

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060006

參展科別 植物學

作品名稱 酯類代謝於花粉萌發及花粉管生長所扮演的角色

得獎獎項 大會獎：二等獎
出國正選代表

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 羅尹廷

作者姓名 張裴苓、張世敏

關鍵詞 油酯、花粉、花粉管

作者簡介



我是張世敏(左)，目前就讀國立台灣師範大學附屬高級中學三年級。

我是張裴苓(右)，目前就讀國立台灣師範大學附屬高級中學三年級。

偶然的機遇下我們才有這個得來不易的機會從事專題研究，而對生物有濃厚興趣的我們毫不猶豫地選擇了生物科，一頭栽進這個充滿神秘與奧妙的世界。從一開始尋找實驗室，到做實驗的過程中遇到了種種關卡，有艱澀難懂的知識背景，有複雜繁瑣的實驗過程，到最後看到心血成果的欣慰，這些都化為我們成長的養分，遇到問題時，我們學會如何找尋資料，並思考為什麼以及如何改善解決實驗中遇到的困難，在準備的過程中，我們也學會如何口語表達並展現我們的實驗成果，希望透過我們對於生物的興趣以及熱情，能夠為科學盡一點點心力。也很感謝中研院趙光裕教授以及學長姐老師們給我們這個珍貴的學習機會並幫助我們！

摘要

研究初期顯示增加儲存時間會降低花粉萌發率，並造成內源性酯類顯著降解。因此我們推測花粉萌發所需的能量可能由內源性酯類提供。先前研究發現雌蕊柱頭分泌物(SE)含有促進花粉萌發的因子，本研究探究 (1)花粉萌發過程中內部酯類組成變化；(2)找出 SE 如何影響酯類代謝進而促進花粉萌發。利用薄層色層分析法比較後發現極性酯於花粉萌發較中性酯重要，而 SE 主要加速了磷脂酰肌醇(PIs)、磷脂酰膽鹼(PCs)的降解與雙酸甘油酯(DAGs)的生成。利用 LC-MS 發現添加 SE 確實能加速 PCs/Pis 的降解及 DAGs 的生成，更能促進 PAs 的快速生成再降解。我們推測添加 SE 能夠促進 PCs/Pis 降解，Pis 磷酸化成 PIP2 後經過 PLC 水解生成 1,4,5-三磷酸酯(IP3)以及 DAGs，IP3 能促使粗糙內質網釋放內源性鈣離子，而 DAGs 磷酸化成磷酸酯(PAs)後促使膜上的鈣離子通道打開，讓外源性鈣離子進入花粉管內。而 PCs 在經過 PLD 水解後也能形成 PAs 讓鈣離子進入花粉管內。

Abstract

It is known that a lot of lipid drops are accumulated and stored in the mature pollen grains. This observation raised a very intriguing hypothesis that proper pollen germination required endogenous lipids. Pollen germination pollen tube elongation requirement of energy provided by stored materials. When we compared the germination rates of pollen grains stored at 4°C for one month and one year, the germination rate pollen stored for one year significantly decreased as compared to those stored for one month. Interestingly, the endogenous stored lipids significantly decreased in pollen grains with longer period of storage. Previous studies indicated that stigma exudate contains some unknown active components to promote pollen germination. In this study, we focused on (1) the variety of the lipid composition during the pollen germination process, (2) the roles of stigma exudate on lipid metabolism and following promotion of pollen germination. We used thin-layer chromatography to compare the metabolism of neutral and polar lipids in the pollen grains before and after pollen germination, and the results suggested that polar lipids were more important than neutral lipids for pollen germination. The treatment of stigma exudate primarily

accelerated the degradation and formation of phosphatidylinositol, phosphatidylcholine and diacylglycerol, respectively. To LC-MS analysis, we found that SE treatment accelerate the degradation of PCs/PIs and the production of DAGs, and promote the PAs rapidly produced and afterward it degraded. We proposal that SE treatment can increase the degradation of PCs/PIs. After PIs phosphorylate into PIP2, it can be hydrolyzed to produce 1,4,5-triphosphate (IP3) and DAGs by PLC. In addition, IP3 can promote the release of endogenous calcium from the rough endoplasmic reticulum. On the other hand, the DAGs phosphorylated into phosphatidic acid (PAs), that can promote the opening of the membrane's calcium channel, allowing the enter of exogenous calcium into the pollen tube. Besides, PCs can also form PAs after hydrolysis of PLD to allow calcium ions to enter the pollen tube.

壹、前言

一、研究動機

傳宗接代是生命體最重要的行為，花粉 (pollen) 做為植物傳宗接代的生命之源，重要性不言可喻。近幾年來，花粉相關的食品、藥品、美容化妝品不斷問世，甚至被認為是「微型營養寶庫」備受世界重視。營養物質中又以油脂這種神奇的物質，引起了我們對於它的興趣，希望藉由研究，發掘出花粉酯類的奧秘。在實驗室學長姐的前期研究之下發現，百合花粉具有極高的酯類含量，這些酯類都被儲存在稱為油滴(oil body)的胞器之中〔1〕。由於花粉管萌發的過程中需要極高的能量提供給花粉生長，因此我們很好奇是在花粉管萌發的過程中，酯類所扮演的是什麼角色。

二、研究背景

(一) 鐵炮百合

我們選擇的研究材料為鐵炮百合(Lily)的花粉。鐵炮百合為多年生宿根性草本，具有園藝觀賞與藥用，極富經濟價值。此外，鐵炮百合為復活節的節慶主題花，又稱為復活節百合，最大生產國為美國與荷蘭〔2-3〕。

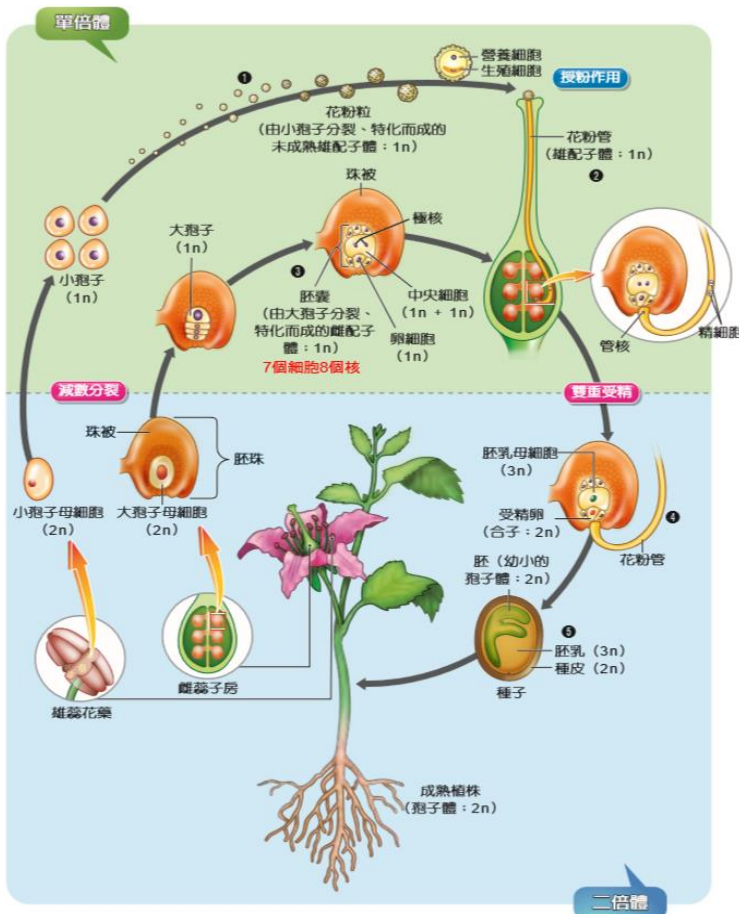
百合的花器包括了花萼、花瓣、雄蕊和心皮，每一個雄蕊由花藥和花絲組成；在花藥中有許多花粉囊，其中有花粉粒（雄性配子體）在花粉囊裡發育長大。雌蕊的基部是膨大的子房，百合有上千個胚珠，而子房的上方為花柱極具有黏性的柱頭，花粉藉由風、昆蟲等媒介附著於柱頭上，便啟動授粉。為了繁衍下一代，花粉扮演相當重要的角色〔4〕。

(二) 花粉的發育

雄性配子體要形成時，必須經過兩個階段：一、小孢子形成階段，由孢源細胞形成開始，小孢子的形成結束，發生的部位在花藥的花粉囊中，在成熟的花藥中，四個花粉囊各自具有由花粉囊壁包覆的孢源細胞，而花粉囊壁的最內層稱作營養層，在花粉生長時提供許多的能量。具有生殖能力的孢源細胞經有絲分裂分化雙倍體的小孢子母細胞（花粉母細胞），小孢子母細胞又在花粉囊內繼續行減數分裂，會分化為單倍體的小孢子四分體（花粉粒）（ n ）；二、小配子形成階段，由小孢子進行有絲分裂開始，配子（精細胞）形成結束。每個小孢子將會進行不對稱的有絲分裂形成兩個大小不同的細胞，一個是體積較小的生殖細胞和另一個是體積較大的營養細胞（管細胞），較小的生殖細胞會被包於大的營養細胞內（未成熟雄性配子體、小配子體），但這兩個細胞依然由原本的花粉壁所包圍。其後，生殖細胞進行第二次有絲分裂，依其發生的時期不同，可分為雙細胞型花粉粒和三細胞型花粉粒。大約三分之二的開花植物都是屬於雙細胞型，即所形成的花粉粒內僅含營養細胞核及生殖細胞，生殖細胞進行第二次有絲分裂是在生長的花粉管中進行，形成兩個雄性小配子（即是精細胞）。三細胞型花粉粒是生殖細胞在形成花粉粒之前會再經過一次的有絲分裂，形成內含兩個精細胞的花粉粒。此外，花粉粒在花藥開

裂釋放前（裂孔），也會受到營養細胞中累積的許多物質供給給花粉管快速生長（圖 a）。

百合的花粉管經由花柱往胚囊生長時進行第二次有絲分裂以形成兩個精細胞。生殖核分裂成二個精核，花粉管向子房內的胚珠延伸，穿入胚囊（雌配子體）。而雌蕊的子



房內含多個胚珠，胚珠內有一個大孢子母細胞（ $2n$ ），經減數分裂形成四個大孢子（ n ）但僅有一個大孢子（胚囊細胞）存活，續經數個有絲分裂形成胚囊，胚囊內含八個細胞、一個卵、兩個極核、兩個輔助細胞、三個反足細胞。當花粉管將兩個精細胞送至胚囊進行雙重受精時：一個精核與卵結合形成受精卵並發育成胚（ $2n$ ）；另一個精核和兩個極核結合形成胚乳核並發育成胚乳（ $3n$ ）〔4-5〕（圖 a）。

圖 a、(http://cgblue.cgsh.tc.edu.tw/wordpress/cst/wp-content/uploads/sites/32/2017/04/04_課本_ch4-p150-154.pdf)

花粉粒最具特色的構造即是在減數分裂後會立刻形成細胞壁，基本上花粉細胞壁可分為外壁與內壁：外壁由生物性聚合物孢粉素所構成，為花粉粒提供多種保護，包含抗紫外線、抗病菌、防止失水等；另外壁上的溝孔可作為花粉管萌發的出口，並方便對外界物質進行吸收，能隨著滲透壓改變大小，收縮則可以避免水分散失。三溝孔花粉通常出現在雙子葉植物，而單溝孔花粉出現於單子葉植物；內壁則是位於外壁與原生質體間，是纖維素及果膠所構成〔6〕（圖 b）。

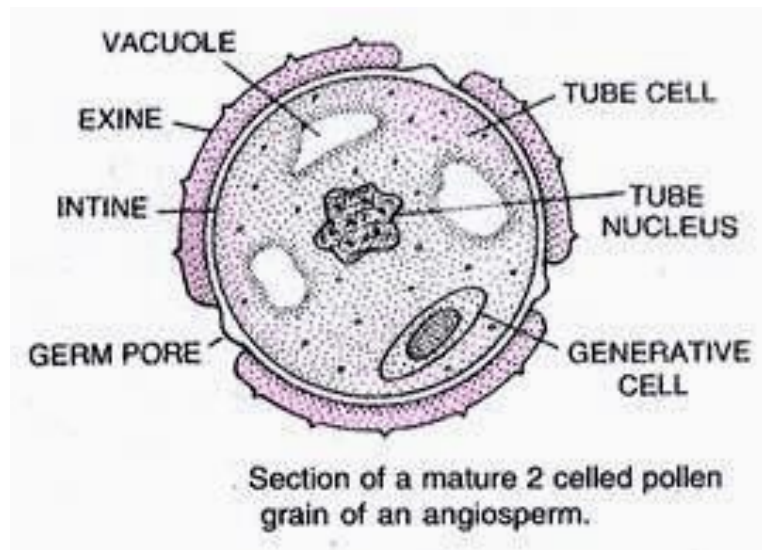


圖 b、(<http://www.biologiks.co.in/home/archives/01-2017>)

(三) 花粉管

百合的花粉管是一個研究細胞極性生長及細胞骨架和囊泡運輸的理想體系。花粉管的生長為典型的頂端生長，當花粉管由花粉粒內壁突出，其內壁受營養細胞內壓增加，花粉外壁的萌發溝因而向外伸出細管，花粉管前端由囊泡攜帶酵素分解花柱，後端由高基氏體分泌胼胝體，形成胼胝栓。當花粉管穿過花柱沿著花柱伸向子房時，花粉粒中的內容物全部都集中到花粉管的前端，花粉管主要作用將攜帶的精子和其他內容物運至卵器或卵細胞內，達到受精的作用。花粉管是雄配子體的一部分，在開花植物中，含有精細胞的花粉粒（雄配子體）必須經過萌發形成萌發管，才能將精細胞送入在雌蕊子房胚珠內的雌配子體（胚囊），完成受精〔4,7〕（圖 c）。

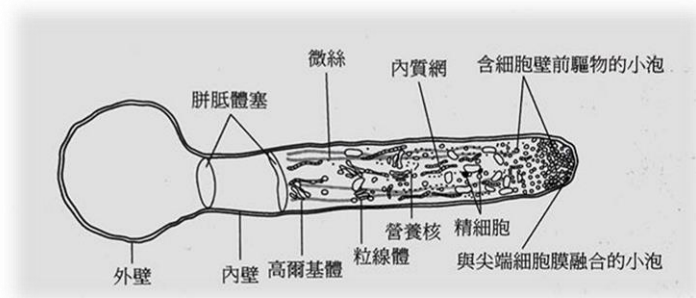
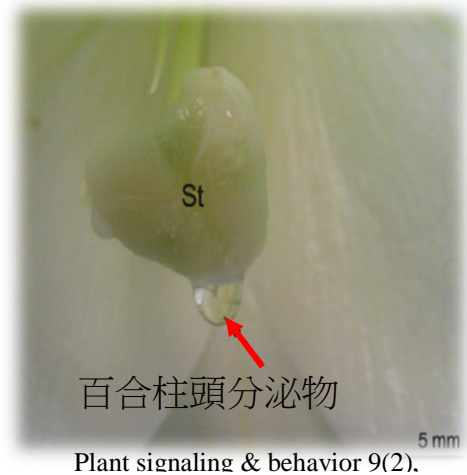


圖 c、(王淑美(2006)。植物生理學。台北縣：藝軒出版)

(四) 柱頭及柱頭分泌物

柱頭位於雌蕊的頂端位置，是接受花粉的部位，柱頭成熟時為花粉萌發提供必要的物質與信號。其中擬柱頭組織又稱為傳遞花粉的組織，為與柱頭組織有明顯的細胞及生理上相似性的組織，一般它的位置在花柱中央，具有濃厚細胞質的一束細胞，主要作為花粉管進入花柱的通路，同時會給予發育的花粉管營養〔8〕。一般柱頭膨大成各式各樣的形狀，可分為乾柱頭與濕柱頭。乾柱頭：在被子植物中極為常見，這類柱頭在傳遞花粉時通常不產生分泌物，但柱頭表面存在親水性的蛋白質薄膜和角質層，能從薄膜下角質層的中斷處吸收水分，所以生理上這層薄膜與濕柱頭的分泌相似，十字花科（阿拉伯芥）、石竹科植物和鳳梨、蓖麻、月季等，以及禾本科植物的水稻、小麥、大麥、玉米等屬於此類型〔7〕。濕柱頭：當傳粉時，有的柱頭表面濕潤，表皮細胞分泌水分、糖類、脂類、酚類、激素、酶等物質，並成為花粉萌發提供必要的基質，例如：菸草、百合、蘋果、豆科類植物〔8〕。當花粉粒傳送到雌蕊柱頭上，與柱頭相互作用下，被柱頭接受的有親和性的花粉粒，吸水膨脹後，內壁經外壁上的萌發孔會形成花粉管。花粉粒中貯存的酶和各種代謝物質，是花粉萌發的重要因素並為花粉管的最初生長提供了物質基礎。濕性柱頭表面的分泌物可提供前述重要物質為花粉萌發提供了必需的基質，此外柱頭分泌物亦可有效協助花粉粒附著於柱頭上，進而促進（確保）花粉能順利萌發並成功地完成雙重受精的重要使命〔9〕。



(五) 影響花粉萌發的因素

1. 溫度

花粉管萌發對於溫度極為敏感，溫度過高或過低，其生長速率都會減低。阿拉伯芥的相關研究中指出，花粉萌發與花粉管生長皆與溫度變化有關，在 22°C 時阿拉

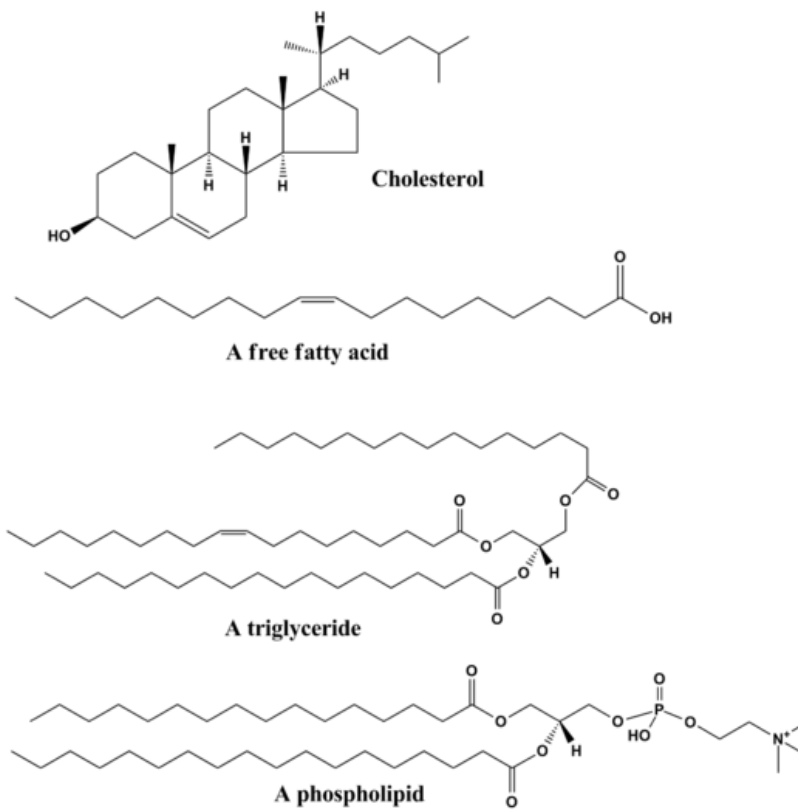
伯芥花粉萌發率高達 80%，但是高於或低於 22°C 時，萌發率則會顯著降低〔10〕。因此找到適合的花粉萌發溫度是本實驗非常重要的控制變因。

2. 花粉壽命

花粉成熟離開花藥後，活力會急速下降。例如水稻花藥裂開後，花粉活力會在五分鐘後降低至 50% 以下、玉米花粉壽命約 1 天；果樹則能維持數週到數個月〔11〕。因此如何儲存與延長花粉壽命是非常重要的研究課題。

(六) 酯類(Lipids)

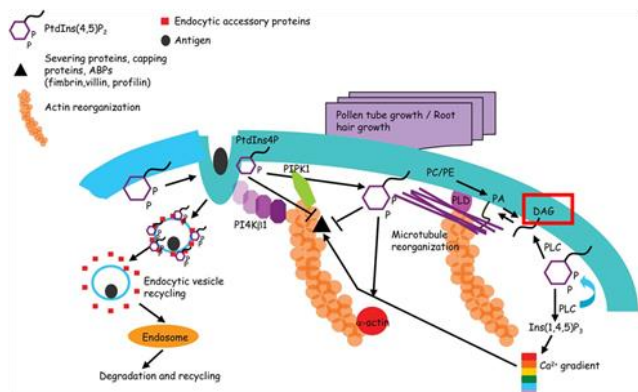
酯類主要分成中性酯類(Neutral lipids)與極性酯類(Polar lipids)兩種類型。中性酯類包含三酸甘油酯 (Triacylglycerols, TAGs)、雙酸甘油酯 (Diacylglycerols, DAGs)、單酸甘油酯 (Monoacylglycerols, MAGs)、固醇酯 (Sterol esters)、固醇 (Sterols) 與脂肪酸 (Fatty acids)。三酸甘油酯被認為是能量儲存最主要的形式，儲存在油滴之內〔12〕。磷脂 (Phospholipids) 則是極性酯類最主要的成分。磷脂為兩性分子，一端為親水的含氮或磷的頭，另一端為疏水（親油）的長烴基鏈。磷脂親水端相互靠近，疏水端相互靠近，構成脂雙分子層，成為細胞中所有膜狀構造的主要成分。磷脂是生物膜的主要組成分，分為甘油磷脂與鞘磷脂兩大類，分別由甘油和鞘氨醇構成。甘油磷脂依照結構主要包含 Phosphatidic acid (PA)、Phosphatidylethanolamine (PE)、Phosphatidylcholine (PC)、Phosphatidylserine (PS)、Phosphatidylinositol (PI)、Phosphatidylinositol phosphate (PIP)、Phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) 與 Phosphatidylinositol trisphosphate (PIP3)。鞘磷脂依照結構主要包含 Ceramide phosphorylcholine、Ceramide phosphorylethanolamine 與 Ceramide phosphoryllipid〔13〕。



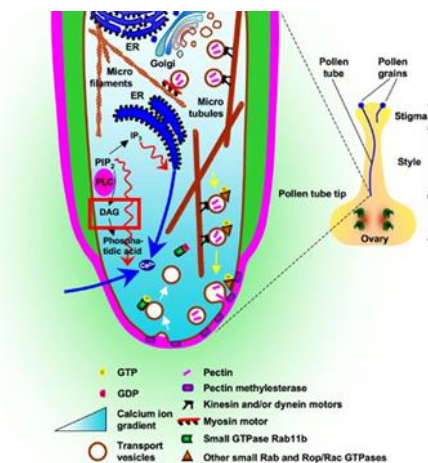
(<https://zh.wikipedia.org/wiki/脂類>)

(七) 花粉管萌發時酯類的變化

許多不同種類的脂質是信號分子或是次級訊息傳遞訊號系統的一部份。例如，雙酸甘油酯 (DAG) 及 PIPs 和蛋白激酶 C 以鈣來引導的活化有關。鈣離子在花粉萌發和花粉管生長過程扮演非常重要的角色。花粉管壁的構築需要鈣離子的幫忙；之前的研究也指出，外源的鈣離子在適當的濃度 (0.1~1mM) 對於非洲鳳仙花粉萌發率僅有提升的效果 [14]。花粉管萌發過程中，PIP₂ 會被 Phospholipase C (PLC) 降解成為肌醇 1,4,5-三磷酸酯 (1,4,5-trisphosphate, IP₃) 與 DAG。IP₃ 會刺激內質網釋放出鈣離子；DAG 則又會再被代謝生成磷酯酸 (Phosphatidic acid)，而磷酯酸又會再促進鈣離子通道的打開，讓外面的鈣離子進入花粉管內，提高花粉管內的鈣離子濃度，提供給花粉管壁生成的材料。另外，鈣離子濃度提高則能夠提高 PLC 的活性，進一步提高花粉管內的鈣離子濃度。



Biochem.J.(2009)421,145–156



Developmental Biology 303 (2007) 405–420

(八) 薄層色層分析 (thin layer chromatography, TLC)

薄層層析為最常用於酯類組成份分析的方法。吸附劑如矽或礬土均勻塗佈在鋁片、膠片或玻璃板上形成薄層，作為層析固定相 (stationary phase)，再將混合物試樣點附在此薄層固定相上，以液體展開劑作為流動相 (mobile phase)，透過毛細作用由下往上移動。由於不同的化合物與靜相之吸附力和流動相間溶解度的差異，當展開劑上升、流經所吸附的試樣點時，吸附力弱的物質移動快，吸附力強的移動慢。由於各種物質移動的速率不同，使混合物最後在靜相薄層上分開達到分離目的。一個化合物在層析片上上升的高度與展開劑上升高度的比值，是化合物在該分析條件下的特性參數，稱為 Rf 值。利用 Rf 值，可以判斷兩化合物是否為相同的化合物。除了可用來判斷兩化合物是否為相同，也可用於決定混合物中至少含有多少種成分物、作為管柱層析沖提劑選擇的參考，或用來檢視分離純化方法的離析成效，還可以追蹤化學反應的進行程度〔15〕。

(九) 液相色譜法-質譜聯用 (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS)

LC-MS 是一項具有非常高的敏感度和選擇性的非常強有力的分析技術，它使用於很多的領域。一般說來，它的使用方向是在多種其他化合物從在的復合混合物中，測出各種組分並有可能確定其詳細結構。〔16〕

液相層析法適用於純化大部分的化合物。液相層析儀最主要就是「動相式液體」，利用流動相 (mobile phase) 和固定相 (stationary phase) 的交互作用，當混合物進入系統內

時，不同成分的特性將決定物質在層析管柱內流動的快慢，再利用各成分移動速率之不同來分離。〔17〕

質譜儀是一種能夠判別樣品的元素組成或分子的分析儀器，其原理主要是利用離子之荷質比的不同加以分離各個離子，並測量其分子量。質譜儀之構造主要分成五個部份：樣品導入系統、離子源(ion source)、質量分析器(mass analyzer)、偵測器(detector)、質量處理系統(data analysis)。首先，利用導入系統將樣品導入，這些樣品會在離子源的地方產生電離，被分解成離子態，再藉由電場加速正離子之運動(電場方向會決定打出去的離子是帶正電或負電，在此，我們利用的是正離子)，使正離子變成離子束，打向質量分析器，而分析器處設有一個磁場，這些正離子在磁場中會受到垂直速度方向的磁力影響，因為荷質比的不同，造成之磁力便會不同，因此，各個正離子會根據不同磁力所造成的軌跡前進，接著撞擊在偵測器上，當離子撞擊偵測器時，連接著偵測器的電線會提供電子，用以中和離子使其恢復電中性，這些電子在電線上不斷移動，使電線產生電流，最後，質量處理系統根據這些電流大小進行分析，便可知道分離出來的粒子為何。〔18〕

(十) 基因槍技術

又被稱為生物彈道技術(Biolistic Technology) 或微粒轟擊技術(Particle Bombardment Technology),是 用火藥爆炸或者高壓氣體加速將包裹了 DNA 的球狀金粉或者鎢粉顆粒直接送入完整的組織或者細胞中的一種技術。它是基因轉移技術中的一種方法。其基本原理就是採用一種微粒加速裝置,使裹著外源基因的微米級的金或鎢(它們比重大, 而且化學性質都很穩定)顆粒獲得足夠的動量打入靶細胞或組織。〔19〕

三、研究目的

- (一) 探討種子與花粉間油脂成分的差異
- (二) 探討萌發前後花粉內油脂的變化
 - 1. 養分的循流方式
 - 2. 重要油脂的定序與定量
- (三) 探討加入柱頭分泌物會促進哪些油脂的消長

貳、研究方法

一、實驗材料

鐵炮百合、柱頭分泌物(*Stigma exudate*,SE)

二、一般化學藥品

異丙醇 (isopropanol)、C15 的三酸甘油酯(TAG-C15)、氯仿(Chloroform)、甲醇(Methanol)、1M 氯化鉀(KCl)、硫酸(H₂SO₄)、己烷(Hexane)、液態氮(N₂)、乙醚(diethyl ether)、乙酸(Acetic acid)、螢光染色劑(dye)

三、溶液

(一) 10X Germination medium 10%

	1X	10X
CaCl ₂	1.27mM	12.7mM
H ₃ BO ₃	0.162mM	1.62mM
KNO ₃	0.99mM	9.9mM

加 sucrose 10% + MQ(滅菌水)

(二) 中性酯展開液

	體積比(V/V/V)
Hexane	70
(C ₂ H ₅) ₂ O	30
CH ₃ COOH	1

(三) 磷酯展開液

	體積比(V/V/V)
CHCl ₃	32.5
MeOH	12.5
H ₂ O	2

四、設備

量筒、15ml 離心管、小培養皿、TLC 層析分離板、研鉢、磁石、載玻片、蓋玻片、微量吸管 Pipettement、微量離心管、Tank、秤量紙

五、儀器

單眼相機、烘箱、光學顯微鏡、抽氣櫃、恆溫水槽、電磁加熱攪拌器、pH 儀、立體顯微鏡、試管振盪器 Vortex Mixer、無菌操作台、離心機、震盪混合器、氣相層析儀、高壓滅菌器、桌上型離心機、恆溫箱、-86°C 超低溫冷凍櫃

六、百合花粉管萌發:

(一) 實驗材料

鐵炮百合、柱頭分泌物(Stigma exudate,SE)

(二) 花粉管萌發溶液(*Germination medium*)

	<i>1X</i>	<i>10X</i>
<i>CaCl₂</i>	<i>1.27mM</i>	<i>12.7mM</i>
<i>H₃BO₃</i>	<i>0.162mM</i>	<i>1.62mM</i>
<i>KNO₃</i>	<i>0.99mM</i>	<i>9.9mM</i>

加 *sucrose 10% + MQ(滅菌水)*

(三) 以錫箔紙避光，以 50 Revolutions Per Minute(RPM)均勻混和培養。

(四) 用光學顯微鏡拍照觀察，用輔助軟體 image j 計算萌發率

七、百合花粉與花粉管之總酯類萃取

(一) 用液態氮將種子、未萌發的花粉及萌發後的花粉磨成粉末狀

(二) 加入 3ml isopropanol(異丙醇)，置於 75 度的溫水中反應 15min(使內部蛋白質失活 保存更久)每 5min 搖勻一次

(三) 加入內標(IS Internal Standard)因為各試管萃取效率可能會不同，因此我們加入 C15 的三酸甘油酯作為內標(TAG-C15 因自然界沒有奇數碳)

(四) 加入 1.5ml 的氯仿和 0.6ml 的水

(五) 置於均質機反應 1 小時，後會出現分層----**第一次萃取**

(六) 將浮在上層的油吸出，置於乾淨的管子。

(七) 剩餘樣本以體積比 2：1 的 chloroform 和 MeOH(甲醇)用均質機萃取----**第二次萃取**

- (八) 再次將浮在上層的油吸出
- (九) 再次以體積比 2 : 1 的 chloroform 和 MeOH(甲醇)萃取至色白
- (十) 使用均質機效果更佳----**第三次萃取**
- (十一) 再次將浮在上層的油吸出，加入 1ml 1M 的 KCl，Vertex(均勻混和)，離心(3500RPM) 15min，丟掉上層。
- (十二) 下層溶液加入 2ml 的水，Vertex，離心(3500RPM) 15min，丟掉上層。
- (十三) 重複 11.
- (十四) 以氮氣吹乾

八、秤重

- (一) 秤每管微量離心管(Eppendorf)之原重
- (二) 用氯仿及甲醇回溶先前用氮氣吹乾的酯類並移入 Eppendorf
- (三) 以氮氣吹乾
- (四) 秤總重
- (五) 總重-管重=油脂淨重
- (六) 得到每克花粉/種子含幾克的油脂(g/g FW) *FW=free weight

九、薄層色層分析:

- (一) 實驗材料：矽膠薄層板(背面是玻璃)、烘箱、烤箱、濃硫酸、展開液、tank、圖畫紙、保鮮膜、待測油脂
- (二) 步驟：用烘箱 85°C 烤乾水分 (避免實驗誤差)，依比例配好展開液後，將展開液倒入 tank，放入圖畫紙讓展開液(配方如下)的揮發氣體均勻分布，後以保鮮膜封口，用 Chloroform, methanol 回溶稀釋先前吹乾的油。取 10 μ l 的油等間距滴上薄層板，間隔大約 1.5 公分，下方保留約 3 公分(避免倒流)，注意不可碰觸到薄層板以避免實驗誤差。確認圖畫紙吸滿展開液(大約 1hr)即可將準備好的薄層板放入，吸至距頂約 3cm 入 tank，放入圖畫紙讓展開液(配方如下)的揮發氣體均勻分布，後以保鮮膜封口，用

Cholorform, methanol 回溶稀釋先前吹乾的油。取 10 μ l 的油等間距滴上薄層板，間隔大約 1.5 公分，下方保留約 3 公分(避免倒流)，注意不可碰觸到薄層板以避免實驗誤差。確認圖畫紙吸滿展開液(大約 1hr)即可將準備好的薄層板放入，吸至距頂約 3cm 即可取出，均勻噴灑濃硫酸使之脫水碳化，後用烤箱 175°C 烤乾呈色，完成上述步驟及至暗處置於光板上拍照記錄。

1. 中性酯類展開液

體積比(V/V/V)

Hexane 70

(C₂H₅)₂O 30

CH₃COOH 1

2. 磷酯展開液

體積比(V/V/V)

CHCl₃ 32.5

MeOH 12.5

H₂O 2

參、研究過程

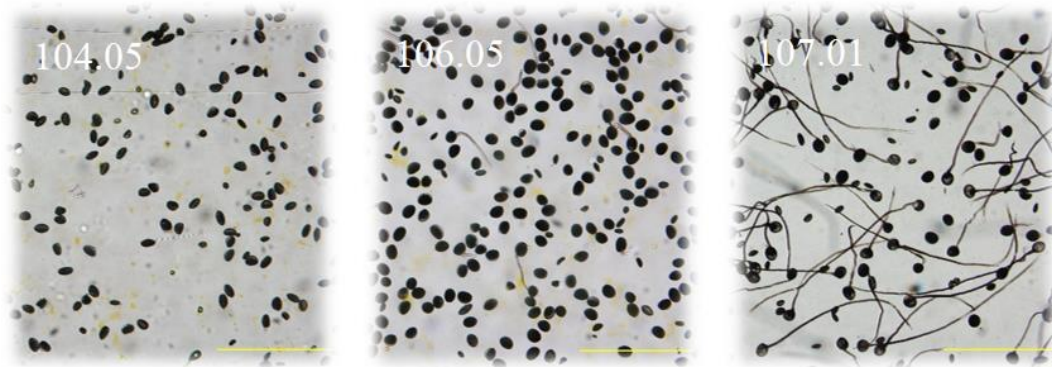
影響花粉萌發有以下幾個因素：萌發溫度、柱頭分泌物之濃度、花粉新鮮度、培養液新鮮度。我們首先進行前導實驗，試圖找出花粉萌發試驗的最佳條件。

一、實驗一：花粉新鮮度對百合花粉萌發率之影響。

(一) 操縱變因：分別使用儲存 1 個月(107.01)、9 個月(106.05)、33 個月(104.05)的花粉

(二) 步驟：秤每盤花粉各 0.005g，將配好的花粉和溶液置於 28°C 恆溫箱中回溫 1 小時，相互間隔 15 分鐘將 2ml 的培養液加入培養皿(共 3 盤)，再放回恆溫箱內的振盪混和器待其萌發。之後每隔 1 小時用光學顯微鏡觀察其萌發狀況並拍照。

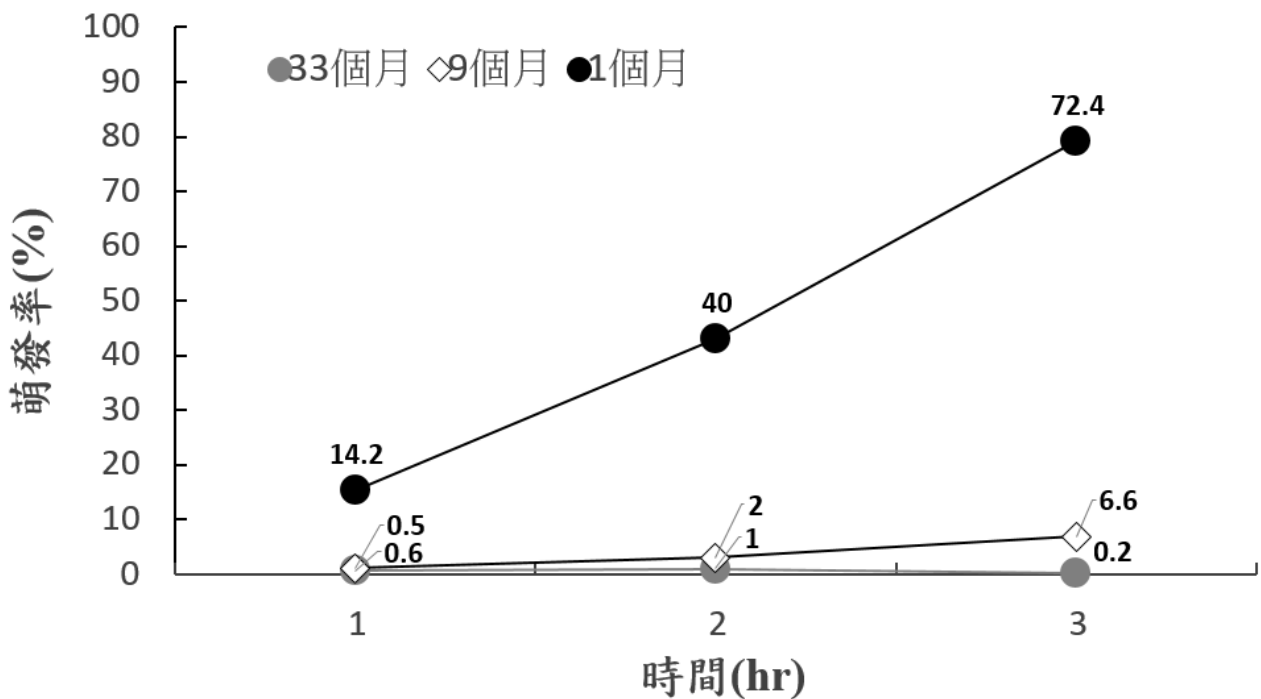
(三) 結果顯示：如圖一所示，儲存 33 個月和儲存 9 個月的花粉萌發率甚低，使其充分萌發 3hr 後，萌發率分別只有 0.2% 及 6.6%，而儲存 1 個月的花粉在 3hr 則有 72%，可知花粉新鮮度對於花粉萌發率有很大的影響。



33 個月

9 個月

1 個月



圖一、花粉新鮮度對百合花粉萌發率之影響。

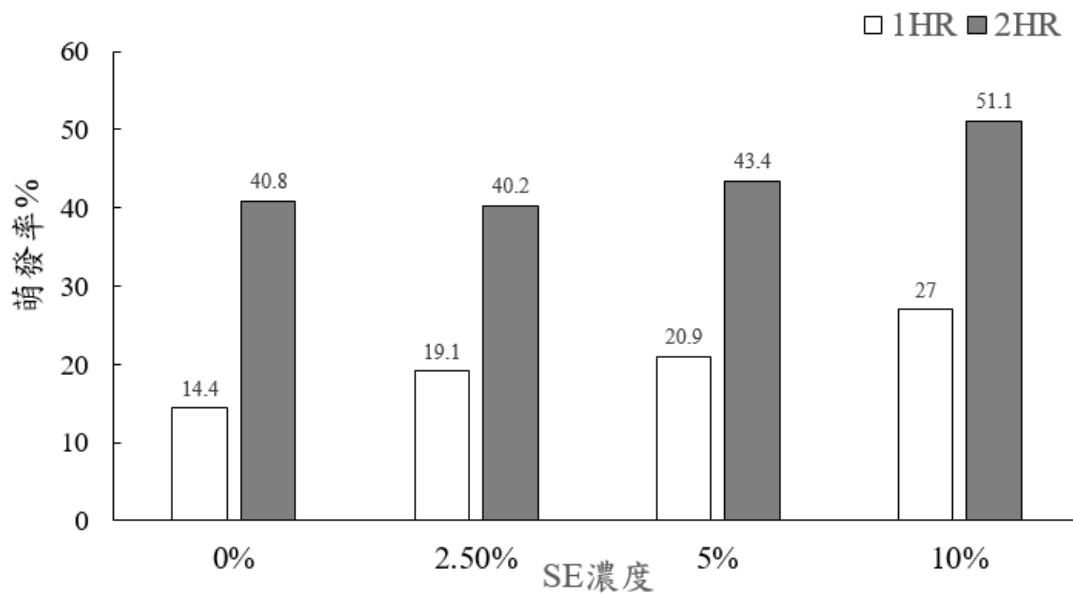
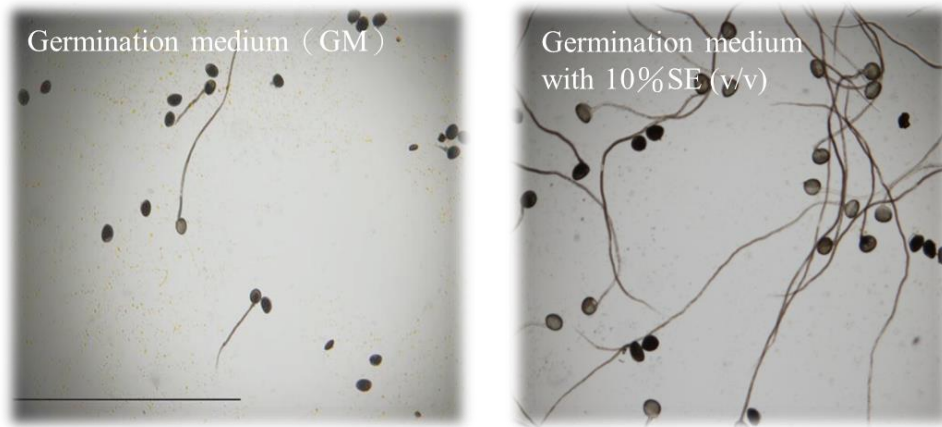
二、實驗二：柱頭分泌物(SE, Stigma exudate)的濃度對於百合花粉萌發率之影響

(一) 操縱變因：0%、2.5%、5%、10%的 SE

(二) 步驟：將培養液分為 4 管，分別配置成含 0%、2.5%、5%、10% SE 的溶液各

2ml。秤每盤花粉各 0.005g，將配好的花粉和溶液置於 25°C 恆溫箱中回溫 1 小時，相互間隔 15 分鐘將 2ml 的培養液加入培養皿(共 4 盤)，再放回恆溫箱內的振盪混和器待其萌發。

(三) 結果顯示：如圖二所示，經兩小時萌發後，加入 2.5%SE 的花粉萌發率和 0%SE 相差不多，加入 5%SE 的花粉萌發率比 0%SE 多出了 3.4%，而加入 10%SE 則有最顯著差異，比未加入 SE 的萌發率高出約 10%。



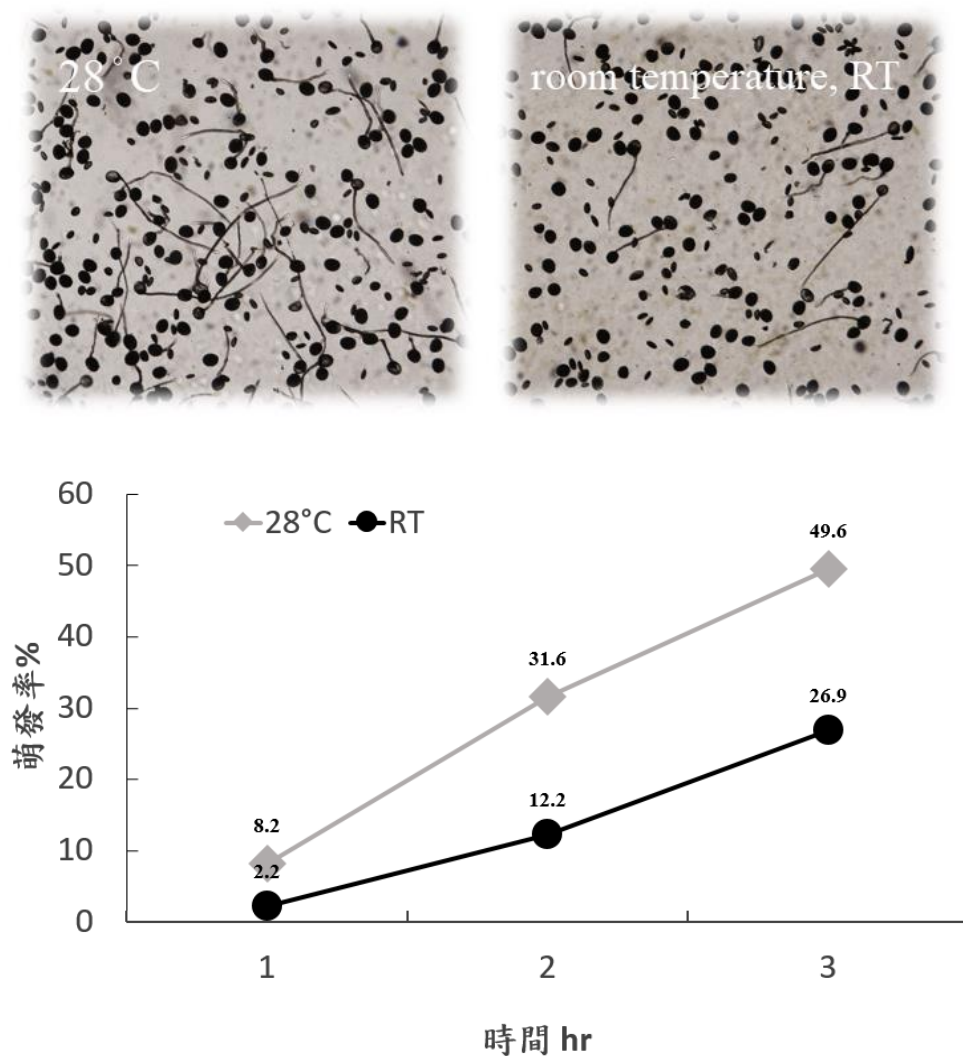
圖二、柱頭分泌物的濃度對於百合花粉萌發率之影響。

三、實驗三：溫度對於百合花粉萌發率之影響。

(一) 操縱變因：28°C 與室溫(約 25°C)

(二) 步驟：每盤花粉各秤 0.005g 後，將配好的花粉和溶液置於 28°C 的恆溫箱與室溫中回溫 1 小時。相互間隔 15 分鐘將 2ml 的培養液加入培養皿(共 2 盤)，再放回恆溫箱內的振盪混和器待其萌發，之後每隔 1 小時用光學顯微鏡觀察其萌發狀況並拍照。

(三) 結果顯示：如圖三所示，在 28°C 下萌發，花粉萌發率明顯較室溫為高(高出約 23%)。顯示百合花粉萌發實驗對溫度的改變非常敏感，本實驗適合在 28°C 下進行試驗。



圖三、28°C 與室溫(room temperature, RT) 對於百合花粉萌發率之影響。

根據上列之實驗，我們知道最佳的條件為：

使用新鮮花粉並以含有 10%SE 培養液於 28°C 的溫暖環境下讓花粉萌發

四、實驗四：花粉與花粉管油滴觀察

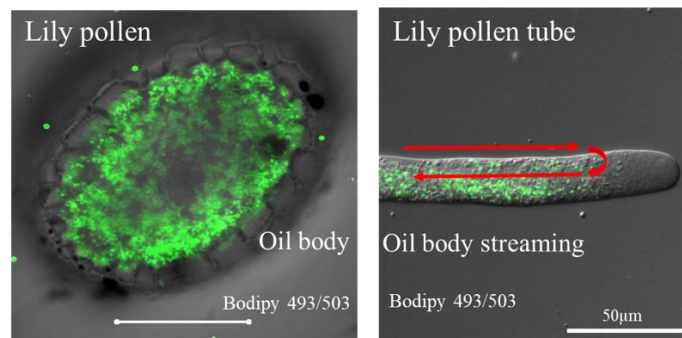
由前面的研究結果顯示，花粉內的油酯與花粉的萌發息息相關，因此我們想透過油滴的螢光染劑 Bodipy593/503 將花粉內的油滴染色後，觀察油滴在花粉管內的變化。

(一) 操縱變因：花粉與花粉管

(二) 步驟：花粉利用 Bodipy593/503 染色後進行花粉萌發，在顯微鏡下觀察油酯狀況。

(三) 結果顯示：

由圖四所示，花粉內的油滴非常多。花粉萌發生長後，油滴會在花粉管內隨著花粉管生長由兩側向前流動至花粉管尖端後，再由中間往後回流。實驗室學長姊解釋這就是花粉管內的細胞質巡流現象(Cytoplasmic streaming)。因此我們推測，花粉內含的油滴會隨著細胞質巡流到花粉管的尖端，提供花粉管生長所需要的能量與組成份。



圖四、花粉萌發的油滴觀察

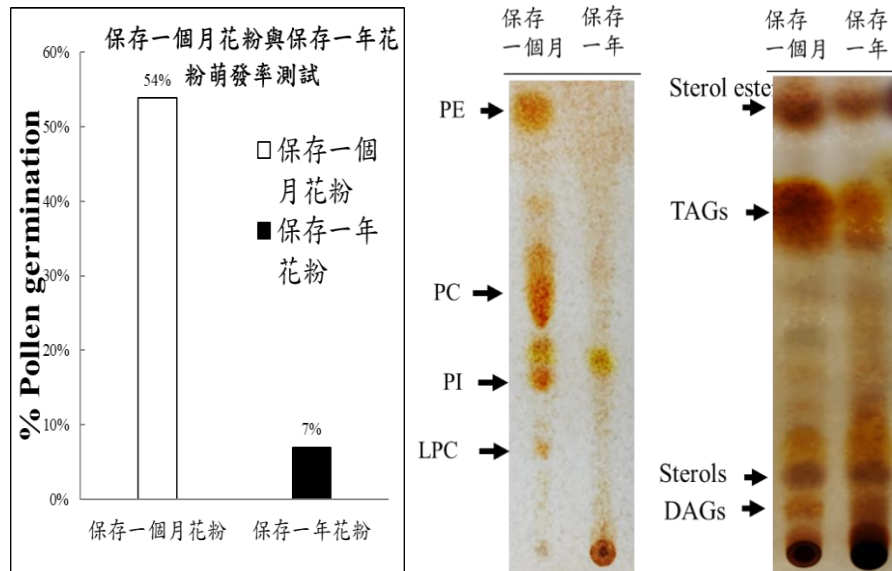
五、實驗五：儲存時間對於花粉油酯的影響

(一) 操縱變因：保存一年與一個月的百合花粉

(二) 步驟：由於儲存的時間對於花粉萌發的活力有很大的影響，隨著保存時間增加，花粉萌發的活力會急遽降低，因此我們想知道花粉萌發的活力的下降是否與花粉內的油酯變少有關。因此我們使用保存一年與一個月的百合花粉萃出總酯類後，以薄層分析法分離中性與極性脂。

(三) 結果顯示：

由圖五所示，由實驗室學姐所做花粉萌發試驗，測試保存一個月與一年的花粉之間的萌發率，結果發現保存一個月的花粉萌發率遠高過保存一年的花粉。我們透過薄層分析法觀察保存一個月與一年花粉之間的油酯有沒有差異，結果發現在保存一年的花粉中，無論是中性酯或是極性酯類都減少許多，所以花粉內的油酯會隨著儲存時間而減少，因此我們認為花粉內含的酯類與花粉萌發有正相關。



圖五、儲存時間對於花粉油酯的影響

六、實驗六：百合種子、花粉與萌發後花粉之酯類之比較

(一) 操縱變因：百合種子、花粉與萌發後的花粉管

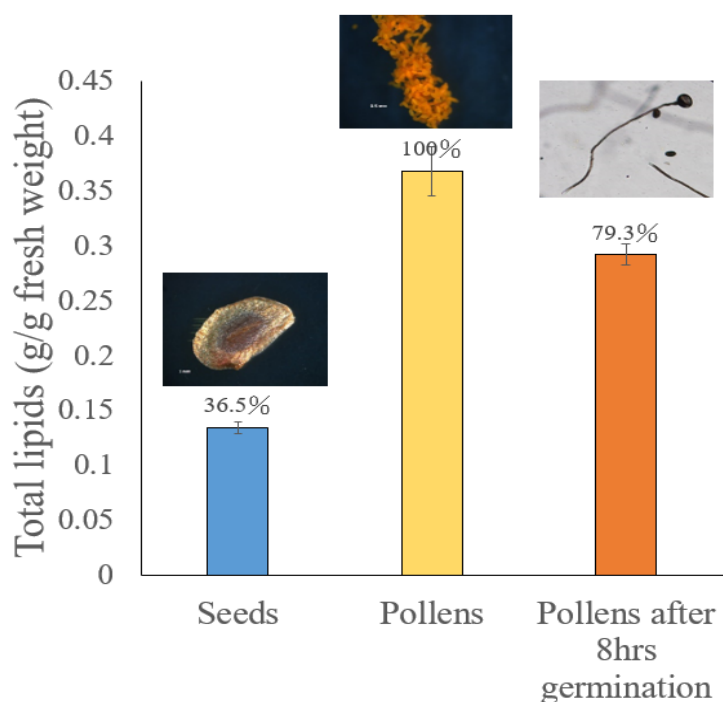
(二) 步驟：根據上述前測實驗所得出的結果，我們使用 107.01 的新鮮花粉、現配的培養液(二者混合前需回溫 1 小時)，並置於 28°C 的恆溫箱下待其萌發。本次實驗我們改用 0.05g 的花粉，並將萌發時間延長至 8hr。先前實驗進行時使用量少導致一點誤差便影響了實驗結果，而且反應時間不夠充分(或許只是未萌發不代表不會萌發)許多算進萌發數的花粉常常只是冒出一點花粉管，為了避免如此我們這次改用大量(0.05g)的花粉，並給予充分反應時間。每項樣本秤 0.05 克後，種子與花粉依照研究方法二的總酯類萃取方法萃取脂類後秤重。花粉萌發後的樣本則依照研究方法一所寫花粉管萌發方法，萌發 8 小時後，萃取總酯類後秤重。

(三) 結果顯示：

如圖六所示，我們首先比較百合種子與花粉之間的酯類重量，原本我們以為富含油脂的種子會高於花粉，但我們意外發現花粉內含的油脂重量比種子高出約 63.5%，由於花粉管萌發所需的能量完全依靠花粉內儲存的酯類提供，且花粉管萌發必須短時間完成，因此我們認為花粉萌發時所需要的酯類對於花粉管的萌發非常重要。

為了證明酯類對於花粉萌發的重要性，我們進一步研究花粉在萌發後有多少的酯類被消耗掉。如圖六，花粉萌發前後油脂含量減少了約 20%，推測酯類在花粉萌發過程

中，扮演著提供給花粉管萌發的能量與花粉管組成分的角色。



圖六、百合種子、花粉與萌發後花粉之酯類比較

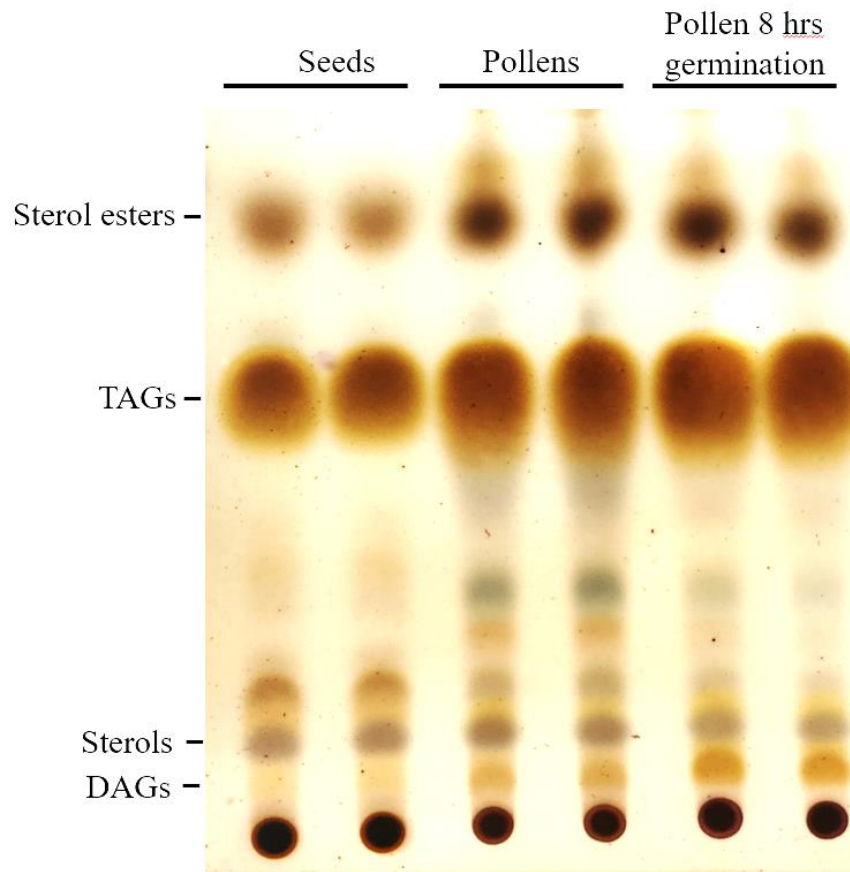
七、實驗七：種子、花粉與萌發後的花粉間的中性酯類差異

(一) 操縱變因：百合種子、花粉與萌發後的花粉管

(二) 步驟：為了進一步了解種子、花粉與萌發後的花粉間的油脂差異，我們透過薄層分析法分離不同的酯類進行比較。種子、未萌發花粉、萌發 8hr 萃出總酯類後，以薄層分析法分離中性脂。

(三) 結果顯示：

如圖七所示，相較於種子，花粉內有較多的固醇酯(Sterol esters)、三酸甘油酯(TAGs)與雙酸甘油酯(DAG)。推測這些中性酯類就是花粉較種子多的酯類成份。花粉萌發 8 小時後，相較於花粉萌發前固醇酯有些微減少；三酸甘油酯則沒有明顯變化，但固醇(Sterols)有明顯減少。此結果與圖六對比後，發現花粉在萌發過程所減少的約 20%並不是中性酯類，因此我們推測花粉管萌發過程中，中性酯類的重要性較低。另外我們也發現 DAG 有明顯增加，因為 DAGs 為生物體重要的訊息傳遞訊號，所以我們進一步進行了極性酯類的薄層分析比較。

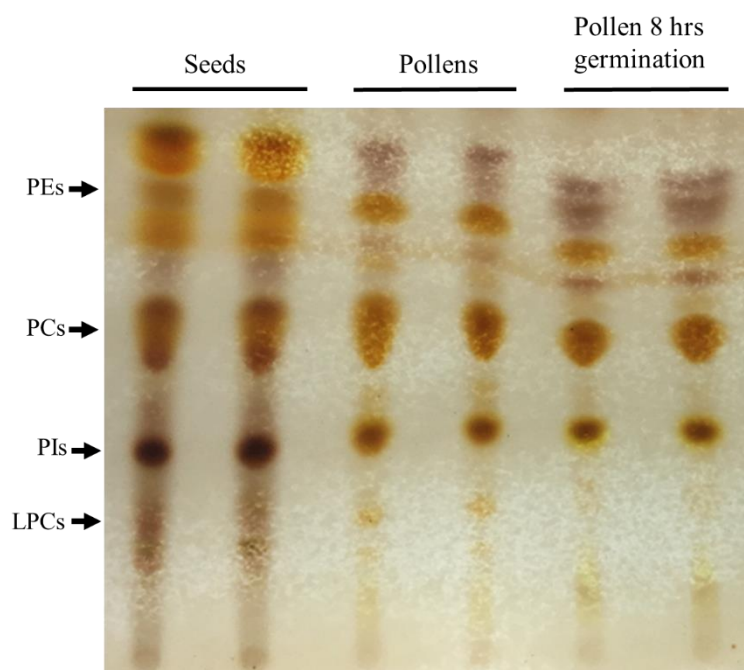


圖七、百合種子、花粉與萌發後的花粉管之中性酯類比較

八、實驗八：種子、花粉與萌發後的花粉間的極性酯類差異

- (一) 操縱變因：百合種子、花粉與萌發後的花粉管
- (二) 步驟：種子、未萌發花粉、萌發 8hr 萃出總酯類後，以薄層分析法分離極性脂。
- (三) 結果顯示：

圖八所示，相較於花粉，種子內有較多的 PIs、PCs 與 LPCs，但 PE 則是花粉較多。花粉萌發 8 小時後，相較於花粉萌發前 PEs、PCs、PIs 與 LPCs 都有明顯減少，此結果與圖六對比後，發現花粉在萌發過程所減少的約 20% 主要為極性酯類，因此我們推測花粉管萌發過程中，極性酯類的重要性較中性酯類高。



圖八、百合種子、花粉與萌發後的花粉管之極性酯類比較

九、實驗九：柱頭分泌物(SE, Stigma exudate)對於花粉之酯類代謝分析

由之前的實驗結果顯示，柱頭分泌物的添加能有效提升花粉的萌發率(如圖二)，我們好奇是否柱頭分泌物能加速花粉內的某種酯類代謝，進而提升花粉的萌發率。本次實驗為了要比較出有添加柱頭分泌物與未添加之間的差別，縮短萌發時間(1-3 小時)，避免萌發時間太長萌發率都達到最高而無法比較。

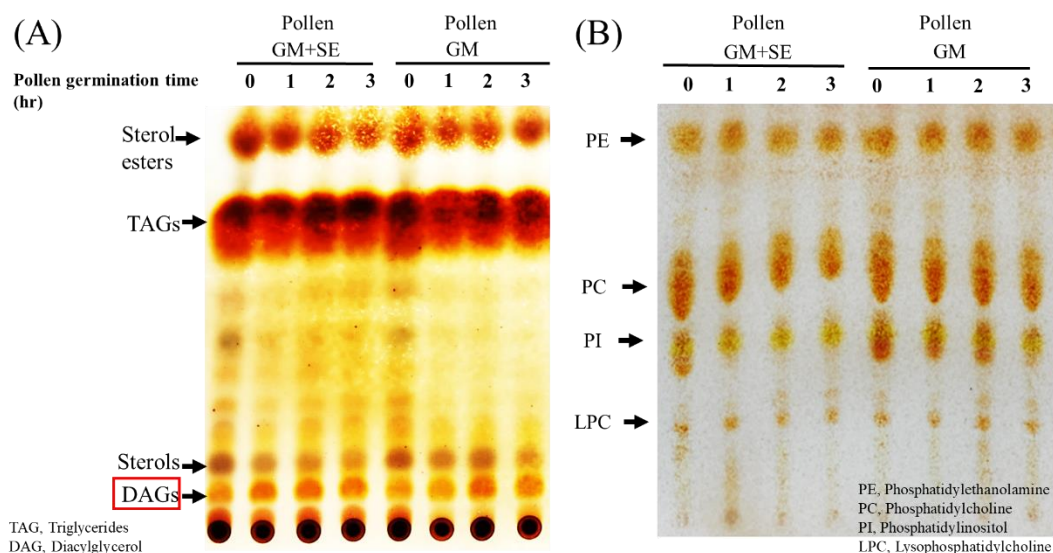
(一) 操縱變因：百合花粉未添加與添加柱頭分泌物

(二) 步驟：將培養液分為 6 管，3 管配置成 10% SE 的溶液各 2ml，另外 3 管則無添加 SE。秤每盤花粉各 0.005g，將配好的花粉和溶液置於 25°C 恆溫箱中回溫 1 小時，相互間隔 15 分鐘將 2ml 的培養液加入培養皿(共 4 盤)，再放回恆溫箱內的振盪混和器待其分別萌發 1、2 與 3 小時後，與未萌發的花粉(0 小時)一起萃取總酯類後進行薄層分析。

(三) 結果顯示：

圖九(A)所示為中性酯類的消長情形，添加柱頭分泌物並未有明顯提高固醇酯與三酸甘油酯減少速率，但固醇在添加柱頭分泌物 1-2 小時都較未添加的少，顯示固醇的降解

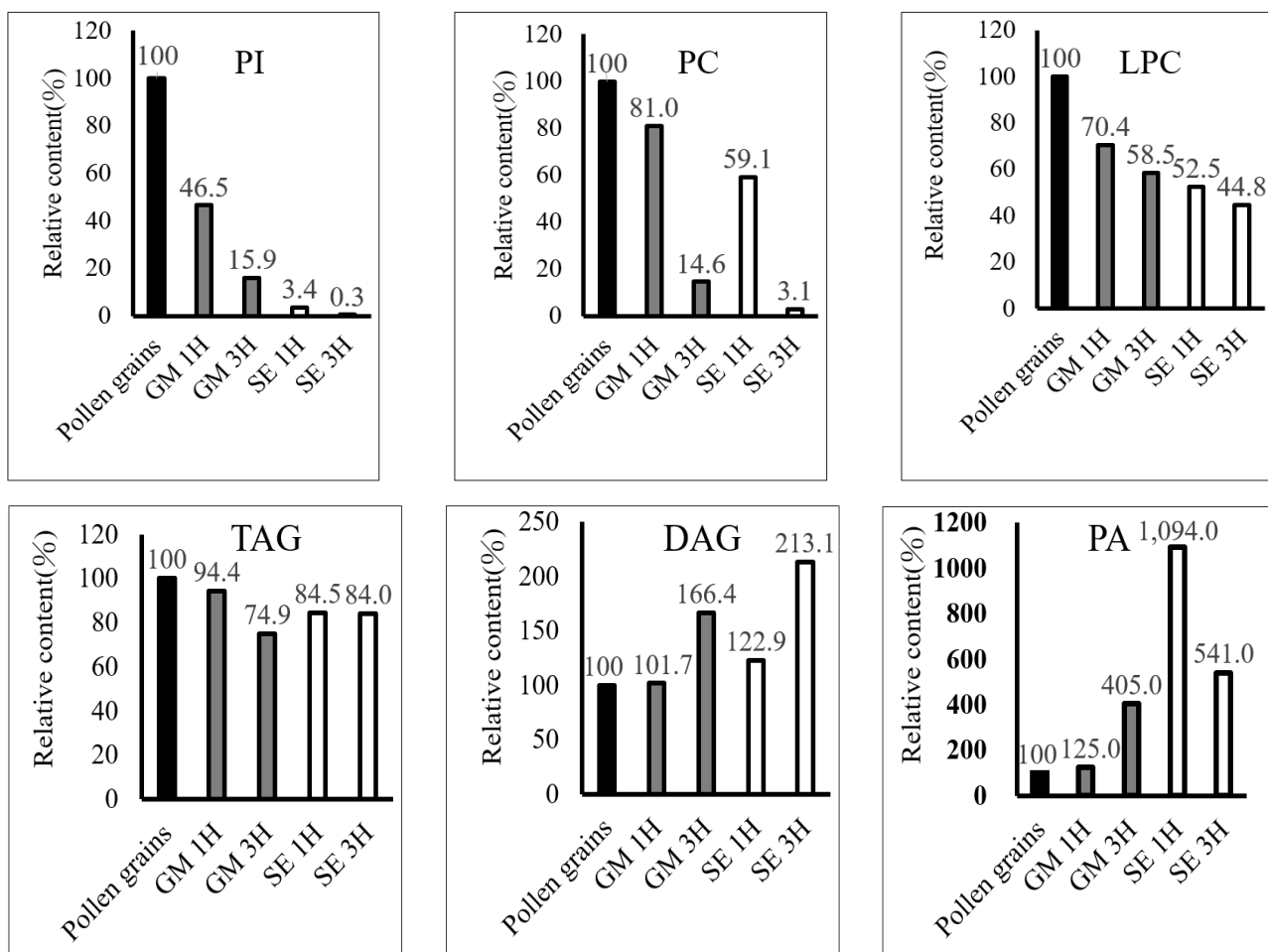
速率在添加柱頭分泌物後增加。而添加柱頭分泌物的實驗組的雙酸甘油酯則在添加 1 小時顯著的高於未添加的控制組，顯示在添加柱頭分泌物後增加雙酸甘油酯的生成速率。圖九(B)所示為極性酯的消長情形，添加柱頭分泌物後 PCs 與 PIs 快速減少，PIs 尤其明顯。因此我們可以知道柱頭分泌物主要是加速了 PCs 與 PIs 的降解，與雙酸甘油酯的生成。



圖九、柱頭分泌物(SE, *Stigma exudate*)對於花粉之酯類代謝分析

十、實驗十：酯類的定量

- (一) 操縱變因：比較添加 10%SE 後萌發 0hr、1hr、3hr 之間各種脂類的含量變化
- (二) 步驟：為了進一步確認花粉萌發前後內部酯類變化的多寡，以及添加 10%SE 對花粉萌發過程中酯類代謝產生的影響，我們將花粉內部酯類萃取出來後，利用 LC-MS 檢測花粉管萌發過程中酯類的變化。
- (三) 結果顯示：如圖一所示，添加 SE 後提高了 PCs, PIs 與 LPCs 的降解速率，其中以 PCs 與 PIs 最為顯著。而添加 SE 後 TAG 的降解速率反而減緩，DAG 的生成則明顯增加，而 PA 更是快速生成後再降解。因此我們推測 SE 的處理提升了 PCs 與 PIs 降解成為 DAG 及其後續反應的速率。



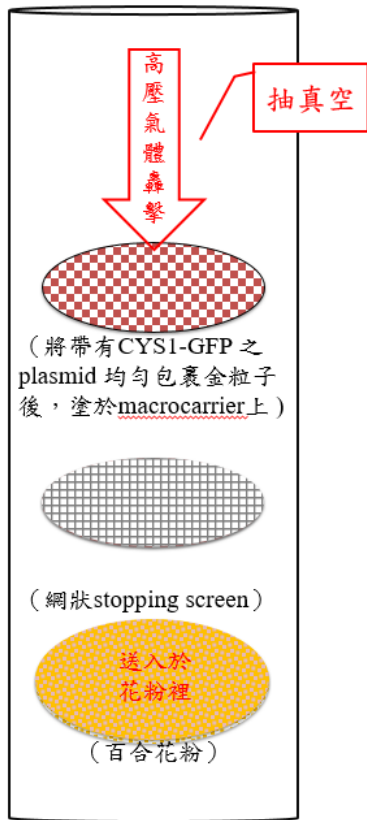
圖十、花粉內部酯類含量的比較

十一、實驗十一：花粉管萌發之 DAG 分布變化

(一) 操縱變因：比較有無添加 10%SE 的花粉 DAG 分布變化

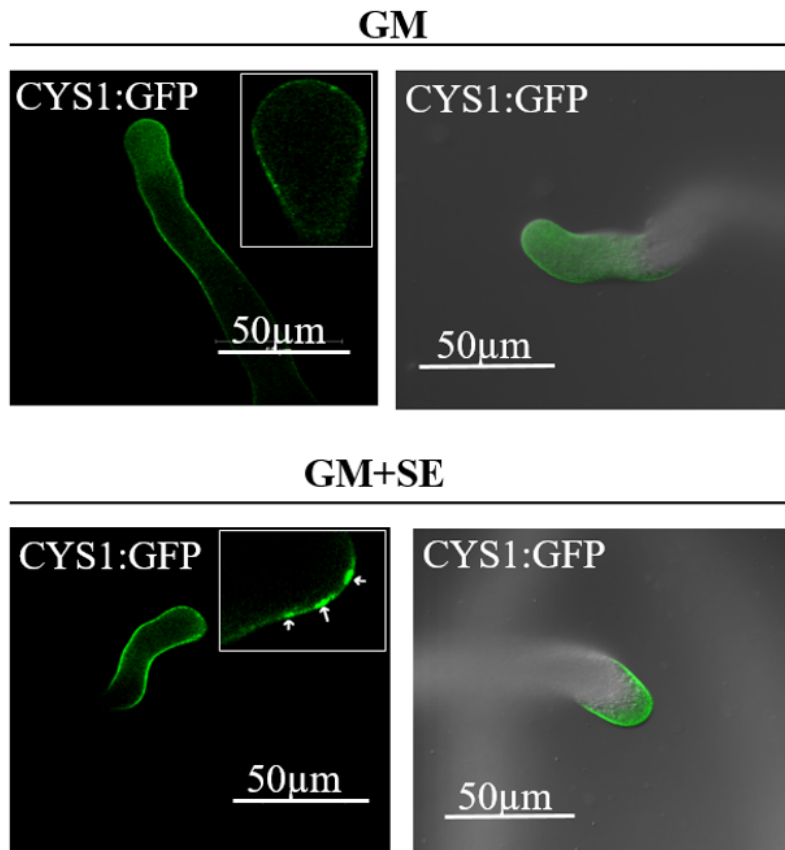
(二) 步驟：DAG 磷酸化成 PA 後能促使鈣離子通道打開，讓外源性的鈣離子進入花粉管，進而促進花粉管之萌發。因此我們將帶有 CYS1-GFP 之 plasmid 均勻包裹金粒子後，塗於 macrocarrier 上。運用高壓氣體加速將包裹了的球狀金粉子直接送入花粉後，用共軛焦顯微鏡觀察花粉生長過程的 DAG 分布。

(三) 結果顯示：如圖十二所示，經 SE 處理後的花粉管內之 CYS1:GFP 之訊號較強，且有在花粉管尖端聚集之現象。因此我們可以得知經 SE 處理可促進花粉管萌發時 DAG 的生成。



CYS1:GFP – binding DAG fluorescent protein

圖十一、基因槍示意圖



圖十二、花粉管萌發之 DAG 分布

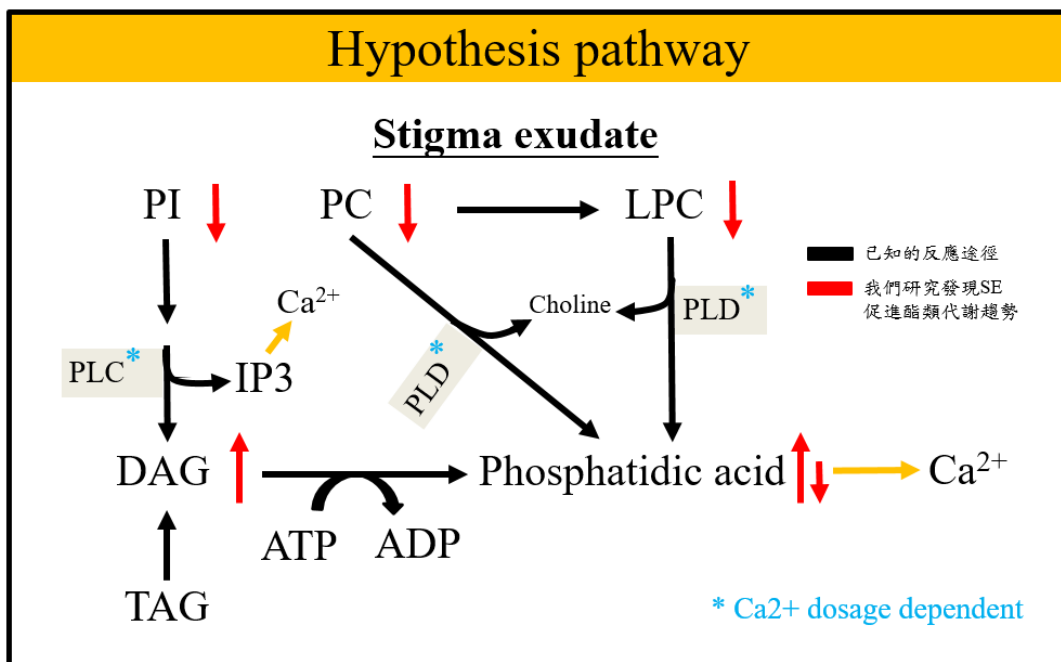
肆、結論與應用

長久以來，許多研究觀察發現成熟的花粉粒內含有許多的油體，但是對這些油體的功能及其後續的代謝過程所知相當有限。我們的研究結果顯示這些儲存於油體中的酯類對於花粉萌發及後續花粉管生長扮演了十分重要的角色。因為，當花粉粒於低溫儲存過久，會導致儲存於油體的酯類逐漸降解，因此花粉幾乎不會萌發。此外，由於花粉萌發會造成這些儲存性酯類的種類及含量發生改變，因此意味著花粉內酯類代謝與其萌發有關，並提供給花粉管萌發的能量與組成成分。在進一步分析後發現花粉在萌發過程所減少的酯類約 20% 為極性酯類 (相較於花粉萌發前 PEs、PCs、PIs 與 LPCs 都有明顯減少)，可見極性酯類的重要性較中性酯類高。在另一個實驗中我們發現添加 SE 後 PCs 與 PIs 快速減少，PIs 尤其明顯。因此可以知道柱頭分泌物主要是加速了 PCs 與 PIs 的降解，與 DAGs 的生成。其中又以 PIs 最為特殊，從結果可以知道 PIs 在花萌發後有明顯消耗，而且其也是 SE 處理後所主要促進消耗的

酯類，因此可以斷定 PIs 在花粉萌發的過程中扮演了重要的角色。

由於在先前實驗中我們已經發現了 PA 的訊號於是我們利用 LC-MS 確認此物質為 PA。發現萌發過程中花粉內部的 PAs 含量會逐漸增加，而添加 SE 更能促進 PAs 的快速生成再降解，因此我們推測添加 SE 能夠促進 PCs/PIs 降解，PIs 磷酸化成 PIP2 後經過 PLC 的水解生成 IP3 以及 DAGs，IP3 能促使粗糙內質網釋放內源性的鈣離子，而 DAGs 繼續磷酸化成 PAs 後，促使膜上的鈣離子通道打開，讓外源性鈣離子進入花粉管內。而 PCs 在經過 PLD 水解後，也能形成 PAs 讓鈣離子進入花粉管內。

在未來，我們會利用染劑將鈣離子染色，觀察鈣離子的分佈是否和 DAGs 一致，除此之外我們會使用 PLC 以及 PLD 的抑制劑，確認阻斷反應途徑後，SE 是否還能促進花粉管的生長。



伍、參考文獻

- [1] 江佩倫，百合花粉與蘇鐵雌配子體中油體蛋白的基因選殖與分析，國立中興大學生物科技學研究所博士論文
- [2] <https://zh.wikipedia.org/wiki/麝香百合>
- [3] <http://kplant.biodiv.tw/鐵炮百合/鐵炮百合.htm>
- [4] 李家維、徐歷鵬、崔文慧、張立雪、黃壁祈、葉開溫、鍾楊聰編（2002）。生物學（第四版）。偉明圖書有限公司及培生教育出版股份有限公司聯合出版。
- [5] <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=64748>
- [6] <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=64747>
- [7] <http://www.twword.com/wiki/花粉管>
- [8] <http://www.twword.com/wiki/柱頭>
- [9] <http://cht.a-hospital.com/w/花粉粒>
- [10] 劉賢祥(1992)。植物生理學。臺北市：徐氏出版
- [11] 王淑美(2006)。植物生理學。台北縣：藝軒出版
- [12] <https://zh.wikipedia.org/wiki/脂類>
- [13] <https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid>
- [14] 黃誼欣、黃蓉與王苓侃，「鈣」是奇才-探討鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長的影響，中華民國第四十八屆中小學科學展覽會作品
- [15] <https://www.ch.ntu.edu.tw/~genchem99/doc/tech->
- [16] <https://zh.m.wikipedia.org/zhtw/%E6%B6%B2%E7%9B%B8%E8%89%B2%E8%AD%9C%E6%B3%95-%E8%B3%AA%E8%AD%9C%E8%81%AF%E7%94%A8>
- [17] <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=63412>
- [18] <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=2626>
- [19] <https://www.itsfun.com.tw/基因槍/wiki-5988217-1507096>
- [20] 邱捷湘，鐵炮百合柱頭分泌物之促進花粉萌發因子分離與活性分析，2016 暑期生大學生培育計畫書面報告

【評語】 060006

有關本研究，建議如下：

1. 實驗之題目清楚且聚焦，對相關研究有所貢獻。
2. 實驗設計周延、論述完整，但數據必須要有三次重複及統計分析，以免結論有所偏差。
3. 海報資料具邏輯性，了解結果之意義及限制。
4. 了解與花粉萌發及花粉管生長的基本科學原理，了解結果之釋義及限制。