

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會
作品說明書

國中組 生物科

第三名

030315

「鹽」而有「杏」~探討番杏的抗鹽方式與鈣離子對抗鹽能力的影響

學校名稱：高雄市立明華國民中學

作者： 國二 王駿愷 國二 張伶禕 國二 黃紫璇	指導老師： 蘇育弘 李冠徵
---	-----------------------------

關鍵詞：番杏、鹽逆境、鈣離子

摘要

抗鹽耐旱的台灣原生濱海植物—「番杏」，對抗鹽逆境的機制為何，十分耐人尋味。我們發現提高鹽度會使番杏的發芽率些微下降，但仍有一定的發芽率。0、0.5%的鹽度之下，番杏葉面積與根長、生物質量均有較好生長情形，番杏滲透濃度可能介於 0~0.5%鹽度之間。番杏幼苗發展至第 3 對葉，較能忍受高鹽度的環境。鹽逆境會使新長出的葉子囊狀細胞增大，已長出的細胞則不影響；有趣的是，鹽度提升後，不只新生葉內的結晶鈣數量變多，原本舊葉內結晶數量也會變多，顯示結晶鈣的數量在番杏內是會變動的。加入外源性的鈣離子(5mM)，會促進葉肉組織內結晶數量的增加，並可以提升囊狀細胞累積鹽分的能力，在鹽逆境下，添加鈣離子組別，番杏生長情形也較好。

壹、研究動機



圖 1 台灣海邊原生植物番杏

在東部的海邊旅遊，發現海灘長著叢叢綠意的盾形植物，尤其陽光下發亮的新生葉，更吸引目光，接近看發現這些毛茸茸構造是一顆顆囊狀的細胞，在台灣海邊不利生存的環境卻有著綠意的植物，這不禁引起我們的疑問，這些植物是如何在鹽

度較高的逆境下存活呢？查詢文獻後得知，這是台灣原生種海邊植物~番杏，由花蓮區農改場推廣為原生野菜，具極高營養價值，也因為如此，資料偏向於營養及種植介紹，關於番杏如何在逆境下生存的資料相對則較為罕見。在花蓮農改場研究員的協助及種植指導下，我們取得了番杏種子來進行研究，想從種子在鹽逆境的發芽開始，記錄不同鹽逆境下的生長情形，接著由外觀毛茸茸的構造開始觀察，以了解這是否與逆境適應間有所關聯，除了外部構造，顯微鏡下發現番杏內部存在一顆顆結晶，這些為數不少的晶體與逆境是否有關？讓我們從種植開始，逐步解開番杏適應逆境的相關謎團。

貳、研究目的

- 一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形
- 二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色
- 三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色
- 四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響



圖 2a 新葉具毛茸茸構造

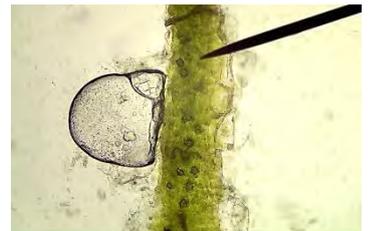


圖 2b 葉內具一顆顆結晶

參、研究器材與設備

一、種植相關

番杏(*Tetragonia tetragonioides*)，番杏科番杏屬，台灣原生種海邊植物，一年生草本，葉呈卵形至盾形，生於海邊沙地上，種植發芽率不高。為了解番杏在鹽逆境下的生長，我們在花蓮區農改場的協助下取得種子(圖 3)，於土耕環境下種植。

1. 光照條件：室內 LED 白燈 4 呎*8 ，光照 12 小時、黑暗 12 小時(圖 6)，照射距離 20CM。
2. 土耕條件：育苗以培養土(圖 5)；長至 2~3 對葉後移盆，培養土與沙土(圖 4)混合(1：1)。
3. 鹽逆境實驗：以氯化鈉調製不同鹽逆境，每日定時澆灌至底部流出為止。
4. 鈣離子實驗：將不同濃度下鈣離子及 EGTA，每日定時澆灌至底部流出為止。



圖 3 番杏種子(木質化果實內)



圖 4 培養土與沙土混合種植



圖 5 利用育苗盆提升發芽率

二、測量器材與設備

1. 土耕種植觀察

番杏種子、菠菜種子(對照組用)、土耕育苗盆、土耕紅色小盆、大盆(圖 7)、LED 燈組、電子天平、燒杯、電子游標尺、IMAGE J 軟體(葉面積測量用)、洗滌瓶



圖 6 室內土耕光照裝置

2. 外部囊狀細胞實驗觀察

解剖顯微鏡、電子目鏡、筆電、顯微測量軟體、培養皿、鹽度計、解剖針、烘箱、鹽度計、微量滴管



圖 7 室內土耕移盆種植情形

3. 內部結晶鈣實驗觀察

複式顯微鏡、電子目鏡、蓋、載玻片、測微軟體、單面刀、氯化鈣(5、10、20mM)、EGTA(5、10、20mM)

肆、研究過程及方法

◎查閱相關文獻

(一) 番杏基礎資料

台灣海岸線長達 1500 公里，相對於遠離海岸線的土地，海邊貧瘠且鹽鹼較高，再加上夏季高溫炎熱、冬季東北季風等等的嚴苛環境，能夠於其中生活，一定有其特別的對抗逆境方式，番杏就是台灣海邊的原生種植物之一，具備耐高溫、抗旱及抗鹽化的多重抗逆境能力，再加以生長期長，且營養豐富，具有鈣、鐵、維他命等多種營養，適合作為較極端環境下的蔬菜來源，但目前關於番杏的抗逆機制並不甚清楚，本篇將針對番杏在不同鹽逆境下的生長情形來探討，並進一步探討相關的抗鹽機制。

(二) 文獻一、養我育我的部落勇士-探討小米的生存之祕(中華民國第 55 屆中小學科學展覽)

1. 模擬常米在生長時可能遇到的逆境，結果顯示小米能在缺水 20 天的情況下生長，但卻無法在太濕或鹽分過高的環境中生存。
2. 由實驗結果，篩選出兩種耐鹽小米與兩種不耐鹽小米，它們在鹽逆境下皆能透過鈣離子來調節小米的抗鹽反應，耐鹽小米能透過較高的過氧化酶與過氧化氫酶活性來提升耐鹽小米的抗氧化能力。

(三) 文獻二、葉裡的祕密-鈣離子對結晶形成的影響(中華民國第 50 屆中小學科學展覽)

1. 環境中鈣離子濃度越高，植物於生長初期結晶長度越長，隨時間增加則不再受其影響，而鈣離子濃度和結晶密度則呈正相關。
2. 當環境中鈣離子濃度突然改變，植物體內結晶密度亦會改變，且呈正相關。在實驗中也發現，一植株內結晶密度最高的葉片為新生葉。

一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形

番杏為台灣原生種海邊植物，但關於逆境下生長的資料卻相對缺乏，因此我們自行建立鹽逆境環境，以了解由種子開始的逆境生長情形並記錄型態差異。

(一) 探討不同鹽逆境下的種子發芽率及存活率

1. 在花蓮區農改場協助下取得番杏種子約 2000 顆。
2. 利用氯化鈉配製不同濃度鹽水，分別為 0、0.5、1、2、3、5%。

- 將種子分別浸泡於不同濃度鹽水中(圖 10),使果皮軟化,待一週後將種子取出平鋪於對應鹽水的衛生紙塑膠皿上,計算發芽率。種子數 $N=50$,進行六重覆取平均值。
- 設立菠菜為控制組,以不同濃度鹽水處理,計算發芽率。種子數 $N=50$,三重覆取平均。



圖 9 控制組菠菜發芽情形

- 將發芽種子取出,置於育苗盆內(圖 11),每日午後固定時間將不同濃度鹽水澆至育苗盆流出為止。
- 將長出子葉個體(圖 12)澆灌不同濃度鹽水,持續觀察並計算不同鹽逆境之下的存活率。控制組設立為菠菜,相同計算及處理方式。

註：存活率定義為番杏植株生長至第 15 天(約第一對葉)為止。



圖 10 種子浸於鹽水中軟化



圖 11 番杏種子發芽情形



圖 12 育苗盆長出子葉情形

(二) 比較不同鹽逆境下的生長情形與生長曲線建立

在了解發芽率及植株存活率之後,我們選取了番杏能夠生存的鹽度範圍來進行實驗。接著想比較在不同鹽逆境之下的生長情形有什麼樣的差異,因此我們將針對不同時間的根長、最大葉面積、生物質量這幾種生長數據等來進行了解。此外,不同鹽逆境下的生長速率是如何呢,我們也藉由生長曲線的建立來了解其中差異。

- 不同時間點,鹽逆境的處理：分別將 0、0.5、1、2%鹽水處理下的番杏,隔 15 日,也就是第 15 天、30 天、45 天、60 天取出進行以下處理。 $N=3$,三重覆取平均。在花蓮區農改場研究員建議下,將生長至第 3 對葉(圖 13)的植株移至紅色小盆內繼續觀察。
 - 根長：在不同的時間點取出植株,將土壤浸於水中,並仔細以洗滌瓶洗去根上土壤後,以電子游標尺進行長度量測。
 - 最大葉面積：將不同時間點取出之植株,選取不同鹽逆境處理下的最大葉子,剪下並拍照,利用 IMAGE J 軟體(圖 14)進行面積測量。

(3) 生物質量：將不同時間點處理之植株，去除土壤後，仔細洗滌乾淨並吸乾根莖葉水份後，置於電子天平上稱量鮮重。

2. 生長曲線建立：記錄不同鹽水處理下的種子發芽日數，並將番杏對葉由下向上依序定義為第 1 對、第 2 對…(老葉至新葉)，觀察每對新生葉出現時間。N=3，三重覆取平均。



圖 13 生長至第 3 對葉時移盆



圖 14 用 IMAGE J 軟體測面積



圖 15 記錄不同對葉出現時間

(三) 探討葉肉組織滲透濃度與鹽適應關聯

在了解番杏於不同鹽逆境下的生長情形之後，我們進一步進行切片，探討葉肉組織滲透濃度與鹽適應間的關聯，以了解生長情形是否與胞質濃度有所關聯。

1. 由上述鹽逆境下生長情形結果，選取生長良好的番杏葉片進行組織切片，並分別滴入 0、0.5、1、2、3% 等不同濃度鹽水，靜置 15 分。(圖 16)
2. 以複式顯微鏡 100X 觀察，檢視視野內發生葉肉細胞質壁分離比例。

註：質壁分離比例接近 50% 時，表示滴入濃度為組織的等張溶液。

(四) 探討番杏生長與鹽適應間的關聯

在不同鹽逆境下的發芽率與生長情形結果，我們了解番杏並非從小就開始適應較高鹽度 (3%) 的刺激，因此進一步進行不同生長階段與鹽適應間的關聯。

1. 選取已長出子葉的植株，開始以 0、3、5% 等不同濃度鹽水進行處理。
2. 分別記錄不同生長階段下(子葉、第 1、2 對..)，在鹽水澆灌下的存活率。(圖 17)



圖 16 不同鹽度處理，取得滲透濃度



圖 17 生長期與鹽適應(3%)間關聯

二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色

番杏新生葉具明顯的毛茸茸構造，顯微鏡下為透明的囊狀細胞。在研究目的的一的型態觀察中也發現不僅新生葉，其餘葉的葉背及莖上也都有為數不少的囊狀細胞，這些明顯的外部囊狀細胞是否與番杏的鹽適應有所關聯？我們將針對這些為數不少的細胞進行測量，以了解不同鹽逆境下的數量、面積是否有所差異，並進一步釐清囊狀細胞在逆境適應上的角色。

(一) 觀察並探討囊狀細胞內容物與耐鹽關聯

1. 將不同鹽逆境(0、0.5、1、2%)下生長至 45 天番杏取出(N=3)，並將根部土壤洗滌乾淨，
2. 將取出之植株，置於烘箱(55 度)中 8 小時，待乾燥後取出。
3. 將根莖葉各取 0.5 克磨碎，加入 0.5 克蒸餾水混合，以鹽度計(圖 18)測量(N=3 取平均)。
4. 將不同鹽逆境(0、0.5、1%)下生長至第 3 對葉之番杏葉取出(N=3)。
5. 以微量滴管吸取第 3 對葉葉背囊狀細胞內容物，置於鹽度計內進行量測。

(二) 探討不同鹽逆境下，囊狀細胞所扮演的角色

比較完不同部位的鹽分含量之後，我們將針對外部囊狀細胞的數量、面積大小來進行測量，以了解不同鹽逆境對囊狀細胞所造成的差異。

番杏條件：不同鹽逆境(0、0.5、1、2%)處理之番杏，待生長至第 3 對葉(45 天)取下處理。

1. 囊狀細胞數量量測：

- (1) 將子葉至第 3 對葉分別取下，置於解剖顯微鏡下進行葉面及葉背細胞分佈的觀察。
- (2) 選取不同鹽逆境下的各葉片(圖 19)，以電子目鏡隨機取葉背三處進行拍攝，並計算單位面積(約 0.5mm^2)下囊狀細胞的數量。(N=3，三重覆取平均值)
- (3) 以 image J 軟體計算不同條件處理之葉片葉面積，再計算葉背的囊狀細胞總量。

註：囊狀細胞總量= 葉背面積*單位面積數量 / 電子目鏡下單位面積



圖 18 鹽度計測不同部位鹽度



圖 19 不同鹽逆境下葉片



圖 20 子葉囊狀細胞小而密集

2. 囊狀細胞面積大小量測

(1) 於解剖顯微鏡下觀察不同鹽逆境(0、0.5、1、2%)下生長至第 3 對葉之番杏葉片。由子葉至第 3 對葉，隨機各取 6 個囊狀細胞，以電子目鏡拍攝並測量直徑，再以測微軟體換算成面積。(三重覆取平均)

(2) 初步觀察後發現子葉囊狀細胞面積小而密集(圖 20)，推測囊狀細胞可能會隨葉面積有所變動，因此為了解囊狀細胞在單位葉面積下的大小，以 image J 軟體計算葉面積後，計算囊狀細胞面積 / 葉面積的比值，並比較差異。

(三) 探討鹽度發生變化下，囊狀細胞所扮演的角色

在了解鹽逆境對囊狀細胞的影響後，我們想知道當環境發生變動，如海水倒灌發生時，會使得土壤的鹽度提升，那新生葉的囊狀細胞是否也會有所改變呢？

1. 由研究一的生長與鹽適應結果，了解到番杏生長至何時較能適應高鹽環境。由淡水環境(0%)下培養至第 4 對葉，進行鹽度改變實驗，分別設立 0、1、3、5%等組別，每日固定澆灌至底部流出為止(圖 21b)，連續以鹽處理 28 日。
2. 將處理後的各組葉片，取下第 4 對葉(原培養環境)及第 5~7 對葉(鹽度改變環境)，以電子目鏡拍攝並量測直徑，並測量葉面積後，計算囊狀細胞與葉面積比值。
3. 比較控制組與鹽化後組別、原培養葉與新生葉間的囊狀細胞差異性。



圖 21a 選取生長至第 4 對葉進行



圖 21b 澆灌鹽水，模擬鹽度改變

三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色

在研究一的組織滲透實驗中，發現番杏組織內有明顯的結晶鈣出現，我們很好奇的是這些結晶鈣和鹽逆境間是否有所關聯，因此進行了以下實驗。

番杏條件：不同鹽逆境(0、0.5、1、2%)處理之番杏，待生長至第 3 對葉(45 天)取下處理。

(一) 探討不同鹽逆境下，番杏葉內結晶的分佈情形

1. 取下不同鹽逆境處理，子葉至第 3 對葉葉片，用單面刀橫切(圖 22a)取下葉子前、中、後共三段相同長度的組織，置於複式顯微鏡下進行結晶分佈的觀察。
2. 計算不同處理下前中後三段組織內的結晶數量，並取平均值。(N=3 取平均)
3. 以顯微測微軟體測量，不同鹽逆境下處理的結晶直徑，單位視野內各取 6 顆平均。

(二) 探討鹽度發生變化下，結晶鈣結晶所扮演的角色

由上個鹽逆境實驗結果，了解逆境對結晶數量或是直徑大小的影響後，改變鹽度環境來看結晶所扮演的角色。

1. 由淡水環境(0%)下培養至第 4 對葉，進行鹽度改變實驗。並設立不同模擬的鹽度環境 ~0、1、3、5%等組別，每日固定澆灌至底部流出為止，連續以鹽處理 28 日。
2. 將鹽處理 28 天後的葉片取下，選取第 4 對葉(原培養環境)及第 5~7 對葉(鹽度改變環境)，各取單葉的前中後三段，計算結晶數量。
3. 比較鹽度發生改變後，鹽化組、新生葉與原培養葉間結晶鈣的差異。



圖 22a 單面刀橫切不同部位

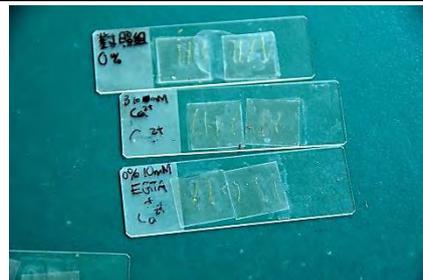


圖 22b 計算橫切組織結晶數

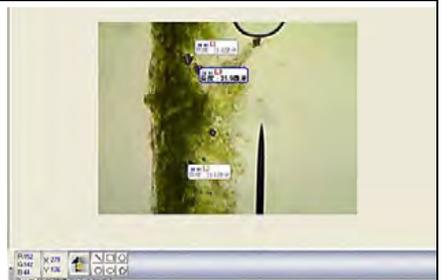


圖 22c 顯微測量軟體計算直徑

四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響

在鹽逆境對結晶鈣的影響實驗後，查詢文獻發現鈣離子與結晶鈣的結晶有所關聯，且當生物遭受脅迫環境時，胞質中的鈣離子濃度會提升，因此我們想知道的是鈣對於研究二、三的結果有什麼樣的影響，另外，是否外源性的鈣離子也能增加植物對鹽逆境的反應呢？

(一) 探討不同濃度的鈣離子，對番杏生長的影響

1. 配製不同濃度氯化鈣溶液，分別為 5mM、10 mM、20 mM。
2. 將在淡水(0%)環境中培養至第 3 對葉之番杏，以不同濃度鈣離子每日固定澆灌至底部流出為止，持續處理至第 5 對葉長出為止。
3. 將不同處理組取出，洗滌乾淨測量生物質量(鮮重)與最大葉面積。(N=3，三重覆平均)

(二) 探討鈣離子對番杏外部囊狀細胞的影響

由上述實驗結果，選取對番杏生長最好之鈣離子濃度(5mM)進行接下來的實驗。另外，除了解外加性鈣離子的影響之外，我們也配製了 EGTA(圖 23a) (鈣離子螯合劑)來進行比較。

1. 選取在淡水(0%)環境下栽植至第 3 對葉之番杏後，分為淡水組(0%)與鹽水組(3%)，同時以不同溶液每日固定進行澆灌至底部流出為止，處理至第 5 對葉形成。

處理組別如下：

0%組			3%組(探討鹽逆境下的反應)		
0%	5mM	5mM	3%	5mM	5mM
對照組	鈣離子	EGTA	對照組	鈣離子	EGTA

2. 比較 0%、3%兩個組別，在原環境(第 3 對葉)與處理後環境(第 4、5 對葉)之囊狀細胞在面積大小比值上的差別。(N=3，三重覆取平均)

(三) 探討鈣離子對番杏內部結晶鈣的影響

1. 選取番杏及處理條件與囊狀細胞實驗相同。在持續不同溶液處理第 5 對葉形成後，將第 3~5 對葉片取下，將分別將葉前中後進行橫切，置於複式下計算結晶數量。
2. 比較 0%、3%兩個組別，在原環境(第 3 對葉)與處理後環境(第 4、5 對葉)之結晶鈣在結晶數量上的差別。(N=3，三重覆取平均)

(四) 探討鈣離子對囊狀細胞內鹽度的影響

1. 設立 3%及 3%+鈣離子的組別，待生長至第 3 對葉後，取葉背囊狀細胞進行量測鹽度。

(五) 探討鈣離子對番杏抗鹽逆境的影響

1. 選取番杏處理條件與上述實驗同。持續處理至第 5 對葉形成後，取下不同溶液之植株。
2. 測量不同溶液處理條件下的根長、生物質量(圖 23c)與最大葉面積。
3. 比較生長情形與囊狀細胞及結晶鈣結果，了解鈣離子對逆境所扮演的角色。



圖 23a 配製 EGTA 溶液



圖 23b 以不同溶液處理番杏



圖 23c 測量不同條件下鮮重

伍、研究結果

一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形

(一)探討不同鹽逆境下的種子發芽率及存活率

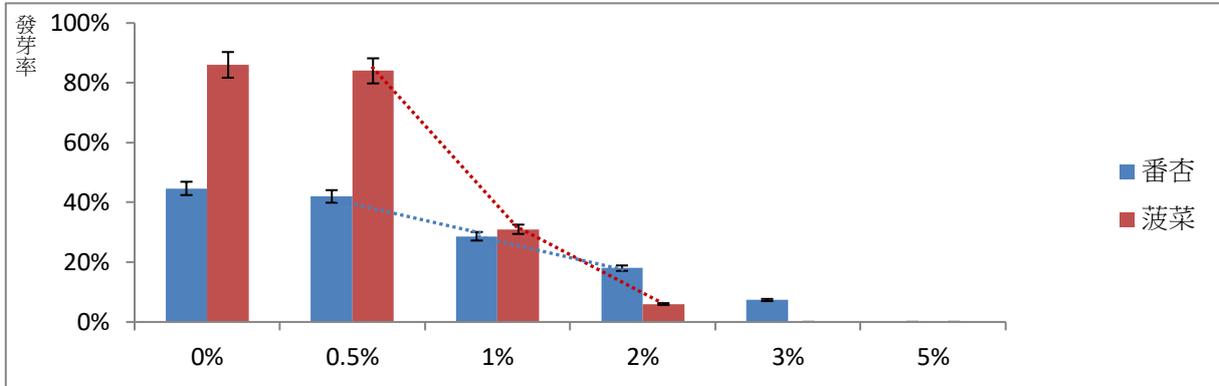


圖 24a 不同鹽逆境下的發芽率

在不同鹽逆境下的發芽率結果，番杏的發芽率即使在淡水環境中也不高(44%)，但在相當 1/3 海水濃度(1%)下的發芽率，仍有 28.67%。對照組的菠菜，雖然 0.5%以下的發芽率維持在 80%以上，但鹽度提升至 1%時，發芽率大幅下降 69%。相當海水濃度則僅有番杏能夠發芽

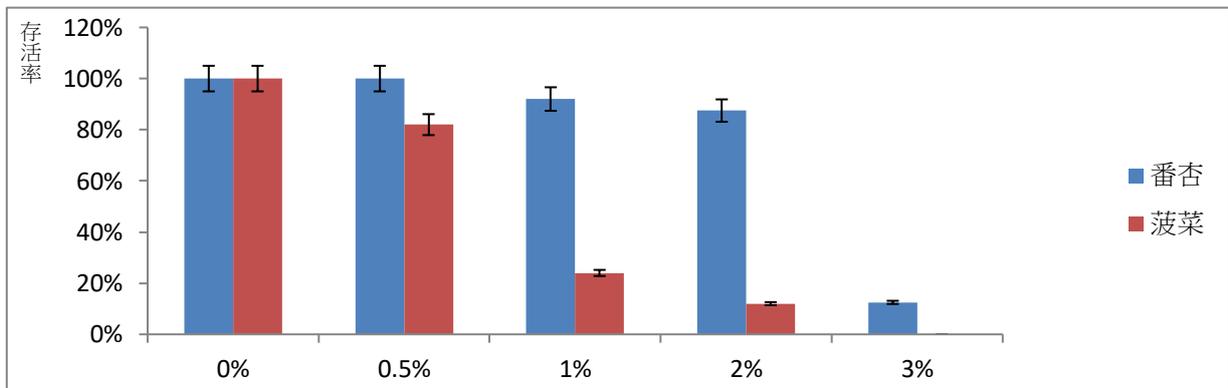


圖 24b 不同鹽逆境下存活率(以生長至第 1 對葉，約 15 天為記錄依據)

在鹽逆境下存活率方面，番杏在 2%鹽度以下，大致有 85%以上存活率，對照組的菠菜，在鹽度提升至 1%時，存活率大幅下降約 75%，降至 24%左右。值得一提的是，番杏在相當海水濃度(3%)處理下，存活率降至 12.5%，顯示番杏可能在這個生長期無法耐受較高鹽度。



圖 24c 番杏第一對葉(箭頭)



圖 24d 菠菜鹽逆境生長(0、0.5、1、2%)

(二)比較不同鹽逆境下的生長情形

番杏的種子發芽率不高(50%以下)，子葉長出之後，持續鹽逆境的环境，生長情形是如
呢？我們將對直接接觸逆境的根、與光合作用相關的葉面積以及整體生物質量來進行探討，
此外，在發芽率的結果中，3%明顯較不好，因此接下來生長情形的逆境設定在0~2%範圍內。

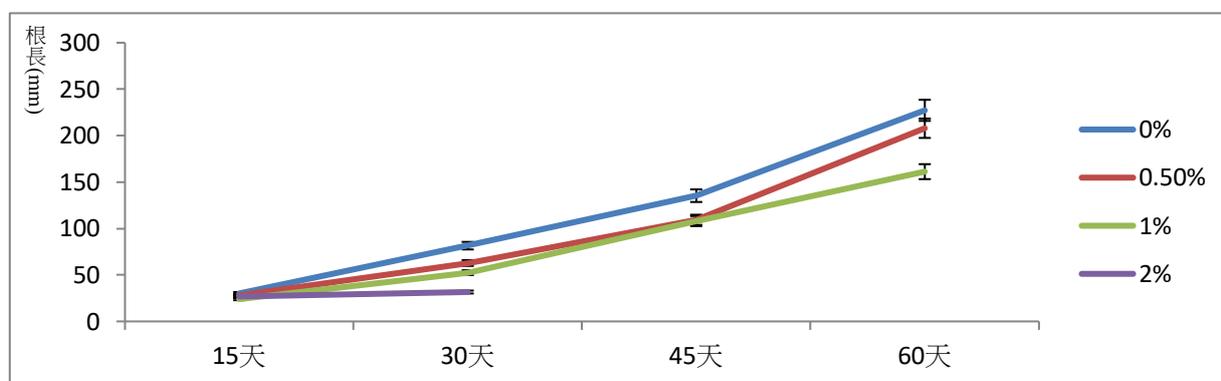


圖 25a 不同鹽逆境下，不同生長時間根長比較

不同鹽逆境根長比較結果，2%的組別可能因較高鹽度，生長速率較緩慢，記錄至 30 天
的根長，葉面積、生物質量也如此。整體來看，隨著鹽度上升，根長隨之下降。在 0%的組別，
根發展的最好，且種植時間較長的情形下(60 天)，0、0.5%的組別根長明顯與 1%出現差別。

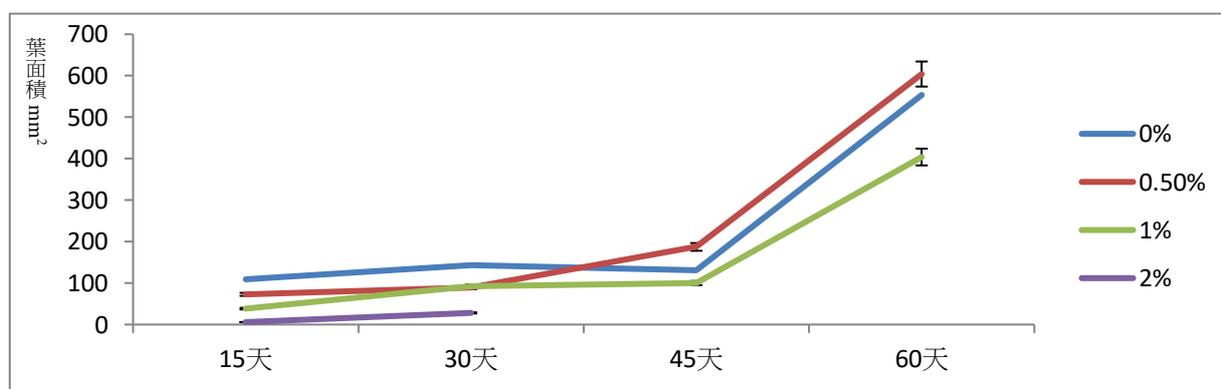


圖 25b 不同鹽逆境下，不同生長時間葉面積比較

最大葉面積的結果，生長初期(30 天)以前，以 0%的組別具有最大的葉面積生長，但
30 天之後，鹽度略為提升的環境(0.5%)之下，卻有較好的生長表現，顯示可能 30 天後較
為適應此鹽度環境，有較好的葉生長面積。



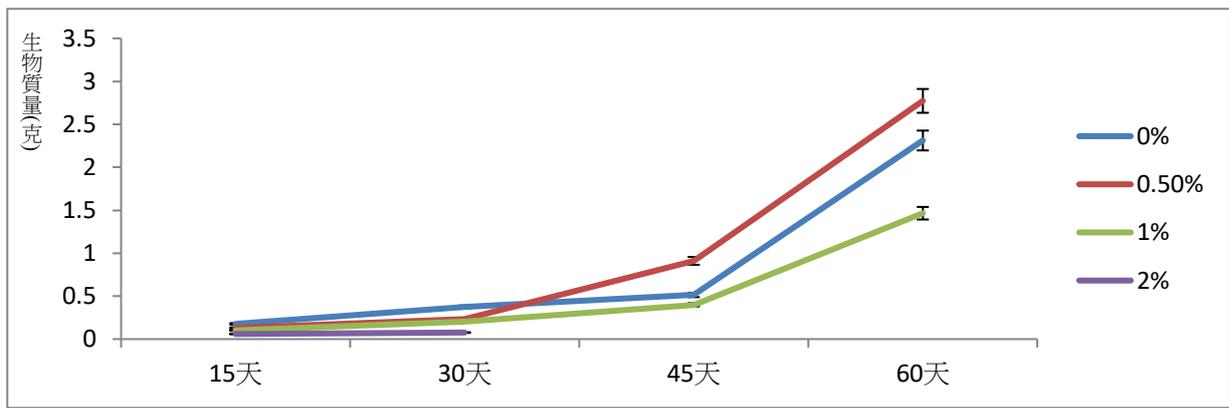


圖 26a 不同鹽逆境下，不同生長時間生物質量比較

在生物質量(鮮重)的測量結果，與最大葉面積結果類似。30 天之前，以淡水環境 0% 的組別有較好的生長，但在 30 天之後，可能較能適應低鹽度(0.5%)的環境，反而有較好的生物質量表現。當鹽度提升到 1% 時，整體的生物質量與 0、0.5% 的組別出現較明顯的差異，在我們的持續觀察 60 天之後的生長，更為明顯。

綜合生長情形來看，30 天左右的生長時間(第 3 對葉形成)可能對番杏而言是一個生長較為成熟的時間點，也就是說在這個時期較能適應鹽度刺激(0.5%)的環境，在光合作用的葉面積以及整體發展的生物質量上均可看出這個趨勢，值得一提的是根長並沒有相似的生長情形，至 60 天為止都以 0% 為較好。



圖 26b 不同生長時間下，鹽逆境對生長情形影響

甲、乙，由左至右分別為 0、0.5、1、2%；丙、丁由左至右為別為 0、0.5、1%。

生長情形部份，可看出在 30 天以前的差異性不太，且 0% 組別較為良好，但在 30 天後的鹽適應上出現一些轉變，0.5% 組別相對生長較好(面積、質量)。

(三)記錄不同鹽逆境下的生長曲線

番杏為台灣海邊原生種植物，文獻上並沒有見到相關的鹽逆境下生長記錄，因此我們由發芽日數開始進行，並記錄新葉的出現時間，建立室內土耕環境下的生長曲線。

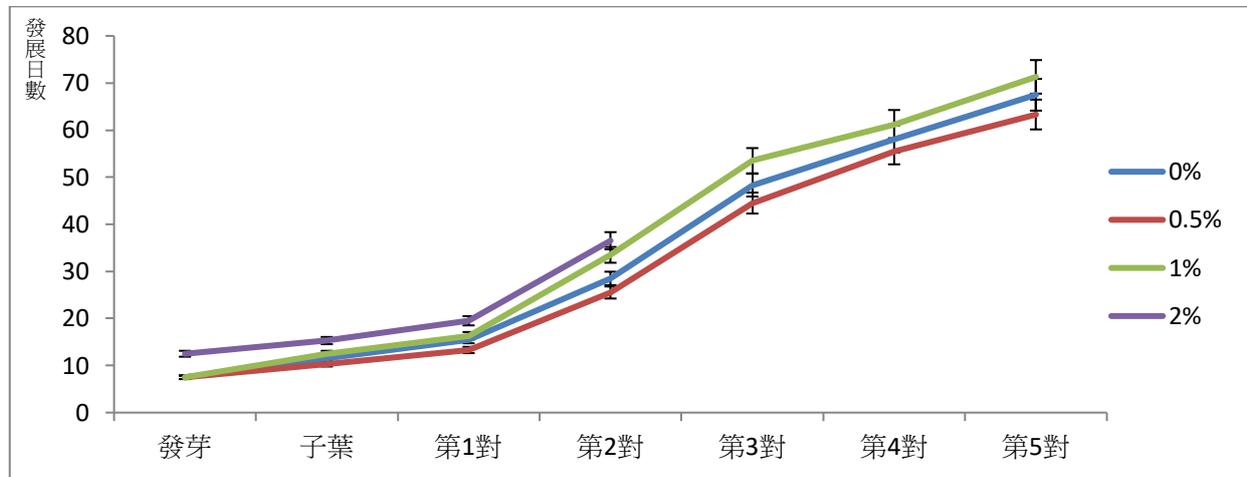


圖 27a 不同鹽逆境下的生長曲線

相當海水鹽度(3%)的組別，在發芽率及存活率上皆偏低(圖 24a、b)，且生長十分緩慢，葉子呈現半枯萎狀(圖 27b)，因此在生長曲線方面，不列入討論。生長曲線的橫軸表示出現的新葉數目，縱軸表示新葉的出現記錄時間，所需時間愈多表示相對生長較為緩慢。

生長曲線結果顯示，以 0.5%的組別生長較快，由發芽所需日數，到子葉及其它新葉的生長，均較其它組別來得快，而 0%及 1%的組別，生長時間則相對較慢，當鹽度提升到 2%時，對於番杏的生長出現明顯的阻礙，0~1%組別生長至第 5 對葉時，2%仍未有新葉出現。在過高(1、2%)的鹽環境中，番杏的生長速度較緩慢，而淡水、較低鹽分(0.5%)的環境番杏的生長速度較快。

由生長曲線及上述生長的研究結果來看，大致上而言，在 30 天(第 3 對葉)時是個有趣的切分點，30 天前，0%長得較好；30 天後 0.5%則長得較快也較好。我們推測第 3 對葉對於番杏在耐鹽上可能扮演一定分量的角色。

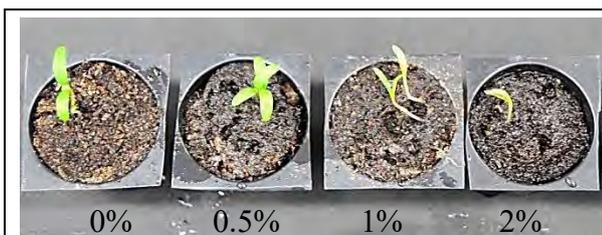


圖 27b 不同鹽逆境下長出子葉時間不同

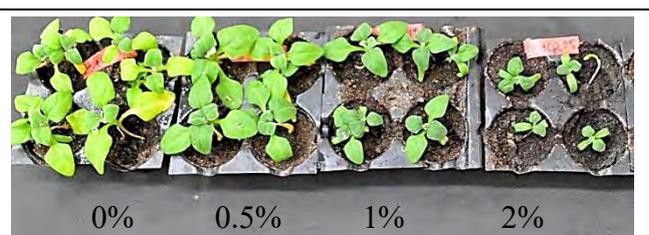


圖 27c 30 天後，0.5%的生長情形較好

(四)探討葉肉組織滲透濃度與鹽適應關聯.

在鹽逆境與生長情形的結果，0.5%組別在 30 天後，生物質量及葉面積都有較好的生長，顯示番杏較能適應這個鹽度。我們好奇的是，番杏葉肉組織的滲透濃度是否接近這個鹽度呢？

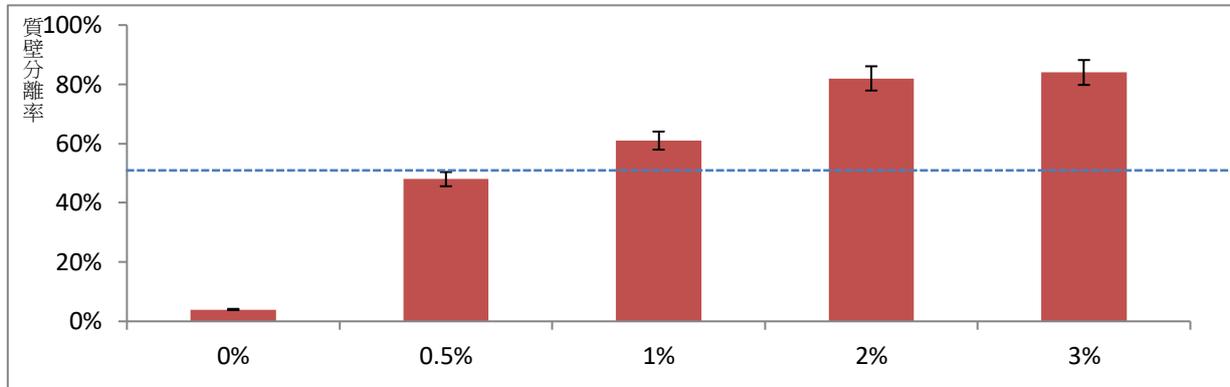


圖 28a 不同鹽逆境下，番杏葉肉組織細胞質壁分離比例 (N=62)

在滲透結果，番杏葉肉浸於 0.5%溶液，質壁分離比例較接近 50%，顯示此濃度(0~0.5%)可能接近番杏的等滲透濃度，此外 1、2、3%組別，質壁分離比例分別為 61、82、84%，顯示過高的滲透濃度較不利生長。這與之前的鹽逆境生長結果類似。註：質壁分離比 50%時為等張溶液

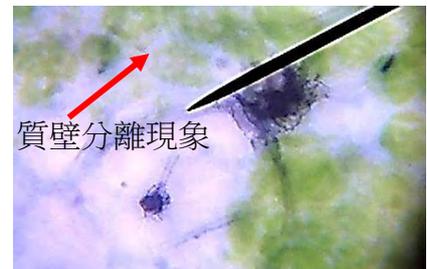


圖 28b 0.5%，質壁分離約 50%

(五)探討番杏生長與鹽適應間的關聯

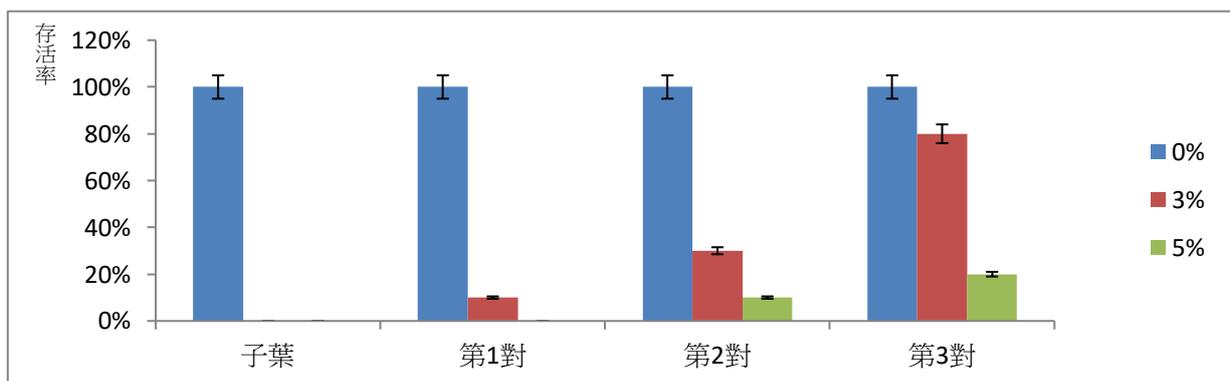


圖 29a 不同鹽逆境下與生長期之存活率

由種子發芽率及存活率了解，3%鹽度不利番杏生長，我們進行不同生長期與鹽適應間的實驗。結果顯示高鹽度(3%)處理，第 3 對葉有不錯存活率(80%)，而第 2 對葉之前皆出現不耐鹽現象。第 3 對葉可能是番杏耐鹽的關鍵葉片。



圖 29b 不同生長期與鹽逆境

二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色

首先，我們將從番杏外部進行囊狀細胞的初步觀察，並探討根莖葉的鹽份含量，以了解番杏不同部位的鹽分含量情形，並進一步探討囊狀細胞內容物與耐鹽關係。

(一)觀察並探討囊狀細胞內容物與耐鹽關聯



初步觀察番杏外觀，囊狀細胞分佈在莖、葉面及葉背。葉面的囊狀細胞較不明顯，葉背的囊狀細胞不論老葉或新葉均較明顯。因此我們選擇葉背的囊狀細胞來進行後續的實驗。

為了了解囊狀細胞是否具有儲鹽的功能，我們將不同鹽逆境下處理的番杏進行烘乾，將根莖葉分開，以測量鹽分含量。

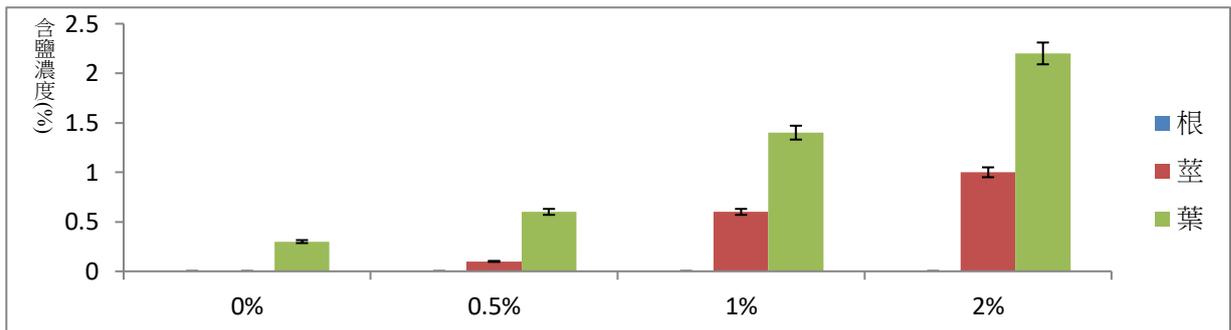
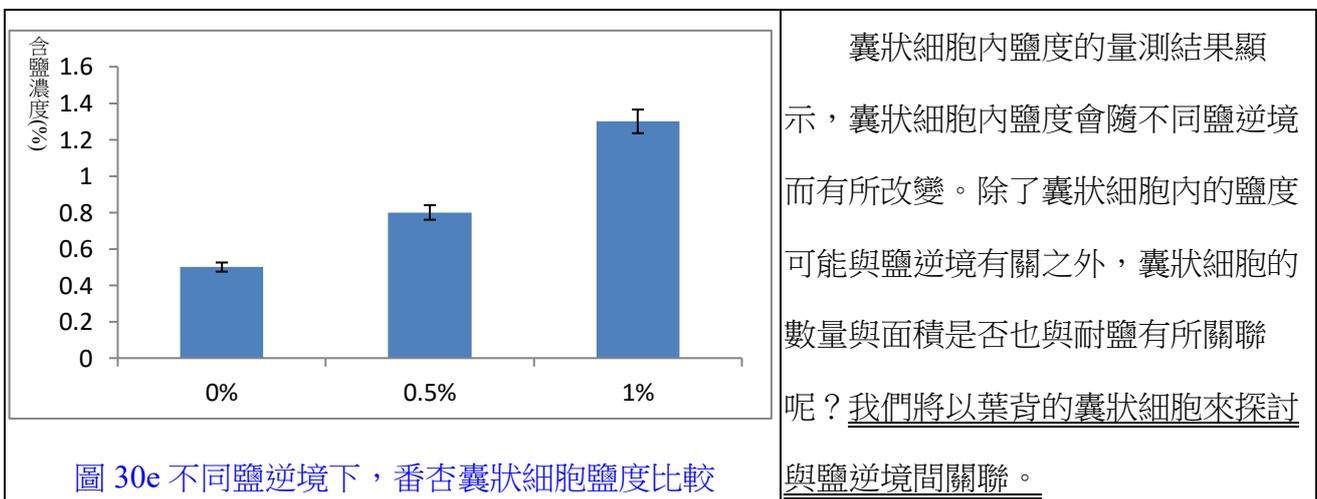


圖 30d 不同鹽逆境下番杏，不同部位含鹽情形

由不同部位含鹽情形，可以看出具有囊狀細胞的莖及葉皆能測得鹽分的存在，而根的部分則無法測得鹽分，顯示具有囊狀細胞的莖、葉有可能與鹽逆境有所關聯。



(二)探討不同鹽逆境下，囊狀細胞所扮演的角色

在了解為數不少的囊狀細胞可能與鹽逆境有關後，接著我們將測量計算不同鹽逆境下密集的囊狀細胞，以了解是否隨著鹽度上升，而囊狀細胞數量也隨之上升。

1. 囊狀細胞的數量與鹽逆境關聯

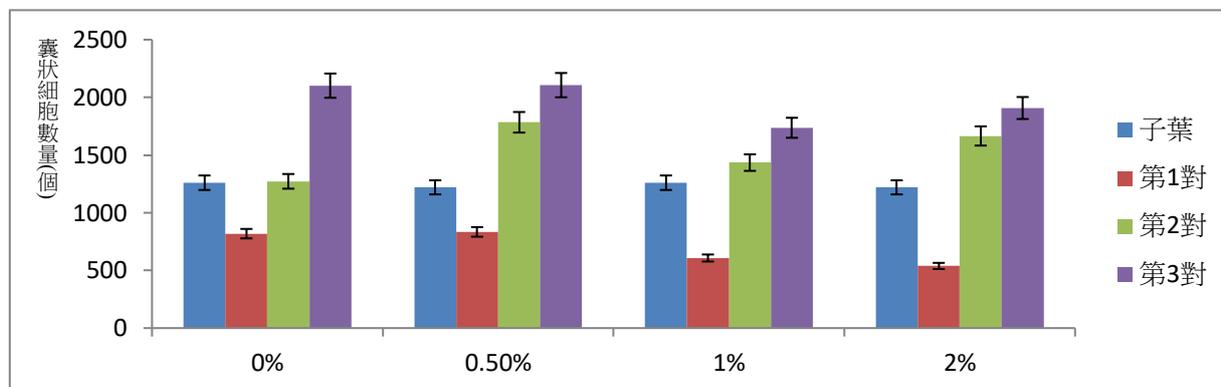


圖 31a 不同鹽逆境下，葉背囊狀細胞總量

在不同鹽逆境處理的結果，同一對葉，在不同鹽度的處理下，囊狀細胞總量差異性並不大，0、0.5%的第3對葉較1、2%濃度多，第2對葉在不同鹽逆境下也無法看出有一定的傾向。囊狀細胞的數量與鹽逆境間的關聯，似乎不是很明確，我們將進行囊狀細胞面積的測量，以了解是否隨鹽度上升而上升。

2. 囊狀細胞的面積大小與鹽逆境關聯

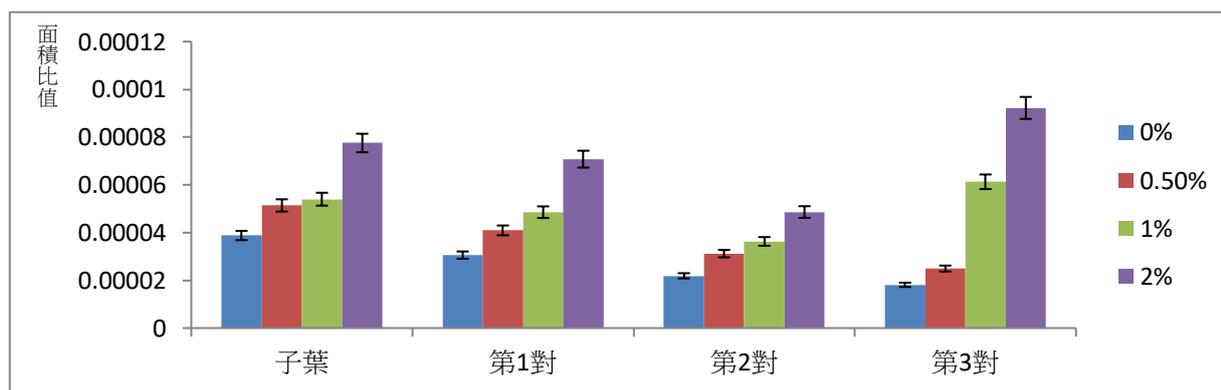


圖 31b 不同鹽逆境下，囊狀細胞面積與葉面積比值

我們量測囊狀細胞面積與葉面積進行比值來了解差異。結果大致上以子葉的相對面積最大，隨新生葉而逐漸減小，在不同鹽逆境方面，隨鹽度上升，皆有面積變大趨勢。值得一提的是，在鹽度提升的環境下(1、2%)，第3對葉的囊狀細胞相對比值變大，這與研究目的的一的結果，第3對葉為鹽適應的關鍵時期類似，顯示囊狀細胞的面積與鹽逆境間存在一定關聯。

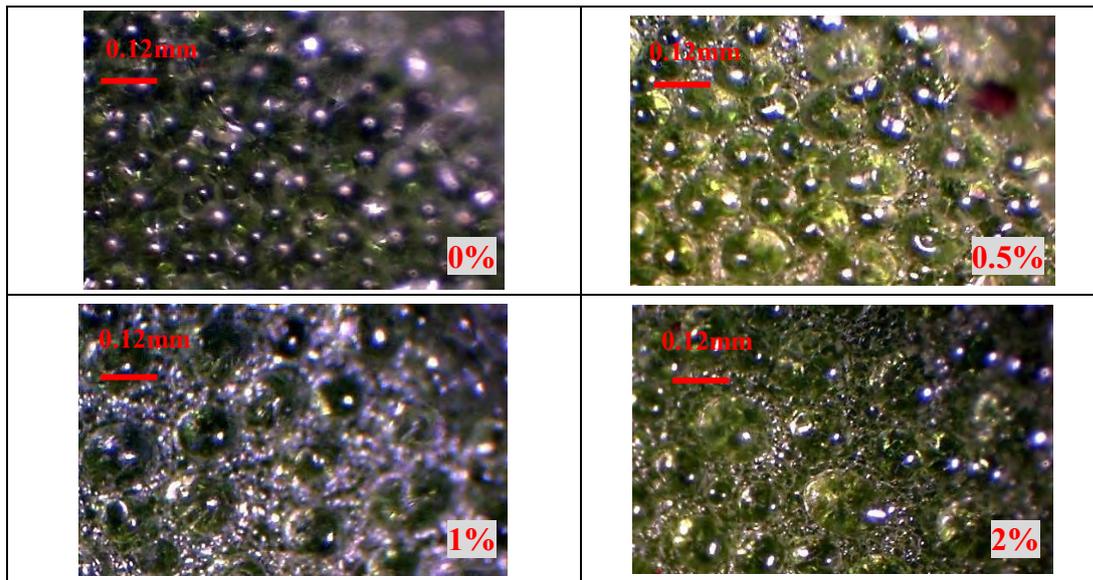


圖 31c 不同鹽逆境下，第 3 對葉背囊狀細胞的比較

(三)探討鹽度發生變化下，囊狀細胞所扮演的角色

番杏原生地在台灣海邊，在颱風季節常有海水淹到海灘地的情形，我們想知道鹽度發生改變對番杏的影響是什麼，並進一步了解囊狀細胞在鹽逆境下所扮演的角色。

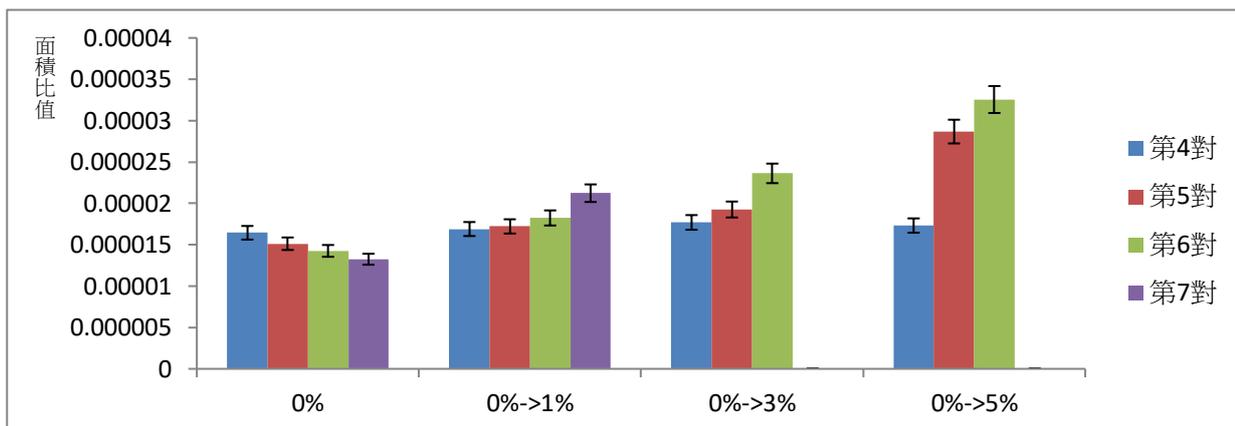


圖 32a 不同鹽度改變下，囊狀細胞面積與葉面積比值

將 0%培養至第 4 對葉後，開始進行鹽度改變的澆灌，持續約 1 個月的時間。由上述結果了解囊狀細胞與鹽逆境間的關聯，與數量上較無相關，而是與面積的比值有關，因此這個部份的研究結果以面積比值進行討論。結果顯示，鹽度發生改變時，在生長情形方面，高鹽度環境會使得生長速率趨緩，0%->3%、0%->5%這兩組的第 7 對葉與另外兩組相比，尚未形成。在囊狀細胞面積比值部分，大致上鹽逆境處理的新葉(第 5~7 對)有面積比值變大的趨勢，尤其改變鹽度至 5%組別，第 5、6 對的細胞面積比值更是比對照組(0%)分別增加 89%、128%，原淡水環境培養的第 4 對葉，則面積比值改變差異不大。由這個實驗，可以了解番杏在鹽度提升下，可能會藉由囊狀細胞的相對面積變大來進行適應。

三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色

在研究目的的一的滲透實驗，發現了葉肉組織有明顯的結晶鈣，除了外部囊狀細胞與鹽適應間的關聯外，我們很好奇的是這一顆顆星羅棋佈的結晶，是否也與鹽逆境隨應有所關聯？

(一)探討不同鹽逆境下，番杏葉內結晶的分佈情形

1. 結晶鈣的大小與鹽逆境間關聯

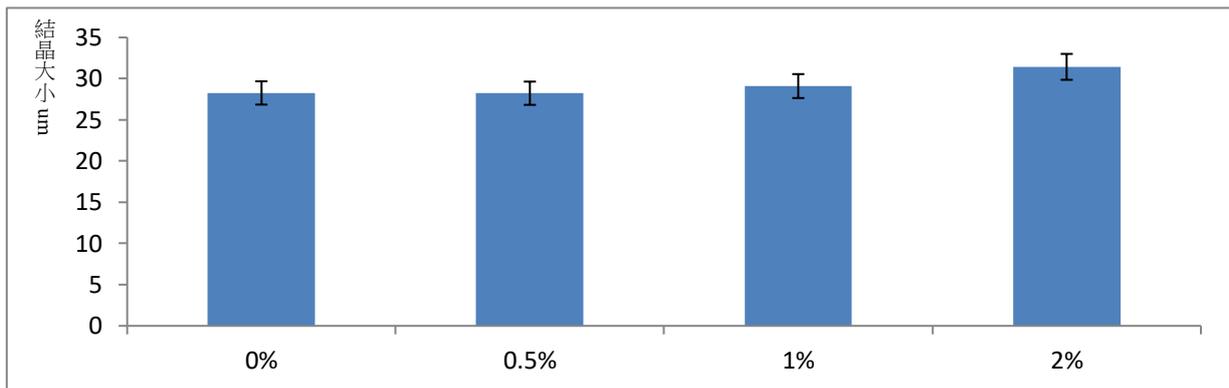


圖 33a 不同鹽逆境下，結晶鈣結晶的大小

在不同鹽逆境下的結晶鈣大小比較，結果顯示結晶鈣的結晶大小與鹽度的提升沒有明顯的關聯(圖 33c)。1%與 2%結晶鈣大小之 t 檢定，p 值=0.10。除了結晶鈣大小，我們發現在較高鹽度的環境下，葉肉組織內的結晶鈣數量有增多的趨勢，接著將對數量進行探討。

2. 結晶鈣的數量與鹽逆境間關聯

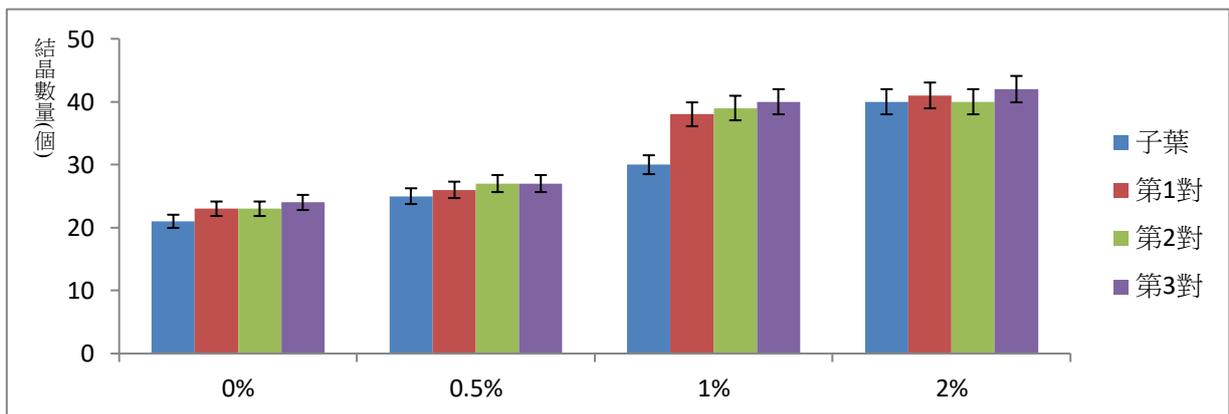


圖 33b 不同鹽逆境下，結晶鈣結晶數量比較

在結晶鈣結晶數量的結果，顯示隨著鹽度的提升，結晶鈣數量有增多的傾向。0%與 0.5%結晶鈣數量之 t 檢定，p 值=0.004，達顯著差異。

整體來看，較高鹽度的環境下(1、2%)，均較 0%的組別有明顯增多的現象，番杏葉內的結晶鈣數量，可能會隨著鹽度上升而有增多的現象。

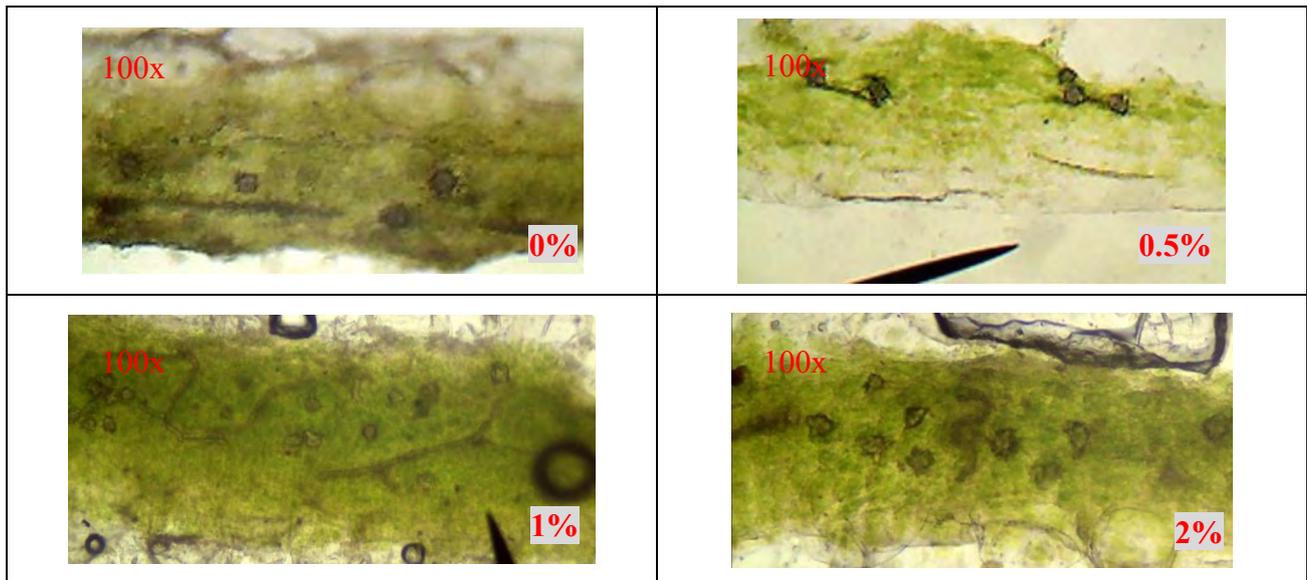


圖 33c 不同鹽逆境下，第 3 對葉內結晶鈣情形

(二)探討鹽度發生變化下，結晶鈣所扮演的角色

為了進一步了解結晶鈣結晶在鹽逆境下所扮演的角色，我們藉由鹽度改變的實驗，來了解結晶鈣數量的變化。

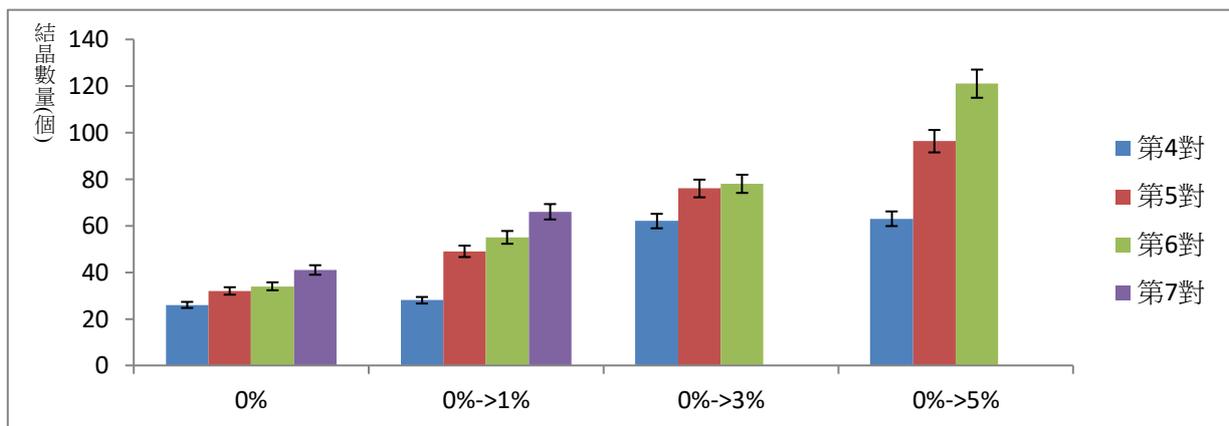


圖 33d 不同鹽度改變下，結晶鈣數量比較

由淡水環境培養至第 4 對葉後，開始進行不同鹽度的處理，持續約 1 個月。結果顯示原淡水環境培養(第 4 對)下的結晶數量，在較高鹽度的組別與淡水對照組相比，有顯著增多的趨勢。同一對葉在不同的鹽改變處理下，與對照組相比均有結晶數量變多傾向，尤其鹽度 5% 組別的第 6 對葉，結晶鈣結晶數量更為對照組的 120%。

鹽度發生改變的結果，結晶鈣不只在新生葉的數量發生變化，在原本已長出的葉子內，結晶數量也會改變，大致隨鹽度上升而增加。這顯示結晶鈣可能是在鹽逆境調節的「倉庫」，數量可能隨環境改變，結晶鈣中的「鈣」會不會是影響結晶數量變動的可能原因呢？

四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響

在鹽逆境下結晶鈣的結果中，我們發現結晶的數量與鹽逆境有關。在查閱文獻後，發現鈣離子在生物逆境中扮演了相當重要的角色，能夠協助對抗逆境。因此，我們進一步想要了解的是，如果額外添加的鈣離子是否會增加結晶鈣的結晶數量呢？此外，對於番杏囊狀細胞的影響是什麼？是否與囊狀細胞內的鹽度有關？更重要的是是否能夠增加番杏在鹽逆境下的生長呢？

(一)探討不同濃度的鈣離子，對番杏生長的影響

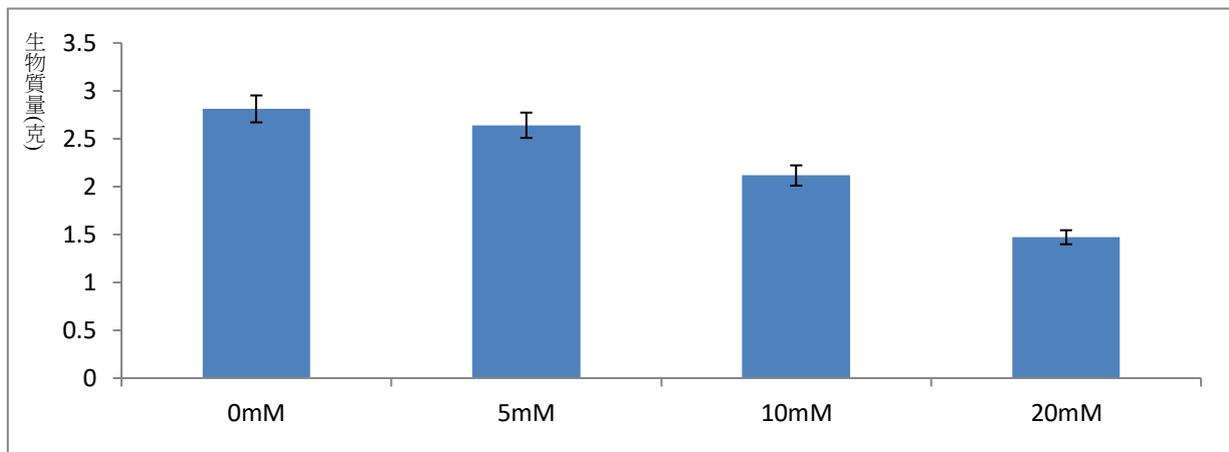


圖 34a 添加不同鈣離子濃度，對生物質量的影響

首先，配製不同濃度的鈣離子，以了解何種濃度對番杏的生長較好。生物質量(鮮重)的結果，在 0%的環境下澆灌，與對照組相比，10mM、20mM 的濃度組別，生物質量分別下降了 24%與 45%，而 5mM 的組別則與無外源性添加的對照組相差不大。可能是較高濃度的 10、20mM 組別反而對生長出現抑制。接下來的實驗，我們將選取鈣離子濃度為 5 mM 來進行。

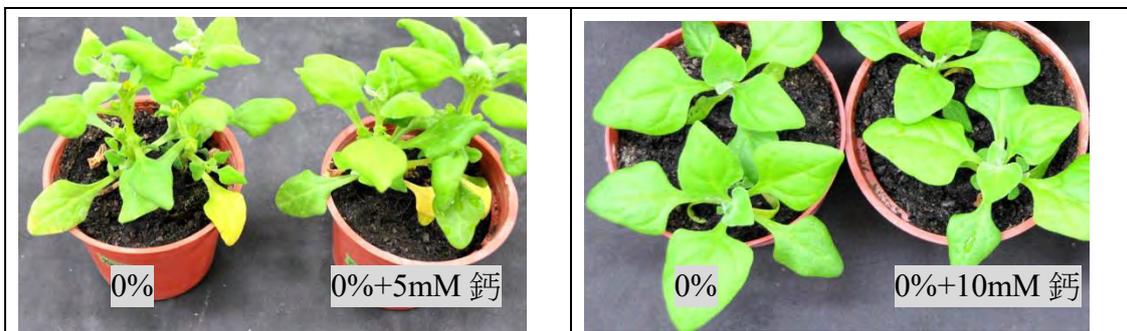


圖 34b 添加不同鈣離子濃度，對生物質量的影響

5mM 的外源性鈣離子較適合番杏的生長，10mM 以上則可能會造成生長情形受到抑制，在生物質量及生長情形較不好。

(二)探討鈣離子對番杏外部囊狀細胞的影響

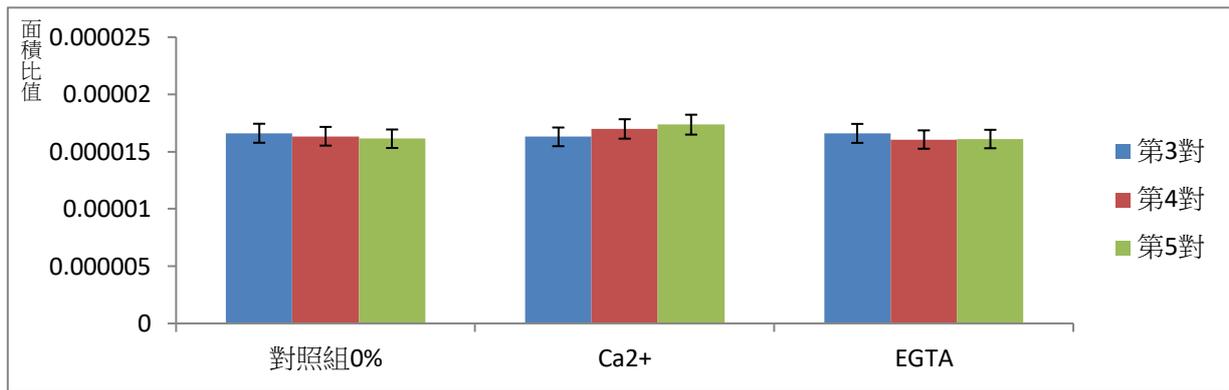


圖 35a 淡水環境下，鈣離子對囊狀細胞面積比值影響

第3對葉形成後，開始進行不同條件處理。除添加外源性鈣離子(5mM)，並加入 EGTA(5mM 鈣離子螯合劑)降低土壤中鈣離子濃度。結果上，淡水環境組別，鈣離子添加、EGTA 與對照組，不論是新長出的第4、5對葉或是原環境第3對舊葉，都無達到顯著差異(p 值>0.05)。外源性鈣離子添加或是降低土壤中的鈣離子，對於0%環境下的囊狀細胞面積比值無太大影響。

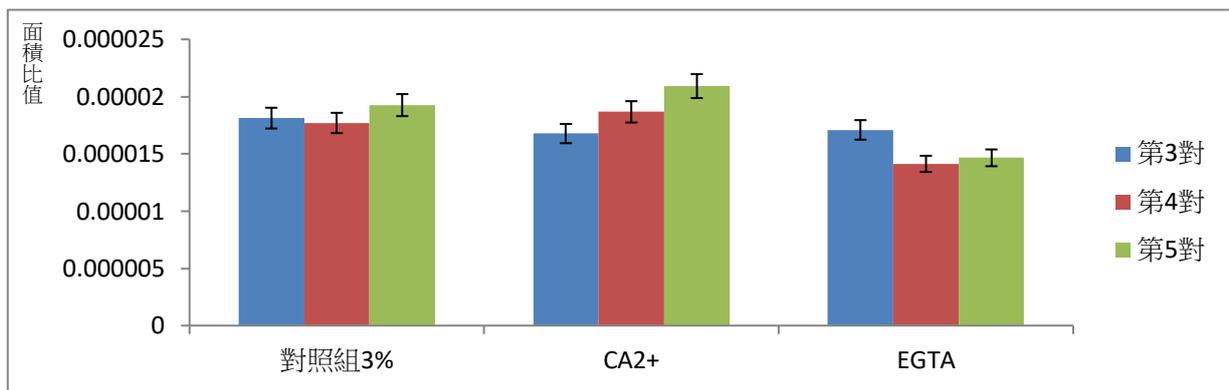
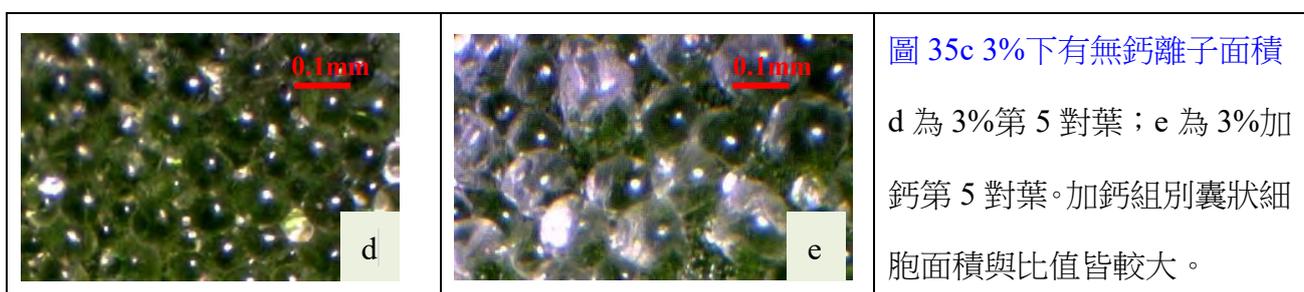


圖 35b 鹽逆境環境下，鈣離子對囊狀細胞面積比值影響

實驗結果，在鹽逆境(3%)處理下，添加鈣離子的組別，新生葉(第4、5對)較原淡水環境(第3對舊葉)的囊狀細胞面積比值大(達顯著差異，p 值皆<0.05)，此外添加鈣離子的新生葉也較對照組的新生葉細胞面積比值大(達顯著差異，p 值皆<0.05)，加入 EGTA 組的新生葉細胞比值則顯著降低。在高鹽逆境發生時，鈣離子的添加會使得新生葉的囊狀細胞面積比值變大。



(三)探討鈣離子對番杏內部結晶鈣的影響

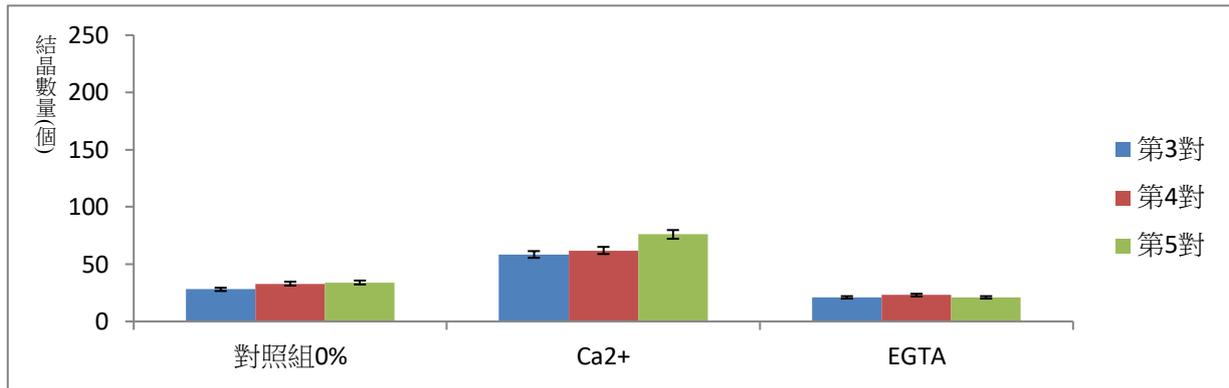


圖 36a 淡水環境下，鈣離子對結晶鈣數量的影響

在形成第 3 對葉形成後，進行不同條件處理。研究結果發現，即使在淡水環境下，加入外源性的鈣離子(5mM)，仍會促進葉肉組織內結晶數量的增加，且不只是新長出的葉子，原環境的第 3 對舊葉也大幅增加，加鈣組與對照組相比，整體結晶數量增加了 106%。在添加 EGTA 的組別，則發現結晶鈣數量與對照組相比下降不少，降低了約 20.6%。

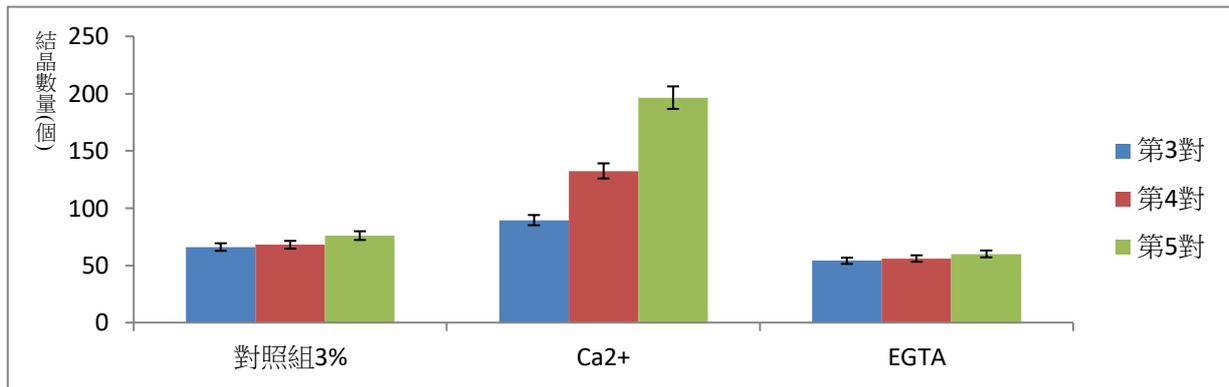


圖 36b 鹽逆境環境下，鈣離子對結晶鈣數量的影響

鹽逆境的結果，加入外源性鈣離子的組別，不僅新生葉的結晶鈣數量顯著增加，且原環境的第 3 對葉也是如此；EGTA 組別的結晶數量則較對照組降低約 19%。

在高鹽逆境發生時，鈣離子使得番杏葉內的結晶鈣數量增多。



(四)探討鈣離子對囊狀細胞內鹽度的影響

在上個實驗中，了解到鈣離子會使得結晶鈣的數量增加，在鹽逆境環境下也是如此，那麼添加的鈣離子與鈉有何關聯呢？是否與囊狀細胞內的鹽度有所相關？

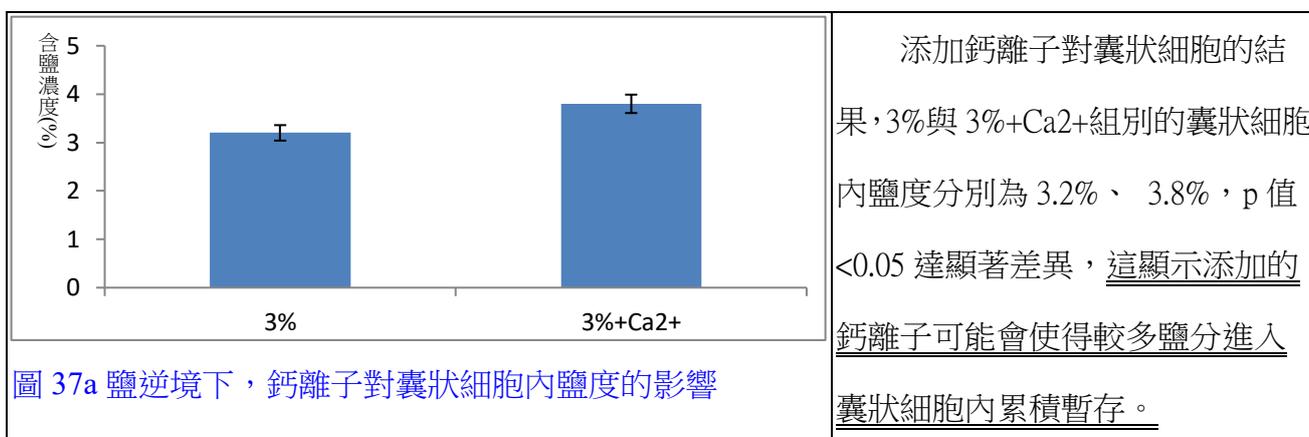


圖 37a 鹽逆境下，鈣離子對囊狀細胞內鹽度的影響

(五)探討鈣離子對番杏抗鹽逆境的影響

由上述的實驗，可以了解到在鹽逆境發生時，鈣離子會使得囊狀細胞比值及結晶數量增加。此外，我們更想知道的是外源性的鈣離子是否能夠協助對抗逆境使得生長較為良好？量測了不同條件鹽逆境下的最大葉面積及生物質量以進行了解。

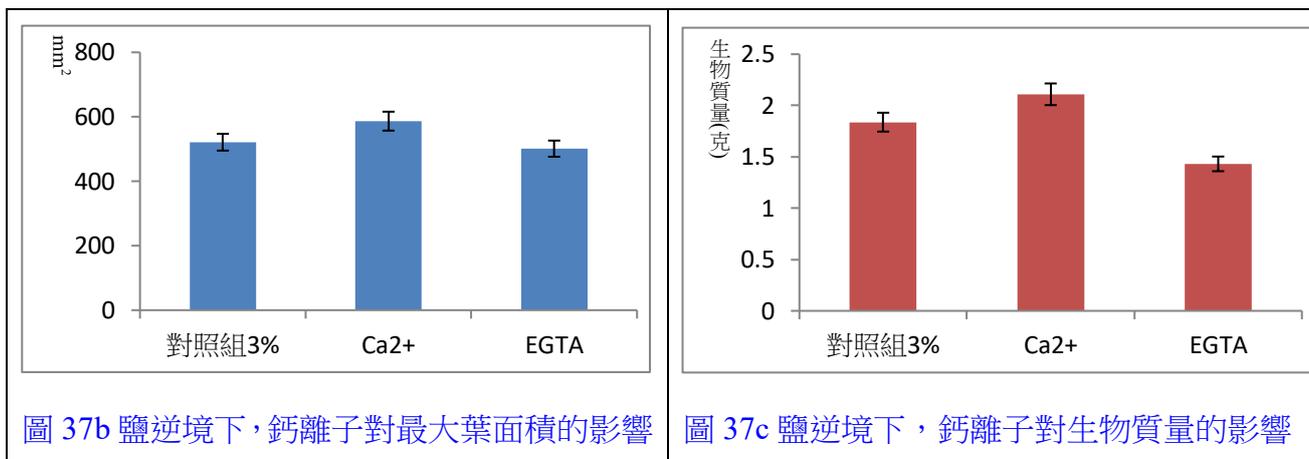


圖 37b 鹽逆境下，鈣離子對最大葉面積的影響

圖 37c 鹽逆境下，鈣離子對生物質量的影響

3%的鹽逆境處理下，最大葉面積的結果顯示，添加鈣離子的組別與對照組葉面積分別為 586.48、521.21mm²，p 值<0.001 達顯著差異，EGTA 的組別(501.13 mm²)與對照組相比也明顯較小。生物質量的結果與最大葉面積的測量類似，添加鈣離子組別(2.11 克)，生物質量顯著高於對照組(1.83 克)，p 值<0.05 達顯著差異。鈣離子能在鹽逆境下，增加番杏葉面積及生物質量。



陸、討論

近年，不只台灣，劇烈型態的天氣變化，除了直接影響人們的生活外，也影響了糧食與蔬菜短缺的危機。台灣近年的夏天炎熱，多個侵襲台灣的颱風，也造成了海水倒灌等問題，冬季雖有暖化的態勢，但仍有不少寒流，極端天氣的型態，對於海邊植物而言更是一個嚴苛的考驗，再加上貧瘠、鹽化的土壤，使得生活於這個險惡環境下的植物，演化了許多抗逆的機制。



圖 38 校園生長良好的番杏

鹽化對植物而言，是很重要的生長阻礙，在台灣造成了許多海邊土地無法種植。劉玉山(2009)於鹽分逆境對植物的文中，提及依植物鹽害反應的不同，將植物分為三大類：1. 鹽土植物，如紅樹林，能忍受 NaCl 濃度在 1.2~3%間；2. 能忍受高鹽的非鹽土植物，如番茄；3. 淡土植物，在 NaCl 濃度 0.2%時即會造成鹽害傷害。因此我們將番杏的鹽逆境濃度設定為 0%(淡土環境)、0.5%(一般植物耐鹽上限)、1、2、3%(高鹽度環境)等幾種。

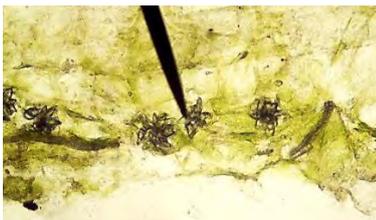
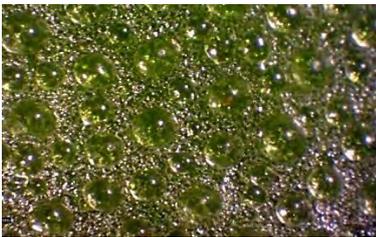


圖 39 番杏囊狀細胞、結晶鈣，鹽逆境相關？

台灣海邊原生種的番杏，具有多重抗逆的能力，全中和(2012)指出番杏具有耐鹽耐旱等能力，能夠適應台灣海邊環境型態，在醫藥方面，楊鈞隆(2006)的論文也提及番杏具有抑制細胞增生能力，也常被作為民間草藥使用。多重抗逆加上營養豐富，口感近似菠菜，被稱為紐西蘭新菠菜、台灣東部的冰花，目前花蓮區農改場正大力推廣作為野菜食用。在查詢文獻後，發現番杏在國內的抗鹽機制相當少見，多偏向野菜的推廣報導，因此我們試著建立不同的鹽逆境環境，來探討番杏在逆境下的生長情形，初步種植之後，發現番杏幼苗期無法忍受較高的鹽

度(3%)，因此我們假設番杏需發展到一定階段才能耐鹽。在鹽逆境適應部份，我們觀察到明顯的葉背囊狀細胞與葉內的結晶鈣，也讓我們很好奇這是否與逆境適應有所關聯，因此假設囊狀細胞的數量與面積、結晶的大小與數量來進行實驗。了解結晶與逆境關係，並進一步探討結晶鈣中的鈣離子對番杏而言，扮演了什麼樣的角色，期待由我們這一系列的實驗，能揭開台灣原生種海邊植物如何在逆境下求生的謎團，以下是關於實驗的討論：

一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形

1. 發芽率：番杏雖然為台灣原生種的植物，但發芽率卻不高，即使在淡水環境下也不到 50%(圖 24a)，但在提高鹽度的環境下，番杏的發芽率雖然有下降的現象，但仍有一定的發芽率。番杏的種子於堅硬的果實內，有時會同時長出兩顆(圖 40)，同為番杏科的外來種新興作物~冰花，陳亮萱(2017)研究指出，冰花在 2%鹽逆境的發芽率仍有 80%以上，在相當海水濃度的 3%也有 30%。番杏的發芽率不高，除了與厚硬的木質化果實有關外，種子可能也無法忍受較高的鹽度。



圖 40 同時長出 2 株子葉種子

2. 鹽逆境下生長與滲透濃度：我們針對最大葉面積、根長與生物質量(鮮重)來進行量測，以了解番杏在逆境下的生長情形。結果顯示，葉面積與根長、生物質量均以 0、0.5%的生長情形較為良好。在組織切片的實驗中，也顯示滲透濃度可能介於 0~0.5%(圖 28a)之間，使得在這個濃度之下的鹽逆境有較好的生長。陳亮萱(2017)的實驗結果指出冰花的胞質濃度介於 0.5~1%、邱志郁(1996)則指出水筆仔在 0.88%下的生長濃度最好，番杏的較低胞質濃度(0.5~1%)，與冰花及水筆仔相比，也表現在發芽率及根葉等等的生長情形上，儘管如此，適度的鹽分 0.5%以下對番杏的生長而言是具有促進效果的，但詳細的機制還需進一步研究。

3. 生長曲線：番杏的發芽時間相當長，即使是較適合的 0.5%濃度也需一週以上的時間，而高鹽對於生長抑制的情形十分明顯，雖然鹽分會抑制生長，卻能以緩慢的速度生長，2%鹽逆境下生長至第 3 對葉約需 50 天。

4. 生長期與鹽適應：番杏的耐高鹽情形，並不是從幼苗就出現。在最大葉面積、生物質量結果都顯示，0.5%下 30 天，番杏生長情形較 0%良好，這個時間點在生長曲線上大約是第 3 對葉，這也顯示發展至第 3 對葉，番杏的耐鹽機制逐漸趨於成熟，也能忍受高鹽度的環境，與陳亮萱(2017)，冰花幼苗期需發展至第 5 對葉後才有較好的耐鹽能力結果類似，比較如下：

	番杏(番杏科番杏屬)	冰花(番杏科松葉菊屬)
發芽率(鹽逆境)	1%鹽，小於 50%	1%鹽下，大於 80%
胞質濃度	0~0.5%	0.5~1%
幼苗耐鹽關鍵期	30 天，第 3 對葉	30 天，第 4 對葉



圖 41 番杏耐鹽期~第 3 對葉

二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色

1. 數量還是面積？囊狀細胞是番杏科很特

別的耐鹽相關結構，番杏葉背具明顯的囊狀細胞，我們假定囊狀細胞在不同鹽逆境下會有不同的數量表現，但研究結果(圖 31a)顯示僅管鹽度的上升，

囊狀細胞的總量並沒有因而改變，這也說明了囊狀細胞的數量不會被鹽逆境所誘導而造成改變。接著我們針對囊狀細胞的面積與葉面積的相對比值來探討，發現鹽逆境會使得新長出的葉子囊狀細胞增大，而已長出的細胞則不影響(圖 32a)。這與冰花的囊狀細胞角色不同，陳亮萱(2017)的研究指出冰花的囊狀細胞數量與面積與鹽逆境較無關聯。

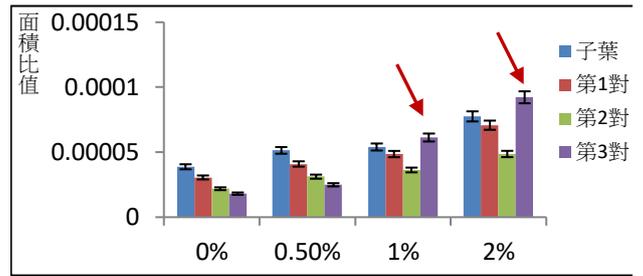


圖 42a 較高鹽度，第 3 對葉囊狀比值變大

2. 耐鹽時期與囊狀細胞：不同鹽度下，0.5%組別第 3 對葉(圖 42a)與 1、2%組別結果有差，可能顯示著 0.5%為番杏的等滲透濃度，1、2%則為較高鹽度，需依靠變大的囊狀細胞面積比值作為因應，同時也說明第 3 對葉在番杏所扮演的角色(圖 42bc)。令人覺得有趣的是，花蓮農改場研究員曾提醒我們生長至第 3 對葉時可進行移植，或許這可能是重要原因之一。

三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色

結晶鈣的晶體在植物葉肉中並不少見，關於結晶的描述有許多文獻探討過，具有多重功能，如中和過多有害的草酸、植物的防衛昆蟲啃食機制等，但目前在國內尚無查詢到相關逆境與結晶間的文獻，尤其在鹽度適應方面。我們試著找尋鹽逆境與結晶鈣數關聯。

1. 結晶大小還是數量？原本預期在較高鹽度下，結晶鈣會較大，經過量測發現，不同鹽逆境下結晶鈣晶體大小並無達到顯著差異。鹽逆境的差別表現在結晶數量方面，這與劉怡君(2013)研究結果類似，環境改變會影響結晶鈣數量。

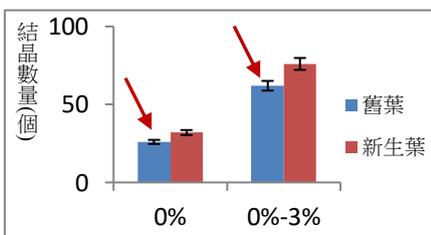


圖 43a 鹽度改變，舊葉結晶數

2. 結晶鈣的數量會變嗎？鹽度改變的結果，當鹽度提升後，不只是新生葉的結晶數量變多，原本葉子的結晶量也會變多，顯示結晶鈣的數量在番杏內是會變動的。圖 43a 由 0%轉為 3%環境，原葉的結晶鈣數量與對照組相比大幅提升。

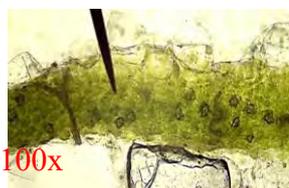


圖 43b 葉內結晶數隨鹽度改變而不同鹽度發生改變時，原舊葉內的結晶鈣數量改變。左為 0%、右為 0->3%的舊葉

四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響

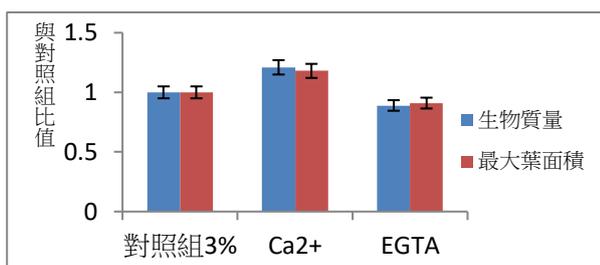


圖 44 鹽逆境下，鈣離子對生長影響

來探討鈣離子對於番杏於鹽逆境下的反應。圖 44 為逆境下加入鈣與 EGTA 對與對照組的比值，結果顯示鈣離子在鹽脅迫下，能協助番杏生長。

外源性鈣的添加，造成了番杏囊狀細胞及結晶數量的變化，整理如下表：

添加 5mM Ca ²⁺	0%淡水環境		3%鹽逆境環境	
	囊狀細胞面積比值	結晶鈣數量	囊狀細胞面積比值	結晶鈣數量
舊葉	無顯著差異	顯著增多	無顯著差異	顯著增多
新生葉	無顯著差異	顯著增多	顯著變大	顯著增多

我們實驗顯示鈣離子添加，能增加番杏的抗鹽逆境能力。這與前人研究相類似，當逆境發生，鈣離子添加具協助抗逆效果，何盈德(2013)研究指出，添加鈣離子能降低綠豆在鹽逆境的傷害；蘇榆茜(2016)的研究也說明鈣會促進逆境下葉狀體的形成；蔡政杰(2012)的研究論文也指出，外源性的鈣離子會減緩氯化鈉對水稻根部生長的阻礙。

比較好奇的是，鈣與鹽逆境機制，高鹽(鈉)環境，結晶鈣的數量會增加，外源性鈣的加入也會使得結晶數增加，且增強逆境下的生長能力，在圖 37a 的結果也顯示，加入鈣的組別會使囊狀細胞內的鹽度提升，鈣、鈉之間有什麼相關性呢？在尋問國立高雄海洋科技大學黃教授後，表示這可能與鈉-鈣離子交換機制有關，在教授協助取得相關文獻，Peng Wang(2012)的研究指出，阿拉伯芥的鈉鈣離子交換機制對鹽逆境的重要性。顯示在番杏實驗中，加入鈣離子可能與鈉離子進行交換，增加葉內的鈣離子濃度，同時並增加結晶鈣數量；而被交換的鈉離子，很有可能進入囊狀細胞內儲存，使得囊狀細胞內所累積的鹽度增加，也讓番杏在鹽逆境下的生長更能適應。

關於番杏在鹽逆境中的探討，不僅逐步解開番杏生長在不同鹽逆境下的情況，鈣離子與結晶鈣數量及囊狀細胞間關聯的了解，更令人期待若在過高鹽土環境下，加入外源性鈣是否能增加這種新興野菜的生存能力呢？

柒、結論

花東海邊沙岸隨處都可見的番杏，是能耐不良環境的海濱草本植物，面對極端氣候表現，具備耐高溫、抗旱、抗鹽化等特質，農委會花蓮區農業改良場經過調查評估，發現番杏更深具高營養價值，所以近年來積極推薦給民眾食用。但在高鹽海岸環境，究竟小小番杏對抗鹽逆境的機制為何，其實十分耐人尋味。我們嘗試觀察與紀錄番杏在鹽逆境下的生長及型態變化，同時也發現有趣的結晶鈣與鈣離子影響抗逆的結果。我們將本實驗的結論整理如下：

1. 番杏發芽率在淡水環境下也不到 50%，發芽時間相當長，即使是較適合的 0.5%濃度也需一週以上的時間，提高鹽度會使番杏的發芽率下降，但仍有一定的發芽率。
2. 我們針對最大葉面積、根長與生物質量(鮮重)來進行量測，以了解番杏在鹽逆境下的生長情形。結果顯示，葉面積與根長、生物質量均以 0、0.5%的鹽度之下，生長情形較為良好。
3. 番杏組織切片的實驗中，也顯示滲透濃度可能介於 0~0.5%的鹽度之間，適度的鹽分 0.5%以下對番杏的生長而言是具有促進效果的，但詳細的機制還需進一步研究。
4. 番杏的耐高鹽情形，並不是從幼苗就出現。在最大葉面積、生物質量結果都顯示，0.5%下 30 天，番杏生長情形較 0%良好，這也顯示此時發展至第 3 對葉，番杏的耐鹽機制逐漸趨於成熟，也能忍受高鹽度的環境。
5. 囊狀細胞內的鹽度，會隨環境中的鹽度提升而增加。
6. 囊狀細胞的數量不會被鹽逆境所誘導而造成改變，鹽逆境會使得新長出的葉子囊狀細胞增大，而已長出的細胞則不影響。
7. 當鹽度提升，不只新生葉的結晶數量變多，原本葉子的結晶量也會變多，顯示結晶鈣的數量在番杏內是會變動的。由 0%轉為 3%環境，原葉的結晶鈣數量與對照組相比大幅提升。
8. 加入外源性的鈣離子(5mM)，會促進葉肉組織內結晶數量的增加，且不只是新長出的葉子，原環境的第 3 對舊葉也大幅增加。
9. 添加鈣離子較無添加鈣離子的組別，會使得囊狀細胞內累積鹽分的能力提升。
10. 在鹽逆境下，添加鈣離子(5mM)組別，番杏生物質量顯著高於對照組，葉面積也同時變大。

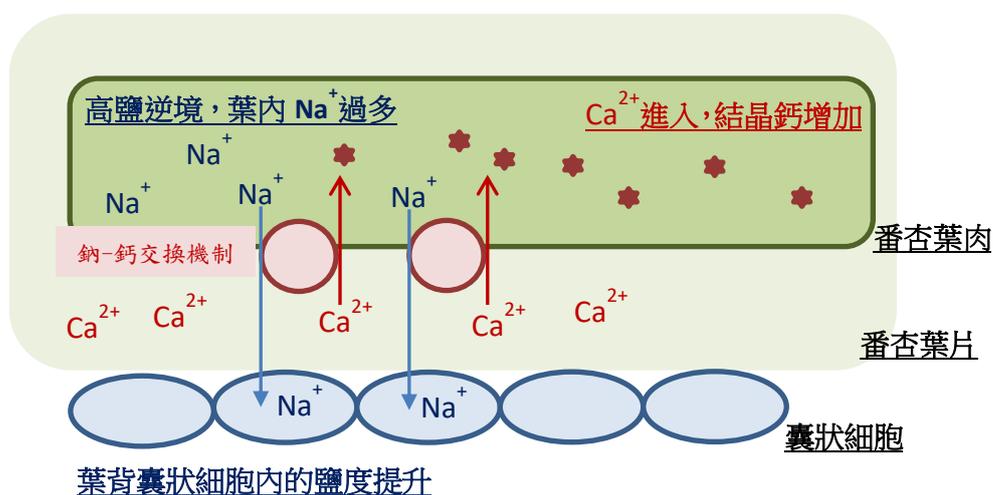


圖 44 高鹽環境下，鈣離子與囊狀細胞內鹽度、葉內結晶鈣數量關係示意圖

推測結晶鈣增多原因，番杏為維持葉肉細胞內較低的鈣離子濃度，將鈣離子轉為結晶鈣 (數量增加)，鈣鈉交換機制得以運作，有利於葉肉細胞鈣進鈉出的排鈉機轉，增加抗鹽能力。

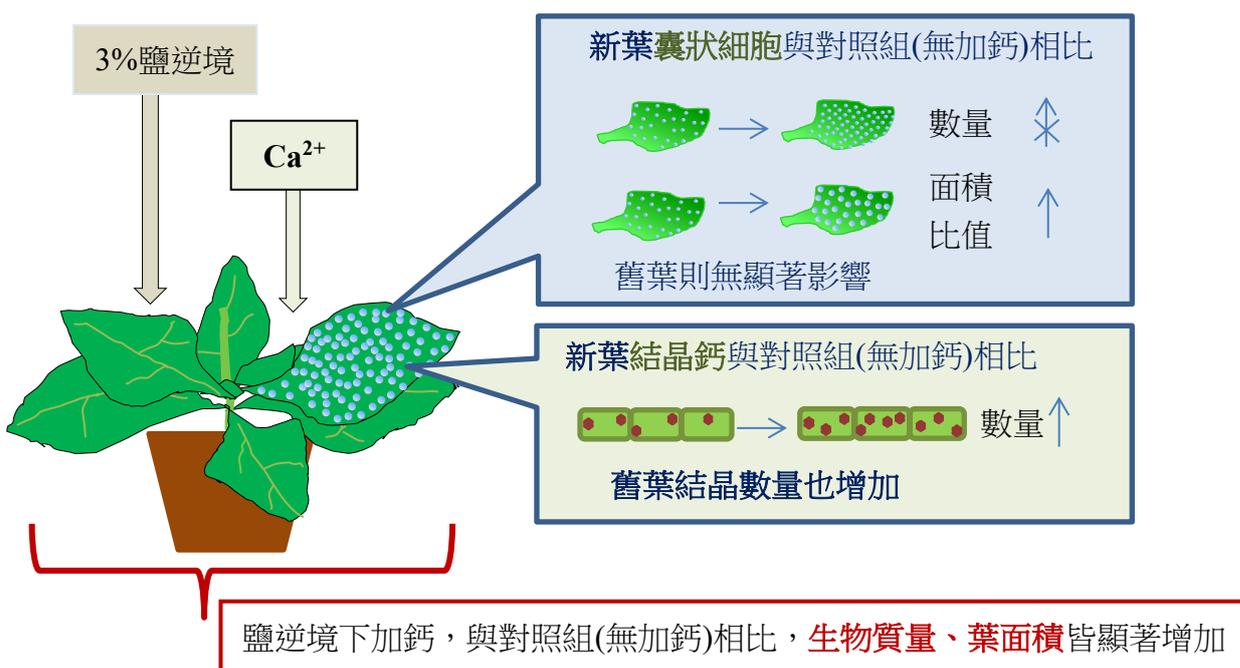


圖 45 鈣離子，對番杏於鹽逆境下抗鹽能力的影響

從這一系列的實驗與觀察中，我們初窺了生命力驚人的番杏是如何在鹽逆境中生存。意外發現葉肉細胞內的結晶鈣結晶與鹽逆境的關聯性，暗示了鈣離子可能扮演了某些角色。

實驗結果證實添加鈣離子能提升番杏的抗鹽能力，但究竟鈣離子的角色為何？是透過怎樣的機制來提升番杏的抗鹽能力？在其他植物是否有類似的機制存在？有無結晶鈣的物種是否有所差異？這些未來的研究方向都有待更進一步的實驗證實。

捌、參考資料

1. 全中和(2012)。海灘野菜-番杏。花蓮區農業專刊 80 期六月號。
2. 全中和(2012)。海濱野菜「番杏」 抗暖抗逆的蔬食新選擇。取自：
<https://www.newsmarket.com.tw/blog/15605/>
3. 王秋美(2005)。海邊植物-番杏三姐妹。取自：國立自然科學博物館學習資源網
dresource.nmns.edu.tw/ShowObject.aspx?id=0b819d5e7e0b81d9d3510b81dae34a
4. 楊茜雯、巴洛克、陳奕婷(2015)。養我育我的部落勇士-探討小米的生存之密。中華民國第 55 屆中小學科學展覽作品。
5. 劉怡君、鍾立婷、蔡盈瑩(2010)。葉裡的秘密-鈣離子結晶的影響。中華民國第 50 屆中小學科學展覽作品。
6. 彭佑寧(2006)。溼地的勇士~海茄苳呼吸根與抗鹽逆境之研究。中華民國第 48 屆中小學科學展覽作品。
7. 陳亮萱、賴芷絮、王怡心(2017)。冰鹽逆險記-探討冰花在鹽逆境下生長與改善土壤鹽化可行性。中華民國第 57 屆中小學科學展覽作品。
8. 蘇榆茜、孫偉哲、周柏仰(2016)。暗藏殺機的許願池」-探討硬幣水對浮萍生長的影響及其生存機制。中華民國第 56 屆中小學科學展覽作品。
9. 何盈德、陳亭瑋、廖芳淳(2013)。逆境求生-幫助綠豆在“鹽逆境”中生長的實驗與研究。中華民國第 53 屆中小學科學展覽作品。
10. 蔡政杰(2012)。氯化鈉對水稻幼苗根生長與發育之影響。國立中興大學農藝學系研究所碩士論文。
11. 劉玉山(2009)。植物對鹽分逆境 (Salinity Stress) 的反應。取自：教育部高瞻自然科學教學資源平台。<http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=1077>
12. 楊鈞隆(2006)。番杏(*Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Ktze.)粗抽物誘導人類肝癌細胞株 HepG2 細胞週期停滯及細胞凋亡之分子機轉。中國醫藥大學中國藥學研究所碩士論文。
13. Peng Wang(2012)。A Na⁺/Ca²⁺ Exchanger-like Protein (AtNCL) Involved in Salt Stress in Arabidopsis

【評語】 030315

本研究探討邊海植物番杏的耐鹽機制，不僅能增進對植物生理學的了解，也具有農業生產的應用潛力。

本研究已有初步的分析結果，但若能有更謹慎的實驗設計，則應可有更明確的結論，如對植物如能選擇與番杏同科的不同耐鹽植物，則更加具有比較性。此外，作者推測番杏增加結晶鈣的數量已改變滲透壓而達到耐鹽的能力，然而滲透壓為依數性質，而結晶鈣屬不溶物，應無法有助於提升細胞滲透壓，故作者需有另外的設計與證據。

摘要

抗鹽耐旱的台灣原生濱海植物—「番杏」，對抗鹽逆境的機制為何，十分耐人尋味。我們發現提高鹽度會使番杏的發芽率些微下降，但仍有一定的發芽率。0、0.5%的鹽度之下，番杏葉面積與根長、生物質量均有較好生長情形，番杏滲透濃度可能介於0~0.5%鹽度之間。番杏幼苗發展至第3對葉，較能忍受高鹽度的環境。鹽逆境會使新長出的葉子囊狀細胞增大，已長出的細胞則不影響；有趣的是，鹽度提升後，不只新生葉內的結晶鈣數量變多，原本舊葉內結晶數量也會變多，顯示結晶鈣的數量在番杏內是會變動的。加入外源性的鈣離子(5mM)，會促進葉肉組織內結晶數量的增加，並可以提升囊狀細胞累積鹽分的能力，在鹽逆境下，添加鈣離子組別，番杏生長情形也較好。

壹、研究動機

在海邊旅遊時，看到海灘長著叢叢綠意的植物，吸引著目光。查詢文獻後得知，這是台灣原生種海邊植物~番杏，相關生長資料不多，我們很好奇的是這種原生種植物，是如何在海邊不利生存的環境下生存的呢？是否有什麼特別的抗鹽逆境機制呢？顯微鏡下發現番杏內部存在一顆顆的結晶鈣，這些為數不少的晶體與鈣離子，在鹽逆境中扮演了什麼角色？讓我們從種植開始，逐步解開番杏適應逆境的相關謎團。

貳、研究目的

- 一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形
- 二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色
- 三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色
- 四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響



圖 1 台灣海邊原生種~番杏



圖 2a 新生葉明顯毛茸茸構造



圖 2b 葉背明顯的囊狀細胞

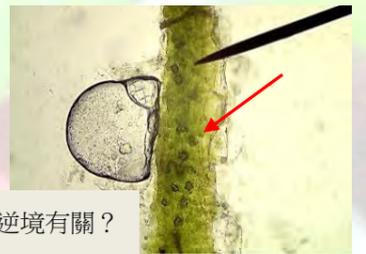


圖 3 葉內具一顆顆結晶

參、研究器材與設備

一、實驗器材與設備：

番杏(*Tetragonia tetragonioides*)，番杏科番杏屬，台灣原生種海邊植物，生於海邊沙地上，種植發芽率不高。

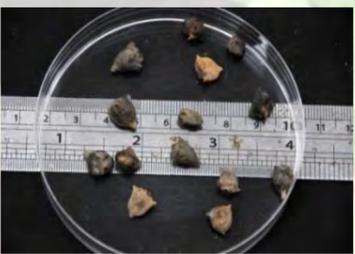


圖 4 番杏種子(木質化果實內)



圖 5 將種子置於育苗盆內發芽



圖 6 室內土耕以 LED 燈照射



圖 7 澆灌鹽水，模擬鹽逆境

(一)生長情形：電子游標尺、IMAGE J 軟體(葉面積測量用) (二)囊狀細胞及結晶：解剖顯微鏡、電子目鏡、測微軟體

二、種植及處理條件：

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| (一)鹽逆境：以氯化鈉配製 0、0.5、1、2、3% | (二)室內光源：白燈 LED，光週期 12hr |
| (三)土壤鹽化：加鹽水，定時澆灌至底部流出 | (四)鈣離子實驗：氯化鈣、EGTA (5、10、20mM) |

肆、研究過程與方法

一、番杏基礎資料

番杏是台灣海邊原生種植物，具耐高溫、抗旱及抗鹽化的多重抗逆境能力，加以生長期長，且營養豐富，適合作為較極端環境下蔬菜來源，目前關於番杏的抗逆機制並不甚清楚。

二、實驗流程

番杏抗鹽方式及鈣離子對抗鹽的影響

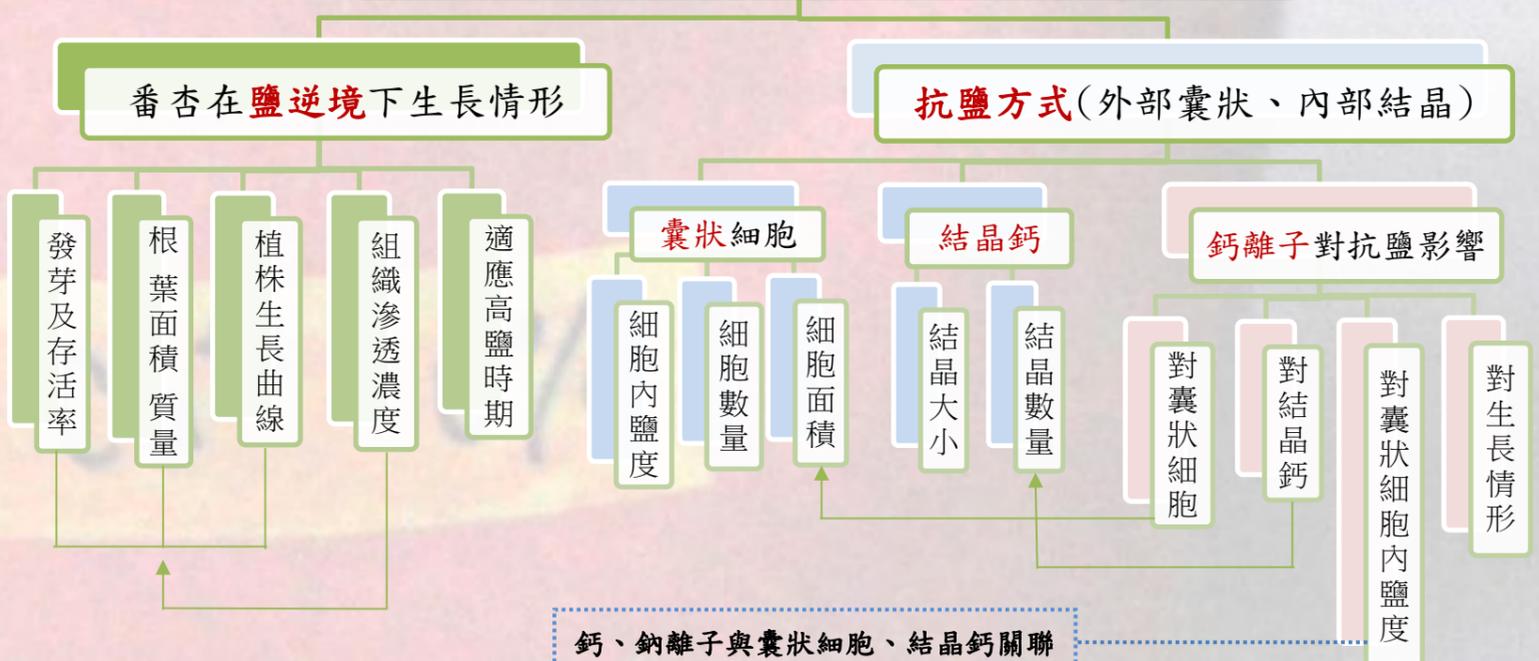


圖 8 以 IMAGE J 測量葉面積



圖 9 單面刀橫切計算結晶數量



圖 10 顯微軟體測量結晶大小



圖 11 加鈣離子及 EGTA 處理

伍、研究結果

一、觀察番杏在不同鹽逆境下的生長情形

(一) 探討不同鹽逆境下的種子發芽率及存活率

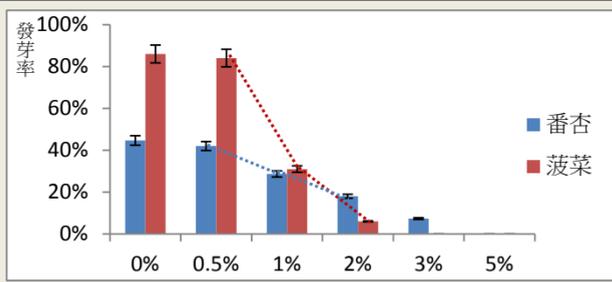


圖 12a 不同鹽逆境下的發芽率

番杏發芽率在淡水不高。在海水濃度(3%)能發芽。

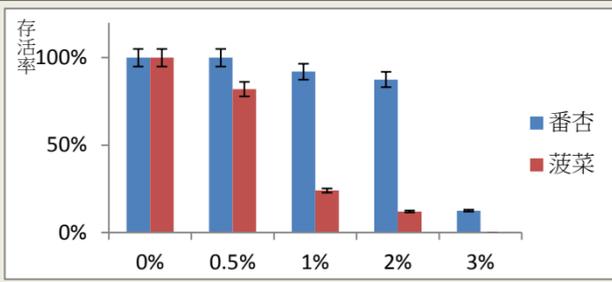


圖 12b 不同鹽逆境下存活率(生長出第 1 對葉)

番杏在 2% 鹽度以下，大致有 85% 以上存活率。

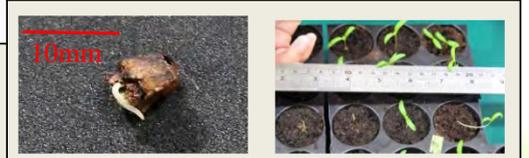


圖 12c 種子發芽



圖 12d 番杏子葉



圖 12e 第 1 對葉



圖 12f 對照組菠菜

(二) 比較不同鹽逆境下的生長情形

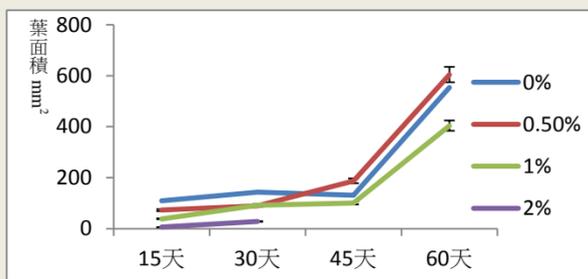


圖 13b 不同生長時間，番杏葉面積比較

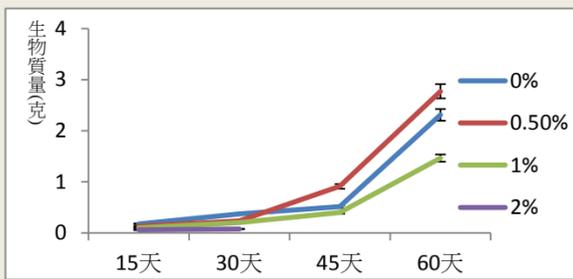
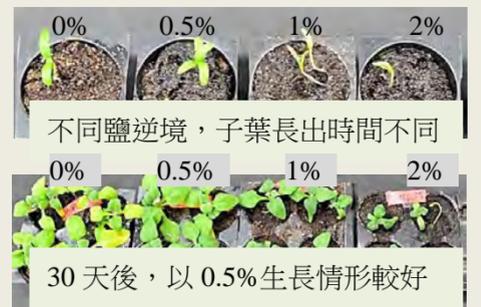


圖 13c 不同生長時間，番杏生物質量比較



30 天後，以 0.5% 生長情形較好

生長情形上，大致以 0、0.5% 的組別較好。30 天左右的生長時間(第 3 對葉形成)，較適應 0.5% 刺激，可能對番杏是一個生長較為成熟的時間點。

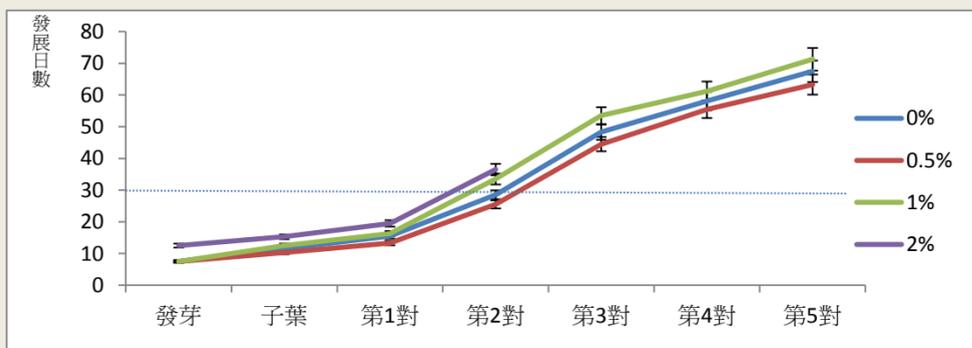


圖 13d 不同鹽逆境下，番杏的生長曲線

生長曲線結果顯示，0.5% 的組別生長較快，不論是發芽至子葉等各皆段生長皆是如此。此外，也發現 30 天前，0% 長得較好；30 天後 0.5% 則長得較快也較好



圖 13e 不同生長時間下，鹽逆境對生長情形影響

(甲、乙，由左至右分別為 0、0.5、1、2%；丙、丁由左至右為別為 0、0.5、1%)

(三) 探討葉肉組織滲透濃度與鹽適應關聯

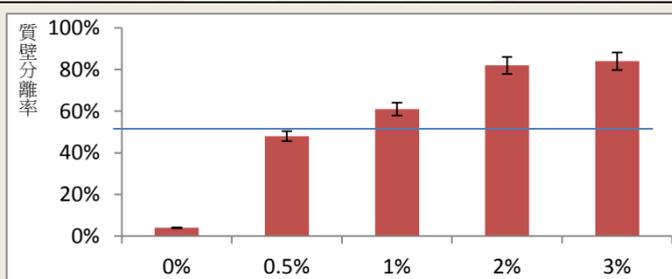


圖 14a 浸於不同鹽度下，番杏葉肉組織細胞質壁分離比

在 0.5% 的濃度(質壁分離約 50%)可能接近等滲透濃度。

(四) 探討番杏生長與鹽適應間的關聯

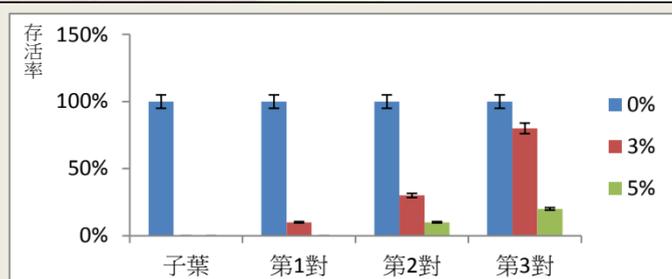


圖 15a 不同鹽逆境下與番杏生長期之存活率

第 3 對葉開始較能耐高鹽，可能是耐鹽發展較成熟。



圖 14b 0.5% 質壁分離約 50%



圖 15b 不同生長期耐鹽關聯

二、探討外部囊狀細胞在鹽逆境下的角色

(一) 觀察並探討囊狀細胞內容與耐鹽關聯

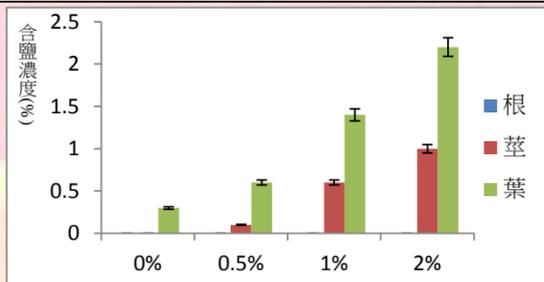


圖 16a 不同鹽逆境下，番杏不同部位含鹽情形

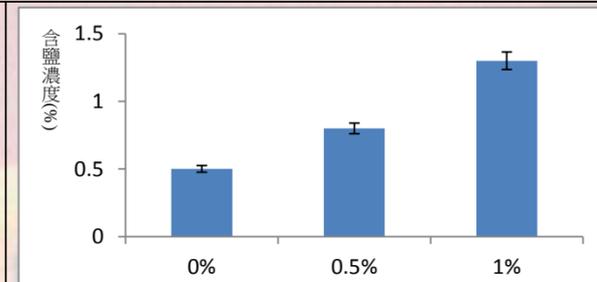


圖 16b 不同鹽逆境下，番杏囊狀細胞鹽度比較

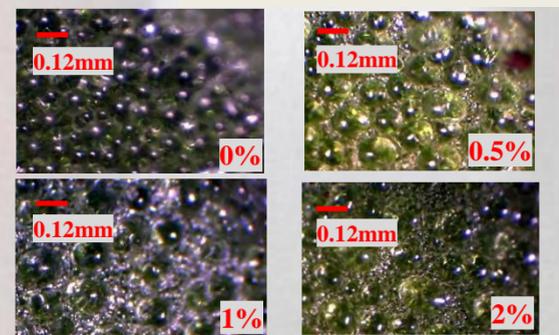


圖 19 不同鹽逆境，第 3 對葉背囊狀細胞的比較

(二) 探討不同鹽逆境下，囊狀細胞所扮演的角色

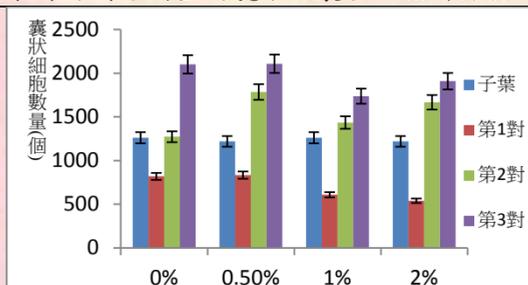


圖 17a 不同鹽逆境，葉背囊狀細胞總量

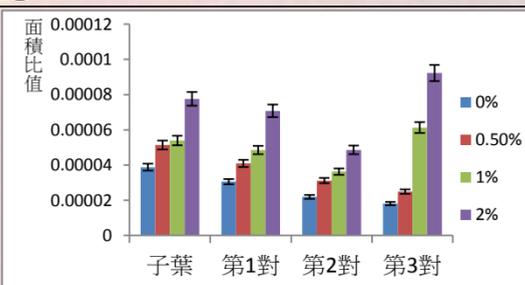


圖 17b 不同鹽逆境，囊狀細胞與葉面積比值

(三) 探討鹽度發生變化，囊狀細胞所扮演的角色

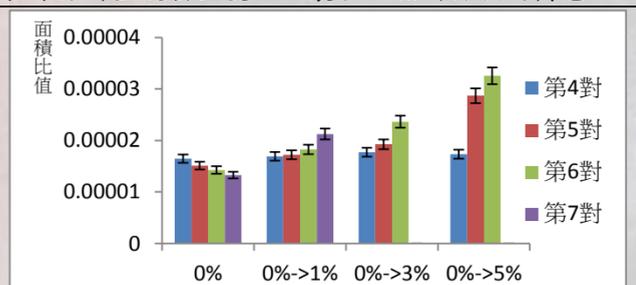


圖 18 不同鹽度改變，囊狀細胞面積與葉面積比值

取較明顯的葉背囊狀細胞實驗，分別探討鹽逆境數量及面積上的關係，實驗結果顯示囊狀細胞的面積與鹽逆境較有關聯，數量上似乎不是很明確。

第 4 對為 0% 培養舊葉，第 5~7 對則為鹽度改變下新葉。鹽度提升下，相對面積則變大來進行適應。

三、探討內部結晶鈣在鹽逆境下的角色

(一) 探討不同鹽逆境下，番杏葉內結晶的分佈情形

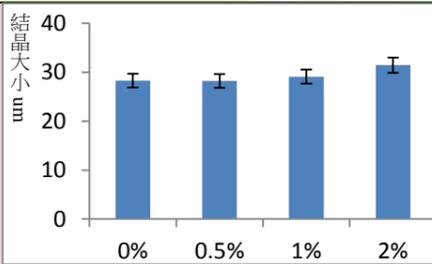


圖 20a 結晶鈣的大小比較

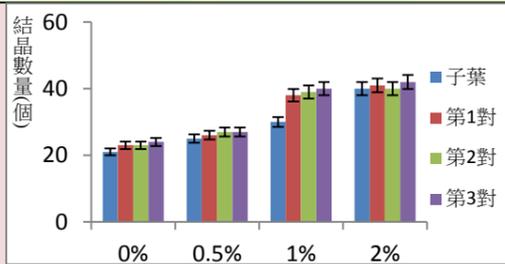


圖 20b 結晶鈣數量的比較

(二) 鹽度發生變化，結晶鈣所扮演角色

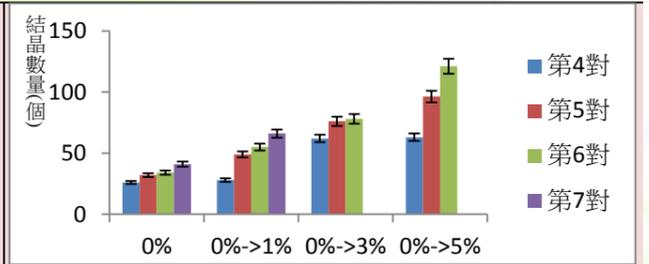


圖 21 不同鹽度改變下，結晶鈣數量比較

結晶鈣大小與鹽度無明顯關聯，隨鹽度提升，結晶數量有增加現象

舊葉(第4對)及新葉結晶鈣數量皆隨鹽度變動

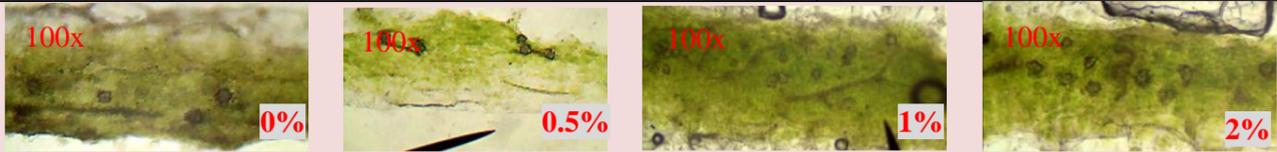


圖 22 不同鹽逆境下，第3對葉內結晶鈣情形

四、探討鈣離子對番杏在鹽逆境下的影響

(一) 鈣離子對番杏生長影響

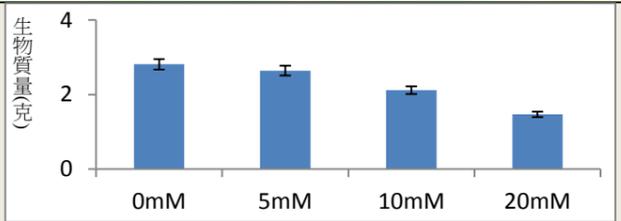


圖 23 不同濃度鈣離子對番杏生物質量影響

mM 鈣離子與對照組相比，生物質量差異不大

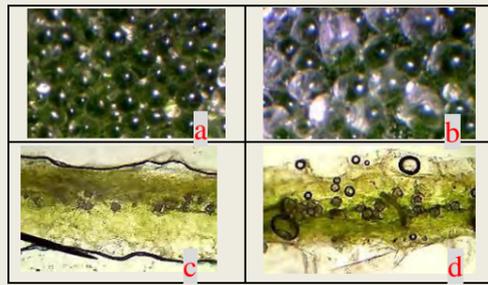


圖 26 鈣離子對囊狀及結晶數影響
a(3%)、b(3%加鈣)；c(3%)、d(3%加鈣)



圖 27 3%鹽度下加鈣生長情形
整體的生長情形，EGTA 且相對不好，以加鈣離子組別的生長較為良好。

(二) 探討鈣離子對番杏囊狀細胞及結晶鈣的影響

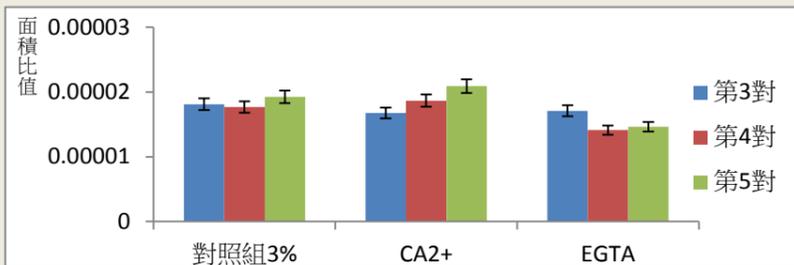


圖 24a 鹽逆境環境下，鈣離子對囊狀細胞面積比值影響

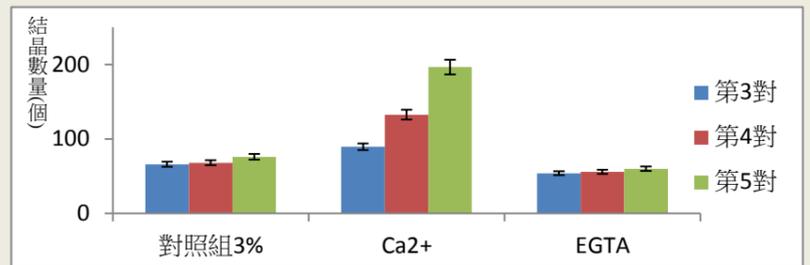


圖 24b 鹽逆境環境下，鈣離子對結晶鈣數量的影響

鹽逆境發生下，鈣離子的添加會使新生葉(4~5對)囊狀細胞面積比值增大，舊葉(第3對)不變；結晶數則新、舊葉皆會增加。

(三) 探討鈣離子對囊狀細胞鹽度影響

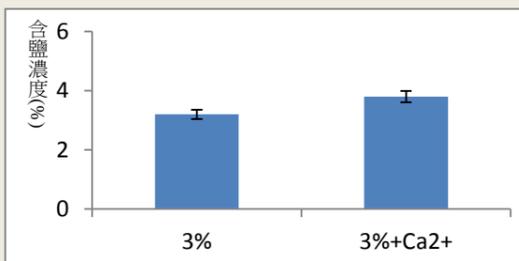


圖 24c 鹽逆境，鈣對囊狀細胞鹽度影響

(四) 探討鈣離子對番杏抗鹽逆境的影響

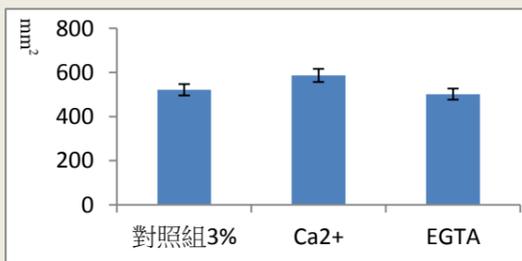


圖 25a 鹽逆境，鈣離子對最大面積影響

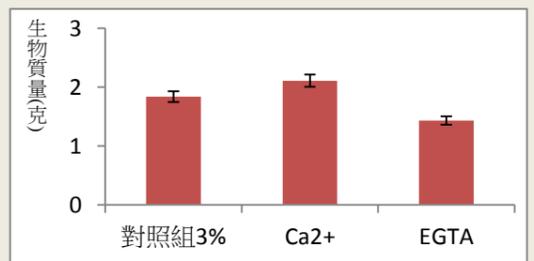


圖 25b 鹽逆境，鈣離子對生物質量影響

EGTA 鈣離子螯合劑使生長情形較為不好，添加鈣離子使囊狀細胞內鹽度增加，葉面積及生物質量均增加(p<.001 達顯著差異)

陸、討論與結論

花東海邊沙岸可見的番杏，在高鹽的海岸環境中，究竟小小番杏對抗鹽逆境的機制為何，十分耐人尋味。在我們的研究中發現，番杏的耐高鹽情形並不是從幼苗就出現，而是大約發展至第3對葉，耐鹽機制才逐漸成熟，有趣的是花蓮農改場研究員曾提醒我們生長至第3對葉時可進行移植，這可能是重要原因之一。

添加外源鈣離子，造成番杏囊狀細胞及結晶變化，也令人期待在海邊過高鹽土環境下，加入外源性鈣是否能夠增加這種新興野菜的生長能力呢？關於鈣離子整理如下：

添加 5mM Ca ²⁺	0%淡水環境		3%鹽逆境環境	
	囊狀細胞面積比值	結晶鈣數量	囊狀細胞面積比值	結晶鈣數量
舊葉	無顯著差異	顯著增多	無顯著差異	顯著增多
新生葉	無顯著差異	顯著增多	顯著變大	顯著增多

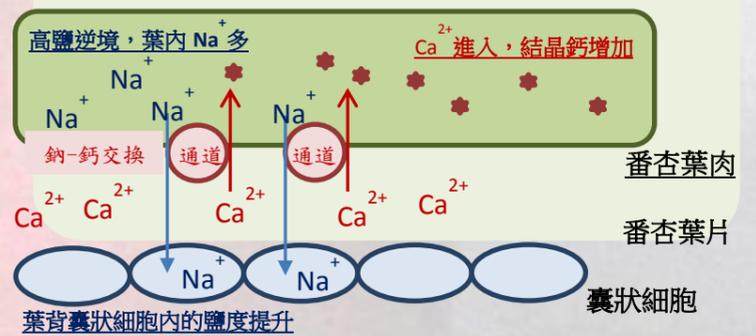


圖 28a 鈣-鈉離子與囊狀細胞鹽度、結晶鈣數量關係示意圖

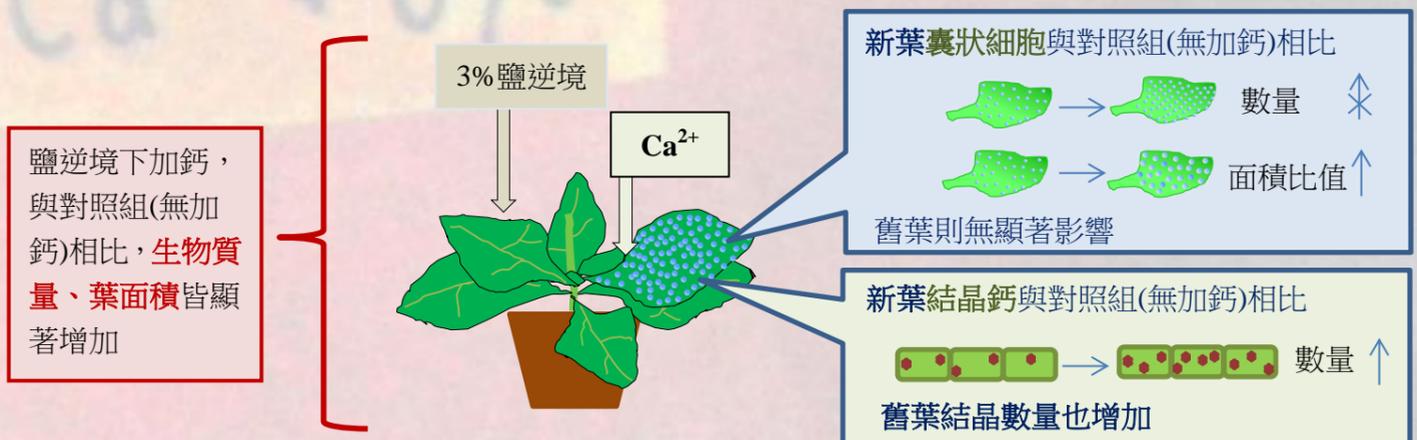


圖 28b 鈣離子，對番杏於鹽逆境下抗鹽能力的影響

柒、參考資料

- 全中和(2012)。海邊野菜-番杏。花蓮區農業專刊 80 期六月號。
- Peng Wang(2012)。A Na⁺/Ca²⁺ Exchanger-like Protein (AtNCL) Involved in Salt Stress in Arabidopsis