

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060007

參展科別 植物學

作品名稱 阿拉伯芥個體間防禦訊息根部傳遞之研究

得獎獎項 大會獎：一等獎

突尼西亞國際工程與科技展覽會

出國正選代表

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中學

指導教師 陳逸然、朱秋欣

作者姓名 陳勇安

關鍵詞 根部遠端訊號(long distance signaling)、
阿拉伯芥、AtCAPE peptide

作者簡介



從國小第一次接觸科展便熱愛上從事實驗，至今是我的第五件科展作品，在每一次的科展裡都不斷蛻變成長，各階段所學皆不相同，各種挑戰，各種挫折，在一次次打擊下，抬起頭來，突破，如此的循環，越是大風大浪，越是堅強，在汗與淚的交織下，收成蜜果越是甜美，這種成就感的喜悅，無可替代，這就是我熱愛的科展。

摘要

在植物中，對於外在威脅能有效進行防禦一直是個非常重要的課題，而此實驗在探討植物彼此間經由根部傳遞的防禦訊息與生理防禦機制。

利用鹽刺激使其根部分泌出 AtCAPE1 胜肽進行防禦訊息的傳遞，[以證實阿拉伯芥防禦訊息確實可經由根部進行彼此的溝通](#)，且可利用擁有正常基因的植株提升突變株的防禦能力。

結合 AtCAPE 此種植物體內少有被發現的胜肽進行實驗，並提供了許多延續實驗，為植物防禦系統闢出一條大道。

Abstract

In plants, the effective defense against external threats has always been a very important topic, and this experiment is to explore the defense messages and physiological defense mechanisms transmitted by plants through the roots.

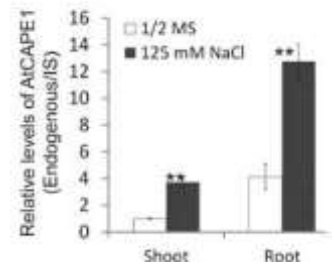
Salt stimulation stimulates the roots to secrete AtCAPE1 peptides for defense message transmission, to confirm that Arabidopsis defensive messages can communicate with each other via roots, and plants with normal genes can be used to enhance the defense ability of mutants.

Combined with AtCAPE, the few peptides found in the plant were tested and provided many continuation experiments to create an avenue for the plant defense system.

壹、研究動機與背景

植物就如同動物，個體間的防禦訊息傳遞扮演著非常重要的角色，而植物，可協調各式各樣的防禦機制進行個體間溝通，為了要提供種族生存之延續，目前知道植物可藉由荷爾蒙，小分子等，進行防禦反應，但是有一類物質仍然研究非常少-胜肽的防禦訊號 CAPE，當接收到外界環境刺激之時，植物生理中會大量表達出 CAPE 的前驅基因，誘導出抗逆境之反應。

關於 CAPE 之研究，最早是在番茄發現(Ying-Lan Chen,2014)，而番茄 SolCAPE1 與抗病及抗蟲相關，因為其在個體間有高保留度，因此在阿拉伯芥中還發現 AtCAPE9 與抗病相關之後研究也發現了阿拉伯芥 AtCAPE1 胜肽是抗鹽的-調控因子(Pei-Shan Chien, 2015)，即含 AtCAPE1 胜肽愈多，愈無法抗鹽，其研究發現 AtCAPE1 胜肽會在根部大量表達(如圖一)。



圖一：AtCAPE1 胜肽表現位置

根部會因鹽逆境大量的表現此段 AtCAPE1 胜肽，但此段胜肽訊號會被分泌出嗎？又分泌後是否能夠順利傳遞到個體間？他株植物能夠順利地接收訊號並表達出來嗎？希望能藉此實驗探討此項結合胜肽防禦訊息傳遞的機制研究！

貳、研究目的

- 一、證明阿拉伯芥可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至其他個體。
- 二、研究阿拉伯芥藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之防禦機制。

參、研究流程



圖二：研究流程圖

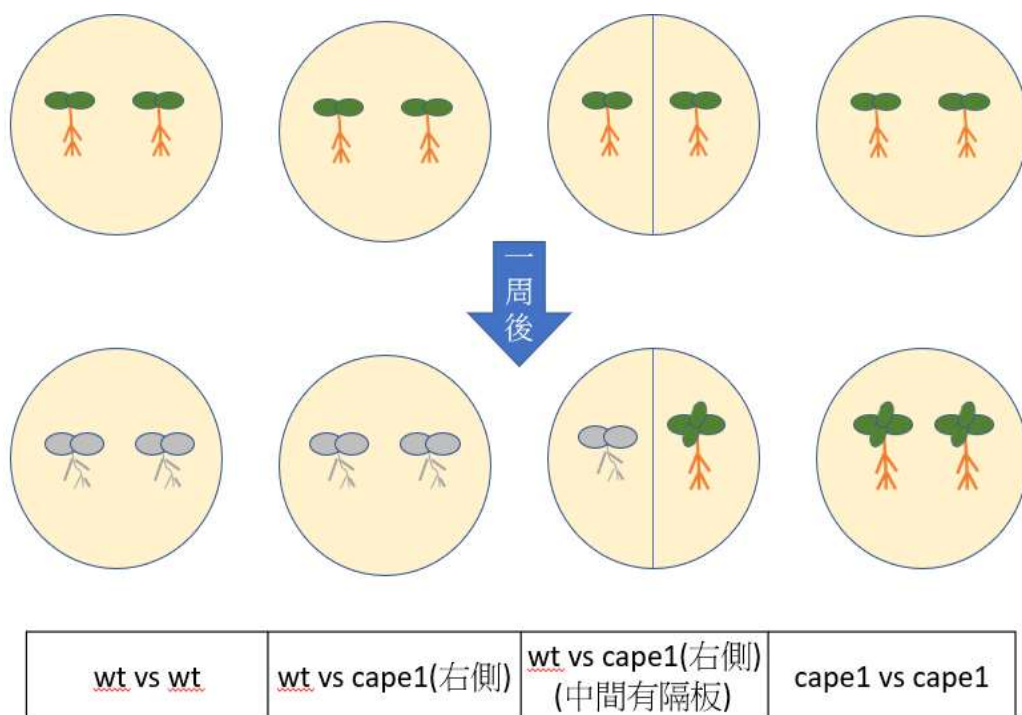
肆、研究方法

一、研究假設：

(一)利用是否接收到由根部分泌出去之 AtCAPE1 胜肽此段胜肽荷爾蒙，而表現出相對應之表徵，來判斷是否能夠藉由根部分泌出胜肽防禦訊號傳送至其他個體。

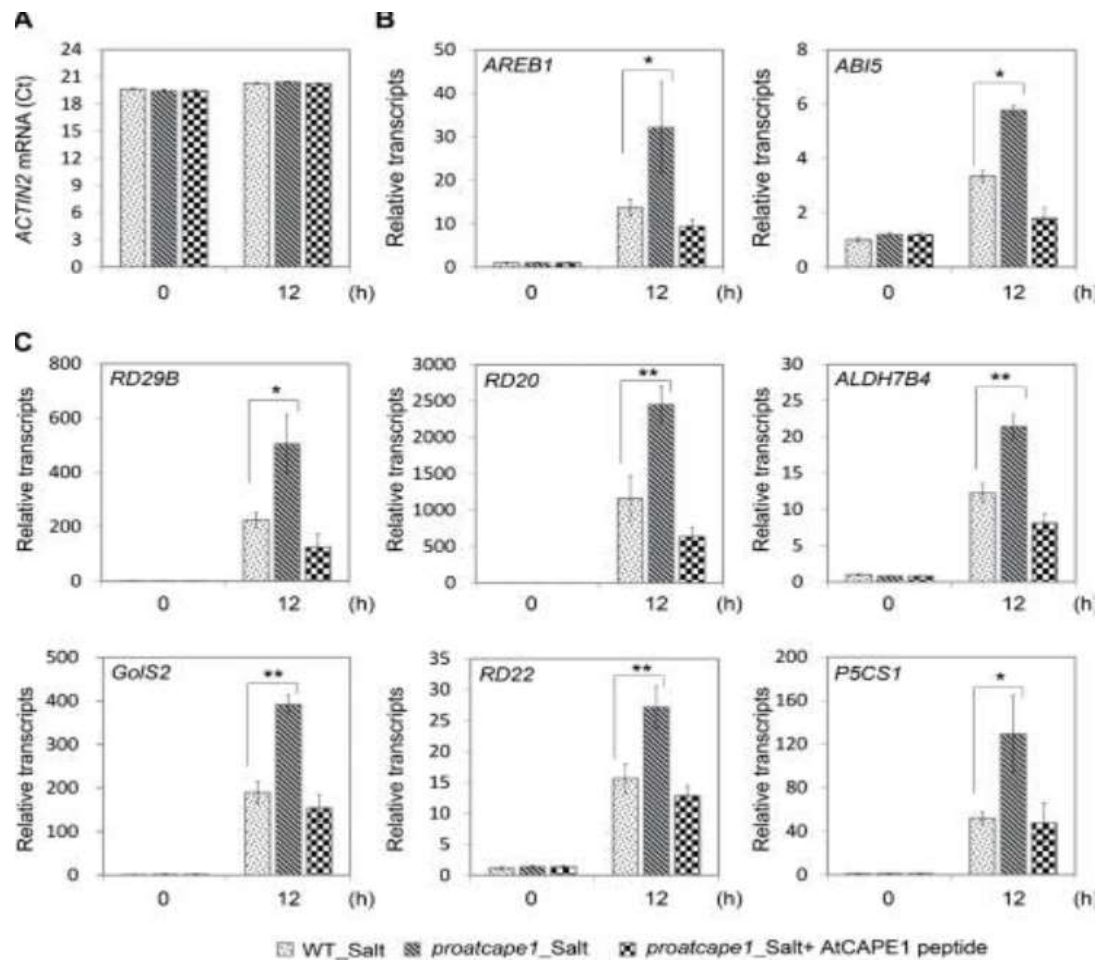
表一、AtCAPE1 胜肽鹽逆境一周表徵推測圖

WT vs WT	均有AtCAPE1而無法抗鹽死亡
AtCAPE1 vs AtCAPE1	無AtCAPE1而抗鹽，正常生長
AtCAPE1 vs WT	WT分泌AtCAPE1，AtCAPE1突變株接收訊號，無法抗鹽，死亡
AtCAPE1 vs WT(中有隔板)	僅氣體進行傳遞，AtCAPE1突變株沒收到AtCAPE1訊號，生長良好，僅WT死亡



圖三、AtCAPE1 胜肽鹽逆境一周表徵推測圖

(二) 抗鹽基因之相關表現量應符合圖四。



圖四、基因表現量預期結果值(Pei-Shan Chien, 2015)

此篇論文是直接滴 AtCAPE1 胜肽於培養液中

- 1.淺灰色僅 WT 在鹽盤中，相對應表中 WT vs WT，抗鹽基表現量低。
- 2.深灰色僅 AtCAPE1 胜肽突變株在鹽盤中，相對應表中 AtCAPE1 胜肽 vs AtCAPE1 胜肽，抗鹽基表現量高。
- 3.黑白格子相間為 AtCAPE1 胜肽 突變株在鹽盤中滴有 AtCAPE1 胜肽，相對應表中 AtCAPE1 胜肽 vs WT，滴之 AtCAPE1 胜肽相當於 WT 所分泌的，因收到 AtCAPE1 胜肽並做出相關反應，使之抗鹽能力變差，抗鹽基表現量恢復成與 WT vs WT 差不多低。

二、研究器材

表二、研究器材圖

		
QPCR machine	Gel Doc XR+影像系統	攝影翻拍架
		
nano drop	離心機	磁石攪拌器
		
pH machine	振盪器	PCR machine
		
墊子天秤	加熱板與試管振盪器	微量滴管

		
Geno Grinder	抽風櫥	植物生長箱
		
烘箱	無菌操作台	冷房
		
-80°C 冰箱	4°C 冰箱	-20°C 冰箱

三、可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明方法

(一)生長盤配置(參考 Connor Sweeney, 2017)

1.設備：

- (1)燒杯、量筒、刮杓
- (2)電子秤和秤量紙
- (3)血清瓶與滅菌膠帶與滅菌膠帶
- (4)攪拌器與磁石
- (5)pH meter 與校正液(4、7)
- (6)高溫高壓滅菌釜
- (7)植物生長盤(2 公分高)
- (8)laminar flow、酒精
- (9)抗高溫手套
- (10)冷房 4°C

2.材料：

- (1)1/2MS M0222(分子量 220.3g)
- (2)sucrose
- (3)agar

3.流程

- (1)將 sucrose 濃度為 3%及 1/2MS 濃度為每公升有 2.203g 秤好，加入燒杯
 - (2)加入攪拌子，並加入二次水，未全滿，將燒杯放於攪拌器上，待其攪拌到完全無粒狀
 - (3)以 pH meter 量取 pH 值，並利用 3M 的 KOH 和 HCL 調整至植物最適合酸鹼環境 5.72
 - (4)當溶液 pH 測量好時，將其倒入量筒之中，並加入二次水至所需之量
 - (5)將 agar 濃度為 0.8%加入血清瓶，並將用二次水清洗過的磁石加入
 - (6)將瓶上貼上滅菌膠帶後放入滅菌釜滅菌
 - (7) 在 laminar flow 終將其倒入 plate 中，約 1/2 深
- 註：若到時有小氣泡產生，用火槍火破
- (8)待其凝固及完成，封好後可封於 4°C

(二)鹽盤配置

1.設備：

(1)同(一)生長盤配置設備

(2)植物生長盤改為(1.5 公分高，1section 和 2section)

(3)50ml 電子 pipetman 及 tip

2.材料：

(1)1/2MS M0222(分子量 220.3g)

(2)sucrose

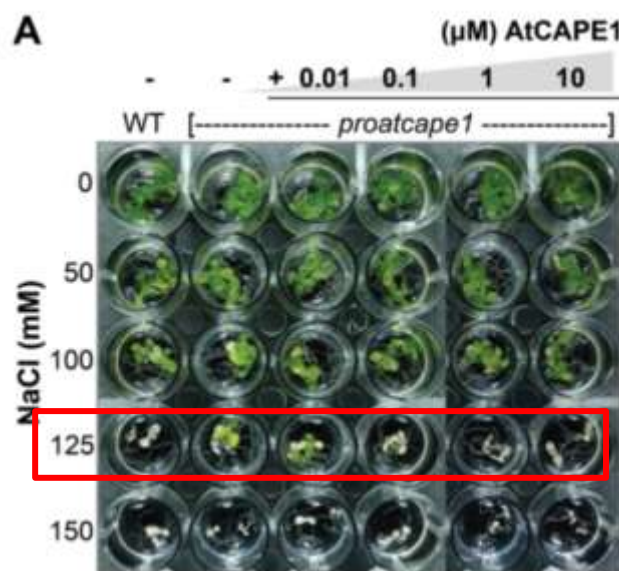
(3)MES(分子量 195.2)

(4)NaCl(分子量 58.44)

(5)agar

3.流程

(1)將 sucrose 濃度為 3%及 1/2MS 濃度為每公升有 2.203g 及 MES 濃度為 0.05M 及 NaCl 濃度為 125mM 如圖五(參考 Pei-Shan Chien, 2015)秤好，加入燒杯



圖五、鹽濃度溶液表徵測試

因鹽之濃度為 125mM 時可以較易觀察出抗鹽及無法抗鹽而白化之表徵

(2)同生長盤配置方法(2)-(7)

(3)以 50ml 電子 pipetman 吸取 30cc 入 1section 之生長盤，分別 14cc 入 2section 之生長盤

(4)待其凝固及完成，封好後可封於 4°C

(三)種植 7 天大及 14 天大的阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株

1.設備：

- (1)laminar flow
- (2)tip、垃圾桶、廢液瓶、rack(15ml 和 5ml)、1ml pipetman
- (3)透氣膠
- (4)振盪器
- (5)冷房 4°C

2.材料：

- (1)阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之種子
- (2)15% bleach
- (3)10% triton X-100
- (4)滅菌水
- (5)以配置好的 1/2MS M0222 生長盤

3.流程：

- (1)將 1/2MS plate 曬於 laminar flow
- (2)數好種子後，用 15% bleach 1ml 和 10% triton X-100 10 μ l，將種子泡在其中
- (3)用振盪器混洗 10 分鐘
- (4)於 laminar flow 中進行後續操作
- (5)1-5 次直接倒掉廢液，第 6 次用 pipetman 將水吸乾
- (6)將種子吸起，用 tip 點在 plate 上，好後封上透氣膠
- (7)以鋁箔紙包好，移入冷房春化兩天，後取出移入組培室 5 天及 12 天

(四)鹽逆境刺激種植 7 天大及 14 天大的阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株

1.設備：

(1)laminar flow、酒精

(2)鑷子

(3)噴火槍

(4)計時器

2.材料：

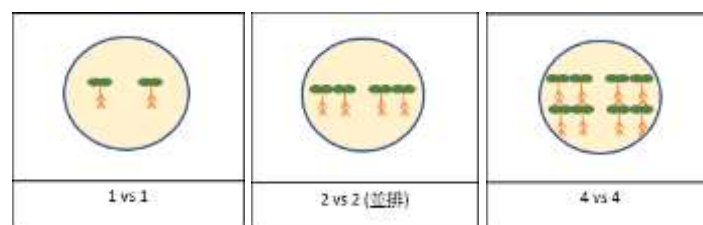
(1)阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株

(2)以配置好的 1/2MS M0222 鹽盤

3.流程(均在 laminar flow 中操作)：

(1)以酒精擦鑷子，並以火燒之，甩涼

(2)移植方式

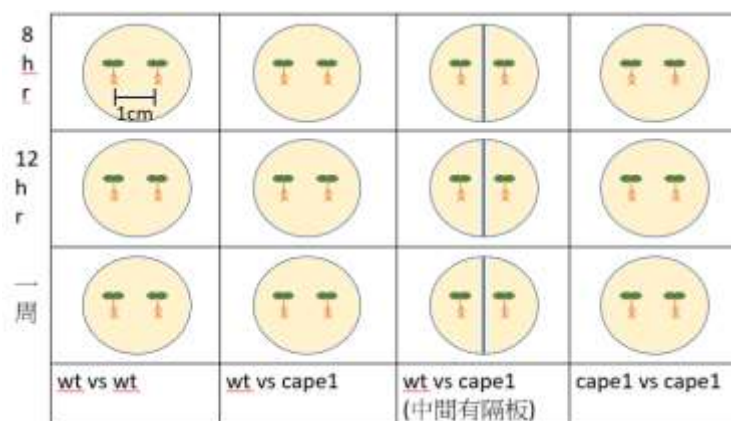


圖六、鹽逆境移植方式

(3)移植時輕夾葉片，不可受傷，注意葉片大小數量需相近，葉片避免碰到鹽盤

(4)兩組間虛相間隔 1cm，如圖四

(5)移植時段與組別



圖七、鹽逆境移植時段與組別

註：中間有隔板是作為僅用氣體荷爾蒙進行防禦訊號傳遞之對照組

(五)鹽逆境各時段表觀觀察及樣品採收

1.設備：

- (1)相機翻拍架
- (2)液態氮、杜耳瓶
- (3) 2ml safe lock tube
- (4)瓷珠
- (5)火槍
- (6)-80°C 之冰箱

2.材料：

- (1)經鹽逆境刺激個時段的各組別阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株，如圖六和七

3.流程：

- (1)利用攝影機架在翻拍架上拍照
- (2)在 laminar flow 中，先以火槍燒鑷子，甩涼
- (3)在 2ml safe lock tube 中加入 1 個瓷珠
- (4)將樣品夾入 2ml safe lock tube
- (5)立刻放入液態氮
- (6)冰去-80°C 之冰箱

(六)基因表現量測量-RNA extraction

1.設備：

- (1)Geno Grinder
- (2)瓷珠
- (3)homogenize tube
- (4)parafilm
- (5)加熱版、烘箱
- (6)液態氮、杜耳瓶
- (7)pipetman、filter tip
- (8) -80°C 之冰箱
- (9)離心機

2.材料：

- (1)經鹽逆境刺激個時段的各組別阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株，如圖六和七

- (2)Total RNA Mini Kit (Plant)

品牌：(Genaid)

- (3) β -Mercaptoethanol
- (4) 100% ethanol

3.流程：

- (1)方法同(五)鹽逆境各時段表觀觀察及樣品採收(3)-(5)，或是將樣品從冰箱中拿出放於液態氮中
- (2)將 500 μ l RB 和 5 μ l β -ME 加入其中，插於冰上
- (3)用 parafilm 將 homogenize tube 封口
- (4)Geno Grinder 使用
 - a.將時間(左旋鈕)設定為 2 分鐘，震動速率(右旋鈕)設定為 1550 rpm
 - b.載物座四腳必須放置樣品
 - c.按下開始
 - d.震動完成後插於冰上 2 分鐘冷卻
 - e.重複 de 直到樣品完全無法看到顆粒
- (5)靜置於 60°C 加熱版 5 分鐘
- (6)將混和液移置已裝上 2 ml collection tube 的 filter column
- (7)以 1000xg 離心 1 分鐘，丟掉 filter column
- (8)將樣品移轉至新的 1.5ml tube
- (9)加入 1/2 量之 100% ethanol，劇烈搖晃
- (10)將樣品移置已裝上 2 ml collection tube 的 RB column
- (11)以 16000xg 離心 1 分鐘，到去下方液
- (12)加 400 μ l W1 buffer 到 RB column，搖一搖
- (13)以 16000xg 離心 30 秒，到去下方液
- (14)加 600 μ l Wash (已加入 100% ethanol)到 RB column
- (15)以 16000xg 離心 30 秒，到去下方液
- (16)加 600 μ l Wash (已加入 100% ethanol)到 RB column
- (17)以 16000xg 離心 1 分鐘，到去下方液
- (18)以 16000xg 空離 3 分鐘
- (19)將 RB column 轉移至新的 1.5ml tube，放入烘箱 5 分鐘，RNase free water 以夾子夾好，一同放入
- (20)加入 20 μ l RNase free water 到 RB column 正中心
- (21)靜置 10 分鐘
- (22)離心 16000xg 1 分鐘，使 RNA 回溶，存於-80°C 之冰箱

(七)基因表現量測量-轉 cDNA

1.設備：

- (1)PCR machine
- (2)nano drop
- (3)離心機
- (4)-20°C 冰箱

2.材料：

- (1)萃取出之經鹽逆境刺激個時段的各組別阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株，如圖六和七的 RNA
- (2)滅菌 ddH₂O
- (3)Oligo dT
- (4)dNTP
- (5)5X first strand buffer
- (6)DTT
- (7)SuperScrip III Reverse Transcriptase

3.流程：

- (1)將萃取出好的 RNA 退冰，以震盪器加速融化及混和均勻，再用小離心機離心，插在冰上
- (2)nanodrop 使用
 - a.點選 Nucleic Acid 進入，先以試鏡紙輕擦淨
 - b.以 ddH₂O 吸 1μl 滴在 nanodrop 鏡頭上，每測一次就要用試鏡紙輕擦淨
 - c.再以 ddH₂O 吸 1μl 滴在 nanodrop 鏡頭上，進行背景值測量(blank)
 - d.利用 nanodrop 測量 RNA 濃度
 - e.在上方拉選 Sample type 選 RNA，在 Sample ID 位置輸入樣品名稱，吸取 1μl 之 RNA 滴在 nanodrop 鏡頭上，放下手臂後按 measure
 - f.拿起手臂後，用試鏡紙輕擦淨，重複步驟 4
- 註：260/280 之值要落在 1.8-2.1，260/230 之值要落在 2 以上
- (3)濃度測量好後，計算相對應濃度所需之水量
- (4)將 dNTP 和 Oligo dT 取出退冰，並均勻混合
- (5)先將 RNA 所需之量加 ddH₂O 等於 11μl，再加入 dNTP 和 Oligo dT 各 1μl
- (6)放入 PCR machine 進行第一個程序 65°C 5 分鐘，確認 volume 為 13μl，點 verify block
- (7)程序再跑之時，製作 premix2(4ul 5xbuffer，1ul 0.1M DTT，1ul ddH₂O)
- (8)將以跑完程序之樣品取出，放涼後，加入 premix2 和 1μl SS III RT
- (9)此時每管樣品中共 20μl，放入 PCR machine 中執行第二個程式，50°C 60 分鐘，72°C 15 分鐘，確認 volume 為 20μl，點 verify block
- (10)當程序跑完時，加入滅菌 ddH₂O，使 cDNA 濃度為每 20 ul 樣品有 1μl cDNA
- (11)將樣品存於-20°C

(八)基因表現量測量：RT-PCR

1.設備：

- (1)製膠膜(8 格 25ml)、跑膠台
- (2)PCR machine
- (3)Gel Doc XR+影像系統
- (4)血清瓶、微波爐、電子秤

2.材料：

- (1)萃取出之經鹽逆境刺激個時段的各組別阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株，如圖六和七的 cDNA
- (2)agar
- (3)TAE buffer
- (4)actin2 和各基因的 forward、reverse transcriptase
- (5)ddH₂O 滅菌水
- (6)2X GT PreMix
- (7)health view
- (8)DNA Marker

3.流程：

- (1)製膠濃度配 1.5%
- (2)將 agar 加入 TAE buffer
- (3)拿去微波爐微波，直到完全融解，加入 3μl health view
- (4)倒入模型，插孔，使其冷卻凝固
- (5)先將 fw、rv、2X GT PreMix 和 ddH₂O 滅菌水先 premix，插於冰上

表三、RT-PCR 藥材劑量表

fw	rv	2X GT PreMix	ddH ₂ O 滅菌水	cDNA
0.5μl	0.5μl	12.5μl	10.5μl	1μl

- (6)將 premix 加入 cDNA
- (7)放入 PCR machine，進行 PCR
- (8) stage1 95°C 5 分鐘
stage2 95°C 15 秒，55°C 15 秒，72°C 30 秒
stage3 72°C 5 分鐘，16°C 持續
確認 volume 為 25μl，設定 stage2 重複次數
點 verify block
- (9)將電泳台倒入 TAE Buffer
- (10)將各樣品吸取 10μl 注入孔中，而最左邊加入 DNA Marker 2μl
- (1) DNA Marker 跑到 agar 邊後，將膠拿去 Gel Doc XR+影像系統掃描及完成

(九)基因表現量測量：QPCR

1.設備：

(1)96 孔盤與封膜

(2)QPCR machine

(3)電子 pipetman

2.材料：

(1)萃取出之經鹽逆境刺激個時段的各組別阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 knockdown 突變株之 7 天大及 14 天大植株，如圖六和七的 cDNA

(2)各個基因的 forward primer 和 reverse primer

表四、檢測基因簡介

基因名稱	功能	參考資料
<i>At4g33730</i>	為 AtCAPE1 之前驅基因	1.Pei-Shan Chien, 2015
<i>Actin2</i>	作為 internal control	1.Pei-Shan Chien, 2015
<i>ABA-responsive element binding protein 1 (AREB1)</i>	是在乾旱和高鹽度條件下參與 ABA 信號傳導扮演亮氨酸拉鍊轉錄因子	1.Fujita <i>et al.</i> , 2005 2.Uno <i>et al.</i> , 2000 3.Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013
<i>ABA-INSENSITIVE 5 (ABI5)</i>		1.Finkelstein and Lynch, 2000 2.Uno <i>et al.</i> , 2000 3.Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013
RD29B	植物脫水受鹽逆境時表現	1.Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki, 1994 2. Ingram and Bartels, 1996
RD20		1.Takahashi <i>et al.</i> , 2000
RD22		1.Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993
ALDH7B4	參與植物排毒	Kirch <i>et al.</i> , 2004 Kotchoni <i>et al.</i> , 2006
<i>[11-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1 (P5CS1)]</i>	參與滲透保護劑生物合成酶的基因	Yoshida <i>et al.</i> , 1999
<i>GALACTINOL SYNTHASE (GOLS2)</i>		Tajiri <i>et al.</i> , 2002

(3) 2X SYBR Green

(4) ddH₂O

3. 流程：

(1) 將 FW、RV、2X SYBR、ddH₂O 製成 premix (註：未加 cDNA 前=19μl)

表五：QPCR 藥材劑量表

Premix					96 孔盤
FW	RV	2X SYBR	ddH ₂ O	cDNA	total
1μl	1μl	10μl	7μl	1μl	20μl

(2) 將 premix 與 cDNA 加入 96 孔盤中

(3) 利用電子 pipetman 吸取 premix

註：將吸取量設定為 19μl，repeat 設定為 6 次

註：吸取時將 tip 插入 premix 中，按第一次為吸取，按第二次為排出(仍要插在 premix 中)，接下來可以滴，6 次滴完後，再快速按兩次，為排空(不可插入 premix，在 premix 上空)

(4) 用一般的 pipetman 吸取 1μl 的 cDNA 加入

(5) 封膜

(6) 離心 10000xg

(7) 放入 QPCR machine 中偵測

(8) 圖表分析

四、AtCAPE1 之擴散效率測量方法

1.生長盤配置(法同可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明)

2.鹽盤配置(法同可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明)

註：植物生長盤改成方形刻度培養皿

3.種植 7 天大及 14 天大的阿拉伯芥 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged(法同可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明)

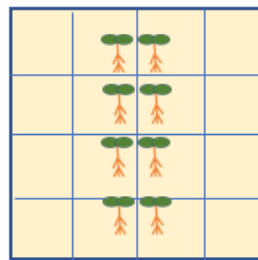
註：種子為 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged

4.鹽逆境刺激種植 7 天大及 14 天大的阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged(法同可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明)

註：

(1)阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged 之 7 天大及 14 天大植株

(2)移植方式



圖八、擴散效率量測移植方式

5.以螢光解剖顯微鏡觀察各時段 AtCAPE1 的擴散效率

1.設備：

(1)螢光解剖電子顯微鏡

2.材料：

(1)經鹽逆境刺激個時段阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged 之 7 天大及 14 天大植株

3.流程：

(1)將經鹽逆境刺激個時段阿拉伯芥 wild type 和 AtCAPE1 overexpression protein(eYFP)-tagged 之 7 天大及 14 天大植株拿去螢光解剖電子顯微鏡

(2)量取螢光距中縣的距離

(3)推算擴散效率

伍、研究結果

一、可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

(一)1/2MS M0222 與 M0231 種植效果比較

表六、1/2MS M0222 與 M0231 種植效果比較

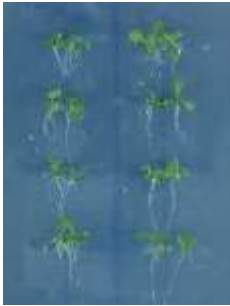
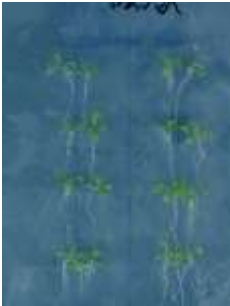
	
Mo231 CAPE1	Mo222 CAPE1

1.結果：1/2MS M0222 之發芽率及生長狀況均較 M0231 來的好。

(二)overexpression AtCAPE9(簡稱 OXC9)由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至其他個體之證明

1.表徵

表七、OXC9 鹽逆境個時段表徵

	1hr	2hr	4hr	8hr
wt vs wt				
wt vs overexpression cape9(右側)				
overexpression cape9 vs overexpression cape9				
				
Mo222 wt vs wt 一周	Mo222 wt vs overexpression cape9(右側)一周		Mo222 overexpression cape9 vs overexpression cape9 一周	

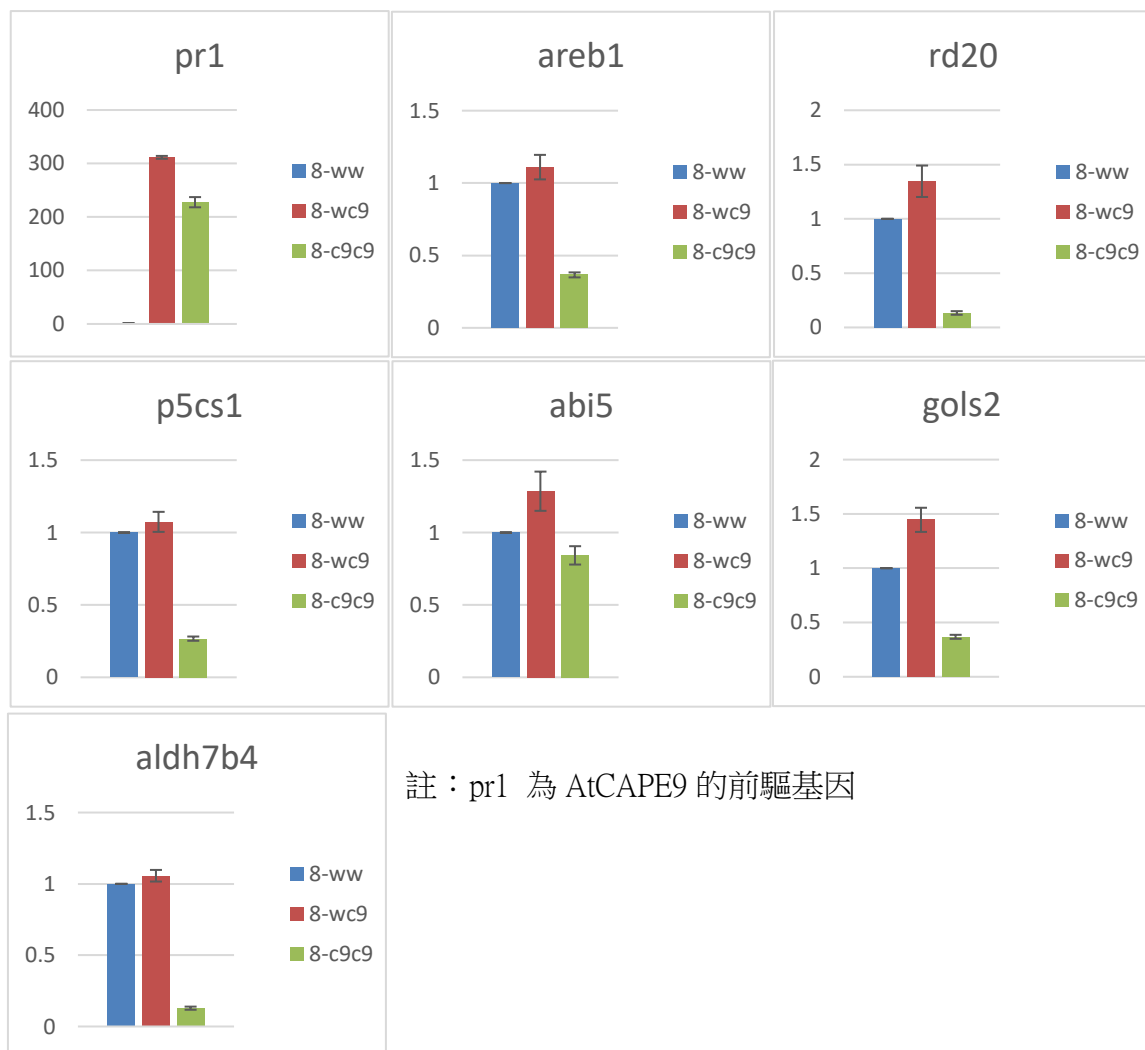
2. RT-PCR

表八、OXC9 pr1 表現量檢測

	
PCR 次數 25 迴圈	PCR 次數 29 迴圈

3.QPCR

表九：QPCR 基因表現量量測結果



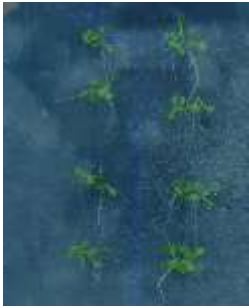
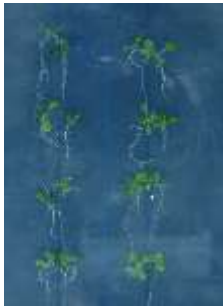
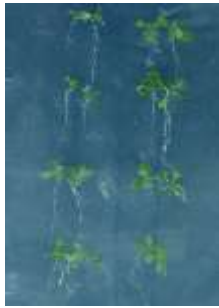
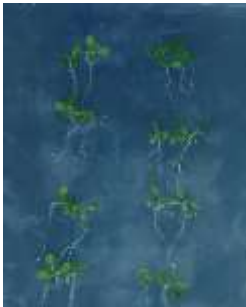
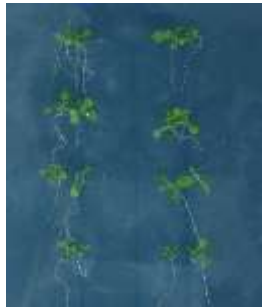
4.結果

- (1)無法從 OXC9 經鹽逆境 1、2、4 和 8 小時觀察到表徵上明顯差異
- (2)可從 OXC9 經鹽逆境 1 周後觀察到表徵上明顯差異，WT vs WT 與 WT vs OXC9 均死亡白化，OXC9 vs OXC9 生長良好，符合預期結果，如表(四)所示。
- (3)藉 RT-PCR 確認突變株為 OXC9。
- (4)經 QPCR 分析，當 OXC9 與 WT 種在一起，抗鹽基因表現量大量提升，而剩餘組別，WT vs WT 與 OXC9 vs OXC9 之抗鹽基因表現量均較低。
- (5)鹽逆境 8 小時基因表現量與鹽逆境刺激 1 周的 OXC9 vs OXC9，WT vs WT 與 OXC9 vs WT 表徵無法吻合圖四所示。

(三)AtCAPE1 胜肽由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至其他個體之證明

1.表徵-方盤種植 14 天大

表十、AtCAPE1 胜肽 14 天大鹽逆境個時段表徵

	1hr	2hr	4 hr	8hr
wt vs wt				
wt vs cape1(右側)				
cape1 vs cape1				

(1)結果：無法從 AtCAPE1 胜肽經鹽逆境 1、2、4 和 8 小時觀察到表徵上明顯差異。

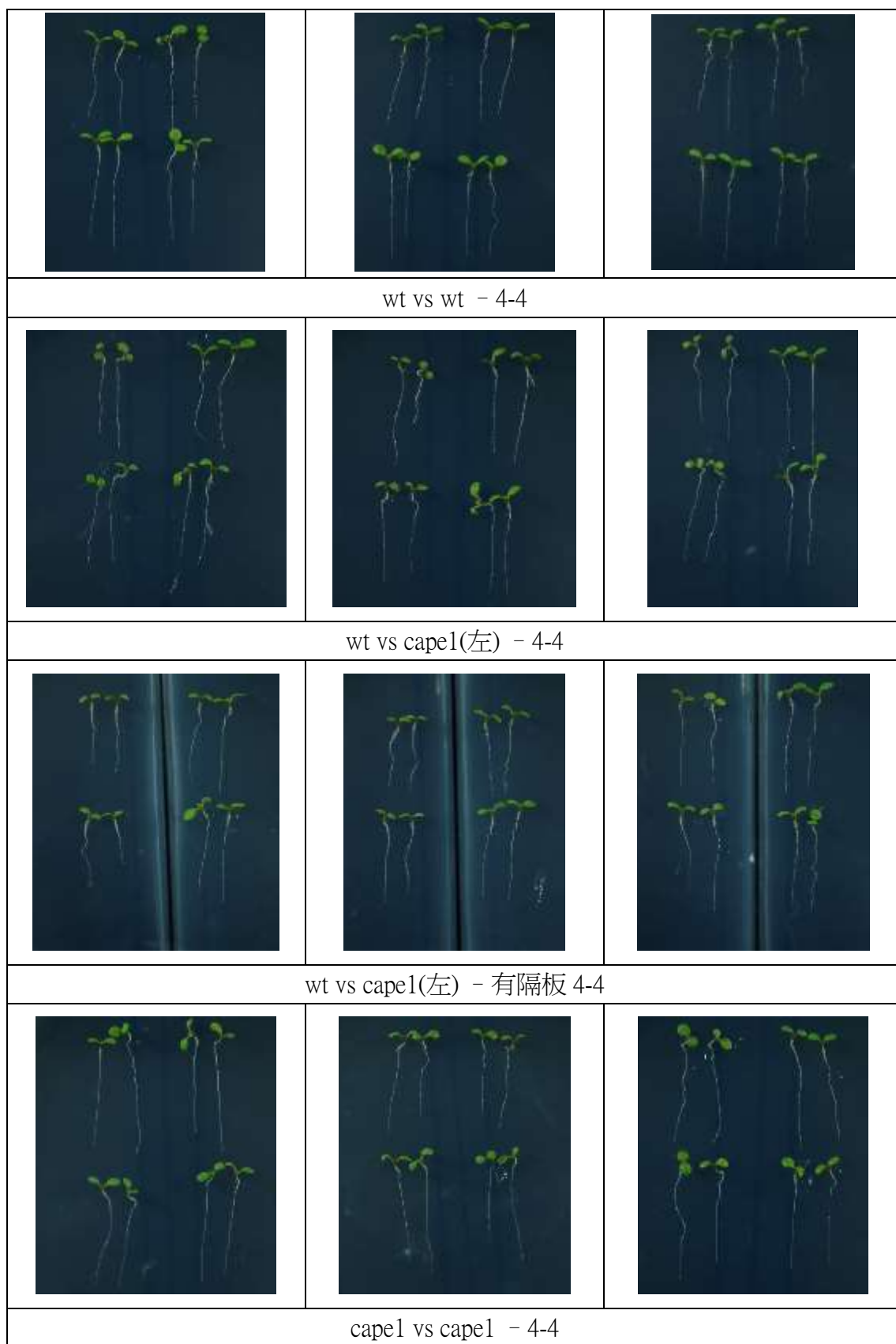
2.表徵-圓盤種植 7 天大

(1)12 小時鹽逆境(均在光週期)

表十一、AtCAPE1 胜肽 7 天大鹽逆境 12 小時表徵(以下三重複)

		
wt vs wt		
		
wt vs cape1(左)		
		
wt vs cape1(左)		
		
cape1 vs cape1		

		
wt vs wt - 2-2		
		
wt vs capel(左) - 2-2		
		
wt vs capel (左) - 有隔板 2-2		
		
capel vs capel - 2-2		



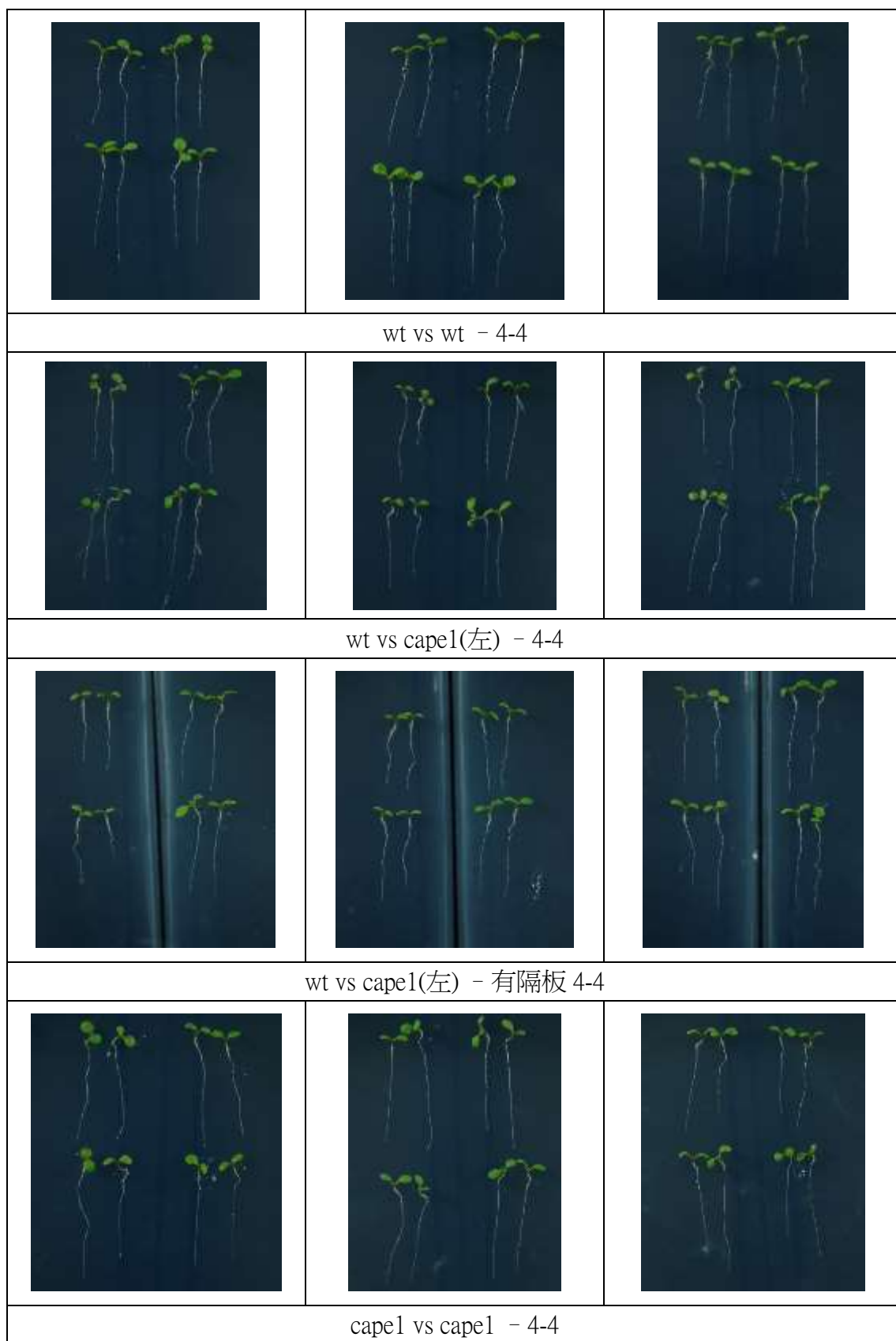
a.結果：無法從 AtCAPE1 胜肽七天大經鹽逆境 12 小時之 1-1、2-2、4-4 觀察到表徵上明顯差異。

(2)24 小時鹽逆境(均於早上 10：00 放入)

表十二 4、AtCAPE1 胜肽 7 天大鹽逆境 24 小時表徵(以下三重複)

		
wt vs wt		
		
wt vs cape1(左)		
		
wt vs cape1(左) - 有隔板		
		
cape1 vs cape1		

		
wt vs wt - 2-2		
		
wt vs capel(左) - 2-2		
		
wt vs capel (左) - 有隔板 2-2		
		
capel vs capel - 2-2		



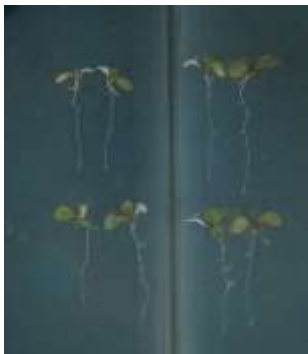
a.結果：無法從 AtCAPE1 胜肽七天大經鹽逆境 24 小時之 1-1、2-2、4-4 觀察到表徵上明顯差異。

(3)一周鹽逆境

表十三、AtCAPE1 胜肽 7 天大鹽逆境一周表徵(以下三重複)

		
wt vs wt		
		
wt vs cape1(左)		
		
wt vs cape1(左) - 有隔板		
		
cape1 vs cape1		

		
wt vs wt - 2-2		
		
wt vs capel(左) - 2-2		
		
wt vs capel (左) - 有隔板 2-2		
		
capel vs capel - 2-2		

		
wt vs wt - 4-4		
		
wt vs capel(左) - 4-4		
		
wt vs capel(左) - 有隔板 4-4		
		
capel vs capel - (1)	capel vs capel - (2)	capel vs capel - (3)

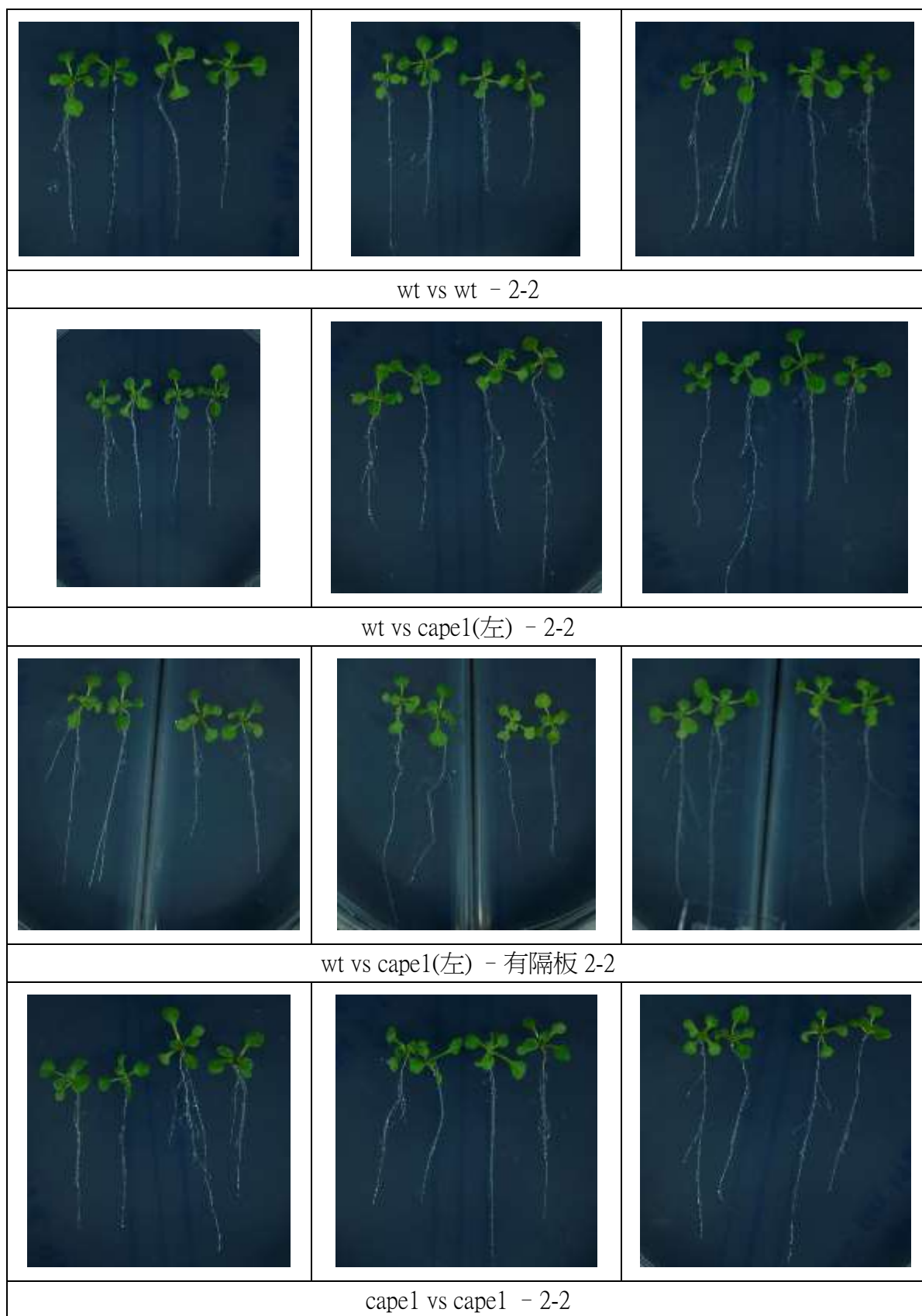
a.結果：可從 AtCAPE1 胜肽七天大經鹽逆境一周之 1-1、2-2、4-4 觀察到表徵上白化現象，但不明顯，無法從表徵觀察出預期結果如圖三所示。

3.表徵-圓盤種植 14 天大

(1)12 小時鹽逆境

表十四、AtCAPE1 胜肽 14 天大鹽逆境 12 小時表徵(以下三重複)

		
wt vs wt		
		
wt vs cape1(左)		
		
wt vs cape1(左) - 有隔板		
		
cape1 vs cape1		

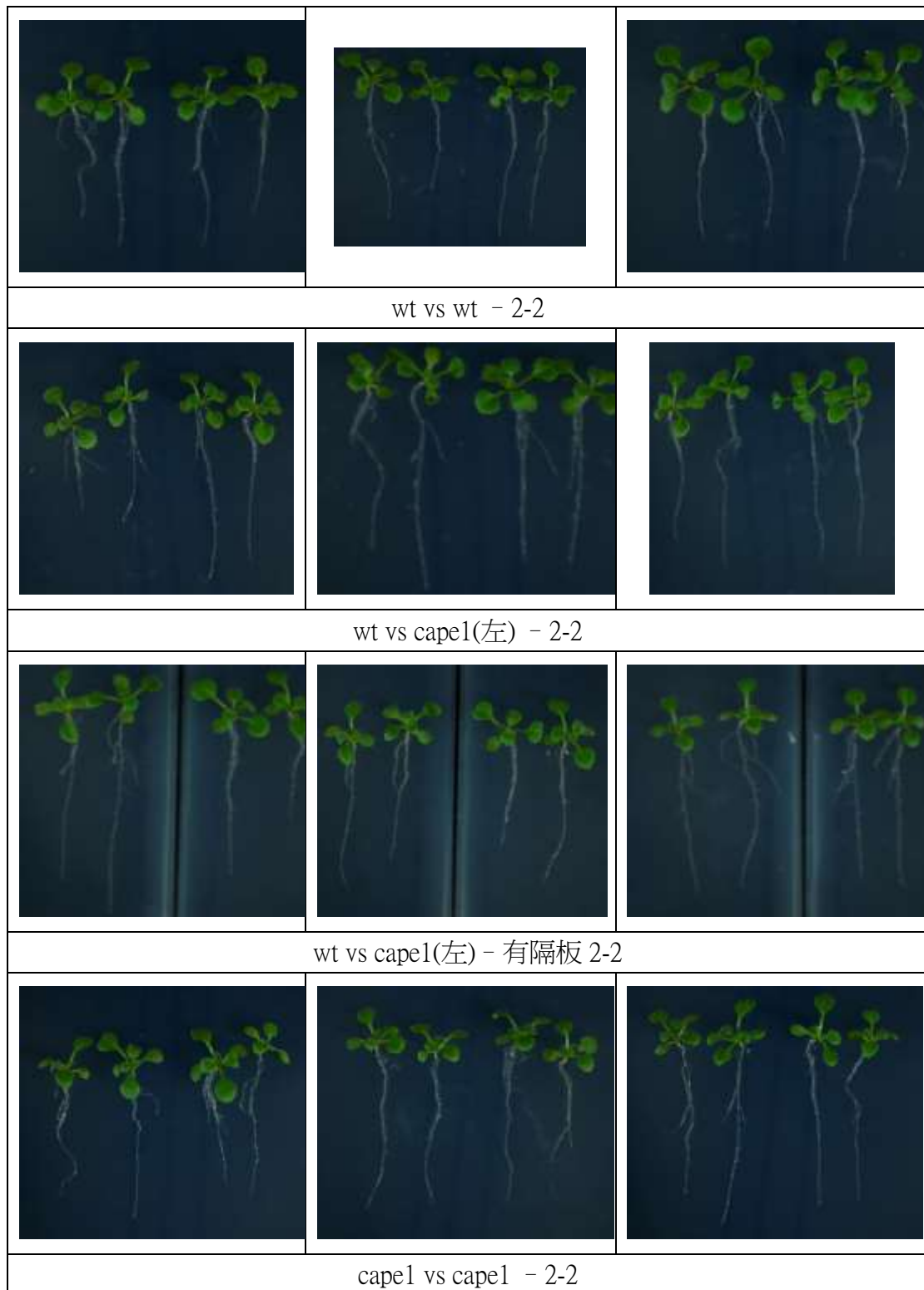


a.結果：無法從 AtCAPE1 胜肽十四天大經鹽逆境 12 小時之 1-1、2-2 觀察到表徵上明顯差異。

(2)24 小時鹽逆境

表十五、AtCAPE1 胜肽 14 天大鹽逆境 24 小時表徵(以下三重複)

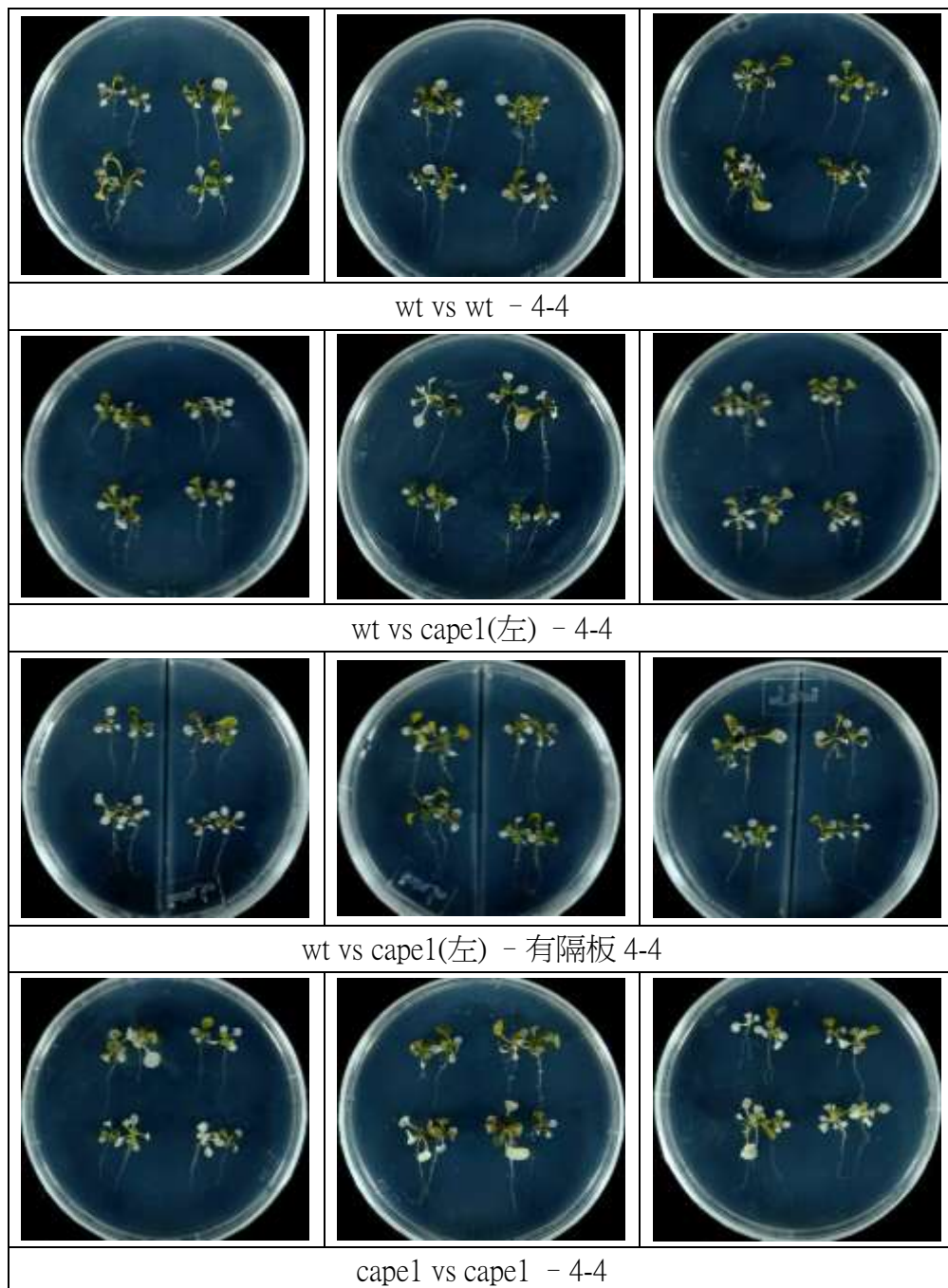
		
wt vs wt		
		
wt vs capel(左)		
		
wt vs capel(左) - 有隔板		
		
capel vs capel		



a.結果：無法從 AtCAPE1 胜肽十四天大經鹽逆境 24 小時之 1-1、2-2 觀察到表徵上明顯差異。

(3)一周鹽逆境

表十六、AtCAPE1 胜肽 14 天大鹽逆境一周表徵(以下三重複)



a.結果：可從 AtCAPE1 胜肽十四天大經鹽逆境一周之 4-4 觀察到表徵上白化現象，但不明顯，無法從表徵觀察出預期結果如圖三所示。

二、AtCAPE1 胜肽之擴散效率測量

1.螢光解剖顯微鏡無法測得 eYFP 螢光。

陸、討論

一、可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

(一)1/2MS M0222 與 M0231 種植效果比較

1. 1/2MS M0222 之發芽率及生長狀況均較 M0231 來的好，推測是因為 M0222 多了維生素 B5 等，具有更多的營養，因此後續實驗皆採用之。

(二)overexpression AtCAPE9 由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

1.可從 OXC9 經鹽逆境 1 周觀察到表徵明顯差異，推測是因 AtCAPE9 胜肽與 AtCAPE1 胜肽互相拮抗。

(1)WT vs WT 因均含有 AtCAPE1 胜肽而無法抗鹽死亡。

(2)WT vs OXC9 因 WT 分泌出 AtCAPE1 胜肽，使原 OXC9 中被拮抗而降低表現的 AtCAPE1 胜肽再次回到 WT 中的正常表現量而無法抗鹽死亡。

(3)OXC9vs OXC9 因拮抗降低 AtCAPE1 胜肽表現，使其可抗鹽。

2.鹽逆境 8 小時基因表現量與鹽逆境刺激 1 周的表徵狀況無法吻合可能是因

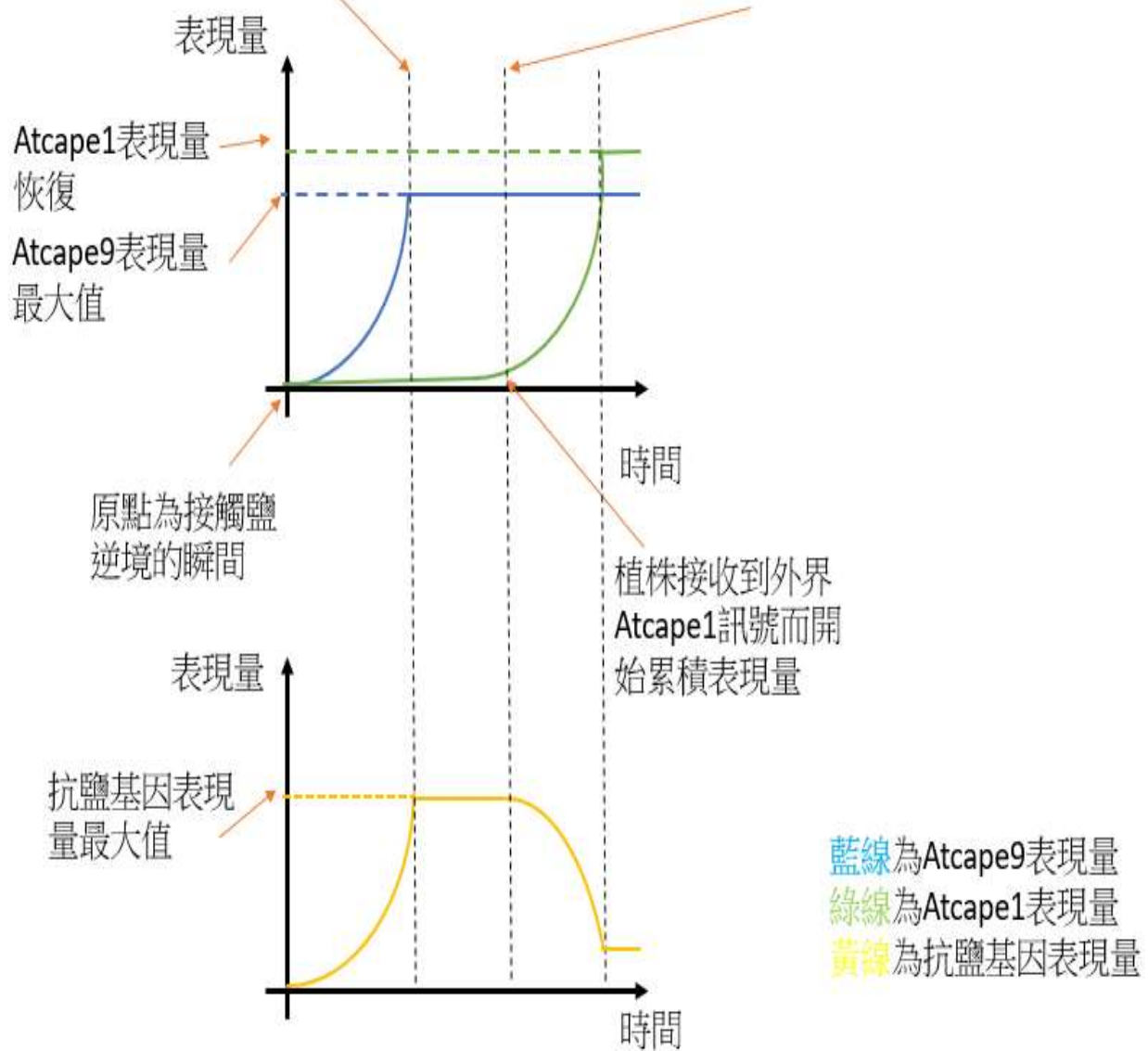
(1)WT vs WT 均含 AtCAPE1 胜肽而無法抗鹽死亡，此基因表現量與鹽逆境刺激 1 周表徵狀況吻合。

(2) WT vs OXC9 因 WT 分泌出 AtCAPE1 胜肽，使原 OXC9 起初收到 AtCAPE1 胜肽此段鹽逆境訊號，大量表現 AtCAPE9，拮抗 AtCAPE1 胜肽，使抗鹽基因表現大幅提升，但隨著時間，收到 AtCAPE1 胜肽量回到 WT 中的正常表現量而無法抗鹽死亡，作用機制圖入圖九。

3.植物無法在短時間內有表徵上的改變，反應無法如此快速，至少需等六天以上才有辦法觀察到較明顯的變化。

Atcape1表現量因Atcape9而抑制，
使抗鹽基因表現量能夠不斷表達

植株接收到外界Atcape1訊號而
開始Atcape1累積表現量，進而
抑制抗鹽基因表達



圖九、AtCAPE9 與 AtCAPE1 胜肽相互作用調控抗鹽機制推測圖

(三)AtCAPE1 胜肽由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

1.經過多次測試，均無法從表徵觀察出預期結果如圖三所示。

2.討論：

(1)可從水耕液中萃取出 AtCAPE1 胜肽。

(2)WT 無白化可能是因為在培養液鹽濃度無法相對應到鹽盤中。

(3)因為整個實驗室，連做培養液的實驗人員也無法測得當初論文所觀測到的表徵，與實驗室研究人員與教授討論的結果，可能是因為此 WT 種子在 4°C 冰箱兩年，種子休眠過久，而變性，使得實驗無法順利進行，須從美國 ABRC 重新調種子！

二、AtCAPE1 胜肽之擴散效率測量

(一)將 7，14 天，及 1 個月大的 AtCAPE1 胜肽 overexpression protein(eYFP)-tagged 整株植株藉由螢光解剖顯微鏡均無法測得 eYFP 螢光。

(二)討論

(1)因為 eYFP 螢光亮度不足，需以正立螢光顯微鏡才能觀測到 eYFP 螢光，但這樣須做切片，無法有要進行擴散速率測量，需另尋方式測量。

柒、本實驗之創見性及其未來應用

一、本實驗之創建性

- 1.對於植物體而言，對於胜肽的瞭解少很多，而極少人研究扮演防禦訊號的胜肽荷爾蒙，尤其在抗鹽抗病相關，大部分都是研究荷爾蒙、小分子等。
- 2.利用根部傳遞胜肽防禦訊息，其分子量相當大，且被環境或自身降解的可能性極高，且目前對於根部傳遞防禦訊號的研究僅有蘋果酸，而其為荷爾蒙，分子量相對少，且相對穩定。
- 3.利用根部傳遞防禦訊息並結合 AtCAPE 此中植物體內少有被發現的胜肽進行實驗。

二、本實驗之延續性

- 1.實驗一旦證實了根部能傳遞防禦訊息，一些如植物連鎖擴大訊息傳遞，抑或是不同植株間的訊息傳遞都可以陸續進行研究，進而了解到一個完善的植物防禦系統。

三、未來應用

- 1.於魚菜共生、農作物抵抗病蟲害的良好方式，以鹽刺激其中幾株植株，而使其以為受到威脅，進而啟動防禦機制，並靠著根部間的訊息傳播達到使周圍植株也啟動防禦機制，就如同植物的預防針，是種環保且低成本的良好防害方式，以後更甚至可以利用此結果取代農藥。

捌、實驗改良及所需克服之問題

一、可藉由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

- 1.以培養基方式測試圖三來篩選最適合觀察出表徵的鹽度，將 agar 濃度減為 0.5% 進行測試。
- 2.以最直接方式不同頻率滴各種濃度 AtCAPE1 胜肽在植株種植位置來觀察，確認是否能得到預期結果的表徵。
- 3.以滴各種濃度的 AtCAPE1 胜肽於各種距離觀察其表徵，了解相對應距離需傳遞達到效果之濃度。
- 4.待直接滴的表徵有辦法確認後，改以真正的植株進行測試，不同年齡，不同的距離，不同酸鹼及光週期的環境進行測試，且將植物單株種植的方式改為一次種一叢，使其具有統一上意義，並對照 3.的結果進行推測。
- 5.實驗過程中，可藉由 secretion mutant 進行對照且測量之基因表現量應符合 Pei-Shan Chien, 2015 所測量之結果，如圖四所示。

二、AtCAPE1 胜肽 之擴散效率測量

1. 利用 AtCAPE1 胜肽 overexpression protein(eYFP)-tagged 之缺點乃因鑲上一段蛋白質，使分子量變大，使其擴散速率可能降低。
- 2.可設法找到一段跟 AtCAPE1 胜肽分子量差不多大小的有色分子進行擴散速率測試。

三、所需克服之問題

- 1.如何確認 AtCAPE1 胜肽不會在環境中被分解掉。
2. AtCAPE1 胜肽擴散機制。

四、發現之問題

- 1.當種子經休眠過久是否會使其變得能夠抗鹽。

玖、心得

在這段實驗期間內，我深深體會到當研究人員的辛苦，起初接觸一項新的技術會感到非常新奇，但是經過好幾次以上之時，有時難免會覺得枯燥，尤其當實驗結果不如預期之時，更是沮喪。

暑假期間，我住在台北，每天早上六點起床，六點半進實驗室，晚上十一點多才從實驗室離開，常常是只剩下我獨自一人在實驗室做研究，為了要做十二小時處理，非常的累，一次次的不如預期，總是令我心相當淒涼，不過，看到學長姐為了得出一個結果，做了好幾年才成功啊！

實驗，是一項在錯誤中不斷修正，不斷注入新想法的事，各個步驟環環相扣，一步的疏忽，換來的將會是好幾倍不必要時間的殘缺，頻繁的檢視，思考，討論，嚴謹不嫌麻煩的態度，資料閱讀，都是實驗的必備品。

雖然常常受各種打擊，但一次次的累積將使心靈更加堅強與茁壯，也體認到實驗精神價值，先做各種最壞的打算，但以堅毅與不屈衝破極限。

Today's impossible, tomorrow's miracle!

我想，這就是實驗人生啊！

拾、參考文獻

1. Chen YL, Lee CY, Cheng KT, Chang WH, Huang RN, Nam HG, Chen YR. 2014. Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato. *The Plant Cell* 26, 4135 – 4148.
2. Chien PS, Nam HG, Chen YR. 2015. A salt-regulated peptide derived from the CAP superfamily protein negatively regulates salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 66, 5301-5313
3. Sweeney C, Lakshmanan V, Bais HP, 2017. Interplant Aboveground Signaling Prompts Upregulation of Auxin Promoter and Malate Transporter as Part of Defensive Response in the Neighboring Plants. *Frontiers in Plant Science* 8:595
4. Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 3470 – 3488.
5. Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 11632 – 11637.
6. Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports* 32, 959 – 970.
7. Finkelstein R, Lynch T. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12, 599 – 609.
8. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6, 251 – 264.
9. Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 377 – 403.

10. Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2000. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant and Cell Physiology* 41, 898 – 903.
11. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 238, 17 – 25.
12. Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ. 2004. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9, 371 – 377.
13. Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* 29, 1033 – 1048.
14. Yoshida Y, Nanjo T, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Stress-Responsive and Developmental Regulation of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate Synthetase 1 (P5CS1) Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 766 – 772.
15. Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29, 417 – 426.
16. Delwiche CF, Goodman CA, Chang C. 2017. Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, 265-266

拾壹、附錄

(一) overexpression AtCAPE9 由根部分泌出胜肽防禦訊號並傳送至他個體之證明

1.RNA extraction 濃度

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
8-ww	604.22	15.105	6.847	2.21	2.39	40	230	6.321	0.011
8-woxc9	755.44	18.886	8.591	2.2	2.41	40	230	7.842	0.383
8-oxc9oxc9	701.7	17.542	7.997	2.19	2.41	40	230	7.269	0.022

2.QPCR

Sample Name	Target Name	C _T	ΔC_T	$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$ Mean	stdev
8-ww	actin2	20.28531					
8-ww	actin2	20.07029					
8-ww	actin2	20.00094					
8--wc9	actin2	19.91103					
8--wc9	actin2	19.83645					
8--wc9	actin2	19.82408					
8-c9c9	actin2	19.84048					
8-c9c9	actin2	19.86511					
8-c9c9	actin2	19.85094					
8-ww	areb1	22.39244	2.107128		1	1	0
8-ww	areb1	22.18316	2.112879		1		
8-ww	areb1	22.4319	2.430964		1		
8--wc9	areb1	21.91333	2.002306	-0.10482	1.075362	1.110009	0.084723
8--wc9	areb1	21.90948	2.073036	-0.03984	1.028002		
8--wc9	areb1	21.9603	2.136223	-0.29474	1.226664		
8-c9c9	areb1	23.40301	3.562531	1.455402	0.364653	0.365774	0.017367

Sample Name	Target Name	C _T	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}	2 ^{-ΔΔC_T} Mean	stdev
8-c9c9	areb1	23.51295	3.647848	1.534969	0.345087		
8-c9c9	areb1	23.64933	3.798386	1.367422	0.387583		
8-ww	abi5	25.4828	5.197489		1	1	0
8-ww	abi5	25.69542	5.625135		1		
8-ww	abi5	25.62583	5.624895		1		
8--wc9	abi5	24.951	5.039974	-0.15751	1.115364	1.285333	0.135414
8--wc9	abi5	24.92879	5.092342	-0.53279	1.446727		
8--wc9	abi5	25.07724	5.25316	-0.37173	1.293908		
8-c9c9	abi5	25.59599	5.730885	0.105749	0.929322		
8-c9c9	abi5	25.76823	5.917286	0.292391	0.816548		
8-c9c9	abi5	25.39536	5.554882	0.357393	0.780574	0.842148	0.063367
8-ww	at2g	26.9706	6.685287		1	1	0
8-ww	at2g	26.94059	6.870306		1		
8-ww	at2g	26.92731	6.926376		1		
8--wc9	at2g	18.33055	-1.58048	-8.26577	307.7826	311.4933	2.656283
8--wc9	at2g	18.41747	-1.41898	-8.28929	312.8418		
8--wc9	at2g	18.4565	-1.36758	-8.29396	313.8555		
8-c9c9	at2g	18.77405	-1.06643	-7.75172	215.5261	227.6345	9.52543
8-c9c9	at2g	18.83574	-1.02936	-7.89967	238.8014		
8-c9c9	at2g	18.94079	-0.91015	-7.83653	228.5761		
8-ww	rd20	18.89902	-1.38629		1	1	0
8-ww	rd20	18.97764	-1.09265		1		
8-ww	rd20	19.04836	-0.95258		1		
8--wc9	rd20	18.31094	-1.60009	-0.2138	1.159738	1.346198	0.144691
8--wc9	rd20	18.29338	-1.54306	-0.45042	1.366437		
8--wc9	rd20	18.27464	-1.54943	-0.59686	1.51242		
8-c9c9	rd20	21.62449	1.784004	3.170292	0.111083	0.133511	0.016649
8-c9c9	rd20	21.6243	1.759192	2.851837	0.13852		
8-c9c9	rd20	21.62641	1.775469	2.728045	0.15093		
8-ww	aldh7b4	19.30919	-0.97612		1	1	0
8-ww	aldh7b4	19.18389	-0.8864		1		
8-ww	aldh7b4	19.23787	-0.76307		1		
8--wc9	aldh7b4	18.90878	-1.00225	-0.02612	1.018272	1.056994	0.040624
8--wc9	aldh7b4	18.89402	-0.94243	-0.05603	1.0396		

Sample Name	Target Name	C _T	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ⁻ ΔΔC _T	2 ⁻ ΔΔC _T Mean	stdev
8--wc9	aldh7b4	18.90641	-0.91767	-0.1546	1.11311		
8-c9c9	aldh7b4	21.95288	2.112396	3.08852	0.117561	0.128299	0.010998
8-c9c9	aldh7b4	21.99118	2.126076	3.012476	0.123924		
8-c9c9	aldh7b4	21.88962	2.038683	2.801756	0.143413		
8-ww	gols2	23.86714	3.581831		1	1	0
8-ww	gols2	23.75838	3.688091		1		
8-ww	gols2	23.88991	3.888973		1		
8--wc9	gols2	23.06059	3.149563	-0.43227	1.349353	1.44536	0.11117
8--wc9	gols2	23.05409	3.21764	-0.47045	1.385543		
8--wc9	gols2	23.03391	3.209835	-0.67914	1.601183		
8-c9c9	gols2	24.93273	5.092245	1.510414	0.35101	0.368044	0.018402
8-c9c9	gols2	25.02905	5.163944	1.475853	0.359521		
8-c9c9	gols2	25.08511	5.234171	1.345198	0.3936		
8-ww	p5cs1	19.15757	-1.12774		1	1	0
8-ww	p5cs1	19.06921	-1.00108		1		
8-ww	p5cs1	19.16185	-0.83908		1		
8--wc9	p5cs1	18.66354	-1.24749	-0.11975	1.086547	1.073706	0.069178
8--wc9	p5cs1	18.85968	-0.97677	0.024307	0.983293		
8--wc9	p5cs1	18.78176	-1.04232	-0.20324	1.151278		
8-c9c9	p5cs1	20.72265	0.882172	2.009907	0.248289	0.267056	0.014648
8-c9c9	p5cs1	20.67989	0.814785	1.815865	0.284034		
8-c9c9	p5cs1	20.907	1.056063	1.895147	0.268846		

【評語】 060007

相當創新的科展作品，發現胜肽 AtCAPE1 可以從根分泌到植物體外。也設計出很有趣的實驗說明植物可以藉由胜肽影響旁邊的植物的存活，也就是說植物可能可以透過胜肽做植物個體間的溝通。實驗結果的創性度很好，應可以加強對該新機制的生態及生理意義的了解。作者的表達能力以及對該題目了解程度都很好。