

臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：植物學

作 品 名 稱：水生開花食蟲植物絲葉狸藻捕蟲囊構造及共質體輸送

得 獎 獎 項：第一名
美國團隊正選代表:美國第 57 屆國際科技展覽會

學 校 / 作 者：高雄市立五福國民中學 莊迪喬
 高雄市私立道明高級中學 莊淳喬



莊淳喬

我是莊淳喬，高二生，生長在一個很棒的家庭中，爸、媽、妹妹和我無所不聊，有困難時大家一起腦力激盪互相幫忙。自小對自然科學就有極濃厚的興趣，更幸運的是一直都有機會接觸科學實驗。雖然自覺個性有些剛毅木納，但總能用無比的執著與責任心來完成每一件事，這也是我做科展最大的優勢，且從國中開始年年都得獎。雖然每天在課業及科展中打轉，而誘人的科學研究是我學業生涯中最美好且喜愛的一部份。每件深入探討的研究中，都令我感到自己的渺小，然而宇宙大自然的奧妙實在有太多可以作為研究的題材，期許自己潛能無限！不斷努力！

莊迪喬

我是莊迪喬，個性爽朗天真。感謝父母在家採取所謂“開放明理”的管教方式，從不強迫學習，僅要求禮貌、品德及課業達應有的水準。大概就因在這種無壓力的環境下成長，使我對所有的事物都很有興趣。美籍 Emily Dickinson 和英籍 Robert Frost 的詩是我的消遣，繪畫是我表達情緒的方式，閒來無事就愛翻書，Time、Newsweek、〈Biology〉、〈科學人〉、〈牛頓〉或炙手可熱的原文“魔戒”，甚至連字典都是我愛翻閱的。我也愛彈奏鋼琴吹奏木笛，不過我最感興趣的莫過於科學，自然也是科展的常客，從小就不斷地參與各種科學實驗，經常是卯足全力花盡心血做研究，也皇天不負苦心人得了兩次全國科展第一名及國際科展第二名。參加比賽主要是開眼界，吸取他人的長處，當然最重要的是過程。

Trap Architecture and Symplastic Transport of the Aquatic Flowering Carnivorous Plant *Utricularia gibba*

Abstract

The aquatic carnivorous plant *Utricularia gibba* is very unique. It has not only the ability to undertake photosynthesis just like other plants, but also can trap and obtain the nutrients from the freshwater zooplankton. Its trapping organ is very sophisticated but not complicate. The digestion and absorption process inside the trap are mainly accomplished by the quadrifids structure. According to our knowledge, we are the first to introduce the phloem-mobile, fluorescent probe carboxyfluorescein (CF) and confocal laser scanning microscope (CLSM) to the study of the symplastic transport in the *Utricularia* trap. In addition, we use edible food colorings as tracers for this transport study. Both approaches turn out to be very successful in delineating the symplastic transport of the trap. But CF quenches rapidly so the observation time is restricted. On the contrary, food colorings don't have these disadvantages; it is inexpensive, easy to perform, and the transport process is not fast. As a result, the study is easily to be completed. These methods will be very helpful in the studies of symplastic transport in other plants.

Key words: carboxyfluorescein, symplastic transport, *Utricularia gibba*.

水生開花食蟲植物絲葉狸藻捕蟲囊構造及共質體輸送

摘要

水生食蟲植物絲葉狸藻 (*Utricularia gibba*) 是非常獨特的，它不但跟其他植物一樣能行光合作用，且具備捕蟲囊捕捉水中小生物，補充生長所必需的營養元素。捕蟲囊的構造精密卻不複雜，消化吸收主要靠囊內壁上的四爪腺毛，目前尚未有文獻實際以追蹤物質描述出整個共質體輸送路徑。我們是最先以螢光染劑 (carboxyfluorescein) 及共軛焦雷射掃描顯微鏡 (confocal laser scanning microscope) 成功地描繪出捕蟲囊共質體運輸路徑。同時我們也以對細胞無害的食用色素，進行相同的實驗觀察。發現食用色素不但成本低，且較螢光染劑有更多的優點，如觀察時間較不受限制等，非常適合用來研究捕蟲囊吸收物質的路徑，因此，本實驗的模式可以應用在其他水生植物運輸路徑的研究。

關鍵詞：共質體輸送，螢光染劑，絲葉狸藻

水生開花食蟲植物絲葉狸藻捕蟲囊構造及共質體輸送

前言

在國中的課外教學活動中，我們第一次接觸到狸藻，之後就深深的被它吸引著。在我們的觀念中，植物一直是生物界的生產者，而食蟲植物卻具備著動物的某些行爲，能捕捉其他小生物作為氮、磷、硫、鉀、鈣及鎂的來源 (Adamec, 1997)。

狸藻的捕蟲器官為捕蟲囊，捕蟲囊內充滿著腺毛。這些腺毛的結構及功能一直是生物學家注目的焦點，從早期達爾文的顯微鏡觀察紀錄 (Darwin, 1875) 到最近利用電子顯微鏡的研究，這些腺毛的結構及功能漸漸的為大家所了解。捕蟲囊共有四種腺毛，即囊內四爪腺毛 (quadrifids) 及二爪腺毛 (bifids)，囊入口的表面腺毛 (pavement epithelium glands) 及低矮具有圓頂的囊外表腺毛 (external glands)。腺毛的結構可以分為底層的表皮細胞 (basal epidermal cell)，上面緊接著基座細胞 (pedestal cell)，基座細胞再聯結 2~4 條尾端細胞 (terminal cell) (Finerran, 1985)。基座細胞的側壁不具通透性，且分化為輸送細胞 (transfer cell) (Offler *et al.*, 2003 ; Plachno *et al.*, 2004)，而四爪或二爪腺毛的輸送細胞分化最為明顯。囊內腺毛主要功用如下：(1) 捕蟲囊因捕捉到小生物舒張後，靠著囊內腺毛排出囊內水份，成為二側內凹，再次回復囊內負壓，伺機捕蟲狀態。(2) 溶質的運輸。(3) 捕蟲囊的消化吸收功能。

目前對於捕蟲囊內的消化機制並不是很明瞭，囊內消化酶的作用一直缺乏在活體狀況下 (in situ) 的研究。但已有證據顯示囊內有蛋白質分解酶 (protease) 存在，且可用細胞化學反應法，發現四爪腺毛消化腺體內有酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 及酯酶 (esterase) (Sirova *et al.*, 2003)。有時亦可在囊內發現各式各樣的微生物群落，如細菌、綠藻、原蟲及輪蟲，甚至可以發現到眼蟲在囊內生殖繁衍，因此有學者認為囊內的酶消化反應可能來自於這些微生物群落，且它的重要性大於捕蟲囊的捕蟲行爲 (Richard, 2001)。

物質進入植物內有兩條運輸路徑，共質體 (symplastic pathway)—物質沿著細胞一個接一個進出傳送，及非共質體 (apoplastic pathway)—物質沿著細胞壁傳送，不進入細胞

內。最早在 1980 年有學者以硝酸鑷 (Lanthanum nitrate) 及醋酸鈾 (Uranyl acetate) 為追蹤物質，驗證捕蟲囊內腺毛的非共質體運輸路徑。以電子顯微鏡觀察四爪及二爪腺毛，發現到這些追蹤物質只在細胞壁上，沒有進入細胞原生質內。它們順著細胞壁內緣一直進入到基座細胞壁內，並無法直接由基座細胞的側表面進入，即基座細胞的側表面由一層不具通透性的物質所包圍著。這些物質為過渡金屬或放射性元素，不容易獲得，且更需要使用到電子顯微鏡觀察 (Fineran *et al.*, 1980)。至於狸藻捕蟲囊內腺毛的共質體運輸路徑，目前尚未有文獻實際以追蹤物質描述出整個路徑。

捕蟲植物的共質體運輸路徑，目前研究較多的是豬籠草 (*Nepenthes*) 的捕蟲器官。但只有二篇文獻以螢光染劑 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 來說明豬籠草腺體的共質體路徑 (Owen *et al.*, 1999; Schulze *et al.*, 1999)。CFDA 原是用來探測植物韌皮部的共質體路徑 (symplastic pathway)，它經由細胞與細胞間的細胞質間絲 (plasmodesmata) 流動，而不會進入到非共質體路徑 (apoplastic pathway) (Grignon, 1989)。因此對於植物的裝載或卸載研究 (loading, unloading)，常以 CFDA 作為材料 (Oparka *et al.*, 1994) (Knoblauch *et al.*, 1998)。CFDA 本身並不具螢光，但通透過細胞膜後，在細胞內可被胞內的酯酶 (esterase) 分解為具螢光反應的物質 (carboxyfluorescein)，且只會停留在細胞內，不會再擴散出細胞外。因此藉由螢光物質的分佈及走向，可以探討腺體吸收路徑。但豬籠草的捕蟲器官屬於多層細胞結構，腺體較小且為扁平狀，較不易觀察。狸藻捕蟲囊內的四爪腺毛結構上並不同於豬籠草內的消化吸收腺體，至目前為止，尚未有應用 CFDA 在狸藻的吸收路徑的研究上。

在本實驗中，我們將對狸藻的捕蟲器官—捕蟲囊做完整的觀察，接著首先應用螢光顯微鏡及共軛焦雷射掃描顯微鏡來觀察螢光染劑在捕蟲囊內的吸收，探討囊內四爪腺毛的物質輸送現象。同時我們也嘗試以方便取得，易於觀察，對細胞無害的食用色素，在簡單的實驗器材下進行捕蟲囊吸收物質路徑觀察，並加以分析討論，嘗試描繪出捕蟲囊吸收物質的完整路徑。根據文獻資料顯示，不論是使用螢光染劑或是食用色素，都是首次應用在狸藻捕蟲囊吸收物質路徑的研究。

研究材料及方法

一、材料

本實驗是以台灣的水生開花食蟲植物絲葉狸藻 (*Utricularia gibba*) 作為研究的對象，將田心生態農場 (屏東麟洛鄉) 帶回的絲葉狸藻，培養在室外陽台。培養箱為一不透明塑膠桶，裝滿水約 150 公升，水深維持在 60 公分，使用礦泉水補充水份的蒸散，培養箱內水溫約 25~28°C，pH 值為 6.0±0.1。

二、顯微鏡觀察捕蟲囊

本實驗所使用的顯微鏡包括；解剖顯微鏡 (Motic X40)、複式數位照相顯微鏡 (Alphaphot-2 YS2)、數位相機 (Nikon Coolpix 990)、螢光照相顯微鏡 (Olympus BH2-RFCA)及共軛焦雷射掃描顯微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope, Nikon EZ-C1, Laser type V-LD (408), Ar (488), G-HeNe (543), Y-HeNe (594), R-HeNe (633))。

以顯微鏡觀察各部分的形態及內部構造，比對文獻資料，加以分辨其特徵及功能。並進一步觀察捕蟲囊吸入紅色、藍色食用色素及螢光染劑後，在不同時間的即時變化。

三、捕蟲囊螢光染劑之吸收

將 6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA, $C_{25}H_{10}O_9$, 分子量 460, fluorescent wavelengths λ_{ex} 492 nm; λ_{emm} 517 nm, Sigma) 溶於丙酮中，而後以蒸餾水調配成 1 mM 的溶液。CFDA 可以通透過細胞膜，在細胞內被酯酶 (esterase) 分解為螢光物質 carboxyfluorescein (CF) 而停留在細胞內，不會再擴散出細胞外。由於捕蟲囊內有酯酶，所以同時加入 0.1 mM Eserine ($C_{15}H_{21}N_3O_2$, 分子量 275.35, Sigma) 在 CFDA 溶液中 (Schauze et al., 1999)，它是酯酶的抑制劑，避免 CFDA 尚未擴散入四爪腺毛之前，在囊內被分解成 CF，而無法進入四爪細胞內。

將狸藻株放入內含 1 mM CFDA 及 0.1 mM Eserine 的 20 ml 蒸餾水溶液培養皿中，在解剖顯微鏡下以自製頭髮探針刺激觸發毛，使捕蟲囊開起瓣蓋吸入水溶液。取出狸藻，於清水中清洗，靜置於暗箱內。接著在螢光照相顯微鏡及共軛焦雷射掃描顯微鏡下觀察捕蟲囊內螢光的即時變化。並手工解剖開捕蟲囊，觀察四爪腺毛細胞質內的螢光反應。同樣地，我們亦將狸藻放入 CFDA 的螢光染劑中，但不刺激觸發毛吸入 CFDA，用清水沖洗後，作為對照組放在螢光顯微鏡下加以觀察。

四、捕蟲囊食用色素之吸收

應用在本實驗的食用色素 (Food color) 分別為紅色食用色素 (Amaranth, Food Red 9, $C_{20}H_{11}O_{10}N_2S_3Na_3$, 分子量 604.48, Scott-Bathgate LTD. Canada) 及藍色食用色素 (Brilliant Blue FCF, Food Blue 2, $C_{37}H_{36}N_2O_9S_3Na_2$, 分子量 794, Scott-Bathgate LTD. Canada)，以 1 : 15 的比例調配成 20 ml 的有色蒸餾水溶液放於培養皿中。將狸藻株放入培養皿，在解剖顯微鏡下以自製頭髮探針刺激觸發毛，使捕蟲囊吸入食用色素。取出狸藻，清水中洗掉外表的食用色素，靜置於清水中觀察並記錄。不同時間手工解剖捕蟲囊，放在複式數位照相顯微鏡下觀察四爪腺毛細胞質內的有色物質的變化。

五、捕蟲囊物質吸收與光合作用的關係

我們亦探討光合作用提供的能量與四爪腺毛的物質吸收速率的關係。本實驗以光合作用的有無分為二組。無光合作用的實驗組，以 D2 代表狸藻先放在黑暗下 2 天，D1 代表先放在黑暗下 1 天，D0 表示未先黑暗處理的狸藻。將 D2, D1 及 D0 捕蟲囊吸入色素後，持續保持在黑暗環境下，而後每小時剖開捕蟲囊觀察囊內四爪腺毛。有光照處理的實驗組 (PL-F27W 日光燈下 36 公分)，以 L0 代表未先光照處理的狸藻，L1 代表先光照 1 天後，L2 表示先光照 2 天。將 L0, L1 及 L2 捕蟲囊吸入色素後，持續保持在光照下，而後每小時剖開捕蟲囊觀察囊內四爪腺毛。Multi Gauge 2.0 (Fuji Film) 是用來定量比較各種照片顯色程度的軟體，我們將它應用在四爪腺毛內色素的量化，發現它有很高的可靠性。

研究結果與討論

一、絲葉狸藻各部位型態的觀察

狸藻無根，漂浮於水面。主要為一長莖，前端呈捲曲狀，不停的由前端向前成長 (Fig. 1A)，尾端會慢慢老化掉落。花高出水面，黃色無味，花期約 3 天 (Fig. 1B)。捕蟲囊分佈在莖兩側的細葉上，每一對葉可長出淡綠色的捕蟲囊，外表類似甲蟲，大小約 0.3~1.0 mm (Fig. 1C)，可以捕食水中小生物，且有葉綠體可以行光合作用。捕蟲囊囊口邊緣有一對天線般的細枝，及其他較小的細枝，可能用來吸引水中生物或阻擋雜物流入捕蟲囊。在入口瓣蓋上有細小的觸發毛 (Fig. 1D)。

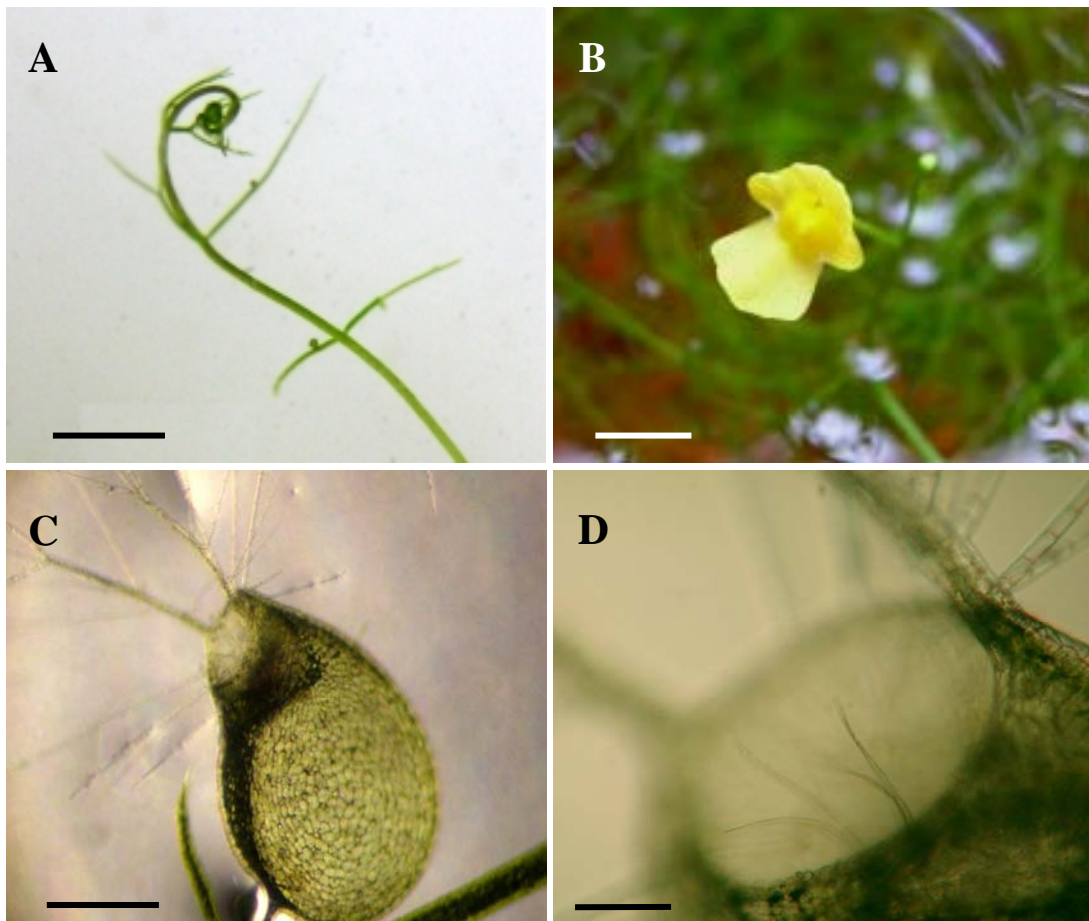


Figure 1. 單株狸藻、花、捕蟲囊及其囊口

(A) 狸藻主要為一長莖，長可達 20 ~ 30 cm，生長前端為捲曲狀，兩側具絲狀小葉。Bar = 0.5 cm。(B) 雙子葉開花植物，花高出水面，黃色無味，花期約 3 天。Bar = 0.3 cm。(C) 每一對葉可長出淡綠色的捕蟲囊，外表類似甲蟲，有葉綠體可以行光合作用。Bar = 0.5 mm。(D) 捕蟲囊囊口緣天線細枝及囊入口的觸發毛。Bar = 0.1 mm。

二、捕蟲囊捕捉水中生物的前後變化

捕蟲囊長期是以兩側內凹狀態等待獵物 (set phase) (Fig. 2A)。當捕蟲囊處於收縮狀態下，小生物碰觸到觸發毛，捕蟲囊的瓣蓋隨即向內打開，吸入小生物 (firing)，捕捉過程在 1/30 秒內瞬間舒張完成 (unpublished data) (Fig. 2B)。30~50 分鐘後四爪腺毛及囊外表腺毛 (external glands) 將囊內的水排出 (re-setting phase)，兩側再度呈內凹狀態 (Fig. 2A)，蓄勢待發，準備再一次的捕蟲任務。我們亦觀察到，即使沒有捕到水中生物也會有自發性舒張。這種自發性舒張解除囊內壓力，不同於其他食蟲植物。

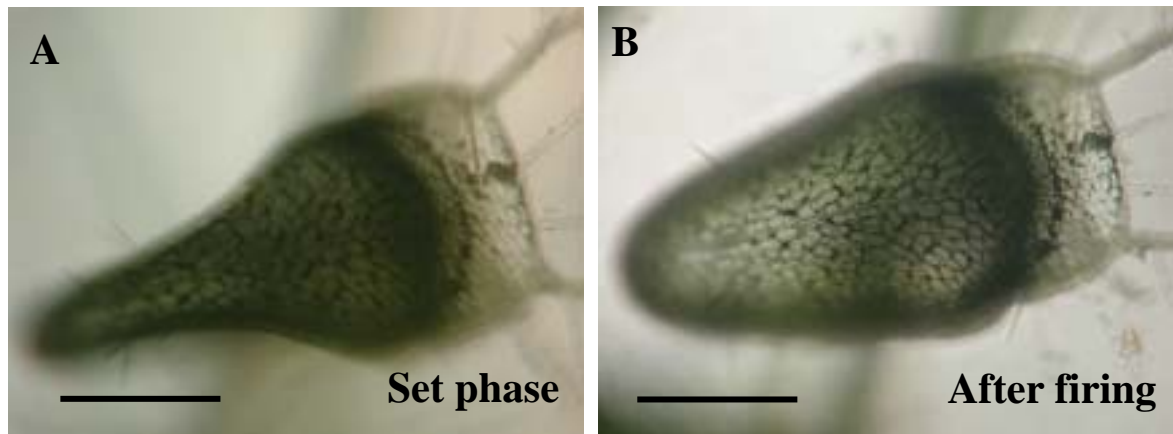


Figure 2. 捕蟲囊捕捉水中生物的前後外型變化

(A) 捕蟲囊長期是以兩側內凹狀態等待獵物 (set phase)，當小生物碰觸到觸發毛，捕蟲囊的瓣蓋向內打開，吸入小生物。(B) 捕捉過程 1/30 秒內瞬間舒張完成 (after firing)。接著四爪腺毛及囊外表腺毛 (external glands) 將囊內的水排出 (re-setting)，30~50 分後兩側再度呈內凹狀態蓄勢待發，準備再一次的捕蟲任務 (set phase)。(A) 及 (B) 圖中 Bar = 0.25 mm。

三、捕蟲囊吸入螢光染劑及紅色、藍色食用色素的外型變化

捕蟲囊均可以人工方式刺激瓣蓋張開而吸入 CFDA 溶液及藍、紅色食用色素。在螢光顯微鏡下，未進行實驗操作的狸藻捕蟲囊全部變為紅色，仔細觀察可以發現這些是捕蟲囊壁葉綠體的自體螢光反應 (autofluorescence) (Fig. 3A)。捕蟲囊吸入 CFDA 後，在數分鐘之內即可以看到捕蟲囊內四爪腺毛充滿螢光 (Fig. 3B)。在共軛焦雷射掃描顯微鏡下的四爪腺毛螢光反應特別明顯 (Fig. 3C)。捕蟲囊在共軛焦雷射掃描顯微鏡穿透光下亦可以看到四爪腺毛螢光的變化 (Fig. 3D)。在操作捕蟲囊吸入各樣的色

素過程中，並沒有難易度上的差異。以肉眼就可以看到捕蟲囊吸入藍色、紅色食用色素的外觀變化 (Figs. 4A and 4B)。

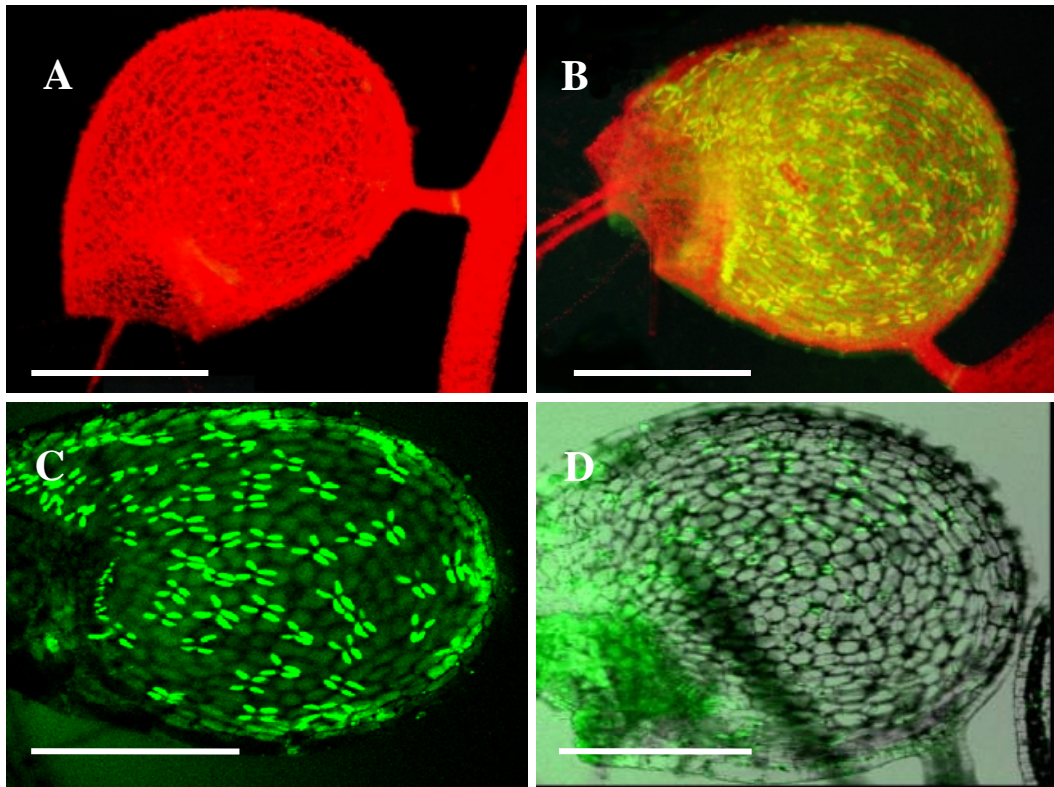


Figure 3. 捕蟲囊及四爪腺毛在螢光顯微鏡 (A-B) 及共軛焦雷射掃描顯微鏡 (C-D) 下的外型變化

(A) 在沒有吸入螢光染色劑之前，由於葉綠體的自體螢光反應 (autofluorescence)，在螢光顯微鏡下，捕蟲囊全部為紅色。(B) 捕蟲囊吸入 CFDA 後，在數分鐘之內即可以看到整個捕蟲囊充滿螢光的四爪腺毛。(C) 在共軛焦雷射掃描顯微鏡下的捕蟲囊，四爪腺毛的螢光反應特別明顯 (D) 捕蟲囊在穿透光之下的變化。圖中 Bar = 0.5 mm。

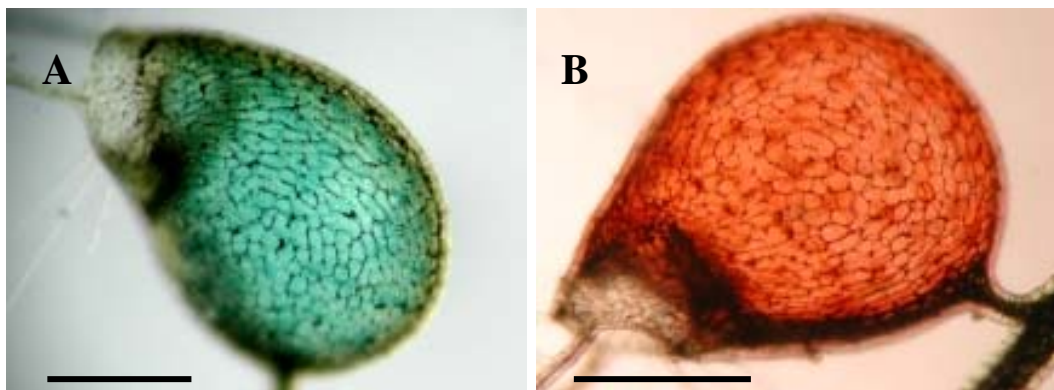


Figure 4. 捕蟲囊吸入紅色、藍色食用色素的外型變化 (複式數位照相顯微鏡)

捕蟲囊吸入藍、紅食用色素後，在複式數位照相顯微鏡下的外觀變化。(A) 吸入藍色食用色素的捕蟲囊，(B) 吸入紅色食用色素的捕蟲囊。圖中 Bar = 0.5 mm。

四、捕蟲囊的結構

捕蟲囊結構可分為：(1) 囊口緣：緣上的天線細枝可阻止雜物或較大生物堵住囊口，又可提供小生物躲藏及覓食 (Figs. 5A and 5B)。(2) 囊入口：內側表面腺毛具長柄、燈泡狀的頭，向中間及瓣蓋入口生長 (Fig. 5C)，小生物一旦游進去不易游出，如碰觸瓣蓋上的觸發毛 (Fig. 5B) 會被吸入囊內。(3) 瓣蓋及觸發毛：為進入捕蟲囊的門，只能向內開，上面有四根觸發毛及短柄的腺毛 (Fig. 5B)。(4) 囊壁：含葉綠體，由二層細胞構成，即內表皮(inner epidermis) 及外表皮 (outer epidermis)。外表皮扁平多角形，上面均勻分佈著囊外表腺毛 (external glands)，有排水功能。內表皮細胞較薄，上面佈滿四爪腺毛。囊口領內側有二爪腺毛 (Fig. 5D)。內部四爪腺毛 (Figs. 5E, 5F, and 5G) (部份有三爪腺毛)，具吸收消化及排水功能。

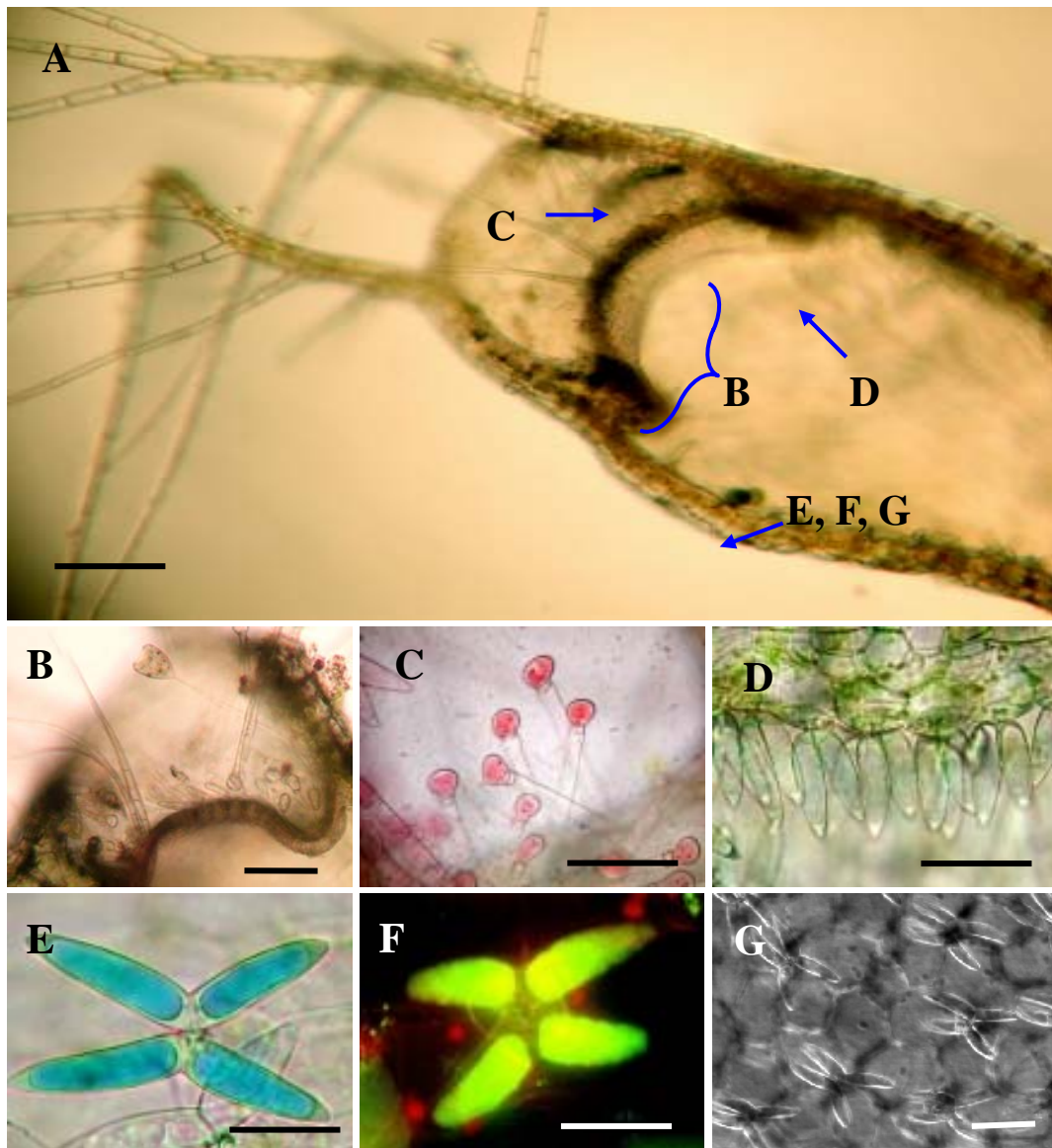


Figure 5. 捕蟲囊的結構 (一般光學顯微鏡 A-E, 螢光顯微鏡 F, 共軛焦雷射掃描顯微鏡 G)

(A) 捕蟲囊縱切後的結構可分為囊口緣及上面的天線細枝、囊入口、瓣蓋及捕蟲囊內部。Bar = 0.1 mm。(B) 瓣蓋及觸發毛。Bar = 0.1 mm。(C) 囊入口內側表面腺毛。(D) 接近瓣蓋口囊口領內側的二爪腺毛，能防止小生物游向開口脫逃。四爪腺毛充滿於內囊壁，具吸收消化及排水功能。(E) 吸入藍色食用色素的四爪腺毛。(F) 充滿螢光染劑的四爪腺毛，背景為葉綠體的紅色自體螢光反應。(G) 在共軛焦雷射掃描顯微鏡下四爪腺毛的合併影像，捕蟲囊並未切開。(C) 至 (G) 圖中 Bar = 0.02 mm。

五、以螢光染劑及食用色素探討捕蟲囊內四爪腺毛的輸送路徑

(一) 螢光染劑實驗結果：

1、以螢光顯微鏡觀察觀察 (Epifluorescein Microscope)

捕蟲囊吸入 CFDA 後，以手工切開在螢光顯微鏡下觀察，可以看到四爪腺毛的尾端細胞及底層表皮細胞(Fig. 6A)充滿著螢光，在四爪腺毛的側面像，可以發現到螢光進入到四爪腺毛的柄及基座細胞(Fig. 6B)及下面的底層表皮細胞(Fig. 6C)。

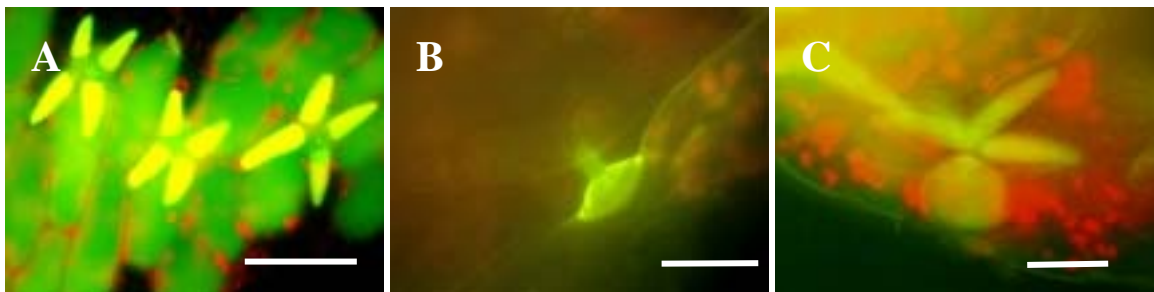


Figure 6. 螢光顯微鏡觀察結果

捕蟲囊吸入 CFDA 後，(A)四爪腺毛的尾端細胞及底層表皮細胞很快地充滿著螢光。Bar = 0.06 mm。(B)四爪腺毛的側面像，螢光進入到四爪腺毛的柄及基座細胞。Bar = 0.02 mm。(C)下面底層表皮細胞。Bar = 0.02 mm。

2、以共軛焦雷射掃描顯微鏡觀察 (Confocal Laser Scanning Microscope)

在共軛焦雷射掃描顯微鏡下，捕蟲囊並不需要切開，也有相同的發現，但影像更為清晰。捕蟲囊吸入 CFDA 後整個囊內四爪腺毛充滿著螢光(Fig. 7A)。放大影像調整 Z 軸的深淺，四爪腺毛尾端細胞(Fig. 7B)、底層表皮(Fig. 7C)及內表皮細胞(Fig. 7D)層次分明，由囊壁側面更能顯現這些結

構(Fig. 7E)。之後捕蟲囊柄(Fig. 7F)及細葉、莖(Figs. 7G-7I)也出現螢光。

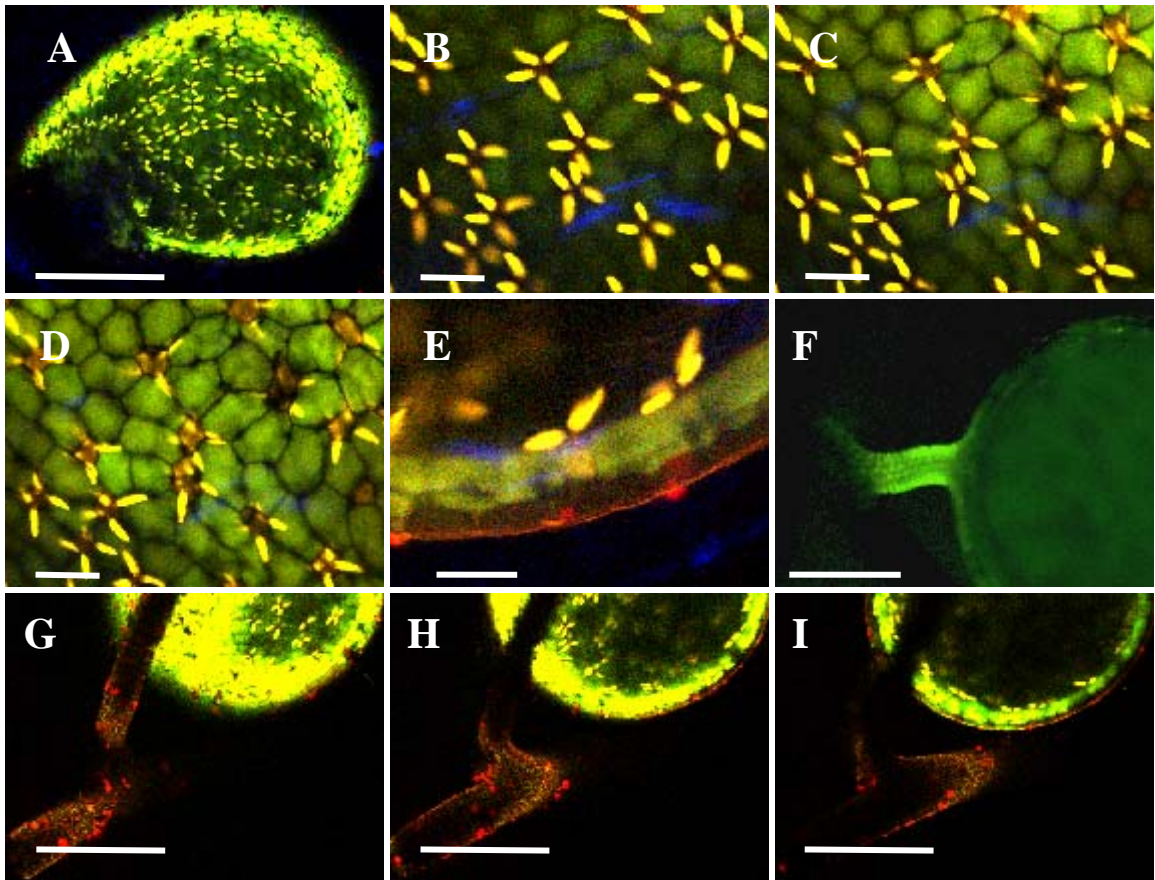


Figure 7. 共軛焦雷射掃描顯微鏡觀察結果

在共軛焦雷射掃描顯微鏡下，(A)捕蟲囊吸入 CFDA 後整個囊內四爪腺毛充滿著螢光。Bar = 0.5 mm。放大影像調整 Z 軸的深淺，(B)四爪腺毛尾端細胞、(C)底層表皮及(D)內表皮細胞，層次分明。Bar = 0.02 mm。(E)由囊壁側面更能顯現這些結構。Bar = 0.02 mm。捕蟲囊柄及細葉(F)、莖(G-I)也出現螢光。Bar = 0.5 mm。

(二) 食用色素實驗結果：以一般複式數位照相顯微鏡觀察

捕蟲囊吸入食用色素(Fig. 8A)，8 小時(Fig. 8B)，及 16 小時(Fig. 8C)後囊內的色素會漸漸的變淡。過程中四爪腺毛內紅色色素反而越來越明顯，影像放大後四爪腺毛及囊內表皮細胞的色素更為清晰可見(Fig. 8D)。四爪腺毛的側面像，可以發現色素流向四爪腺毛的短柄(Fig. 8E)。在 1~2 天後在捕蟲囊柄可看見色素，就如同將色素輸送到葉部(Fig. 8F)。這些結果與螢光染劑的實驗相同。

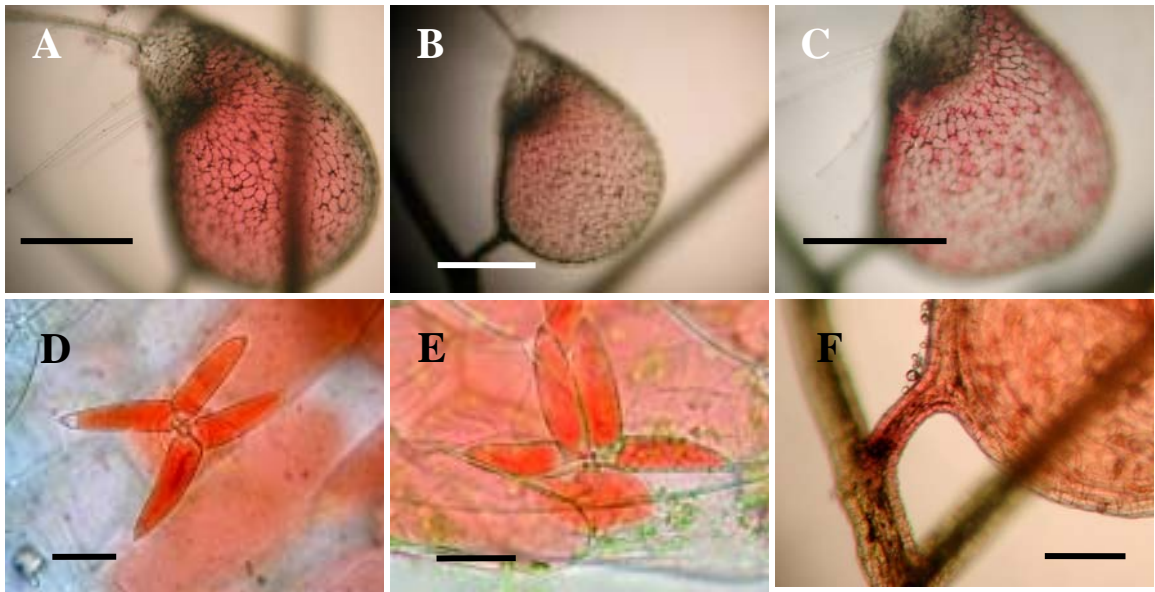


Figure 8. 食用色素實驗結果

捕蟲囊吸入食用色素(A), 8 小時(B), 及 16 小時(C)後囊內的色素會漸漸的變淡。Bar = 0.5 mm。 (D)四爪腺毛及囊的內表皮細胞的色素清晰可見。Bar = 0.02 mm。 (E)四爪腺毛側面像, 底層表皮細胞的色素。Bar = 0.02 mm。 (F)在 1~2 天後捕蟲囊柄及葉可看見色素。Bar = 0.2 mm。

六、捕蟲囊內四爪腺毛食用色素的消失現象觀察

捕蟲囊吸入食用色素 16 小時後, 以複式數位照相顯微鏡持續觀察四爪腺毛, 發現充滿四爪腺毛的紅色食用色素, 顏色逐漸加深, 在 30 分鐘後向細胞中間聚縮成團, 接著慢慢膨脹顏色變淡, 最後色素全部消失, 全部過程約 2 小時, 每間隔 10 分鐘將整個過程拍照記錄如下 (Fig. 9)。以 Multi gauge 軟體將色素在四爪腺毛上分佈的面積及顏色深淺的變化, 加以量化分析, 更能表現出這奇妙的現象 (Figs. 10 and 11)。

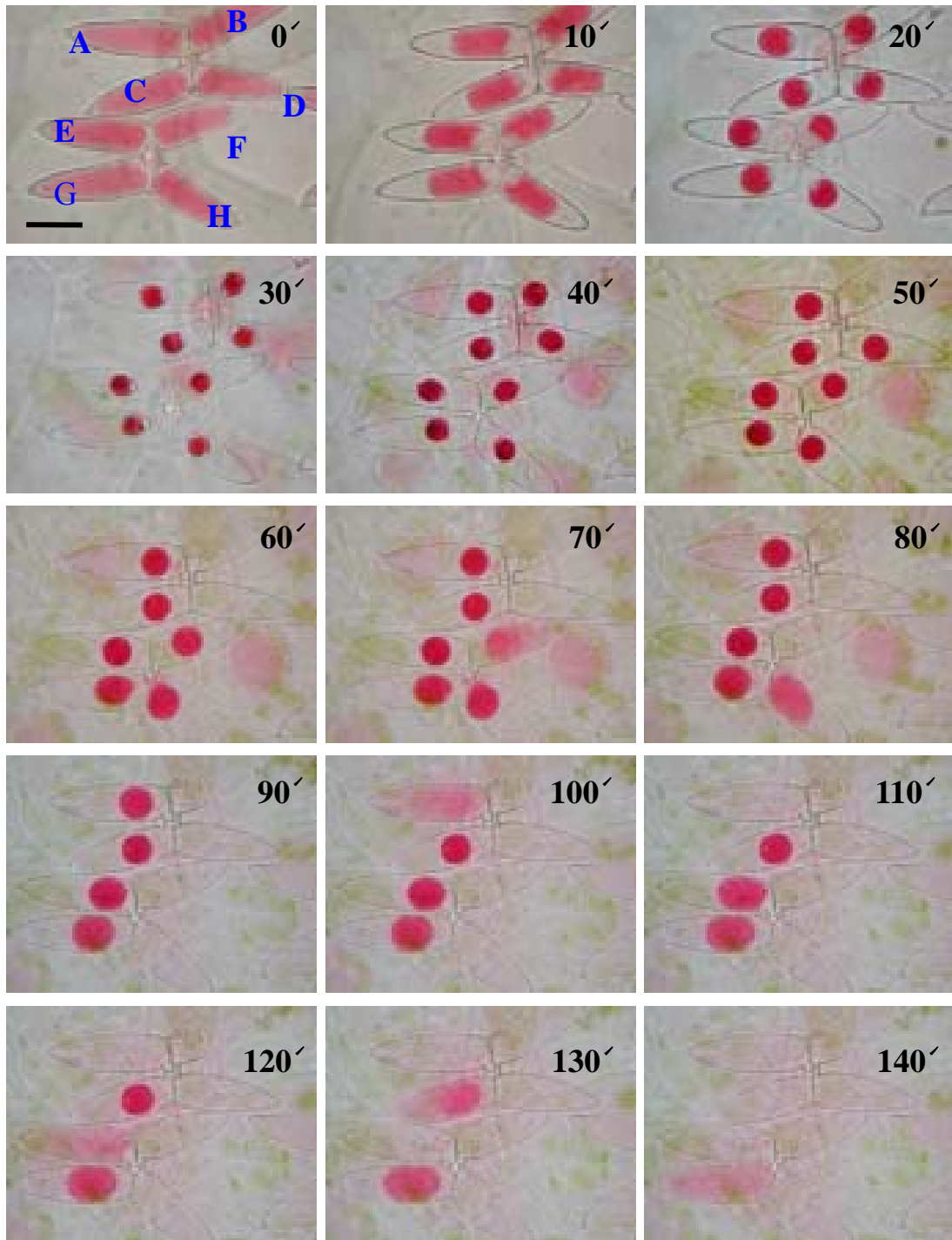


Figure 9. 四爪腺毛內紅色食用色素的消失現象

一對四爪腺毛上的尾端細胞分別標示為 A, B, C, D 及 E, F, G, H，每間隔 10 分鐘拍照記錄。剛開始時顏色範圍漸漸變小，在 30 分鐘後縮小為一團，接著慢慢的膨脹而後色素消失不見。(Bar = 0.01 mm)。

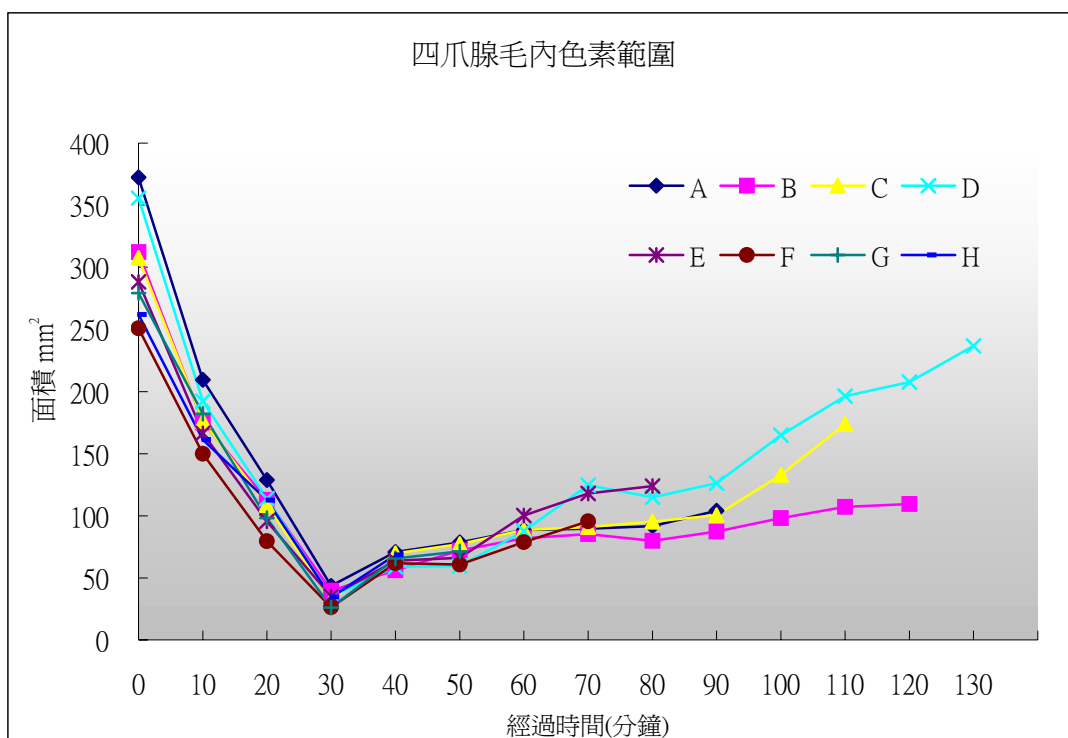


Figure 10. 四爪腺毛內紅色食用色素範圍的變化

四爪腺毛上充滿的紅色食用色素範圍，隨著時間的經過而漸漸縮小，在 30 分鐘後向細胞中間聚縮成團，之後慢慢膨脹且顏色變淡，最後色素全部消失。二個四爪腺毛上的尾端細胞 A, B, C, D 及 E, F, G, H 均有相似的變化。

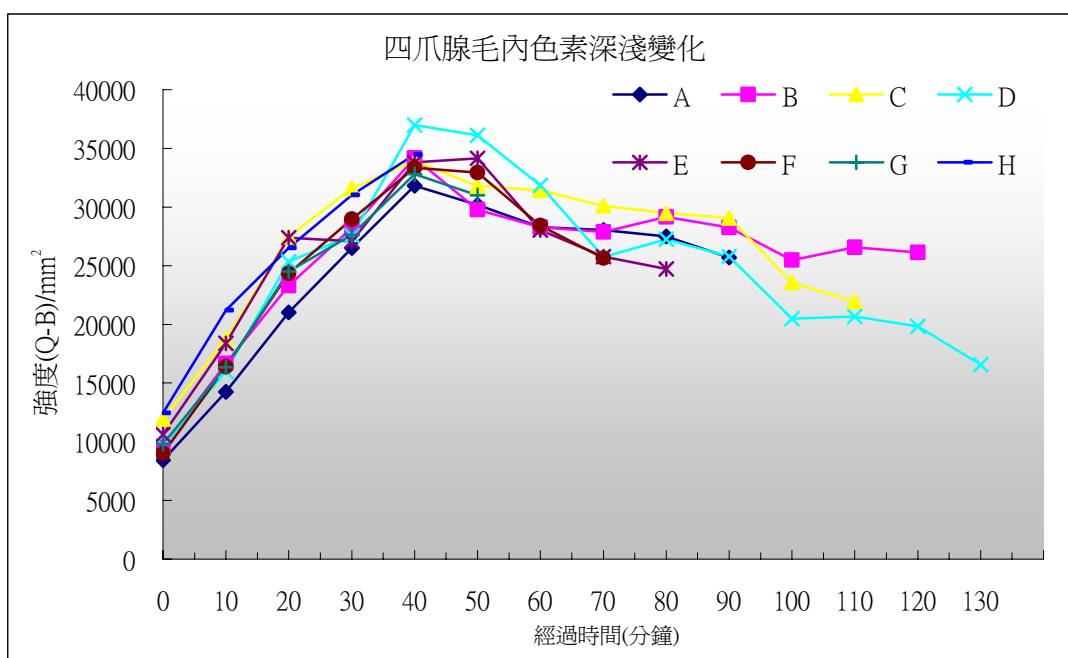


Figure 11. 四爪腺毛內紅色食用色素深淺的變化

四爪腺毛上充滿的紅色食用色素，隨著時間的經過而顏色漸漸變深，在 40 分鐘時顏色最深，但慢慢的顏色範圍膨脹顏色變淡，最後色素全部消失。二個四爪腺毛上的尾端細胞 A, B, C, D 及 E, F, G, H 均有相似的變化。

七、捕蟲囊內四爪腺毛對食用色素的吸收速率與光合作用關係

本實驗以光合作用的有無分為二組，整個實驗設計及結果 (Figure 12) 如下表所示。

無光合作用實驗組

代號	實驗前的處理	第 1 階段處理	第 2 階段處理	四爪腺毛開始吸收色素的時間	圖示
D2	黑暗環境中 2 天	使吸入色素後持續保持黑暗	每隔 1 小時剖開捕蟲囊觀察	第 4 小時	Fig. 10 D2
D1	黑暗環境中 1 天			第 3 小時	Fig. 10 D1
D0	無任何處理			第 2、3 小時	Fig. 10 D0

有光合作用實驗組

代號	實驗前的處理	第 1 階段處理	第 2 階段處理	四爪腺毛開始吸收色素的時間	圖示
L0	無任何處理	使吸入色素後持續保持光照	每隔 1 小時剖開捕蟲囊觀察	第 2、3 小時	Fig. 10 L0
L1	光照 1 天			第 1、2 小時	Fig. 10 L1
L2	光照 2 天			第 1 小時	Fig. 10 L2

我們以 Multi gauge 軟體將上述結果加以量化分析，求出個別實驗組在第 4 小時的色素增加速率，並加以作圖表示 (L2 在第 4 小時已達最大吸收量)。縱軸為色素的深淺量增加速率，橫軸為個別實驗組 (Figure 13)。很明顯的可以看出增加光合作用時間，四爪腺毛對色素的吸收速率，明顯增加；相反地，若增加在黑暗下的時間，則色素的吸收會明顯變慢。我們也以同樣的方法，用紅色色素進行實驗，也得到類似的結果。因此光合作用所提供的能量與四爪腺毛對色素的吸收速率有很大的關係。

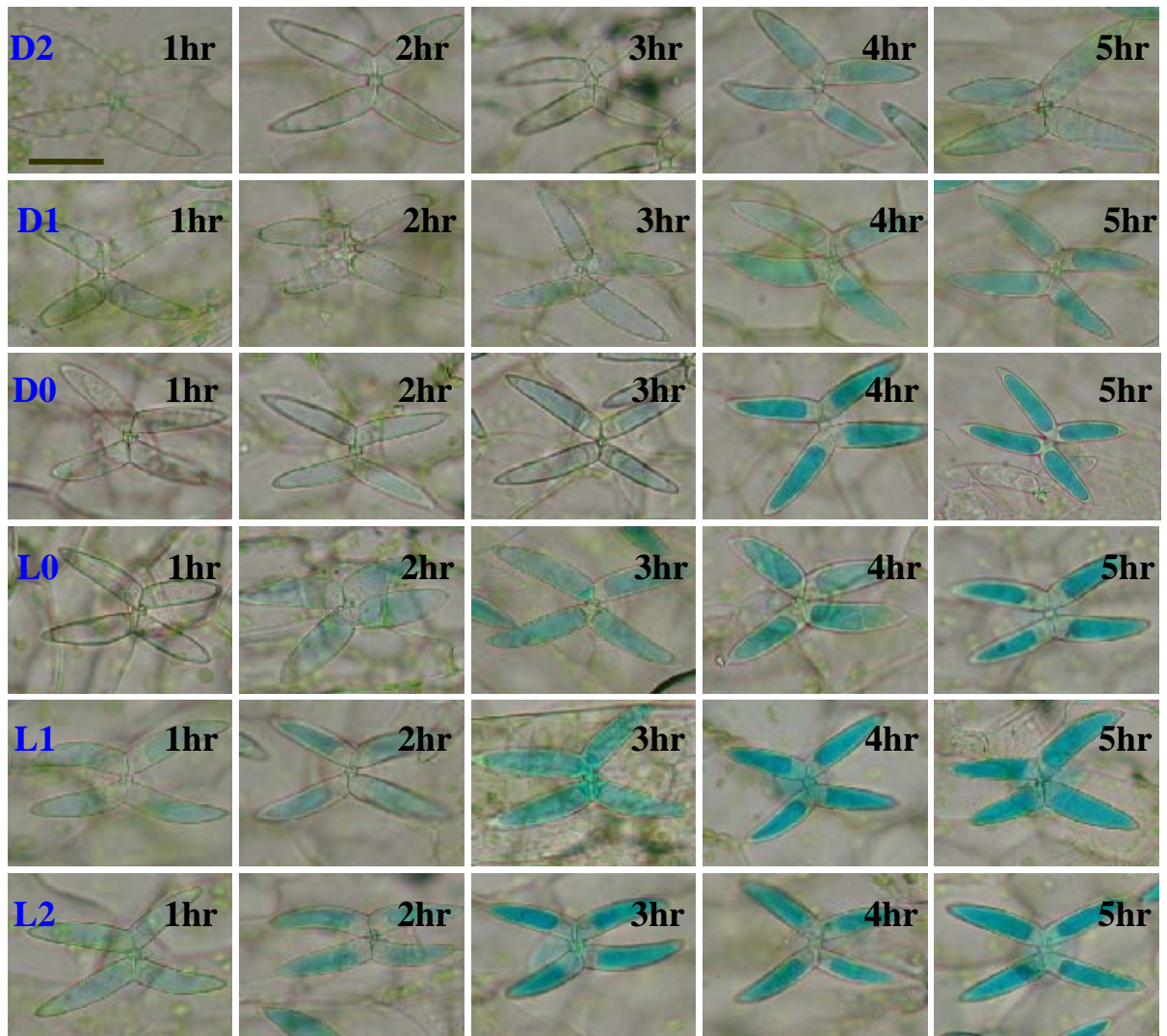


Figure 12. 四爪腺毛對食用色素的吸收與黑暗或光照的關係（每隔 1 小時剖開觀察）

D2, D1, D0 分別代表先放在黑暗下 2 天、1 天及未先黑暗處理的狸藻捕蟲囊，在吸入色素後，持續保持在黑暗環境。L0, L1, L2, 分別代表未先光照處理、先光照處理 1 天、2 天的狸藻捕蟲囊，吸入色素後，持續保持在光照下。(D2) 狸藻捕蟲囊先在黑暗下 2 天後，色素的吸收明顯較慢，在第 4 小時四爪腺毛才有吸收色素。(D1) 黑暗下 1 天後，在第 3 小時四爪腺毛才有見到吸收色素。(D0) 一般環境下的捕蟲囊，也就是未先黑暗處理的狸藻，在第 2、3 小時即有色素吸收現象。(L0) 未先光照處理的捕蟲囊，在第 2、3 小時即有色素吸收現象。(L1) 先光照 1 天後，在第 1、2 小時即可看到四爪腺毛明顯的吸收色素。(L2) 已光照 2 天的捕蟲囊最明顯，在第 1 小時即可看到四爪腺毛明顯的吸收色素。(Bar = 0.02 mm)。

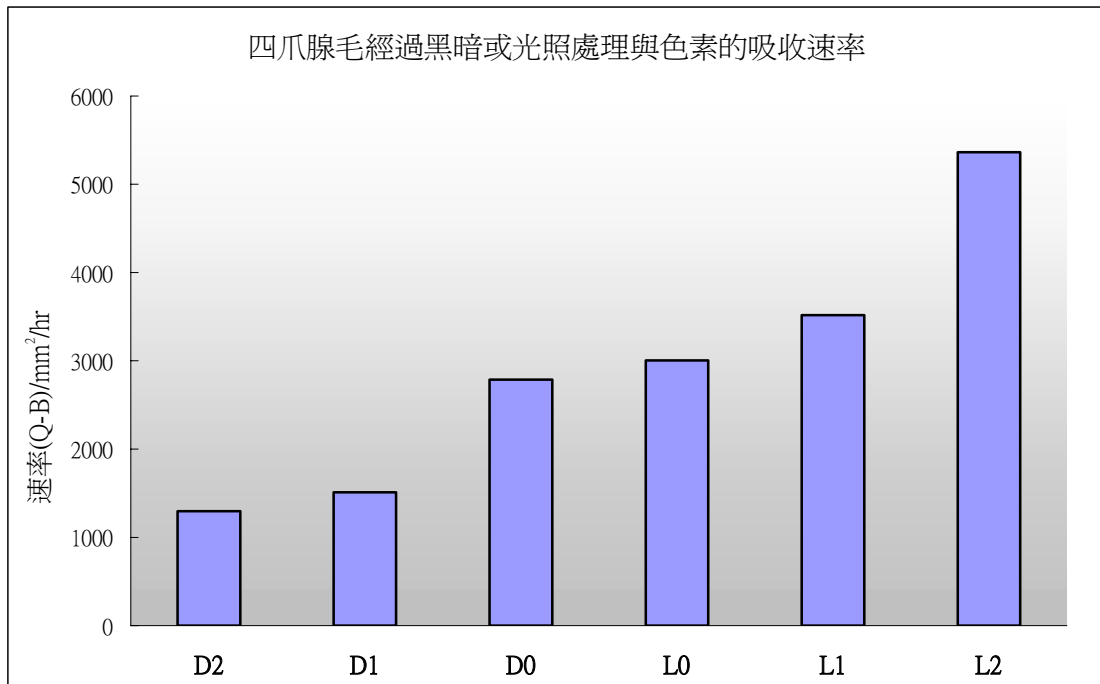


Figure 13. 光合作用所提供的能量與四爪腺毛對色素的吸收速率的關係

狸藻先黑暗下處理後，吸收色素的速率明顯較慢 (D2, D1, D0)。相對地先光照處理後的狸藻 (L0, L1, L2)，四爪腺毛吸收色素的速率較快，尤其先光照 2 天的捕蟲囊最為明顯。

討論

達爾文在 1875 年發表「食蟲植物」(Darwin, 1875)，從此學者開始注意到食蟲植物，但對於狸藻捕蟲囊的詳細結構及囊內腺毛功能的研究並不多。一直到 1985 年才由 Fineran (1985) 以電子顯微鏡將捕蟲囊及其腺毛作一完整有系統文獻回顧及整理。包括以 Lanthanum 及 Uranyl salt (Fineran and Gilbertson, 1980) 作為研究非共質體運輸的追蹤標記，發現溶質由囊內運送到四爪腺毛的非共質體路徑後，它的輸送是有受到限制的，因此在四爪腺毛內需要有經細胞質間絲 (plasmodesmata) 的共質體輸送路徑。

捕蟲植物的共質體運輸路徑，目前文獻只能找到以豬籠草 (*Nepenthes*) 的研究報告，是將螢光染劑 CFDA 放在豬籠草的捕蟲器官內，而後觀察腺體內螢光染劑的分佈。但豬籠草捕蟲器官的吸收腺體較為扁平不明顯，且為多層細胞結構，普通顯微鏡下不易於觀察。據我們所知，目前為止並沒有以 CFDA 來探討狸藻捕蟲囊的共質體運輸的研究報告。因此本實驗為首次應用 CFDA 在狸藻的研究。Grignon *et al.*, (1989) 指出螢光染劑

(CF) 是研究韌皮部共質體輸送的良好材料，它在植物體內可以長距離一個細胞接一個細胞的運輸，而不會進入到非共質體路徑內。

我們發現狸藻捕蟲囊具簡單的雙層細胞，腺毛突出明顯，CFDA 被捕蟲囊吸入後，很快的進入到四爪腺毛內及內表皮層，很簡單的手工切片就可能達到觀察的目的。因此可以作為植物共質體運輸路徑很好的研究材料。以食用色素或螢光染劑實驗中，CFDA 可以很快的進入到四爪腺毛的基座細胞，但食用色素則較慢，我們認為是它們之間結構上的差別。CFDA 分子量為 460，分子結構為兩端含羧基，而紅色及藍色食用色素分子量各為 604.48 及 794，兩端與 Na 鍵結。溶於蒸餾水中後，食用色素的 Na 會解離而變為極性更大的物質，不易通過細胞膜，而 CFDA 則極性較小，比較容易通過細胞膜。雖然食用色素較慢進入細胞，但這也提供了仔細觀察物質在四爪腺毛輸送路徑的機會，且沒有 CFDA 怕見到光的缺點。食用色素與 CFDA 在研究四爪腺毛物質運輸路徑的比較如下：

	食用色素	CFDA
材料	取得方便	較費時
價格	便宜	貴
調配	簡單	較複雜
保存	不須特別環境	冷凍室
顯微鏡	一般複式	螢光顯微鏡/共軛焦雷射掃描顯微鏡
可觀察時間	可長時間觀察	螢光數分鐘會消退 無法持續觀察檢體不可見光
進入腺毛速度	較慢，整個運輸途徑較可以從容觀察。	CFDA 較快，一下子就在路徑中，所以次序的先後較不易掌握。
分子式及分子量	紅色色素 $C_{20}H_{11}O_{10}N_2S_3Na_3$ (MW 604.48) 藍色色素 $C_{37}H_{36}N_2O_9S_3Na_2$ (MW 794)	CFDA $C_{25}H_{10}O_9$ (MW 460)

但是否會有其它因素影響 CFDA 或食用色素進入四爪腺毛的快慢呢？CFDA 一般認為以被動的擴散作用進入細胞內 (Breeuwer *et al.*, 1995)，速度較快，而經過我們對狸藻在光照或黑暗情況下，四爪腺毛對食用色素的實驗發現，有光照的狸藻對食用色素的吸

收速率有明顯的增加，對照的黑暗組吸收時間相對延後，因此我們推論狸藻四爪腺毛對色素的吸收至少在吸收後期，當四爪腺毛細胞外色素濃度很低時，為需要耗能量的主動運輸。

在沒有吸入螢光染色劑之前，顯微鏡下的狸藻株全部變為紅色，仔細觀察可以發現這些是葉綠體的自體螢光反應 (autofluorescence)。剖開後觀察，也可以見到二爪腺毛、四爪腺毛上有少許的自體螢光反應，另外在捕蟲囊的外表腺毛 (external glands)，也有淡金黃色的螢光反應，這二類細胞的自體螢光反應不同於內含葉綠體的其它部分細胞，因此不同功能的植物組織會反應出不同的自體螢光反應。

在螢光染劑及食用色素的實驗中，二爪腺毛及四爪腺毛均有吸收現象，但外表腺毛並沒有相同的反應，因此可以推論它們具有不同的功能。目前認為四爪腺毛主要功用為分泌酵素、消化吸收及排出囊內水份，而外表腺毛的功用為將水份接著分泌出去，回復囊內負壓 (Fineran, 1985)。

結 論

為了在貧瘠環境下能夠生長，食蟲植物發展出一套精緻的結構，一般認為這是由葉片演化而來，以獲取生長所需的營養素，尤其是氮元素。而狸藻的捕蟲囊可以說是所有捕蟲植物中，最為獨特有效率的捕蟲結構。在捕蟲囊捕獲小生物後，不但必須將囊內水份主動的從囊內運送出去，以回復負壓狀態，且在這過程中瓣蓋保持緊密，維持住負壓。接下來囊內腺毛的分泌消化酵素，吸收分解後的營養素，這些任務是靠特殊的結構及生理機能才能達到的。

CFDA 應用在狸藻的研究付之闕如，我們是最先以共軛焦雷射掃描顯微鏡，觀察螢光標記 (carboxyfluorescein) 在捕蟲囊內的變化，成功地描繪出捕蟲囊共質體運輸路徑。同時我們也以對細胞無害的食用色素，進行捕蟲囊吸收物質路徑觀察。我們發現食用色素不但成本低廉，且較螢光染劑有更多的優點，例如觀察時間較不受限制等，非常適合用來研究捕蟲囊吸收物質的路徑，且本實驗的模式可以應用在其他植物運輸路徑的研究

上。

我們認為狸藻捕蟲囊內物質的輸送路徑如下：①由捕蟲囊內部 → ②進入到四爪腺毛的尾端細胞 → ③基座細胞 → ④底層的表皮細胞 → ⑤捕蟲囊內表皮 → 囊柄 → 狸藻葉及莖 (Fig. 14)。

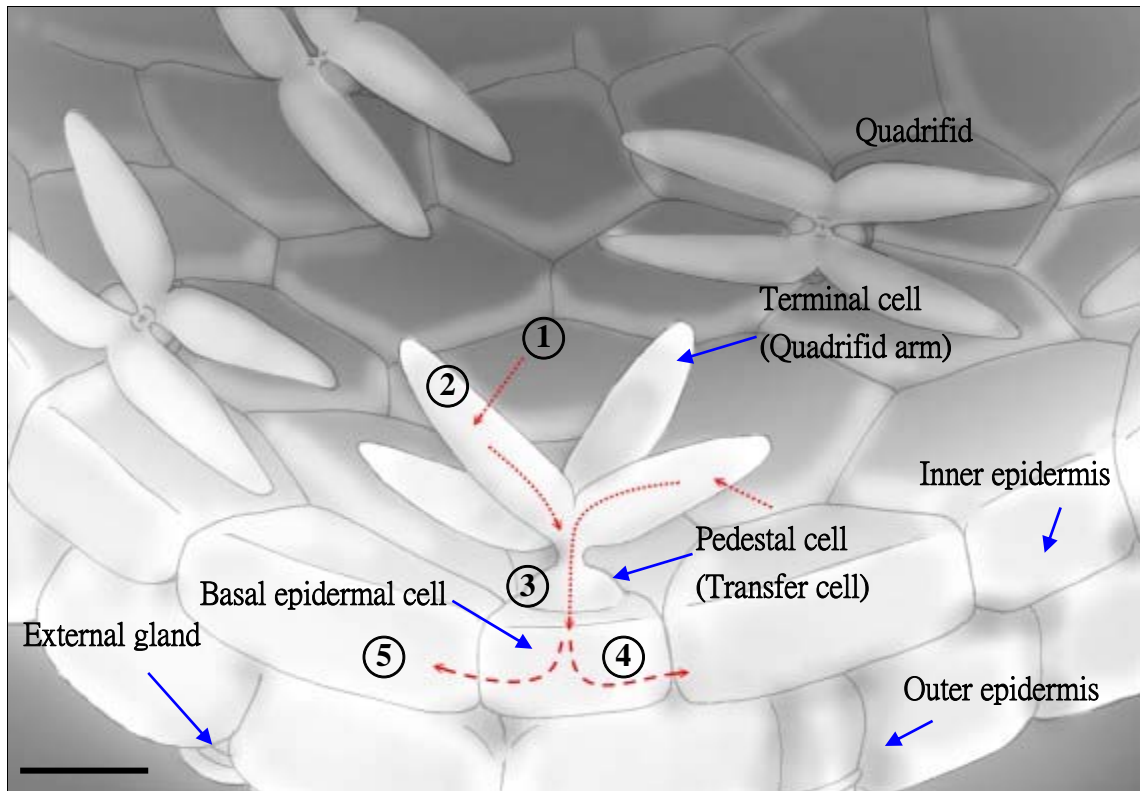


Figure 14. 四爪腺毛 (quadrids) 的結構及輸送物質的路徑 (Drawn by author)

四爪腺毛可以分為底層的表皮細胞 (basal epidermal cell)，上面緊接著基座細胞 (pedestal cell)，再聯結 4 條的尾端細胞 (terminal cell)。物質的輸送路徑以紅色虛線表示，由 ①捕蟲囊內 → ②進入到四爪腺毛的尾端細胞 (terminal cell) → ③基座細胞 (pedestal cell) → ④底層的表皮細胞 (basal epidermal cell) → ⑤捕蟲囊內表皮細胞層 (trap inner epidermis)。Bar = 0.02 mm。

參考文獻

- Adamec, L. (1997).** Mineral nutrition of carnivorous plants: A review. *Bot. Rev.* **63**, 273-299.
- Breeuwer, P. Drocourt, J. L., Bunschoten N., Zwietering, M. H., Rombouts, F .M., and Abee, T. (1995).** Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl Environ Microbiol.* **61** (4), 1614–1619.
- Darwin, C. (1875).** *Insectivorous plants.* J. Murray, London. (The Writings of Charles Darwin on the web, http://pages.britishlibrary.net/charles.darwin3/insectivorous/insect_fm.htm)
- Fineran, B. A., and Gilbertson, J.M. (1980).** Application of lanthanum and uranyl salts as tracers to demonstrate apoplastic pathways for transport in glands of the carnivorous plant *Utricularia monanthos*. *Eur J Cell Biol.* **23**(1), 66-72.
- Fineran, B. A., (1985).** Glandular trichomes in *Utricularia*: a review of their structure and function. *Israel Journal of Botany* **34**, 295-330.
- Flury, M., and H. Flu"bler. (1994).** Brilliant Blue FCF as a dye tracer for solute transport studies—A toxicological overview, *J. Environ. Qual.*, **23**, 1108–1112.
- Grignon, N., Touraine, B., and Durand, M. (1989).** 6(5)-Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. *Am. J. Bot.* **76**, 871–877.
- Offler, C.E., McCurdy, D.W., Patrick, J.W., and Talbot, M.J. (2003).** Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annu Rev Plant Biol.* **54**, 431-54.
- Opaka, K.J., Duckett, C.M., Prior, D.A.M., and Fisher, D.B. (1994).** Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The plant Journal.* **6**(5), 759-766.
- Owen, T. P., Lennon, K. A., Santo, M. J. and Anderson, A. Y. (1999).** Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Ann. Bot.* **84**, 459-466.
- Plachno, B.J., and Jankuna. (2004).** Transfer cell wall architecture in secretory hairs of *Utricularia intermedia* Traps. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **46**,193–200.
- Richards, J. H. (2001).** Bladder function in *Utricularia purpurea* (*Lentibulariaceae*): is carnivory important ? *Am. J. Bot.* **88**, 170-176.
- Schulze, W., Frommer, W.B., Ward, J.M. (1999).** Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J.* **17**, 637-46.
- Sirova, D., Adamec L., and Vrba J. (2003).** Enzymatic activities in traps of four aquatic species of the carnivorous genus *Utricularia*. *New Phytologist* **159**, 669-675.

Direct Evidence of the Symplastic Pathway in the Trap of the Bladderwort *Utricularia gibba*

Tanya Chun-Chiao Juang, Sonya Di-Chiao Juang

INTRODUCTION

The bladderwort *Utricularia gibba* is an aquatic angiospermic carnivorous plant that is equipped with specialized traps for capturing preys (Fig. 1). After the preys are digested, the resulted nutrients are thought to be internalized by either the apoplastic or symplastic pathway, as in most higher plants. The apoplastic pathway in *U. gibba* has been demonstrated by using radioactive uranium salts and electron microscopy a quarter of a century ago (Fineran and Gilbertson, 1980), however, the symplastic pathway has not yet been shown (Owen *et al.*, 1999).

In this study, we used food and fluorescent dyes as tracers to manifest the absorption process under light, fluorescence, and confocal microscopes. Our results unambiguously demonstrate that the symplastic pathway does exist in *U. gibba* and that such process is energy dependent.

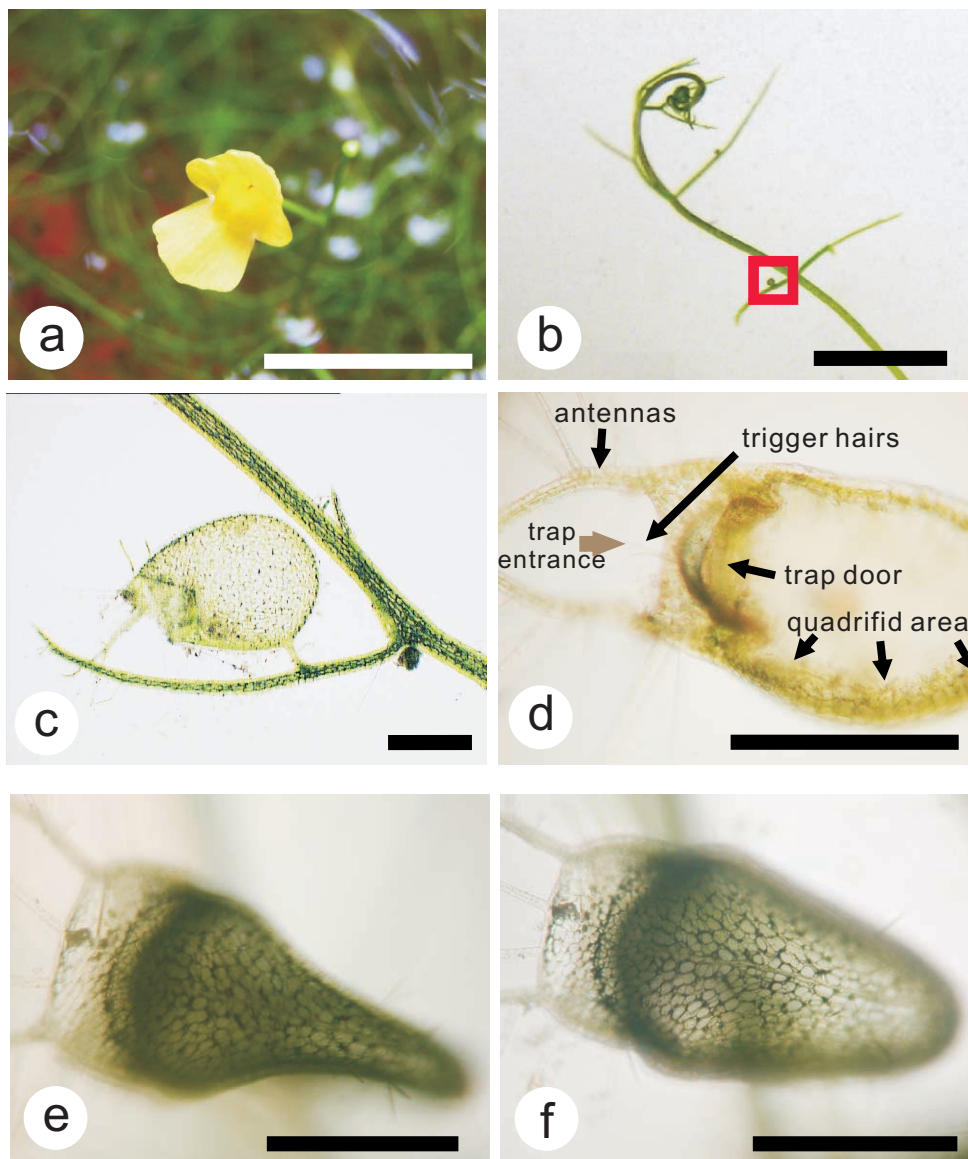
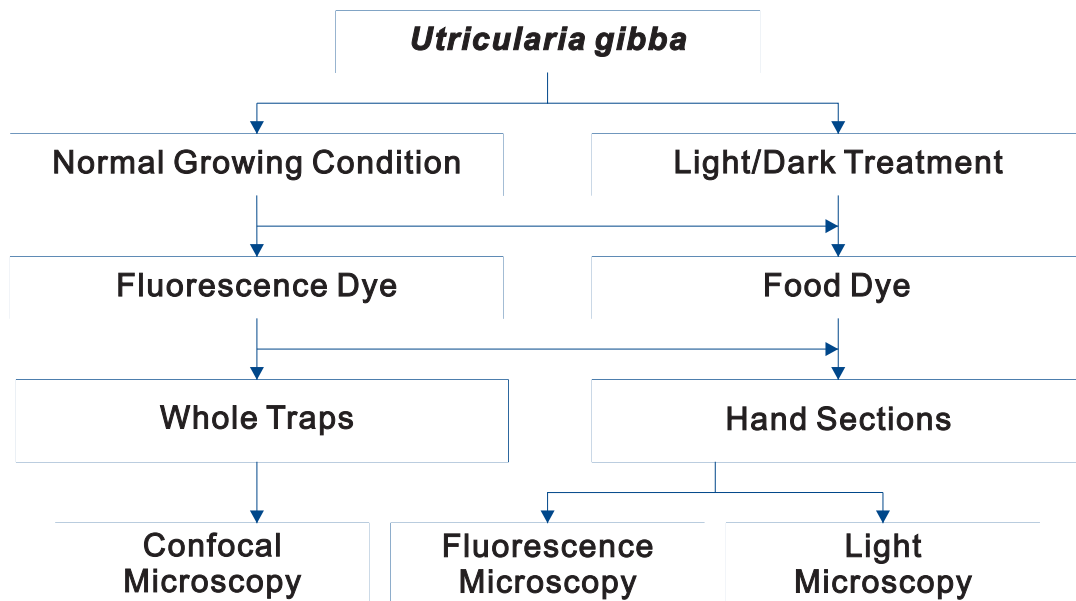


Fig. 1. Morphology of *U. gibba* and the trap.

(a) The flower. Bar = 10 mm. (b) The apical meristem. Bar = 10 mm. (c) The trap. Bar = 1 mm. (d) Longitudinal section of the trap. Bar = 1 mm. The trap in set phase (e) and in re-setting phase (f). Bar = 1 mm.

PROCEDURES



Plant and Treatment

U. gibba, obtained from the ponds in southern Taiwan, was cultivated outdoors in plastic containers under normal conditions. In the study of the effect of light on the absorption of food dye, samples of *U. gibba* were separately grown in light or dark environments for 48 hrs before experiment.

Labeling and Microscopy

One mM carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Sigma) and 6% food dye (Amaranth Red, Scott-Bathgate LTD.) were used. CFDA is membrane permeable. Upon cleavage by intracellular esterases, a membrane impermeant fluorescent compound (carboxyfluorescein, CF) is formed. Therefore, 0.1 mM Eserin (Sigma) was added into the CFDA solution to block secreted esterases inside the traps and to prevent cleavage of CFDA prior to uptake into quadrifids. CF is a reliable fluorescent tracer for symplastic transport (Grignon *et al.*, 1989). After being loaded with tracers, free hand sections of the traps were examined by using a light microscope (Alphaphot-2 Ys2) or a fluorescent microscope (Olympus BH2-RFCA) at various time intervals. The whole trap was also directly mounted in water without dissection and observed under a confocal laser scanning microscope (Nikon EZ-C1, Laser type Ar 488).

Assay of the Absorption of Dye in Quadrifids

The absorption intensity of the food dye inside the terminal cells were assayed by Multi Gauge software 2.0 (Fuji Film).

RESULTS AND DISCUSSION

Absorption and Transportation of Dyes

As shown in Fig. 2, it is clear that the food dye was clearly up taken into the traps when the suck-in action was triggered (Fig. 2a), the dye was subsequently accumulated within the terminal cells (Fig. 2b). Since dye accumulation was observed in the terminal cells when both food and fluorescent dyes were used as tracers, and also because of the cuticle that covered the inner epidermis and the quadrifid stalk (Fineran 1980), the terminal cell became the only entrance available for the symplastic route. When CFDA was used as a tracer, the such process was confirmed in further details (Figs. 2,c and d).

Still in the quadrifid (Figs. 3, a and b), the dyes were found to move from the terminal cells to the pedestal cell. Fig.3 c and d also clearly demonstrated, indicating the symplastic transportation since the dyes were clearly located in the cytoplasmic areas.

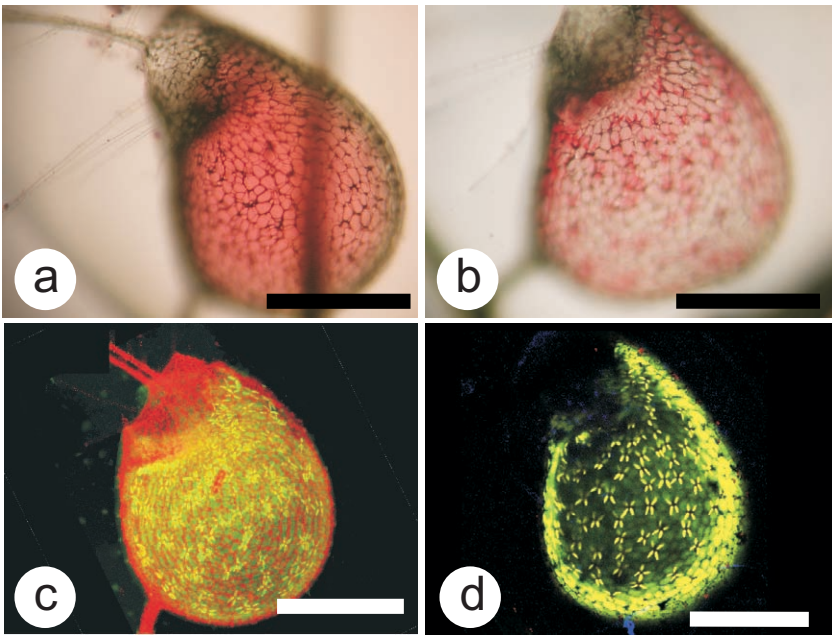


Fig. 2 Time dependent dye absorption.

(a) Traps evenly filled with food dye immediately after firing.
 (b)-(d) Dye accumulation in quadrifids with images taken by (b) light, (c) fluorescence, and (d) confocal microscopy.
 Bar = 1 mm.

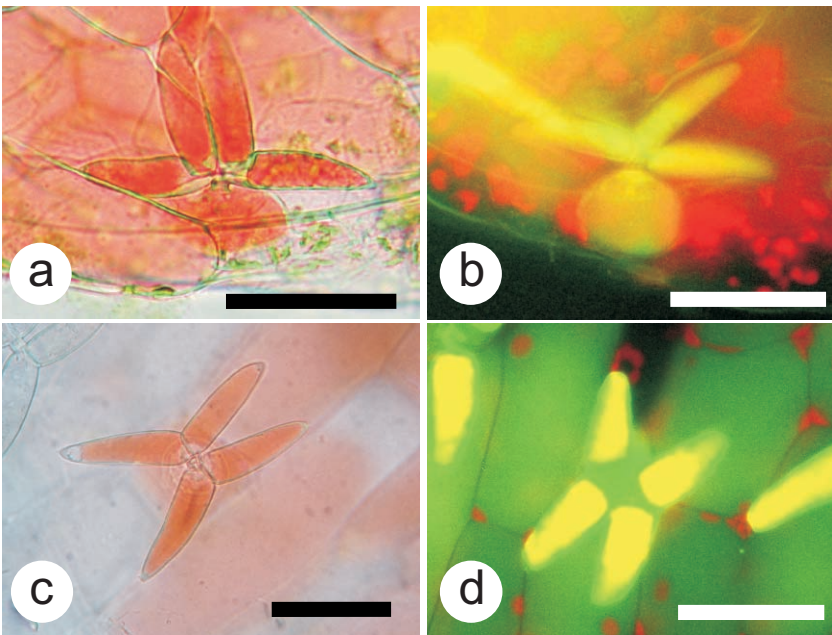


Fig. 3 Dye transportation from quadrifid to epidermis (left).

(a) and (b) Fully stained pedestal cells; sideviews.
 (c) and (d) Stained quadrifids and epidermal cells; topviews.
 Bar = 0.1 mm.

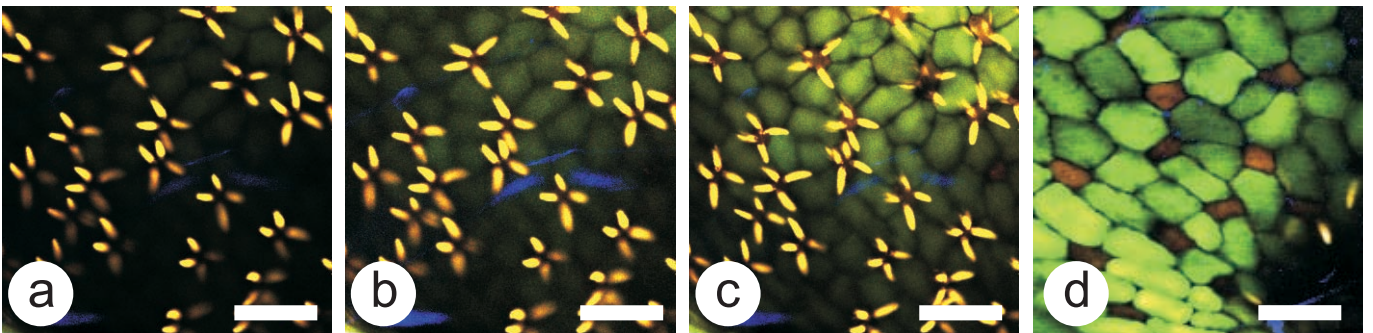


Fig. 4 Distribution of CF inside the trap (below).

(a) The tips of the terminal cells.
 (b) The terminal cells.
 (c) The inner epidermis and the basal epidermal cells.
 (d) The inner epidermis at a plane underneath the quadrifids.
 Bar = 0.1 mm.

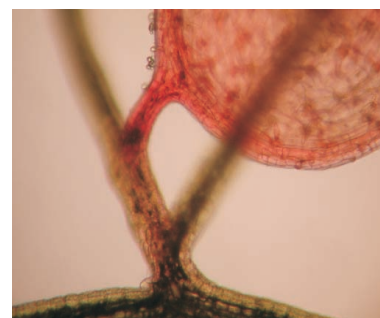
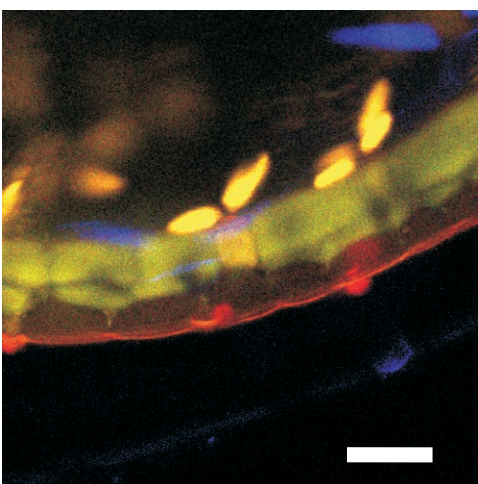


Fig. 6 Dye transportation from trap to stem. Bar = 1 mm.

Fig. 5 Tissue distribution of CF in the trap.

Fluorescent signals in the quadrifid stalk, pedestal cell and basal epidermal cells.
 Bar = 0.1 mm.

The usage of confocal microscopy allowed plane by plane images taken (Fig. 4), and enabled us to monitor the transportation process without dissection.

The lateral view of the quadrifids showed that the transportation of the dyes was restricted in the inner epidermis but absent in the outer epidermis (Fig. 5). Two days after the absorption, the dye could be observed in the stem (Fig. 6).

Effects of Light on Dye Absorption

Dye accumulation was observed directly by free hand sections of the traps under light microscopy (Fig. 7). In the dark treatment, dye absorption was delayed by 3 hrs as compared to the control or the light treatment. The duration of light exposure on the plant determined the dye absorption rate by the trap (Fig. 8), suggesting that the uptake process was energy dependent.

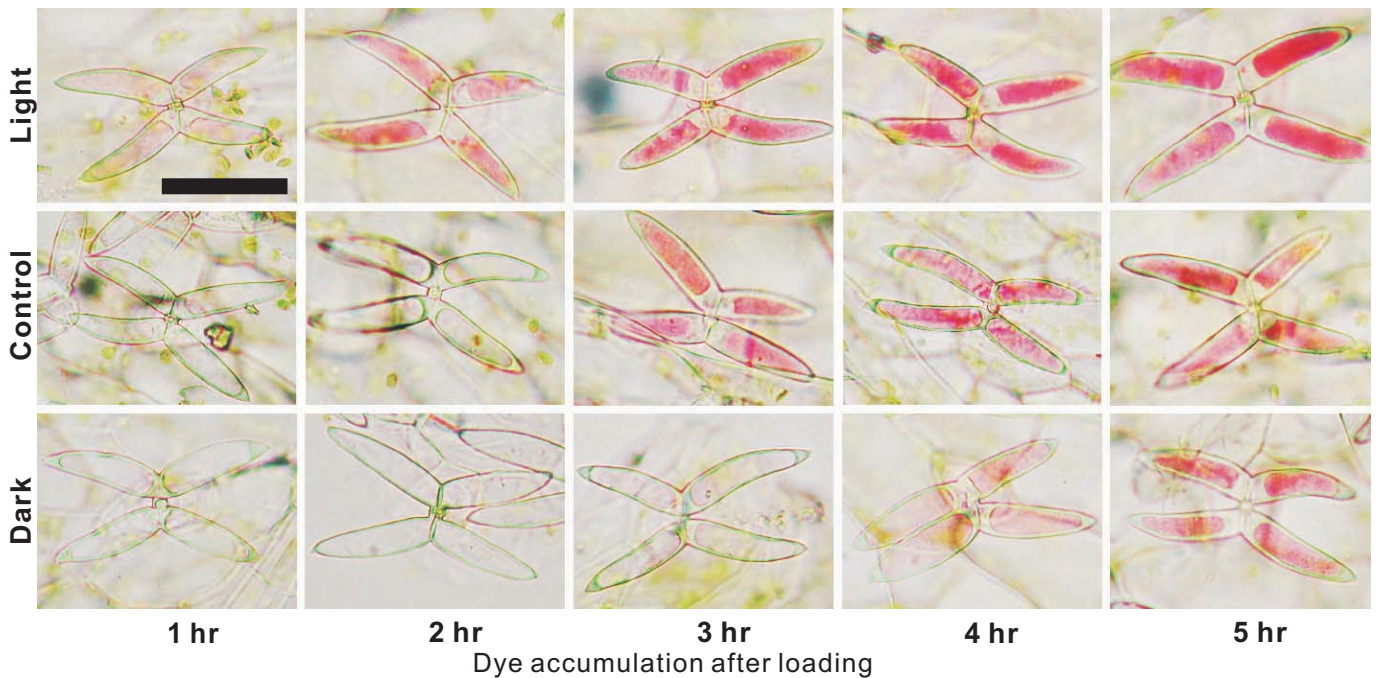


Fig. 7 Effects of light on the accumulation of food dye into quadrifids.

Plants were grown under continuous light (48 hrs) (top row), normal condition (16 hrs light, 8 hrs dark) (middle row), or continuous darkness (48 hrs) (bottom row) before dye loading. Bar = 0.1 mm.

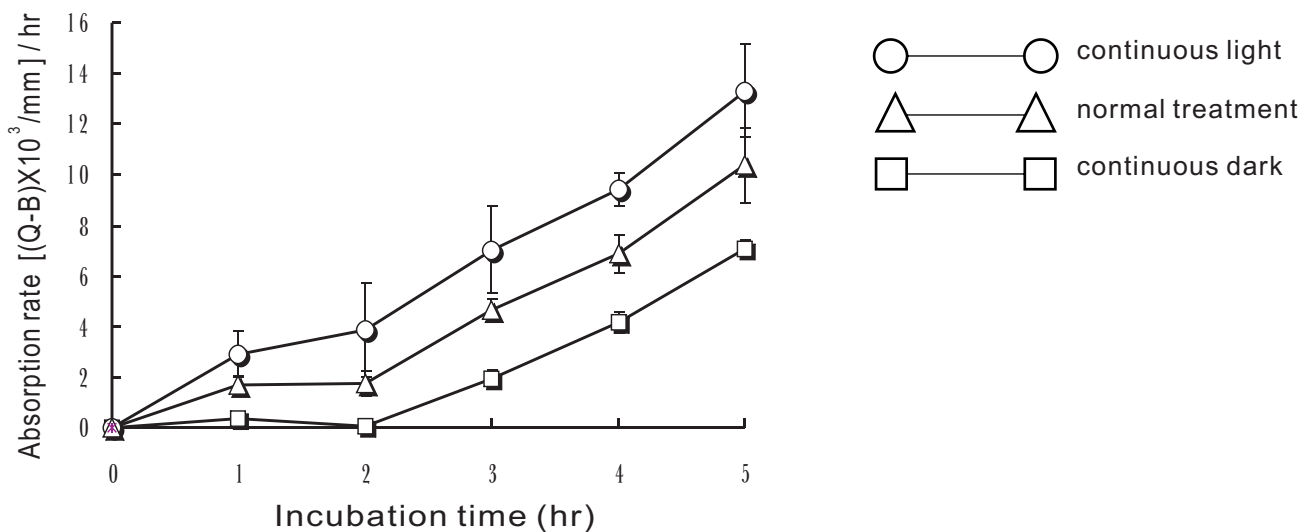


Fig. 8 Quantitative analysis of the effect of light on the rate of dye accumulation in quadrifids. The data were mean \pm SD from three independent experiments.

CONCLUSIONS

Our results have clearly demonstrated that the tracers are transported via the symplastic pathway through different tissues in the following order: terminal cells, stalks, pedestal cells, basal cells, surrounding epidermal cells, nearby leaves and finally stems. Our data also suggests that such process is energy dependent.

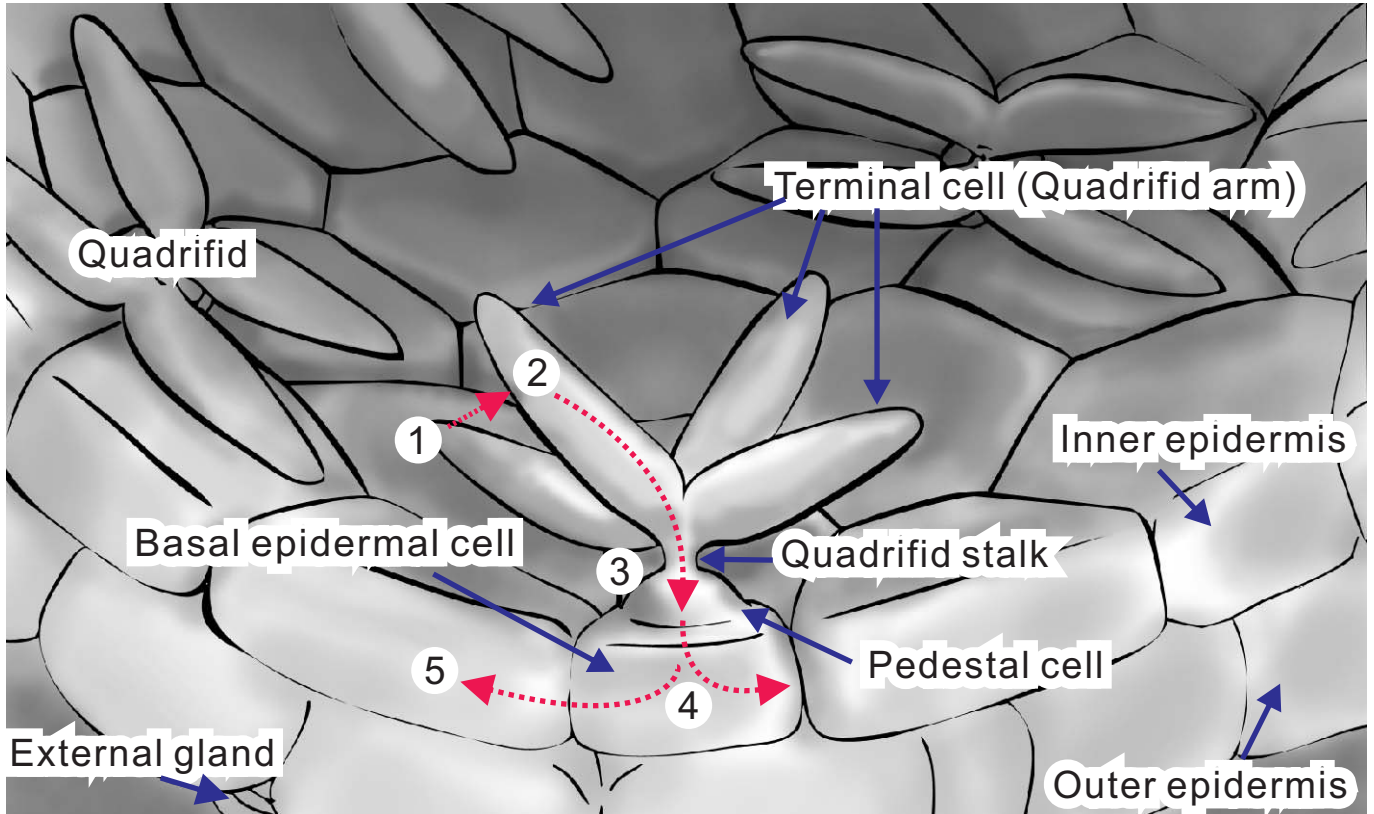


Fig. 9 Model of the symplastic pathway in the quadrifid glands of *U. gibba*.

The trap wall consists of two cell layers. On the inner epidermis rests countless quadrifids and the outer epidermis scatters dome-shaped hairs referred as external glands. Each glandular hair consists of six cells, the basal epidermal cell, pedestal cell and four terminal cells (or quadrifid arms). Solutes (food dye and CF) and water may follow a symplastic route as manifested.

① → ② → ③ → ④ → ⑤

REFERENCES

- Adamec, L. (1997) Mineral nutrition of carnivorous plants: A review. *Bot. Rev.* 63, 273-299.
- Fineran, B. A. and Gilbertson, J.M. (1980) Application of lanthanum and uranyl salts as tracers to demonstrate apoplastic pathways for transport in glands of the carnivorous plant *Utricularia monanthos*. *Eur. J. Cell Biol.* 23, 66-72.
- Fineran, B. A. (1985) Glandular trichomes in *Utricularia*: a review of their structure and function. *Israel J. Bot.* 34, 295-330.
- Grignon, N., Touraine, B. and Durand, M. (1989) 6(5)-Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. *Am. J. Bot.* 76, 871-877.
- Owen, T. P., Lennon, K. A., Santo, M. J. and Anderson, A. Y. (1999) Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Ann. Bot.* 84, 459-466.

評語

研究主題與實驗設計能配合，並有具體結果。成果的書面呈現與口頭表達都很良好。建議：1.結果的呈現能突顯主要的研究成果。2.若能設計實驗證實天然營養成分的運輸途徑會與染劑的運輸途徑相似，則更具學術意義。