

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

第三名

052104

大「逆」不道 —— 局部逆境下植物體內傳訊與
物質分配機制

學校名稱： 國立臺南第一高級中學

作者： 高二 呂家瑋 高二 賴楚元	指導老師： 鄭楷騰 江芝韻
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞： 局部逆境、傳訊機制、物質分配

摘要

植物一葉片受到逆境時，其體內如何將逆境訊號傳遞到其他組織並進行物質分配？此領域過去研究甚少，而品萍特殊的葉狀體相連構造搭配二分盤裝置，很適合處理局部逆境並探討體內傳訊與物質分配機制。研究發現：當母葉遭遇局部逆境時會將健康子葉釋放以減少子葉產生連帶傷害；而子葉遭遇局部逆境時，母葉選擇保留子葉並持續送物質助其生存。深入研究發現，逆境子葉累積的 ROS 將觸發物質分配，使其向母葉傳送求救訊號，促使母葉內部以 Ca^{2+} 做訊息傳導後將物質送往子葉助其生存。選擇性斷裂則由母葉內部 Ca^{2+} 與 ROS 共同調節觸發，母葉遭遇逆境時， Ca^{2+} 為上游觸發母葉節處累積 ROS 並向子葉傳遞單向斷裂訊號，使子葉節處累積 ROS 後誘導斷裂，降低母葉對子葉的連帶傷害。

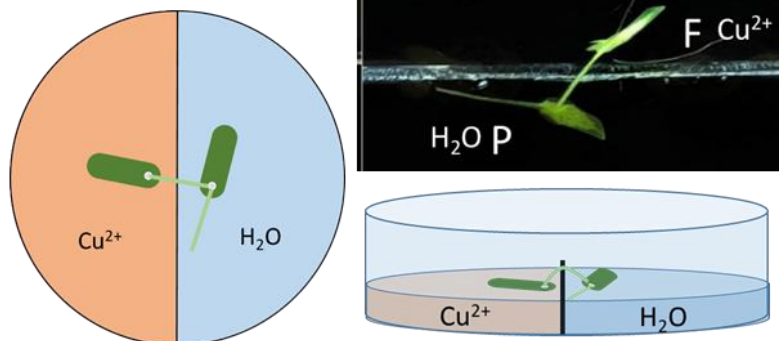
壹、前言

一、研究動機

植物一葉片受到逆境時，其體內如何將逆境訊號傳遞到其他組織並進行物質分配呢？我們觀察到水生植物品萍有非常特殊的葉狀體連結構造，其子葉具有長柄連結與母葉的節上，相互交錯形成大型網狀構造。我們突發奇想！這種特殊的連結方式不是剛好適合利用二分盤來創造出局部逆境嗎?!，透過品萍的特性與裝置設計就可深入探討植物在局部逆境下組織間的訊息傳遞與物質分配機制。於是我們利用二分盤將品萍處理局部逆境，試圖探討其中的奧秘。



(圖 1-1) 品萍連結構造



(圖 1-2) 以二分盤建立局部逆境的裝置示意圖

二、研究目的

- (一)、挑選品萍合適的金屬離子逆境種類與濃度。
- (二)、品萍局部逆境並觀察其形態與生理反應。
- (三)、探討品萍選擇性斷裂現象的啟動位置、傳訊方向與背後生理意義。
- (四)、探討局部逆境下品萍選擇性斷裂過程的近端與遠端傳訊機制。
- (五)、探討局部逆境下品萍的物質分配機制。
- (六)、探討局部逆境下品萍物質分配過程的近端與遠端傳訊機制。
- (七)、探討品萍局部逆境下訊息分子交互作用關係。

三、文獻回顧

植物體內有養分分配，使營養物質有效地分配到不同組織和器官以維持其生長和發育所需的過程，如將養分分配給予成熟的果實，或老化葉分配養分給新葉。這一過程涉及到複雜的訊號傳遞，與細胞分裂素（CK）的作用 (Moustafa Fathy, 2022)。

由於含銅的農藥被廣泛使用以及銅離子的污染物被排放到環境、尤其溪水中，銅污染對植物造成了有害影響。在植物中，過量的銅離子可以通過產生過氧化物（ROS）、破壞酵素等蛋白質結構而引起植物毒性 (Ru-Xin Wang, 2024)。為了應對環境中銅含量的變化，植物通過多種調節機制精確調節銅離子的恆定。本文對銅離子影響生物功能、過量銅離子對植物的毒性、植物中銅離子的運輸過程以及植物解毒和耐受銅脅迫的機制進行了描述。此外，提出了更好地理解植物對銅脅迫的分子調節機制的潛在研究方向。

大部分植物體在面對逆境時，會利用體內增加的過氧化物及 Ca^{2+} ，於 RBOH 酵素系統的幫助下做出正回饋，單向傳遞一 ROS wave，可因此長距離傳送逆境訊號，使植物產生因應逆境的反應，以求最大的生存率 (Takamitsu Kurusu, 2015)。

最終將以上概念合併，知道植物會有養分分配，那逆境下植物是否會進行養分分配？其中訊息傳遞與養分分配間的關係又是如何？於是我們將以有著特殊葉狀體連接結構的品萍，透過二分盤的實驗裝置探討植物在逆境下體內的訊息傳導與養分分配機制。

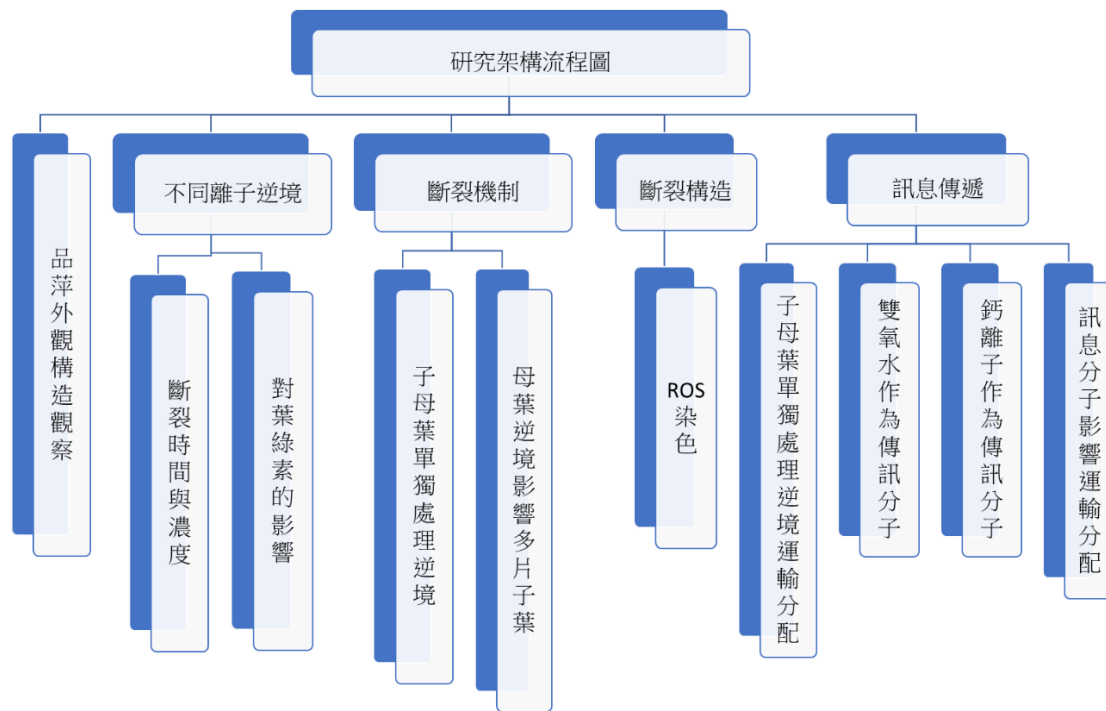
貳、研究設備與器材

一、研究材料：品萍 (*Lemna trisulca*)

二、實驗藥劑：CuCl₂、KCl、NaCl、MnCl₂、MgCl₂、CaCl₂、DAB、MES buffer pH6.8、NAC、乙醇、過氧化氫、EDTA、EGTA

三、實驗器材：燒杯、電子天秤、二分盤、震盪儀、石英管、分光光度計、微量吸管、培養皿、解剖顯微鏡、複式顯微鏡

參、研究過程與方法



一、品萍培養

(一)、與水草飼養業者購買品萍並放入水缸中培養

(二)、每隔一個禮拜定期換水

二、葉綠素濃度測定

- (一)、將品萍置入裝有 95 度酒精之試管中
- (二)、煮至 80°C 持續 15 分鐘
- (三)、取出品萍，留下葉綠素酒精溶液
- (四)、將溶液進行分光光度計檢測吸光度，並測出光波長 645nm 之吸光度 A_{645} 及光波長 663nm 之吸光度 A_{663}

1、葉綠素 a 濃度： $13.7 \times A_{663} - 5.76 \times A_{645}$

2、葉綠素 b 濃度： $25.8 \times A_{645} - 7.60 \times A_{663}$

(五)、葉綠素濃度 = 葉綠素 a 濃度 + 葉綠素 b 濃度

三、連接率計算

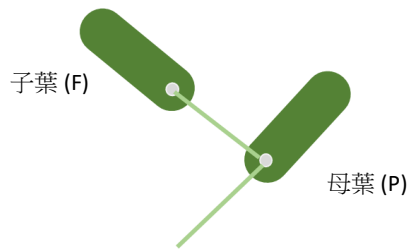
- (一)、取 10 片連續之品萍葉，其連接數為 9，及初始連接數 C_0
- (二)、於實驗結果中計算出連接數 C
- (三)、計算連接率 $\text{Connection Rate} = C / C_0$

四、過氧化物質 ROS 染色

- (一)、將 DAB 0.2g 加至 100ml MES 緩衝溶液(pH=6.8)
- (二)、將樣本和 DAB 藥劑置入培養皿中
- (三)、抽真空 10 分鐘，再放置暗處 8 小時
- (四)、置於 99%酒精中，褪去葉綠素
- (五)、以顯微鏡觀察葉片染色結果

五、品萍母葉子葉定義

將品萍二分葉取出，被連接者稱為母葉，連接者稱為子葉。



(圖 1-1) 品萍母葉子葉示意圖

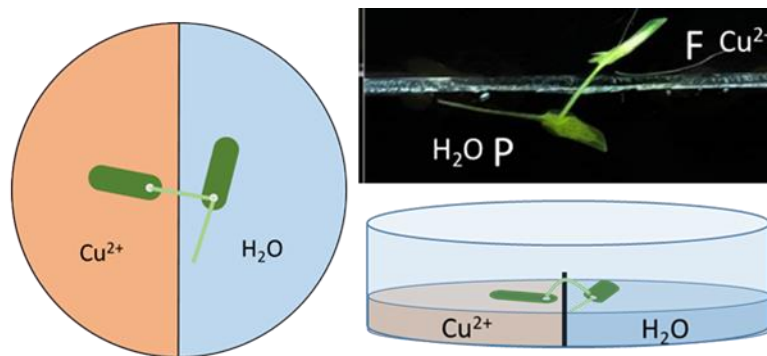
六、二分盤實驗

先將 9cm 二分盤隔板中央切一個 1cm*1cm 的小洞，將品萍的子、母葉分別置於二分盤兩側，並添加 10ml 不同溶液

(一)、斷裂探討：添加 2 毫升 10mM Cu^{2+} 逆境在二分盤一側，於 24 小時後利用解剖顯微鏡觀察物質運輸情形。

(二)、運輸分配探討：添加 2 毫升紅墨水在二分盤一側，於 24 小時後利用解剖顯微鏡觀察物質運輸情形。

(三)、傳訊機制探討：於 10mM 雙氧水逆境中添加 10mM 抗氧化劑(NAC) 在二分盤一側，於 24 小時後觀察斷裂情形，並進行 DAB 染色，再利用解剖顯微鏡觀察。



(圖 1-2) 二分盤建立局部逆境的裝置示意圖

七、鈣離子傳訊探討

- (一)、將 10 片相連的品萍置於 50ml 燒杯處理 50ml 10 μ M 銅離子逆境
- (二)、添加 5、10、15 μ M Ca^{2+} ，觀察斷裂情形
- (三)、另加入 0.1mM EGTA 螯合 Ca^{2+} ，以確認 Ca^{2+} 在傳訊過程所扮演的角色。
- (四)、於其中加入 0.1mM EGTA，觀察 Ca^{2+} 被螯合的影響。

八、過氧化物傳訊探討

- (一)、將 10 片相連的品萍置於 50ml 燒杯處理 50ml 10mM 雙氧水逆境，觀察斷裂情形。
- (二)、添加 1mM, 5 mM, 10 mM 抗氧化劑(NAC)，觀察過氧化物被清除的影響

肆、研究結果

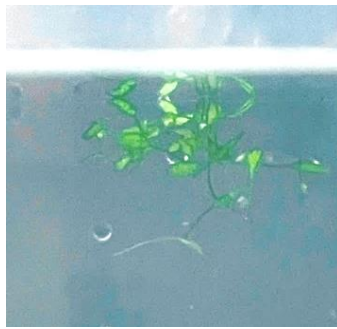
一、品萍外觀構造觀察

眾多浮萍中，品萍的結構相當特殊！於顯微鏡下觀察，可見品萍呈現互相連接現象，品萍新生子葉會由母葉的節處長出，並以長柄黏附於母葉上，如圖 1-1 所示，每片母葉會著生一或二片子葉，而子葉長大後能成扮演母葉，從節處新生新子葉，如此持續延伸形成網狀交錯的結構，如圖 1-2 所示。



(圖 1-1) 品萍複式顯微鏡下外觀 (100x) (圖 1-2) 品萍顯微鏡下外觀 (10x) / (40x)

此外，品萍是罕見有沉水狀態的浮萍，圖如 1-3 為品萍水下側面觀，僅最上層之品萍浮於水面上，其餘均於水面下，此種生長模式存在的光線遮蔽的問題！下層品萍會被上方品萍遮蔽，且水中的光線也比水面來的更低，應具有較差的光合作用與較差的生長狀態，但經觀察發現，品萍被遮蔽的下層品萍一樣保持翠綠，葉片大小與形態與未被遮蔽的表層品萍無明顯差異。我們推測，品萍之間應存在物質分配機制！未被遮蔽的上層品萍可能藉由物質輸送將光合作用的養分傳給下層的遮蔽品萍。

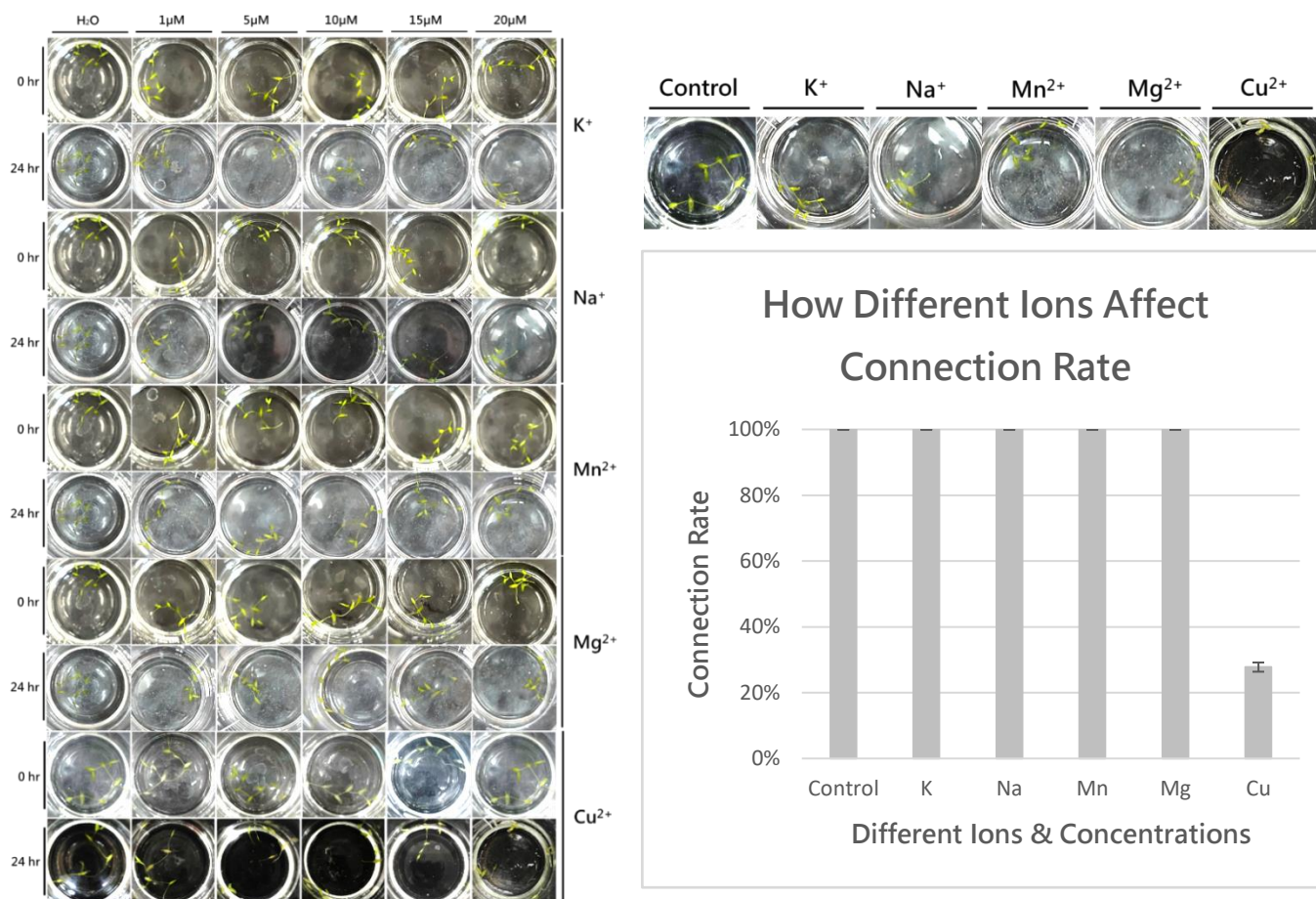


（圖 1-3）品萍水下生長情形

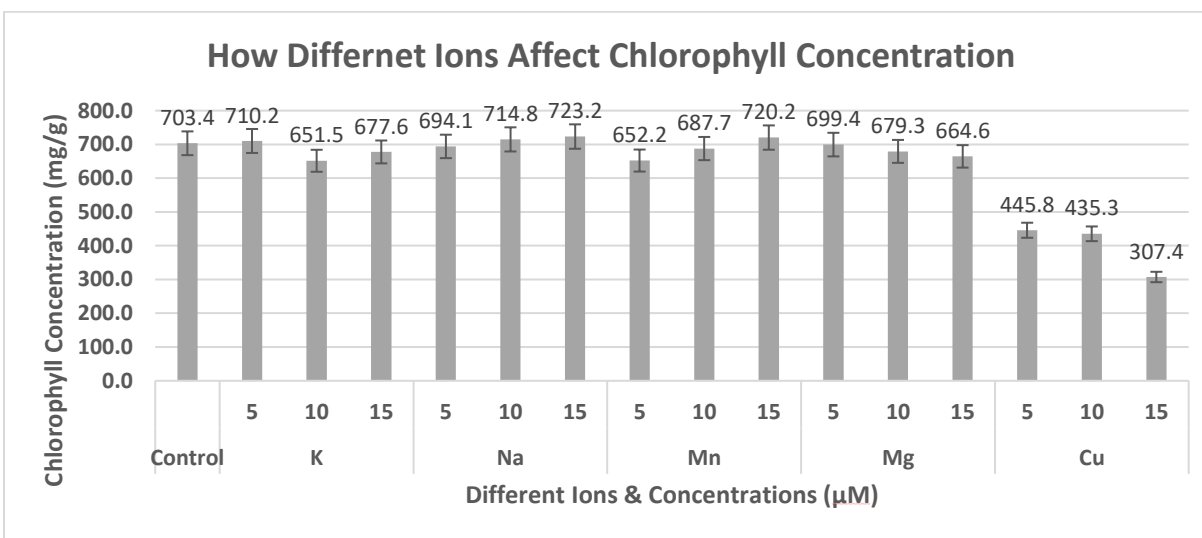
經上述觀察後我們突發奇想！品萍內部應存在物質分配的能力，加上特殊的葉狀體連結構造非常適合利用二分盤製造出單側的局部逆境，是探討植物局部逆境下訊息傳遞與物質分配的好材料！故我們選用品萍並設計二分盤裝置，進行後續深入研究。

二、挑選品萍合適的金屬離子逆境種類

在深入研究植物局部逆境下的傳訊與物質分配之前，得先選定逆境的種類。品萍生活的淡水水域常受金屬離子污染。因此，我們想先尋找哪類的金屬離子會對品萍產生逆境傷害。我們選用常見的金屬離子（ K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} ）及對照組（ H_2O ）將相連 10 片的品萍葉浸入，且使用濃度 1、5、10、15、20 μM 使品萍於其中生長 24 小時，並觀察其生長狀況並測量葉綠素含量並觀察其生長狀況，計算連接率及葉綠素濃度。



(圖 2-1) 各金屬離子對品萍生長之影響、品萍於 $10\ \mu\text{M}$ 各金屬離子之生長狀態及連接率



(圖 2-2) 品萍於 5、10、15 μM 各種金屬離子之葉綠素濃度

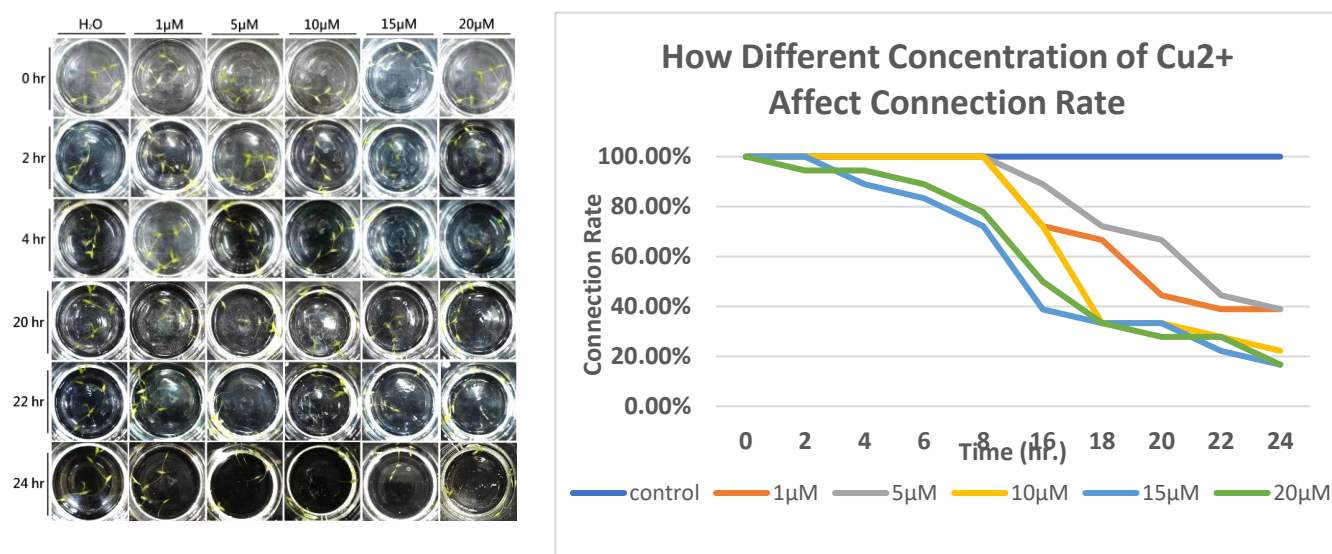
綜合上述圖表，品萍於 K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 中均無白化與斷裂情形，連接率為 100%，即所有 9 個連接均存在，且均保持原來葉綠素濃度，故推測 $15\mu M$ 濃度內的 K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 均不會對品萍造成傷害。反之，當品萍於 Cu^{2+} 環境中 24 小時後，60% 的連結構造產生斷裂，且葉綠素濃度顯著下降產生白化、枯萎等現象，故推測 $15\mu M Cu^{2+}$ 會對品萍產生逆境傷害。

由以上兩證據推測 $15\mu M Cu^{2+}$ 對品萍是一種逆境，並出現斷裂、白化、枯萎等現象。因此，後續將以 Cu^{2+} 作為局部逆境的處理條件。

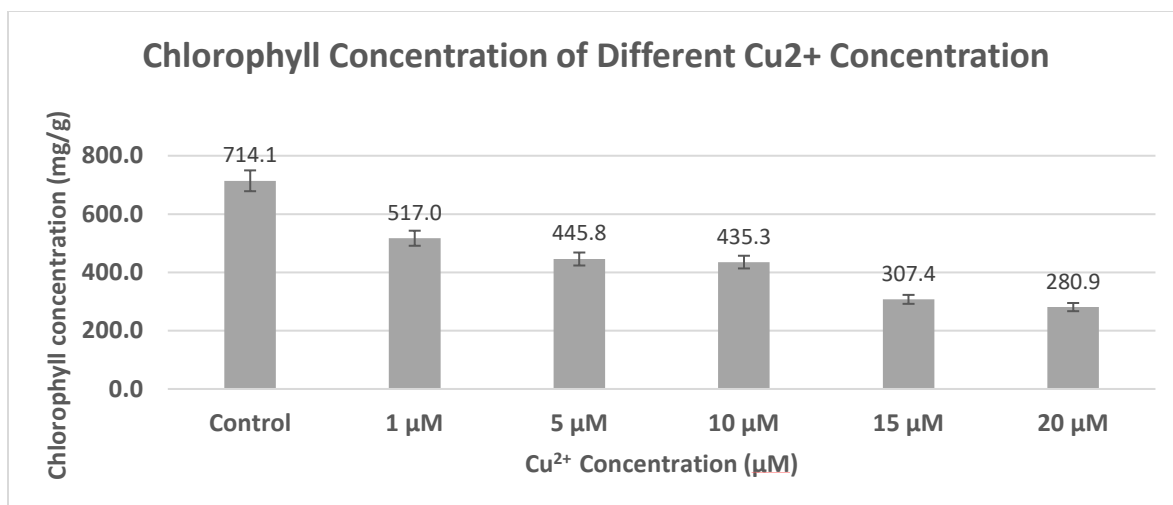
三、尋找最佳的銅離子逆境濃度

（一）、詳細觀察固定時間之品萍斷裂情形

先前實驗已確認 Cu^{2+} 會對品萍產生逆境反應，而想進一步探討做局部逆境實驗的最佳選用 Cu^{2+} 濃度，因此想探討不同濃度之 Cu^{2+} 對連接率與斷裂所需時間的關係。於是，我們將 10 片連續之品萍葉浸入濃度 1、5、10、15、20 μM 之 Cu^{2+} ，使品萍於其中生長 24 小時，並每兩小時觀察，紀錄連接數，以計算連接率。



（圖 3-1）品萍於水、1、5、10、15、20 μM 銅離子 24 小時後之生長狀態、詳細連接



(圖 3-2) 品萍於銅逆境之葉綠素濃度

綜合上述圖表，品萍於所有濃度中均有斷裂情形，連接率經 24 小時後均降至 40% 以下，即 9 個連接均剩 3 個或更少，與控制組 (H₂O) 形成明顯落差。詳細探討各濃度與時間的關係，15、20 μM 的 Cu²⁺ 下，品萍 2 小時後即出現斷裂情形，並持續斷裂，24 小時後即剩約 16.7% 之連接率。10 μM 之 Cu²⁺ 下，品萍前 8 小時後無斷裂情形，18 小時後即迅速斷裂至剩約 33.3% 之連接率，24 小時後即剩約 22.2% 之連接率。1、5 μM 的 Cu²⁺ 下，品萍斷裂情形均較其他的差，即連接率較高，24 小時後連接率為約 38.9%。

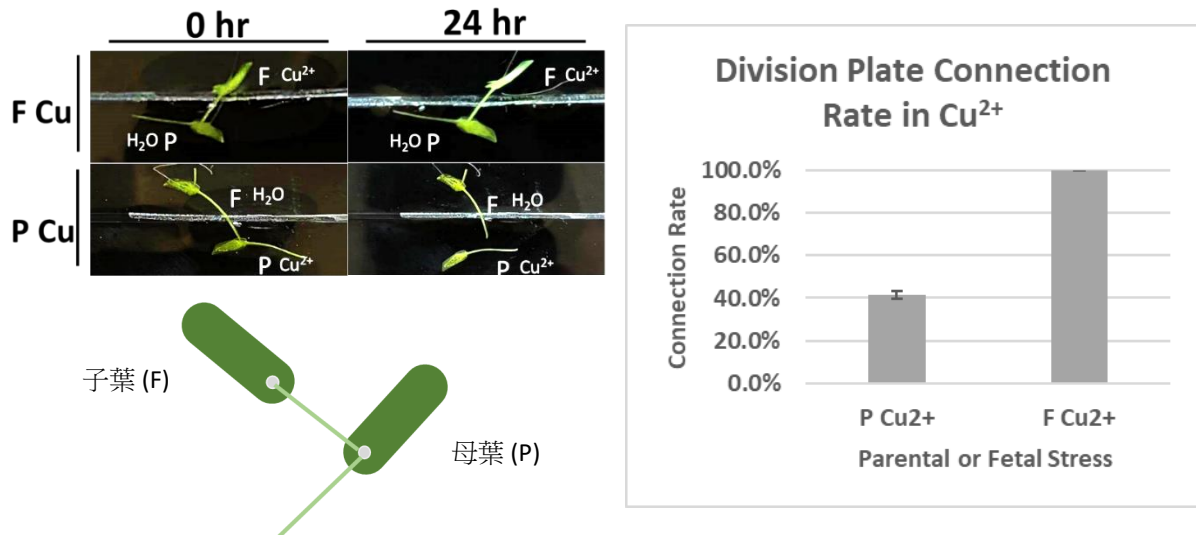
由葉綠素濃度可見，品萍於 Cu²⁺ 環境中 24 小時後，葉綠素濃度下降許多，且 Cu²⁺ 濃度越高，葉綠素濃度越低，白化、枯萎等現象於 10、15、20 μM 較為明顯。

由以上兩證據推測 Cu²⁺ 濃度介於 1~20 μM 時，Cu²⁺ 濃度越高，品萍連接率越低，葉綠素濃度越低，即逆境反應越明顯。為了使後續實驗之品萍斷裂、逆境效果明顯，且保持品萍不過度白化、死亡，後續均選用連接率以及葉綠素濃度均下降約一半的 10 μM Cu²⁺ 濃度作為後續單側局部逆境的實驗處理濃度。

四、子葉或母葉單獨處理銅逆境下的斷裂機制

(一) 母葉子葉單獨處理逆境的斷裂情形

由上述的實驗中我們得知了品萍在銅逆境下會產生斷裂情形，我們開始好奇究竟此斷裂機制是由母葉還是子葉主導的？於是我們取用品萍二分葉，即一子葉一母葉的連接體，利用二分盤使子葉和母葉分別處於 $10\mu\text{M}$ 銅離子逆境和水中並觀察斷裂情形。

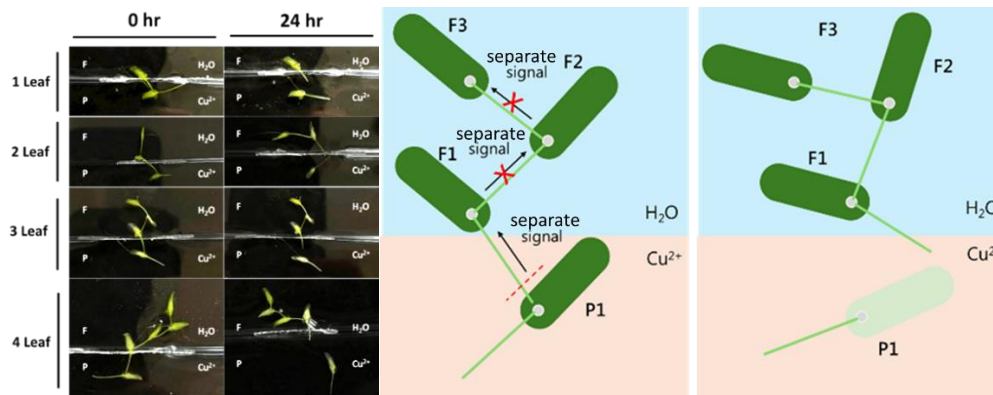


(圖 4-1) 子葉或母葉單獨處理銅逆境下的斷裂情形、連接率、二分體示意圖

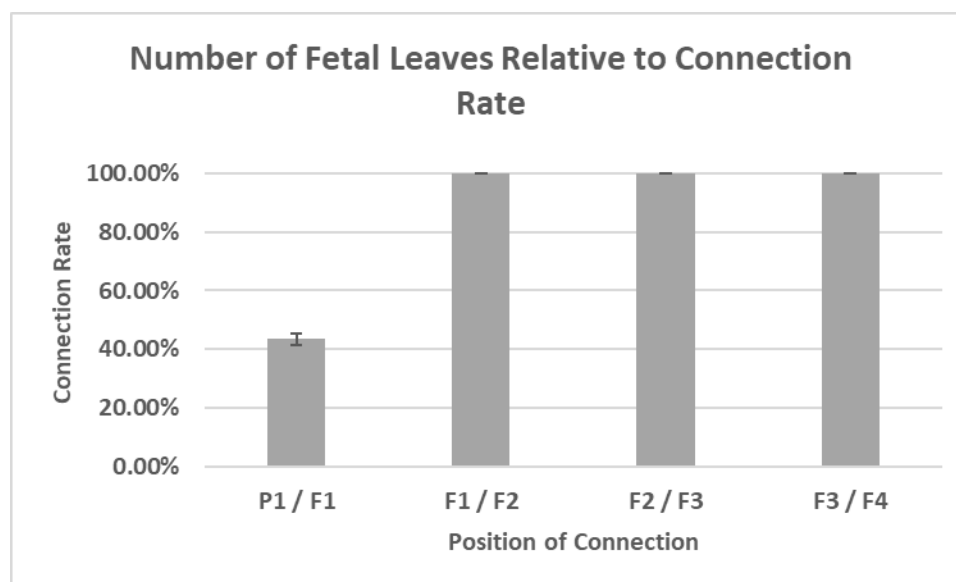
如圖 4-1 中所示當母葉單獨處理逆境時，品萍之間只有約 40% 的連接率。而子葉單獨處理逆境則無斷裂之現象發生。我們推測選擇性斷裂現象是由母葉主導發起的，僅有在單側母葉遭受逆境時才會將斷裂訊號給子葉誘發子葉斷裂，藉以減少健康子葉被逆境母葉連累，若是子葉處理單側逆境時，母葉不會將子葉釋出，推測斷裂訊號不會由逆境子葉回傳給健康母葉，此現象有助於健康母葉持續提供物質供養逆境子葉助其生存。

綜合以上研究我們推測，品萍在銅逆境下斷裂訊號是由母葉發起並且是單向傳訊！斷裂訊號僅由逆境母葉向健康子葉傳遞，逆境子葉的斷裂訊號不會回傳給健康母葉。

在了解品萍的斷裂訊號是母葉發起且具單向傳遞現象後，我們好奇逆境母葉的斷裂訊號最多能向前傳遞給幾片健康子葉？於是我們在二分盤一側對母葉 P1 處理 $10\mu\text{M}$ 銅離子逆境；另一側以水處理 1,2,3,4 片子葉，觀察品萍在第幾片葉之間會產生斷裂。



(圖 4-2) 母葉逆境對多片子葉的斷裂情形

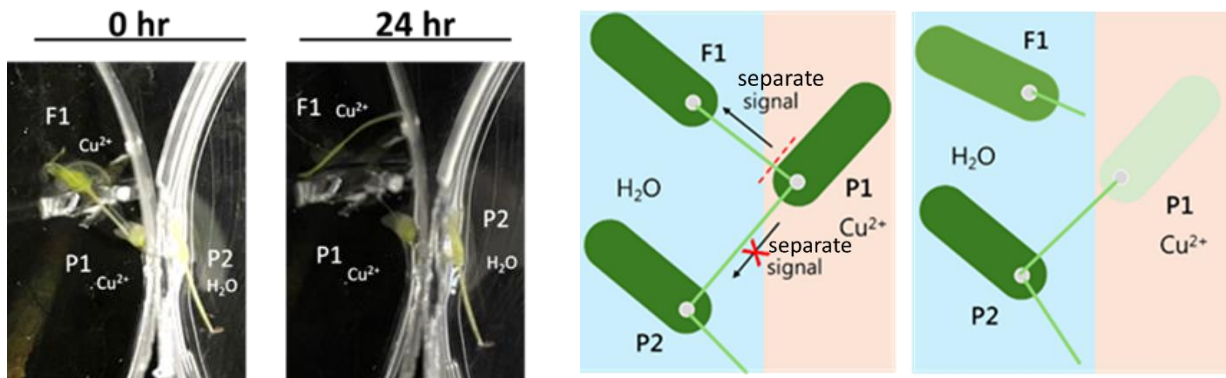


(圖 4-3) 母葉 (P1) 逆境對多片子葉 (F1、F2、F3、F4) 的斷裂機率

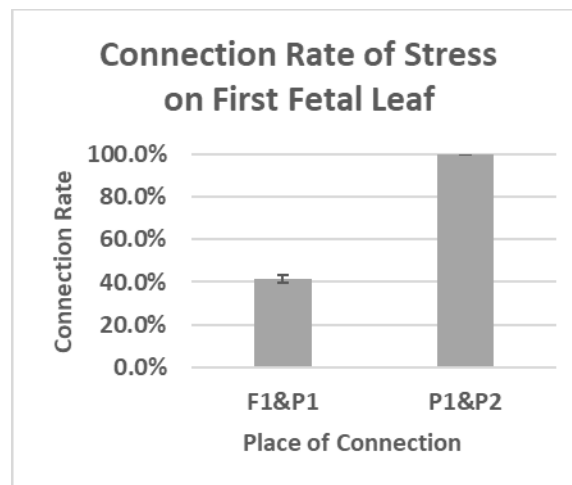
如圖 4-3，當一片母葉接著多片子葉並處理逆境時，只有第一片子葉 F1 與母葉 P1 之間產生斷裂，且連接率皆在 40% 左右，而其他子葉都沒有斷裂情形發生，我們認為在逆境母葉的斷裂訊號僅能傳到最接近之一片子葉 (F1) 就停止，並不會再向前傳遞到第二片子葉 (F2)，為了確保其餘子葉不受影響，以確保最大生存率。

接著我們好奇斷裂訊號是否真的只能單向由母葉傳往子葉，不會由子葉回傳母葉呢？為了解開疑惑我們利用兩個二分盤創造出三個不相通的水域環境，並讓中間水域中的葉狀體處於逆境，觀察斷裂訊號是否會回傳給後面的母葉造成斷裂？於是我們將一母葉

連接之兩片子葉中之靠近母葉的子葉（第一母葉 P1）處理 10 μ M 銅離子逆境，其餘（P2 及 F1）則置於水中。



（圖 4-4）中間子葉逆境斷裂情形

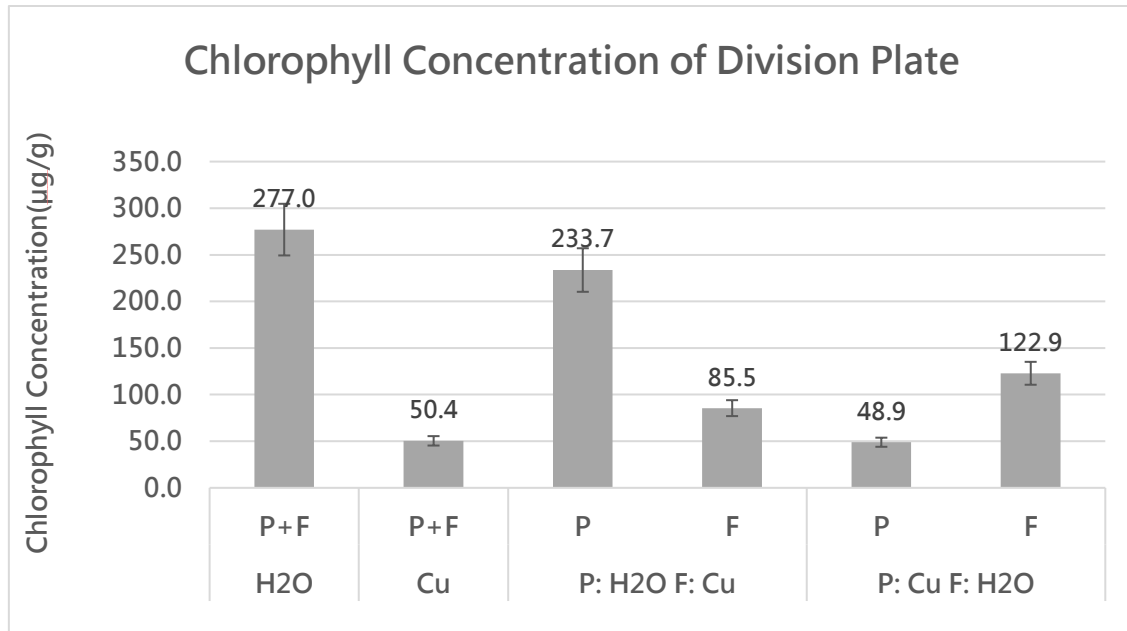


（圖 4-5）中間子葉逆境斷裂機率

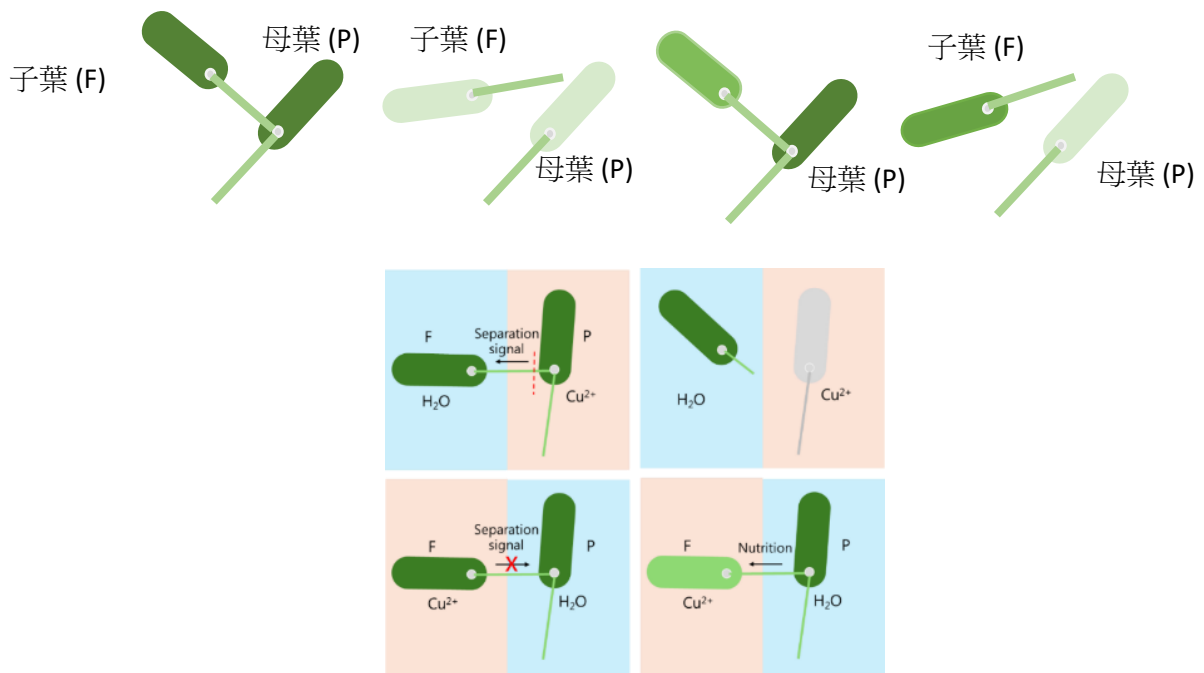
如圖 4-5，我們發現第一子葉及第一母葉間（F1,P1 間）有一定機率發生斷裂，使第一子葉（F1）不受逆境影響；第一子葉(F1)和母葉(P)間則依然保持連結並無斷裂發生，故我們確認品萍不會將斷裂訊息回傳給前面的健康母葉，與前述品萍斷裂訊號單向傳遞的結果一致，斷裂訊息僅會由母葉 P1 傳向第一子葉 F1，讓母葉能持續協助子葉應付逆境。

五、全株處理逆境及單獨處理子葉或母葉逆境下的葉綠素濃度

由上述實驗我們發現當子葉遇到逆境時，斷裂訊號不能回傳給健康母葉，使逆境子葉持續黏附在逆境母葉上，而有什麼好處呢？我們推測保持連接可使健康母葉持續運輸物質來給予逆境子葉支持以增加生存率。為了驗證我們猜想，我們想藉由檢測植物的葉綠素含量以驗證此推論。



(圖 5-1) 子葉或母葉單獨處理銅逆境下的葉綠素含量



(圖 5-2) 4 組實驗結果示意圖

實驗結果顯示，當母葉單獨處理逆境時，母葉的葉綠素含量與子、母葉皆處理逆境時大致相同，子葉也有葉綠素減少的情形，但相較之下受到較少影響，較均處理銅逆境時的 $50.4 \mu\text{g/g}$ 高出約 $72.5 \mu\text{g/g}$ 。而子葉單獨處理逆境時，子葉葉綠素有減少的現象，但較全株處理銅逆境時高出約 $35.1 \mu\text{g/g}$ ，而母葉葉綠素則與對照組差異不大

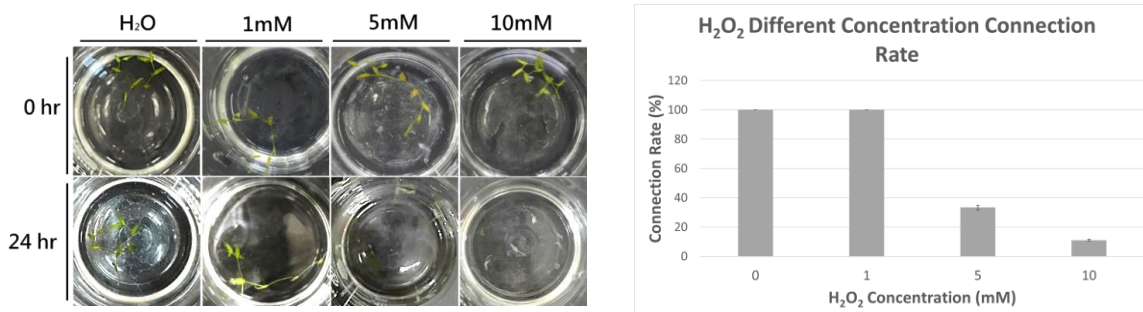
由上述結果，我們得到結論，若為母葉單獨處理逆境，則將產生斷裂減少逆境母葉對健康子葉的連累，使子葉保持翠綠，增加物種生存機率；反之，若僅子葉處理逆境，則將不會出現斷裂，使子葉持續黏附在母葉上，使得母葉可以運輸物質去救助子葉的生長，減少白化程度，使其生存機率能提升。

六、ROS 即為母葉向子葉單向傳遞的斷裂訊號

我們查詢資料後我們發現銅逆境會誘導植物累積過氧化物質（ROS）進而對植物造成傷害，但同時 ROS 也擔任訊息傳遞分子的角色，藉以啟動植物的抗逆境機制。因此，我們好奇，ROS 是否參與品萍局部逆境下的物質分配與選擇性斷裂機制的訊息傳遞？其扮演的角色為何？為此我們進行以下一系列的研究。

（一）、品萍處理雙氧水逆境中觀察斷裂情形

首先，我們得先確認 ROS 真的有參與品萍的斷裂機制，我們將 10 片相連的品萍處放入 1mM、5mM、10mM H_2O_2 溶液中觀察其斷裂情形。

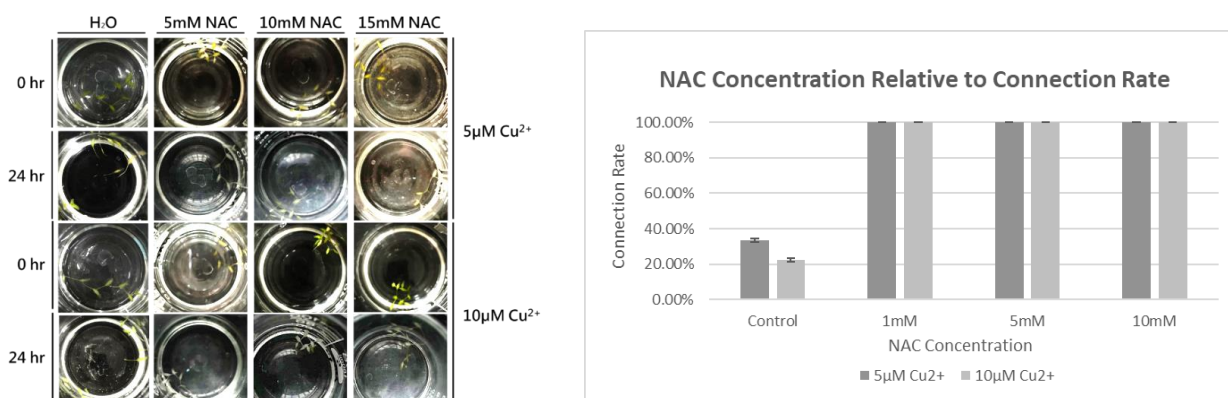


(圖 6-1) 品萍處理雙氧水逆境中斷裂情形、連接率

如圖 6-1 所示，在 **5mM H₂O₂** 溶液能誘發品萍產生斷裂現象，連接率約 33.3%，而於 10mM H₂O₂ 下，品萍有著非常顯著的斷裂僅約 16.7%之連接率。可知**過氧化物質確實有參與品萍斷裂機制**。

（二）、品萍處理銅逆境添加抗氧化劑 NAC 觀察斷裂情形

上述實驗雖確定 ROS 會誘發品萍斷裂機制，**但尚不能保證銅逆境誘發的 ROS 會促使斷裂機制發生！**為此我們設計實驗，於 5μM,10μM 銅離子逆境中加 1mM, 5 mM,10 mM **抗氧化劑（NAC）**藉以阻斷銅逆境下 ROS 的累積，並觀察其斷裂情形。

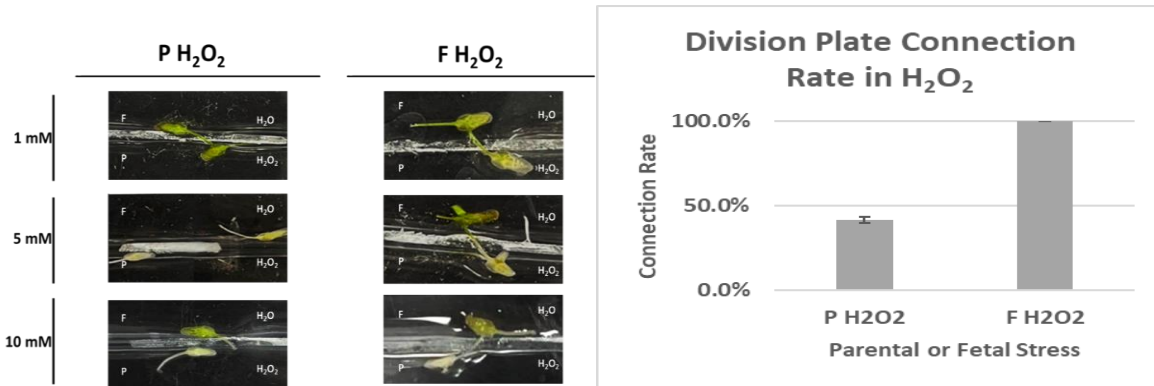


（圖 6-2）品萍處理銅逆境添加抗氧化劑 NAC 之斷裂情形、連接率

如圖 6-2 所示，雖然銅逆境仍會使品萍白化，但**只要加入 NAC 清除銅離子逆境誘發產生的 ROS**，品萍將不會產生斷裂情形！連接率均為 100.0%，也驗證了銅逆境下產生的 ROS 確實有參與品萍的斷裂機制。

（三）、ROS 作為局部逆境下品萍選擇性斷裂的關鍵訊息傳遞因子

由上述實驗已確認銅逆境下產生的 ROS 確實有參與品萍的斷裂機制。接著我們好奇，**ROS 是否為局部逆境下品萍誘發選擇性斷裂的關鍵訊息傳遞分子？**為解開疑惑，我們再次利用二分盤使子葉或母葉單側處理 10mM 雙氧水中並觀察斷裂情形。

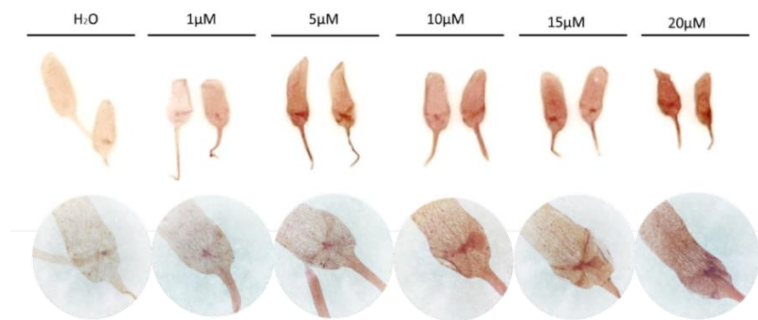


(圖 6-3) 品萍母葉、子葉分別單獨處理雙氧水斷裂情形、連接率

如圖 6-3 所示，僅有在母葉單獨處理 H₂O₂ 的組別，品萍之間才會產生斷裂之現象，且連接率約 41.2%。而子葉單獨處理 H₂O₂ 則無斷裂發生，連接率為 100.0%，實驗結果與前面單側銅逆境結果一致。由此我們推測 ROS 應作為品萍單側逆境下選擇性斷裂的關鍵訊息傳遞分子。

(四)、品萍處理銅逆境之 ROS 染色

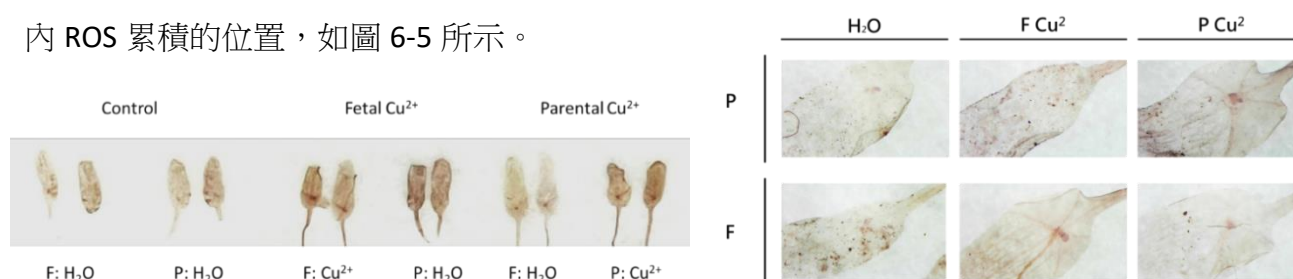
由上述實驗我們推知品萍於銅逆境下會利用 ROS 作為選擇性斷裂的訊息傳遞分子，而斷裂訊號又具有單向傳遞特性(僅由母葉傳往子葉)，因此我們好奇，是否 ROS 就是單向傳遞的斷裂訊號呢？為解開疑惑，首先我們得先知道銅逆境下 ROS 會累積於品萍何處與分布位置。我們透過 DAB 藥劑進行組織染色，藉以觀察銅逆境下 ROS 的累積位置。



(圖 6-4) 品萍處理銅逆境之 ROS 染色情形

首先我們先將品萍全株處理銅逆境後進行 DAB 染色，如圖 6-4，銅逆境濃度越高，其節點 ROS 累積越明顯，而節點又同時是連接斷裂點的位置，此結果增加了 ROS 與品萍

斷裂機制有關假設之真實性。接著我們以二分盤裝置讓品萍單側處理局部逆境後觀察其體內 ROS 累積的位置，如圖 6-5 所示。



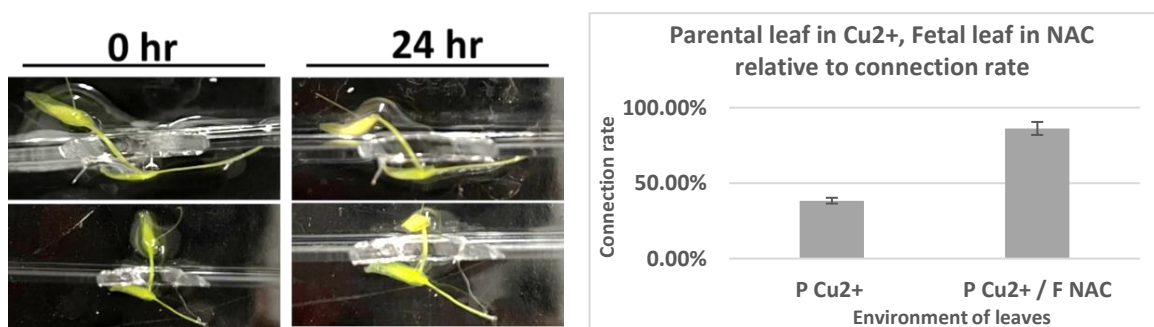
(圖 6-5) 品萍母葉、子葉分別單獨處理銅逆境 ROS 染色情形

當品萍子葉單獨處理銅逆境時，子葉節點有 ROS 累積，但母葉則無累積，推論子葉逆境下，逆境子葉不會將斷裂訊號回傳給母葉，母葉也因此不累積 ROS！而當母葉單獨處理銅逆境時，子、母葉節點皆有 ROS 累積，推測逆境母葉的斷裂訊號單向傳遞到健康子葉能誘導其節處累積 ROS 後接著產生斷裂！歸納以上實驗，我們做出以下推論：逆境母葉將斷裂訊息單向傳遞給健康子葉後誘發子葉節處累積 ROS！

(五)、ROS 最為局部逆境下品萍體內遠端溝通的訊號分子

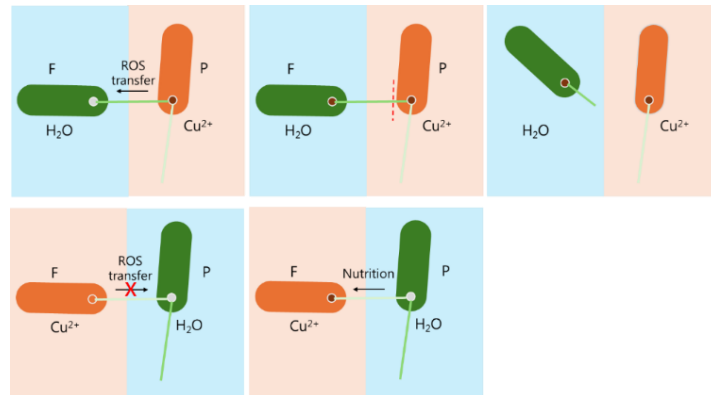
前面實驗推測逆境母葉的斷裂訊號會單向傳給健康子葉並誘發其節處累積 ROS，但子葉節處累積的 ROS 真的是誘發斷裂的關鍵嗎？若透過抗氧化劑阻斷 ROS 累積，藉以打斷母葉向子葉的斷裂訊息傳遞，是否還會產生斷裂現象呢？因此我們設計出以下實驗來驗證。

我們利用二分盤將母葉單獨處理銅逆境，同時在子葉處加入抗氧化劑 NAC，以阻斷 ROS 累積的方式嘗試打破斷裂訊號傳遞，結果如圖 6-6 所示。



(圖 6-6) 品萍母葉單獨處理逆境，子葉單獨處理 NAC 生長狀況、連接率

當母葉單獨處理逆境，子葉單獨處理 NAC 時，斷裂率顯著下降！品萍的連接率提升至約 86%。由此可知，若阻斷 ROS 由母葉向子葉的單向傳遞機制將無法啟動斷裂！實驗結果說明母葉傳遞斷裂訊號給子葉，能誘導子葉節處累積 ROS，當子葉與母葉兩者節處都累積 ROS 才會啟動斷裂機制。斷裂訊號是無法由子葉回傳給母葉，因此，當子葉遭受逆境時，子葉無法讓遠端的母葉節處累積 ROS，因此不會產生斷裂，子葉持續依附於母葉上，透過母葉供養增加逆境子葉生存率。



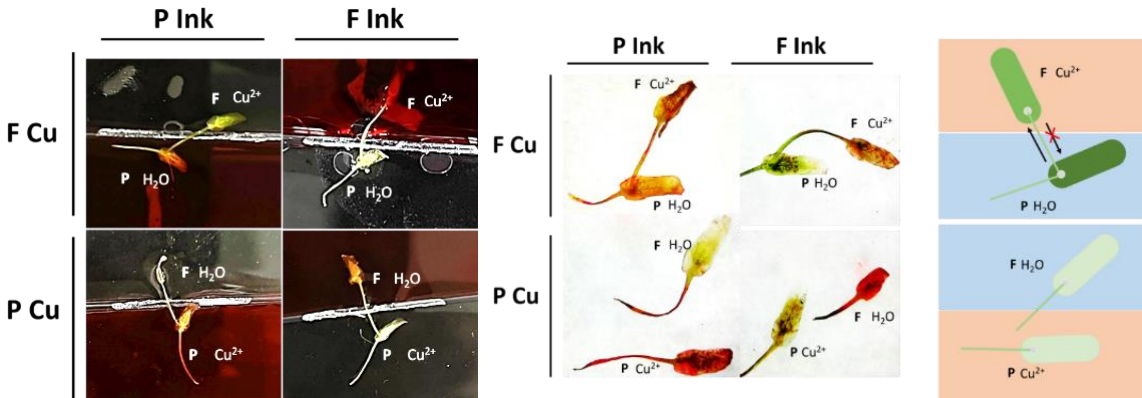
(圖 6-7) 品萍局部逆境運輸分配示意圖

七、單邊逆境下影響養分運輸分配

(一)、品萍母葉、子葉分別處理單邊銅離子逆境觀察運輸分配

上述實驗中我們得知了母葉處於銅逆境下會誘發健康子葉斷裂釋出減少連帶傷害，子葉處於銅逆境時會保持與母葉間的連結以提升生存率。但健康母葉真的會輸送物質給逆境子葉助其抵抗逆境嗎？為了確認局部逆境下植物體內物質運輸機制真實存在，我們以二分盤裝置創造出單側的局部逆境，並加入紅墨水藉以觀察單側局部逆境下物質植物體內

物質輸送方向，如圖 7-1 所示，於 24 小時後利用解剖顯微鏡觀察。



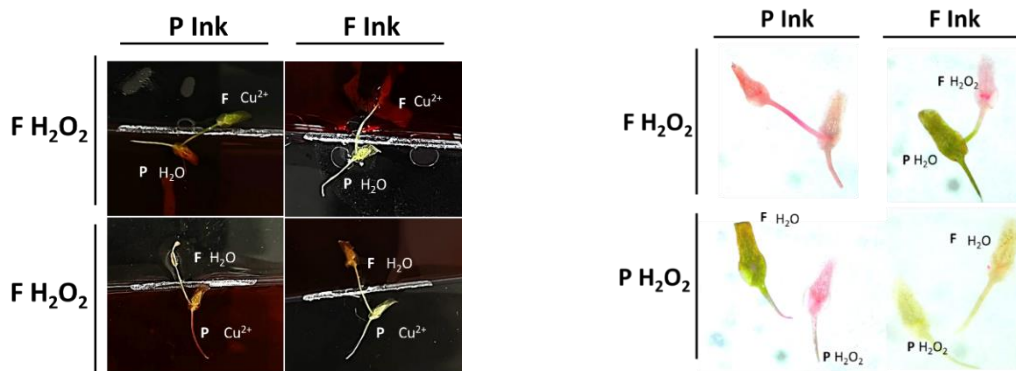
(圖 7-1) 子葉、母葉單獨處理銅逆境和紅墨水之情形、解剖顯微鏡下 (40x)

如圖 7-1，當子葉處理銅逆境、母葉處理紅墨水時，子葉於一天後有呈現紅色之現象；子葉處理銅逆境和紅墨水時，母葉無顏色之變化，顯示出子葉處於逆境中時，母葉會將物質運往子葉，而子葉則不會傳遞物質給母葉！當母葉處理銅逆境、子葉處理紅墨水時，母葉無顏色之變化；母葉處理銅逆境和紅墨水時，因有斷裂發生，子葉之顏色變化不明顯。此實驗結果可證實，在子葉單獨處理銅逆境時，健康母葉將能輸送物質給逆境子葉助其生存，同時逆境子葉不會將毒性物質回傳給母葉，減少母葉產生連帶傷害。

(二)、品萍母葉、子葉分別處理單邊雙氧水觀察運輸分配

前面實驗得知，ROS 作為植物在局部內逆境下組織間遠端溝通的訊息傳遞分子，而我們好奇，ROS 是否作為單邊銅逆境下的品萍體內物質運輸的傳訊分子？為了確認 ROS 是否參與協調局部逆境下的養分分配，我們再次子葉或母葉單獨處理 H_2O_2 的實驗中加入紅墨水，於一天後利用解剖顯微鏡觀察植物體內運輸情形。

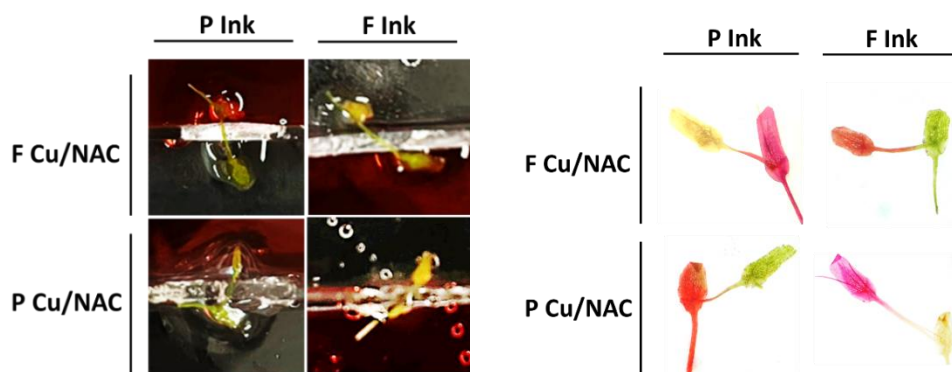
如圖（圖 7-2），當子葉處理 H_2O_2 、母葉處理紅墨水時，子葉有明顯染紅情形；子葉處理 H_2O_2 和紅墨水時，母葉無顏色之變化。當母葉處理 H_2O_2 、子葉處理紅墨水時，母葉無顏色之變化；母葉處理 H_2O_2 和紅墨水時，子葉有些染紅現象。顯示出當子葉處理 H_2O_2 時，母葉會將物質運往子葉，而子葉則不會傳遞物質給母葉；而當母葉處理 H_2O_2 時，會由母葉和子葉共同誘發斷裂，綜合以前結果我們得知，子葉銅逆境下累積的 ROS 可作為母葉輸送物質前來子葉的訊號。



（圖 7-2）品萍母葉、子葉分別單獨處理雙氧水運輸分配情形、解剖顯微鏡下(40 x)

（三）、品萍母葉、子葉分別單獨處理銅逆境添加 NAC 觀察運輸分配

由上述實驗，我們已知 ROS 會影響運輸機制，接著我們將子葉或母葉單獨處理 $10\mu M$ 銅逆境和 $10mM$ NAC，並在其中加入紅墨水，試圖探討是否為銅離子逆境下誘發產生的 ROS 影響物質運輸機制。



（圖 7-3）品萍母葉、子葉分別單獨處理銅逆境,NAC 運輸分配情形、解剖顯微鏡下(40 x)

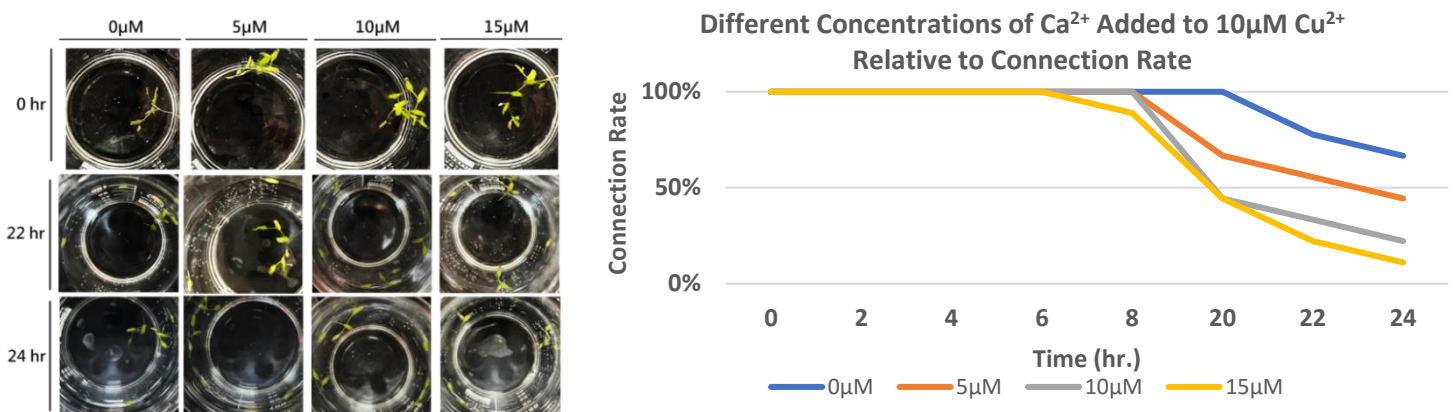
如圖 7-3，當品萍子、母葉分別處於逆境環境中並含抗過氧化劑時，品萍間不會發生斷裂，子、母葉間也不會有物質傳遞，即各自自由自身環境吸取物質，不將體內物質傳遞給彼此。確立了子葉單側銅逆境下誘發產生的 ROS 將啟動植物體內物質運輸機制。

八、鈣離子作為品萍斷裂機制的傳訊分子

已知品萍的斷裂機制中具有彼此溝通傳訊的特性，且 ROS 是其中重要的傳訊分子，而接著我們想知道植物體內常見的傳訊分子—鈣離子 Ca^{2+} —是否也可作為品萍體內的傳訊物質，於是我們做出以下實驗。

（一）、銅離子逆境中加入鈣離子傳訊物質

我們取出 10 片連續之品萍葉處理於 $10\ \mu\text{M}\ \text{Cu}^{2+}$ ，且加入濃度 5、10、15 μM Ca^{2+} ，使品萍於其中生長 24 小時，並觀察其是否斷裂，計算連接率。



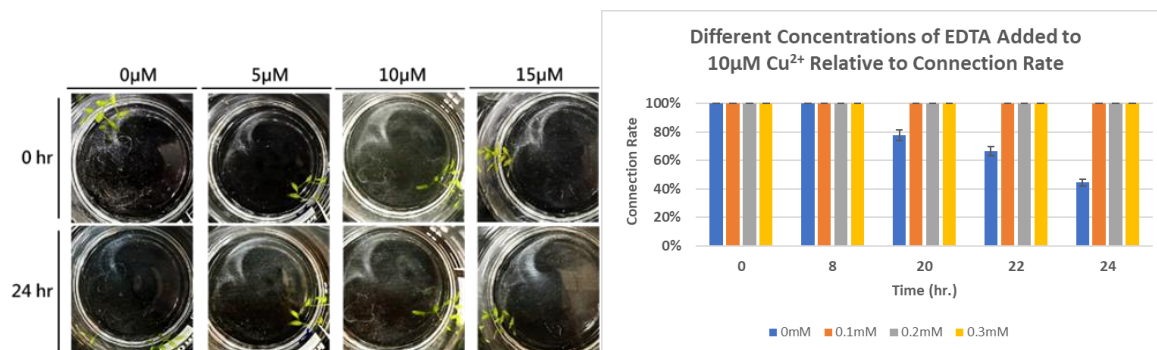
（圖 8-1）銅離子逆境中加入鈣離子傳訊物質之斷裂情形、連接率

統整以上圖表，與實驗二中無鈣離子之品萍連接率比較，鈣離子使品萍有加速斷裂及增加斷裂效果的現象，如達 8 小時，加入 15 $\mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$ 的品萍，連接率已減至約 88.9%，但對照組連接率仍於 100.0%，而最終三組有加入 Ca^{2+} 之組別連接率均低於對照組，可推測鈣離子會增強銅逆境下品萍的逆境斷裂現象，代表鈣離子有參與品萍的斷裂機制。

（二）、銅離子逆境中加入 EDTA 螯合金屬離子

我們仍擔心品萍會不會只是因為環境中 Ca^{2+} 濃度上升影響斷裂，而非品萍自身因

銅逆境而誘導產生 Ca^{2+} 引發的斷裂。為了確認 Ca^{2+} 是品萍體內必要的傳訊物質，我們在銅逆境下加入 EDTA 螯合鈣離子。我們取出 10 片相連品萍葉處理多杯之 $10\ \mu\text{M}\ \text{Cu}^{2+}$ ，分別加入濃度 0.1、0.2、0.3mM EDTA，使品萍於其中生長 24 小時，觀察後計算連接率。

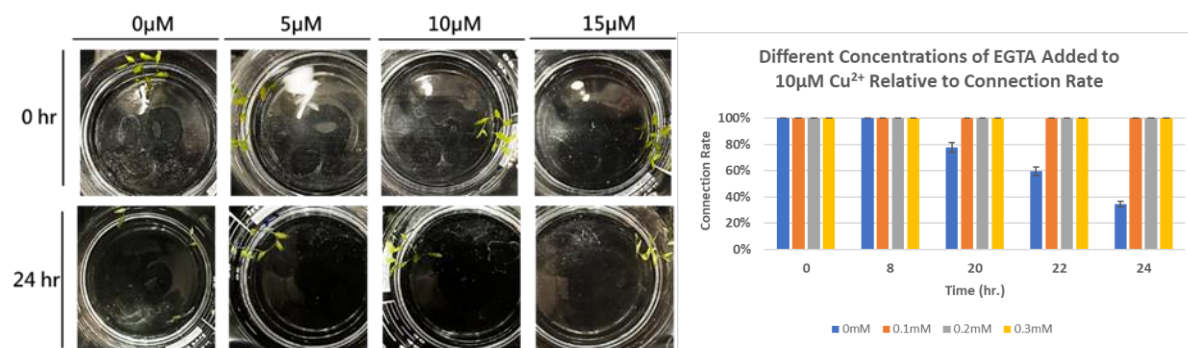


(圖 8-2) 銅離子逆境中加入 EDTA 之斷裂情形、連接率

統整以上圖表，與前述實驗中加入鈣離子之品萍連接率比較，鈣離子被螯合使品萍消失所有逆境斷裂的現象，連接率均維持最初之 100.0%，可推測鈣離子有參與品萍銅逆境下的斷裂機制，但由於 EDTA 仍有機會螯合銅離子，我們做了以下實驗。

(三)、銅離子逆境中加入 EGTA 螯合金屬離子

由於 EDTA 有與銅離子螯合之可能，我們利用 EGTA 只螯合鈣離子的特性，加入 EGTA 觀察斷裂情形。於是我們將 10 片連續之品萍葉處理之 $10\ \mu\text{M}\ \text{Cu}^{2+}$ ，且分別加入濃度 0.1、0.2、0.3mM EGTA，使品萍於其中生長 24 小時，觀察其是否斷裂，計算連接率。



(圖 8-3) 銅離子逆境中加入 EGTA 之斷裂情形、連接率

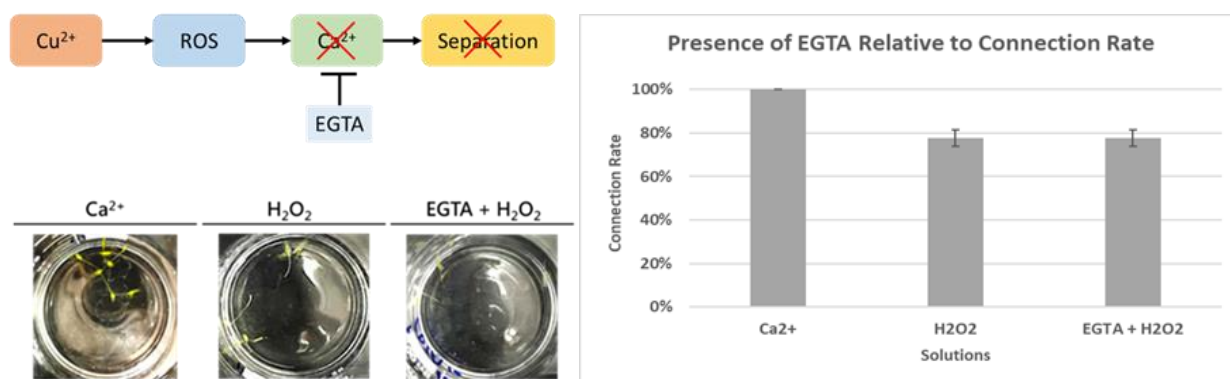
統整以上圖表，與前述二實驗中添加鈣離子及添加 EDTA 之品萍連接率比較，當確定僅鈣離子被螯合時，結果為不斷裂，連接率仍維持 100.0%，可確認鈣離子確實有參與品萍逆境斷裂機制，是銅離子逆境下誘發斷裂的必要傳訊分子。

九、雙氧水與鈣離子在品萍銅逆境下相互影響機制

由於我們已知 Ca^{2+} 做為斷裂過程中必要的傳訊物質，而過氧化物亦可使品萍產生斷裂的逆境反應，故我們想知道這二者對於品萍逆境斷裂的機制有何交互影響，確定其中的傳訊流程，誰是上游，誰是下游，誰是造成斷裂的主要物質。

我們做實驗前，以探討可能的傳訊流程，想藉由實驗以確認何者為正確的機制，於是我們想先確認 Ca^{2+} 及 ROS 的上下游關係，首先我們假設 ROS 為上游， Ca^{2+} 為下游，誘導斷裂，故我們做出以下實驗。

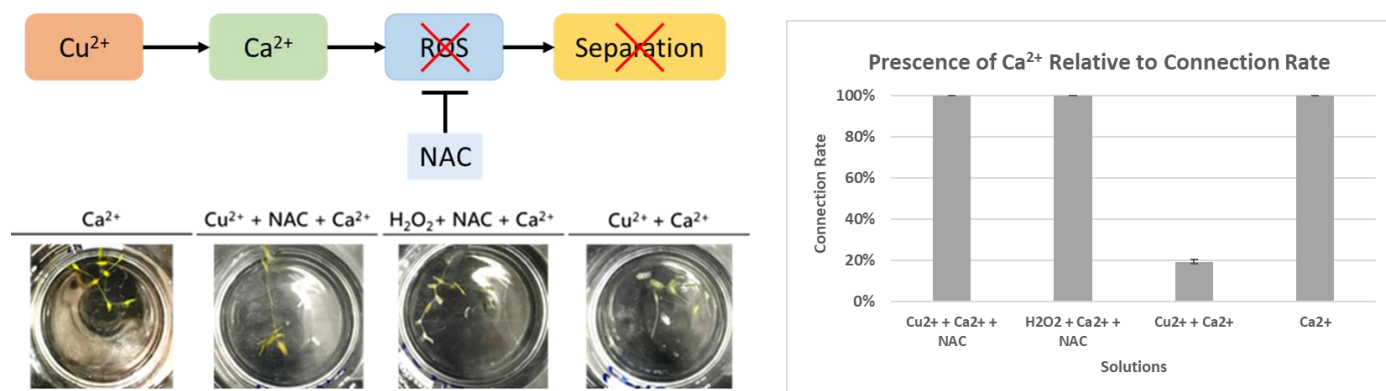
為了確認我們的猜測，我們將品萍處理 0.1mM EGTA + 10mM H_2O_2 溶液、10mM H_2O_2 溶液、10 μM Ca^{2+} 溶液中，並處理 24 小時，觀察其生長情形與計算連接率。若符合我們的假設，則 H_2O_2 實驗的连接率要大於 EGTA + H_2O_2 實驗的连接率。



(圖 9-1) 品萍於 Ca^{2+} 、 H_2O_2 、EGTA+ H_2O_2 三種環境中 24 小時後之生情形與連接率

統整上述圖表，品萍於 H_2O_2 中之斷裂情形，與品萍於 EGTA + H_2O_2 中之斷裂情形大致相同，連接率均約 77.8%。因此，我們原本的假設是錯的，於是推測過氧化物造成的品萍的逆境斷裂反應與有無 Ca^{2+} 無關， Ca^{2+} 不影響過氧化物造成品萍斷裂，僅影響 Cu^{2+} 造成品萍斷裂，猜測 Ca^{2+} 才是上游，過氧化物為下游。

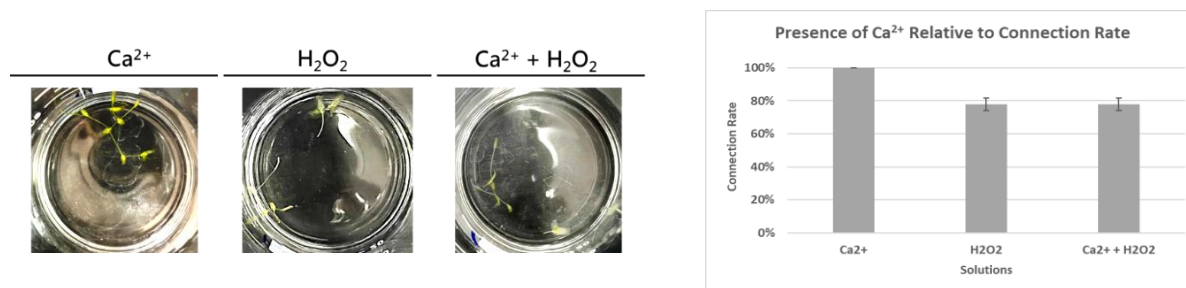
為了驗證這個猜想，我們將品萍處理 $10\ \mu\text{M Cu}^{2+} + 10\text{mM NAC} + 10\ \mu\text{M Ca}^{2+}$ 、 $10\text{mM H}_2\text{O}_2 + 10\text{mM NAC} + 10\ \mu\text{M Ca}^{2+}$ 、 $10\ \mu\text{M Cu}^{2+} + 10\ \mu\text{M Ca}^{2+}$ ，並處理 24 小時，觀察其生長情形與計算連接率。如果此猜想是正確的，那有加入 NAC 之實驗應都不斷裂，因為過氧化物質都被清除，即使有 Ca^{2+} 也不促進斷裂現象加劇。



(圖 9-2) 品萍於 $\text{Cu}^{2+} + \text{NAC} + \text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAC} + \text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 之斷裂情形

實驗結果與符合猜想，有 NAC 加入的組別均無斷裂，可證實上游傳訊物是 Ca^{2+} ，下游傳訊物是過氧化物質，而過氧化物質最終誘發斷裂。

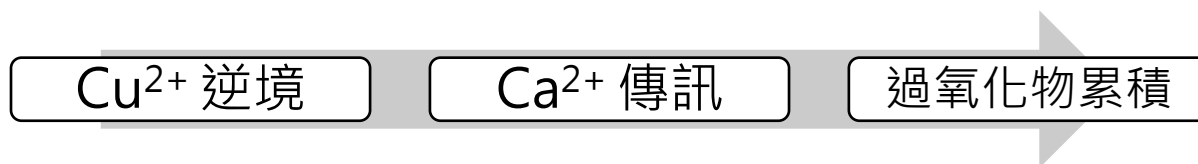
接下來我們好奇 Ca^{2+} 與過氧化物質之間是否有著正回饋的機制，兩者是否會相互促進對方濃度累積？於是我們將品萍浸入 $10\ \mu\text{M Ca}^{2+} + 10\text{mM H}_2\text{O}_2$ 溶液、 $10\text{mM H}_2\text{O}_2$ 溶液、 $10\ \mu\text{M Ca}^{2+}$ 溶液中，並處理 24 小時，觀察其生長情形與計算連接率。如果有正回饋機制，則處理 Ca^{2+} 及 H_2O_2 的組別連接率應比處理 H_2O_2 的還低，斷裂現象被強化。



(圖 9-3) 品萍於 Ca^{2+} 、 H_2O_2 、 $\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ 三種環境中 24 小時後之斷裂情形與連接率

由實驗結果可發現，處理 Ca^{2+} 及 H_2O_2 的組別與處理 H_2O_2 的組別連接率相同，於是可推測在品萍內 Ca^{2+} 與 H_2O_2 之間無相互誘導對方累積的正回饋機制。

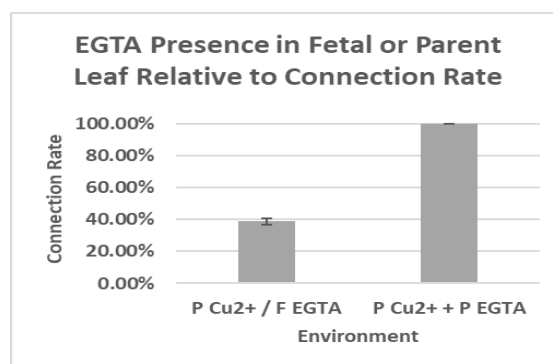
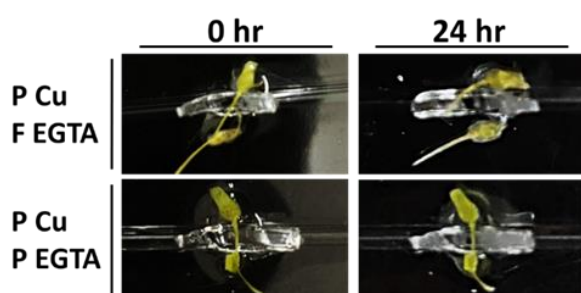
故我們將品萍的斷裂機制做出以下結論，品萍感受 Cu^{2+} 逆境，再以 Ca^{2+} 作為傳訊分子，將逆境的訊息傳送於植物體各處，最終產生過氧化物，來引發斷裂的結果，其中無回饋作用。



十、鈣離子在品萍局部銅逆境下傳訊機制

(一)、 Ca^{2+} 作為受傷組織內傳訊分子

我們已知 Ca^{2+} 為品萍內重要的傳訊分子，並了解其與 Cu^{2+} 、 H_2O_2 之關係，而接下來我們好奇 Ca^{2+} 是否能作為受傷組織內的訊息傳導或遠端溝通的訊息分子。於是我們將品萍二分葉置於二分盤，分兩組實驗，一為將母葉處理銅逆境與 EGTA；另一組將母葉處理銅逆境，子葉處理 EGTA，並觀察斷裂情形。

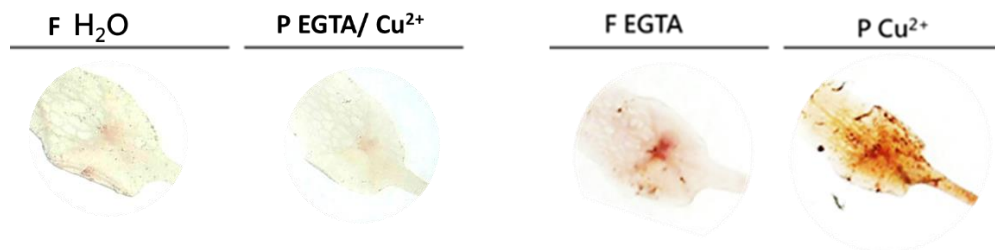


(圖 10-1) 品萍母葉處理 Cu^{2+} /EGTA 與 母葉處理 Cu^{2+} 子葉處理 EGTA 之生長情形、連接率

如圖 10-1，當母葉處理銅逆境與 EGTA 時，品萍連接率為 100%，無斷裂情形發生，顯示 Ca^{2+} 必須參與受傷母葉內部的訊息傳遞才可誘發斷裂機制產生；而當母葉處理銅逆境，子葉處理 EGTA 時，連接率為 40%左右，可知子葉內的 Ca^{2+} 被螯合後不會改變斷裂率，我們做出以下推測，受傷母葉需透過 Ca^{2+} 協助才能將斷裂訊號單向傳遞給健康子葉，並觸發子葉斷裂釋出，此過程子葉內部 Ca^{2+} 不參與！總結以上實驗， Ca^{2+} 影響品萍選擇性斷裂機制僅發生在受傷母葉！子葉則無。

(二)、 Ca^{2+} 不會作為遠端溝通的訊息分子

先前實驗得知，斷裂訊號僅由母葉向子葉單向傳遞，最終使母葉與子葉兩者的節處累積 ROS 後誘發子葉斷裂釋出，而 Ca^{2+} 雖參與局部逆境誘發的選擇性斷裂機制，但 Ca^{2+} 的影響僅侷限於母葉。此外，先前實驗發現，ROS 與 Ca^{2+} 兩訊息分子具有交互作用的關係，再透過文獻查詢得知，ROS 與 Ca^{2+} 兩者相互作用下可產生 ROS 波(ROS wave)在植物體內進行組織間的遠端訊號傳遞，因此我們好奇，母葉中的 Ca^{2+} 是不是透過類似機制，與 ROS 交互作用後產生 ROS 波(ROS wave)向子葉單向傳遞，進而誘發子葉節處累積 ROS 後觸發斷裂現象。為了確認上述猜測，我們將母葉處理銅逆境，子、母葉分別單獨處理 EGTA 的品莖進行 DAB 染色，以觀察 Ca^{2+} 被螯合下，品莖累積 ROS 情形。



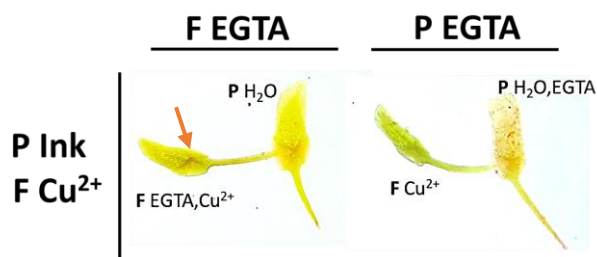
(圖 10-2) 母葉處理銅逆境，子、母葉分別單獨處理 EGTA 的 ROS 染色情形 (40x)

如圖 10-2，母葉處理銅逆境，子葉處理 EGTA 下，子、母葉皆在節點處累積 ROS，顯示單向傳遞之斷裂訊號不受子葉 Ca^{2+} 螯合影響；而母葉單獨處理銅逆境和 EGTA 下，子、母葉皆無明顯 ROS 累積，說明母葉逆境下 ROS 累積受 Ca^{2+} 影響外， Ca^{2+} 扮演啟動母葉向子葉單向傳遞斷裂訊號的關鍵角色，我們推測逆境母葉內 Ca^{2+} 與 ROS 相互作用下，產生向健康子葉的 ROS 波(ROS wave)作為單向傳遞的斷裂訊號，促使子葉節處累積 ROS 後誘發子葉斷裂釋出。

十一、鈣離子影響品莖在局部銅逆境下運輸分配機制。

由前述實驗中我們得知了在子葉單獨處理銅逆境時，會累積過氧化物，使健康的母葉輸送物質給逆境子葉助其生存，同時逆境子葉不會將毒物回傳給母葉，減少母葉產生連帶傷害。我們好奇此運輸分配機制是否會受 Ca^{2+} 調控？子葉逆境下健康母葉會運送物質助子葉生存，代表子葉應有向母葉傳遞求救訊號，但逆境子葉無法誘發健康母葉累積 ROS，那會不會逆境子葉是誘發母葉內部的 Ca^{2+} 傳訊而啟動物質分配呢？，於是我們將一

品萍二分葉的子葉處理銅逆境和 EGTA，母葉處理紅墨水；另一組將子葉處理銅逆境，母葉處理 EGTA、紅墨水，並於 24 小時後利用解剖顯微鏡觀察運輸分配情形。



(圖 11-1) 品萍母葉處理 Cu^{2+} /EGTA 與母葉處理 Cu^{2+} 子葉處理 EGTA 運輸分配情形 (40 x)

由圖 11-1，子葉處理銅逆境和 EGTA，母葉處理紅墨水下，子葉節處(紅色箭號處)變紅，母葉還是會將物質運往子葉協助其度過逆境；而當子葉處理銅逆境，母葉處理 EGTA、紅墨水時，則無物質運輸分配現象發生，推測子葉處於逆境下時，子葉內部會累積 ROS，向母葉送出求救訊號，接著母葉再利用產生 Ca^{2+} 進行內部傳訊，啟動母葉向子葉傳送物質以救助子葉的機制。

伍、討論

一、品萍的物質分配機制

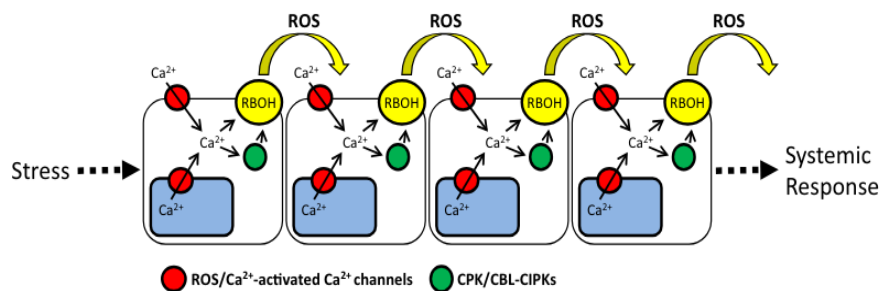
已知細胞分裂素 (CK) 可影響養分分配，而我們猜測當僅品萍子葉處理逆境時，品萍藉由 CK 來分配養分，使母葉可增加子葉其中的養分，來維持子葉的生長，保持子葉的最大生存機率。而品萍在逆境下時，增加的過氧化物質 ROS 可影響品萍內離子通道活性，來調節營養缺乏的相關信號及傳遞途徑，而這樣的情況下，品萍體內的 CK 將增加，將營養送往這些營養缺乏之處，即為母葉傳往子葉。

二、 H_2O_2 、 Ca^{2+} 、RBOH 間的回饋關係，以探討品萍的斷裂機制

ROS，如單重氧 (O_2)、超氧 (O_2^-) 或過氧化氫 (H_2O_2) 作為信號傳導分子，可以控制從發育和生長調控到對生物性或非生物性刺激的反應等一系列生物學過程。這個網絡使細胞能夠保持非毒性穩態的 ROS 水平，同時允許在特定細胞位置中瞬時積聚 ROS 作為信號。這些通路包括基本的細胞過程，如光合作用、呼吸作用和光呼吸作用，它們產生

ROS 作為不可避免的副產物。在這個 ROS 生成酶網絡中的一個關鍵參與者是專門的呼吸爆發或 NADPH 氧化酶。而在機制中常見 Ca^{2+} 作為另一傳訊分子，於網絡中兩者有互相回饋之機制，故我們認為品萍可利用 RBOH 酵素系統在體內執行傳訊。

其中 RBOH 酵素運作方式為，植物體感受局部逆境，使其細胞內產生 Ca^{2+} 訊息傳遞因子，觸發 RBOH 酵素向其他組織單向傳遞 ROS，稱為 ROS wave。而於品萍內，我們推測母葉在感受逆境時，會使體內 ROS 即 Ca^{2+} 濃度上升，藉由 ROS wave 單向向子葉傳送 ROS，使子葉節處累積 ROS，兩者互相溝通後，產生斷裂。



(圖 12-1) 植物體內 ROS wave 示意圖

出處：Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination, Feroza K. Choudhury, The Plant Journal (2016)

三、物質分配對於品萍的生態用意

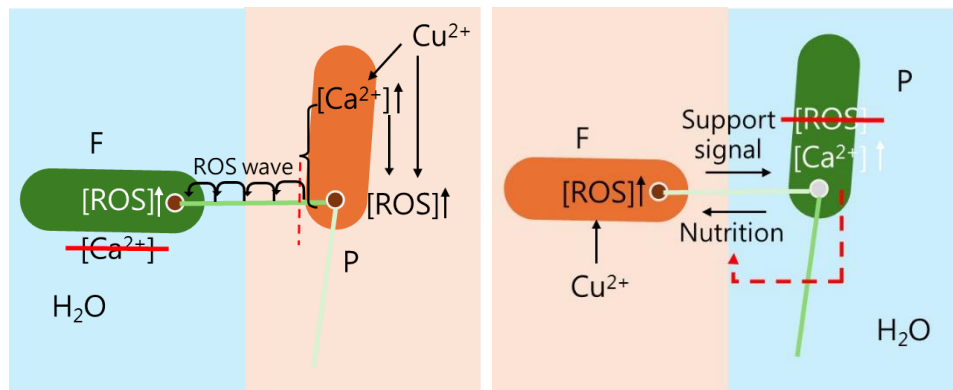
品萍的物質分配主要發生於逆境下，而於生態中，品萍為了因應自身生長環境的重金屬逆境，如 Cu^{2+} ，將產生類似的營養分配機制，使整株品萍中較老的葉片營養分配至較為年輕的葉片，再調節細胞分裂，使物種持續繁衍，以求最大的物種生存率，不致滅絕。

陸、結論

實驗結果我們發現 Cu^{2+} 對品萍是一種逆境，母葉於逆境下會誘發斷裂減少子葉受逆境影響，子葉於逆境下，母葉會助其應付逆境，即母葉去救助子葉生長。接著我們確認了品萍於銅離子逆境下產生 ROS 作為必要傳訊分子並誘發斷裂。此外，品萍在銅離子逆境下，品萍的節處會累積 ROS，且子葉逆境下，逆境子葉 ROS 訊號不會回傳給健康母葉；母葉逆境下，ROS 訊號能單向傳遞到健康子葉的節處後誘發斷裂。我們也得知需兩者相互溝通後，在兩側累積 ROS 才能誘發斷裂。再來我們發現鈣離子對品萍逆境斷裂機制有影響，為誘發斷裂的必要傳訊分子。針對詳細斷裂傳訊機制，我們得出品萍感受 Cu^{2+} 逆

境，再以 Ca^{2+} 作傳訊分子，將逆境的訊息傳送於植物體各處，最終產生過氧化物，來引發斷裂的結果和改變物質運輸分配，其中無正回饋作用。

接著我們發現 Ca^{2+} 與 ROS 均對品萍選擇性斷裂與物質分配均有影響，在選擇性斷裂機制的部分，母葉會透過銅逆境誘發體內 ROS 累積，而其中也有 Ca^{2+} 參與，推測其可共同協助母葉內產生單向向子葉傳遞的 ROS wave，誘發子葉節處累積 ROS，最終在這樣的訊息溝通後，導致斷裂，ROS 單向傳遞的特性即是品萍局部逆境下產生選擇性斷裂的關鍵原因，使得母葉單獨逆境時會釋出健康子葉避免連累子葉。而在運輸分配物質的部分，子葉會透過銅逆境誘發體內 ROS 累積，推測其中改變了植物體內激素濃度梯度，使激素分布改變，如圖中所述子葉向母葉傳遞求救訊號，而再誘發母葉節處累積 Ca^{2+} ，此時母葉將會改變品萍內部的運輸分配，使養分、物質分配給予子葉，增加子葉存活率與整體的最大存活率。



(圖 13-1) 品萍局部逆境下的斷裂傳訊機制與物質分配傳訊機制

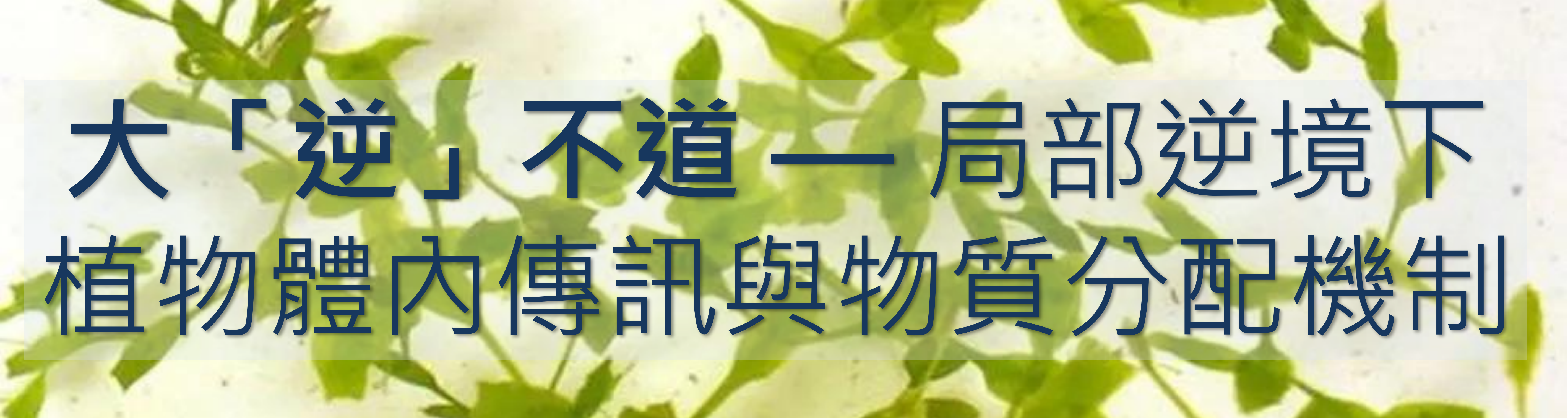
柒、參考文獻及其他

1. 周柏仰、林子翔、洪瑋廷 • 當機立「斷」——浮萍自裂脫險的機制與生態意義 • 臺南市:臺南市私立德光高級中學
2. Lubovska, Z., Dobra, J., Storchova, H., Wilhelmova, N., and Vankova, R. (2014). Cytokinin Oxidase/dehydrogenase Overexpression Modifies Antioxidant Defense against Heat, Drought and Their Combination in Nicotiana Tabacum Plants. J. Plant Physiol. 171, 1625–1633. doi:10.1016/j.jplph.2014.06.021
3. Sławomir Samardakiewicz, Weronika Krzeszowiec-Jeleń, Waldemar Bednarski, Artur Jankowski, 4Szymon Suski, Halina Gabryś, and Adam Woźny. Pb-Induced Avoidance-Like Chloroplast Movements in Fronds of Lemna trisulca L
4. Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu, and Yuichi Tada. Plant signaling networks involving Ca^{2+} and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. Front Plant Sci. 2015; 6: 427.
5. Moustafa Fathy, Sahar M. Saad Eldin, Muhammad Naseem, Thomas Dandekar, Eman M. Othman. Cytokinins: Wide-Spread Signaling Hormones from Plants to Humans with High Medical Potential
6. Ru-Xin Wang, Ze-Hang Wang, Ya-Dan Sun, Lei-Lei Wang, Min Li, Yi-Ting Liu, Hai-Meng Zhang, Peng-Wei Jing, Qiao-Fang Shi, Yi-He Yu (2024). Molecular mechanism of plant response to copper stress: A review. Environmental and Experimental Botany. Volume 218. 105590. doi: 10.1016
7. Feroza K. Choudhury, Rosa M. Rivero, Eduardo Blumwald, Ron Mittler(2016). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. The Plant Journal: Volume 90, Issue 5 Special Issue: Plant Abiotic Stress. Pages: 835-1025.

【評語】 052104

1. 本研究以品萍 (*Lemna trisulca*)為材料，探討在銅離子逆境下母葉與子葉之間的體內傳訊與物質分配機制。
2. 結果發現當母葉遭遇局部逆境時會將健康子葉釋放，而子葉遭遇局部逆境時，母葉會選擇保留子葉並持續送物質助其生存。
3. 本研究在題目上應直接明示實驗所用的逆境為銅離子逆境。
4. 其他環境逆境如高鹽及溫度逆境是否會有類似的結果值得探討。
5. 本研究實驗內容邏輯清晰，結果的分析亦詳實合理。
6. 文獻回顧可再加強。

作品簡報

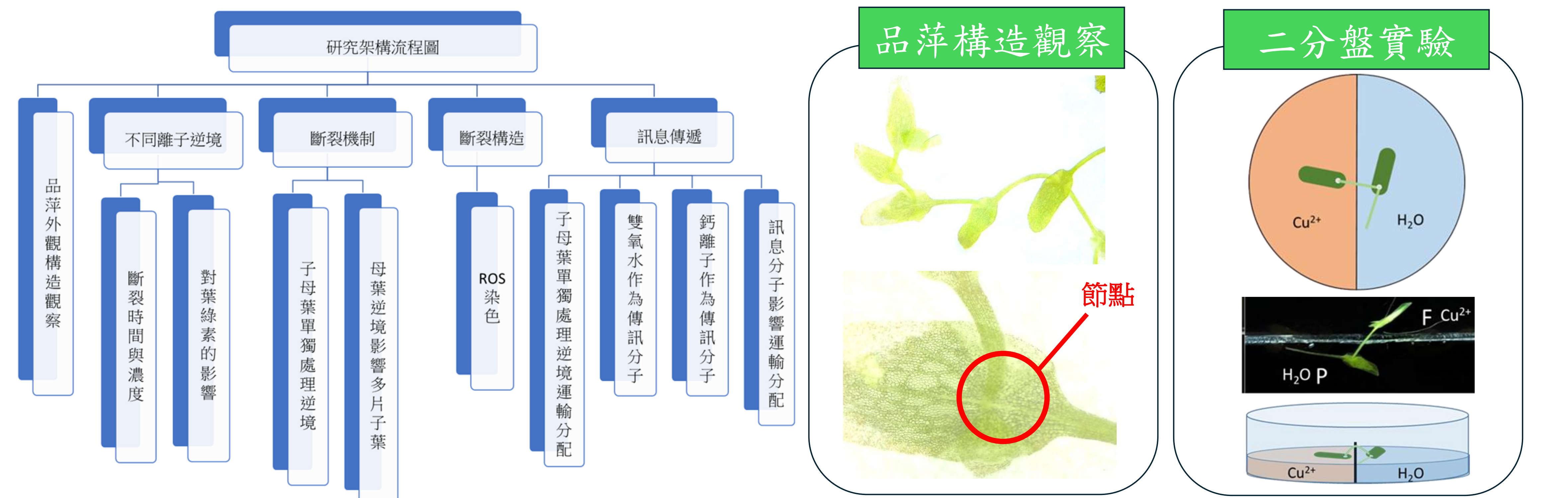


大「逆」不道——局部逆境下 植物體內傳訊與物質分配機制

摘要

植物一葉片受到逆境時，其體內如何將逆境訊號傳遞到其他組織並進行物質分配？此領域過去研究甚少，而品萍特殊的葉狀體相連構造搭配二分盤裝置，很適合創建局部逆境並探討體內傳訊與物質分配機制。研究發現：當母葉遭遇局部逆境時會將健康子葉釋放以減少子葉產生連帶傷害；而子葉遭遇局部逆境時，母葉選擇保留子葉並持續送物質助其生存。深入研究發現，逆境子葉累積的ROS將觸發物質分配，使其向母葉傳送求救訊號，促使母葉內部以Ca²⁺做訊息傳導後將物質送往子葉助其生存。選擇性斷裂則由母葉內部Ca²⁺與ROS共同調節觸發，母葉遭遇逆境時，Ca²⁺為上游觸發母葉節處累積ROS並向子葉傳遞單向斷裂訊號，使子葉節處累積ROS後誘導斷裂，降低母葉對子葉的連帶傷害。

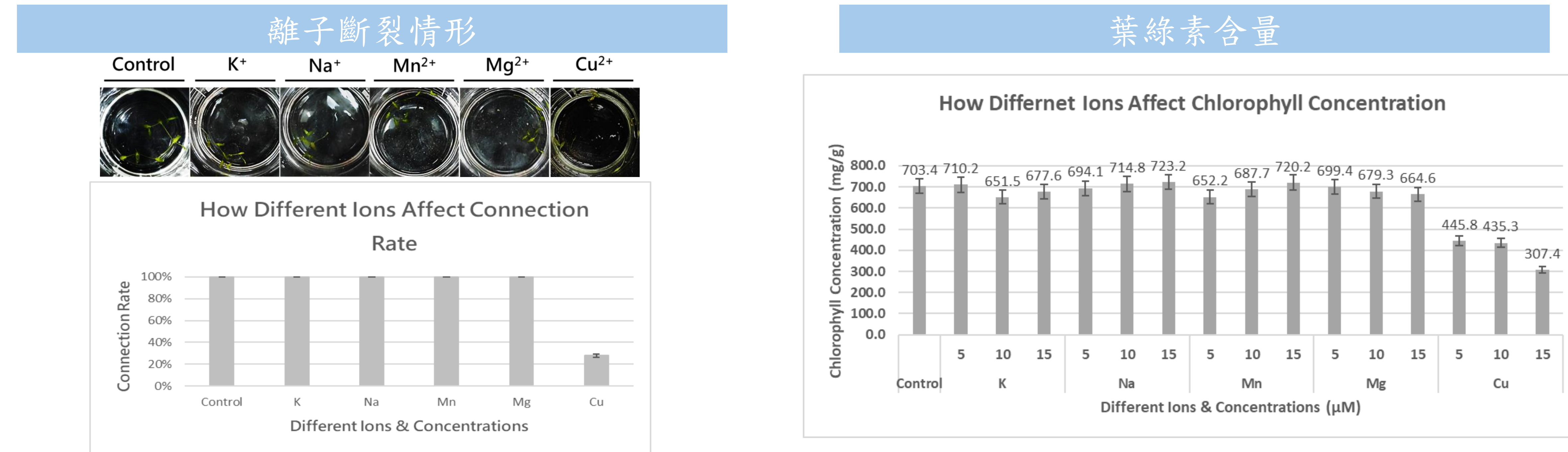
貳、研究過程與方法



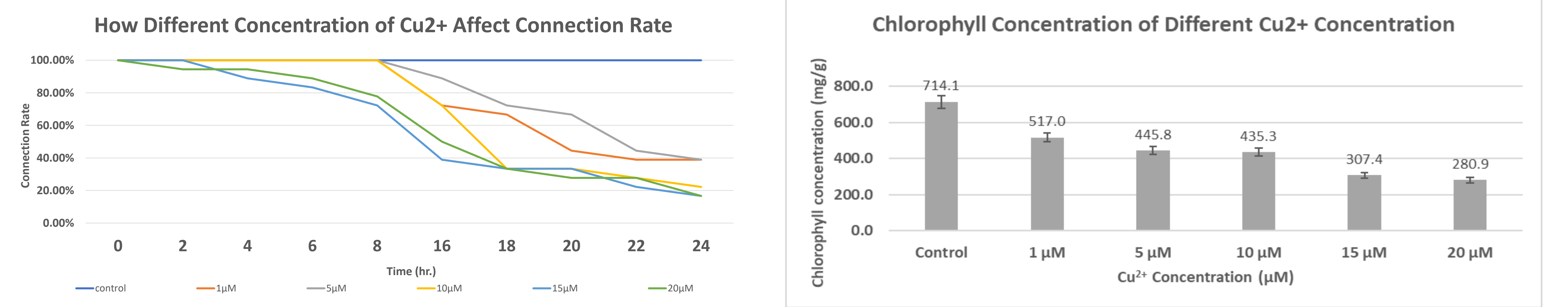
參、研究結果

逆境與濃度的選擇

目的 探討何種金屬離子對於品萍為逆境離子及何種濃度為最適作用濃度。



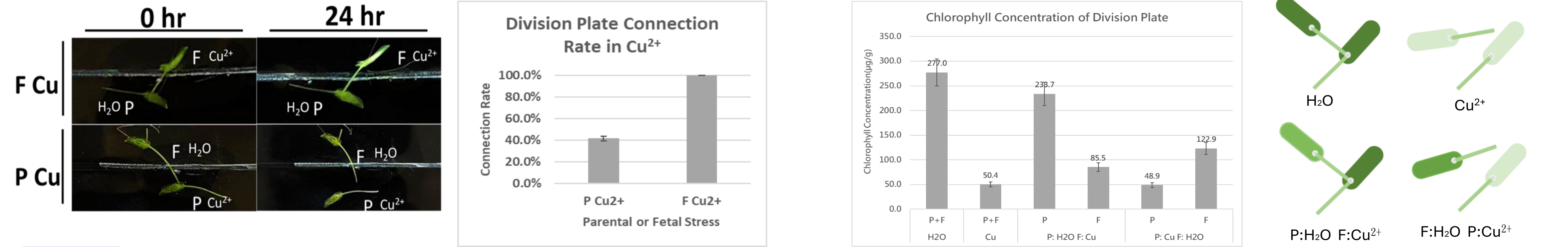
整株品萍處理銅逆境斷裂情形



結果 K⁺、Na⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 均不是逆境離子，Cu²⁺ 是逆境離子，使品萍出現斷裂、白化、枯萎。且使連接率、葉綠素濃度下降約一半，故我們將使用10 μM Cu²⁺ 作為後續實驗濃度。

品萍於局部銅逆境之生長狀態

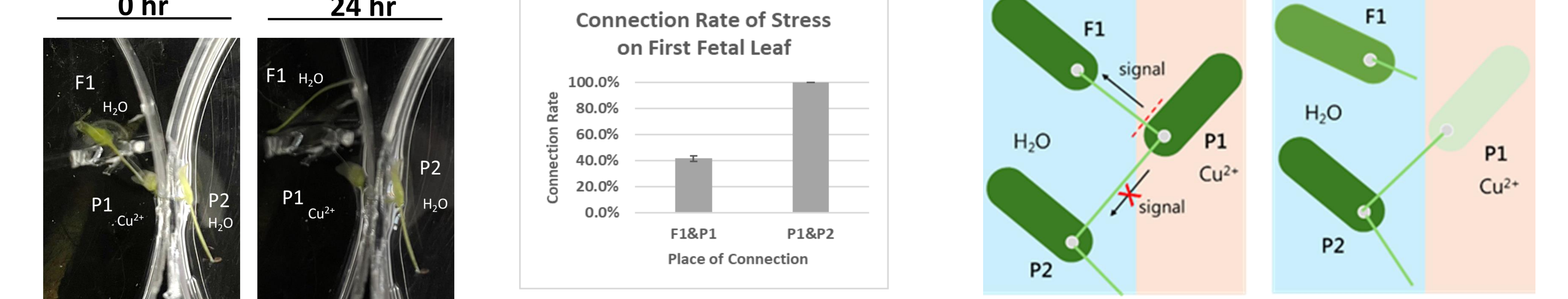
子葉、母葉單獨處理銅逆境斷裂情形



結果 母葉於逆境下會誘發斷裂，而子葉處理逆境時，沒有斷裂情形發生，且推測母葉會救助子葉。

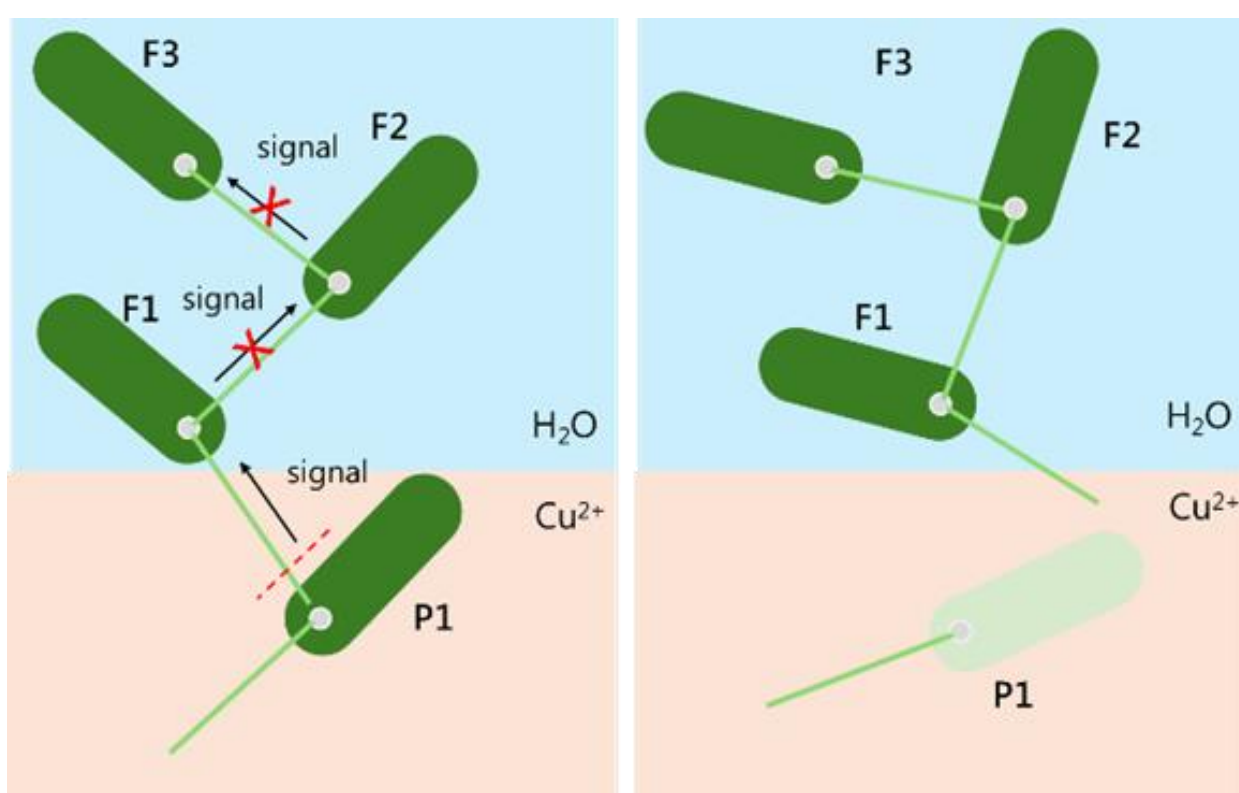
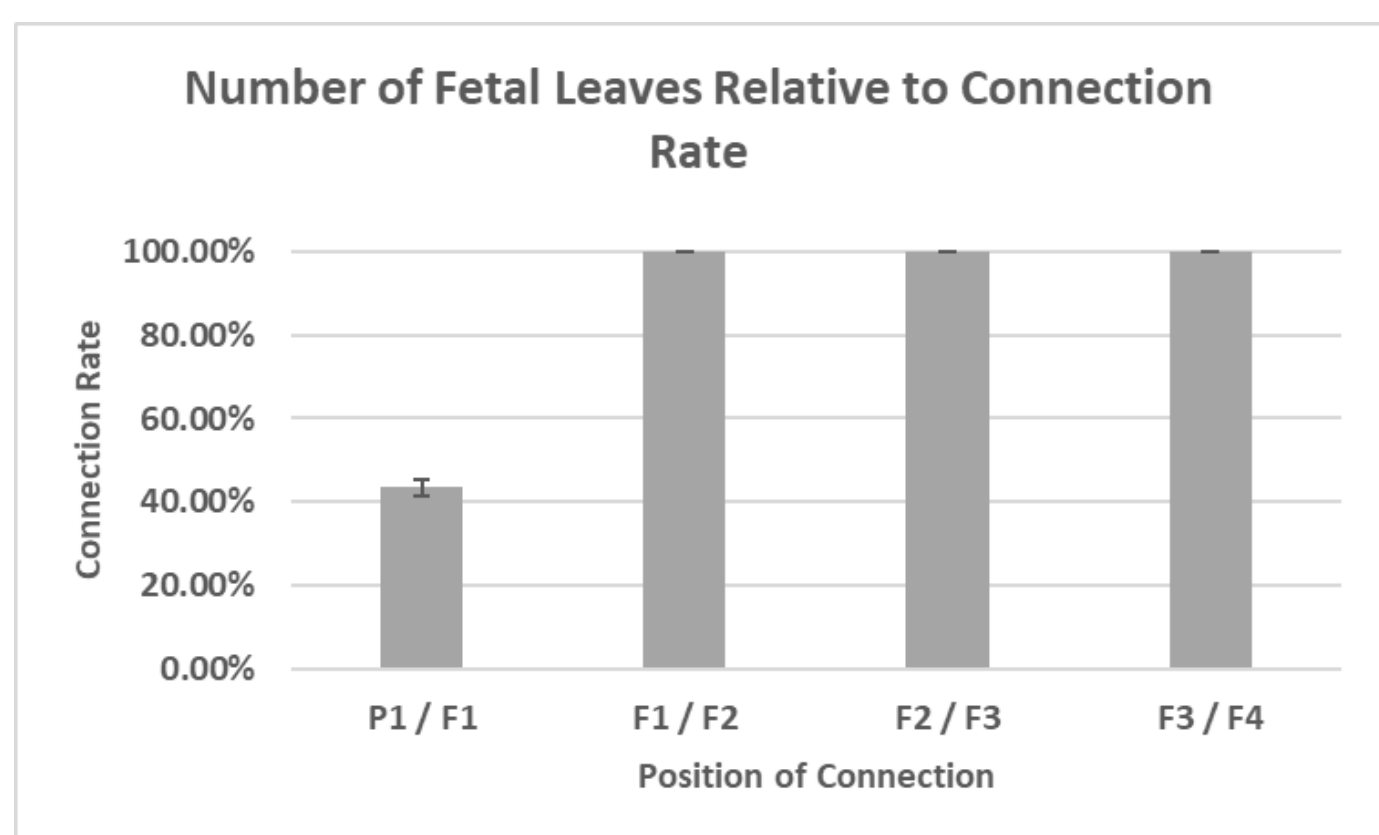
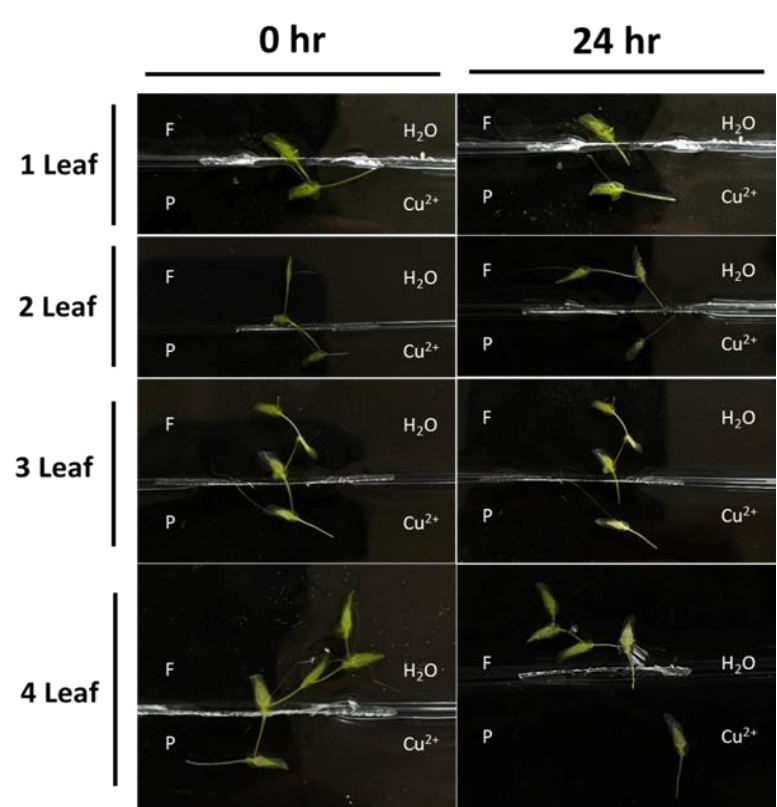
目的 探討品萍斷裂訊息的傳遞機制

中間銅逆境



參、研究結果

單片母葉連接多片子葉處理銅逆境



結果

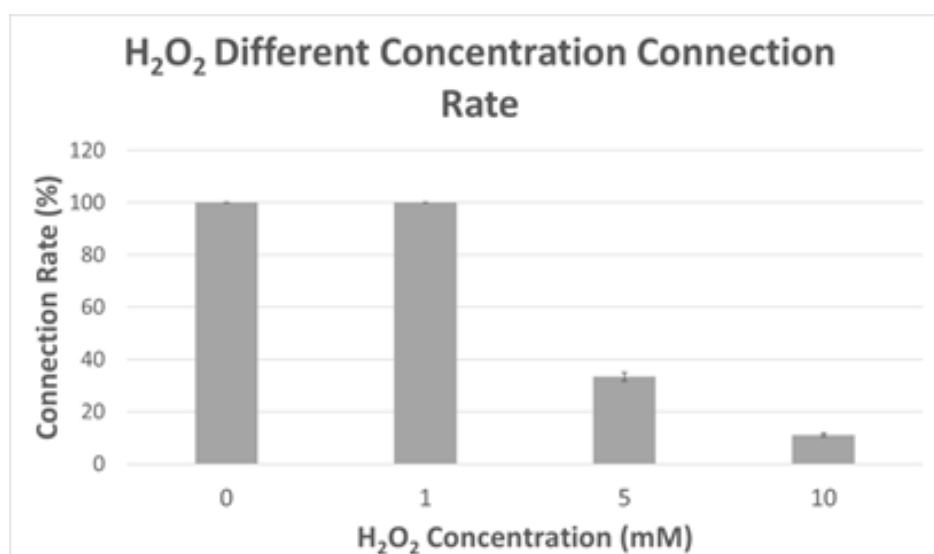
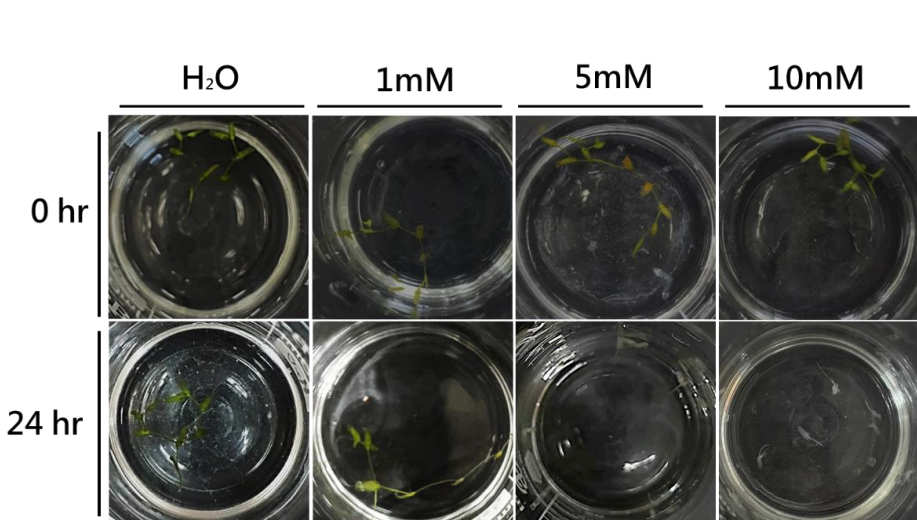
斷裂訊號不會回傳給上一片母葉，只會傳給第一片子葉，而不影響後續子葉

雙氧水作為品萍斷裂機制的傳訊分子

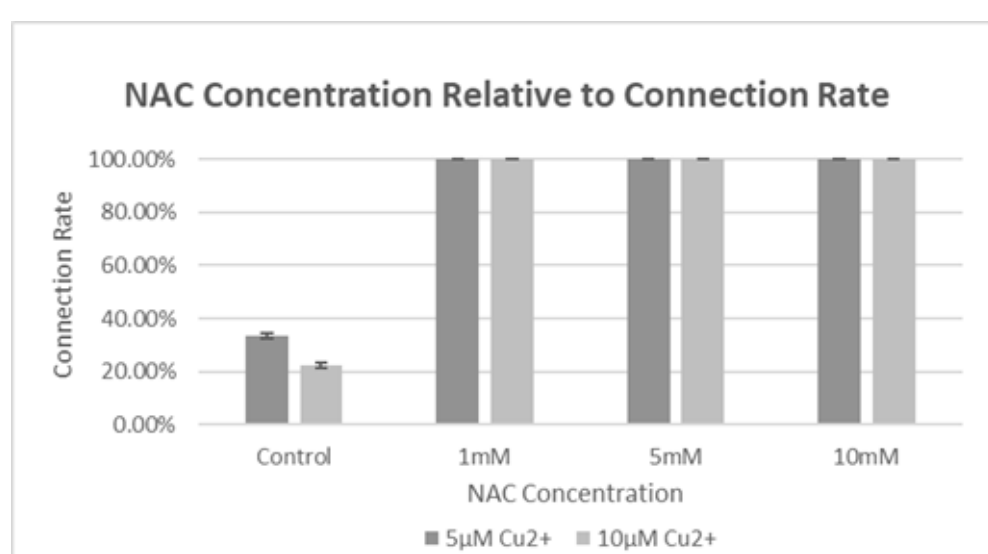
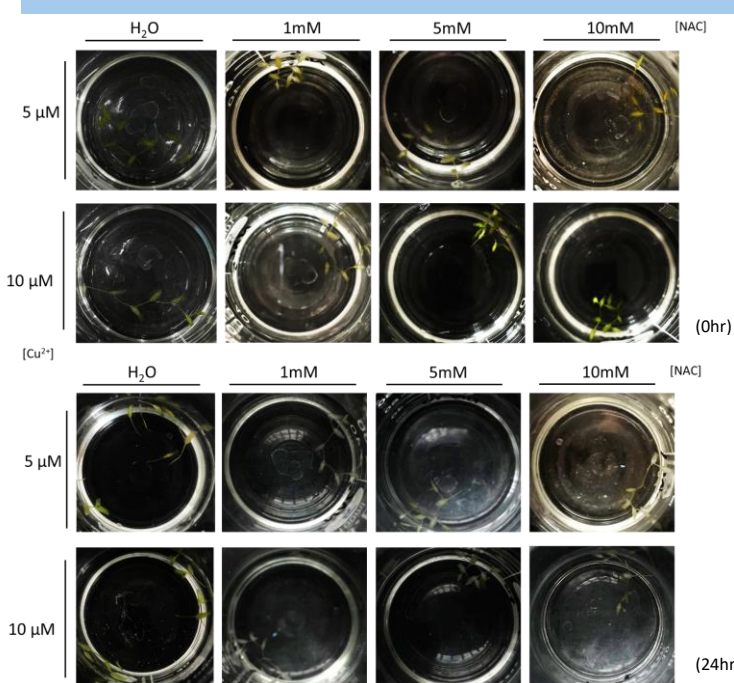
目的

探討品萍於H₂O₂逆境下的斷裂情形。

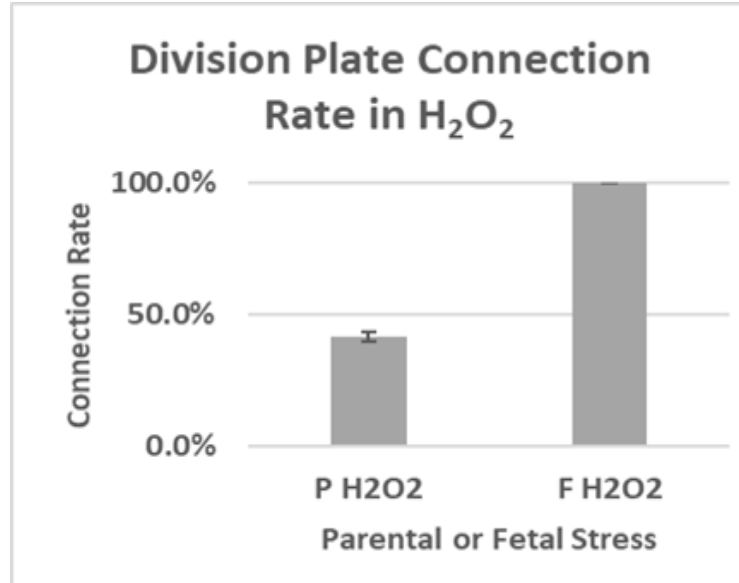
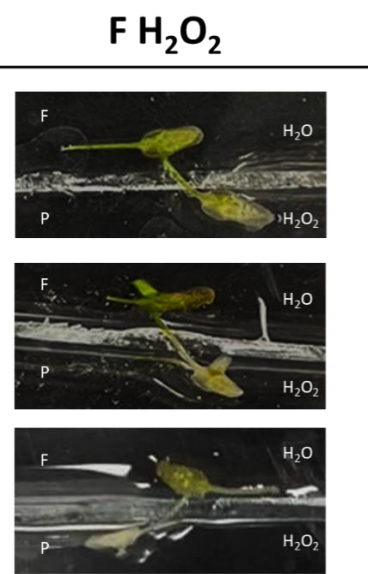
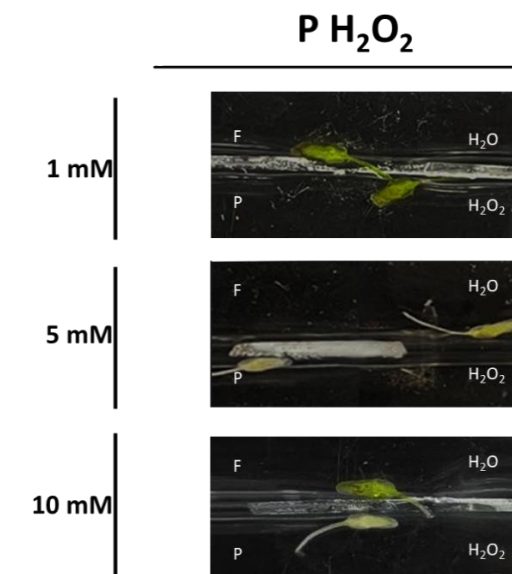
整株品萍處理H₂O₂



整株品萍處理Cu²⁺+NAC



子葉、母葉單獨處理H₂O₂



結果

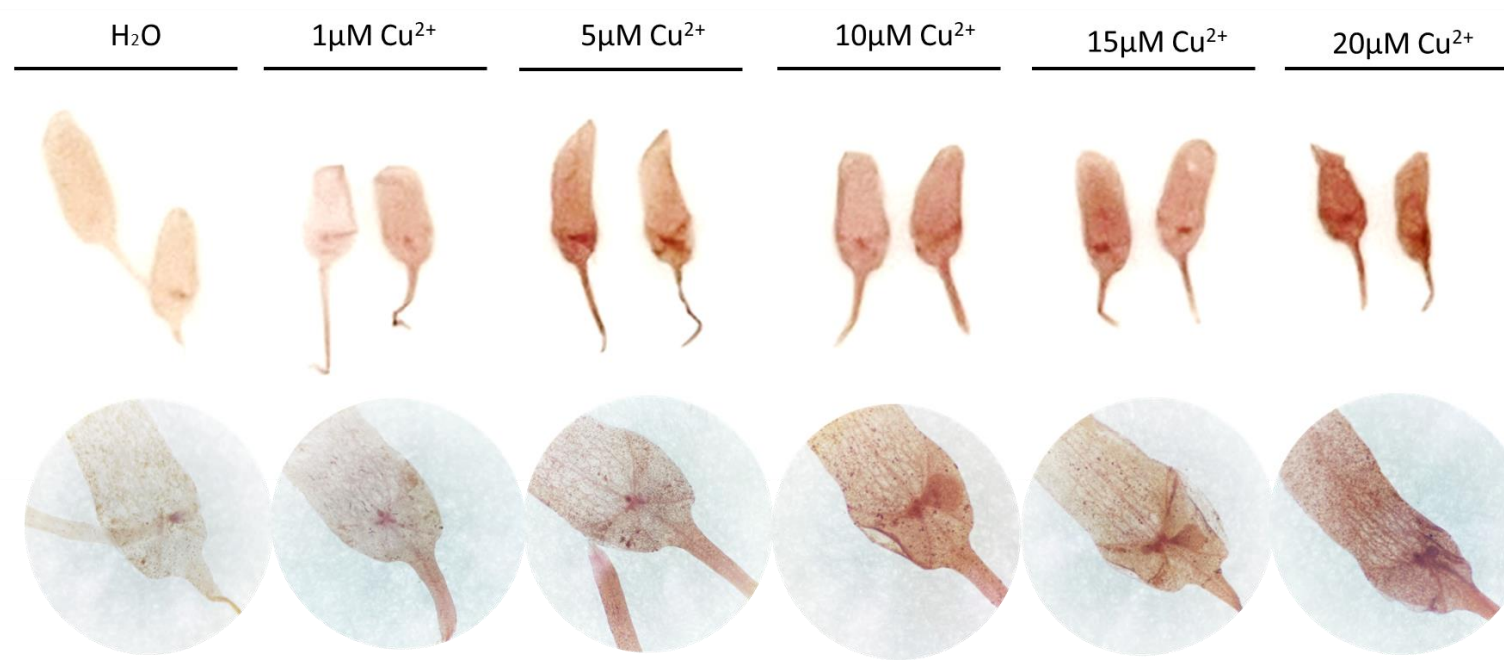
品萍於H₂O₂逆境下的斷裂結果與處理Cu²⁺時相似，應是品萍在感受Cu²⁺後，將使體內產生過氧化物質，誘發斷裂，且也會作為單邊銅逆境下選擇性斷裂的傳訊分子。

銅逆境下的過氧化物質影響斷裂機制

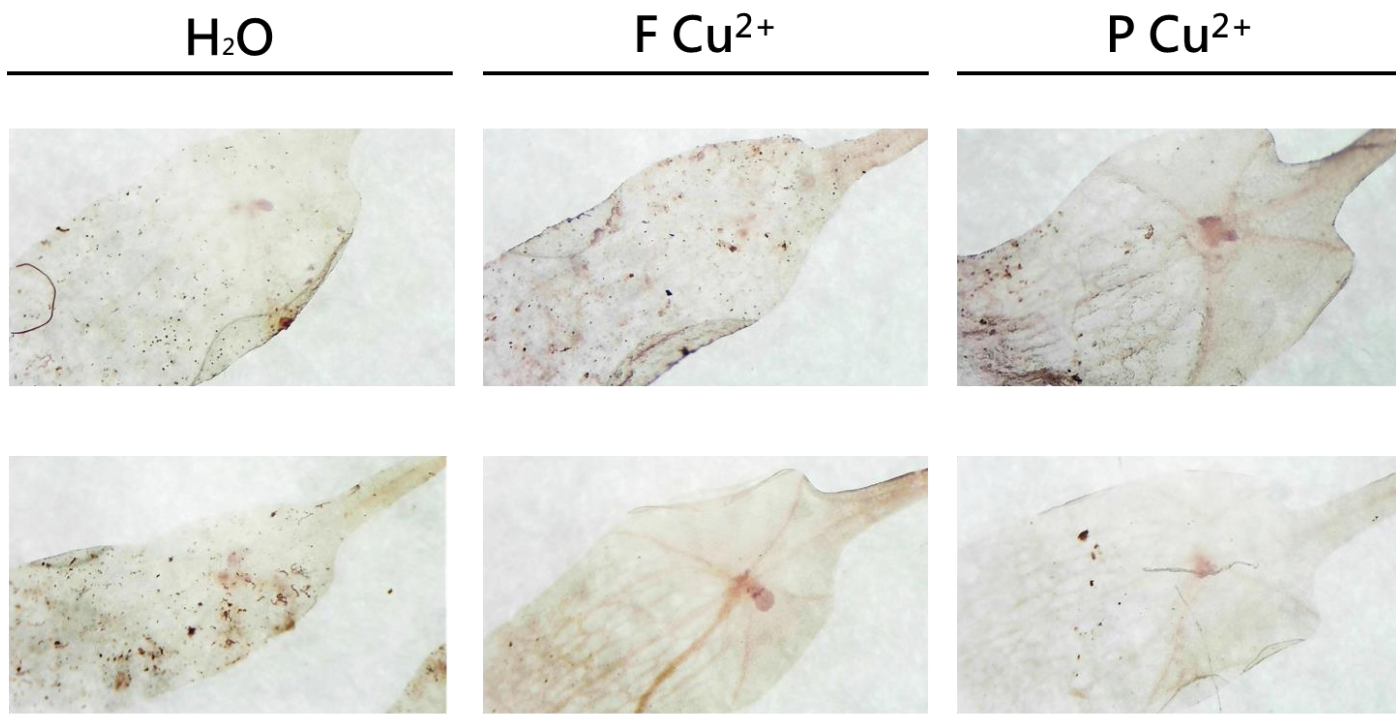
目的

探討品萍於銅逆境下的過氧化物質ROS如何影響斷裂機制。

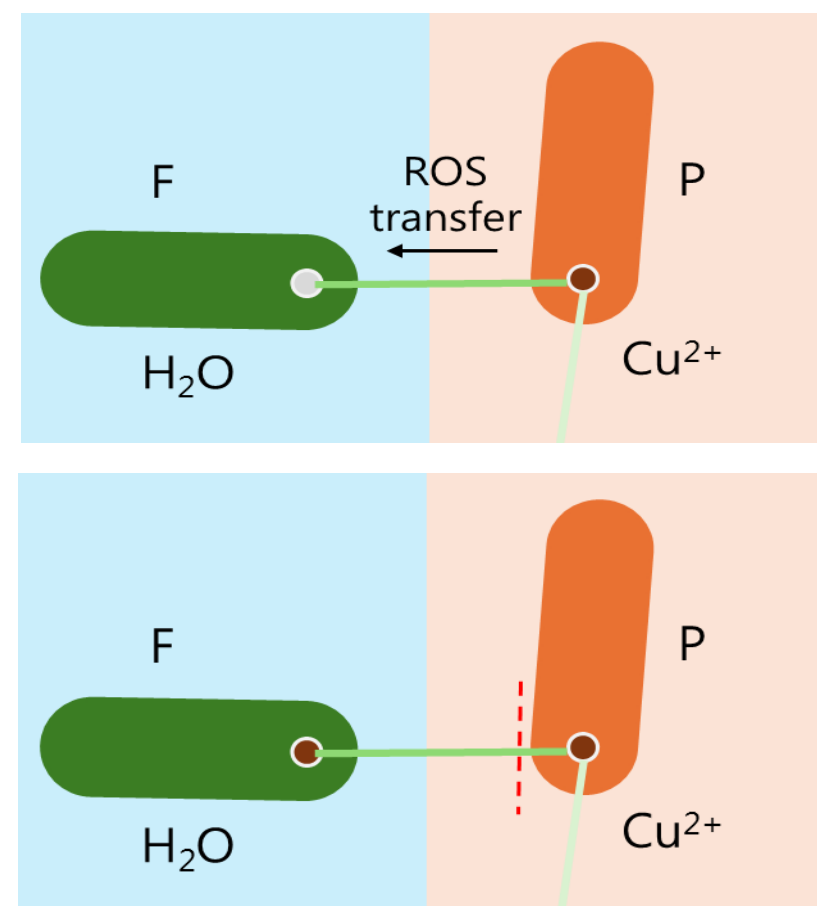
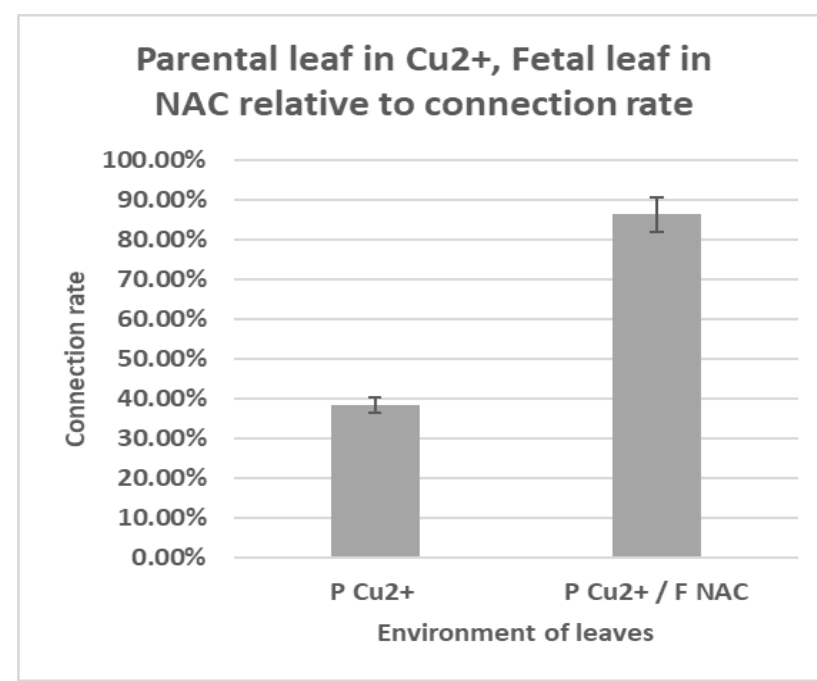
DAB染色銅逆境下的品萍



DAB染色單邊銅逆境下的品萍



母葉銅逆境下子葉NAC



結果

品萍於逆境下會累積ROS，子葉單獨處理銅逆境時，僅子葉節處累積ROS，不會將斷裂訊號回傳母葉；母葉單獨處理銅逆境時，母葉會將斷裂訊號回傳子葉，並子、母葉同時在節處累積ROS以誘發斷裂。

品萍處於單邊逆境下的運輸分配

目的

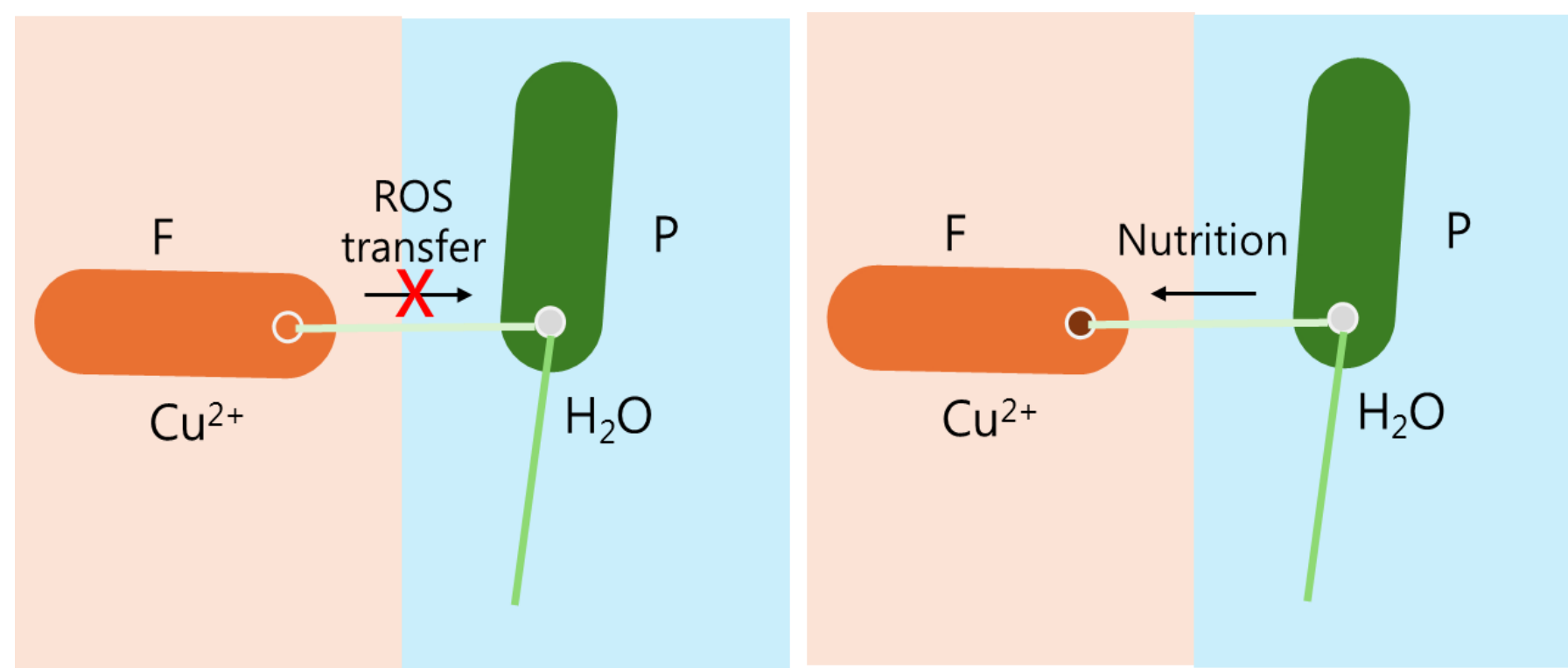
探討品萍單獨處理逆境下的運輸分配機制。

P Ink

F Cu²⁺

F H₂O₂

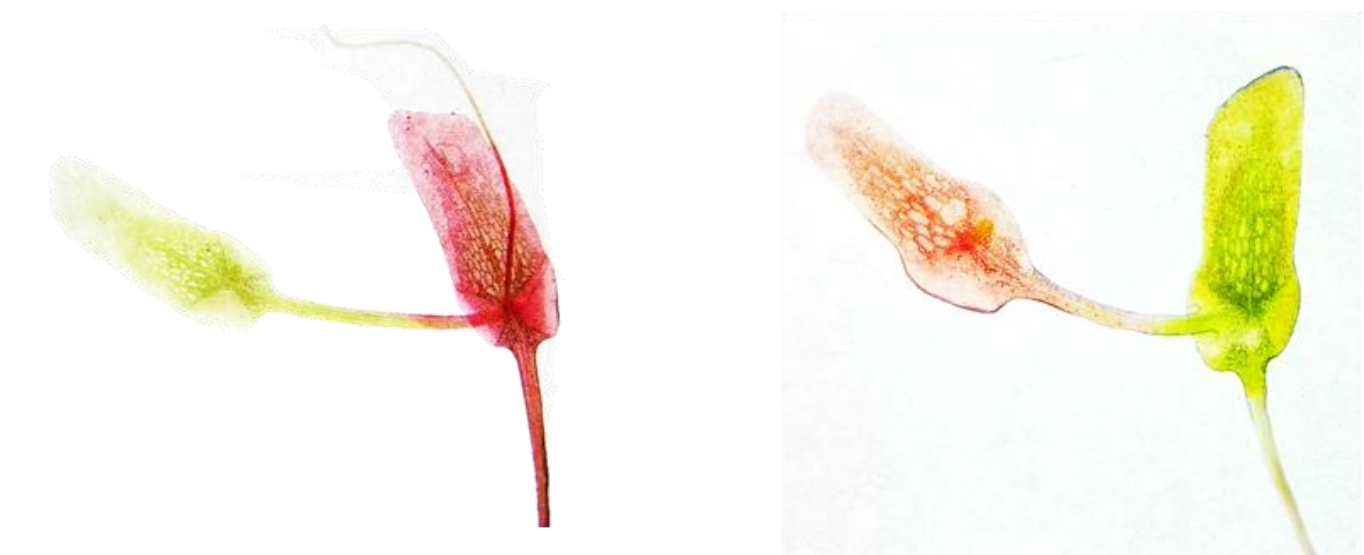
F Cu²⁺ + NAC



P Ink

F Ink

H₂O



結果

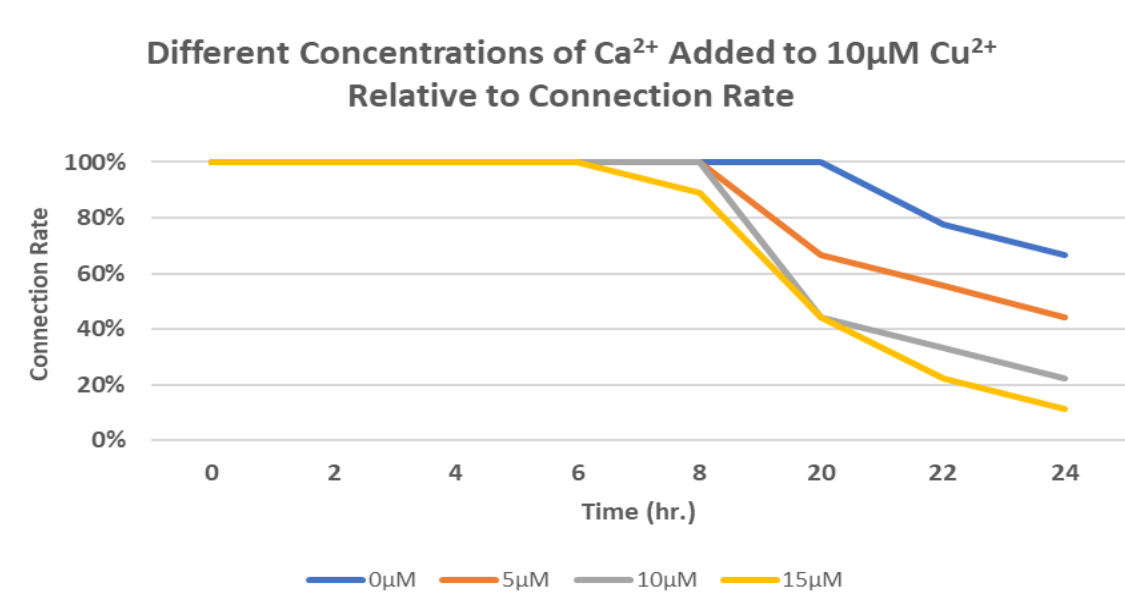
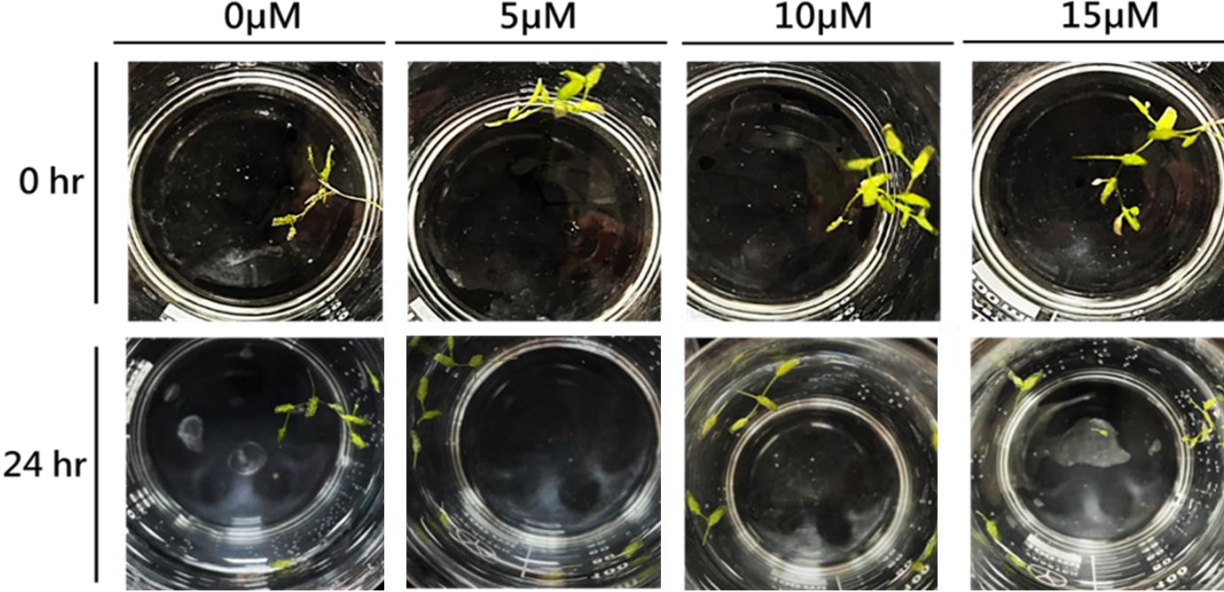
推測母葉於銅逆境下會產生ROS誘發斷裂，減少子葉受到逆境影響；若是子葉處理逆境時，母葉會幫助其應付逆境，即母葉提供養分救助子葉生長，若無逆境則無明顯物質運輸。

品萍於逆境下的傳訊機制

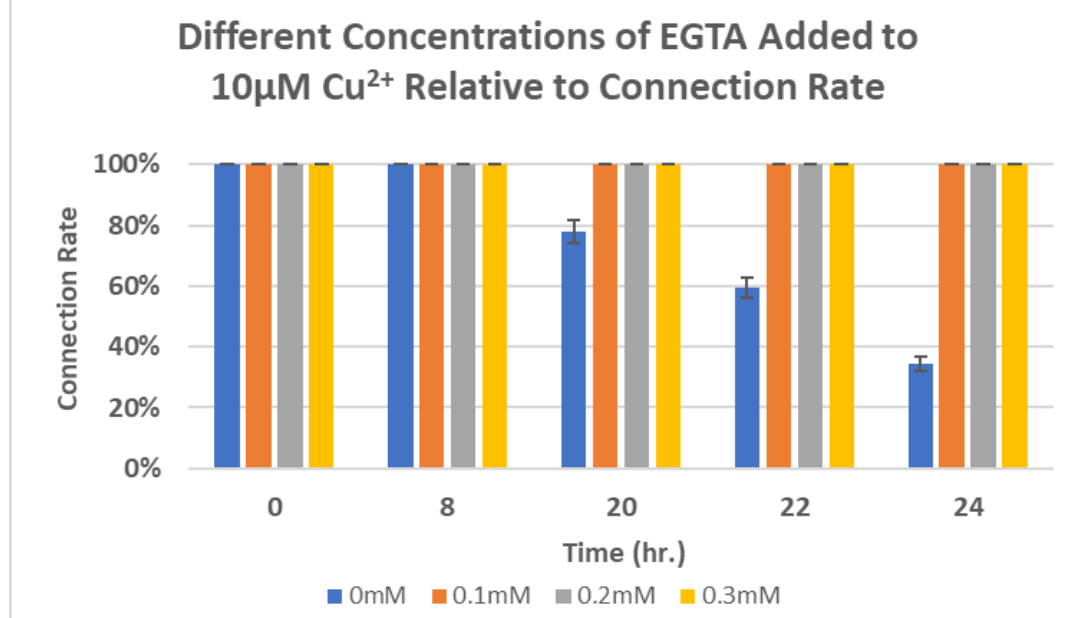
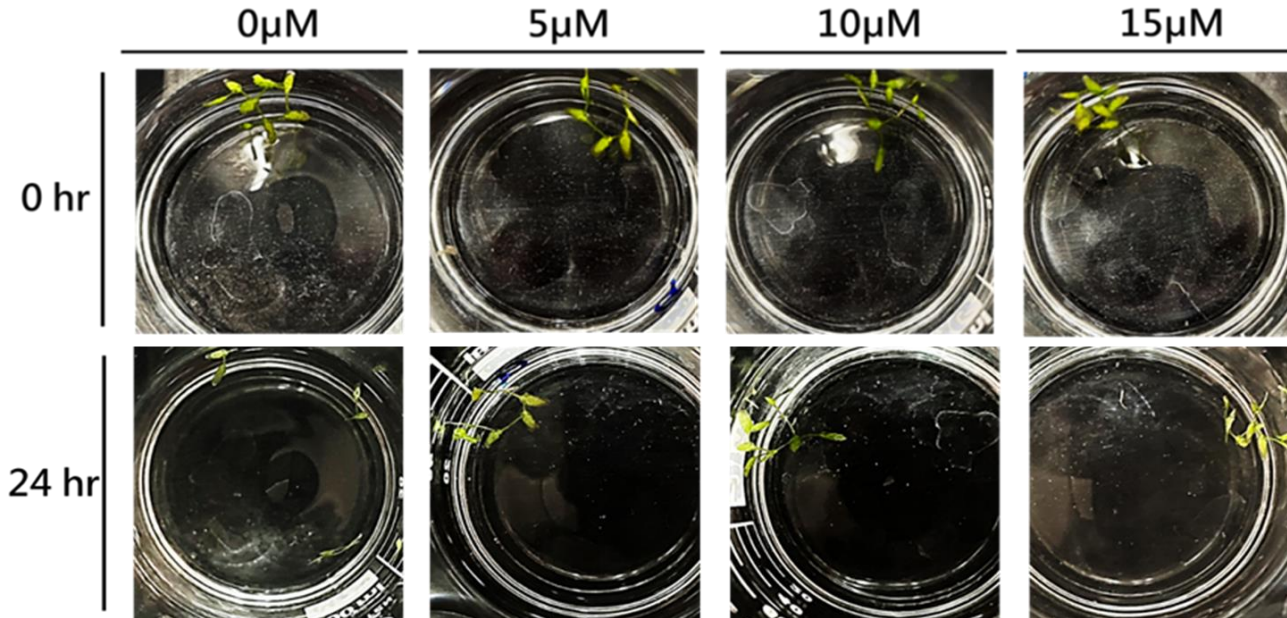
目的

探討品萍鈣離子是否做為逆境下的斷裂機制的傳訊分子。

銅逆境中加入鈣離子之斷裂情形



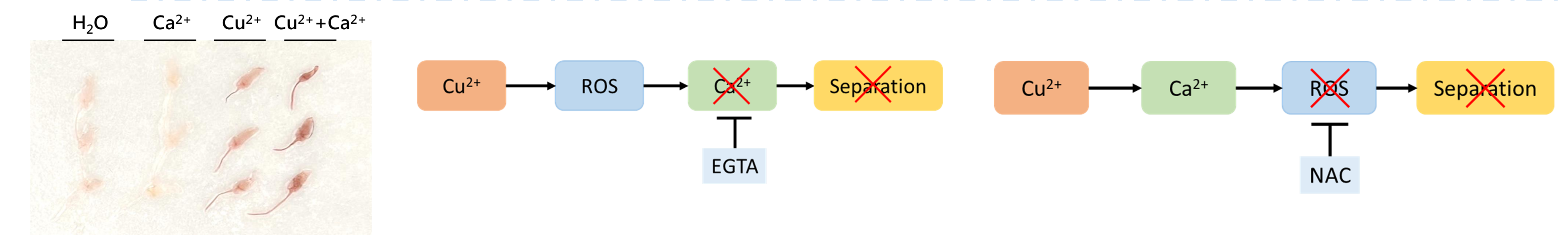
銅逆境中加入EGTA之斷裂情形



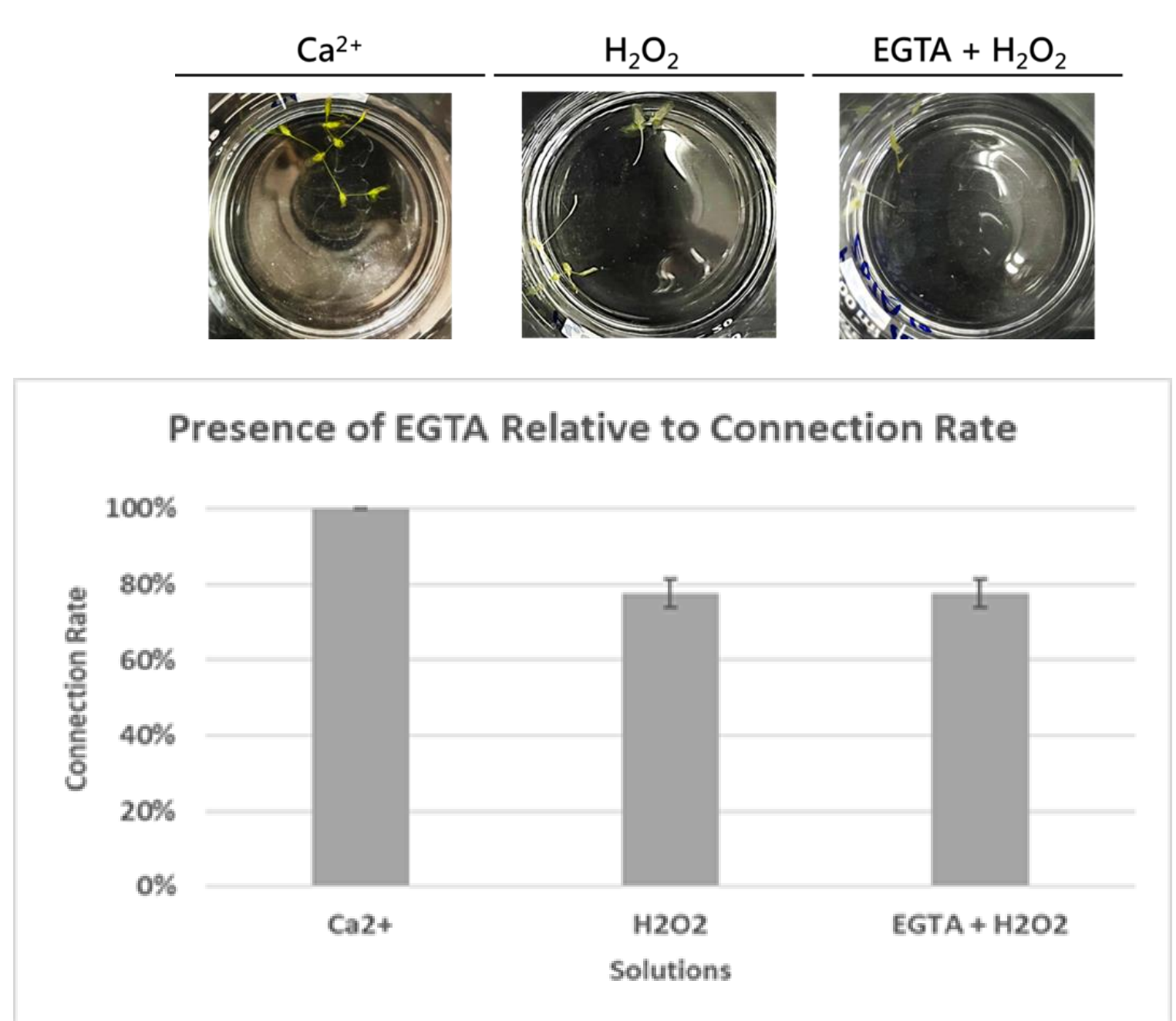
結果

鈣離子為銅逆境下誘發斷裂的必要傳訊分子，且有助於品萍的斷裂。

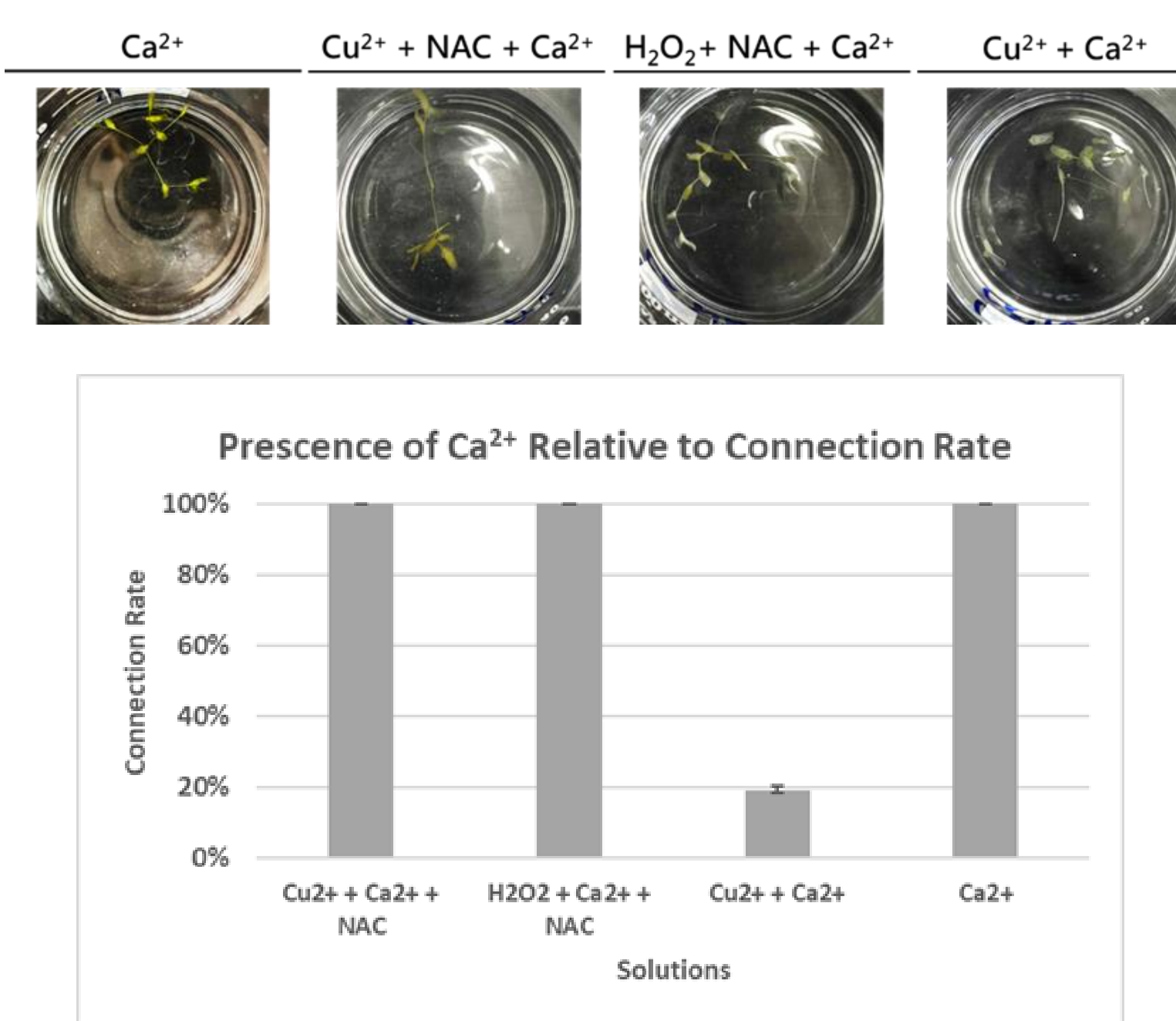
目的 探討品萍在銅逆境下雙氧水與鈣離子相互影響機制。



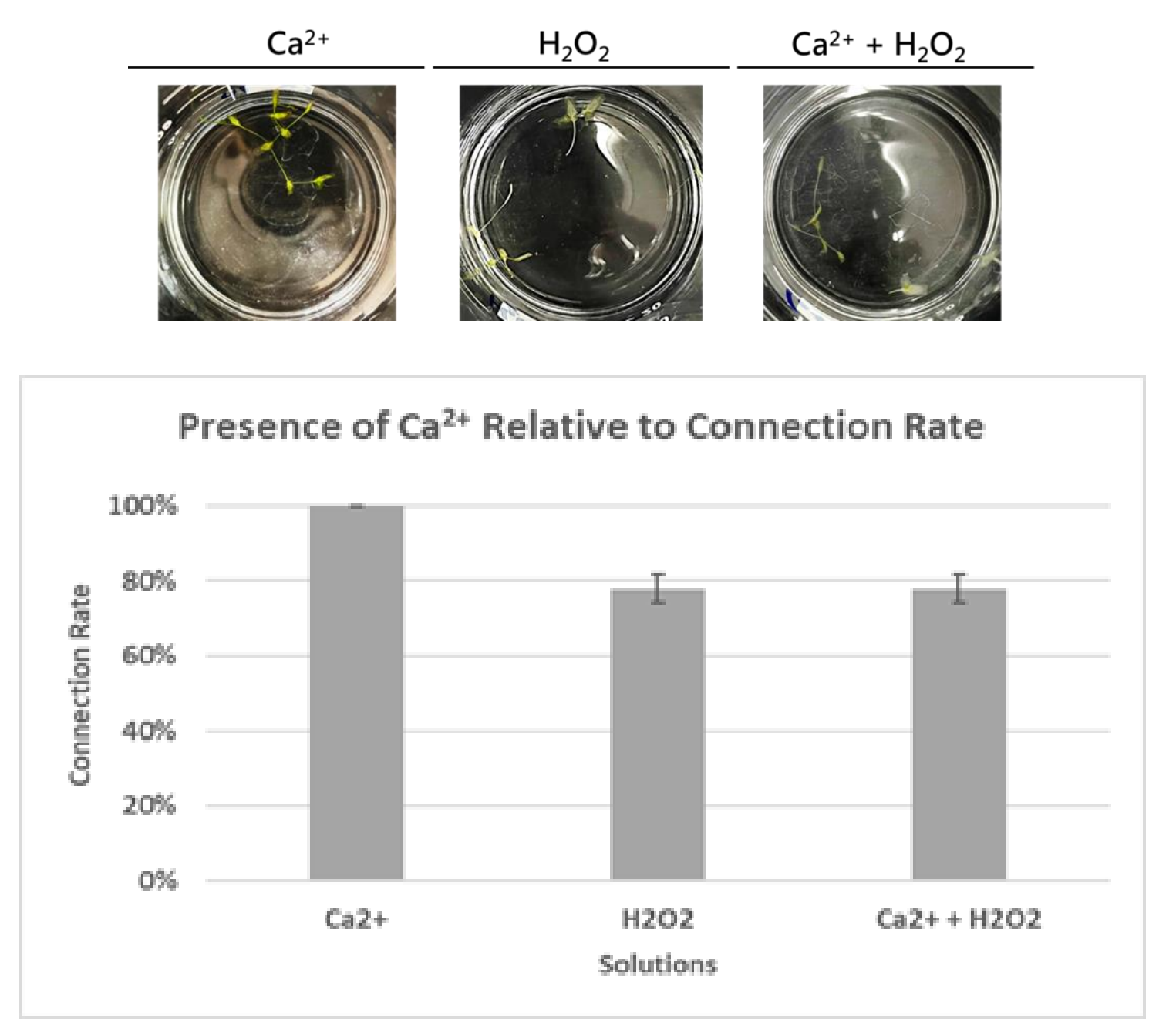
探討 Ca^{2+} 與 H_2O_2 之間互相影響之機制



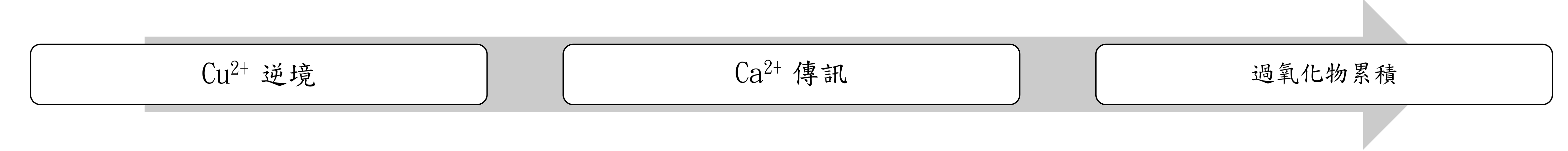
探討 Ca^{2+} 與 H_2O_2 之間互相影響之機制



探討 Ca^{2+} 與 H_2O_2 之間互相影響之機制

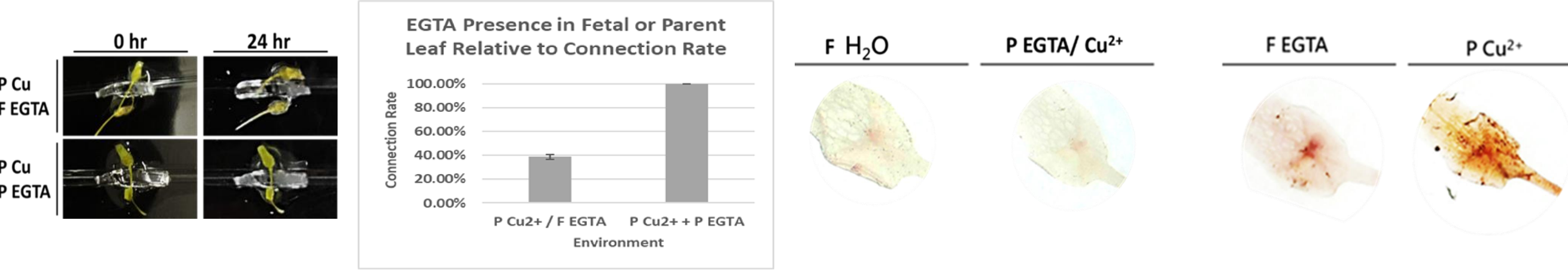


結果 品萍感受 Cu^{2+} 逆境，再以 Ca^{2+} 作為傳訊分子，將逆境的訊息傳送於植物體各處，最終產生過氧化物，來引發斷裂的結果，其中無回饋作用或鈣離子濃度已達閾值。



鈣離子在局部逆境下品萍內的傳訊

目的 探討 Ca^{2+} 是否能作為受傷組織內的訊息傳導或遠端溝通的訊息分子。

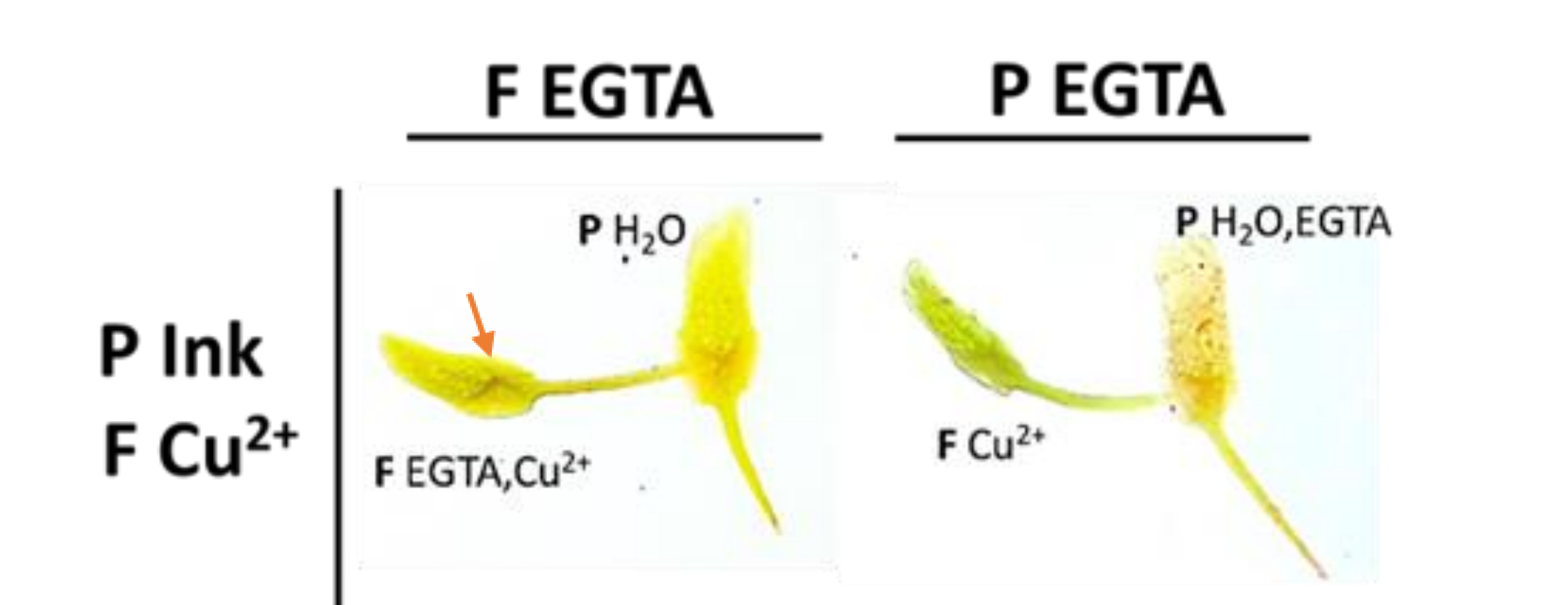


結果 Ca^{2+} 必須參與受傷母葉內部的訊息傳遞才可誘發斷裂，並推測與ROS相互作用後產生ROS波來產生受傷組織向遠端傳遞斷裂訊號，促使子葉節處累積ROS。

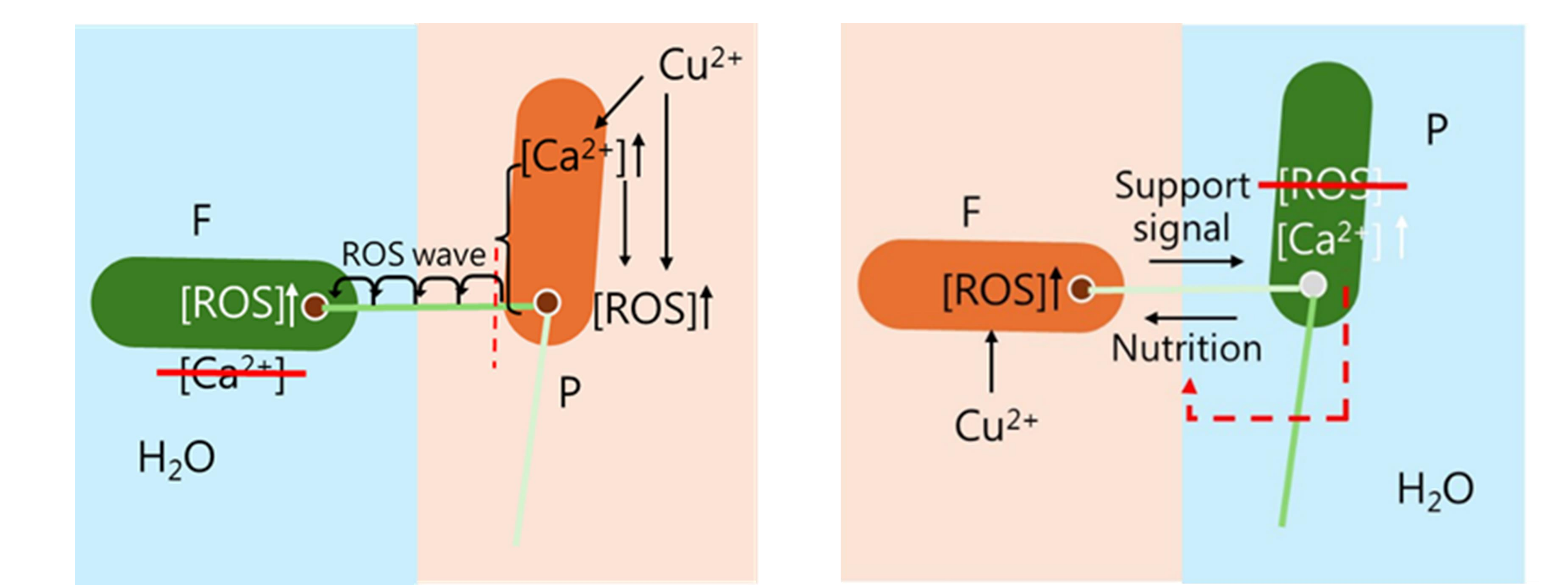
鈣離子參與局部逆境下品萍內物質分配的機制

目的 探討 Ca^{2+} 是否能調控運輸分配機制。

結果 子葉處於逆境下時，子葉內部會累積ROS，送出求救訊號使母葉內部產生 Ca^{2+} 訊息傳導，最終導致母葉向子葉傳送物質，救助子葉。



肆、結論與討論



伍、參考資料與其他

1. 周柏仰、林子翔、洪瑋廷當機立「斷」——浮萍自裂脫險的機制與生態意義·臺南市：臺南市私立德光高級中學

2. Lubovska, Z., Dobra, J., Storchova, H., Wilhelmova, N., and Vankova, R. (2014). Cytokinin Oxidase/dehydrogenase Overexpression Modifies Antioxidant Defense against Heat, Drought and Their Combination in *Nicotiana Tabacum* Plants. *J. Plant Physiol.* 171, 1625–1633. doi:10.1016/j.jplph.2014.06.021

3. Sławomir Samardakiewicz, Weronika Krzeszowiec-Jeleń, Waldemar Bednarski, Artur Jankowski, 4Szymon Suski, Halina Gabryś, and Adam Woźny. (2015) Pb-Induced Avoidance-Like Chloroplast Movements in Fronds of *Lemna trisulca* L

4. Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu, and Yuichi Tada. Plant signaling networks involving Ca^{2+} and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front Plant Sci.* 2015; 6: 427.