

中華民國第 59 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

第二名

052102

翹楚—探討相剋物處理下根部上翹的機制

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者： 高二 陳昱全 高二 林 杰 高二 廖致翔	指導老師： 鄭楷騰 江芝韻
---	-----------------------------

關鍵詞：根上翹、訊息傳遞、逆境

摘要

種植小白菜時，偶然看到其在鳳凰木汁液下會有根部上翹的現象，我們深入探討與進行一連串實驗後發現：根部上翹可能為一生存機制，讓其逃離相剋化合物逆境。在驗證根上翹不是滲透壓造成後，我們發現莖也參與此機制。其中，根的根系減少、且可能藉由提高澱粉酶活性降低根尖澱粉體含量，失去向地性而翹起；莖則變粗、變重及彎曲，使植株質心偏移，根部上翹。我們驗證了根部上翹的訊息傳遞因子為 ROS 與鈣離子：鈣離子會刺激 Rboh 酵素產生 ROS 累積，兩分子可能是透過正回饋來累積濃度後，再進而影響根莖的生理變化造成上翹，使小白菜能藉此逃離逆境。未來將深入探討 ROS 與鈣離子在此機制中的交互作用，並深入了解 IAA 對根尖上翹的調節。

壹、研究動機

有些植物會分泌相剋化合物影響周圍植物生長。我們好奇，周遭的植物有沒有發展出生存機制來應對逆境呢？我們先嘗試將小白菜種植在榕樹和鳳凰木樹葉萃取汁液中，發現小白菜生長情形的確較差，但根部卻有上翹情形，這個現象會不會是植物的一種生存機制？我們覺得這個現象很有趣，因而探討上翹原因、參與的化學物質以及植物內部的反應機制。

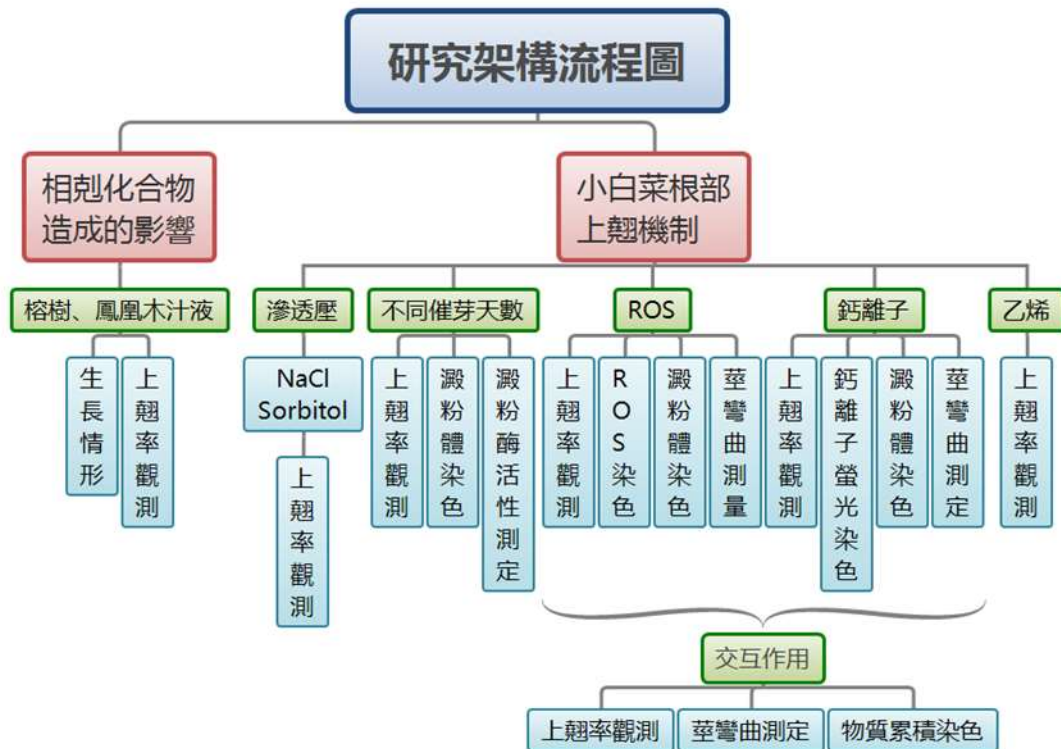
貳、研究目的

- 一、觀察不同植物萃取液中的相剋化合物對小白菜生長的影響。
- 二、探討樹汁造成的滲透壓差異是否為小白菜上翹的原因。
- 三、比較不同催芽天數的小白菜加入樹汁對上翹比率之影響。
- 四、探討小白菜受樹汁刺激後的反應或改變與上翹的關聯。
- 五、研究根部上翹對處於逆境中的小白菜的背後意義。
- 六、探討過氧化物與鈣離子對小白菜上翹之影響。
- 七、研究過氧化物與鈣離子之間的交互作用機制。
- 八、探討乙烯對小白菜上翹之影響。

參、研究設備與器材

- 一、研究植物：小白菜(*Brassica rapa chinensis*)
- 二、實驗藥劑：Sorbitol(山梨糖醇)、EGTA(乙二醇雙氨乙基醚四乙酸)、CaCl₂、過氧化氫、醋酸鈉、鹽酸、DNS(二硝基水楊酸)、NAC(乙醯半胱氨酸)、氫氧化鈉、酒石酸、DAB(3,3'-二氨基聯苯胺)、MES(2-嗎啉乙磺酸)(pH6.5)、silwec77界面活性劑、乙醇、DPI、oregon green 488。
- 三、實驗器材：天秤、離心管、冷凍離心機、震盪儀、分光光度計、微量滴管、培養皿、濾紙、石臘膜、研鉢、杵、顯微鏡、培養箱(恆溫25度)

肆、研究過程與方法



一、小白菜培養

將單張濾紙放入培養皿中加入 5ml 的蒸餾水，接著放入 10 顆小白菜種子，上蓋用石臘膜封住周圍縫隙後，放入恆溫 25 度培養箱。

二、植物汁液萃取

將樹葉放入烘乾機 24 小時後，取 10 克的樹葉與 90 克的蒸餾水放入果汁機打碎，2 分鐘後將汁液倒出，接著放入離心機以轉速 6000rpm 離心，最後將上清液放入冷凍庫保存。

三、上翹率及莖彎曲測定

(一) 根部上翹測定：如圖所示為小白菜最前端(根尖)超出液面。

(二) 莖部彎曲測定：莖部彎曲部分在中間即為莖彎曲。植株被定義為彎曲後，接著量取莖彎曲角度—沿著莖部頂端和底端的位置向後延長所夾出的角度。

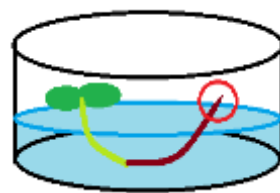


圖 上翹示意圖

四、根尖澱粉體觀測

切下小白菜樣本的根尖(約 0.2 公分)後用碘液染色 5 秒，接著放置到顯微鏡下觀察。

五、澱粉酶活性測定

(一) 緩衝溶液配置

秤取 1.025 克醋酸鈉固體和 0.0277 克氯化鈣固體加入含有約 200 毫升蒸餾水的定量瓶中，最後加入鹽酸及水，完成含有 50mM 醋酸鈉和 1mM 氯化鈣的 pH=5 緩衝溶液 250 毫升。

(二) 澱粉液配置

秤取 0.1 克澱粉倒入試管，並加入上述 pH=5 之緩衝溶液至 10 毫升處，微波加熱 10 秒使其溶解，即得到 1%(g/ml)澱粉液。

(三) DNS 溶液配置

秤取 0.8 克 DNS 固體、0.5 克氫氧化鈉固體、15 克酒石酸固體，置於管中，並加水到 50 毫升處並使之完全溶解，即得用以偵測還原糖的 DNS 溶液。

(四) 實驗步驟

將植物秤重後用低溫研鉢磨碎，滴入 1ml 的緩衝液，混和均勻後放入小試管以低溫 2 度、RPM14000 離心 5 分鐘。吸取 0.2ml 的澄清液分裝保存在 38 度下，15 分鐘後加入 0.2ml 的 1%澱粉液，靜待 60 分鐘使其反應。反應後，加入 0.05ml 的 2N 氫氧化鈉和 0.45ml 的 DNS，並放置在 100 度環境中 5 分鐘，最後放入分光光度計以 O.D. 540nm 檢測。

六、過氧化物質(ROS)染色

將 DAB 0.08g 加至 40ml MES 緩衝溶液(pH=6.5)，再加入 20 微升的 silwec77 界面活性劑，混和均勻。將小白菜和 DAB 藥劑置入培養皿後放在抽氣機中抽真空 10 分鐘，再放置暗處 6 小時，最終置於 99%酒精中加熱，退去葉綠素。

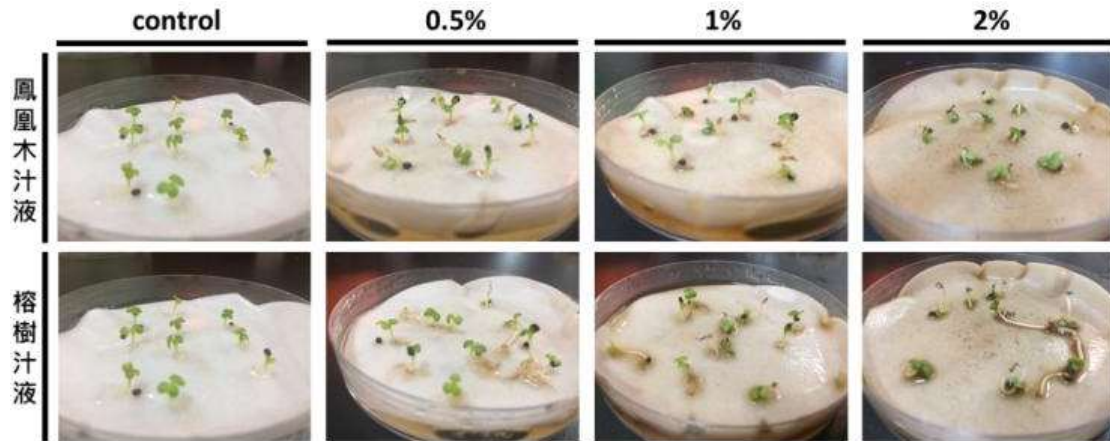
七、鈣離子螢光染色

將植物浸泡在 10 μ M oregon green 488 30 分鐘後，用清水洗去外部染劑，再將植物放置顯微鏡下利用 488nm 雷射激發光照色，觀察綠色螢光反應處便可得知鈣離子的累積含量。

伍、研究結果

一、鳳凰木及榕樹汁液對小白菜上翹的影響

我們想了解相剋化合物對植物的影響，在查詢資料後發現鳳凰木及榕樹汁液裡有相剋化合物，會影響周遭植物，因而選擇這兩種植物的萃取液來進行實驗。選取催芽三天後、大小型態相近的小白菜放入培養皿中，加入0.5%、1%、2%濃度的樹汁，放入生長箱觀察四天。



(圖 1-1) 小白菜處理植物汁液後第四天生長情形



(圖 1-2) 小白菜根處理植物汁液的上翹情形



(圖 1-3) 小白菜根上翹特寫

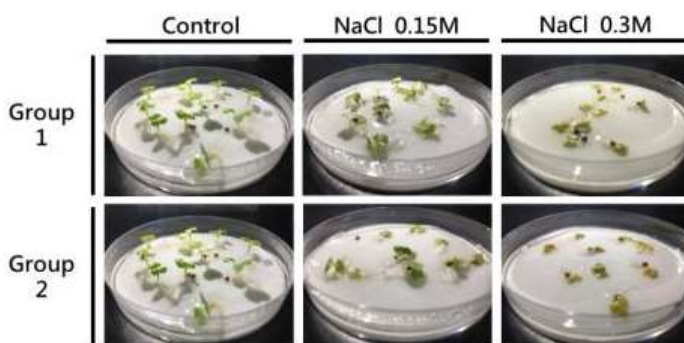
實驗結果如圖 1-1，我們發現：與控制組相較之下，生長在兩種樹汁環境中的小白菜，植株有較小、變黃的現象，表示樹汁會對植物生長造成負面影響；此外，我們也發現了一個特別的現象：小白菜的根部有上翹的情形，且兩種萃取液皆會使小白菜根部上翹，經計算後得知上翹比例與濃度和種植天數呈正相關。我們覺得這個現象相當有趣且值得探討，決定就上翹的現象進行深入研究。在數次實驗測試後，因為鳳凰木汁液的上翹表現及植物生長型態相對穩定，所以選定鳳凰木汁液(以下簡稱樹汁)進行接下來的實驗。

二、滲透壓對小白菜根部上翹的影響

在上一個實驗我們發現了小白菜根會上翹的有趣現象，但我們也思考：究竟這個現象會不會只是滲透壓所導致的結果，而不是相剋化合物使根部上翹呢？因此我們想到用氯化鈉模擬小白菜會碰到的滲透壓逆境，便能驗證此假設。

(一) 氯化鈉對小白菜根部上翹的影響

加入氯化鈉使小白菜根部的滲透壓上升，觀察其根部是否會上翹。



(圖2-1) 小白菜處理NaCl的生長情形

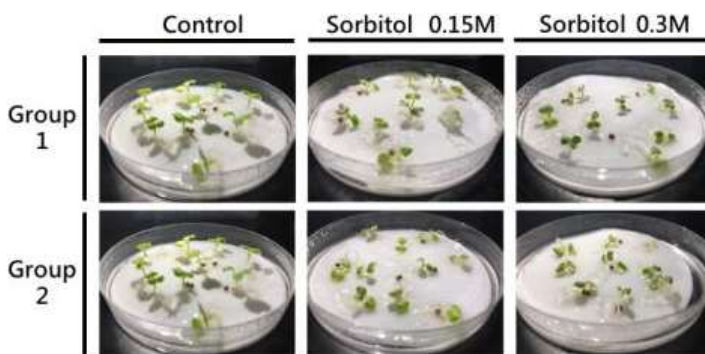


(圖2-2) 加入NaCl對小白菜根上翹的影響

實驗結果在如圖2-1，我們發現：小白菜在滲透壓逆境中有變黃情形，生長情形不佳；但根部的上翹率都只有0.1~0.2左右，並沒有明顯上升(圖2-2)，故推論根部上翹的情形可能不是滲透壓所致。

(二) 山梨糖醇(Sorbitol)對小白菜根部上翹的影響

在討論上一個實驗的結果時，我們想到氯化鈉溶於水中產生的鈉離子可能會對小白菜造成傷害，導致上翹機制受到影響。為了排除這個可能性，我們改由加入植物體代謝速度較慢的山梨糖醇(Sorbitol)來取代氯化鈉，觀察其根部是否會上翹。



(圖2-3) 小白菜處理Sorbitol



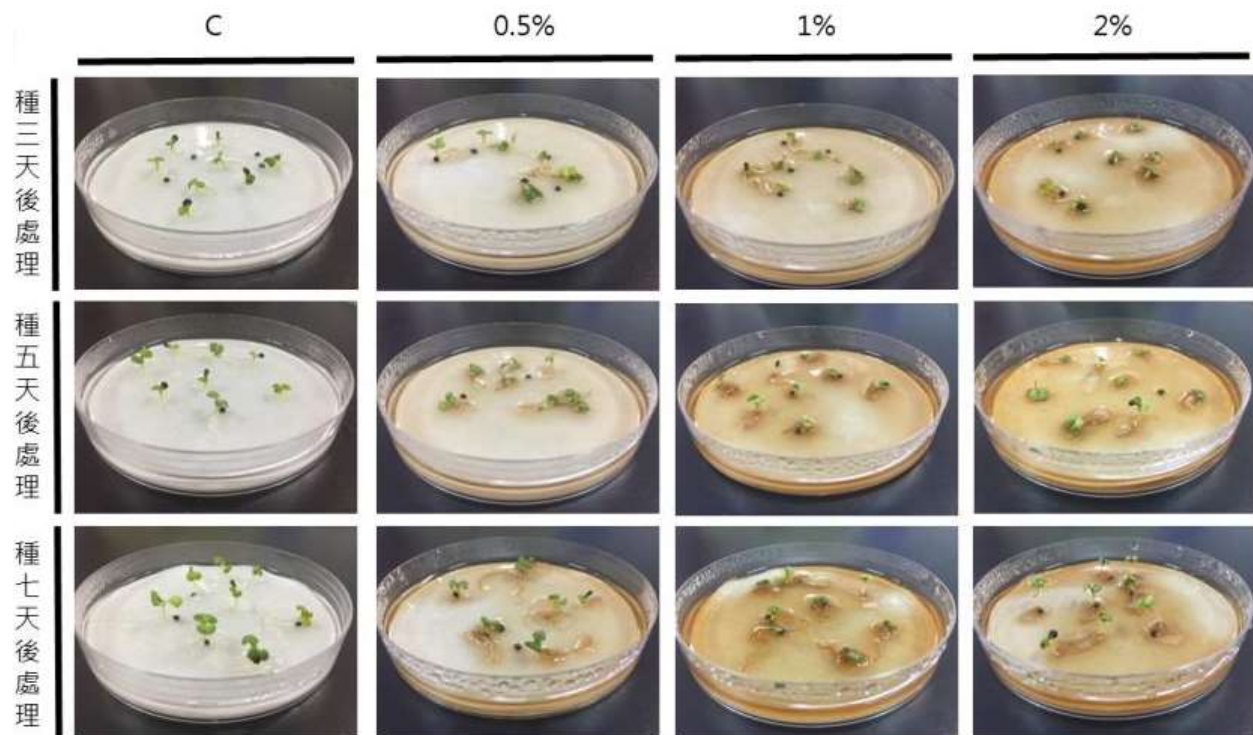
(圖2-4) 加入Sorbitol對小白菜根上翹的影響

實驗結果如圖 2-3、2-4，我們發現：小白菜在外加山梨糖醇(Sorbitol)的環境下生長情形不佳，表示滲透壓會造成植物的傷害。但經處理後的小白菜，其根部上翹比率都在 0.1~0.2 之間，沒有明顯上升。推測小白菜上翹情形並非滲透壓所致，而是可能有其他的因素導致上翹。

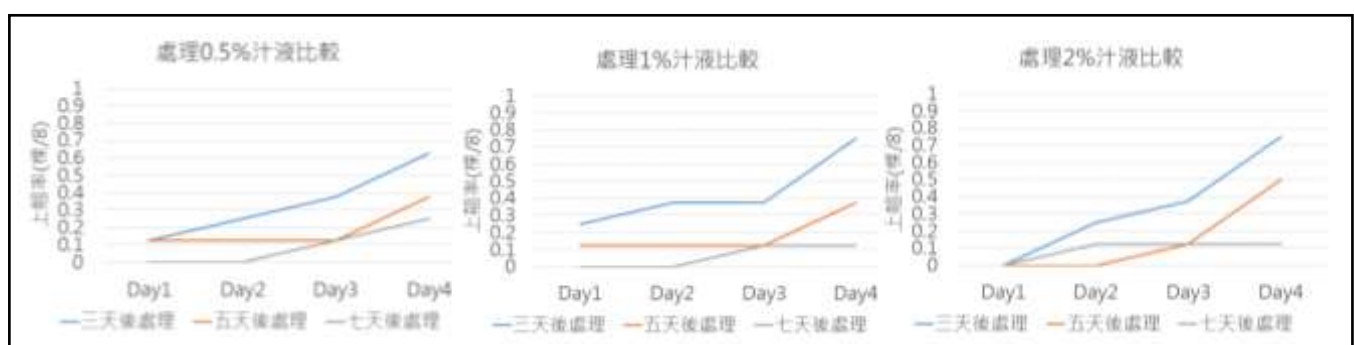
三、不同發芽天數的小白菜利用鳳凰木汁液處理，觀察小白菜根部上翹情形

在實驗一中發現小白菜在碰到樹汁時根尖會上翹。接著我們想進一步了解：小白菜生長的時間長短與上翹的關係，以及上翹對小白菜生長的意義，因此設計以下實驗來探討。我們分別將小白菜催芽三天、五天、七天並種植在不同濃度的樹汁中，四天後記錄其上翹率。

(一) 上翹率



(圖 3-1) 小白菜處理不同濃度的樹汁後第三天



(圖 3-2) 加入不同濃度的樹汁對小白菜根上翹的影響

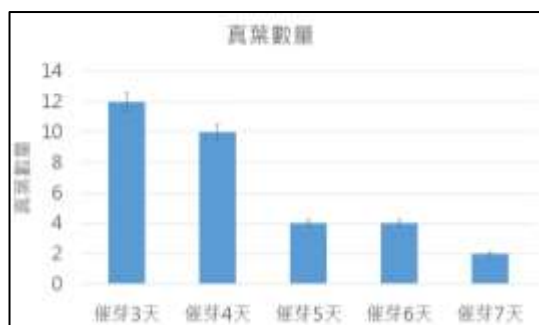
觀察圖 3-1 可知，加入樹汁的小白菜生長情形較控制組差，且有上翹情形。由圖 3-2 的數據中可以看到，加入樹汁的小白菜上翹率從第一天都不超過 0.3，到第四天時三組不同時間處理的小白菜都有上升趨勢，其中三天後處理組的上翹率約為 0.6~0.8，高於五天後處理組及七天後處理組的上翹率。我們認為可能是**年幼的根部較能產生上翹的機制**。

(二) 小白菜上翹的生理意義

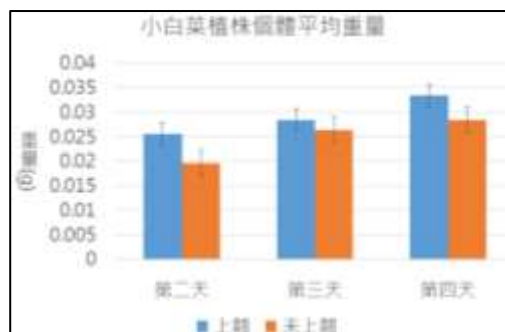
上一個實驗我們發現小白菜幼根較容易上翹，不禁好奇上翹對小白菜的意義是什麼？因此我們將小白菜多觀察了幾天，用催芽不同天數的小白菜加入樹汁後在第十一天觀察。



(圖 3-3) 種植不同天數的小白菜加入樹汁後第十一天觀察



(圖 3-4) 小白菜真葉數量



(圖 3-5) 上翹與未上翹植株重量比較

從圖 3-3 可知，催芽三天後加入樹汁的小白菜生長情形明顯較佳，而我們利用植株的真葉數量(圖 3-3)來量化生長情形，由此可以看出：催芽三天後種在樹汁中的小白菜，真葉數量多於催芽天數大於三天的小白菜。與圖 3-2 比較後，催芽三天後種在樹汁中的小白菜，上翹比率多於催芽天數大於三天後種在樹汁中的小白菜，**由此推測小白菜應是透過根部上翹以避免碰觸到鳳凰木的汁液，作為其應對樹汁逆境的機制**。另外，越早接觸樹汁的小白菜生長情形較佳，猜測可能因為催芽時間較長的小白菜上翹能力喪失，導致生長情況不佳。

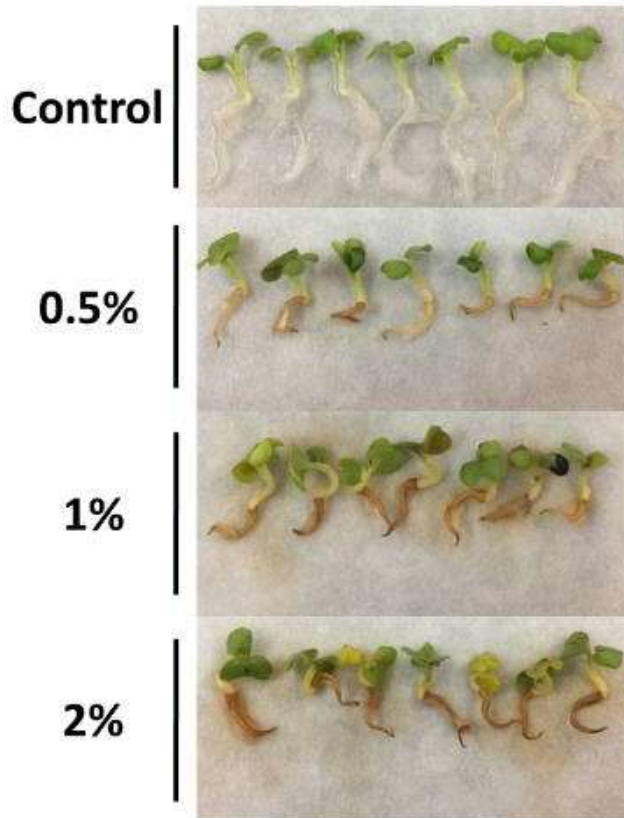
但我們也考慮到小白菜的年齡差異可能是影響生長好壞的因素，因此我們將催芽相同天數的小白菜處理樹汁後，在第二、三、四天分別秤取有上翹和沒有上翹的小白菜重量來定義生長的情形。由圖 3-5 可知，有上翹現象的小白菜，重量會大於沒有上翹的小白菜植株。結

合圖 3-4 實驗的推測，證實了上翹是一種協助生存的機制。

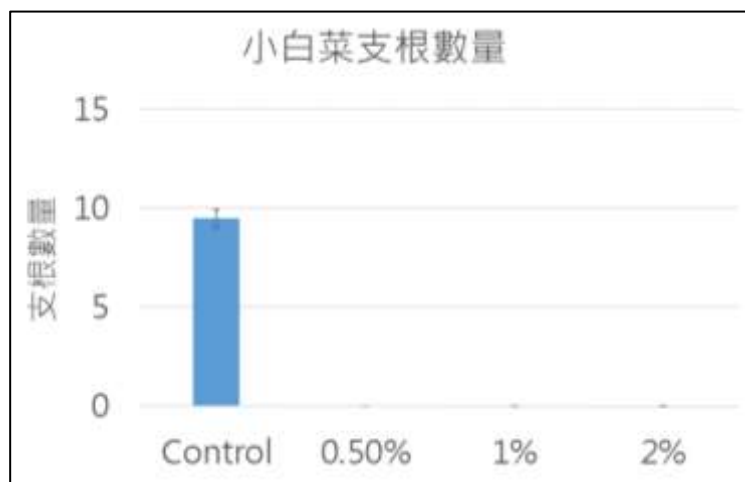
四、小白菜上翹機制研究

經過前面的實驗，我們推測小白菜可是透過上翹來應對逆境；同時我們也好奇小白菜是透過什麼方法使根上翹？

(一)小白菜根系照片與支根數量



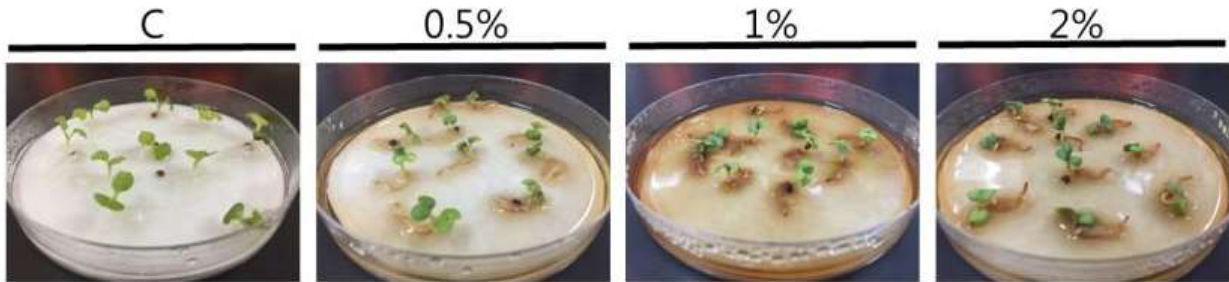
(圖 4-1) 小白菜根系照片



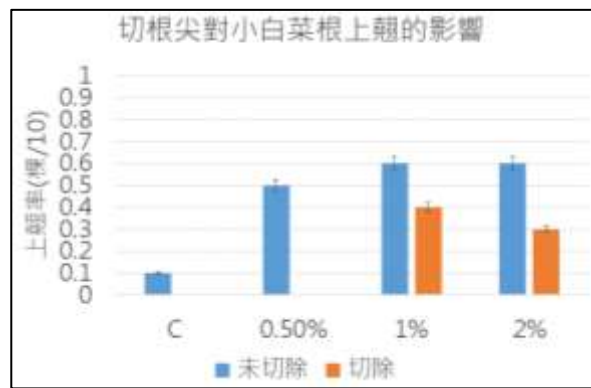
(圖 4-2) 小白菜支根數量

將處理不同濃度樹汁的小白菜排列在濾紙上(如圖 4-1)可以看出：與控制組的小白菜相比，處理樹汁後的小白菜根系生長情況較差；而利用圖 4-2 的支根數量比較後發現，只有控制組的小白菜才有長出支根。而支根為支撐植物體的方式之一，因此我們推測小白菜在逆境下會透過減少支根的生長使其抓地力下降，達到上翹的目的。

(二) 切除根尖對於小白菜根部上翹的影響



(圖 4-3) 切根尖後小白菜生長情形



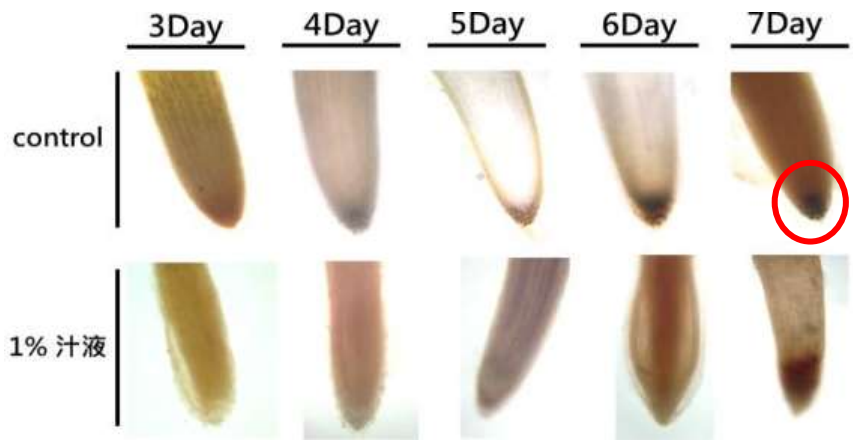
(圖 4-4) 切根尖後小白菜上翹比率

在前面的實驗中，我們發現小白菜似乎會透過使根部上翹的方式來避開樹汁。我們猜測小白菜的上翹可能與向地性有關，因此將影響向地性的根尖切除來觀察小白菜的上翹情形。由圖 4-4 可以發現，切除根尖後的小白菜上翹比率較未切除根尖的小白菜低，故推測小白菜會透過影響根尖的向地性，進而使小白菜的根部上翹。

(三) 澱粉體對於小白菜根部上翹的影響

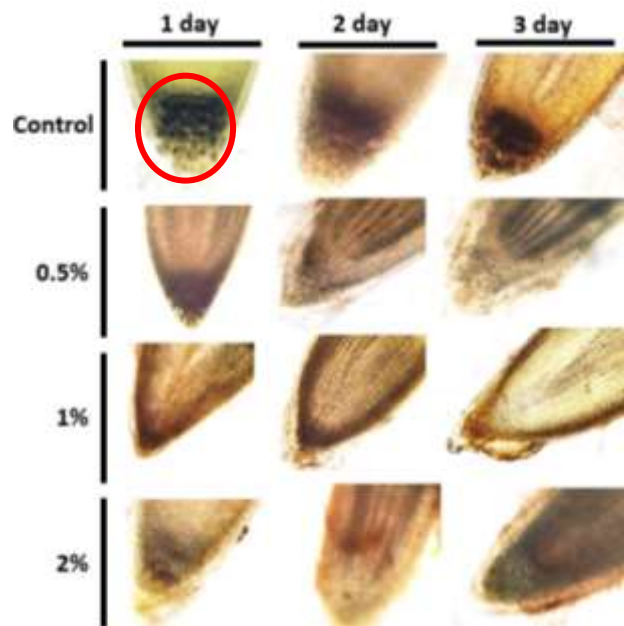
(催芽天數)

討論實驗時，想起先前所學：植物根尖有澱粉體，會影響植物體的向地性。我們猜測小白菜在逆境中會透過改變澱粉體數量導致喪失向地性，最後使根部上翹躲避樹汁。因此我們將加入樹汁的小白菜根部切片觀察其澱粉體。



(圖 4-5) 樹汁處理後的小白菜澱粉體

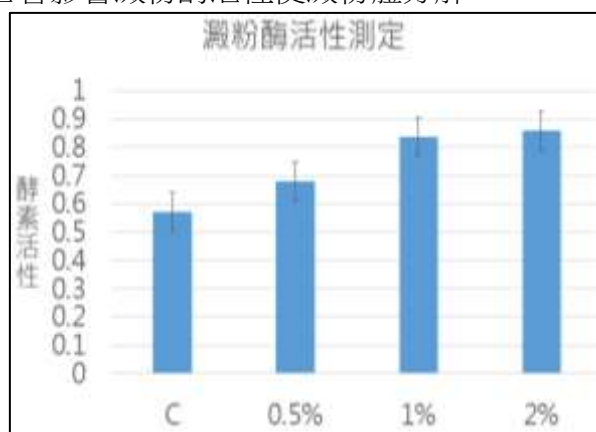
如圖 4-5，我們先將催芽不同天數的小白菜根尖切片觀察，發現隨著小白菜生長時間愈長，澱粉體(如紅圈處，深色顆粒狀物體)越明顯。接著我們將催芽不同天數的小白菜加入樹汁，發現澱粉體都消失。最後將三天後的小白菜處理不同濃度樹汁後，分別在加入樹汁後第一天、第二天及第三天切片觀察其澱粉體數量(如圖 4-7)，發現隨著天數增加，澱粉體數量會變少。根據實驗結果我們推測：樹汁會促使澱粉體分解或抑制澱粉體生成，使根部上翹。



(圖 4-6) 加入不同濃度樹汁的小白菜澱粉體

(四)澱粉酶活性與澱粉體數量的關係

在上一實驗中我們推測樹汁可能會分解澱粉體或抑制澱粉體生成，而我們想透過測定澱粉酶活性來了解樹汁是否會影響澱粉酶活性使澱粉體分解。

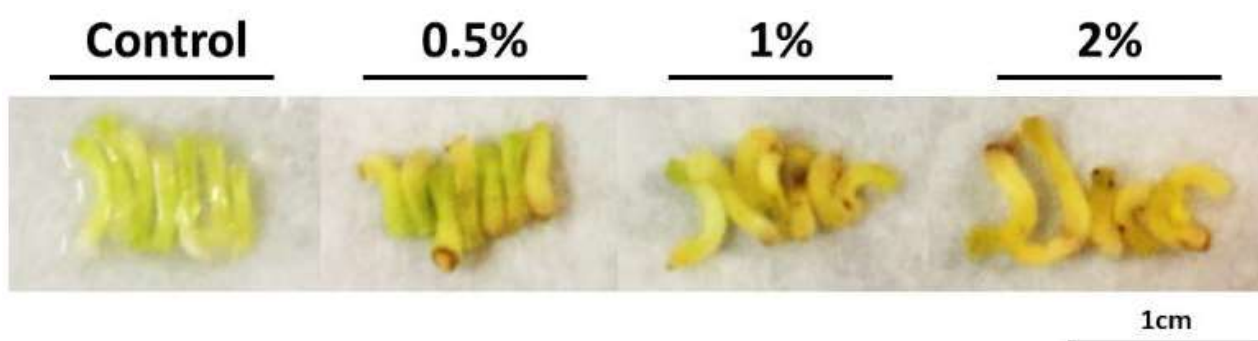


(圖 4-7) 不同濃度樹汁處理的小白菜澱粉酶活性(吸光值/g per hour)

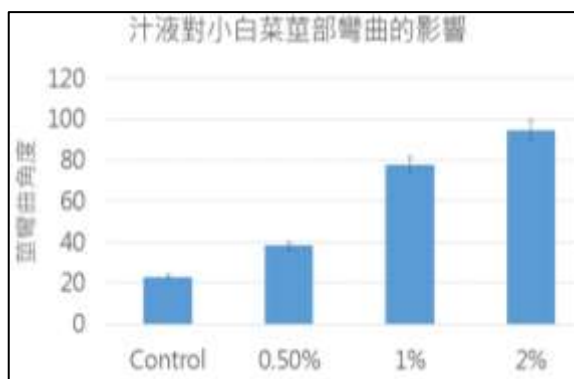
如圖 4-7，我們發現隨著樹汁濃度增加，澱粉酶活性會增加。綜合(三)、(四)實驗我們推測樹汁可能會影響澱粉酶活性上升讓澱粉體分解，應是使根部上翹的原因之一。

(五) 樹汁對小白菜莖部的影響

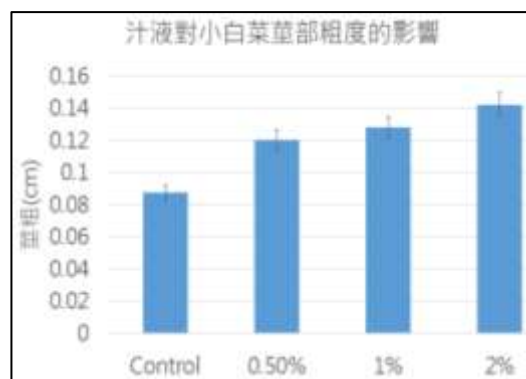
從圖 4-4 中發現切除根尖的小白菜在處理樹汁後上翹率雖然下降，但仍有一部分的小白菜根部有上翹，顯示小白菜可能還有其他的部位能控制根部上翹。此外，在一次實驗觀察中我們發現：種在樹汁中的小白菜，其莖似乎較粗壯、彎曲程度較大，是否代表莖也會影響根部上翹呢？因此我們將小白菜分別處理不同濃度的樹汁，在五天後觀察其寬度及彎曲程度。



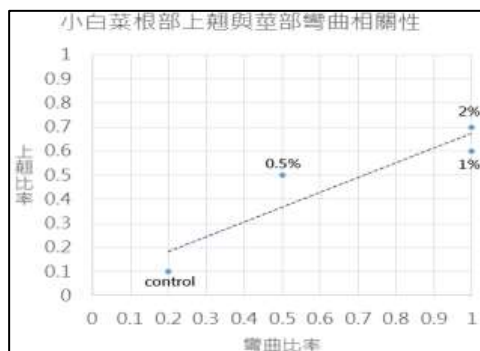
(圖 4-8) 小白菜莖部變粗



(圖 4-9) 樹汁與莖部彎曲關係



(圖 4-10) 樹汁對莖部粗度關係



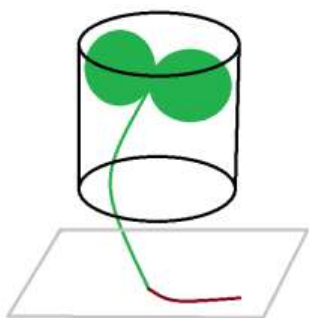
(圖 4-11) 上翹與彎曲相關性

由圖 4-9 可以看出種植在樹汁中的小白菜莖部彎曲程度較大，且有隨著濃度上升而彎曲程度變大的趨勢。而從圖 4-10 中得知，樹汁也會影響小白菜莖的寬度：與控制組相較之下，種在樹汁中的小白菜莖部較粗，也有隨著濃度上升而變粗的趨勢。最後將上翹與彎曲數據比對發現(如圖 4-11)，只要莖部彎曲的植株，其根部皆有上翹現象。

綜合以上兩個實驗，發現在逆境中的小白菜莖部會有彎曲、變粗的現象；我們設想，**小白菜可能會透過以上的方式來使其質心偏移，造成植株傾倒使其根部上翹。**

(六) 質心偏移推論-吸管套反證實驗

在先前的實驗中，我們發現小白菜的莖彎曲可能是根部上翹的關鍵。綜合以上所述，我們認為「質心偏移」是小白菜為了要使其根部上翹而發動的機制之一。為了證明此推論，我們設計了一個實驗裝置(如圖 4-12)，利用吸管套住小白菜使其無法彎曲，觀察根部是否會上翹。實驗結果如圖 4-13，發現被套住的小白菜莖部無法彎曲，其根部也沒有上翹的情形。

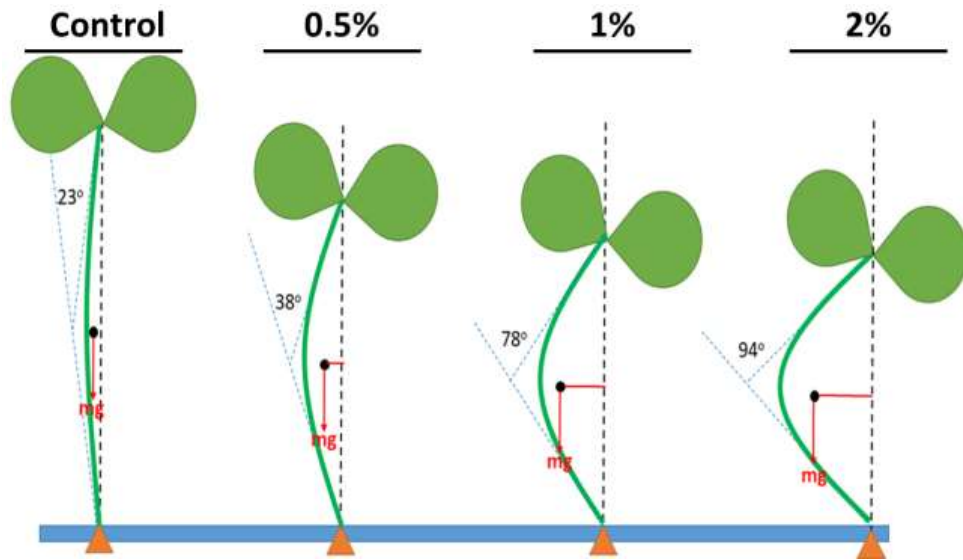


(圖 4-12) 實驗裝置



(圖 4-13) 在實驗裝置中的小白菜

綜合以上所述，我們發現小白菜的根部與莖部皆會影響根尖的上翹；根部的機制應為分解澱粉體或抑制澱粉體合成使其喪失向地性，而莖部則是透過「質心偏移」造成植株傾倒使其根部上翹(如圖 4-14)。



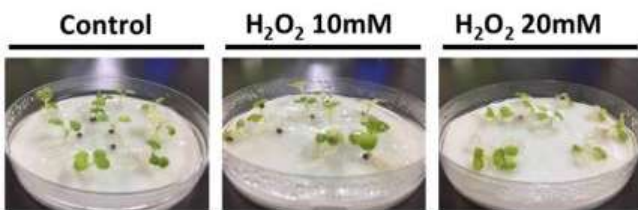
(圖 4-14) 莖彎曲與質心偏移示意圖

五、過氧化物質(ROS)對小白菜根上翹的影響

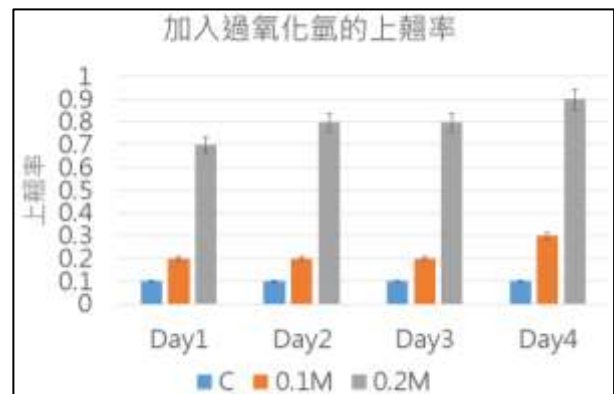
接著我們進一步對小白菜根部上翹的原因進行探討。查詢資料後得知：近期研究發現過氧化物質(ROS)可能不只會對植物體造成傷害，也可能被植物體當作訊息傳遞分子，啟動對抗逆境的機制。

(一) 外加ROS觀察小白菜根上翹

為了知道過氧化物質會不會影響上翹，於是我們將催芽三天的小白菜加入0.1M及0.2M的過氧化物質(H_2O_2)，並在四天後記錄其上翹率。



(圖5-1) 加入 H_2O_2 後小白菜生長情形

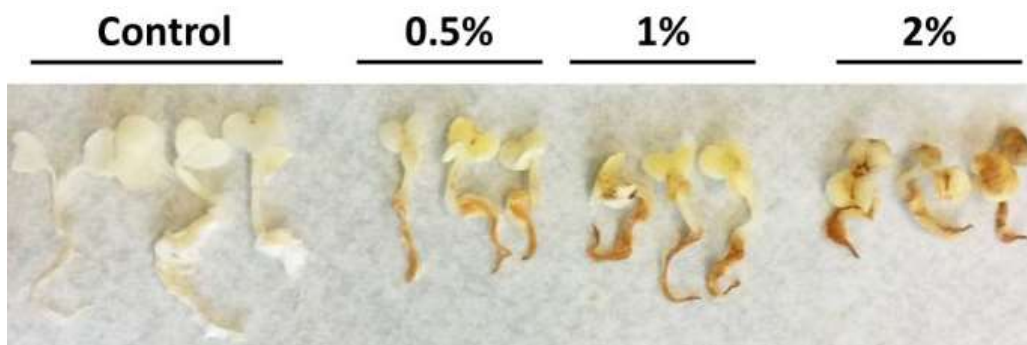


(圖5-2) 加入 H_2O_2 後小白菜上翹比率

實驗結果如圖5-2，我們發現小白菜在處理過氧化氫後根部都有上翹情形，且在0.2M過氧化氫處理下上翹率比0.1M及控制組高出許多。推測過氧化氫在小白菜體內可能扮演訊息傳遞的角色，使根部上翹；且會促進小白菜上翹的過氧化氫濃度可能在0.1M~0.2M之間。

(二) 種在樹汁中的小白菜ROS染色

由先前實驗發現，外加過氧化氫會導致小白菜上翹，推測ROS可能作為小白菜的訊息傳遞分子。我們想進一步了解過氧化物質是累積在小白菜的哪一部位，故將催芽三天的小白菜種植在不同濃度樹汁中，並在四天後利用DAB進行ROS染色，觀察過氧化物質的累積情形與位置，其中深褐色部分是ROS累積較多處。

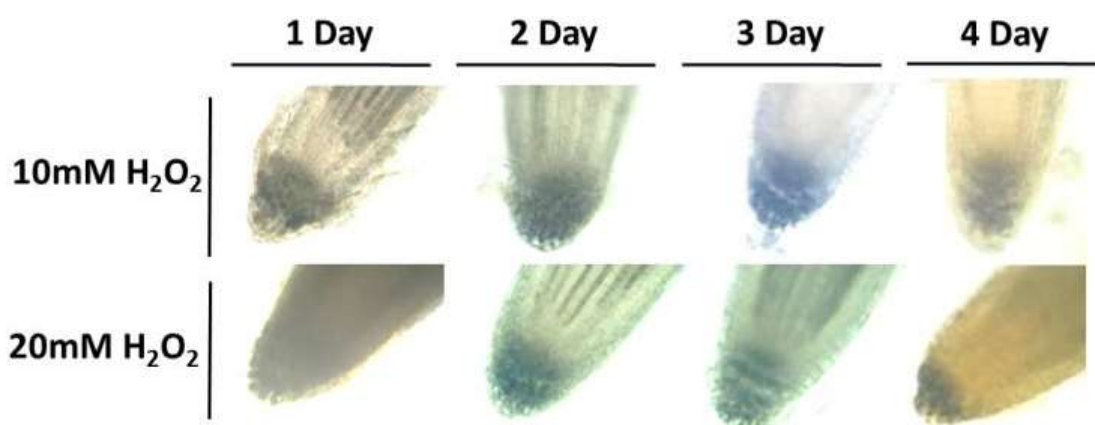


(圖 5-3) ROS 在小白菜體內的累積

觀察圖 5-3 可知，除了控制組沒有累積 ROS 之外，其餘種植在樹汁中的小白菜在根部及莖頂有變色，我們推測在逆境中的小白菜會累積 ROS，可能是導致根部上翹的原因。

(三) 過氧化氫影響上翹與澱粉體關係

從上一實驗得知處理 ROS 的小白菜會在根部及莖頂累積 ROS，我們不禁聯想到，先前的實驗發現小白菜澱粉體數量減少可能會使其根部上翹，因此我們將催芽三天大的小白菜外加過氧化氫，並在四天後將根尖切片放到顯微鏡下觀察其澱粉體數量。

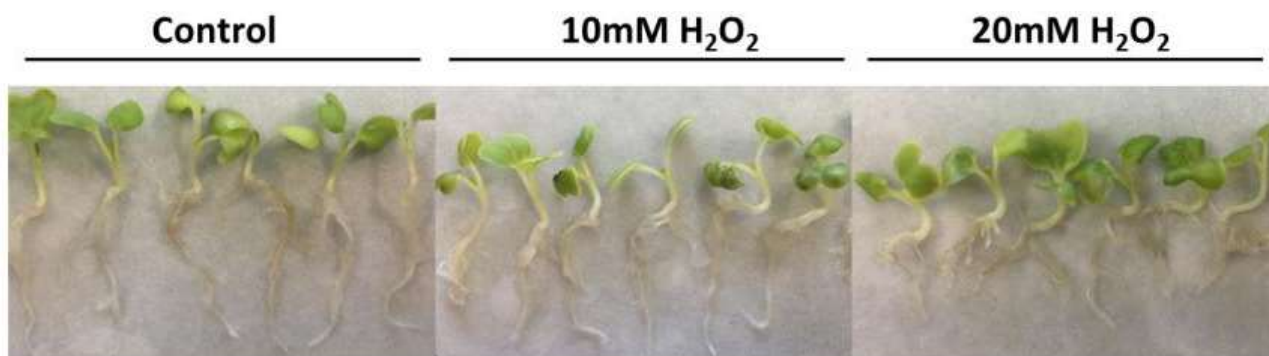


(圖 5-4) 在過氧化氫處理下澱粉體數量

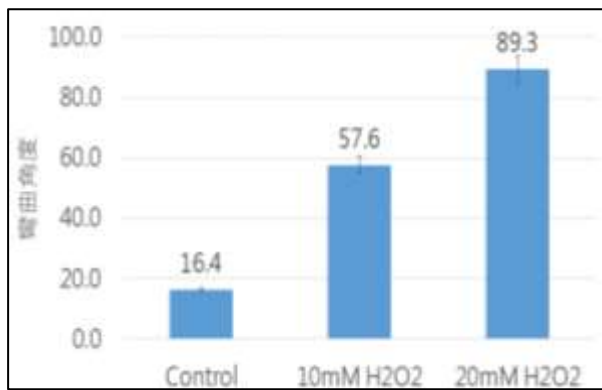
從圖5-4中得知小白菜在過氧化氫處理下仍具有澱粉體，且數量與控制組相差不大。因此我們推測：雙氧水調控的上翹機制不是透過澱粉體途徑。

(四) 外加過氧化氫與莖彎曲關係

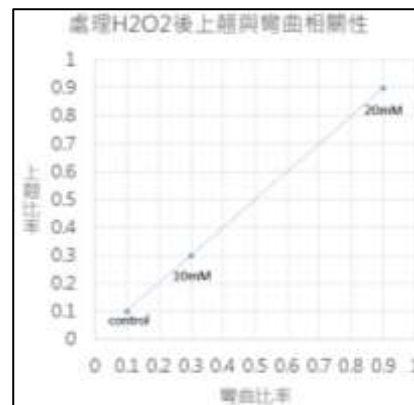
先前發現莖彎曲會影響小白菜上翹，我們推測雙氧水調控的上翹有可能是透過莖彎曲的徑。因此我們將催芽三天大的小白菜外加過氧化氫，在四天後測量其莖部彎曲角度。



(圖 5-5) 在過氧化氫處理下小白菜莖彎曲情形



(圖 5-6) 在過氧化氫處理下莖彎曲角度



(圖 5-7) 同時有根部上翹及莖彎曲比率

觀察圖 5-5、圖 5-6 可以發現，小白菜彎曲的程度會隨著過氧化氫濃度提高而變大，而由圖 5-7 可以發現莖彎曲的小白菜根部都有上翹情形，因此我們推測：**當小白菜面對過氧化物質逆境時，會使莖彎曲而導致根部上翹。**

六、鈣離子對小白菜根上翹的影響

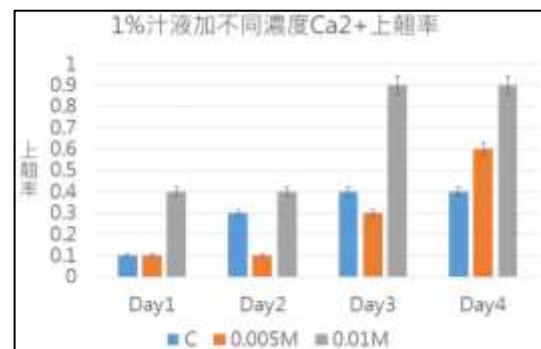
除了過氧化物以外，我們從文獻中得知植物體內最常見的訊息傳遞分子是鈣離子，當植物接觸到逆境時，會被植物體當作訊息傳遞分子來啟動防禦機制。因此我們想探討鈣離子是否參與上翹機制。

(一) 外加樹汁時鈣離子濃度變化與上翹的關係

為了知道鈣離子會不會影響上翹，於是我們將催芽三天的小白菜種植在1%樹汁中，並外加5mM及10mM濃度的鈣離子，在四天後記錄其上翹率。



(圖 6-1) 小白菜處理鈣離子後的生長情形



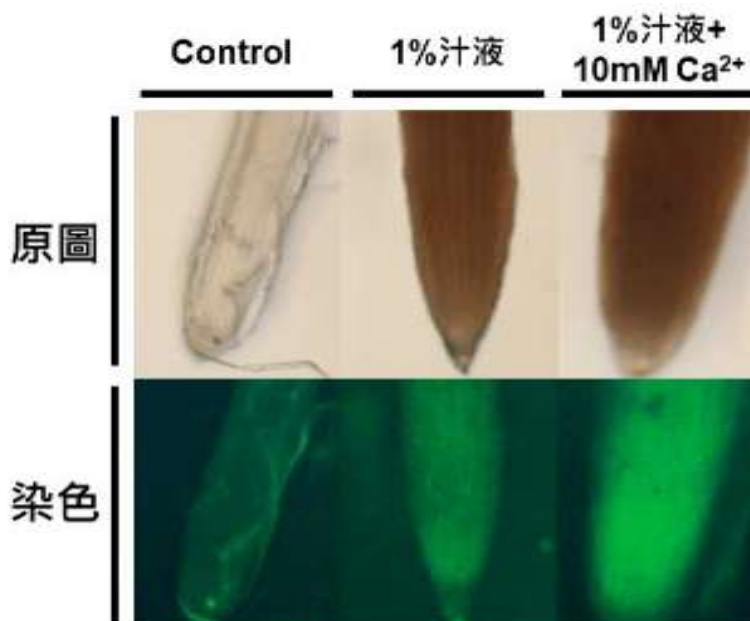
(圖 6-2) 小白菜處理鈣離子後的上翹率

由圖 6-1 得知，外加鈣離子的小白菜與單純外加 1% 樹汁的小白菜相比，生長情形較佳；由圖 6-2 可知處理樹汁的小白菜在外加 0.01M 的鈣離子後，上翹率達到 0.9，且上翹率與鈣離子的添加濃度有正相關。因此我們推測，**鈣離子與小白菜的上翹機制有關**；而鈣離子濃度越高上翹率越高，表示鈣離子越多，其逆境機制作用會越明顯，**推測鈣離子可能參與上**

翹的訊息傳遞。此外，外加鈣離子的小白菜生長情形較佳，則可驗證圖 3-3、3-4 的結果，代表上翹為小白菜的生存機制。

(二) 鈣離子在小白菜體內的累積

由上一實驗我們推測鈣離子與小白菜上翹機制有關；接著我們想確認在處理樹汁後，小白菜體內的鈣離子數量變化，藉此推論鈣離子濃度變化是否影響逆境應變機制。查詢文獻得知：透過螢光染色法將鈣離子染色，能夠看出鈣離子在植物體內的分布情形，確認外加的鈣離子是否能進入小白菜體內。我們想藉此確認小白菜在樹汁逆境下是否會累積鈣離子。



(圖 6-3) 小白菜根部處理鈣離子後的螢光染色

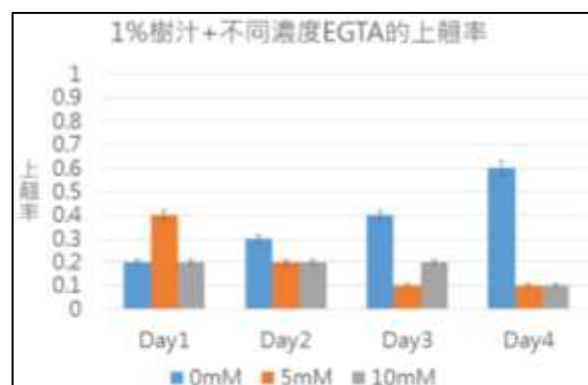
如圖 6-3，發現正常的小白菜根部會累積些許鈣離子，而處理 1% 樹汁的小白菜根部染色較明顯，表示小白菜在樹汁的逆境下會使鈣離子累積，可能會影響上翹機制；另外，處理 1% 樹汁及 10mM 鈣離子的小白菜根部螢光染色最深，表示外加鈣離子會被根部吸收。

(三) 鈣離子螯合劑(EGTA)反證

從圖 6-3 得知小白菜外加鈣離子後上翹率會提高，而如果將環境中原本的鈣離子去除，上翹率會不會下降？進一步搜尋相關文獻後，發現鈣離子螯合劑(EGTA)能夠去除環境中的鈣離子；於是我們將催芽三天的小白菜種植在 1% 樹汁中，並外加 5mM 及 10mM 濃度的 EGTA，並在四天後記錄其上翹率。



(圖 6-4) 處理樹汁+EGTA 後的生長情形

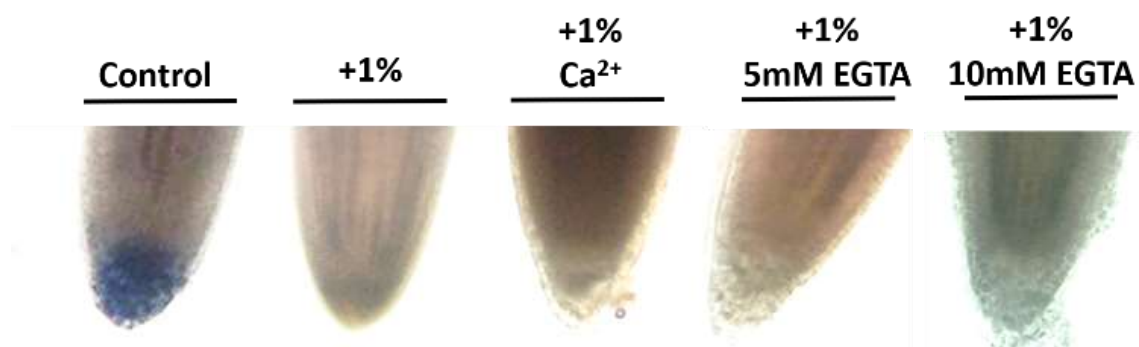


(圖 6-5) 處理樹汁+EGTA 後的上翹率

觀察其外表型(如圖 6-4)，發現在加入 EGTA 後植株變的較矮小，生長情況較差；而由圖 6-5 可以發現，處理 EGTA 後小白菜根部的上翹率呈現下降趨勢：從 1mM 的 0.4，到 5mM 和 10mM 只剩下 0.1，表示外加 EGTA 螯合鈣離子後，小白菜原本受到鈣離子影響而作用的上翹機制便受到影響。此結果能與圖 6-3 之外加鈣離子能增加上翹率相呼應，證實了鈣離子會對小白菜根部上翹產生影響。

(四) 鈣離子影響上翹與澱粉體關係

從文獻中得知鈣離子是小白菜中的重要傳訊分子，我們聯想到先前的實驗發現小白菜澱粉體數量減少可能會使其根部上翹，我們猜想鈣離子會不會參與澱粉體調節小白菜根部上翹的機制？因此我們將催芽三天大的小白菜外加 EGTA 去除生長環境中的鈣離子，在四天後將根尖切片置於顯微鏡下，觀察小白菜根部澱粉體分布情形。

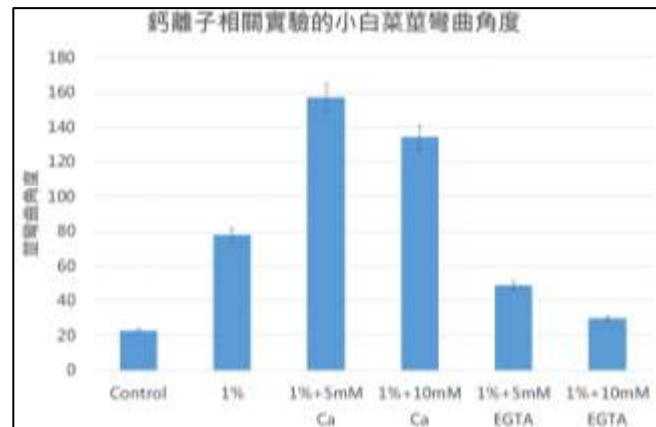


(圖 6-6) 在處理 1%樹汁環境中外加鈣離子與 EGTA 下小白菜根尖澱粉體的分布情形

觀察圖 6-6，發現除了控制組以外，外加 EGTA 和外加鈣離子的小白菜根部澱粉體都消失不見，但對照圖 6-5 發現處理樹汁並外加 EGTA 的小白菜，根部上翹率卻呈現下降的趨勢。因此我們推測：鈣離子並不會參與澱粉體消失造成根部上翹的機制。

(五) 外加鈣離子與莖彎曲關係

由圖 6-6 得知鈣離子不會影響澱粉體，因此我們回頭觀察其外表型，發現莖部有明顯彎曲現象，故推測鈣離子所調控的上翹機制有可能是透過莖彎曲的途徑。

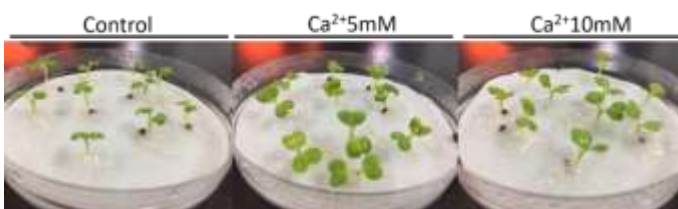


(圖 6-7) 在樹汁與鈣離子處理下小白菜莖的彎曲角度比較

如圖 6-7，我們將催芽三天大的小白菜外加過氧化氫，在四天後測量其莖部彎曲角度，發現處理樹汁的小白菜莖彎曲角度約 78 度；外加 5mM 及 10mM 的鈣離子，其莖彎曲角度分別為 157 及 134 度，皆有上升趨勢；而在加入 5mM 及 10mM 的 EGTA 後，小白菜莖彎曲的角度反而下降至 49 度及 30 度，驗證外加鈣離子會使小白菜莖彎曲，進而影響上翹。

(六) 單純加入鈣離子對上翹的影響

由上述實驗我們得知，樹汁外加鈣離子，小白菜莖彎曲及上翹程度會提高；同時也好奇，如果只有加入鈣離子到生長環境中，會不會啟動一連串的反應？因此我們將催芽三天大的小白菜加入不同濃度的鈣離子，在四天後記錄上翹率。



(圖 6-8) 小白菜處理鈣離子後的生長情形

上翹率	0mM	1mM	5mM	10mM
Day1	0	0	0	0
Day2	0	0	0	0
Day3	0	0	0	0
Day4	0	0	0	0

(圖 6-9) 小白菜處理鈣離子後的上翹率

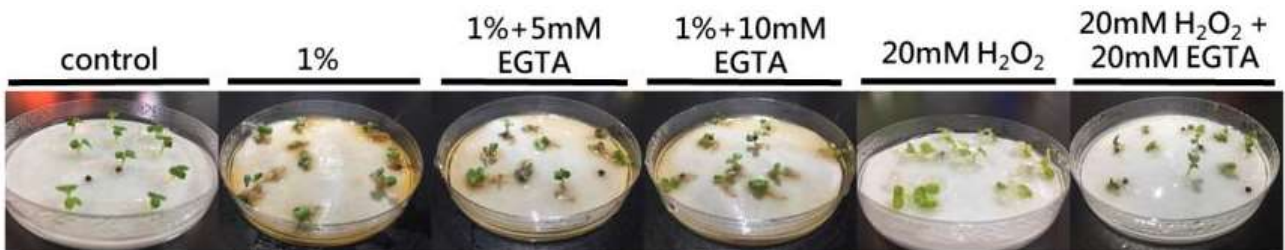
由圖 6-9 發現，單純加入鈣離子無法使小白菜彎曲上翹，推測仍有未知的因素導致此應對機制的啟動；鈣離子則是輔助、加強訊號的因子，濃度提高有助於擴大反應。

七、鈣離子和 ROS 間的交互作用機制探討

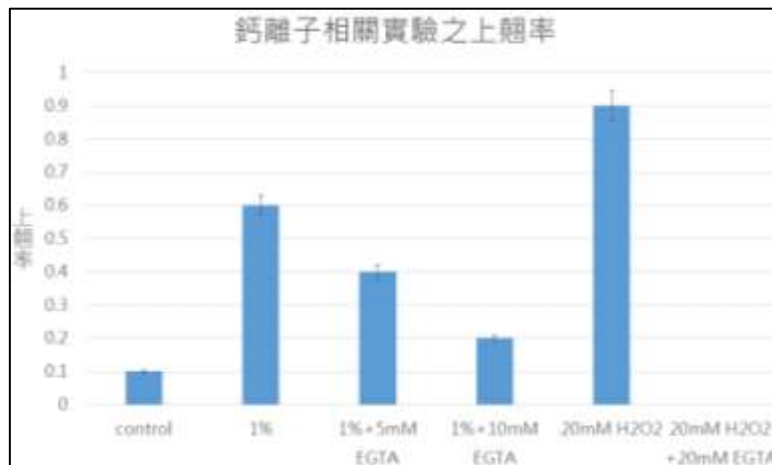
由先前的實驗發現，鈣離子和 ROS 皆會使小白菜根部上翹，且兩種物質作用的機制相同：皆是透過影響莖彎曲的方式使質心偏移，導致根部上翹以脫離逆境。但經由圖 7-6 發現鈣離子並非直接啟動機制的因子，可能有其他物質與鈣離子共同作用。因此我們猜測，鈣離子和 ROS 之間可能具有某種關聯，兩者共同影響小白菜莖彎曲的機制。為了確認兩者的相互作用關係，因此我們想透過阻斷其中一種物質的方法來觀察其生長情形以及上翹的現象。

(一) 螯合鈣離子對上翹的影響

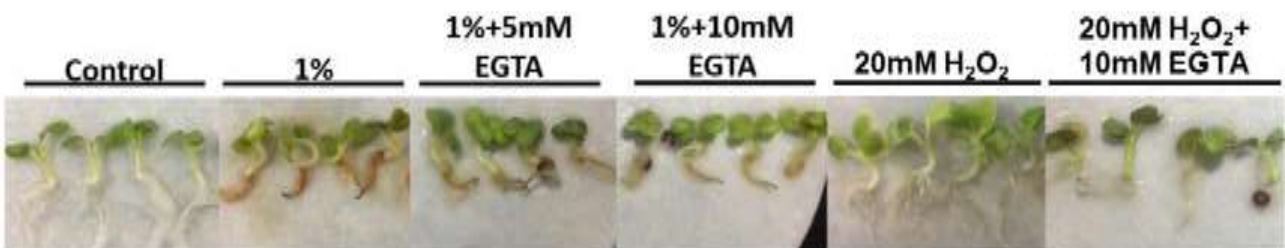
為了了解螯合鈣離子對上翹是否有影響，因此我們在催芽三天的小白菜中加入過氧化氫以及鈣離子螯合劑，放置四天後觀察。



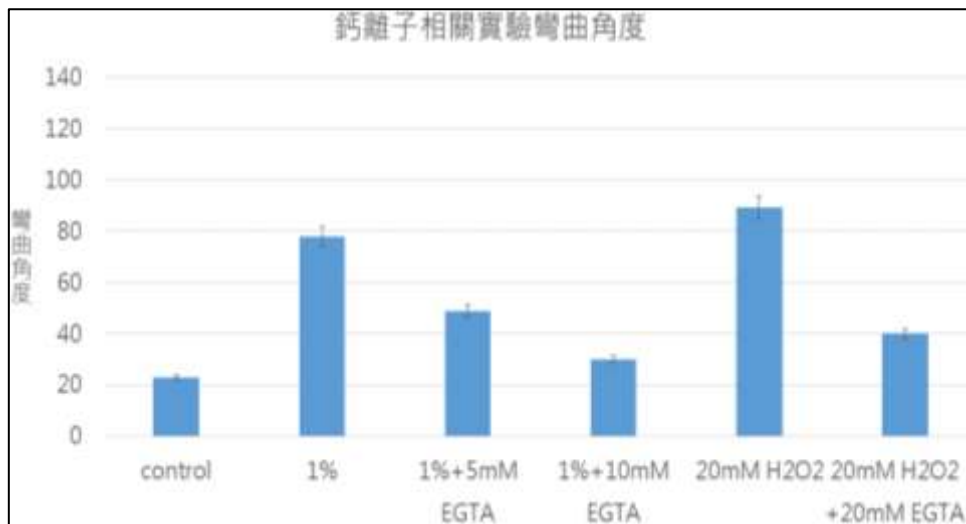
(圖 7-1) 螯合鈣離子後小白菜的生長情形



(圖 7-2) 螯合鈣離子後小白菜根的上翹比率



(圖 7-3) 螯合鈣離子後小白菜莖的彎曲情形



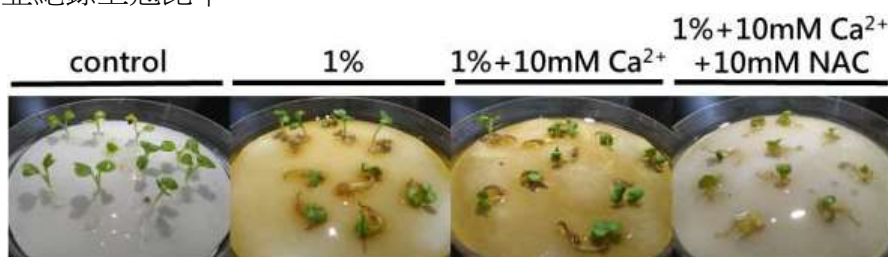
(圖 7-4) 螯合鈣離子後小白菜莖的彎曲角度比較

比較上翹率(如圖 7-2)，發現同樣都有加入樹汁的小白菜，若外加 EGTA 則上翹率會降低，與先前圖 6-5 實驗的趨勢大致相同，顯示鈣離子濃度減少會影響小白菜的上翹機制。同時，我們也觀察到：加入 20mM 過氧化氫及 EGTA 的小白菜，上翹率比加入 20mM 過氧化氫的小白菜還低，應是 EGTA 螯合鈣離子後，會影響 ROS 所導致的上翹。

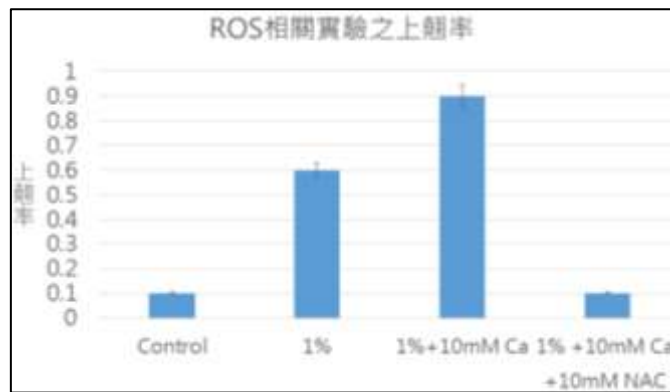
比對彎曲角度的結果，也有與上翹率相同的趨勢：原本種植在 20mM 過氧化氫環境中的小白菜彎曲角度約為 90 度，外加 EGTA 後其彎曲角度會下降至 40 度左右，我們猜測可能是 EGTA 螯合鈣離子後，ROS 作用的莖彎曲途徑便受到影響。根據上述實驗結果，我們推測鈣離子會影響 ROS 作用的莖彎曲途徑，進而使質心偏移，最終導致上翹。

(二) 去除 ROS 對上翹的影響

從上一實驗得知，鈣離子會參與 ROS 的作用機制，同時也想到：既然鈣離子也有一條影響的路徑，那 ROS 會不會反過來影響鈣離子的作用機制呢？因此我們接著探討去除 ROS 對上翹是否有影響：將催芽三天的小白菜種植在 1% 樹汁、鈣離子及抗氧化劑 NAC 中，放置四天後觀察並紀錄上翹比率。



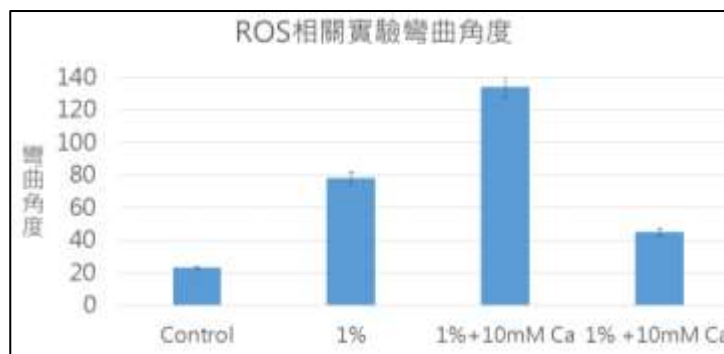
(圖 7-5) 去除 ROS 後小白菜的生長情形



(圖 7-6) 去除 ROS 後小白菜根的上翹比率



(圖 7-7) 去除 ROS 後小白菜莖的彎曲情形



(圖 7-8) 去除 ROS 小白菜莖的彎曲角度比較

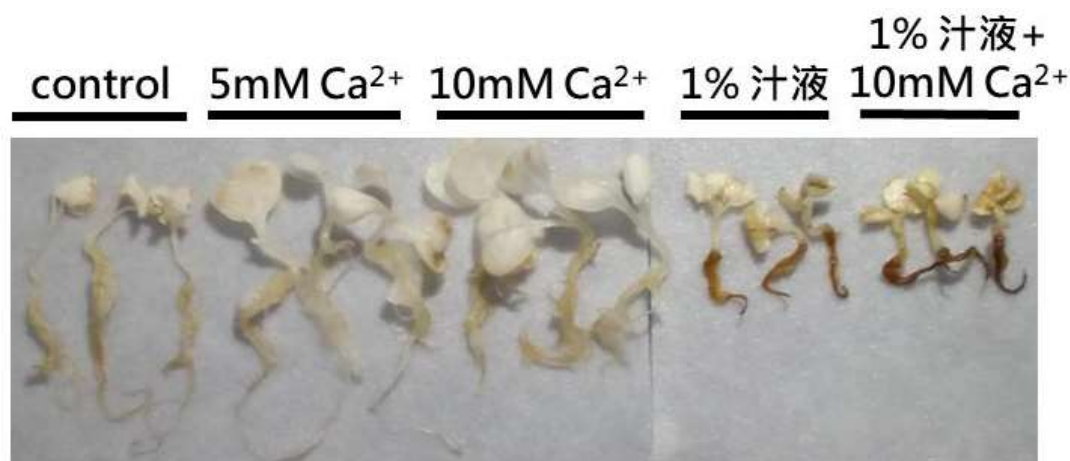
由上翹率數據(如圖 7-6)發現種植在 1%樹汁中的小白菜上翹率為 0.6，而種植在 1%樹汁及 10mM 鈣離子環境中的小白菜其上翹率達到 0.9，顯示提高鈣離子濃度會提升小白菜的上翹表現。我們也發現，種植在 1%樹汁、10mM 鈣離子及 10mM NAC 中的小白菜，上翹率只有 0.1，比種植在 1%樹汁及 10mM 鈣離子中的小白菜的上翹率 0.9 還低，推測應是 NAC 還原 ROS 後，會影響原本鈣離子所作用的上翹途徑。

比對彎曲角度後我們發現，其趨勢與上翹率大致相同：原本種植在 1%樹汁及 10mM 鈣離子中的小白菜彎曲角度約為 134 度，外加 NAC 後其彎曲角度便減少至 45 度。我們猜測可能是 NAC 的還原作用使 ROS 濃度下降，連帶影響鈣離子機制使彎曲角度下降。根據上述實驗結果，我們推測 ROS 會影響鈣離子作用的莖彎曲途徑，進而使質心偏移，最終導致上翹。

經由上述的兩組實驗，發現不論去除鈣離子或 ROS，都會使小白菜的莖彎曲程度下降以及上翹比率降低；推論鈣離子和 ROS 之間並不是單純的上下游關係，而是存在著更複雜的交互作用，共同影響小白菜的莖彎曲途徑。

(三) 觀察樹汁外加鈣離子小白菜的 ROS 累積

根據上述實驗結果，我們推測：鈣離子引起的上翹機制需要ROS協助才能發揮效用，同時ROS引起的上翹機制也必須有鈣離子參與才能作用，兩者缺一不可。為了進一步證明這個互相調控的機制，我們想到可以用先前做過的DAB染色：將同時加入樹汁與鈣離子的小白菜以及單純加入樹汁的小白菜利用DAB進行ROS染色後觀察其累積處，便可得知鈣離子是否會導致ROS的累積。

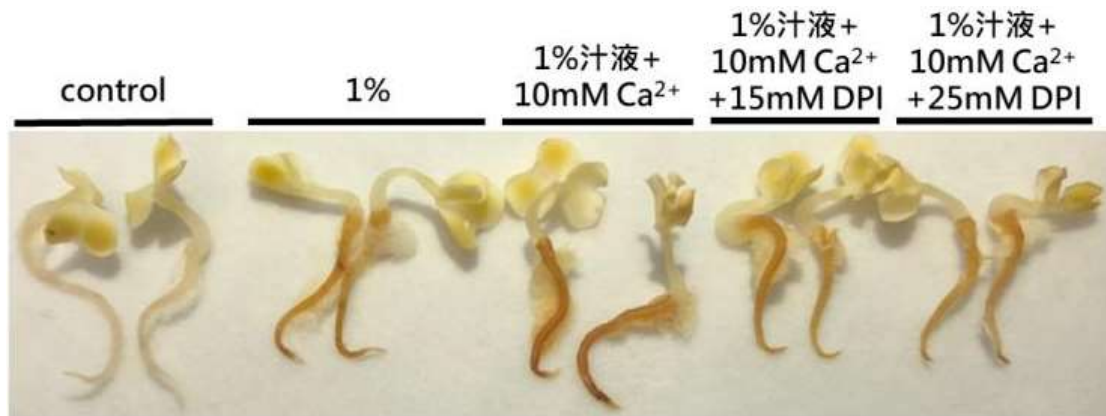


(圖 7-7) 鈣離子相關處理後用 DAB 染 ROS 結果比較

由圖 7-7 可以看出(深褐色部分是 ROS 累積較多處)，單純加入鈣離子的小白菜體內不會累積 ROS；而觀察同時都有加入 1%樹汁的小白菜時，發現有額外加入鈣離子的小白菜和只有加入 1%樹汁的小白菜相比，染色結果有加深的現象，因此符合我們的先前的推測：鈣離子能協助 ROS 累積，進而導致小白菜莖彎曲、根部上翹等一連串機制作用。

(四) Rboh 的參與

經由上述實驗我們發現：額外加入鈣離子的組別，小白菜根部上翹率以及莖的彎曲角度都明顯上升；從圖 7-7 發現，處理 1%樹汁並加入鈣離子的組別，ROS 染色結果有較深的現象，推測鈣離子的作用會幫助 ROS 的累積。我們進而猜測，可能有某種因素會調控兩種物質之間的作用。查詢相關文獻後，得知了一種存在於植物細胞膜上的酵素「Rboh」，此種酵素在鈣離子的刺激下，會累積 ROS 使濃度上升，或許是因為在 Rboh 的作用下，使我們加入鈣離子到小白菜的樹汁逆境後，會導致小白菜的根部上翹率以及莖彎曲角度上升。為了驗證 Rboh 是否參與兩物質之間的交互作用，因此我們利用 DPI 加入小白菜的生長環境中來抑制 Rboh 的作用，並利用 DAB 進行小白菜的 ROS 染色，觀察 ROS 的累積量變化。



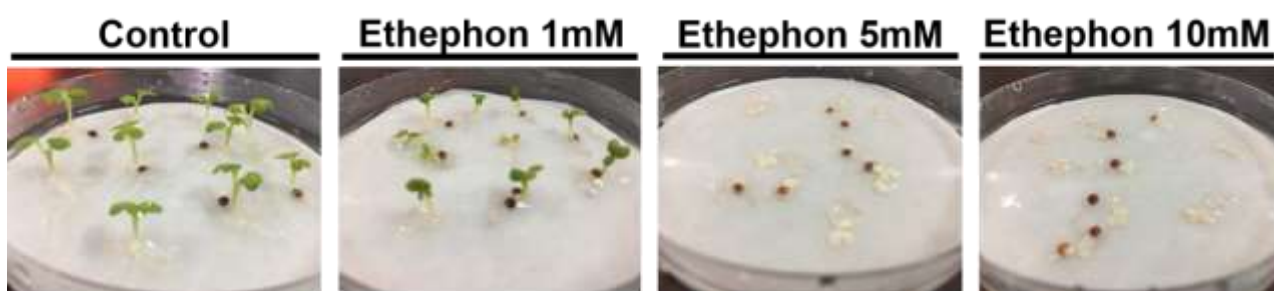
(圖 7-8) 小白菜處理 DPI 後 ROS 染色結果比較

觀察圖 7-8(深色處為 ROS 累積處)，發現無加入樹汁的小白菜不會累積 ROS，而加入樹汁及鈣離子的小白菜其 ROS 累積量比只加入樹汁的小白菜還多，與先前實驗結果吻合。此外我們發現：外加 DPI 的小白菜，其 ROS 累積量較加入樹汁及鈣離子的小白菜有明顯下降，推測 DPI 會抑制 Rboh 的作用，可能使鈣離子無法成功刺激 Rboh 造成 ROS 累積。

綜合以上結果我們推測：當小白菜生長在樹汁逆境中時，體內的鈣離子濃度會上升進而刺激 Rboh 累積 ROS，最終使莖彎曲角度增加導致質心偏移，達到上翹的結果。

八、乙烯對小白菜根上翹的影響

根據上面的實驗，我們觀察到種植在樹汁中的小白菜，會有變短、變粗、變彎的現象，這讓我們聯想到課堂中所提到有些植物面對乙烯刺激所產生的「三相反應」。我們好奇，小白菜的根上翹會不會受到乙烯所影響呢？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-ethylphosphonicacid, CEPA)，將液體稀釋於水溶液當中便會釋放乙烯。我們便觀察小白菜在乙烯處理下，其根部上翹現象是否有受影響。



(圖8-1) 在Ethephon處理下小白菜的生長情形

上翹率	C	1mM	5mM	10mM
Day1	0	0.1	0	0
Day2	0	0	0	0
Day3	0	0	0	0
Day4	0	0	0	0

(圖8-2) 在Ethephon處理下小白菜根部的上翹率

由圖8-1觀察到，處理乙烯後的小白菜，卻沒有明顯的變矮、變粗、變彎現象，反而造成小白菜變白、變軟，故從本實驗可知乙烯與小白菜根部上翹現象可能無關。

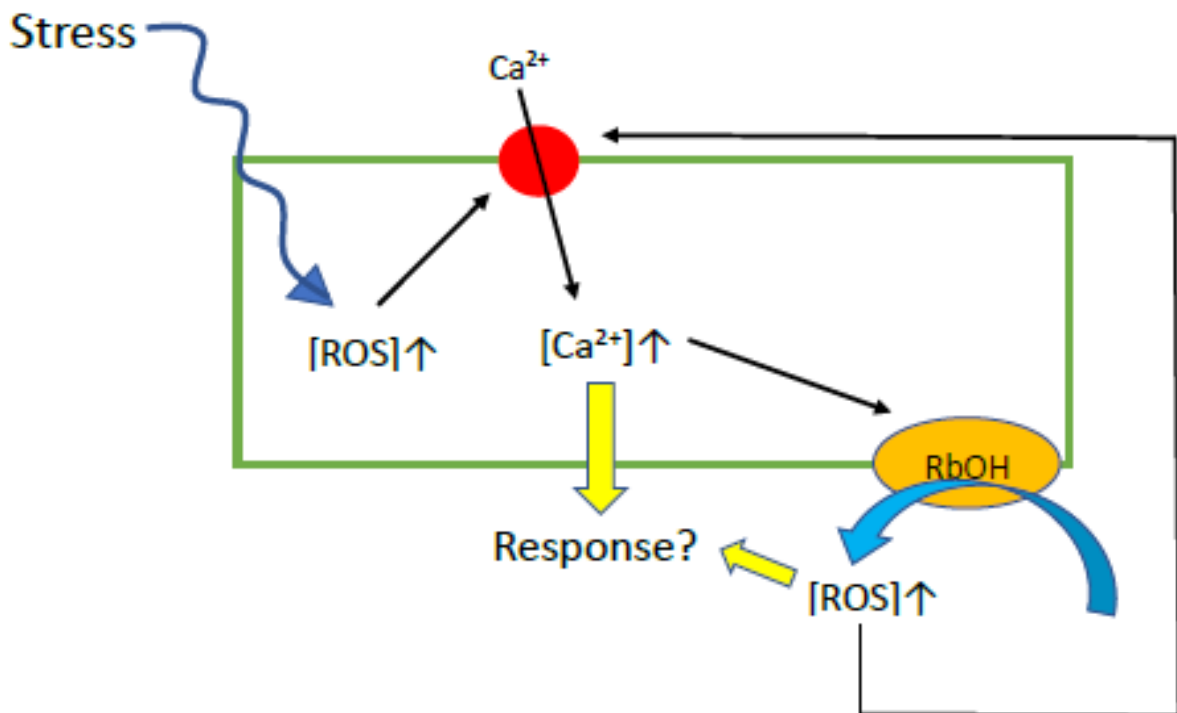
陸、討論

一、雙氧水對鈣離子正回饋的影響

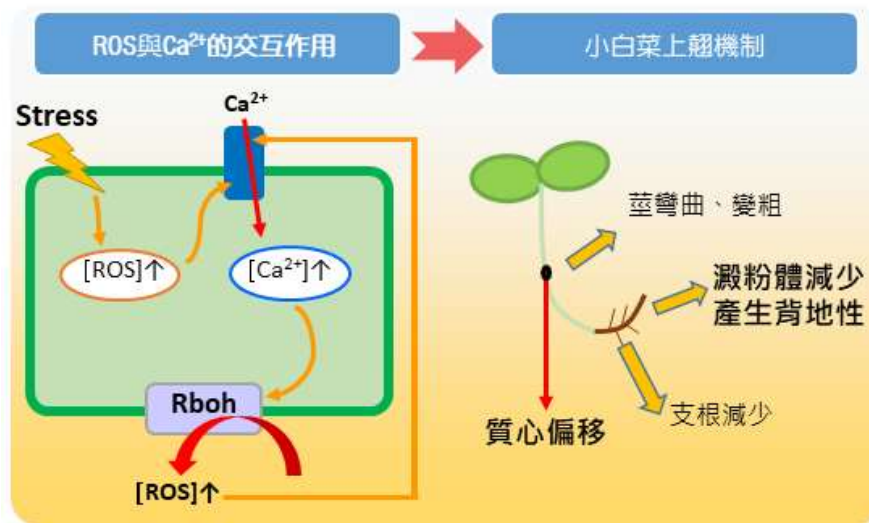
由先前研究 ROS 和鈣離子的交互作用時，我們得知：若要使植物根部上翹，鈣離子和 ROS 的累積兩者缺一不可，也就是說：在小白菜的生長環境中「加入鈣離子卻去除 ROS」或是「加入 ROS 卻螯合鈣離子」，小白菜都沒有上翹情形。在查詢相關文獻時，得知 ROS 的累積會造成鈣離子通道的打開，造成植物體內鈣離子的濃度上升；我們推測，植物體內可能利用此機制，累積鈣離子造成上翹，又或是累積的鈣離子造成 ROS 物質累積，最後導致植物上翹。

二、IAA 傳訊

由圖 5-3 我們發現，ROS 大多累積在小白菜的根部和莖頂，莖的中間卻完全沒有累積 ROS 的情形，因此我們聯想到了高中課程所提到的「生長素」—源於根部與莖頂，且能使植物產生彎曲（向性）。查詢相關資料後，得知一種名為 PIN 蛋白的酵素會參與生長素的運送；我們推測，有可能是 ROS 或是 ROS 誘導累積的鈣離子影響到 PIN 蛋白，改變了生長素的運送路徑，最後讓植物的莖產生彎曲，最終導致上翹情形使植物脫離逆境。



柒、結論



我們觀察到小白菜生長在含有榕樹及鳳凰木汁液的逆境下會有上翹的現象，透過滲透壓的實驗推測上翹應是受到相剋化合物影響而非滲透壓。後經由實驗發現有上翹的植株生長情況較佳，推測上翹的主要原因是為了逃離逆境。

小白菜主要透過幾項因素來使根部上翹：抑制根尖澱粉體之合成或促進其分解，使之失去向地性；使莖部彎曲和變粗，導致質心偏移使植株較易傾倒；加上抑制支根生長使根系抓地力不足，共同影響小白菜的質心偏移機制。

實驗後我們發現小白菜種植在含有鈣離子與 ROS 的環境中會有莖彎曲以及上翹情形，推測兩物質作為訊息傳遞分子，透過莖彎曲使植物上翹。同時我們也發現：若小白菜體內的鈣離子與 ROS 其中一物質濃度下降會導致小白菜根部上翹率下降，因而得知兩物質會互相影響，共同作用使莖部彎曲後導致上翹。另外，小白菜體內鈣離子濃度上升會使 ROS 累積量變多，且種植在只含有鈣離子環境中的小白菜其根部不會上翹。根據上述實驗結果，我們推論其上翹機制應是透過 ROS 的刺激導致鈣離子濃度上升，經由一連串的反应後使莖部彎曲，達到上翹目的。

捌、參考文獻及其他

1. 高景輝（2005）。*植物生理分析技術*。臺北市：五南。
2. Aaron Baxter, Ron Mittler, Nobuhiro Suzuki(2013). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, Volume 65, Issue 5, 1 March 2014, Pages 1229 – 1240.
3. Zhulong Chan, Ken Yokawa, Woe-Yeon Kim, Chun-Peng Song(2016). *ROS Regulation during Plant Abiotic Stress Responses. frontiers in Plant Science*.
4. 李芳琳。2005。國立中興大學農藝學系碩士學位論文。Ascorbate peroxidase 8, glutathione reductase2 及 glutathione reductase3 在離層酸誘導幼苗老化扮演之角色。
5. 楊光。2018。山梨醇對植株抗逆性作用的研究進展。
6. 盧裔，盧重逸，張馥鏗。2012。『剋』敵致勝－植物的相剋作用。

【評語】 052102

1. 本研究主要在探討相剋物處理下根部上翹的機制。
2. 作者觀察到鳳凰木萃取液會讓小白菜根上翹，接著探討哪些訊息傳導物質會讓小白菜根上翹，成果相當豐碩。
3. 實驗結果發現根可能藉由提高澱粉酶活性降低根尖澱粉體含量，進而失去向地性而翹起。而鈣離子會刺激 Rboh 酵素酶生 ROS 累積，再進而影響根莖的生理變化造成上翹，而使小白菜能藉此逃離逆境。
4. 對研究結果所代表的意義，有相當的了解。
5. 本研究結果已獲初步成果，期待未來能繼續對根尖上翹的調節機制做進一步分析。

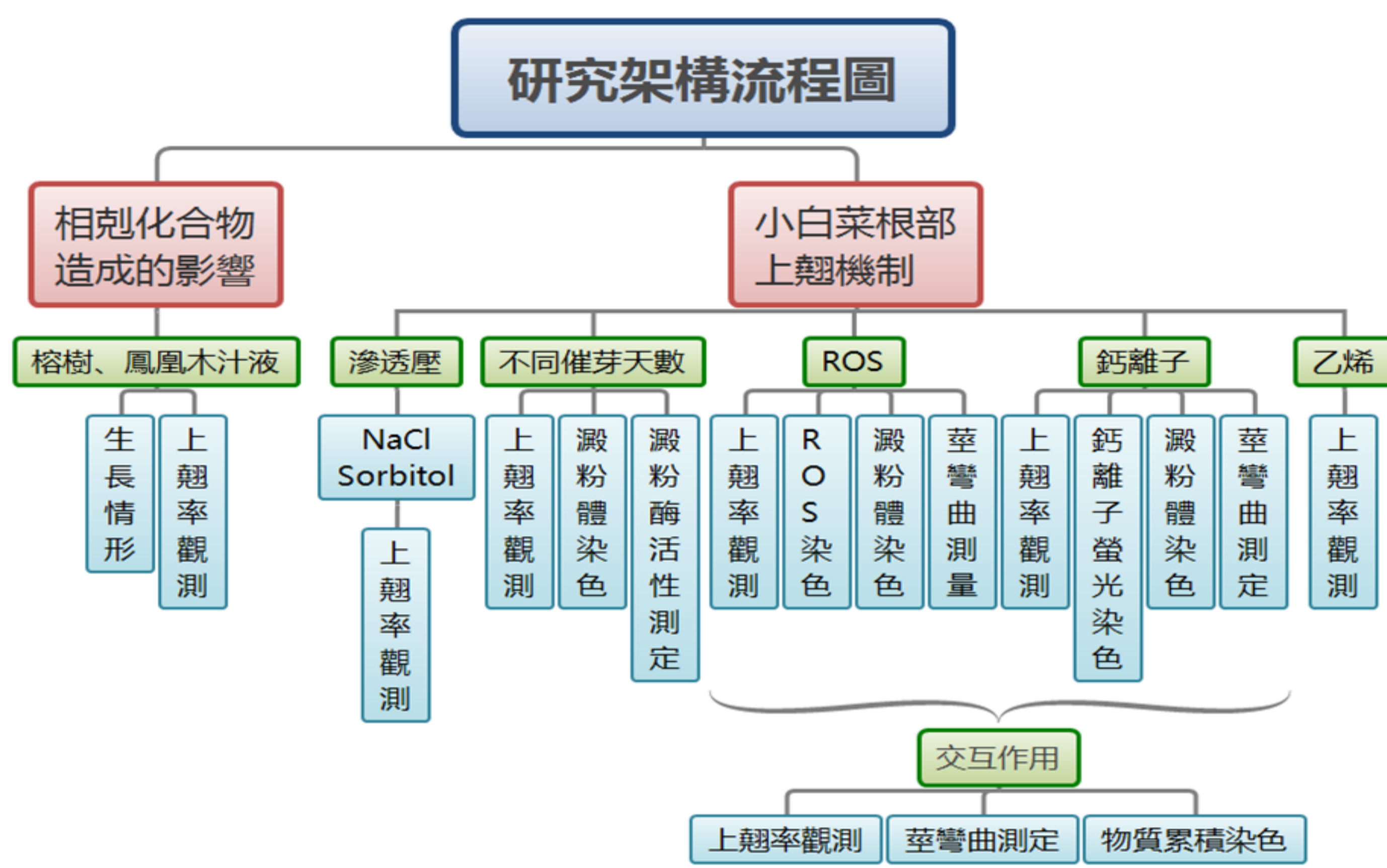
摘要

種植小白菜時，偶然看到其在鳳凰木汁液下會有根部上翹的現象，我們深入探討與進行一連串實驗後發現：根部上翹可能為一生存機制，讓其逃離相剋化合物逆境。在驗證根上翹不是滲透壓造成後，我們發現莖也參與此機制。其中，根的根系減少、且可能藉由提高澱粉酶活性降低根尖澱粉體含量，失去向地性而翹起；莖則變粗、變重及彎曲，使植株質心偏移，造成根部上翹。我們驗證了根部上翹的訊息傳遞因子為 ROS 與鈣離子：鈣離子會刺激 Rboh 酵素產生 ROS 累積，兩分子可能是透過正回饋來累積濃度後，再進而影響根莖的生理變化造成上翹，使小白菜能藉此逃離逆境。未來將深入探討 ROS 與鈣離子在此機制中的交互作用，並深入了解 IAA 對根尖上翹的調節。

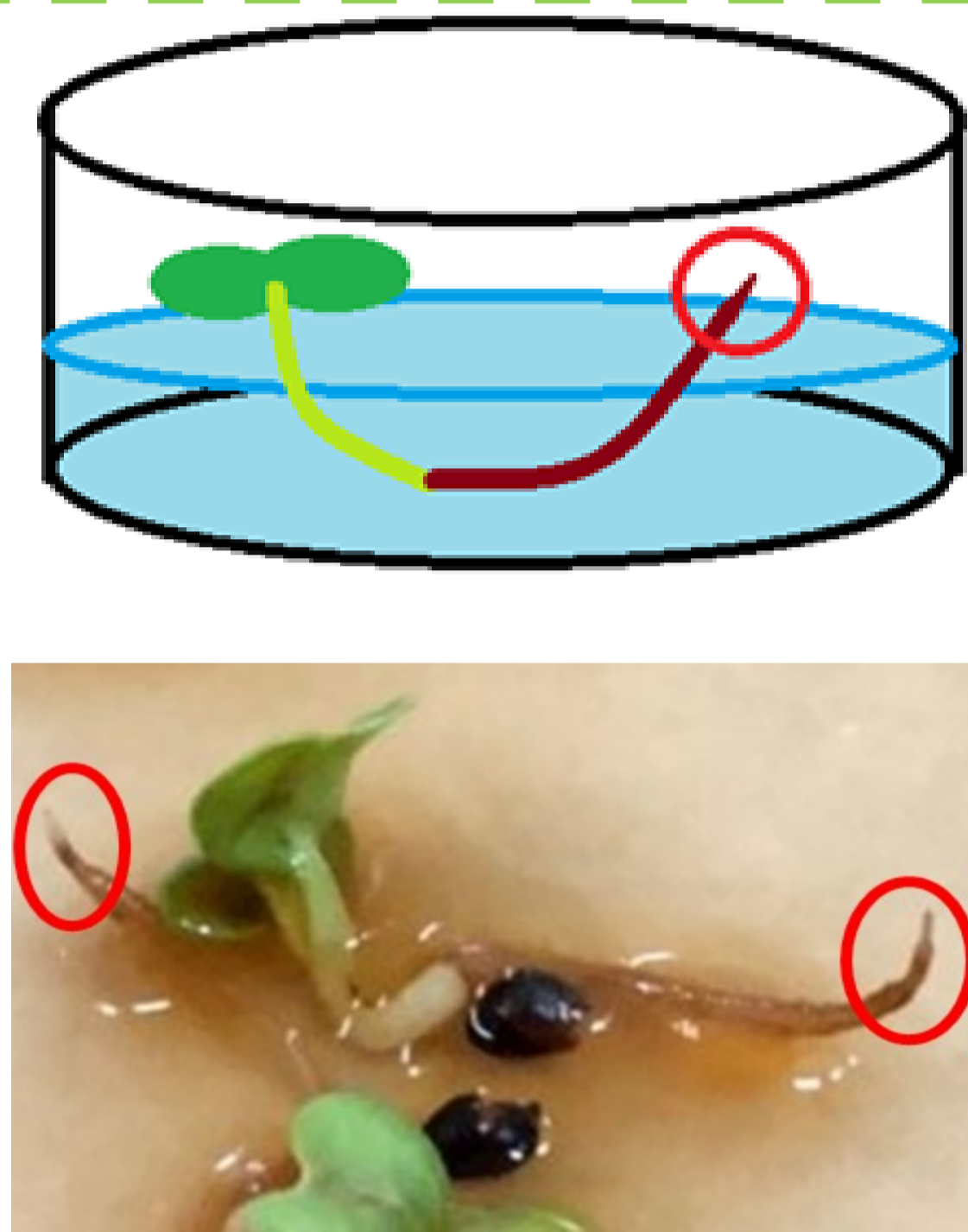
研究動機

上課時老師曾說到，有些植物會分泌相剋化合物影響周圍植物生長。我們好奇，周遭的植物有沒有發展出生存機制來應對逆境呢？我們先嘗試將小白菜種植在榕樹和鳳凰木樹葉萃取汁液中，發現小白菜生長情形的確較差，但根部卻有上翹情形，會不會是一種生存機制？我們覺得這個現象很有趣，因而探討上翹原因、參與的化學物質以及植物內部的反應機制。

研究架構



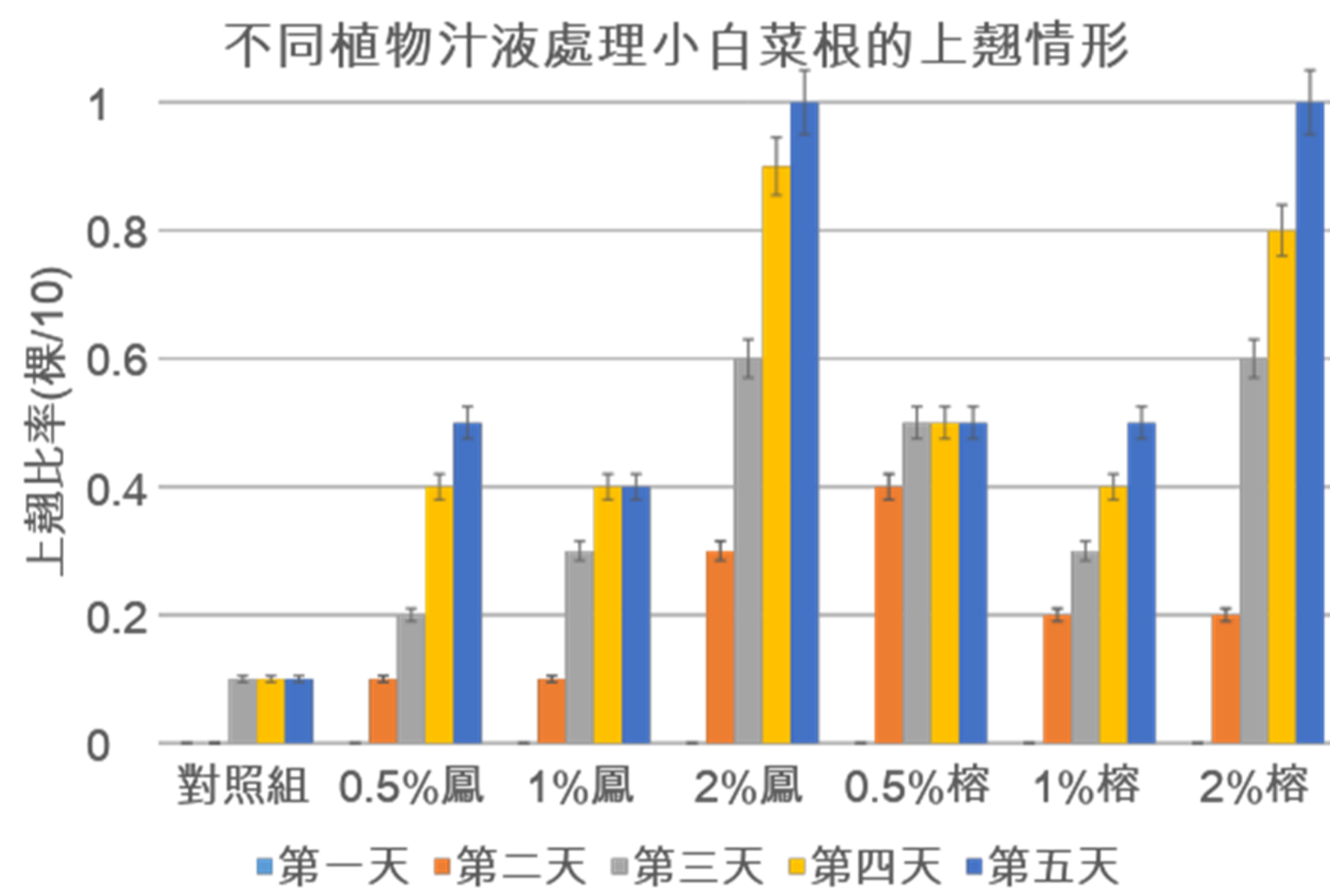
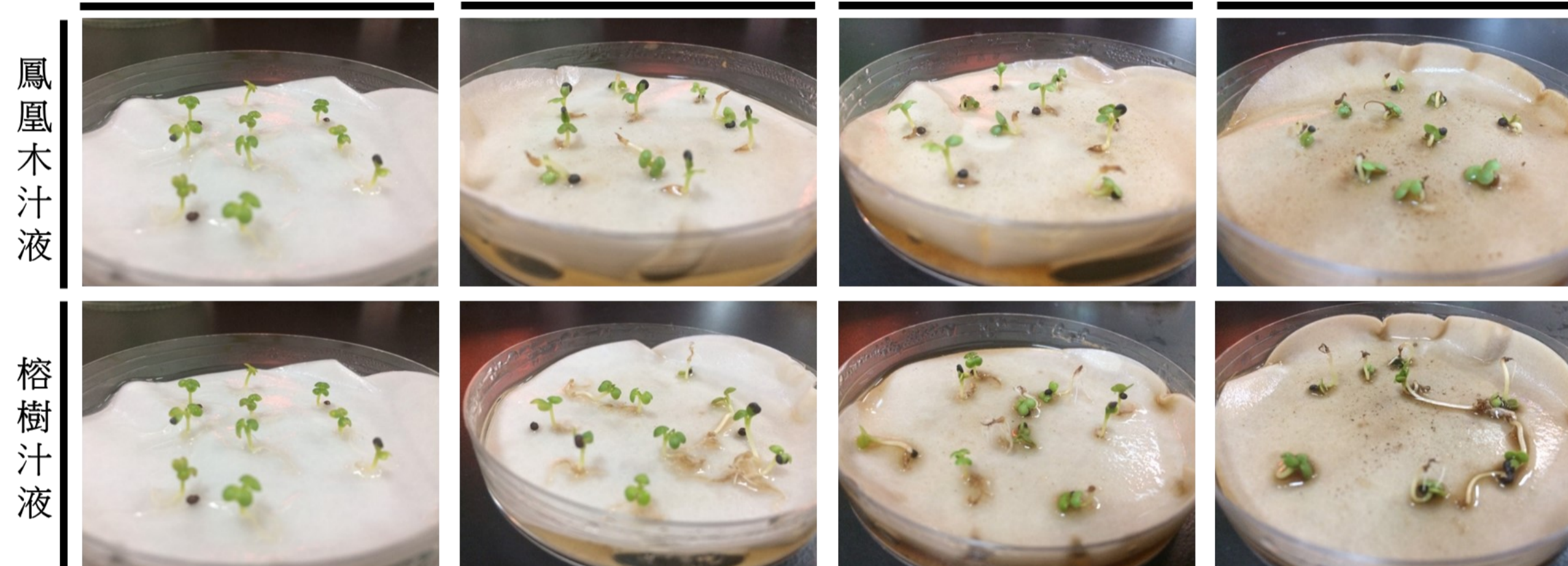
根尖上翹示意圖



研究結果

不同相剋植物汁液對根部上翹的影響

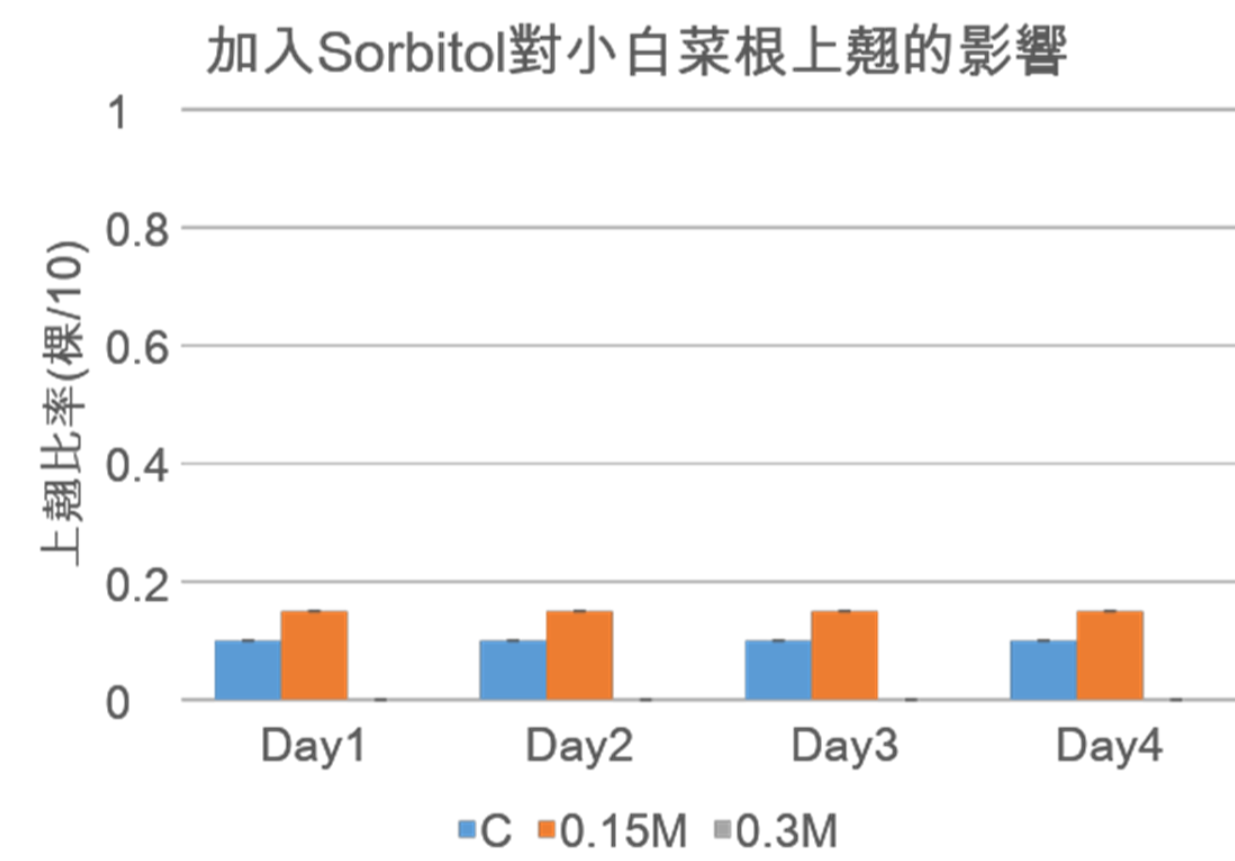
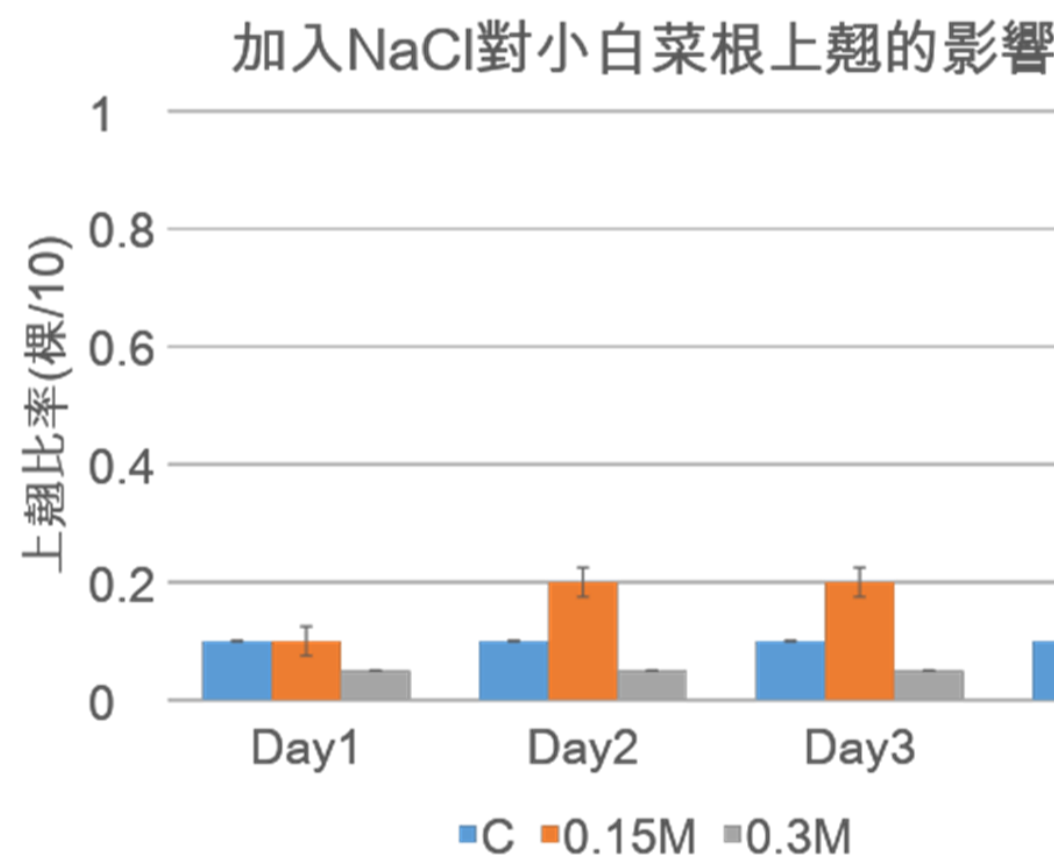
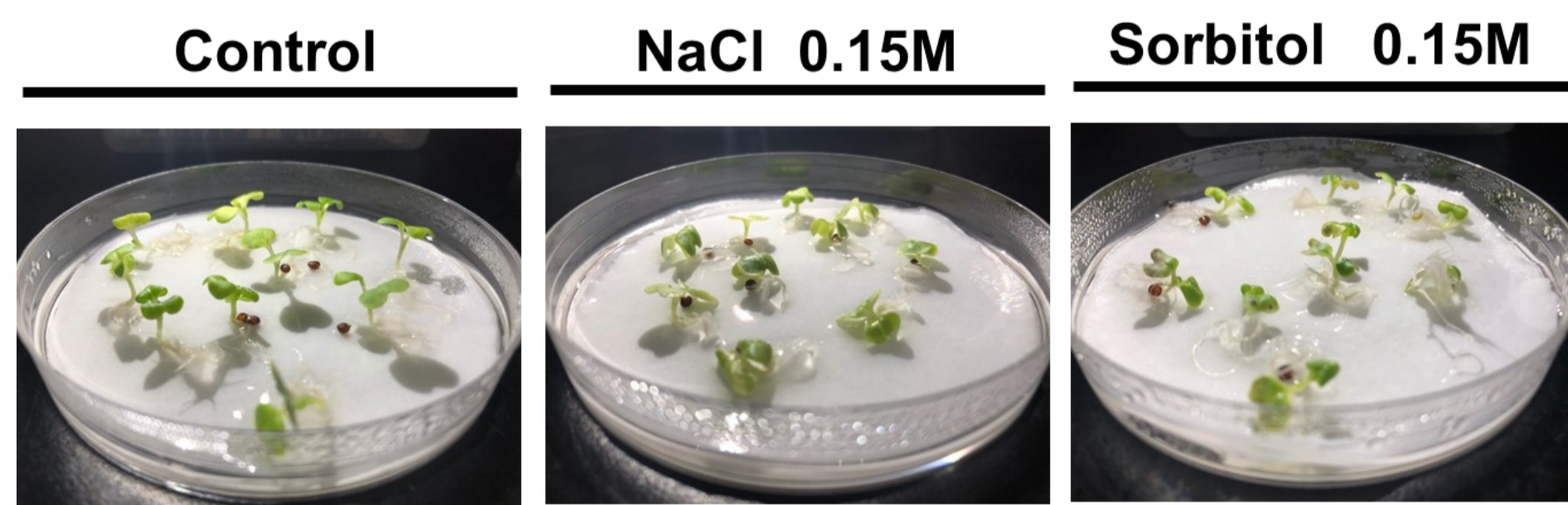
目的 探討不同相剋化合物對植物造成的影響。



結果 兩種植物汁液的相剋化合物皆造成小白菜上翹現象。

滲透壓對根部上翹的影響

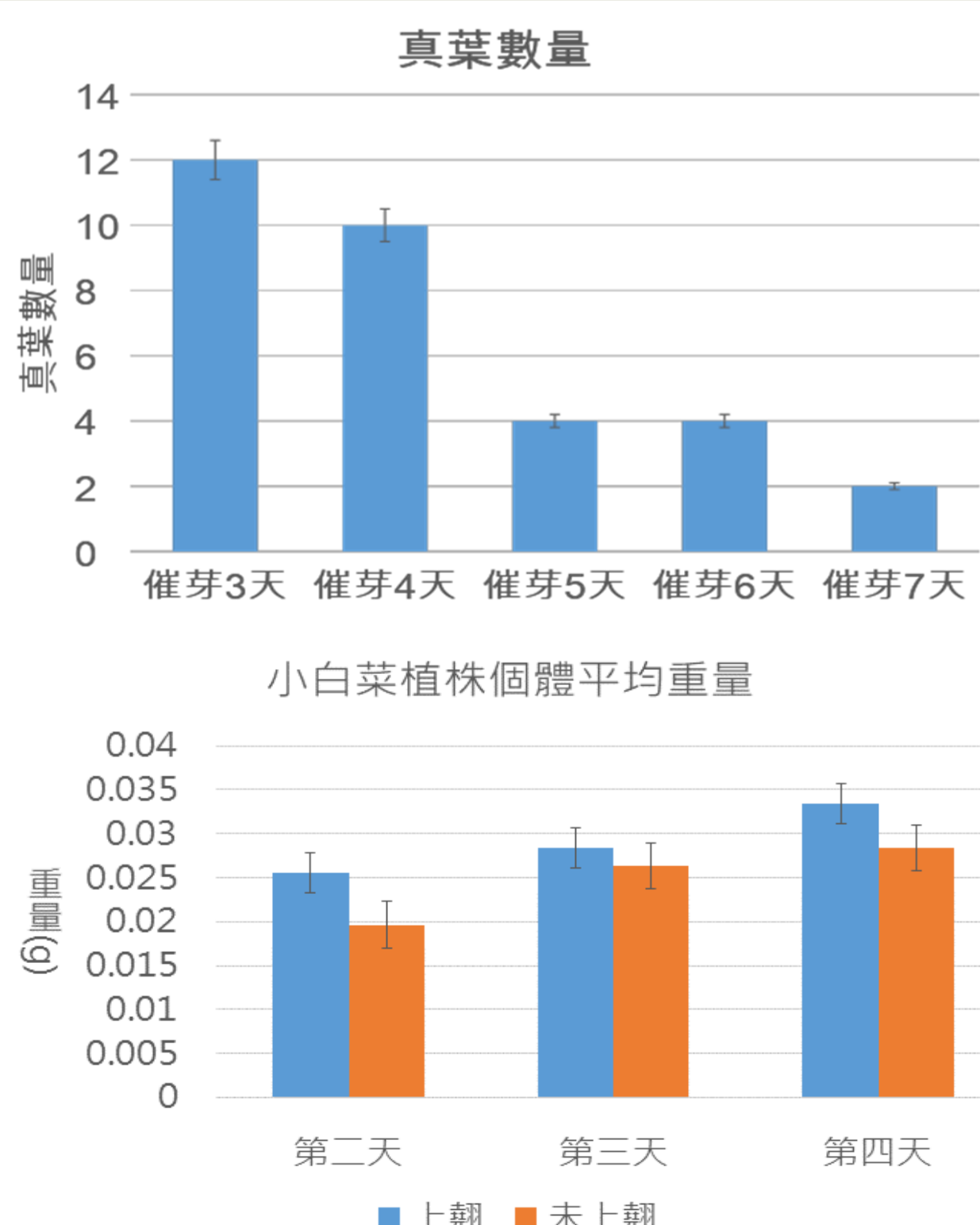
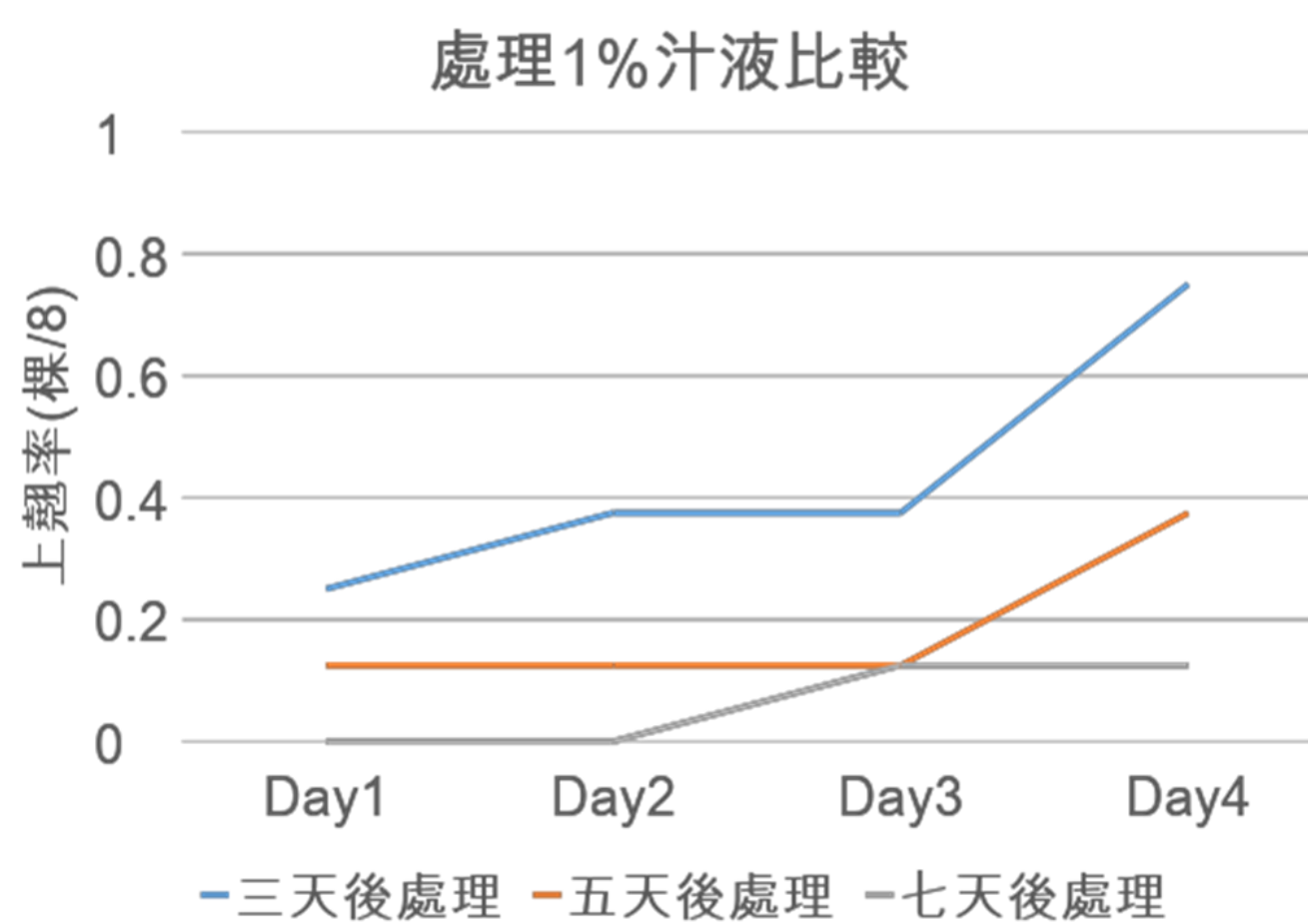
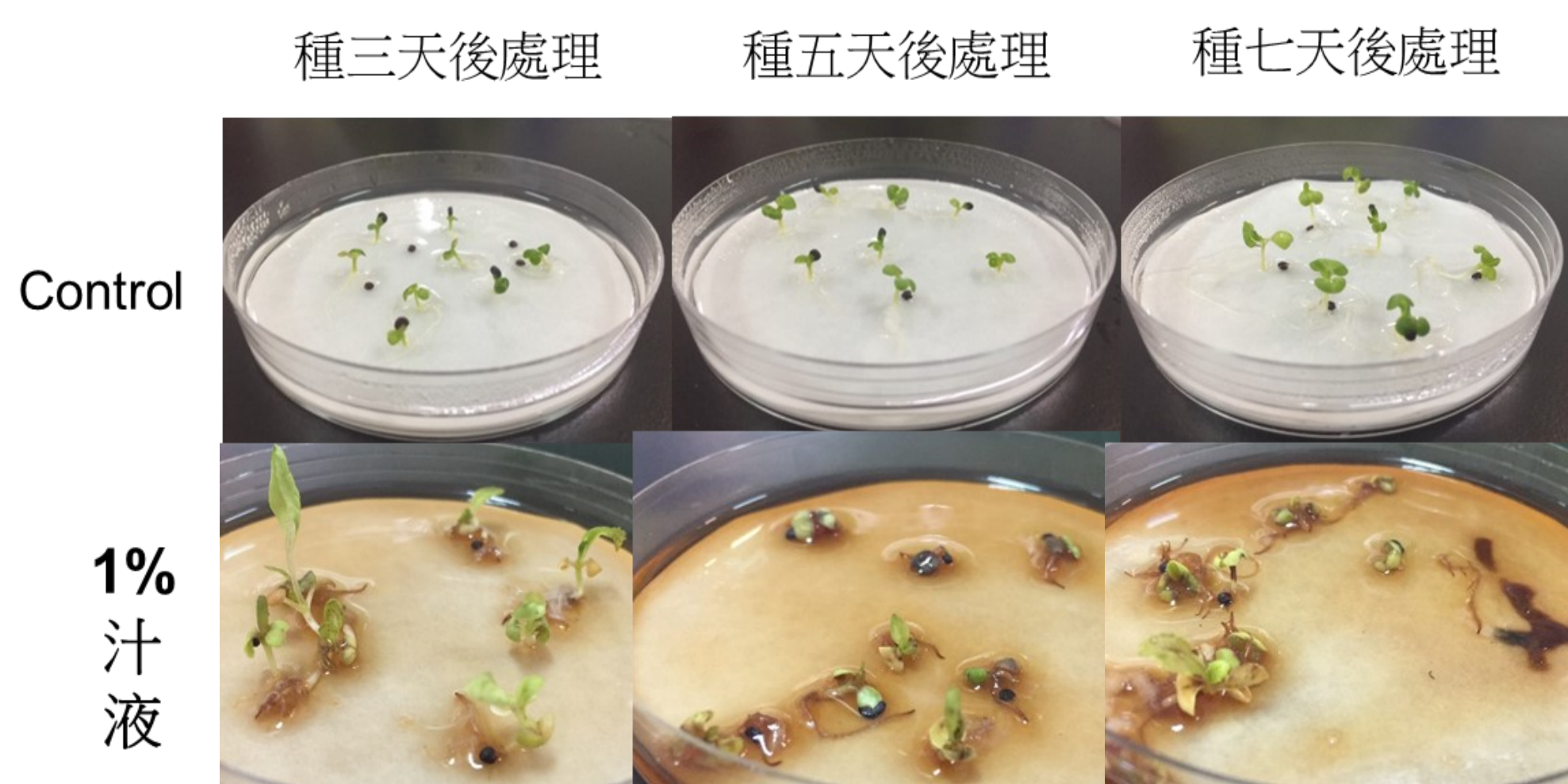
目的 為驗證小白菜上翹並非滲透壓所致。



結果 滲透壓增加並不會造成明顯的上翹現象。

上翹生存機制

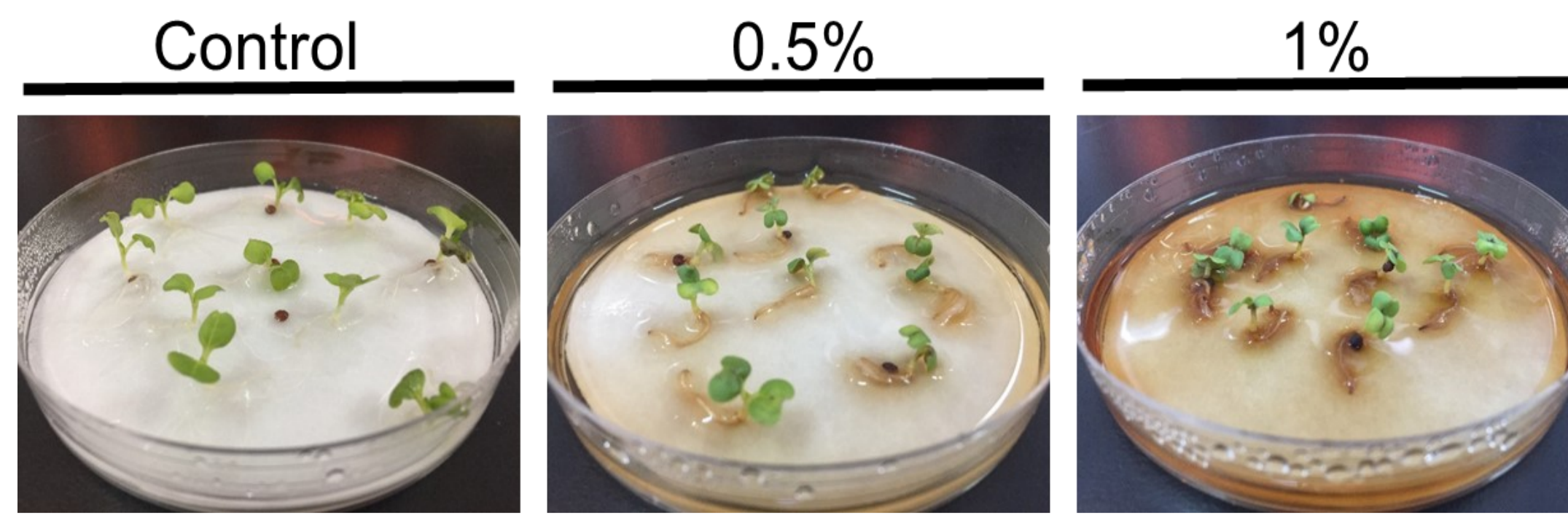
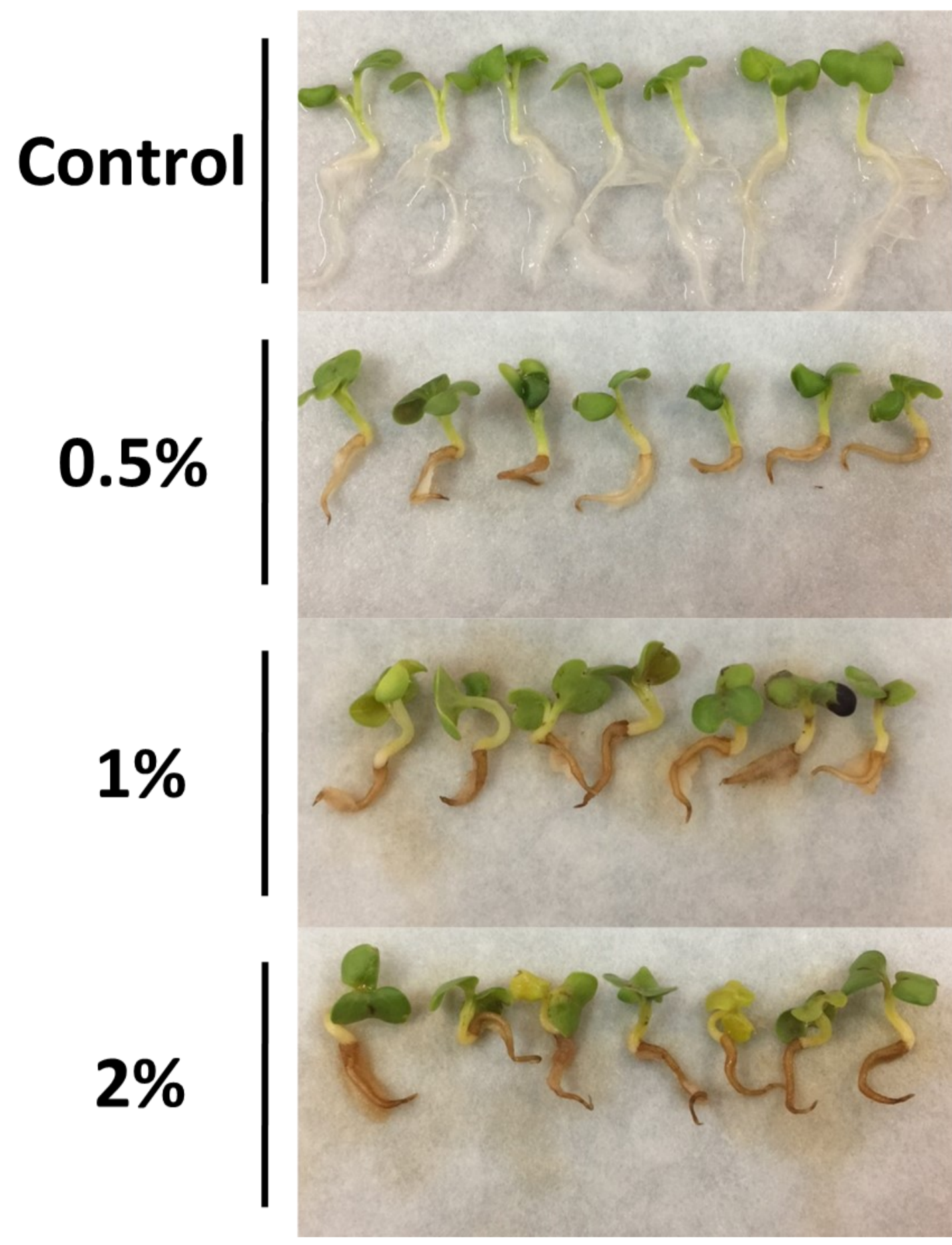
目的 改變小白菜催芽天數並種植在樹汁環境中比較上翹情形。



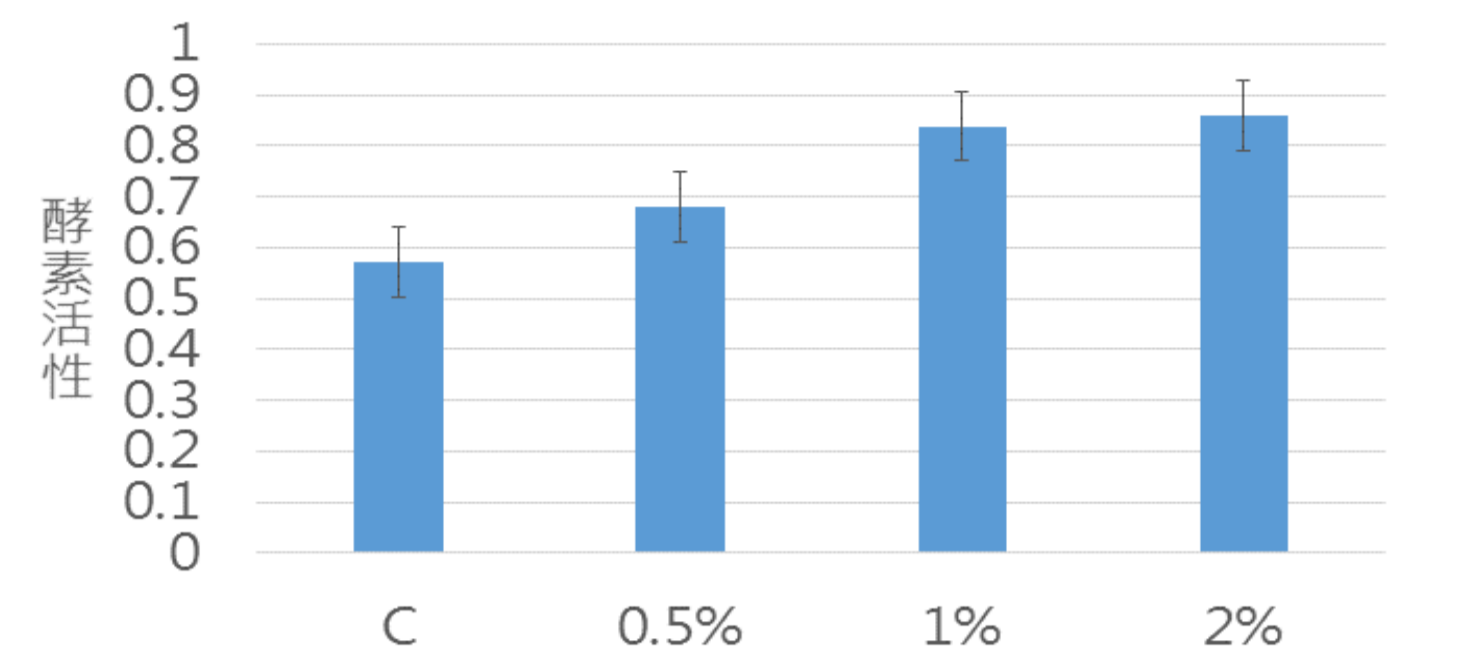
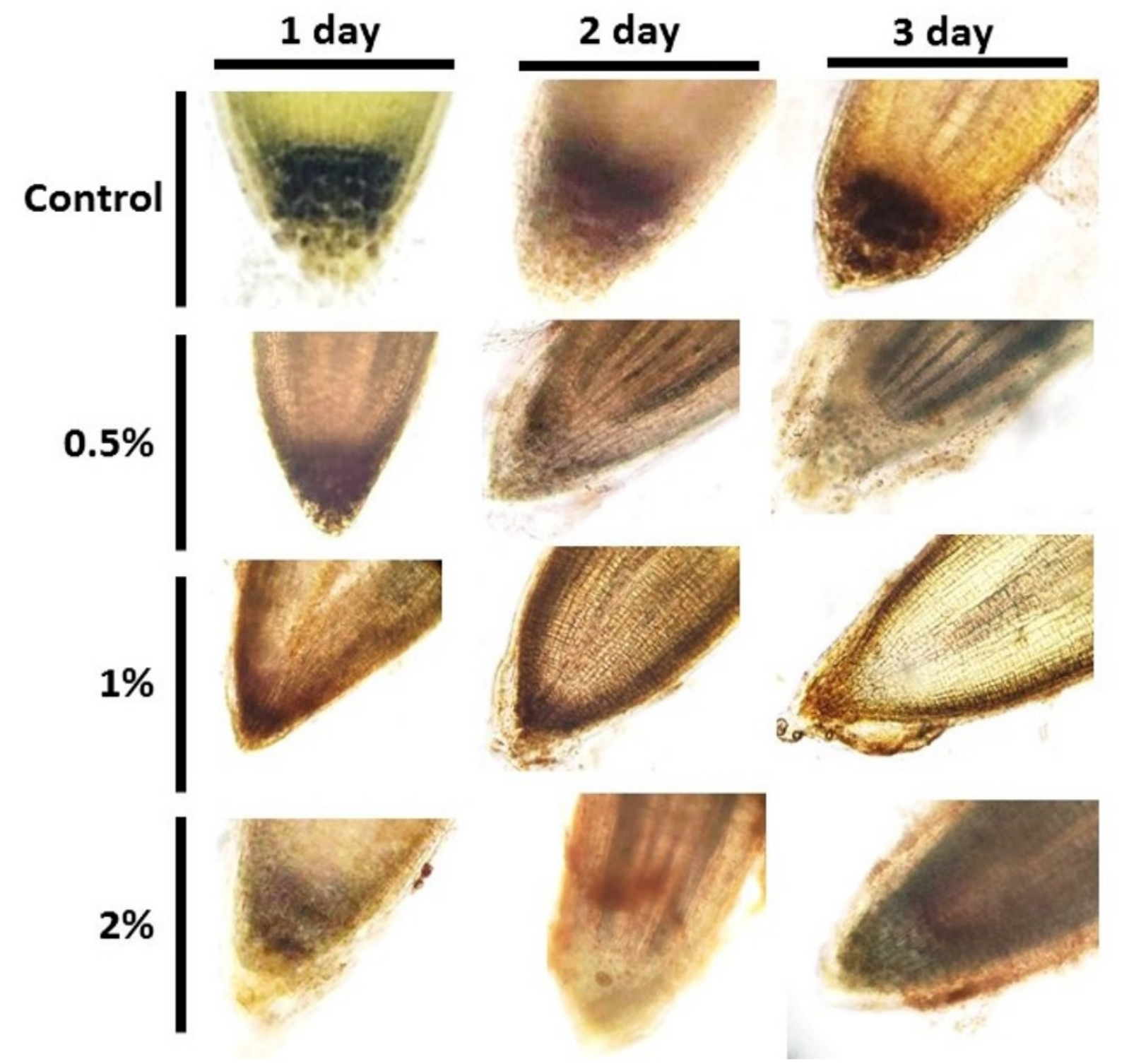
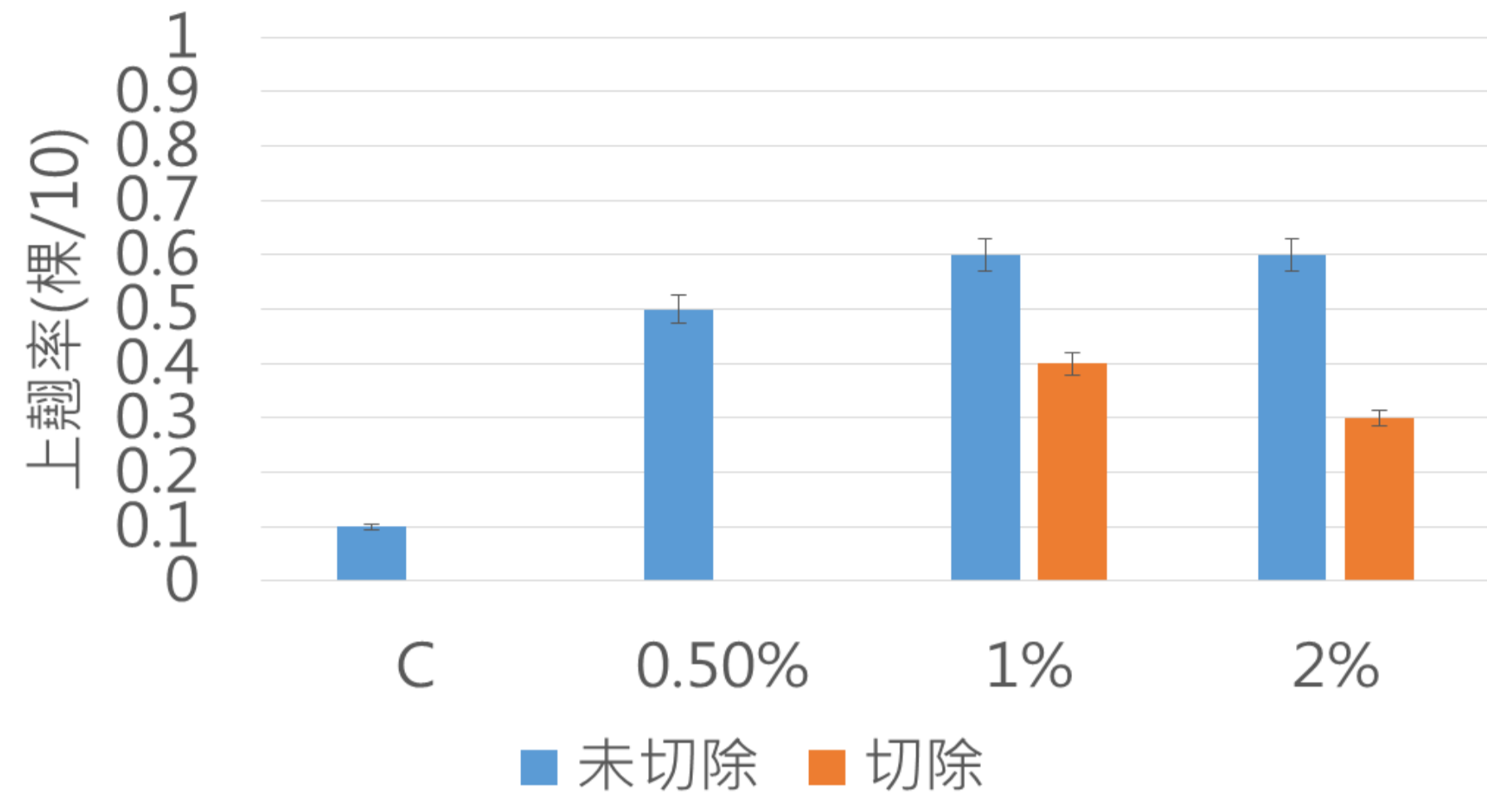
結果 結果推測上翹為一生存機制。

上翹原因研究-根部

目的 欲得知支根及根尖對上翹之影響。



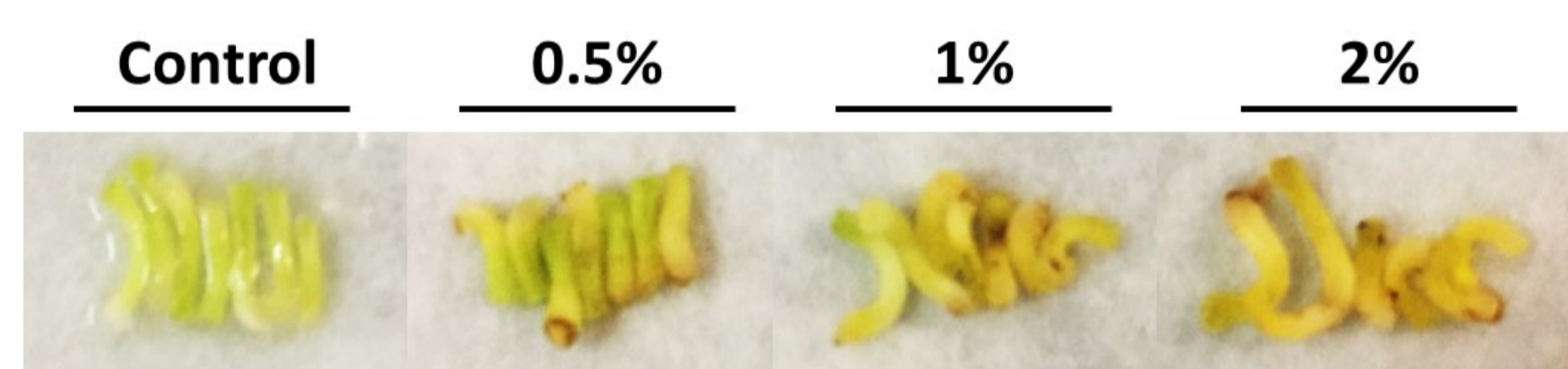
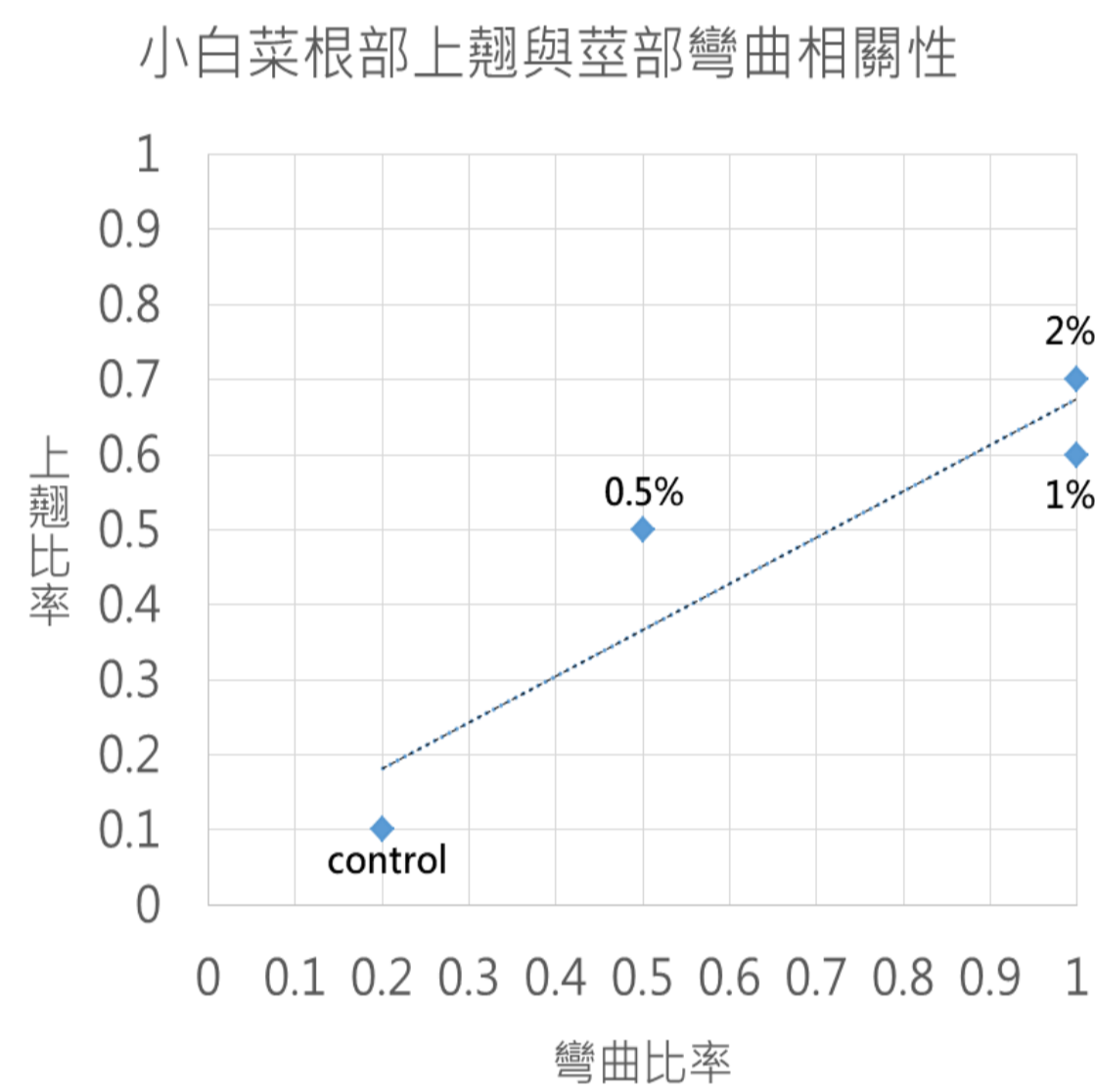
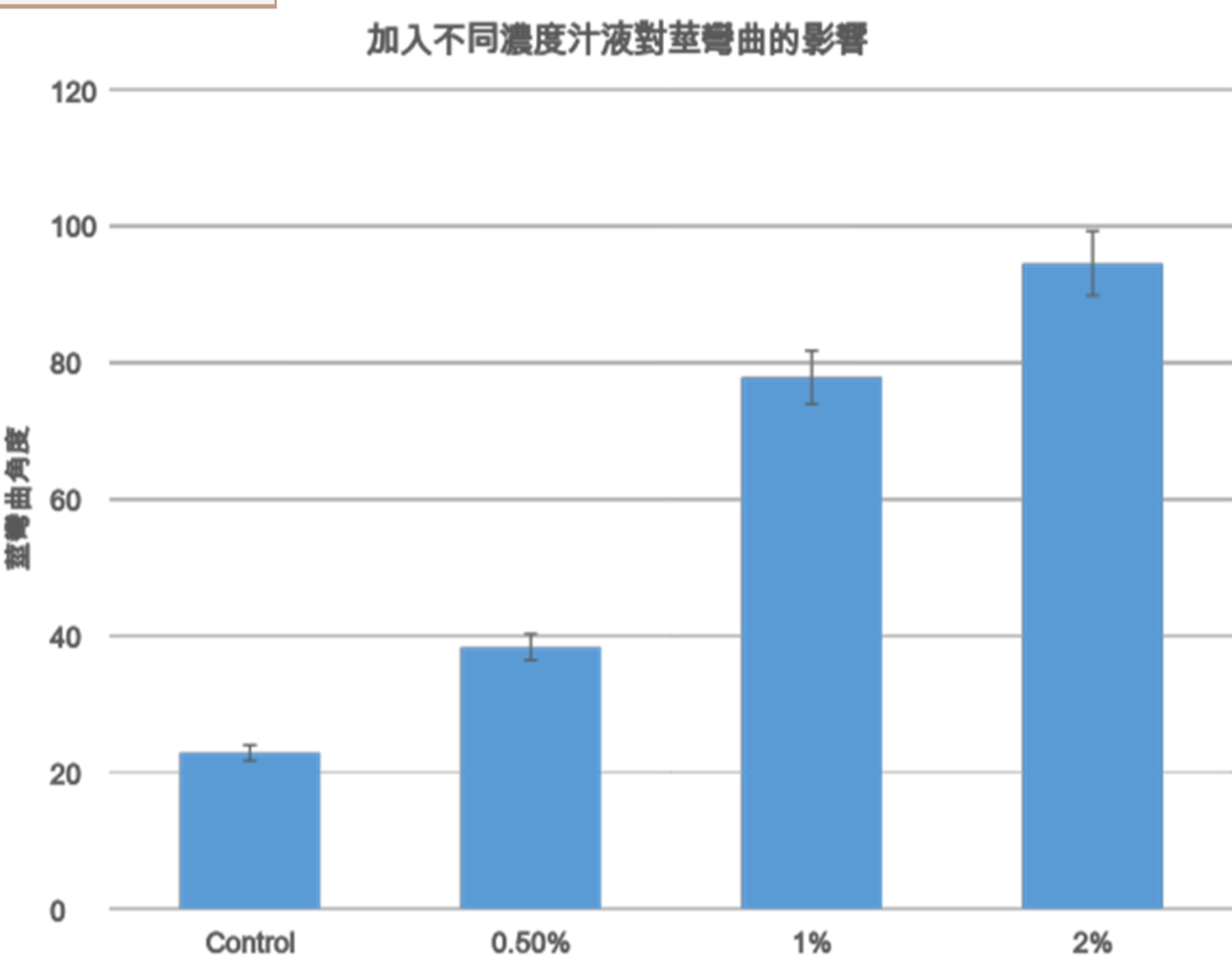
切根尖對小白菜根上翹的影響



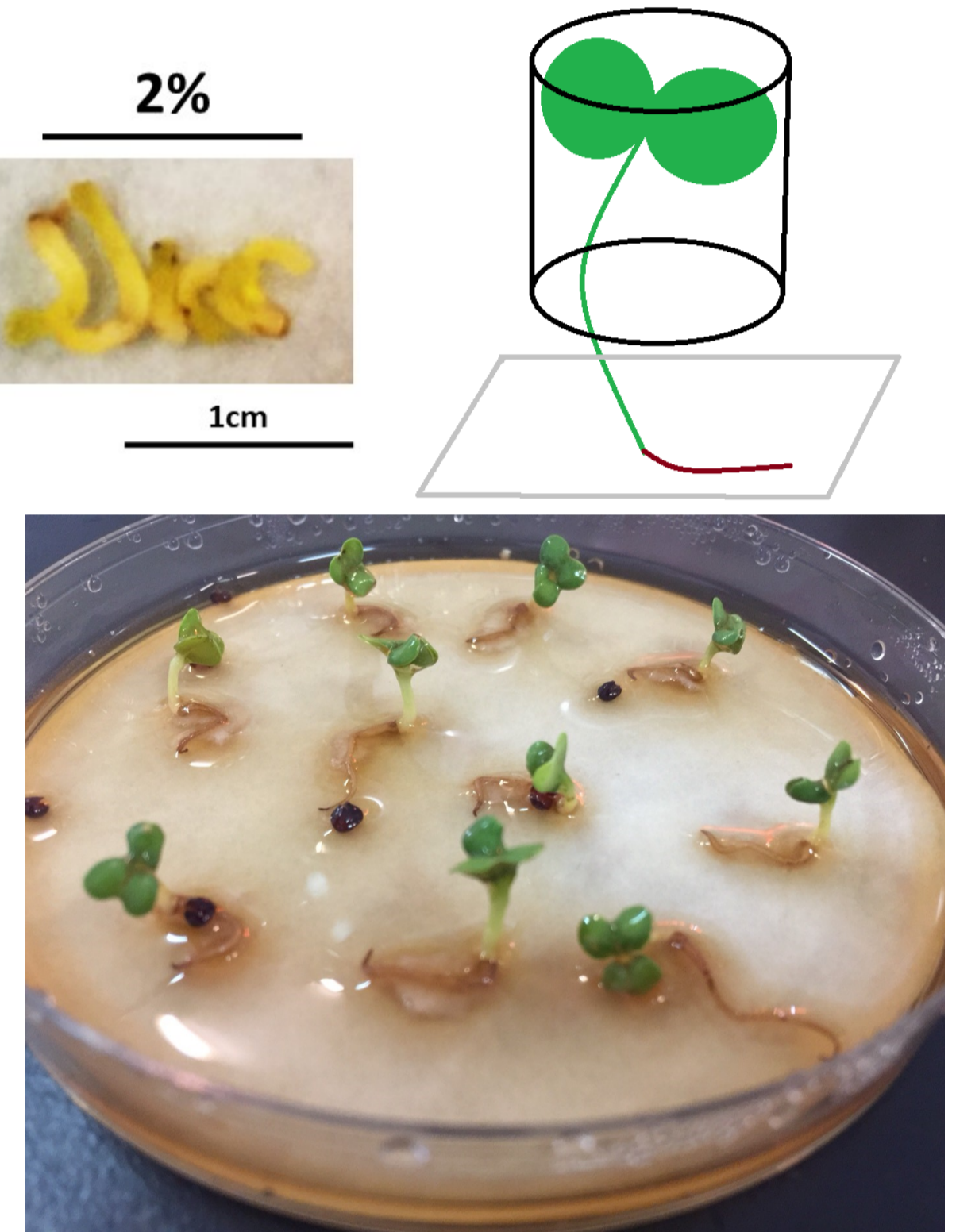
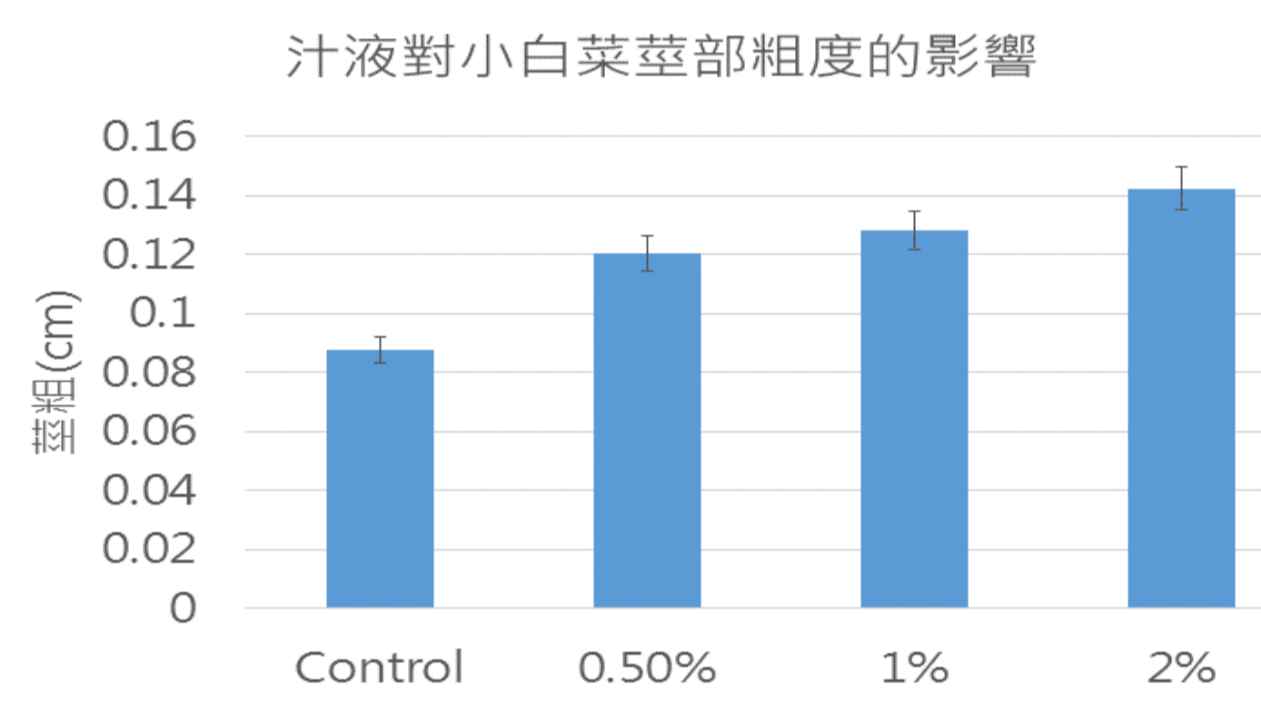
結果 上翹原因為根系不明顯使抓地力下降，或是根尖澱粉體消失使根失去向地性。

上翹原因研究-莖部

目的 探討莖部彎曲與根上翹之相關性。



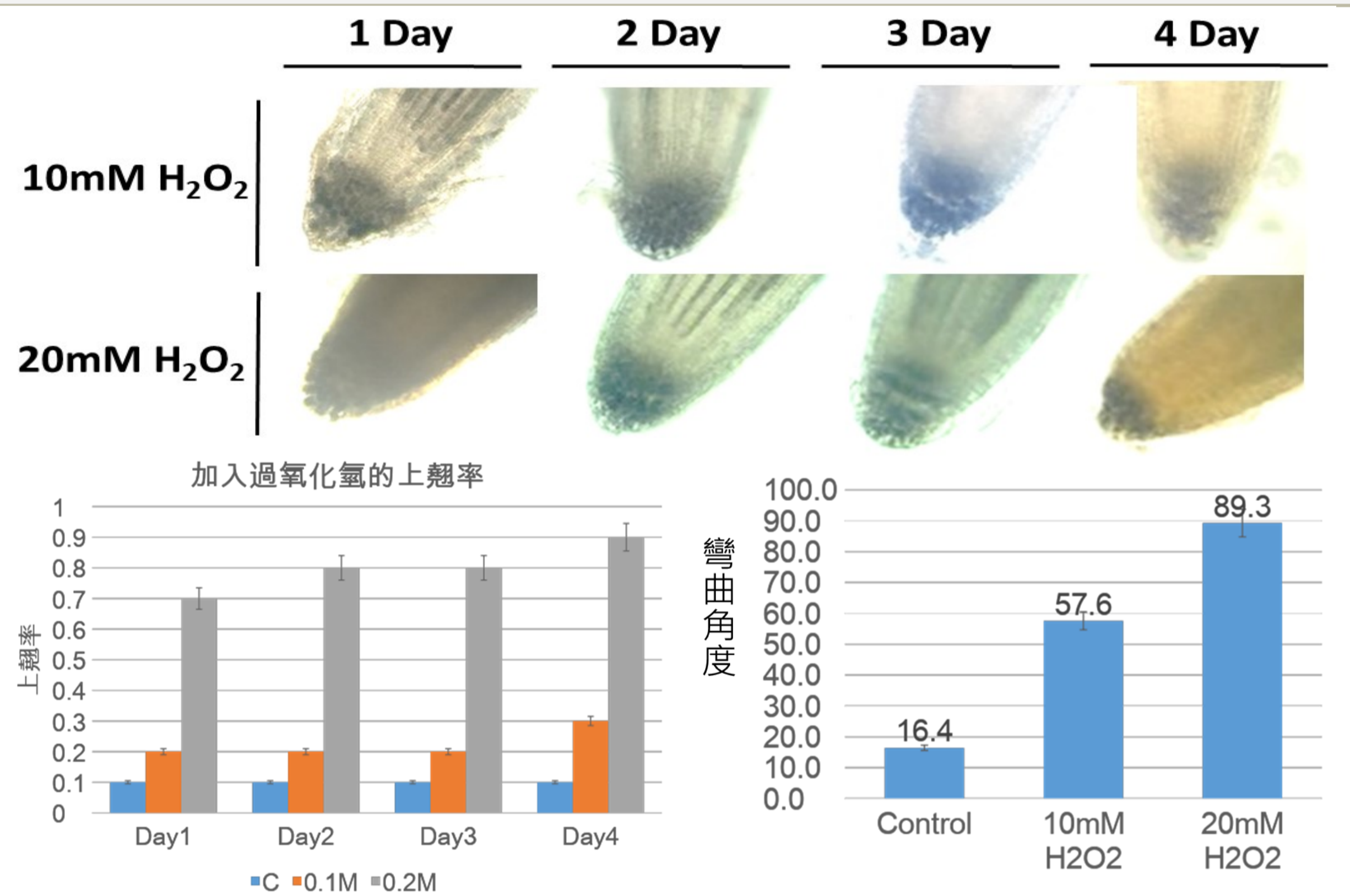
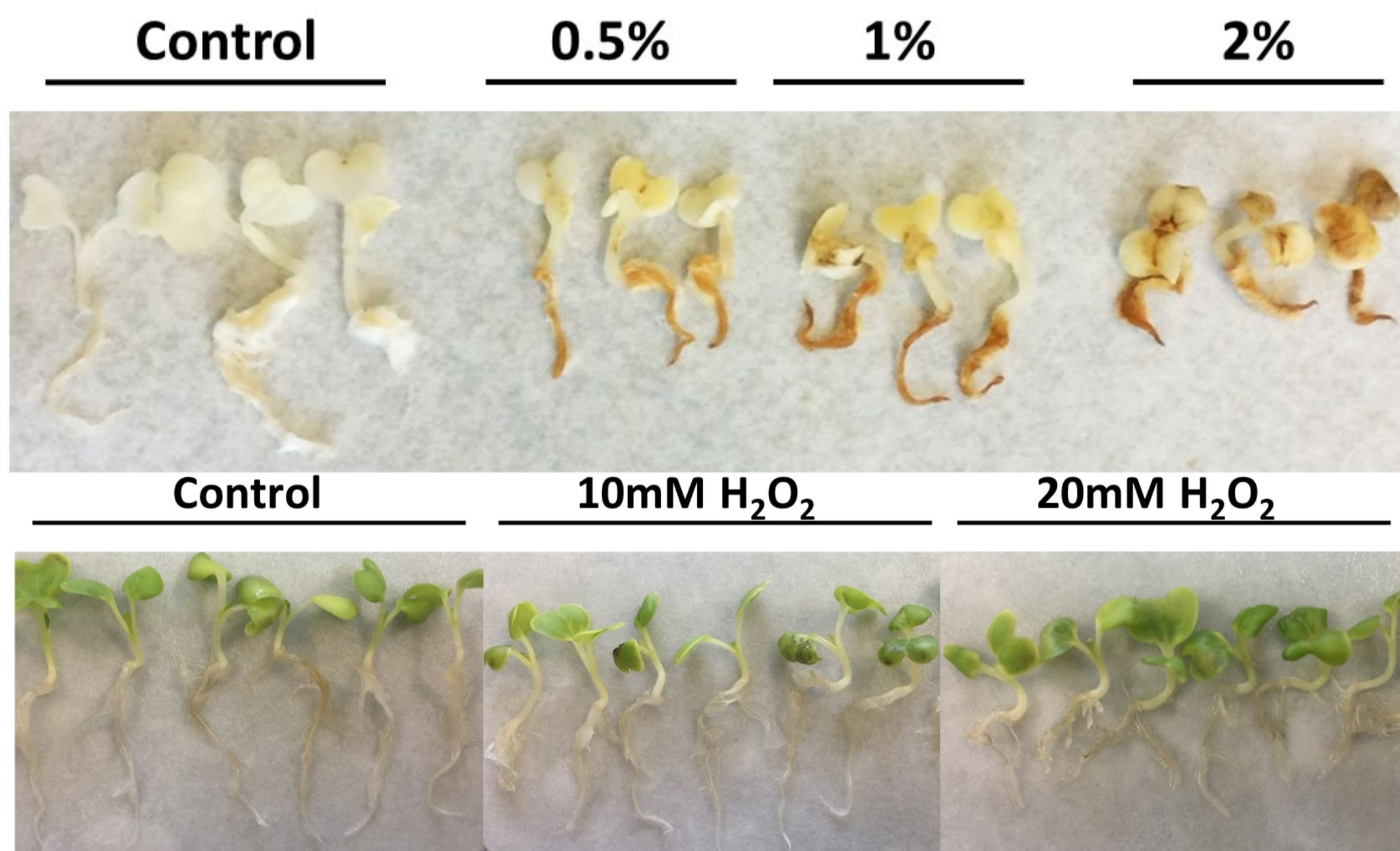
莖粗度定量



結果 莖彎曲與上翹有正相關性。

過氧化物影響上翹

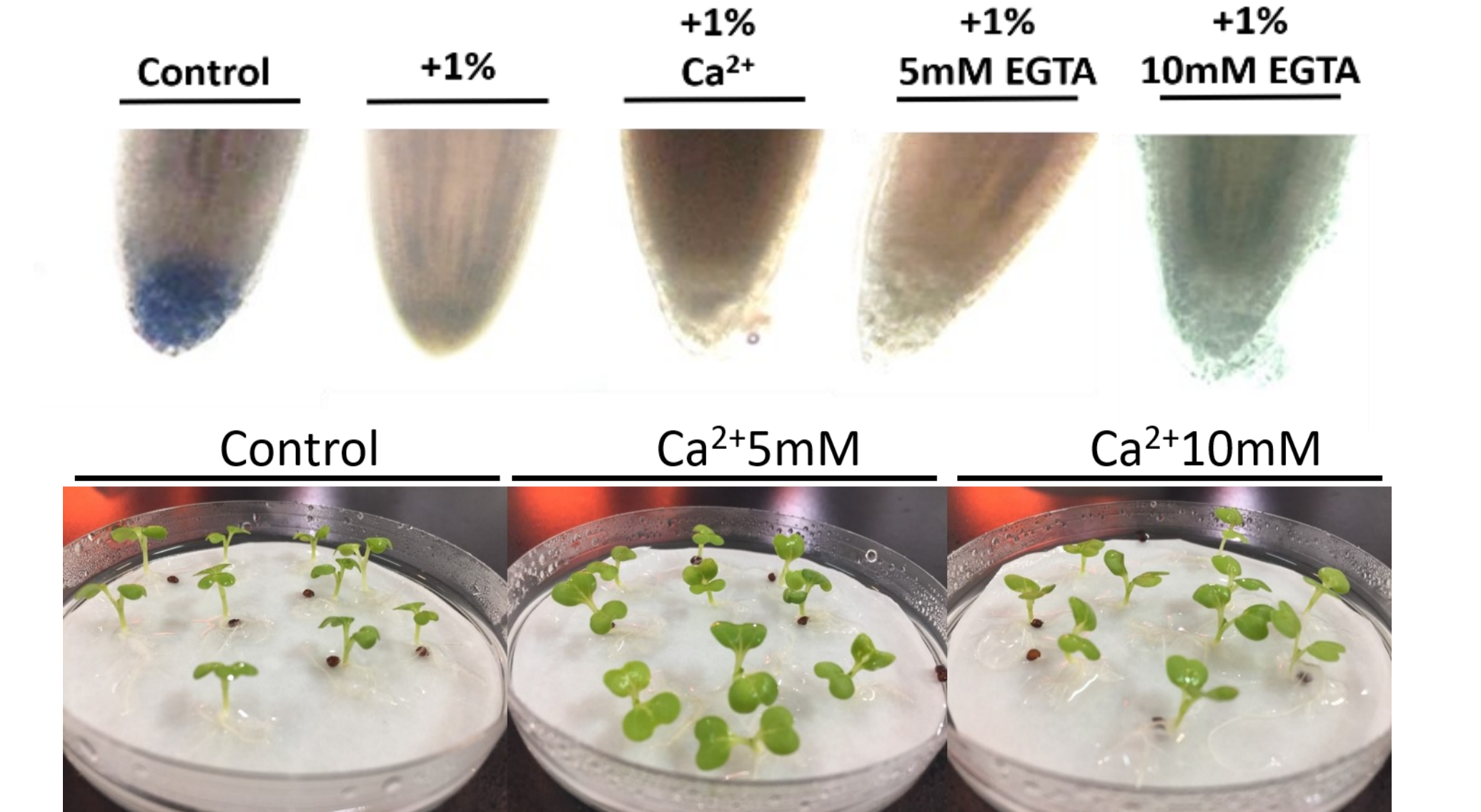
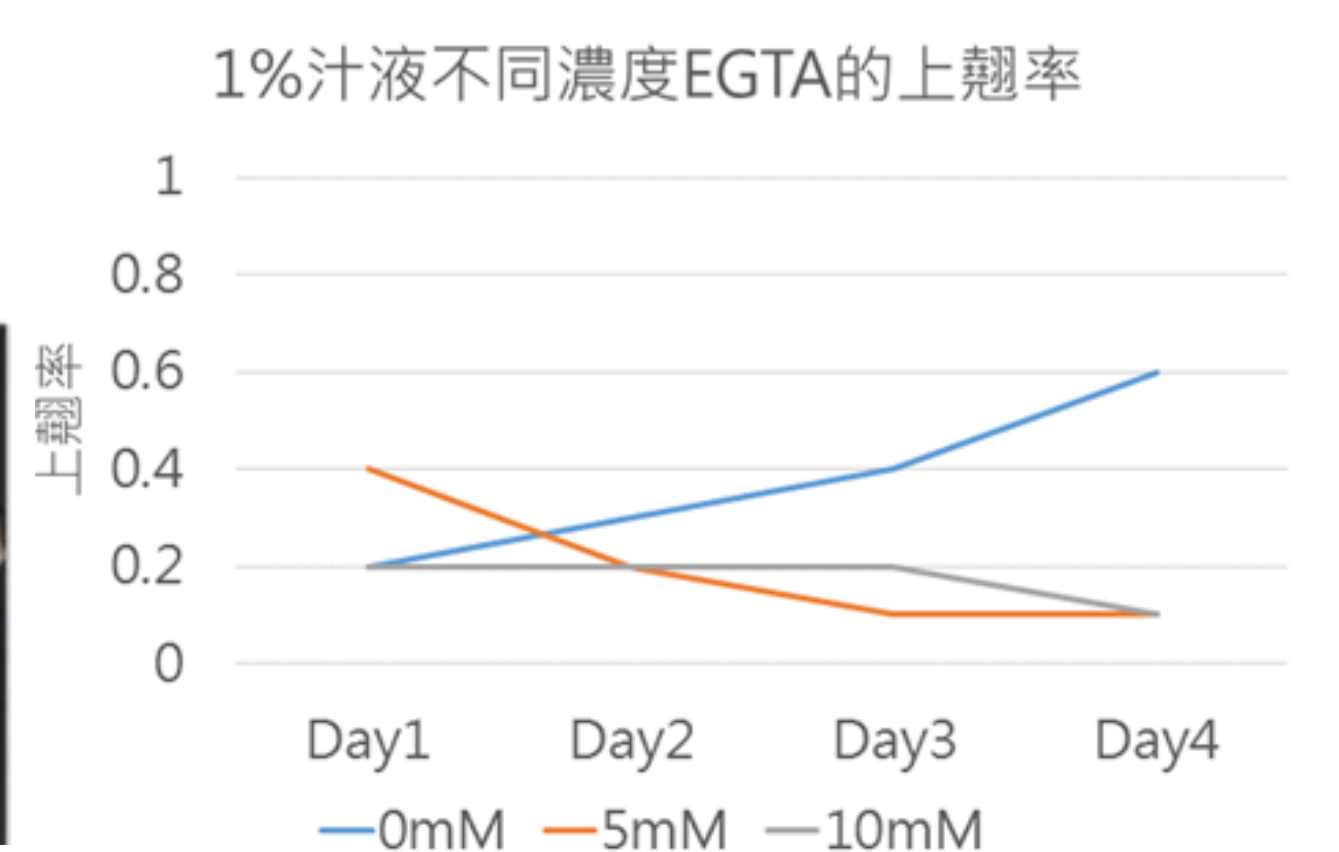
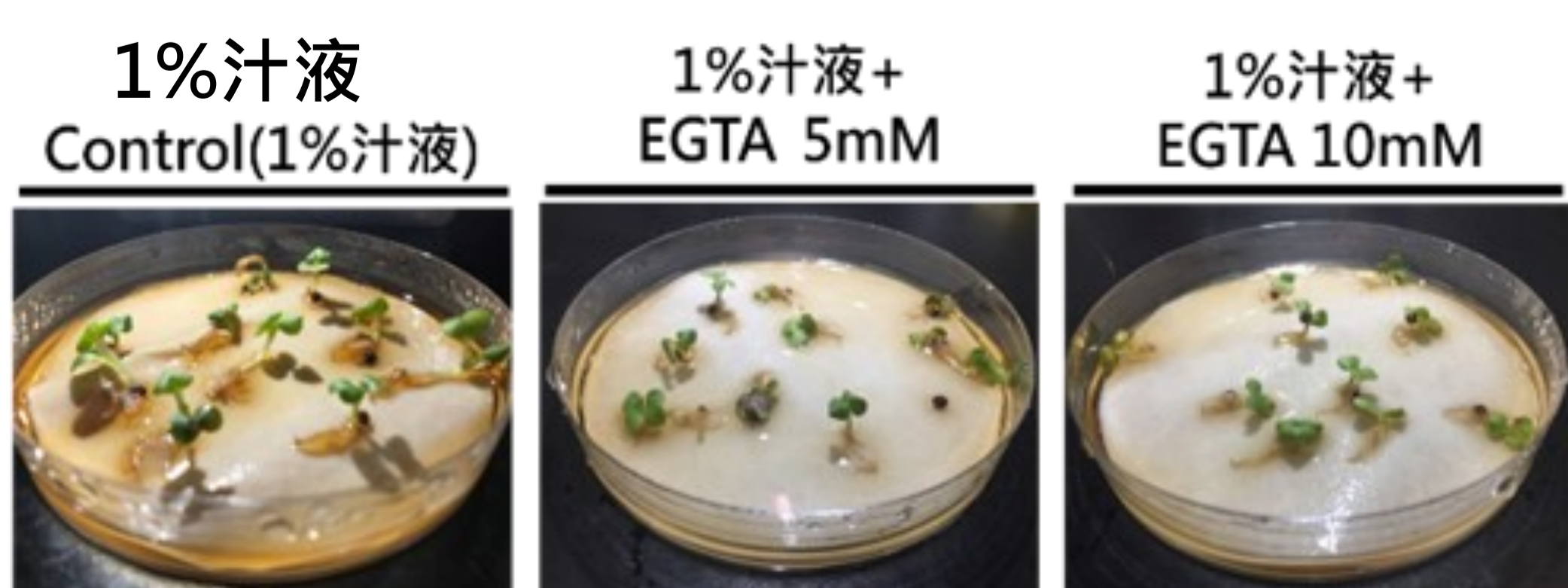
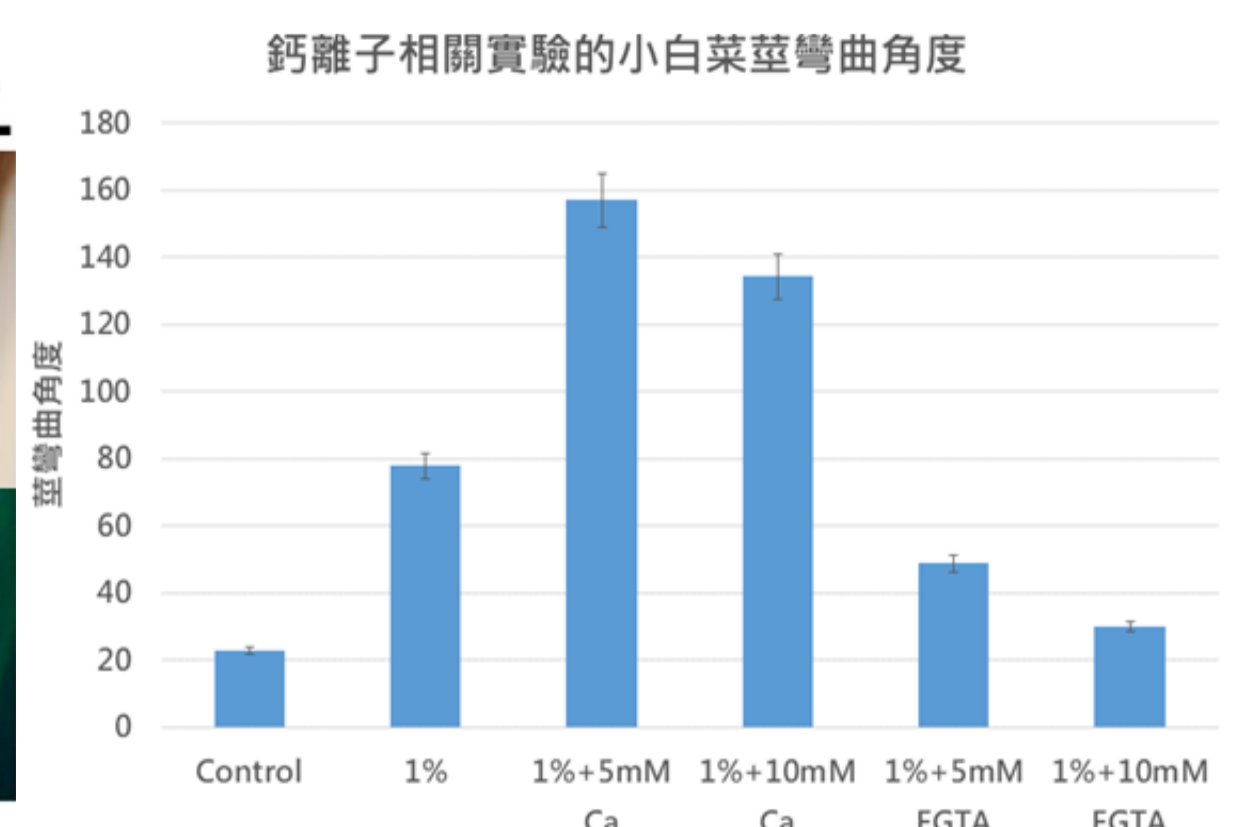
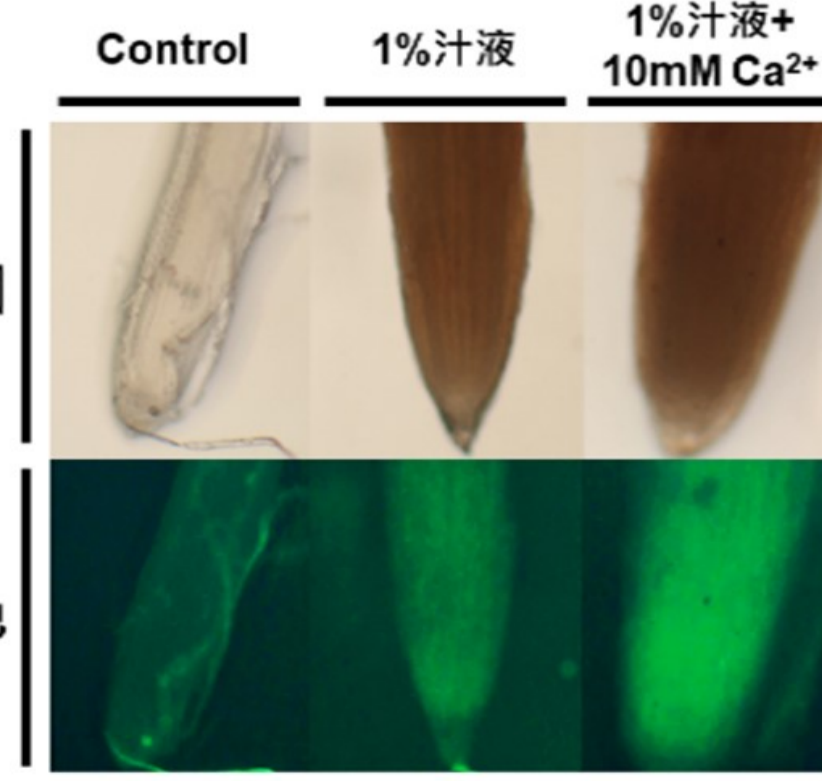
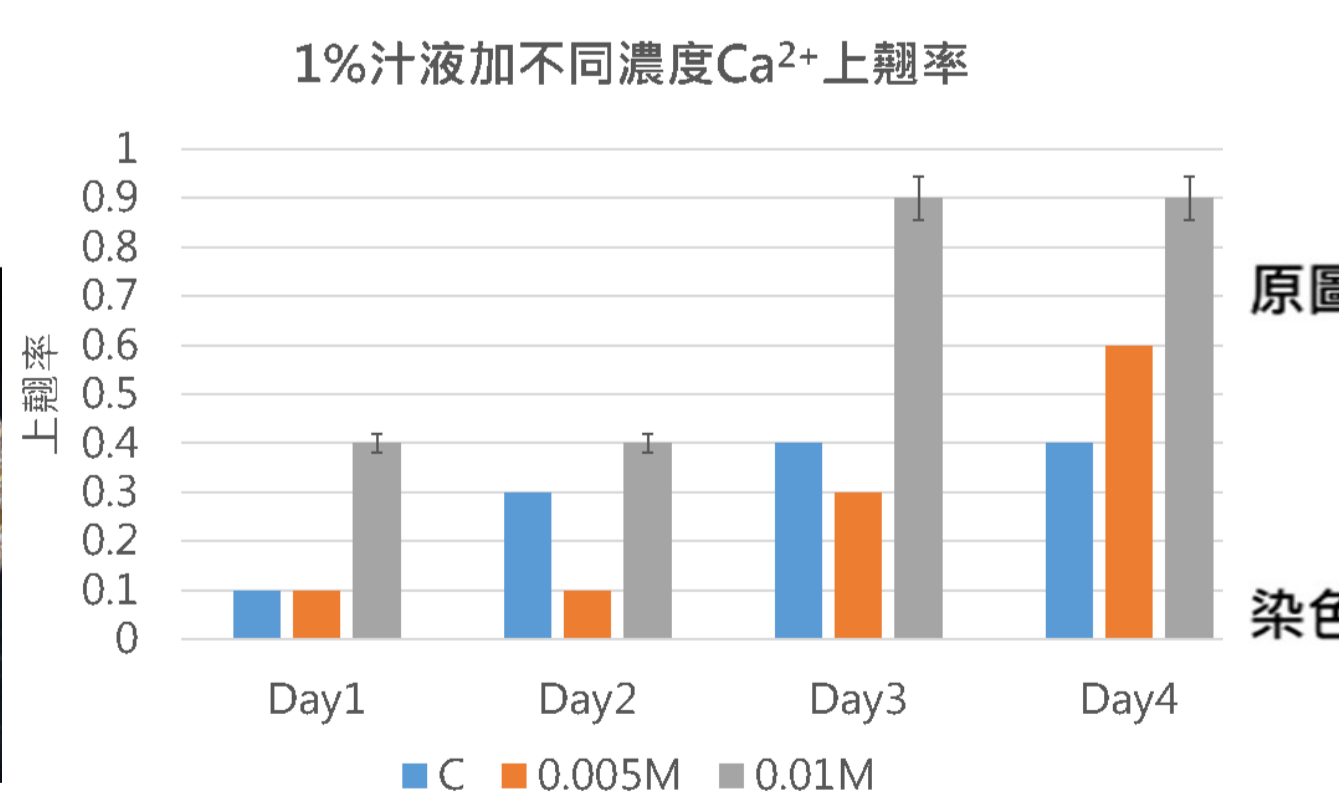
目的 藉由外加 ROS 探討過氧化物對植物上翹之影響。



結果 外加雙氧水會使小白菜根部上翹及莖彎曲，推測過氧化物影響莖部彎曲，使質心偏移導致上翹。

Ca²⁺對小白菜根上翹的影響

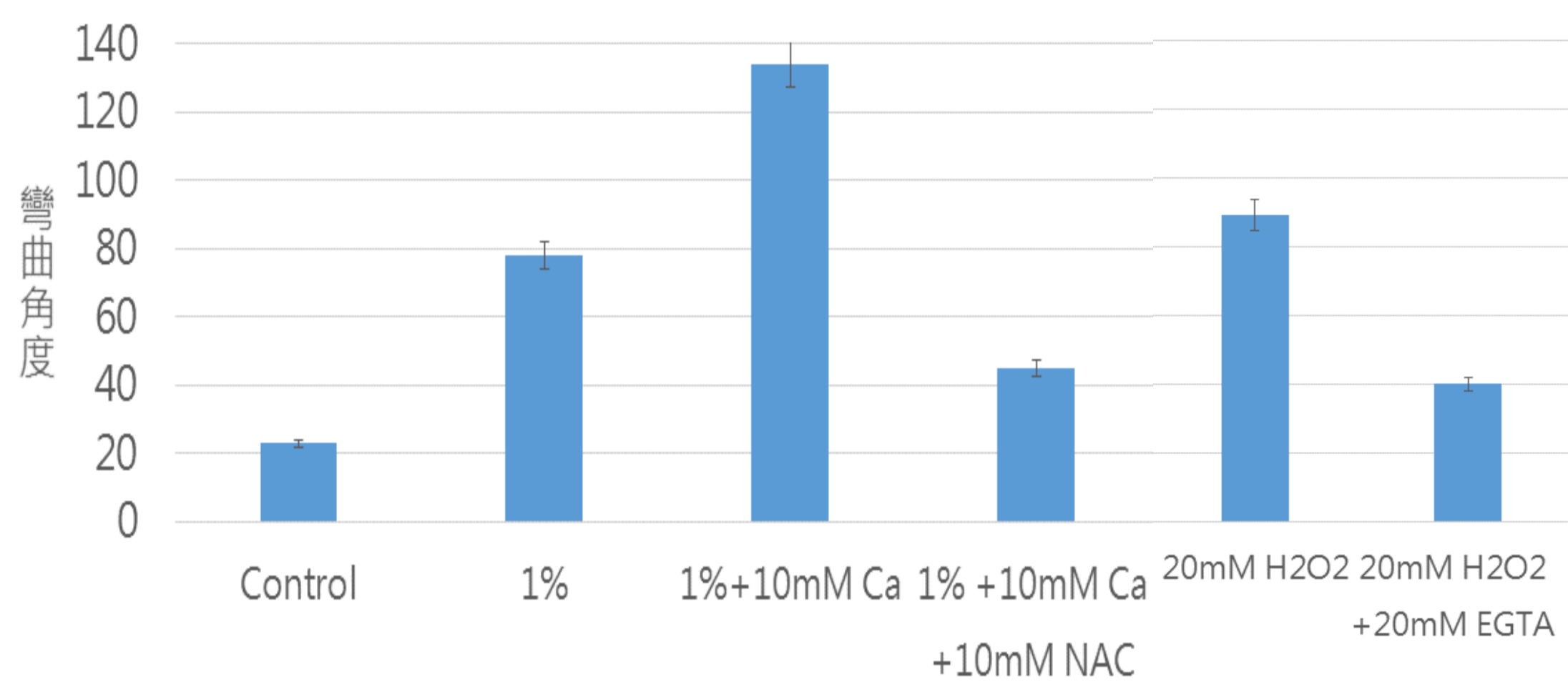
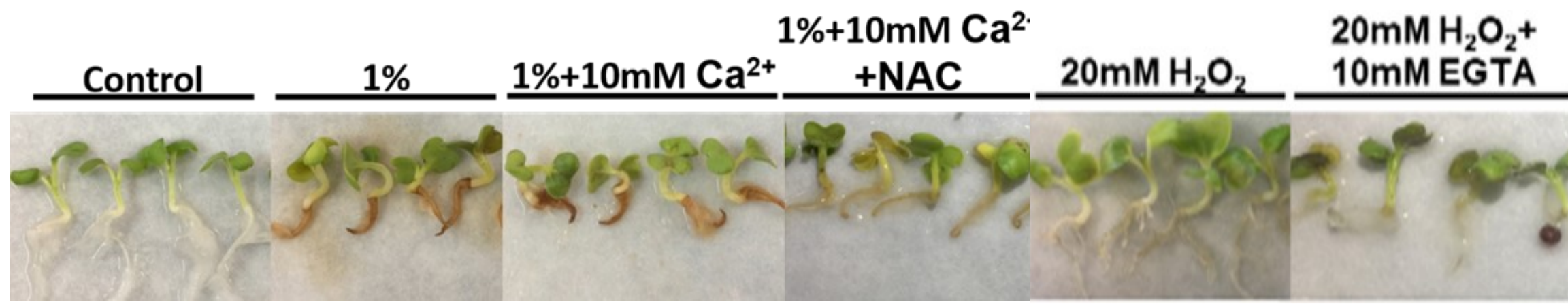
目的 藉由外加鈣離子及樹汁探討鈣離子對植物上翹之影響。



結果 鈣離子會透過影響莖彎曲使質心偏移的途徑造成小白菜的根部上翹。

Ca²⁺和 ROS 的交互作用

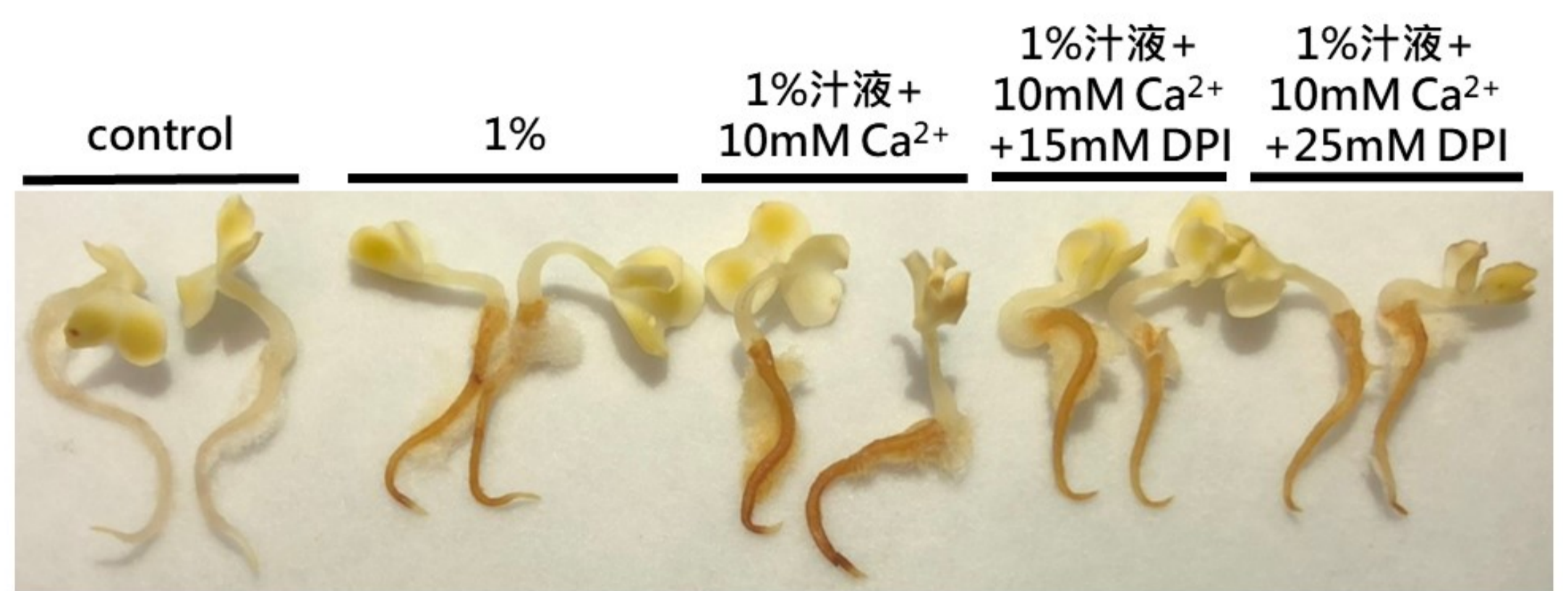
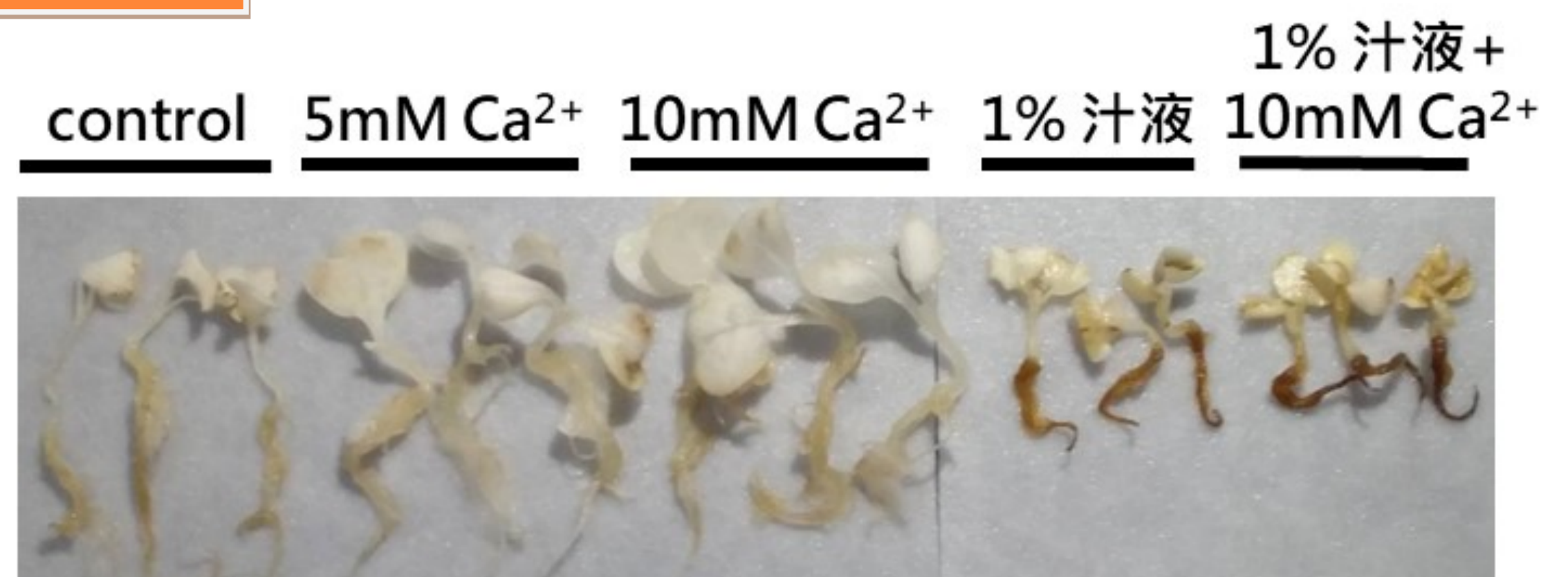
目的 去除小白菜生長環境中的鈣離子與過氧化物，探討兩者對於上翹的交互作用。



結果 鈣離子能協助 ROS 累積，導致一連串機制。

Ca²⁺誘導 ROS 累積

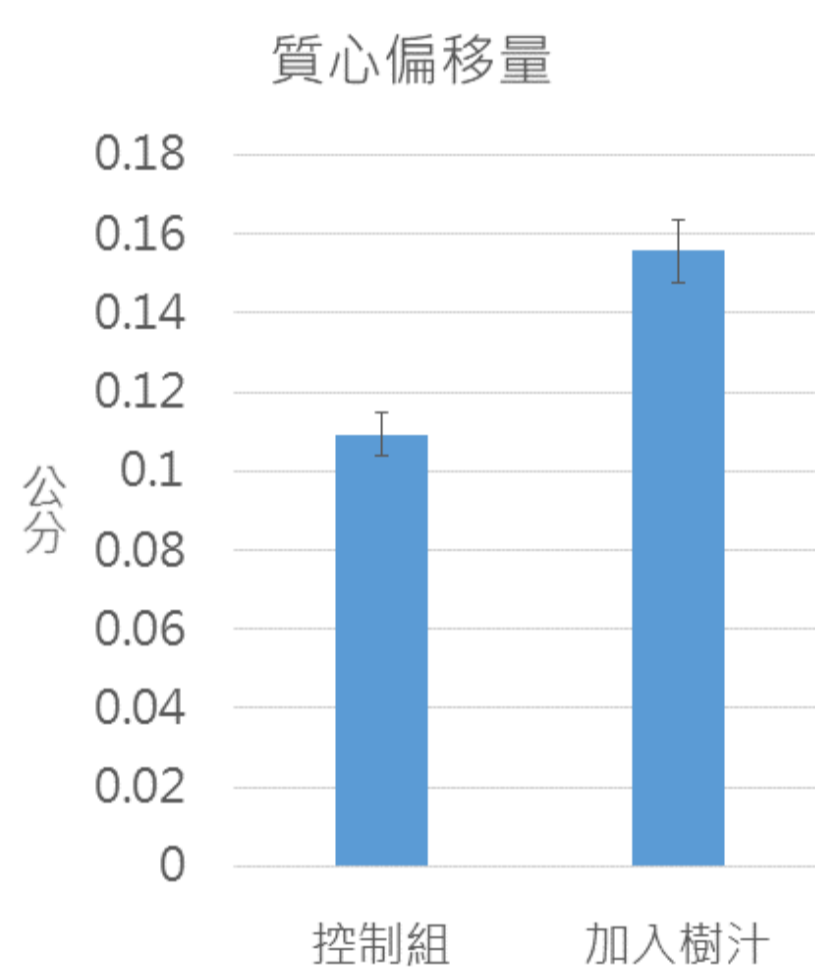
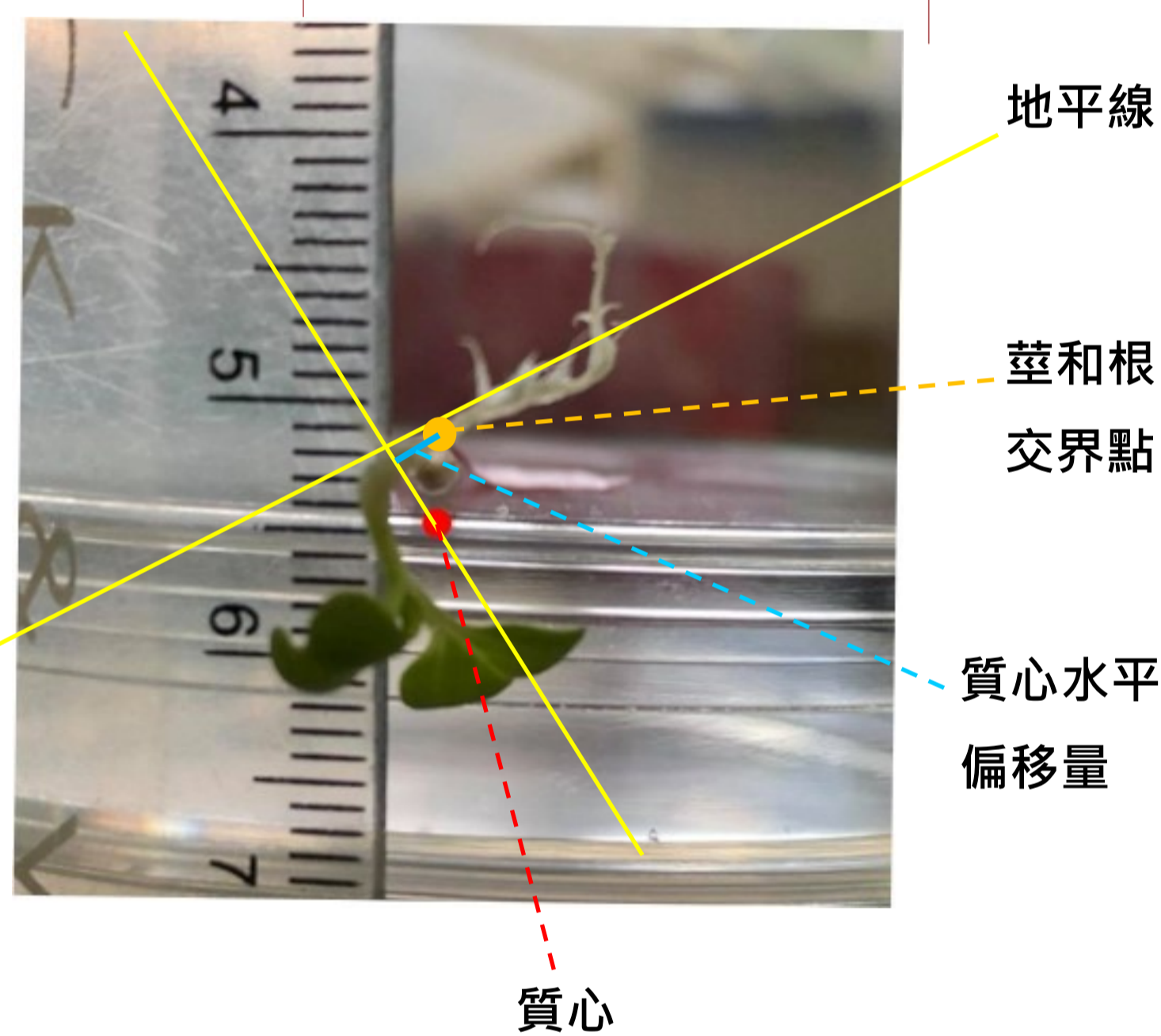
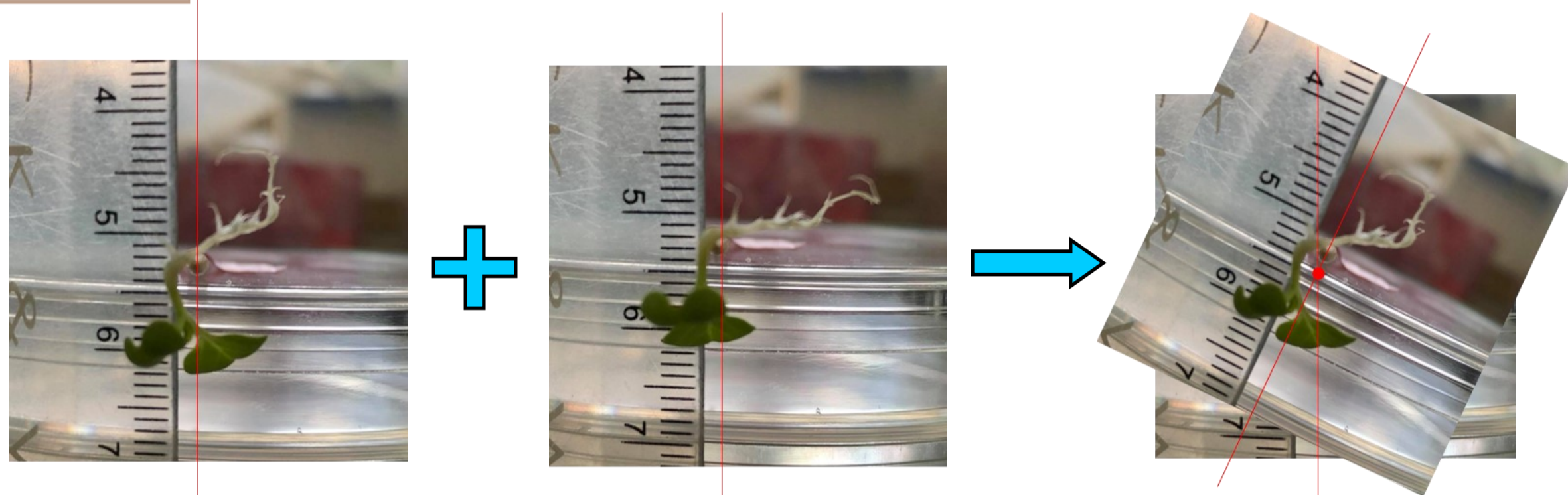
目的 探討 Ca²⁺是否會誘導 ROS 累積及其原因。



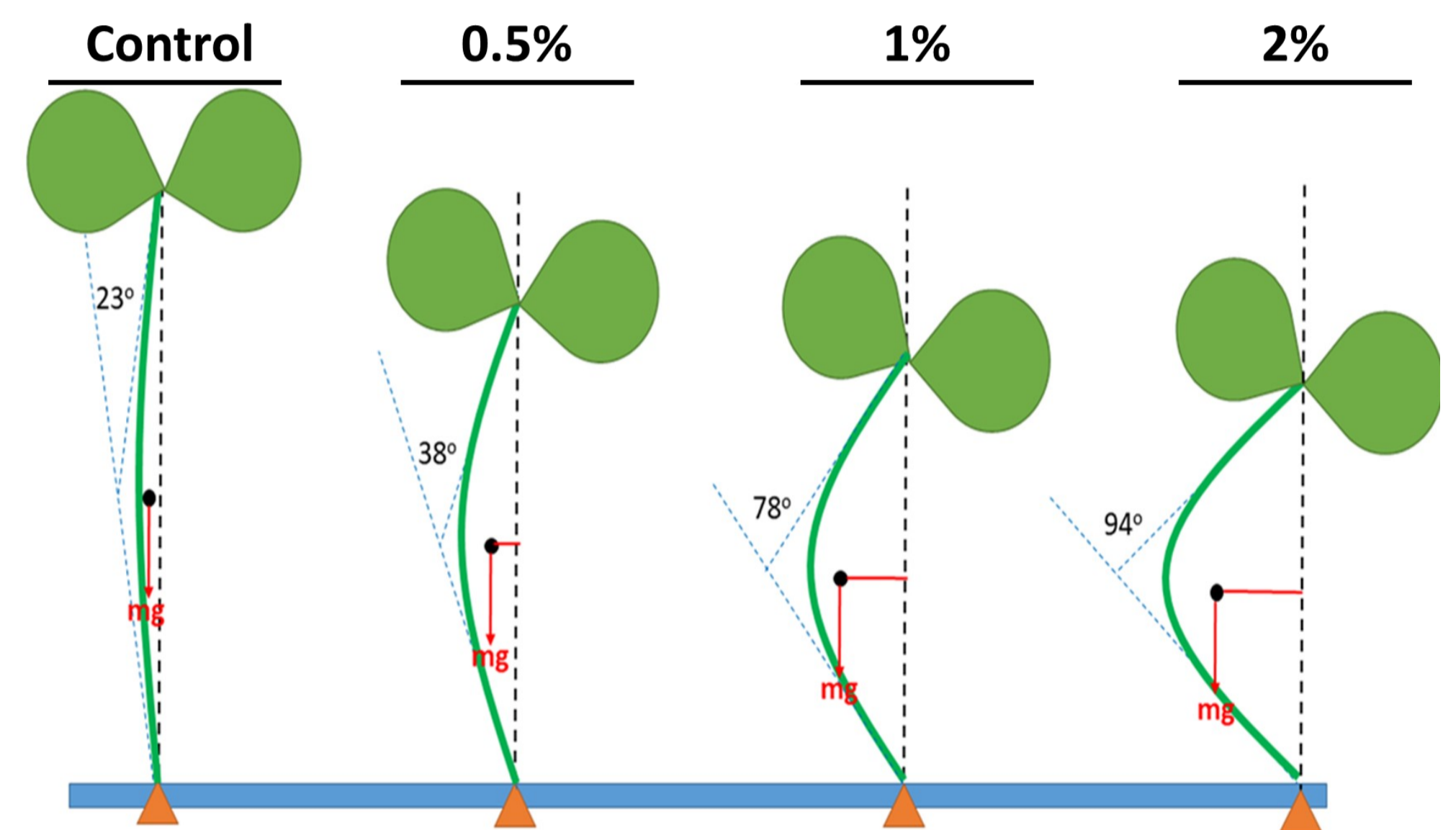
結果 植物在逆境中會累積 Ca²⁺濃度，進而刺激 RbOH 累積 ROS。

物理方法探討質心偏移現象

目的 探討質心偏移對上翹是否產生影響。

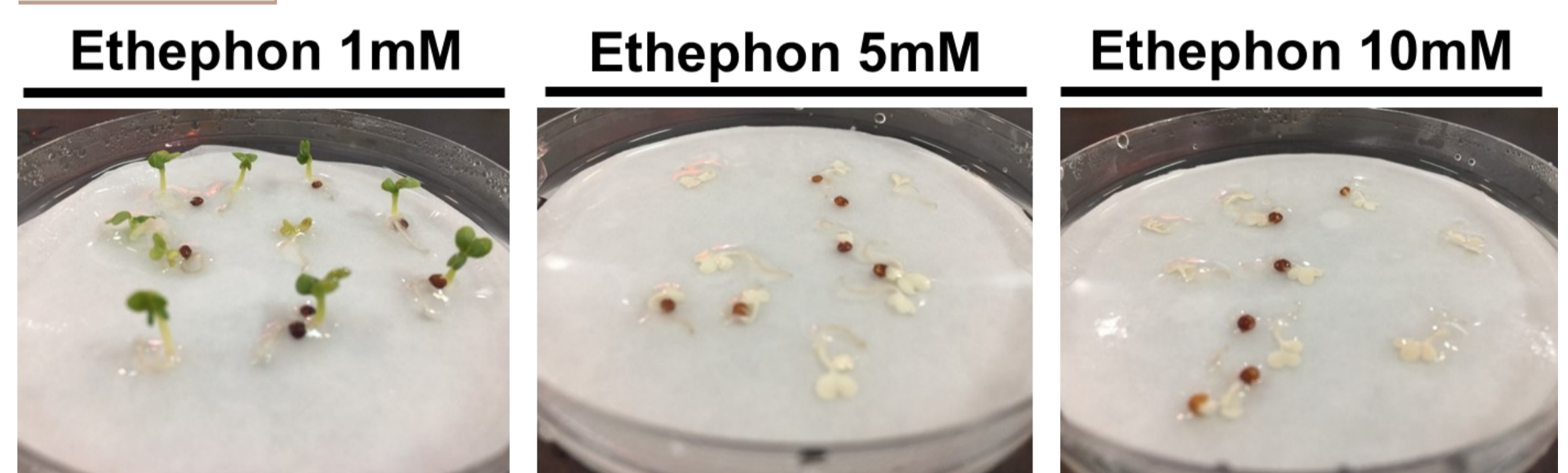


結果 樹汁會使小白菜產生質心偏移現象導致上翹。



乙烯對小白菜之影響

目的 觀察乙烯對小白菜上翹是否有影響。



結果 乙烯與小白菜上翹機制並無明顯關係。

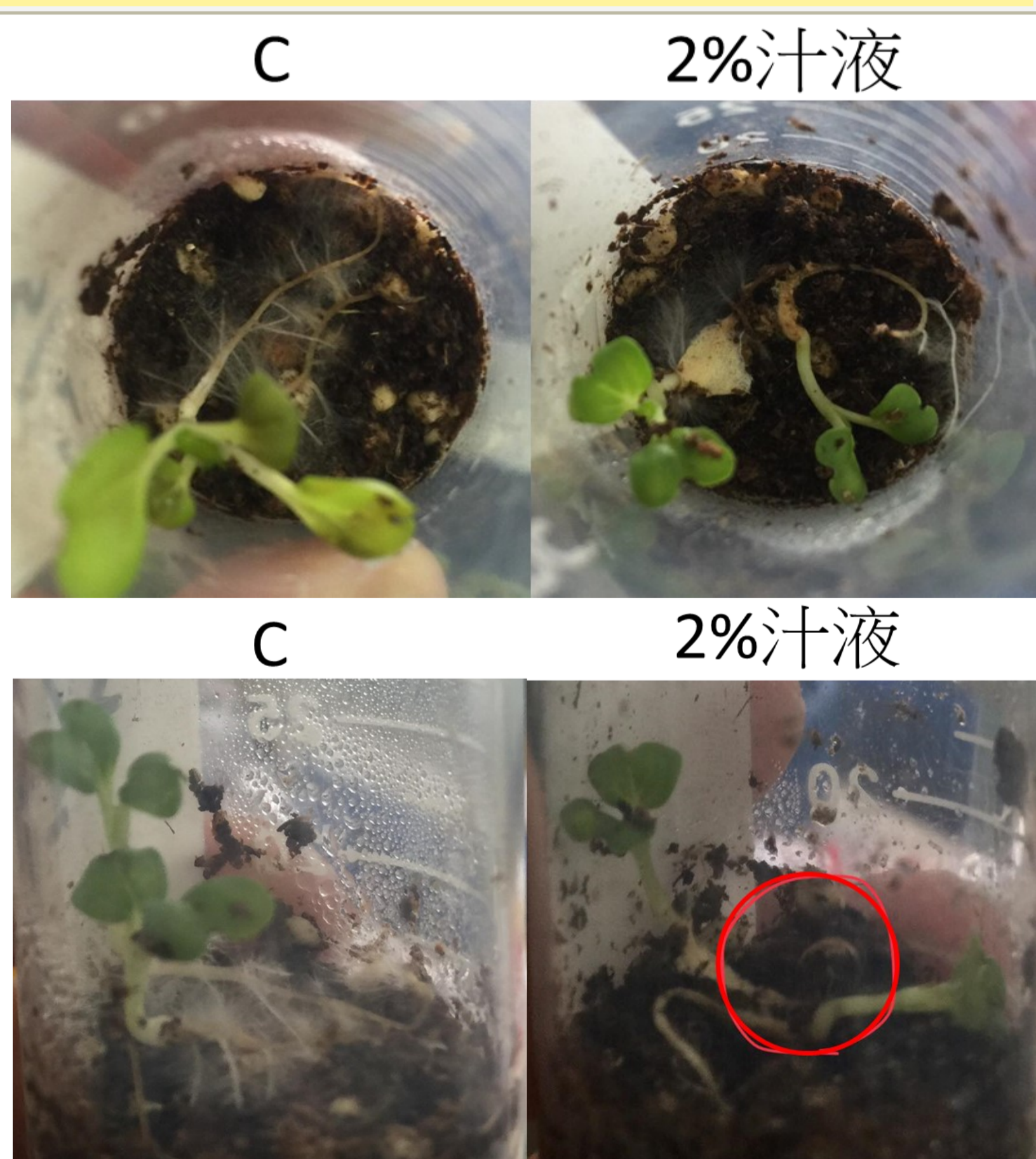
土壤環境模擬

目的

驗證在土壤中是否依然出現上翹情形。

結果

小白菜種植在土壤中，會出現根部上翹、根系減少的情形，符合先前的實驗結果。



IAA 傳訊

探究原因

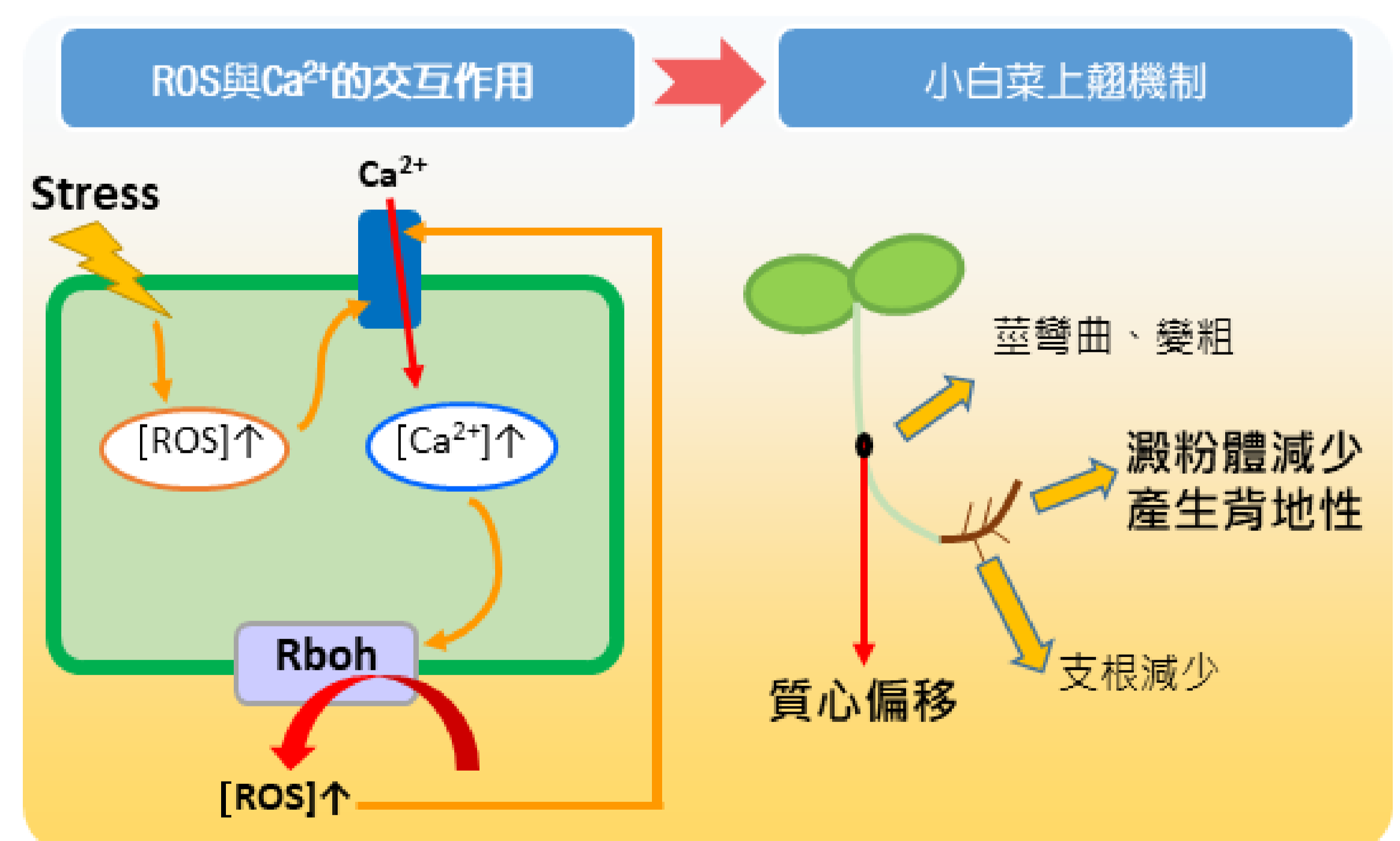
ROS 大多累積在小白菜的根部和莖頂，而生長素也源於根部與莖頂，能使植物產生向性。

討論部分

查詢資料後得知 PIN 蛋白的酵素會參與生長素的運送；推測有可能是 ROS 或是 ROS 誘導累積的鈣離子影響 PIN 蛋白，改變了生長素的運送路徑，使莖產生彎曲，最終導致上翹情形使植物脫離逆境。

討論與結論

結論



參考資料

- 高景輝 (2005)。植物生理分析技術。臺北市：五南。
- Aaron Baxter, Ron Mittler, Nobuhiro Suzuki(2013). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, Volume 65, Issue 5, 1 March 2014, Pages 1229 – 1240.
- Zhulong Chan, Ken Yokawa, Woe-Yeon Kim, Chun-Peng Song(2016). ROS Regulation during Plant Abiotic Stress Responses. *frontiers in Plant Science*.
- 李芳琳。2005。國立中興大學農藝學系碩士學位論文。Ascorbate peroxidase 8, glutathione reductase2 及 glutathione reductase3 在離層酸誘導幼苗老化扮演之角色。
- 楊光。2018。山梨醇對植株抗逆性作用的研究進展。
- 盧裔，盧重逸，張馥鏞。2012。『剋』敵致勝 - 植物的相剋作用。