選用百合作為材料乃原因在於其花器大，柱頭明顯，且為濕柱頭，方便收集其分泌物，但由於柱頭分泌物非常稀少，故本次使用前幾年的分泌物進行分析，實驗中，先利用 10 kDa 的分子篩將柱頭分泌物分離成 > 10 kDa、<10 kDa 層，觀察其促進花粉萌發活性，再將柱頭分泌物和其 <10 kDa 水層溶入 0.1 % H₃PO₄ 與甲醇中，並以高效能液相層析儀(High-performance liquid chromatography, HPLC)對花柱分泌物與 < 10 kDa 水層進行分離。

一、 離心與冷凍乾燥

將15 ml 花柱分泌物以10 kDa 分子篩以4000 rpm、30 min 離心，離心後用10 mL 二次水沖提篩孔，避免大分子物質阻塞篩孔，重複此步驟兩次，收集離心後的> 10 kDa 及< 10 kDa 水層以冷凍乾燥機去除水分，乾燥後將結晶狀 > 10 kDa 與 < 10 kDa 研磨成粉末，並以二次水回溶至原體積。

二、 有機溶劑萃取及減壓濃縮

將兩管體積為 1 ml 的花柱分泌物分別加入 5 mL 甲醇、乙醇，並以震盪混合均勻，將混和溶液以 4000 rpm、10 min 條件下離心，使無法溶解於溶劑內的固體沉澱，在收集上清液，分別對甲醇萃取液、乙醇萃取液進行減壓濃縮，去

除有機溶劑，再分別以 1ml 二次水回溶。

三、可溶性測試

為了挑選可完全溶解柱頭分泌物的流動相，以進行高效能液相層析儀分析，故將 100 μ l 柱頭分泌物分別加入 500 μ l 水、乙腈 (Acetonitrile)、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯與正己烷，震盪混合均勻後，觀察其溶解情形。

四、proteinase K 處理

為了得知鐵砲百合柱頭分泌物中促進花粉萌發的有效物質是否為蛋白質，所以我們將 1 mg 的 proteinase K 粉末溶入 1 ml 的 0.5 M Tris-HCl 溶液中，並取 10 μ l proteinase K 混和溶液加入 90 μ l 的花柱分泌物中，震盪混合均勻後，在溫度 37 度中反應 1 小時，以適當比例與一倍萌發液混和後，進行萌發率測試。

五、活性測試

為了得知 > 10 kDa、< 10 kDa 水層、甲醇萃取液、乙醇萃取液、高效能液相層析儀分離濾液，是否會對花粉萌發速率造成影響，故各種溶液已是當比例將加入萌發液中，觀察花粉萌發率變化。實驗花粉為鐵砲百合 (*Lilium longiflorum*)，先將花粉秤取 0.001 g 分裝至微量離心管中，在實驗前先將含花粉的微量離心管取出，花粉回溫後加入 200 μ l 一倍萌發液(12.7 mM CaCl₂、

1.62 mM H₃BO₃、9.9 mM KNO₃、10% sucrose，pH5.2)，將花粉與一倍萌發液混合均勻後，加入 200 ul 萃取液與 1600 ul 一倍萌發液，倒入小型培養基，在恆溫震盪培養箱中以溫度 30°C、轉速 50 rpm 培養 2 小時，於顯微鏡下，觀察其萌發狀況六、高效能液相層析儀(High-performance liquid chromatography, HPLC)分離 將 5 ml 原鐵砲百合花柱分泌物冷凍乾燥去除水分後，磨碎成粉末並以二次水回溶至 5 ml，完成前處理後開始進行高效能液相層析儀分離，儀器為 Agilent Technologies，型號為 1260 infinity，於注射樣品前要先以 80%的 0.1 % 磷酸加上 20 % 甲醇以流速 1 ml/min 平衡管柱(SHODEXTM C18M 4E) 30 分鐘，平衡管柱後注入 100 ul 的樣品，以 0.5 ml/min 的流速，分離 1 小時，並用 UV 光譜波長 200 nm 與 254 nm 偵測訊號。

六、 高效能液相層析儀(High-performance liquid chromatography, HPLC)分離

將 5 ml 原鐵砲百合花柱分泌物冷凍乾燥去除水分後，磨碎成粉末並以二次水回溶至 5 ml，完成前處理後開始進行高效能液相層析儀分離，儀器為 Agilent Technologies，型號為 1260 infinity，於注射樣品前要先以 80%的 0.1 % 磷酸加上 20 % 甲醇以流速 1 ml/min 平衡管柱(SHODEXTMC18M 4E) 30 分鐘，平衡管柱後注入 100 ul 的樣品，以 0.5 ml/min 的流速，分離一小時，並用 UV 光譜波長 200 nm 與 254 nm 偵測訊號。

七、 高效能液相層析儀濾液收集與回溶

依照高效能液相層析儀分離時間 0~10 分鐘、10~20 分鐘、20~40 分鐘、40~60 分鐘，收集分離的液體，使用氮氣吹乾儀去除濾液中的有機溶劑，再以冷凍乾燥法去除剩餘的水分，最後以二次水回溶至 100 ul，並進行萌發活性測試。

結果

一、鐵砲百合柱頭分泌物基礎性質與溶劑分析

為了確認花柱分泌物實際功效與重複驗證前人實驗結果，因此我們對花柱分泌物進行各種定性分析，發現相對於萌發液而言，花粉受柱頭分泌物處理二至四小時後確實可以提高花粉萌發速率約 7~10 % (圖一); 但受花柱分泌物處理後的花粉管生長速率相較於對照組(一倍萌發液)並無顯著提升，如圖二所示。

(I) 分子篩分離結果 (純化超濾管)

先前實驗室研究運用乙酸乙酯萃取花柱分泌物的結果推斷，花柱分泌物中可促進萌發的有效成分，可能為小分子物質。因此，我們先運用 10 kDa 分子篩對花柱分泌物進行分離，並分別取 0 ul、25 ul、50 ul、100 ul、200 ul 之 > 10 kDa、 < 10 kDa 水層、原花柱分泌物與一倍萌發液混合，得到 2ml 混合溶液，進行花粉萌發率測試，觀察其花粉萌發率變化。由圖三所示，我們發現 > 10 kDa、 < 10 kDa 水層皆有促進萌發的能力，且花粉萌發率會隨著 > 10 kDa、 < 10 kDa 水層的濃度梯度而提升。

(II) > 10 kDa、 < 10 kDa 水層在高濃度抑制萌發

> 10 kDa、 < 10 kDa 層在濃度 100 ul/1000 ul 的混和溶液內，其處理過的花粉，萌發率皆能隨濃度提升，但是我們使用冷凍乾燥將大、小分子層濃縮至兩

倍濃度，卻發現在 100 ul/1000 ul 濃度之下，萌發率卻相較於一倍濃度出現下降之意象；但當我們將等體積的大、小分子層並回溶至 1/2 體積，並以 200 ul/1000 ul 的濃度進行萌發率測試，發現其萌發率雖然仍比 200 ul/1000 ul 的花柱分泌物低，但卻比兩倍濃度的大、小分子層，其結果如圖四。

(III) 滅菌與 proteinase k 處理柱頭分泌物

由於 > 10 kDa、 < 10 kDa 水層皆可促進花粉萌發，推測分子篩並無法將有效物質分離，因此直接從花柱分泌物進行外源性處理，試圖推估其有效成分為何種物質。將花柱分泌物置於滅菌釜中，滅菌加熱 30 分鐘後，取滅菌加熱後的花柱萃取液 200 ul 並加入一倍萌發液至 2 ml，以此混合溶液進行花粉萌發測試，發現其萌發率並無顯著下降，且與對照組(原花柱分泌物)近似，結果如圖五。雖然滅菌加熱處理應該可以使大部分的蛋白質失去活性，但某些耐熱性蛋白可能無法以此方法去除，所以我們另外使用 proteinase K 處理花柱分泌物，並進行萌發測試，其結果和滅菌加熱處理相似，花粉萌發率與對照組(原花柱分泌物)相似，結果如圖六。從滅菌加熱與 proteinase K 處理的結果得知，蛋白質可能不是影響花粉萌發的必要因子。

(IV) 甲、乙醇萃取

在可溶性測試實驗中發現，花柱分泌物易溶解於水中，但是加入甲醇、乙醇與丙酮則出現白色沉澱物；以乙酸乙酯與正己烷則完全無法互溶。由此可得知花粉分泌物屬於高極性。我們進一步分別利用甲、乙醇對花柱分泌物進行萃取，

試圖測試甲醇與乙醇所萃出之物質是否含有促進花粉萌發之有效物質。由於甲醇對蛋白質具有毒性，當用甲醇萃取時，大多數的蛋白質會析出，因此甲、乙醇的萃取液會減少許多大分子的蛋白質，可能會較為適合進行高效能液相層析儀分析，但是其促進花粉萌能力並未特別出色，其結果如圖七，且運用甲、乙醇萃取液所萌發之花粉管長度相較於(對照組)花柱分泌物而言，較為短小，如圖六所示。

(V) 高效能液相層析儀分離結果

為了將花柱分泌物中的促進花粉萌發物質分離，故使用高效能液相層析儀對花柱分泌物進行分離。高效能液相層析儀常應用於物質之分析與分離。相較於氣相層析儀分析物質無法回收，液相層析儀所分離之物質仍能回收再利用，由上述實驗中顯示，甲醇萃取層仍能保有促進花粉萌發之活性，因此甲醇能做為移動相之組成。於測試高效能液相層析儀分離花柱分泌物時，發現全光譜之波峰顯示，在波長 254 um 到 600 um 並無明顯之訊號產生，而訊號主要集中在 200 um~254 um 之間，因此我們將以 200 um 與 254 um 作為偵測的波長。從高效能液相層析儀的波峰的分布得知在 0~20 分鐘時無論是在波長 200 um 或 254 um 皆發現有明顯的吸收峰，由管柱流動相的組合推測這些吸收峰所代表的應該是某些較為親水性的物質，但在 20~60 分鐘雖然仍有吸收峰訊號，但訊號數量較少且稍弱，推測其中為某些低極性物質，結果如圖九所示。將分離時間 0~10 分鐘(A)、10~20 分鐘(B)、20~40 分鐘(C)、40~60 分鐘(D)所收集的分離液，利用氮氣吹乾儀去除有機溶液，再使用冷凍乾燥法去除殘留水分，並以二次水回溶至原體積，最後加入一倍萌發液，混合成 10 %的混和溶液進行萌發率測試。從萌發率測試得知，

20~40 分鐘所收集的濾液促進萌發的能力為四個時間點中最高，但皆低於一倍萌發液或花柱分泌物處理之花粉萌發率，其結果如圖十所示。

討論

一、柱頭分泌物基礎定性分析

從圖一發現在萌發兩小時後，受花柱分泌物處理過的花粉，其萌發率約高於受對照組(一倍萌發液)處理後的花粉萌發率 10 %，由此可知鐵砲百合花柱分泌物對於鐵砲百合的花粉萌發確實有顯著的影響。從圖二觀察花粉管增長速率時，發現 1~2 小時之間，花柱分泌物對花粉管生長速率有些微影響，但 2~4 小時之後發現生長速率並沒有較大的優勢，由此可見花柱分泌物應該對花粉管的生長速率影響不大。

二、柱頭分泌物的簡易分離與活性分析

圖三中發現 >10 kDa 水層與 < 10 kDa 水層，皆對促進花粉萌發有所影響，但提高濃度時卻會抑制花粉萌發。我們推測 10 kDa 為分子篩可能無法將花柱分泌物中的促進花粉萌發有效物質分離，該物質會在低濃度時促進萌發，在高濃度時抑制萌發，又或者 10 kDa 分子篩已將促進花粉萌發的有效物質分離，但該物質並非單一物質，在高濃度時需形成複合體，方可促進萌發，因故將 >10 kDa 水層與 <10 kDa 水層混合，並以高濃度混合溶液測試萌發活性，發現其促進花粉萌發率能力趨近於高濃度的花柱分泌物，由此可推測，花柱分泌物中可促進花粉萌發的物質可能不是單一物質。

三、 蛋白酶 proteinase K 與滅菌加熱等外源性處理分析

經 proteinase K 或滅菌加熱處理可降解大部分的蛋白質，故將花柱分泌物以 proteinase K 或滅菌加熱進行處理，由圖五結果發現，無論 proteinase K 或滅菌加熱處理過後的花柱分泌物，其促進花粉萌發活性與原花柱分泌物差異不大，由此推測蛋白質可能不是花柱分泌物中促進花粉萌發的主要因子，令人意外的是，以 proteinase K 或滅菌加熱進行處理後的花柱分泌物進行花粉萌發測試時，發現兩者的花粉管長度皆有縮減的現象，如圖六所示，推測花柱分泌物中的蛋白質雖與花粉萌發的促進現象無關，但卻與花粉管的長度生長有密切相關。

四、 甲醇、乙醇萃取與萌發活性結果

甲醇與乙醇可以萃取出極性較低的物質，且絕大多數的可溶性蛋白質會在其中變性，某些較長鏈的脂類也會在其中析出，從圖六可發現花柱分泌物由甲醇萃取後，對其萌發活性並無太大影響，但乙醇萃取後萌發活性明顯較低，由此可見，使用甲醇萃取花柱分泌物所造成萌發的影響，較使用乙醇萃取的影響低，因此在制定高效能液相層析儀的分離條件時，使用低濃度的磷酸加上甲醇當成移動相，而非乙醇。在圖六中也發現，無論使用甲醇或是乙醇萃取的花柱分泌物皆對花粉管的長度造成了相當的影響，此結果與使用 proteinase K 或滅菌加熱處理後造成花粉管長度的減短相互呼應，因為無論是甲醇、乙醇、proteinase K 或滅菌加熱都會對蛋白質造成影響，由此可見花柱分泌物中的蛋白質可能為控制花粉管長度的重要因子。

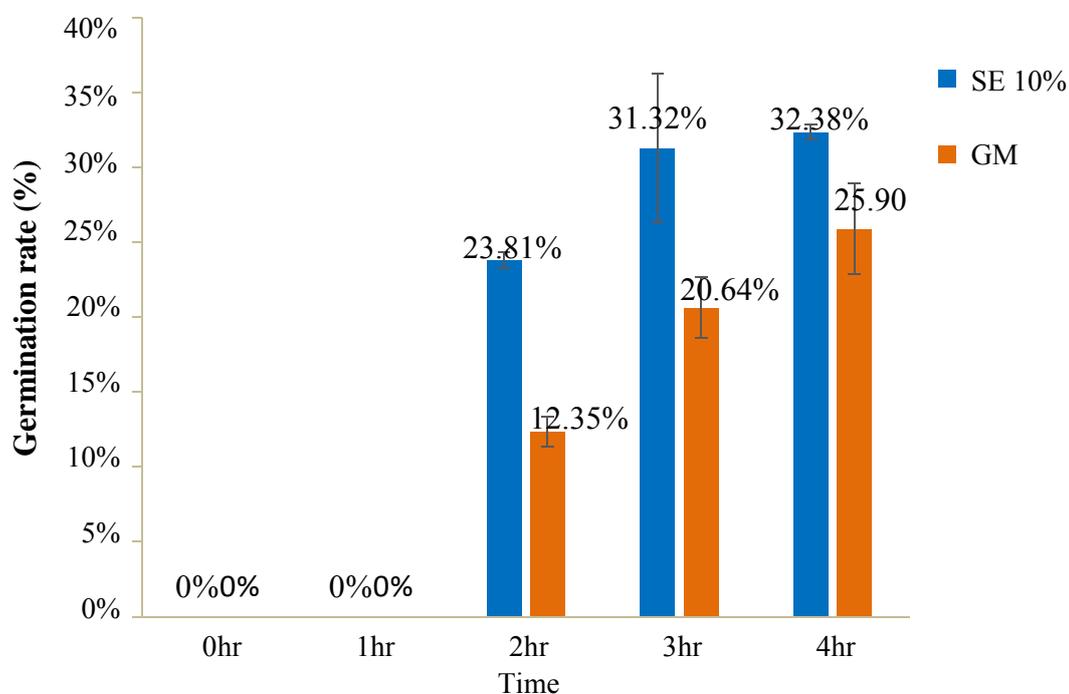
五、柱頭分泌物經高效能液相層析儀分離與活性測試

從圖九高效能液相層析儀的分離結果發現，分離開始 3 分鐘後即開始偵測到訊號，且在 3~20 分鐘內觀測到大部分的訊號，依照管柱與流動相的類型判斷，這些較快速分離的物質應該是某些極性較高的物質，2 分鐘後仍有少量的訊號，為了瞭解那些物質可促進花粉的萌發，故對不同時間點的分離液進行花粉萌發活性測試，發現四個中 20~40 分鐘(C)促進萌發的能力較其他時間點高，但四種分離液促進萌發的能力皆較對照組(一倍萌發液)促進萌發的效果低，推測可能是四種分離液單獨處理花粉時可能會有抑制的效果，當四種分離液以不同的組合混合後才能促進花粉萌發，也有另一種推測，可能在操作氮氣吹乾儀時並未去除分離液中全部的有機溶劑，這些有機溶劑可能會對花粉萌發造成影響。

六、未來展望

從先前的實驗中，我們以推測花柱分泌物中促進花粉萌發的物質並非單一物質，故之後可將高效能液相層析儀分離後的四種分離液，進行不同的組合，觀察對花粉萌發之影響。從圖七中發現使用甲醇萃取花柱分泌物後，其萌發活性與於花柱分泌物類似，且甲醇能夠使花粉萌發中扮演較不重要的蛋白質或是一些不能溶解的粘性物質析出，可大大降低管柱堵塞的機會，故可以嘗試使用甲醇萃取過的花柱分泌物來進行高效能液相層析儀分離。

圖表

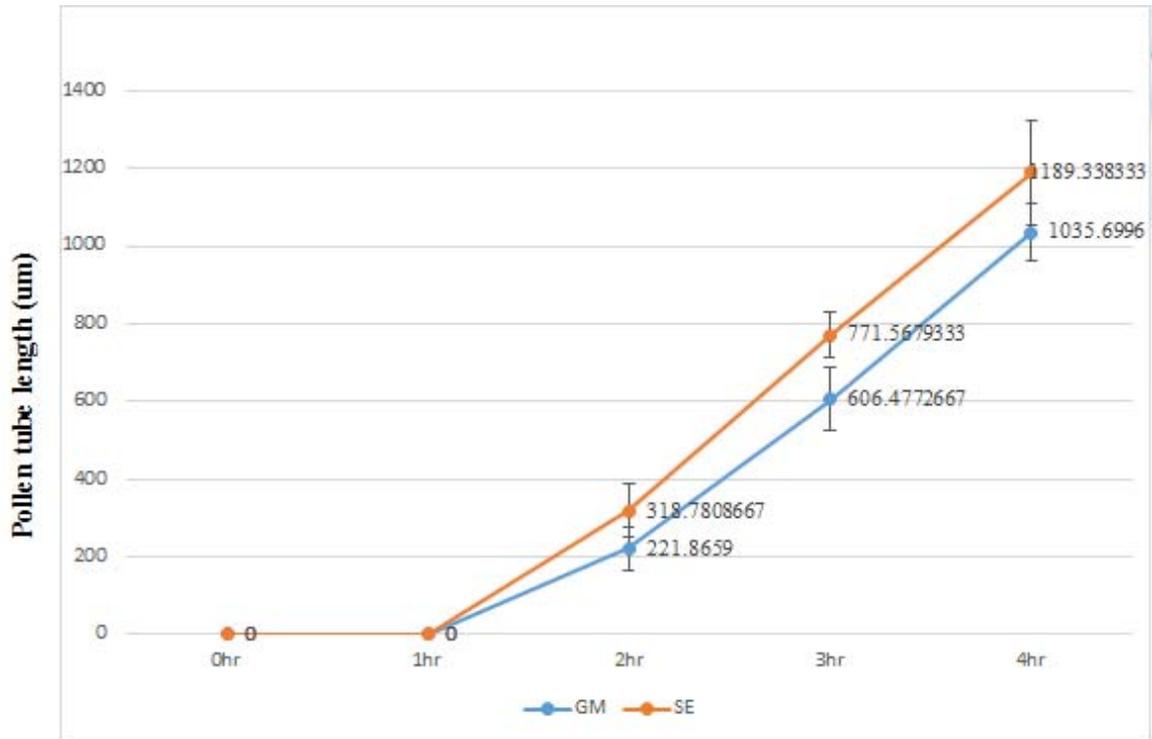


圖一、鐵砲百合花粉萌發率統計圖。

加入花柱分泌物時，對於促進花粉萌發速率較為顯著(大於一倍萌發液)，且其效果

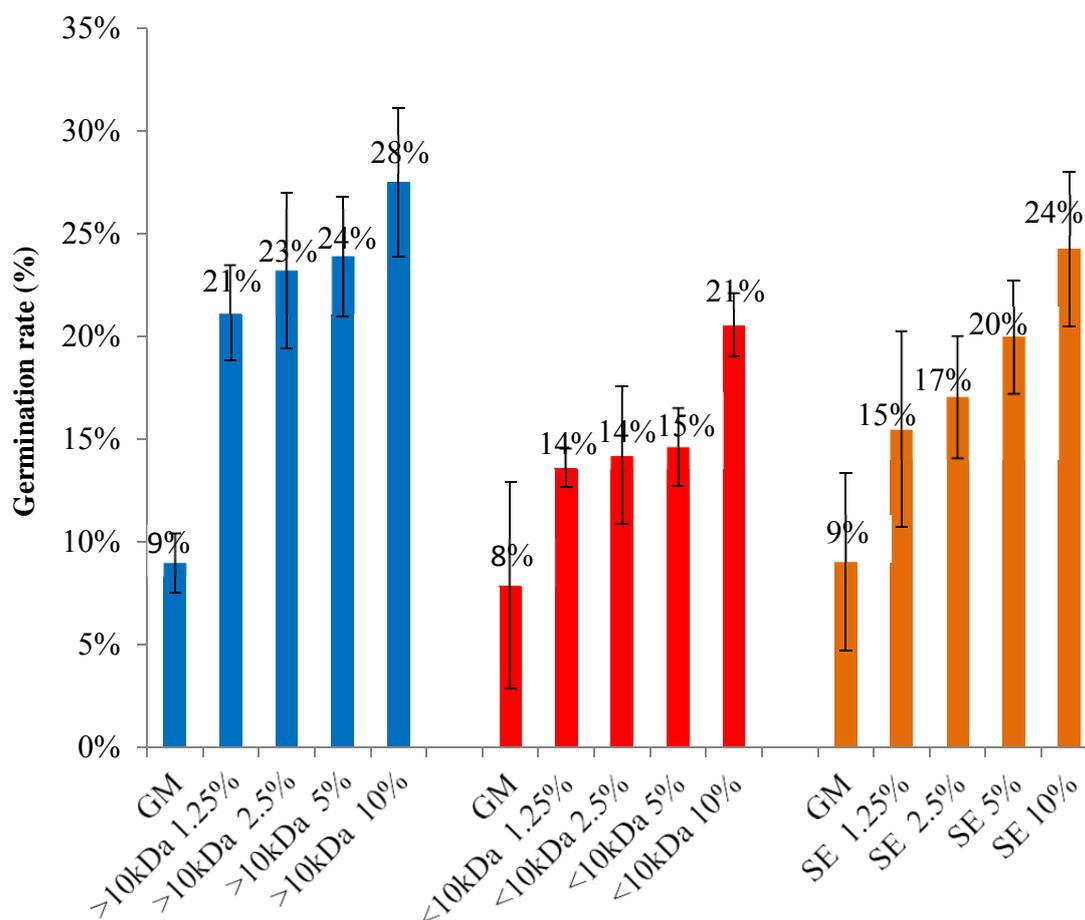
直至4小時仍有差異。SE 10% (stigma exudate (花柱分泌物) 200 ul + 1X germination medium

(萌發培養基) 1800 ul)、GM (1X germination medium)。



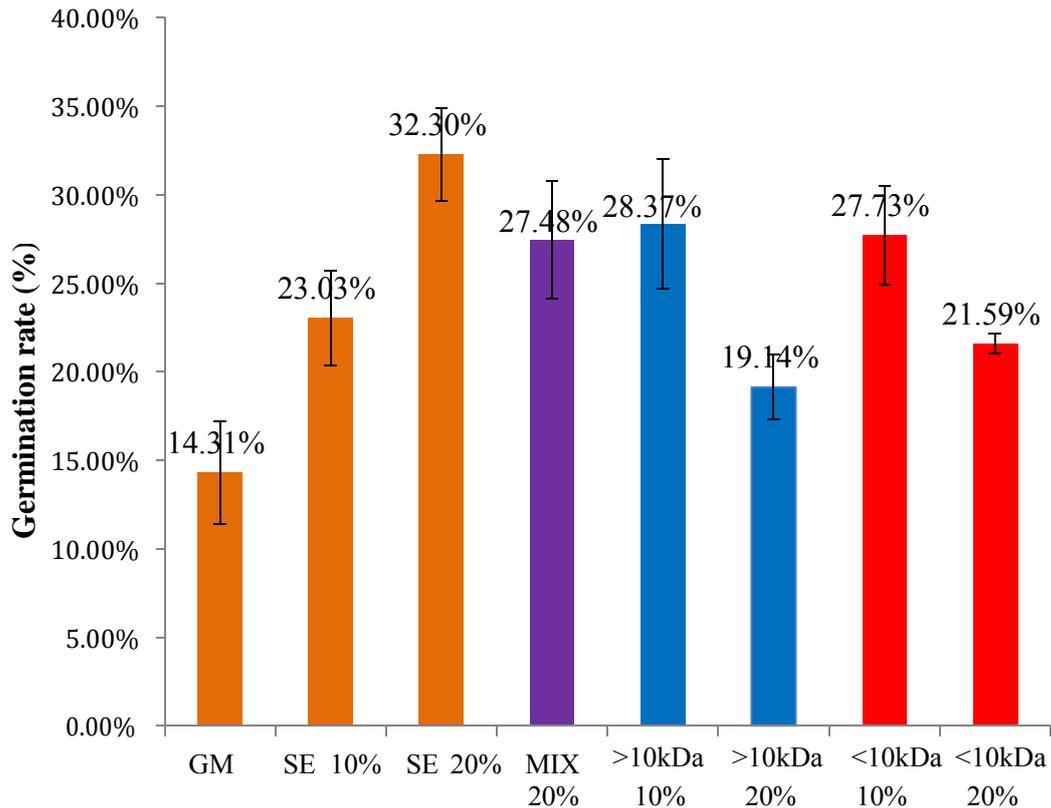
圖二、鐵砲百合萌發花粉管長度統計圖。

該圖的斜率代表花粉管的生長速率，從斜率看來受花柱分泌處處處理萌發的花粉管生長速率在1~2小時雖有些許提升，但2小時過後，兩者生長速率並無太大改變。SE (stigma exudate (柱頭分泌物) 200 ul + 1X germination medium(萌發培養基) 1800 ul)。



圖三、鐵砲百合添加不同濃度之大小分子層萌發率統計圖。

無論大分子層或是小分子層皆有促進萌發的效果，且其萌發率會隨著添加物的濃度而提升。>10kDa 1.25/2.5/5/10% (> 10kDa 水層 25/50/100/200 ul + 1X germination medium(萌發培養基)1975/1950/1900/1800 ul)、<10kDa 1.25/2.5/5/10%(< 10kDa 水層 25/50/100/200 ul + 1X germination medium 1975/1950/1900/1800 ul)、SE 1.25/2.5/5/10%(stigma exudate(花柱分泌物) 25/50/100/200 ul + 1X germination medium 1975/1950/1900/1800 ul)、GM(1X germination medium)。



圖四、高濃度添加物萌發率比較。

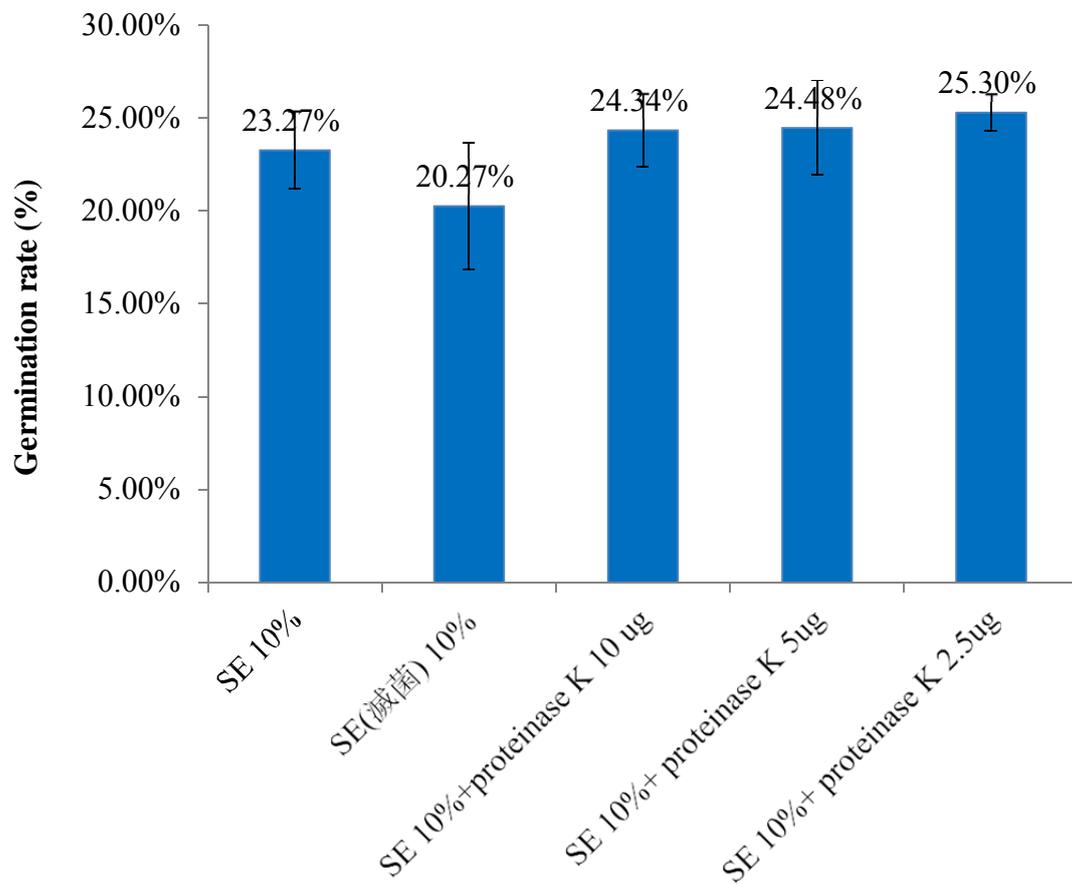
無論 $> 10\text{kDa}$ 或是 $< 10\text{kDa}$ 在添加至 20 % 時皆發現有抑制花粉萌發的現象，但將 $> 10\text{kDa}$ 與 $< 10\text{kDa}$ 水層混合並回溶至 1/2 體積後(MIX)，卻發現其萌發率與 20 % 的花柱分泌物無明顯差異。

GM (1X germination medium(萌發培養基))、SE10/20% (stigma exudate(花柱分泌物) 200/400 ul + 1X germination medium 1800/1600 ul)、MIX ($> 10\text{kDa}$ 400 ul +

$< 10\text{kDa}$ 400 ul，濃縮至 1/2 體積再加入 1X germination medium 1600 ul)、 > 10

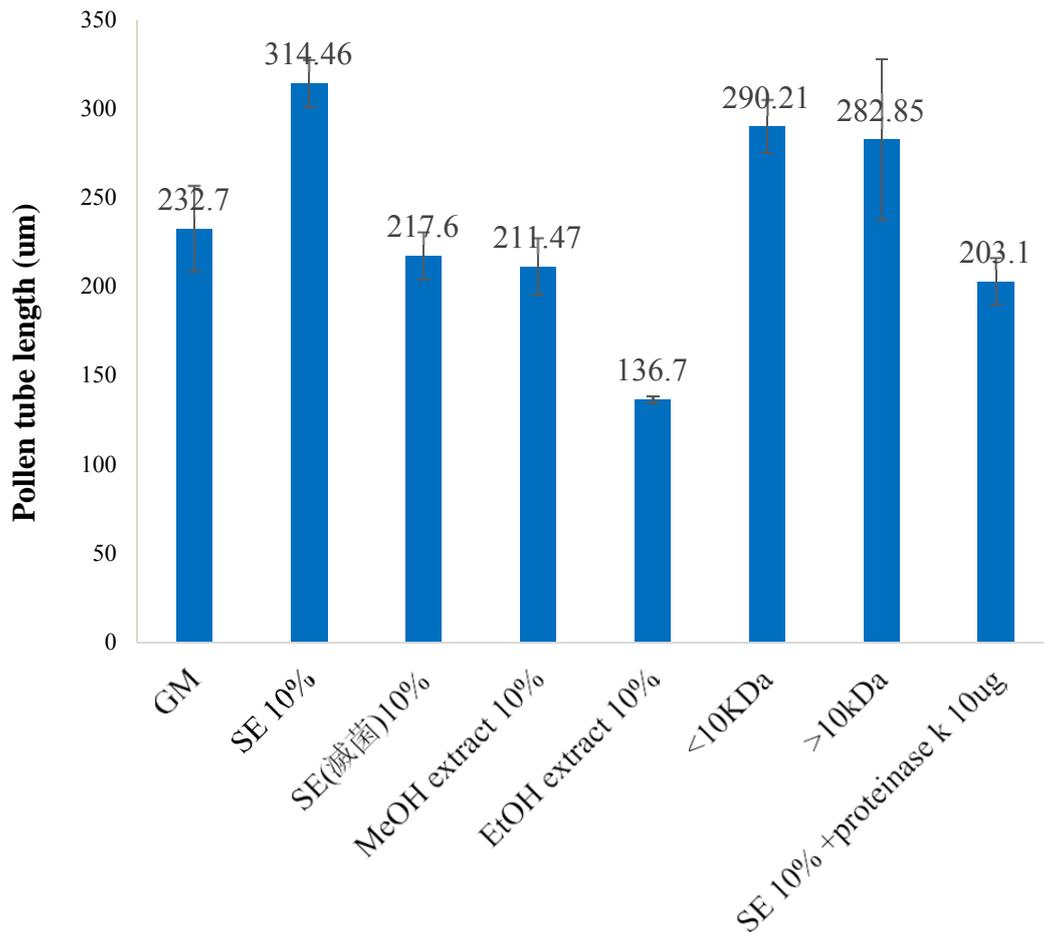
kDa 10/20% ($> 10\text{kDa}$ 水層 200/400 ul + 1X germination medium 1800/1600 ul)、

$< 10\text{kDa}$ 10/20% ($< 10\text{kDa}$ 水層 200/400 ul + 1X germination medium 1800/1600 ul)。



圖五、鐵砲百合經滅菌或proteinase K 處理後萌發統計圖。

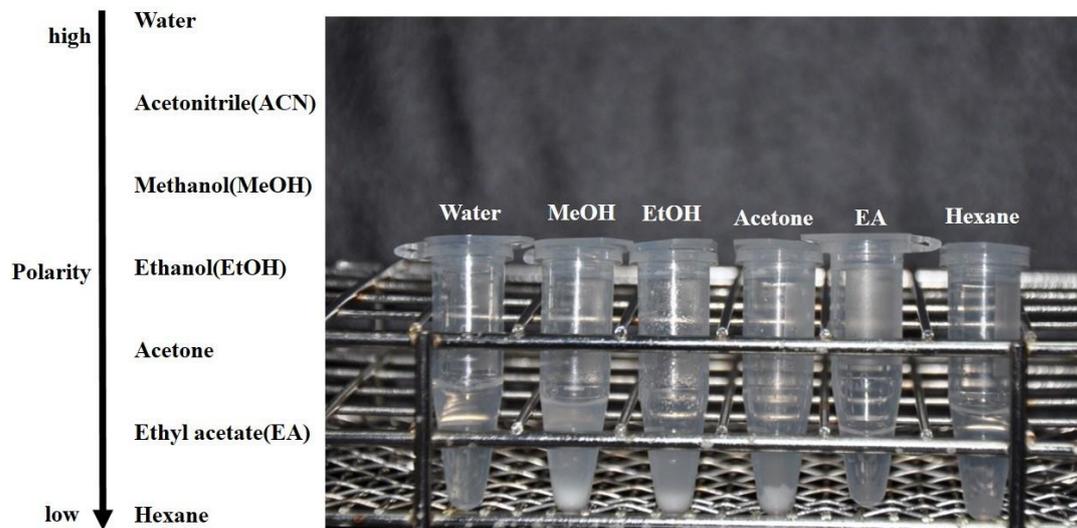
無論對花柱分泌物進行滅菌處理或是加入不同量的proteinase K 後皆對其促進萌發的能力沒有太大的影響。



圖六、花粉於不同萃取/分離液中萌發之花粉管長度圖。

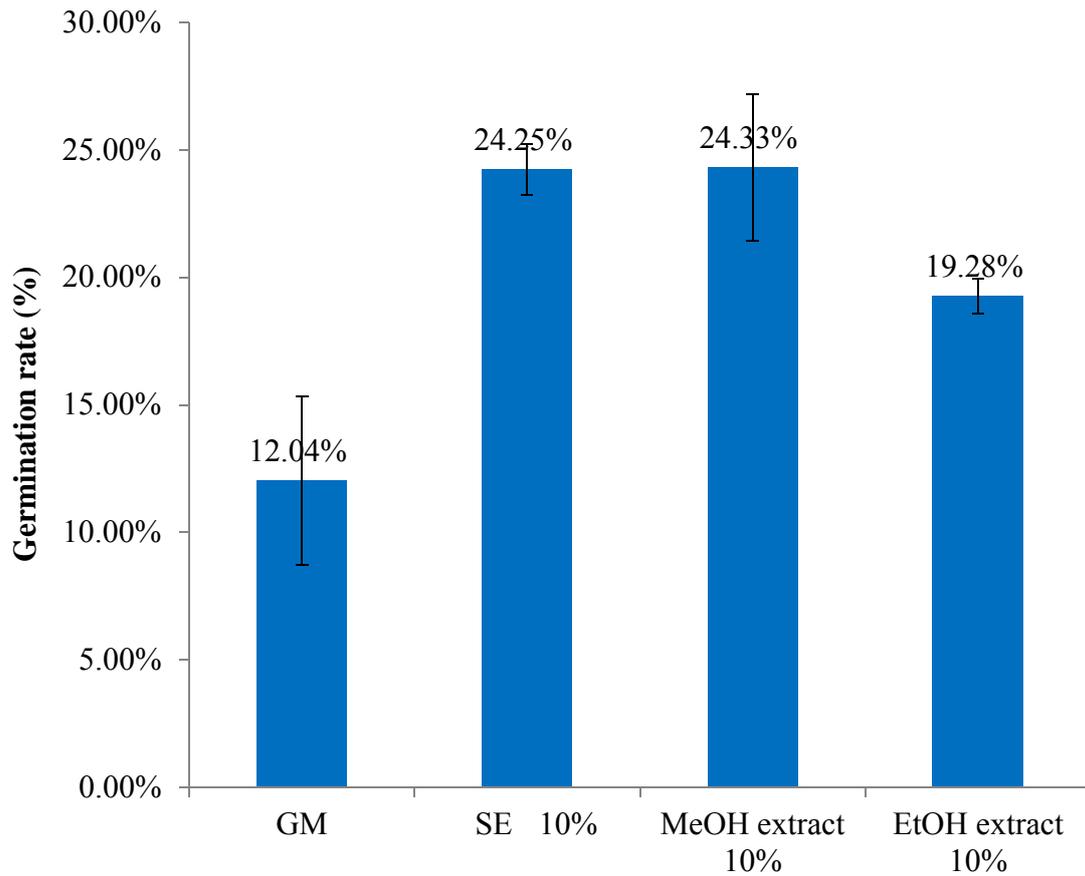
無論是滅菌處理、甲醇萃取、乙醇萃取、加入 proteinase K 後皆對花粉管長度有顯著的影響，較添加花柱分泌物所萌發的花粉管短。

GM (1X germination medium(萌發培養基))、SE 10%(stigma exudate(花柱分泌物) 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、SE (滅菌)10%(stigma exudate (滅菌) 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、MeOH extract 10 %(甲醇萃取液 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、EtOH extract 10 %(乙醇萃取液 200 ul + 1X germination medium)、</> 10kDa (</> 10kDa 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、SE 10% + proteinase K (stigma exudate 200 ul + proteinase K 10 ug + 1X germination medium 1800 ul)。



圖七、花柱分泌物可溶性測試圖。

花柱分泌物略溶於水中，當花柱分泌物溶與甲醇或乙醇時，在離心管底部有白色物質析出，當花柱分泌物溶與丙酮、乙酸乙酯、正己烷時，離心管底部有半透明物質凝聚。

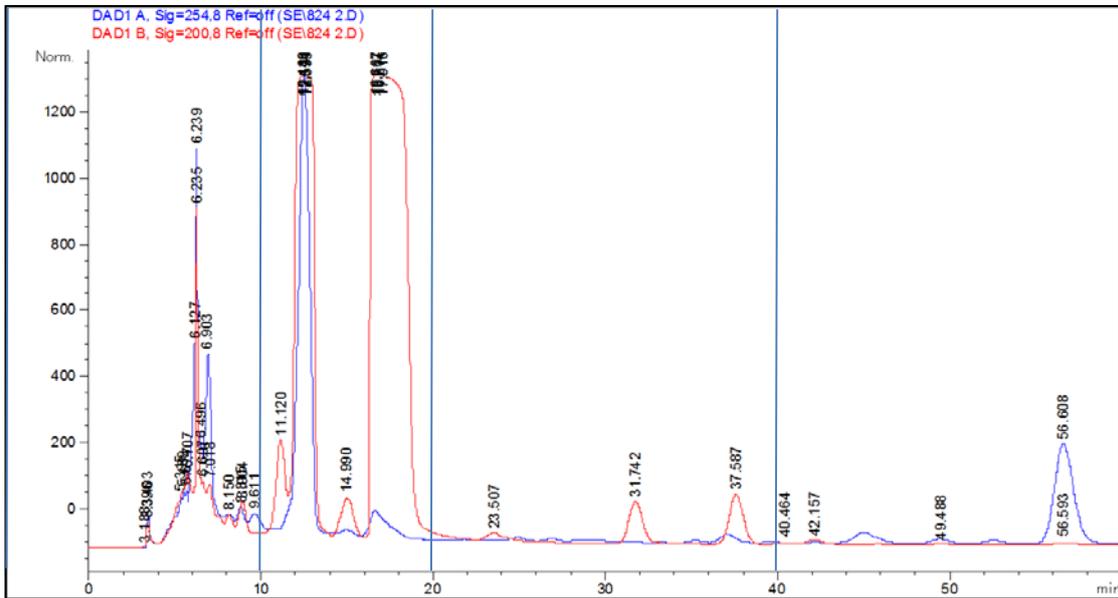


圖八、甲醇、乙醇萃取萌發統計圖。

花柱分泌物經甲醇、乙醇萃取後，其促進萌發的能力並未有太大的改變，但乙醇萃取液的促進花粉萌發能力較甲醇萃取液稍差。

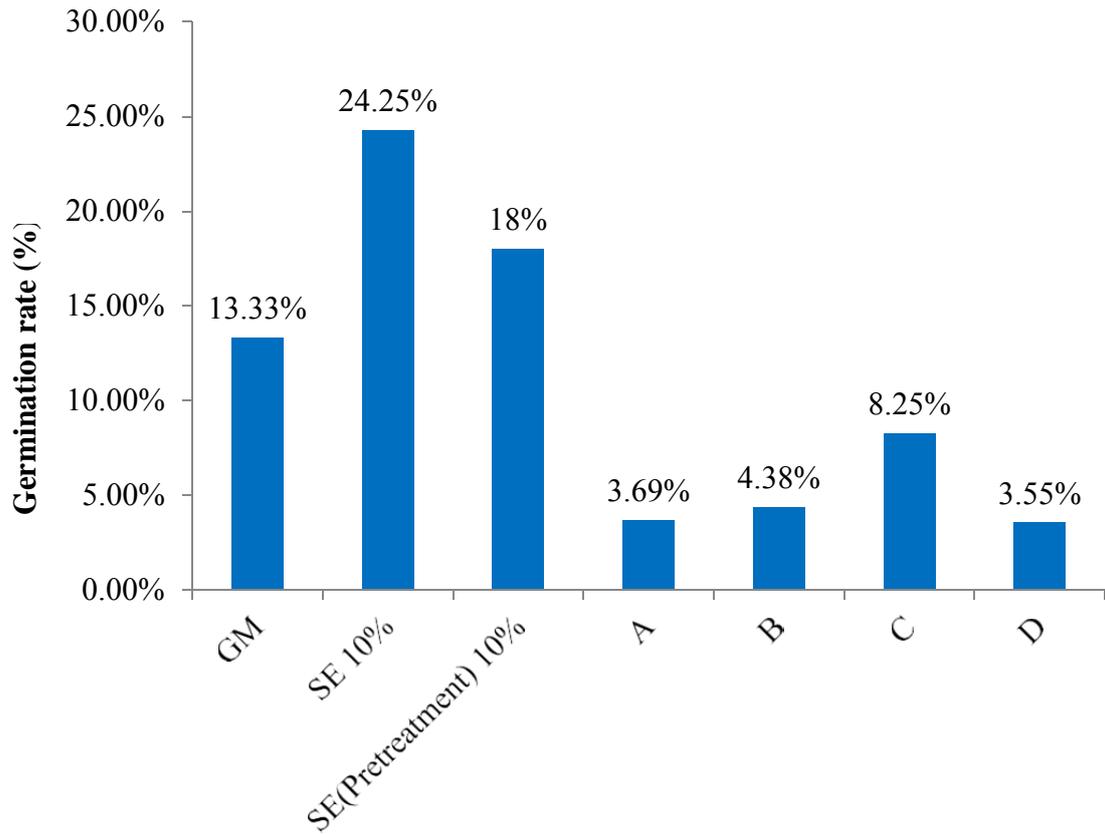
GM (1X germination medium(萌發培養基))、SE 10 %(stigma exudate(花柱分泌物) 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、MeOH extract 10 %(甲醇萃取液 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、EtOH extract 10 %(乙醇萃取液 200 ul + 1X germination medium)。

(A) (B) (C) (D)



圖九、高效能液相層析儀分離圖。

在3~20分鐘內有明顯的吸收峰訊號，推測為花柱分泌物中大量的極性較高物質，而 20~60 分鐘仍有少量的吸收峰訊號。A/B/C/D 為分離時間 0~10/10~20/20~40/40~60 分鐘之收集濾液。



圖十、高效能液相層析儀分離濾液影響花粉萌發率統計圖。

C 濾液於四份濾液 中促進花粉萌發能力最高，推測其中促進花粉萌發物質較其他濾液多，但四種濾液的促萌發能力皆一倍萌發液(GM)低。

GM (1X germination medium(萌發培養基))、SE 10%(stigma exudate(花柱分泌物) 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、SE (Pretreatment) 10%(stigma exudate (Pretreatment) 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)、A/B/C/D (高效能液相層析儀 0~10 / 10~20 / 20~40 / 40~60 min 分離濾液 200 ul + 1X germination medium 1800 ul)。

參考文獻

- Barrett, S. C. (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1537), 99-109.
- Bedinger, P. A., K. J. Hardeman and C. A. Loukides (1994). Travelling in style: the cell biology of pollen. *Trends Cell Biol*, 4(4), 132-138.
- Borg, M., L. Brownfield and D. Twell (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot*, 60(5), 1465-1478.
- Chen, Y., S. Lei, Z. Zhou, F. Zeng, B. Yi, J. Wen, J. Shen, C. Ma, J. Tu and T. Fu (2009). Analysis of gene expression profile in pollen development of recessive genic male sterile Brassica napus L. line S45A. *Plant Cell Rep*, 28(9), 1363-1372.
- Du, H., R. J. Simpson, A. E. Clarke and A. Bacic (1996). Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. *Plant J*, 9(3), 313-323.
- Edlund, A. F., R. Swanson and D. Preuss (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell*, 16 Suppl: S84-97.
- Hepler, P. K., L. Vidali and A. Y. Cheung (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 159-187.
- Hiscock, S. J. and A. M. Allen (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol*, 179(2), 286-317.
- Jasavala, R., H. Martinez, J. Thumar, A. Andaya, A. C. Gingras, J. K. Eng, R. Aebersold, D. K. Han and M. E. Wright (2007). Identification of putative androgen receptor interaction protein modules: cytoskeleton and endosomes modulate androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, 6(2), 252-271.
- Knox, R. B. and J. Heslop-Harrison (1970). Pollen-wall proteins: localization and enzymic activity. *J Cell Sci*, 6(1), 1-27.
- Kost, B., P. Spielhofer and N. H. Chua (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J*, 16(3), 393-401.
- McCormick, S. (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell*, 16 Suppl: S142-153.
- Reddy, A. S. (2001). Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci*, 160(3), 381-404.

Tang, X., Z. Y. Zhang, W. J. Zhang, X. M. Zhao, X. Li, D. Zhang, Q. Q. Liu and W. H. Tang (2010). Global gene profiling of laser-captured pollen mother cells indicates molecular pathways and gene subfamilies involved in rice meiosis. *Plant Physiol.* 154(4), 1855-1870.

Twell, D. (2011). Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex Plant Reprod*, 24(2), 149-160.

Zonia, L. (2010). Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *J Exp Bot*, 61(7), 1939-1957.

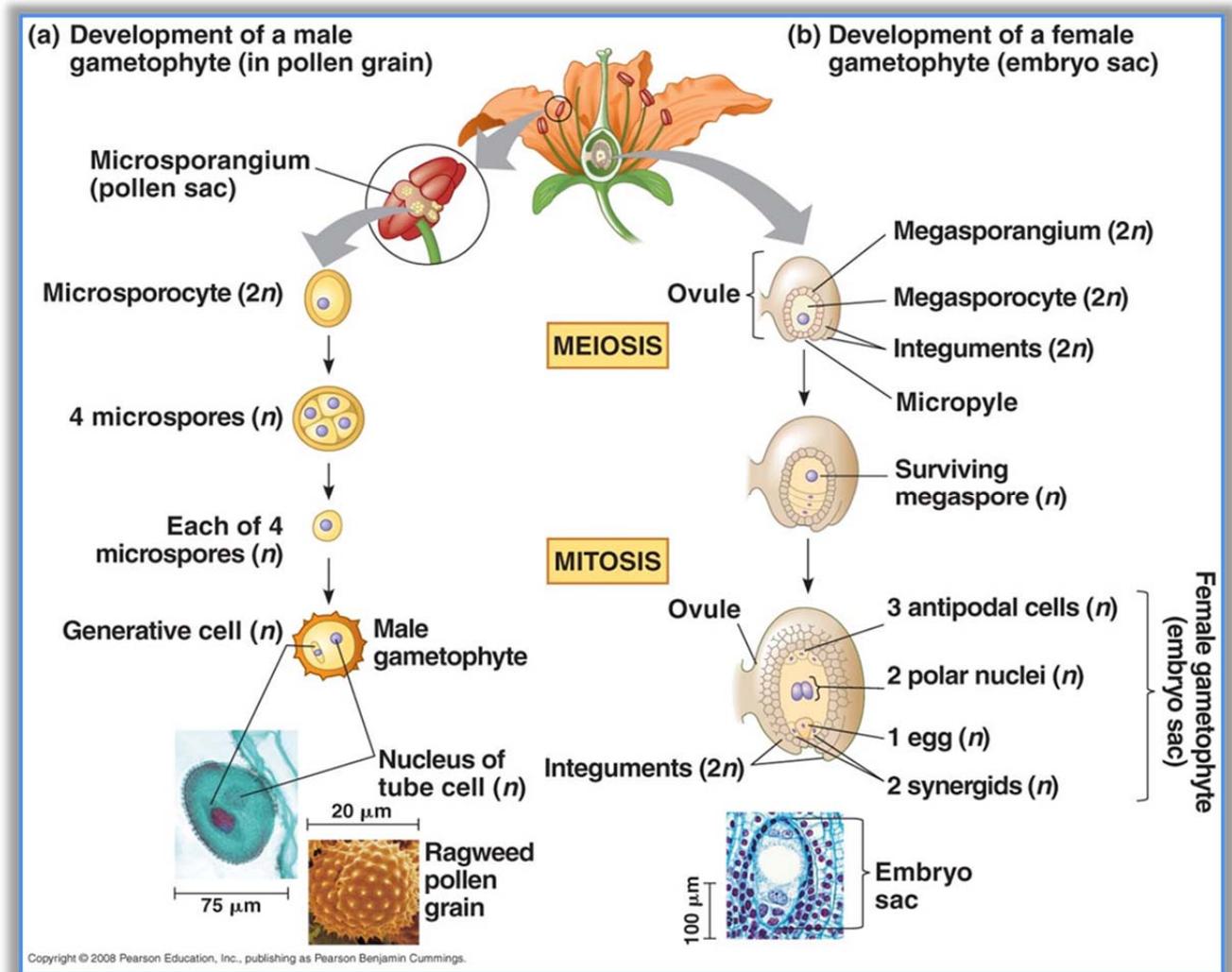
古家齊 (2011)。鐵砲百合柱頭/花柱分泌物可促進花粉特殊分子之鑑定與功能分析(未出版之碩士論文)。國立屏東教育大學，屏東市。

附錄一

SE (stigma exudate)	柱頭分泌物
GM (germination medium)	萌發液培養基
HPLC (High-performance liquid chromatography)	高效能液相層析儀
Methanol (MeOH)	甲醇
Ethanol (EtOH)	乙醇
Acetonitrile	乙腈
Acetone	丙酮
Ethyl Acetate (EA)	乙酸乙酯
<i>n</i> -Hexane	正己烷

附圖一

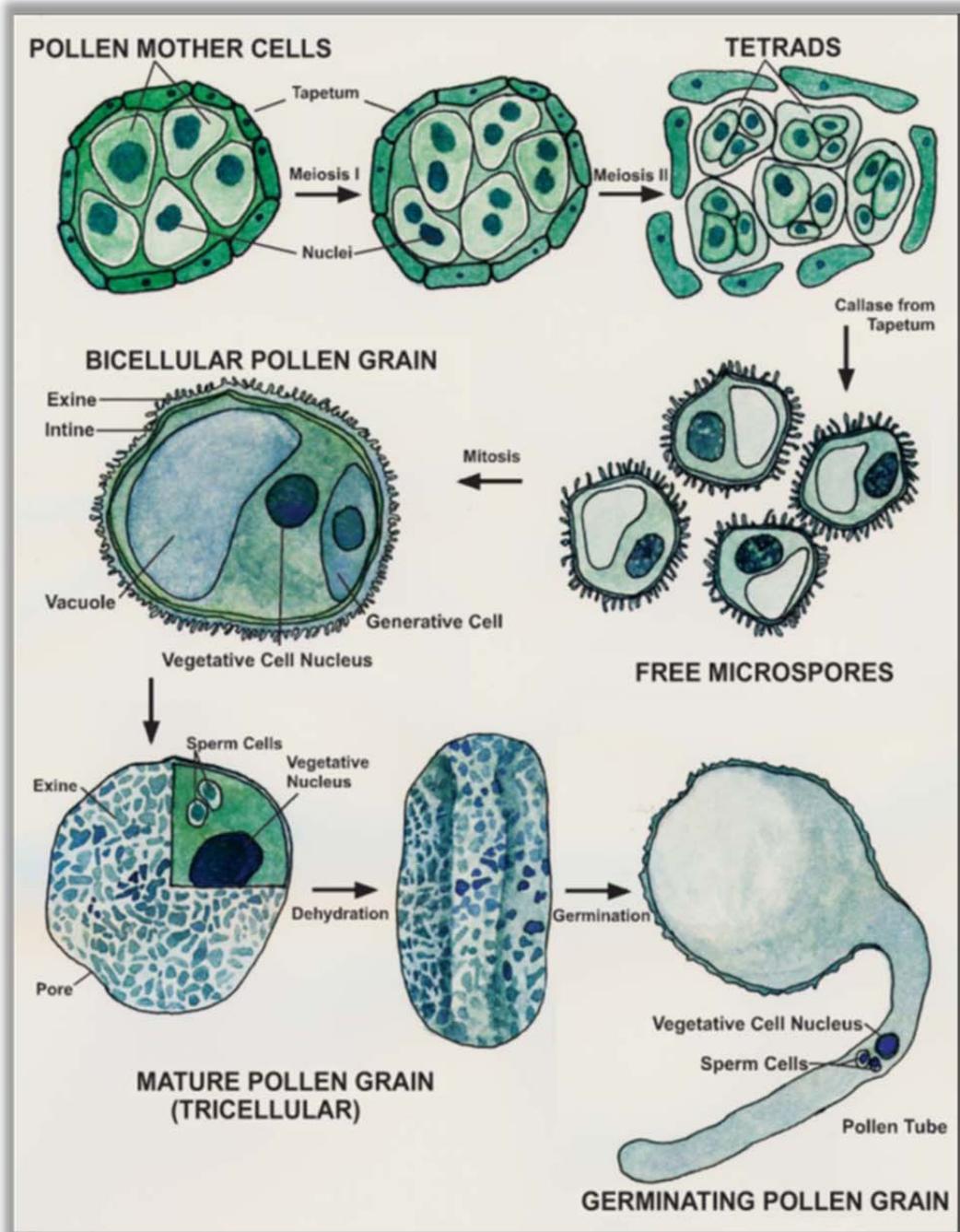
雌/雄配子體發育過程



Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings. 2008

附圖二

花粉發育過程



(McCormick, 2004)