投稿類別:自然科學類

篇名:

木黴菌對花粉管生長的影響

作者:

傅詩晴。花蓮縣國風國中。七年十四班。

傅傳勛。花蓮縣國風國中。九年十八班。

指導老師:

林家瑜老師

壹、前言

一、 研究動機

我們過去執行小論文和科展時都會到東華的實驗室準備實驗要用的東西，有一次我們過去的時候看到無菌操作台裡有一圈一圈綠色的東西在培養皿裡，老師跟我們說才知道那是木黴菌也就是植物的益生菌，在田間施作可以對抗病原菌讓植物長得更好，碰巧我們之前的科展和小論文是以花粉為研究主題，我們就想知道在噴灑木黴菌的時候如果花粉碰到木黴菌液的話會不會影響花粉管的生長呢?經過實驗室老師的同意我們開始學習怎麼培養木黴菌，然後利用手機顯微鏡來觀察暴露於木黴菌液的時候花粉管的生長情形。

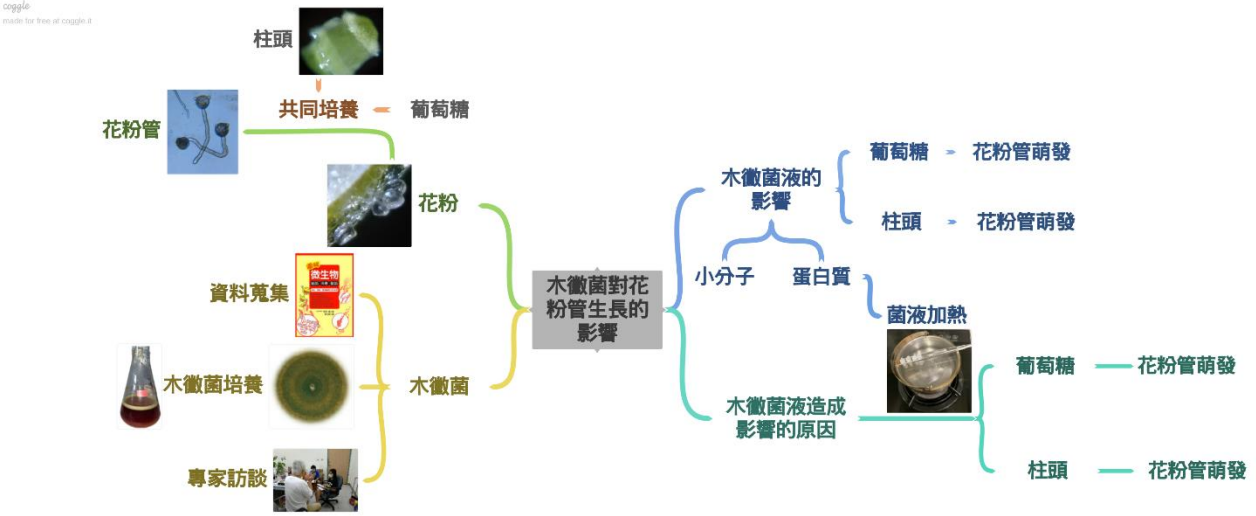
二、 研究目標

(一) 探討木黴菌液對葡萄糖誘導花粉管生長的影響。
(二) 探討木黴菌液對柱頭誘導花粉管生長的影響。
(三) 觀察加熱對木黴菌液抑制花粉管生長的影響。

三、 研究方法

(一) 利用手機顯微鏡拍照或縮時攝影的方式觀察並記錄木黴菌液對葡萄糖或柱頭誘導花粉管生長的影響。
(二) 透過與專家及農民訪談了解木黴菌實際應用的情形。

四、 研究架構



貳、正文

一、 文獻蒐集

(一) 花粉與花粉管

花粉是長在雄蕊上的雄性生殖細胞，花粉可以利用風、水、昆蟲、小鳥來傳播。花粉黏到雌蕊的柱頭上，柱頭會分泌水分、糖類等物質，來幫助柱頭黏住更多花粉，這些水分和糖類也可以幫助花粉長出花粉管，經由花粉管把精子送到子房裡胚珠和卵就完成授精，然後子房變成果實，胚珠變成種子。當花粉落在柱頭上後，花粉的外壁會釋放出外壁蛋白，與柱頭乳突細胞的蛋白質表膜相互辨認，如果二者是親合的會釋出角質酶，而溶解下方角質層，使花粉管可以入侵柱頭表面。

(二) 木黴菌

木黴菌普遍存在於植物殘株與土壤中的腐生性真菌。木黴菌可應用於生產酒精、造紙、飼料等產業。另外，木黴菌也被廣泛的應用在農業，堆肥的時候使用木黴菌可促進有機物分解，縮短堆肥腐熟時程，直接田間施作可以促進生長及防治作物病害和抑制病原，如立枯絲核菌、灰黴菌等。木黴菌可用來防治病害或抑制病原的主要原因，可被歸類成五大類，即 1.產生抗生素：如抗菌胜肽 (peptaibols)，蒽醌類 (anthraquinones) 、黴膠毒素 (gliotoxin) 等物質，可抑制病原菌孢子發芽與菌絲生長。2.營養競爭：競爭能力強的微生物可搶走競爭能力弱病原菌的食物，可限制病原菌的生長、發芽和代謝。3.超寄生：木黴菌附著在病原菌的菌絲上，進入真菌細胞，然後分解。4.細胞壁分解酵素：真菌細胞壁的主要成分是幾丁質與葡聚醣所組成，木黴菌可分泌可分解幾丁質與葡聚醣的物質，可直接分解真菌細胞壁。5.誘導植物產生抗性。所以木黴菌是目前主要生物防治真菌之一，主要是透過奪取或阻斷病原菌所需的養分。

(三) 真菌感染

植物角質層的蠟質可作為防禦昆蟲、病毒、細菌以及真菌侵染，但是許多真菌入侵植物時會分泌角質酶分解表皮角質層，就能入侵底層組織。真菌附著植物後會產生發芽管附著器，接著分泌酵素使細胞壁軟化或溶解，然後入侵植物。

(四) 相關研究報告

碩博士論文研究報告指出木黴菌利用稻草培養後二次代謝產物，能有效的抑制植物病原菌，而且利用加熱處理以及蛋白酶來移除蛋白質後，發現 T. koningii RIS 3-8 分泌物仍可有效抑制植物病原菌，推測蛋白質在抗真菌測試中沒有活性 (施惠儂，2011) 。另外，鐵砲百合柱頭和花柱分泌物應該存在讓花粉管萌發的有效物質，所以研究者在實驗裡將分離柱頭或花柱分泌物利用加熱滅菌或蛋白酶 K 這兩種外源性處理，結果發現處理後不會影響花粉萌發，但是花粉管長度卻縮減了，作者認為蛋白質可能不是影響花粉萌發的必要因子 (古家齊，2011)(傅小娟，2016)。

97 年全國高級中等學校小論文的報告「花粉管不為人知的秘密」指出花粉管萌發必須有鈣離子參與，同種植物柱頭的黏液可以促進花粉管萌發 (藍梓羽，2008)。而我們在 109 年花蓮小論文的報告「花粉 你覺得糖好吃嗎?」(傅詩晴，2020) 中觀察到營養性的糖會使花粉管愈長愈長，但是使用非營養性的代糖會使花粉管萌發，但是不會延伸變長。我們在 110 年花蓮小論文「花蓮縣明義國小校園植物的甜祕密」和科展「植物柱頭與花粉的悄悄話」的實驗中發現柱頭誘導花粉管的生長是一個多重調節的過程，除了糖類可以做為提供花粉管萌發及生長的能量來源外，另外還存在有容易受熱破壞的物質，參與在柱頭誘導花粉管的生長調節過程 (傅詩晴，2021) 。

二、 研究實驗過程與方法

(一) 實驗準備

1. 實驗器材：手機顯微鏡、顯微鏡專用測微校正尺、燒杯、電子天平、加熱攪拌器、試管混和器、恆溫震盪培養箱、酒精燈、攪拌子、離心管、微量吸管、試管架、培養皿、蓋玻片 、載玻片 、鑷子。
2. 實驗試劑：葡萄糖、馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato Dextrose Agar，PDA) 、馬鈴薯葡萄糖培養基 (Potato Dextrose Broth，PDB)。
3. 應用程式： IC Measure—花粉直徑測量、Coggle—實驗架構繪製。

(二) 實驗內容

1. 木黴菌固態培養
   a. 先開無菌操作台裡的 UV 燈 30 分鐘，保持在無菌的狀態。
   b. 將放進去的東西都用 75%酒精消毒。
   c. 將打洞器用酒精燈加熱消毒。
   d. 等打洞器冷卻後在母盤的 PDA 上打洞。
   e. 夾起附著有木黴菌的 PDA。
   f. 將木黴菌放入新的 PDA 培養基的中間，至於 25°C 培養箱中培養 6 天。

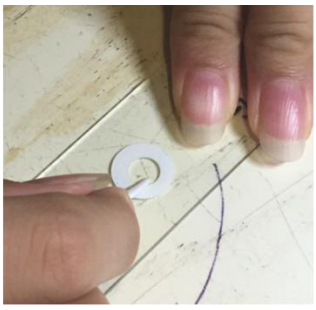
2. 木黴菌液態培養
   a. 先開無菌操作台裡的 UV 燈 30 分鐘，保持在無菌的狀態。
   b. 將放進去的東西都用 75%酒精消毒。
   c. 將打洞器用酒精燈加熱消毒，等打洞器冷卻後在母盤的 PDA 上打洞。
   d. 用酒精燈加熱消毒錐形瓶瓶口。
   e. 把鋁箔紙剝掉，再用酒精燈加熱消毒一次。
   f. 把 8 個木黴菌塊放進 PDB 中。
   g. 再用酒精燈加熱消毒瓶口和鋁箔紙，用鋁箔紙密封瓶口，再用酒精燈加熱消毒一次。
   h. 用恆溫震盪培養箱震盪培養，轉速 180 rpm、溫度保持在 25°C，培養 6 天。
   i. 取上清液進行實驗。

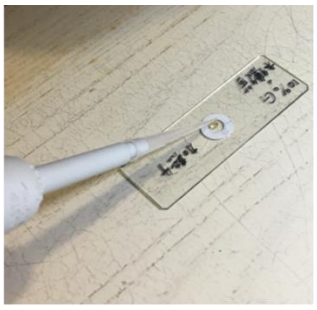
3. 木黴菌液對葡萄糖誘導日日春花粉管生長的影響
   a. 把泡好的溶液放在冰塊裡退冰。
   b. 把花粉塗到加強圈裡。
   c. 在加強圈裡分別滴入 20 μl 的 20%葡萄糖溶液、10%葡萄糖溶液、20%葡萄糖+木黴菌液、10%葡萄糖溶液+木黴菌夜、木黴菌液。
   d. 蓋上蓋玻片，把濕衛生紙團和玻片一起放在培養皿裡面，室溫培養。
   e. 分別在 30、60、120、180、240 及 360 分鐘時觀察花粉管的萌發情形並拍照紀錄。

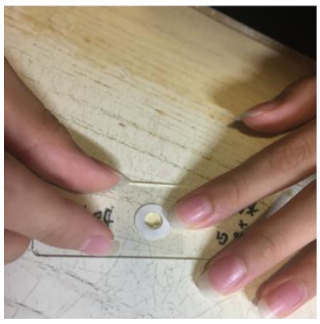
f. 拍照做紀錄。
g. 花粉管萌發率計算。

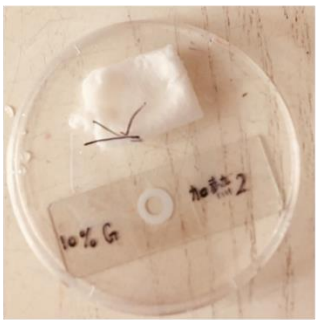
溶液退冰

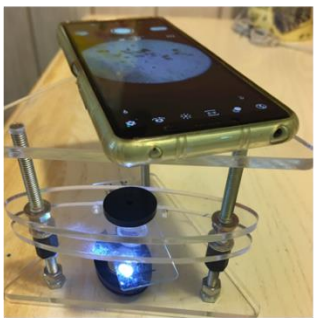
挖花粉

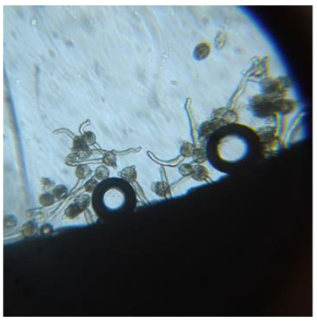

塗花粉


滴溶液

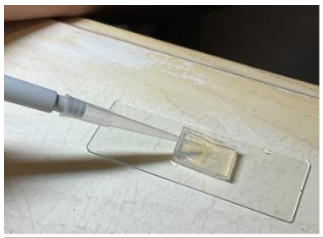

蓋上蓋玻片

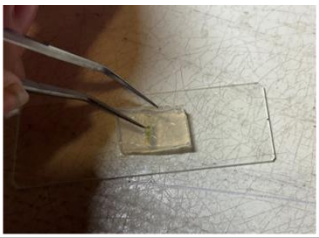

室溫培養


視野調整

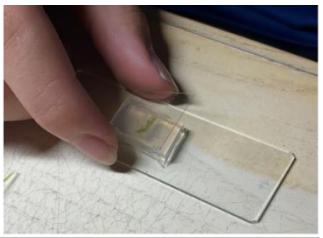

拍照記錄

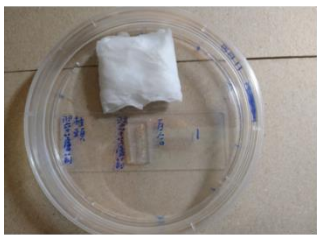
4. 木黴菌對柱頭誘導日日春花粉管生長的影響
   a. 先在洋菜膠上割一個凹槽。
   b. 加 20 µl 的木黴菌上清液到洋菜膠上的凹槽裡，等 30 分鐘，待菌液被洋菜膠吸收。
   c. 把柱頭放入凹槽。
   d. 在溝槽的兩旁塗上花粉。
   e. 蓋上蓋玻片。
   f. 把濕衛生紙團和玻片一起放在培養皿裡面，室溫培養。
   g. 分別在 60、120、180、240 及 360 分鐘時觀察花粉管的萌發情形並拍照紀錄。
   h. 拍照做紀錄。
   i. 花粉管萌發率計算及長度測量。

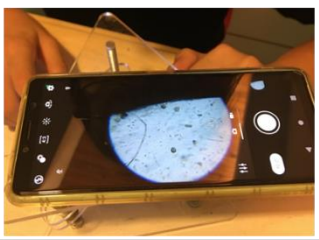

加入木黴菌液

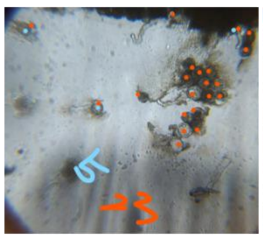

放入柱頭

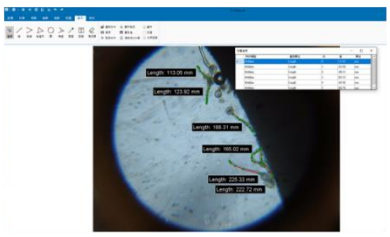
塗花粉

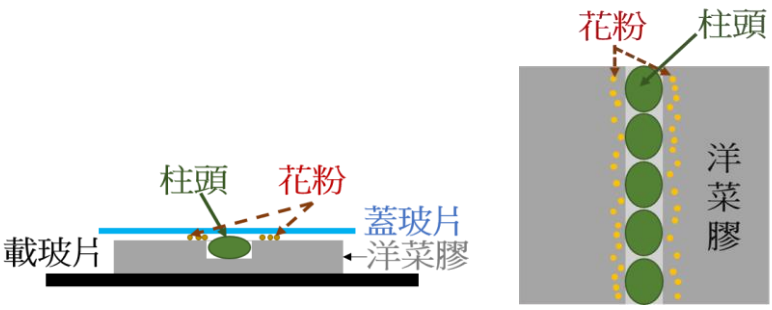

蓋上蓋玻片


室溫培養


拍照記錄


萌發率計算


花粉管長度量測



柱頭/花粉放置示意圖

5. 木黴菌液加熱
   a. 將裝有溶液的離心管放入沸水中加熱 30 分鐘。

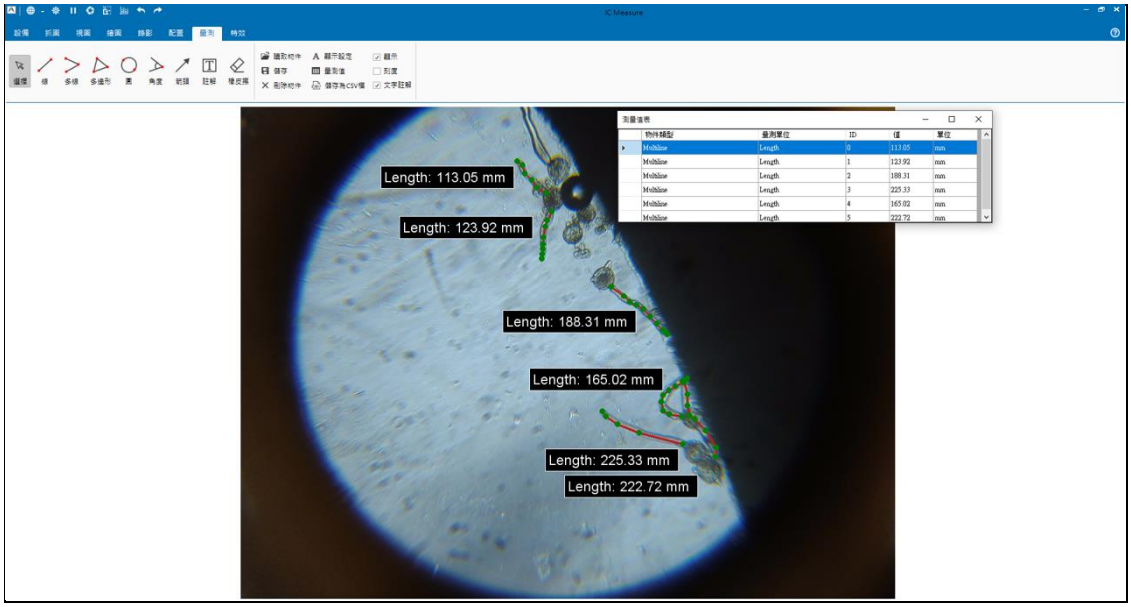
(三) 花粉試驗的定量方法：

在本篇文章中所描述之專有名詞和計算方法，定義如下：

1. 萌發：花粉管達到花粉直徑的一倍長（含以上）即認定為萌發。

2. 萌發率：計算 5 個以上不同的鏡頭下的花粉總數中包含已萌發花粉數目的相對比例。
   萌發率＝萌發花粉數量 /花粉總數 × 100%

3. 發長度：利用 IC Measure 軟體提供的測量功能計算 5 個以上不同的鏡頭下萌發的花粉管長度再求其平均值。



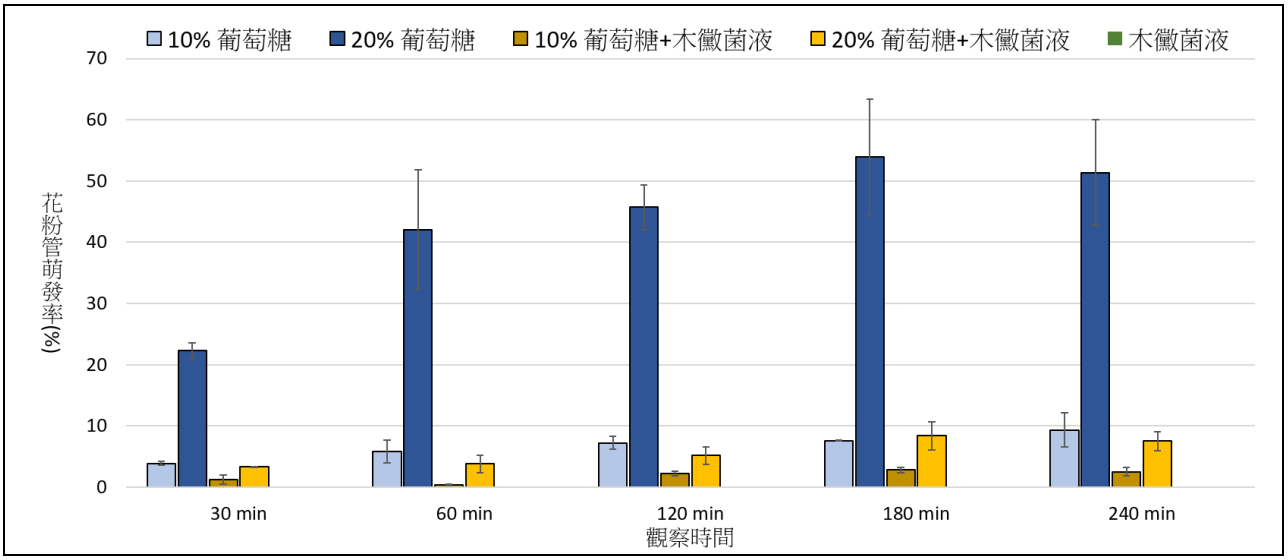
三、 實驗結果

(一) 木黴菌液對葡萄糖誘導日日春花粉管生長的影響

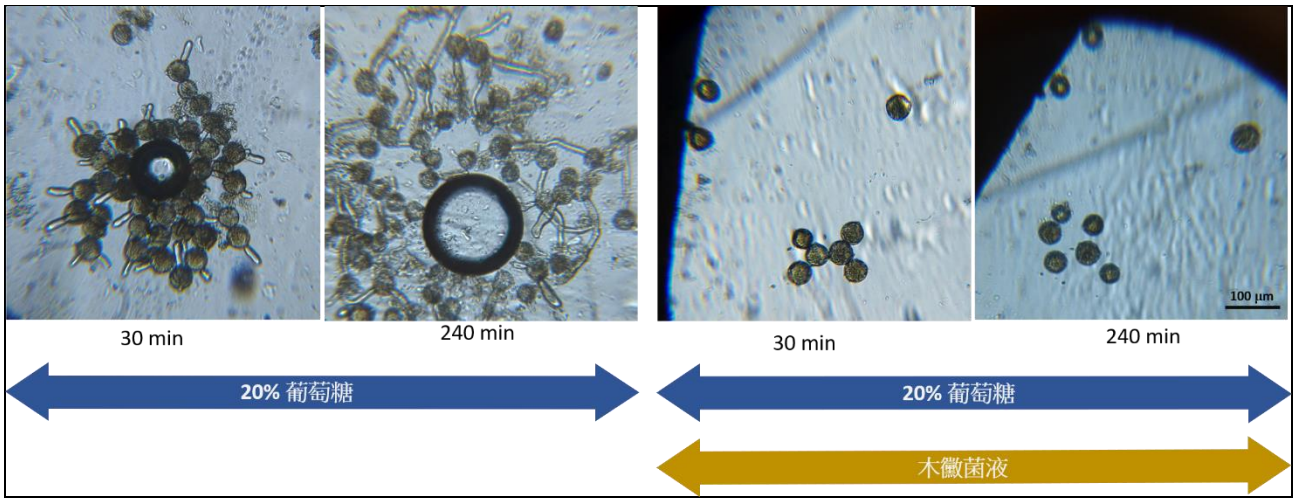
圖一顯示日日春花粉與葡萄糖共同培養，觀察 30、60、120、180、240 分鐘時花粉管萌發的情形，結果顯示隨著葡萄糖濃度和觀察時間增加日日春花粉管萌發率也隨著增加。共同處理木黴菌液可有效抑制葡萄糖誘導花粉管的生長。單獨處理木黴菌液並不會誘導花粉管生長。

圖一 B 看到花粉位置略有移動是因為此實驗是利用液態培養方式觀察，移動玻片時可能會造成液體些微的流動，進一步改變花粉粒的分布位置。

A.



B.

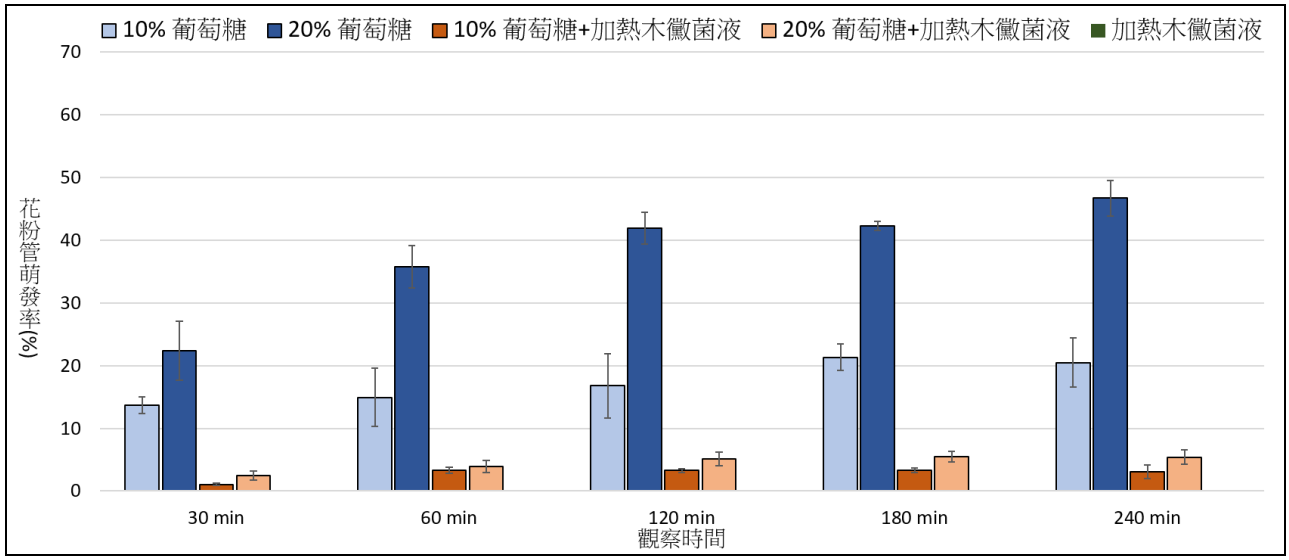


圖一、木黴菌液對葡萄糖誘導日日春花粉管生長的影響

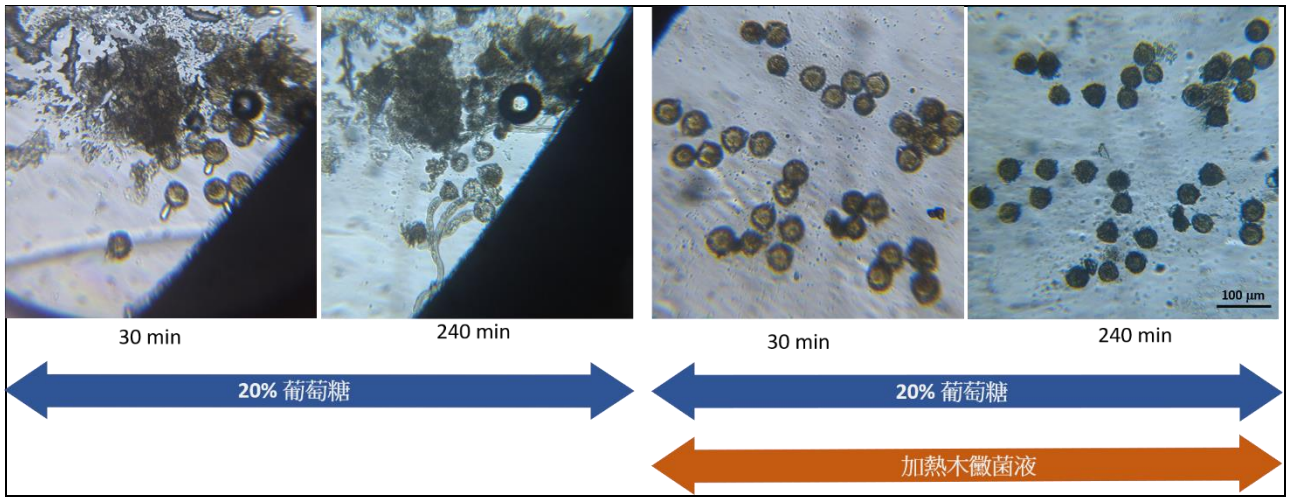
(二) 木黴菌液加熱對葡萄糖誘導日日春花粉管生長的影響

圖二顯示日日春花粉與葡萄糖共同培養，觀察 30、60、120、180、240 分鐘時花粉管萌發的情形，結果顯示隨著葡萄糖濃度和觀察時間的增加日日春花粉管萌發率也隨著增加。共同處理經過加熱處理的木黴菌液可有效抑制葡萄糖誘導花粉管的生長。

A.



B.



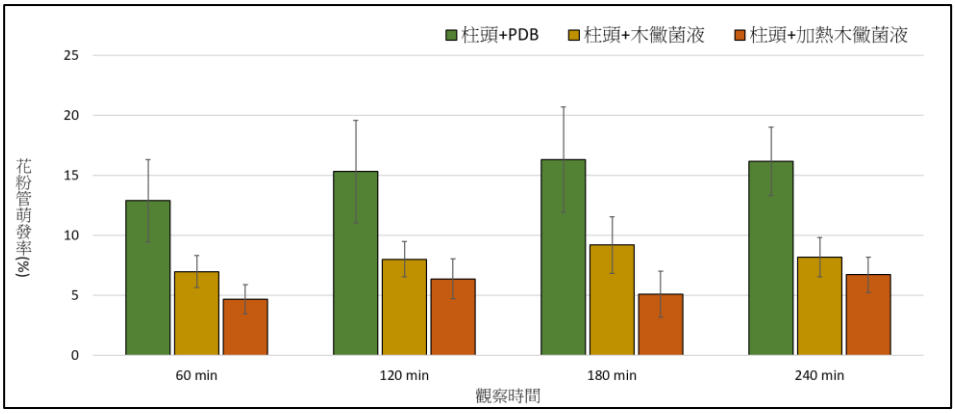
圖二、加熱木黴菌液對葡萄糖誘導日日春花粉管生長的影響

(三) 木黴菌液對柱頭誘導日日春花粉管生長的影響

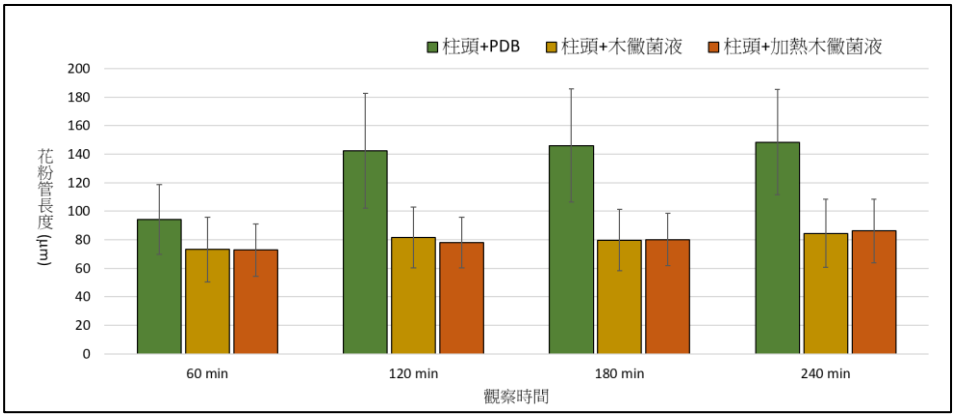
圖三 A 和圖三 C 顯示日日春花粉與柱頭共同培養，觀察 60、120、180、240 分鐘時花粉管生長的情形，結果顯示隨著觀察時間的增加花粉管萌發率也會隨著增加。加入木黴菌液共同處理可有效抑制柱頭誘導花粉管的萌發，但大約只能抑制一半左右的萌發率。共同處理經過加熱處理的木黴菌液也可有效抑制柱頭誘導花粉管的萌發，也是只能抑制大約一半左右的萌發率。

圖三 B 和圖三 C 顯示日日春花粉與柱頭共同培養，觀察 60、120、180、240 分鐘時花粉管的長度，結果顯示隨著觀察時間的增加花粉管長度也會隨著增加。加入木黴菌液及經過加熱處理的木黴菌液共同處理 60 分鐘花粉管仍然會生長，但是 60 分鐘以後以木黴菌液及經過加熱處理的木黴菌液處理的這 2 組花粉管長度並沒有繼續延伸，一直維持一樣的長度。

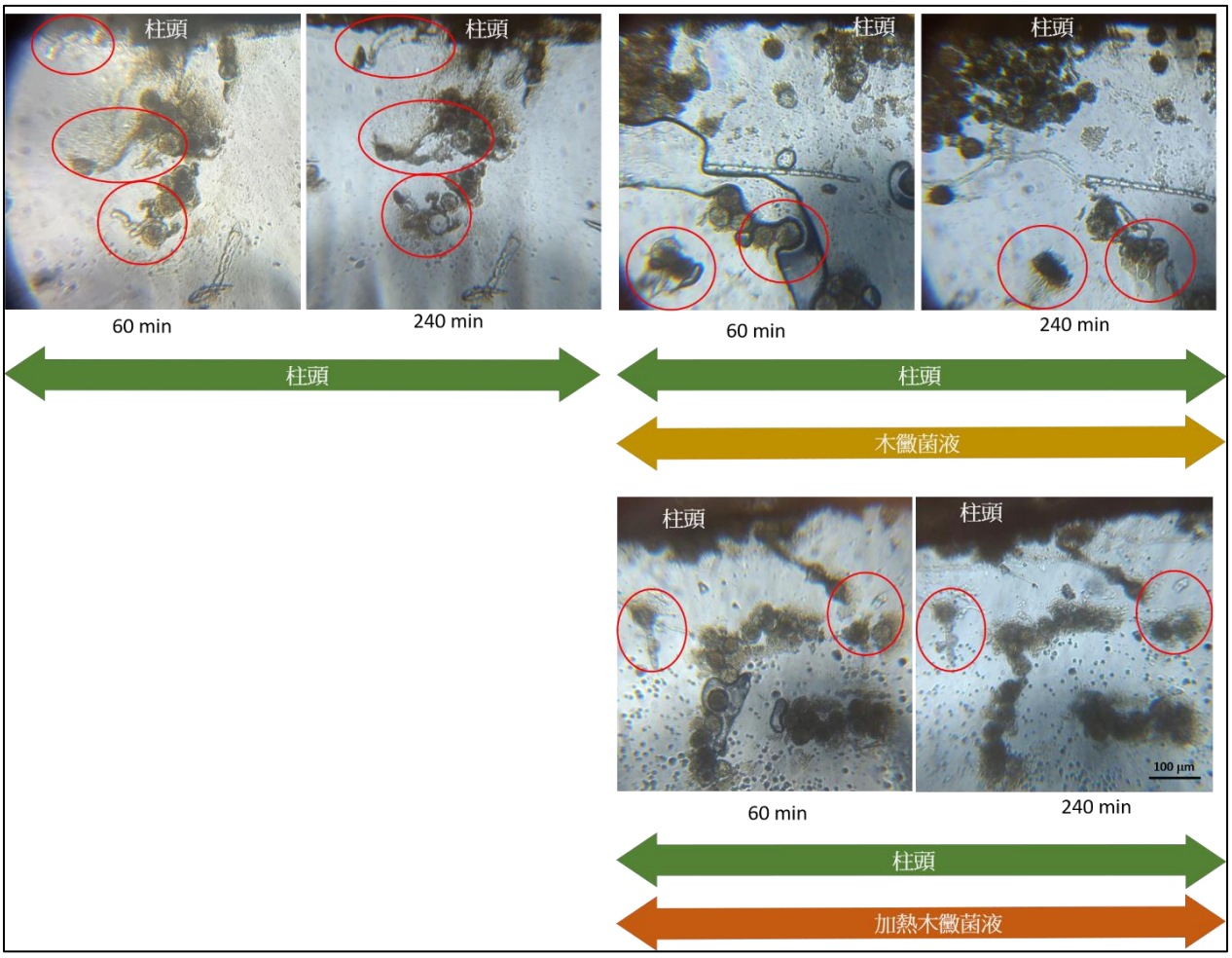
A.



B.



C.



圖三、木黴菌液對柱頭誘導日日春花粉管生長的影響

參、結論

一、 研究討論

(一) 由我們先前的研究發現日日春花期長，而且花粉管萌發現象容易利用顯微鏡觀察。另外木黴菌對日日春病害中常見的灰黴菌和立枯絲核菌有很好的防治作用，因此本實驗選擇台灣常見的高腳紫品種日日春為實驗對象。

(二) 在木黴菌的培養過程中可以觀察到，不論是固態培養或是液態培養都可以發現培養基的顏色慢慢呈現黃色到棕紅色，經過資料搜尋知道這是因為木黴菌會分泌帶有黃紅色的蒽醌類(Anthraquinones)二次代謝物到培養基中的原因，而這些二次代謝物是木黴菌用來殺死植物病原菌的主要物質。

(三) 木黴菌液會抑制大部分葡萄糖誘導的花粉管生長，但只能抑制大約一半比例柱頭所引起花粉管萌發。在我們以前科展的研究中發現柱頭誘導花粉管的生長是一個多重調節過程；除了糖類可以做為提供花粉管萌發及生長的能量來源外，另外還有其他物質參與在柱頭誘導花粉管的生長調節過程。因此我們推測可能是木黴菌液會抑制糖類的反應，但不會影響其他會促使花粉管生長的物質，所以木黴菌液無法完全抑制柱頭所引起的花粉管生長，卻可以抑制大部分葡萄糖誘導的花粉管生長。

(四) 在我們先前的研究發現柱頭對同植物的花粉管具有吸引力，會使花粉管趨向柱頭生長，本次實驗也觀察到一樣的現象，但是以木黴菌液處理後卻觀察不到這個現象，這可能和木黴菌液處理後花粉管長度無法隨著共同培養的時間增加而增加有關，所以造成與木黴菌液共培養的柱頭無法誘導花粉管轉彎。

(五) 實驗初步測試時我們觀察到木黴菌液有抑制葡萄糖和柱頭誘導花粉管生長的情形，所以我們想進一步去了解木黴菌液會抑制葡萄糖和柱頭誘導的花粉管生長原因，經過資料搜尋知道木黴菌會分泌抗菌物質等小分子和蛋白質等大分子到培養基中，因此我們決定利用將木黴菌液加熱的方式破壞蛋白質或其他易受熱破壞的物質，接著觀察木黴菌液加熱處理後對葡萄糖和柱頭誘導花粉管生長的情形會不會有影響，結果發現木黴菌液經過加熱處理仍然會抑制葡萄糖和柱頭誘導的花粉管生長，由這部分實驗結果可以知道木黴菌液對花粉管生長的抑制作用與蛋白質等對熱敏感的物質無關。

(六) 真菌的孢子可以利用分子之間的引力把自己與寄主拉黏在一起 ，並產生發芽管及附著器，然後伸出侵入釘，並分泌角質酶使寄主之細胞壁軟化或溶解，進而感染植物。當花粉落在柱頭上後，花粉的外壁會釋放出外壁蛋白，與柱頭乳突細胞的蛋白質表膜相互辨認，如果二者是親合的會釋出角質酶，而溶解下方角質層，使花粉管可以入侵柱頭表面，花粉管與真菌入侵植物的方法相似。在搜尋的資料中可以知道木黴菌是利用稻草培養後的二次代謝產物，而非蛋白質抑制植物病原菌生長， 這與我們觀察到木黴菌液對花粉管生長的抑制作用與蛋白質等對熱敏感的物質無關是很類似的，因此我們推測木黴菌液中不會被熱破壞的抑菌物質可能透過類似抑制真菌生長的機轉來抑制花粉管生長。

二、 研究結論

(一) 我們推測木黴菌液中不會被熱破壞的抑菌物質可能透過類似抑制真菌生長的機轉來抑制植物花粉管生長。

(二) 由上述得知木黴菌液會抑制花粉管生長，建議農人對植物施作木黴菌液肥時盡量不

要噴灑到花朵或避開植物開花期，以免影響植物授粉。

三、 未來研究方向

(一) 本實驗目前只針對日日春花粉進行實驗，未來應該進一步探討其他植物的花粉管生長是不是也會受木黴菌液影響。

(二) 在木黴菌液抑制花粉管生長的機轉方面，可以進一步利用已知木黴菌會分泌的抗菌物質來做測試。

(三) 此實驗的發現屬於實驗室體外測試的結果，未來還是需要在植株上實際操作才知道木黴菌液接觸到花朵是否會影響植物授粉。

肆、引註資料

一、 書籍

1. 陳玉華 (譯) (2009)。圖解微生物：細菌・病毒・黴菌 (原作者：田中修)。世茂出版有限公司。
2. 李佩瑜 (譯) (2012)。超迷你微生物和神奇的發酵 (原作者：高銀貞)。漢湘文化事業股份有限公司
3. 林筑茵 (譯) (2017)。3 小時讀通植物學 (原作者：田中修)。世茂出版有限公司。
4. 劉徽 (譯) (2017)。漫畫大英百科-真菌與蘚苔 (原編輯團隊：BomBom Story)。三采文化股份有限公司。(原著出版年:2016)
5. 陳朕疆 (譯) (2020)。有趣到睡不著的自然科學 (原作者：左卷健男)。快樂文化出版·遠足文化事業股份有限公司。

二、 學位論文

1. 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 (未出版的碩士論文)。國立屏東教育大學化學生物系。
2. 施惠儂（2011）。木黴菌二次代謝產物之殺真菌功能及 imidazolium salts 合成化合物之殺真菌功能。國立東華大學生命科學系生物技術碩士班。
3. 傅小娟（2016）。鐵砲百合柱頭分泌物內促進萌發因子之分離與活性分析 (未出版的碩士論文) 。 國立屏東大學應用化學系碩士班。

三、 文章

1. 陳俊位(2010)。木黴菌在農業商之應用。臺中區農業改良場九十九年專題討論專集。https://www.tdais.gov.tw/upload/tdais/files/web_structure/6868/TC02-105-16.pdf
2. 傅詩晴、謝涵 (2020)。花粉 你覺得糖好吃嗎。109 年花蓮縣網路國民中小學小論文暨本土使命行動研究競賽。https://student.hlc.edu.tw/hualien/action/report1/3841/20201022130010020.pdf
3. 傅詩晴、謝涵 (2021)。花蓮縣明義國小校園植物的甜祕密。111 學年度太平洋盃全國中小學網路小論文專題暨本土使命式行動研究競賽。https://student.hlc.edu.tw/action/report1/88/20211006204652296.pdf
4. 傅詩晴、連苡萱、林妤璇、姚尹婕(2021)。植物柱頭與花粉的悄悄話。花蓮縣第 62 屆國民中小學科學展覽會。