

中華民國第 65 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

052102

千錘百鍊—阿拉伯芥熱鍛鍊次數之研究

學校名稱： 國立彰化女子高級中學

作者： 高二 林俐	指導老師： 蕭碧鳳
------------------	------------------

關鍵詞： 阿拉伯芥、熱鍛鍊、後天耐熱性

千錘百鍊—阿拉伯芥熱鍛鍊次數之研究

摘要

全球暖化對生物構成重大威脅，生物熱適應成為關鍵課題。本研究探討阿拉伯芥的制約學習及不同熱鍛鍊方式對短期後天耐熱性(SAT)與長期後天耐熱性(LAT)的影響。結果發現阿拉伯芥在經過 200Hz 聲音與熱鍛鍊聯結的訓練後，未顯示制約學習；多次間歇熱鍛鍊對 SAT 有顯著的累加效果，而 LAT 的提升則是持續熱鍛鍊較有效；藉由數學建模分析，增加熱鍛鍊次數、持續時數，SAT、LAT 的耐熱能力會遞增但增益效應卻遞減，可依據建模因應不同需求來調整熱適應策略；分子機制上，SAT 的增益效應可能與 sHSP17.6 有關，LAT 則與 HSP101 及 HSA32 有關，顯示不同熱鍛鍊方式可透過不同機制來調控耐熱蛋白的表現與衰減。這些成果深化我們對植物熱適應的理解，還為應對不同熱逆境提供具體精準的策略。

壹、前言

一、研究動機

植物學家加利亞諾曾對含羞草做過一項著名實驗，這種植物面對陌生的機械刺激時會閉合葉子，如果讓含羞草一再地從高處墜落，從一開始會緊閉葉子，到後來反應發生變化，在跌落時不再閉緊葉片，這並非含羞草已經筋疲力盡，而是含羞草已經知道跌落不會造成危害，產生了類似動物習慣性適應的學習行為(Gagliano et al., 2014)；加利亞諾另一項豌豆的實驗，將豌豆栽培於 Y 型迷宮中，訓練期間先以風扇吹拂再照藍光，接著在測試階段，僅以風扇在 Y 型迷宮的某一端吹拂，受過訓練的豌豆就像知道風扇吹拂的方向就會出現光源，會在黑暗的迷宮中朝向有風扇吹拂的方向生長，而未受訓練的豌豆則不會出現朝風扇吹拂方向生長的偏好行為，顯示豌豆能透過訓練來建立並記憶不同刺激間的特定聯結(Gagliano et al., 2016)，就像著名的巴夫洛夫古典制約試驗。加利亞諾的試驗開啟了後續許多針對植物記憶與學習的研究，但因其試驗無法在其他實驗室重現而遭到質疑(Markel K., 2020)，植物沒有大腦甚至連神經元都沒有，如何因應外界刺激做出適當的反應，對植物的生存與適應

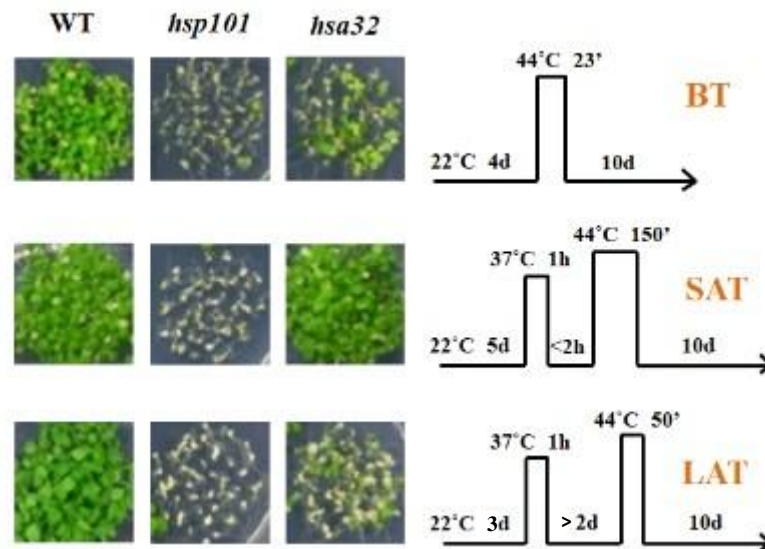
極其重要。

進入工業時代以來，人類的碳排放量逐年飆升，溫室效應所造成的全球暖化對植物生存是很大的挑戰。科學家已知道植物預先經過較溫和的熱鍛鍊(heat training)之後，可以對極端高溫有較強的耐受性，這種後天耐熱性的過程就如同動物的學習，透過適當的熱鍛鍊記取經驗，可以提升後續抵抗熱逆境的能力，又稱為熱適應(heat acclimatization)。模式植物阿拉伯芥具有在實驗室操作的便利性，且科學家已建立強大的分子遺傳學系統可以進行分析研究，與其重複做豌豆的制約實驗，不如以阿拉伯芥的熱適應能力為基礎，來探討阿拉伯芥熱適應的能力能否被制約以及相關耐熱機制的表現。

二、文獻回顧

(一) 阿拉伯芥的耐熱反應多樣性

阿拉伯芥的耐熱反應多樣性可分為基礎耐熱性(Basal thermotolerance, BT)以及後天耐熱性，而基礎及後天耐熱性的差別在於有無熱鍛鍊的過程(Hu et al., 2012)。「熱鍛鍊」講述的便是將植物先置於非致死的高溫中使其耐熱機制啟動的過程，經過熱鍛鍊後的阿拉伯芥便可獲得後天耐熱性，此種後天獲得的耐熱性有助於植物度過原本無法忍受的極端高溫環境，故稱為熱適應(heat acclimatization)；其中，依熱鍛鍊後遭遇熱逆境（極端高溫）的間隔時長不同又分為短期後天耐熱性(Short-term acquired thermotolerance, SAT)以及長期後天耐熱性(Long-term acquired thermotolerance, LAT)，SAT 熱鍛鍊後間隔的時長小於 2 小時，而 LAT 則多於 2 天，如圖一所示：基礎耐熱性(BT)是將未經 37°C 熱鍛鍊的阿拉伯芥，直接置於 44°C 的極端高溫中；短期後天耐熱性(SAT)及長期後天耐熱性(LAT)則是將阿拉伯芥先經 37°C 的熱鍛鍊後間隔一段時間再置於 44°C 的極端高溫。

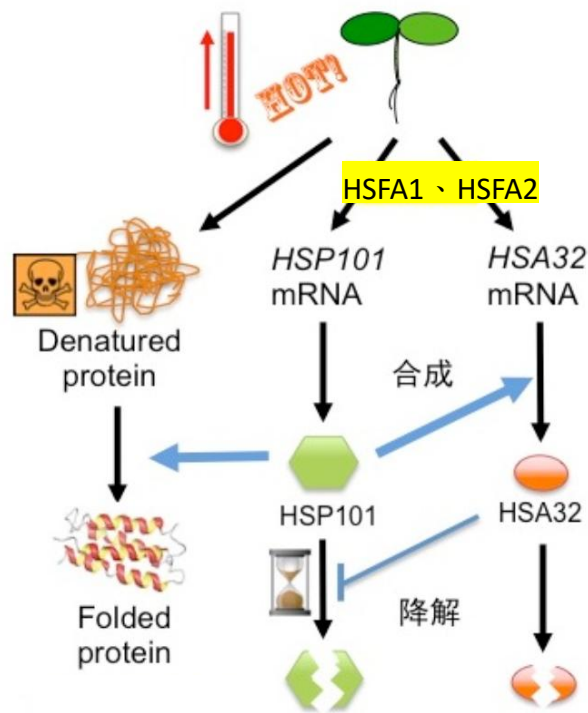


圖一、阿拉伯芥的三種耐熱反應多樣性，WT 為野生型，*hsp101* 為 *HSP101* 基因缺失之突變株，而 *hsa32* 則為 *HSA32* 基因缺失之突變株。（圖片引用自 Hu et al., 2012）

（二）影響阿拉伯芥後天耐熱性的基因

研究發現阿拉伯芥經過適當熱鍛鍊後可透過許多分子機制來啟動耐熱反應，包含熱休克轉錄因子(heat shock factor)、熱休克蛋白(heat shock protein)以及表觀遺傳調控等。阿拉伯芥至少可透過兩個路徑來延長熱鍛鍊的效應，如圖二所示：1. HSFA2 (heat shock factor A2)參與的轉錄調控路徑；2. HSP101 (heat shock protein 101)及 HSA32 (heat shock associate protein 32)在後轉錄階段的正回饋調控路徑(Wu et al., 2013)。

熱休克轉錄因子是調控熱休克蛋白基因表達的轉錄因子，其中 HSFA2 在熱鍛鍊後會大量且持續表達而被認為與植物耐熱能力有重要關連，透過 HSFA2 延長了部份熱休克蛋白基因的表現，如 *HSP101*。HSP101 可協助蛋白質的正常摺疊，其存續與否和後天耐熱性的維持有直接相關；而 HSA32 雖然不如熱休克蛋白家族直接參與植物的耐熱機制，但其與 HSP101 的表現量多寡息息相關，涉及熱休克蛋白在轉譯合成與降解層面的相互作用，可能機制為 HSP101 提高 HSA32 的生合成，而 HSA32 則回過頭來減緩了 HSP101 的降解，間接地延長熱鍛鍊效應的效期。



圖二、阿拉伯芥延長熱鍛鍊效應的路徑（圖片引用自 Wu et al., 2013）

三、研究目的

- （一）探討阿拉伯芥熱適應的學習能力能否被制約
- （二）探討熱鍛鍊次數與間隔對阿拉伯芥熱適應的影響
- （三）研究熱鍛鍊方式提升熱適應能力的建模
- （四）研究不同熱鍛鍊方式影響耐熱機制的路徑

貳、研究設備及器材

一、研究設備

- （一）高溫滅菌釜
- （二）無菌操作台：4BH-2 (High Ten)
- （三）恆溫震盪水浴槽：BT-350D (Yih Der)
- （四）植物生長箱：CK-68EX-LED (Chang Kuang)
- （五）植物組織均質機：SH-48 Autogrinder (Kurabo)

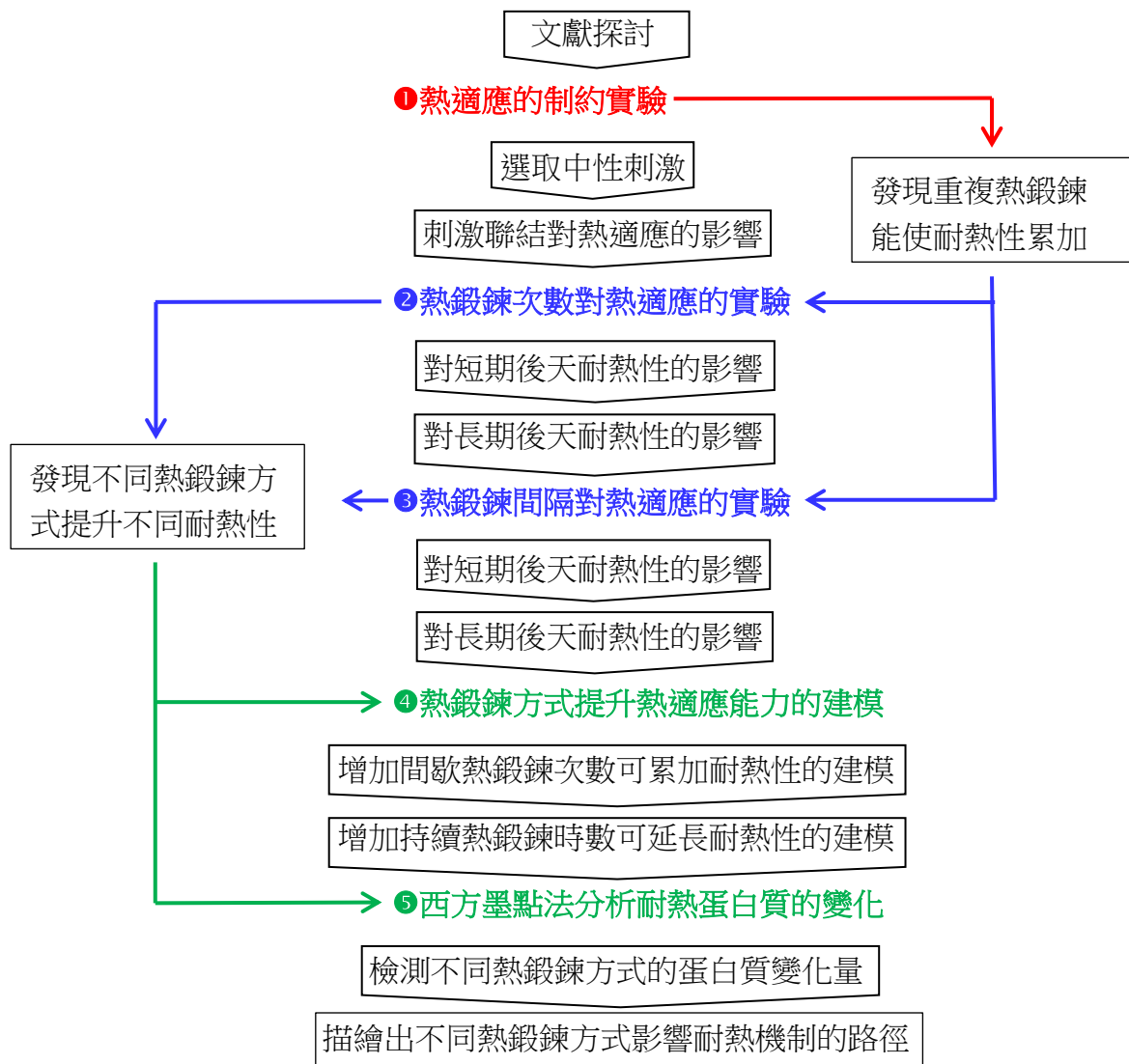
- (六) 離心機：Fresco™ 17 Microcentrifuge (Thermo Scientific)
- (七) 多功能微量盤檢測儀：Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek)
- (八) 乾浴器：ThermoMixer F1.5 (eppendorf)
- (九) 電泳槽：XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)
- (十) 轉印槽：XCell II Blot Module (Invitrogen)
- (十一) 高解析螢冷光生醫影像系統：UVP ChemStudio PLUS (Analytik Jena)

二、研究器材

- (一) 野生型及 3 種突變型阿拉伯芥：WT (wild type)、*hsa32* (heat shock associate 32-kD mutant)、*hsp101* (heat shock protein 101 mutant)、*hsfA2* (heat shock factor A2 mutant)，其中突變株是利用農桿菌將 T-DNA 插入基因內，破壞該基因使植物無法將其表現。種子來源由中研院農業科技研究中心提供，自行在學校實驗室培養種植阿拉伯芥植株，待種子成熟後採收供實驗使用。
- (二) 培養基：1/2MS medium、Agar (0.96%)、sucrose (1%)，pH=5.7
- (三) 萃取緩衝液(extraction buffer)：60mM Tris-HCL、2% SDS (pH8.5)、2.5% glycerol、0.13mM EDTA、1% protease inhibitor cocktail
- (四) Bio-Rad DC Protein Assay：檢測蛋白質濃度
- (五) NuPAGE® electrophoresis system：電泳、轉印
- (六) Ponceau S staining：蛋白質染色
- (七) PBS：0.25M KH₂PO₄、1.5M NaCl
- (八) PBST：100ml PBS、900ml 水，調整 pH=7.2，再加 3ml Tween-20
- (九) 抗體：
 - 1. Rabbit anti-Arabidopsis HSA32 由 Charng et al. (2006) 製備
 - 2. Rabbit anti-Arabidopsis HSP101 由 Chi et al. (2009) 製備
 - 3. Hen anti- Arabidopsis AtHSP17.6/sHSP-CI (Agrisera, catalog number: AS08 284)
 - 4. Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo)
- (十) HRP 酵素冷光試劑 (PerkinElmer)

參、研究過程或方法

一、研究架構



二、研究方法

(一) 阿拉伯芥的培養與紀錄

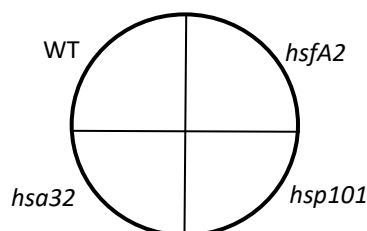
1. 1/2MS 培養基配置：

水 200ml、MS power 0.474g、Agar 1.92g、Sucrose 2g 煮至溶解後，調整 pH 值至 5.7，置於高溫滅菌釜中滅菌 15 分鐘，冷卻後倒入培養皿中靜置凝固。

2. 阿拉伯芥種子的種植：將阿拉伯芥種子以 75% 酒精消毒 5 分鐘，1% 次氯酸鈉的漂白水清洗 10 分鐘，再以滅菌水清洗並重複多次後，種植於培養基上，以白色透氣膠帶纏繞

於培養基外側避免汙染，先置於 4℃ 冰箱，2 天後移置植物生長箱，生長箱設置：22℃、光照 16 小時黑暗 8 小時，照光強度為 254~255 lux。

3. 種植方式：4 個品系種植如圖三，在培養皿底部以抗酒精筆區隔並標示，方便觀察與紀錄。

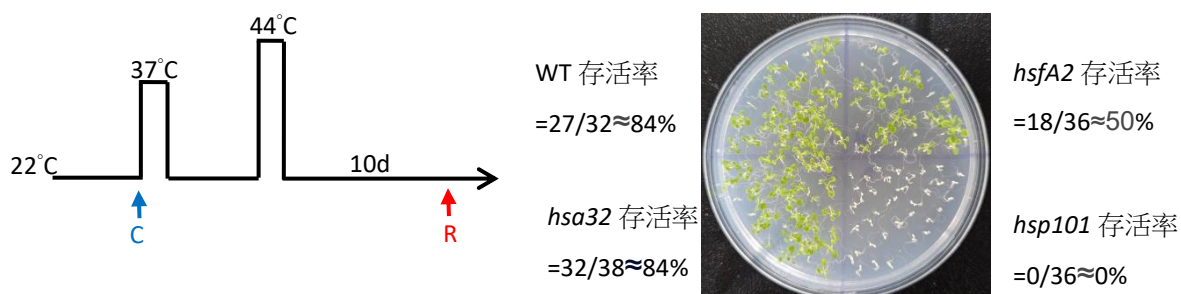


圖三、阿拉伯芥種植示意圖（自繪）

4. 拍照記錄方式，如圖四

(1) 熱鍛鍊前樣本(C)：於進行熱鍛鍊（37℃處理）前計算發芽數。

(2) 熱逆境後置於 22℃ 十天後的樣本(R)：於進行熱逆境（44℃處理）後，置於 22℃ 培養箱十天後拍照並計算存活率。葉片枯萎或白化，並無新葉長出，登記為死亡，其餘登記為存活。



圖四、樣本記錄時間以及存活率計算示意圖（自繪）

(二) 熱鍛鍊與熱逆境的方式

採用水浴法進行熱鍛鍊與熱逆境的處理：將水浴槽調整至所需溫度，熱鍛鍊為 37℃，熱逆境為極端溫度 44℃，培養皿外緣纏繞黑色電器膠帶封緊避免水滲入，放入水浴槽中固定位置後進行水浴，並以計時器定時。

(三) 聲音處理的方式

使用手機音訊發聲器 app，連接藍芽喇叭，將音頻調至 200Hz，音量調至最大。將已用膠帶封緊的培養基移至設定好溫度的水浴槽內，藍芽喇叭則置於水浴槽旁，讓培養基同

時進行特定溫度與 200Hz 聲音的處理。

(四) 資料分析

使用 Exeal 繪製柱狀圖或折線圖觀察圖表趨勢，並以 ANOVA 與 Tukey HSD 進行統計分析與事後檢定，檢驗組間是否有顯著差異。柱狀圖標上不同小寫英文字母代表有顯著差異($p < 0.05$)，標上相同小寫英文字母則代表無顯著差異。

(五) 蛋白質萃取與西方墨點法

- 1.將秤重後的阿拉伯芥幼苗與鎢鋼珠放進微量離心管，放入液態氮冷卻後以植物組織均質機磨碎。
- 2.依阿拉伯芥幼苗重量加入萃取緩衝液(extraction buffer)，加入的量為 $2\mu\text{l}/\text{mg}$ ，靜置室溫 10 分鐘後進行離心，取上清液至新的離心管。
- 3.加入 Bio-Rad DC Protein Assay 的試劑和蛋白質樣本反應，計算蛋白質濃度，推算 $50\mu\text{g}$ 蛋白質的取樣體積、補足的水量以及 NuPAGE® electrophoresis system 的試劑至離心管中，最後總體積為 $16\mu\text{l}$ 。
- 4.將離心管放入乾浴器， 70°C 加熱 10 分鐘，離心後取上清液即為蛋白質電泳的樣本。
- 5.將樣本置入電泳膠的間隔中，在 200V 下進行電泳 60 分鐘。
- 6.將電泳膠上的蛋白質在 15V 下進行轉漬(transfer)至硝酸纖維轉印膜 90 分鐘。
- 7.先將轉印膜進行 Proceau S staining 後清洗並拍照。
- 8.再以脫脂奶粉將轉印膜上的空白處填滿(blocking)。
- 9.將轉印膜浸泡於配置好的一級抗體溶液中隔夜備用。
- 10.以 PBST 快速清洗轉印膜 3 次，再慢速清洗 5 分鐘，重複 3 次。
- 11.將轉印膜浸泡於配置好的二級抗體溶液中 30 分鐘。
- 12.以 PBST 快速清洗轉印膜 3 次，再慢速清洗 5 分鐘，重複 3 次。
- 13.加入受質進行反應後，將膜置於冷光攝像機偵測冷光並成像。
- 14.使用 Image J 軟體進行影像處理與分析定量。

肆、研究結果

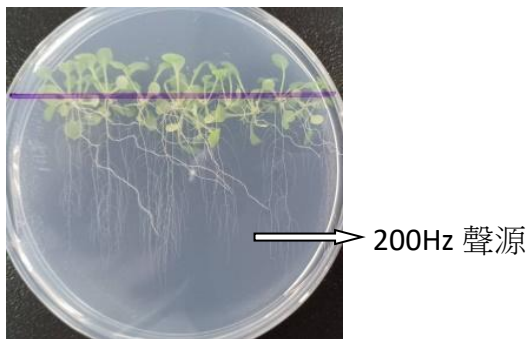
一、熱適應的制約實驗

(一) 選取中性刺激

巴夫洛夫古典制約試驗的過程如下：

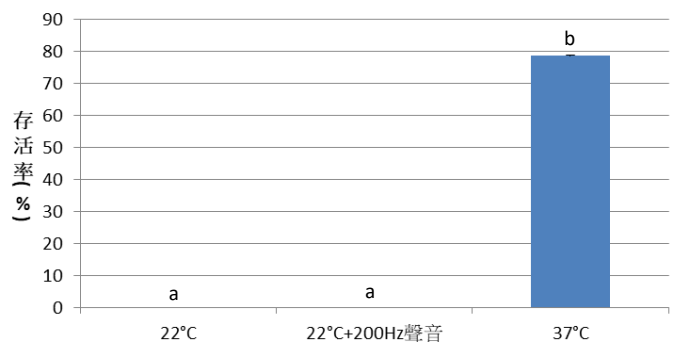
1. 非制約行為：食物（非制約刺激）→ 唾液分泌（非制約反應）
2. 刺激連結訓練：聲音（中性刺激）+ 食物（非制約刺激）→ 唾液分泌（非制約反應）
3. 制約行為：聲音（中性刺激=制約刺激）→ 唾液分泌（制約反應）

仿照巴夫洛夫的制約試驗，以阿拉伯芥與生俱有的短期後天耐熱性(SAT)進行制約實驗，熱鍛鍊(37°C)作為非制約刺激，初始的 SAT 為非制約反應，選取 200Hz 聲音作為中性刺激。確認 200Hz 聲音為中性刺激，即阿拉伯芥可以偵測但初始不會影響 SAT，查詢論文發現阿拉伯芥可以偵測 200Hz 的聲音使根產生向聲性 (Rodrigo-Moreno et al, 2017)，制約實驗前先測試藍芽喇叭的 200Hz 聲音可誘使阿拉伯芥的根產生向聲性，結果如圖五所示；再進一步確認制約實驗前 200Hz 聲音無法如熱鍛鍊使 SAT 的存活率提高，結果如圖六所示。



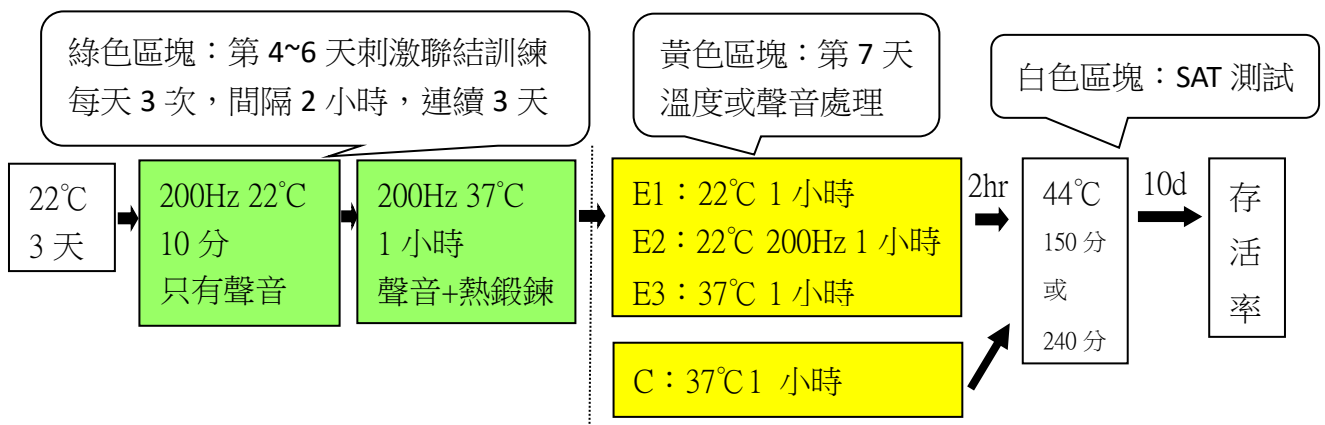
圖五 部分根朝向聲源生長(自攝)

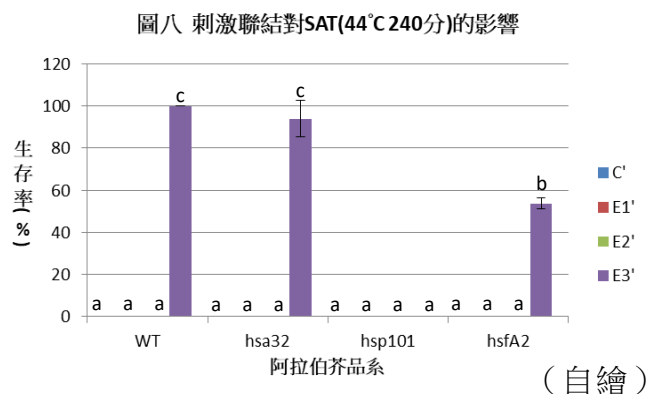
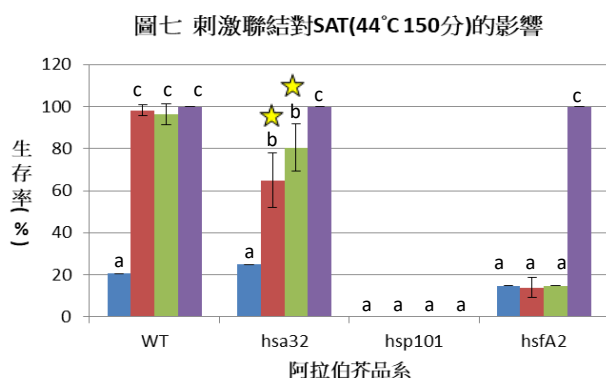
圖六 初始不同刺激對SAT的影響



(自繪)

(二) 刺激連結訓練對 SAT 的影響





C 為 SAT 的控制組，未經過刺激聯結訓練；E 為實驗組，經過刺激聯結訓練之後再進行 SAT 的處理，E1 為 22°C 1 小時，E2 為 22°C 加上 200Hz 聲音 1 小時，E3 為熱鍛鍊 37°C 1 小時，若阿拉伯芥在刺激聯結訓練後可以產生刺激聯結的制約反應，亦即在經過多次 200Hz 聲音與 37°C 刺激聯結的訓練之後，200Hz 聲音 (E2 處理) 可以取代熱鍛鍊 37°C (E3 處理) 的刺激使阿拉伯芥產生 SAT 的熱適應，使存活率提高；若無產生刺激聯結的制約反應，則 200Hz 聲音 (E2 處理) 會與 22°C (E1 處理) 的結果相同。

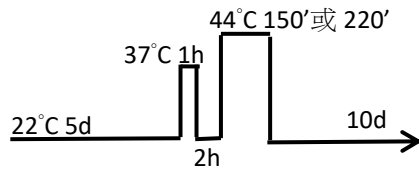
圖七中，WT 的 E1~E3 的存活率皆趨近 100%，無法判定有無制約反應，在 *hsa32*、*hsfA2* 中，僅 *hsa32* 中 E1 和 E2 的存活率雖然有差別但在統計上並無顯著差異 ($p=0.324>0.05$)，由此可將 E1 與 E2 處理的存活率視為一樣，而 E3 的存活率則皆為 100%，可藉以判斷阿拉伯芥在刺激聯結訓練後應沒有產生刺激聯結的制約反應。在圖八中，將 44°C 逆境由 150 分增加至 240 分，E1'、E2' 皆死亡，僅有 E3' 的處理可以存活，更能證明阿拉伯芥在刺激聯結訓練後沒有產生刺激聯結的制約反應。

另外在圖七 WT 及 *hsa32* 中，E1、E2 及 E3 的存活率皆大於 C，代表刺激聯結訓練過程中，多次 37°C 的熱鍛鍊可能使耐熱性產生累加作用，使阿拉伯芥的存活率提高。這結果曾造成干擾，讓我誤以為 E2 的聲音刺激可以如同 E3 的 37°C 熱鍛鍊提升存活率，後來增加未經過刺激聯結訓練的對照組 C，才確認應是多次 37°C 的熱鍛鍊造成的累加作用，這是一個很意外但非常有趣的發現，故後續針對多次熱鍛鍊的累加作用進行探討。

二、熱鍛鍊的次數對熱適應的影響

(一) 對短期後天耐熱性(SAT)的影響

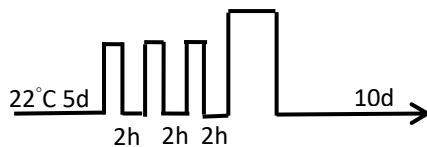
S1 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 1 次



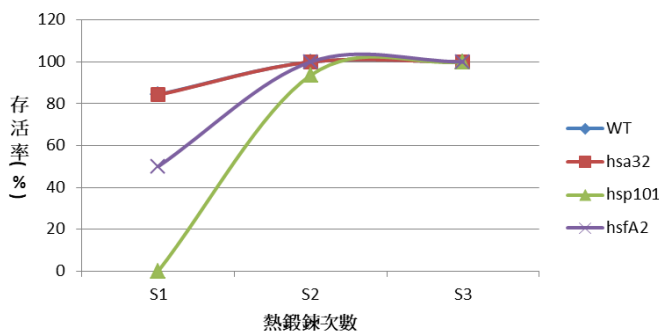
S2 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 2 次



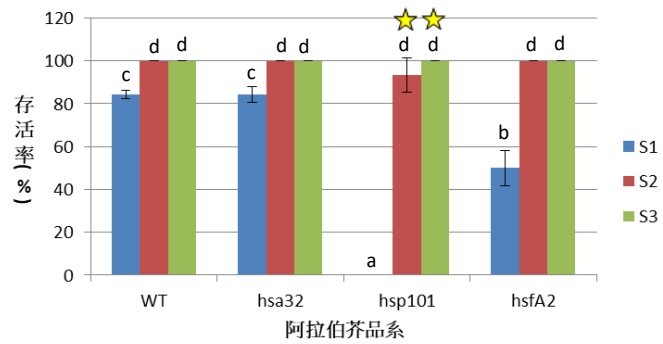
S3 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 3 次



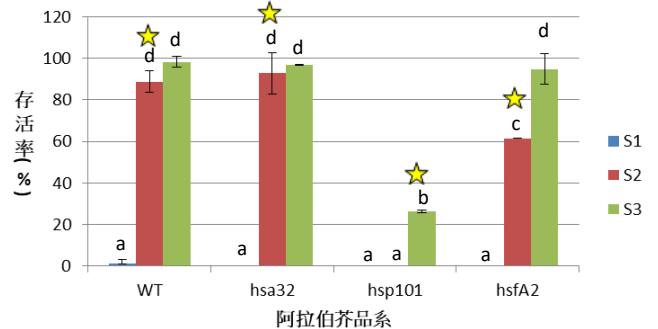
圖十一 熱鍛鍊次數對不同品系SAT(44°C 150分)的影響趨勢



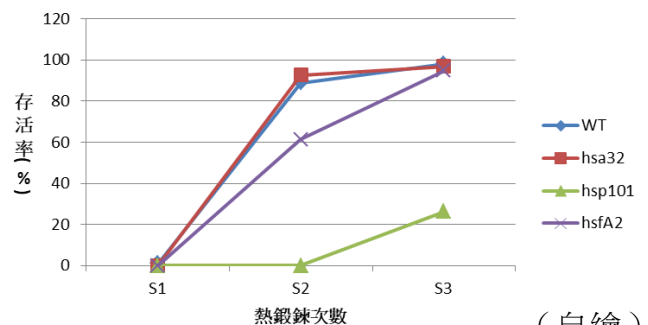
圖九 熱鍛鍊次數對SAT(44°C 150分)存活率的影響



圖十 熱鍛鍊次數對SAT(44°C 220分)存活率的影響



圖十二 熱鍛鍊次數對不同品系SAT(44°C 220分)的影響趨勢



(自繪)

阿拉伯芥 SAT 為熱鍛鍊後 2 小時進行 44°C 極端高溫處理，由於 44°C 150 分鐘處理 WT 的存活率接近 100%，故另外延長 44°C 至 220 分鐘，增加熱逆境的強度使存活率降低，更易看出熱鍛鍊次數對 SAT 的影響。

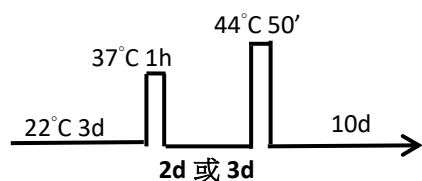
由圖九、圖十可知熱鍛鍊次數愈多，阿拉伯芥 SAT 的存活率愈高，四種品系的存活率皆有 S1<S2<S3 的趨勢，且在嚴重熱逆境的情況下（圖十），2 次熱鍛鍊即可將 WT 的存活率從 1 次熱鍛鍊的趨近 0% 提升至趨近 100%，由此可知增加熱鍛鍊次數確實可顯著提升阿拉伯芥對 SAT 的熱適應。

由圖十一、圖十二可比較熱鍛鍊次數對四種品系 SAT 的存活率影響差異，熱鍛鍊次數對 WT 和 *hsa32* 品系的影響較為相似，與對 *hsp101*、*hsfA2* 的影響較為不同。HSP101 表現量的多寡與熱適應直接相關，其基因缺失對 SAT 的存活率影響最重大，增加熱鍛鍊次數雖可提升存

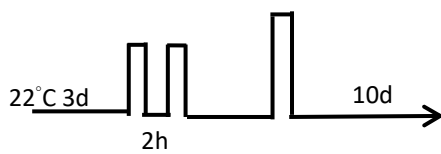
活率，但面臨相對嚴重的熱逆境（44°C 220 分），3 次熱鍛鍊也只能將存活率提升至 26%，可見 HSP101 在 SAT 熱適應的重要性，熱鍛鍊次數增加讓 *hsp101* 突變株存活下來也代表可能有其他熱休克蛋白的參與。*HSA32* 與 *HSFA2* 兩個基因皆可影響 HSP101 的表現量，*HSFA2* 基因缺失對 SAT 的存活率影響較 *HSA32* 大，推測 *HSFA2* 基因缺失對 HSP101 的表現量影響較 *HSA32* 大；另外在相對嚴重的熱逆境下（44°C 220 分），四種品系的 S1 存活率皆趨近 0%，在 2 次熱鍛鍊後(S2)，WT 與 *hsa32* 的存活率皆可提升至趨近 100%，但 *hsfA2* 則只能提升至 61%，可推論熱鍛鍊次數增加對 *HSA32* 基因調控 HSP101 表現量的影響較小，而對 *HSFA2* 基因的影響較大，由此可推測 *HSFA2* 基因可能在熱鍛鍊次數提升 SAT 熱適應的過程中扮演較重要的角色。

（二）對長期後天耐熱性(LAT)的影響

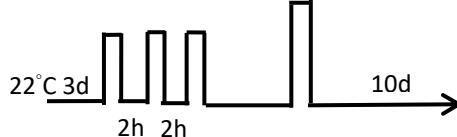
L1 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 1 次



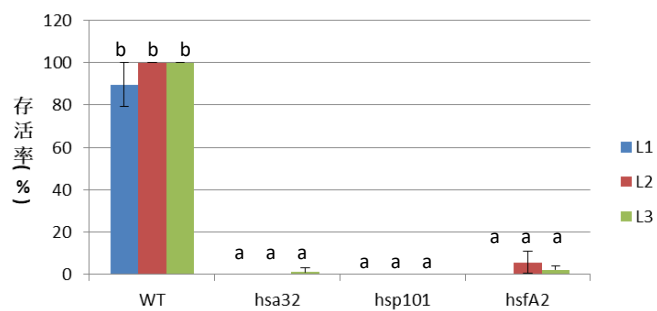
L2 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 2 次



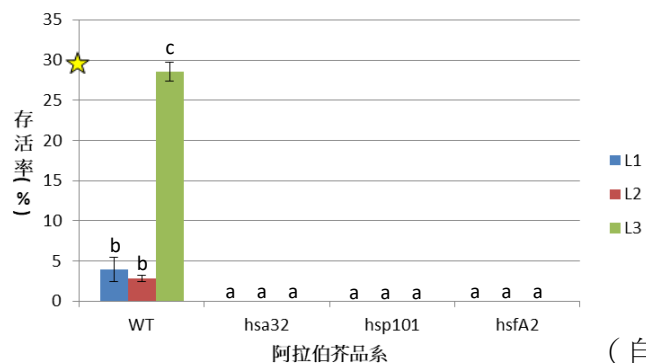
L3 處理：37°C 1 小時熱鍛鍊 3 次



圖十三 熱鍛鍊次數對LAT(鍛鍊後2d)存活率的影響



圖十四 熱鍛鍊次數對LAT(鍛鍊後3d)存活率的影響



(自繪)

阿拉伯芥 LAT 為熱鍛鍊後 2 天進行 44°C 極端高溫 50 分鐘處理，由於 2 天後處理的 WT 存活率接近 100%，故另外將熱鍛鍊後的時間延長至 3 天再進行同樣的極端高溫處理，使 WT 的存活率降低，較易看出熱鍛鍊次數對 LAT 的影響。

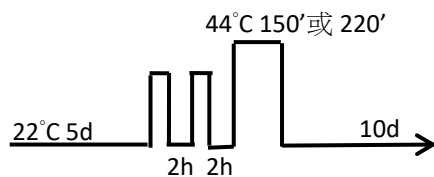
圖十三中在熱鍛鍊 2 天後進行極端高溫處理，WT 的存活率皆趨近 100%，三種突變品系的存活率皆趨近 0，無法比較熱鍛鍊次數的影響；圖十四中在熱鍛鍊 3 天後進行極端高溫處理，熱鍛鍊 1 次與 2 次後的 WT 存活率皆小於 5%，但熱鍛鍊 3 次後存活率可上升至 29%，可知熱鍛鍊次數增加僅能略微提高 WT 在 LAT 的存活率，且完全無法提升 *hsa32*、*hsp101* 以及

hsfA2 的存活率。由此可推論 *HSA32*、*HSP101* 及 *HSFA2* 三個基因皆在 LAT 熱適應的過程中扮演重要角色，在此三個基因出現個別缺失的情況下，即使熱鍛鍊次數增加可增加耐熱蛋白質的產量，但因耐熱蛋白質會隨時間逐漸減少，在熱鍛鍊 2 天與 3 天後已減少到無法提高阿拉伯芥在 LAT 的存活率。

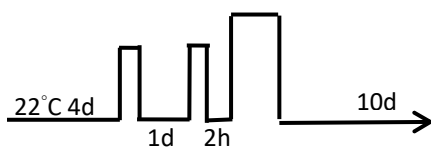
三、熱鍛鍊間隔對熱適應的實驗

(一) 對短期後天耐熱性(SAT)的影響

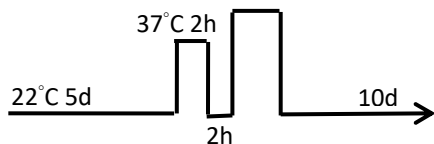
S2 處理：2 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 2 小時



S2d 處理：2 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 1 天



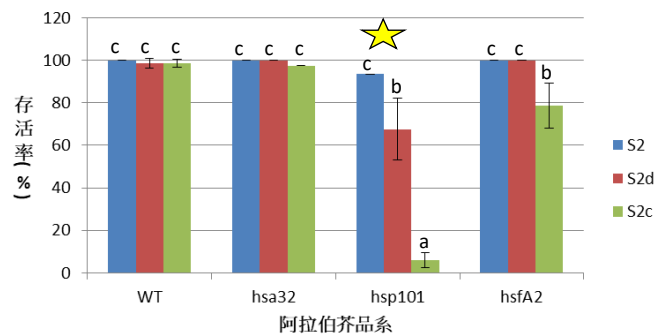
S2c 處理：37°C 熱鍛鍊無間隔持續 2 小時



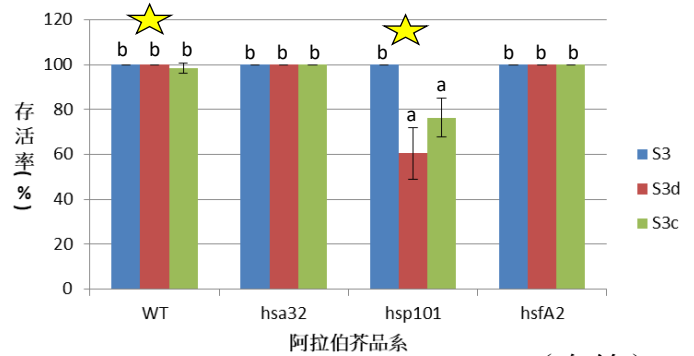
S3 處理：3 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 2 小時；S3d 處理：3 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 1 天

S3c 處理：37°C 熱鍛鍊無間隔持續 3 小時

圖十五 2次熱鍛鍊間隔對SAT(44°C 150分)存活率的影響

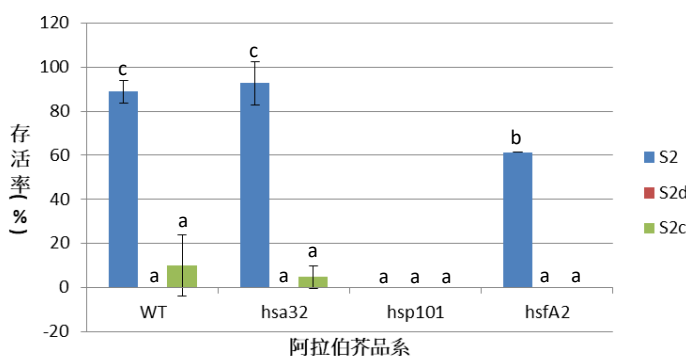


圖十六 3次熱鍛鍊間隔對SAT(44°C 150分)存活率的影響

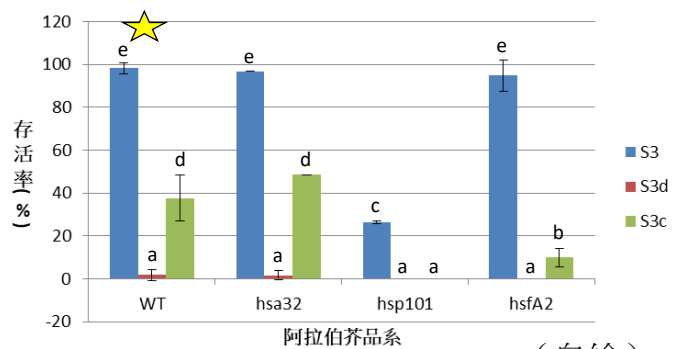


(自繪)

圖十七 2次熱鍛鍊間隔對SAT(44°C 220分)存活率的影響



圖十八 3次熱鍛鍊間隔對SAT(44°C 220分)存活率的影響



(自繪)

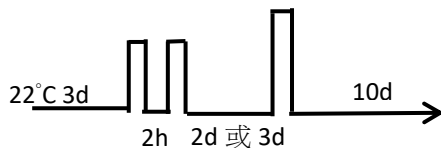
由圖十五、十六可知在相對輕微的熱逆境下 (44°C 150 分)，多次熱鍛鍊後 WT、*hsa32* 的

存活率皆趨近 100%，看不出熱鍛鍊間隔的影響；而多次熱鍛鍊對 *hsfA2* 的存活率提升為 S（熱鍛鍊間隔 2 小時）= S_d（熱鍛鍊間隔 1 天）> S_c（熱鍛鍊持續無間隔）；另外對 *hsp101* 的存活率提升同樣為 S（熱鍛鍊間隔 2 小時）最好，但間隔 1 天的 2 次與 3 次熱鍛鍊對 *hsp101* 的存活率無顯著影響，持續無間隔的熱鍛鍊 2 小時的存活率相較於 3 小時的存活率由 6% 提升至 76%，推測在 HSP101 缺失的情況下，多次熱鍛鍊可能會激發其他非 HSP101 的熱休克蛋白產生而提升存活率，多次熱鍛鍊間隔 2 小時的提升效果最好，間隔 1 天次之，持續無間隔的熱鍛鍊則至少要 3 小時才能提升 SAT 的熱適應能力。

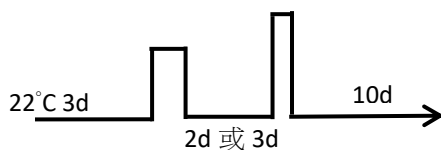
由圖十七、十八可知在相對嚴重的熱逆境下（44°C 220 分），多次熱鍛鍊間隔 2 小時對存活率的提升效果最好，持續無間隔的熱鍛鍊次之，而多次熱鍛鍊間隔 1 天則幾乎無法提升存活率。與相對輕微的熱逆境相比，多次熱鍛鍊間隔 1 天對存活率的提升效果在相對嚴重的熱逆境中幾乎消失，推測有間隔的多次熱鍛鍊與持續無間隔的熱鍛鍊可能會激發不同的路徑來產生熱休克蛋白，因而造成在不同熱逆境下的存活率差異。

（二）對長期後天耐熱性(LAT)的影響

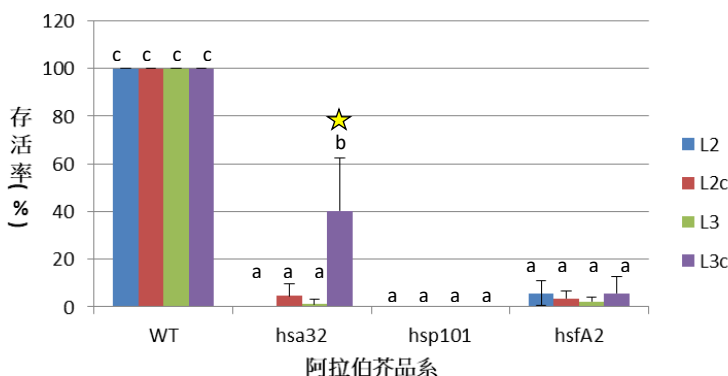
L2 處理：2 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 2 小時；L3 處理：3 次 37°C 1 小時熱鍛鍊間隔 2 小時



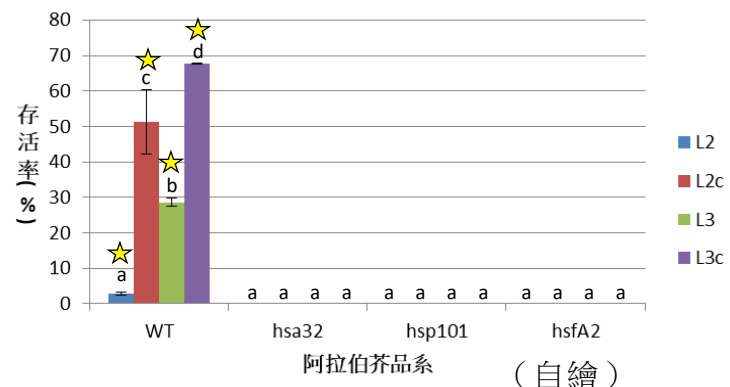
L2c 處理：37°C 熱鍛鍊持續 2 小時；L3c 處理：37°C 熱鍛鍊持續 3 小時



圖十九 熱鍛鍊間隔對LAT(鍛鍊後2d)存活率的影響



圖二十 熱鍛鍊間隔對LAT(鍛鍊後3d)存活率的影響



(自繪)

因圖十九 WT 的存活率幾乎 100%，無法得知熱鍛鍊間隔的影響，僅可從 *hsa32* 在持續無間隔的熱鍛鍊 3 小時後 2 天的 LAT 存活率從趨近於 0 提升至 40% 左右，推測在 *HSA32* 基因缺失導致 HSP101 減少的情況下，持續無間隔的熱鍛鍊 3 小時可能激發與 *HSA32* 不同的路徑來產生熱休克蛋白，使 LAT 的存活率提高。

在圖二十中，將熱鍛鍊後進行極端高溫處理的間隔時間延長至 3 天，三種突變型皆無法存活，僅部分 WT 可存活下來。WT 在 2 次熱鍛鍊間隔 2 小時的存活率趨近 0，在 3 次熱鍛鍊間隔 2 小時的存活率提升至 29%，而在持續無間隔熱鍛鍊 2 小時可提高存活率至 51%，持續無間隔熱鍛鍊 3 小時則提升至 68%，可見持續無間隔的熱鍛鍊相較多次間隔 2 小時的熱鍛鍊對 LAT 存活率的提升有更好的效果。

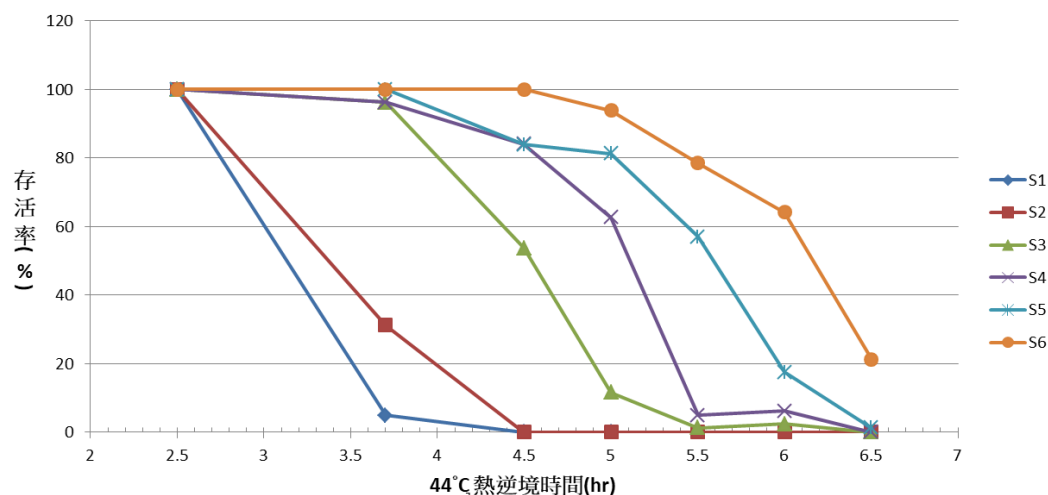
綜合上述，多次熱鍛鍊的間隔除了在輕微、嚴重熱逆境的影響不同，對 SAT、LAT 的影響也不同，亦支持多次有適當間隔與持續無間隔的熱鍛鍊可能會影響不同路徑而產生不同的耐熱效應，除了對抗逆境的效力不同，衰減的時間也有所不同，而在 SAT、LAT 表現不同的耐熱性。

四、鍛鍊方式提升熱適應能力的建模

（一）增加間歇熱鍛鍊次數可累加 SAT 耐熱性的建模

處理：S1 為熱鍛鍊 1 次，S2 為 2 次，依此類推至 S6 為 6 次，並將 SAT 的 44°C 熱逆境時間由最初的 150 分(2.5 小時)、220 分(3.7 小時)逐次增加 0.5 小時至 6.5 小時為止。

圖二十一 熱鍛鍊次數對 SAT 耐熱性的累加效果

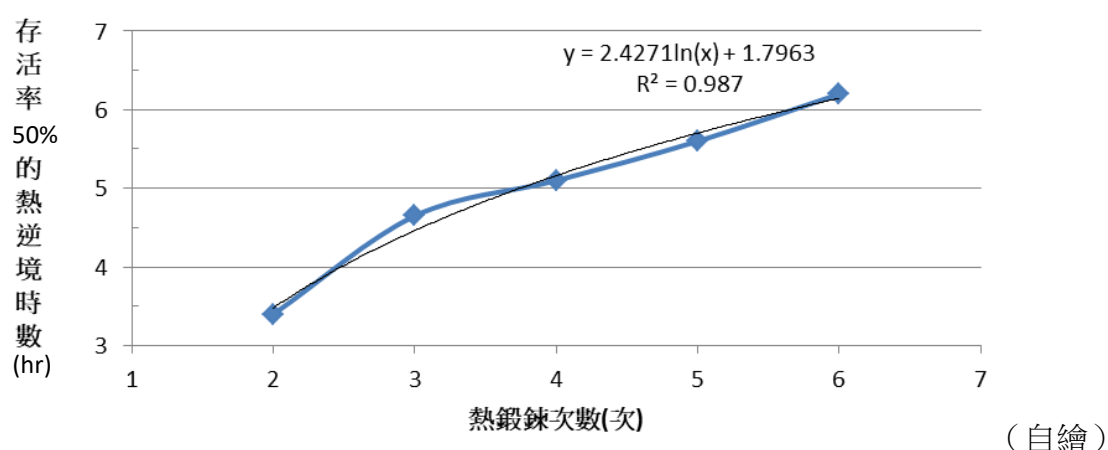


(自繪)

在圖二十一中，在 3.7 小時的 44°C 熱逆境下，S1、S2 的存活率急遽下降，而 S3~S6 的存活率趨近 100%，隨著熱逆境時數增加，S3~S6 的存活率逐漸遞減，存活曲線大致呈現逆向 S 型曲線。顯示熱鍛鍊次數對 SAT 耐熱性的提升具有累加效果，熱鍛鍊次數愈多，能忍受 44°C 熱逆境的時間愈久，存活率愈高。

分別由圖二十一找出 S1~S6 曲線中存活率為 50% 時的熱逆境時數，由於 S1、S2 兩條曲線很接近，故只取 S2~S6 在存活率 50% 的熱逆境時數對熱鍛鍊次數作圖，如圖二十二所示，再加上趨勢線與迴歸分析的公式與 R 平方，R 平方可作為衡量一個統計模型與觀測數據符合程度的指標。

圖二十二 存活率50%的熱逆境時數與熱鍛鍊次數之關係

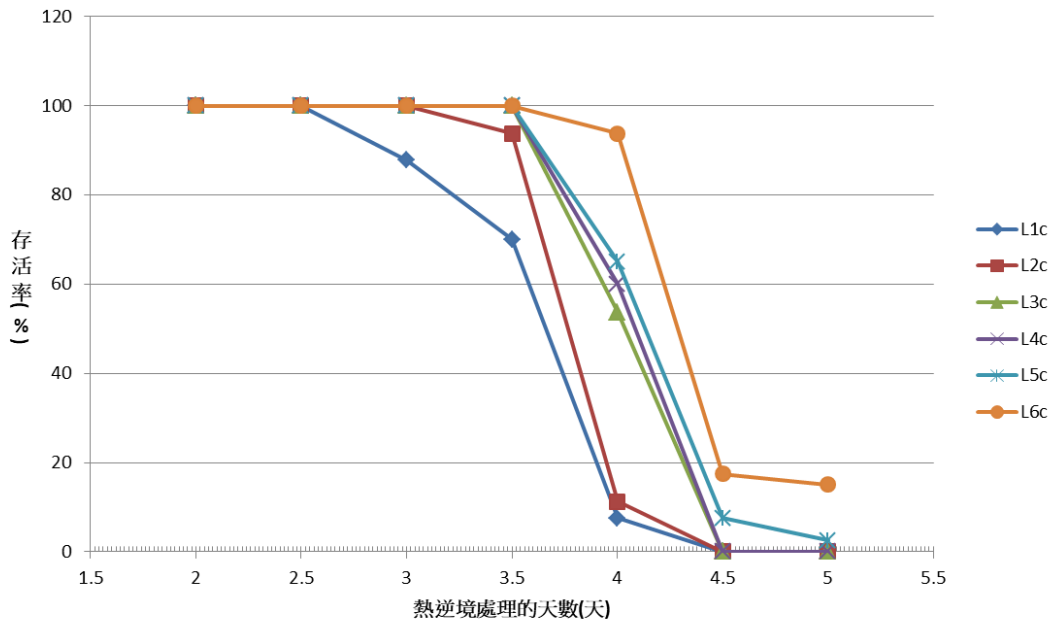


由公式可知 y 隨 x 的自然對數呈線性增長，亦即 y 隨著 x 增加而增加，但由於對數函數的特性，這種增長的速率會逐漸變慢。也就是說存活率 50% 的熱逆境時數會隨熱鍛鍊次數增加而增加，但存活率 50% 的熱逆境時數的提升趨勢會隨熱鍛鍊次數增加而逐漸趨緩，亦即熱鍛鍊次數對 SAT 耐熱性具有累加的效果，但累加效果逐漸遞減，可利用此公式評估熱鍛鍊次數對 SAT 耐熱性的提升效果。

(二) 增加持續熱鍛鍊時數可延長 LAT 耐熱性的建模

處理：L1c 為持續熱鍛鍊 1 小時，L2c 為 2 小時，依此類推至 L6c 為 6 小時，並將 LAT 的 44°C 熱逆境處理時間由最初的 2 天，逐次增加 0.5 天至 5 天為止。

圖二十三 持續熱鍛鍊時數對LAT耐熱性的影響

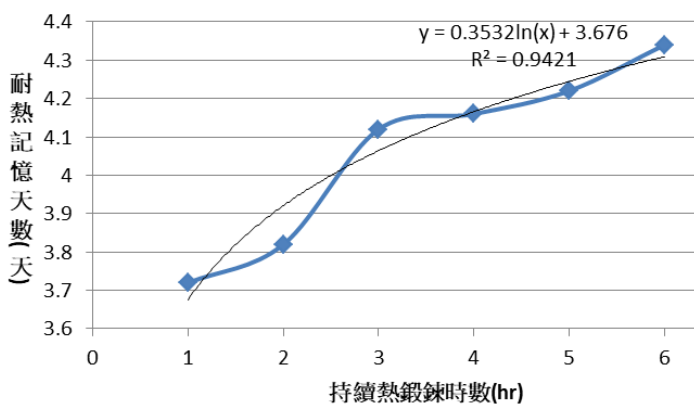


(自繪)

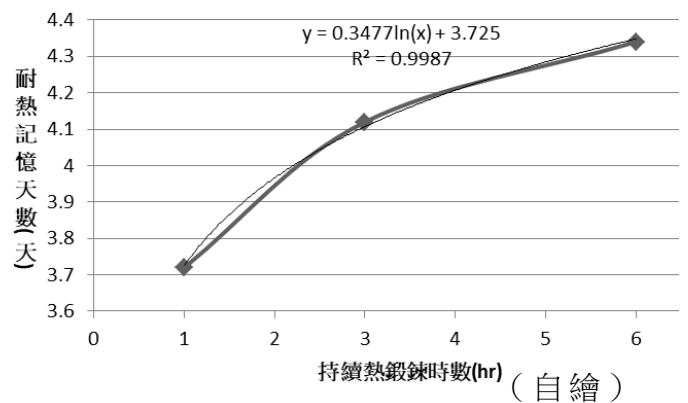
在圖二十三中，熱鍛鍊時數由 1 小時(L1c)至 6 小時(L6c)逐次增加，各組在熱逆境下的存活率下降時間逐漸延後，特別是 L6c，即便在熱鍛鍊後 4.5 天才進行熱逆境處理，仍維持顯著的存活率。顯示熱鍛鍊時數可有效延長 LAT 的耐熱記憶天數，且其效果與訓練時數呈正相關。

分別由圖二十三找出 L1c~L6c 曲線中存活率為 50%時的熱逆境處理天數，以此代表 L1c~L6c 之耐熱記憶的天數。將耐熱記憶的天數對持續熱鍛鍊時數(L1c~L6c)作圖，如圖二十四所示，由於 L1、L2 的曲線較相近，L3、L4、L5 也很接近，僅取 L1c、L3c、L6c 作圖，如圖二十五所示，再加上趨勢線與迴歸分析的公式與 R 平方。

圖二十四 持續熱鍛鍊時數與存活率50%時的耐熱記憶天數之關係



圖二十五 持續熱鍛鍊時數與存活率50%時的耐熱記憶天數之關係



(自繪)

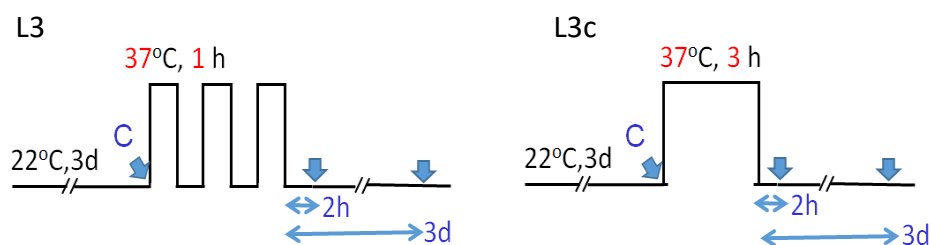
在圖二十四、二十五中，持續熱鍛鍊時間與 LAT 耐熱記憶天數之間皆呈現對數正相

關，亦即隨著持續熱鍛鍊的時數增加，LAT 的耐熱記憶天數就愈長，但延長效果會隨熱鍛鍊時數增加而遞減，圖中的公式可用以評估持續熱鍛鍊時數對 LAT 耐熱記憶延長的效果。圖二十五中單取 L1c、L3c、L6c 做圖進行迴歸分析可獲得趨近 1 的 R 平方值(0.9987)，雖然 3 點本身就容易高估趨勢準確性，但從圖二十三中確實可看到延長持續熱鍛鍊時數產生的耐熱性增益效果並非隨次數逐漸累加，而是呈現跳躍式增加，這也是一個很特別的發現。

五、蛋白質萃取與西方墨點法

(一) 蛋白質萃取

處理：L1~L3 為間隔 2 小時的多次熱鍛鍊；L2c、L3c 為持續熱鍛鍊 2 小時、3 小時，預計收取野生型(WT)阿拉伯芥的樣本時間：熱鍛鍊前：C、熱鍛鍊後 2 小時：2h、熱鍛鍊後 3 天：3d，以 L3、L3c 為例表示如下，藍色箭頭為收集阿拉伯芥幼苗的時間。



測量收集樣本之鮮重、依重量加入蛋白質萃取緩衝液(2 μ l/mg)，使用 Bio-Rad DC Protein Assay 測量萃取液的蛋白質濃度，計算取 50 μ g 蛋白質所需的萃取溶液體積，補入適當的水使總體積為 10.4 μ l，相關數據如表一，製備完成後即可進行電泳。

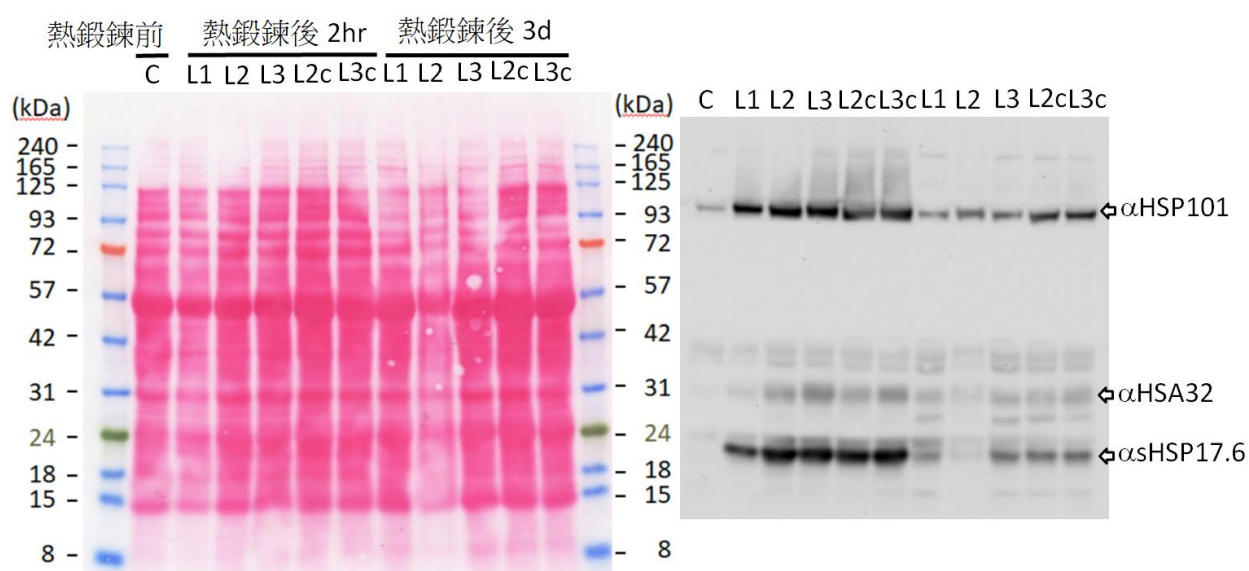
表一 製作電泳蛋白質樣本的相關數據

No.	樣本	幼苗鮮重 (mg)	緩衝液 (μ l)	蛋白質濃度 (μ g/ μ l)	50mg 蛋白質 取樣體積(μ l)	補 H ₂ O 體積(μ l)	總體積 (μ l)
1	C	25.5	50	11.59	4.3	6.1	10.4
2	2hr-L1	33.6	65	19.93	2.5	7.9	10.4

3	2hr-L2	30.7	60	10.93	4.6	5.8	10.4
4	2hr-L3	35.1	70	8.74	5.7	4.7	10.4
5	2hr-L4	25	50	8.65	5.8	4.6	10.4
6	2hr-L5	25.6	50	10.42	4.8	5.6	10.4
7	3d-L1	50.6	100	9.02	5.5	4.9	10.4
8	3d-L2	40	80	8.51	5.9	4.5	10.4
9	3d-L3	46.8	100	9.39	5.3	5.1	10.4
10	3d-L4	43.1	85	6.64	7.5	2.9	10.4
11	3d-L5	34.5	70	7.95	6.3	4.1	10.4

(二) 西方墨點法

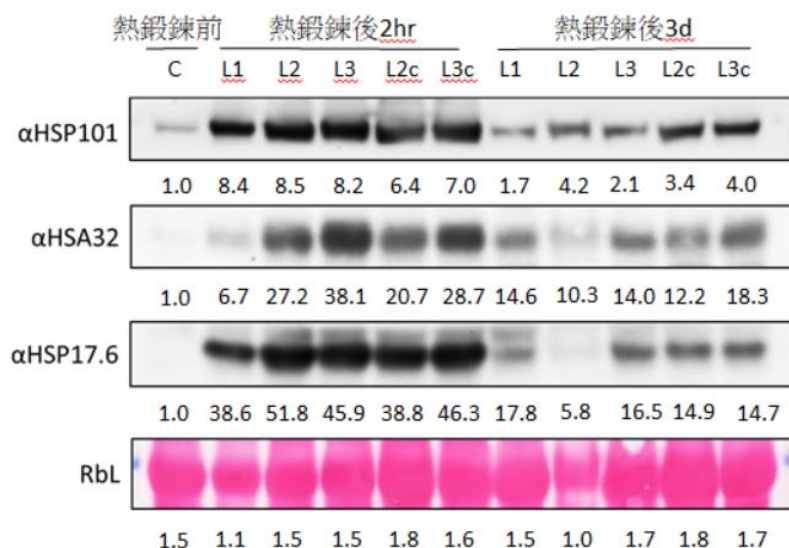
使用 NuPAGE® electrophoresis system 進行蛋白質樣本的電泳、轉印與後續西方墨點的抗體標定，圖二十六左側為轉印膜進行 Ponceau S staining 後的照片，右側為抗體標定後冷光成像的照片。兩張照片進行比對找出 HSP101、HSA32 與 sHSP17.6 的位置。



圖二十六 轉印膜 Ponceau S staining 的照片與抗體標定後冷光成像的照片比對(自繪)

使用 Image J 軟體進行影像處理與分析，計算每種蛋白質的相對表現量。RbL 為 RuBisCO 的大次單元，在植物體內會大量表現且表現量大致固定，故每一條電泳帶的蛋

白質皆除以同一條電泳帶中的 RbL 表現量來標準化數據，標準化後再計算個別蛋白質的相對表現量，將同一蛋白質不同樣本中此種蛋白質最少的表現量視為 1，再求取其他樣本中相對於最少表現量的倍數。結果如圖二十七。



圖二十七 不同熱鍛鍊處理的蛋白質相對表現量之變化（自繪）

由於 3d-L2 的樣本在電泳 loading 時不小心漏出，故此部分數據誤差較大。在熱鍛鍊前的 C，HSP101、HSA32 及 sHSP17.6 表現量皆最少，在熱鍛鍊後 2hr，3 種耐熱蛋白的表現量皆激增，在熱鍛鍊後 3d，表現量呈現下降的趨勢。

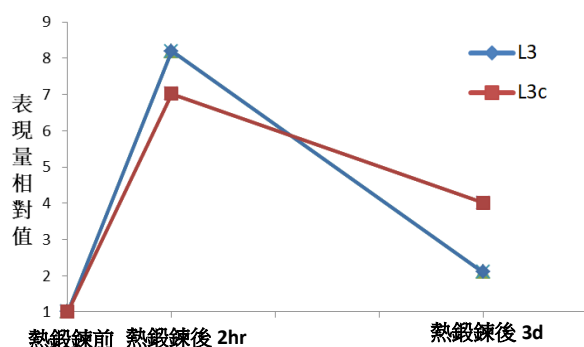
HSP101 中在熱鍛鍊後 2hr，L1~L3 的變化量不明顯，無法對應 SAT 存活率的變化，且 L2c、L3c 的表現量較 L2、L3 少；但在熱鍛鍊後 3d，L3c 的表現量反而較 L3 多，其趨勢變化如圖二十八，可對應多次間歇與持續熱鍛鍊在 SAT 與 LAT 的存活率變化。

HSA32 中在熱鍛鍊後 2hr，L1~L3 的表現量隨熱鍛鍊次數增加而增加，可對應 SAT 存活率的變化，且 L2c、L3c 的表現量較 L2、L3 少；但在熱鍛鍊後 3d，L3c 的表現量反而較 L3 多，其趨勢變化如圖二十九，可對應多次間歇與持續熱鍛鍊在 SAT 與 LAT 的存活率變化。

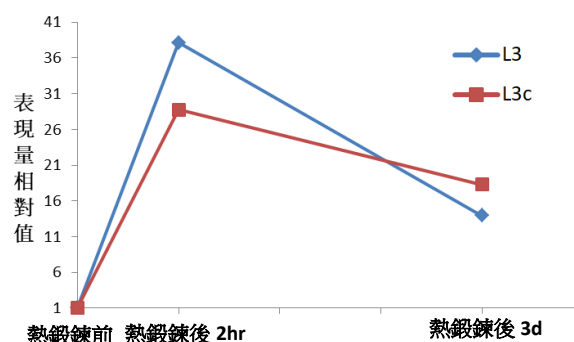
sHSP17.6 中在熱鍛鍊後 2hr，L1~L3 的表現量有隨熱鍛鍊次數增加而增加的趨勢，可對應 SAT 存活率的變化，且 L2c 的表現量較 L2 少，但 L3c、L3 的表現量差不多；在熱鍛鍊後 3d，L3c 的表現量反而較 L3 少，其趨勢變化如圖三十，無法對應多次間歇與持續熱

鍛鍊在 SAT 與 LAT 的存活率變化。

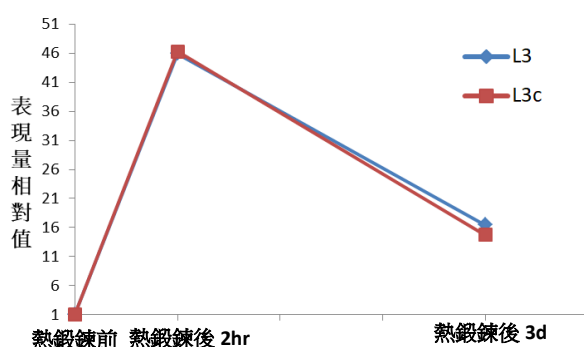
圖二十八 HSP101在熱鍛鍊處理前後的表現量變化



圖二十九 HSA32在熱鍛鍊處理前後的表現量變化



圖三十 sHSP17.6在熱鍛鍊處理前後的表現量變化



(自繪)

伍、討論

一、植物學家加利亞諾的含羞草習慣性適應與豌豆制約學習的實驗，開啟了植物學習行為的研究大門，但其實驗因很難在其他實驗室重現而備受爭議。因為阿拉伯芥的後天耐熱性就如同動物的學習行為，經過熱鍛鍊就能提升耐熱的能力，且阿拉伯芥又是常用的模式植物，相較於豌豆更適合大量繁殖，用來研究植物的學習行為。因此我才會仿照豌豆制約學習的實驗來設計阿拉伯芥熱適應的制約實驗，結果顯示阿拉伯芥在經過連續 3 天每天 3 次 200Hz 聲音與熱鍛鍊聯結的訓練之後不會產生制約學習，為加利亞諾的制約實驗再添加一筆負面結果。

二、初步制約實驗的設計與結果仍不夠全面，是否因訓練強度不夠或中性刺激選擇不當等才導致負面結果，未來可再調整實驗的設計，如增加訓練次數或天數、改變中性刺激的強度或種類等再次進行驗證。學術研究的可再現性是科學研究的重要原則，但是很少人會重複做別人的實驗，因為既不創新又缺乏回報，就算有人想要重複實驗，通常也會因為

原始研究中未詳盡記錄的細節，或無法完全控制的實驗條件，而無法複製相同的結果。所以許多科學實驗的真相往往曖昧不明，我們是否注定無法找到真相嗎？也沒有那麼悲觀，隨著愈來愈多相關研究的累積與交叉驗證，科學的自我修正機制將逐步修正錯誤、澄清疑點，最終引導我們朝向更接近真實的理解。

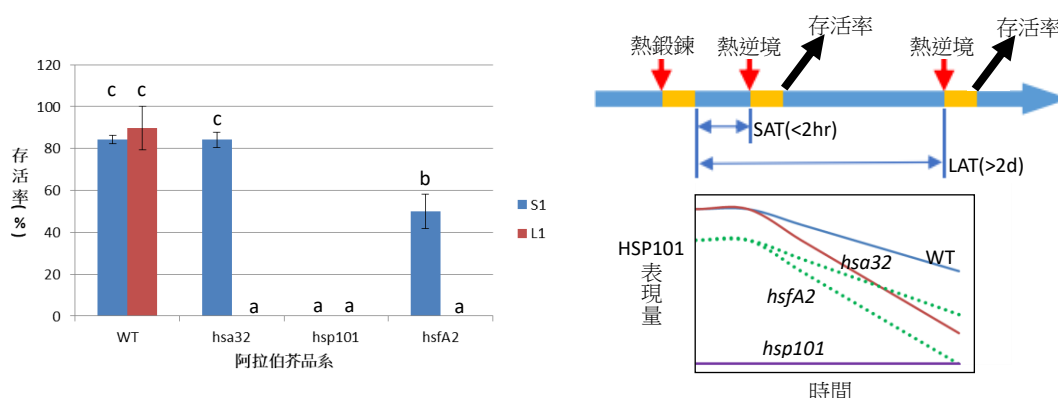
三、短期後天耐熱性(SAT)為熱鍛鍊(37°C 1 小時)後 2 小時內進行熱逆境(44°C 150~220 分)處理；長期後天耐熱性(LAT)則為熱鍛鍊後 2~3 天進行熱逆境(44°C 50 分)處理。在熱鍛鍊後，SAT 可協助阿拉伯芥對抗較立即且時間更長的極端高溫(44°C)；而 LAT 則是幫助對抗更久以後的極端高溫但持續時間就不能太長。阿拉伯芥若沒有歷經熱鍛鍊就無法在極端高溫的處理中存活，所以熱鍛鍊就如同動物的學習，在學習後留存記憶用以提高之後適應環境的能力。在熱鍛鍊後可激發阿拉伯芥若干基因的表現，如 HSP101、HSA32 和 HSFA2 等，這些與耐熱性相關的基因表現可提高阿拉伯芥的耐熱能力。其中 HSP101 為熱休克蛋白，可協助蛋白質的正常摺疊，其存續與否與後天耐熱性的維持有直接相關，而 HSA32 與 HSFA2 可影響 HSP101 的表現量。HSFA2 為轉錄因子可影響許多耐熱基因的表現，包括影響 HSA32 與 HSP101 的表現量；而 HSA32 與 HSP101 之間則具有正回饋控制的機制，HSA32 的存在可延緩 HSP101 的衰減程度，使耐熱能力延續較長的時間。根據野生型(WT)與三種突變型(*hsa32*、*hsp101*、*hsfA2*)在 1 次熱鍛鍊後 SAT 與 LAT 的存活率表現，推測四種阿拉伯芥品系的 HSP101 表現量如圖二十五所示：

WT 的 HSP101 在熱鍛鍊後開始表現並維持一定量，2 小時後開始衰減，在 SAT (44°C 150 分)、LAT (鍛鍊後 2 天，44°C 50 分) 都能維持趨近 100%的存活率。

hsa32 的 HSP101 也在熱鍛鍊後開始表現，但在 2 小時後因無 HSA32 的正回饋調控使得 HSP101 衰減的速率超過 WT，故 *hsa32* 能與 WT 一樣在 SAT 維持趨近 100%的存活率，但無法在 LAT 存活。

hsfA2 的 HSP101 因有其它基因(如 *HSFA1*)的調控也會在熱鍛鍊後開始表現，但因無 HSFA2 促進許多耐熱基因的表現，使得 HSP101 一開始的表現量就減少，讓 *hsfA2* 在 SAT 的存活率減低至 50%左右，隨後 HSP101 也會逐漸衰減，因 HSFA2 會影響 HSA32 與其他耐熱基因的表現，可推測衰減速率應比 WT 快，但無法確定比 *hsa32* 快或慢，故以兩條虛線表示，因 HSP101 衰減速率較 WT 快，使得 *hsfA2* 在 LAT 中也無法存活。

hsp101 則因完全無法表現 HSP101，在 SAT 與 LAT 中都無法存活。



圖三十一 SAT 與 LAT 處理的存活率與不同阿拉伯芥品系的 HSP101 表現量之對應（自繪）

四、增加熱鍛鍊次數對 SAT 的熱適應具有累加性，次數愈多，熱休克蛋白的生成量愈多，熱適應的能力愈好，存活率愈高；但增加熱鍛鍊次數只能提升 WT 在 LAT 的存活率，幾乎無法提升其他 3 種突變型的存活率，顯示增加熱鍛鍊次數對 LAT 的熱適應也具有累加性，但不若 SAT 明顯，熱休克蛋白的生成量雖可因熱鍛鍊次數的累加效應而增加，但也會隨時間衰減，在 2~3 天後已衰減很大程度，對 LAT 的存活率提升效果不若 SAT 顯著。

五、同樣次數的熱鍛鍊但不同的間隔時間，在不同的熱逆境下對提升 SAT 的存活率效果有不同的影響，在相對輕微的熱逆境下（44°C 150 分），熱鍛鍊間隔 2 小時 = 熱鍛鍊間隔 1 天 > 無間隔持續熱鍛鍊；但在相對嚴重的熱逆境下（44°C 220 分），則為熱鍛鍊間隔 2 小時 > 無間隔持續熱鍛鍊，熱鍛鍊間隔 1 天幾乎無法提升存活率。多次熱鍛鍊間隔 1 天所激發出的熱休克蛋白可協助阿拉伯芥對抗輕微熱逆境，但對嚴重熱逆境卻作用不大，反而是無間隔持續熱鍛鍊所激發出的熱休克蛋白在對抗嚴重熱逆境仍保有部分效力。推測多次間歇熱鍛鍊與無間隔持續熱鍛鍊可透過激發不同路徑產生熱休克蛋白，無間隔持續熱鍛鍊可能激發不同路徑產生更多的 HSP101，或者激發不同路徑產生不同的熱休克蛋白，因不同的 HSP101 表現量或其它的熱休克蛋白而使對抗熱逆境的能力不同，造成在不同熱逆境下的存活率差異。由此可見阿拉伯芥在熱適應過程中具有調節基因表現的多樣性，透過 *HSA32*、*HSFA2* 影響 *HSP101* 表現僅是其中一個重要路徑，還有其它路徑可協助阿拉伯芥在嚴重熱逆境中存活下來。

六、同樣次數的熱鍛鍊但不同的間隔時間，對提升 LAT 存活率的效果而言，為無間隔持續熱

鍛鍊 > 間隔 2 小時，顯示熱鍛鍊間隔在影響 SAT 與 LAT 的差異性。此也支持前一點的推測：多次間歇熱鍛鍊與無間隔持續熱鍛鍊可透過不同的路徑產生熱休克蛋白，因不同路徑的 HSP101 表現量不同或產生不同的熱休克蛋白，除了對抗逆境的效力不同，衰減的時間也有所不同而造成阿拉伯芥在 SAT 與 LAT 的存活率差異。

七、多次間隔 2 小時的熱鍛鍊可有效提升阿拉伯芥在 SAT 的熱適應能力，且耐熱性會隨熱鍛鍊次數增加而累加，進一步增加熱鍛鍊次數，檢測其 SAT 耐熱性的累加效果，利用迴歸分析加以建模，發現熱鍛鍊次數(x)與 SAT 耐熱性(y)呈現對數線性相關，公式為 $y=2.4271*\ln(x)+1.7963$ ；另外在 LAT 的熱適應能力提升則是無間隔持續的熱鍛鍊較為有效，亦進一步增加持續熱鍛鍊時數，測試其 LAT 耐熱記憶可延長多久並加以建模，同樣發現持續熱鍛鍊時數(x)與 LAT 耐熱記憶(y)呈現對數線性相關，公式為 $y=0.3532*\ln(x)+3.676$ (L1~L6) 或 $y=0.3477*\ln(x)+3.725$ 。對數線性相關代表其耐熱能力雖然隨熱鍛鍊次數或持續時間增加而增加，但增加效益會逐漸遞減。可能因為熱鍛鍊所激發的後天耐熱性需要額外合成許多耐熱蛋白，勢必壓擠到其他正常生理活動，基於能量負擔與生理極限，耐熱機制必然不能無限開啟，使得熱鍛鍊次數增加或持續時數增加產生的增益效應逐漸遞減。另外，增加持續熱鍛鍊時數對 LAT 的增益效應並非隨次數累加，而是呈現跳躍式增加，可能代表在持續熱鍛鍊的區間，耐熱機制並非持續被激發，而是在激發後會有一段不反應期或需要一段恢復期然後才可以再次被激發，有待後續實驗加以驗證。最後，由於持續熱鍛鍊時數與 LAT 耐熱記憶的對數線性函數之斜率太小(0.3532 或 0.3477)，代表增加持續熱鍛鍊時數的增益效應較差，過長的持續熱鍛鍊雖然有效但增幅小，因此持續熱鍛鍊的時數不須太長，既能有效提升 LAT 又能避免不必要的能量與時間投入。

八、上述熱鍛鍊的相關實驗有助於我們了解如何透過適當的熱鍛鍊方式來提升阿拉伯芥的耐熱性，若是要因應較為立即且嚴苛的熱逆境可採取多次間歇且短暫的熱鍛鍊，倘若是要因應更久之後的熱逆境則可採取較長時間的持續熱鍛鍊。針對不同的熱逆境可利用建模的公式評估，選擇適當的熱鍛鍊次數、間隔與每次持續的時間來達到最佳的熱適應狀態，未來可因應不同的熱逆境客製化不同的熱鍛鍊方式，來提升植物適應熱逆境的能力。

九、HSP101、HSA32 與 sHSP17.6 三種耐熱蛋白在 SAT、LAT 的作用及功能的比較如表二(Charnget al., 2023)。透過西方墨點法追蹤 HSP101、HSA32 以及 sHSP17.6 在熱鍛鍊前後的動態變

化，來對應阿拉伯芥的存活率變化，發現 sHSP17.6 在熱鍛鍊後 2hr 的表現量會隨著次數增加而增加，而 HSP101 卻不會，HSP101 雖然對 SAT 很重要，但在圖九、圖十中熱鍛鍊次數增加可使部分 *hsp101* 突變株存活下來，代表有其他熱休克蛋白的參與，可能就有 sHSP17.6，由此可推測間歇熱鍛鍊次數增加對 SAT 的增益效果可能和 sHSP17.6 較相關，而與 HSP101 較無關。另外，在熱鍛鍊後 3d，HSP101 和 HSA32 的表現量在多次間歇熱鍛鍊(L3)與持續熱鍛鍊(L3c)的變化趨勢不同（圖二十八、二十九），雖然持續熱鍛鍊在鍛鍊後 2hr 的表現量較少，但在 3d 表現量卻反而比較多，使得 L3c 較 L3 在 LAT 有更高的存活率（圖十九、二十）。顯示不同熱鍛鍊方式會影響 HSP101 和 HSA32 的衰減速率，多次間歇熱鍛鍊雖然可以激發較多的 HSP101 和 HSA32 產生，但其衰減速率較持續熱鍛鍊快，所以在 LAT 的適應上反而不如持續熱鍛鍊好，代表 2 種熱鍛鍊方式可能透過不同的機制來調控 HSP101 和 HSA32 的表現與衰減，未來可再持續研究。而 sHSP17.6 表現量的變化則與 2 種熱鍛鍊方式較無關聯，代表其可能在熱鍛鍊初始階段被激發後就持續衰減。

表二 HSP101、HSA32 與 sHSP17.6 三種耐熱蛋白的比較

耐熱蛋白	SAT 中作用	LAT 中作用	關鍵功能
HSP101	啟動蛋白修復	持續但需穩定	解聚蛋白、恢復蛋白活性
HSA32	無明顯作用	穩定熱適應	穩定 HSP101、熱記憶維持
sHSP17.6	初期保護蛋白	作用不明顯	防止蛋白聚集、膜保護

十、藉由西方墨點法追蹤耐熱蛋白的變化，可提供阿拉伯芥在 SAT 與 LAT 中熱適應能力的分子證據，由於沒有可以檢測 HSFA1 與 HSFA2 的抗體，所以無法看到這 2 種熱鍛鍊方式如何影響此 2 種轉錄因子的表現，此 2 種轉錄因子的功能與角色如表三所示(Charnng et al., 2023)。若想再深入探討多次間歇和持續熱鍛鍊提高熱適應能力的路徑差異，除了進行西方墨點法，亦可針對數種耐熱基因進行 RT-PCR 來分析基因的轉錄量，更全面性可以進行轉錄體學、蛋白質體學分析比較不同熱鍛鍊方式的基因轉錄或蛋白質表現差異，來找出參與間歇或持續熱鍛鍊的特定基因，研究這些路徑的差異性。

表三 HSFA1 與 HSFA2 兩種轉錄因子的比較

轉錄因子	HSFA1	HSFA2
類別	主轉錄因子	次轉錄因子、熱記憶相關因子
誘導時機	熱鍛鍊初期（數分鐘內）	熱鍛鍊後中後期（數小時後）
SAT 中作用	啟動熱應激反應	較次要，受 HSFA1 誘導

LAT 中作用	開始誘導，但本身不維持反應	長期誘導與熱記憶維持
下游調控基因	HSP101、sHSPs、HSFA2、DREB2A 等	HSP101、HSA32、sHSPs、APX2 等
熱記憶功能	無法獨自維持熱記憶	關鍵熱記憶調節者

十一、幾乎所有生物在暴露於熱或其他壓力（如重金屬、氧化壓力）時，會表現出熱休克蛋白，這是一種保守的細胞應激反應，幫助細胞維持蛋白質的穩定性與功能。熱休克蛋白是一個在多數物種中高度保守的系統，這使得它們在不同生物中的功能和結構都顯示出一定程度的相似性(Lindquist et al., 1988)。研究熱休克蛋白系統有助於開發抗熱改良策略，對動植物與未來人類在適應極端的氣候變化或運動員的熱適應訓練上相當受用。

陸、結論

- 一、阿拉伯芥在經過連續 3 天每天 3 次 200Hz 聲音與熱鍛鍊聯結的訓練之後，未產生明確的制約學習。
- 二、熱鍛鍊次數增加可有效提升阿拉伯芥熱適應的能力，對 SAT 的提升效果大於 LAT。
- 三、多次有適當間隔的熱鍛鍊可有效提升阿拉伯芥在 SAT 的熱適應能力，但在 LAT 的熱適應能力提升則是持續的熱鍛鍊較為有效。
- 四、利用數學建模分別評估增加熱鍛鍊次數、持續時數對 SAT、LAT 產生的增益效應，皆呈現對數線性相關，代表耐熱能力雖能遞增但增益效應卻逐漸遞減。未來可針對不同的熱逆境客製化不同的熱鍛鍊方式來達到最佳的熱適應。
- 五、增加熱鍛鍊次數對 SAT 的增益效應可能和 sHSP17.6 有關；而 LAT 的增益效應則和 HSP101、HSA32 的變化趨勢有關，不同熱鍛鍊方式可能透過不同的機制來調控 HSP101 和 HSA32 的表現與衰減。

柒、參考資料

- 林嘉音、葉信宏、葉國楨與常怡雍。(2022)。植物逆境反應的預啟(Priming)與記憶。 *台灣農業化學與食品科學*，60(2)，68-72。
- 常怡雍。(2025)。植物高溫逆境反應與記憶。中央研究院農業生物科技研究中心。取自：

- Bhandawata, A., Jayaswallb, K., Sharmaa, H. & Roya, J. (2020). Sound as a stimulus in associative learning for heat stress in Arabidopsis. *Communicative & integrative biology*, 13(1), 1 – 5.
- Charng, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Hsu, F. C. & Ko, S. S. (2006). Arabidopsis Hsa32, a Novel Heat Shock Protein, Is Essential for Acquired Thermotolerance during Long Recovery after Acclimation. *Plant Physiology*, 140, 1297 – 1305.
- Charng, Y. Y., Hsiang-Chin Liu, Liu, N. Y., Chi, W. T., Wang, C. N., Chang, S. H., Wang, T. T. (2007) A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(1), 251-62.
- Charng, Y. Y., Mitra, S. & Yu, S. J. (2023). Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation. *The Plant Cell*, 35, 187 – 200.
- Gagliano, M., Renton, M., Depczynski, M. & Mancuso S. (2014). Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia*, 175(1), 63-72.
- Gagliano, M., Vyazovskiy, V. V., Borbély, A. A., Grimonprez, M. & Depczynski, M. (2016). Learning by Association in Plants. *Scientific Reports*, 6:38427.
- Hu, C., Lin, S. Y., Chi, W. T. & Charng, Y. Y. (2012). Recent Gene Duplication and Subfunctionalization. Produced a Mitochondrial GrpE, the Nucleotide Exchange Factor of the Hsp70 Complex, Specialized in Thermotolerance to Chronic Heat Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158, 747 – 758.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, 631 – 677.
- Markel K., (2020). Lack of evidence for associative learning in pea plants. *eLife*, Jun 23, 1-11.
- Rodrigo-Moreno, A., Bazihizina, N., Azzarello, E., Masi, E., Tran, D., Bouteau, F., Baluska, F. & Mancuso, S. (2017) Root phonotropism: Early signalling events following sound perception in Arabidopsis roots. *Plant Science*, 264, 9-15.
- Ghosh R., Mishra R. C., Choi B., Kwon Y. S., Bae D. W., Park S. C., Jeong M. J., Bae H. (2016) Exposure to Sound Vibrations Lead to Transcriptomic, Proteomic and Hormonal Changes in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 6:37484.

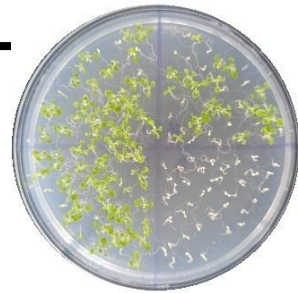
- Tiwari, L. D., Khungar, L., Grover, Anil. (2020) AtHsc70-1 negatively regulates the basal heat tolerance in *Arabidopsis thaliana* through affecting the activity of HsfAs and Hsp101. *The Plant Journal*, 103, 2069 – 2083.
- Wu, T. Y., Juan, Y. T., Hsu, Y. H., Wu, S. H., Liao, H. T., Fung, R. W. M. & Charng, Y. Y. (2013). Interplay between Heat Shock Proteins HSP101 and HSA32 Prolongs Heat Acclimation Memory Posttranscriptionally in *Arabidopsis*1. *Plant Physiology*, 161, 2075 – 2084.

【評語】 052102

1. 本研究以模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 為研究對象，系統探討不同熱鍛鍊方式與制約學習對其短期後天耐熱性(SAT)與長期後天耐熱性(LAT)的影響。研究發現多項結果，如多次間歇熱鍛鍊對 SAT 有累加效果，而 LAT 的提升則是持續熱鍛鍊較有效，此外在分子機制上，SAT 的增益效應可能與 sHSP17.6 有關，LAT 則與 HSP101 及 HSA32 有關。
2. 本研究進行多項實驗，所得結果推論合理。建議除在 HSP 表現的分子層級外，可對植物生長表型影響等變化進行觀察記錄，以能更全面理解熱適應。
3. 先前研究已報導阿拉伯芥熱適應的能力會受熱鍛鍊誘導，及其相關基因的重要性；此研究進一步觀察熱鍛鍊次數及間隔會增加熱適應的能力，此研究成果創新度尚有進步的空間。
4. 數學建模分析預測及評估是一個好的設計及分析方法。惟圖 22/24/25 實驗每個處理只包含一個數據點，且未指出資料集是從幾個獨立實驗收集而來的，如可以從多個獨立實驗收集數據，將會幫助提升模型預測的穩健性。

作品海報

千錘百鍊

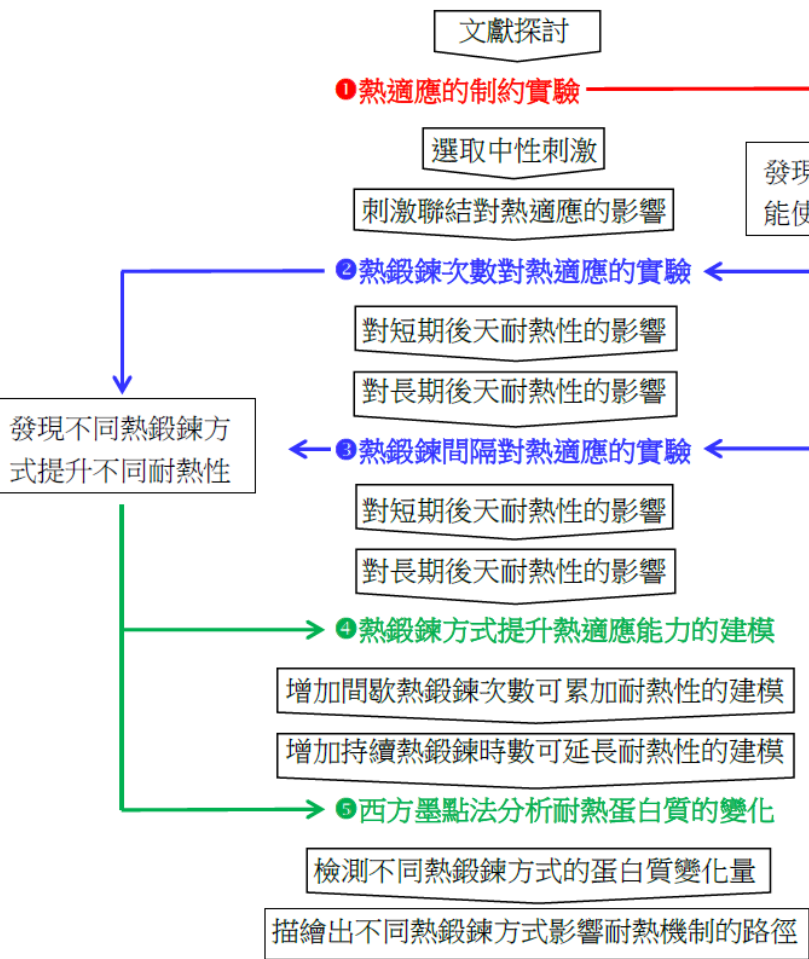


阿拉伯芥熱鍛鍊次數之研究

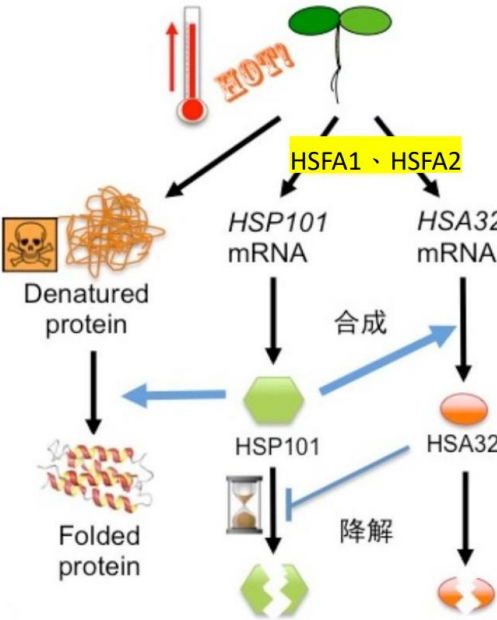
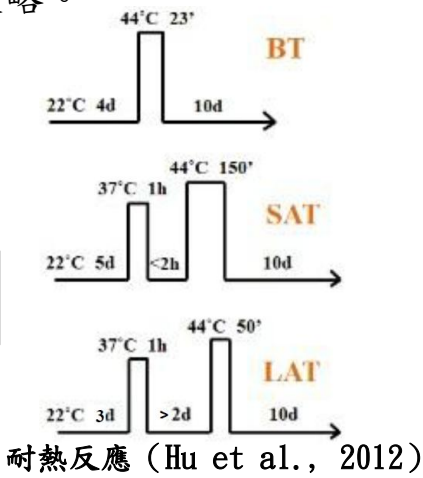
摘要

全球暖化對生物構成重大威脅，生物熱適應成為關鍵課題。本研究探討阿拉伯芥的制約學習及不同熱鍛鍊方式對短期後天耐熱性(SAT)與長期後天耐熱性(LAT)的影響。結果發現阿拉伯芥在經過 200Hz 聲音與熱鍛鍊聯結的訓練後，未顯示制約學習；多次間歇熱鍛鍊對 SAT 有顯著的累加效果，而 LAT 的提升則是持續熱鍛鍊較有效；藉由數學建模分析，增加熱鍛鍊次數、持續時數，SAT、LAT 的耐熱能力會遞增但增益效應卻遞減，可依據建模因應不同需求來調整熱適應策略；分子機制上，SAT 的增益效應可能與 sHSP17.6 有關，LAT 則與 HSP101 及 HSA32 有關，顯示不同熱鍛鍊方式可透過不同機制來調控耐熱蛋白的表現與衰減。這些成果深化我們對植物熱適應的理解，還為應對不同熱逆境提供具體精準的策略。

研究過程與目的



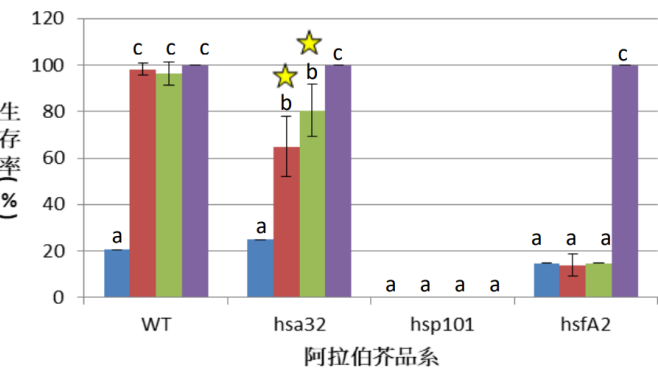
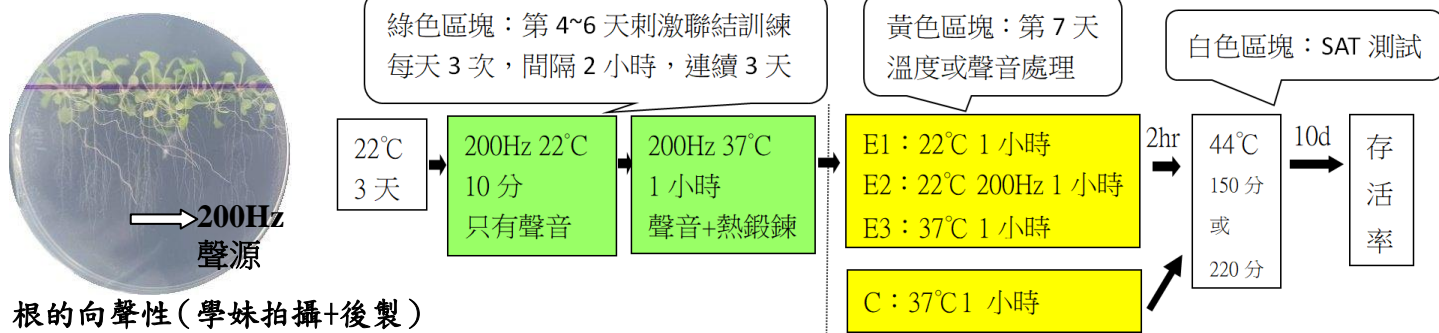
流程圖(自繪)



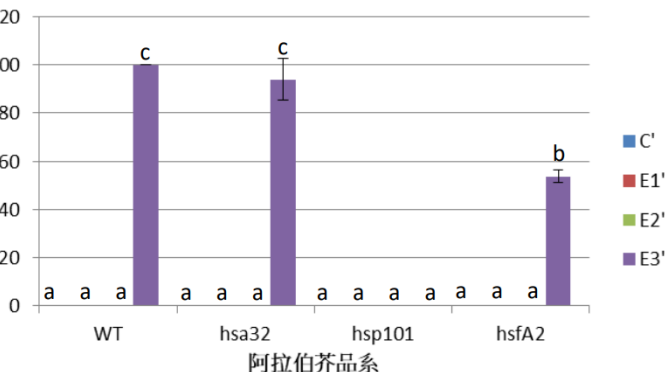
熱鍛鍊效應的路徑 (Wu et al., 2013)

研究結果與討論

一、熱適應的制約實驗：



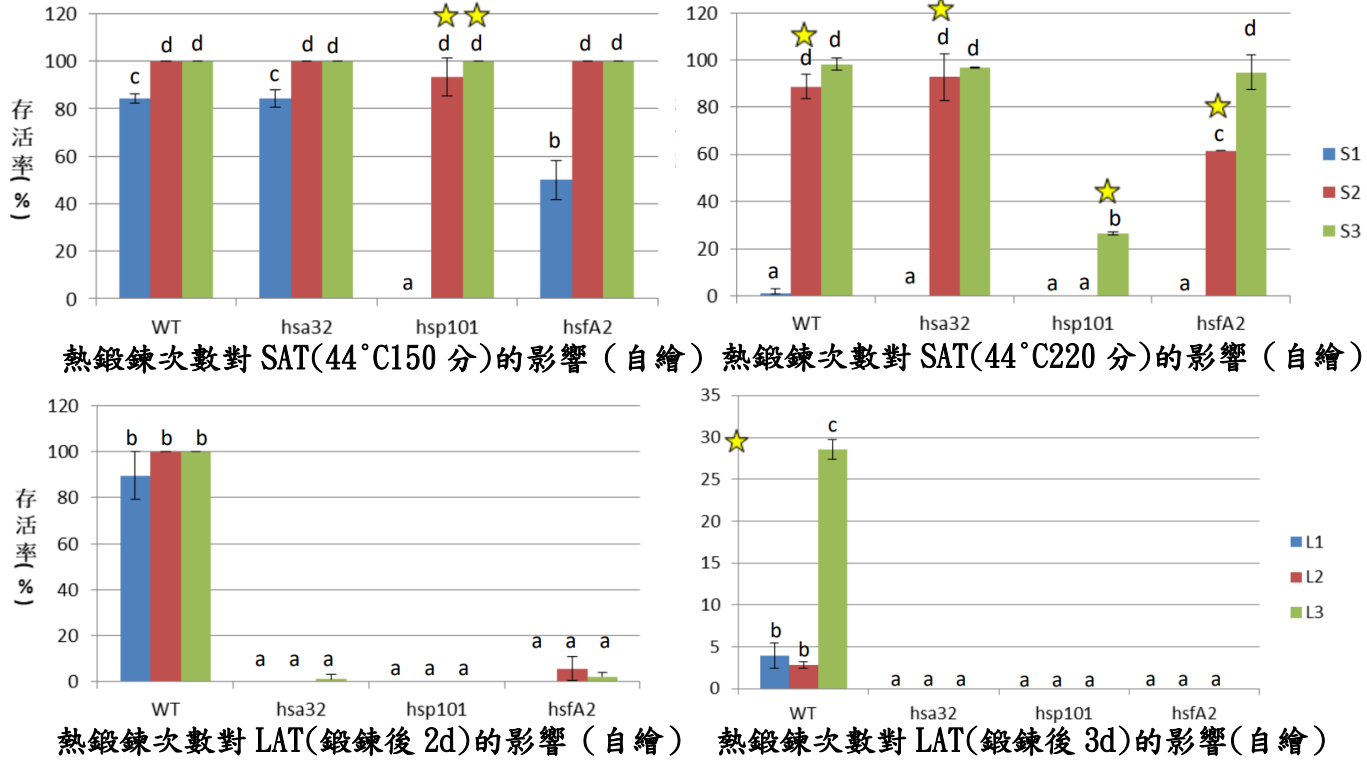
刺激聯結對 SAT(44°C150 分)的影響 (自繪)



刺激聯結對 SAT(44°C220 分)的影響 (自繪)

- E2、E2' 未能如 E3、E3' 的效果，代表阿拉伯芥在刺激聯結訓練後沒有產生制約反應。是否訓練強度不夠或中性刺激不當等導致負面結果，未來可再調整實驗設計進行測試。
- E3 和未經過刺激聯結訓練的對照組 C 比較，確認多次 37°C 的熱鍛鍊會提升耐熱能力，後續針對熱鍛鍊次數造成的耐熱累加作用進行研究。

二、熱鍛鍊次數對熱適應的影響：1 次、2 次、3 次

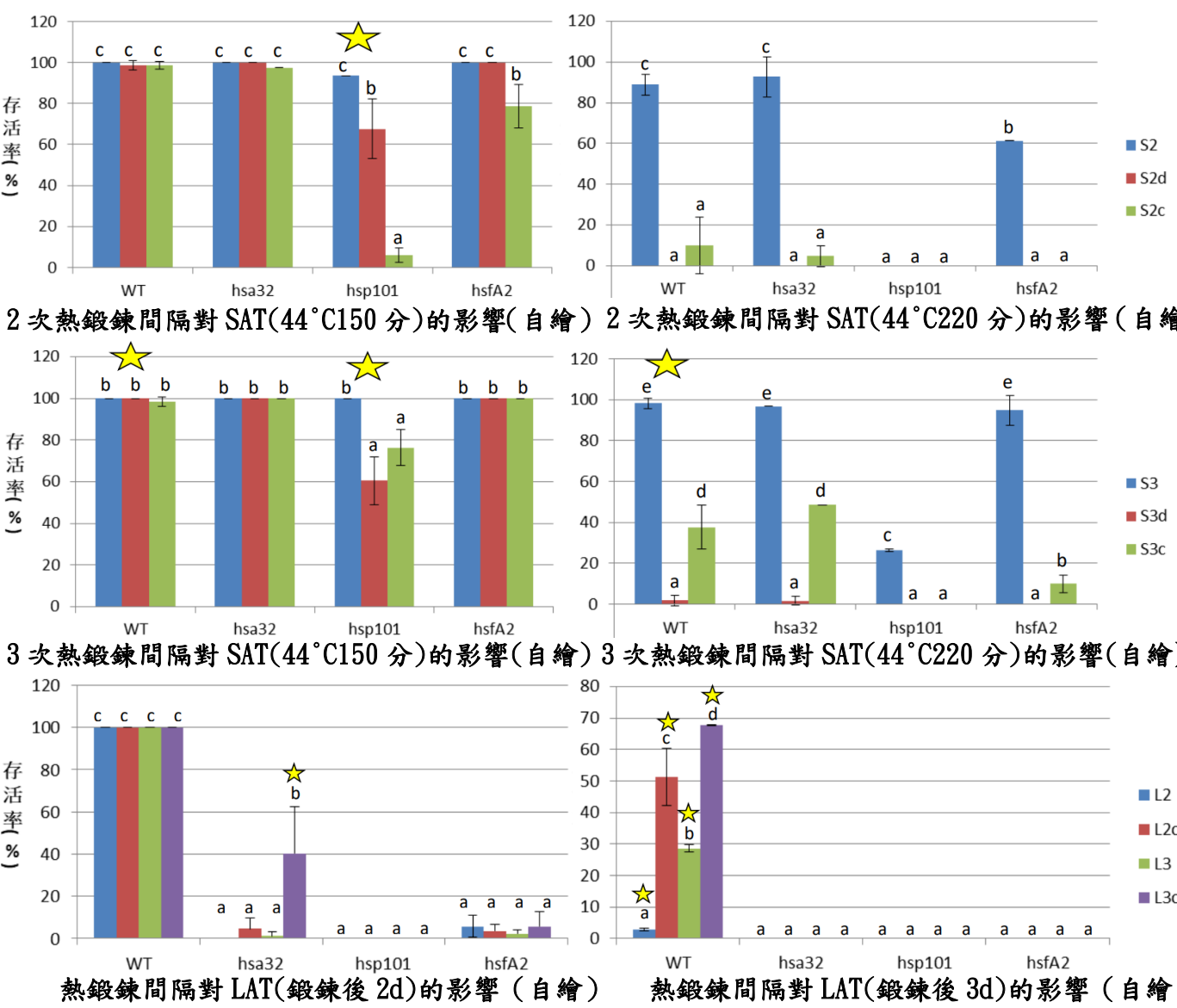


增加熱鍛鍊次數可提升 SAT、LAT 的存活率，且對 SAT 的提升大於 LAT。

在 SAT，WT 與 hsa32 的表現相似；在 LAT，HSA32、HSP101、HSFA2 扮演重要角色。

Hsp101 增加熱鍛鍊次數可能激發其他非 HSP101 的熱休克蛋白而提升在 SAT 的存活率。

三、熱鍛鍊間隔對熱適應的影響：間隔 2hr、間隔 1d、持續無間隔

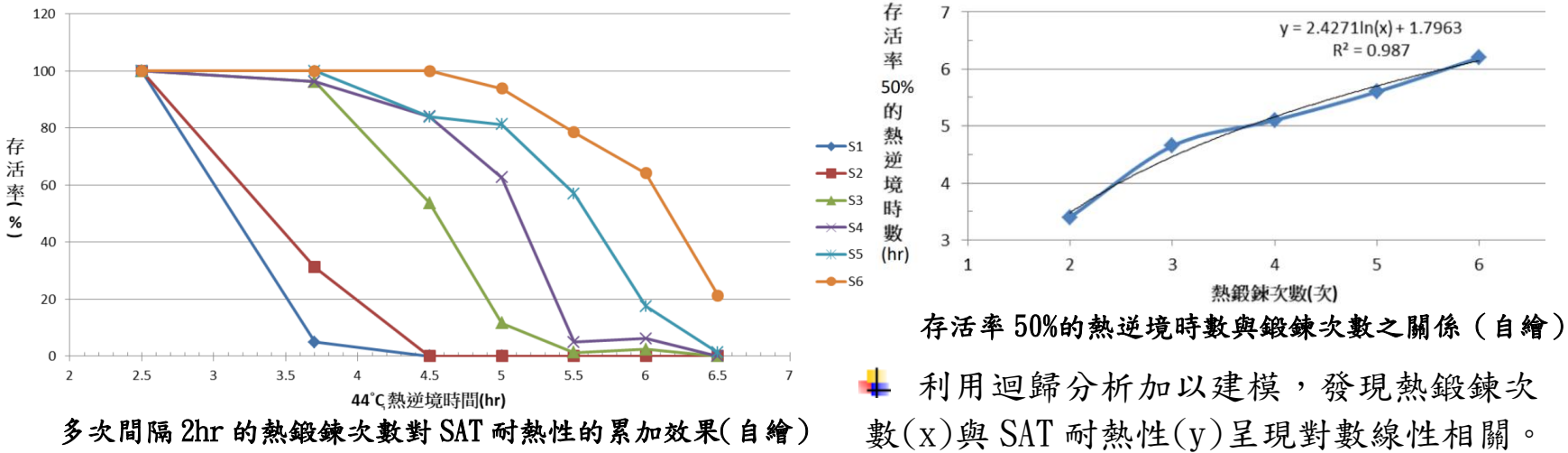


間歇熱鍛鍊與持續熱鍛鍊對耐熱性的影響不同。間隔 2hr 提升 SAT 存活率最佳，持續熱鍛鍊提升 LAT 存活率最佳；且熱鍛鍊次數增加的影響不同，對抗熱逆境的影響也不同。

持續 3hr 的熱鍛鍊對 hsp101 在 SAT 存活率有明顯提升，顯示持續熱鍛鍊激發非 HSP101 的熱休克蛋白不是隨次數增加而累加，可能呈現跳躍式增加。

持續 3hr 的熱鍛鍊可能影響非 HSA32 而提升 LAT 的耐熱性。

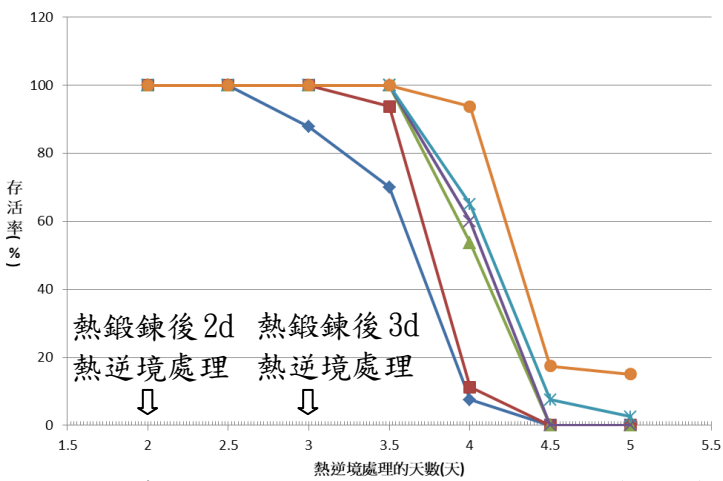
四、熱鍛鍊方式提升熱適應能力的建模：



多次間隔 2hr 的熱鍛鍊可有效提升 SAT 的耐熱性，次數愈多，能忍受熱逆境的時間愈長。

利用迴歸分析加以建模，發現熱鍛鍊次數(x)與 SAT 耐熱性(y)呈現對數線性相關。

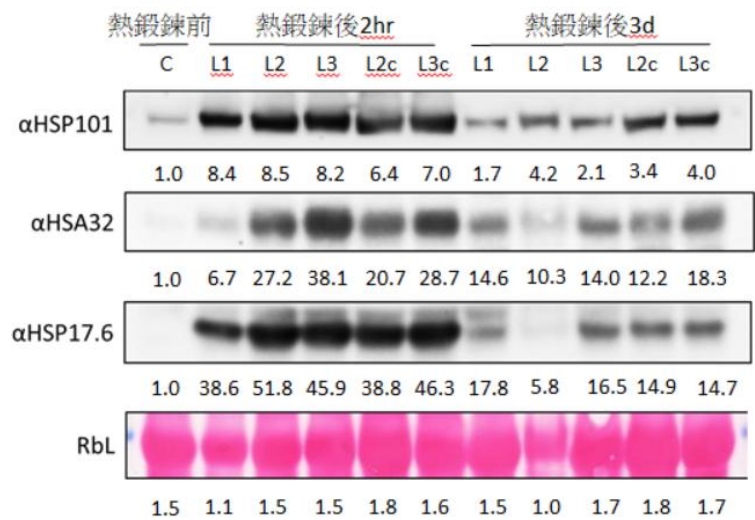
耐熱性雖然隨熱鍛鍊次數增加而增加，但增加效益會逐漸遞減，可能有能量負擔或生理極限。



增加持續熱鍛鍊時數對 LAT 耐熱性的影響(自繪)

- 持續熱鍛鍊時數愈多，延長 LAT 耐熱記憶的天數愈長。
- 建模發現持續熱鍛鍊時數(x)與 LAT 耐熱記憶(y)亦呈現對數線性相關，且耐熱性可能呈現跳躍式增加。
- 建模函數的斜率太小，增加持續熱鍛鍊時數的增益較差，持續熱鍛鍊時數不需太長。

五、西方墨點法分析耐熱蛋白表現量：

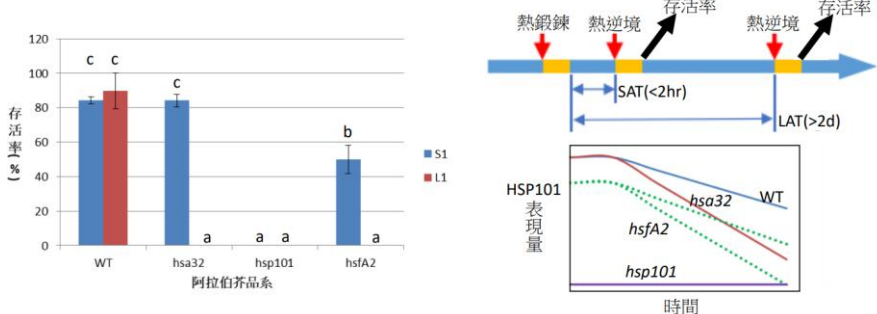


不同熱鍛鍊處理的蛋白質相對表現量之變化(自繪)

- sHSP17.6 在熱鍛鍊後 2hr 的表現量有隨著次數增加的趨勢，而 HSP101 不會，顯示增加間歇熱鍛鍊次數對 SAT 的增益效果可能和 sHSP17.6 較相關；而 HSA32 的變化量可能反應後續 HSP101 的表現量，進而影響 LAT。
- 多次間歇熱鍛鍊可在熱鍛鍊後 2hr 激發較多的 HSP101 和 HSA32 產生，但其衰減速率較持續熱鍛鍊快，所以在 LAT 的適應上反而不如持續熱鍛鍊好，代表 2 種熱鍛鍊方式可能透過不同的機制來調控 HSP101 和 HSA32 的表現與衰減。

結論

一、從 1 次熱鍛鍊後 SAT 與 LAT 的存活率推估 HSP101 表現量如下所示(自繪)：



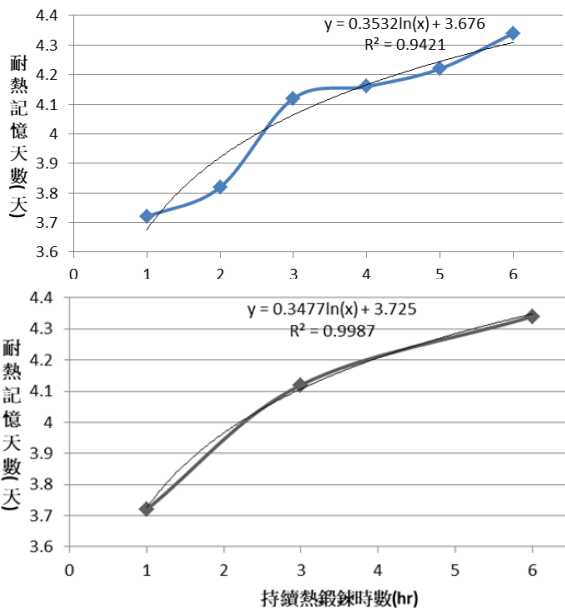
二、阿拉伯芥在經過連續 3 天每天 3 次 200Hz 聲音與熱鍛鍊聯結的訓練之後，未產生明確的制約學習。

三、增加熱鍛鍊次數可有效提升阿拉伯芥熱適應的能力，對 SAT 的提升大於 LAT。

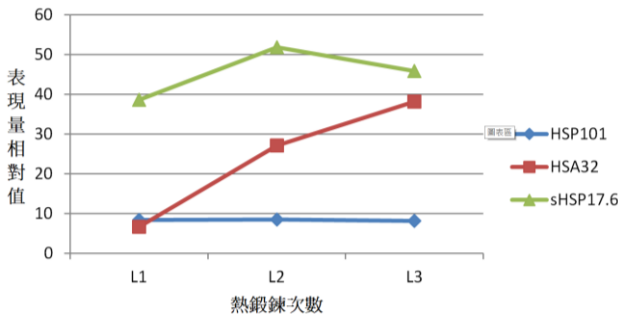
四、多次有適當間隔的熱鍛鍊可有效提升阿拉伯芥在 SAT 的熱適應能力，但在 LAT 的熱適應能力提升則是持續的熱鍛鍊較為有效。

五、利用數學建模分別評估增加熱鍛鍊次數、持續時數對 SAT、LAT 產生的增益效應，皆呈現對數線性相關，代表耐熱能力雖能遞增但增益效應卻逐漸遞減。未來可針對不同的熱逆境客製化不同的熱鍛鍊方式來達到最佳的熱適應。

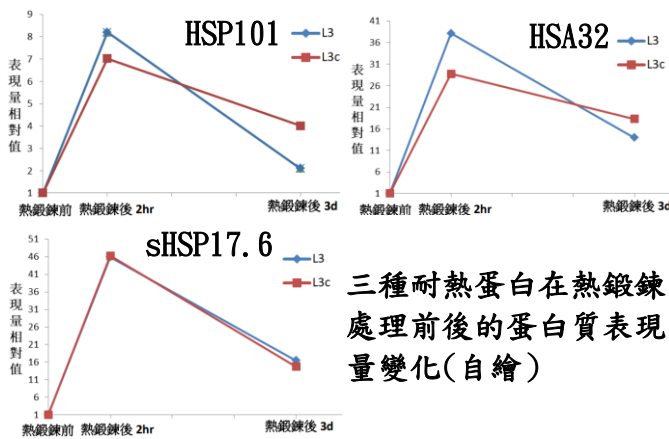
六、增加熱鍛鍊次數對 SAT 的增益效應可能和 sHSP17.6 有關；而 LAT 的增益效應則和 HSP101、HSA32 的變化趨勢有關，不同熱鍛鍊方式可能透過不同的機制來調控 HSP101 和 HSA32 的表現與衰減。



持續熱鍛鍊時數與存活率 50%時的耐熱記憶天數之關係(自繪)



熱鍛鍊後 2hr 的蛋白質表現量(自繪)



三種耐熱蛋白在熱鍛鍊處理前後的蛋白質表現量變化(自繪)