

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060012

參展科別 植物學

作品名稱 ERF 參與 FT 調節植物活性氧的誘導開花

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 國立南科國際實驗高級中學

指導教師 陳郁蕙

作者姓名 詹佳容、楊昕宜

關鍵字 過氧化氫、開花、開花素

作者簡介



我是詹佳容，目前就讀國立南科國際實驗高級中學高中部二年級，從小我就很喜歡在花圃旁觀察植物，對於學習生物總是抱持著好奇的心態。我很享受在實驗室裡做實驗的過程，也很喜歡和同學討論實驗的感覺，對於能夠參與這次的國際科展真的是既興奮又感動，希望可以藉由這次的國際科展，和來自世界各國的學生分享我們的實驗成果。

大家好，我是楊昕宜，目前就讀國立南科國際實驗高級中學高中部二年級，從小，我就喜歡閱讀有關生物的書籍，無論有關人體、動物亦或是植物的知識都另我深深著迷，也不禁感嘆生命是如此微妙以及神秘。因此，當我得知有幾機會得以探索未知的生命世界時，內心感到十分的雀躍與期待。很謝謝各位給我們這個機會可以分享我們的實驗成果，在這個過程裡我們真的學到很多，讓我的學生生活有了與別人不同的體驗。

摘要

輕微乾旱會造成植物提前開花。實驗結果發現 20 mM 過氧化氫能有效促進阿拉伯芥開花。晚開花 *ft* 轉殖株噴灑過氧化氫後，沒有促進植物開花，因此 *FT* 可能參與過氧化氫控制開花。我們利用即時定量 PCR 方法證實在過氧化氫狀態下，*FT* 及其下游基因會受到誘導而表現。以 *FT* 啟動子驅動螢光基因，發現 *FT* 確實會受到過氧化氫的誘導而啟動。以次世代定序得知過氧化氫處理後，得知 ERF109 受到抑制。利用 *FT* 啟動子序列刪除及 ERF109 以基因槍實驗，得知低濃度活性氧可以充當輕微逆境下的訊號，抑制 ERF109 表現再誘導 *FT* 啟動，促使 *FT* 基因及其下游開花基因表現，使植物提早開花。

Abstract

Mild drought causes plants to flower earlier. We found that 20 mM H₂O₂ is capable of promoting early flowering in both *Arabidopsis*. When late-flowering mutant plants are treated with H₂O₂, we show that *FT* gene, which is a floral pathway integrator that promotes flowering, is likely involved in the H₂O₂-mediated flowering process. The *FT* and downstream regulated genes are involved in ROS induced flowering by real-time PCR experiments. *FT* indeed induced by ROS from the results of *FT* promoter analysis. We also found that ERF109 is repressed by ROS. Using a transient assay system, we show that ERF109 can suppress the reporter gene driven by the *FT* promoter. Based on our experimental results, we clearly demonstrate that low concentration of H₂O₂ may serve as a ROS signal to repress ERF109, then activate the *FT* and downstream genes to promote early flowering in plants.

壹、 研究動機

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

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

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

利用過氧化氫處理，我們可以觀察哪一種基因轉殖轉殖株沒有反應，藉以瞭解是哪些基因參與活性氧誘導開花的機制。我們也想透過即時定量 PCR 方法，分析過氧化氫處理植物之基因表現狀況，以確認哪些基因參與植物逆境下開花的機制。我們也想利用轉殖株（潘子明，2012），將開花基因啟動子驅動螢光蛋白，利用基因轉殖的方法，表現在阿拉伯芥中，來推論過氧化氫以及該基因的關聯性。最後我們想找到是否有轉錄因子參與在活性氧誘導開花的路徑上。

貳、 研究目的

- 一、利用次世代定序及即時定量 PCR，確認過氧化氫控制開花的基因和途徑。
- 二、以開花基因啟動子驅動螢光基因，再以過氧化氫處理，來觀察過氧化氫是否確實可以誘導該基因表現。
- 三、基因槍暫時性表現證實轉錄因子參與過氧化氫調控開花機制。

參、 研究設備及器材

一、 研究材料與器材

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

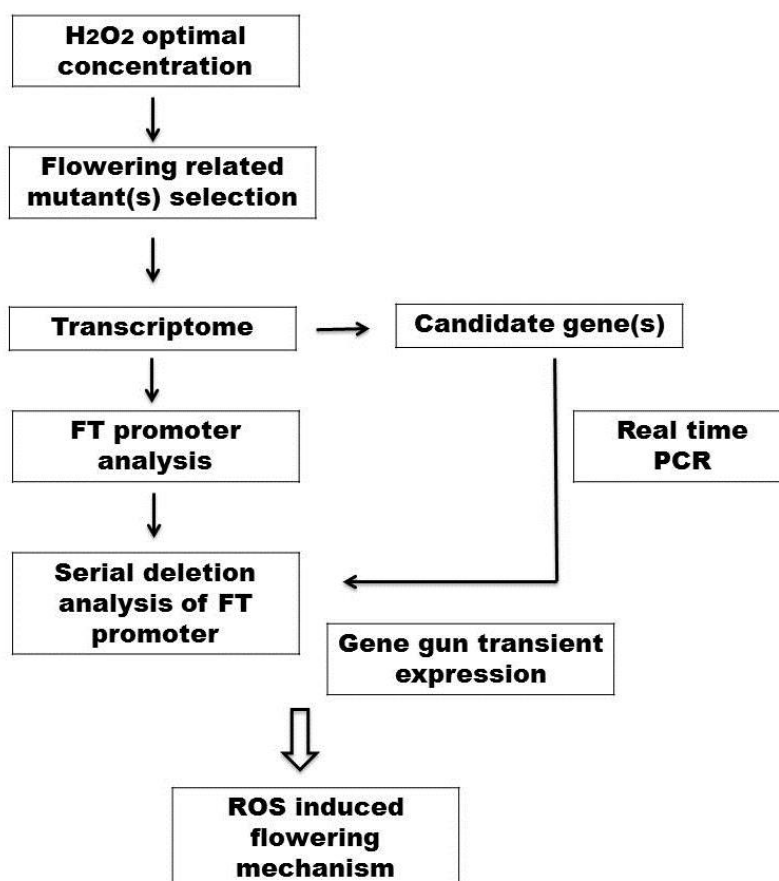
28	實驗紀錄簿	2 本	
29	相機	1 台	廠牌：Nikon

阿拉伯芥轉殖株：

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

肆、 研究過程或方法

研究策略如下：



一、 阿拉伯芥消毒、播種與移植

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

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

二、 配製過氧化氫及維生素 C

(一) 配製過氧化氫

1. 取出適當量的 30% H₂O₂ 在少量的水中。
2. 加入 50 mg/l 緩衝劑 (MES) 和 50 μl/l 展著劑 (Tween-20)，加水調整到 200ml。

(二) 配製維生素 C

1. 取適當量的維生素 C，加入少量水中讓它溶解。

2. 加入 50 mg/l 緩衝劑(MES)和 50 μ l/l 展著劑(Tween-20)，最後加水調整到 200ml。

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

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

三、分別處理野生型與阿拉伯芥轉殖株

(一) 野生型阿拉伯芥植物（大約 9 到 11 片葉子開花）

1. 將不同濃度的過氧化氫噴灑在兩週半大的阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有 6 到 8 片葉子。

2. 將不同濃度的維生素 C 噴灑在三週大的阿拉伯芥葉片上，植物葉片數約有 8 到 10 片葉子。

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

(二) 阿拉伯芥轉殖株

1. 早開花阿拉伯芥轉殖株（大約 5 到 8 片葉子開花），於此植物 4 到 6 片葉子時，做維生素 C 噴灑處理。

2. 晚開花阿拉伯芥轉殖株（大約 30 片葉子開花），於此植物在植物 20 片葉子時做過氧化氫噴灑處理。

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

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

四、即時定量 PCR（Real-time PCR）分析

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

抽取 RNA 方法與次世代定序分析相同。取得 RNA 後，先使用 First-strand cDNA synthesis kit（Promega）製備阿拉伯芥 cDNA。取 3 μ g total RNA 加入 1 μ l 10 μ M oligo dT，加入 DEPC 水至 10 μ l，混合均勻後置於 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，迅速至於冰上 5 分鐘。加入 6 μ l M-MLV RT 5X Reaction buffer[25 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 3 μ l 10 μ M dNTP, 0.5 μ l M-MLV RT, 0.1 μ l RNase inhibitor，加入 DEPC 水補至 30 μ l。置於 42 $^{\circ}$ C

反應 1 小時，72°C 反應 10 分鐘，加入 70 µl 無菌水。

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

五、測定植物體內過氧化氫含量

植物取材時間點是以早開花植物已開花時，即刻採收樣品。取十株植物作為實驗材料，加入 3 毫升 sodium phosphate (50 mM, pH 6.8) 溶液研磨。4°C 下 6000 g 離心 25 分鐘。取上層液放在冰上備用。取 2 毫升上層液和 1 毫升 TiCl₄ [titanium chloride (0.1%, v/v) 溶於 20% (v/v) H₂SO₄]。振盪均勻後，於室溫下以 5000 g 離心 15 分鐘。以分光光度計測 A₄₁₀。TiCl₄ 劇毒，配置時要戴手套並在通風廚中操作。H₂O₂ 含量 (µmolg⁻¹FW) = A₄₁₀ / 0.28 (K = µmolg⁻¹cm⁻¹) X 1.5 (dilution) / FW (g)。

六、過氧化氫誘導 *FT* 啟動子驅動螢光基因轉殖株

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

七、以基因槍進行暫時性表達實驗

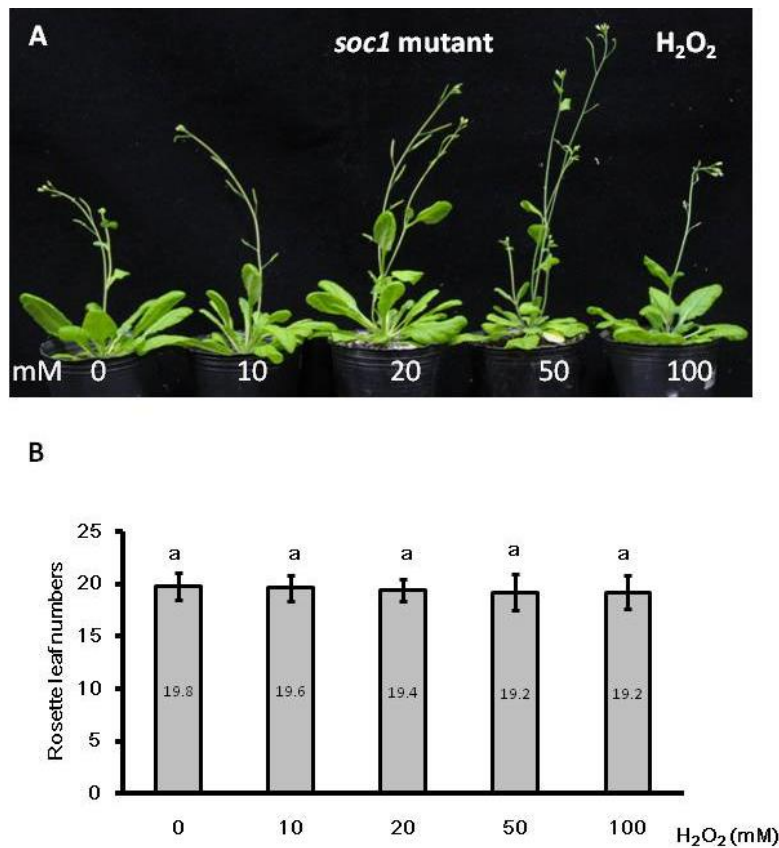
以 8K 的 *FT* 啟動子驅動螢光基因的載體為模版，利用序列刪除進行 *FT* 啟動子 6K 啟動子的選殖。中間對照 (internal control) 為 pBI221，對照組為 *mini35S* 啟動子驅動螢光基因。作用載體則是以 35S 啟動子驅動 *ERF109* 基因。實驗則是以基因槍轟擊於阿拉伯芥葉子上。再以螢光反應 kit 抽取蛋白質，再以螢光反應器讀取作用後的螢光讀值。作用載體則是以 pJD301 中的螢光基因以 *ERF109* 基因取代。

伍、 研究結果

我們先前的實驗已經證實 20 mM 的過氧化氫可以促進植物開花，*ft* 轉殖株處理過氧化氫則不會提早開花，顯示 *FT* 可能是活性氧誘導開花的重要基因（詹等人，2013）。我們進一步以 *FT* 下游的基因突變植物做相類似試驗，以探討活性氧誘導開花的路徑。

壹、 *soc1* 轉殖株處理過氧化氫。

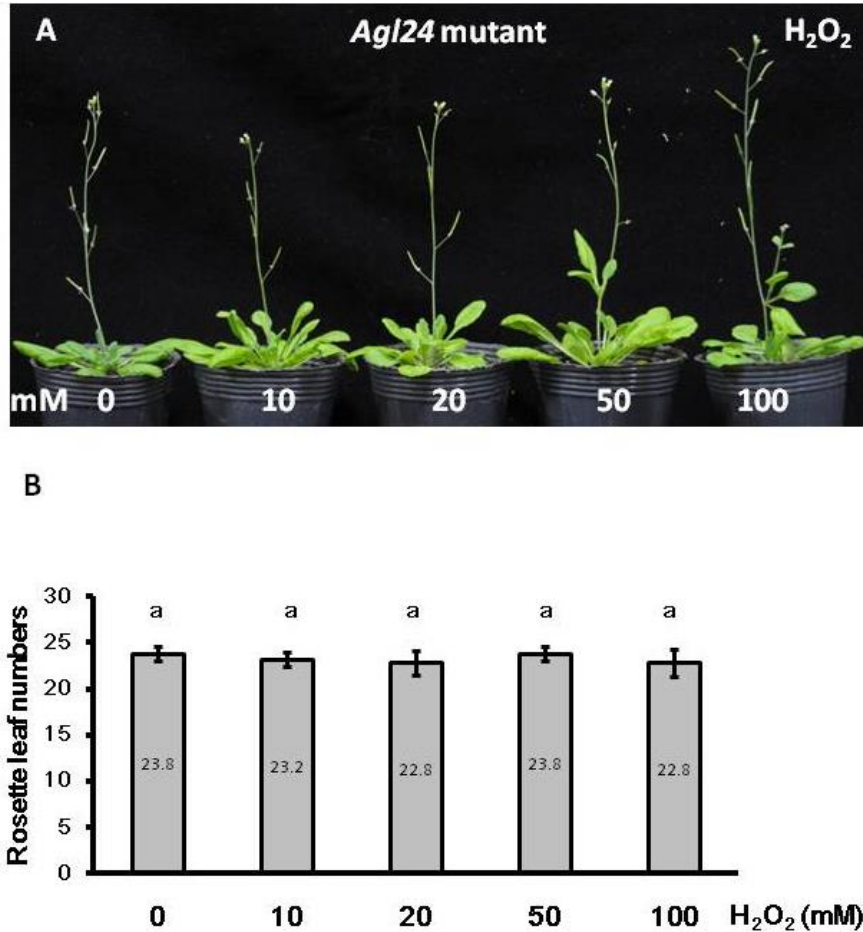
以 0 mM 的過氧化氫為對照組，在 20 片葉子時有花苞產生，其他處理組都跟對照組一樣，在 20 片葉子時有出現花苞（圖一）。此結果可知 *SOC1* 基因影響過氧化氫促進開花的效果，表示 *SOC1* 基因可能跟活性氧促進開花有直接的關聯性。我們先前也有做過類似實驗，但是後來發現原本的 *soc1* 轉殖株生長可能被污染，後代族群並未有相同開花特性，所以我們又重複這個實驗。



圖一、噴灑 H₂O₂ 後，*soc1* 轉殖株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差（standard deviation）。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。

貳、 *agl24* 轉殖株處理過氧化氫

agl24 轉殖株的處理結果與 *soc1* 轉殖株的結果相類似 (圖二)。0 mM 的過氧化氫，為對照組，在 24 片葉子時有花苞產生。其他處理組都跟對照組一樣，在 24 片葉子時有出現花苞。此結果可知 *AGL24* 基因影響過氧化氫促進開花的效果，表示 *AGL24* 基因可能跟活性氧促進開花有直接的關聯性。



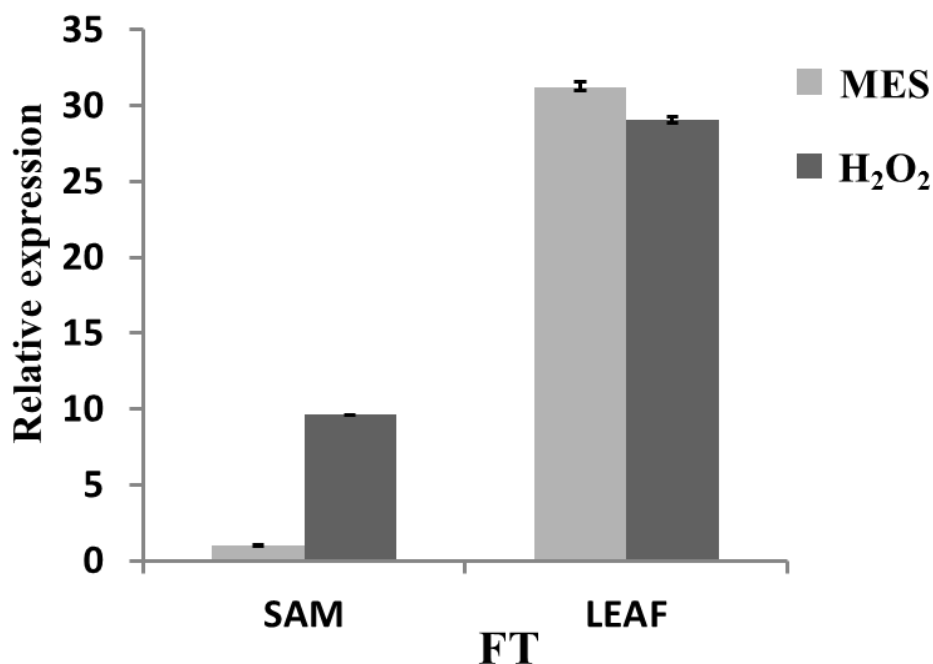
圖二、噴灑 H₂O₂ 後，*agl24* 轉殖株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。

參、以即時定量 PCR 檢測活性氧誘導開花基因之表現

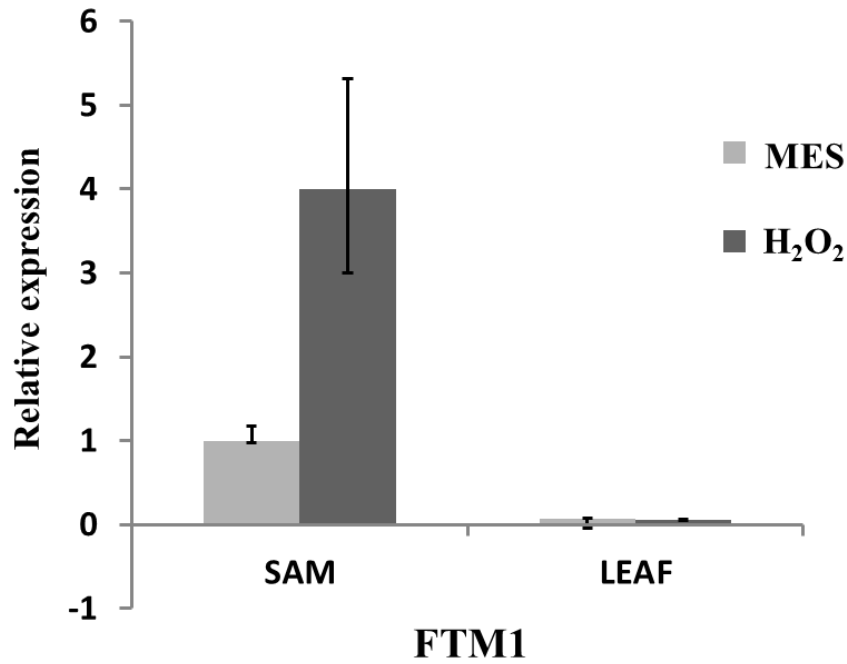
我們挑出 *FT* 下游的基因，設計 specific primer (附錄二) 後，收取處理與未處理的葉片及莖頂生長點樣本，進行即時定量 PCR (Quantitative real-time PCR) 驗證是否能得到同樣的表現情形。這些基因大多是位於 *FT* 的下游或是不同途徑調控著開花途徑的整合基因。我們以對照組之生長點基因表現倍率為 1 倍，來看相對表現的情形。

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

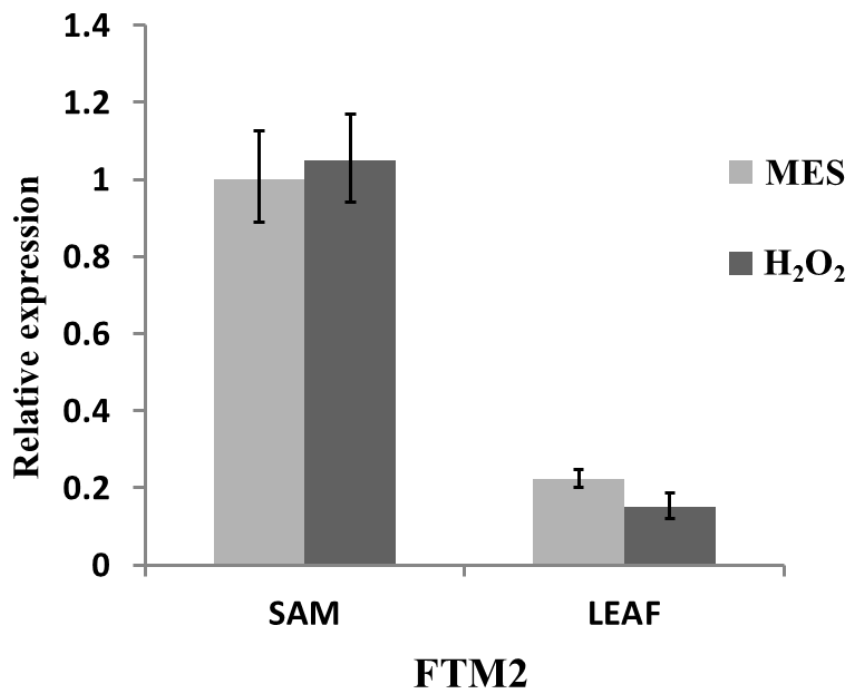
另外 *FTM1*, *FTM4*, *FTM5* 在生長點被誘導的情形也跟 *FT* 基因的表現情形相類似 (圖四，圖七，圖八，圖九)。*FTM6* 則是在莖頂生長點及葉子中，皆會被過氧化氫誘導表現。而 *FTM2* 及 *FTM3* 的表現則在處理與未處理之間，表現差異不顯著 (圖五及圖六)。*API* (圖十) 在生長點的 RNA 也在過氧化氫處理下，被大量誘導。這個結果顯示開花基因確實被活性氧誘導而啟動。



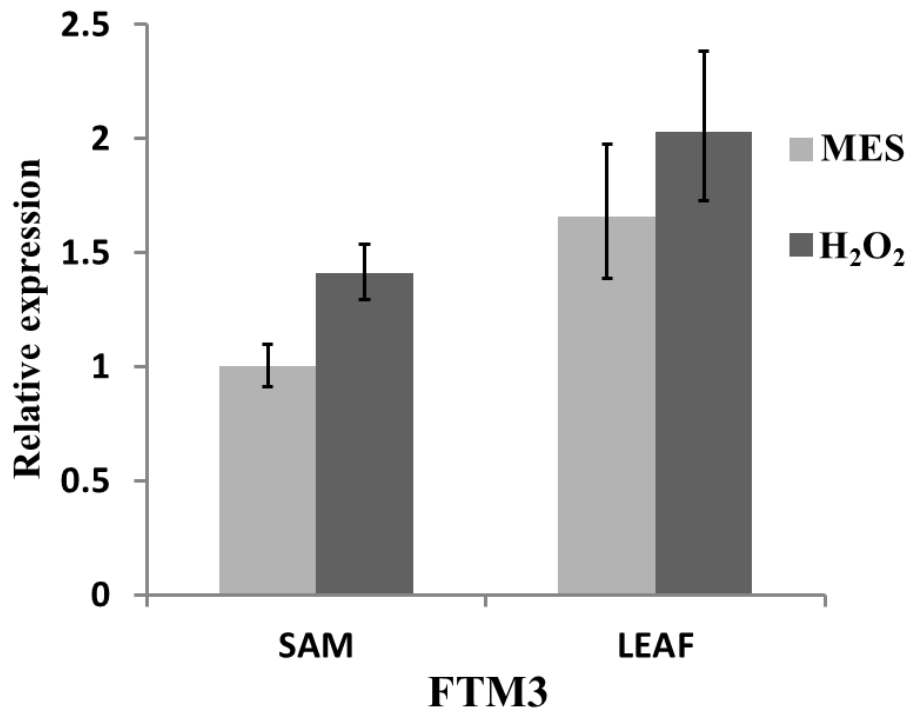
圖三、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FT* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FT* 基因被過氧化氫大量誘導。



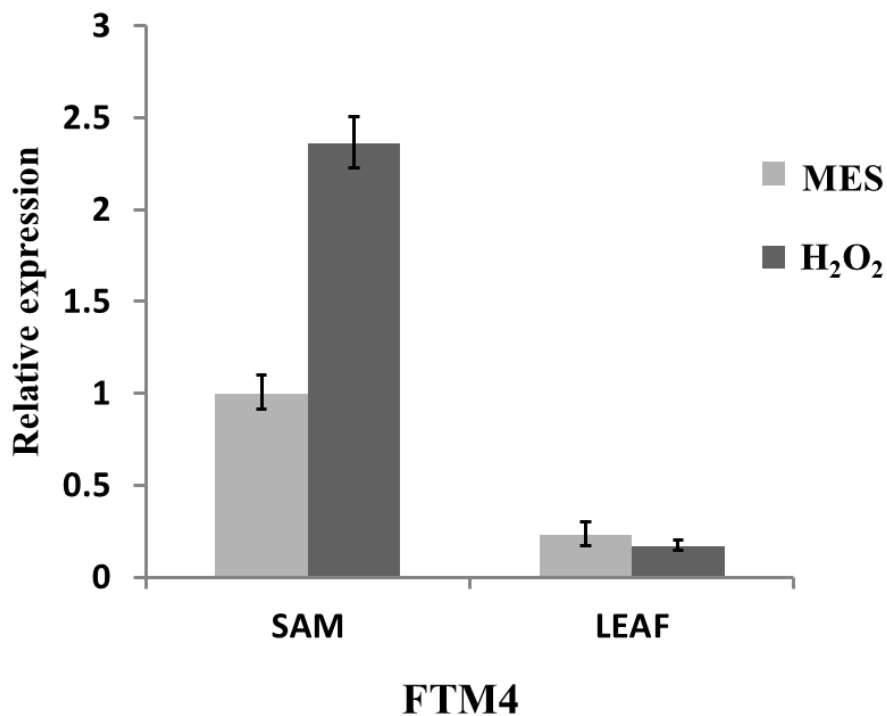
圖四、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FTM1* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM1* 基因被過氧化氫大量誘導。



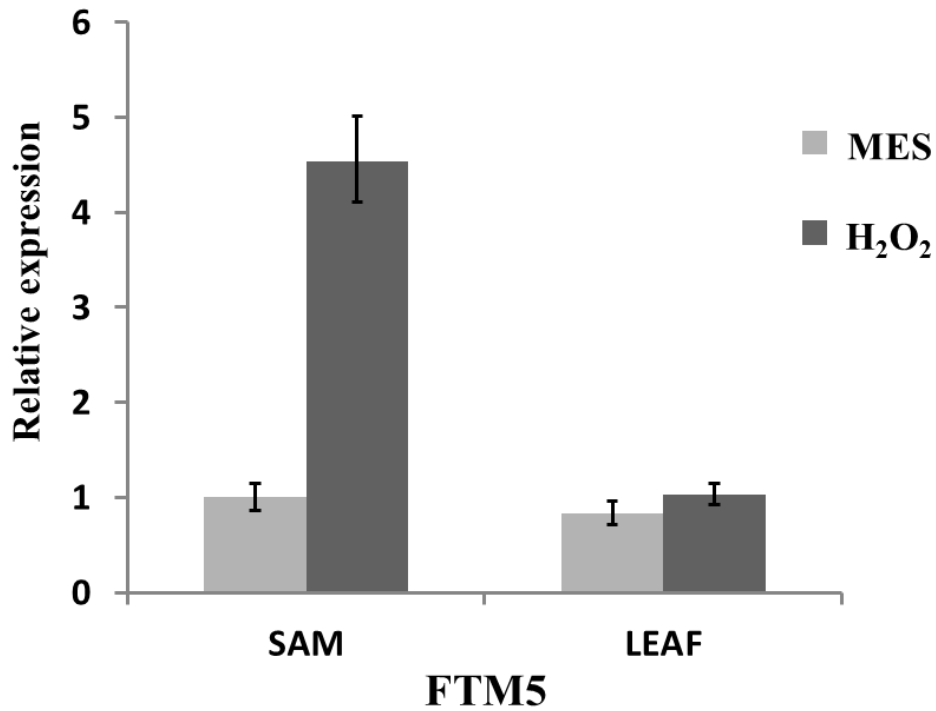
圖五、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FTM2* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM2* 基因在處理與未處理間差異不顯著。



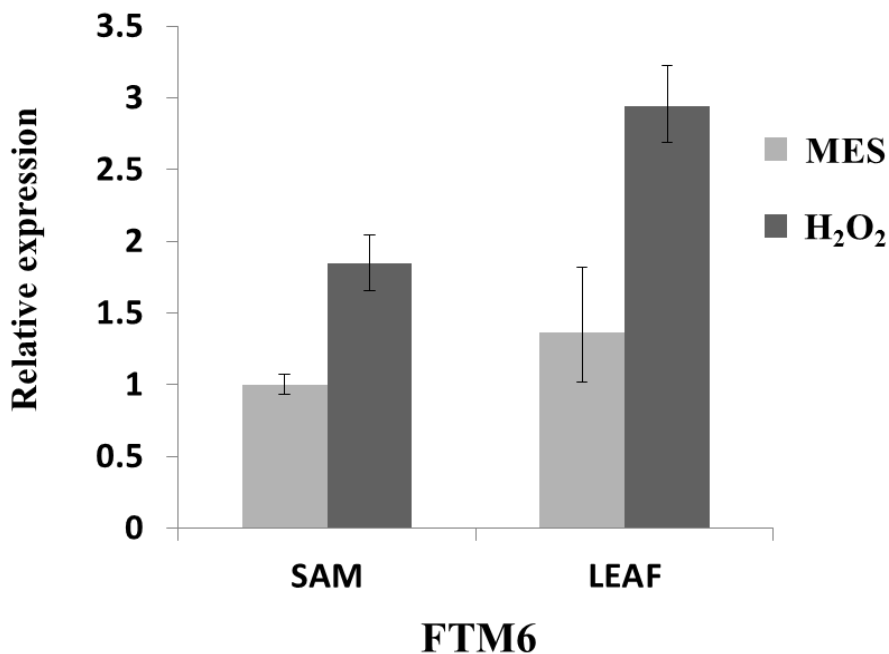
圖六、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FTM3* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM3* 基因在處理過氧化氫後，有略微增加表現量。



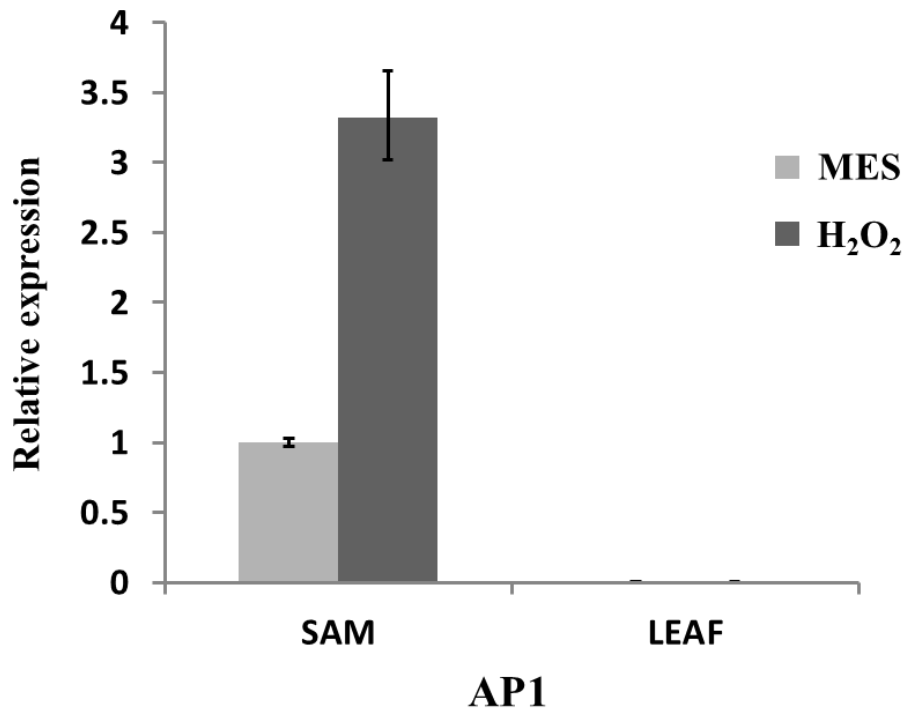
圖七、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FTM4* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *FTM4* 基因會被過氧化氫大量誘導。



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



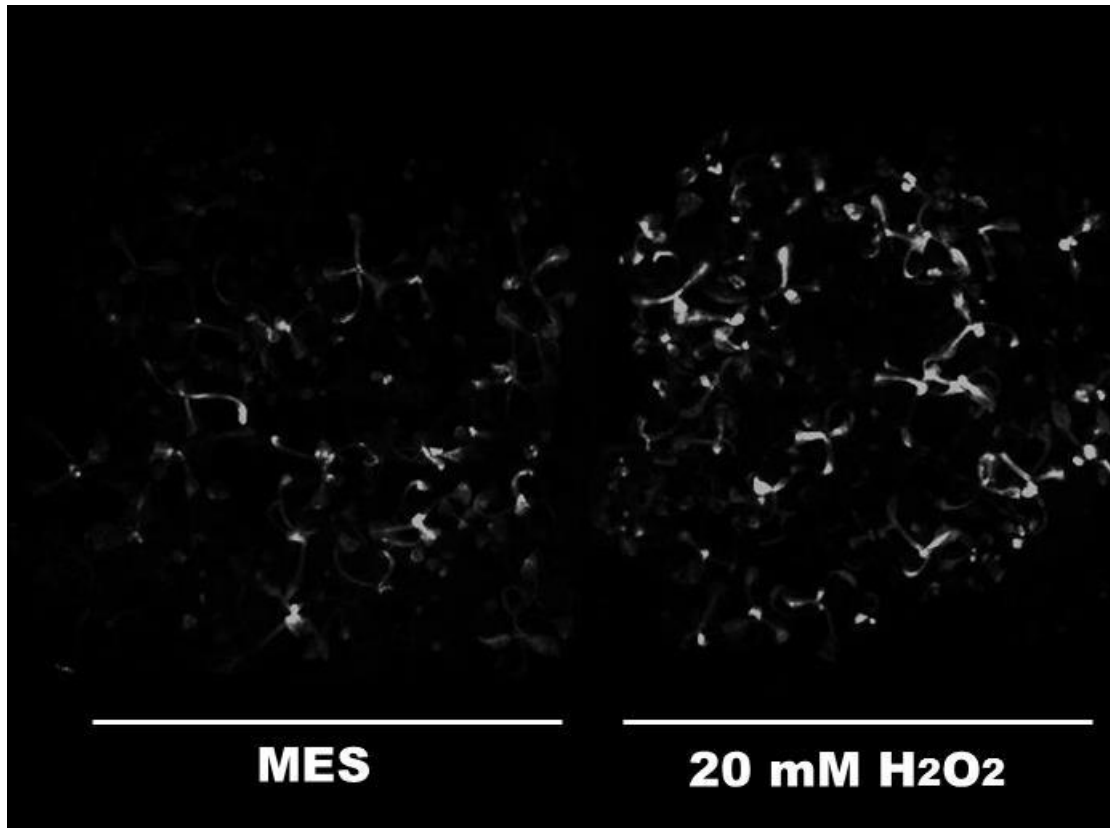
圖九、過氧化氫與對照組(MES)處理，*FTM6* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點及葉片中 *FTM6* 基因會被過氧化氫大量誘導。



圖十、過氧化氫與對照組(MES)處理，*API* 基因在分別在葉子(LEAF)及生長點(SAM)表現的情形。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示莖頂生長點 *API* 基因會被過氧化氫大量誘導。

肆、以 *FT* 啟動子驅動螢光基因驗證 *FT* 基因受活性氧誘導

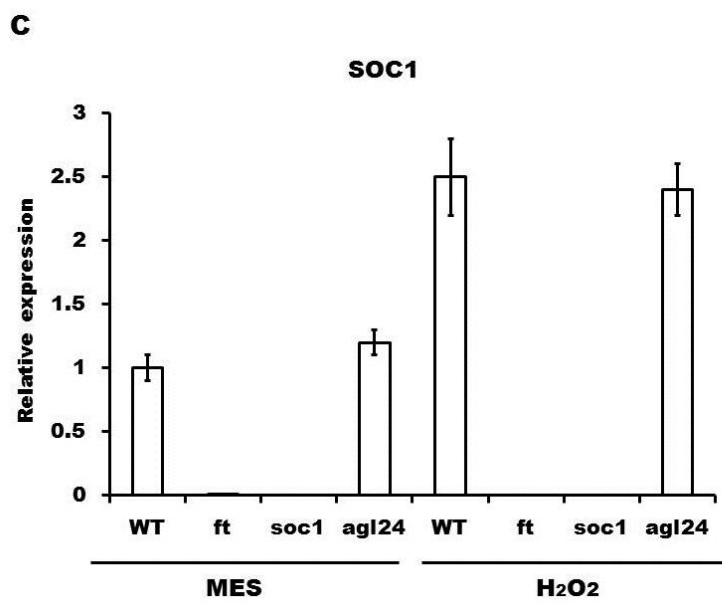
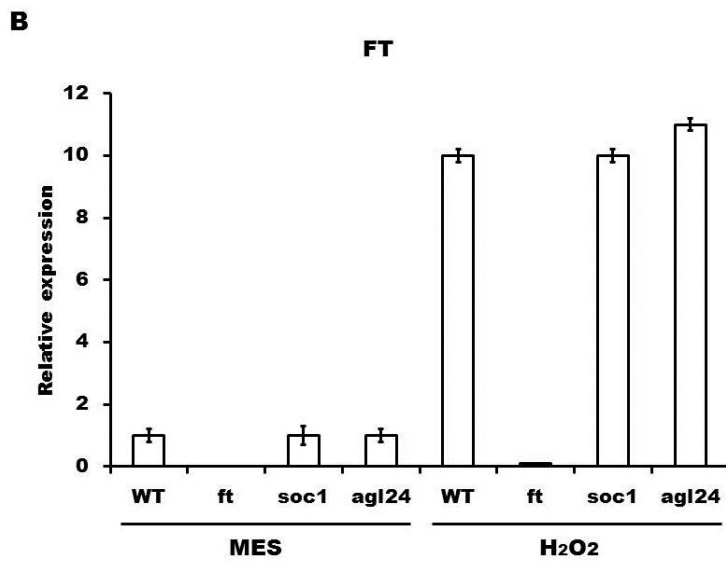
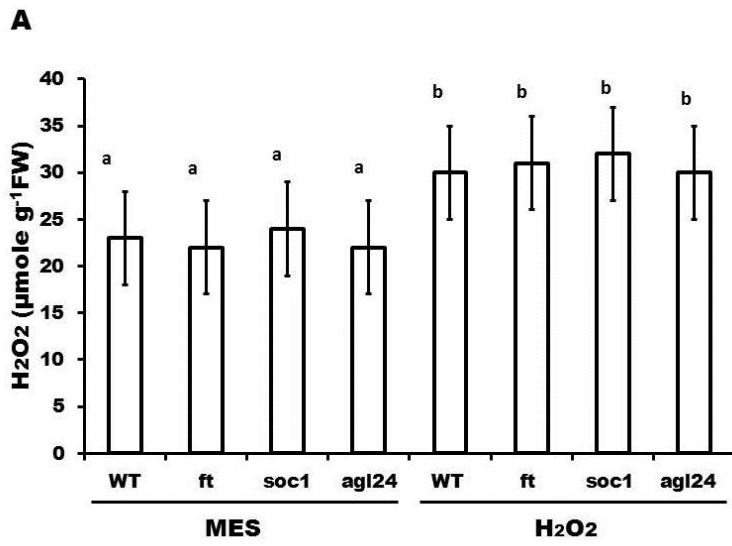
因為基因是受到啟動子驅動而表現，如果啟動子會受到誘導，則後面的基因就會表現。啟動子則會受到生物內外因子所影響，使基因在不同時間、不同組織、不同環境而表現。我們利用 *FT* 啟動子來驅動螢光基因 *Luciferase*，如果 *FT* 啟動子會受到過氧化氫的誘導，那麼螢光基因就會表現，使植物發出螢光。實驗結果發現對照組 (0 mM H₂O₂) 會呈現螢光，這是因為 *FT* 啟動子會受到光線誘導。與對照組比較，經過五天處理 20 mM 過氧化氫後，螢光基因大量表現。螢光的強度遠大於對照組，這個結果顯示 *FT* 啟動子會受到過氧化氫的誘導 (圖十一)。我們也做了暗處理，然後再做螢光照相，則無論有無處理過氧化氫，都沒有螢光產生 (結果未顯示)。這結果也暗示 *FT* 啟動子受過氧化氫誘導，需要有光照才能持續激發。

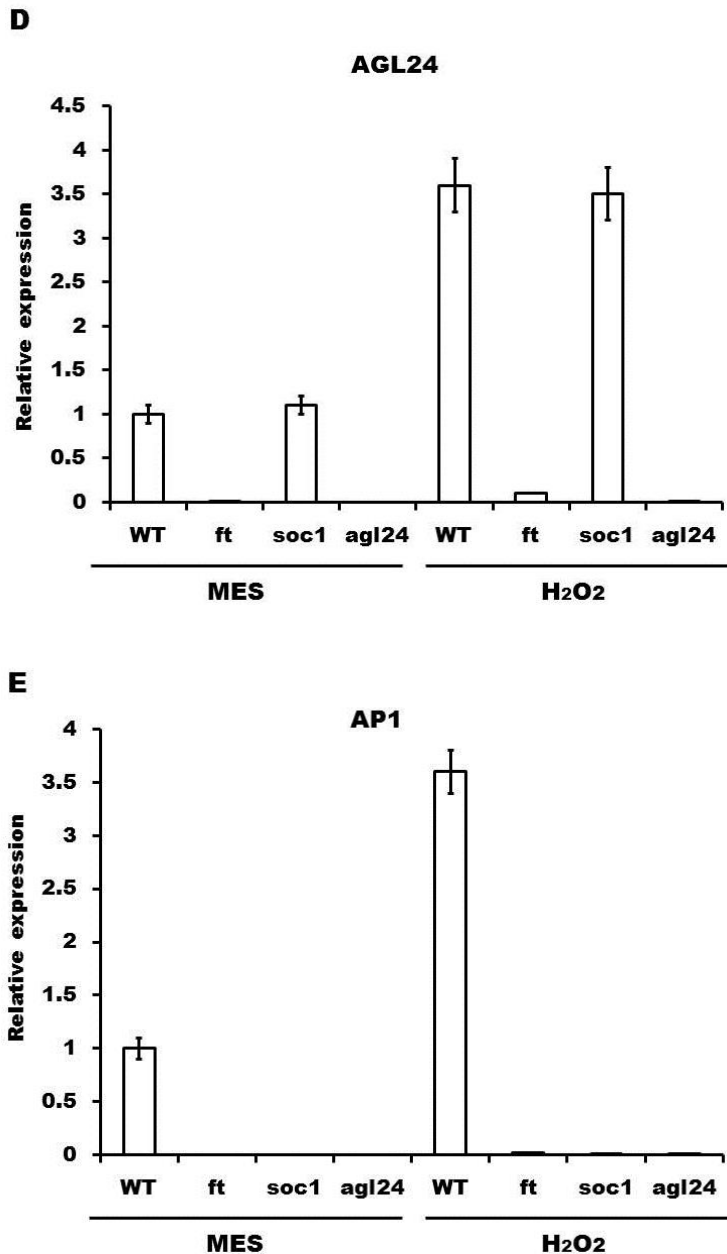


圖十一、帶有 *FT* 啟動子驅動螢光基因的轉殖株，經過 20 mM 過氧化氫誘導後，其螢光表現情形。圖左邊是過氧化氫處理，圖右邊是對照組處理。經過過氧化氫處理 5 天後，處理組會比對照組激發較強的螢光。

伍、 野生型及突變植物內生性過氧化氫含量及開花基因表現

處理過氧化氫後，野生型植物開花時，將所有植物（包含轉殖株）進行植物體內過氧化氫含量偵測，結果野生型與轉殖株體內過氧化氫的含量皆類似，而處理過氧化氫會提高野生型與轉殖株之內生過氧化氫含量（圖十二 A）。我們進一步以即時定量 PCR 偵測 *FT* 的表現，發現以過氧化氫處理後，野生型及 *soc1*, *agl24* 轉殖株的 *FT* 表現均增加，再次證實 *FT* 受到活性氧誘導，*ft* 轉殖株則因為 *FT* 被破壞而不受過氧化氫誘導（圖十二 B）。而 *SOC1*（圖十二 C），*AGL24*（圖十二 D）也是呈現相類似的情形，且 *ft* 轉殖株之 *SOC1* 及 *AGL24* 無論有無過氧化氫處理均不表現，顯示 *SOC1* 及 *AGL24* 為 *FT* 之下游基因，與前人研究相符。*API*（圖十二 E）在過氧化氫的處理下，僅有野生型植物能正常受到過氧化氫的誘導，*ft*, *soc1*, *agl24* 轉殖株之 *API* 則不受過氧化氫誘導，可知 *API* 為 *FT*、*SOC1*、*AGL24* 參與活性氧誘導開花機制中的下游基因。





圖十二、野生型、*ft*、*soc1* 及 *agl24* 轉植株處理過氧化氫後基因表現情形。(A) 過氧化氫含量。(B) *FT* 基因表現。(C) *SOC1* 基因表現。(D) *AGL24* 基因表現。(E) *API* 基因表現。以對照組之生長點基因表現為 1 倍，顯示野生型之莖頂生長點 *FT*、*SOC1*、*AGL24* 及 *API* 基因會被過氧化氫大量誘導，*ft*、*soc1* 及 *agl24* 轉植株則因基因被破壞而對過氧化氫無反應。

陸、 ERF109 調節 *FT* 的暫時性表現

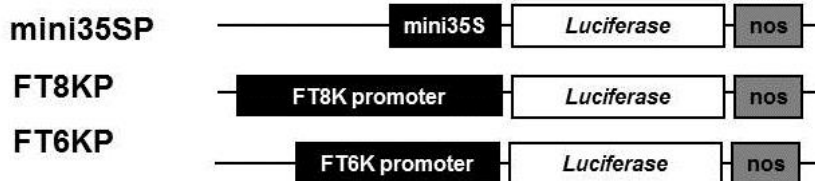
以次世代定序分析找到 *ERF* (Ethylene response factor / Ethylene-responsive element binding factor) 基因也會受到過氧化氫誘導而表現 (資料未顯示)，因此我們進一步探討 *ERF* 是否為過氧化氫處理下影響 *FT* 啟動子而調節植物開花的轉錄因子，同時也繼續分析 *FT* 啟動子上哪一段為受過氧化氫誘導使轉錄因子影響 *FT* 表現的序列。

以暫時性表現系統處理過氧化氫，各個載體示意圖顯示在圖十三 A 中。暫時性表現顯示

8K 的啟動子 (FT8KP) 確實會受到過氧化氫的處理而誘導約 1.7 倍，而 6K 啟動子 (FT6KP) 則不受過氧化氫的處理而誘導。在 ERF109 的作用下，沒有過氧化氫存在下，*FT* 會被抑制至 0.4 倍。在過氧化氫處理下，ERF109 會抑制 *FT* 表現至 0.69 倍 (圖十三 B)。而 FT6K 啟動子並不會受過氧化氫及 ERF109 調節 (圖十三 B)。這些結果顯示，ERF109 會抑制 *FT* 啟動子表現，FT8K 和 6K 啟動子區域間，有一個 ERF109 結合的位置。而在過氧化氫處理下，ERF109 會受到抑制 (圖十三 C)，我們推論 ERF109 會抑制 *FT*，但在過氧化氫處理下，ERF109 表現降低，所以這種抑制效果降低，進而使得 *FT* 開始累積表現，再促進 *FT* 下游的基因群去調節植物開花。我們的結果也證實 *FT* 確實會受到過氧化氫的誘導及 ERF109 的調節。在 PlantCare 軟體的分析下，*FT* 啟動子約 6~7K 間確實有 GCC box (圖十四)，而這區域確實是 ERF 轉錄因子的結合位置。

A

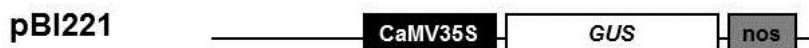
Reporter plasmid

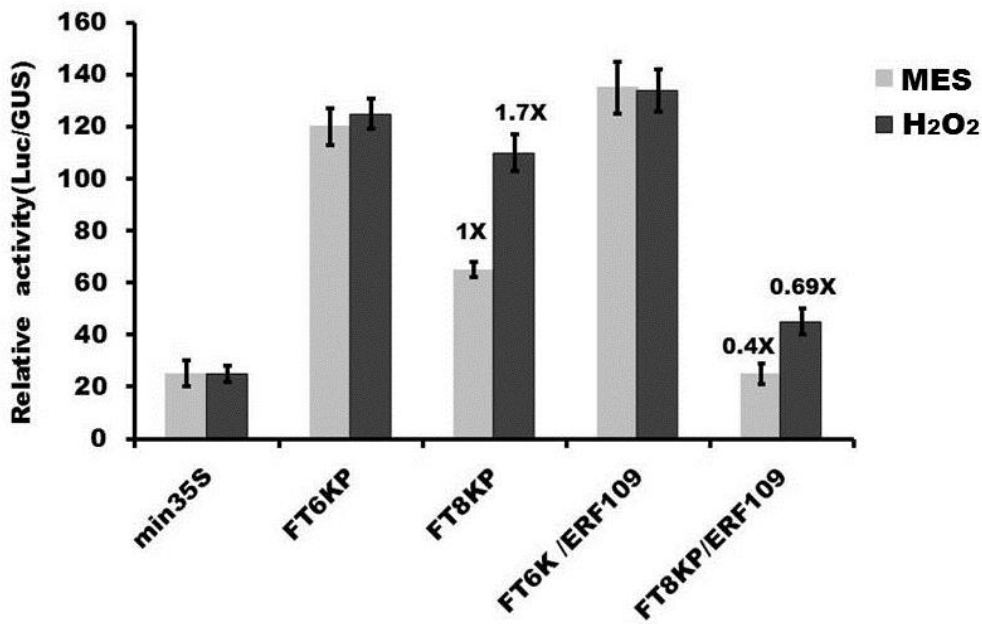
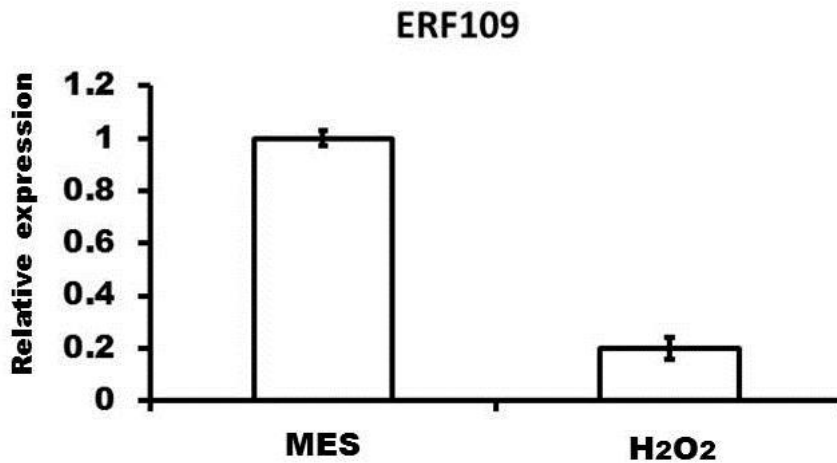


Effector plasmid

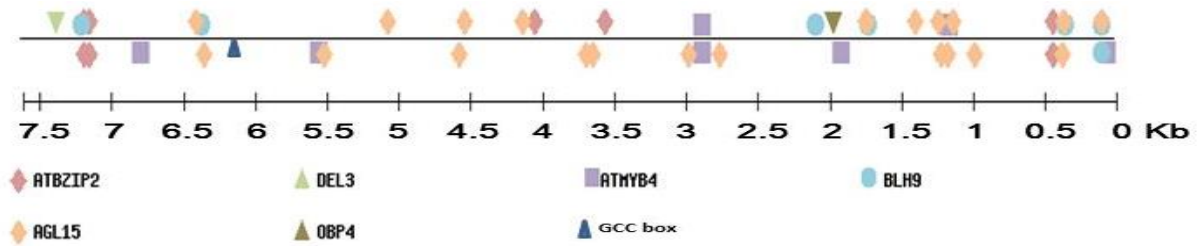


Internal control



B**C**

圖十三、*ERF109* 調節 FT 啟動子。(A)報導載體，中間對照載體，作用載體的結構示意圖。報導載體是 mini3，FT8K 及 FT6K 啟動子驅動螢光基因。作用載體則是 *ERF109* 基因以 35S 啟動子驅動。中間對照組則是 pBI221 載體。(B)基因槍暫時性表現螢光讀值。各個實驗皆重複三次。作用載體與報導載體及中間對照載體皆一起轟擊在阿拉伯芥葉子上。(C) 在過氧化氫處理下，*ERF109* 的基因表現。



圖十四、FT 啟動子結構圖。其中在接近 6K 處有 GCC box，此為 ERF 轉錄因子結合位置。

陸、 討論

一、過氧化氫和維生素 C 對植物的影響

植物遭受逆境後，會產生活性氧（ROS）， H_2O_2 （過氧化氫）是活性氧的一種，而維生素 C 可以抑制過氧化氫（蔣永正，2011）。

低濃度的過氧化氫可作為過氧化氫訊息來促進開花，我們認為輕微逆境，在植物不至於死亡的情況下，逆境所造成的訊息會使植物得知，此環境不適合生長，因而使其盡速開花繁殖後代，以利於綿延生存。低濃度的維生素 C 可抑制過氧化氫濃度，進而抑制開花。我們認為低濃度的維生素 C 抑制過氧化氫後，植物認為此環境良好，利於生存，進而繼續生長，使得原本花期延後。也有其他研究指出，綠豆幼苗或蝴蝶蘭的幼苗以過氧化氫進行前處理，再接受低溫的逆境可以得到保護，而減輕低溫的傷害(Yu et al., 2002)。

我們利用晚開花轉植株 (*soc1* 和 *agl24*)，來做過氧化氫的處理實驗。因過氧化氫會促進開花，而早開花轉植株本身即會提早開花，如果將早開花轉植株做過氧化氫處理，會不知早開花的效果是由何者導致，再加上處理後結果也不明顯（一開始，我們對早開花株做過氧化氫噴灑實驗，但是發現噴灑後，每一種濃度處理和對照組都會同時開花）。所以，我們對晚開花轉植株噴灑過氧化氫，看看溶液影響開花的效果是否也會在轉植株中出現，並試圖找出相關的基因。

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

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

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

二、活性氧誘導開花基因

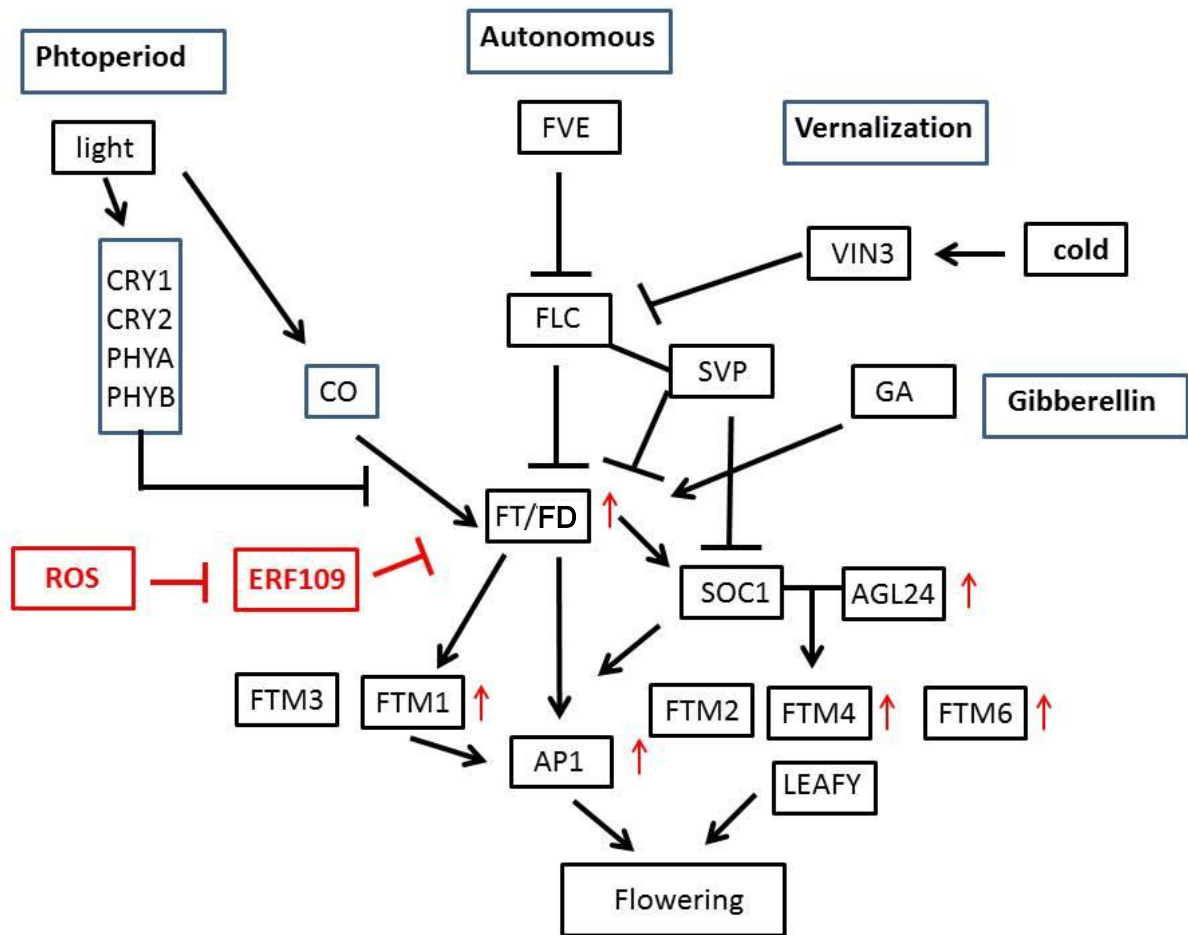
為了證實這些基因參與過氧化氫刺激開花，我們做了即時定量 PCR 分析。結果指出，在 H_2O_2 處理後我們可以清楚的看到在生長點有許多開花基因被誘導出來，但是在葉子部份，各基因的 RNA 並沒有顯著的被誘導。同時我們也證明分開葉子和生長點組織是一項對的實驗手段，這也是為什麼我們先前做整株植物的生物晶片分析，並沒有得到完整結果的原因（數據並未顯示）。在不同組織中，基因的表現也是有很大的差異的。而花是從生長點開始形成，所以有不同基因表現在不同空間上的現象，也是生物的一種有趣現象。

根據 Torti 等人 (2012) 年的研究 (附錄四), 發現 *FT* 下游控制開花還有不少基因參與, 從 *FTM1-FTM6* 基因都參與開花機制。在我們的實驗中, 以即時定量 PCR 都顯示, 這些基因除了 *FTM2* 及 *FTM3* 基因外都參與在活性氧誘導開花的機制中。我們先挑選了 *FT* 做研究, 結果都暗示 *FT* 基因確實受到過氧化氫的誘導而大量啟動。而 *FT* 是開花素 (蔡, 2009), 所以這些 *FT* 下游的基因確實是受到 *FT* 的影響而啟動的。另外 *SOC1*, *LFY*, *API*, *SPL3* 都是 *FT* 的下游基因 (Higginset al., 2010), 而轉殖株以及即時定量 PCR 的結果, 都顯示這些基因也參與在低濃度活性氧誘導開花的機制中。而目前的證據, 顯示 *FT* 確實扮演重要角色, 這跟之前我們做 *ft* 轉殖株所做的實驗結果相吻合。

在 *FT* 啟動子誘導實驗中, 我們也發現在剛處理過氧化氫時, 前三天處理組和對照組的螢光反應並沒有顯著差異 (結果並未顯示)。這個結果與我們對野生型植物處理過氧化氫時開花時間的促進效果相類似。而處理第四天, 雖然有些微差異, 但是照相結果並未顯示顯著差異。這個結果和野生型植物處理過氧化氫四天後, 開始有花原基出現的現象十分吻合。但也不是所有處理植物都出現開花現象。轉殖株實驗也證實, 植物在處理過氧化氫後, 體內過氧化氫含量確實提高 (圖十二), 而突變植物並未有早開花現象是因為基因受到突變, 無法完成開花動作 (圖十二), 這也顯示 *FT* 確實是受到活性氧誘導開花的重要因子。這個結果顯示在活性氧未致死濃度下, 這個逆境誘導的開花訊號是慢慢累積的, 並促使植物開花並延續後代。

暫時性表現結果充分證實, *ERF109* 參與活性氧誘導植物早開花的調控機制中。*ERF109* 會抑制 *FT* 啟動子的表現, 在過氧化氫存在下 *ERF109* 會受到抑制, 當 *ERF109* 的表現降低後, *FT* 會受到誘導, 進而調節下游基因促進植物開花。

最後, 我們推出一個過氧化氫誘導開花的途徑 (圖十五)。在未致死濃度下, 活性氧在光照情形下誘導 *FT* 表現。我們從前人的研究中發現 *FT* 可與一個轉錄因子 *FD* 結合, 去誘導下游開花基因表現, 進而促使植物提早開花 (Abe, et al., 2005) 然而在即時定量 PCR 中發現 *FD* 基因的表現沒有差異, 顯示 *FD* 為開花所需的轉錄因子, 並不因為過氧化氫處理而使 *FD* 大量表現。而 *ERF109* 轉錄因子則被活性氧抑制表現, 進而促進 *FT* 基因表現造成植物提早開花, 為參與在活性氧誘導開花的轉錄因子。



圖十五、活性氧 (ROS) 誘導植物開花的途徑。活性氧累積後，在未致死濃度下，會誘導 *FT* 表現。*FT* 再去誘導其他下游開花基因的表現，進而使植物提早開花。ROS 誘導及抑制的紅色箭頭是實驗中所得到的推論。紅色 T 型箭頭 (—|) 表示該基因被抑制表現。ROS 抑制 ERF109 表現，ERF109 抑制 *FT* 表現。整體而言，ROS 促進 *FT* 表現而使植物提早開花。

柒、 結論

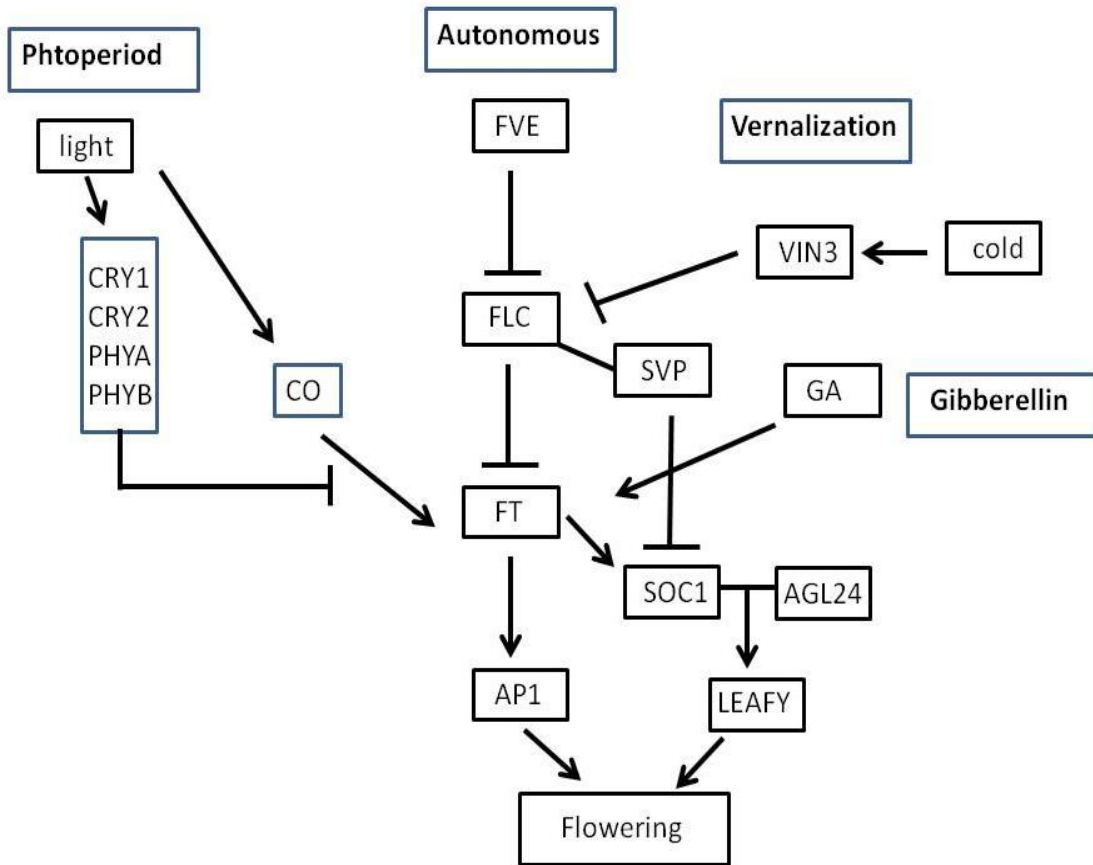
- 一、活性氧是輕微逆境下的一個訊號，低濃度過氧化氫 (20 mM) 可以促進植物提早開花。
- 二、即時定量 PCR 及 *FT* 啟動子誘導的實驗結果，都顯示 *FT* 是活性氧調節植物開花的重要基因。
- 三、ERF109 表現會受到活性氧的抑制，ERF109 會抑制 *FT* 的表現。分析 *FT* 啟動子序列中確實有 ERF 結合的 GCC box。
- 四、活性氧促進 *FT* 及其下游基因表現，是透過抑制 ERF109 這個抑制型轉錄因子，使得 *FT* 的表現可以提高，再促進開花。

捌、 參考資料及其他

- 黃信端 (2005) 。H₂O₂ 對水稻根部細胞生長及對其 MAPK 活性之研究。94 年度高級中學基礎科學資優人才培育計畫期末報告。
- 詹佳容、楊昕宜、鄭茲庭 (2013) Low concentration of ROS is the key factor to regulate flowering under stress condition. 2013 年臺灣國際科學展覽會研究報告書。
- 蔡任圃 (2009) 。揪出開花素的本尊 – 開花素是 mRNA 還是蛋白質? 科學月刊, 479, 885-857。
- 蔣永正 (2011) 植物對環境逆境之調控與應用。農情與農政。第 231 期。
<http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=24091>
- 潘子明 (2012) 農業生物技術大躍進。正確認識基因改造作物，邁向綠色永續未來。作物永續發展協會出版。
- Higgins, J.A., Bailey, P.C., and Laurie, D.A. (2010) . Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLoS One* 5 : 10065.
- Oh, S.K., Baek, K.H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Park, J.M., et al. (2010) CaMsrb2, pepper methionine sulfoxide reductase B2, is a novel defense regulator against oxidative stress and pathogen attack. *Plant Physiol.* 154: 245-261.
- Torti, S., Fornara, F., Vincent, C., Andre's, F., Nordstro"m, K., Go"bel, U., Knoll, D., Schoof, H., and Coupland, G. (2012) Analysis of the Arabidopsis shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* 24: 444-462.
- Yu, C.-W., Murphy, T.M., Sung, W.-W., and C.-H. Lin. (2002) . H₂O₂ treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Functional Plant Biology* 29:1081-1087.
- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. (2005) .FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052-1056.

附錄一

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



附錄二

即時定量 PCR 引子序列

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

附錄三

先前實驗部份結果（2013 年臺灣國際科學展覽會研究報告書）

一、過氧化氫對植物的影響

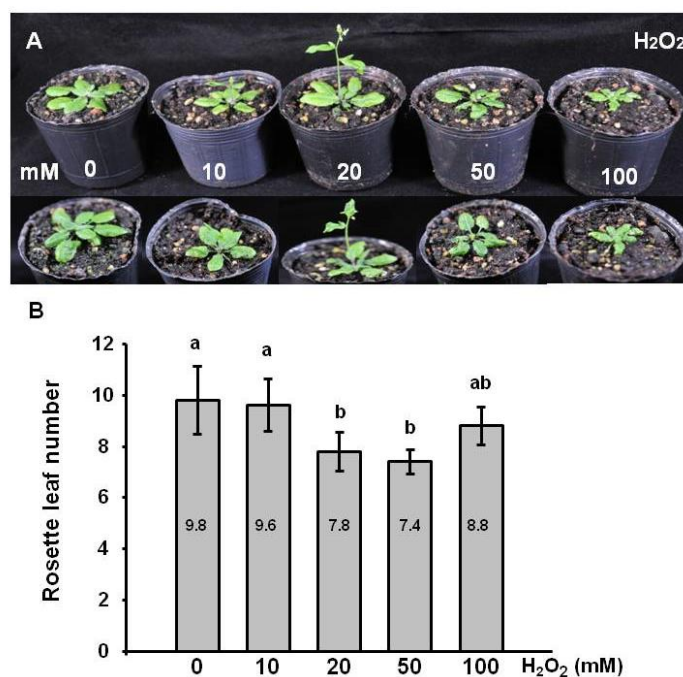
(一) 試驗低濃度過氧化氫對植物的影響，並想得知過氧化氫是否會傷害植物。

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

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

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

這個結果顯示低濃度過氧化氫會促進植物開花，而過氧化氫也是屬於活性氧的一種（蔣永正，2011），代表低濃度活性氧會促進開花，但高濃度活性氧抑制了植物本身的生長。



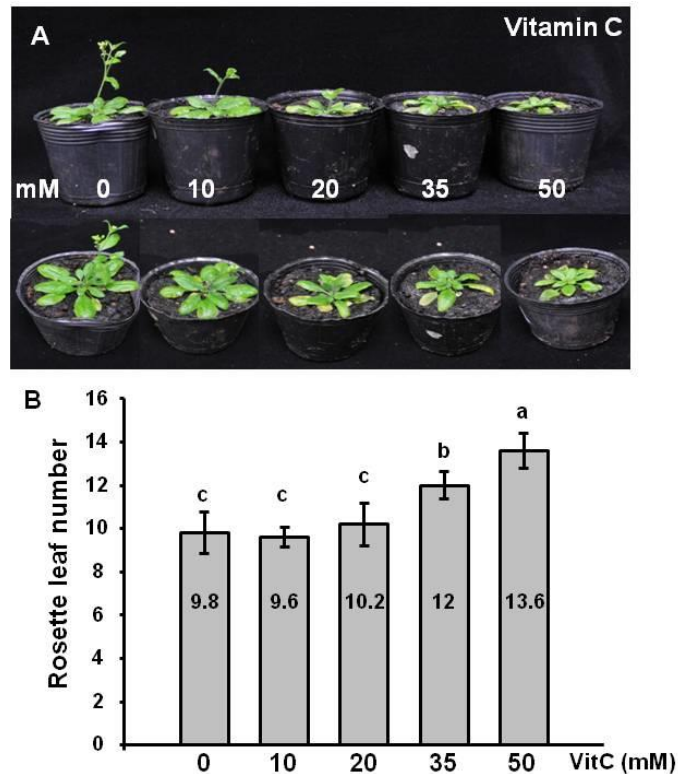
圖一、噴灑不同濃度過氧化氫後，野生型植物開花情形。A. 噴灑七天後阿拉伯芥的開花情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。不同英文字母代表處理間有差異。b 與 a 相比代表 20 及 50 mM 處理和對照組有差異。

二、維生素 C 對植物的影響

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

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

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



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

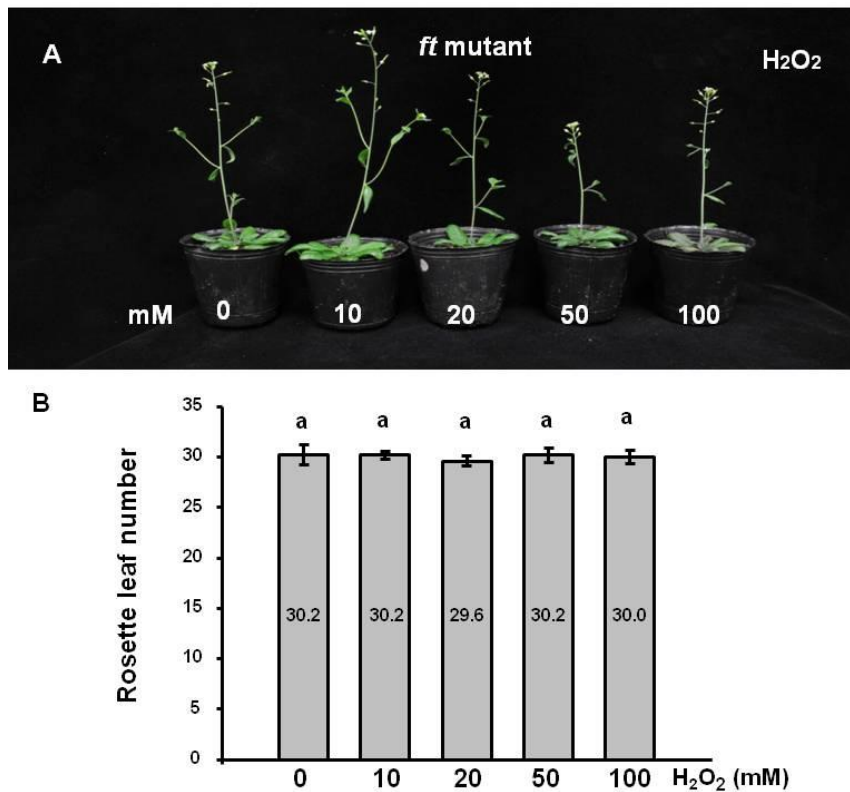
三、 H_2O_2 對晚開花突變植物的影響

為了得知過氧化氫是否能促進晚開花的植物提早開花，我們利用了幾種晚開花的植物做了同為噴灑溶液的實驗。

(一) *ft* 轉植株處理過氧化氫 (附錄三圖三)。

0 mM 的過氧化氫，為對照組，於 30 片葉子時有花苞產生。10、20、50、100 mM 的過氧化氫，和對照組一樣皆為 30 片葉子出現花苞。於 *ft* 轉植株實驗中，不同濃度的過氧化氫噴灑都無法促進植物開花。實驗組和對照組花期相近，皆在在葉子約 30 片時有花苞產生。

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



圖三、噴灑 H₂O₂ 後，*ft* 轉殖株開花的情形。A. 噴灑七天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。英文字母 a 代表處理間沒有差異。

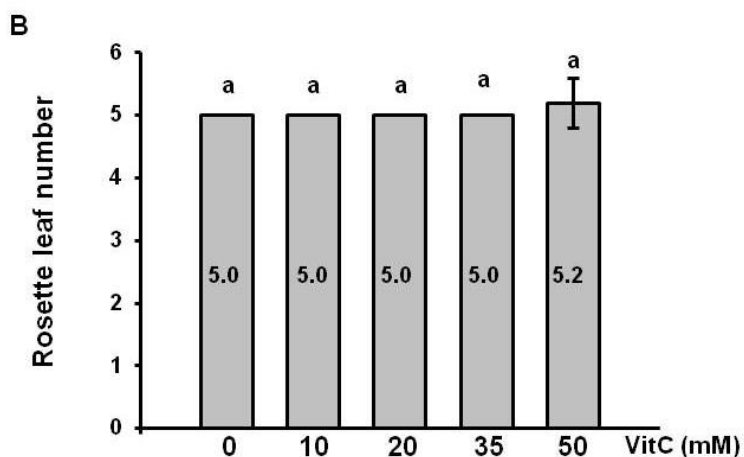
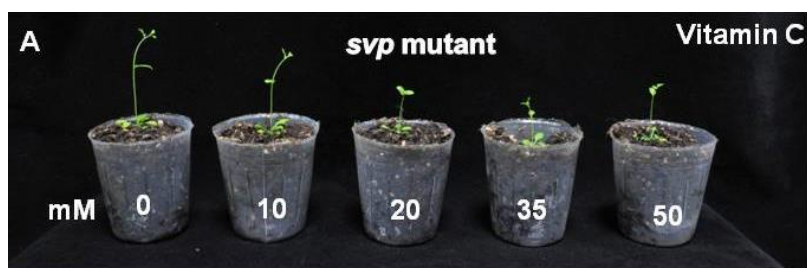
四、維生素 C 對早開花突變植物的影響

為了瞭解維生素 C 能抑制早開花轉殖株延緩開花，我們利用了幾種早開花突變植物做了同為噴灑溶液的實驗。

(一) *svp* 轉殖株處理維生素 C，於此轉殖株有 4 片葉子時進行噴灑 (圖四)。

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

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

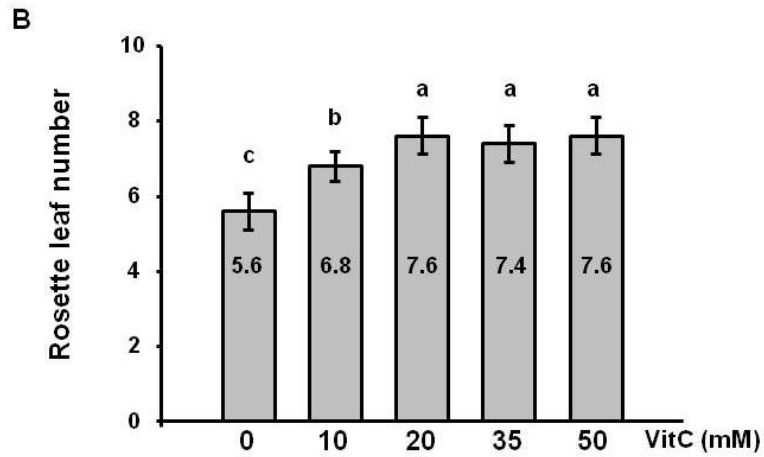
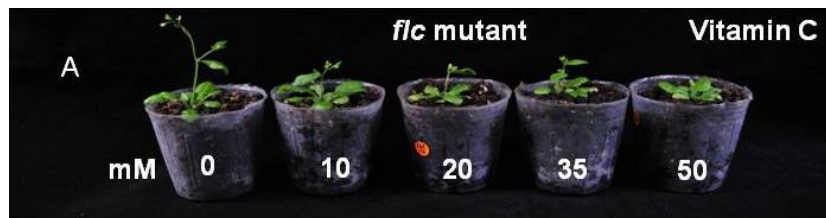


圖四、噴灑維生素 C 後，*svp* 轉植株的開花情形。A. 噴灑十天後植物的情形。B. 不同濃度噴灑，植物出現花苞時的葉子數目。柱狀圖中數字為每個處理開花時的葉片平均數，並畫出標準偏差 (standard deviation)。小寫的英文字母則代表鄧氏新多變域測驗後差異的結果。a 代表這組處理間沒有差異。

(二) *flc* 轉植株處理維生素 C，於此轉植株有五片葉子時進行噴灑 (圖五)。

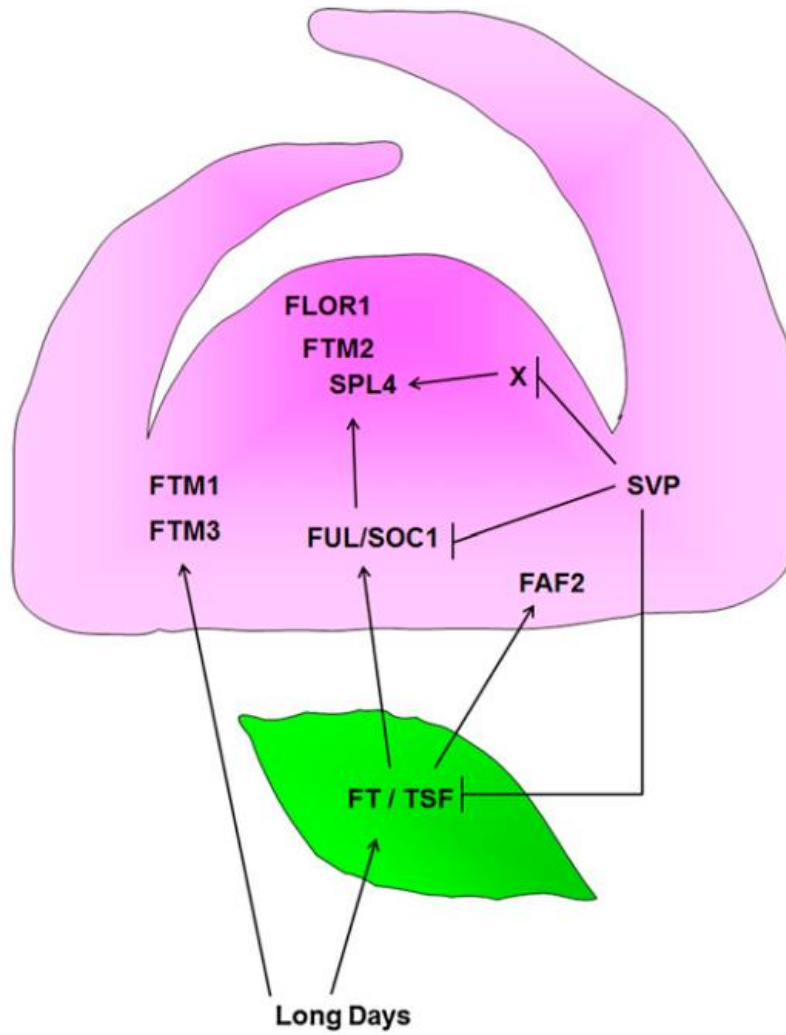
1. 0 mM 的維生素 C，為對照組，約在 6 片葉子時出現花苞。
2. 10 mM 的維生素 C，此濃度處理即有抑制開花的效果，在 6-8 片葉子時有花苞。
3. 20、35 mM 的維生素 C，隨著濃度略增，抑制植物開花的效果也漸增，在 7-8 片葉子時產生花苞。
4. 50 mM 的維生素 C，也有抑制開花的效果，但此濃度會抑制花梗的生長，也在 7-8 片葉子時出現花苞。

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



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

附錄四



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

(節錄自 Torti, 2012)

【評語】 060012

1. 故事十分完整，但因非一般高中生所能執行實驗，參賽者必須更努力充實背景知識，以展現對研究的原發性熱忱。
2. 由於開花的研究太多，要在強調誘導開花的原創性。