

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

國中組 生物科

第二名

030321

喔「葉」！皇宮菜在缺水逆境中訊號傳遞之研究

學校名稱：復旦學校財團法人桃園市復旦高級中等學
校

作者： 國二 林宥甄 國二 皮羽晴	指導老師： 陳郁君
---------------------------------	------------------

關鍵詞：皇宮菜、氣孔簇、過氧化氫

摘 要

本實驗探討皇宮菜為適應乾旱的訊息調控機轉，我們發現不同生長階段耐旱程度不同，具耐旱力的成熟植株透過氣孔密度提高、氣孔簇發生和降低氣孔張開度，來減緩水分蒸散速率以維持葉子含水量，同時也發現皇宮菜在乾旱脅迫下過氧化氫的提高。我們噴施過氧化氫於耐旱力低的幼苗葉片，結果顯示氣孔密度和氣孔簇增加以提高葉片含水量，增強幼苗的耐旱性。當以抗氧化劑處理會降低成熟植株的抗旱能力，且進一步證實過氧化氫參與ABA的訊息調控機轉，改變表皮細胞形態和氣孔分布，並透過鈣離子調節氣孔運動優化氣體交換效率，達到減少水分散失維持光合產量，此有助於理解作物在乾旱下的氣孔發育模式，作為影響作物產量和土壤節水可能的潛在機制。

壹、研究動機

近年來全球性氣候的極端變化引發乾旱程度加重，對糧食生產造成嚴重的威脅，全世界的可耕地處於供水不足的狀態，乾旱會成為限制農業作物生產量的問題，尤其台灣地狹人稠使得可利用淡水資源不足，水資源危機和乾旱危害會加劇影響農業生產的發展。因此在水資源總量有限的情況下，發展節水型農業是緩解水資源供需的根本措施，如何提高作物的抗旱性，使作物能在旱地提高水分利用效率，灌溉少量的水分就能滿足作物代謝需水量是持續發展的目標選擇。

我們在國小進行科展研究時發現夏令作物皇宮菜可以對外界水分變化做出快速的調整反應，隨不同缺水程度氣孔密度明顯增加，而且在嚴重乾旱下氣孔簇發生率提高可以減少水分的蒸散量(第60屆科展)。查閱文獻指出「氣孔簇」(stomatal clusters)是植物陸生適應的標誌，氣孔聚集成簇的現象可能與外界環境水分變化有關，當植物生長在缺水環境，植物會以氣孔簇方式來反應乾旱逆境甚至逐步適應(Yi Gan et al.2010)，有研究報導植物為適應陸生環境形成了複雜的氣孔發育調控機制，涉及許多基因、訊號分子……(陸雯芸,2016)。於是我們想要探討皇宮菜在缺水條件下，表皮細胞透過何者訊息傳遞途徑來影響氣孔的發育以調整氣孔的數量，透過協調植物表皮的發育和生長的關係，以適應植物所處的外部環境條件。因此如何增強作物對乾旱脅迫的適應性，使其在缺水環境條件下透過灌溉少量的水分就能滿足作物代謝需求用水，提高植物的抗逆性，使水分利用效率顯著提高，維持較高的產量和品質成為我們關注的焦點。我們企圖研究皇宮菜適應乾旱的訊號分子，其如何誘導皇宮菜氣孔的發育，期望透過皇宮菜的耐旱機制尋找出如何提高作物抗旱，增強水分利用速率，對於乾旱環境中農業作物栽植提供基礎研究的應用價值可能性。

表一：本屆作品和第六十屆作者研究作品之比較

屆別	主題	動機和論點
第六十屆	喔「葉」！皇宮菜在缺水逆境的適應研究	<ol style="list-style-type: none">1. 好奇夏令作物中，其耐旱性是否相同？ →在夏令作物中發現皇宮菜的耐旱能力最強，相較其他作物，皇宮菜的蒸散速率快和氣孔密度高。2. 好奇皇宮菜的耐旱性是否和氣孔發育有關？ →皇宮菜在不同缺水程度下，氣孔密度和氣孔係數顯著增加，且明顯出現氣孔簇。
第六十三屆 本研究作品	喔「葉」！皇宮菜在缺水逆境中訊號傳遞之研究	<ol style="list-style-type: none">1. 研究皇宮菜在不同生長階段的抗旱性表現是否具有差異？2. 研究皇宮菜在適應乾旱下，透過那些訊號分子以調控氣孔發育和氣孔運動，來維持較高的光合產量。3. 以模型強化解釋「氣孔簇」的生物意義。

(一)「**皇宮菜**」(又名**落葵**)的介紹說明：

(1)學名：**Basella alba**，(落葵科 **Basellaceae**，落葵屬 **Basella**)。

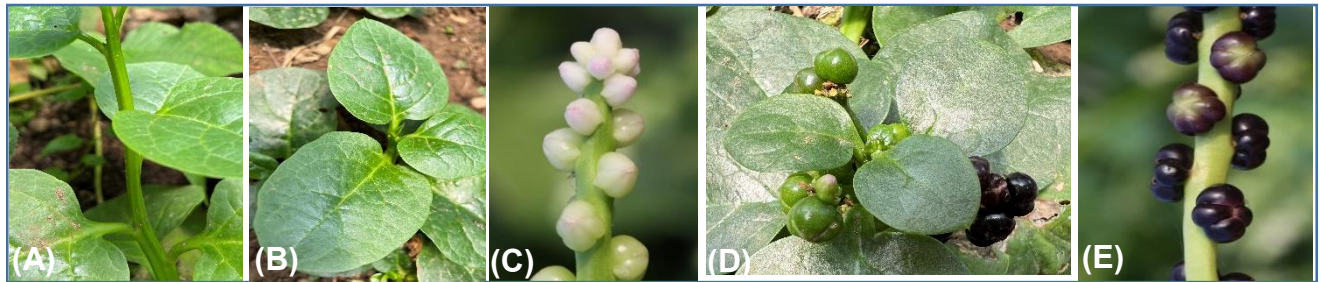
(2)分佈：原產於熱帶亞洲及非洲，廣泛分佈於低海拔地區。

(3)特徵：**(A)莖**：多年生的草本植物，肉質的莖具蔓延性，可直立伸展或沿支柱蔓生。

(B)葉：單葉呈卵圓形，互生於莖上，葉全緣無缺刻，有葉柄且柄長。

(C)花：花序為穗狀花序，花色淡粉紅，腋生，花徑約**0.4**公分，花萼**2**片，著生花冠基部；花冠**5**裂，裂片直立，先端鈍；雄蕊**5**枚，不具花絲；子房球形，花柱**3**個。

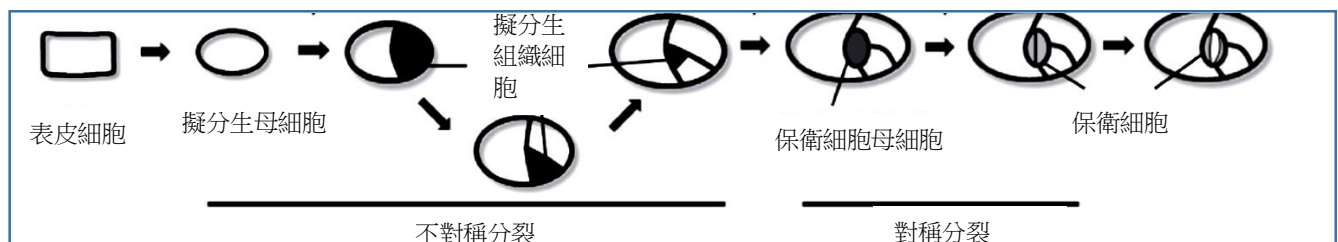
(D)果實：漿果，直徑約**0.5**公分，未熟時呈綠色，成熟後紫黑色，內含一粒種子，種子堅硬成熟時紫黑色，多汁而易於染色，是天然的食物著色劑。



圖一、皇宮菜的特徵 **(A)**葉互生於草本莖上**(B)**葉卵形**(C)**穗狀花序**(D)-(E)**未成熟和成熟漿果。

(二)氣孔的發育：

在氣孔演化過程中氣孔的數目和分佈遵循「至少一個細胞間隔」(one cell spacing cell) 的基本規則，也就是基本結構都是由一對保衛細胞和中間的微孔組成，每二個保衛細胞之間至少被一個非氣孔細胞分隔開，這種分佈有利於氣孔的開放和關閉，可以優化氣體的交換效率。



圖二、氣孔發育過程。(陸雯芸,2016)

研究報導指出雙子葉植物的原表皮細胞(protodermal cell)進入氣孔發育途徑，轉變為擬分生母細胞(meristemoid mother cell, MMC)。MMC 在一次不對稱分裂後形成一個呈小三角形的擬分生組織細胞(meristemoid, M)，和一個大的姐妹細胞，也稱之為氣孔世系基細胞(stomatal lineage ground cell, SLGC)，其中 M 可以繼續擴增或直接發育成保衛細胞母細胞(guard mother cell, GMC)，而 SLGC 則可分化為鋪板細胞(pavement cell)或衛星擬分生組織(satellite meristemoid, SM)，SM 能在胞間信號調控下形成 GMC。GMC 經一次對稱分裂之後，產生 2 個高度特化的保衛細胞(GC)，從而形成氣孔(陸雯雲,2016)。氣孔的發育過程會受到外界的環境信號的影響，如外界的光照或水分等，引發內部細胞之間的訊息分子的傳遞，協調植物表皮的發育和生長的關係，以適應植物所處的外部環境條件。

貳、研究目的

本研究目的在探討皇宮菜在乾旱逆境中，氧化壓力和氣孔發育之間的關聯性，進一步研究過氧化物和離素參與植物抗旱性的分子訊號調控機制。

- 一、觀察不同生長階段的皇宮菜在面臨乾旱環境下葉子氣孔形態和生理化學反應的變化。
 - (一)比較幼苗和成熟植株在不同程度的缺水條件中，氣孔密度、氣孔簇形成的差異。
 - (二)比較幼苗和成熟植株在不同程度的缺水條件中，氣孔張開度和蒸散速率的差異。
 - (三)比較皇宮菜在不同缺水逆境下，過氧化物生成量的差異。

- 二、探討在外源過氧化物下，皇宮菜的氣孔形態、氣孔運動和過氧化物濃度的關聯性。
 - (一)外加不同濃度的 H_2O_2 處理，比較氣孔密度、氣孔簇形成的差異。
 - (二)外加不同濃度的 H_2O_2 處理，比較氣孔張開度和蒸散速率的差異。

- 三、探討外源抗氧化劑 **NAC**，比較皇宮菜在面臨缺水逆境下葉子氣孔形態、氣孔運動和生理化學反應的變化。
 - (一)外加抗氧化劑處理，觀察氣孔密度、氣孔簇形成的差異。
 - (二)外加抗氧化劑處理，觀察氣孔張開度和蒸散速率的差異。

- 四、探討外源離素 **ABA** 和 Ca^{2+} ，比較皇宮菜在面臨缺水逆境下葉子氣孔形態、氣孔運動和生理化學反應的變化。
 - (一)外加 **ABA** 和 Ca^{2+} 處理，觀察氣孔密度、氣孔簇形成的差異。
 - (二)外加 **ABA** 和 Ca^{2+} 處理，觀察氣孔張開度和蒸散速率的差異。
 - (三)外加 **ABA** 和 Ca^{2+} 處理，比較過氧化物生成量的差異。

- 五、分析皇宮菜在乾旱條件下，歸納過氧化物和離素在皇宮菜面臨乾旱環境中所扮演的角色作用，和氣孔發育、分佈的關聯性，期此基礎研究可以應用在耕作節水之參考可能性。

參、研究設備與器材

一、儀器設備：

複式顯微鏡、電子目鏡、精密電子數位式天秤、分光光度計、植物培養箱、烘箱、離心機。



圖三、儀器 (A)複式顯微鏡 (B)電子目鏡 (C)分光光度計 (D)植物培養箱 (E)電子數位式秤。

二、實驗器材、藥品和生物材料：

(一)植物氣孔玻片製作器材：載玻片、透明指甲油、透明膠帶。

(二)蒸散速率測量器材：氯化亞鈷試紙、鑷子、吹風機、測時碼表。

(三)藥品和配製器材：過氧化氫(H_2O_2)、NAC (N-Acetyl-L-Cysteine, BioChemica)、ABA(abscisic acid, $C_{15}H_{20}O_4$)、氯化鈣($CaCl_2$)、燒杯(500、250、100ml)、量筒、滴管、微量吸管、噴霧器、離心管。

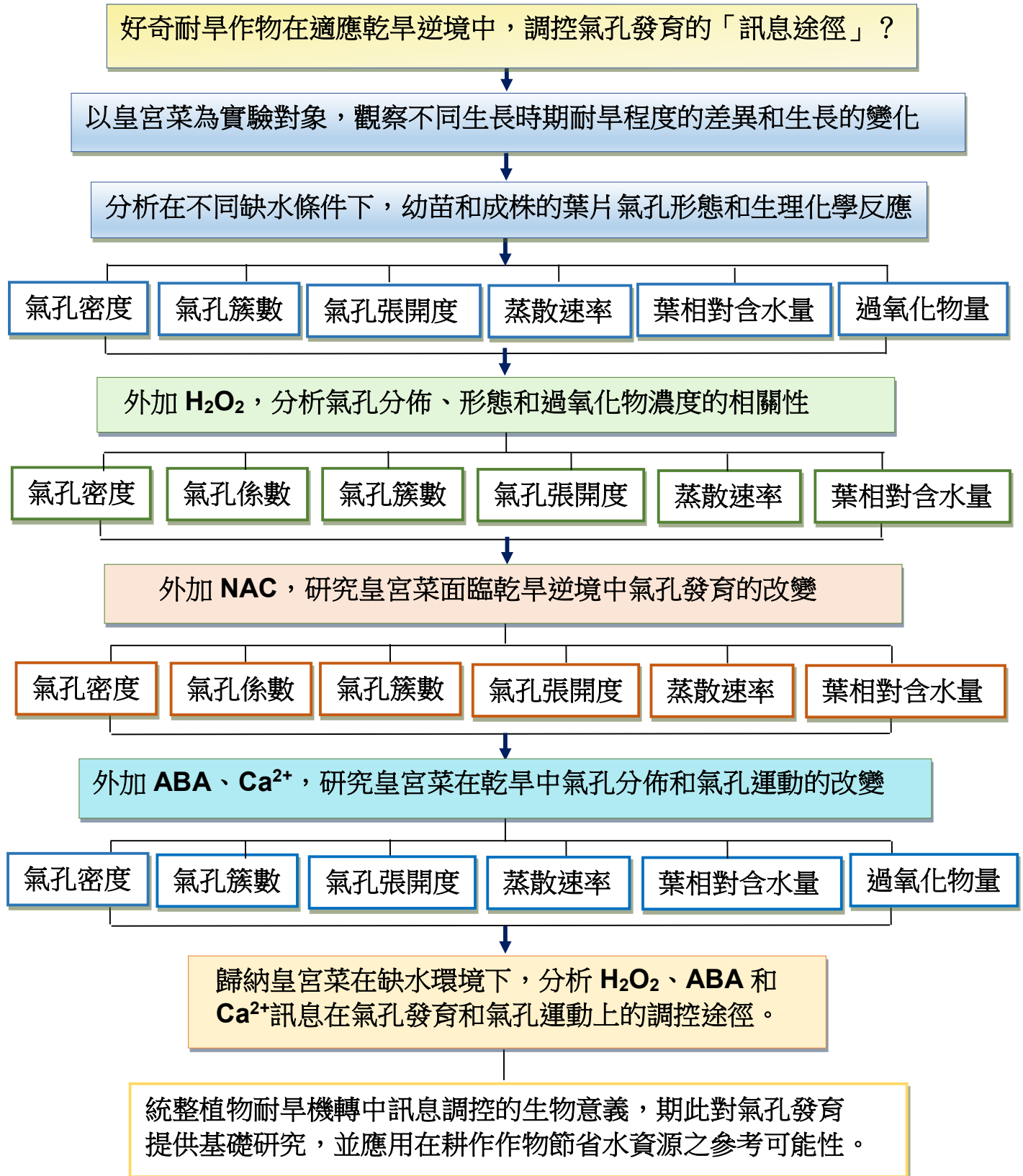
(四)其他：游標尺、計數器、土壤溼度計、照度計、研鉢、培養土、3吋盆栽數個。

(五)生物材料：皇宮菜幼苗和成熟植株。



圖四、實驗器材和生物材料 (A)皇宮菜植株 (B)蒸散測量用 (C)藥劑和配置用 (D)土壤溼度測試

肆、研究過程與方法



一、馴化植株和設計不同程度的乾旱條件

(一)在實驗溫室馴化和幼苗植株、成熟植株的篩選：

- 1.將植株莖高度3公分以內(初生和後生葉共六片)皇宮菜栽種在三吋盆栽,作為「幼苗植株」,以及莖高度15公分以上的皇宮菜作為「成熟植株」,每天固定時間澆水固定量20cc使土壤呈飽和狀態(澆水量能維持總土量潮濕,溼度計測土壤濕度達80%以上),進行馴化一週。
- 2.觀察馴化一週皇宮菜的生長狀況,以有新生葉子和老葉無出現黃化的盆栽視為「生長適應良好」,將生長適應良好植株盆栽以指定條件或外加噴液處理。在試驗過程中盆栽置於植物培養箱(恆溫26°C、光照強度200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14小時光照/10小時黑暗)進行觀察。

(二)皇宮菜在不同缺水條件的耐旱試驗設計：

1.不同程度乾旱試驗的指定條件：

不同乾旱條件	飽水	輕度乾旱	中度乾旱	嚴重乾旱
處理方式	20cc / day (每天澆水)	60cc / 3day (第三天澆水)	20cc / 3day (第三天澆水)	完全不澆水

2.每天秤重盆栽,進行蒸散量測試,和在第一、第二、第三和第四週進行蒸散所需時間測試,比較不同程度乾旱的蒸散速率差異,第四週試驗畢後以指甲油印模法觀察氣孔數量、分佈的改變。以上各組條件皆試驗三重複以上。

3.生長情形觀察:皇宮菜在特定處理下觀察指定葉片生長狀況,利用游標尺測量試驗前後的葉片的長徑和寬徑,計算長 \times 寬之值,「試驗後」 \div 「試驗前」計算出「生長率」。



圖五、幼苗和成熟植株皇宮菜在不同缺水程度逆境中的生長觀察和氣孔蒸散量試驗。

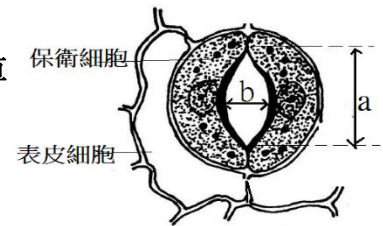
二、蒸散速率和氣孔分佈變化的研究

(一)利用指甲油印模法觀察植物葉子的氣孔分佈和數量：

- 1.不同條件處理皇宮菜在指定葉子(從莖頂往下數的第5、6片葉子)採集葉下表皮的基部，為印跡樣品。
- 2.以透明無色指甲油薄薄地塗在待觀察之葉片上，等至薄膜自然乾透，黏上透明膠帶並撕下黏在載玻片上，於複式顯微鏡下觀察氣孔在葉片上的數量和分佈情形，移動玻片隨機選擇5個視野並以電子目鏡連接顯微鏡和DINO-EYE軟體擷取目鏡視野下的照片。每個處理至少進行三重複，得葉表皮印跡共30個數據(2個葉片×5個視野×3重複)，用於葉表皮形態氣孔特徵的觀察和分析。
- 3.各項指標項目觀察：

- (1)利用計數器計算每張照片的氣孔和表皮細胞的數量，再藉由載物台測微器以換算顯微視野的實際直徑，計算顯微實際面積，求得每平方mm有多少個氣孔，為「氣孔密度」。
- (2)一個氣孔是由兩個保衛細胞所包圍，我們將氣孔數乘上2倍再除以保衛細胞數和表皮細胞總數，可以得知每平方mm內的保衛細胞數目與表皮細胞數目總和中有幾個氣孔，求得「氣孔係數」。
- (3)觀察每個視野下出現多少次氣孔簇，每個玻片選擇十個視野以上，求得氣孔簇總和後再除以觀察視野數目，做為平均一個視野出現幾次氣孔簇，為「氣孔簇發生率」。
- (4)每個玻片選取十個外形完整的氣孔，利用Image J軟體測其長徑(a)及寬徑(b)(如右圖)，利用橢圓形面積公式計算氣孔張開面積，作為氣孔張開度。

$$\text{氣孔張開度} = \frac{\text{長徑} \times \text{寬徑} \times 3.14}{4} \quad (\text{mm}^2)$$



氣孔密度(stomatal density)= 氣孔數目/單位面積(氣孔數目/mm²)

氣孔係數(stomatal index)= $2N_s/(2N_s+N_e)$ (N_s ：氣孔數目， N_e ：表皮細胞數目)

氣孔簇發生率(clustering index)：氣孔簇出現的總數/選取的視野數目×100%

氣孔張開度(stomatal aperture)：(氣孔長徑×氣孔寬徑×3.14)÷4

透明指甲油塗在葉背的基部部位 → 用透明膠帶黏在風乾後指甲油上 → 將指甲油拓印的膠帶黏在載玻片 → 以顯微鏡觀察氣孔，DINO-EYE 連接顯微鏡，在電腦上擷取照片



圖六、以指甲油印模法觀察氣孔密度分布和氣孔運動的試驗。

(二)測量蒸散所需時間的蒸散速率測試：

- 1.將實驗組別分別於處理特定天數下，取各組指定的葉子(從莖頂下數的第5片葉子)，以透明膠帶黏上無水氯化亞鈷試紙，先經吹風機乾燥處理30秒，立刻貼在葉上指定位置。
- 2.當藍色氯化亞鈷試紙貼至待測葉背的基部位置，同時按下碼表計時器，以碼表計時葉片上的藍色氯化亞鈷試紙，整張完全轉變為粉紅色的時間 (變粉紅代表乾燥氯化亞鈷試紙潮濕，表示水分蒸散量足以使氯化亞鈷試紙潮濕所需時間)，紀錄蒸散所需時間。
- 3.每個特定處理條件至少三重覆，計算出平均值，以Excel和SPSS進行資料分析及繪製統計圖。



圖七、以氯化亞鈷試紙測量蒸散速率試驗。

(三)測量蒸散量的測試：

- 1.將作物種在三吋盆栽，每天固定時間澆水20cc(維持土壤濕度=80%以上)，至土壤飽滿水分，盆栽內多餘水分會從盆栽底洞流出，直到不再有水流出再進行秤重。隔天開始不澆水處理為「第一天」進行(嚴重)乾旱試驗，連續四週。(另外只有土壤沒有栽植作物的盆栽，為對照組。)
- 2.蒸散量測試：乾旱試驗過程中，每天觀察作物的存活情形和生長表現以記錄之，並進行盆栽秤重，計算每天重量的變化，扣除背景蒸發量後再求出不同處理組別的蒸散量，以統計分析蒸散量製作曲線圖。

蒸散量 = 有作物的盆栽減少的重量 - 只有土壤的盆栽減少的重量(自然蒸發量)

= [(作物盆栽重量) - (前一天作物盆栽重量)] - [(只有土壤盆栽重量) - (前一天只有土壤盆栽重量)]

(四)測量葉片的相對含水量：

- 1.乾旱處理四週後，取各組特定處理植株的新鮮葉片各五片(由頂芽下第4~8片)，秤新鮮葉片的質量(「鮮重」)後泡水至飽和(約浸泡3小時)，進行秤重質量為「飽和鮮重」，放進烘箱以70°C烘乾六小時後，再秤質量(「乾重」)，計算出相對含水量。
- 2.依公式計算：相對含水量 = (鮮重 - 乾重) ÷ (飽和鮮重 - 乾重) × 100%。進行三重覆。

三、過氧化物含量的測定

取試驗葉片1公克和10ml蒸餾水在研鉢中進行研磨，研磨後的溶液放進離心管，利用離心機轉速 2000 r.p.m.旋轉10分鐘。之後取離心管中上層清澈溶液放入測定瓶中，加入過氧化氫測定藥錠，由分光光度水質分析儀器顯示測定濃度值(mg/L)，再以葉片鮮重量1公克(Fresh Weight, F.W.)進行轉換數據(mg/g F.W.)，每一條件處理進行三重複以上。

四、以外加試劑噴施方式對皇宮菜在逆境中試驗：

1.在乾旱處理前三天開始對植物葉面連續噴施特定濃度的試驗溶液試劑，每天每盆植株噴施1次，每盆每次噴施量均保持相同(為1mL，噴施程度為葉面濕透無滴水)，連續進行四周。每個條件皆以三個不同植株進行處理且至少試驗三重複。

2.處理條件：

藥劑	對照組	H ₂ O ₂ (μmole/L)				NAC (mmole/L)		ABA(μM)	CaCl ₂ (mM)
濃度	蒸餾水	200	500	1000	2000	10	50	200	50

3.測定各項指標：各組別進行蒸散量、蒸散速率、和表皮細胞形態顯微觀察等實驗。



圖八、配製試劑溶液和過氧化物測定試驗。

五、資料統計方法

(一)Excel繪製統計圖：

所有處理均以三次重複數據的平均值和標準誤差(standard deviation)表示，利用Excel繪長條圖，並在長條圖表示誤差線(error bar)，以此數據最為整體數據分散程度的指標。

(二)SPSS 檢定統計量分析：

利用獨立樣本 T-test 或 ANOVA 檢定，和虛無假設無差異雙尾檢定(two-tailed)以分析是否有差異或關聯存在，若 p 值小於 0.01，表示虛無假設不成立，可確定實驗結果是具有顯著性差異 (獨立 T 檢定 p < .01 以 * 表示，ANOVA 以不同字母表示 p < .01)。

伍、實驗結果

一、 探討皇宮菜在不同缺水條件下的葉片氣孔形態和生理化學反應

(一)不同生長時期的皇宮菜在乾旱環境中的生長情況：

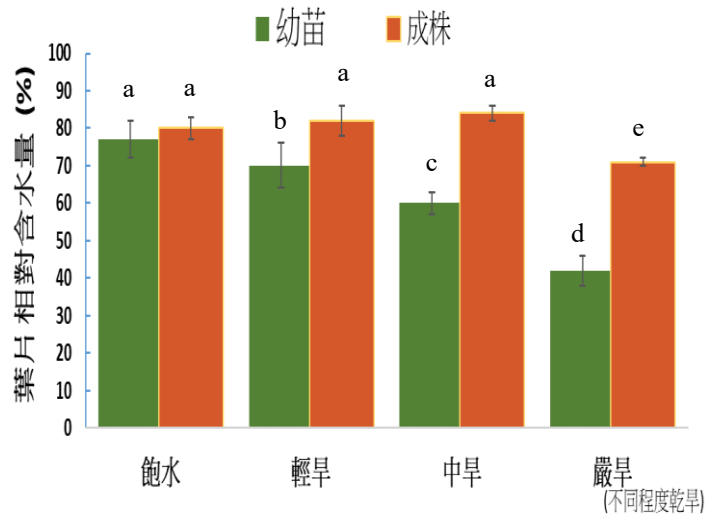
我們在國小科展的研究中發現皇宮菜相較其他夏季作物，具有很強的耐旱能力，於是我們繼續選擇皇宮菜作為我們的研究對象，探討適應耐旱的訊號機轉。首先我們好奇不同生長階段的皇宮菜，耐旱能力是否具有差異。我們發現不論是幼苗或成熟植株的皇宮菜在試驗兩週內沒有出現明顯枯萎，然而在試驗四周之後，成熟植株在嚴重缺水逆境中葉片仍能存活，大部分葉片保持鮮綠，但幼苗的葉片有明顯面積縮小、厚度變薄的趨勢，邊緣開始皺縮最後枯萎。此試驗我們得知皇宮菜的幼苗相較成熟植株個體，無法適應長期嚴重乾旱的環境，我們猜測皇宮菜成熟植株對水分的需求量低，在長期嚴重缺水環境中仍能生存，相較幼苗期可以表現出極強的乾旱適應力。



圖九、不同生長階段的皇宮菜在缺水環境的生長差異。(藍色箭頭表示葉皺縮，黃色為葉黃化)

(二)不同時期的皇宮菜在不同缺水條件下葉片含水量的差異：

皇宮菜成熟植株和幼苗適應耐旱程度不同，可能是在不同生長階段的代謝需水量不同，我們好奇葉片的含水量是否具有差異。我們將成熟植株和幼苗植株分別以不同乾旱程度處理四週後，發現在相同乾旱程度中，成熟植株的葉片相對含水量皆高於幼苗，而且成熟植株在輕度和中度乾旱的含水量相較飽水處理沒有顯著差異，而重度乾旱只降低約10%，但是幼苗組在嚴重乾旱的葉片含水量，相較飽水處理顯著減少40%以上。由此可知成熟皇宮菜不論在飽水或乾旱中，其葉片相對含水量都維持高比例狀態，可以具有極高的保水能力，以適應乾旱環境，我們發現幼苗葉片含水量在乾旱環境下明顯減少，以致幼苗的抗旱力低於成熟植株，然而成熟植株和幼苗的葉片含水量差異是否和水分蒸散有關呢？

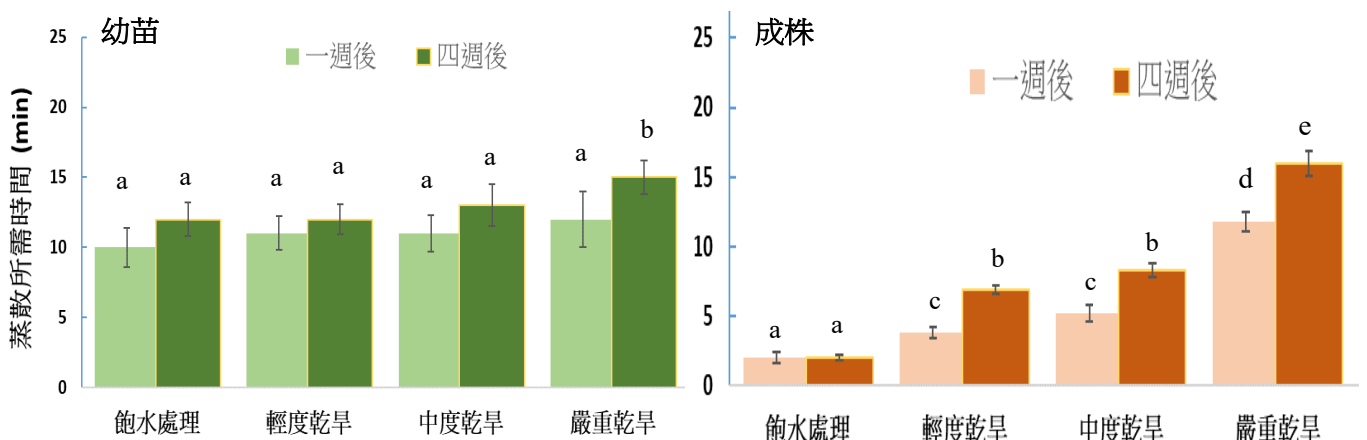


圖十 不同乾旱條件對皇宮菜葉片含水量的影響

(組間比較,字母不同 $p < .01$)

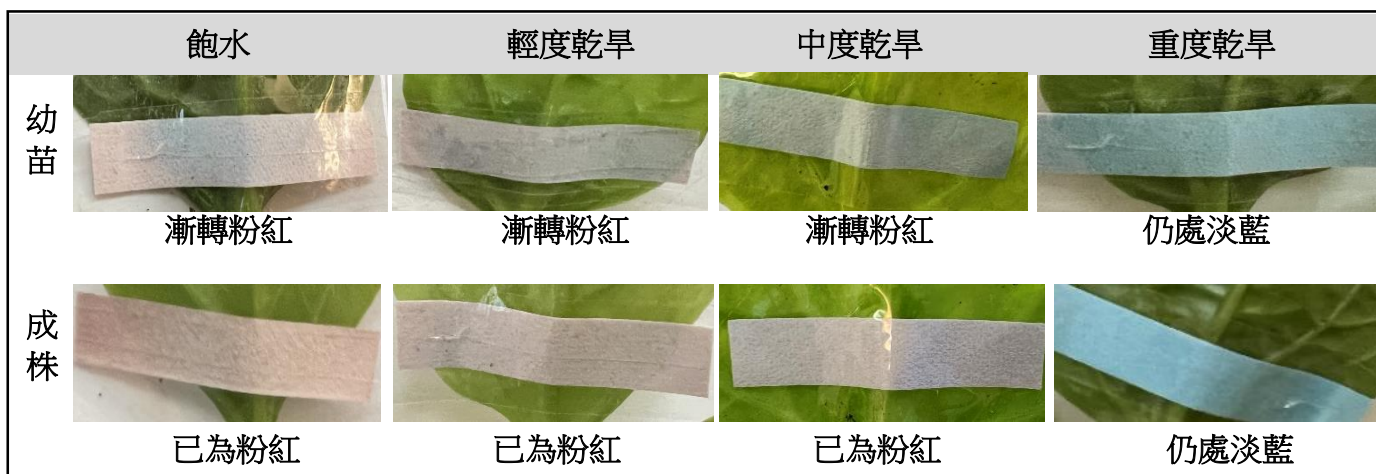
(三)不同時期的皇宮菜在不同缺水條件下蒸散速率的差異：

我們採用氣孔數較多的下表皮基部作為觀察位置，比較在不同程度乾旱環境中氣孔蒸散速率是否有所差異，我們發現成熟植株在乾旱初期時，蒸散所需時間明顯拉長是飽水對照組的兩倍，隨著乾旱程度的加劇，蒸散速率愈慢，尤其嚴重乾旱組在長期乾旱下的氯化亞鈷試紙完全變粉紅所需的時間，相較飽水處理組近多達十倍。但是幼苗在乾旱環境中，一週後和四週後時的葉片單位面積蒸散速率和飽水組相比無顯著差異，即使是嚴重乾旱條件，不同於成熟植株組別，蒸散速率沒有明顯加快或減慢。由以上結果得知成熟植株在乾旱環境會減慢蒸散速率以保持葉片含水量，因此我們推論幼苗和成熟植株在面臨乾旱環境蒸散速率的差異，會影響皇宮菜抗旱能力的表現。



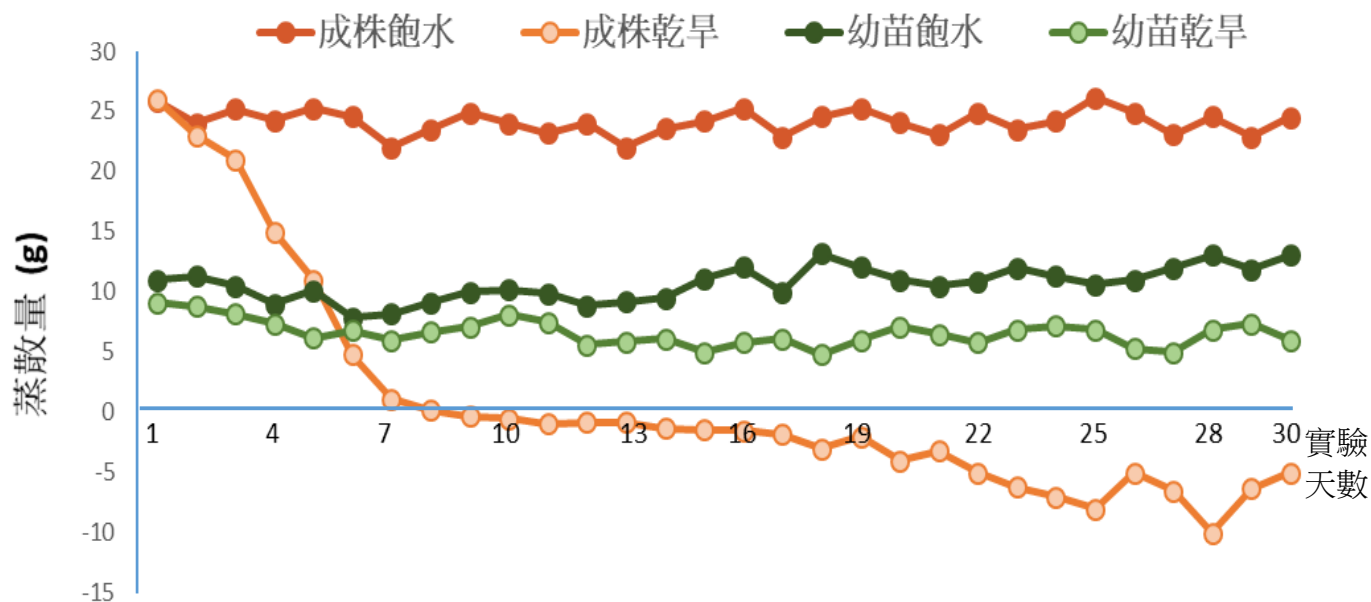
圖十一 不同乾旱條件對皇宮菜蒸散速率的影響

(組間比較,字母不同 $p < .01$)



圖十二、皇宮菜幼苗和成株在缺水四週的蒸散速率試驗 (氯化亞鈷試紙測試十分鐘後的變色情形)。

進一步我們發現皇宮菜的蒸散量也隨著蒸散速率的差異而有所變化。成熟植株在每天提供20cc飽水處理下，氣孔的蒸散量大約在20~25公克，但在缺水條件下，氣孔的蒸散量開始出現明顯降低，在嚴重乾旱的長時間缺水下，蒸散量更是明顯有加劇下滑的趨勢，甚至蒸散量出現負值，有趣的是耐旱性較差的幼苗在乾旱環境中無此現象。我們認為皇宮菜透過調控氣孔蒸散的變化，使其具有將水分保存在體內的能力，以適應乾旱缺水的環境，而成熟植株相較幼苗有高抗旱能力，抗旱性的差異是否和葉面氣孔密度分布和氣孔運動相關呢？

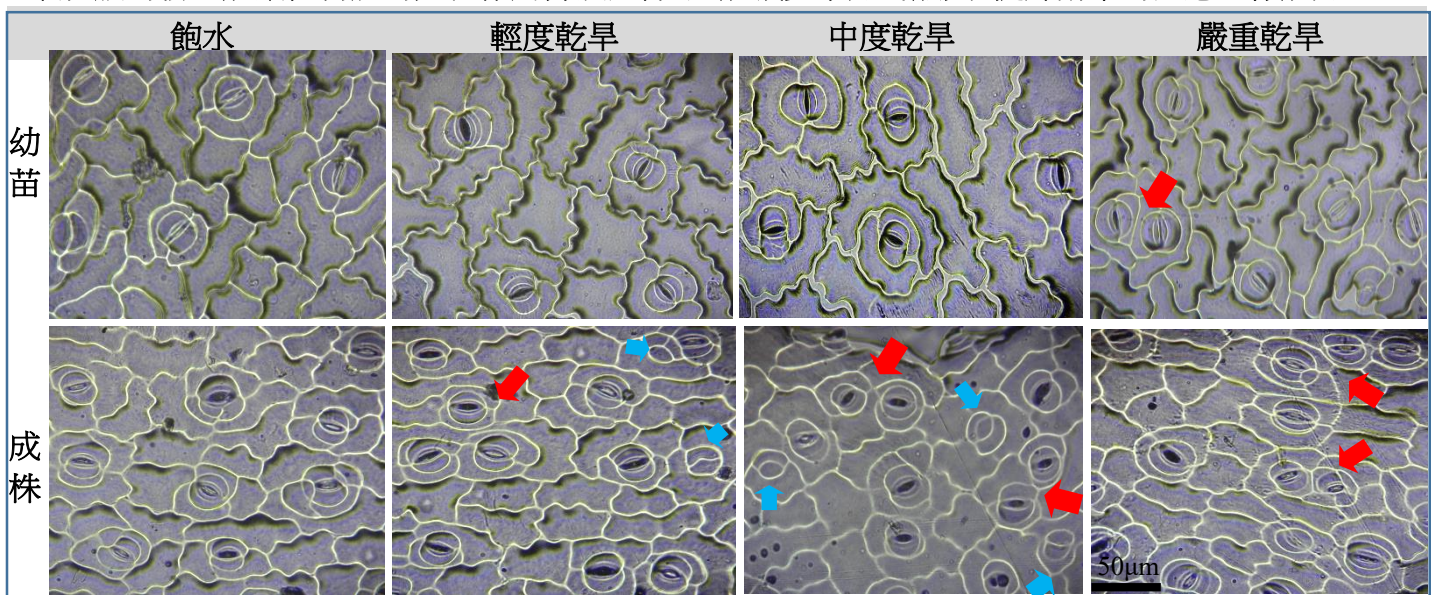


圖十三不同乾旱條件對皇宮菜蒸散量的影響

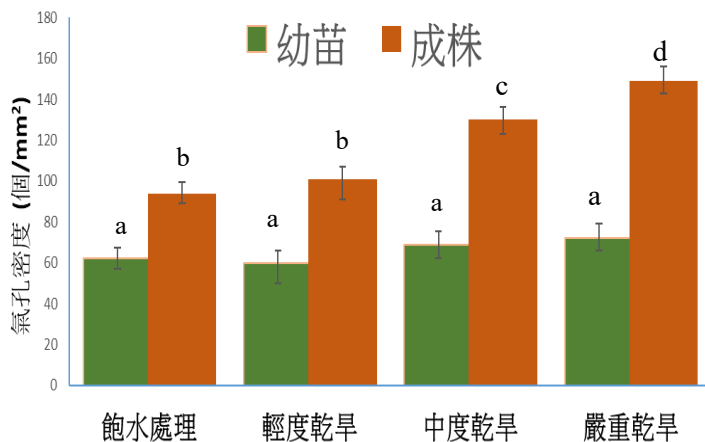
(四)不同時期的皇宮菜在不同缺水條件下氣孔分佈和氣孔運動的變化：

氣孔在植物的蒸散過程中扮演著重要的角色，而氣孔在葉面的密度和分佈與蒸散作用的強度存在著密切關係，我們以指甲油印模法來觀察皇宮菜在不同的缺水逆境下，氣孔密度和分佈是否會有所差異，以及和蒸散速率是否有所關聯。在實驗四週後發現成熟植株在輕度乾旱下的氣孔密度和飽水組沒有顯著差異，但中度乾旱組和嚴重乾旱組的氣孔密度有明顯增加，而且嚴重乾旱組的氣孔密度、氣孔係數，相較飽水處理的對照組分別增加了60%、40%。但特別的是，乾旱的幼苗和飽水組相比，沒有顯著差異。

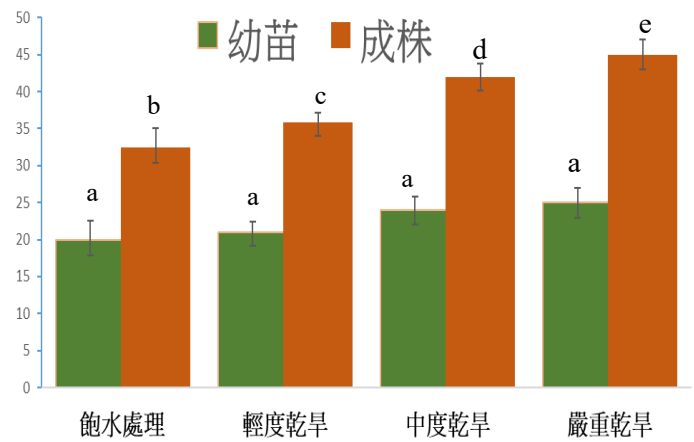
我們不僅發現成熟植株因應乾旱表皮細胞分化為保衛細胞的比例顯著明顯，氣孔密度隨乾旱程度有明顯上升，在顯微觀察氣孔的分佈有聚集成簇的表現形態，而且簇狀氣孔群發生頻率隨乾旱程度加劇和乾旱天數拉長而有增加的趨勢，嚴重乾旱組的氣孔簇出現的比例最高，相較對照組增加五倍以上。但耐旱性低的幼苗在乾旱中沒有顯著增加氣孔簇。我們推測成熟植株在缺水逆境下蒸散速率減緩，可能和氣孔密度與氣孔簇發生率的增加有所相關，皇宮菜藉由氣孔密度和氣孔分佈的改變和減小氣孔張開度，但並非全部關閉的趨勢，以維持光合產量。皇宮菜在乾旱期間，氣孔簇的發生能讓植物體的光合作用持續進行，又能減少水分的散失，提升耐旱的適應生存能力。



圖十四、顯微觀察葉面下表皮的氣孔分佈。(紅色箭頭為氣孔簇形成，藍色箭頭為擬分生組織細胞)

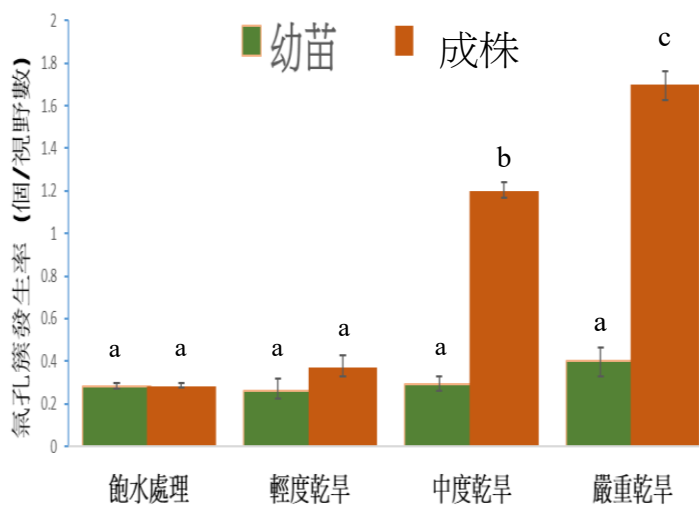


圖十五 不同乾旱條件對皇宮菜氣孔密度的影響

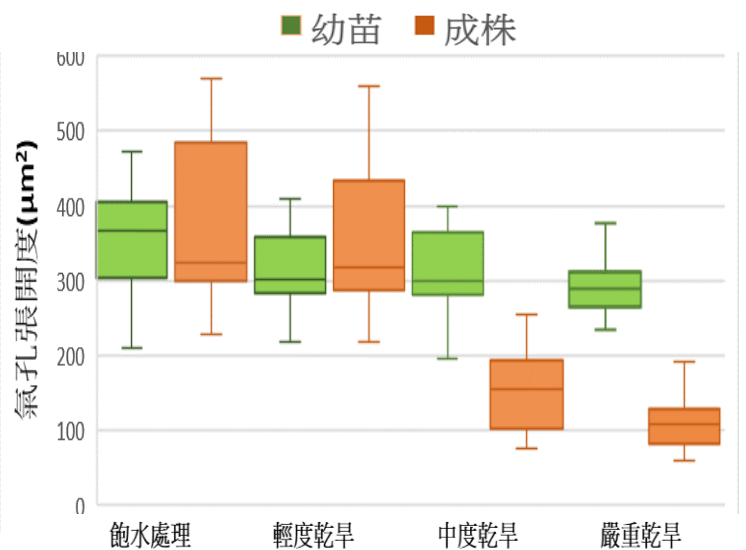


圖十六 不同乾旱條件對皇宮菜氣孔係數的影響

(組間比較,字母不同 p< .01)



圖十七 不同乾旱條件對皇宮菜氣孔簇發生率的影響
(組間比較,字母不同 p< .01)



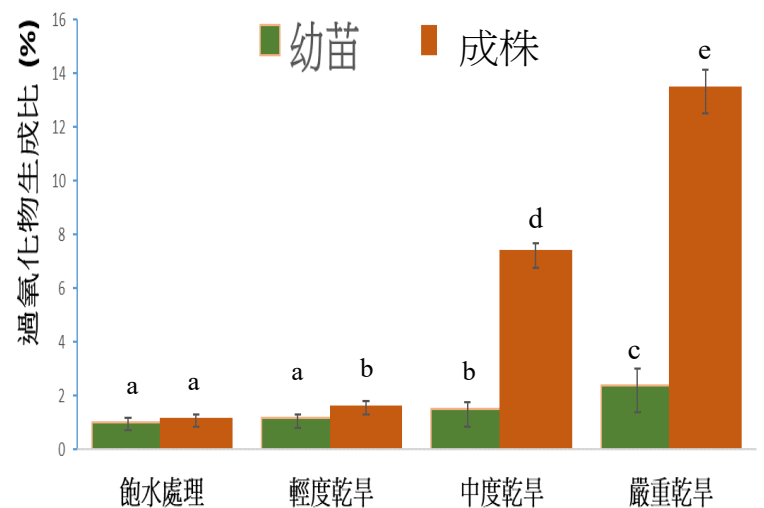
圖十八 不同乾旱條件對皇宮菜氣孔張開度的影響

(五) 不同時期的皇宮菜在不同缺水條件下細胞內過氧化物生成的差異：

由文獻資料中得知植物面臨逆境會增加過氧化物以應付逆境，我們好奇耐旱性高的皇宮菜細胞內的生理化學反應機制，在缺水條件下是否會產生過氧化物。

化學分析結果指出幼苗在乾旱四週生成的過氧化氫產物相較對照組在統計上無顯著差異。但成熟植株在乾旱下產生的過氧化氫產量相較飽水對照組有明顯的差異，而且隨著乾旱程度的提高，過氧化氫產物也隨之增加，同時發現皇宮菜在嚴重乾旱下，過氧化氫增加十倍之多。

綜合以上實驗結果，在中、重度乾旱條件下，氣孔密度和過氧化氫量在成熟植株顯著高於幼苗，這似乎說明具有耐旱能力的成熟植株在乾旱條件下，會促使表皮分化成保衛細胞以形成氣孔，和誘發大量的過氧化氫生成，過氧化氫物質是否影響氣孔分化，在皇宮菜耐旱機轉中扮演重要角色，是我們進一步要去探討的。

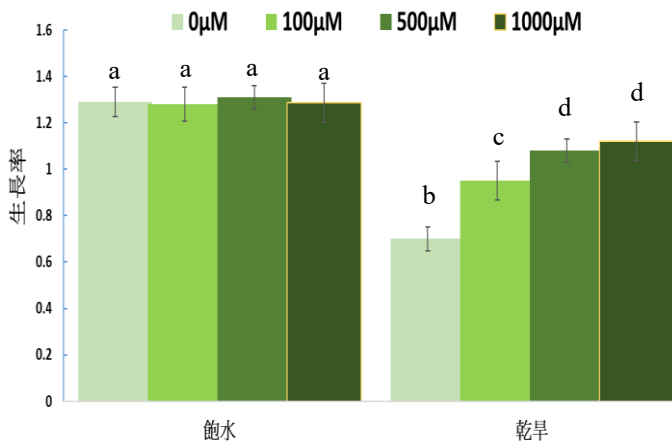


圖十九 不同乾旱條件對皇宮菜過氧化物生成的影響
(組間比較,字母不同 p< .01)

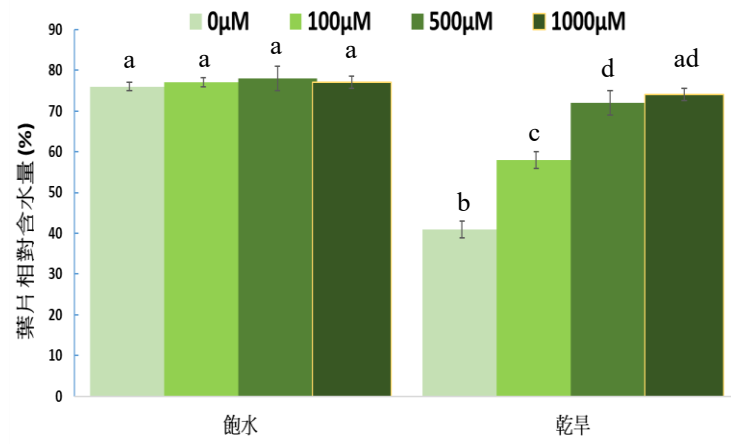
二、探討外源過氧化氫在皇宮菜適應乾旱的訊息調控

(一)外加噴施過氧化物對皇宮菜幼苗葉片含水量的變化：

為了證明過氧化氫參與皇宮菜乾旱適應的生理機轉中，我們以相較成熟植株耐旱性低的幼苗，噴施不同濃度的過氧化氫，觀察幼苗在缺水環境中葉面形態和耐旱表現是否改變。實驗結果發現皇宮菜幼苗在長期嚴重缺水下，葉片面積縮小、邊緣萎縮，但如果每天噴施過氧化氫的組別葉子依然呈現鮮綠，葉片萎縮情況減慢，生長率相較對照組增加40%以上，而且葉子相對含水量比噴施蒸餾水(對照組)顯著增加，隨著 H_2O_2 濃度增加會提高葉片含水量， $500 \mu M H_2O_2$ 組別的葉片含水量達70%，相較對照組約增加80%，但是過高濃度的過氧化氫(超過 $1000 \mu M$)會導致葉子細胞有受損情形發生。我們發現適量濃度的 H_2O_2 對皇宮菜幼苗葉片形態沒有傷害影響，而且在乾旱環境中有助於葉片的生長和含水量的保持，似乎有效提升幼苗的耐旱適應能力。



圖二十、外加 H_2O_2 對幼苗植株葉片生長的影響

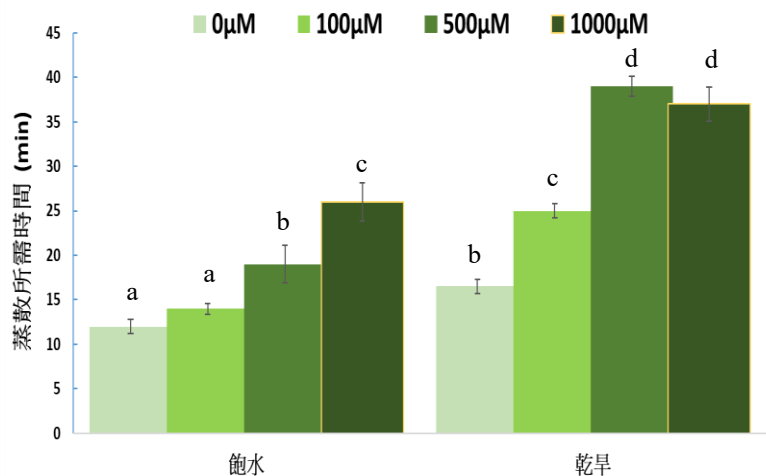


圖二十一、外加 H_2O_2 對幼苗植株葉片含水量的影響

(組間比較,字母不同 $p < .01$)

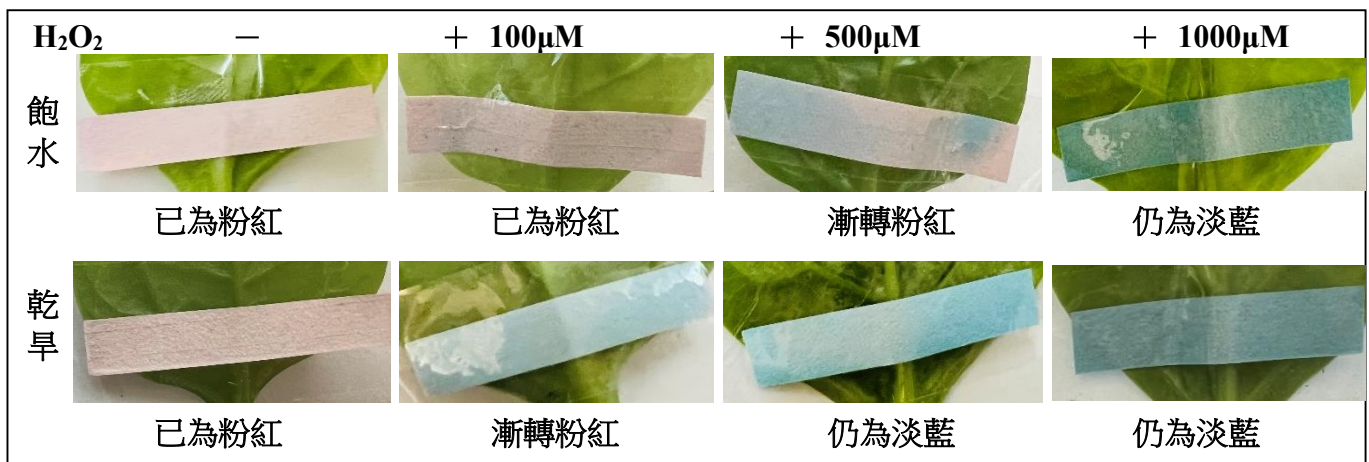
(二)外加噴施過氧化物對皇宮菜幼苗蒸散速率的變化：

H_2O_2 影響幼苗在乾旱中的葉片含水量是否和氣孔蒸散速率有關呢？我們發現以過氧化氫噴施葉片會造成乾旱中的幼苗蒸散所需時間明顯拉長，相較對照組，外加過氧化氫會降低蒸散速率，我們推測過氧化物的加入，會減慢氣孔蒸散速率，以提高幼苗葉片在乾旱環境下的含水量。進一步我們好奇 H_2O_2 作用在葉面上是否會改變氣孔的密度分布，進而影響水分蒸散速率以提高幼苗的耐旱表現。



圖二十二、外加 H_2O_2 對幼苗植株葉片蒸散所需時間的影響

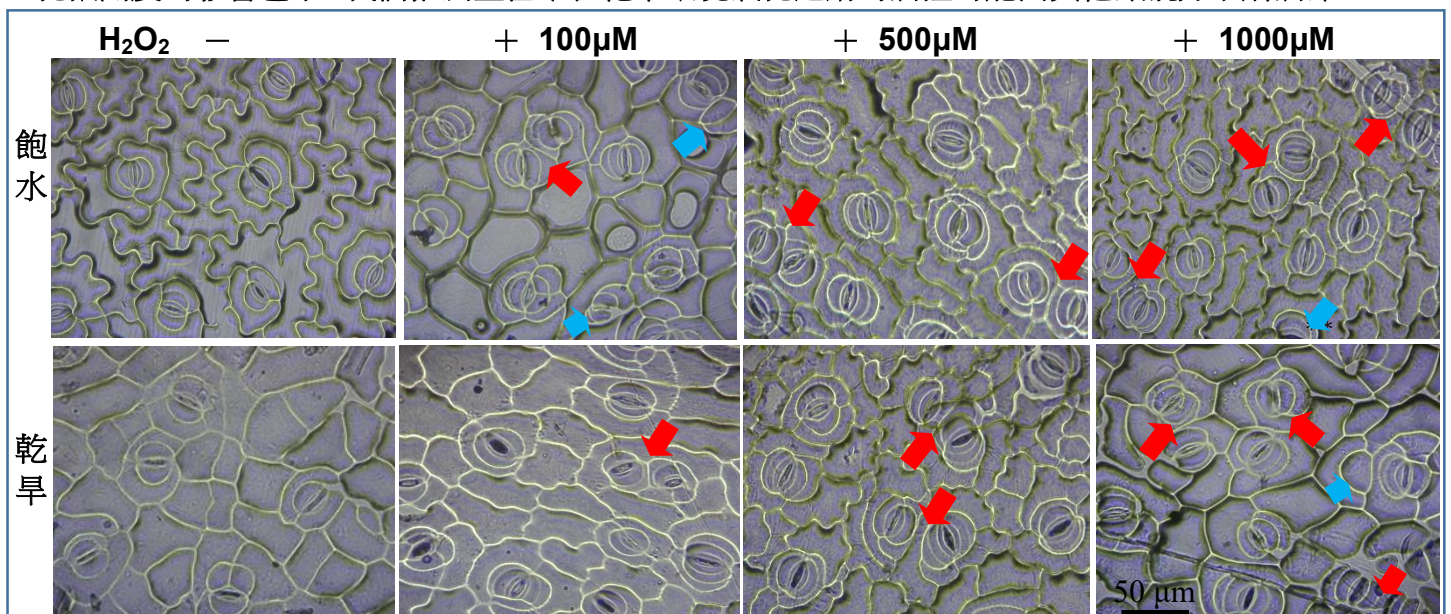
(組間比較,字母不同 $p < .01$)



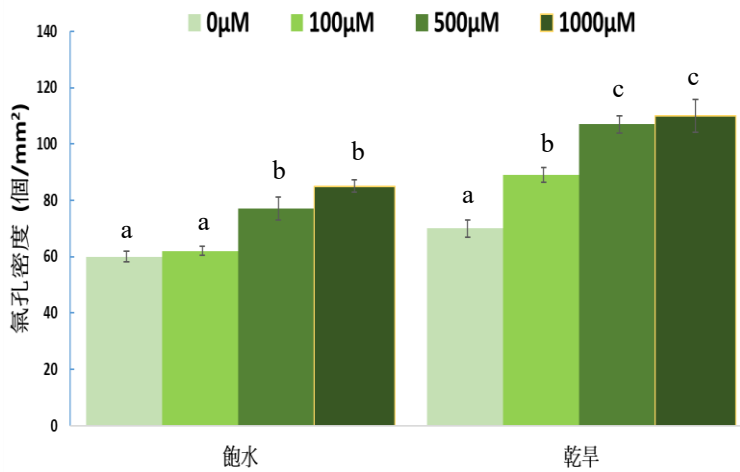
圖二十三、皇宮菜在外加噴施過氧化氫四週後的蒸散速率試驗（氯化亞鈷試紙測試十五分鐘後的變色情形）。

(三)外加噴施過氧化物對乾旱中皇宮菜幼苗氣孔分布的變化：

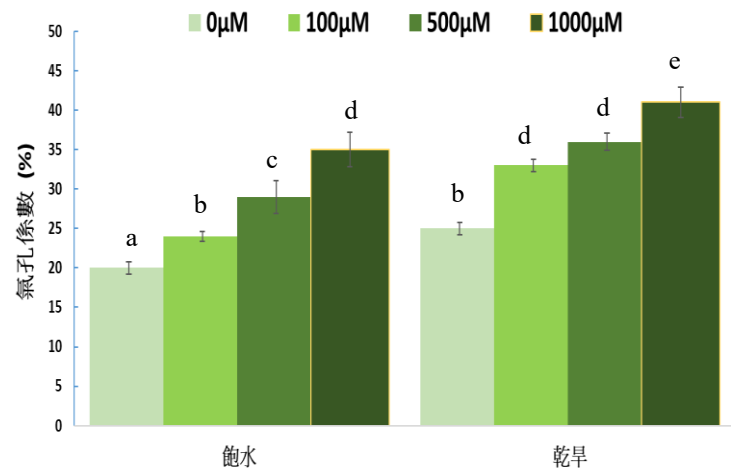
我們發現皇宮菜幼苗葉片經噴施過氧化氫處理，會誘導保衛細胞的分化形成氣孔，隨著 H₂O₂處理濃度的提高，氣孔密度、氣孔係數有明顯上升趨勢，**1000μM**過氧化氫處理四週後氣孔密度和氣孔係數皆增加**50%**以上，而且氣孔簇發生頻率隨過氧化氫濃度提高而有明顯幅度的增加，**500 μ M**組別的氣孔簇增加幅度大，更高濃度處理的氣孔簇數目沒有顯著增加，似乎達定值。皇宮菜幼苗在噴施過氧化氫下，會誘發衍生出氣孔簇的構造，但對於氣孔張開度沒有一致性的顯著影響。以上結果似乎說明過氧化氫會影響氣孔的分化，提高氣孔數目以誘導氣孔簇的發生，推測過氧化氫在皇宮菜乾旱適應的生理機制中扮演著重要功能角色。同時我們發現過氧化氫對氣孔張開度的影響甚小，我們推測皇宮菜在乾旱環境氣孔運動的調控可能由其他訊號分子所調節。



圖二十四、顯微觀察葉面下表皮的氣孔分佈。(紅色箭頭為氣孔簇，藍色箭頭為擬分生組織)

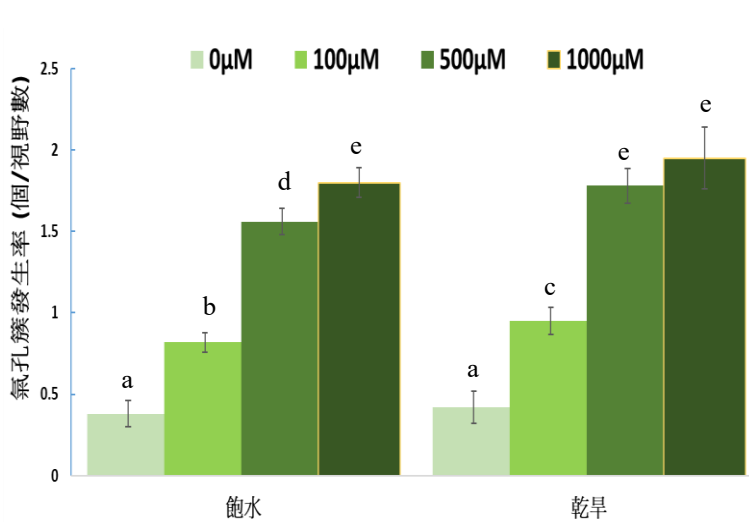


圖二十五、外加H₂O₂對幼苗植株葉片氣孔密度的影響

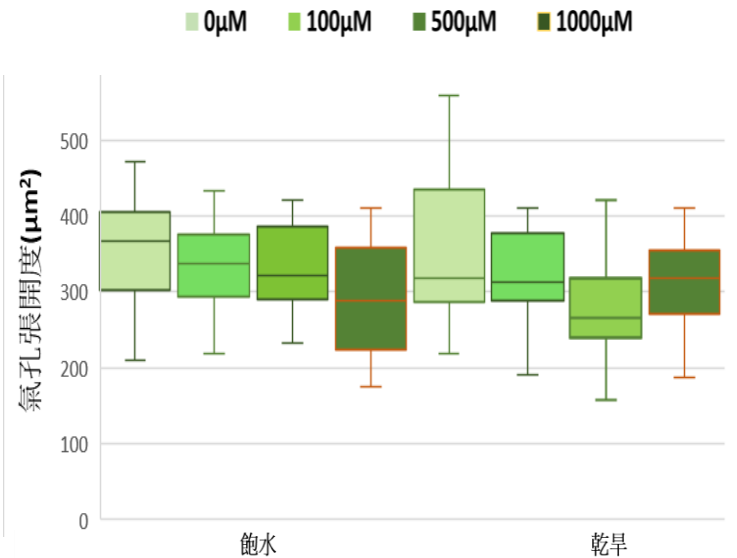


圖二十六、外加H₂O₂對幼苗植株葉片氣孔係數的影響

(組間比較,字母不同 p<.01)



圖二十七、外加H₂O₂對幼苗植株葉片氣孔簇發生的影響

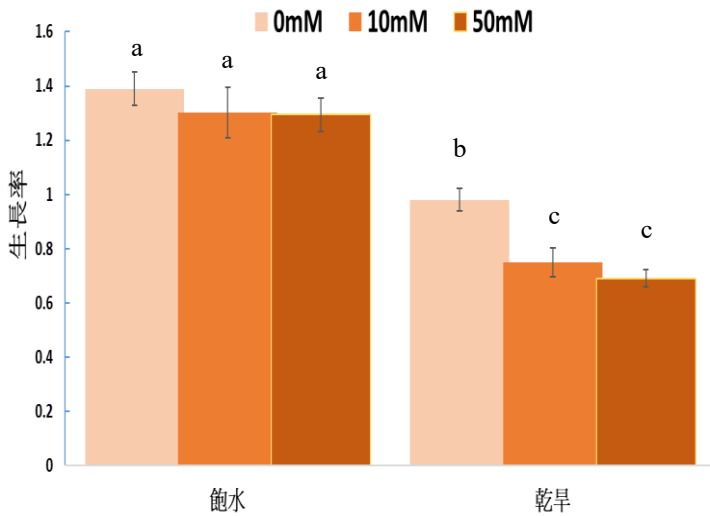


圖二十八、外加H₂O₂對幼苗植株葉片氣孔張開度的影響

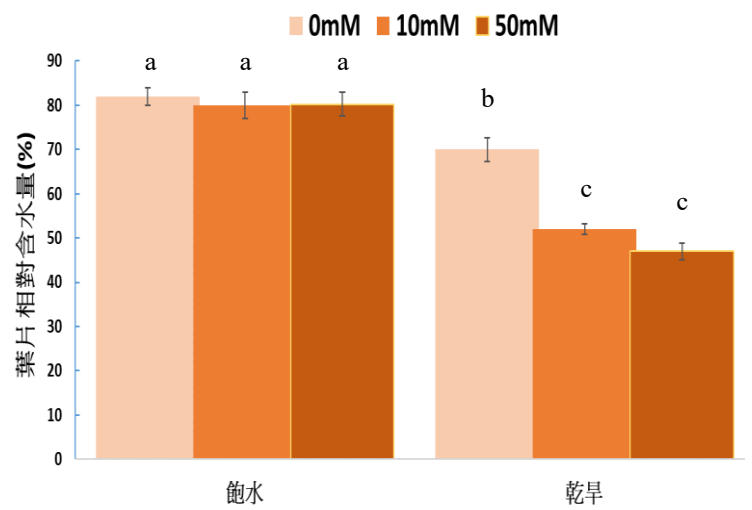
三、探討皇宮菜在消除氧化壓力下的乾旱適應改變

(一)外加噴施NAC抗氧化物對皇宮菜成熟植株葉片含水量的變化：

我們為了證實過氧化氫對皇宮菜適應乾旱的功能角色，以抗氧化劑NAC消除細胞內的過氧化化物測試其是否會影響皇宮菜的抗旱適應。我們以耐旱性高的成熟植株為實驗對象，以噴施NAC抗氧化劑在乾旱環境中皇宮菜的葉片上，實驗結果發現NAC處理連續四週，造成長期乾旱的葉子含水量降低，隨著NAC濃度的提高至50mM，葉子含水量相較對照組降低30%，我們更加確認皇宮菜透過過氧化物訊號分子在乾旱環境中維持葉子含水量，其是否和氣孔的分化和氣孔運動有關呢，我們進一步以指甲油印模觀察氣孔分布試驗來證實。



圖二十九、不同濃度NAC對成熟植株葉片生長的影响

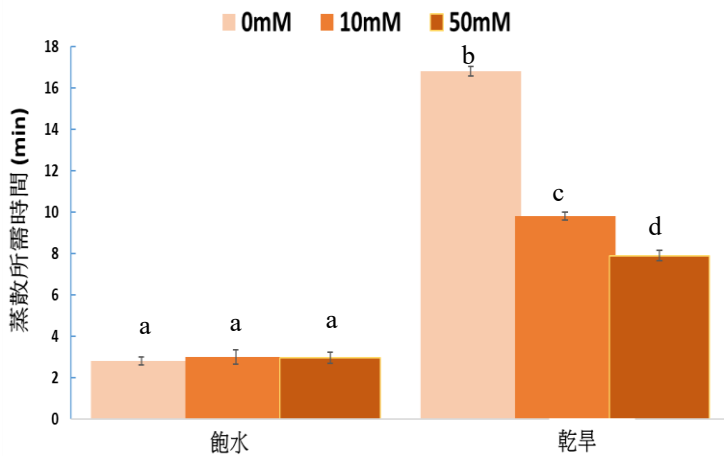


圖三十、不同濃度NAC對成熟植株葉片含水量的影响

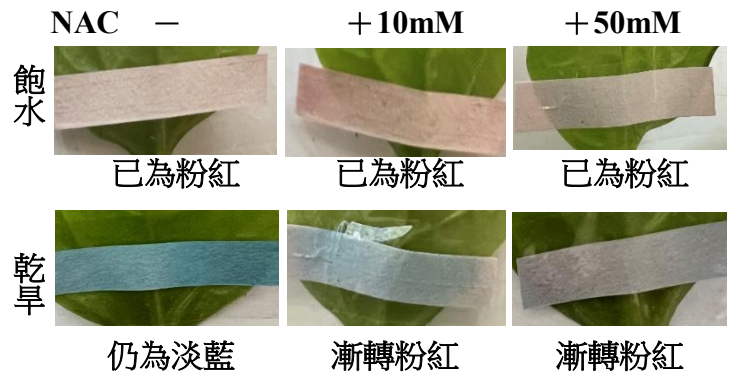
(組間比較,字母不同 p< .01)

(二)外加噴施NAC抗氧化劑對皇宮菜成熟植株蒸散速率的變化：

我們以抗氧化劑消除 H_2O_2 時，發現成熟植株在乾旱條件下氣孔蒸散所需時間縮短，以50mM濃度NAC處理組別的蒸散速率相較對照組(0mM)顯著加快兩倍，同樣地蒸散量也明顯增加。實驗結果顯示皇宮菜在乾旱環境下透過 H_2O_2 訊號分子調控葉片蒸散作用，藉由降低蒸散速率以保持葉子含水量。



圖三十一、不同濃度NAC對成熟植株葉片蒸散速率的影响
(組間比較,字母不同 p< .01)

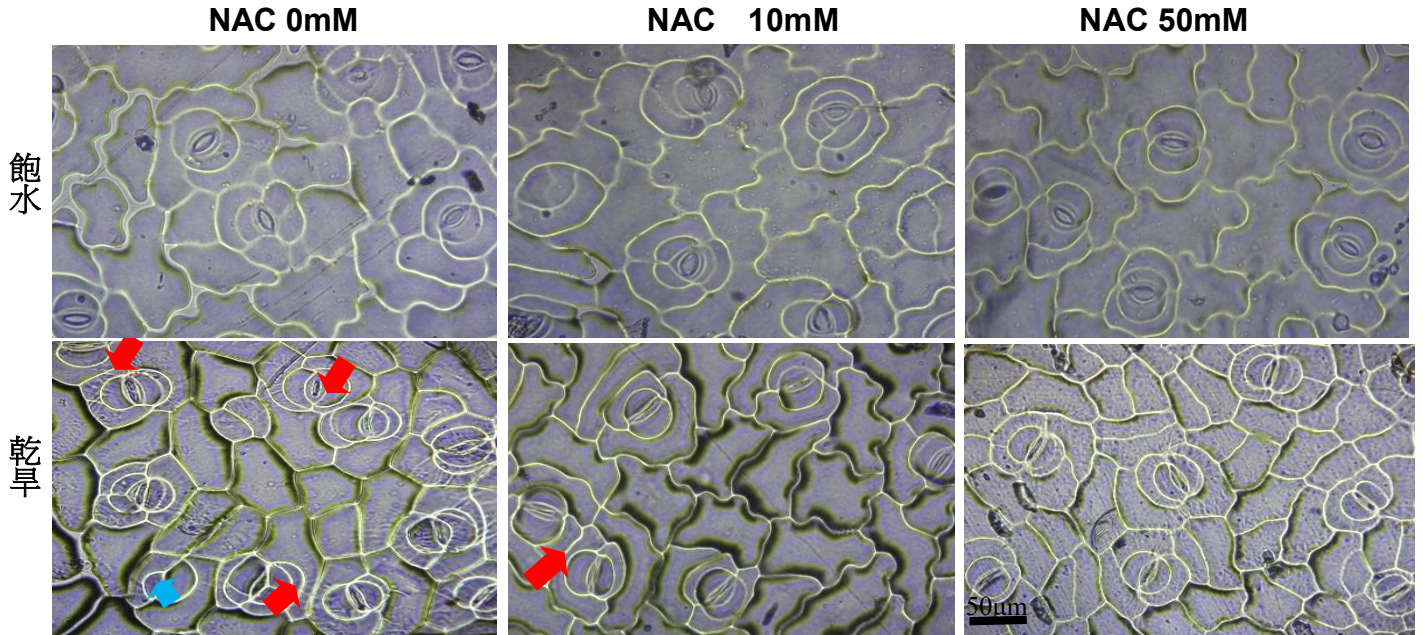


圖三十二 不同濃度的 NAC 對成熟植株葉片的蒸散速率試驗 (氯化亞試紙測試五分鐘後的變色情形)。

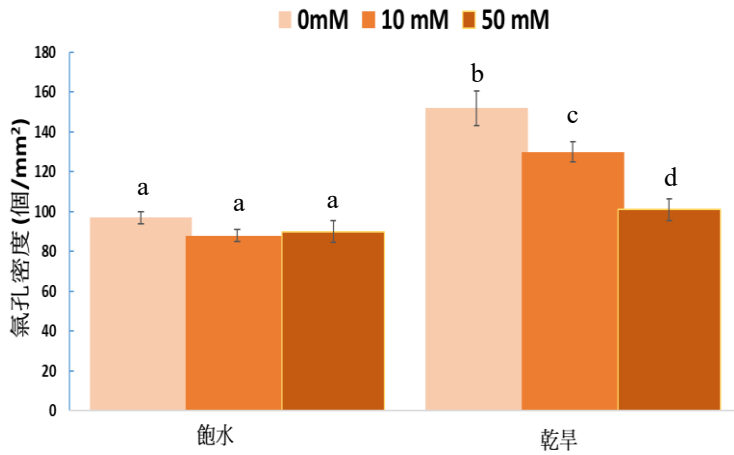
(三)外加噴施NAC抗氧化劑對皇宮菜成熟植株葉片氣孔分布的變化：

我們進一步確認過氧化物影響氣孔的分化和氣孔的運動，以抗氧化劑噴施乾旱處理皇宮菜的葉子，我們發現試驗四週的結果，氣孔數量相較對照組明顯減少，氣孔密度、氣孔指數分別降低65%、70%，具有顯著差異，而且原本乾旱條件誘導氣孔簇的發生也顯著被抑制，但是氣孔的開張度沒有明顯變化。綜合以上的實驗結果，說明皇宮菜在乾旱環境的適應調控中，過氧化氫扮

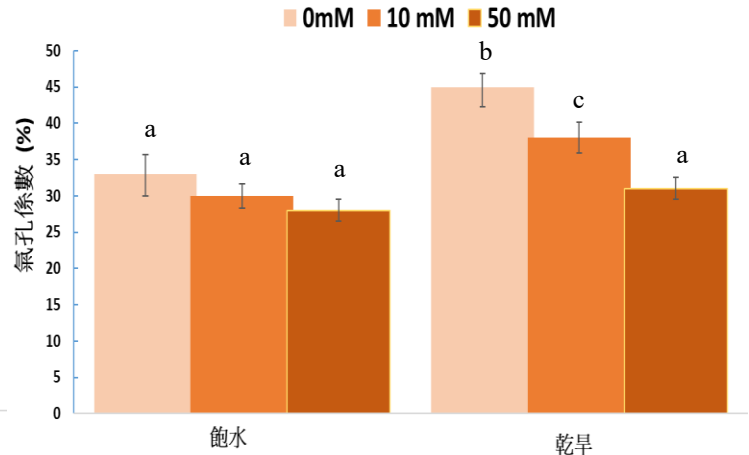
演關鍵的訊號分子以啟動保衛細胞的分化，增加氣孔密度和誘導氣孔簇的發生，以降低氣孔蒸散速率，有利於葉子保持較高的含水量，但過氧化氫對於皇宮菜在乾旱中調控氣孔運動的機轉不甚明顯。



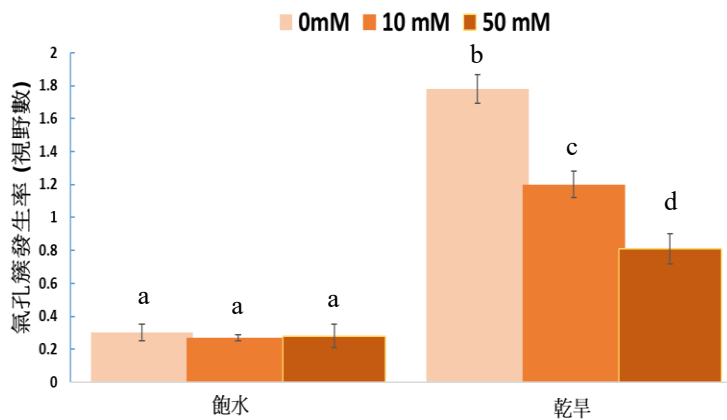
圖三十三、不同濃度的 NAC 對成熟植株葉片氣孔分布的影響。(紅色箭頭為氣孔簇，藍色箭頭為擬分生組織)



圖三十四、不同濃度NAC對成熟植株氣孔密度的影響

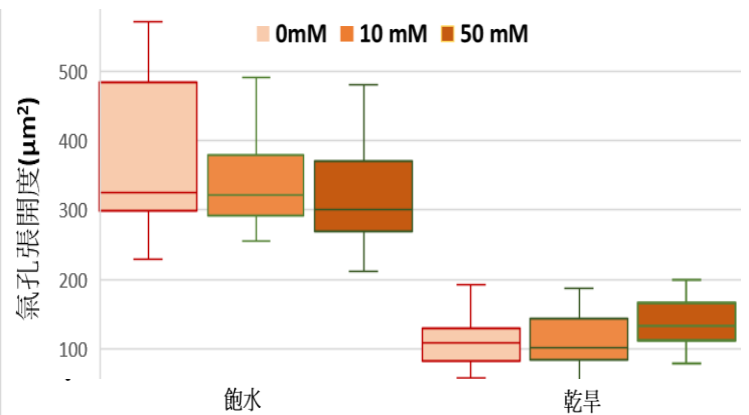


圖三十五、不同濃度NAC對成熟植株氣孔係數的影響



圖三十六、不同濃度NAC對成熟植株氣孔簇發生率的影響

(組間比較, 字母不同 $p < .01$)

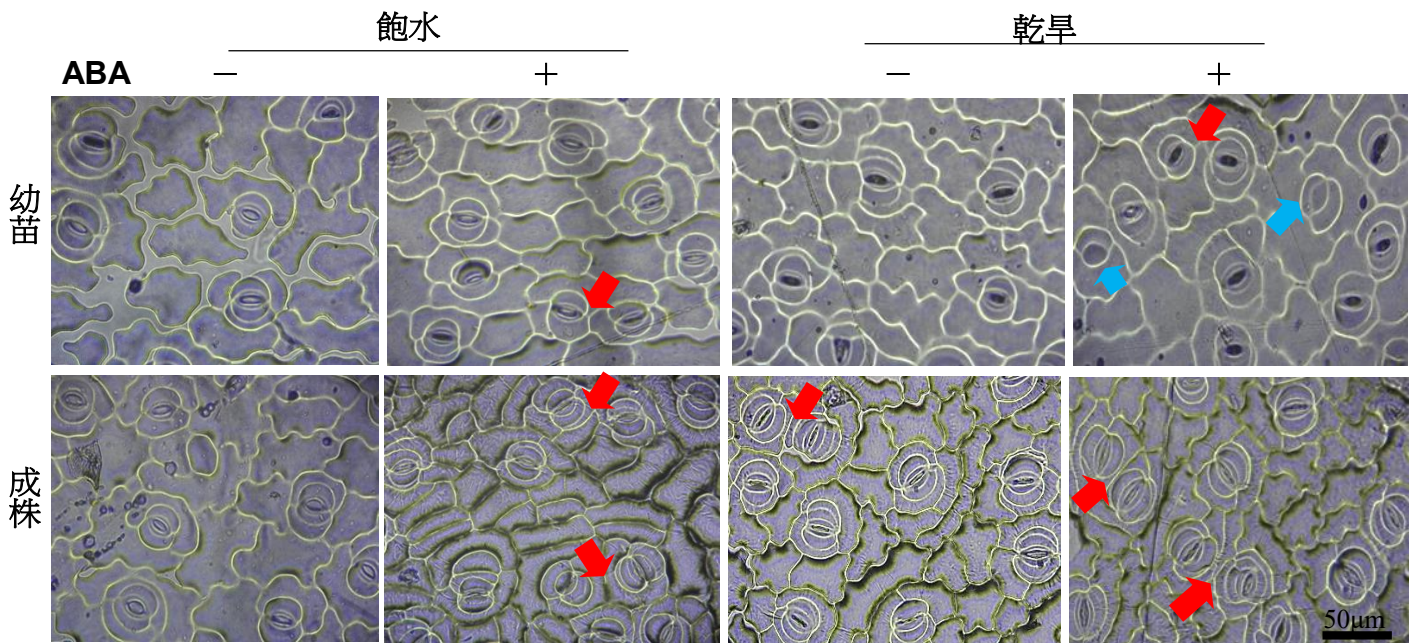


圖三十七、不同濃度NAC對成熟植株氣孔張開度的影響

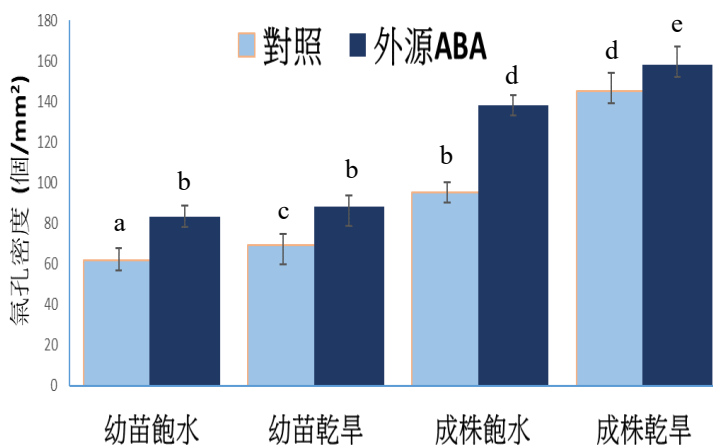
四、探討外源離素ABA對皇宮菜氣孔運動和分化的影響

(一)外加噴施離素對皇宮菜氣孔分布和氣孔運動的變化：

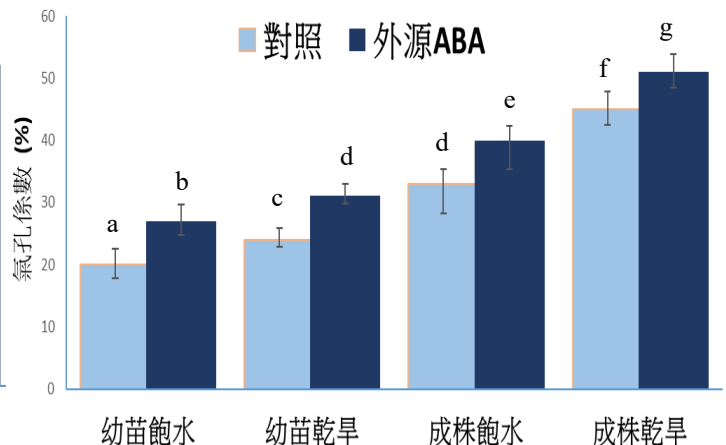
外源過氧化氫的實驗結果，發現過氧化氫可以調控皇宮菜氣孔的分化，在耐旱適應中扮演重要的訊號分子，可以促進氣孔密度的增加和氣孔簇的發生，但甚少影響氣孔運動。文獻指出離素為「逆境激素」，幫助植物適應乾旱環境，於是我們以外加離素噴施在皇宮菜葉片上，是否會影響葉片氣孔形態變化和運動呢。我們發現以200μmole/L離素噴施在葉片連續四週，不論是乾旱或飽水條件，皇宮菜葉片上氣孔密度相較對照組皆顯著增加，其中以成熟植株在飽水下增加幅度最大，達45%，氣孔係數亦增加21%，氣孔張開度減少40%以上。我們的實驗結果說明外源ABA會誘導氣孔的分化，促進氣孔密度增加和氣孔簇的發生，使葉片氣孔呈不均勻分布，且氣孔張開度減小，在ABA誘發氣孔分化的訊號途徑中，H₂O₂分子是否參與其中，扮演下游訊號分子呢？



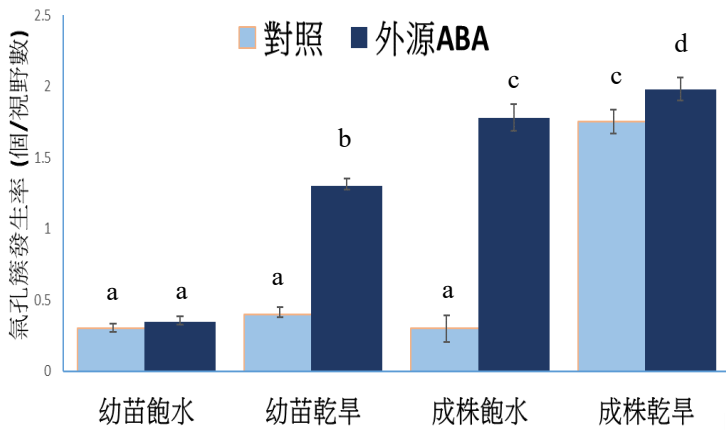
圖三十八、外源 ABA 對皇宮菜氣孔形態和氣孔運動的影響。(紅色箭頭為氣孔簇，藍色箭頭為擬分生組織)



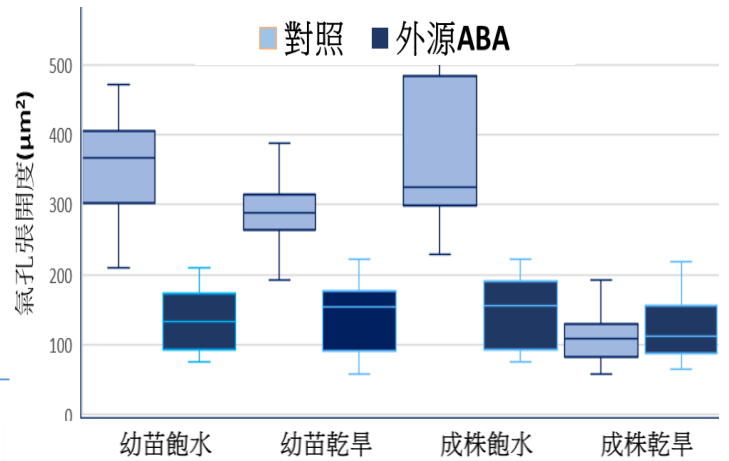
圖三十九 外源ABA對皇宮菜氣孔密度的影響



圖四十 外源ABA對皇宮菜氣孔係數的影響



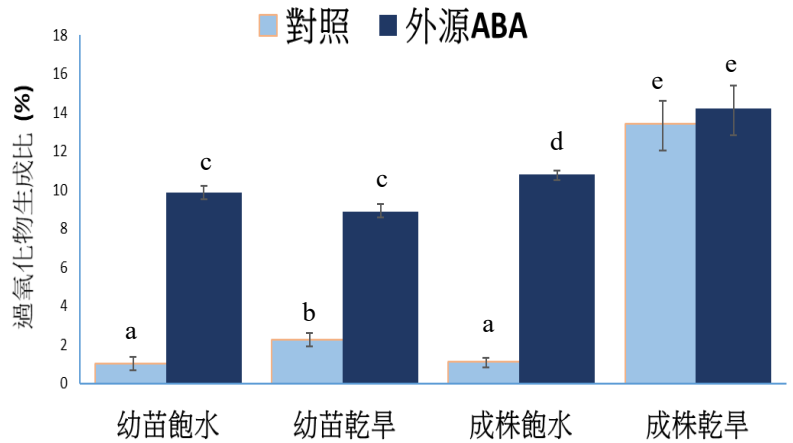
圖四十一 外源ABA對皇宮菜氣孔簇發生率的影響
(組間比較,字母不同 p<.01)



圖四十二 外源ABA對皇宮菜氣孔張開度的影響

(二)外加噴施離素對皇宮菜細胞內過氧化物生成的影響：

我們利用化學分析皇宮菜在噴施ABA連續四周後，發現細胞內的過氧化氫產量相較對照組，不論飽水或乾旱狀態皆顯著增加，尤其皇宮菜幼苗和成熟植株雖然在飽水條件，外加ABA會誘導過氧化氫生成近達十倍，保衛細胞可以感受ABA上升後，通過細胞內機轉途徑以合成H₂O₂，影響氣孔的發育。以上結果顯示ABA誘導氣孔發育和氣孔運動的訊號機轉中，過氧化氫扮演重要的第二訊號分子使表皮細胞分化以形成氣孔，似乎是保衛細胞因應ABA激素訊號的下游物質之一。

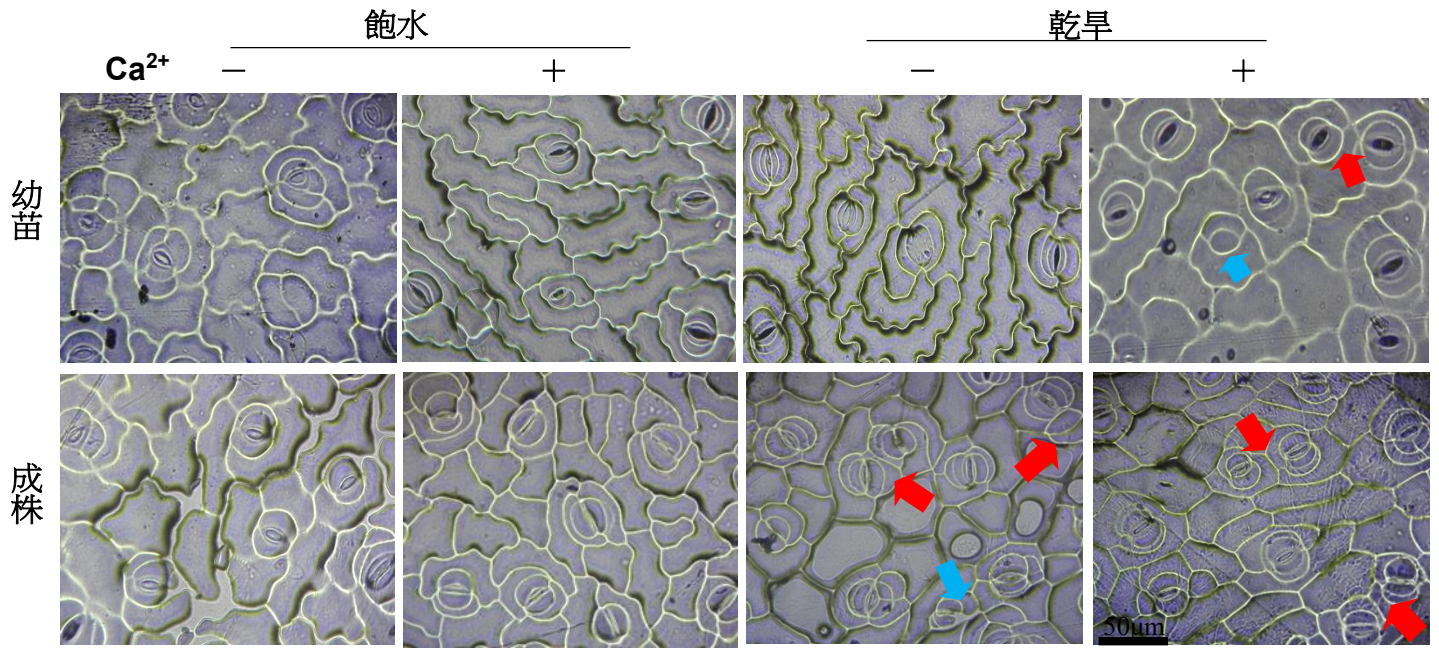


圖四十三 外源ABA對皇宮菜過氧化物生成的影響
(組間比較,字母不同 p<.01)

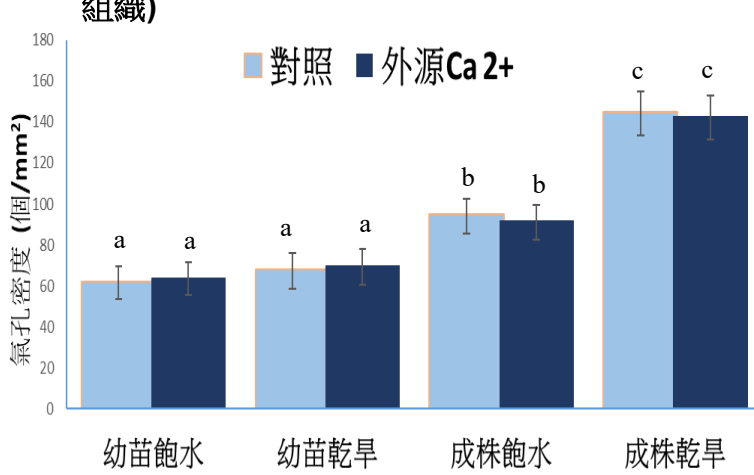
五、探討外源鈣離子對皇宮菜氣孔運動和分化的影響：

(一)外加噴施鈣離子對皇宮菜氣孔分布和氣孔運動的變化：

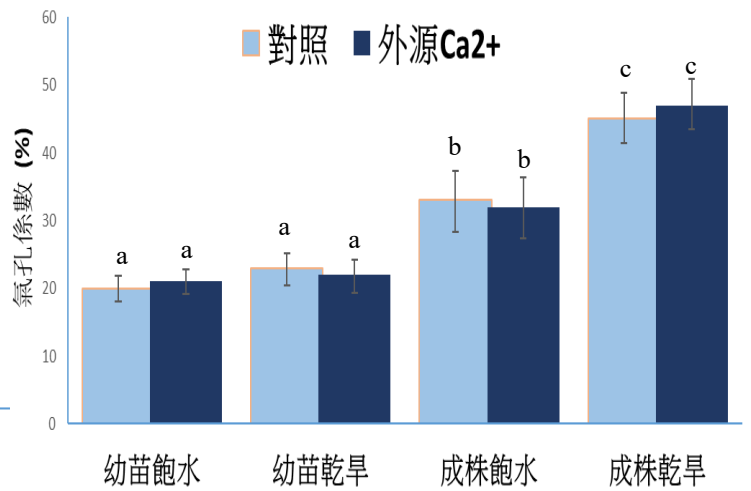
我們發現皇宮菜在耐旱的生理機轉中，透過ABA-H₂O₂途徑誘導氣孔簇的發生，以提高抗旱能力，進一步我們從文獻資料中得到ABA調節氣孔關閉作用中，鈣離子作為第二訊號分子參與氣孔運動的調控(關軍鋒，2001)，因此我們以外加噴施Ca²⁺於皇宮菜葉片上，好奇其是否影響皇宮菜在乾旱中的抗旱表現。實驗結果以50mM CaCl₂噴施在葉片連續四週，我們發現皇宮菜不論在乾旱或飽水條件，皇宮菜葉片的氣孔密度相較對照組均於無顯著差異，但是外源加入Ca²⁺，氣孔張開度明顯降低，即使在飽水狀態氣孔張開度相較對照組顯著減少40%。我們的實驗結果說明鈣離子參與皇宮菜適應抗旱機轉中，誘導氣孔關閉作用。



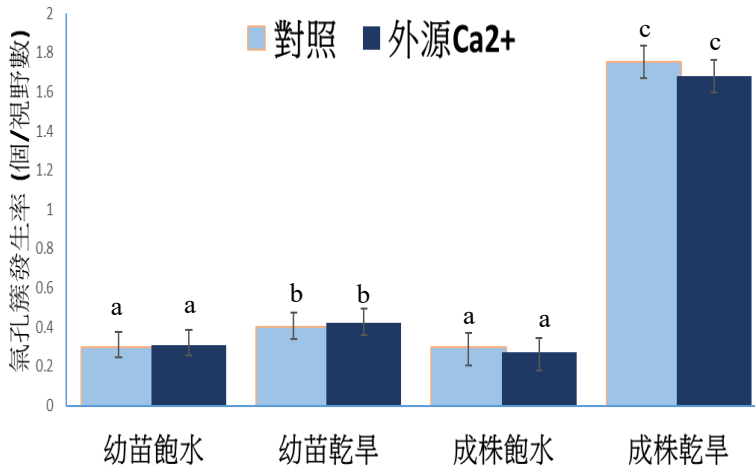
圖四十四、外加鈣對皇宮菜氣孔形態和氣孔運動的影響。(紅色箭頭為氣孔簇，藍色箭頭為擬分生組織)



圖四十五 外源Ca²⁺對皇宮菜氣孔密度的影響

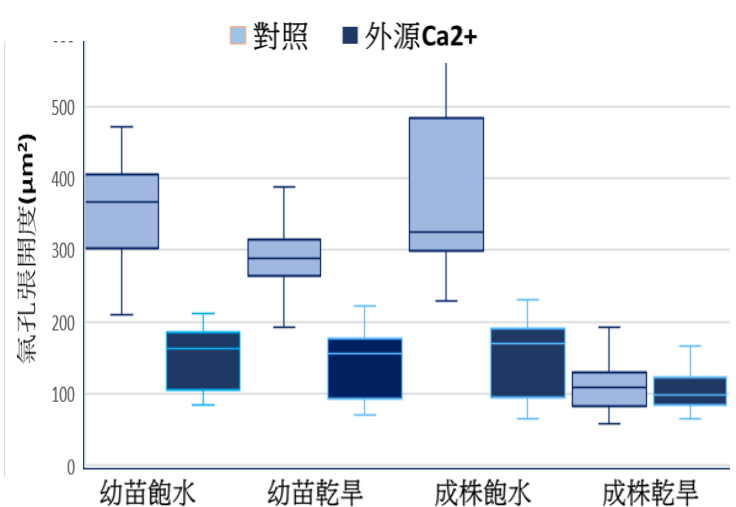


圖四十六 外源Ca²⁺對皇宮菜氣孔係數的影響



圖四十七 外源Ca²⁺對皇宮菜氣孔簇發生率的影響

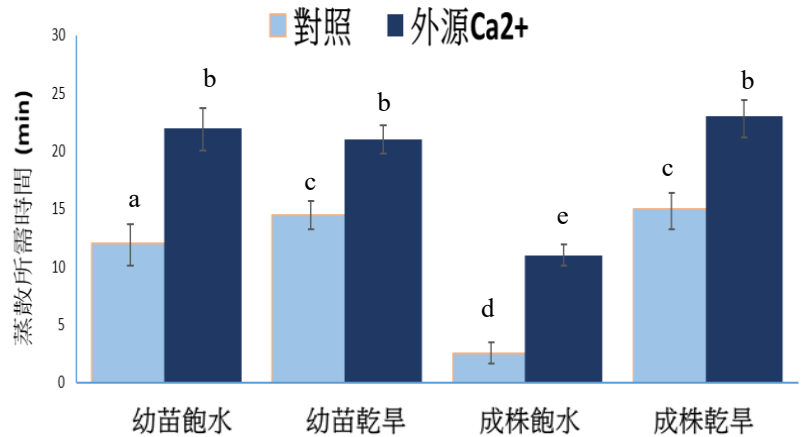
(組間比較, 字母不同 p < .01)



圖四十八 外源Ca²⁺對皇宮菜氣孔張開度的影響

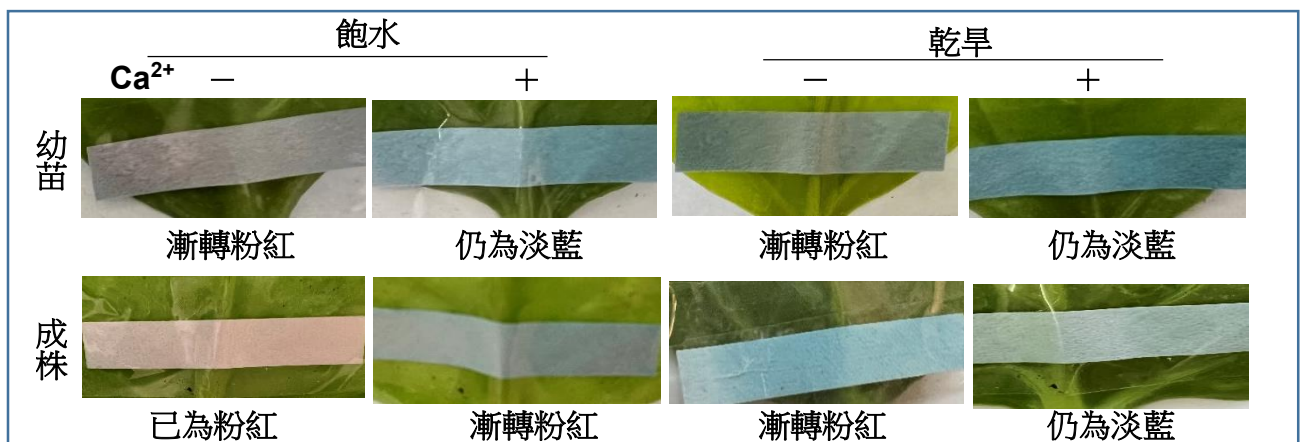
(二)外加噴施鈣離子對皇宮菜蒸散速率的影響：

我們進一步驗證鈣離子對皇宮菜蒸散速率的影響，以氯化鈣噴施在皇宮菜葉片連續四週，結果發現外源鈣離子的組別蒸散所需時間顯著拉長，相較對照組蒸散速率明顯變慢。由實驗結果得知鈣離子的加入會減小氣孔張開度，減慢氣孔蒸散速率，以提高皇宮菜的耐旱表現。我們推測皇宮菜在耐旱機制中，**ABA**透過**Ca²⁺**訊號調控氣孔的張開度，影響蒸散速率，以利皇宮菜適應環境中水分的改變。



圖四十九 外源 Ca²⁺對皇宮菜蒸散速率的影響

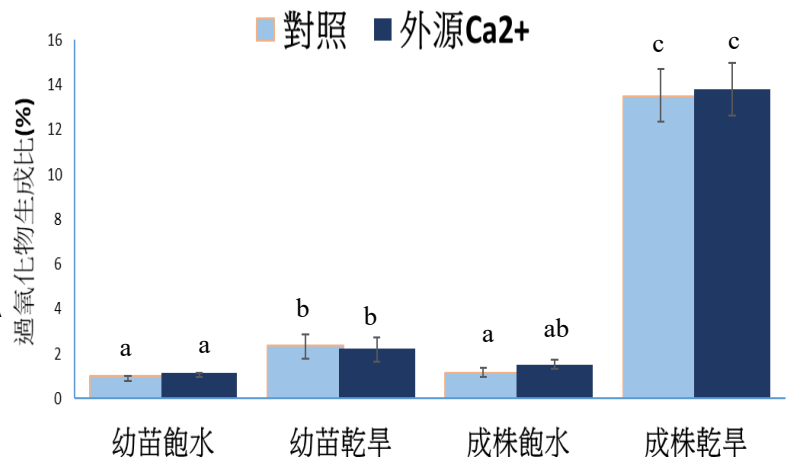
(組間比較,字母不同 p<.01)



圖五十 鈣離子對皇宮菜葉片的蒸散速率試驗 (氯化亞試紙測試十分鐘後的變色情形)。

(三)外加噴施鈣離子對皇宮菜細胞內過氧化物生成的影響：

我們利用化學分析皇宮菜在噴施氯化鈣連續四周後，發現細胞內的過氧化氫生成量，相較對照組沒有明顯差異。實驗結果說明鈣離子訊號分子不會誘導過氧化氫的生成，皇宮菜透過鈣離子調節氣孔運動機轉的途徑中，過氧化氫不是鈣離子下游訊號分子，我們推測皇宮菜在適應乾旱生理機轉中，**ABA**可能透過鈣離子調控氣孔開關，其途徑中過氧化氫不是關鍵訊號角色，細胞因應乾旱啟動**ABA**訊號網絡中，鈣離子和過氧化氫之間是否存在複雜的交叉、相互調節作用，有待進一步證實。



圖五十一 外源 Ca²⁺對皇宮菜過氧化物生成的影響

(組間比較,字母不同 p<.01)

陸、討論

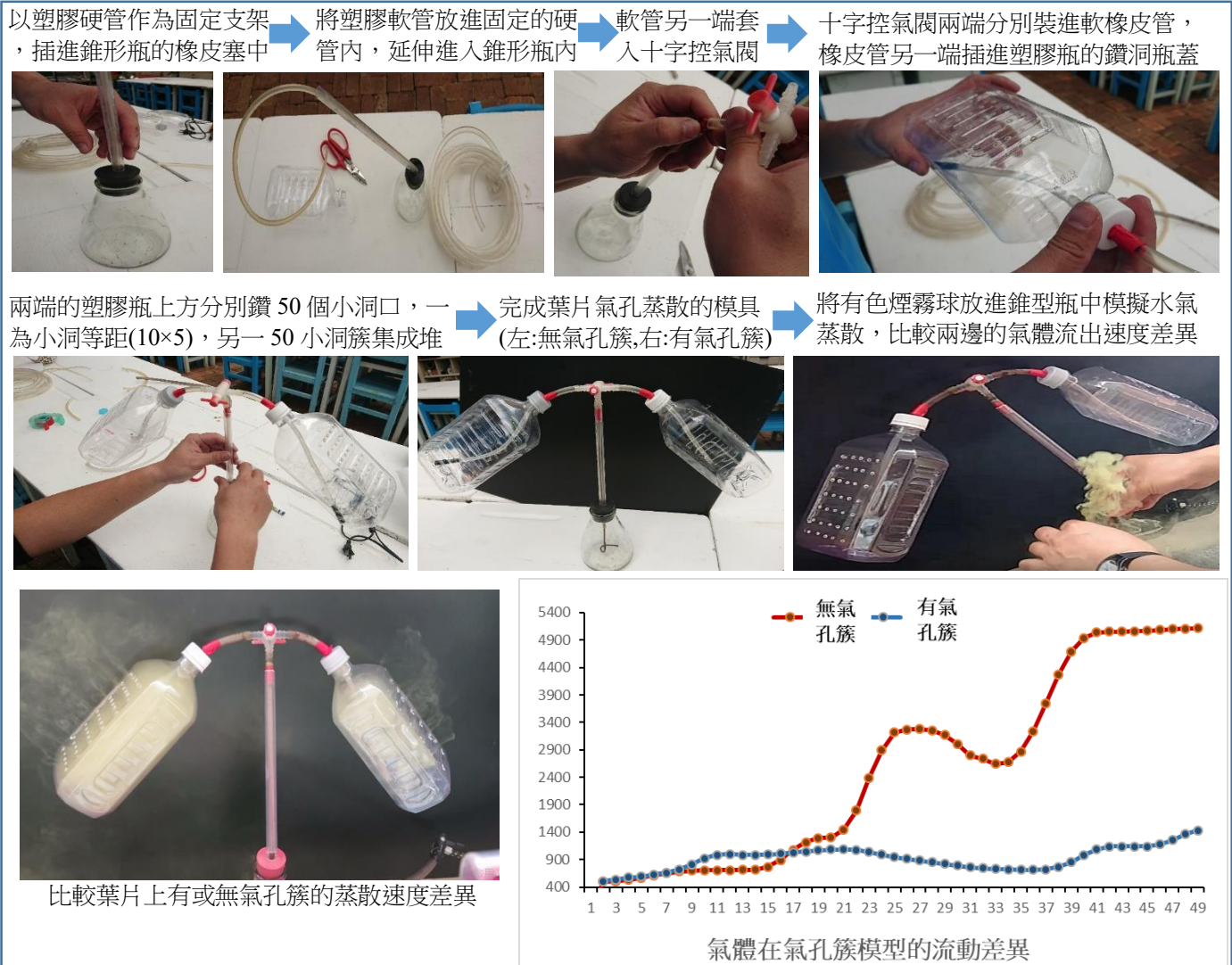
一、皇宮菜在乾旱逆境形成「氣孔簇」的生存適應：

隨著全球氣候的變化，乾旱發生越來越普遍，作物處於供水不足的狀態對糧食生產構成嚴重威脅，如何節約農業用水而有效利用水資源是刻不容緩的問題。乾旱脅迫對植物生長的影響是非常複雜的，植物會透過生理反應和生態策略來應對不同程度的乾旱逆境，例如生長與生物量的分配形式的改變以減小葉面積，或者藉由氣孔調控來降低蒸散速率，以提高水分利用效率等(高春娟,2012)。植物水分利用效率是植物生理活動過程中消耗水形成有機物質，為植物適應乾旱的一個重要生理特性指標，我們先前的研究發現皇宮菜相較其他作物能在乾旱逆境中存活和適應(第60屆科展)，植株經由減少水分蒸散和高度保水能力，可以對外界環境水分變化做出快速的調整反應。本實驗我們也發現乾旱脅迫對皇宮菜幼苗或成熟植株有一定程度的影響，透過葉片相對含水量、氣孔密度、氣孔簇發生和氣孔張開度的變化…，以提升水分利用效率，在不同程度逆境下形成了不同程度的生存策略。

氣孔的調節是植物抵禦逆境和適應環境的機制之一，透過改變氣孔的孔徑和分佈應對環境水分的脅迫(陳雯芸,2016)。我們的實驗結果發現皇宮菜在極度乾旱條件下，氣孔張開度明顯減小，而氣孔密度和氣孔簇發生率卻有顯著增大趨勢，這種氣孔形態的改變不僅能夠促進氣體交換，而且有利於保水，藉由水分蒸散速率和蒸散量下降以提高葉片相對含水量，有助於增強皇宮菜的耐旱性。有研究文獻指出小麥(*Triticum aestivum* Linn.)面臨水分逆境引起氣孔指數上升以提高其抗旱性(李思,2015)，增溫脅迫也顯著增加了多年生黑麥草(*Lolium perenne*)葉片的氣孔長度，同時增溫還可能透過對細胞分裂和分化過程來改變氣孔在葉片上的空間分佈格局(楊傑峰,2021)。本研究結果發現皇宮菜隨著乾旱程度加劇，不僅增加氣孔密度，氣孔簇發生率也顯著提升，打破原本植物氣孔的數目和分布遵循「至少一個細胞間隔」原則，研究指出這種氣孔分布的異常聚集，以「非接觸型氣孔簇」形成來使氣孔微開，能有效地防止水分過度蒸散，同時又能維持基礎的光合作用效能，以維持植物正常生長的基本需求來適應乾旱環境(Papanatsiou M.,2017)。目前有60多種的陸生植物觀察到有氣孔簇的現象，甘藷的研究報導也指出乾旱逆境會明顯增加了蠶豆葉片的氣孔密度和誘發接觸型氣孔簇的出現頻率(Gan,2010)。

皇宮菜以異常聚集的「氣孔簇」打破氣孔自然發展格局，我們為確定這種氣孔發育模式和耐旱能力的關聯性，我們以塑膠軟管、錐形瓶、十字控氣閥、塑膠瓶等為材料，設計自製葉子模型(如圖五十二)，在塑膠瓶上鑽小洞作為氣孔讓氣體進出，一邊為5X10規律排列的氣孔，另一邊同為50個小洞但成簇，模仿成「氣孔簇」，我們以有色煙霧進行觀察比較氣體進出塑膠瓶流量是否有差異。我們以肉眼可以清楚看見有色煙霧氣體從圖中左方塑膠瓶(5X10規律排列)流量明顯高於右方瓶子(50個成簇小洞)如圖所示，我們又以乾冰進行測試二氧化碳在兩者瓶子流量數據量化的差異比較，利用二氧化碳偵測儀即時得知，氣體分別離開「無氣孔簇」瓶子和「有氣孔簇」瓶子在短時間內即有顯著差異，由下圖的曲線變化，可以知道二氧化碳在空氣中背景值大500ppm，

在放進乾冰後二氧化碳離開「無氣孔簇」瓶的濃度快速攀升，40秒後高達5000ppm，「有氣孔簇」瓶的濃度則增加緩慢，只達1400ppm。此結果說明小洞成簇的瓶子氣體散失量較低，得以驗證皇宮菜在乾旱逆境以「氣孔簇」來減少水分散失，可以維持葉子含水量。Maria的文獻指出以氣體動力學解釋秋海棠的氣孔以「氣孔簇」方式的排列格局對氣體交換和缺水環境中有效利用水分的重要性。(Papanatsiou M.,2017)。



圖五十二 自製模具以模擬皇宮菜葉片氣孔的氣體進出。

在漫長的進化過程中，植物形成了複雜的氣孔發育的多方調控，涉及訊號傳導、細胞極性、不對稱分裂和植物激素等重要調控過程，可以通過改變氣孔的孔徑和分布來因應環境的脅迫，除了氣孔形態的改變，我們的研究也發現乾旱對皇宮菜的生化反應變化，會促使細胞內大量產生過氧化氫物， H_2O_2 與植物抗旱性之間的關聯性亦受到研究的關注。

二、過氧化氫在皇宮菜的耐旱性機轉中的角色：

過氧化氫(H_2O_2)除了對細胞有毒害作用外，對植物還具有多種生理功能，是一種重要的訊息

分子。當植物面臨逆境過程會促使活性氧化物產生，對細胞造成威脅，導致細胞死亡的途徑為脂質的過氧化、蛋白質氧化、酵素活性抑制及 DNA 與 RNA 受損等(蔣永正,2011)。另一方面這些氧化物也具有啟動逆境防禦系統的訊息傳導功能， H_2O_2 信號對植物細胞的某種生理過程具有重要的調控作用，可能在植物細胞的分化和形態發育的過程中，扮演著發育訊號的角色(高春娟,2012)。另外， H_2O_2 有助於植物在逆境中產生抗性，作為訊號分子誘導防禦基因的表現(蔣永正,2011; Kehler B.,2003)。本研究結果發現外源適宜濃度的過氧化氫(200、500和1000 μ mole/L)可以有效提高皇宮菜幼苗葉片的相對含水量和氣孔密度，同時也促進氣孔簇的形成，並降低了水分蒸散量，我們推測 H_2O_2 在皇宮菜的抗旱性扮演重要的關鍵分子，研究文獻也指出內源性 H_2O_2 已經被證實能有效提高小麥葉片的抗氧化能力，提高其抗旱性(Feng H., 2008)，也有研究表示噴施能有效提高大豆、萱草的抗旱能力(Ishibashi Y.,2011)。

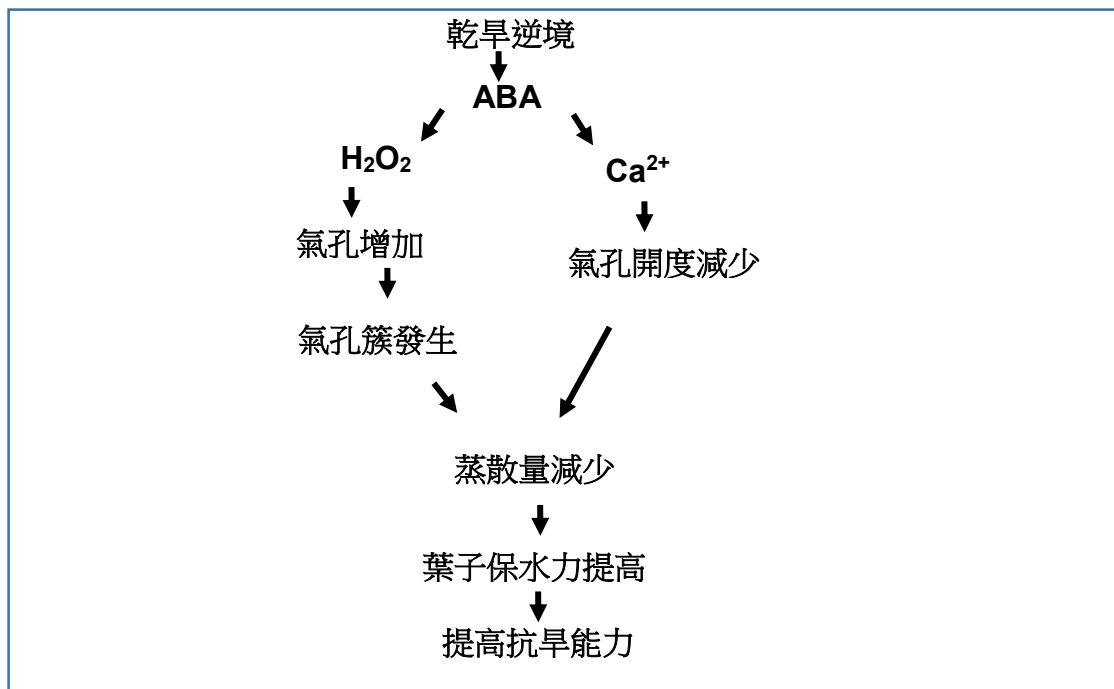
我們利用抗氧化劑消除皇宮菜在乾旱逆境中生成的氧化產物，造成氣孔密度和氣孔簇發生的頻率明顯降低，以及葉子相對含水量減少，氣孔蒸散速率和蒸散量增加，抗氧化劑顯著抑制了皇宮菜成熟植株的抗旱性，進一步證實過氧化氫在皇宮菜的抗旱性扮演重要信號分子。有趣的是我們在實驗結果看到皇宮菜葉片氣孔開度在外源過氧化氫處理下沒有發生顯著的變化，而有報導指出 H_2O_2 會影響氣孔運動，也可參與與激素調節氣孔運動的過程，控制氣孔的開閉(李思,2015)，所以我們好奇植物激素是否介入於過氧化氫在皇宮菜抗旱訊號途徑中。

三、皇宮菜表現抗旱的訊號傳遞途徑：

ABA是一種對植物生長、發育、抗逆性、氣孔運動和基因表現都有重要調節功能的植物激素，有研究說明當植物在水分短缺時，ABA會促進離子流出保衛細胞和降低細胞膨壓，誘導氣孔關閉，以降低水分的消耗，增加植株在乾旱條件下的保水能力(李長寧,2010)。在ABA誘導氣孔關閉的過程中 H_2O_2 作為一個重要的訊號中間分子，參與ABA訊息傳遞(高春娟,2012; Kehler B.,2003)。我們實驗結果顯示皇宮菜葉片施加ABA後，會增加細胞內過氧化氫生成量，然後氣孔密度和氣孔簇發生率增加，同時氣孔張開度會降低，提高葉片相對含水量有利於適應乾旱逆境。Barbara的研究指出擬南芥植物施加ABA後，可增加 H_2O_2 然後關閉氣孔，於是推測出ABA誘導細胞 H_2O_2 產生才具有誘導氣孔關閉的作用(Barbara,2003)。不同的是，皇宮菜透過過氧化氫沒有明顯改變氣孔張開度，似乎在氣孔運動的訊號調控和過氧化氫的關聯性小。

許多文獻指出植物細胞內的 Ca^{2+} 是作為第二訊號分子傳遞乾旱訊息，並調節一系列生理化學反應，關軍鋒研究結果證明，氣孔關閉與細胞質 Ca^{2+} 濃度變化密切相關，同時作為乾旱訊息的ABA也對細胞質 Ca^{2+} 濃度具有調節作用(關軍鋒,2001)。同時，報導也指出乾旱逆境下鈣訊息經 Ca^{2+} -CAM複合體來調節氣孔運動的相關基因，能夠改變氣孔密度和蒸散速率，進而提高水分利用率和葉片保水能力，提高乾旱能力(關軍鋒,2001)。我們在實驗中以噴施氯化鈣在皇宮菜葉片，結果發現氣孔密度和氣孔簇發生率和對照組沒有顯著差異，但外源鈣會減少氣孔張開度，有助皇宮菜在乾旱環境下減少水分過度消耗，以維持較高的葉片相對含水量。

水分逆境中皇宮菜葉片的氣孔密度明顯增加，亦提高氣孔簇的發生，並降低氣孔張開度以度過乾旱，可以得知皇宮菜的保衛細胞具有非常靈敏的感知外界環境變化的能力，氣孔通過植株體內化學訊號的傳遞做出對水分短缺的適應逆境的策略。本研究中得到皇宮菜在面臨乾旱透過植物激素**ABA**，促使葉片表皮細胞**H₂O₂**生成以誘導保衛細胞分化形成氣孔，且造成氣孔不規則格局排列而發生氣孔簇，同時鈣訊息會調控氣孔運動來降低氣孔的寬徑，可以減少水分蒸散量，但也維持光合作用的進行(如圖五十三)。研究氣孔分化和氣孔運動的訊號傳導途徑，對植物如何適應環境變化有著相當重要的作用，氣孔密度和氣孔張開度是直接影響植物蒸散速率和光合產量，如何調節氣孔的發育和運動使這相互矛盾的兩個需求達到最優化是植物適應乾旱環境的關鍵。



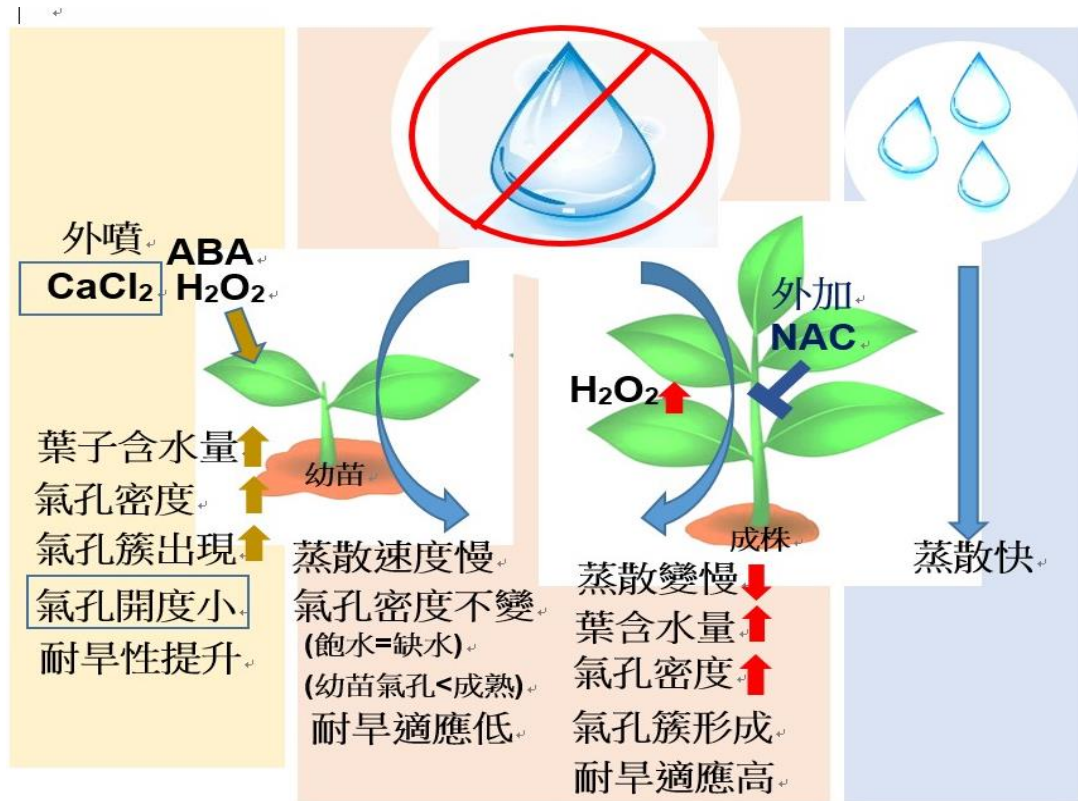
圖五十三皇宮菜抗旱的訊息傳遞

四、未來展望：

在氣候變遷下，乾旱已成為限制作物生產和糧食產量的主要因素，如何增強作物對乾旱脅迫的適應性，使其在乾旱環境條件下維持較高的產量和品質成為了研究的焦點。有文獻報導根系能夠感知乾旱脅迫並產生過多的**ABA**，當這些**ABA**運送至地上部分後就會控制葉片氣孔的開閉程度，進而增加水分利用率。作物抗旱性是結合地上部和地下部的綜合性適應機制，僅研究地上部的反應無法完整說明整體抗旱性的本質，地上部葉片生理過程和地下部分根系的生長發育作為一個相互關聯的有機體。本研究針對地上部位探討皇宮菜面臨乾旱的葉片表皮細胞形態的改變和生理反應的變化，訊號分子**H₂O₂**參與皇宮菜的抗旱性，對於地下部根系的發展在抗旱機制的研究甚少，我們期望未來可以探索植株地下部位在面臨水分脅迫下，如何優化根系形態特徵和生理活性的加強，提高作物在逆境中的適應性和抗旱性，可以提供更有力的科學依據。

柒、結論

- 一、 皇宮菜在不同生長階段抗旱能力不同，成熟植株在長期嚴重缺水條件下，相較幼苗的氣孔密度和氣孔簇發生顯著提高，以減少水分蒸散量，可以維持較高的葉片含水量。
- 二、 成熟植株的皇宮菜隨缺水程度的加劇，細胞內的過氧化氫生成量增加，當乾旱條件下加入抗氧化劑，則減少氣孔密度和抑制氣孔簇的發生，皇宮菜的抗旱能力降低。另外幼苗葉片外源過氧化氫處理，會增加氣孔密度和葉片相對含水量，提高了幼苗的耐旱力，證實 H_2O_2 訊號分子對皇宮菜的抗旱訊號機轉的重要性。
- 三、 外源的ABA會增加葉片表皮細胞過氧化氫的生成，且誘導表皮細胞分化形成氣孔，除了氣孔簇發生率提高，氣孔張開度也明顯減小；同時外源的 Ca^{2+} 也抑制氣孔張開度，但不影響氣孔分化。
- 四、 皇宮菜面臨乾旱啟動ABA訊號，透過 H_2O_2 分子調節氣孔分化，形成氣孔簇；透過 Ca^{2+} 訊號減少氣孔張開度，透過ABA- H_2O_2 和 Ca^{2+} 訊號交互調節以降低水分蒸散，保持葉片含水量度過逆境。



圖五十四 皇宮菜在缺水條件下的抗旱統整圖

捌、參考文獻：

- 一、蔣永正。植物對環境逆境之調控與應用。農業藥物毒物試驗所，農委會出版 2011。
- 二、李思、張莉、姚雅琴。乾旱對冬小麥葉片氣孔、活性氧和光合作用的影響，*河北大學學報(自然科學版)* 2015；35：5。
- 三、楊傑峰、鄧紅華、費永俊。黑麥草不同品種回應乾旱逆境的表型特徵，*湖北農業科學* 2021；60：16。
- 四、陸雯芸、房克、邊紅武、朱睦元。氣孔發育及其調控因素的研究進展，*植物生理學報* 2016；52(6)：782-788。
- 五、高春娟、夏曉劍、師愷、周豔虹、喻景權。植物氣孔對全球環境變化的回應及其調控防禦機制，*植物生理學報* 2012；48 (1): 19~28。
- 六、李長寧、農倩、李楊瑞。水分脅迫下外源ABA 提高甘蔗抗旱性的作用機制，*作物學報*，2010；36(5)：863-870。
- 七、關軍鋒 李廣敏。**Ca²⁺與植物抗旱性的關係**，*植物學通報* 2001；18 (04): 473-478。
- 八、Yi GAN, Lei ZHOU, Zhong-Ji SHEN, Zhu-Xia SHEN, Yi-Qiong ZHANG, and Gen-Xuan Wang。**Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants.** *Botanical Studies* 2010；51: 325-336.
- 九、Maria Papanatsiou, Anna Amtmann and Michael R. Blatt **Stomatal clustering in Begonia associates with the kinetics of leaf gaseous exchange and influences water use efficiency.** *Journal of Experimental Botany* 2017；68(9)：2309–2315。
- 十、Kehler,B., Hills S.,and Blatt M. R.,**Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways.** *Plant Physiol.*, 2003；131:385-388。
- 十一、Zhang Xiao, Fa Cai Dong, Jun Feng Gao, Ghun Peng Song.**Hydrogen Peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure.** *Cell Research* 2001；11(1):37-43.
- 十二、Feng Hanqing, Duan Jiangong, Li Hongyu, Liang Houguo, Li Xin and Han Na. **Alternative respiratory pathway under drought is partially mediated by hydrogen peroxide and contributes to antioxidant protection in wheat leaves.** *Plant Prod. Sci.* 2008；11(1)：59 - 66。
- 十三、Ishibashi Y., Yamaguchi H., Yuasa T., **Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants.** *J. Plant Physiol.*, 2011, 168:1562-1567.
- 十四、林宥甄、李庭瑜、皮羽晴。2020。喔『葉』-皇宮菜在缺水逆境的適應研究。第 60 屆中華民國中小學科學展覽會國小組生物科。

【評語】 030321

優點：

此研究為探討皇宮菜在乾旱環境下的適應機制和訊息調控機制，實驗結果分析的邏輯清晰，結果呈現方式清楚，且研究主題符合當今氣候變遷的議題。整體實驗設計層次分明，環環相扣，邏輯清晰，最後將各項實驗結果進行彙整並提出皇宮菜抗旱過程的訊息傳遞關係圖，推論過程十分完整。在討論中以自製物理性模具模擬氣孔簇對於水分保留之可能性，極富創意和合理性。本研究各項實驗結果皆以生物統計學進行分析，讓實驗結果更具科學及可靠性。

建議及檢討：

1. 噴施過氧化氫可以增強幼苗的耐旱性，但是過氧化氫是否造成植物的其他生理逆境則需要進一步設計實驗驗證。
2. 結果顯示外加過氧化氫和鈣離子對皇宮菜的抗旱性有顯著影響，但在部分試驗結果中，氣孔開啟度沒有明顯改變，顯示氣孔運動和過氧化氫的關聯性並不明確，此部分需要設計試驗進一步探討。

3. 雖然結果顯示皇宮菜在乾旱逆境中的抗旱適應機制，然而在現實應用中需要進一步探討如何將此應用於農業生產，同時應考慮其他因素對植物的影響，如土壤條件、溫度等。

作品海報



喔

「葉」

皇宮菜在缺水逆境中訊號傳遞之研究

摘要

本實驗探討皇宮菜為適應乾旱的訊息調控機轉，我們發現不同生長階段耐旱程度不同，具耐旱力的成熟植株透過氣孔密度提高、誘導氣孔簇發生和降低氣孔張開度，來減緩水分蒸散速率以維持葉子含水量，同時也發現皇宮菜在乾旱脅迫下過氧化氫的提高。我們噴施過氧化氫於耐旱力較低的幼苗葉片，造成氣孔密度和氣孔簇增加和提高葉片含水量，增強幼苗的耐旱性。以抗氧化劑處理會降低成熟植株的抗旱能力，進一步證實 H_2O_2 參與ABA 訊息調控機轉，改變表皮細胞形態和氣孔分布，並透過鈣離子調節氣孔運動來優化氣體交換效率，達到減少水分散失維持光合產量，此有助於理解作物在乾旱下的氣孔發育模式，作為影響作物產量和土壤節水可能潛在機制。

壹、研究動機

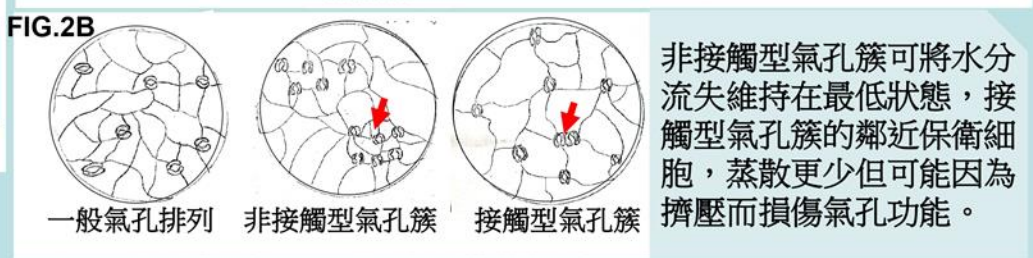
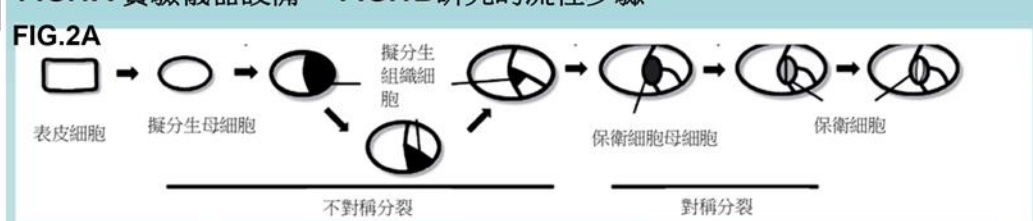
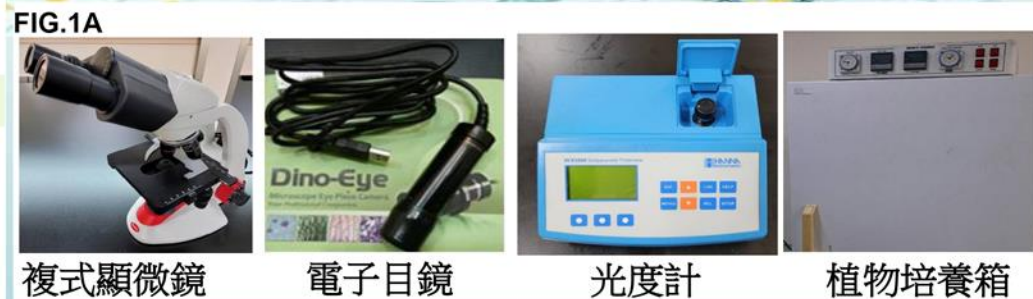
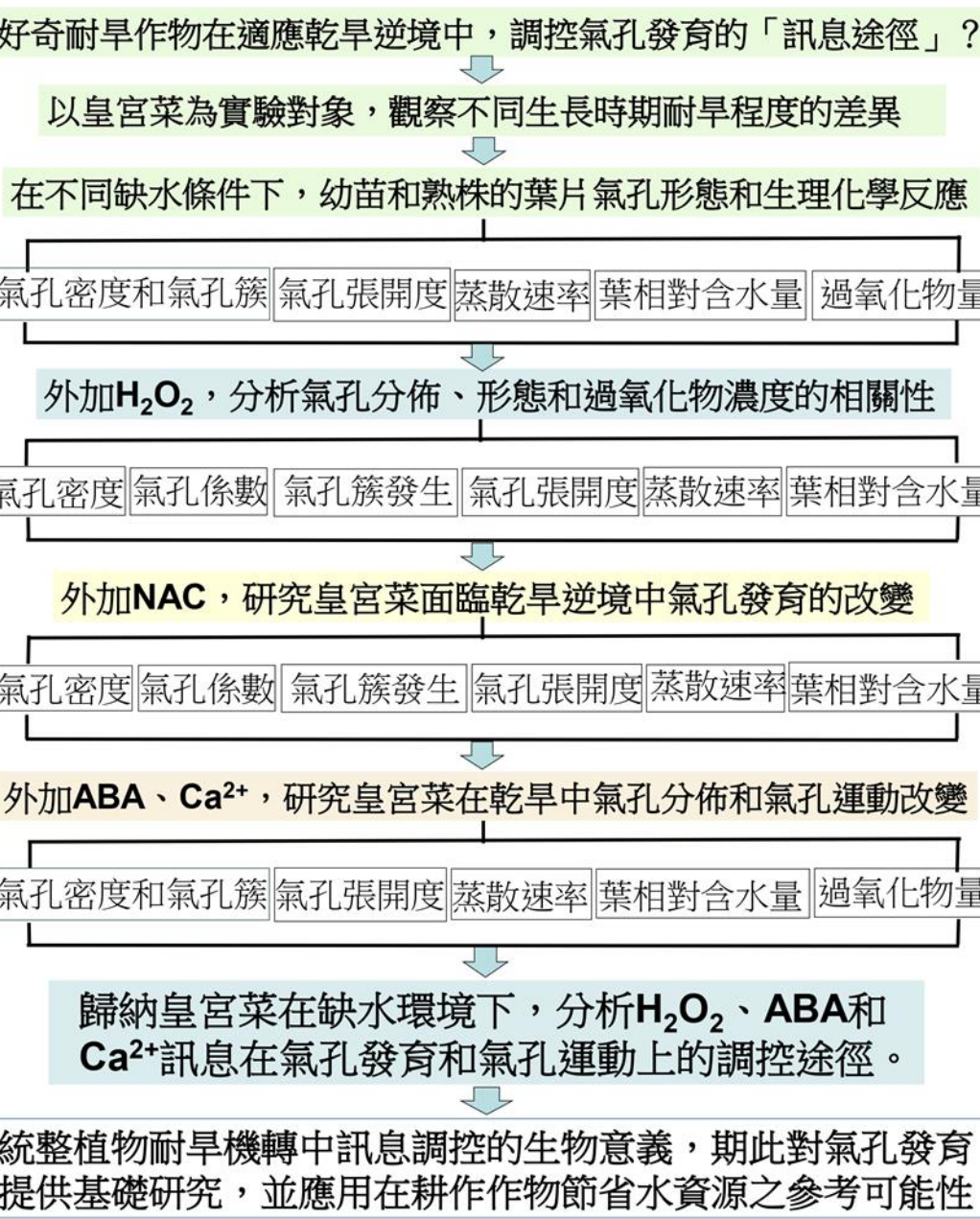
我們在國小的科展研究發現夏令作物皇宮菜可以對外界水分變化做出快速的調整反應，藉氣孔密度明顯增加和氣孔簇的發生來減少水分的蒸散量。然而對於皇宮菜在缺水條件下，表皮細胞透過何者訊息傳遞途徑來影響氣孔的發育以調整氣孔的數量，是我們這屆本作品關注的焦點，我們企圖研究皇宮菜適應乾旱的訊號分子，其如何誘導皇宮菜氣孔的發育，期望透過皇宮菜的耐旱機制尋找出如何提高作物抗旱，增強水分利用效率，對於乾旱環境中農業作物栽植提供基礎研究的應用價值可能性。

屆別	主題	動機和論點
第六十屆	喔「葉」！皇宮菜在缺水逆境的適應研究	1.好奇夏令作物的耐旱性是否相同？→皇宮菜相較其他作物蒸散速度快，但耐旱能力最強。 2.好奇皇宮菜的耐旱性是否和氣孔發育有關？→在不同缺水程度下，氣孔密度和氣孔係數顯著增加，且明顯出現氣孔簇。
第六十三屆	喔「葉」！皇宮菜在缺水逆境中訊號傳遞之研究	1.研究皇宮菜在不同生長階段的抗旱性表現是否具有差異？ 2.研究皇宮菜在適應乾旱下，透過那些訊號分子以調控氣孔發育和氣孔運動，來維持較高的光合產量。

貳、研究目的

- 一、觀察不同生長階段的皇宮菜在面臨乾旱環境下葉子氣孔形態和生理化學反應的變化。
- 二、探討在外源過氧化物中，皇宮菜的氣孔密度和過氧化物濃度的關聯性。
- 三、探討外源抗氧化劑NAC，比較皇宮菜在面臨缺水逆境下葉子氣孔形態、氣孔運動和生理化學反應的變化。
- 四、探討外源離素ABA和 Ca^{2+} ，比較皇宮菜在面臨缺水逆境下葉子氣孔形態、氣孔運動和生理化學反應的變化。

參、研究過程與器材



肆、實驗結果

一、探討皇宮菜在不同缺水條件下的葉片氣孔形態和生理化學反應



不論幼苗或成熟植株在試驗兩週內沒有出現明顯枯萎，但四周之後成熟植株在嚴重缺水逆境中大部分葉片保持鮮綠，但幼苗的葉片有明顯面積縮小、厚度變薄，邊緣開始皺縮最後枯萎，而且幼苗組在嚴重乾旱的葉片含水量，相較飽水處理顯著減少50%以上

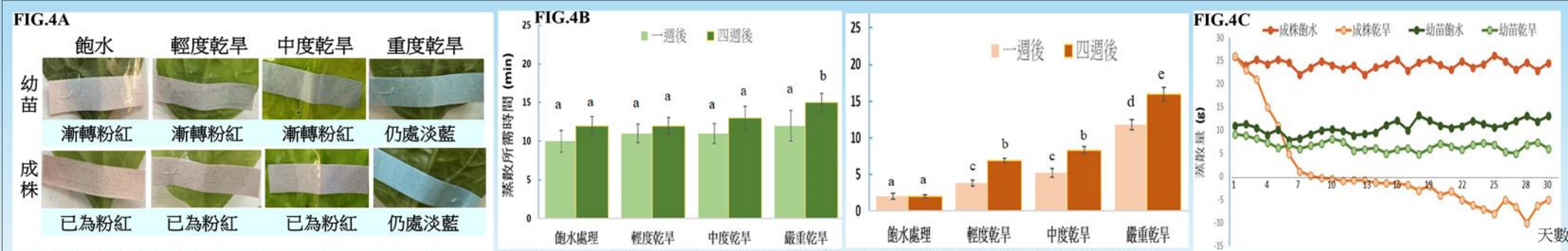


FIG.不同乾旱程度對皇宮菜幼苗和成熟植株的影響。4A.在缺水四週的蒸散速度試驗,4B對蒸散速率的影響,4C.對蒸散量的影響。

成熟植株相較幼苗蒸散快,隨著乾旱加劇,蒸散速度愈慢,但是幼苗在長期乾旱的蒸散速率和飽水組相比則無顯著差異,可以得知成熟植株在乾旱環境會減慢蒸散速率以保持葉片含水量,而且皇宮菜的蒸散量也隨著蒸散速度有所變化。成熟植株在飽水處理下,氣孔的蒸散量大約在20~25公克,但在缺水下明顯降低,甚至長時間乾旱蒸散量出現負值,有趣的是耐旱性較差的幼苗在乾旱環境中無此現象。

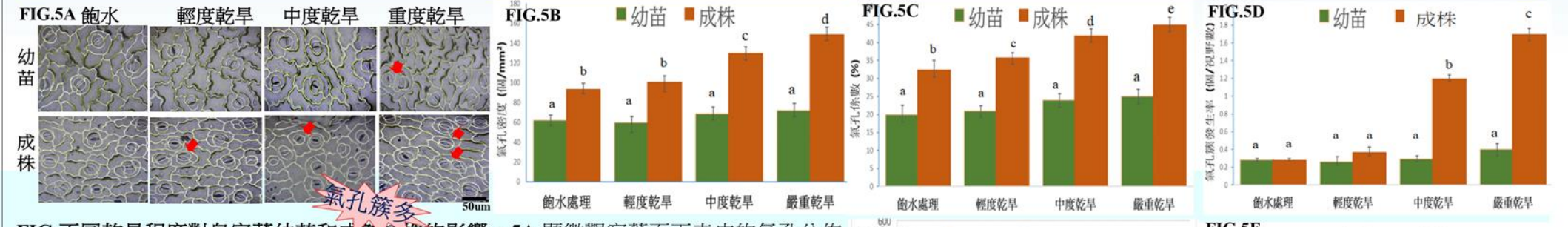


FIG.不同乾旱程度對皇宮菜幼苗和成熟植株的影響。5A.顯微觀察葉面下表皮的氣孔分佈,5B.對氣孔密度的影響,5C.對氣孔係數的影響,5D.對氣孔簇發生率的影響,5E.對氣孔張開度的影響,5F.對細胞過氧化物生成的影響。

中度和嚴重乾旱組的氣孔密度有明顯增加,其中嚴重乾旱的氣孔密度、氣孔係數,相較飽水增加了60%、40%。但特別的是,乾旱幼苗和飽水組相比,沒有顯著差異,且耐旱性低的幼苗沒有氣孔簇發生。同時化學分析指出幼苗在乾旱四週生成的過氧化物相較對照組在統計上無顯著差異,但成熟植株的過氧化氫生成產量相較飽水,隨著乾旱程度而增加,在嚴重乾旱下甚至高達十倍之多。

二、探討外源過氧化氫在皇宮菜適應乾旱的訊息調控

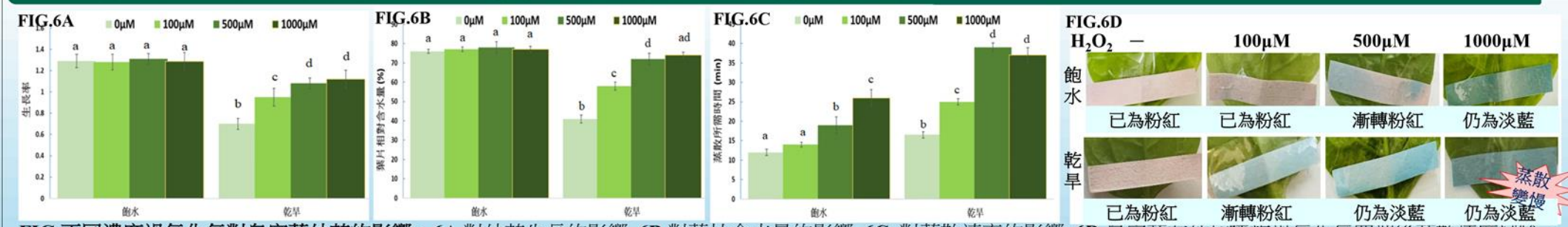


FIG.不同濃度過氧化氫對皇宮菜幼苗的影響。6A.對幼苗生長的影响,6B.對葉片含水量的影响,6C.對蒸散速率的影响,6D.皇宮菜在外加噴施過氧化氫四週後蒸散速度試驗。

1.長期嚴重缺水的幼苗原本葉片面積縮小、邊緣萎縮,噴施過氧化氫的葉子卻呈現鮮綠,萎縮情況減慢,生長率相較對照組增加40%以上,而且葉子相對含水量在500 μM H₂O₂組別達70%。我們發現適量濃度H₂O₂有助葉片生長和含水量保持,似乎有效提升幼苗耐旱適應能力。

2.以過氧化氫噴施葉片會造成乾旱中的幼苗蒸散所需時間明顯拉長,相較對照組,外加過氧化氫會降低蒸散速率,我們推測過氧化物的加入會減慢氣孔蒸散速率以提高幼苗葉片在乾旱環境下的含水量。

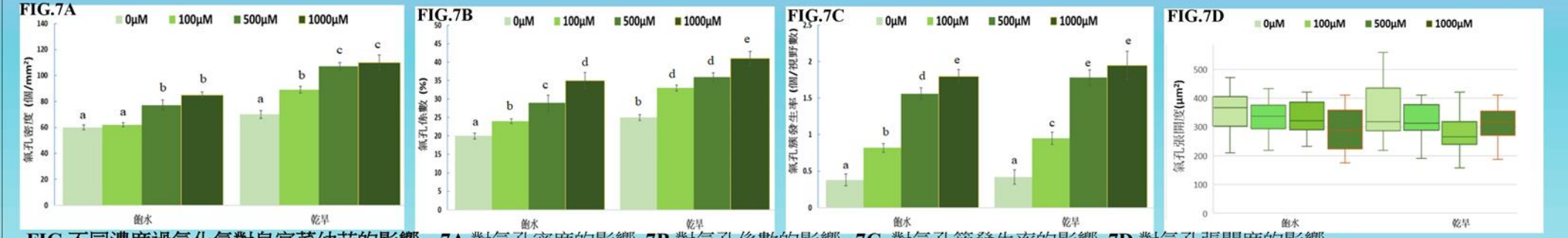


FIG.不同濃度過氧化氫對皇宮菜幼苗的影響。7A.對氣孔密度的影响,7B.對氣孔係數的影响,7C.對氣孔簇發生率的影响,7D.對氣孔張開度的影响。

1.幼苗葉片經噴施過氧化氫處理,會誘導表皮分化成保衛細胞以形成氣孔,隨著H₂O₂處理濃度的提高,氣孔密度、氣孔係數有明顯上升趨勢,1000μM過氧化氫處理四週後氣孔密度和氣孔係數皆增加50%以上,而且500μM組別的氣孔簇發生增加幅度大,但對於氣孔張開度沒有顯著影響。
2.過氧化氫會影響氣孔的分化,提高氣孔數目以誘導氣孔簇的發生,推測過氧化氫在皇宮菜乾旱適應的氣孔發育訊息機制中扮演著重要功能角色。

FIG.7E顯微觀察葉面下表皮的氣孔分佈

三、探討皇宮菜在消除氧化壓力下的乾旱適應改變

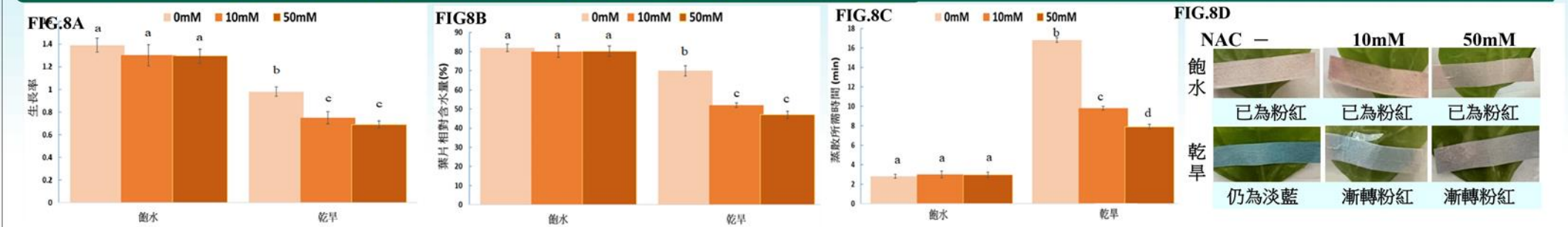


FIG.不同濃度NAC對皇宮菜成熟植株的影響。8A.對生長的影响,8B.對葉片含水量的影响,8C.對蒸散速率的影响,8D.不同濃度的NAC對成熟植株葉片的蒸散速度試驗

1.NAC抗氧化劑處理成熟植株連續四週,造成長期乾旱的葉子含水量降低,隨著NAC濃度的提高至50mM,葉子含水量相較對照組降低30%,我們更加確認皇宮菜透過過氧化物訊號分子在乾旱環境中維持葉子含水量。

2.以NAC消除H₂O₂時,發現成熟植株在乾旱中氣孔蒸散所需時間縮短,以50mM NAC處理組別的蒸散速率相較對照組加快兩倍,蒸散量也明顯增加。這說明皇宮菜在乾旱環境下透過H₂O₂訊號分子調控葉片蒸散作用,藉由降低蒸散速率以保持葉子含水量

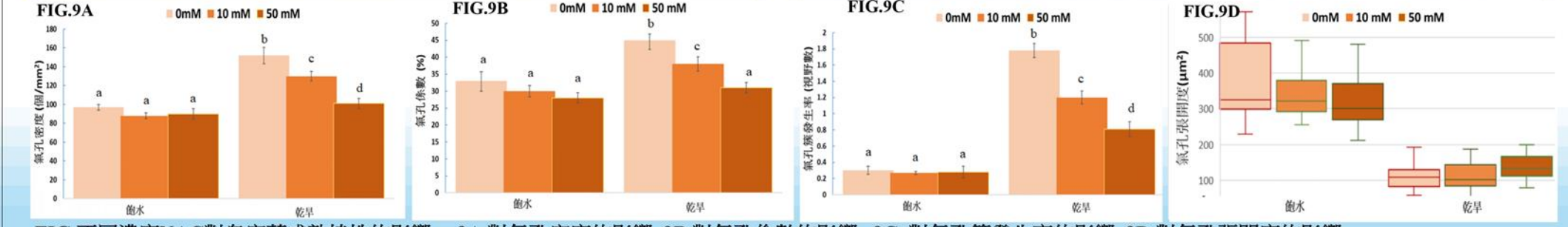


FIG.不同濃度NAC對皇宮菜成熟植株的影響。9A.對氣孔密度的影响,9B.對氣孔係數的影响,9C.對氣孔簇發生率的影响,9D.對氣孔張開度的影响。

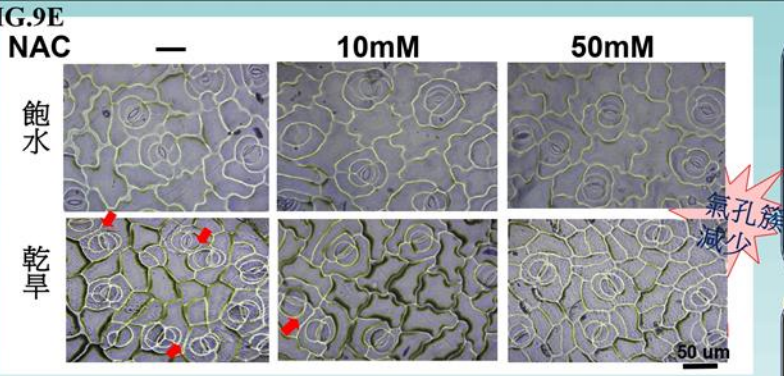


Fig.9E不同濃度的NAC對成熟植株葉片氣孔分布的影響。

我們進一步確認過氧化物影響氣孔的分化和氣孔的運動，以抗氧化劑噴施乾旱處理皇宮菜的葉子，我們發現試驗四週的結果，氣孔數量相較對照組明顯減少，氣孔密度、氣孔係數分別降低65%、70%，具有顯著差異，而且原本乾旱條件誘導氣孔簇的發生也顯著被抑制，但是氣孔的開張度沒有明顯變化。

皇宮菜在乾旱環境的適應調控中，過氧化氫扮演關鍵的訊號分子以啟動表皮分化為保衛細胞，增加氣孔密度和誘導氣孔簇的發生，以降低氣孔蒸散速率，有利於葉子保持較高的含水量。

四、探討外源離素ABA對皇宮菜氣孔運動和分化的影響

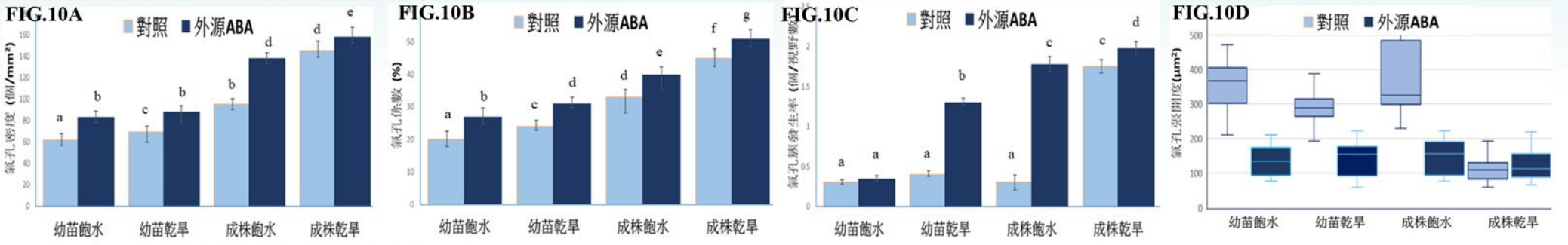


FIG.外源ABA對皇宮菜幼苗和成熟植株的影響。10A.對氣孔密度的影響，10B.對氣孔係數的影響，10C.對氣孔簇發生率的影響，10D.對氣孔張開度影響

以離素噴施在葉片連續四週，葉片上氣孔密度相較對照組皆顯著增加，其中以成熟植株在飽水下增加幅度達45%，氣孔係數亦增加21%，氣孔張開度減少40%以上。同時化學分析發現細胞內的過氧化氫產量相較對照組，生成量高達五倍以上。

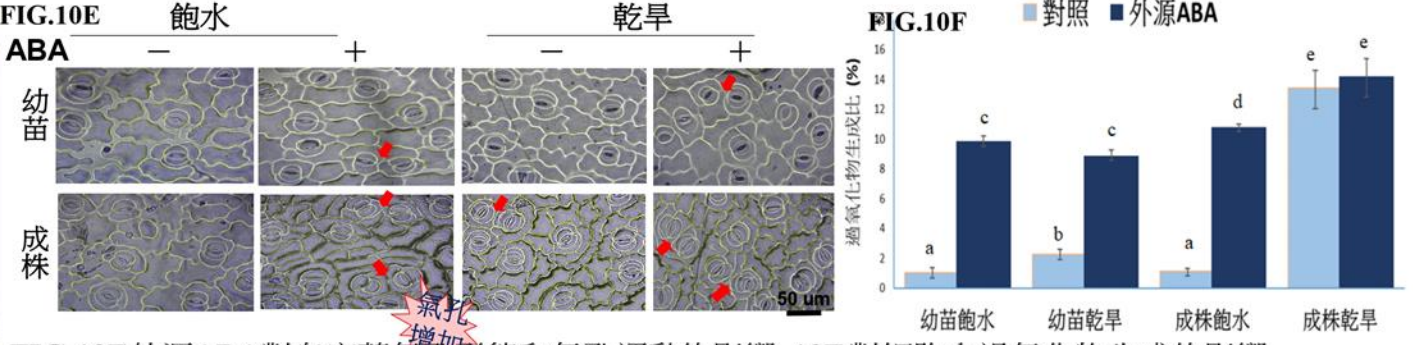


FIG.10E外源ABA對皇宮菜氣孔形態和氣孔運動的影響，10F.對細胞內過氧化物生成的影響。

五、探討外源鈣離子對皇宮菜氣孔運動和分化的影響

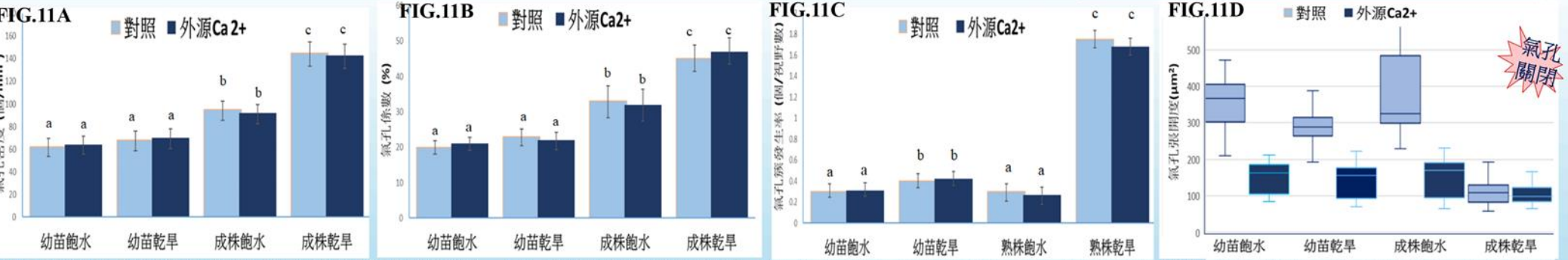


FIG.外源Ca²⁺對皇宮菜幼苗和成熟植株的影響。11A.對氣孔密度的影響，11B.對氣孔係數的影響，11C.對氣孔簇發生率的影響，11D.對氣孔張開度影響

以外加噴施Ca²⁺於葉片連續四週，發現氣孔密度相較對照組均於無顯著差異，但是氣孔張開度明顯降低，即使在飽水狀態氣孔張開度相較對照組顯著減少40%，同時外源鈣離子造成蒸散速率明顯變慢。

化學分析發現細胞內的過氧化氫生成量，相較對照組沒有明顯差異，說明鈣離子訊號分子不會誘導過氧化氫的生成。

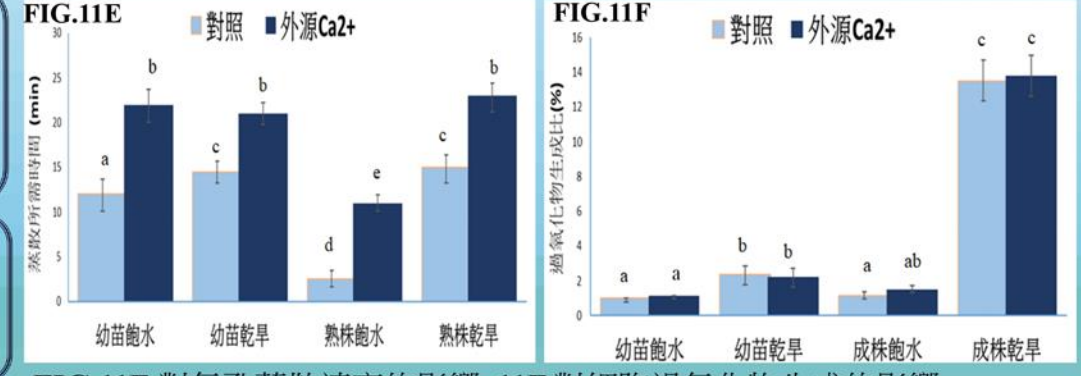
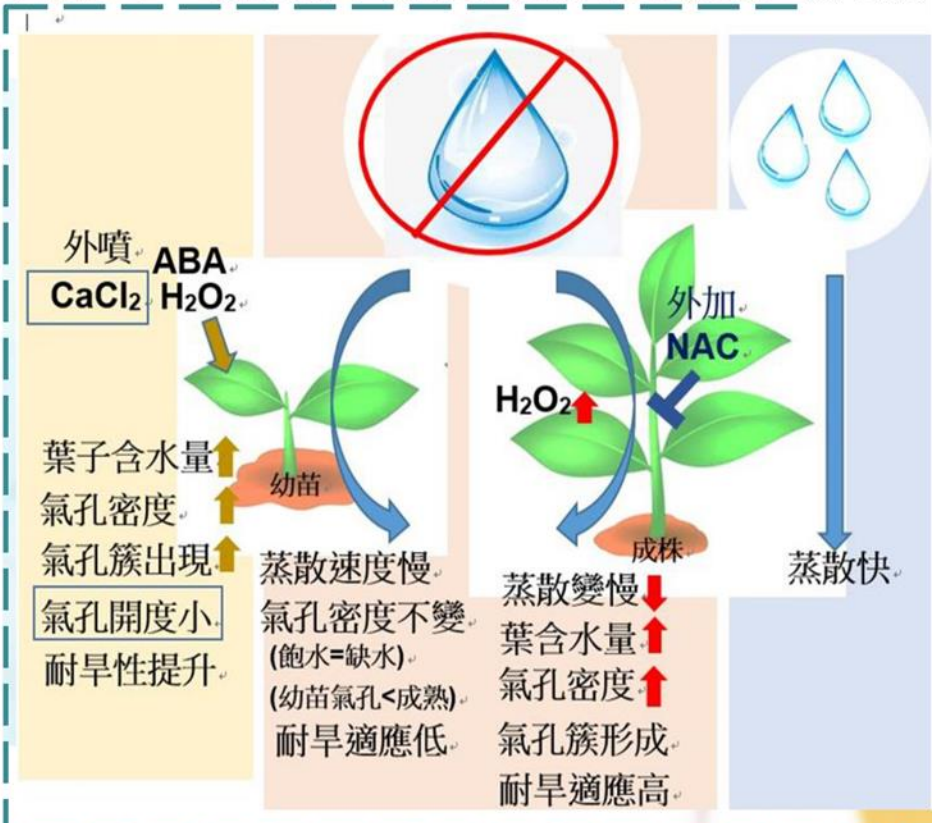


FIG.11E 對氣孔蒸散速率的影響，11F 對細胞過氧化物生成的影響

伍、結論

1. 皇宮菜在不同生長階段抗旱能力不同，成熟植株在長期嚴重缺水條件下，相較幼苗的氣孔密度和氣孔簇發生顯著提高，以減少水分蒸散量，可以維持較高的葉片含水量。
2. 成熟植株隨乾旱加劇，細胞內的過氧化氫生成量增加，當加入抗氧化劑，則減少氣孔密度和抑制氣孔簇的發生。另外幼苗葉片外噴過氧化氫會增加氣孔密度和葉片相對含水量，提高幼苗的耐旱能力，證實H₂O₂訊號分子參與皇宮菜適應乾旱的重要性。
3. 外源ABA會增加葉片表皮細胞過氧化氫的生成，且誘導表皮細胞分化形成氣孔，除了氣孔簇發生率提高，氣孔張開度也明顯減小；同時外源Ca²⁺也減小氣孔張開度，但不影響氣孔分化。
4. 皇宮菜面臨乾旱啟動ABA訊號，透過H₂O₂分子調節氣孔分化，形成氣孔簇，且透過Ca²⁺訊號減少氣孔張開度，降低水分蒸散，保持葉片含水量度過逆境。



陸、參考文獻

- 1 陸雯芸、房克、邊紅武、朱睦元。氣孔發育及其調控因素的研究進展，植物生理學報 2016；52(6)：782-788。
- 2 高春娟、夏曉劍、師愷、周豔虹、喻景權。植物氣孔對全球環境變化的回應及其調控防禦機制，植物生理學報 2012；48(1)19~28
- 3 關軍鋒 李廣敏。Ca²⁺與植物抗旱性的關係，植物學通報 2001；18 (04): 473-478。
- 4 楊傑峰、鄧紅華、費永俊。黑麥草不同品種回應乾旱逆境的表型特徵，湖北農業科學 2021；60：16。
- 5 GAN, Y., Zhou, L., Shen, Z.-J., Shen, Z.-X., Zhang, Y.-Q., and Wang, G.-X. (2010)。Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies*,51: 325-336。
- 6 Kehler,B., Hills S.,and Blatt M. R.,Control of guard cell ion channelsby hydrogen peroxide and abscisic acid indicctes their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol.*, 2003；131:385-388。
- 7 林宥甄、李庭瑜、皮羽晴。2020。喔『葉』-皇宮菜在缺水逆境的適應研究。第 60 屆中華民國中小學科學展覽會國小組生物科。