

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

第三名

040714

低濃度活性氧是植物在逆境下調控開花的關鍵  
因子

學校名稱：國立南科國際實驗高級中學

作者： 高一 詹佳容 高一 楊昕宜	指導老師： 陳郁蕙 蔡銘哲
-------------------------	---------------------

關鍵詞：活性氧、開花、阿拉伯芥

## 摘要

輕微乾旱會造成植物提前開花。是什麼因素讓植物得知遭受逆境而要開花？實驗結果發現 20 mM 雙氧水能有效促進阿拉伯芥開花。50 mM 維生素 C 則會有效抑制阿拉伯芥開花。晚開花 *ft* (flowering locus T) 突變株噴灑雙氧水後，沒有促進植物開花，因此開花基因 *FT* 可能參與活性氧控制開花。以次世代定序方法發現 *FT* 及一些開花基因，會受到低濃度活性氧誘導而表現。以即時定量 PCR 方法證實在活性氧狀態下，這些基因會受到誘導而表現。以 *FT* 啟動子驅動螢光基因，發現活性氧會誘導螢光蛋白大量表現。這結果顯示 *FT* 確實會受到活性的誘導而啟動。我們的實驗證明，低濃度活性氧可以充當植物遭受輕微逆境下的訊號，促使 *FT* 基因及開花基因表現，誘導下游基因群，使植物提早開花。

## 壹、研究動機

國中時，我們發現九層塔處於乾旱的環境時，有提早開花的現象，雖然九層塔即將枯萎死亡，但牠的花卻比以往開得更早，以繁衍後代。我們查詢了資料，發現有許多例子是植物處在逆境環境中，會長得更好，例如：九重葛也要在少澆水的情況下，花才會開得更豔麗。因此，我們想要研究逆境和植物開花間的關係。

從文獻中得知，植物遭受逆境後，會產生活性氧(ROS)，而雙氧水即為活性氧的一種(蔣永正，2011)。 $H_2O_2$ 是一種具強烈毒性的氧化劑，會造成細胞傷害甚至死亡；但同時， $H_2O_2$ 又可作為一訊號分子，來活化細胞救援或防禦系統，以回復植物細胞之氧化還原狀態(黃信端，2005)。我們想利用  $H_2O_2$  來模擬植物的訊號分子，看看植物是否會提早開花？而維生素 C 是種抗氧化劑，是否會使植物體內的活性氧降低，使植物延遲開花？

於一次演講的機會中，我們得知阿拉伯芥有突變種，而突變植物對於科學家而言是極為重要的角色，當一植物之基因突變後，其性狀會發生改變，便可了解該基因之功能為何。為了更進一步了解活性氧與開花間更詳細的關聯性，我們想種植開花相關基因的阿拉伯芥突變株，使特定基因突變。若活性氧會當作訊息來促進植物開花，那麼利用活性氧  $H_2O_2$  和抗氧化劑維生素 C 處理是不是會讓基因轉殖突變株提早或是延後開花？進而推論活性氧跟這些基因的關聯性。

利用活性氧處理，我們可以觀察哪一種基因轉殖突變株沒有反應，藉以瞭解是哪些基因參與活性氧誘導開花的機制。我們也想透過次世代定序及即時定量 PCR 方法，分析活性氧處理植物之基因表現狀況，以確認哪些基因參與植物逆境下開花的機制。最後我們也想利用轉殖植物(潘子明，2012)，將開花基因啟動子驅動螢光蛋白，利用基因轉殖的方法，表現在阿拉伯芥中。來推論活性氧以及該基因的關聯性。

## 貳、研究目的

- 一、利用 *FT* 下游的基因突變植物，來推論這些基因與活性氧逆境誘導開花的關聯性。
- 二、以次世代定序(NGS)，確認活性氧控制開花的基因和途徑。
- 三、利用即時定量 PCR，確認活性氧控制開花的基因和途徑。
- 四、以開花基因啟動子驅動螢光基因，再以活性氧處理，來觀察活性氧是否確實可以誘導該基因表現。

## 參、研究設備及器材

### 一、研究材料與器材

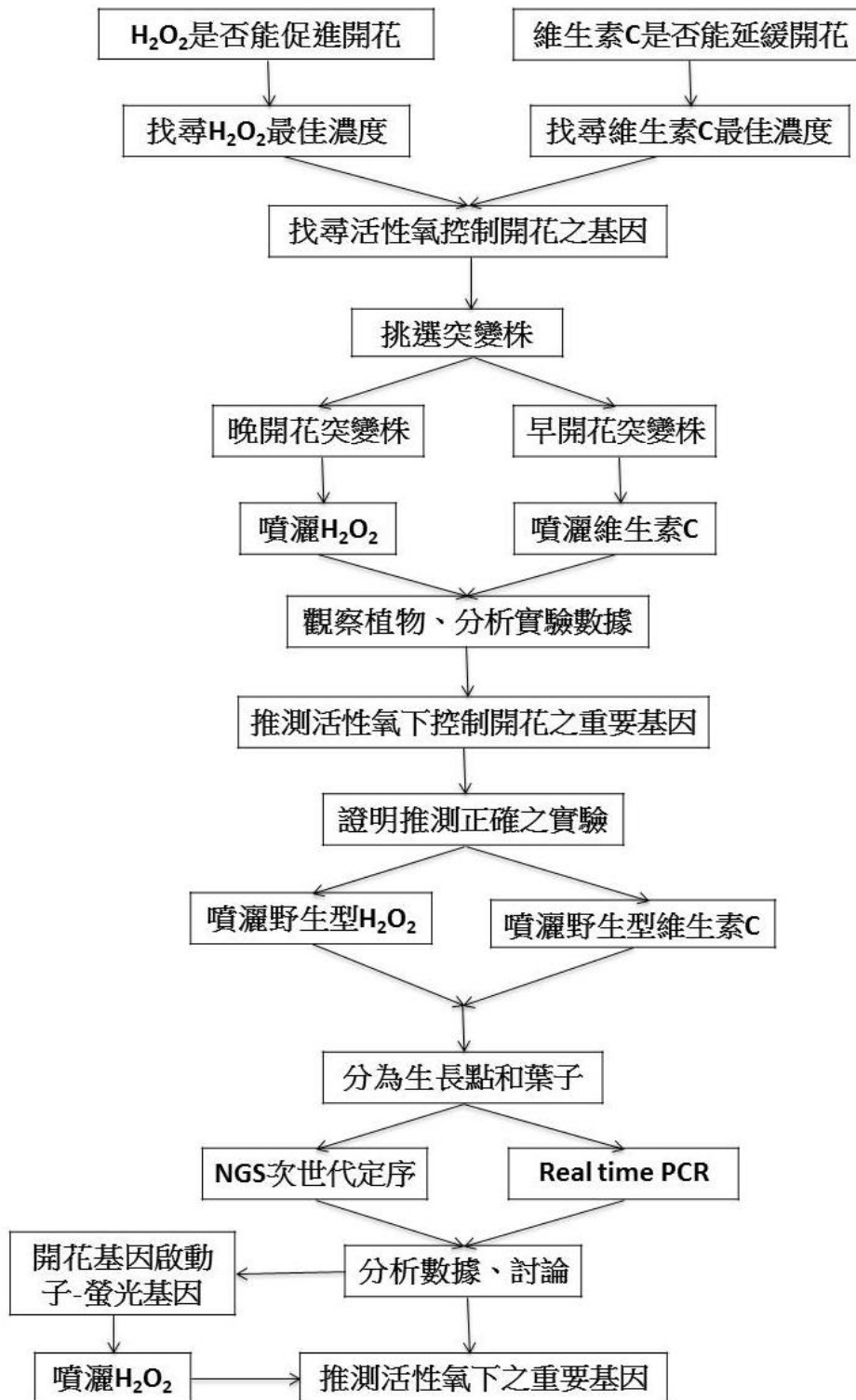
編號	物品名稱	數量	備註
1	阿拉伯芥種子	一包	Columbia 生態種
2	阿拉伯芥突變株	數個	
3	培養土	數袋	
4	一次水	不定時添加	防止植物發霉或長青苔。
5	花寶二號（肥料）	1 包	
6	雙氧水（30% $H_2O_2$ ）	1 瓶	實驗室專用溶液 廠牌：SHOWA 自行調配濃度
6	維生素 C	1 瓶	實驗室專用粉狀 廠牌：Sigma 自行調配濃度
7	緩衝劑（MES）	1 瓶	廠牌：J.T. Baker
8	展著劑（Tween-20）	1 瓶	廠牌：Merck 屬於溶液
9	1 M HCl	1 瓶	廠牌：Sigma
10	1 M NaOH	1 瓶	廠牌：Sigma
11	TRIZOL		實驗室專用溶液
12	Chloroform		實驗室專用溶液
13	液態氮		
14	Pipetteman	2 個	廠牌：Gilson
15	eppendoff tube	數個	廠牌：eppendoff
16	酸鹼檢驗器	1 台	廠牌：Jenco
17	盆栽	數個	
18	托盤	10 個	
20	鑷子	2 組	五金行購買
21	噴霧器	12 個	五金行購買
22	保鮮膜	2 盒	五金行購買
23	實驗衣	2 件	
24	手套	2 盒	
25	電泳槽		廠牌：MUPID-2
26	Real time PCR		廠牌：ABI
27	生物資訊分析軟體		
28	實驗紀錄簿	2 本	
29	相機	1 台	廠牌：Nikon

阿拉伯芥突變株：

編號	阿拉伯芥突變株	基因	備註
1	<i>flc</i> 突變株	Flower locus C	開花途徑抑制基因突變後，使植物早開花（附錄一）
2	<i>svp</i> 突變株	Short vegetive phase	開花途徑抑制基因突變後，使植物早開花（附錄一）
3	<i>soc1</i> 突變株	Suppressor of overexpression of CO1	開花途徑促進基因突變後，使植物晚開花（附錄一）
4	<i>ft</i> 突變株	Flower locus T	開花途徑促進基因突變後使植物晚開花（附錄一）
5	<i>agl24</i> 突變株	Agamous-like 24	開花途徑促進基因突變後使植物晚開花（附錄一）
6	<i>FT</i> 啟動子驅動 螢光蛋白 (luciferase)	FT::Luciferase	開花途徑促進基因啟動子，可觀察 <i>FT</i> 基因表現

## 肆、研究過程或方法

實驗策略流程如下：



## 一、阿拉伯芥消毒、播種與移植

阿拉伯芥品種為 *Columbia* 生態種。另外有早開花和晚開花的突變種，早開花的植物是 *flc* 和 *svp* 突變株植物。晚開花的植物是 *agl24*, *soc1* 及 *ft* 等突變株。*FT* 啟動子驅動螢光基因轉殖植物則是向實驗室索取獲得。其開花時間與野生型對照組沒有差異。

- (一) 前一天將種子泡水，隔天播種成兩大盆，放到植物生長箱中。植物生長條件為 16 小時光照，8 小時黑暗，溫度是光照時 24 °C，黑暗時 22 °C。
- (二) 播種一週後，移植阿拉伯芥至六十盆小盆栽。
- (三) 挑選三十盆生長條件較為相似的阿拉伯芥。

## 二、配製雙氧水及維生素 C

### (一) 配製雙氧水

1. 取出適當量的 30%  $H_2O_2$  在少量的水中。
2. 加入 50 mg/l 緩衝劑 (MES) 和 50  $\mu$ l/l 展著劑 (Tween-20)，加水調整到 200ml。

### (二) 配製維生素 C

1. 取適當量的維生素 C，加入少量水中讓它溶解。
2. 加入 50 mg/l 緩衝劑 (MES) 和 50 $\mu$ l/l 展著劑 (Tween-20)，最後加水調整到 200ml。

(三) 利用 1 M 的 HCl 或 1 M 的 NaOH 調整溶液 pH 值維持在 5.8。

展著劑主要是讓噴出的溶液可以均勻散開在植物葉上，讓植物可以吸收這些溶液。緩衝劑的用途則在維持溶液的酸鹼度。本實驗處理 0mM 對照組僅含 MES 與 Tween-20。

## 三、分別處理野生型與阿拉伯芥突變株

### (一) 野生型阿拉伯芥植物 (大約 9 到 11 片葉子開花)

1. 將不同濃度的雙氧水噴灑在兩週半大的阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有 6 到 8 片葉子。
2. 將不同濃度的維生素 C 噴灑在三週大的阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有 8 到 10 片葉子。

雙氧水和維生素 C 每個濃度各噴五盆，每天噴三次，每次噴出的溶液量約為 5ml。持續噴一週。每個實驗重複三次。實驗結束時拍照並統計整理資料。

### (二) 阿拉伯芥突變株

1. 早開花阿拉伯芥突變株(大約 5 到 8 片葉子開花)，於此植物 4 到 6 片葉子時，做維生素 C 噴灑處理。
2. 晚開花阿拉伯芥突變株(大約 30 片葉子開花)，於此植物在植物 20 片葉子時做雙氧水噴灑處理。

每個濃度各噴五盆，噴出的溶液量約為 5 ml。每天噴三次，持續噴十天。每個實驗重複三次。實驗結束時拍照並統計整理資料。

(三) 所有的實驗，我們都會統計開花時的葉片數目，但是晚開花植物和高濃度處理，開花時統計葉子數目，則根據開花時的時間，才結束實驗。如果葉子枯萎，則記成葉片數目零。如果有些不開花，但葉子也不枯萎，則只計算有開花的植物葉片數再平均。葉子數目是取每個處理五盆，平均所得的結果當作圖表的平均值。生物統計分析則是以 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 程式進行鄧氏新多變域測驗 (Duncan's multiple range test)，分析各種處理開花時葉片數是否有差異。

#### 四、次世代定序

將 20 mM 雙氧水噴灑在兩週半大的野生型阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有六到八片葉子。各噴五盆，每天噴三次，每次噴出的溶液量約為五毫升。持續噴一週。每個實驗重複三次。實驗結束時以螢光照相機拍照並統計整理資料。處理完後，先抽取 RNA。分別取 10 株葉子及生長點部位，以液態氮研磨成粉狀，分裝入無菌的 2 ml 微量離心管中。再加入 1 ml Trizol (Invitrogen)，震盪 (Vortex) 混合均勻後置於室溫反應 5 分鐘。加入 0.2 ml 氯仿 (chloroform)，震盪 15 秒，至於室溫 3 分鐘。於 4°C，13,000 rpm 離心 15 分鐘。取上層液移至新的 1.5 ml 微量離心管。加入 0.5 倍體積之異丙醇 (isopropanol)，於 -20°C 反應 10 分鐘。於 4°C，13,000 rpm 離心 10 分鐘，保留沉澱物。以 0.5 ml 之 75% 酒精清洗沉澱物。於 4°C，13,000 rpm 離心 5 分鐘，保留沉澱物。以 0.2 ml 之 100% 酒精清洗沉澱物，並於無菌操作台風乾五分鐘。加入 30 µl DEPC 水 (1 ml DEPC 加入 1 L 二次水中，於 37 °C 反應隔夜後於高溫高壓滅菌釜滅菌) 回溶沉澱物。利用 NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo) 定量，並保存於 -80°C。反應結束後，加入 10X DNA loading dye 混勻後注入 1% 瓊脂膠體孔內，以 100 伏特電壓進行電泳 25 分鐘，檢測整個 RNA 的完整性。之後送次世代定序前，以 ABI MicroPoly (A) Purist™ Kit 處理 2 次後取得之樣品，500 ng poly (A) RNA 送去次世代定序。之後以 Agilent® 2100 Bioanalyzer 及 RNA 6000 Nano Kit 分析後，樣品之 RIN (RNA integrity Number) 需 >7，不達標準需重新抽取樣品。

#### 五、即時定量 PCR (Real time PCR) 分析

重新種植野生型植物。將 20 mM 雙氧水噴灑在兩週半大的野生型阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有 6 到 8 片葉子。各噴五盆，每天噴三次，每次噴出的溶液量約為 5 ml。持續噴一週。每個實驗重複三次。實驗結束時以螢光照相機拍照並統計整理資料。

抽取 RNA 方法與次世代定序分析相同。取得 RNA 後，先使用 First-strand cDNA synthesis kit (Promega) 製備阿拉伯芥 cDNA。取 3 µg total RNA 加入 1 µl 10 µM oligo dT，加入 DEPC 水至 10 µl，混合均勻後置於 72°C 反應 10 分鐘，迅速至於冰上 5 分鐘。加入 6 µl M-MLV RT 5X Reaction buffer [ 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT ]，3 µl 10 µM dNTP, 0.5 µl M-MLV RT, 0.1 µl RNase inhibitor，加入 DEPC 水補至 30 µl。置於 42°C 反應 1 小時，72°C 反應 10 分鐘，加入 70 µl 無菌水。



之後進行即時定量 PCR，我們使用 KAPA STBR<sup>®</sup> FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS)。定量 3  $\mu$ g RNA 反轉錄成 cDNA。於總反應體積 20  $\mu$ l 中，加入 5  $\mu$ l cDNA，0.2  $\mu$ l gene-specific primer (附錄二)，10  $\mu$ l 2X KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST master mix。PCR 反應條件為 95°C/30 秒，95°C/3 秒與 60°C/20 秒循環 40 次。利用 C1000<sup>™</sup> Thermal Cycler 偵測 PCR 反應螢光量並記錄。以穩定表現之基因 *Actin2* 及 *EF1 $\alpha$*  作為 internal control，並進行基因表現量之相對定量計算。

#### 六、雙氧水誘導 *FT* 啟動子驅動螢光基因轉殖植物

將 20 mM 雙氧水噴灑在兩週半大的 *FT* 啟動子驅動螢光基因阿拉伯芥轉殖植物葉片上，植物葉片數約有 6 到 8 片葉子。各噴五盆，每天噴三次，每次噴出的溶液量約為 5 ml。持續噴一週。每個實驗重複三次。實驗結束時以螢光照相機拍照並統計整理資料。

## 伍、研究結果

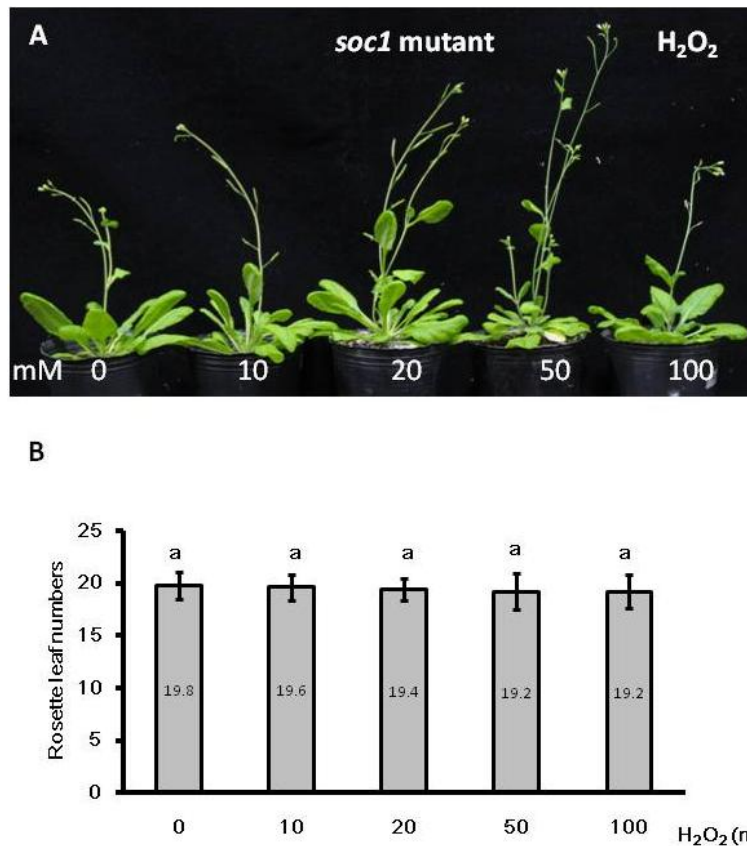
### 一、雙氧水處理 *FT* 下游的基因突變植物結果

我們先前的實驗已經證實 20 mM 的雙氧水可以促進植物開花，而且 *ft* 突變株是也不會受到影響，所以顯示 *FT* 可能是重要基因（詹等人，2013）。所以我們以 *FT* 下游的基因突變植物做相類似試驗。

#### (一) *soc1* 突變株處理雙氧水。(圖一)

0 mM 的雙氧水，為對照組，在 20 片葉子時有花苞產生。其他處理組都跟對照組一樣，在 20 片葉子時有出現花苞。

此結果可知 *SOC1* 基因影響雙氧水促進開花的效果，表示 *SOC1* 基因可能跟雙氧水促進開花有直接的關聯性。我們先前也有做過類似實驗，但是後來發現原本的 *soc1* 突變株生長可能被污染，後代族群並未有相同開花特性，所以我們又重複這個實驗。

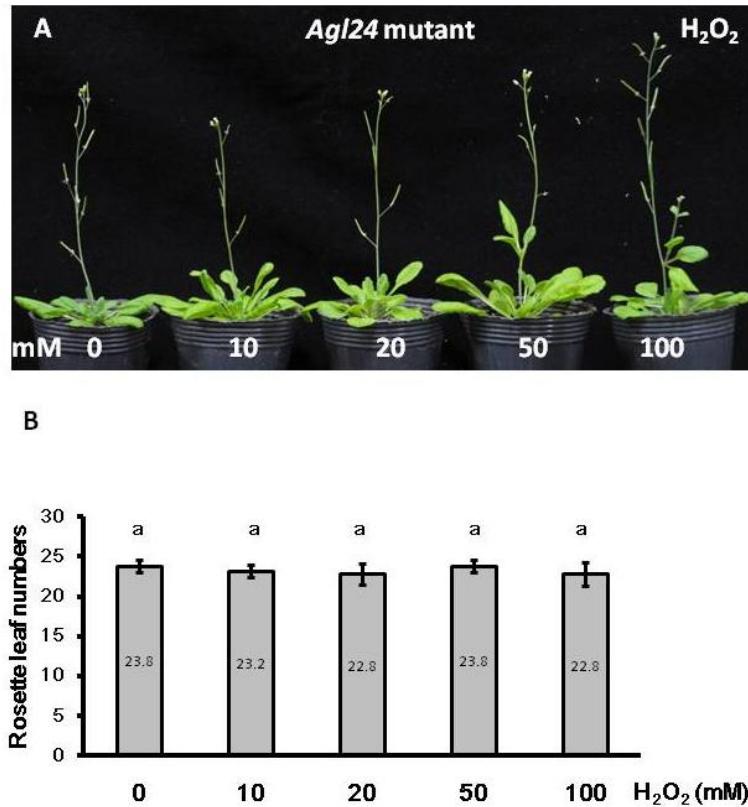


圖一、噴灑 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後，*soc1* 突變株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。

(二) *agl24* 突變株處理雙氧水 (圖二)。

*agl24* 突變株的處理結果與 *soc1* 突變株的結果相類似。0 mM 的雙氧水，為對照組，在 24 片葉子時有花苞產生。

其他處理組都跟對照組一樣，在 24 片葉子時有出現花苞。此結果可知 *AGL24* 基因影響雙氧水促進開花的效果，表示 *AGL24* 基因可能跟雙氧水促進開花有直接的關聯性。



圖二、噴灑 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後，*agl24* 突變株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。

## 二、次世代定序分析結果

爲了瞭解哪些基因是受到活性氧的誘導而參與開花機制，我們取葉子及莖頂生長點的RNA，並送去做次世代定序。經過 GeneSpring 電腦軟體分析後，有許多基因會被活性氧刺激而誘導表現(表一)。我們挑選了開花基因作分析。*FT* 基因是被誘導倍率最高的，而 *FT* 是開花主要的因子。其餘許多 *AGL* 基因也被大量誘導 (*AGL2, 4, 9* 及 *14*)。*SOC1*，*LFY* 及 *API* 則是開花現象的標識基因，有表現此基因，表示開花機制已經被啓動。*PI* 也是開花基因的重要因子。另外 *FTM1-6* 也都有被偵測到，但是 *FTM5*，*FTM1* 及 *FTM4* 被誘導倍率較高。*FUL* 及 *FTM6* 則被誘導將近兩倍。

表一、次世代定序分析，莖頂生長點區域活性氧誘導基因群

location	Gene ID	Gene symbol	MES-RPKM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -RPKM	log2 Ratio	Up/down
SAM	AT1G65480	FT	0.001	0.052119556	5.703753	Up
SAM	AT5G20240	PI	2.334544143	11.618734180	2.31524	Up
SAM	AT1G24260	AGL9	2.616122932	12.078707110	2.206964	Up
SAM	AT3G02310	AGL4	2.10835965	9.097995302	2.109428	Up
SAM	AT1G03170	FTM5	0.383314715	1.586973661	2.049676	Up
SAM	AT3G54340	AP3	2.940840767	12.032229230	2.032603	Up
SAM	AT4G11880	AGL14	0.177089128	0.637860016	1.848764	Up
SAM	AT1G43800	FTM1	4.225490695	14.45648050	1.774526	Up
SAM	AT5G15800	AGL2	3.935115274	12.071520710	1.617130	Up
SAM	AT1G69120	API	4.908459748	13.125661700	1.419047	Up
SAM	AT3G12145	FTM4	83.10413081	203.099059400	1.289191	Up
SAM	AT5G61850	LFY	1.455867529	3.175455136	1.125084	-
SAM	AT5G60910	FUL	11.16158725	22.301129170	0.998574	-
SAM	AT1G53160	FTM6	16.30116273	27.922884900	0.776473	-
SAM	AT5G15840	CO	0.554550808	0.861700395	0.635866	-
SAM	AT2G45660	SOC1	31.2575727	35.632896700	0.189004	-
SAM	AT1G14440	FTM2	43.16993871	43.431916790	0.008728	-
LEAF	AT5G10140	FLC	0.669949648	0.179366149	-1.901145	Down

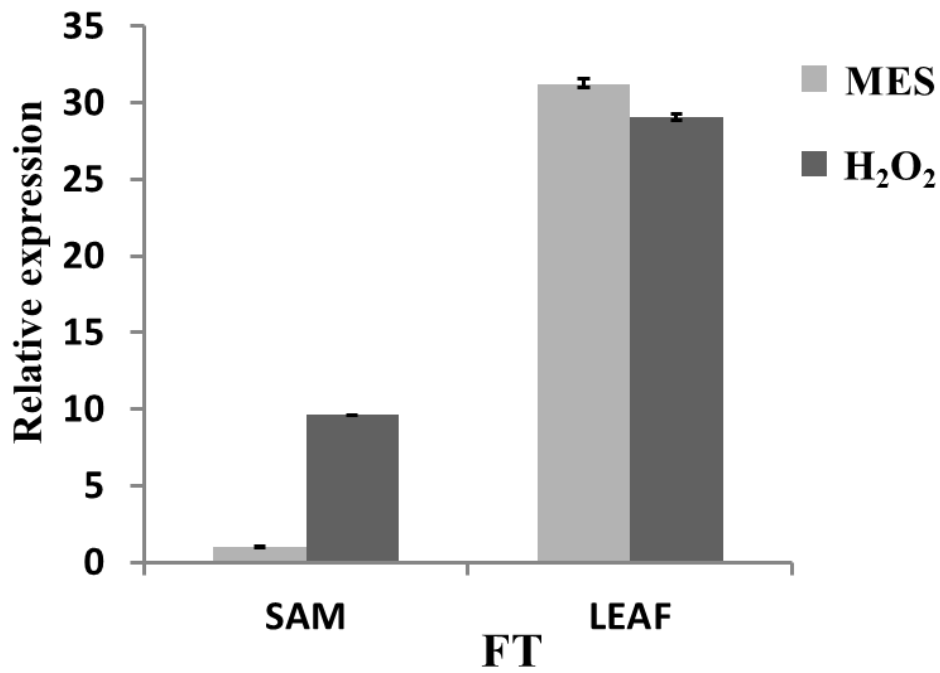
### 三、即時定量 PCR 結果

爲了瞭解哪些基因是受到活性氧的誘導而參與開花機制，我們取葉子及莖頂生長點的 RNA，並送去做次世代定序。經過 GeneSpring 電腦軟體分析後，有許多基因會被活性氧刺激而誘導表現(表一)。我們挑選了開花基因作分析。*FT* 基因是被誘導倍率最高的，而 *FT* 是開花主要的因子。其餘許多 *AGL* 基因也被大量誘導 (*AGL2, 4, 9* 及 *14*)。*SOC1*，*LFY* 及 *API* 則是開花現象的標識基因，有表現此基因，表示開花機制已經被啓動。*PI* 也是開花基因的重要因子。另外 *FTM1-6* 也都有被偵測到，但是 *FTM5*，*FTM1* 及 *FTM4* 被誘導倍率較高。*FUL* 及 *FTM6* 則被誘導將近兩倍。

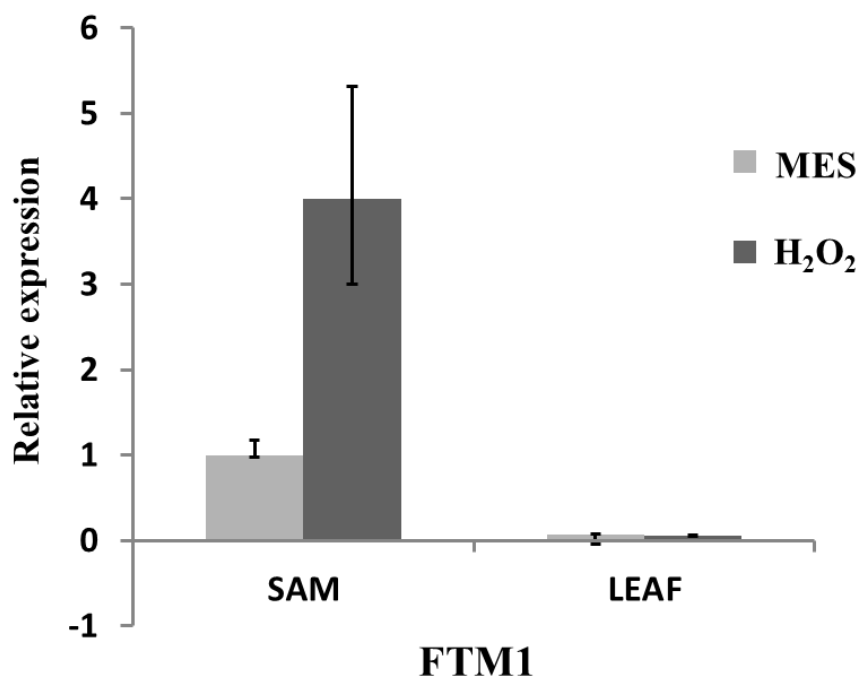
我們挑出 *FT* 下游的基因，設計 specific primer (附錄二) 後，收取處理與未處理的葉片及莖頂生長點樣本，進行即時定量 PCR (Quantitative real-time PCR) 驗證是否能得到同樣的表現情形。這些基因大多是位於 *FT* 的下游或是不同途徑調控著開花途徑的整合基因。我們以對照組之生長點基因表現倍率爲 1 倍，來看相對表現的情形。

其中 *FT* 基因在葉子表現量較高，而在生長點的表現量較少。經活性氧處理後，結果顯示無論處理或不處理雙氧水，在葉子的表現差異都不顯著 (圖三)，但是在生長點處，處理雙氧水的樣品，*FT* 基因則顯著被誘導表現。也就是說，經活性氧處理，我們可以提高 *FT* 基因在生長點的表現量，但對葉子則無明顯影響。

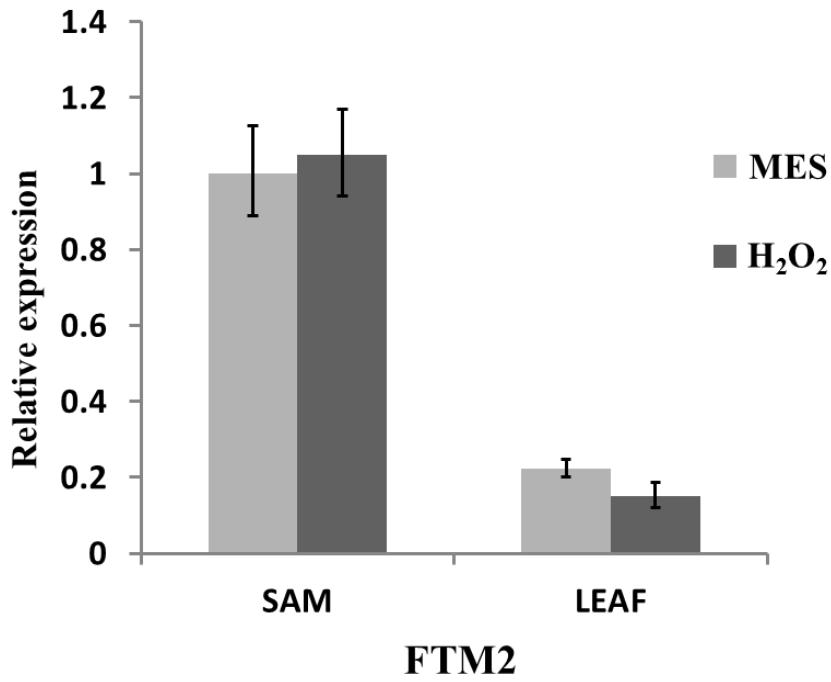
另外 *FTM1*，*FTM4*，*FTM5* 在生長點被誘導的情形也跟 *FT* 基因的表現情形相類似 (圖四，圖七，圖八，圖九)。*FTM6* 則是在莖頂生長點及葉子中，皆會被雙氧水誘導表現。而 *FTM2* 及 *FTM3* 的表現則在處理與未處理之間，表現差異不顯著 (圖五及圖六)。*API* (圖十) 在生長點的 RNA 也在活性氧處理下，被大量誘導。這個結果顯示開花基因確實被活性誘導而啓動。



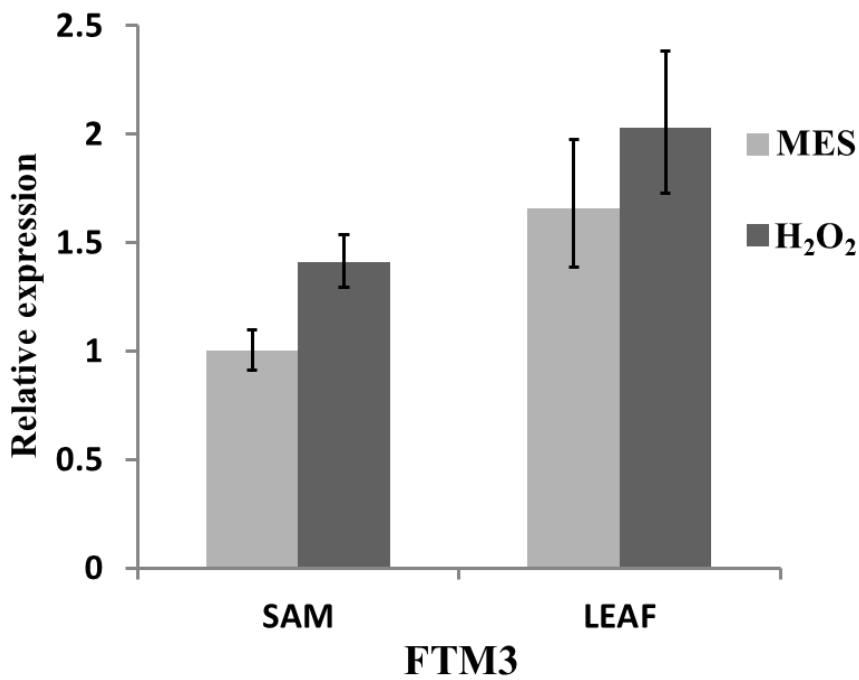
圖三、雙氧水與對照組(MES)處理，*FT* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FT* 基因被雙氧水大量誘導。



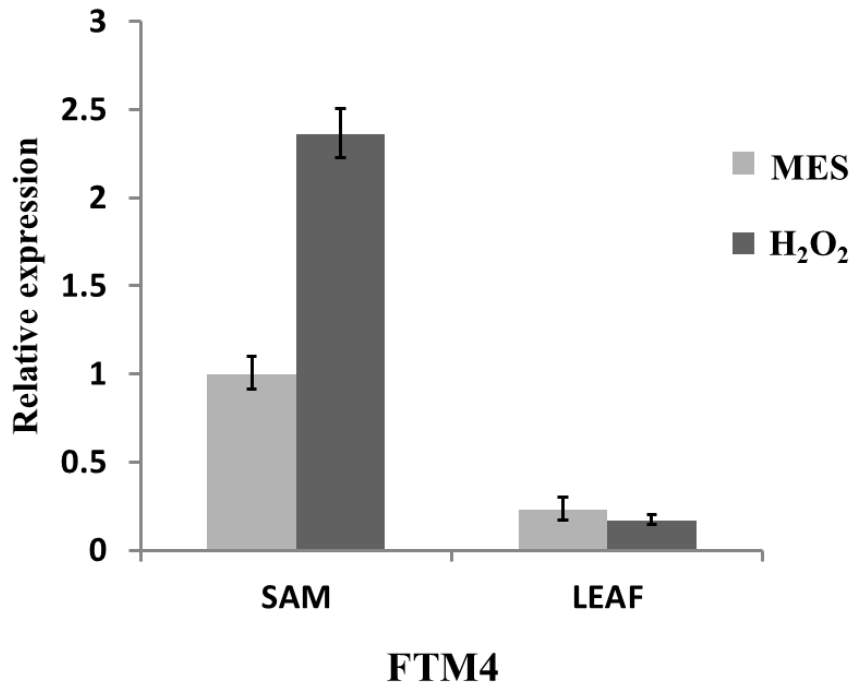
圖四、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM1* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM1* 基因被雙氧水大量誘導。



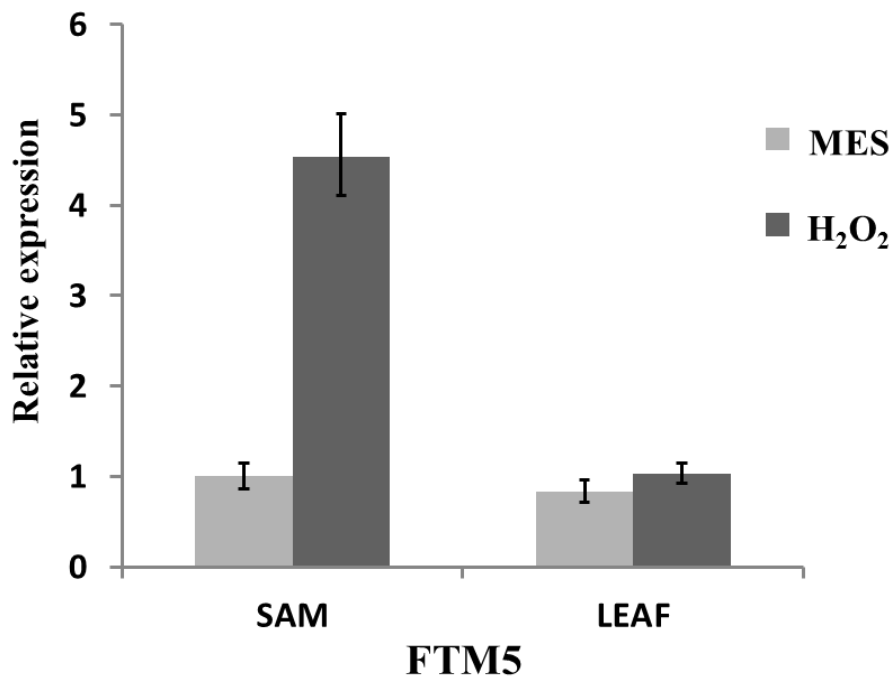
圖五、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM2* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM2* 基因在處理與未處理間差異不顯著。



圖六、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM3* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM3* 基因在處理雙氧水後，有略微增加表現量。

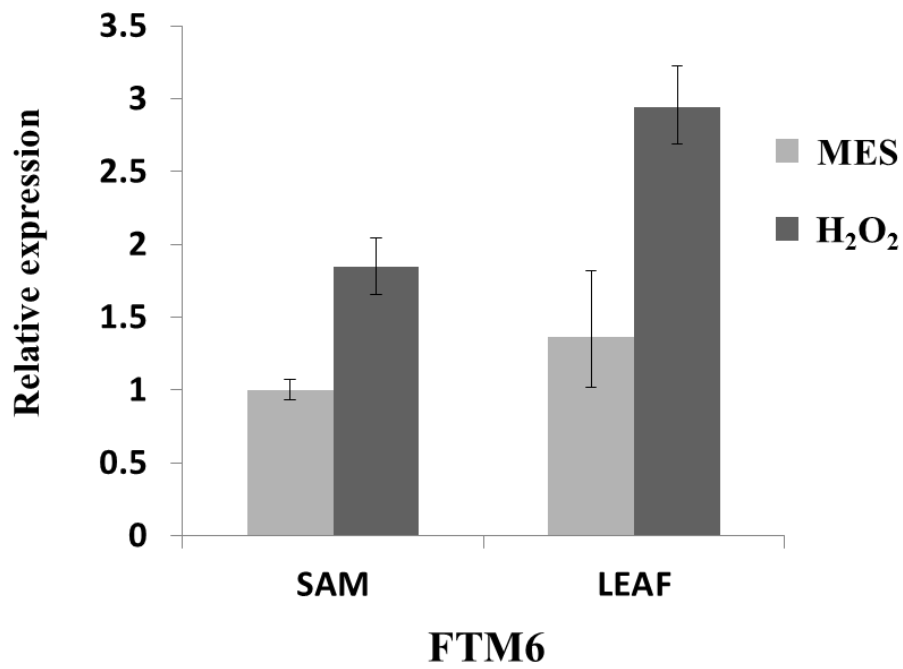


圖七、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM4* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM4* 基因會被雙氧水大量誘導。

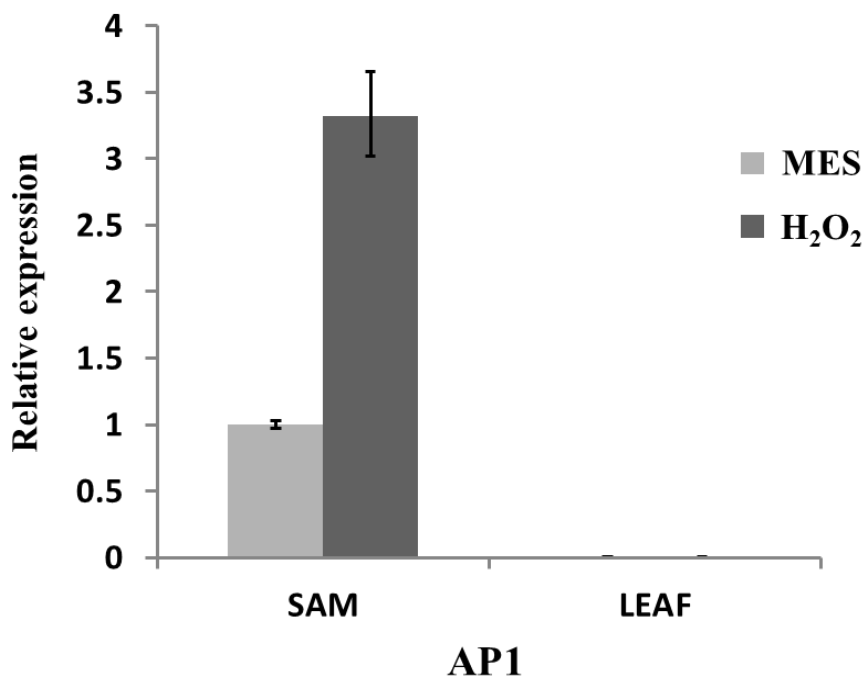


圖八、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM5* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM5* 基因會被雙氧水大量誘導。





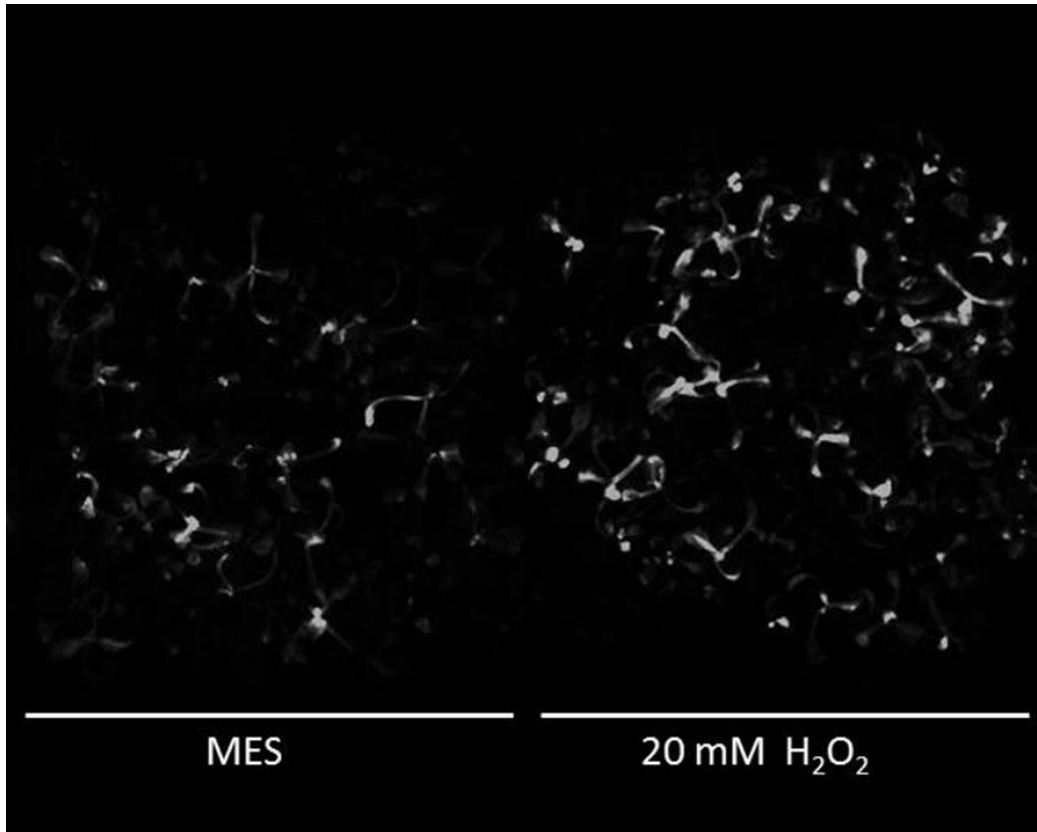
圖九、雙氧水與對照組(MES)處理，*FTM6* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點及葉片中 *FTM4* 基因會被雙氧水大量誘導。



圖十、雙氧水與對照組(MES)處理，*AP1* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *AP1* 基因會被雙氧水大量誘導。

#### 四、*FT* 啟動子驅動螢光基因的結果

因為基因是受到啟動子驅動而表現，如果啟動子會受到誘導，則後面的基因就會表現。啟動子則會受到生物內外因子所影響，使基因在不同時間、不同組織、不同環境而表現。我們利用 *FT* 啟動子來驅動螢光基因，如果 *FT* 啟動子會受到活性氧的誘導，那麼螢光基因就會表現，使植物發出螢光。實驗結果發現對照組（0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）會呈現螢光，這是因為 *FT* 啟動子會受到光線誘導。與對照組比較，經過五天處理 20 mM 雙氧水後，螢光基因大量表現。螢光的強度遠大於對照組，這個結果顯示 *FT* 啟動子會受到活性氧的誘導（圖十一）。我們也做了暗處理，然後再做螢光照相，則無論有無處理雙氧水，都沒有螢光產生（結果未顯示）。這結果也暗示 *FT* 啟動子受活性氧誘導，需要有光照才能持續激發。



圖十一、帶有 *FT* 啟動子驅動螢光基因的轉殖植物，經過 20 mM 雙氧水誘導後，其螢光表現情形。圖左邊是雙氧水處理，圖右邊是對照組處理。經雙氧水處理 5 天後，處理組會比對照組激發較強的螢光。

## 陸、討論

### 一、雙氧水和維生素 C 對植物的影響

植物遭受逆境後，會產生活性氧（ROS）， $H_2O_2$ （雙氧水）是活性氧的一種，而維生素 C 可以抑制活性氧（蔣永正，2011）。

低濃度的雙氧水可作為活性氧來促進開花，我們認為輕微逆境，在植物不至於死亡的情況下，逆境所造成的訊息會使植物得知，此環境不適合生長，因而使其盡速開花繁殖後代，以利於綿延生存。不過高濃度的活性氧(像 100 mM 雙氧水處理)就會造成毒害，使植物死亡；但過低濃度的活性氧(像 10 mM 雙氧水處理)，訊號則太過微弱，導致植物無法察覺，而無法促進開花。

低濃度的維生素 C 可抑制活性氧濃度，進而抑制開花。我們認為低濃度的維生素 C 抑制活性氧後，植物認為此環境良好，利於生存，進而繼續生長，使得原本花期延後。也有其他研究指出，綠豆幼苗或蝴蝶蘭的幼苗以過氧化氫進行前處理，再接受低溫的逆境可以得到保護，而減輕低溫的傷害(Yu et al ., 2002)

#### (一) 雙氧水和維生素 C 對突變植物的影響

我們利用早開花的突變株 (*svp* 和 *flc*) 及晚開花突變株(*soc1*、*ft* 和 *agl24*)，來做雙氧水和維生素 C 的處理實驗。因雙氧水會促進開花，而早開花突變株本身即會提早開花，如果將早開花突變株做雙氧水處理，會不知早開花的效果是由何者導致，再加上處理後結果也不明顯(一開始，我們對早開花株做雙氧水噴灑實驗，但是發現噴灑後，每一種濃度處理和對照組都會同時開花)。所以，我們對早開花突變株噴灑維生素 C、對晚開花突變株噴灑雙氧水，看看溶液影響開花的效果是否也會在突變株中出現，並試圖找出相關的基因，以下是我們推論的理論。

某個基因突變後，植物就失去了這個基因的功能。如果某一個基因並不參與這些反應，那麼這些突變植物對於雙氧水或是維生素 C 的效果應該會跟野生型植物一樣。假設這個基因是重要的參與活性氧控制開花的重要基因，則處理實驗應不會在這個植物表現出差異。

打個比方，我們將活性氧控制開花想像成一間公司，而 *SVP*、*FLC*、*SOC1*、*AGL24* 和 *FT* 等基因都是公司裡的職員，我們將其中一個職員開除，也就是將其中一個基因突變，如果這間公司運作的如往常一般順暢，那我們可以推測我們開除的職員(突變的基因)是對於這間公司來說，較不重要的角色；相反的，一旦我們開除了某個職員(突變了某基因)，這間公司運作就不甚正常，而我們即可推論這個職員(基因)對於公司(活性氧控制開花)而言是個重要的角色。

#### (二) *SVP* 可能參與活性氧誘導開花的途徑

*svp* 突變株本為早開花植物，但處理維生素 C 後，相較於對照組，皆無抑制開花的效果，也就是無論使用了多少濃度的維生素 C，都無法抑制植物開花。這表示此基因參與維生素 C 抑制開花(抑制活性氧濃度)的過程。因此，我們推測其為活性氧控制開花的重要基因。我們同樣也分析了 *flc* 突變株，然而處理維生素 C 可使其延後開花，顯示 *FLC* 基因可能未參與活性氧控制開花。

### (三) *FT*, *SOC1* 及 *AGL24* 可能參與活性氧促進開花的過程

*ft*, *soc1* 與 *agl24* 突變株本為晚開花植物，但處理雙氧水後，相較於對照組，皆無促進開花的效果，也就是無論使用了多少濃度的雙氧水，都無法促進植物開花。這表示此基因參與活性氧（雙氧水）促進開花的過程。因此，我們推測 *FT*, *SOC1* 與 *AGL24* 為活性氧控制開花的重要基因。

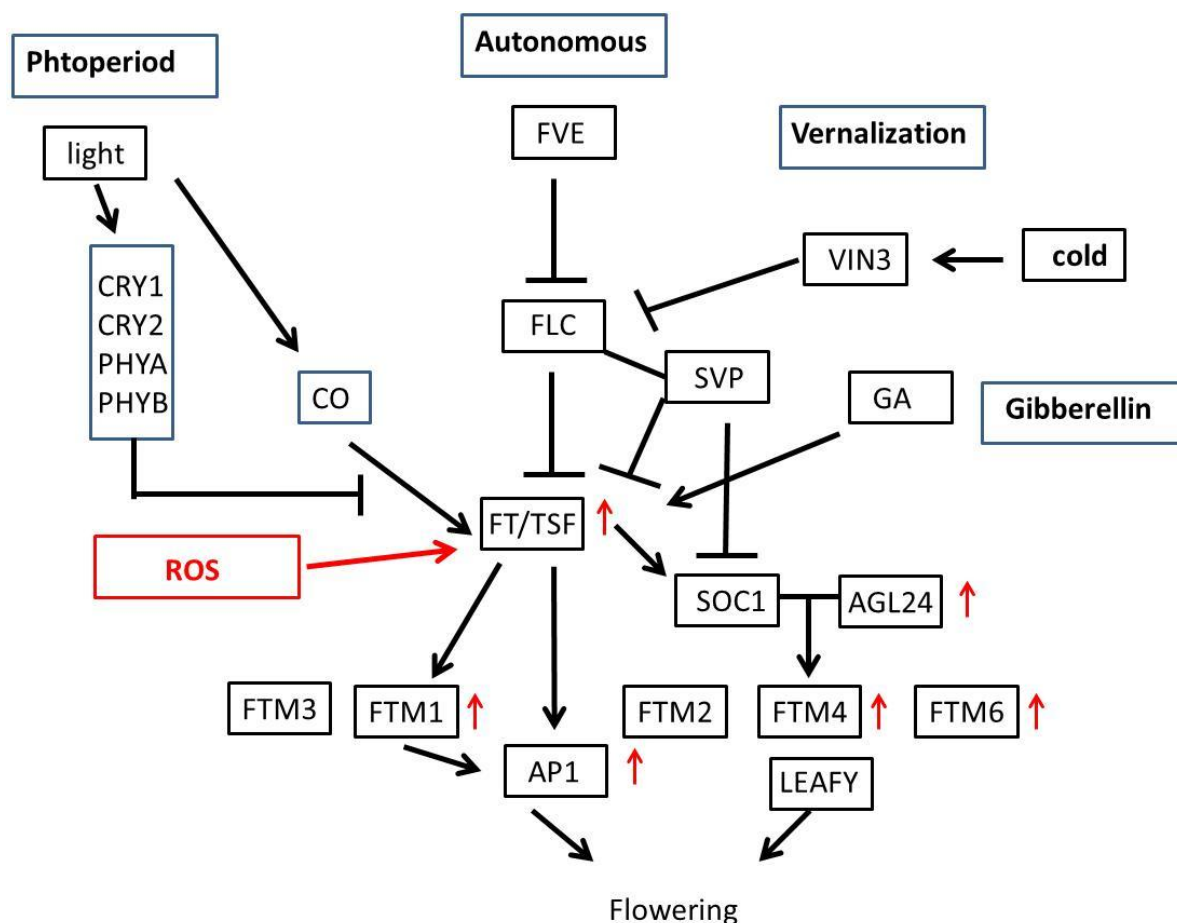
## 二、活性氧誘導開花基因

為了證實這些基因參與活性氧刺激開花，我們做了次世代定序分析。結果指出，在  $H_2O_2$  處理後我們可以清楚的看到在生長點有許多開花基因被誘導出來，但是在葉子部份，各基因的 RNA 並沒有顯著的被誘導。同時我們也證明分開葉子和生長點組織是一項對的實驗手段，這也是為什麼我們先前做整株植物的生物晶片分析，並沒有得到完整結果的原因（數據並未顯示）。在不同組織中，基因的表現也是有很大的差異的。而花是從生長點開始形成，所以有不同基因表現在不同空間上的現象，也是生物的一種有趣現象。

根據 Torti 等人（2012）年的研究（附錄三），發現 *FT* 下游控制開花還有不少基因參與，從 *FTM1-FTM6* 基因都參與開花機制。在我們的實驗中，以次世代定序及即時定量 PCR 都顯示，這些基因除了 *FTM2* 及 *FTM3* 基因外都參與在活性氧誘導開花的機制中。我們先挑選了 *FT* 做研究，結果都暗示 *FT* 基因確實受到活性氧的誘導而大量啟動。而 *FT* 是開花素（蔡，2009），所以這些 *FT* 下游的基因確實是受到 *FT* 的影響而啟動的。另外 *SOC1*, *LFY*, *API*, *SPL3* 都是 *FT* 的下游基因（Higginset al., 2010），所以突變株和次世代定序，以及即時定量 PCR 的結果，都顯示這些基因也參與在低濃度活性氧誘導開花的機制中。而目前的證據，顯示 *FT* 確實扮演重要角色，這跟之前我們做 *ft* 突變株所做的實驗結果相吻合。*AGL* 基因（*AGL2*, *4*, *9* 及 *14*），*AG*，*PI* 等基因都是花始緣起使啟動的基因，它們的大量表現，顯示出經活性氧誘導後的植物，花確實形成。

在 *FT* 啟動子誘導實驗中，我們也發現在剛處理雙氧水時，前三天處理組和對照組的螢光反應並沒有顯著差異（結果並未顯示）。這個結果與我們對野生型植物處理雙氧水時開花時間的促進效果相類似。而處理第四天，雖然有些微差異，但是照相結果並未顯示顯著差異。這個結果和野生型植物處理雙氧水四天後，開始有花原基出現的現象十分吻合。但也不是所有處理植物都出現開花現象。所以這個結果顯示在活性氧未致死濃度下，這個逆境誘導的開花訊號是慢慢累積的，並促使植物開花並延續後代。

最後，我們推出一個活性氧誘導開花的途徑（圖十二）。在未致死濃度下，活性氧在光照情形下誘導 *FT* 表現。我們從前人的研究中發現 *FT* 可與一個轉錄因子 *FD* 結合，去誘導下游開花基因表現，進而促使植物提早開花（Abe, et al., 2005），然而在次世代定序中卻未發現 *FD* 基因的表現，因此活性氧誘導 *FT* 的表現可能與轉錄因子 *FD* 無關。我們未來也想探討是否有其他轉錄因子被活性氧誘導產生，進而促進 *FT* 基因表現，或者是 *FT* 的染色體 DNA 被去甲基化，造成 *FT* 基因被誘導表現，而產生活性氧誘導 *FT* 表現的機制。



圖十二、活性氧誘導植物開花的途徑。活性氧累積後，在未致死濃度下，會誘導 *FT* 表現。*FT* 再去誘導其他下游開花基因的表現，進而使植物提早開花。*ROS* 誘導的紅色箭頭是實驗中所得到的推論。紅色向上箭頭（↑）表示該基因被活性氧誘導表現。

## 柒、結論

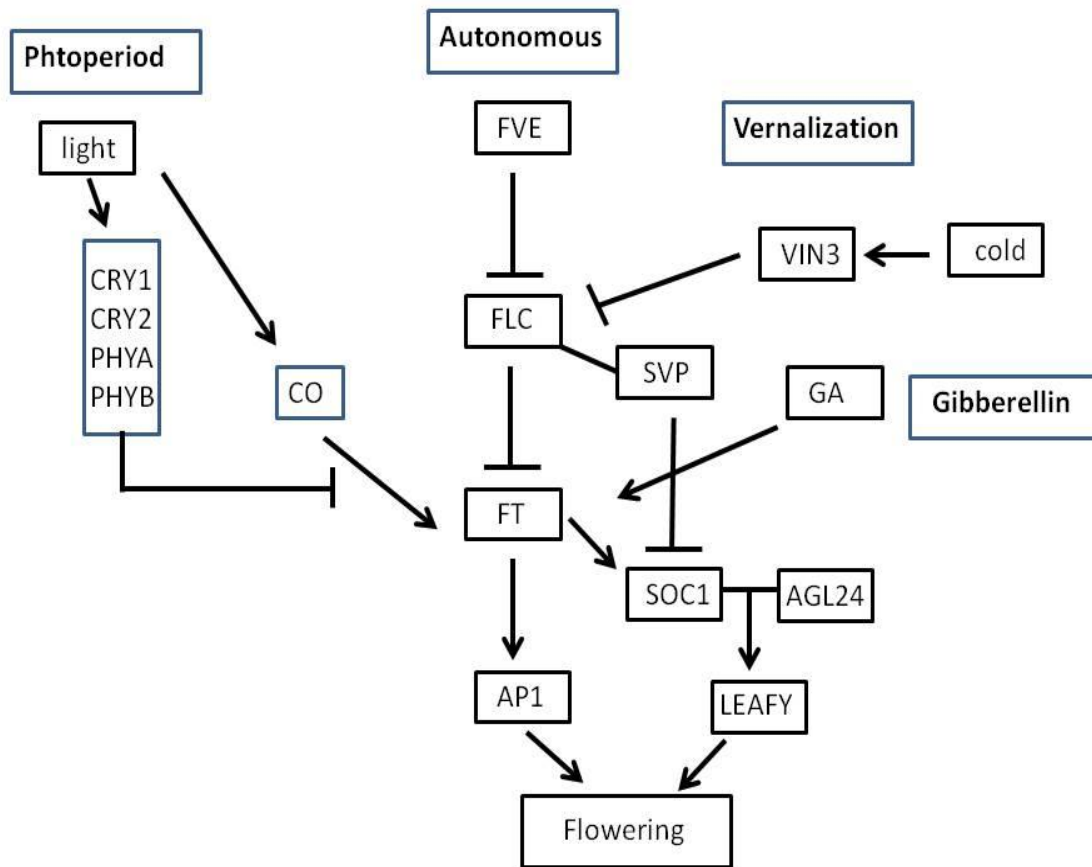
- 一、活性氧是輕微逆境下的一個訊號，低濃度雙氧水（20 mM）可以促進植物提早開花。
- 二、次世代定序、即時定量 PCR 及 *FT* 啟動子誘導的實驗結果，都顯示 *FT* 是活性氧調節植物開花的重要基因。
- 三、是否有其他轉錄因子被活性氧誘導產生，進而促進 *FT* 基因表現；或者是 *FT* 的染色體 DNA 在活性氧處理下被去甲基化，造成 *FT* 基因被誘導表現，仍需更多實驗驗證。

## 捌、參考資料

- 一、黃信端（2005）。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對水稻根部細胞生長及對其 MAPK 活性之研究。94 年度高級中學基礎科學資優人才培育計畫期末報告。
- 二、詹佳容、楊昕宜、鄭茲庭（2013）Low concentration of ROS is the key factor to regulate flowering under stress condition. 2013 年臺灣國際科學展覽會研究報告書。
- 三、蔡任圃（2009）。揪出開花素的本尊 - 開花素是 mRNA 還是蛋白質？科學月刊，479，885-857。
- 四、蔣永正（2011）植物對環境逆境之調控與應用。農情與農政。第 231 期。  
<http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=24091>
- 五、潘子明（2012）農業生物技術大躍進。正確認識基因改造作物，邁向綠色永續未來。作物永續發展協會出版。
- 六、Higgins, J.A., Bailey, P.C., and Laurie, D.A. (2010). Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLoS One* 5 : 10065.
- 七、Torti, S., Fornara, F., Vincent, C., Andrés, F., Nordström, K., Göbel, U., Knoll, D., Schoof, H., and Coupland, G. (2012) Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* 24: 444 - 462.
- 八、Yu, C.-W., Murphy, T.M., Sung, W.-W., and C.-H. Lin. (2002) . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Functional Plant Biology* 29:1081-1087.
- 九、Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052 - 1056.

附錄一

阿拉伯芥控制開花的不同途徑（由 Higgins et al., 2010）。



附錄二、即時定量 PCR 引子序列

qPCR primer

FTM1_FQ	GGT TGG ACG GTG GAG ATT GGA GAA G
FTM1_RQ	GCA AAC CTC ATG GGT CTT CTT AAG C
FTM2_FQ	GTG AAG AGA TTG GAG TGA AGA GAA GAG TGC
FTM2_RQ	GGG ACG ATC TTA GTC ATG TCG TTA TTA CCG
FTM3_FQ	CTG TTC TCA CCG CTC AGA TGG AGG
FTM3_RQ	CGT CGA TCC CAA CCG TAC GAT CAT C
FTM4_FQ	CTA CGG GAA GAT ACC ACC AGC ACT GAC
FTM4_RQ	CAA GCC TTA AGG GGA GTT CCA CAA AGA C
FTM5_FQ	GGA GGA AGA AGA AGA AAC AGA GGA GGG C
FTM5_RQ	GCT GCT TCC AAG TGA GCA TTG GTT TAG
AtSPL3_FQ	CGA GAG AAG GCG GAA AAG CAC AAC
AtSPL3_RQ	CGT AGG TTT AGC AGA TAG CTT TGA TTA CAG G
AtSPL4_FQ	CCT TCC TCC AAC AAA CCA TCT TTA TAA GAC TCC
AtSPL4_RQ	CGA GCC ACC ACG ATT GAT GCT ACC TC
AtCO_FQ	CGA AGC CGA GGA GCA AGG GTT C
AtCO_RQ	GCC AAA ACT ACA AAC CCA TTT GCA C
AtSOC1 QPCR-F	AGCAGCTCAAGCAAAAGGAG
AtSOC1 QPCR-R	TTGACCAAACCTTCGCTTTCA
AtACT2 QPCR-F	CTTGCACCAAGCAGCATGAA
AtACT2 QPCR-R	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
AtFLC QPCR-F	TGTGGATAGCAAGCTTGTGG
AtFLC QPCR-R	TAGTCACGGAGAGGGCAGTC
AtFT QPCR-F	CTAGCAACCCTCACCTCCGA
AtFT QPCR-R	TCGTAACACACAATCTCATTGCCAAA
AtAP1 QPCR-F	TCCACTGATTCTTGTATGGAGAAG
AtAP1 QPCR-R	TCTTCCCAAGATAATGCCTCTGGT
AtTFL1_QF	CAA GGC CAA GCA TAG GGA TAC ATA GG
AtTFL1_QR	CAT GAA ACT AGC GTT TGC GTG CAG
EF1 $\alpha$ -qF1	GAGCCCAAGTTTTTGAAGA
EF1 $\alpha$ -qR1	CTAACAGCGAAACGTCCCA



### 附錄三、

先前實驗部份結果（2013 年臺灣國際科學展覽會研究報告書）

#### 一、雙氧水對植物的影響

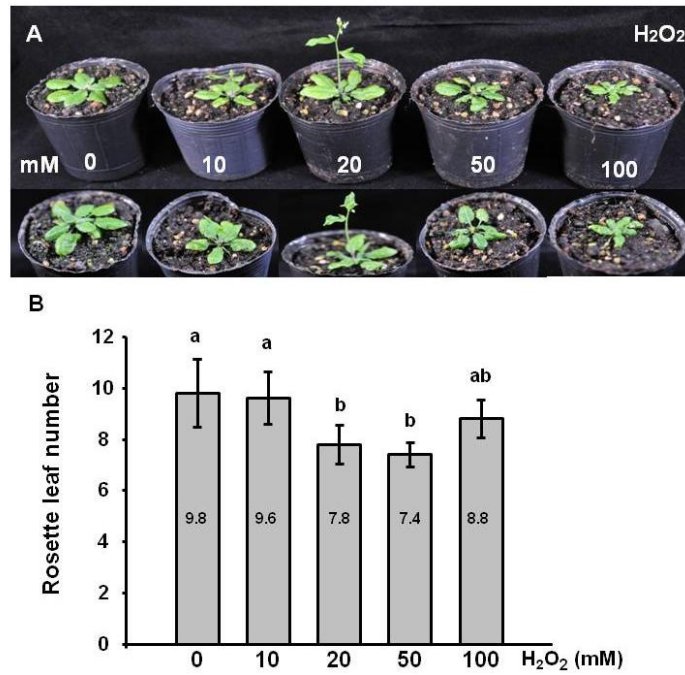
(一) 試驗低濃度雙氧水對植物的影響，並想得知雙氧水是否會傷害植物。

1. 低於 10 mM 的雙氧水，對於阿拉伯芥沒有任何影響。噴灑了七天後，所有的植物都正常生長，十天後所有實驗的植物都正常時程開花，統計實驗植物約在 10 片葉子時花苞出現，並沒有發現任何一組試驗濃度有提早開花的現象。
2. 20 mM 的雙氧水，會讓植物提早開花，大約在 8 片葉子時出現花苞。對照組約在 10 片葉子時出現花苞。和對照組相比，有花期提早的現象。
3. 500 mM 的雙氧水會對植物產生毒害，讓阿拉伯芥葉子枯萎。

(二) 重複實驗，並做更詳細的濃度處理，濃度分別是 0、10、20、50 和 100 mM 雙氧水

1. 0 mM 的雙氧水，為對照組，大約九到十一片葉子開花。
2. 10 mM 的雙氧水，大約 10 片葉子時出現花苞效果，但效果不佳，而且時間要超過七天噴灑才有效果。
3. 20 mM 的雙氧水濃度效果最為顯著，植物約在 7-8 片葉子時有花苞出現，對照組無雙氧水是約在十片葉子時出現花苞（附錄三圖一 A、B）。
4. 50 mM 的雙氧水大都在 7-8 片葉子時出現花苞，甚至有些植物會比 20 mM 更為提早，在 7 片葉子時花苞出現。但第三天後，50 mM 的處理組，葉子逐漸枯萎，花梗也不會伸長，處理七天後與 10 mM 相較之下開花程度一樣不明顯，只有長出花苞。
5. 100 mM 的雙氧水處理和對照組比較，則葉子停止生長，約 10 片葉子長出花苞。

這個結果顯示低濃度雙氧水會促進植物開花，而雙氧水也是屬於活性氧的一種( 蔣永正，2011)，代表低濃度活性氧會促進開花，但高濃度活性氧抑制了植物本身的生長。



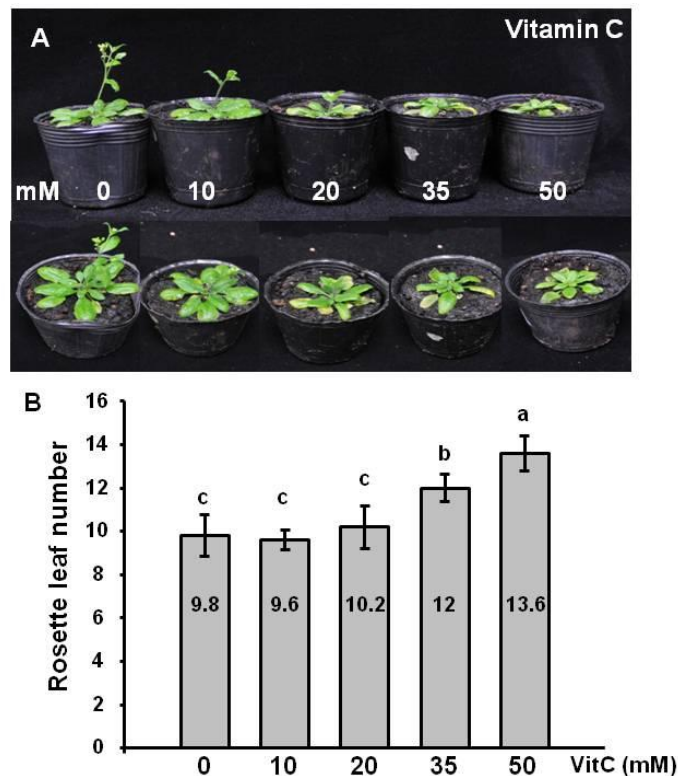
附錄三圖一、噴灑不同濃度雙氧水後，野生型植物開花情形。A. 噴灑七天後阿拉伯芥的開花情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差（standard deviation）。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。b 與 a 相比代表 20 及 50 mM 處理和對照組有差異。

## 二、維生素 C 對植物的影響

(一) 試驗維生素 C 對植物的影響，並希望得知是否能有效抑制植物開花。(附錄三圖二)

1. 0 mM 的 Vit C 為對照組，因無 Vit C 之影響，正常開花，在 10 片葉子產生花苞。
2. 10 mM 的 Vit C，因濃度較低，開花週期雖受影響，但並未完全延緩植物開花，約 10 片葉子出現花苞。
3. 20 mM 的 Vit C，效果並不明顯，於 10 片葉子時花苞產生(附錄圖二 A)。
4. 35 mM 的 Vit C，效果較上述者明顯，12 片葉子才有花苞出現。
5. 50 mM 的 Vit C，則皆有效抑制了植物的開花。約 14 片葉子才有花苞(附錄圖二 B)。
6. 100 mM 以上濃度的 Vit C，植物會迅速枯萎，且易被蟲蛀蝕。因此無法統計葉片數。

由阿拉伯芥實驗，證明維生素 C 可抑制植物的開花，於低於 50 mM 的情況下，濃度越高抑制的效果越佳。



附錄三圖二、噴灑維生素 C 後阿拉伯芥的開花情形。A. 噴灑十天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。a, b 與 c 相比代表 35 及 50 mM 處理和對照組有差異。

### 三、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對晚開花突變植物的影響

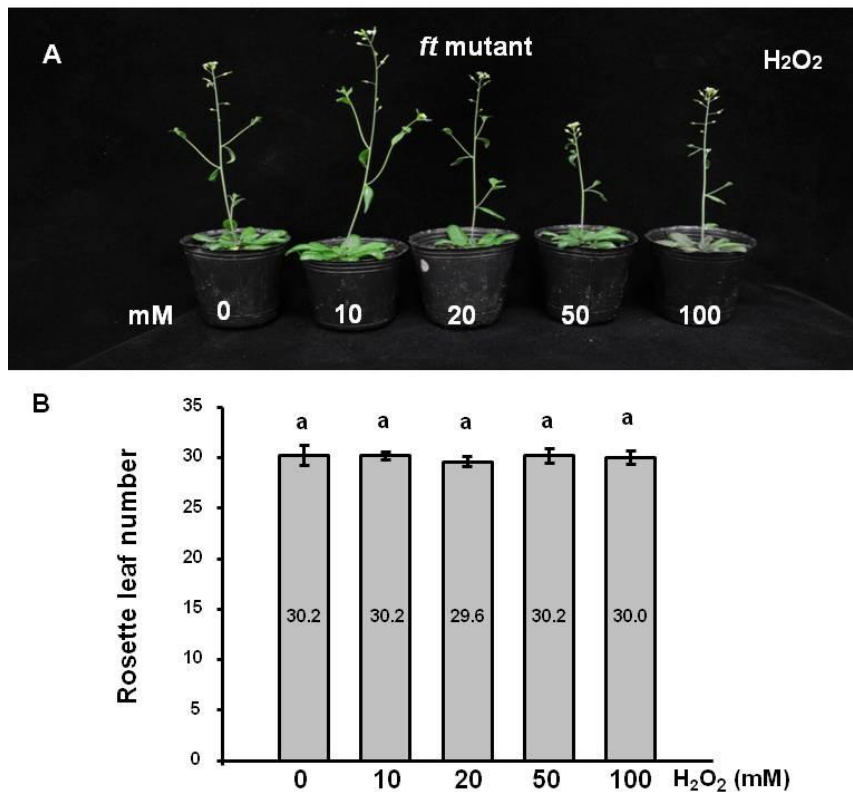
爲了得知雙氧水是否能促進晚開花的植物提早開花，我們利用了幾種晚開花的植物做了同爲噴灑溶液的實驗。

(一) *ft* 突變株處理雙氧水 (附錄三圖三)。

0 mM 的雙氧水，爲對照組，於 30 片葉子時有花苞產生。10、20、50、100 mM 的雙氧水，和對照組一樣皆爲 30 片葉子出現花苞。

於 *ft* 突變株實驗中，不同濃度的雙氧水噴灑都無法促進植物開花。實驗組和對照組花期相近，皆在在葉子約 30 片時有花苞產生。

我們認爲雙氧水無法使此晚開花突變植物提早開花，代表一旦 *FT* 基因突變後，也就是 *FT* 基因的功用被剔除後，雙氧水的促進開花的效果即不顯著。此結果顯示，*FT* 基因可能是活性氧影響植物開花的重要基因。



附錄三圖三、噴灑 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後，*ft* 突變株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字爲每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。英文字母 a 代表處理間沒有差異。

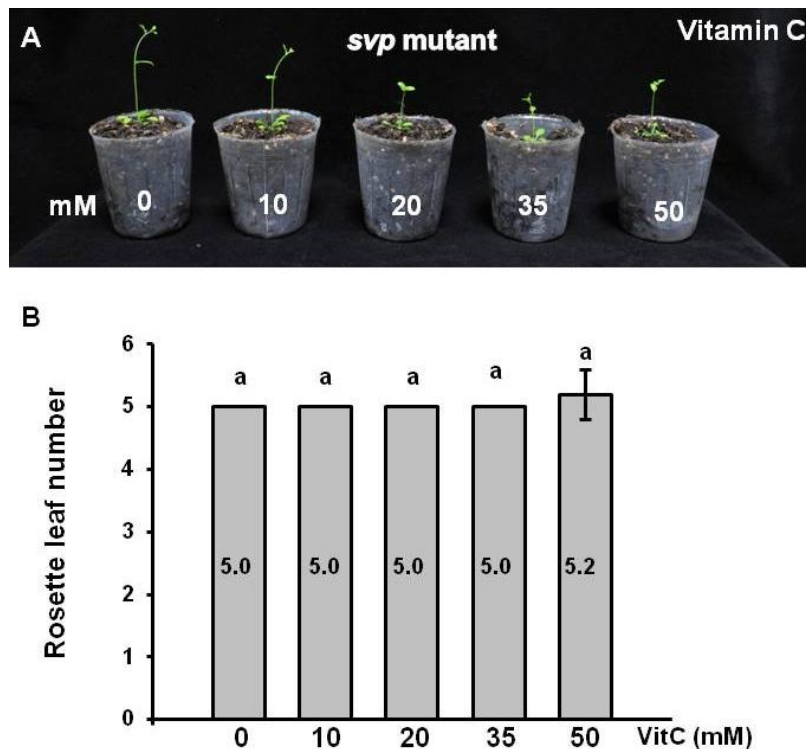
#### 四、維生素 C 對早開花突變植物的影響

爲了瞭解維生素 C 能抑制早開花突變株延緩開花，我們利用了幾種早開花突變植物做了同爲噴灑溶液的實驗。

(一) *svp* 突變株處理維生素 C，於此突變株有 4 片葉子時進行噴灑（附錄三圖四）。

各種不同濃度處理都與對照組相類似，約在 5 片葉子時有花苞出現。於 *svp* 突變株的實驗中，不同濃度的維生素 C 噴灑都無法抑制植物開花，甚至還會使花苞更明顯(50 mM 的處理結果)。實驗組和對照組花期相近，皆在在葉子約 5 片時有花苞產生。

我們認爲維生素 C 無法使此早開花突變植物延遲開花，代表一旦 *SVP* 基因突變後，也就是 *SVP* 基因的功用被破壞，維生素 C 的抑制開花的效果即不被彰顯。此結果顯示，*SVP* 基因可能是活性氧影響植物開花的重要基因。

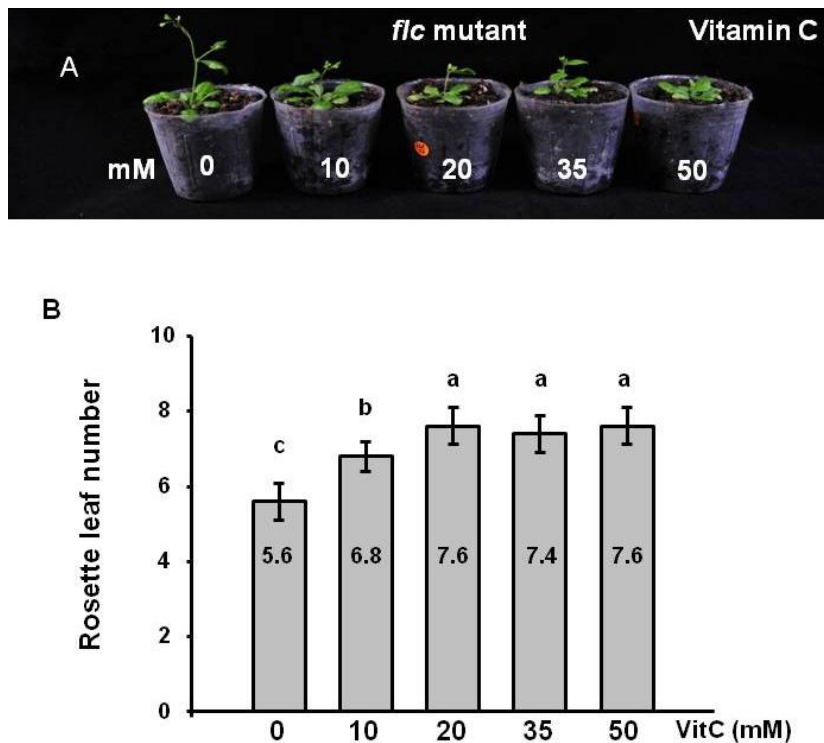


附錄三圖四、噴灑維生素 C 後，*svp* 突變株的開花情形。A. 噴灑十天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字爲每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差(standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。a 代表這組處理間沒有差異。

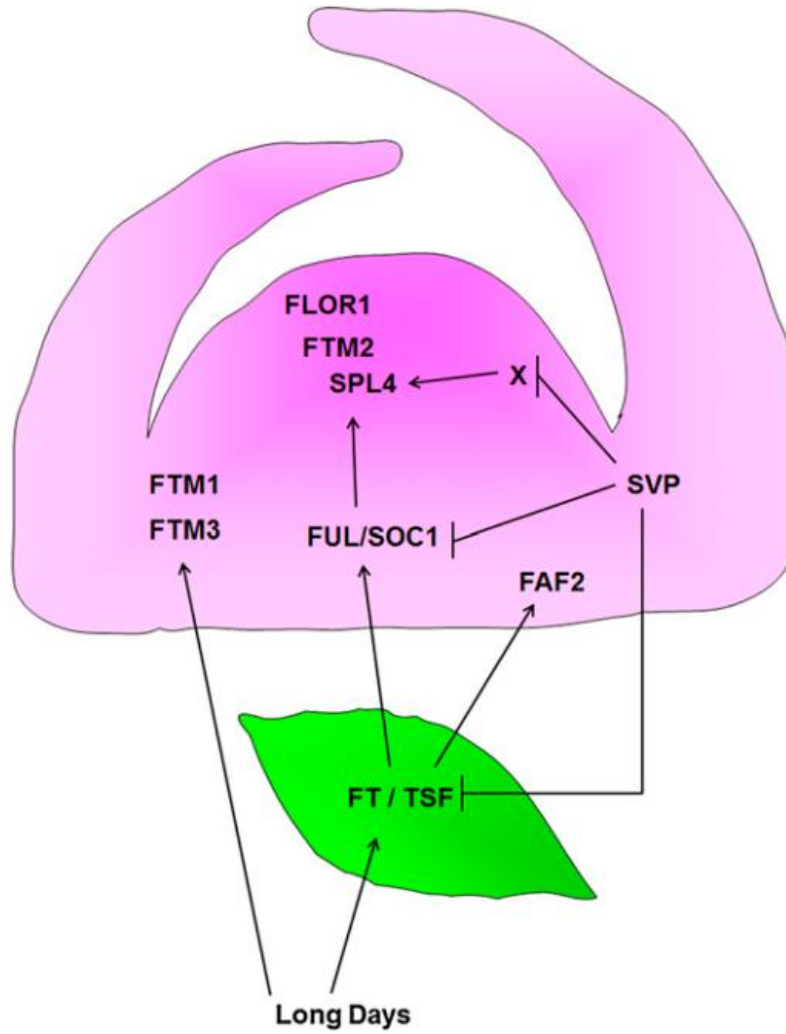
(二) *flc* 突變株處理維生素 C，於此突變株有五片葉子時進行噴灑（附錄三圖五）。

1. 0 mM 的維生素 C，為對照組，約在 6 片葉子時出現花苞。
2. 10 mM 的維生素 C，此濃度處理即有抑制開花的效果，在 6-8 片葉子時有花苞。
3. 20、35 mM 的維生素 C，隨著濃度略增，抑制植物開花的效果也漸增，在 7-8 片葉子時產生花苞。
4. 50 mM 的維生素 C，也有抑制開花的效果，但此濃度會抑制花梗的生長，也在 7-8 片葉子時出現花苞。

此結果可知 *FLC* 基因雖被破壞，但不影響維生素 C 抑制開花的效果，表示 *FLC* 基因可能跟維生素 C 抑制開花沒有直接的關聯性，也就是說此基因和活性氧控制開花無直接關聯性。



附錄三圖五、噴灑維生素 C 後，*flc* 突變株的開花情形（照片是植物較大時照的）。A. 噴灑二十天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差（standard deviation）。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。a, b 與 c 相比代表 20, 35 及 50 mM 處理和對照組有差異。



At Gene No.	Gene Isolation Nos.	Other Names	Predicted Gene Product
AT1G43800	<i>FTM1</i>	<i>S-ACP-DES6</i>	Stearoyl-ACP-desaturase
AT1G14440	<i>FTM2</i>	<i>ATHB31</i>	Zinc finger-homeodomain protein.
AT2G18160	<i>FTM3</i>	<i>GBF5, BZIP2</i>	bZIP transcription factor
AT3G12145	<i>FTM4</i>	<i>FLOR1</i>	LRR protein
AT1G03170	<i>FTM5</i>	<i>FAF2</i>	Unknown protein
AT1G53160	<i>FTM6</i>	<i>SPL4</i>	SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE transcription factor

## 【評語】 040714

以低氧條件促動阿拉伯芥開花機制之探討。在  $H_2O_2$  處理產生活性氧(ROS)確實會誘發逆境開花，以 NGS 及 PCR 分析基因表現，提出初步之調控目標基因 FT，有正相關。惟實驗方法之理論基礎尚待加強。