

從綠竹的相剋作用到殺草劑的應用

高中組生物科第一名

台北市立景美女子高級中學

作者：劉玳、羅巧好、林雅玲

指導教師：游雲霞

一、研究動機

印象中空闊而不生雜草的竹林，是最好的遊戲場所；以前年紀小，只知道不長野草很方便玩，卻一點不感到奇怪。直到高一，有一次生物老師講解生態系時，以竹林為例說明「相剋現象」，頓時想起小時候的經驗。現在，我有一股衝動想研究童年的遊戲舞臺。

二、研究目的

- (一)了解不同濃度之綠竹液對野草光反應的影響。
- (二)了解不同濃度之綠竹液對綠豆發芽及生長的影響。
- (三)探討綠竹液中所含的代謝產物—多酚類，在綠豆初生根中的堆積情形。
- (四)了解多酚類在綠豆初生根中的橫向擴散。
- (五)了解綠竹代謝產物對土壤微生物的影響。
- (六)嘗試以綠竹代謝產物作為生長抑制物或殺草劑的可行性。

三、研究設備及器材

顯微照像機 (Olympus BH-20)	0.5M 蔗糖溶液	菠菜
分光光度計 (Hitachi U-1100)	0.05%DCPIP	假人蔘
離心機 (Kokusen H-120)	碘	咸豐草
pH 檢測機 (Hanna-8520)	碘化鉀	昭和草
高壓蒸汽滅菌機	亞硝酸鈉	黃鶴菜
無菌操作檯	醋酸	火炭母草
微量天平	尿素	青江菜
果汁機	氫氧化鈉	芥藍

四、研究方法

(一)綠竹水溶液之製備：

秤取新鮮綠竹葉片 2.5、12.5、25g，各加水 245.5、237.5，225ml，製成濃度為 1%、5%、10% 的水溶液 (w/v)，室溫下靜置二小時，再以紗布過濾，測 pH 值，並記錄之。

(二)綠豆芽的培養：

將綠豆各泡於 1%、5%、10% 的綠竹液及水中 8 ~ 10，將已浸泡的綠豆置於培養皿中，保持充足的水分，並於 25 °C 的恆溫箱中黑暗培養三天。

(三)多酚類的橫向擴散：

將置於培養皿中，清水培養三天的綠豆芽，放在不同濃度的綠竹液中，浸泡二十四小時，隨後切取下胚軸接近上胚軸的轉換處、染色。

(四)綠竹萃取液的田間開放試驗：

1. 將校園內的草坪，圍起 1 公尺見方的大小。
2. 每日均勻澆灌 500ml 10% 的綠竹葉水溶萃取液，二十五天後，觀察其生長變化。

(五)光反應的還原作用：

1. 秤取葉片 30 克，置砧板上切碎，加 0.5M 蔗糖溶液 20ml，繼續切成泥狀。
2. 將泥狀組織倒入果汁機，加入 0.5M 蔗糖溶液 30ml，以低速打 20 秒。
3. 用雙層紗布將葉汁過濾，濾液以每分鐘 3,000 轉之速度離心 5 分鐘，小心倒除上清液。
4. 加 0.5M 蔗糖溶液 50ml 於沉澱物中，直到沉澱物均勻懸浮，此為葉綠體溶液。
5. 如表一取試管分別標識後，先加入蔗糖溶液、葉綠體溶液及綠竹萃取液，令其分別靜置 0'、60'、120'，再加入 DCPIP，重複二次，置檯燈前 15cm 處照光，等照光 5 分鐘之後，以每分鐘 3,000 轉之速度離心 5 分鐘。取上清液 2ml，用分光光度計測 590nm 的吸光值。

表一綠竹液對光合作用的影響之實驗設計

	0.6 M 蔗糖溶液	DCPIP	葉綠體溶液	萃取液/水
1% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
5% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
10% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
加熱的 1% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
加熱的 5% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
加熱的 10% 綠竹液	3 ml	0.4 ml	1 ml	0.5 ml
對照組	3 ml	0.4 ml	1 ml	水 0.5 ml

(六)綠竹對土壤微生物的影響：

1. 細菌固體培養基：	蛋白凍 (peptone)	0.5 克
	酵母抽出物 (yeast extract)	0.2 克
	洋菜 (agar)	1.5 克
	水	100ml

2. 以保麗龍盒裝土，每日均勻澆灌 50ml 10% 的綠竹葉水溶萃取液，十五天後，取 1 克表土加 99ml 的蒸餾水，取 0.1ml 稀釋液塗於培養皿上，重覆 (三)，經二天觀察菌落生長狀況並記錄之。

3. 對照組土壤則以蒸餾水取代綠竹液。

(七)綠豆上、下胚軸轉換區的顯微觀察：

1. 澱粉的染色法

(1) 藥液：碘 (0.5%) 溶於 5% 碘化鉀溶液中，保存於黑暗。

(2) 方法：切片置於碘液中 2 分鐘→以蒸餾水洗切片並直接觀察。

2. 多酚類 (Polyphenols) 的染色法

(1) 藥液：

① 10% 亞硝酸鈉水溶液。

② 10% 醋酸。

③ 10% 尿素溶液。

④ 2N 氫氧化鈉溶液。

(2) 方法：切片放在藥液①~③的等量新混合液中，處理 3 分鐘→加 2 滴氫氧化鈉溶液。

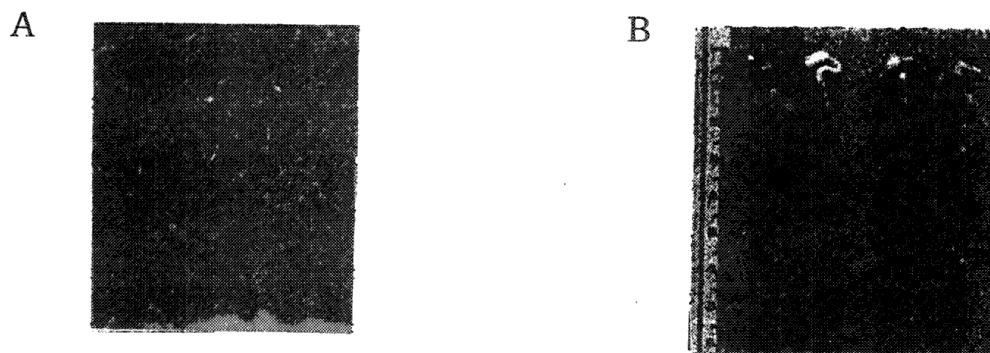
五、研究結果

(一)綠竹液對綠豆初生根的影響

凡浸泡綠竹液的實驗組，自培養後第二天 (圖一 A)，初生根的根長，都較泡水的對照組為短 (表二)；至第三天 (圖一 B)，平均根長的差異愈發明顯，其中以泡 10% 綠竹液的抑制情形最嚴重。若以泡水的對照組培養後第二天到第三天之間的生長量為 100%，那麼泡 1% 綠竹液的生長情形只有 96%，泡 5% 的只及 61%，而泡 10% 的只剩 46% 了。綠竹水溶液的 pH 值，經測定後其值大約為 5.6 ~ 6.0 之間 (表二)。

表二 綠竹液對綠豆初生根的影響

	10% 綠竹液	5% 綠竹液	1% 綠竹液	蒸餾水
pH 值	5.69	5.92	5.9	6.4
第二天平均根長 (cm)	1.8	2	2.2	2.5
第三天平均根長 (cm)	3.1	3.7	4.9	5.3
生長量 (%)	46	61	96	100



圖一 綠竹液對綠豆初生根的影響

(二)綠竹液對野外雜草的影響

先以塑膠盆試種天南星科的土半夏，發現澆 10% 綠竹液的實驗組，第三天葉子即有局部枯黃的現象，而澆水的對照組生長良好。根據土半夏的實驗結果，繼續做 10% 綠竹液對校園內野草的影響試驗。經每日澆灌 10% 綠竹液 25 天之後，該地區的野草明顯的生長不良，也有局部枯黃的現象，其他未經處理的草坪，野草生長良好。

(三)綠竹液對土壤微生物的影響

10% 的綠竹液對植物生長有明顯的抑制作用；但對土壤微生物卻無明顯的抑制。在培養基的菌落數上，以 10% 綠竹液澆灌的土（圖二 A），數量比以水澆灌者（圖二 B）多很多。

(四)綠竹液對植物光合作用的影響

本實驗抽取葉綠體的方法，是根據高中生物課本第二冊實驗 10-1 的內容，稍加修飾而來。不同濃度的綠竹液對各種植物的光合作用有不同程度的抑制，圖三 (A) 可觀察到當加入的綠竹液濃度增加時，葉綠體溶液光反應的效率就越差，尤其是在加入 5%、10% 綠竹液時，其抑制效果明顯。若將葉綠體溶液與綠竹液，混合後一同靜置，使綠竹液對葉綠體的影響更為充分時，結果是隨著靜置時間的延長，抑制情形愈發明顯，綠竹液對葉綠體光反應透過靜置

使效果更為顯著，如火炭母草、假人蔘、菠菜、芥藍、青江菜等。至於昭和草、咸豐草和黃鵪菜這三種菊科植物，在一加入綠竹液之後，抑制情形馬上顯現。

圖三(B)中，所加入的綠竹液先於95℃加熱十分鐘處理，結果如同圖三(A)一般，當加入的綠竹液濃度增加時，葉綠體溶液光反應的效率就越差，而且，隨著靜置時間的延長，抑制情形也愈發明顯。

(五) 多酚類在綠豆上、下胚軸轉換區的橫向擴散情形

圖四A、B、C為培養三天後的綠豆初生根，分別浸泡於1%、5%、10%的綠竹液中二十四小時，用徒手切片法染色多酚類的結果。多酚類聚集處，用本染色法可被染成紅色。當浸泡濃度越高時，切片的紅色處分佈就越廣，並且以中心的髓及髓周圍的維管束最明顯。而且10%的綠竹液其橫向擴散情形最好，5%其次，1%最慢。

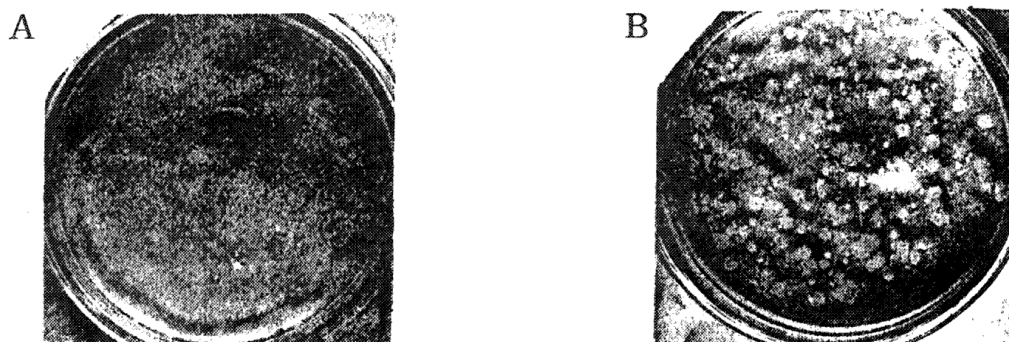
(六) 綠豆上下胚軸轉換區的顯微觀察

1. 綠豆初生根的橫切面

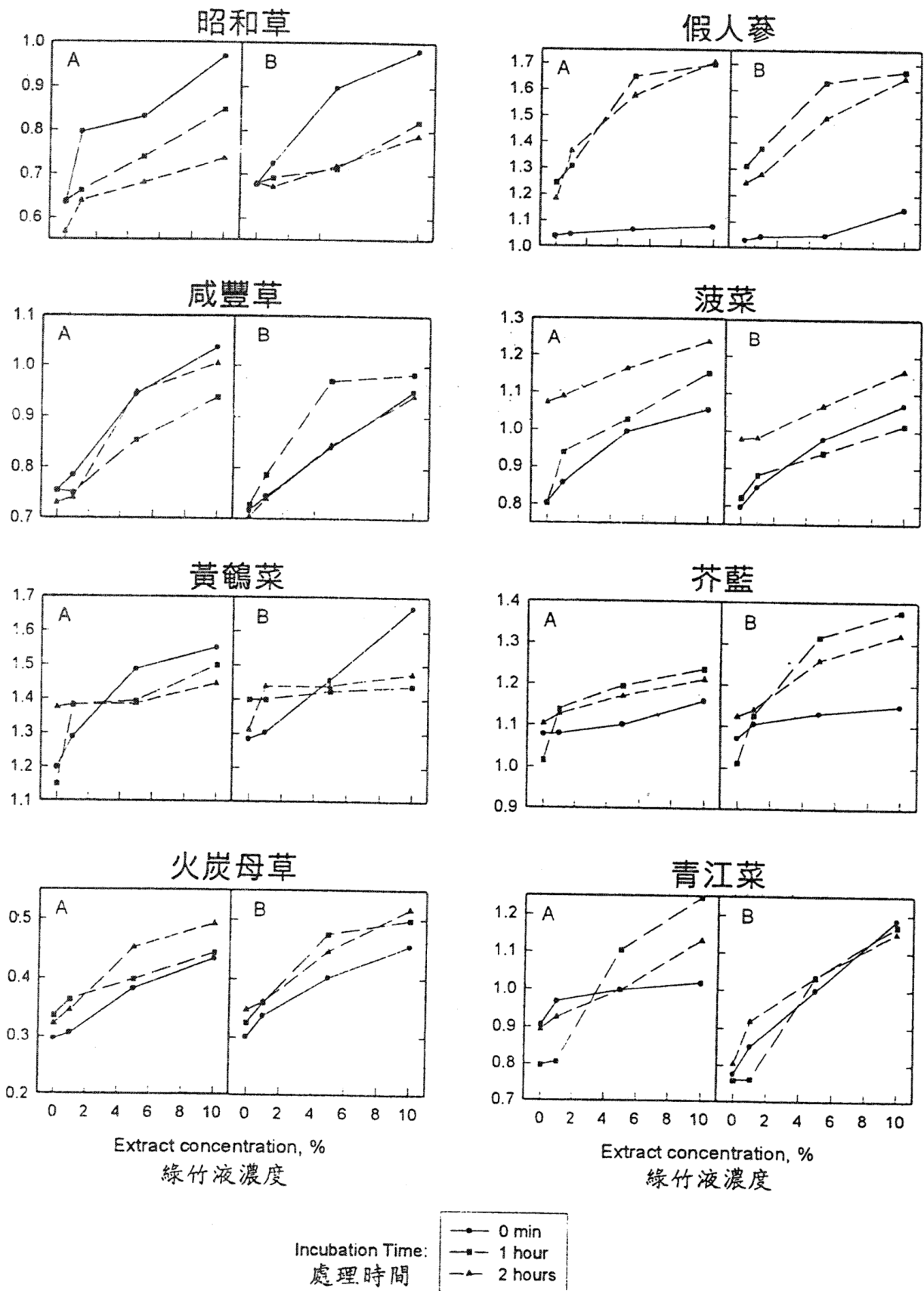
基本上從上、下胚軸轉換區的橫切面，可觀察到由外而內的構造有：表皮、3~4層的厚角細胞、皮層、周鞘、維管束以及中心的髓。泡蒸餾水培養的橫切片，其切面上幾乎沒有黑色堆積物，而浸泡綠竹液培養的切片上，黑色堆積物則隨著綠竹液濃度的提高而增加。此黑色沉積物的堆積，主要分布於維管束附近、中心髓部，並散見於皮層中。

2. 多酚類的染色

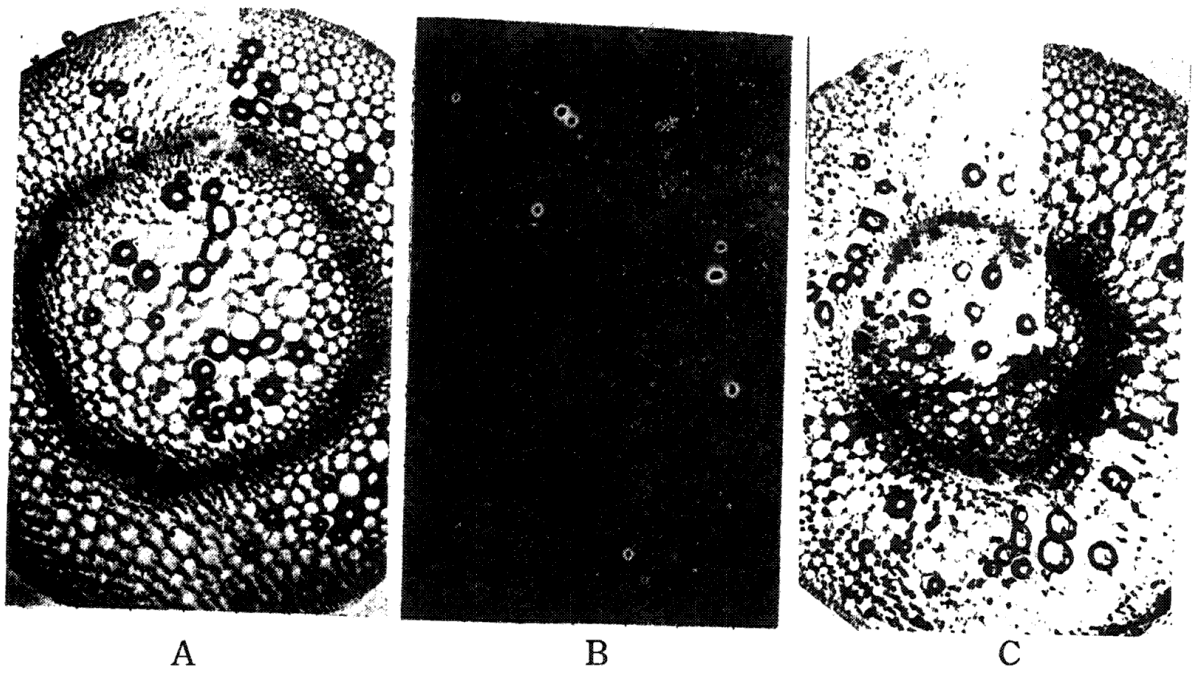
綠豆根部橫切面的黑色堆積物，使我們聯想到，這可能是綠竹液的毒性物質透過擴散而有的堆積。於是試著染色酚酸化合物。而在根部橫切面上出現的黑色堆積物質，經染色的結果也呈現紅色的反應，符合酚酸被染色的預期結果，因此可以肯定，這些沉積物應為酚酸化合物。隨著浸泡的綠竹液濃度之提高，染色後的紅色部分面積就愈大(圖五A、B、C、D)，主要分佈於維管束附近、中心髓部，並散見於皮層中。多酚類染色後，在維管束上呈現一圈真珠狀的排列，相當美麗。



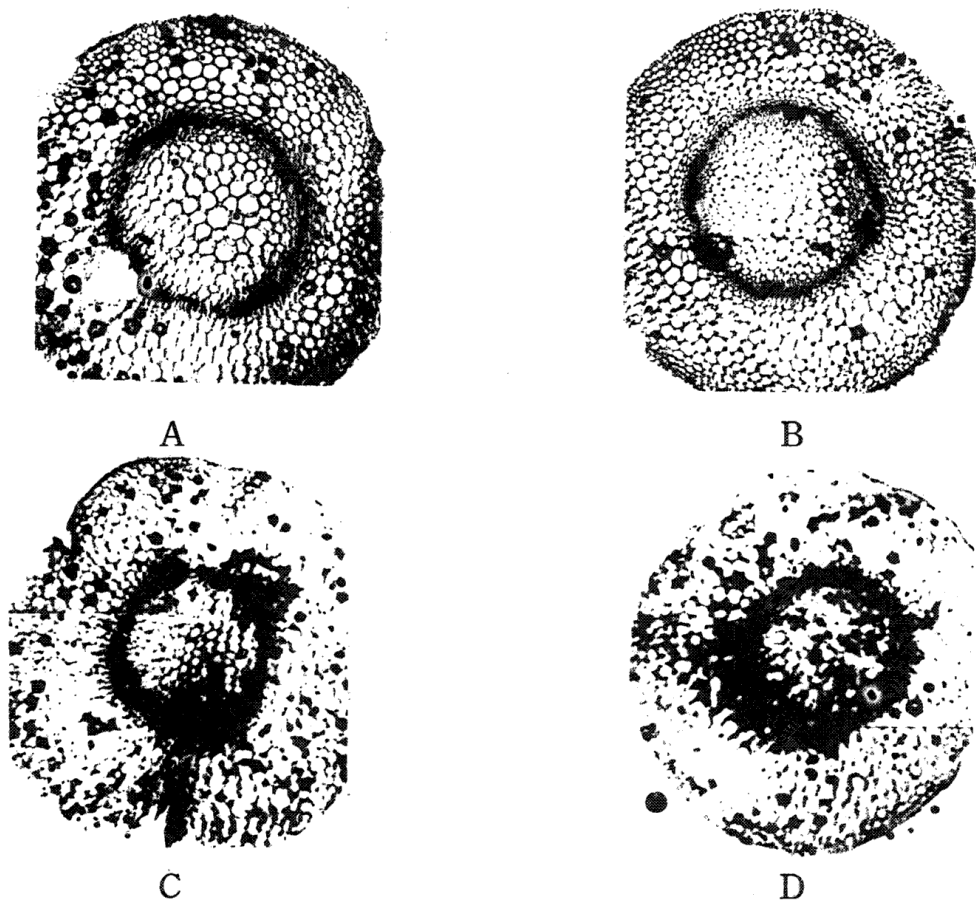
圖二 綠竹液對土壤微生物的影響



圖三 綠竹液對植物光反應的影響
A 加入一般綠竹液 B 加入水浴十分鐘綠竹液



圖四 綠竹液在綠豆根中的擴散情形



圖五 綠竹液對綠豆初生根的影響
 以各種濃度的綠竹液(A,0%;B,1%;C,5%;D,10%)
 培養三天的綠豆初生根之切片，染色多酚類的結果

六、討論

在野外，綠竹林下幾無地被植物的現象，經多年的研究，發現陽光並非是限制因子，也不完全是物理性的競爭所致，而是竹葉掉落經分解後，產生許多酚類物質，抑制了雜草的生長，因此分析竹林土壤的水溶萃取液，所得之植物毒性也與竹葉相似。我們好奇於這種現象的產生，希望能將之應用於殺草劑。若能將綠竹液中，最具毒性的酚酸化合物分離純化，再修飾其化學結構，如同農業上應用的殺草劑 2,4-D，就是從生長素 IAA 改變而來，甚或可提煉為生物防治的生物控制劑，如菊科植物就含有除蟲菊精，能被加工為殺蟲劑。

我們採用切片染色的技術，將多酚類染成紅色，用以確定綠竹液中的多酚類，可經由擴散到達維管束，並在中心髓部、皮層中造成堆積。而多酚類能抑制種子生長的情形，已被多人所證實，若排除綠竹滲透壓的因素，那麼綠豆種子生長受抑制的情形，主要是由綠竹液中所含的多酚類引起的。至於酚類化合物為何集中分佈於維管束及其周圍，而成一圈美麗的真珠狀排列，酚酸是否須透過導管或篩管加以運送，則有待進一步的探討。

有些酚酸化合物，會抑制水稻葉綠素的生合成；而植物次級代謝產物，低濃度時會改變葉綠體中 ATP 形成的過程，在高濃度則會抑制電子傳遞，綜觀圖三 A，綠竹液抑制植物光反應的效率，可能是由於綠竹液所含的高濃度酚酸化合物，抑制了電子傳遞，因此降低了光反應的效率。自然界中的酚酸會因氧化破壞其完整性，使抑制作用消失，我們試圖以加熱來使酚酸氧化，但從圖三 B 卻可發現，95℃ 加熱處理後的綠竹液，並不會喪失抑制光反應的效用。顯然加熱氧化後的酚酸，仍保有抑制光反應的能力。這是否意味著，在田間酚酸雖可被分解，但其毒性殘留的問題，仍應受到重視。

經由 10% 綠竹液，對土半夏及校園野草生長的試驗來看，高濃度的綠竹液確實可使雜草生長受抑制，並引起局部的枯黃，而局部的枯黃不會影響整體的美觀。校園草坪為了維持美觀與綠化的功能，必須定時除草，但除草機的使用，在校園內會造成頻繁的噪音。若能配合適度濃度的綠竹液，做為生長抑制劑之使用，或許可免除一些噪音的干擾。

綠豆連作的相剋作用，可因休耕時間長短，而影響後植植物之生長，當休耕時間較長時，後植的植物就會生長的比較好。可見毒物質在土壤中能被分解，使原來的抑制作用消失，而此分解是透過土壤微生物來進行的。那麼是否在含酚酸的土壤中，微生物的種類以及數目會比較多呢？結果發現澆灌 10% 綠竹液的土中之菌落數，較澆水的對照組多很多，這現象一直困擾著我們，在此提出兩種可能

的解釋：①每日所澆的綠竹液並未滅菌，而竹葉上可能都是細菌，於是使得菌落數增多。②土壤中或有以酚酸化合物為能量來源的細菌，如同獨特的硝化細菌，可利用含氮的無機物為能量來源。

七、結論

感謝指導老師的全力協助，讓我們有機會了解綠竹在植物社會中的優勢，而此極峰群落的產生，竟是透過排出毒物質來達成的，不免令人覺得驚訝。而讓我們更感興趣的是：①為何它不自毒呢？綠竹能分解這些二次代謝產物嗎？②這些毒物質的累積，與綠竹大約四十年會開花，然後死亡的情形是否有關聯呢？③若將原本種綠竹的地，改種別種植物，其毒性會殘留多久呢？我們對這未知的一切充滿了好奇。

當我們在提出利用綠竹液中酚酸化合物，製成殺草劑的同時，其實是懷著戒慎恐懼的心情，雖然這是取自天然的化合物，不過任何物質，只要與環境之間產生了交互作用，就已經脫離了人類所能控制的範圍。好比氟氯化物剛問世時，工業界均宣稱，找到了地球上最無害的冷媒材料，但那裡想得到它在地面的無害，卻跑到上空去破壞臭氧層。我們極願意尊重生命演化過程中，所出現的生物多樣性之可愛，在環境保護上盡一己棉薄之力。

八、參考資料

- (1)李瓊妮。1994年。三種酚酸化合物對水稻葉綠素生合成及根部與葉部細胞微細構造之影響。國立臺灣大學植物學研究所碩士論文。
- (2)周昌弘。1985。植物相剋作用之研究。科學發展 13:147-166。
- (3)周昌弘。1990。植物生態學。聯經出版社。PP.239-270。
- (4)周昌弘。1995。生物多樣性：觀念、假說及研究。科學月刊 26(7):547-553。
- (5)陳忠信。1974。臺灣北部地區植物群落之植物毒性潛能。國立臺灣大學植物學研究所碩士論文。
- (6)黃啓穎。1981。高等植物光合作用機制。科學農業 29(1-2):1-8。
- (7)傅秋玉。1995。台灣之相思樹植物相剋作用潛能研究。國立臺灣大學植物學研究所碩士論文。
- (8)鄭志聖。1993。綠豆連作相剋作用之研究。國立臺灣大學植物學研究所碩士論文。
- (9)劉崑恩譯。1990。植物組織化學與細胞化學導論。茂昌圖書公司。PP.109-122;245-250。

- (10) 蔣慕琰譯。1981。殺草劑對植物病害之效應。科學農業 29(1-2);20-30。
- (11) Chou, C.H. and M.H.Hou. 1981, Allelopathic researches of subtropical vegetations in Taiwan. I. Evaluation of allelopathic potential of bamboo vegetation. 5(3):284-292.
- (12) McClure, P.R., H.D. Gross and W.A. Jackson. 1978, Phosphate absorption by soybean varieties: the influence of ferulic acid. Can. J. Bot. 56: 764-769.
- (13) Morland D.E. and W.P. Navitsky. 1988, Interference by flavone and flavonoids with chloroplast-mediated electron transport and phosphorylation. Phytochemistry. 27:3359-3363.
- (14) Rice, E.L.(ed.) 1984, Mechanism of action of allelopathic agent. In: Allelopathy. 2nd ed. Academic Press. pp.320-344.
- (15) van Sumere, C.F., J. Cottenie, J. DeGreef and J. Kint. 1972, Biochemical studies in relation to the possible generation regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics, Recent Adv. Phytochem. 4:165-175.

評語

本研究由綠竹液對綠豆種子之發芽抑制情形來說明植物之間的相剋作用，本實驗亦從綠豆根之切片來提出證據。研究過程嚴謹而可信，研究報告之撰寫亦詳盡。本研究以極簡單之設備，而能詳盡的說明一個生態現象，非常難能可貴，頗值鼓勵。