

投稿類別：生物類

篇名：

探討鈣離子對於非洲鳳仙花粉生長之影響

作者：

溫信安。私立樹德家商。高三 01 班

蔣昕宏。私立樹德家商。高三 01 班

指導老師：

李冠徵老師

陳樺亭老師

壹●前言

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。在教科書內容中，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。

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。

貳●正文

一、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。

二、研究設備與材料

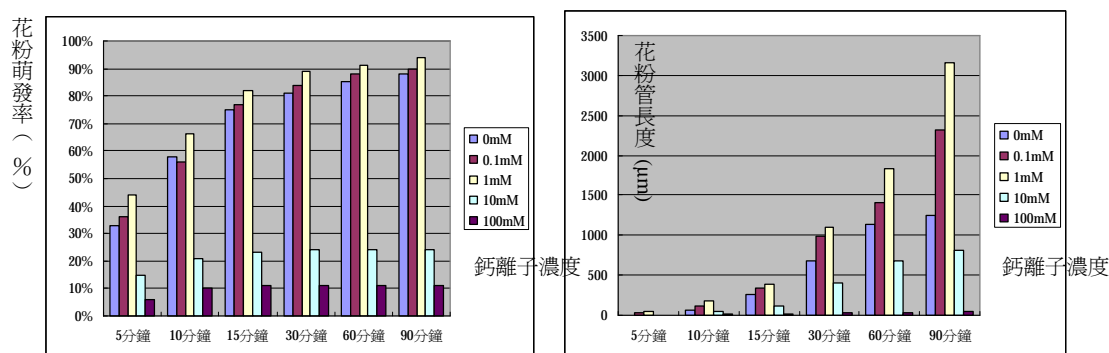
- (一) 實驗材料與藥品：蔗糖、氯化鈣、硝酸亞鈷、EGTA、硝酸、硫酸、鹽酸、廣用試紙(以上藥品廠牌皆為日本藥品株式會社)蒸餾水、非洲鳳仙花。
- (二) 實驗器材：燒杯、試管、滴管、秤量紙、藥匙、量筒(?)、複式顯微鏡(Olympus)、數位相機(Nikon)、微量天平(?)。

三、研究過程

- (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
 - 1. 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°C)。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。(結果見圖一)

2. 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。(結果見圖二)



圖一、外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

圖二、外源鈣離子對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

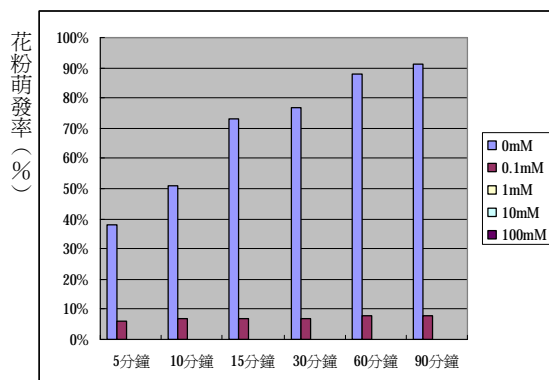
(二) 觀察 EGTA 對於非洲鳳仙花花粉生長的影響，探討花粉內源鈣離子之可能角色

1. 非洲鳳仙花粉之內源鈣離子為花粉萌發所必須

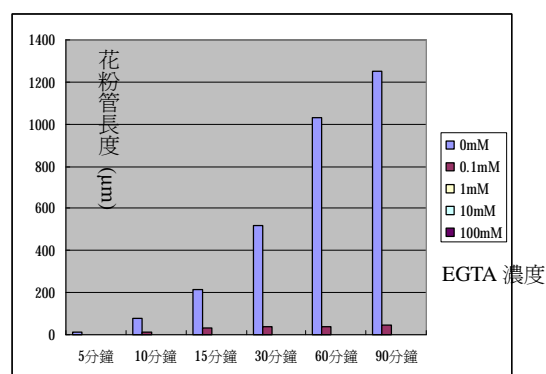
觀察 EGTA (鈣離子螯合劑) 對於非洲鳳仙花粉萌發的影響(溶液條件：7.5%蔗糖溶液、pH6.8、23°C)。發現低濃度的 EGTA (0.1mM) 即對鳳仙花粉萌發有強烈的抑制作用，1mM 的 EGTA 即完全抑制花粉萌發。而對照組不需添加外源鈣離子即能有頗高花粉萌發率，此現象暗示非洲鳳仙花粉內有供給萌發所需的鈣離子，在不給予外源鈣離子仍可進行萌發動作，且由 EGTA 的處理組可以看出花粉之內源鈣離子的確為鳳仙花粉萌發所必需。(結果見圖三)

2. 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°C)。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。(結果見圖四)



圖三、EGTA 對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



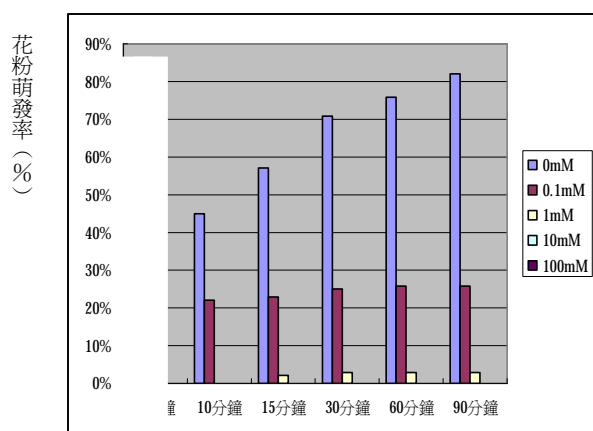
圖四、EGTA 對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

(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

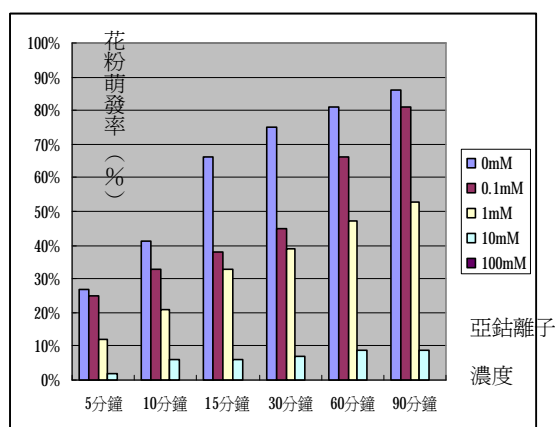
1. 非洲鳳仙花粉內鈣離子通道的正常運作是調節萌發所必須

觀察亞鈣離子(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°C)。發現隨著亞鈣離子濃度的增加，鳳仙花粉萌發率也隨之下降。1mM 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(結果見圖五)。

2. 為了避免亞鈣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 Verapami l (鈣離子通道阻截劑)，發現隨著 Verapami l 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為花粉萌發所必須(結果見圖六)。



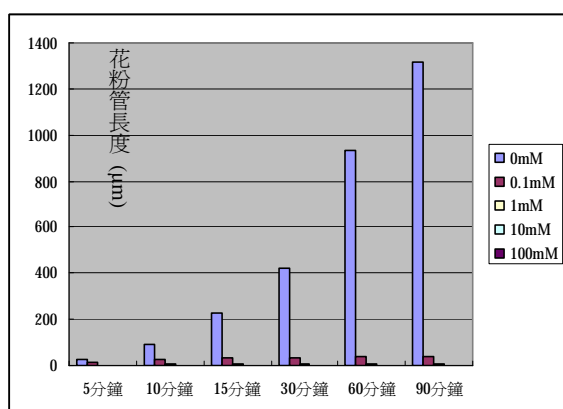
圖五、亞鈣離子對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



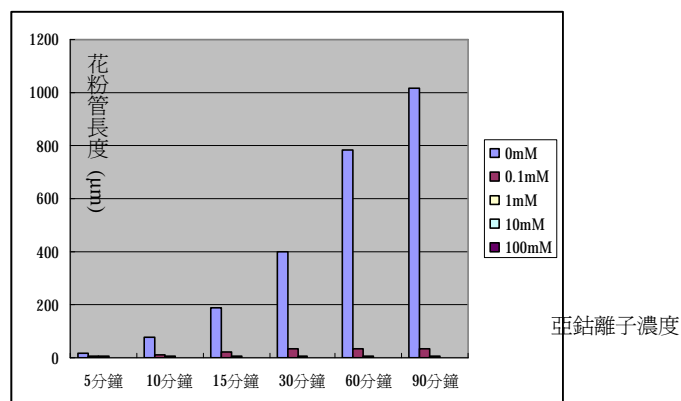
圖六、Verapami l 對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

(四) 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

1. 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°C)。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(結果見圖七)，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生長的必備條件。
2. 使用專一性較高的 Verapami l (鈣離子通道阻截劑)，發現低濃度之 Verapami l 即有強烈抑制花粉管延伸的現象。相較於花粉萌發率而言，Verapami l 對於花粉管延伸的抑制作用更為顯著。綜合以上結果，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(結果見圖八)。



圖七、亞鈷離子對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

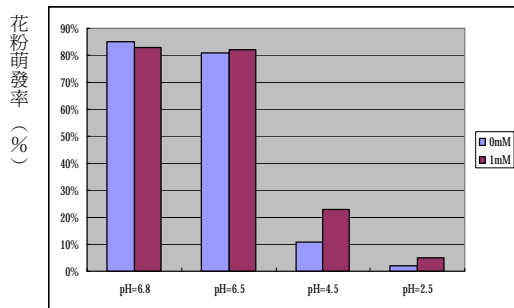


圖八、Verapami l 對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

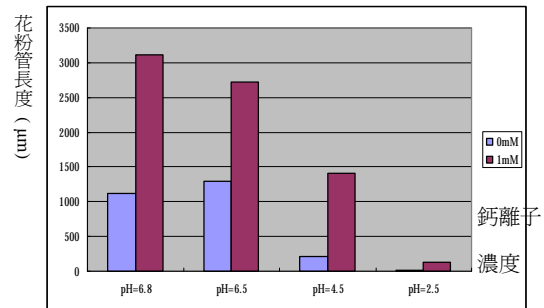
(五) 觀察不同 pH 值時(仿酸雨逆境)，外源鈣離子對於可能促進非洲鳳仙花粉生長的情形

1. 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°C)。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(結果見圖九)。
2. 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)。



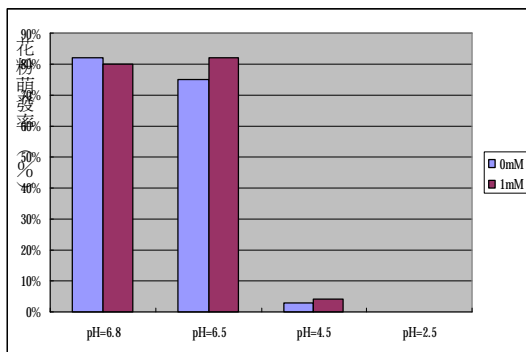
圖九、硝酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



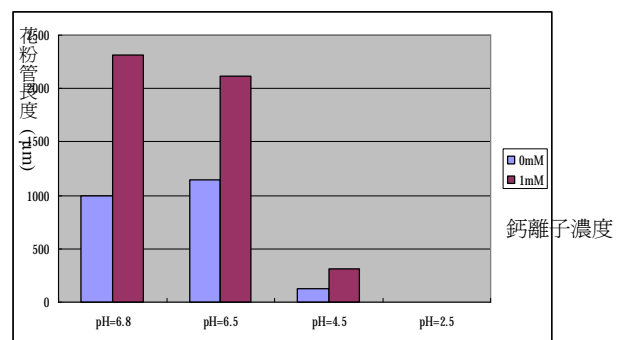
圖十、硝酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

(六) 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。

1. 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°C)。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(結果見圖十一)。
2. 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(結果見圖十二)。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。



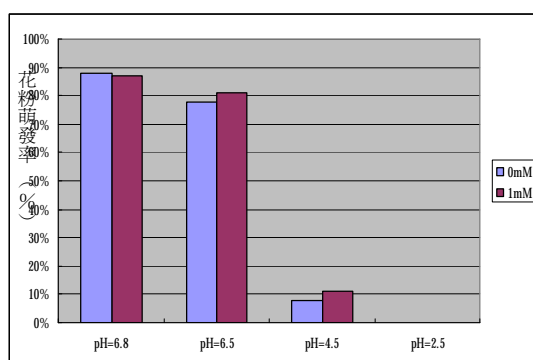
圖十一、鹽酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



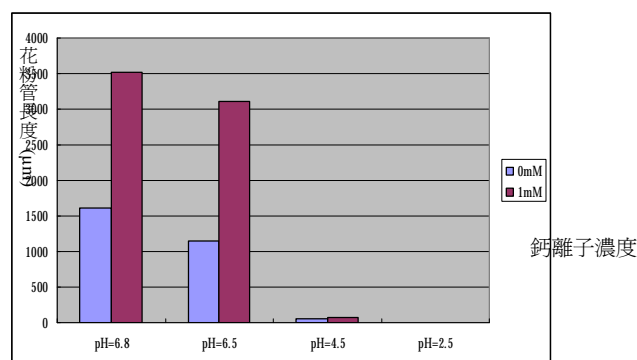
圖十二、鹽酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

(七) 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

1. 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°C)。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(結果見圖十三)。
2. 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(結果見圖十四)。



圖十三、硫酸對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響

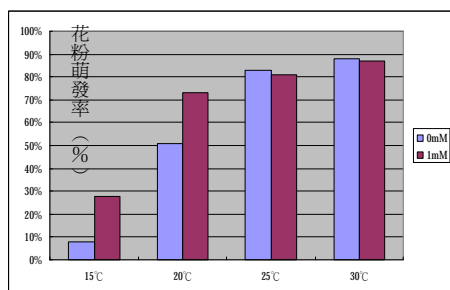


圖十四、硫酸對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

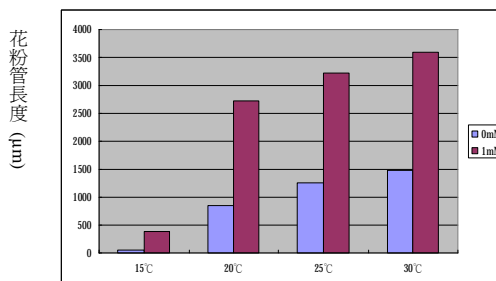
(八) 外源鈣離子明顯促進非洲鳳仙花粉管在低溫中的生長

1. 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°C 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(結果見圖十五)。
2. 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°C 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(結果見圖十六)。在這系列實驗

中，我們得知在 15°C 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。



圖十五、溫度對於非洲鳳仙花粉萌發率的影響



圖十六、溫度對於非洲鳳仙花粉管延伸長度的影響

參●結論

根據實驗結果顯示，室溫下(23°C)，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。

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（ $\text{pH}=4.5$ ）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。

肆●引註資料

- 註一、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。
- 註二、林學聖、彭淑媛（1995）。「精卵的鵲橋—花粉管之研究」。中華民國第34屆國中組生科科展作品。
- 註三、王月雲（1982）。漫談花粉生理。科學教育月刊，51期，73~81
- 註四、Bush, D. S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **46**, 95–122
- 註五、Callewaert, G., Gleeman, L., and Monad, M. (1989). Caffeine-induced Ca^{2+} extrusion via $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger in cardiac myoplasmic. *Am. J. Physiol.* **257**, C147–C152
- 註六、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.

- 註七、Endo, M. (1977). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* **57**, 71–108.
- 註八、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.
- 註九、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.