

# 中華民國第42屆中小學科學展覽會

::: 作品說明書 :::

## 高中-生物科

科 別：生 物 科

組 別：高 中 組

作品名稱：菟絲子寄生南美蟛蜞菊對莖部組織及組織內過氧化酵素、  
木質部變化之研究

關 鍵 詞：菟絲子 (Cuscuta australis R . Br . )、  
南美蟛蜞菊 (Wedelia trilobata (L . ) Hitchc )、  
過氧化酵素、逆境

編 號：040706

---

**學校名稱：**

高雄市立高雄高級中學

**作者姓名：**

楊慶升、張永欣、李翊豪、劉玠璘

**指導老師：**

吳敏昌、曾熾霖



## 一、摘要

本實驗為觀察菟絲子( *Cuscuta australis* R. Br. )寄生南美蟛蜞菊( *Wedelia trilobata* ( L. ) Hitchc. ) 所引發之變化。實驗經由形態的觀察、蛋白質濃度的測定、過氧化酵素活性的測定、木質素含量的測定，來研究菟絲子寄生對南美蟛蜞菊的影響。由實驗結果中得知：( 1 ) 菟絲子的吸器深入南美蟛蜞菊的韌皮部中以吸取養分。( 2 ) 被菟絲子寄生的植株（實驗組）其蛋白質含量較未被寄生者（對照組）為低。( 3 ) 被菟絲子寄生的植株其過氧化酵素活性較對照組為高，且過氧化酵素的種類明顯增加。( 4 ) 被菟絲子寄生的植株其木質素含量較對照組為高。

綜合以上的結果，菟絲子寄生之生物逆境，會造成寄主蛋白質含量下降、木質素含量及過氧化酵素的活性上升。

## 二、研究動機

最近幾年來，常見到高雄市區的安全島上所種植的南美蟛蜞菊被菟絲子寄生，而此種現象引起了我們的注意。後來我們在一些植物逆境的研究資料中得知，植物在逆境中會產生許多生理反應，例如在缺水的逆境下植物體內的離層酸的含量會明顯改變；而逆境有分很多種：如缺水、重金屬污染、溫度過高或過低、生物病原的感染、物理性傷害……等逆境（廖、徐，1999）。這些現象引發了我們的聯想，我們覺得菟絲子的寄生性行為，可能亦是一種生物逆境。在高中基礎生物課本中討論到了寄生植物，於是我們便對南美蟛蜞菊被菟絲子寄生所產生的變化產生極大的興趣，因而決定觀測寄生植物對寄主所造成之變化。

## 三、研究目的

從我們所閱讀的報告中，得知當植物處於逆境時，其組織內木質素及過氧化酵素的含量會有變化，且植物的形態可能會改變。故我們觀察南美蟛蜞菊在遭受此種生物逆境後，其內部發生的變化。我們將觀察：（1）南美蟛蜞菊莖組織的構造變化。（2）莖的組織內蛋白質含量、過氧化酵素活性及木質素含量變化情形。

## 四、研究設備器材

### (一) 切片製作與形態觀察

解剖顯微鏡、複式顯微鏡、單面刀片、載玻片、蓋玻片、解剖針、酒精 ( 50 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、 95 % 、 99.5 % ) 、 Safranin 、 Fast green、燒杯、量筒、培養皿、單眼相機 ( Nikon )

### (二) 過氧化酵素活性與蛋白質總量測量及等電點膠體電泳

液態氮、液態氮桶、鋁箔紙、研鉢、研鉢棒、分光光度計、磷酸鹽緩衝液 ( pH 7.0 ) 離心機、電子天平、蛋白質染劑、過氧化酵素活性染劑 ( 195ul 3,3-DGA , 5ul guaiacol , 25ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) 通風櫥、電泳槽、磷酸緩衝液 ( pH 6.0 )、過氧化酵素活性染劑 ( 0.6mg/ml 4-chloro-naphtol 及 0.16 % 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )

### (三) 木質素含量測定

12N HCl、 2N HCl、 thioglycolic acid、 0.5N NaOH、 震盪培養箱、加熱器、分光光度計。

## 五、材料與方法

### (一) 材料

選取高雄市四維路與文橫路交叉口安全島約 35 平方公尺區域作為採樣

區，採取被菟絲子寄生與未被菟絲子寄生之南美蟛蜞菊植株。經比對鑑定後，本次實驗所採用的樣本植株為「南美蟛蜞菊」(*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc)，又稱「三裂葉蟛蜞菊」，常栽植於道路旁或邊坡及用以覆蓋安全島。台灣常見的菟絲子種類有菟絲子、中國菟絲子、台灣菟絲子，而本實驗所採集的樣本則為「菟絲子」(*Cuscuta australis* R. Br.)。

## (二) 方法

### 1.形態觀察

- (1.) 利用解剖顯微鏡觀察菟絲子吸附蟛蜞菊之外部形態。
- (2.) 利用徒手切片方法製作南美蟛蜞菊之莖部切片，分為實驗組(菟絲子吸附入侵的組織)與對照組(未被菟絲子吸附入侵的組織)，以 Safranin 及 Fast green 染色，並以複式顯微鏡觀察。

### 2.化學的測定

- (1) 樣本的取得：於四維路與文橫路交叉口樣區，隨機選取三十株被菟絲子攀附的南美蟛蜞菊植株，統一取其由頂端往下算約三公分的莖段，小心地除去菟絲子，用鋁箔紙包裹，放入液態氮筒中冰凍，做為實驗組；再隨機選取三十株未被菟絲子攀附植株之相同部位與長度，做為對照組。

## (2) 樣本處理

- A. 取 3 個莖段為一組，每組重約一克，共分十組。放入研鉢中，加入液態氮並加以磨碎至其成粉末狀，蓋上鋁箔紙，待其回溫。
- B. 回溫後加入緩衝液，置入離心管中，以 13000 rpm 離心二十分鐘，再取其上層澄清液，此即蛋白質萃取液。

## (3) 測定南美蟛蜞菊莖內之蛋白質濃度

- A. 取 60  $\mu$ l 之蛋白質萃取液稀釋成原濃度之 1/100。
- B. 取稀釋液 160  $\mu$ l 和蛋白質染劑 40  $\mu$ l 混合。
- C. 放入分光光度計中，在波長 595nm 時測定其吸光值，與蛋白質標準曲線比對得到蛋白質濃度，每組均做二重複，得其濃度之數據。

## (4) 測定南美蟛蜞菊莖內之過氧化酵素活性

- A. 取 25 $\mu$ l 蛋白質萃取液，稀釋成原濃度之 1/100。
- B. 取稀釋液 25 $\mu$ l 和過氧化酵素活性染劑 ( 195 $\mu$ l 3,3-DGA , 5 $\mu$ l guaiacol , 25 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) 混合 ( 此過程於通風櫥中進行 )。
- C. 放入分光光度計中，在波長 490nm 時，測定其吸光值，與標準曲線比對得到過氧化酵素活性，每組均做二重複，得其過氧化

酵素活性之數據。

(5) 等電點聚膠電泳

- A. 根據先前所測得各組蛋白質總含量，於各組中取得等量蛋白質於膠片上。
- B. 在 pH 3.5 到 pH 9.5 的範圍間，以 10 、 30 W 電泳 90 分鐘。
- C. 將膠片浸泡於 500 mL 的磷酸緩衝溶液 ( pH 6.0 ) 中，震盪 30 分鐘。
- D. 將膠片浸泡於含有 0.6mg / mL 4-chloro-naphtol 及 0.16% 的  $H_2O_2$  的磷酸緩衝溶液 200mL 中 10 分鐘。
- E. 取出後紀錄其結果。

(6) 南美蟾蜍菊莖之木質素的測定

- A. 取 3 個莖段為一組，每組重約一克，分實驗組、對照組各 3 組，磨碎加入 6ml ( 99.5% ) EtOH。
- B. 將其以 10000g，離心 15 分鐘。
- C. 將沉澱物移至培養皿，放到通風櫥風乾 ( 24hr )。
- D. 取 0.02g 乾渣放至螺旋蓋試管中，加 5ml 之 2N HCl 和 0.5ml thioglycolic acid。
- E. 在 100 下加熱 4 小時。

- F. 待冷卻後將其在 4 °C 下，以 13000 rpm 離心 30 分鐘。
- G. 取沉澱物，以 2.5ml 蒸餾水洗，再加入 5ml 之 0.5N NaOH 。
- H. 將溶液緩慢地振動 24 小時 25 °C 。
- I. 將溶液以 13000rpm，離心 30 分鐘。
- J. 取上清液，加入 1ml 12N 濃 HCl。
- K. 放置於 4 °C 下 6 小時。
- L. 再將其於 13000 rpm 下，離心 30 分鐘。
- M. 將沉澱物溶在 1ml 的 0.5N NaOH，在波長 280 nm 下測其吸光  
值。
- N. 比對標準曲線以求出組織中的木質素的濃度。

## 六、結果

### (一) 南美蟛蜞菊被菟絲子吸附入侵後形態及組織內木質素含量變化

菟絲子的莖蔓生，並有重寄生的現象及自我寄生的現象（廖等，1991）。在攀附侵入寄主之菟絲子的莖處，內側與南美蟛蜞菊接觸的部位，會產生許多小突起並轉變膨大為吸器，吸器會突破南美蟛蜞菊之細胞壁而進入內部。但南美蟛蜞菊外觀並未有顯著改變，於顯微鏡下觀察切片標本，可明顯見到南美蟛蜞菊的皮層，被菟絲子的吸器穿入至韌皮部（圖二），以利菟絲子吸取寄主之養分。在（圖三 A）中，可見到被菟絲子侵入的南美蟛蜞菊之組織，經 Safranin 及 Fast green 染色後，其

皮層及維管束顏色呈紫紅色，而未被寄生的組織其皮層及維管束均未出現明顯紫紅色(圖三 B)。可得知被寄生的組織其細胞壁較未被寄生的組織明顯有增厚的現象。此外，被寄生之組織內的木質素含量較未被寄生的組織多。經由木質素含量測定，亦顯示實驗組的木質素含量較對照組為高(圖四)。

## (二) 菟絲子對南美蟛蜞菊組織內蛋白質含量的影響

經由吸光度的測定，比對蛋白質標準曲線，得到實驗組與對照組之蛋白質含量。結果發現被菟絲子寄生之實驗組組織內蛋白質含量較少(圖五)。

## (三) 菟絲子對南美蟛蜞菊組織內過氧化酵素的影響

經由吸光度的測定，比對過氧化酵素標準曲線，得到實驗組與對照組之過氧化酵素活性(如圖六)。實驗組的蛋白質平均含量減少但過氧化酵素活性平均量則增加，相對於對照組，實驗組之過氧化酵素比活性較高。

另外，經由等電點聚膠電泳過程，可將過氧化酵素更精確地分離。將膠片以過氧化酵素活性染色處理，根據所得結果，比較對照組與實驗組之差異，發現膠上至少呈現六種不同等電點之過氧化酵素(pI 3.5、pI 3.9、pI 4.4、pI 4.7、pI 8.9、pI 9.1)，其中實驗組比對照組多了

至少五種過氧化酵素 (pI 3.5、pI 3.9、pI 4.7、pI 8.9、pI 9.1)，且有一種過氧化酵素 (pI 4.4) 表現加強，與過氧化酵素比活性在實驗組增加相關 (圖七)。

## 七、討論

由蛋白質濃度測定的實驗中，我們得知實驗組 (有被菟絲子攀附入侵之南美蟛蜞菊組織) 的蛋白質總量比對照組 (沒被菟絲子攀附入侵之南美蟛蜞菊組織) 的總量低，但實驗組之過氧化酵素的比活性卻比對照組之過氧化酵素的比活性高。造成蛋白質總量下降的原因，可能是為了增加過氧化酵素之合成，而使得南美蟛蜞菊本身減少某些蛋白質之製造，才造成實驗組之蛋白質總量低於對照組，且實驗組過氧化酵素所占的比例高於對照組。另外，在電泳的實驗結果中，比較實驗組與對照組，可以看出實驗組比對照組增加了在 pI 3.5、pI 3.9、pI 4.7、pI 8.9、pI 9.1 之過氧化同功酵素，且 pI 4.4 過氧化酵素含量亦因受菟絲子寄生增加許多，所以除了過氧化酵素含量上升外，種類也有增加的現象。過氧化酵素被認為與植物遭受逆境時產生抵抗的過程有密切相關，南美蟛蜞菊因菟絲子寄生所產生的生物逆境，誘發過氧化酵素來適應生存。過氧化酵素被公認為合成木質素之代謝過程中重要之催化劑。

觀察南美蟛蜞菊莖部之組織切片，實驗組被入侵的組織木質化現象明顯，經測定其木質素含量後，亦發現實驗組之木質素含量確實比對照組高。木質素

含量上升使組織木質化可能是南美蟛蜞菊對抗此逆境的方式：南美蟛蜞菊受到菟絲子侵入，因而引發組織木質化使其細胞壁增厚以抵抗菟絲子入侵。文獻亦指出，過氧化酵素與吡吡乙酸（一種植物生長之激素）的分解作用、抗病、防蟲及木質化作用有關（趙，1998）。本實驗所得的結果中，實驗組所增加的過氧化酵素，可能有部分種類與木質素合成的增加有關。

本實驗所採用的樣本，來自於非實驗室內的樣本區（四維路之安全島上），所以我們無法明確控制菟絲子寄生於南美蟛蜞菊的時間，本實驗採用大量的樣本以減少此變因對實驗結果所造成的影響。採樣時用剪刀剪取南美蟛蜞菊可能會造成另一種物理傷害，故必須立即將樣本放入液態氮中低溫保存，避免影響過氧化酵素活性。

## 八、結論

根據以上的結果，得知菟絲子入侵南美蟛蜞菊會造成其組織內蛋白質含量下降、過氧化酵素活性上升、木質素含量上升，此外依等電點聚膠電泳之結果進一步得知，有些原本沒有的過氧化酵素同功酵素被寄生作用所誘發產生。推測其可能是因為南美蟛蜞菊停止製造某些蛋白質，轉而製造過氧化酵素，並造成木質素更多的合成。由形態觀察發現菟絲子之吸器入侵至南美蟛蜞菊之韌皮部，並造成組織細胞木質化。

## 九、參考文獻

1. 呂勝由、楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖 (2001), 台灣維管束植物簡誌第四卷, 行政院農業委員會。
2. 郭長生 (1997), 台灣產菟絲子生殖器官及發育之超微構造。行政院國家科學委員會研報告: 52。
3. 葉修珍 (1994), 台灣產旋花科植物之核型分析。國立中興大學植物學系碩士論文。
4. 趙義蘭 (1998), IBA 大豆下胚軸不定根幼發過程中組織內 IAA 及過氧化酵素之影響。國立中山大學生物科學系碩士論文。
5. 劉清水 (1999), 菟絲子溶菌 活性與寄生能力的研究。中學教育學報, 第六期: 269 - 285。
6. 廖玉琬、徐善德編 (1999), 植物生理學, 啟英文化事業有限公司, 台北市: 540 - 568
7. 廖國瑛 (1989), 台灣產菟絲子屬與無根藤屬植物寄生現象之研究。國立中興大學植物學研究所碩士論文。
8. 廖國瑛、蔡進來、陳明儀 (1991), 台灣產菟絲子屬與無根藤屬植物之自我寄生與重寄生現象。台灣省立博物館年刊, 第三十三卷: 111 - 119。
9. 廖國瑛、蔡進來、陳明儀 (1992), 台灣產菟絲子屬植物之研究。台灣省立博物館年刊, 第三十四卷: 103 - 117。

10. 蔡淑華 ( 1992 ), 植物組織切片技術綱要, 茂昌圖書有限公司。
11. 邱柏鈞、陳浩明、楊筑鈞、李瑞桓 ( 1998 ), 銅與鋅對蘿蔔幼苗生長發育之影響。中華民國第三十八屆中小學科學展覽會。

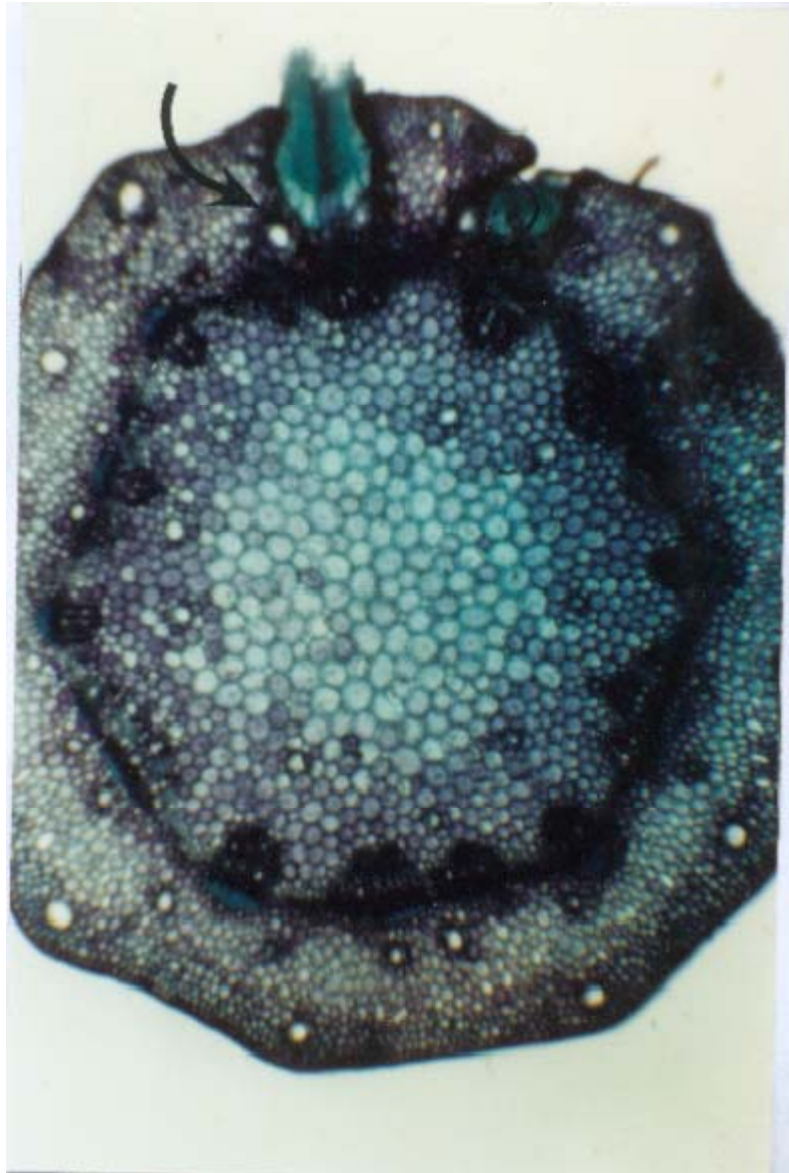
A.



B



圖一、南美蟛蜞菊被菟絲子攀附的型態，菟絲子纏繞於蟛蜞菊的莖  
(A)，可發現莖上的突起與形成的吸器(B)(12 X)。

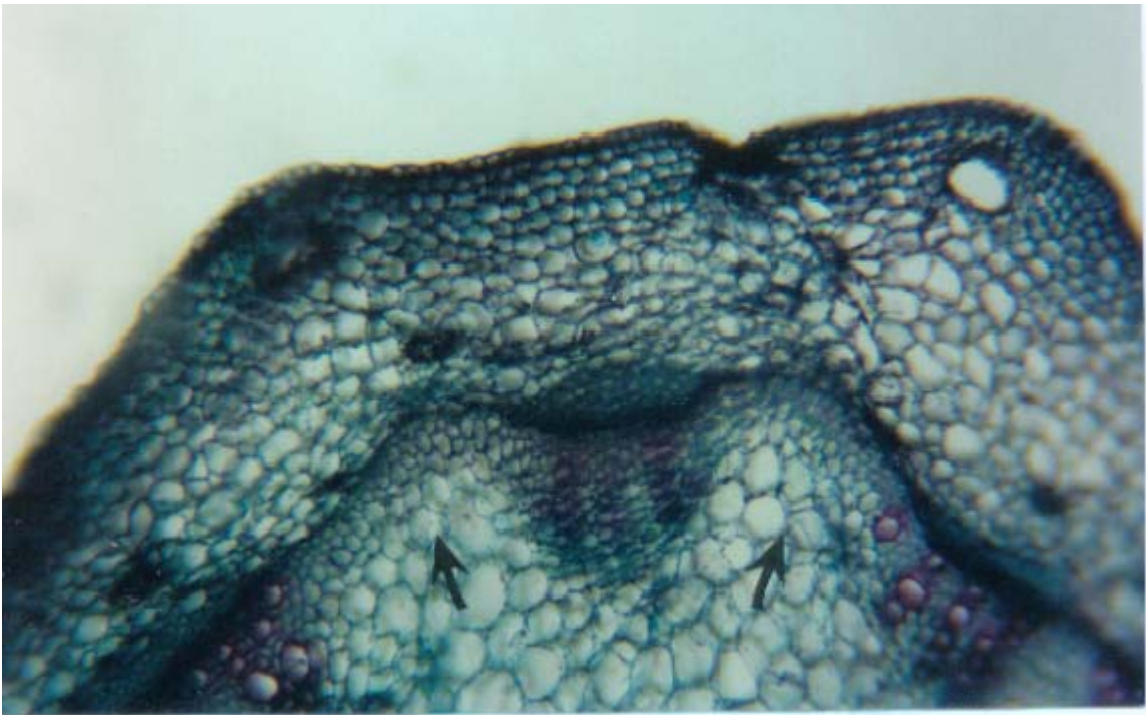


圖二、菟絲子侵入南美蟛蜞菊時，吸器穿入至韌皮部。(32 X)

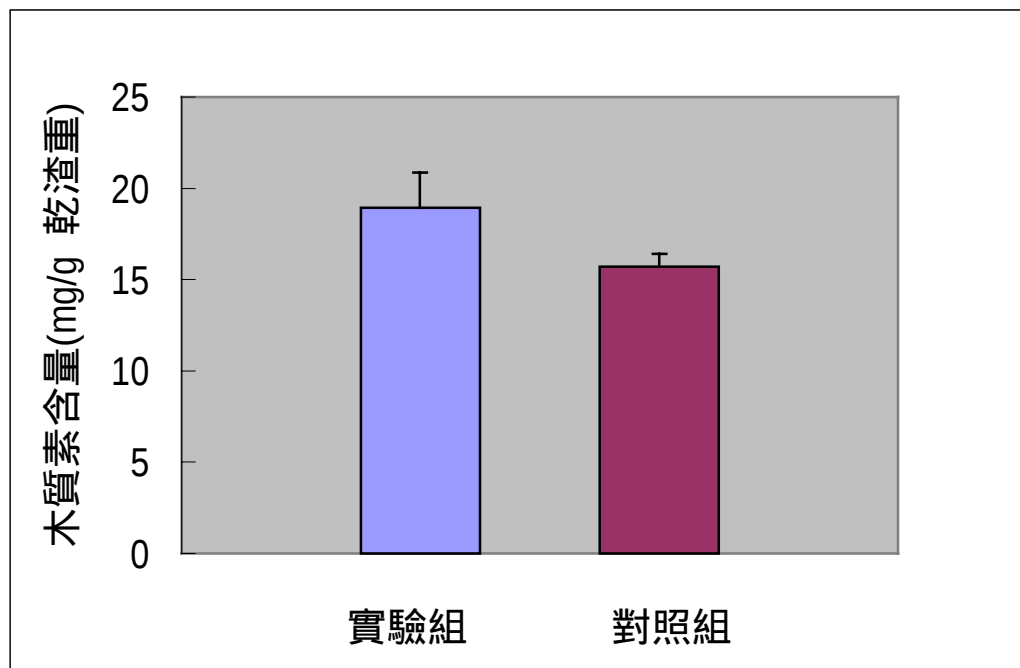
A



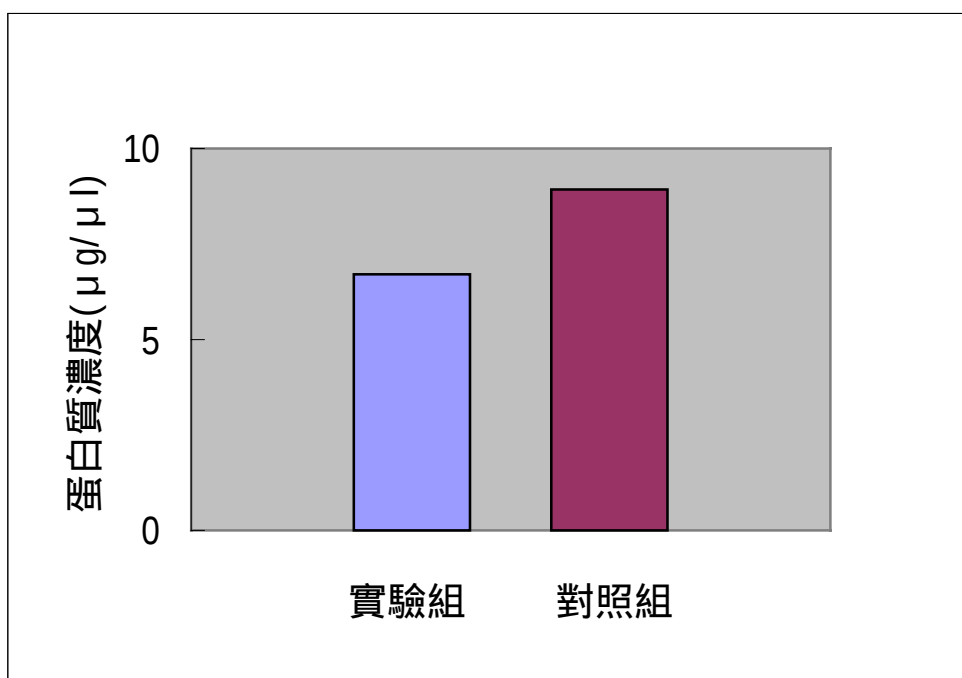
B



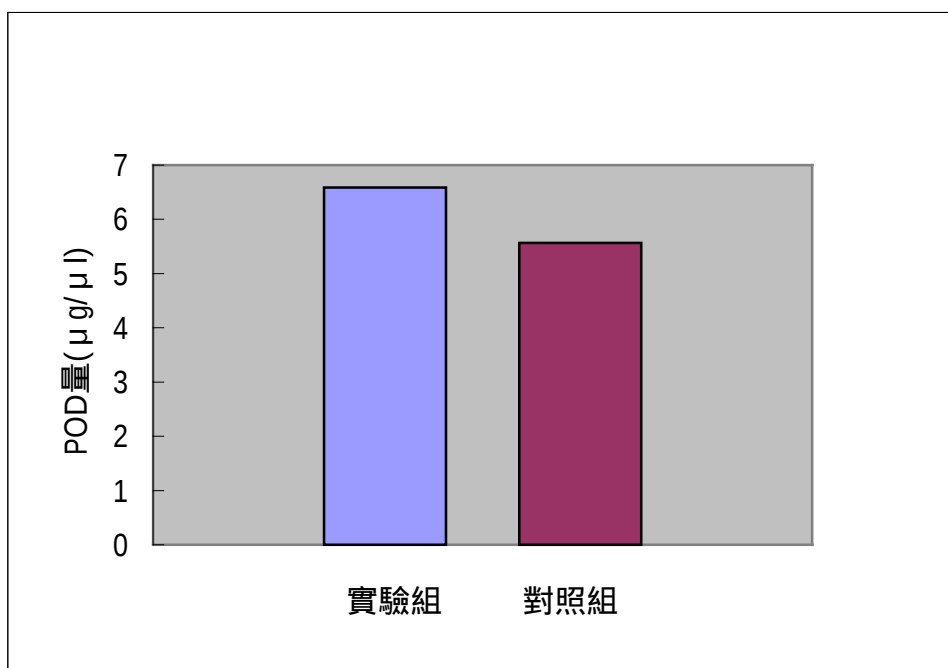
圖三、南美蟛蜞菊被菟絲子攀附的莖組織切片（A），與未被菟絲子攀附的莖組織切片（B），木質部木質化明顯加深，而且皮層亦木質化。（100 X）



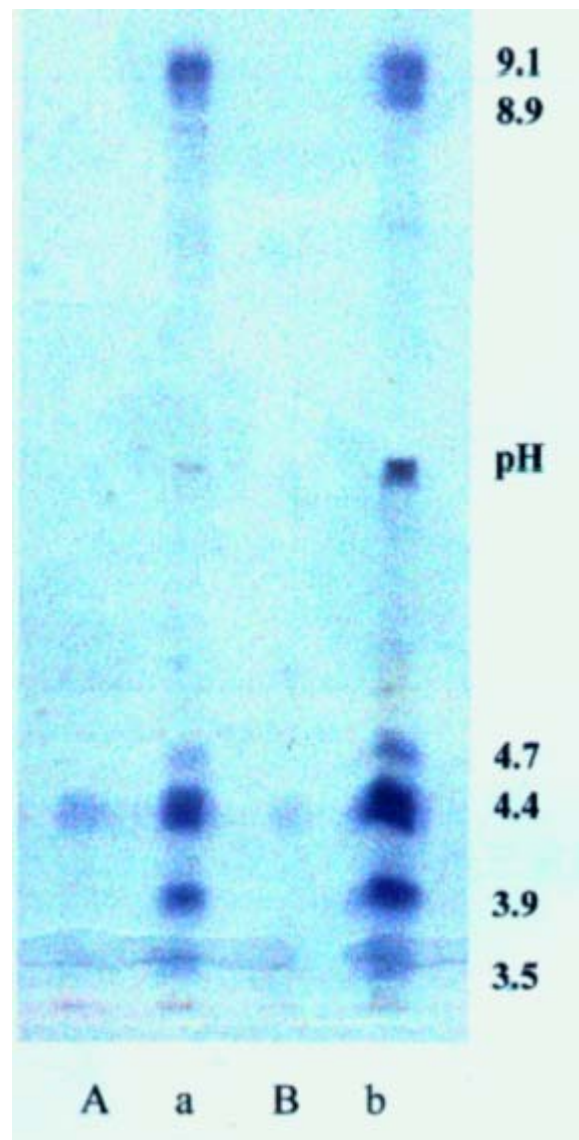
圖四、南美蟛蜞菊組織內木質素含量的變化。數據是三重複的平均值  $\pm$  標準差。



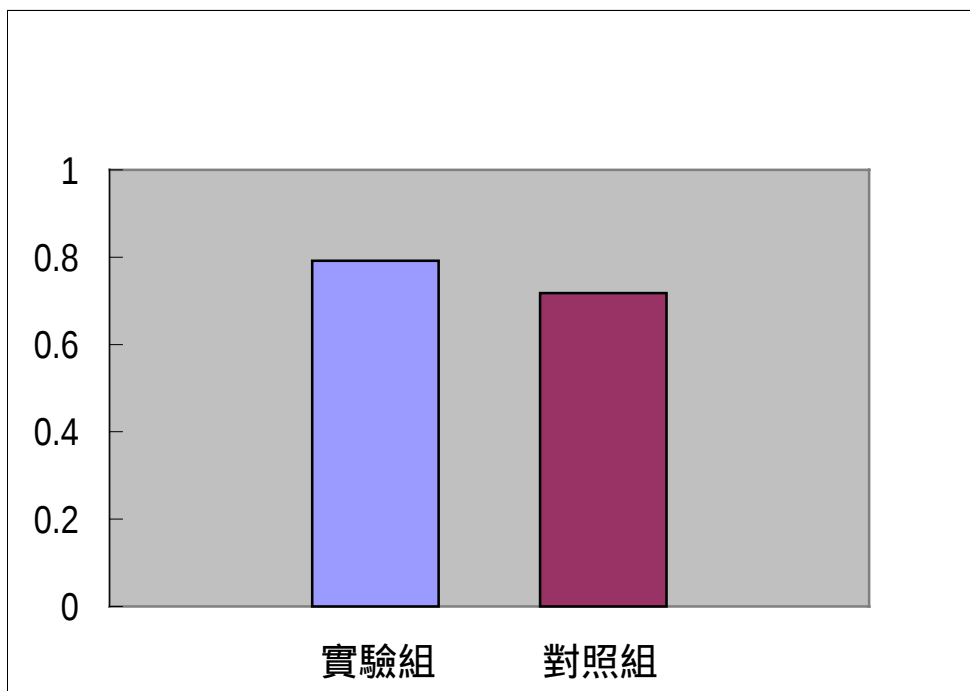
圖五、南美蜚蜢菊組織內蛋白質濃度之變化。



圖六、蟛蜞菊組織內過氧化酵素活性之變化。



圖七、等電點聚膠電泳過氧化酵素活性染色，A、B 為控制組，a、b 為實驗組。



圖八、實驗組與對照組織過氧化酵素比活性



圖九、本實驗所採樣區，位於四維路與文橫路安全島的南美蟛蜞菊族群。



圖十、南美蟛蜞菊的外形。



圖十一、南美蟛蜞菊被菟絲子纏繞的狀況。