

題目：花粉管不為人知的秘密

關鍵字：花粉管、鈣離子、植物荷爾蒙

作者：藍梓羽、林香吟、卓建文、李宜珊

指導老師：張梅玲

目錄

標題	頁次
壹、 前言	2
貳、 研究動機	3
參、 研究目的	3
肆、 研究設備與材料	3
伍、 研究過程、方式	4
陸、 研究結果	5
柒、 討論	6
捌、 結論	15
玖、 參考資料及其他	17
壹拾、 附錄	18

壹、前言

被子植物的有性生殖過程中，雌蕊子房內的胚珠在發育時，其組織中只有 1 個大孢子母細胞 ($2n$)，它經由減數分裂後，產生 4 個大孢子 (n)。但是，此 4 個大孢子通常只有 1 個可順利發育成功，並繼續長成，其餘的則成爲受精卵發育成胚胎的重要場所。雌配子體的構造中含有將參與受精作用的一個雌配子 (卵) 及一個具雙核的細胞，此雙核特稱爲極核。而在雄蕊花藥中具有許多小孢子母細胞 ($2n$)，經減數分裂後，每個小孢子母細胞產生 4 個小孢子 (n)。接著，每一個小孢子進行有絲分裂，並產生特殊的花粉壁，形成花粉粒。此時，花藥內含有大量的花粉粒。在授粉作用後，花粉粒在雌蕊的柱頭上萌發出一個管狀構造，稱爲花粉管，管內有兩個精細胞。花粉管在雌蕊中生長，由柱頭經過花柱朝子房中胚珠的方向延長。當花粉管接觸到胚珠內的雌配子體時，管內的兩個精細胞便進入其中，1 個精細胞與卵結合，形成受精卵 ($2n$)，又稱合子；另 1 個精細胞與 2 個極核結合，形成胚乳核。此過程中發生兩次的受精作用，稱爲雙重受精。(見附錄一)。雙重受精後，胚珠中的合子會發育成胚胎，而胚乳核發育成富含養分的胚乳，以供胚胎生長之需，此外胚胎也透過珠被從雌蕊獲得養分，而珠被則發育爲種皮。此時，胚胎、胚乳以及種皮三者共同構成種子。而種子可保護內在的胚並在適當的環境中萌發，形成新的植物體。

在一連串的找尋相關資料的過程中，在一份文獻上得知『花粉管生長是一個十分快速且具有特殊的極性生長方式，其基因之表現及調控十分嚴謹，目前雖然有許多的基因/蛋白質在不同花粉發育期中被發現，但仍有許多進一步研究的空間，例如：花粉管與花柱間之相互作用及以花粉如何利用其內物質以供花粉管快速生長等。』【註一】在我們的參考其它文獻時，得知柱頭上的物質極有可能是醣類所組成的；所以我們推論澱粉粒和脂肪可能是參與花粉管萌發的養份來源之一。

在『鈣離子會促使花粉管萌發長度變長』【註二】的份文獻中得知他人的結論時，我們心想既然鈣離子可促使花粉管萌發長度變長，那是否也可以讓花粉粒的萌發率提高的效果？所以我們以鈣離子爲實驗並以與 EDTA 作輔證，想了解鈣離子對花粉萌發的影響。

『胚珠數量多寡可能會造成花粉管彎曲程度較高』【註三】據我們推論之下，胚珠數量的多寡所造成的誘導效果，可能是因爲胚珠之間互相競爭受精或胚珠對花粉管所造成的小小引力所造成的。且另外一份文獻中也提到『誘導花粉管萌發最主要因素爲胚珠』【註三】所以爲了驗證胚珠是否真的對花粉粒有誘導的效果，所以我們利用了胚珠進行一連串的實驗。

貳、研究動機

在生物課時，聽到老師介紹花朵內的構造，以及花粉是怎麼到達子房且正確無誤的進入胚珠內進行繁殖時，腦中冒出了些許的疑問，就是那些花粉是如何只靠著管核的引導就這麼的穿越過長長的花粉管內部來到了寬大的子房內部找到適合自己的胚珠呢？難到它們之間不會像動物一樣會爲了雌性動物而打架嗎？在這之中是否有什麼樣的特殊物質在誘導它們呢？會是植物內特殊的荷爾蒙？還是植物內特殊的化學物質？或者是出忽我們意料之外的物質呢？爲了解決心中的疑惑，並進一步探討花粉管內尙未人知的祕密，哪些物質可能對花粉具有誘導的作用，於是我們展開了以下的探討實驗。

參、研究目的

- 一、探討花粉是靠什麼物質的引導來到了寬大的子房內部找到適合自己的胚珠呢？
- 二、以各種方式研究，對所觀察的植物是具有誘導萌發或是抑制萌發的效果
 - (一) 鈣離子
 - (二) EDTA (Ethylenediaminetetraacetates)
 - (三) naphthalene (NAA)
 - (四) cytokinin (CK)

肆、研究設備與材料

- 一、實驗室的基本材器：
 - 燒杯
 - 量筒
 - 量杯
 - 滴管
 - 蓋玻片
 - 載玻片
 - 培養皿
 - 懸滴玻片
 - 解剖刀
- 二、實驗室的儀器：
 - 微量天平（精確值 0000.1g）
 - 磁性加熱攪拌器
 - 立體解剖顯微鏡
 - 數位顯微照相機
 - 恆溫培養箱
 - 高壓滅菌箱
- 三、實驗室的藥品
 - CaCl₂
 - EDTA (Ethylenediaminetetraacetates)

naphthalene (NAA)

cytokinin (CK)

C₁₂H₂₂O₁₁

Agar

四、藥品配製

(一) 100ppmNAA：取 0.01 克 NAA 先溶於少量 95%酒精，再以去離子水定量至 100 毫升。

(二) 100ppmCK：取 0.005 克 CK 以微量 1N 鹽酸溶解改以去離子水定量至 50 毫升。

(三) 1.5%洋菜膠：取 1.5 克洋菜粉溶於 100 毫升水，加熱至沸騰，混合均勻後將此溶液倒至乾淨的培養皿中約 0.1~0.3mm 厚度，待涼凝固。

五、花材：

非洲鳳仙花

數種百合花

伍、研究過程、方法

一、鈣離子對花粉管萌發的影響

(一) 配製 1000ppm 氯化鈣溶液，20%蔗糖溶液，1 % EDTA 溶液。()

(二) 準備四組懸滴玻片。分別標示對照組(清水)、100ppm 鈣離子、300ppm 鈣離子、EDTA，並依序滴入清水、100ppm 鈣離子溶液、300ppm 鈣離子溶液及含 1 % EDTA 溶液。

(三) 另取四組懸滴玻片。分別標示對照組(蔗糖 10%)、100ppm 鈣離子+10% 蔗糖溶液、300ppm 鈣離子+10% 蔗糖溶液、1 % EDTA+10% 蔗糖溶液，利用步驟 1 所配置的溶液稀釋至上述溶液，並依序滴入。

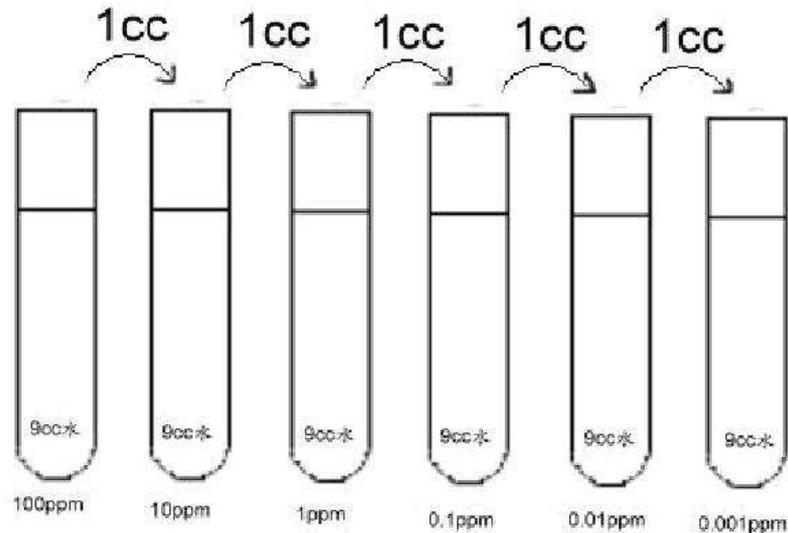
(四) 取數朵鳳仙花花粉集合在一起，平均分配至上述各組玻片中，蓋上蓋玻片，並放入培養皿中防止水分蒸散，置於 30°C 恆溫箱中。

(五)將製作好的玻片置於顯微鏡下觀察，每隔 15 分鐘觀察紀錄萌發率。

二、植物荷爾蒙對花粉萌發率的影響

(一) 取 100ppmNAA 溶液，稀釋後的濃度利用系列稀釋配製 10ppm、1ppm、0.1ppm、0.01ppm、0.001ppm 共五種。

(二) 系列稀釋：從 100ppm 的 NAA 溶液中取出 1 毫升，加入 9 毫升的水，混合均勻，製作成 10ppm 濃度的溶液。再從 10ppm 濃度的 NAA 溶液中取出 1 毫升，加入 9 毫升的水，混合均勻，製作成 1ppm 濃度的溶液。依序製作成 0.1ppm 及 0.01ppmNAA 溶液。



- (三) 依步驟 2.同樣方法配製 100ppm、10ppm、1ppm、0.1ppm、0.01ppm、0.001ppm 各種濃度的 CK 溶液。
- (四) 取數株的百合花花粉加以混合後，平均分配至 10 片懸滴玻片中，依次各加入一滴 100ppm、10ppm、1ppm、0.1ppm、0.01ppm 的 NAA 溶液及 100ppm、10ppm、1ppm、0.1ppm、0.01ppm 的 CK 溶液中再以清水作為對照組。
- (五) 將步驟五的懸滴玻片標本放入 30°C 恆溫箱中，每隔 30 分鐘觀察其萌發情形，並拍照紀錄、計算各組萌發率。

三、植物荷爾蒙對花粉管延伸方向的誘導實驗

- (一) 將 1.5% 洋菜切割成蓋玻片大小放置在載玻片上。
- (二) 利用蓋玻片沾取百合花粉，使花粉在洋菜膠中間排列成一排，在花粉線兩側約 1ppm 處分別塗上水和 10 mm 濃度 NAA。
- (三) 依步驟 2，依序製作 1ppm、0.1ppm 濃度的 NAA 標本，及 10ppm、1ppm、0.1ppm 濃度的 CK 標本。
- (四) 將玻片標本放入 30°C 恆溫箱中，每隔 30 分鐘觀察萌發情形，並拍照紀錄，計算 NAA 及 CK 的誘導效果。

四、胚珠對花粉的誘導實驗

- (一) 將 1.5% 洋菜切割成蓋玻片大小放置在載玻片上。
- (二) 解剖一株百合花子房取下胚珠，將其放置在洋菜膠中間排列成一排，並在胚珠的兩旁約 2mm 處放置花粉，一側放同朵百合的花粉，另一側放置不同品種百合的花粉。
- (三) 將玻片標本放入 30°C 恆溫箱中，每隔 30 分鐘觀察萌發情形，並拍照紀錄，計算胚珠對花粉管萌發方向的誘導。

五、雌蕊柱頭分泌物對花粉萌發的影響

- (一) 利用蓋玻片自黃百合花的柱頭擷取柱頭黏液，滴上少許水。
- (二) 將柱頭黏液分別滴入同株的花粉，製作成玻片標本。另製作一組以蒸餾水與花粉的玻片標本為對照組。
- (三) 將柱頭黏液分別滴入粉紅葵百合的花粉，製作成玻片標本。
- (四) 另取粉紅葵百合的柱頭擷取柱頭黏液，滴入同株的花粉，製作成玻片標本，另一組滴入黃百合的花粉。
- (五) 將標本放置於 30°C 恆溫箱，每隔 30 分鐘觀察萌發情形，並拍照紀錄，計算柱頭黏液的萌發率。

陸、研究結果

一、鈣離子對花粉管萌發的影響

(一)、鈣離子濃度對花粉管萌發的影響

表 1. Ca^{+2} 濃度對花粉管的萌發率

處理 \ 時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
對照組(清水)溶液	0.235	0.336	0.189	0.223
100ppm Ca^{+2} 溶液	0.087	0.13	0.267	0.061
Ca300ppm 溶液	0.117	0.123	0.143	0.143

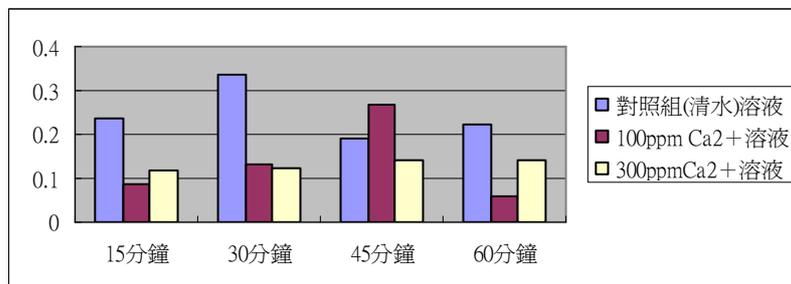


圖 1. Ca^{+2} 濃度對花粉管的萌發率比較

表 2. Ca²⁺ 濃度與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發影響

處理 \ 時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
10%蔗糖	0.417	0.31	0.459	0.25
Ca100ppm+10%蔗糖	0.178	0.163	0.216	0.136
Ca300ppm+10%蔗糖	0.153	0.246	0.149	0.09

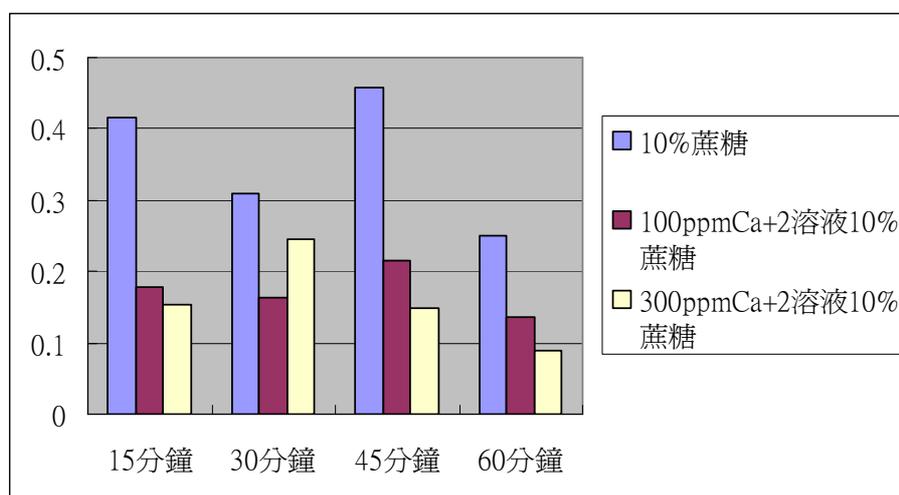


圖 2. Ca²⁺ 濃度與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發影響

(二)、EDTA 對花粉管萌發的影響

表 3、低濃度 EDTA 對花粉管萌發的影響

處理 \ 時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
對照組(清水)	0.235	0.336	0.189	0.223
EDTA (0.3%)	0	0.007	0.073	0.061

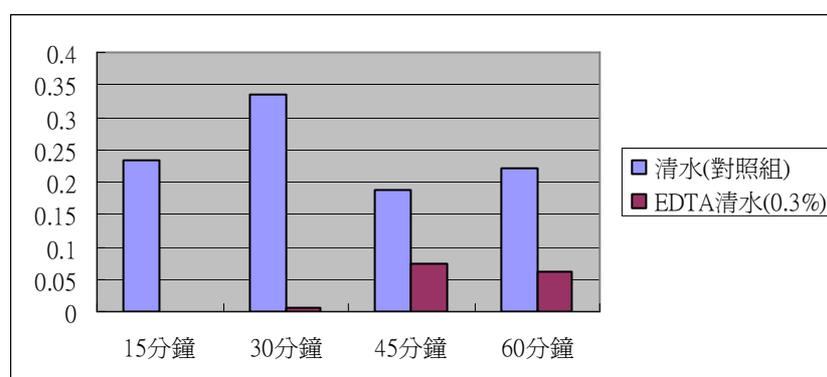


圖 3、低濃度 EDTA 對花粉管萌發的影響

表 4、低濃度 EDTA 與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發的影響

處理	時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
	對照組 (10%蔗糖)		0.417	0.31	0.459
EDTA(0.3%蔗糖)		0.04	0.07	0.107	0.069

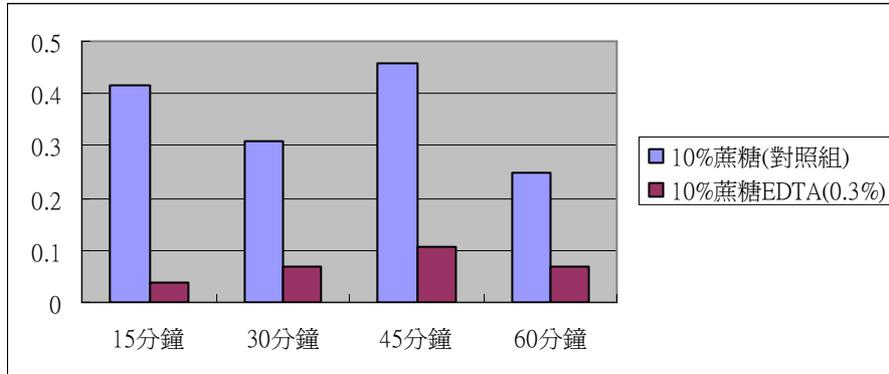


圖 4、低濃度 EDTA 與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發的影響

表 5. 高濃度 EDTA 對花粉管萌發的影響

處理	時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
	對照組(清水)		0.235	0.336	0.189
EDTA (0.6%)		0.030	0.012	0.008	0.012

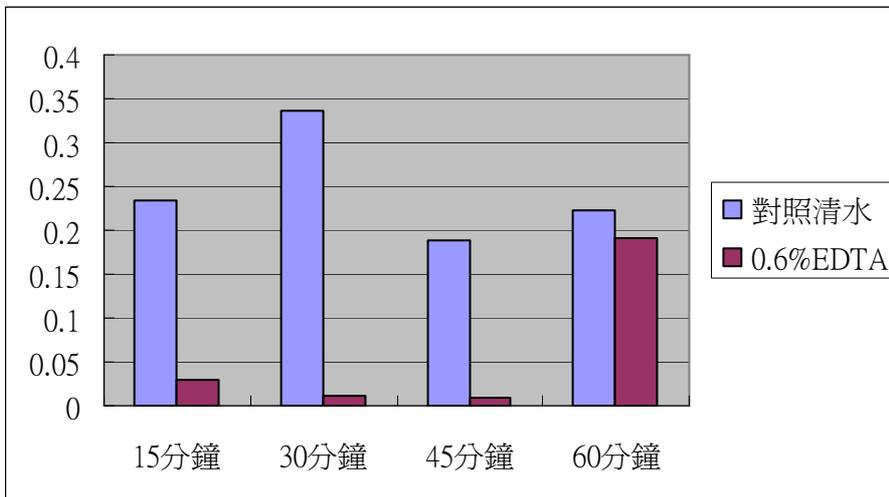


圖 5、高濃度 EDTA 對花粉管萌發的影響

表 6. 高濃度 EDTA 與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發的影響

處理 \ 時間	15 分鐘	30 分鐘	45 分鐘	60 分鐘
10%蔗糖(對照組)	0.417	0.31	0.459	0.25
EDTA(0.6%)+10%蔗糖	0.062	0	0.01	0.05

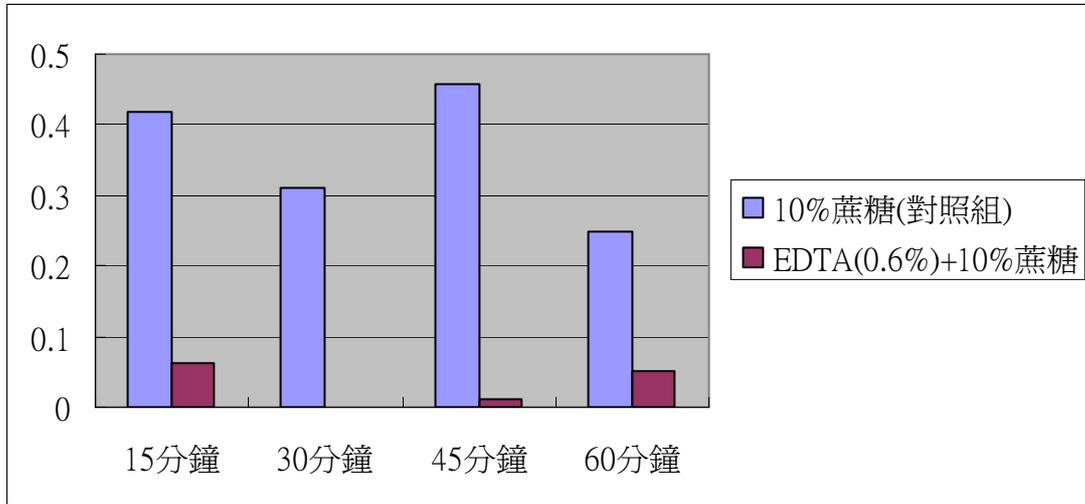


圖 6. 高濃度 EDTA 與 10%蔗糖溶液對花粉管萌發的影響

- 1、100ppm 與 300ppm 鈣離子濃度對花粉管的萌發沒有明顯的促進效果。
- 2、EDTA 的處理對花粉管的萌發有明顯的抑制效果，且 EDTA 濃度愈高抑制效果愈明顯。
- 3、由高二生物課本實驗中得知，鳳仙花粉萌發的最佳濃度是 10%蔗糖溶液，由圖表 2.與圖表 1.比較得知，蔗糖溶液確實會將萌發率提升約一成左右。

二、植物荷爾蒙對花粉萌發率的影響

(一). CK 對花粉萌發率的影響

表 7. CK 濃度對花粉萌發率的影響

萌發率 \ CK 濃度	100ppm	10ppm	1ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.001ppm
清水	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629
CK	0.0444	0.1477	0.2208	0.1318	0.0574	0.0416

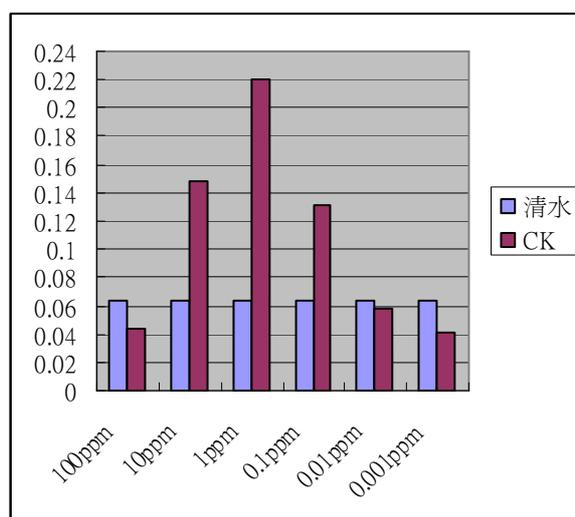


圖 7. CK 對花粉萌發率

(二). NAA 對花粉萌發率的影響

表 8. NAA 對花粉萌發率

萌發率 \ NAA 濃度	100ppm	10ppm	1ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.001ppm
清水萌發率	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629	0.0629
NAA 萌發率	0.0801	0.1112	0.1882	0.0993	0.0850	0.0044

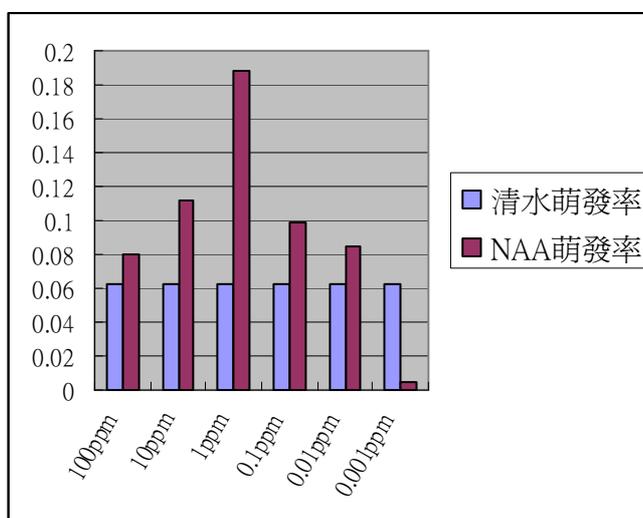


圖 8. NAA 對花粉萌發率

1. CK 在 1ppm 時促進花粉萌發的效果最為顯著，約可比對照組萌發率提升 3.51 倍。
2. 在高濃度 100ppmCK 作用下對花粉管的萌發有抑制效果。
3. CK 濃度低於 0.1ppm 以下則對花粉管沒有促進效果。
4. NAA 在 1ppm 時促進花粉萌發的效果最為顯著，約可比對照組萌發率提升 3 倍。
5. 在低濃度 0.001ppm NAA 作用下對花粉管的萌發有抑制效果。

植物荷爾蒙對花粉管延伸方向的誘導實驗

表 9. CK 花粉管延伸方向的誘導實驗

CK 濃度(ppm)	10 ppm	1ppm	0.1ppm
往 CK 方向生長個數 /總萌發花粉數	6/18	2/2	19/35
往 CK 方向延伸百分率	33.33%	100.00%	27.78%

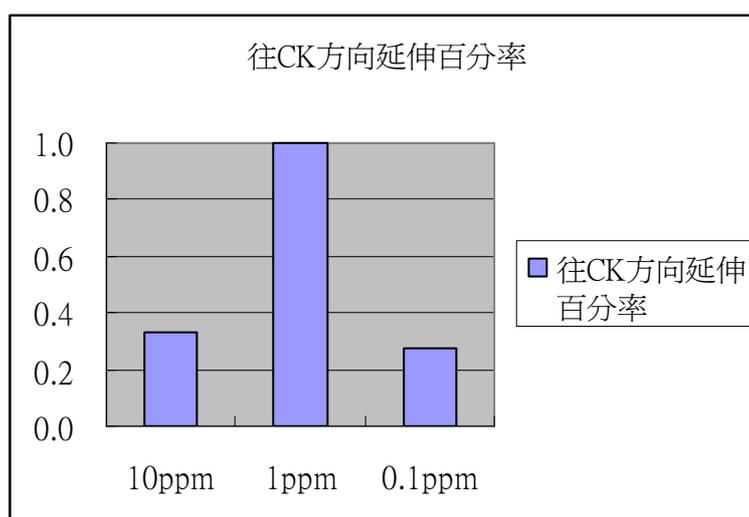


圖 9. CK 花粉管延伸方向的誘導實驗

表 10. NAA 花粉管延伸方向的誘導實驗

NAA 濃度(ppm)	10 ppm	1ppm
往 NAA 方向生長個數 /總萌發花粉數	5/6	13/26
往 NAA 方向延伸百分率	83.33%	50.00%

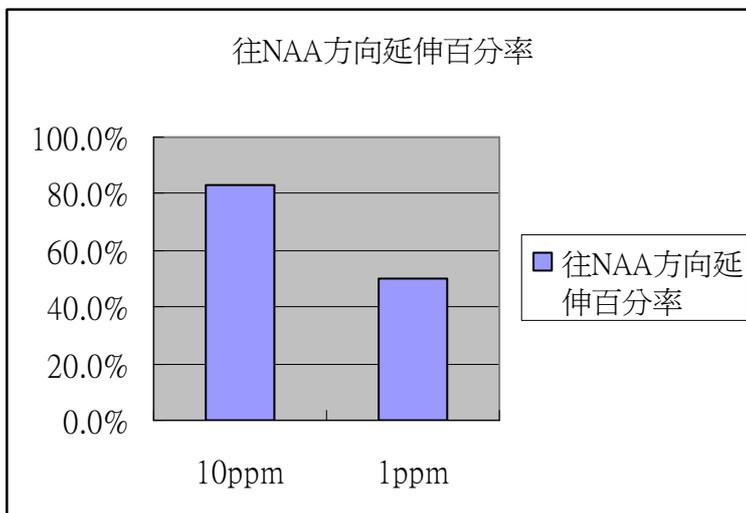


圖 10. NAA 花粉管延伸方向的誘導實驗

1. 1ppm 濃度的 CK 對花粉管具有誘導效果。
2. 10ppm 與 1ppm 濃度的 NAA 對花粉管萌發的誘導率大於 50%，因此具有對花粉管誘導效果。

三、胚珠對花粉的誘導實驗

表 11. 橘色胚珠對花粉的誘導實驗

花粉種類	花粉往胚珠(橘胚珠)的個數	花粉往胚珠(橘胚珠)的比率
橘黃百合	12/183	0.0656
粉紅百合	15/183	0.0820

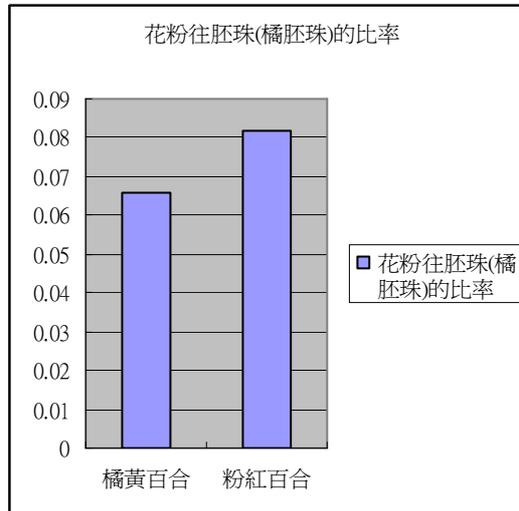


圖 11. 橘色胚珠對花粉的誘導實驗

表 12. 黃色胚珠對花粉的誘導實驗

花粉種類	花粉往胚珠(紅胚珠)的個數	花粉往胚珠(紅胚珠)的比率
橘黃百合	32/365	0.087671233
粉紅百合	8/231	0.034632035

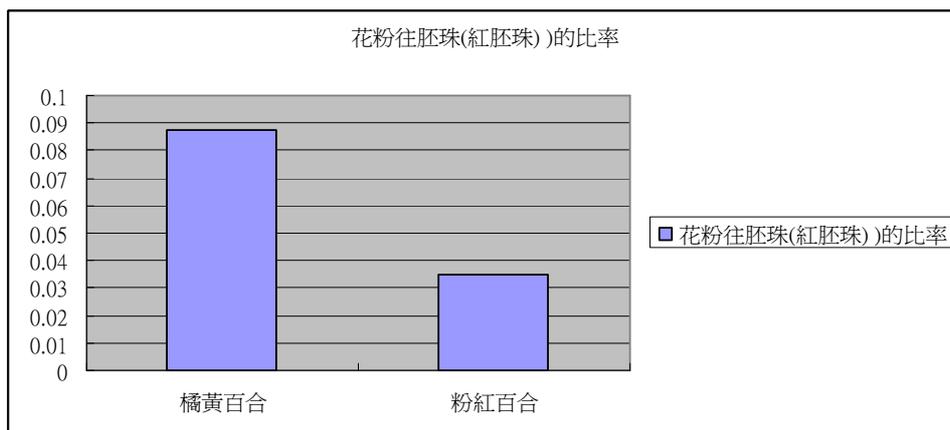


圖 12. 黃色胚珠對花粉的誘導實驗

1. 不同種花色，其胚珠對異種花色吸引力較高。
2. 可能是物種防止自珠授粉保持遺傳多樣性。

四、雌蕊柱頭分泌物對花粉萌發的影響

表 13. 雌蕊柱頭分泌物對花粉萌發的影響

	萌發率
粉紅花粉 vs 粉紅液	0.3478
粉紅花粉 vs 橘色液	0.1257
橘色花粉 vs 橘色液	0.0673
橘色花粉 vs 粉紅色液	0.0877

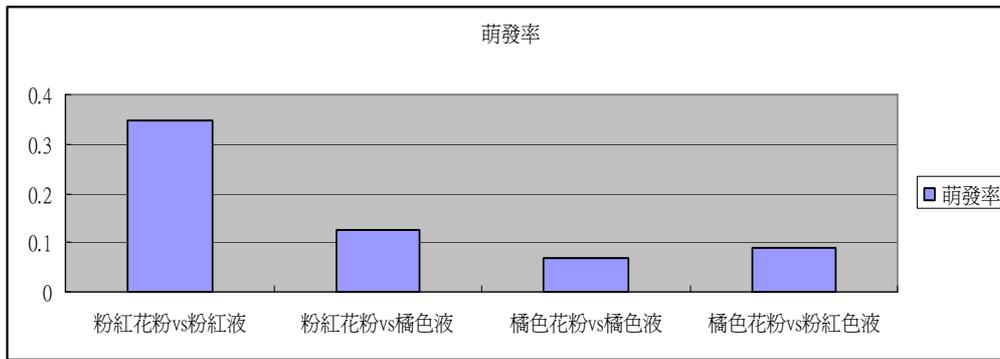


圖 13. 雌蕊柱頭分泌物對花粉萌發的影響

1. 粉紅色的柱頭黏液對同種的花粉萌發率較好，然而橘色花的黏液對橘色花粉及橘色花粉對粉紅黏液比例上較接近，也許是因為當時橘色黏液採樣不足所造成。

柒、討論

- 一、根據參考資料(花粉管的萌發與傳播)指出 Ca^{2+} 對花粉管長度有增長的效果【註四】，以致於我們預測 Ca^{2+} 對花粉的萌發有促進的效果。根據實驗結果，我們發現鳳仙花萌發率，在 10%蔗糖溶液 > 清水 > Ca^{2+} > EDTA。因此，鳳仙花在 10%蔗糖溶液裡萌發率最好，而且 EDTA 加入的量越多，抑制效果愈明顯。 Ca^{2+} 並無明顯促進，反而好像有抑制的效果，重複數次實驗，仍為此結果，因此我們推測花粉萌發必須要有 Ca^{2+} 參與，但濃度可能很低。
- 二、CK 和 NAA 是植物賀爾蒙中具有促進生長效果的激素，也是組織培養中不可或缺的因子，我們推測在花粉萌發的過程中，可能有植物賀爾蒙的參與，因此我們選用這二種激素，做為我們實驗材料。在實驗中結果發現 CK 與 NAA 的濃度在 1ppm 下萌發效果最好，濃度愈高或愈低，呈現遞減現象，甚至出現抑制作用，因此，我們推測胚珠應該會分泌此二種賀爾蒙，濃度可能為 1ppm，來誘導花粉管往胚珠方向生長。
在植物荷爾蒙對花粉管延伸方向的誘導實驗中，我們發現 NAA 的誘導效果較 CK 效果佳，未來我們計畫，在顯微鏡下描繪一個計畫路徑，觀察花粉管是否可以延計畫路線前進，也許可以應用在操控花粉管的延伸路徑。
- 三、根據實驗結果，我們發現，百合花花粉加入同種柱頭黏液之後，在同種間內有明顯的促進萌發效果。而不同種的似乎就有些抑制，這和過去研究發表的不一樣【註四】，此次實驗中，有一些實驗組的萌發率為零，因此懷疑花粉的新鮮度可能造成實驗誤差。

捌、結論

- 一、鈣離子的實驗中，在 300ppm 鈣離子濃度的萌發率高於 100ppm 鈣離子濃度，且在 EDTA 的實驗中發現，加入 EDTA 後，萌發率明顯下降，且愈高濃度的 EDTA，抑制效果愈明顯。
- 二、在許多胚胎發育的研究中顯示， Ca^{2+} 常扮演重要訊息角色，例如鈣離子波(Calcium Wave)，以及與攜鈣蛋白(calmodulin)所涉及的訊息傳遞非常複雜【註五】。在過去研究中，曾有發表 Ca^{2+} 會有使花粉管延長的現象【註四】，而在我們的實驗中，發現高濃度的 Ca^{2+} 對其萌發率產生影響並不大，但 EDTA 加入後即對萌發率有極大的影響，可見可能扮演一個重要扣板機的因子，缺少它則花粉管萌發失敗。
- 三、未來我們希望能建立一個 Ca^{2+} 離子濃度梯度的模式，探討 Ca^{2+} 濃度是否會影響花粉管的延伸方向，如同 Ca^{2+} 離子對果蠅發育中扮演重要角色。
- 四、柱頭分泌物可能含有 NAA 及 CK 的成分或其他我們尚未探討的生長激素所造成的誘導效果和某種專一性的蛋白質利用 Ca^{2+} 離子為輔因子使花粉管成長。
- 五、我們希望藉由單一因子去探討花粉萌發的影響因子，藉以探討胚珠對花粉管的誘導因子，再實驗過程中遇到一些小問題，例如花粉的成熟度、花期、胚珠的挑取、植物賀爾蒙溶解等困難，我們一一克服，未來也希望能有更精密的儀器輔助，例如：冷凍切片，在電子顯微鏡下觀察動態的花粉管延伸情形。

玖、參考資料及其他

- 1、植物暨微生物學研究所 http://ipmb.sinica.edu.tw/faculty/gyjauh_c.html
- 2、菸草花粉萌發和花粉管生長潮期間柱頭和花柱中的鈣分布
<http://www.plant-physiology.com/pmbissue/2005/53.pdf>
- 3、我的花粉管會轉彎－花粉管萌發方向之探討我的花粉管會轉彎－屏東女中
- 4、水稻花粉萌發及花粉管生長動態
<http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotat-ZGSK200705013.htm>
- 5、Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. Dev Biol. 2007 Jul 1;307(1):1-13. Epub 2007 May 3. Review.

壹拾、 附錄

附錄一、花粉管與胚珠關係圖

Pollen tube attraction by the Synergid cell *Science* 293:1441-42, 2001

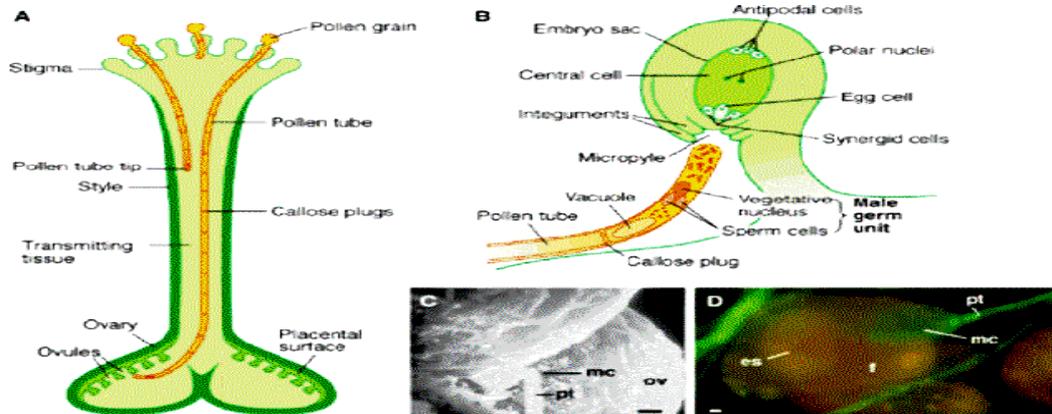
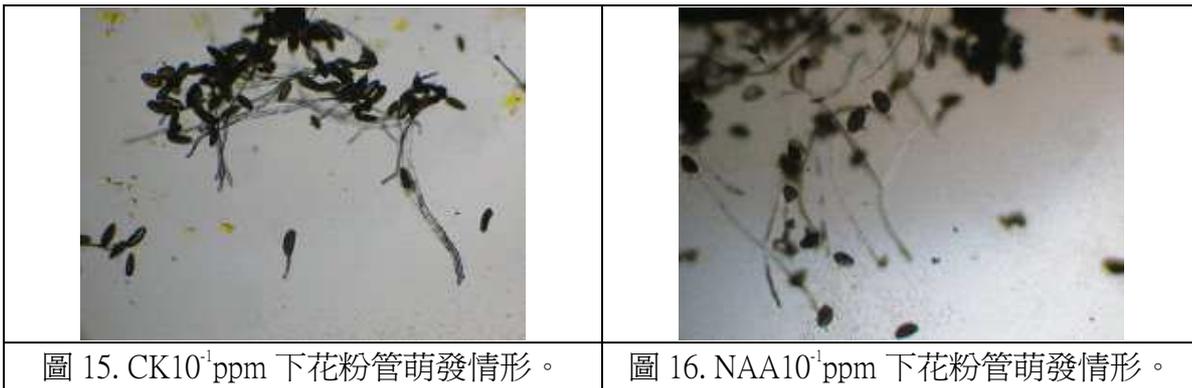
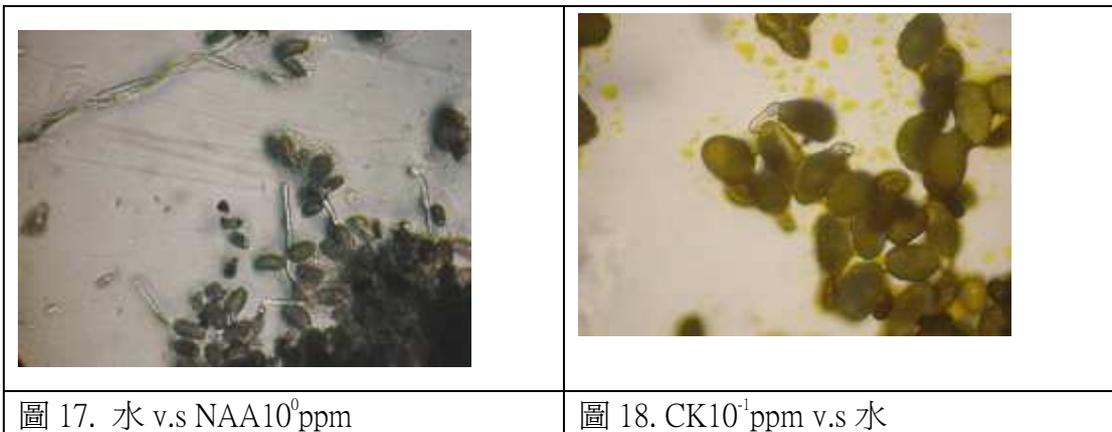


圖 14. 授粉示意圖

附錄二、植物荷爾蒙對花粉萌發率的影響



附錄三、植物荷爾蒙對花粉管延伸方向的誘導實驗



附錄四、胚珠對花粉的誘導實驗



圖 18. 百合胚珠對花粉的誘導。(40X)

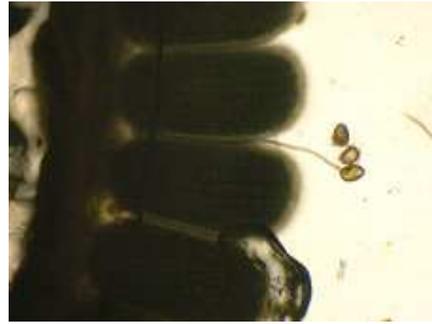


圖 19. 百合胚珠對花粉的誘導。(100X)

附錄五、實驗紀實



偷拍被抓到了==！瞧瞧他正在做什麼？原來正在配置溶液阿！



正全神貫注的小珊，專心的把將花粉和水溶劑混合。



被偷拍了還不知道，真是認真的兩個人。仔細一瞧，原來正在配置溶液阿！



在作什麼呢？原來正在配置溶液和分解胚珠阿！感覺好像很好玩耶！ 😊



噓~夜深了！這四個人依舊彼此分工合作，認真負責的完成手頭上的工作。



噢！正在看什麼阿？



看見了什麼！？快告訴我啦>~<



人家說認真的女人最美麗，原來也可以套用在男人身上耶！



正在看花粉的萌發嗎？人家也要參一腳啦！>~<



好多培養皿，裡面好像放很多花粉的實驗耶！辛苦了，做完那麼多又要看哪麼多！