

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060008

參展科別 植物學

作品名稱 當機立「斷」—— 浮萍自裂脫險的機制與
生態意義

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 國立臺南第一高級中學

臺南市私立德光高級中學

指導教師 鄭楷騰、江芝韻

作者姓名 林子翔、洪瑋廷、周柏仰

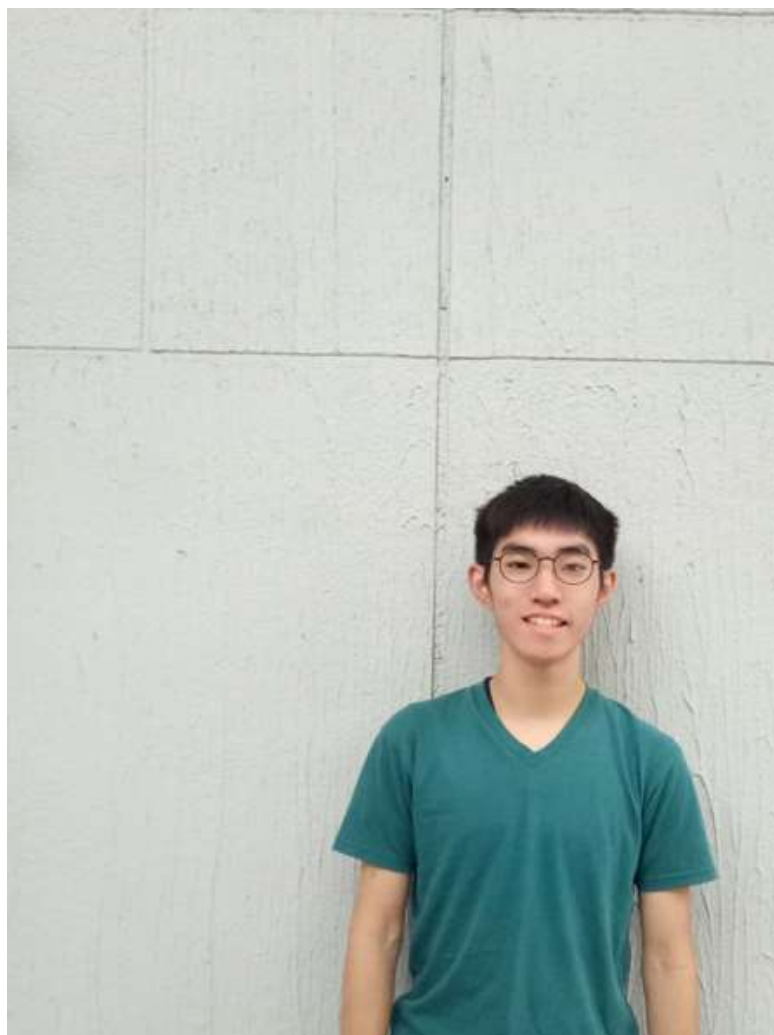
關鍵詞 青萍、紫萍、斷裂

作者簡介



我是林子翔，就讀臺南一中高三，在學校多元的課程當中，提供我廣闊的視野和眼界，在面對問題時，以多面向的角度思考，或許從不同的角度切入，就有不一樣的突破呢！在科展過程中，雖然我們有時會彼此意見不合，但當我們每次得出實驗結果，得以繼續下一步時的那份喜悅，讓先前的辛苦都值得了。

我是洪瑋廷，就讀臺南一中高三。從數年前開始的小實驗，沒想到這麼一做也過兩年了，兩年來跟著老師觀察現象、設計實驗到推論假說，實驗如火如荼進行時才發現原來做研究是如此繁忙的一件事。儘管重複許多次，卻發現結果仍不如預期，甚至與原先假設完全相反！這種抽絲剝繭，探究真相的過程，才是科學最令人著迷部分啊！



我是周柏仰，就讀台南德光中學高二。從國二開始參加科展，在這四年之中，讓我對於科學有進一步的認識。上了高中之後，一開始也曾因為無法在課業和科展之間取得平衡，而感到迷惘，但適應後，漸漸發現科展不僅僅能夠探討有趣現象，更讓我在高中課程中能夠有更深一層的理解。未來，我也會記起科學教會我的事，繼續探索科學。

摘要

浮萍在逆境下葉狀體會有分離的現象，本研究證實：浮萍透過葉狀體分離，增加逃離逆境的機率，提升族群生存率。此分離機制受到過氧化物質(H_2O_2)的調控，逆境下，浮萍母葉節處(node)的 H_2O_2 含量上升並誘導細胞死亡，進而造成連接構造斷裂，另能透過乙烯途徑活化纖維素分解酶使葉狀體分離。我們也發現青萍及紫萍具不同生存策略：青萍對 H_2O_2 的高敏感度使其能在逆境下快速分離，進而降低其葉狀體間的內聚力，更容易藉由風吹或水流加速逃離逆境；紫萍則對 H_2O_2 較不敏感且內聚力大，以較大的單一個體及對逆境的高耐受性來渡過危機。蛋白質含量極高的浮萍是蛋白質補給品的好原料，期待分離機制的深入研究能應用在浮萍種植上，使其快速分離提升產量，應對將到來的糧食危機。

ABSTRACT

Duckweed is a widespread plant around the world, which had the phenomena of frond division. In this research, we found out that duckweed fronds will divide under stress, which increases the chances of escape, leading to higher survival rate of the whole group. This division mechanism is under the control of hydroperoxide. When duckweed encounters stress, the content of H_2O_2 will accumulate at node between fronds, causing cell death and following by the fracture of the connection structure. In addition, duckweeds can also divide through another pathway, which was related to the effects of ethylene-activated cellulase. Furthermore, *Lemna aequinoctialis* and *Landoltia punctata* had different strategies upon stresses. The *Lemna aequinoctialis* was more sensitive to lower amount of H_2O_2 , leading to quicker division under stress. After division, the cohesion decreased, which means that the individual frond could escape easier via winds or water flow. On the other hand, *Landoltia punctata* had higher threshold when detecting H_2O_2 , and had higher cohesion between its fronds. In conclusion, the status without frond division of larger size and its higher tolerance help *Landoltia punctata* undergo the stress. With relatively high protein content, duckweed is a good candidate for future protein production. The results of this study are valuable and could be used in future breeding and production of duckweed industry, which might help human being assist in facing the crisis of food shortage in the future.

壹、研究動機

前年的科展中，我們發現在硬幣水下的青萍、紫萍會葉狀體分離，並猜測葉狀體分離是浮萍的生存機制。我們好奇分離後的浮萍真的能夠利用這項機制，長回原本樣貌嗎？不同種浮萍背後的生存機制相同嗎？又究竟是哪些因素的調節或者是否有其他的外力因素？我們花了兩年時間，試圖找出隱藏在浮萍葉狀體分離背後的祕密，並探討其機制與生態上的意義。

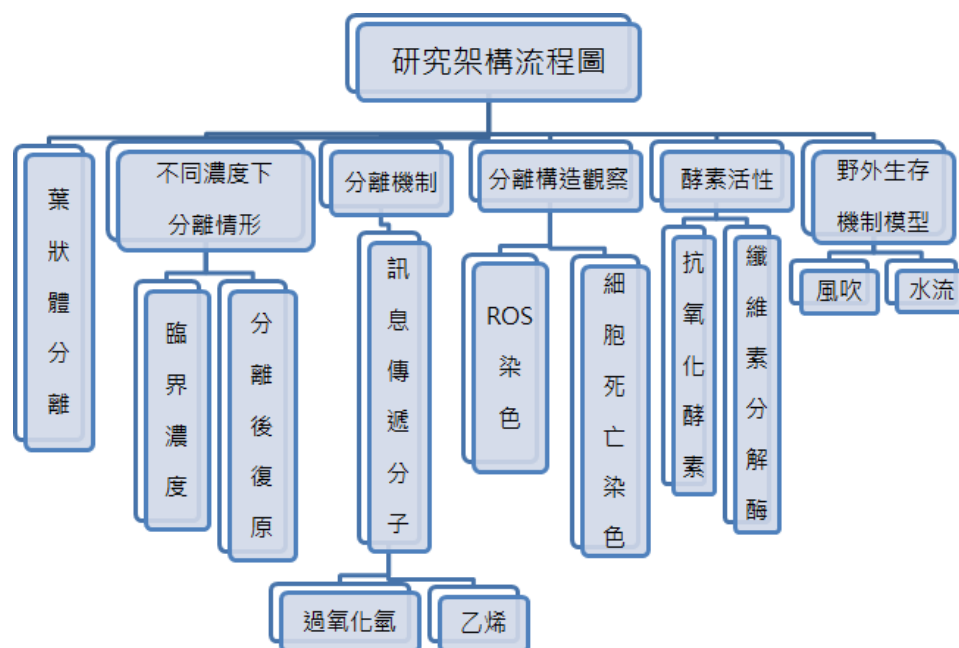
貳、研究目的

- 一、探討浮萍在逆境下葉狀體分離機制。
- 二、比較兩浮萍在逆境下葉狀體分離速度及對逆境敏感度差異。
- 三、研究葉狀體分離對處於逆境中的浮萍有何幫助。
- 四、比較兩浮萍在逆境中生存策略異同。
- 五、探討浮萍葉狀體分離的訊息傳遞分子及誘導葉狀體分離的途徑。
- 六、觀察浮萍葉狀體分離連接構造的斷裂位置與細胞死亡狀況。
- 七、探討在野生環境中葉狀體分離對於生存機率的影響。
- 八、研究浮萍自然相聚與分離後分散程度的物理理論模型。

參、研究設備與器材

- 一、研究材料：青萍(*Lemna aequinoctialis*)、紫萍(*Landoltia punctata*)
- 二、實驗藥劑：CuCl₂、CaCl₂、DAB、MES buffer pH6.8、界面活性劑、NAC、液態氮、乙醇、磷酸氫鉀緩衝溶液 (pH7.0)、磷酸氫鈉緩衝溶液(pH6.8)、維他命 C、愈創木酚、ddH₂O、過氧化氫、EDTA、EGTA、丙酮、AnSiP[®]、Evans blue、NaAc Buffer(pH4.8)、DNS、DAB
- 三、實驗器材：天秤、離心管、冷凍離心機、比色管、震盪儀、分光光度計、微量吸管、培養皿、濾紙、研鉢、杵、顯微鏡、馬達、風速計、風扇、真空抽氣機、水浴槽

肆、研究過程與方法



一、 浮萍培養:從校園水池採集青萍及紫萍

(一)、從校園取採集浮萍後改放至溫室培養。

(二)、實驗環境位於 27°C 培養箱中，16hr 光照。

二、 過氧化物質(ROS)染色

將 DAB 0.2g 加至 100ml MES 緩衝溶液(pH=6.8)，將樣本和 DAB 藥劑置入培養皿中，抽真空 10 分鐘，再放置暗處 8 小時，最終置於 99%酒精中，退去葉綠素。

三、 抗氧化酵素活性測定：

(一)、 青萍、紫萍樣本萃取

取浮萍樣本磨碎，加入 pH7.0 磷酸氫鉀緩衝溶液(比例 1:1)，最後以 13200rpm 離心十分鐘後抽取上清液。

(二)、 蛋白質濃度測定:

使用 DC™ Protein Assay 測定蛋白質濃度，取萃取液 2μl 與 Reagent A 100μl 混合，再加入 Reagent B 800μl，靜置 15 分鐘，測量 750nm 吸光值。

(三)、 過氧化酶(Peroxidase, POD):

試管中加入 0.5ml 磷酸氫鉀緩衝溶液(pH7.0)、0.25ml 蒸餾水及 0.1ml 愈創木酚(2.5%)、2 μ l 蛋白質萃取液、0.1ml 過氧化氫，倒入塑膠比色管中測量 470nm 1min 吸光值變化。

(四)、 過氧化氫酶(Catalase, CAT):

試管中加入蛋白質萃取液(紫萍 40 μ l、青萍 10 μ l)、30mM 雙氧水(紫萍 960 μ l、青萍 990 μ l)，加入比色管以水為 Blank，測量五分鐘 240nm 吸光值每分鐘變化量。

(五)、 抗壞血酸過氧化酶(Ascorbate Peroxidase, APX):

試管中加入 0.25ml pH7.0 磷酸氫鉀緩衝溶液、0.25ml 1.5mM 抗壞血酸、0.1ml 0.75mM EDTA、0.02ml 萃取液、0.125ml 6mM H₂O₂，混合後測量其一分鐘內 290nm 吸光值變化量。

四、 纖維素分解酶活性：

將浮萍磨碎，加入 700 μ l 50mM pH4.8 醋酸鈉緩衝溶液，13200rpm 離心 10 分鐘抽取上清液，將等量濾紙放入離心管，加入 0.5ml 萃取液，並放入 50°C 恆溫水域，60 分鐘後加入 3ml DNS 藥劑，煮沸 5 分鐘後測量 540nm 吸光值。

五、 細胞死亡染色：

將組織浸入 0.25% Evans blue 染劑中，抽真空三次，退染後利用顯微鏡觀察細胞死亡部位。

六、 野外環境建模：

(一)、 風吹模擬野外環境

將塑膠水缸裝水至約八分滿，在水缸中心放置 10 株浮萍，並在固定位置放置風速 1.6m/s 之下，並比較不同組別分散程度。

(二)、 水流模擬野外環境

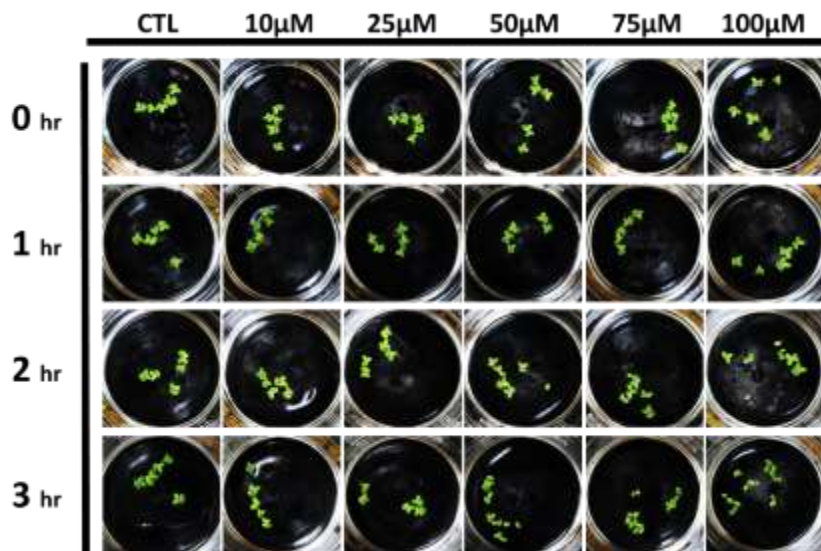
將塑膠水缸裝水至七分滿，在水缸中心放置 10 株浮萍，並將吸管自製穩流器置於出水口，再以抽水馬達固定出水速率（41.67ml/sec），比較不同組別浮萍分散程度。

伍、研究結果

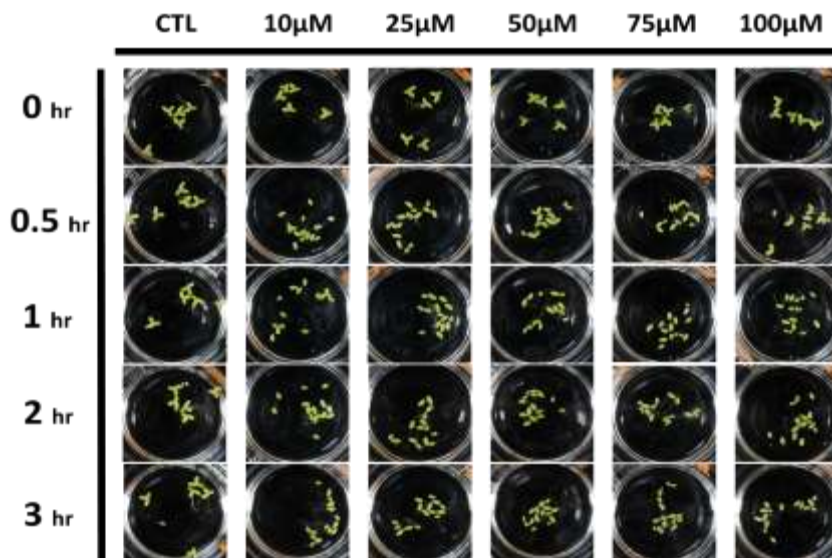
一、銅離子對浮萍葉狀體分離的影響

前年的研究中我們發現浮萍在金屬逆境下會有葉狀體分離的現象，而今年為了深入了解浮萍葉狀體分離的原因及其目的，我們挑選了銅離子作為實驗材料並作了以下實驗。

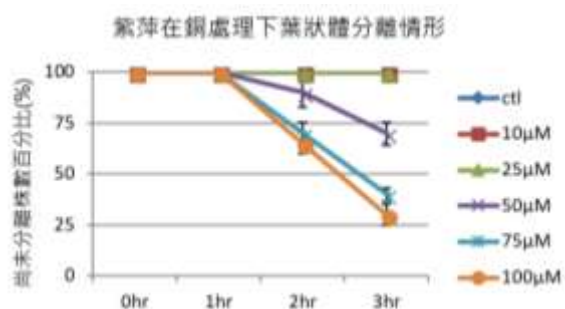
為了找到浮萍分離的臨界濃度，我們以 10 倍差距的銅離子濃度來處理浮萍，選取大小型態相近的浮萍放入 150ml 燒杯中，再加入不同濃度的氯化銅溶液(0、10、100、1000 μ M)，放入培養箱觀察。實驗結果我們發現分離的臨界大約在 10~100 μ M 之間，為了解浮萍在分離臨界間內部的機制調控與細胞生理變化，我們將 10~100 μ M 又細分為 10、25、50、75、100 μ M，觀察葉狀體的分離情形。



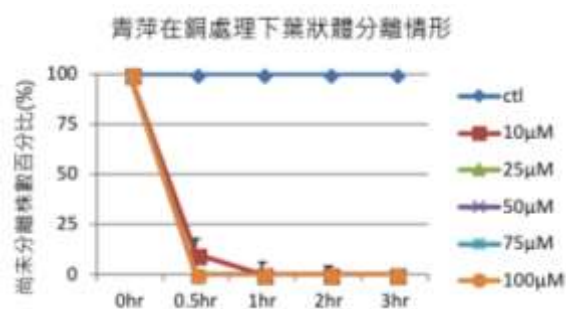
(圖1-1) 紫萍在細分濃度銅處理下葉狀體分離情形



(圖1-2) 青萍在細分濃度銅處理下葉狀體分離情形



(圖1-3) 紫萍銅處理下葉狀體分離情形



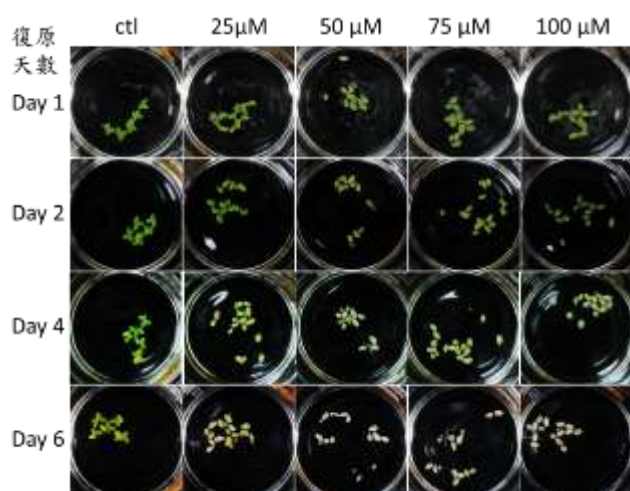
(圖1-4) 青萍銅處理下葉狀體分離情形

綜合上述圖表，紫萍與青萍分離機制明顯不同。紫萍在 25μM 銅處理三小時後仍無分離情形，而青萍在最低濃度 10μM 銅處理短時間即出現明顯的分離情形。我們推測兩者面對逆境的抵抗機制不同：**青萍在逆境中藉由快速分離來增加逃出逆境的機率**。因此我們設計以下實驗，觀察分離後若脫離逆境，兩種浮萍的生存機率是否有差異。

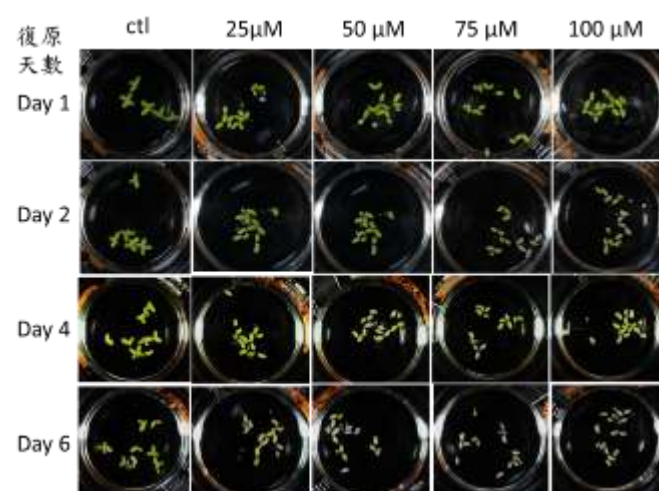
二、銅離子處理後浮萍復原情形

浮萍雖為被子植物，但主要是採用無性生殖以葉狀體增生的方法來增加族群的大小，並以葉狀體分離的機制增加族群個體數，為一循環生活史。

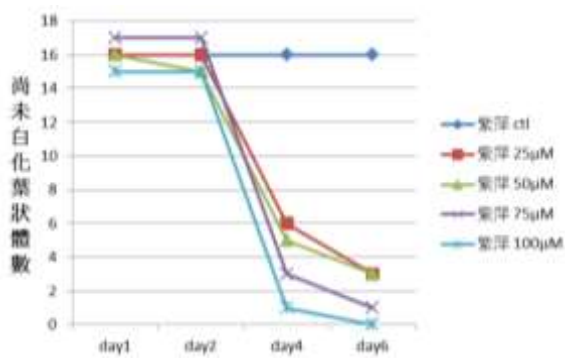
因此，在外加銅離子的實驗中，我們推測浮萍葉狀體分離是為了脫離逆境，增加生存機會。為了驗證此假設，我們便將浮萍分別放入 25、50、75、100μM 銅離子溶液中，待其葉狀體分離後即放入正常水域，模擬浮萍成功逃脫逆境後的生長狀態。



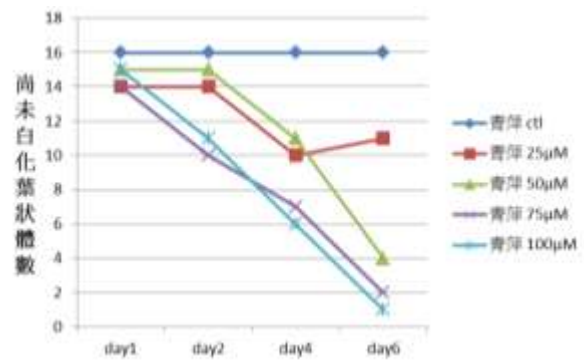
(圖2-1) 紫萍在葉狀體分離後移入正常水域後的生長情形



(圖2-2) 青萍在葉狀體分離後移入正常水域後的生長情形



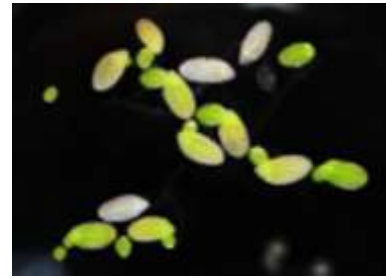
(圖2-3) 紫萍移入正常水域後尚未白化葉狀體數



(圖2-4) 青萍移入正常水域後尚未白化葉狀體數



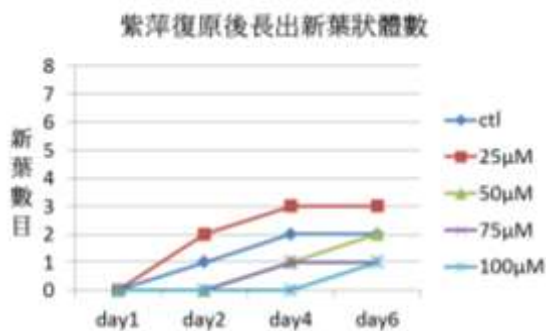
(圖2-5) 紫萍復原後長出新葉25μM Day6



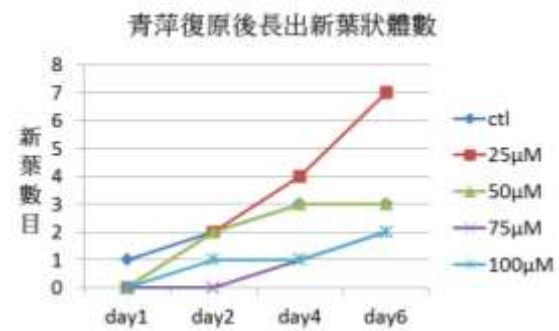
(圖2-6) 青萍復原後長出新葉25μM Day6

紫萍在逆境中下數小時後才開始分離，而青萍在放入逆境後約 1 小時，即全數分離。

在實驗當中我們發現部分浮萍在移回正常水域後有長出新葉狀體的情形，因此我們以天數及長出新葉狀體數目作圖來定量分析。



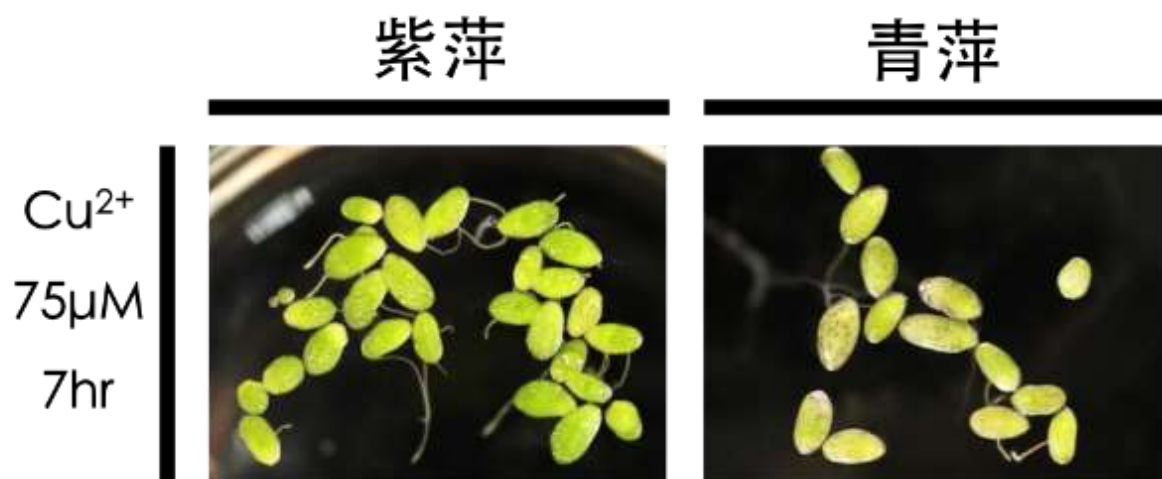
(圖2-7) 紫萍移入正常水域後長出新葉狀體數



(圖2-8) 青萍移入正常水域後長出新葉狀體數

從圖 2-1 中可以看到浮萍的葉片逐漸白化。綜合圖 2-5 與 2-6 發現紫萍在第六天觀察到的白化現象較青萍嚴重。長時間復原後觀察生長情況，發現青萍在白化葉狀體上，有新生的子葉狀體(如圖 2-6)，復原狀況優於紫萍。**推測青萍於野生的環境下若順利脫離，則較紫萍具有更高的生存優勢。**

但先前實驗中，卻發現相同濃度銅處理若未撈回正常水域，則青萍生長較紫萍差，為了進一步觀察，選用 75μM 銅處理，觀察長時間生長情形。



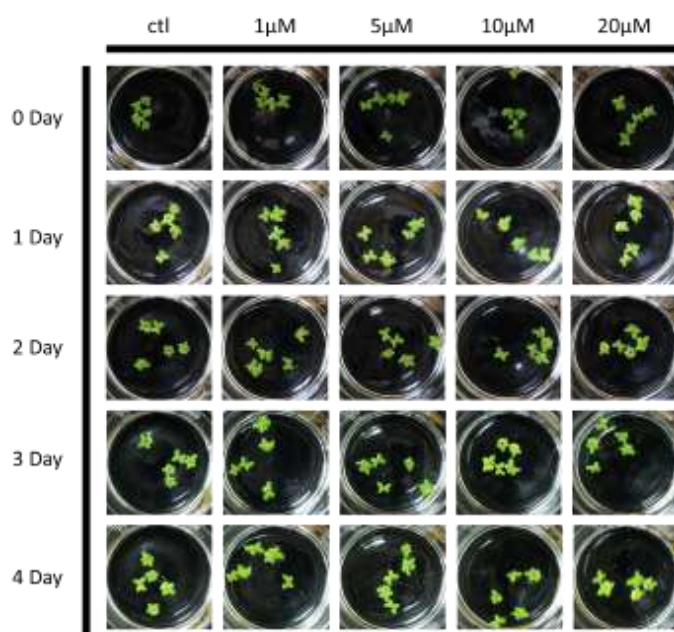
(圖2-9) 紫萍與青萍長時間逆境下的外觀型態差異

如圖 2-9 所示，7 小時後，青萍葉面開始出現黃化及潰爛等現象。由此證實，紫萍與青萍若持續處於相同逆境中，當未逃脫逆境回到正常水域時，則紫萍生長情形較青萍更具優勢。

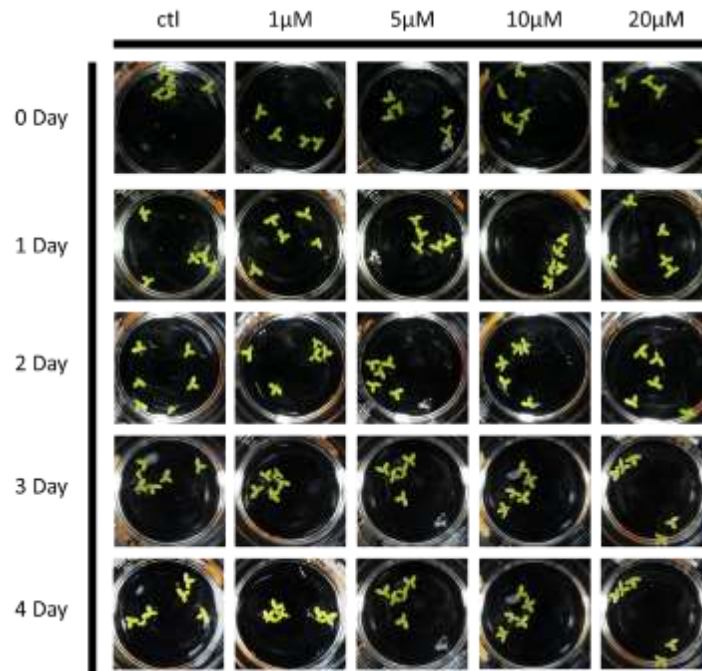
三、 浮萍葉狀體分離原因探討

經以上實驗，我們進一步對浮萍分離的原因進行探討，查詢資料後我們發現植物體內最常見的訊息傳遞分子是鈣離子，而近年來研究發現過氧化物質(ROS) 可能不只是對植物體造成傷害，也可能被植物體用來做為訊息傳遞分子，啟動對抗逆境的機制，進而協助植物抵抗逆境，因此我們做了以下實驗：

(一)、 鈣離子對於浮萍葉狀體分離的影響



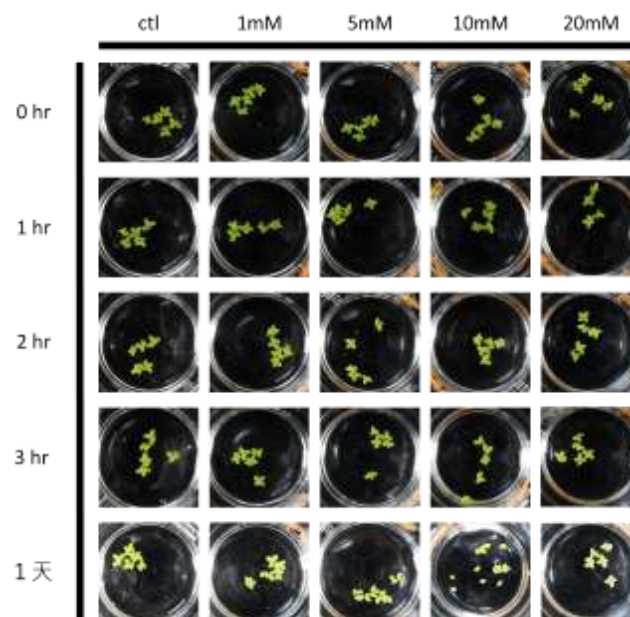
(圖3-1) 紫萍在鈣離子處理下的生長情形



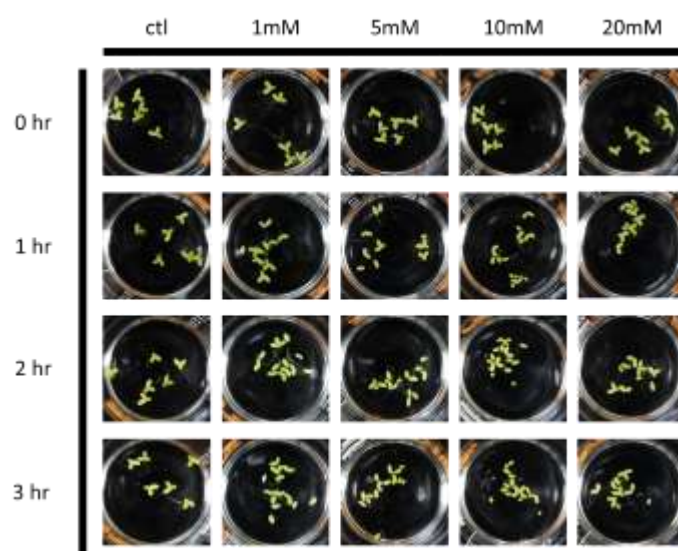
(圖3-2) 青萍在鈣離子處理下的生長情形

從圖 3-1、3-2 中可以看到，紫萍及青萍在鈣離子處理 4 天後皆無生長狀況惡化的情形，也沒有出現葉狀體分離的現象，因此我們推測：鈣離子並未參與浮萍葉狀體分離的訊息傳遞路徑。

(二)、 過氧化氫對於浮萍葉狀體分離的影響



(圖3-3) 紫萍在過氧化氫處理下的生長情形



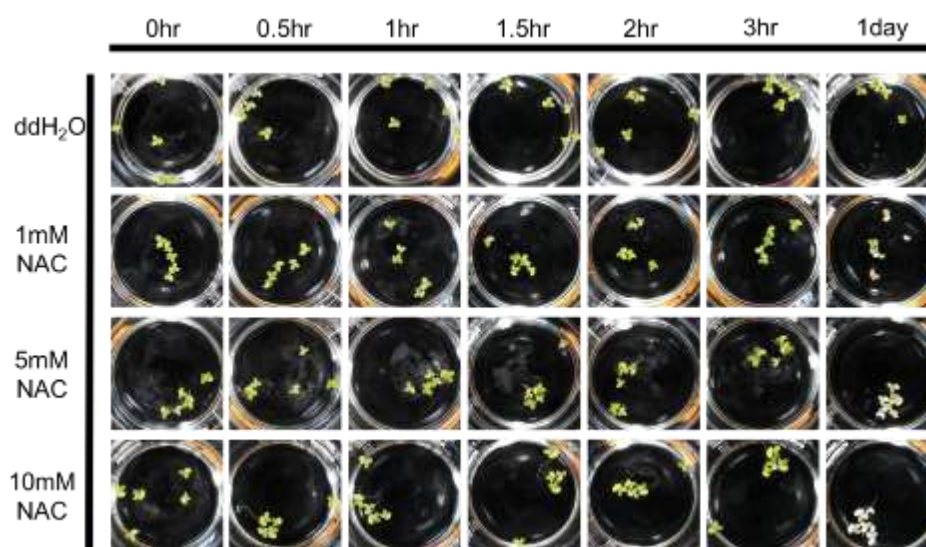
(圖3-4) 青萍在過氧化氫處理下的生長情形

在圖 3-3 中可以看到，紫萍在過氧化氫 10mM 和 5mM 濃度處理下，一天後開始出現葉狀體分離的情形。而在圖 3-4 中可以看到，加入 10mM 過氧化氫處理下，青萍 1 小時即出現葉狀體分離的現象，而在處理過氧化氫最低濃度 1mM 下，3 小時後葉狀體全數分離。

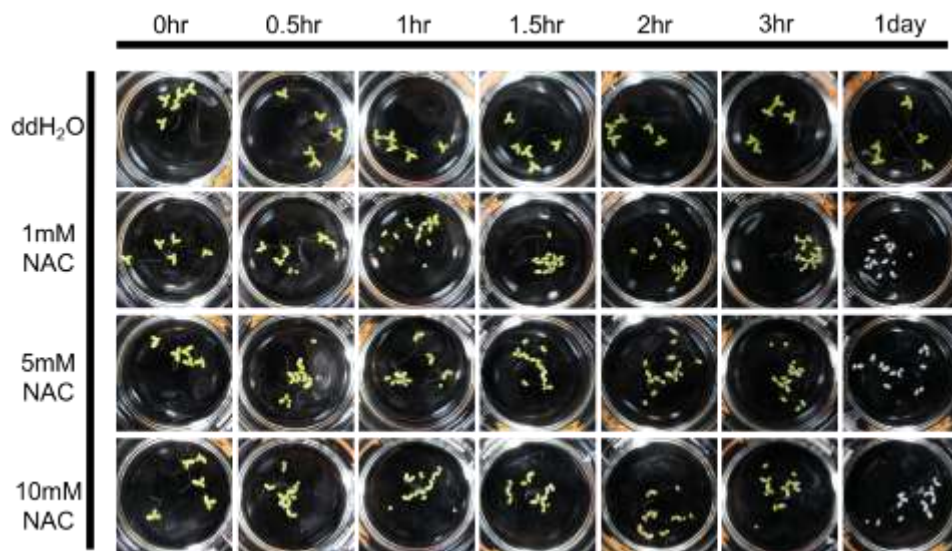
據上述實驗可知，青萍與紫萍在沒有銅離子存在時，僅有過氧化氫即會葉狀體分離，推測過氧化氫在葉狀體分離機制中可能扮演訊息傳遞的角色。

四、 抗氧化劑對浮萍葉狀體分離的影響

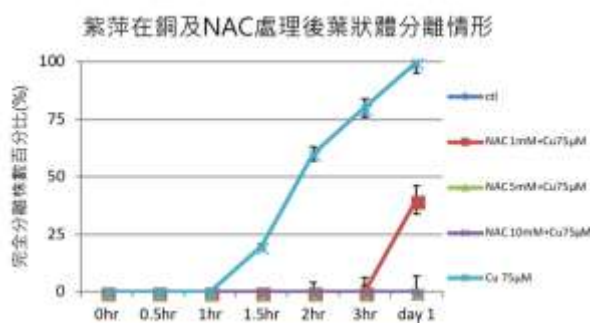
在上述實驗中我們發現過氧化氫會促進紫萍及青萍的葉狀體分離，為了確定銅離子逆境會透過過氧化氫作為訊息傳遞分子，使葉狀體分離，我們加入抗氧化劑 NAC 作為反證。



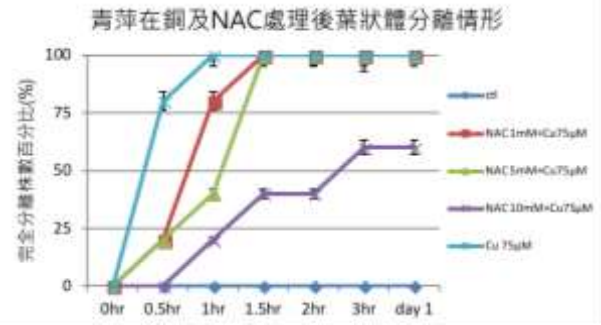
(圖4-1) 紫萍在75 μ M銅處理下加入抗氧化劑的生長情形



(圖4-2) 青萍在75 μ M銅處理下加入抗氧化劑的生長情形



(圖4-3) 紫萍75 μ M銅處理下加入NAC的生長情形

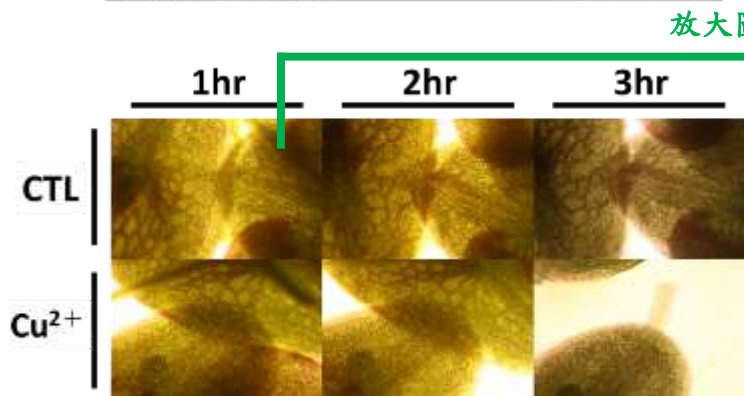
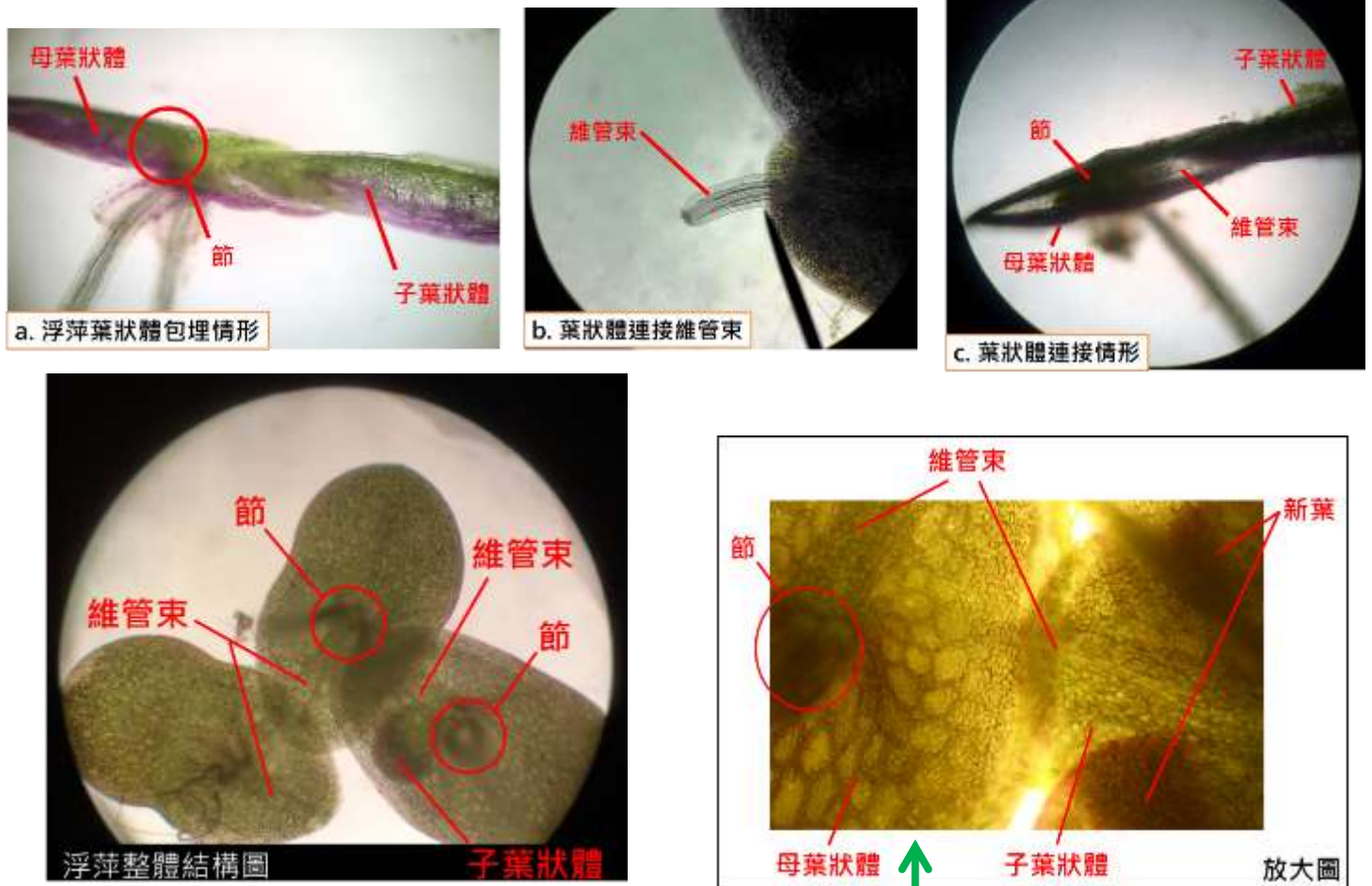


(圖4-4) 青萍75 μ M銅處理下加入NAC的生長情形

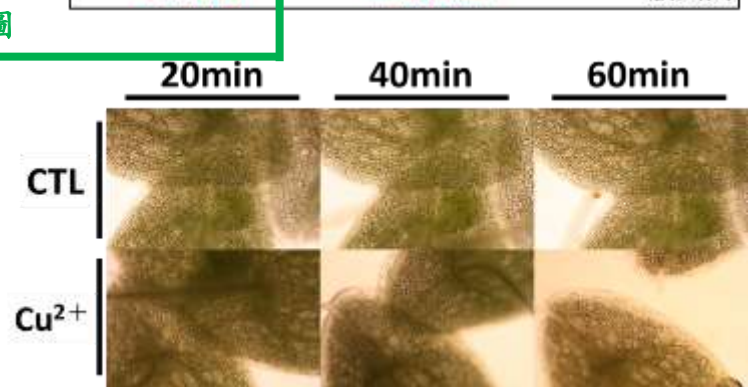
從圖 4-3、4-4 可以看到兩種浮萍在加入抗氧化劑 NAC 後，葉狀體分離的情形明顯減緩，所以我們可以推測銅離子是藉由過氧化氫來參與葉狀體分離的訊息調控。

五、浮萍葉狀體連結構造

觀察到了浮萍葉狀體的分離現象之後，我們好奇浮萍的葉狀體彼此是如何連接的呢？因此我們以光學顯微鏡觀察浮萍在不同狀態下的連接機制。



(圖5-1) 紫萍在不同狀態下的葉狀體連接情形

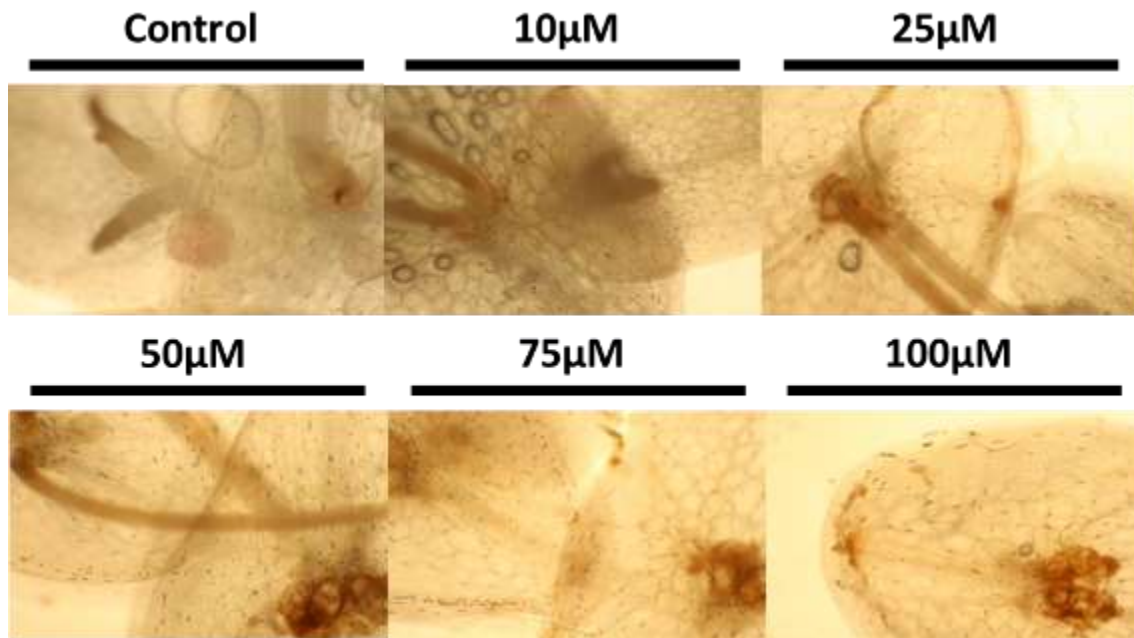


(圖5-2) 青萍在不同狀態下的葉狀體連接情形

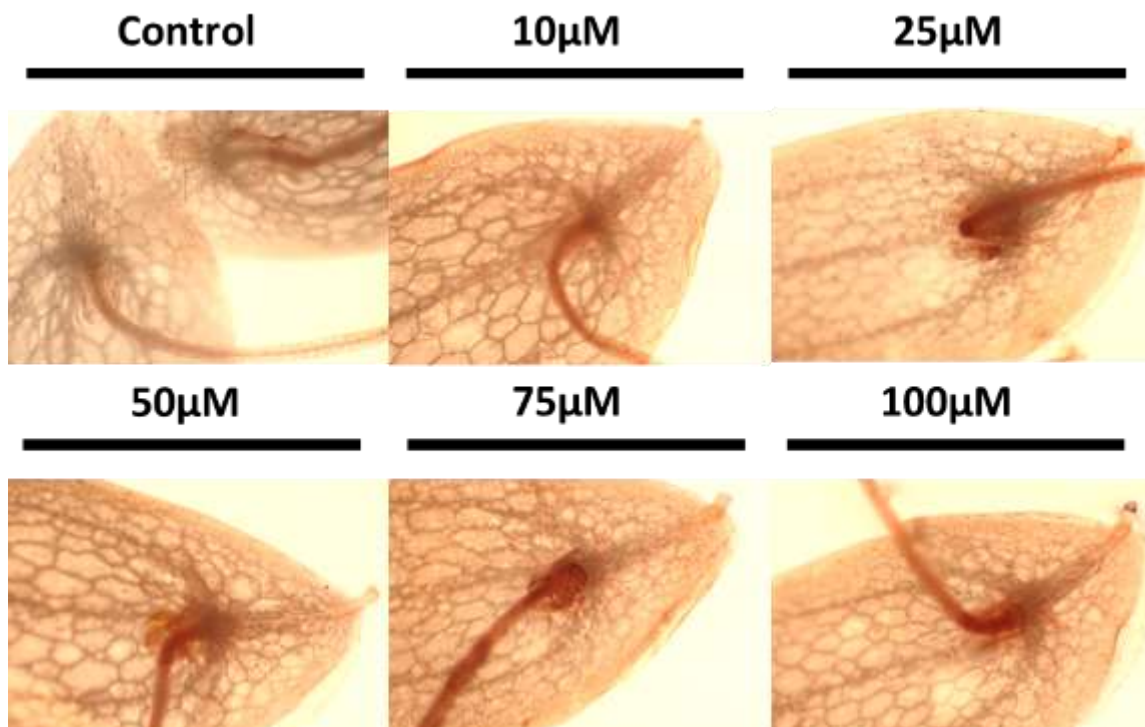
由上圖 5-a.中可見，浮萍葉狀體互相包埋，且連接構造維管束接在母葉的節上。圖 5-1、5-2 銅處理後，可到看到子葉狀體的分離斷裂是從母葉的節處脫離。

六、浮萍體內的過氧化物質

觀察完連接構造後，且由先前實驗發現，浮萍藉由產生過氧化氫作為訊息傳遞因子，而我們好奇過氧化物質是累積於連接構造的何處，因此對紫萍及青萍進行了 DAB 染色，觀察過氧化物質累積處，其中深褐色部分是 ROS 累積較多處。

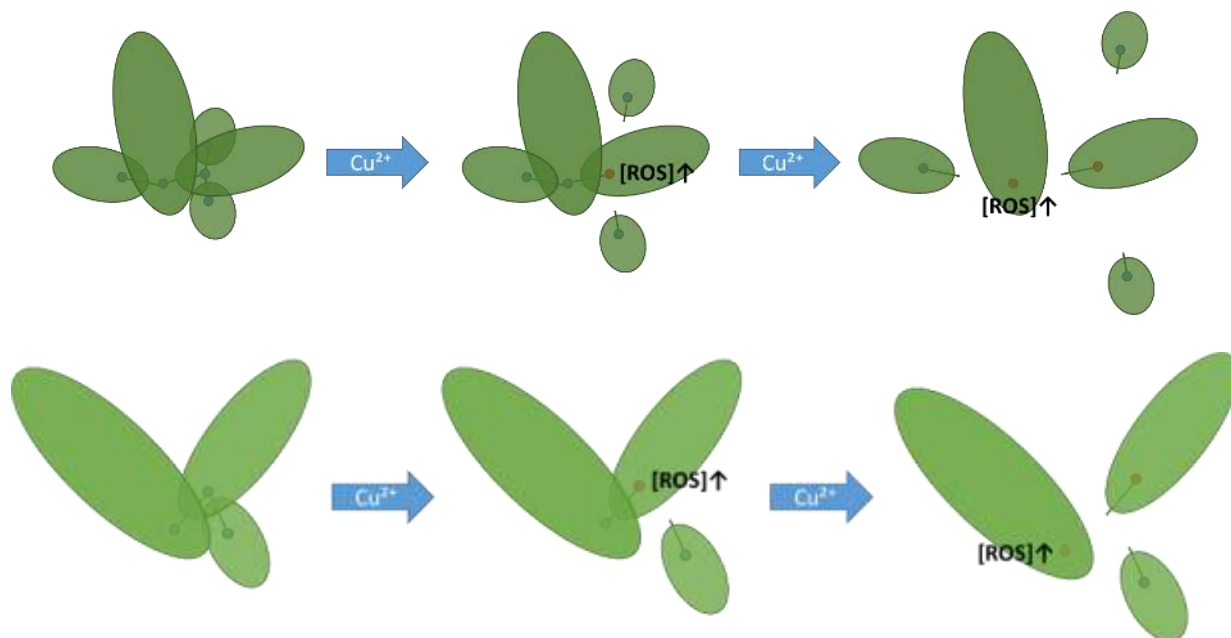


(圖6-1) 紫萍過氧化物質ROS的累積



(圖6-2) 青萍過氧化物質ROS的累積

由上兩圖中可以看到，紫萍與青萍 ROS 皆累積在母葉狀體的節（node）上，經實驗觀察染色，我們可以發現較年輕的子葉狀體節上所累積的 ROS 比母葉較少。並且配合圖 5-1、5-2 的觀察，發現浮萍葉狀體連結構造皆是由母葉的節處累積大量 ROS 後斷裂分離，且其子葉狀體的脫離順序，是傾向於從較年輕（較小型葉狀體）到老（較大型葉狀體）。

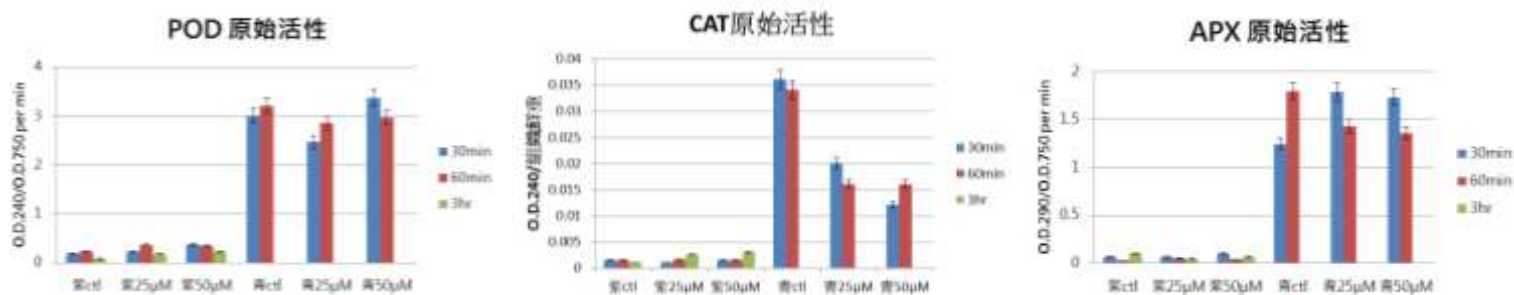


(圖6-3) 紫萍及青萍葉狀體分離示意圖

七、 抗氧化酵素對於葉狀體分離的影響

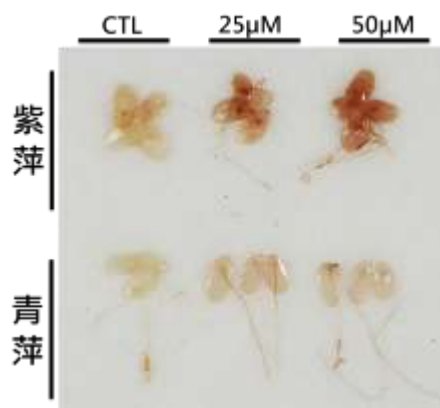
做完前述實驗後，我們得知紫萍及青萍在逆境下 ROS 會參與葉狀體分離的調控，而植物體內 ROS 的含量受到體內抗氧化酵素調控，因此我們想知道青萍及紫萍體內的抗氧化酵素活性差異，以及在經過逆境後的活性變化。

從先前實驗的結果，我們發現紫萍葉狀體分離速度較青萍慢。我們推測，紫萍體內抗氧化酵素活性可能比青萍高，藉此減少逆境下 ROS 的累積，來達到較慢的葉狀體分離速度。為了驗證我們的假設，我們測定了浮萍在銅離子下，抗氧化酵素的活性變化。



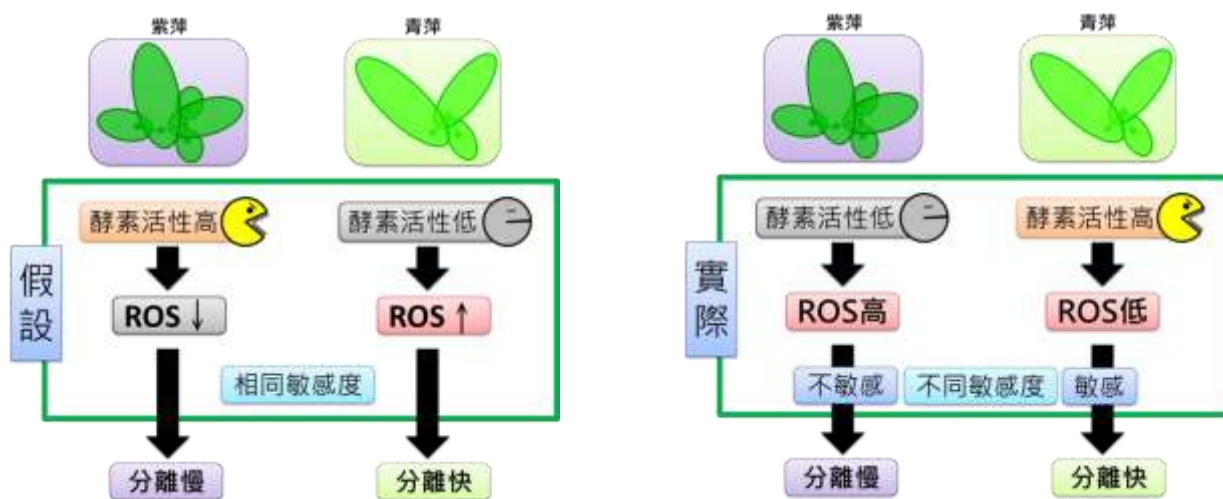
(圖7-1) 抗氧化酵素活性

綜合上述圖表，紫萍與青萍在不同時間與不同銅離子濃度處理下，三種酵素的活性與對照組相比都沒有顯著的差異。但，值得注意的是，在青萍中，不論是對照組或是處理組，其體內三種抗氧化酵素的活性，皆較紫萍高出許多，其中，POD、CAT 的高出十倍，而 APX 甚至高達約 20 倍。實驗結果與我們原來假設的紫萍抗氧化酵素活性較高相反。此時我們好奇青萍既然較快分離，而體內抗氧化酵素活性又高出紫萍許多，那麼體內 ROS 累積量是否會較紫萍低呢？因此我們以相同逆境條件處理紫萍及青萍，並以 DAB 染色 3hr 後觀察其體內 ROS 累積量，並探討 ROS 與抗氧化酵素活性的關係。



(圖7-2) 紫萍及青萍不同濃度處理下ROS累積量

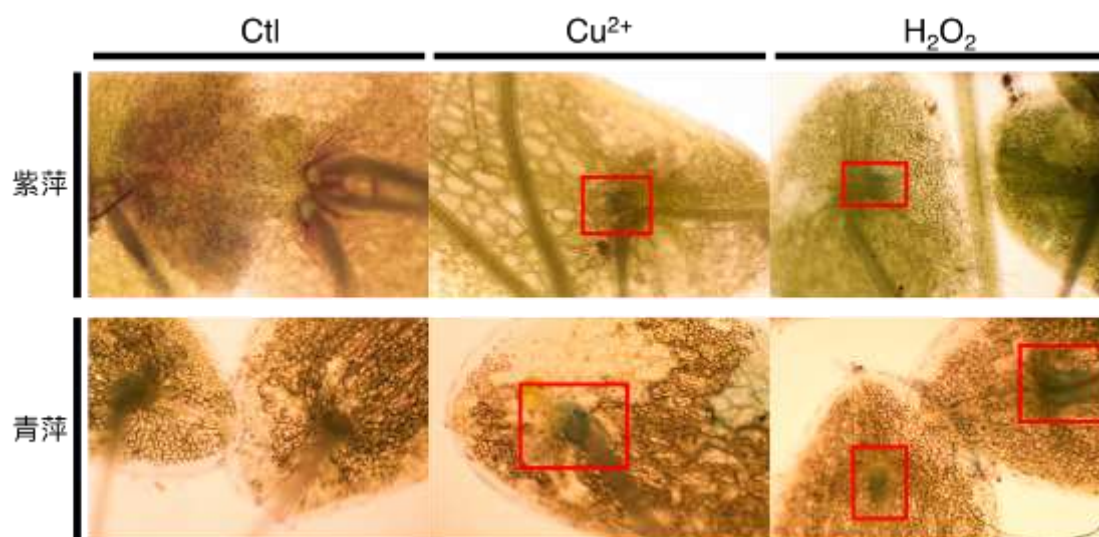
從圖 7-2 可以明顯看到紫萍及青萍經過銅處理後，青萍體內累積的 ROS 明顯較紫萍少，佐證了青萍具高抗氧化酵素活性的實驗結果，而高活性抗氧化酵素能提升青萍體內的 ROS 清除力，進而減少逆境下 ROS 的累積。但為何在逆境下紫萍卻較青萍慢分離，我們推測是紫萍對於 ROS 較不敏感，因此必須累積大量 ROS 才能啟動葉狀體分離的訊息傳遞。而配合先前圖 3-3、圖 3-4，青萍在雙氧水處理下，低濃度短時間即出現葉狀體分離，相較紫萍需要高濃度且長時間的雙氧水處理才會出現分離，更證明了青萍對於過氧化物質的敏感度較紫萍高上許多。



八、葉狀體分離與細胞死亡

查詢文獻後，我們發現：ROS 會誘導細胞死亡，如圖 6-3 所示，紫萍及青萍在老葉節處累積 ROS，造成子葉狀體分離。所以猜想：是否因為 ROS 的累積，而造成連接處的細胞執行細胞程序性死亡，進而使葉狀體分離，因此在銅離子和雙氧水處理後，進行細胞死亡染色，藉此觀察由何處的細胞最先開始死亡，及細胞死亡的位置與 ROS 累積位置是否相符。

我們利用 Evans blue 染劑進行細胞死亡染色，圖中呈現藍色部分代表染劑滲入細胞，也就是細胞死亡處。



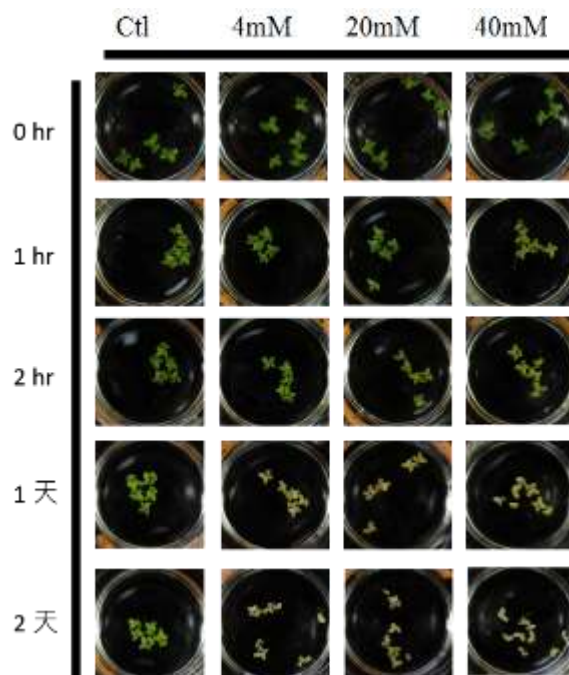
(圖8-1)細胞死亡染色

根據上圖，我們清楚看到細胞死亡的位置與 ROS 累積位置皆位於節處，進一步確認由 ROS 作為訊息傳遞分子，誘導節處細胞死亡進行葉狀體分離。而從圖中可知，紫萍細胞死亡範圍較小，符合紫萍較慢分離的實驗結果，印證了青萍對逆境敏感度高而使葉狀體快速分離。

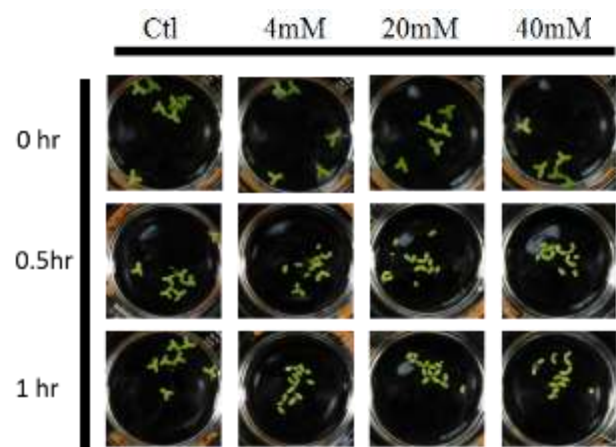
九、乙烯對與浮萍葉狀體分離的影響

根據上述實驗，讓我們不禁聯想，浮萍葉狀體分離的模式彷彿與植物離層斷裂有些相似，而植物離層發生是透過乙烯途徑，會不會其實浮萍的葉狀體分離也是受到乙烯途徑所影響呢？

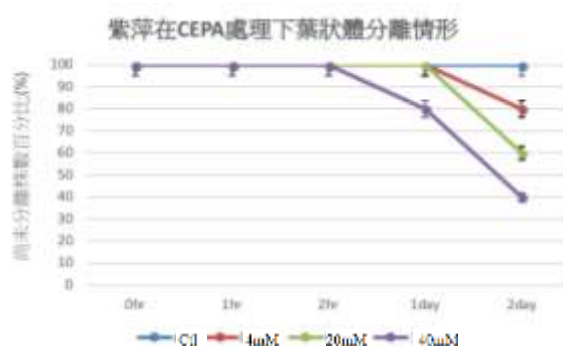
查詢文獻後，我們發現農業上有一種催熟劑稱為益收生長素 (2-Chloro-ethylphosphonic acid, CEPA)，將液體稀釋於水溶液當中，便會釋放乙烯。我們便觀察浮萍在乙烯處理下，葉狀體分離現象是否有受影響。



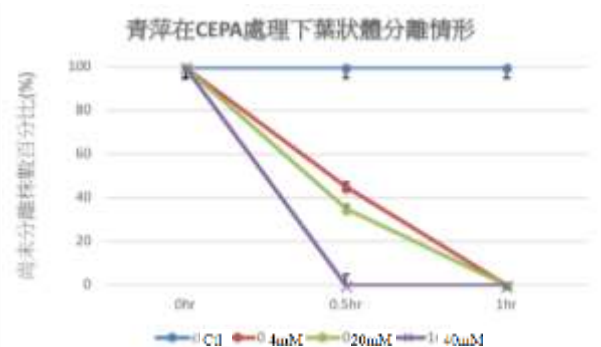
(圖9-1)加入CEPA對紫萍分離速度的影響



(圖9-2)加入CEPA對青萍分離速度的影響



(圖9-3)紫萍在CEPA處理下葉狀體分離情形

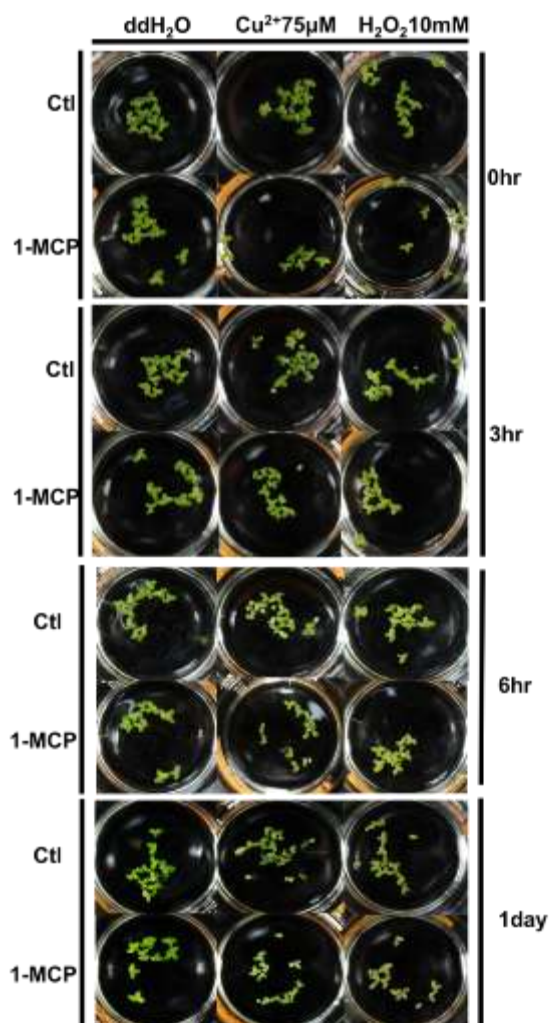


(圖9-4)青萍在CEPA處理下葉狀體分離情形

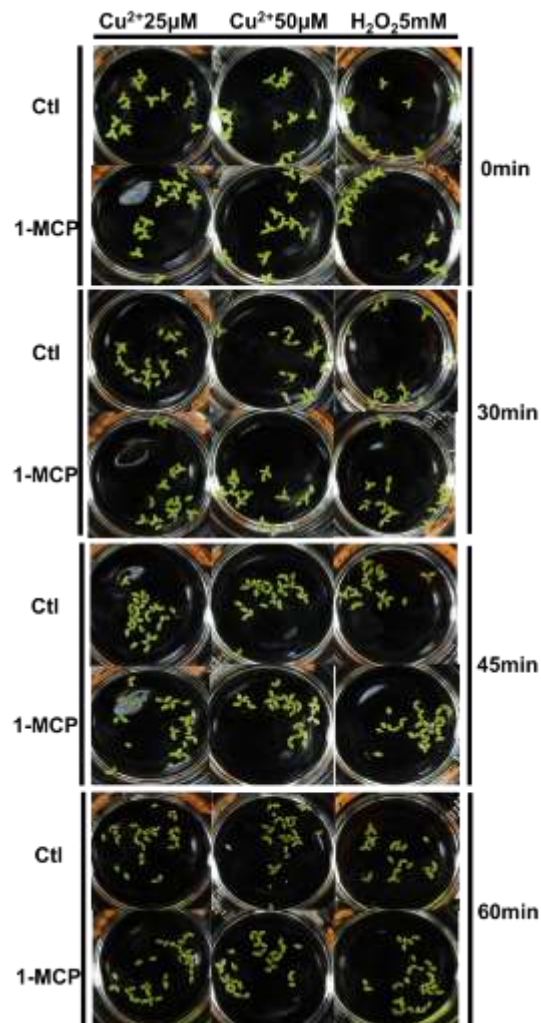
從圖 9-1 中可以看到，紫萍在 CEPA 4mM 濃度處理下，2 天後才開始出現葉狀體分離的情形，而將濃度提高至 40mM，則 1 天後會出現葉狀體分離的現象。而從圖 9-2 中可以看到，青萍在 CEPA 稀釋 4mM 濃度處理下，半小時後就開始出現葉狀體分離的情形，到了一小時後便全數分離。本實驗發現浮萍在 CEPA 處理下，會產生葉狀體分離的現象，**推測乙烯途徑可能參與葉狀體分離機制。**

十、 乙烯拮抗劑對與浮萍葉狀體分離的影響

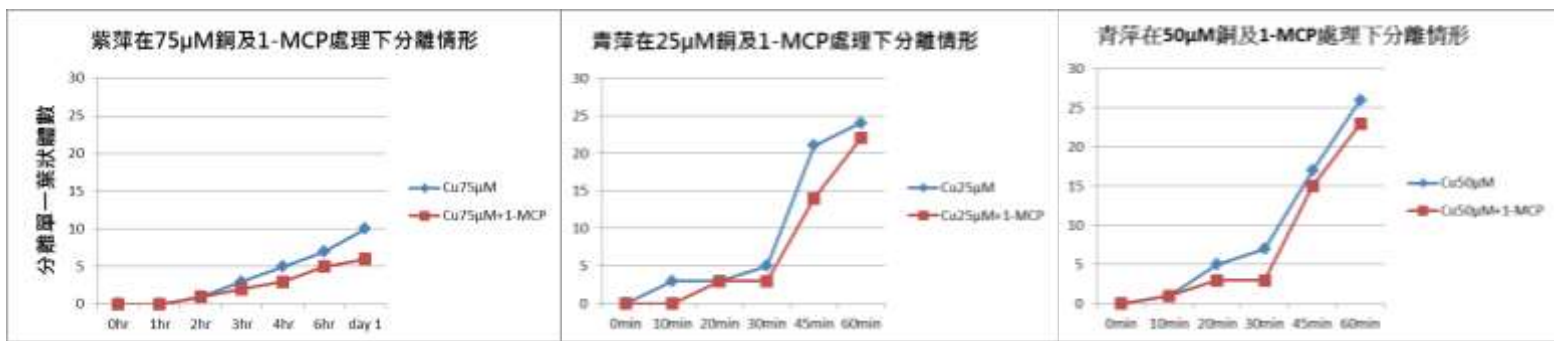
在上述實驗中我們發現乙烯會促進紫萍及青萍的葉狀體分離，為了確定乙烯途徑真的參與葉狀體分離機制，因此我們觀察抑制乙烯的傳遞後，浮萍的生長狀況。查詢文獻後，我們發現農業上有一種保鮮劑稱為 1-甲基環丙烯（1-Methylcyclopropene, 1-MCP），其作用原理便是利用 1-MCP 的氣體結構類似乙烯，會與乙烯受器結合，藉以阻斷乙烯作用，且為不可逆的，我們便觀察加入 1-MCP 後，葉狀體分離現象是否有受影響。



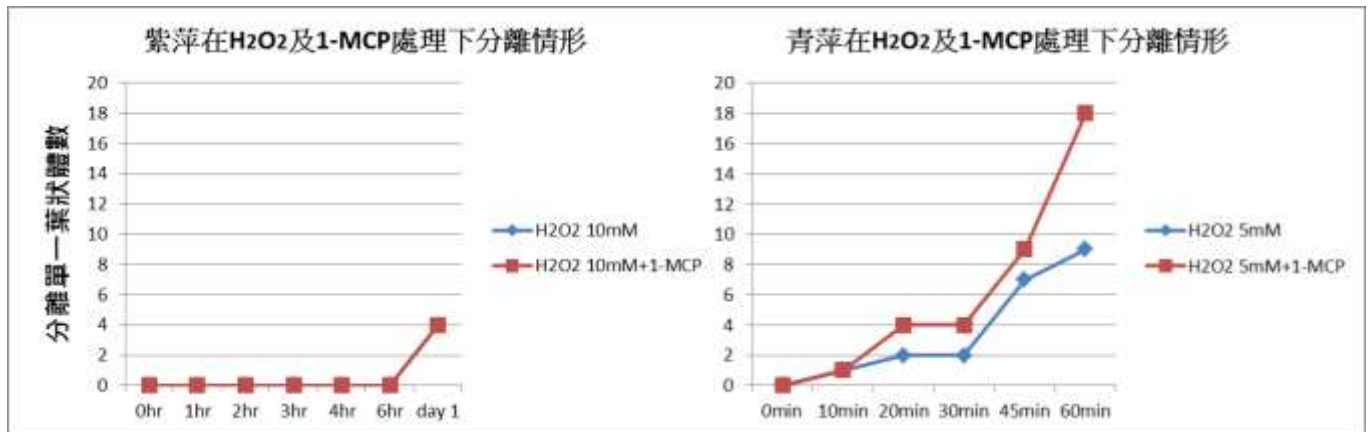
(圖10-1)加入1-MCP對紫萍分離速度的影響



(圖10-2)加入1-MCP對青萍分離速度的影響



(圖10-3)浮萍在銅及1-MCP共處理下葉狀體分離情形

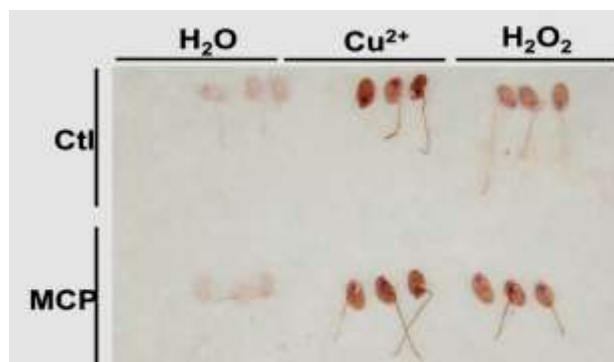
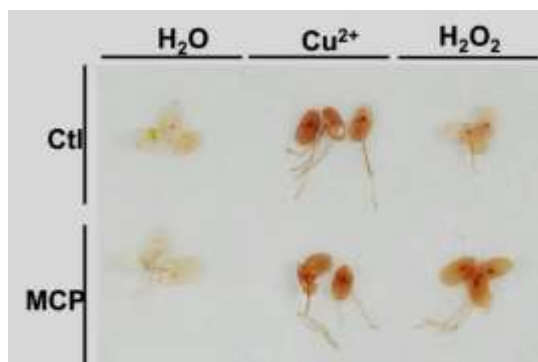


(圖10-4)浮萍在雙氧水及1-MCP共處理下葉狀體分離情形

本實驗發現銅加 1-MCP 後，浮萍葉狀體延緩分離，證明乙烯途徑可能參與銅離子誘導的葉狀體分離機制。我們先前發現銅離子逆境會造成過氧化氫的累積。我們猜想是否過氧化氫的訊息傳遞會影響乙烯途徑，導致葉狀體分離，所以我們假設加入 1-MCP 後，過氧化氫與銅處理或許會看到葉狀體的延緩分離。但我們意外的發現，在過氧化氫處理下，若加入 1-MCP 後，反而會促進葉狀體分離，與我們原始假設銅離子與過氧化氫皆牽涉到乙烯途徑有些出入。推測過氧化氫與乙烯在浮萍葉狀體分離機制中，乙烯並非位於 ROS 的下游。

十一、 1-MCP 和 H₂O₂ 共處理浮萍，浮萍體內 ROS 含量變化

由先前的實驗當中我們發現，在過氧化氫處理下的浮萍，若加入 1-MCP 後，反而會促進葉狀體分離，在查詢文獻後我們也得知 1-MCP 及過氧化氫共處理的植物，體內過氧化氫的含量會增加，超越未處理 1-MCP 的組別，部分文獻也指出，1-MCP 與過氧化氫共處理後抗氧化酵素活性會略為降低。因此我們將長時間(紫萍 3hr、青萍 2hr)處理於 1-MCP 和 H₂O₂ 的浮萍進行較長時間(紫萍 3hr、青萍 24hr)的 ROS 染色以觀察不同組別差異，觀察體內過氧化物累積。



(圖 11-1) 紫萍於不同物質處理下 ROS 累積量 (圖 11-2) 青萍於不同物質處理下 ROS 累積量

本實驗發現，青萍和紫萍於銅離子處理下，無論是否加入 1-MCP，ROS 含量相差不大，但是，在 1-MCP 和 H_2O_2 共處理下，ROS 含量上升。而實驗十當中，浮萍於 1-MCP 和 H_2O_2 共同處理之下，葉狀體分離的情形更為明顯。我們推測原因為，當 1-MCP 和 H_2O_2 共同作用浮萍下，造成浮萍體內 ROS 含量更高，引發細胞死亡，造成葉狀體分離。

十二、 乙烯處理浮萍，浮萍體內 ROS 含量變化

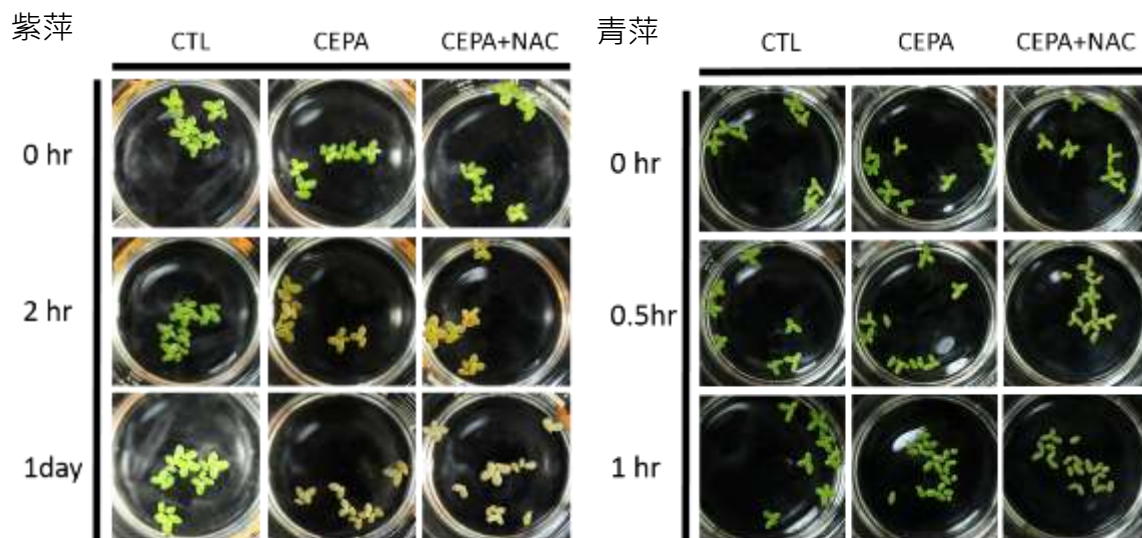
由先前的實驗我們得知，浮萍在透過 ROS 途徑造成葉狀體分離時，乙烯並非位於 ROS 的下游。我們猜測，會不會乙烯是 ROS 的上游呢？因此我們進一步探討當浮萍藉由啟動乙烯途徑造成葉狀體分離時，ROS 的含量變化。我們以 40mM 的益收生長素 (2-Chloro-ethylphosphonic acid, CEPA) 處理浮萍，並進行 ROS 染色。從圖 12-1 可以看見，在 CEPA 處理之下，浮萍體內 ROS 含量並未明顯上升，故推論當浮萍啟動乙烯途徑時，不會導致 ROS 含量上升，推測在浮萍葉狀體分離時，**乙烯並非位於 ROS 的上游**。



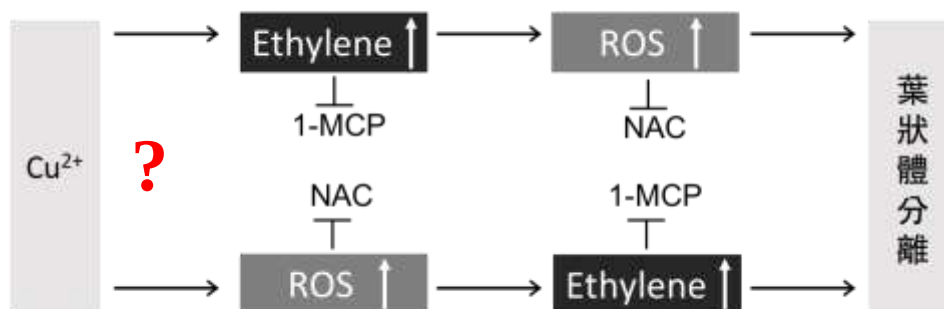
(圖 12-1) 浮萍於乙烯處理下 ROS 累積量

十三、 乙烯和抗氧化劑共處理對浮萍葉狀體分離的影響

為了更進一步確認浮萍在葉狀體分離時，乙烯並非位於 ROS 的上游，我們透過外加抗氧化劑 NAC 進行反證實驗。我們將 10mM 的 NAC 和 40mM 的 CEPA 混合共同處理浮萍，從圖 13-1 可以看見，加入抗氧化劑 NAC 的組別分離狀況並未延緩，因此我們推測，ROS 和乙烯途徑雖然都可以造成葉狀體分離，但**兩條並非上下游的關係，而是獨立的途徑**。

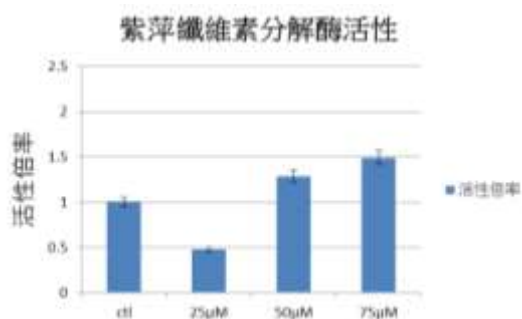


(圖 13-1) CEPA 和 NAC 對浮萍葉狀體分離的影響

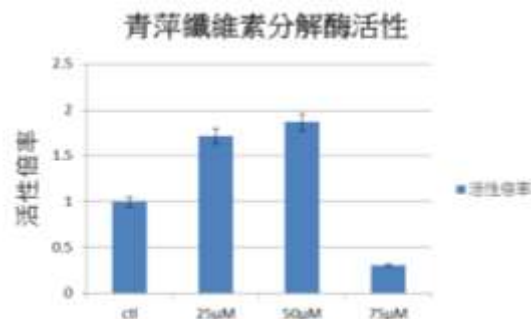


十四、纖維素分解酶的活性變化

許多文獻都指出乙烯會使纖維素分解酶活性上升，我們便尋找方法測量纖維素分解酶的活性，觀察浮萍葉狀體分離時是否會有纖維素分解酶活性上升的現象。



(圖 14-1)紫萍不同濃度銅處理下纖維素分解酶活性



(圖 14-2)青萍不同濃度銅處理下纖維素分解酶活性

實驗結果我們發現在銅離子濃度 $25\mu\text{M}$ 的處理下，紫萍的纖維素分解酶活性下降到對照組的一半左右，而青萍則是上升至約 1.7 倍，而隨著銅離子濃度上升，酵素活性整體而言呈現上升的趨勢，而青萍在 $75\mu\text{M}$ 銅離子濃度下活性則是明顯下降，我們推測可能是因為在此濃度下 1hr 後青萍早已完全分離，因此酵素活性已經降低。

從上述實驗結果，我們可以得知，在銅離子處理下，會使浮萍體內纖維素分解酶的活性上升，可能藉此讓葉狀體連結處的纖維被分解，進而導致葉狀體分離。

十五、 浮萍在分離前後逃出逆境的情形

在先前浮萍實驗中，偶然發現浮萍會有互相聚集的情形(如圖 11-1)，而紫萍又比青萍來的更加容易聚集，既然我們知道浮萍以葉狀體分離來做為主要增殖的手段，若在野外逆境中，葉狀體分離，那環境中的風吹、水流會不會影響浮萍間生存機率的差異呢？而浮萍相聚對於生存策略上有何意義呢？因此我們想知道青萍與紫萍在分離前後聚集程度的差異，由於青萍對逆境的高敏感度使得青萍分離時紫萍尚未有分離現象，因此我們便選取了已分離青萍、未分離青萍及未分離紫萍，模擬三者在野生環境中逆境下的逃脫情形。



(圖 15-1) 紫萍互相聚集情形

我們發現，浮萍有聚集在一起的傾向，而在池塘中也發現浮萍大多群聚在池塘邊緣，我們覺得這個現象很有趣，搜尋資料後發現，物理中有一個 Cheerios effect 正好是描述這個現象。生活中還有更多類似的現象，像飲料上的泡泡也都是呈現一團一團聚集且依附在杯壁，甚至還排列成規則的形狀。Dominic Vella and L. Mahadevan 2005 年發表於 American Journal of Physics 中的文章，對此有詳盡的推導和解釋：

單位長度水平作用力的數值， F_h

$$F_h = - \int_{-\infty}^{h_2(0)} \rho g z dz + \int_{-\infty}^{h_1(0)} \rho g z dz = \int_{h_2(0)}^{h_1(0)} \rho g z dz$$

$$= \frac{1}{2} \rho g [h_1(0)^2 - h_2(0)^2],$$

$$F_h = - \frac{\gamma}{2} \left[\frac{(\cot \theta_1 \cosh(d/L_c) + \cot \theta_2)^2}{\sinh^2(d/L_c)} - \cot^2 \theta_1 \right] = - \frac{\gamma}{2} (\cot^2 \theta_1 + \cot^2 \theta_2 + 2 \cot \theta_1 \cot \theta_2 \cosh \lambda d)$$

其中 $\lambda = \sqrt{\frac{\rho g}{\gamma}}$ 、 d 為葉片邊緣到池塘緣的距離。上式中負值代表相吸，方程式中

$\cot^2 \theta_1$ 、 $\cot^2 \theta_2$ 、 $\cosh \lambda d$ 皆為正值，因為浮萍邊緣的液面彎曲呈彎月狀向上所以 $\cot \theta_1 \cot \theta_2 > 0$ ，因此浮萍與池塘邊緣相吸。

計算兩浮萍間的引力，將浮萍邊緣的有效質量表示成 $2\pi\gamma RB\Sigma$ ，也就是造成周圍液面變形彎曲的浮萍有效質量，其中 R 為浮萍葉緣曲率半徑、 $B=\rho g R^2/\gamma$ 、

$$\Sigma = \frac{2\rho s-1}{3} - \frac{1}{2} \cos \theta + \frac{1}{6} \cos^3 \theta$$

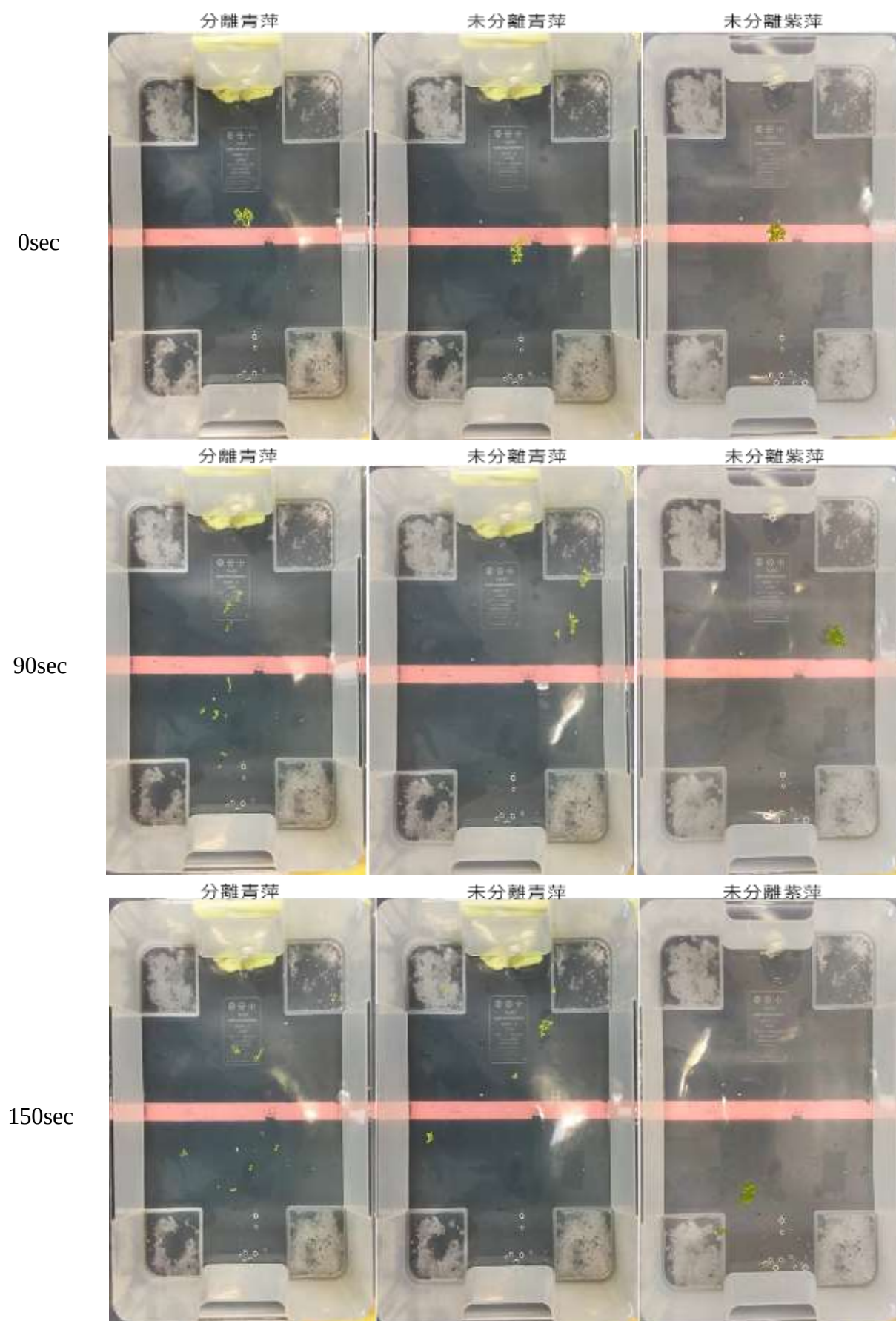
兩浮萍間的能量可表示成 $E(l)$ ；所以兩浮萍間的作用力表示成 $F(l)=-dE/dl$ ：

$$F(l) = -2\pi\gamma RB^{5/2}\Sigma^2 K_1\left(\frac{l}{L_c}\right) \quad K_n(x) \text{ 為 Modified Bessel Function for the second kind.}$$

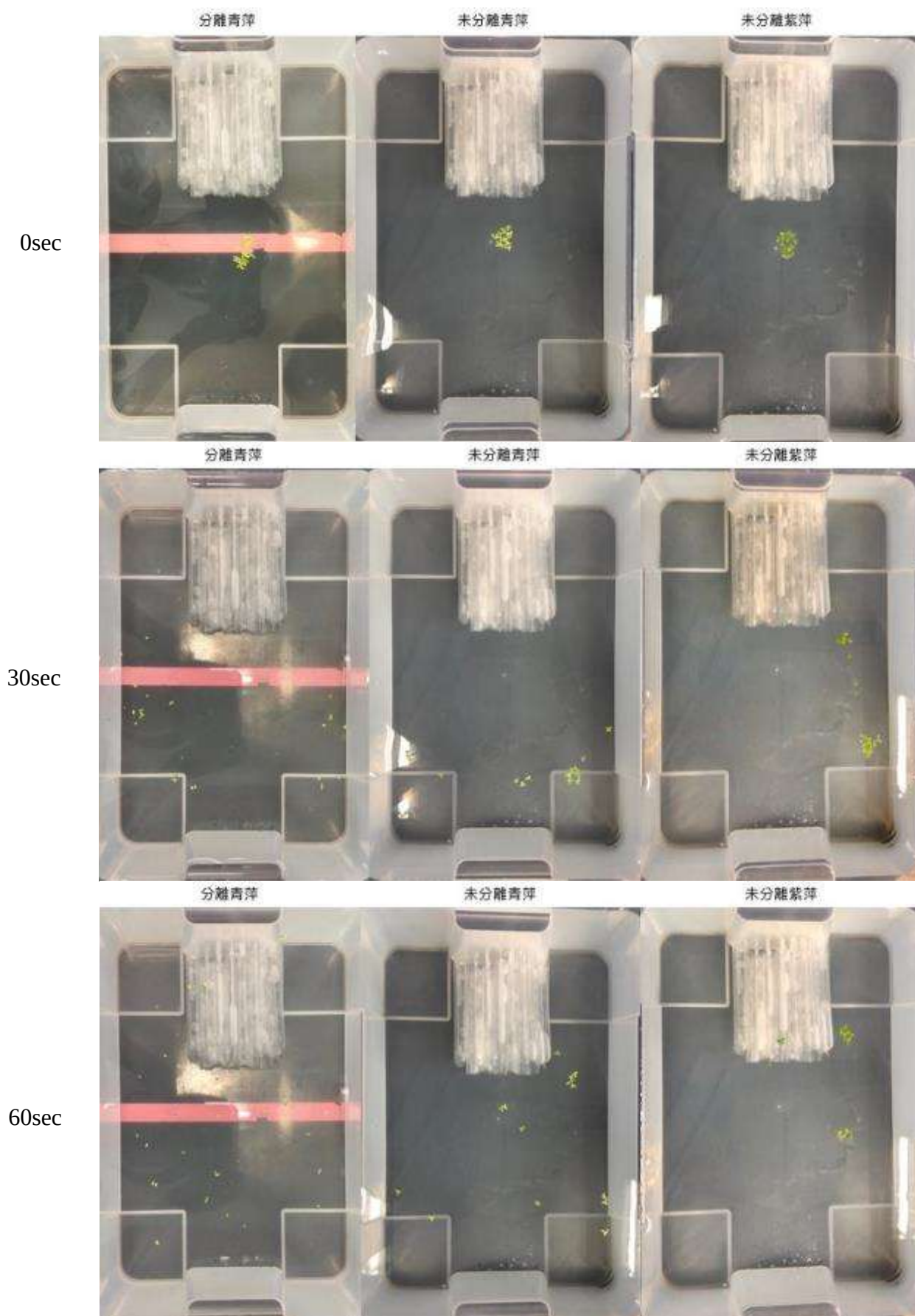
經由上述公式計算出的結果，我們發現：兩紫萍間相距一公分時的吸引力，與兩青萍間相距一公分的吸引力相差兩個數量級之多(100 倍)，與我們實驗時發現的現象吻合，且兩種浮萍間相聚程度具有顯著差異。

藉由以上理論，解釋了我們在池塘中看到浮萍的相聚現象，我們不禁聯想，既然浮萍能利用葉狀體分離來產生新個體，那青萍是否就是藉著對逆境的高度敏感，一遇逆境隨即分離，分離後的葉狀體其單一個體質量減輕，液面的彎曲程度減少，導致兩浮萍葉狀體間互相吸引的能量減弱，藉此來脫離母群體，以增加逃出逆境的機會。我們也從逆境後復原實驗中看到的結果：青萍遭遇逆境脫離後，具有較佳的復原能力，若能再靠著葉狀體分離來增加個體數、減少內聚力，更是大大提高了族群的生存率。為了應證此假設，我們便進行以下實驗來模擬野外環境，憑藉風力的吹拂與水的流動，青萍的分離機制是否真能達到我們所假設的能增加族群的分散程度呢？

在實驗設計中我們以蒲福風級 2 級的輕風，調整風扇的風速為 1.6m/s 模擬野生環境中的輕風吹拂，初始狀態將浮萍集中相聚於水盆中央，並以 30 秒為間隔拍攝一次，持續 150 秒後比較分散程度差異。而水流則是選用 41.67mL/sec 的流速，因水流對於浮萍分散影響較大，所以選用 15 秒為間隔，持續 60 秒觀察。



(圖 15-2) 浮萍在風吹下分離程度比較

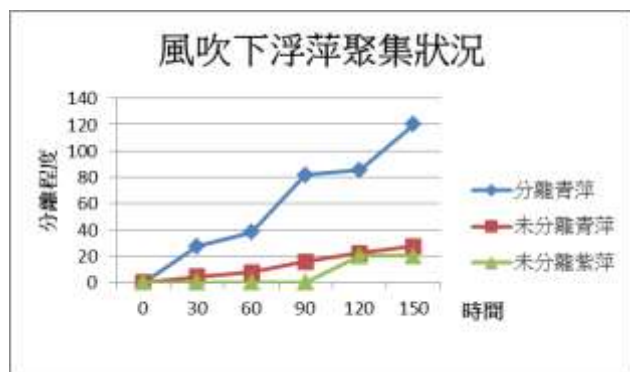


(圖 15-3) 浮萍在水流下分離程度比較

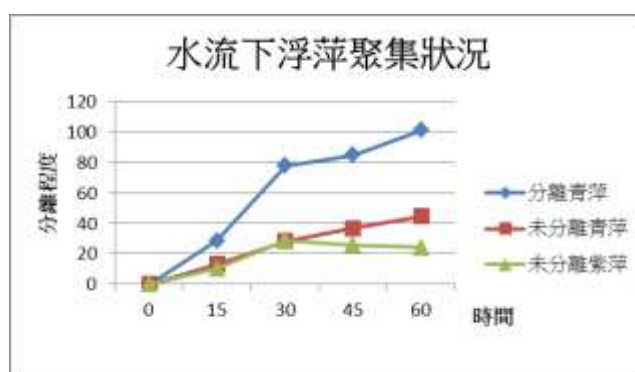
因本實驗主要探討風吹與水流後的分散程度與分佈，而子群體個體數越少且離母群體距離越遠則越分散，因此，我們希望葉狀體數目越少，距離母群距離越遠，數值越大。所以我們以脫離母群的葉狀體數與距離作為定量的變數。設計出以下公式作為量化依據：

$$\Delta = \frac{\sum[(\frac{1}{n}) \times d]}{k}$$

n 為葉狀體數目，
d 為與母群體距離，
k 為子群體數。



(圖 15-4) 風吹對浮萍分散程度的影響



(圖 15-5) 水流對浮萍分散程度的影響

由上兩圖明顯看出不管是風吹或水流，已分離青萍的分散程度較其他兩者具顯著差異。

在風吹的部分可以看到，紫萍在風吹下到了 90 秒時仍維持初始狀態的單一群體，到了 120 秒時才有一株脫離母群，與先前的物理計算結果吻合，紫萍本身內聚程度高，所以較不易分散。

而水流對於浮萍的影響較為直接，在短時間下便會有較明顯的分散狀況。而在水流下 30 秒時，已分離青萍的分散程度遠遠超越未分離的青萍及紫萍。與我們假設浮萍在葉狀體分離後較容易逃出逆境的假設相吻合，驗證了分離後的青萍聚集力下降，較容易分散逃離逆境。

陸、討論

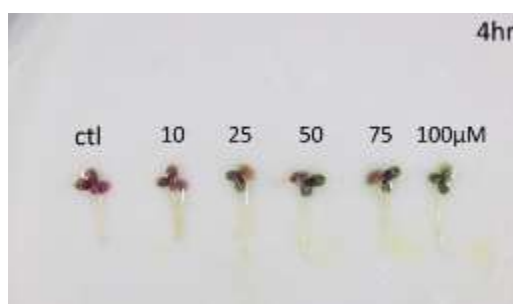
一、 比較青萍及紫萍的結構差異

在實驗中我們發現紫萍及青萍在自然環境下會有不同的形態：紫萍主要以 4~5 片葉狀體組成單一植株，而青萍的單一植株則以 3 片葉狀體組成，推測是由於青萍本身對過氧化物的高敏感度，使在微量過氧化物質的調節下，較容易分離，因此常以三葉型態存在。此外，紫萍的葉狀體葉緣有略為下凹的形狀，青萍則是平面。我們推測紫萍葉狀體的形狀會讓液面下陷較深，再加上葉片數較多導致重量較大，造成兩紫萍間的吸引力較大；青萍的葉狀體則幾乎不會讓液面有下陷的情形，因此兩青萍間的吸引力較小。

而我們在挑取浮萍時也發現紫萍的連接構造明顯比青萍來的堅固，青萍的葉狀體在稍微用力碰觸便會斷裂，我們認為這可能也是造成青萍可以快速分離而紫萍卻要數小時才能分離的原因之一。

二、 紫萍耐受性之討論

從前面的實驗我們推測：青萍在逆境下快速分離以逃脫逆境；而紫萍則對於逆境的耐受性較高，等待逆境結束。而紫萍在相同時間銅處理下的生長情形明顯較青萍來的好，實驗中我們也發現隨著處理的濃度越高，紫萍葉背的花青素含量便越少(如下圖)。



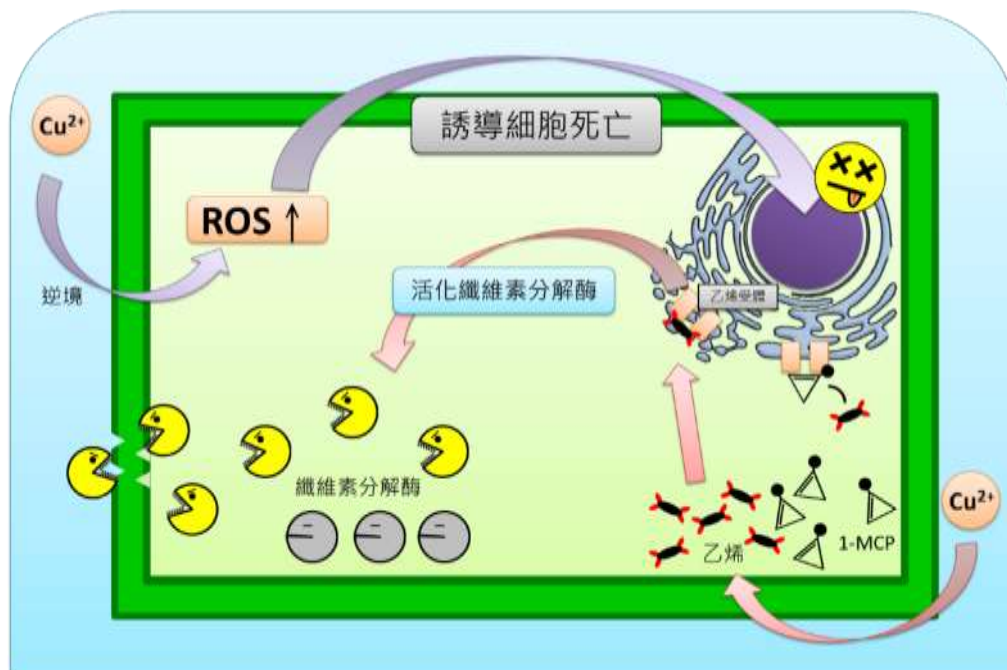
紫萍在不同濃度銅處理下葉背花青素含量比較

在查詢文獻後我們得知花青素是多酚類的一種，其結構中攜帶有羥基而具有還原能力，可以用來抵抗逆境所造成的氧化傷害。因此我們推測紫萍對於逆境的耐受性較高的原因是因其平時在葉背累積花青素，來提升紫萍在逆境下的抗氧化能力，造成紫萍對於逆境的較高耐受性。

三、 H_2O_2 和乙烯與斷裂機制的關聯性

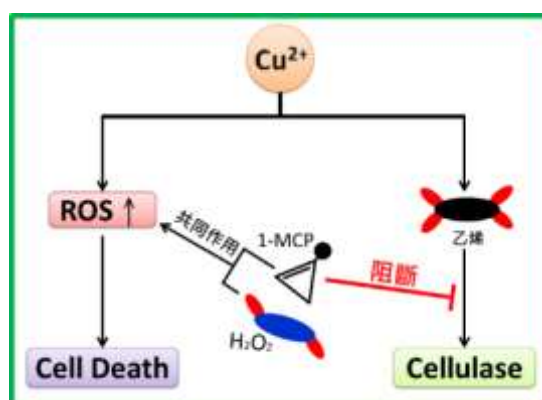
實驗中我們發現銅逆境會導致浮萍體內過氧化物質累積，起初我們推測過氧化物質的累積會造成浮萍體內的乙烯生成，進而影響浮萍葉狀體分離，但在乙烯拮抗劑的實驗

當中，我們發現在銅離子及過氧化氫處理下，以 1-MCP 處理過的浮萍會受到相反的影響：1-MCP 處理過後的浮萍在銅處理下分離狀況有些微延緩，但在外加雙氧水的部分卻會些微促進其分離，因此我們推測過氧化物及乙烯並不是上下游關係，而可能是銅離子同時誘導過氧化物及乙烯生成。



查詢文獻後我們得知 ROS 會誘導細胞死亡，而乙烯則與纖維素分解酶的活化相關。綜合以上結果，我們推測在銅處理下浮萍的 ROS 及乙烯累積是兩種途徑，銅離子會造成浮萍體內 ROS 的累積，並誘導連接構造的細胞死亡；而銅離子也會活化浮萍體內的乙烯途徑，乙烯接上受體後間接活化纖維素分解酶，兩條機制同時作用下造成浮萍葉狀體分離的現象。

實驗結果當中我們發現同時加入 1-MCP 及過氧化氫的組別葉狀體分離的現象不但沒有被抑制，反而有些微被促進的情形，而我們也發現了在雙氧水及 1-MCP 的共同處理下，浮萍的 ROS 累積量確實會較多，部分文獻指出，1-MCP 與過氧化氫共處理後抗氧化酵素活性會略為降低，因此我們推測在同時加入 1-MCP 及過氧化氫後，浮萍體內抗氧化酵素活性降低，進而造成 ROS 含量上升，促進葉狀體分離。



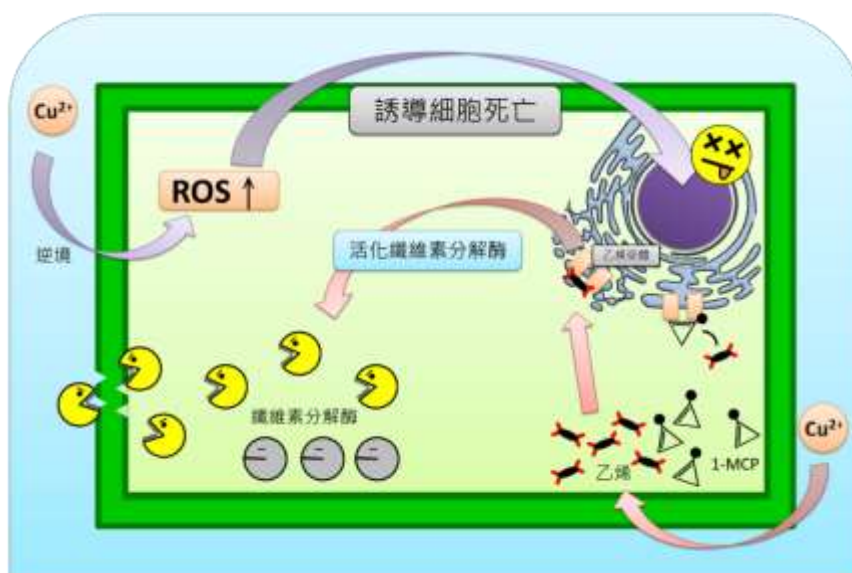
四、 斷裂機制的生態意義

在生態環境中，植物於逆境中都有獨有的生存機制，其中，有許多植物會利用增加族群個體數目，當作其對抗逆境的手段。例如阿勃勒在乾旱環境下，為避免將來無法繁殖，會自我發出警訊，以提早開花傳宗接代作為面對乾旱逆境的生存機制。此外，第 52 屆中小學科學展覽會作品「花仙子的美麗與哀愁」，內文提及：當阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)處於逆境下，低濃度的雙氧水可以當作低濃度活性氧訊號，促使植物提前開花，以面對逆境。或許在各種植物中，都可能類似的機制，當處於逆境環境下，利用快速繁衍增加個體數的手段來維繫族群生存。在我們的實驗中，我們發現，當浮萍處於逆境下，會藉由 ROS 累積導致葉狀體分離，利用無性生殖方式，藉此來增加族群個數以及逃出逆境的機率。

五、 未來展望

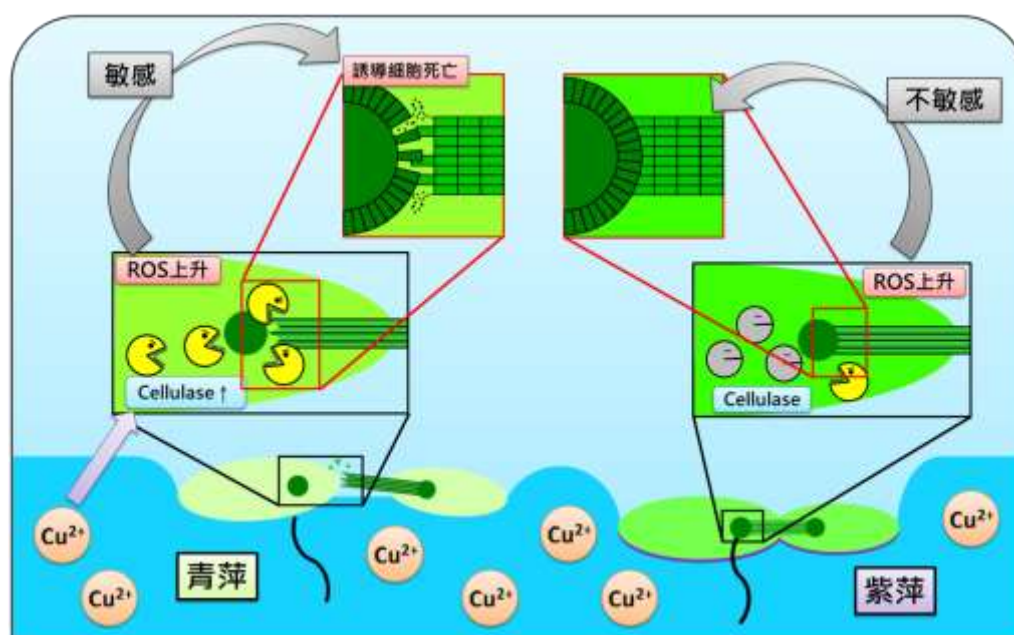
隨著全球人口日漸增加，糧食逐漸不足，而浮萍體內有相當高量的蛋白質，希望未來可以將其製成蛋白質補給品，成為人類蛋白質來源之一，而我們希望可以利用本研究結果更進一步的了解浮萍的連接機制，加快繁殖速度並增加浮萍的產量。

柒、結論



實驗結果我們發現浮萍在逆境下節處的 ROS 含量會上升，並會有細胞死亡的情形，而纖維素分解酶的活性也會有上升的趨勢。綜合以上實驗，我們推測在銅離子處理下，浮萍體內

ROS 含量上升並會誘導斷裂面的細胞死亡；此外，我們推測在銅離子處理下，會活化浮萍體內的乙烯途徑，並提升纖維素分解酶的活性，讓浮萍連接的構造斷開，在兩類途徑協同作用下造成葉狀體分離的現象。



浮萍在逆境下會有葉狀體分離的現象，而我們推測葉狀體分離的主要原因是為了逃離逆境，增加族群逃離逆境的機率。

此外，浮萍在野外環境下會有聚集的情形，當水面下陷的越深時兩浮萍間的吸引力越大，其中以紫萍的吸引力較大，而在葉狀體分離後，由於重量減輕、水面下陷減少，葉狀體間的吸引力會下降，造成分離後的葉狀體較容易離開逆境。

綜合上述實驗，兩浮萍在逆境下有不同的應對機制，青萍在逆境下會快速分離，在短時間內逃出逆境，增加族群生存率；而紫萍在逆境下要到數小時甚至數天後才開始有分離的現象，在逆境初期，紫萍利用較大單一個體及對於逆境的較高耐受性來抵抗逆境，等待逆境結束。紫萍及青萍在銅處理下會有 ROS 累積的情形，而 ROS 可作為訊息傳遞分子參與浮萍葉狀體分離，其中青萍對於 ROS 含量較為敏感，在體內 ROS 累積較少時即開始出現葉狀體分離的現象；而紫萍則對 ROS 較不敏感，在逆境下不分離，以較大顆單一個體的方式來對抗逆境。

捌、參考文獻及其他

1. 蘇榆茜、孫偉哲、周柏仰（2016）．「暗藏殺機的許願池」——探討硬幣水對浮萍生長的影響及其生存機制．臺南市：天主教私立德光高級中學(附設國中)。
2. 高景輝（2005）．植物生理分析技術．臺北市：五南。
3. Chiriboga,M.A., Bordonaba,J.G., Schotsmans,W.C., Larrigaudière,C. & Recasens,I. (2013) Antioxidant potential of ‘Conference’ pears during cold storage and shelf life in response to 1-methylcyclopropene, LWT - Food Science and Technology. 51,170-176.
4. Yu,X., Liu,Y., Cui,Y., Cheng,Q., Zhang,Z., Lu,J.H., Meng,Q., Teng,L. & Ren,X.(2015). Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay, Saudi Journal of Biological Sciences. 23(1),S93-S98.
5. Dominic Vella and L. Mahadevan (2005). “The Cheerios effect”, American Journal of Physics. 73(9),817-825.
6. 詹佳容、楊昕宜、鄭茲庭 (2012)．花仙子的美麗與哀愁．臺南市：國立南科國際實驗高級中學（附設國中）。

【評語】 060008

這是一件完全在高中實驗室完成的作品，在有限的經費與設備下設計實驗廣泛地了解浮萍自裂的調控機制，是很值得嘉獎的作品。發現乙烯跟過氧化物參與了銅誘發浮萍自裂。作者巧妙地用抑制劑來了解乙烯跟過氧化物的上下游關係。如有大學教授輔導，必能讓作品更上一層樓。