

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 植物學科

佳作

052104

「葵」藿傾陽，「銅」生共死

學校名稱：雲林縣私立揚子高級中學

作者： 高二 沈晏仔 高二 沈文蓉 高二 洪 晴	指導老師： 陳尚民 劉家齊
---	-----------------------------

關鍵詞：向日葵、銅離子、卡氏帶

摘要

本研究結果顯示，硫酸銅水溶液對向日葵種子發芽率並無影響，反而有幫助於向日葵種子的成長；硫酸銅水溶液濃度到達 **300ppm** 會抑制向日葵生長，隨著濃度增減，其根、莖長度都有著明顯的減短，結果顯示其生長抑制率與濃度成正比。高濃度的硫酸銅水溶液，會使向日葵重量變輕，隨著濃度遞增而重量遞減。銅離子進入幼苗時期的向日葵後，堵塞在韌皮部的外側，無法藉由木質部往上運輸，而堵住銅離子金屬的正是**卡氏帶**，任何物質儘管是水，都無法自由通過，必須藉由細胞上的特殊管道進入細胞。從 **DPPH**、總酚量、可溶性蛋白質，皆可推算其抗氧化物以及降解率，從這兩樣數據可見橙黑的重金屬耐受度高於橙綠。

壹、研究動機

高一的時候，生物課本有提到植物的水分循環，油然想起當初國小自然課時，我們曾經做過將芹菜放入紅墨水中，觀察其在芹菜中的循環流動，這是一個簡單又基礎的實驗，然而此時如果將紅墨水換作含有重金屬的水溶液，情況會如何?接著我們請教了學校師長們的想法、上網查了資料，得知現今有許多關於其他物質在植物體內運輸的相關資料，卻少有針對重金屬方面的文獻，好奇心驅使下，我們想找出重金屬在植物體內的運輸，而在千迴百轉的考慮下，最終決定我們以向日葵作為實驗的對象。

貳、實驗目的

- 一、測量出向日葵種子的發芽率是否受到影響
- 二、吸收重金屬離子後的向日葵生長是否受到影響
- 三、比較出在不同濃度硫酸銅下植株的長度與重量
- 四、觀察銅離子在向日葵幼苗內的累積部位
- 五、比較橙綠及橙黑對銅離子的耐受度

參、研究設備與器材

表一、使用材料

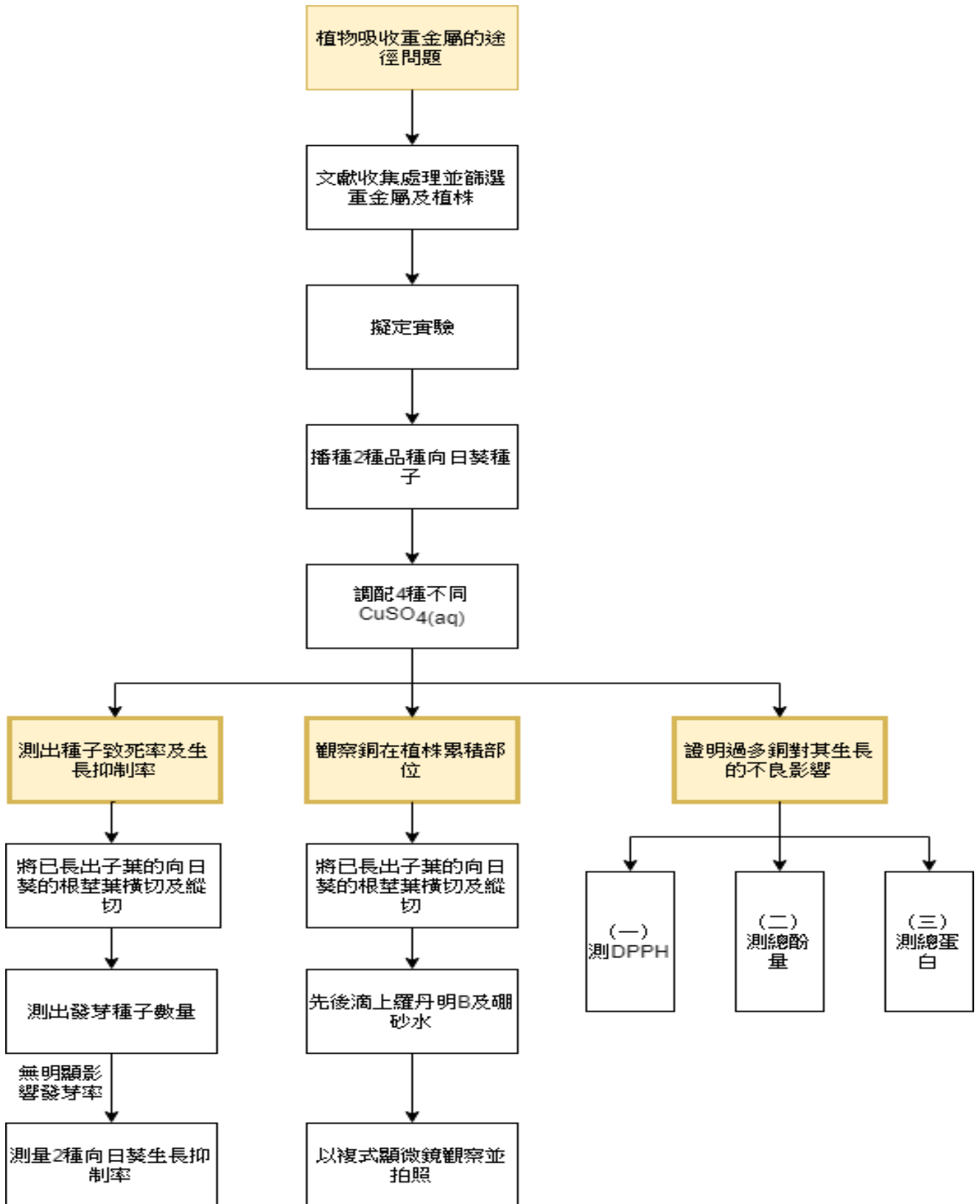
編號	物品	數量	用途
一	筆記型電腦	2 台	撰寫電子檔
二	筆記本、鉛筆	1 本、1 支	撰寫實驗日誌
三	智慧型手機	2 台	拍攝紀錄實驗流程
四	分析天平	1 台	秤量藥品重量
五	複式顯微鏡	2 台	觀察植物體內流動
六	顯微攝錄機	1 台	將顯微鏡的結果拍攝
七	解剖刀	3 片	將植物切片
八	擦手紙	2 包	種植向日葵
九	培養皿	15 個	種植
十	手套	3 雙	保持手部清潔
十一	超純水製造機	1 台	實驗用水
十二	酵素免疫分析儀	1 台	清除 DPPH 自由基能力測定
十三	微量滴管	1 支	滴取溶液

表二、使用藥品及植物

編號	物品	數量	用途
一	向日葵 (橙、黑)	20 包	種植觀察
二	向日葵 (橙綠)	20 包	種植觀察
三	酒精	1 瓶	配置染劑
四	Rhodamine B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$)	1 瓶	配置染劑
五	硼砂	1 瓶	洗去多餘染劑
六	含水硫酸銅	1 瓶	可溶性蛋白含量測定(A 試劑)
七	三羥甲基氨基甲烷 (Tris-Hcl buffer(pH7.4))	1 瓶	清除 DPPH 自由基能力測定
八	DPPH-ethanol 溶液	1 瓶	清除 DPPH 自由基能力測定
九	乙酸緩衝劑 (acetate buffer)	1 瓶	總酚量化合物分析
十	福林試劑 (folin reagent)	1 瓶	總酚量化合物可溶性蛋白含量測定 (試劑 B)
十一	碳酸鈉 (Na_2CO_3)	1 瓶	總酚量化合物分析 可溶性蛋白含量測定(試劑 A)
十二	咖啡酸 (caffeic acid)	1 瓶	總酚量化合物分析
十三	酒石酸銻鉀 (Potassium Tartrate)	1 瓶	($K_2C_4H_4O_6$)可溶性蛋白含量測定 (試劑 A)
十四	氫氧化鈉 (NaOH)	1 瓶	可溶性蛋白含量測定(試劑 A)

肆、研究過程與方法

一、研究流程



二、文獻資料

(一) 向日葵種類

向日葵 sunflower (學名：Helianthus annuus) 原產於美洲西部，是一年生草本植物，菊科(compositae)向日葵屬(Helianthus)，其盤型花序可寬達 30 釐米，因花序會隨太陽轉動而得名。最適合栽種的溫度是 21°~24°C，因此全台都適合栽種。在品種上有極多種類，在花形上有分單瓣、重瓣或單花、多花之分，在花色上主要以黃色以及橘色系為主，另外還有深紅色鑲有金黃邊、銅紅、白色等特殊品種，常見的有高達 150 cm 的高莖型向日葵還有 30~50cm 的矮型向日葵。

表三、向日葵實驗種類說明

照片		
	(圖一) 橙黑品種	(圖二) 橙綠品種
特性	台灣花卉市場中主要的品種。	台灣花卉市場的次要品種。

(二) 植物吸收重金屬及累積的機制(過程共分為三個階段，以吸收鎘為例)

第一階段：植物根部釋出[H⁺] 酸化土壤，以利植物吸收鎘或分泌植物金屬螯(PC)或土壤中螯合以力嵌住土壤中的金屬，螯合物發生氧化還原反應，以利鎘的吸收。

第二階段：

鎘在植物體內的運輸：鎘→根→木質部→莖鎘到達木質部有以下兩種方法

1. 直接穿過根中無生命部分，如：細胞間隙，及利用非原生體系進入木質部。
2. 直接進出層層相連細胞，此一方法需消耗能量穿過皮層到達木質，就是利用原生體系進入木質部。

第三階段：

植物細胞加以解毒：鎘進入根細胞後，可能的解毒方式有兩種：

1. 鎘和植物性螯合物結合，再送入液泡中累積，或是進入細胞後再與植物性重金屬螯合物結合。
2. 經由輸導組織向上運輸鎘，在到達運輸終點後再與植物性金屬螯合物結合累積在液泡中。

(三) 銅離子於農業上的應用

銅離子可以有效的抑制細菌與真菌的生長，所以現今農民所使用的農藥部分都含有銅離子，由於噴灑在植物葉片上的銅元素不具有流動性，所以並不會被植物給吸收。在遇到弱酸性露水或著是雨點時，銅元素會以+1 或+2 價的離子型態存在，當銅離子接觸到細菌、真菌或者是他們的孢子時，會穿透他們的細胞壁，繼而干擾細胞體內酶的活性，破壞細胞的生長。

農藥的成分中，銅可能以下列方式存在：氫氧化銅、硫酸銅、氧氯化銅、氧化銅等等，而不同的存在方式有不同的效果時間，就雨水和膠水流失性而言，氧化銅的效果是最為優異的。

最近最為新型的殺菌劑-新型波爾多液是硫酸銅、生石灰、水混和後發生化學反應生成氫氧化銅，他對植物的好處有許多，不僅能夠進行殺菌，還能夠提供植物所需要的銅離子以及鈣離子，更能改變土壤中的 PH 值。

其他植物在吸收銅離子後不同部位的銅含量(以綠豆為例)



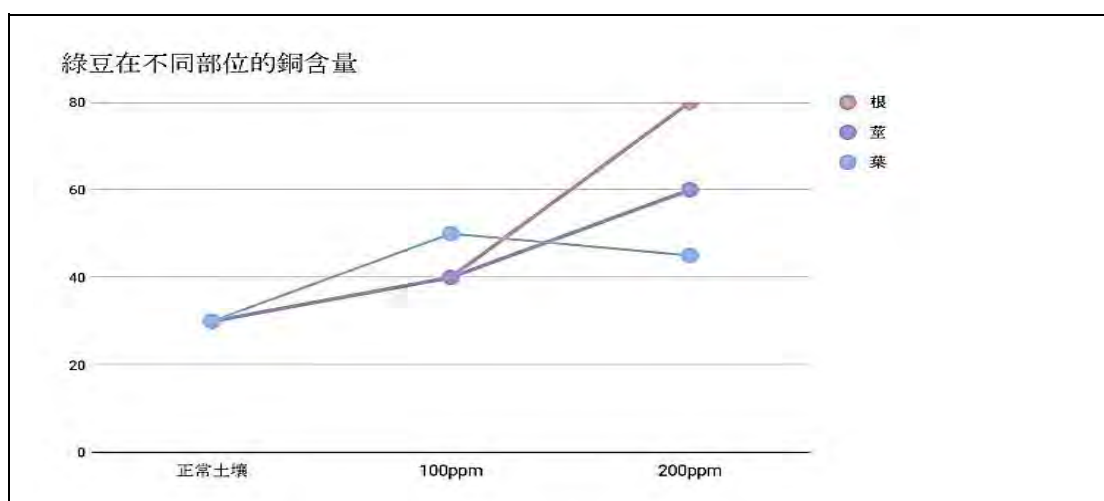
(圖三)新型波爾多液

資料來源:台灣好園藝

表四、綠豆吸收銅離子的抑制率

	根(銅含量 $\mu\text{g gDW}$)	莖(銅含量 $\mu\text{g gDW}$)	葉(銅含量 $\mu\text{g gDW}$)
正常土壤	$<30\mu\text{g/gDW}$	$<30\mu\text{g/gDW}$	$<30\mu\text{g/gDW}$
100ppm	$40\mu\text{g/gDW}$	$40\mu\text{g/gDW}$	$50\mu\text{g/gDW}$
200ppm	$80\mu\text{g/gDW}$	$60\mu\text{g/gDW}$	$45\mu\text{g/gDW}$

(發現：400ppm 之後，植物因銅濃度過高而死亡)



(圖四)綠豆在不同部位的銅含量

(四) 銅離子對植物的影響

銅在植物中扮演的角色為光合作用和呼吸作用的氧化酶成分，且可以促進植物對蛋白質的利用。

(1)缺乏：在生長過程中會產生抑制，幼葉則會呈現黃白化且出現捲曲變形，嚴重的話，還會呈黑色並枯萎，對開花也會受到相當程度的影響。

(2)過量：葉片的部分會出現濃綠色之後會有缺鐵黃化的現象，而且葉片也會變得比原本厚了許多，根則會有刺鐵絲的形狀，並且會使分孽受阻。

(五) DPPH 簡易介紹

DPPH 自由基清除能力測試是在測試一個成分是否具有抗氧化性。而 DPPH 是較為安定的自由基，其在波長 517nm 處具高吸光值且呈現藍紫色。若 DPPH 自由基與式樣反應，顏色會轉為黃色，其吸光值會降低，此處吸光值愈低表示試樣清除 DPPH 自由基的能力越強，意即抗氧化能力越高。

(六) 總酚量簡易介紹

酚類化合物是植物體內抗氧化成分的來源。總酚量是測試樣本裡酚的含量，常用方法為 Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，樣本裡若有酚類化合物即會跟 Folin-Ciocalteu 反應呈色，而其呈色可利用分光光度計測量其吸收值。此處吸光值越高抗氧化能力越佳。至於對照之標準品常用沒食子酚或沒食子酸以標準品做出減量線即可對應其酚的含量。總酚量的多寡可代表抗氧化能力的高低。

(七) 可溶性蛋白簡易介紹

植物體的可溶性蛋白大多為參與代謝的酶類，測其含量是為了作為植物總代謝與抗氧化性的一個指標，常見方法為考馬斯亮藍法 G-250 染料結合法及 LOWRY 法。前者穩定而後者簡便。但兩者的缺點分別為前者在蛋白質含量較高時線性關係稍偏低，且不同蛋白質與色素結合狀況有差異，至於後者會受植物體內存在的酚類物質干擾。

三、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率

- (一) 準備十個培養皿，取數張擦手紙沿培養皿邊緣裁剪，鋪在培養皿上並兩種向日葵種子以十顆為一組放在各個培養皿上，並在每顆種子中取適當間隔
- (二) 依各種濃度分別各取 5cc 滴於每組向日葵，放進 27.8 C 的生長箱內並在培養皿上覆蓋鋁箔紙以防止水分快速散失且每天更換擦手紙，且兩天後觀察發芽率，共分為兩次：

第一次：發現發芽率為 100%

第二次：發芽率也為 100%(決定測量生長過程中的抑制率)



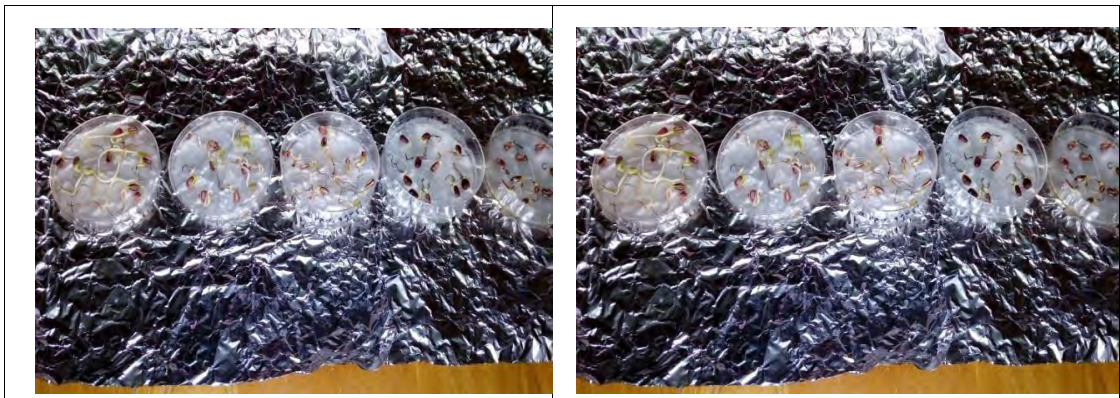
(圖五) 五種不同硫酸銅濃度的橙綠



(圖六) 五種不同硫酸銅濃度的橙黑

四、探討橙黑及橙綠向日葵的生長抑制率

(一)利用第二次的四種濃度，加上一組對照組持續以 5cc 的量，滴在各組的向日葵上並於種子發芽後，第十四天進行觀察向日葵在各種濃度中生長情形，並將其差異且與對照組進行比較。



(圖七) 觀察向日葵的生長

(二) 量出各組濃度的向日葵長度並和對照組進行比較

1. 以尺量出各向日葵幼苗的長度並做出統計。
2. 將結果作成圖表形式，以長條圖呈現根、莖長度因濃度不之差異並比較不同品種間對銅離子的耐受度。

五、秤出向日葵幼苗在吸收銅離子後的重量

(三) 將每株幼苗放到電子秤上並記錄所有的重量，且將數字做出統計並統整結果。

(四) 將統計出來的結果利用圖表的形式呈現，觀察出隨著濃度的增加，向日葵幼苗的重量會出現遞減的現象。

六、觀察銅離子在向日葵幼苗內的累積部位

(五) 在測量長度的結果中發現向日葵幼苗在 150ppm 的時候，生長的情形還算尚可，所

以本團隊要用顯微鏡觀察對照組及 150ppm 在這兩種品種中的累積部位。

(六) 利用顯微鏡觀察銅離子累積部位：

利用羅丹明 B(Rhodamine B)配製染劑方法：

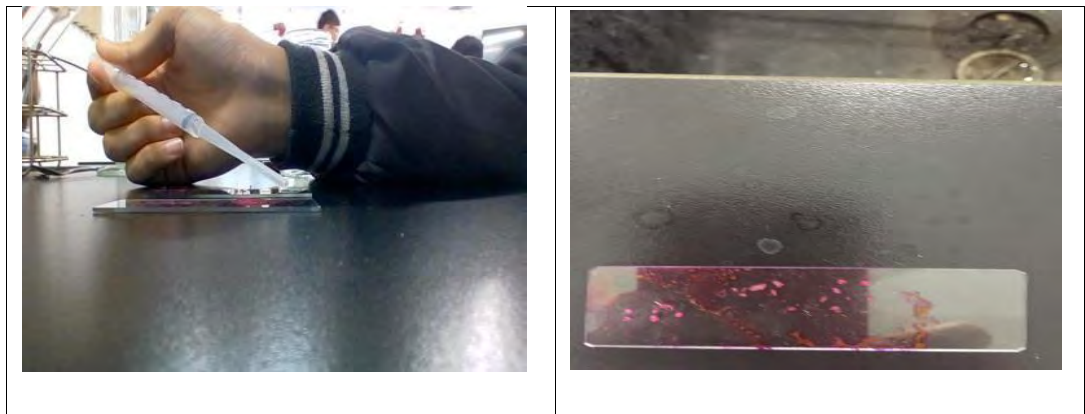
取 1 克的羅丹明 B(Rhodamine B)加上 95%的酒精
100cc

1. 將做好的切片置於載玻片上，並滴入些許羅丹明 B(Rhodamine B)的染劑，然後放入 70°C 的烘箱中九分鐘



2. 在載玻片上滴入硼砂(主要公用為去除多餘的羅丹明 B)

3. 在顯微鏡下可以觀察到植物在滴入染劑後，銅離子累積的部位會呈現棕色的情況，其餘則是以粉紅色呈現。

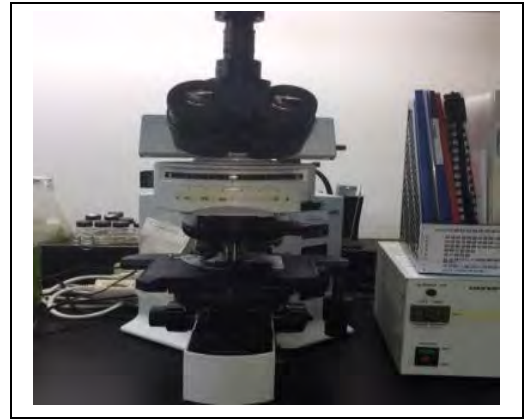


(圖九)製作切片過程

4. 在顯微鏡下以 40 倍率觀察各個部位，並以肉眼方式比較不同品種對銅離子的吸收程度。

(三) 顯微鏡觀察結果

以顯微鏡的結果推測出向日葵在幼苗時期對銅離子的吸收以向日葵的軸的剖面圖仔細觀察銅離子的累積部位，並將剖面圖進行對照且統合不同品種向日葵對銅離子的吸收。



(圖十)顯微拍攝

七、清除 DPPH 自由基能力測定試驗步驟：

使用酵素結合免疫分析法(ELISA)96well(最大容量為 300 μ L)進行試驗

- (一) 1g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)研磨。

- (二) 取 100 μ L 樣本+200 μ L 濃度為 0.1mM DPPH-ethanol 溶液。

- (三) 30 分鐘後以酵素結合免疫分析法(ELISA)測定位於波長 517nm 之吸光值 DPPH 自由基抑制率=(1-實驗組吸收值/對照組吸收值)x100。



(圖十一)酵素分析光譜儀

八、總酚量化合物分析試驗步驟：

- (一) 1g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)
- (二) 過濾後取上清液
- (三) 再加上 0.1 mL 福林試劑(folin reagent)及 0.2 mL 碳酸鈉(Na_2CO_3)
- (四) 加上 8.7 mL 的水混合均勻
- (五) 沸水三分鐘後冷卻
- (六) 用 660nm 的波長分析，標準品以 100ppm 的咖啡酸(caffeic acid)

九、可溶性蛋白含量測定分為試劑 A 及試劑 B：

(七) 試劑 A：

2g 碳酸鈉(Na_2CO_3)+1 mL 2%酒石酸鉀鉀(Potassium Tartrate)($\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)+1 mL 1% 硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$)+10 mL 1N 氫氧化鈉(NaOH)+90 mL H_2O

(八) 試劑 B：

福林試劑(folin reagent)： H_2O 以 1：1 混合試驗步驟：

(一) 0.5g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)

(二) 過濾後取上清液

(三) 0.1 mL 上清液+1.9 mL H_2O

(四) 加 5 mL 試劑 A 混合均勻並靜至十分鐘

(五) 加 0.5 mL 試劑 B 混合均勻並靜置三十分鐘

(六) 用 600nm 波長分析，標準品以 0.2mg/ mL 牛血血清蛋白(BSA)

伍、研究結果

一、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率



(圖十二)觀察種子發芽

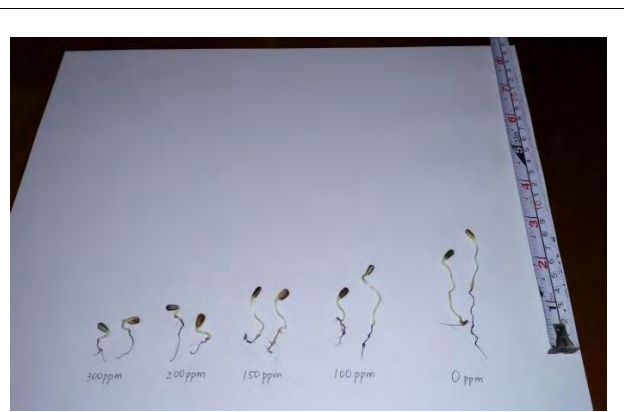
1. 於一天後進行第一次的觀察，發現橙黑(左圖)及橙綠(右圖)的 0ppm 及其他濃度(100ppm、150ppm、200ppm、300ppm)的某部分種子已開始發芽，但仍有少許種子沒有發芽的跡象。
2. 約莫三天後，進行第二次的重點觀察，橙黑(左圖)和橙綠(右圖)在五種不同濃度(100ppm、150ppm、200ppm、300ppm)下的每個種子皆為發芽狀態，可見在 0~300ppm 濃度範圍下，橙黑及橙綠發芽率皆不會因硫酸銅水溶液的濃度受到影響。

- 發現任何濃度在發芽率上都達到了 100%原因：因為硫酸銅水溶液有相當好的殺菌效果 (被應用於殺菌劑波爾多液)，或許可佐證種子在 300ppm 仍然能發芽的情況。
- 因橙黑及橙綠種子在各種濃度皆全數發芽，反而更容易於進行接下來的生長抑制率的相關實驗。

二、探討橙黑及橙綠向日葵的生長抑制率

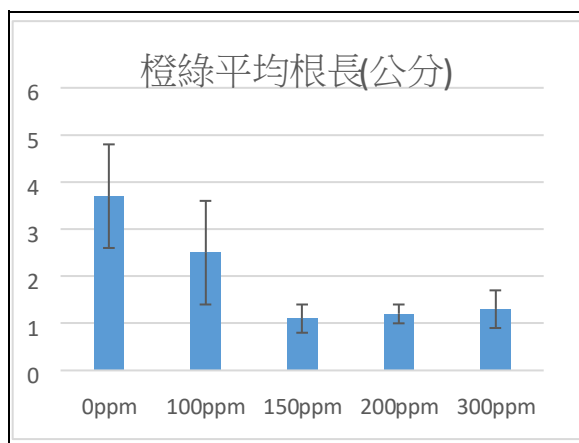


(圖十三) 橙黑的根、莖部測量

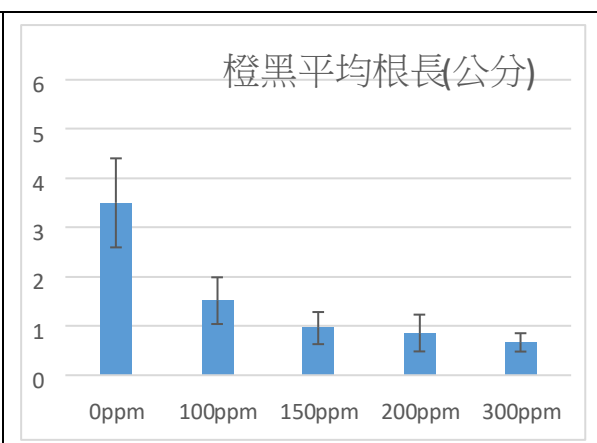


(圖十四) 橙綠的根、莖部測量

- 於兩星期後進行觀察，由橙黑(圖十三)及橙綠(圖十四)的比較圖中可看出:隨著濃度的增加，植株的根、莖部都有變短的趨勢，尤其是與對照組相較下，更顯出其差別。
- 得出一個結論:銅離子的濃度與橙綠、橙黑植株的根、莖長呈現反比關係。



(圖十五) 橙綠平均根長

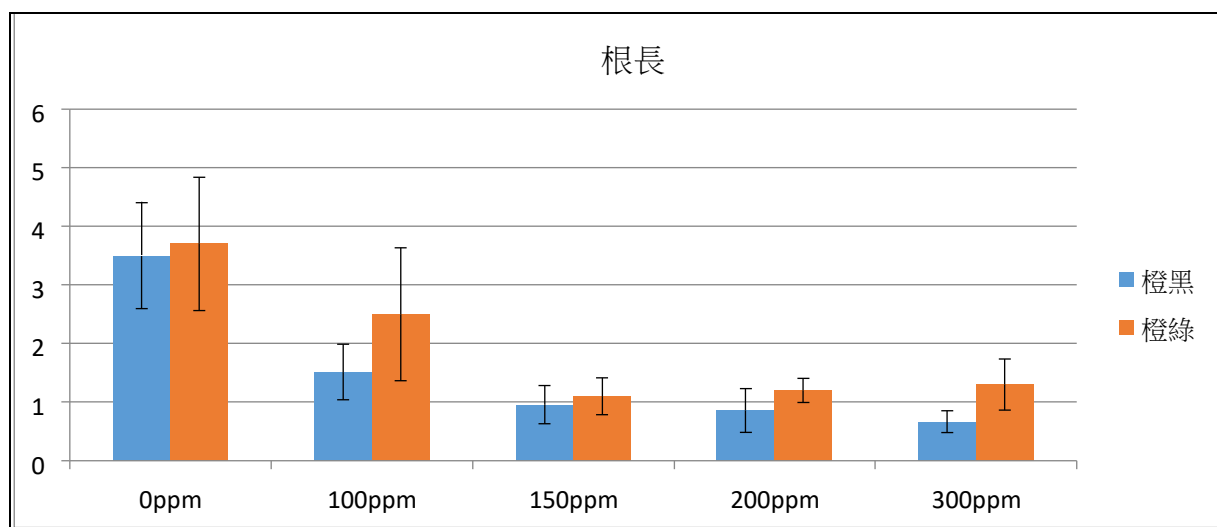


(圖十六) 橙黑平均根長

由 (圖十五)、(圖十六)的平均根長長條圖中(已將數據取平均值並刪去誤差最大之數據)明顯觀察出:橙綠 0ppm(3.70cm)與其他四組濃度的根長差異約為 0.20cm~2.40cm。橙黑 0ppm 與其他四組濃度的根長差異約為 1.99cm~2.83cm 皆呈現大幅縮短的現象且橙黑根部影響較明顯。

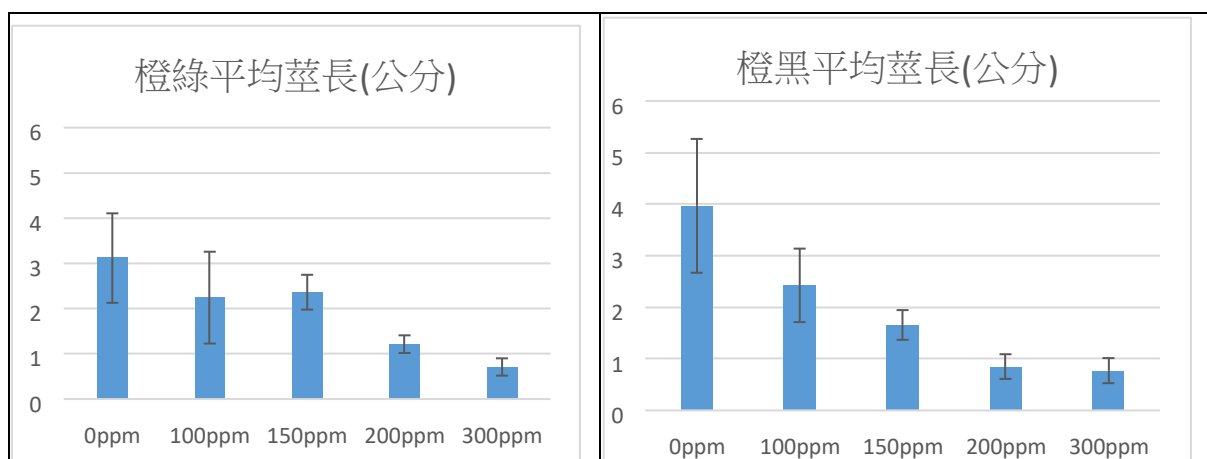
表五、向日葵在不同濃度時的平均根長

品種 \ 濃度	0ppm	100ppm	150ppm	200ppm	300ppm
橙黑	3.50cm	1.51cm	0.96cm	0.86cm	0.67cm
橙綠	3.70cm	2.50cm	1.10cm	1.20cm	1.30cm



(圖十七)橙黑以及橙綠兩種品種下不同濃度的根長比較

由(圖十七)，更可證明:無論在哪個濃度下，橙綠根部生長狀況較橙黑良好，且橙綠根部受銅離子影響的幅度比橙黑還明顯，推論橙綠根部可能較橙黑還不受銅離子的影響，根部生長抑制狀況較不明顯。



(圖十八)橙綠平均莖長

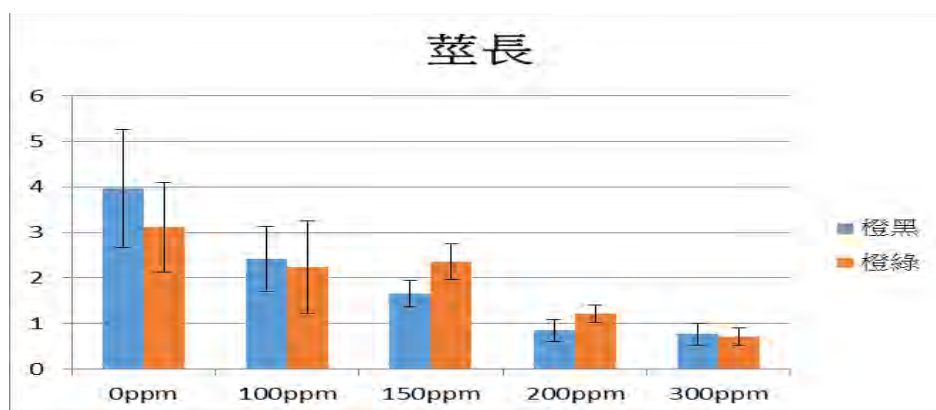
(圖十九)橙黑平均莖長

由 (圖十八)以及(圖十九)的平均莖長長條圖中(已將數據取平均值並刪去誤差最大之數據)觀察出:橙綠 0ppm 與其他四種濃度的莖長差異約為 1.54cm~3.20cm。橙黑 0ppm 與其他四濃

度的莖長差異約為 0.88cm~2.41cm 和根部情形相同皆呈現大幅縮短的現象，而橙黑莖部影響仍然較為明顯。

表六、橙黑橙綠的莖於不同濃度的長度

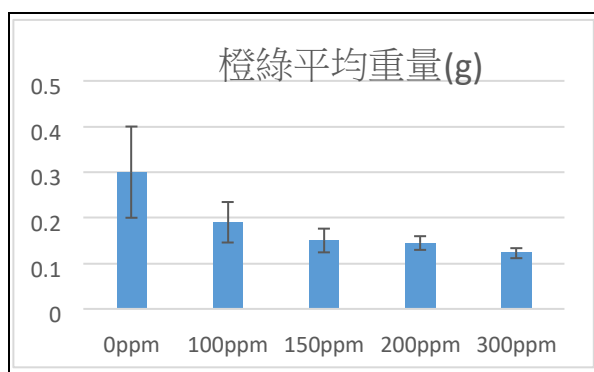
濃度 品種	0 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	300 ppm
橙黑	3.97 cm	2.43 cm	1.66 cm	0.85 cm	0.71 cm
橙綠	3.12 cm	2.24 cm	2.36 cm	1.21 cm	0.77 cm



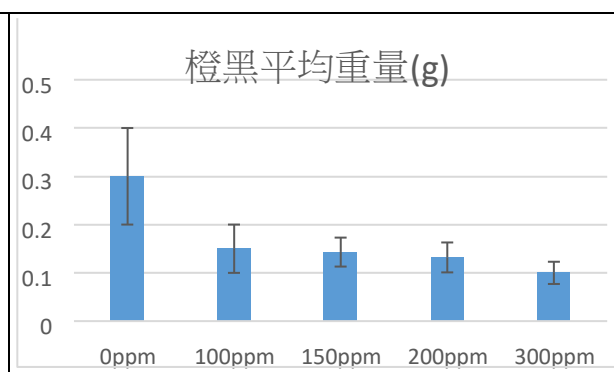
(圖二十)橙黑橙綠兩個品種不同濃度的長度比較

由(圖二十)清楚看出:無論在哪個濃度下，橙黑幼苗的平均莖長皆比橙綠長。隨著濃度增加，橙黑莖長遞減的幅度大於橙綠，兩者差異尤其在 150ppm(橙黑:2.36cm 橙綠:1.66cm) 與 200ppm(橙黑:1.21cm 橙綠:0.85cm)之間最為明顯，橙黑的平均莖長縮短了 1.15cm，而橙綠的平均莖長則是縮短 0.81cm。

三、 向日葵幼苗在吸收銅離子後的重量

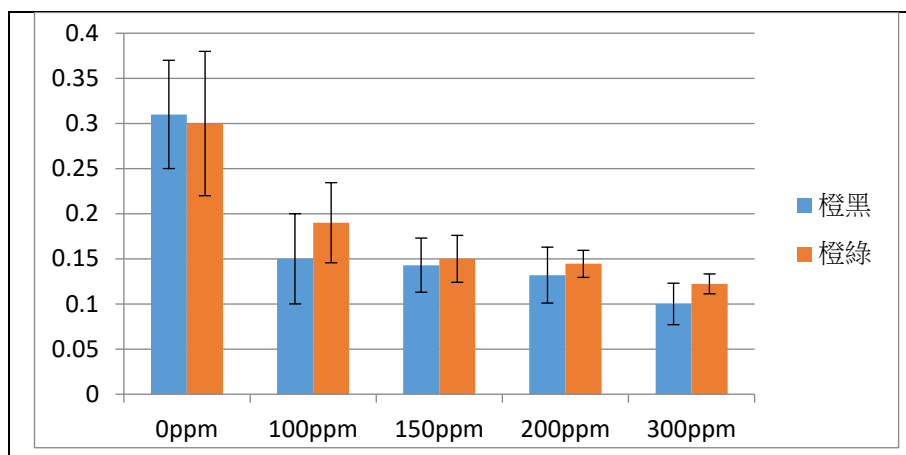


(圖二十一)橙綠平均重量



(圖二十二)橙黑平均重量

1. 在重量上的變化，向日葵的成長與濃度成反比。
2. 橙黑及橙綠在 0ppm 時重量位在範圍 0.2~0.4g，這是每種植株在基因上的生長差異。
3. 以 0ppm 及 100ppm 相較，兩種品種重量急遽下降，這是因為植物在體抗過程中需要能量，原本供應向日葵生長的能量被轉用來合成酵素。
4. 到了 150、200、300ppm 重量下降的程度變緩，此為植物能用的能量以消耗完剩下單純的植物體所產生的結果。



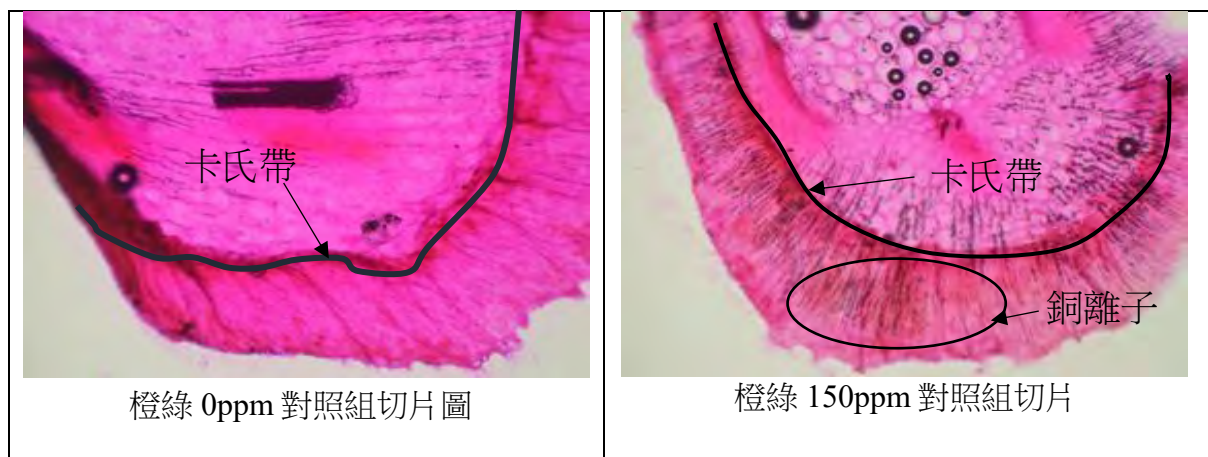
(圖二十三)橙黑橙綠兩種品種在不同濃度時重量比較

由 (圖二十三)的 0ppm 和 100ppm，可得知橙黑平均重量的下降量— 0.15g，和橙綠— 0.10g，而作為推測成黑消耗較多的能量在合成酵素上的根據，且可以結合後面的化學劑量在做進一步的解釋。

四、觀察銅離子在向日葵幼苗體內的累積部位

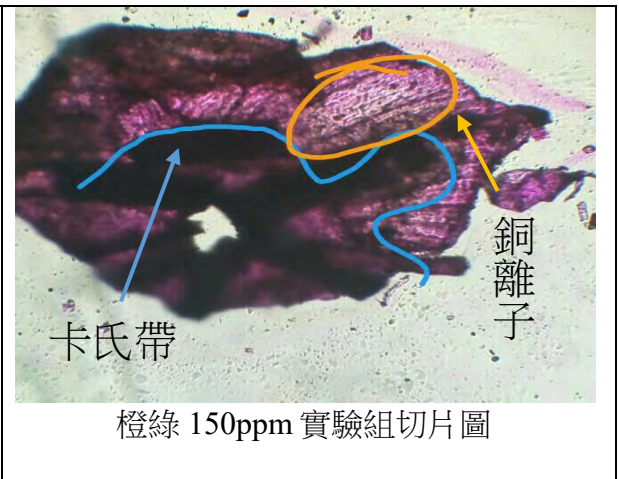
(一)幼苗時期的橙綠(物鏡 40 倍率、目鏡 2 倍率)：

軸的剖面圖 (與對照組比較)





(圖二十四)0ppm 切片圖



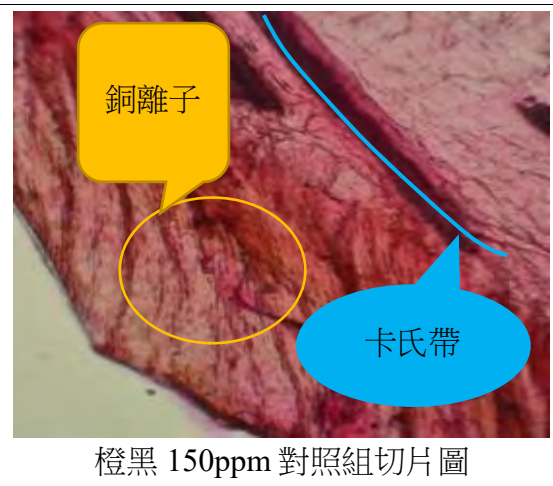
(圖二十五)150ppm 切片圖

(二)幼苗時期橙黑(物鏡 40 倍率、目鏡 2 倍率)：

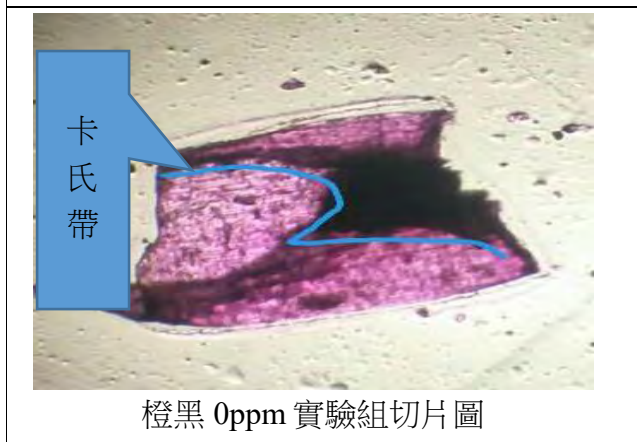
軸的剖面圖 (與對照組比較)



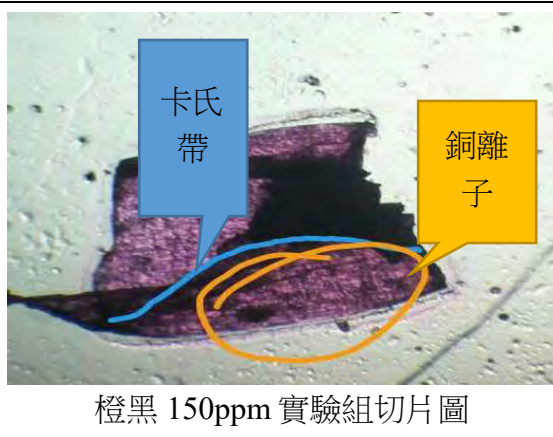
(圖二十六)0ppm 切片圖



(圖二十七)150ppm 切片圖



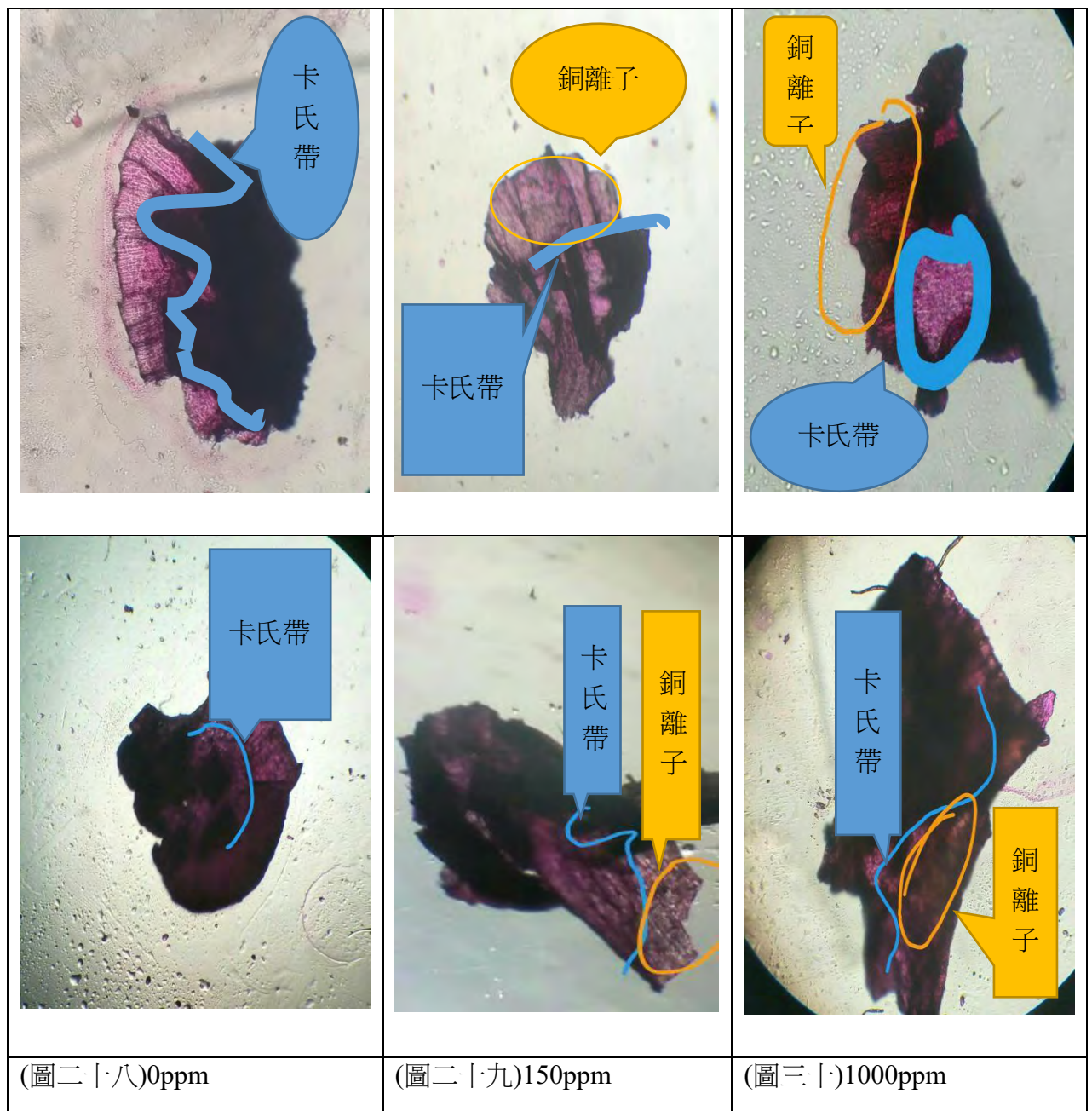
(圖二十六)0ppm 切片圖



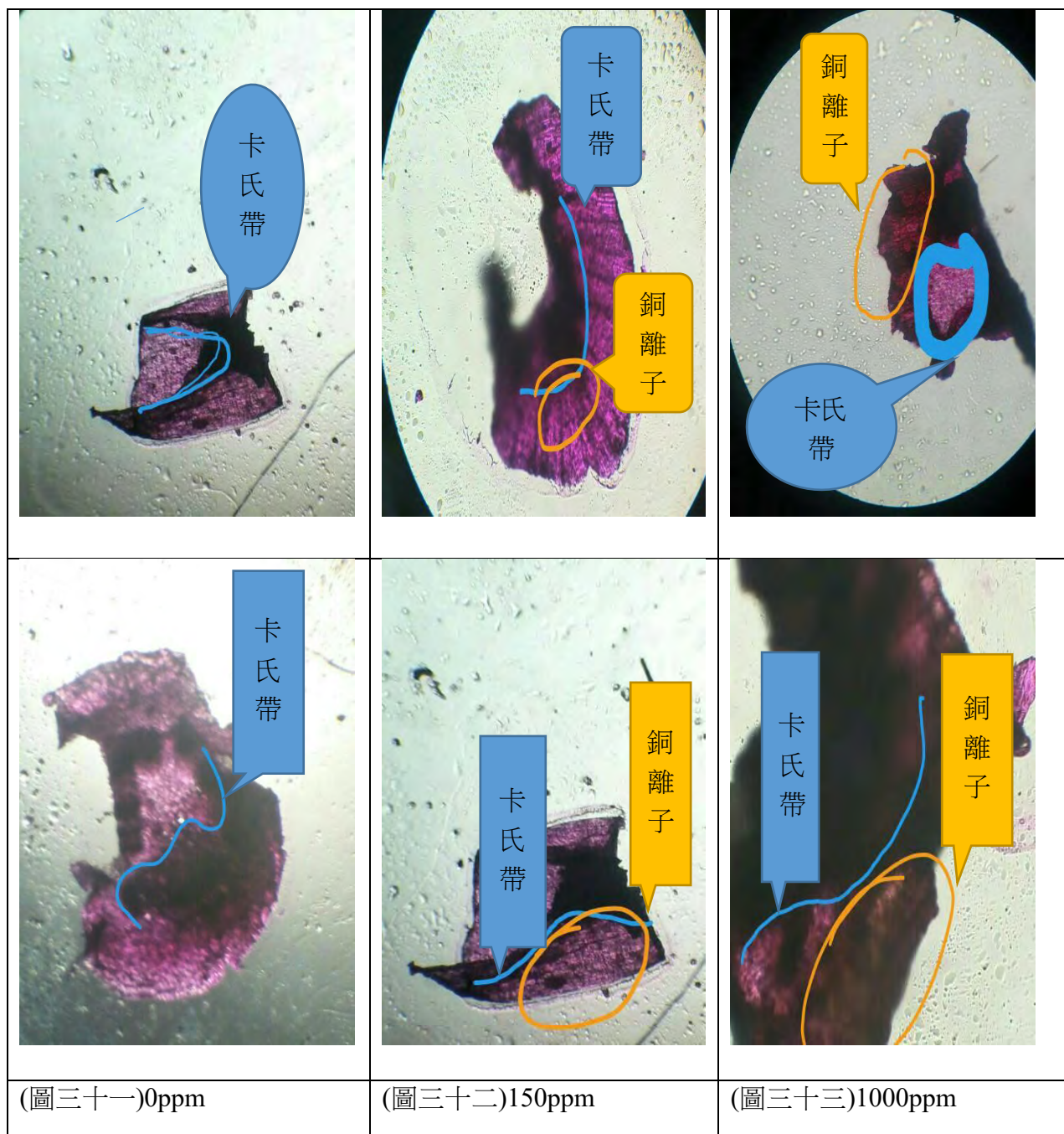
(圖二十七)150ppm 切片圖

於吸收一星期的硫酸銅水溶液後，橙黑及橙綠向日葵含 150ppm 硫酸銅水溶液含銅離子與純水之切片圖比較，明顯的，含有銅離子的幼苗在染色後，呈現了深棕色的情況，並且發現累積的部位經維管束吸收後都滯留在皮層且無法進入維管束，而擋住大部分銅離子向上運輸的正是卡氏帶，大部分植物如向日葵，其根部具有卡氏帶，其功用是阻擋物質進出入細胞，包刮水，主要是防止物質倒流出植物體，而其剛好也阻擋了大部分銅離子進入木質部，使其滯留於皮層。

(三) 成株時期橙黑根的剖面圖(物鏡 10 倍，目鏡 4 倍率)



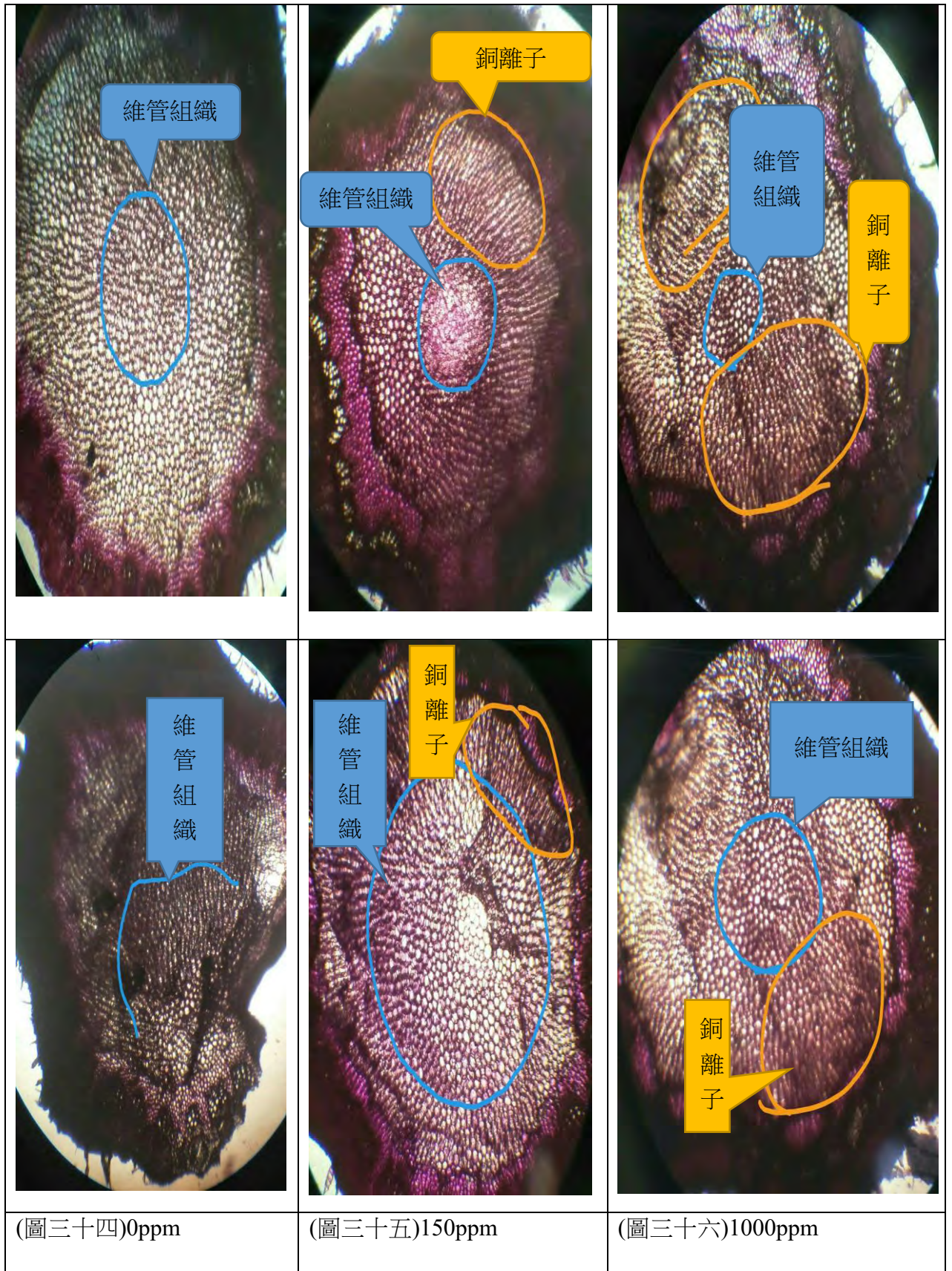
(四)成株時期橙綠根的剖面圖(物鏡 10 倍，目鏡 4 倍).



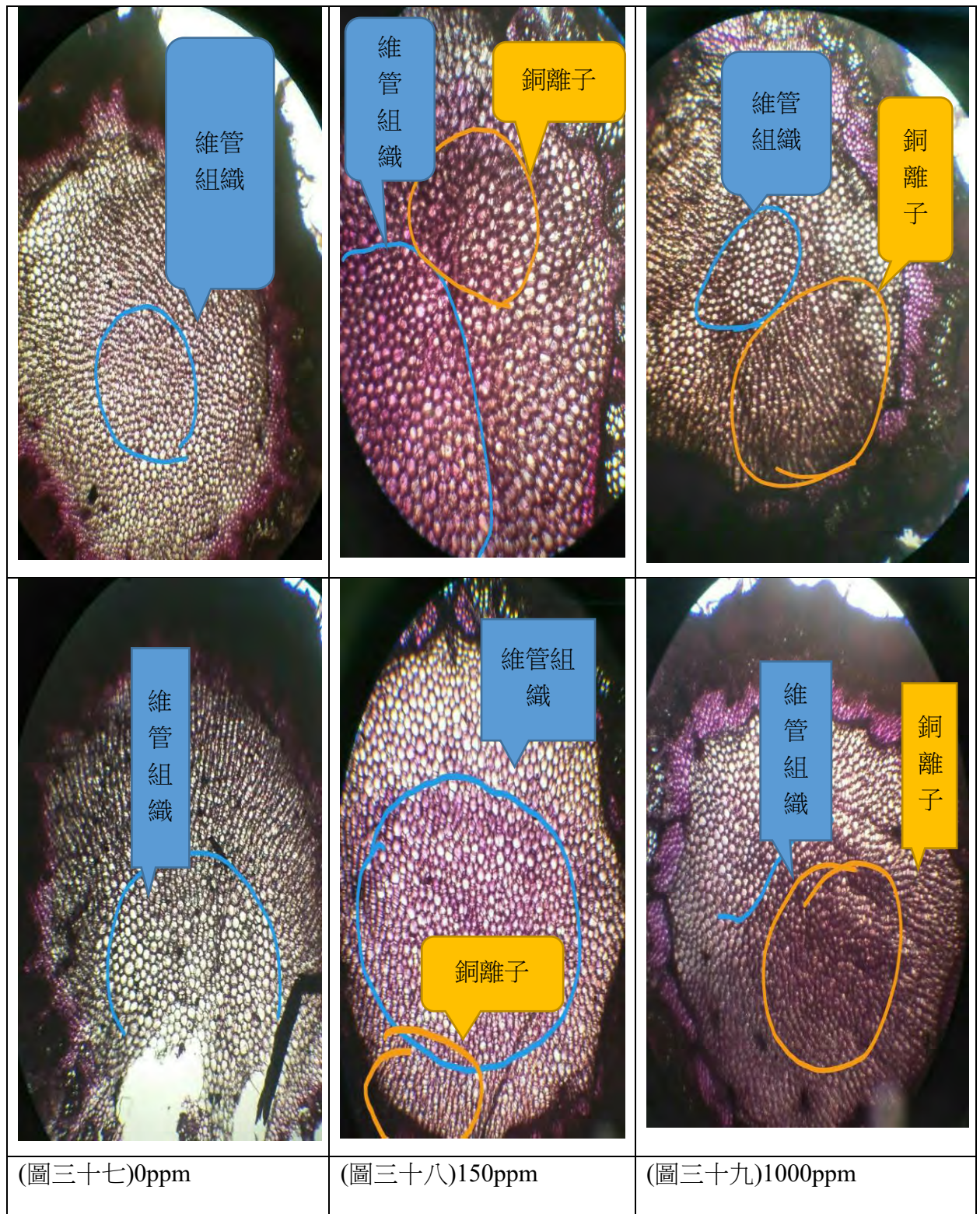
說明:

吸收一個星期後的硫酸銅水溶液成株，不論是橙黑還是橙綠，他們的根部在含銅的地方都呈現了深褐色，並且在越往高的濃度中，褐色越來越深，代表著進入的銅離子越多，但是大部分的銅離子與幼苗時期相同，無法進入卡氏帶，留在皮層繼續累積，僅有部分的銅離子通過了卡氏帶，再繼續莖部的運輸，而這是需要透過消耗能量的方式才能夠進行。

(五)成株時期橙黑莖的剖面圖(物鏡 40 倍，目鏡 2 倍)



(六)成株時期橙綠莖的剖面圖(物鏡 40 倍，目鏡 2 倍)

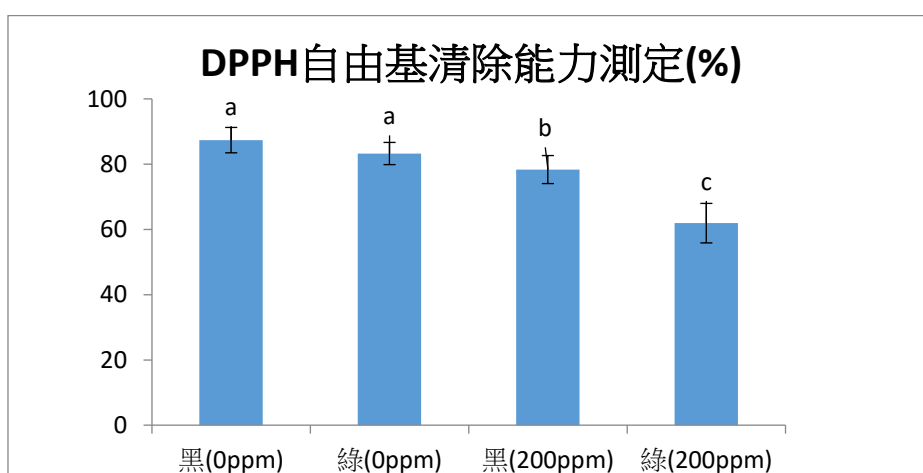


通過根部卡氏帶的銅離子，再向上運輸到了莖部，由剖面圖可清楚見到，含銅的地方呈現顯眼的棕色堆積，在橙黑橙綠的體內都一樣，而其累積的地方，是維管束，越往高濃度的剖面圖，含有銅離子的地方呈現的褐色越深。

(七)清除 DPPH 自由基能力測定

(表七)DPPH 自由基抑制率

濃度 品種	橙黑	橙綠
	0ppm	87.36%
200ppm	78.34%	61.91%



(圖四十) DPPH 自由基清除能力測定

(表八)TTEST 檢定

品種	濃度	0ppm	200ppm
	橙黑		0.6178126
橙綠		0.039052	0.003606

1. 在 DPPH 自由基抑制率的表現上(表七.)，從 0ppm 中可看出橙黑的 DPPH 自由基抑制率約為 87.36%，而橙綠的 DPPH 自由基抑制率約為 83.25%，所以橙黑的 DPPH 自由基抑制率比橙綠高；當濃度到了 200ppm，橙黑的 DPPH 自由基抑制率 78.34%>橙綠的 DPPH 自由基抑制率 61.91%。已知 DPPH 自由基抑制率愈高，其吸光值愈低，可得到橙黑吸光值較橙綠低。
2. 已知此處的吸光值愈低，抗氧化能力愈強。因為橙黑的 DPPH 自由基抑制率高且吸光值低，所以其抗氧化能力比橙綠好。經由(表八)更加確定不同濃度及品種有無差異。

由(圖四十)中，不同品種以及濃度的向日葵，可以看出其 DPPH 清除率有著明顯的變化，尤其是在橙綠 200ppm 時，明顯少了一大截，可見其耐重金屬能力差。

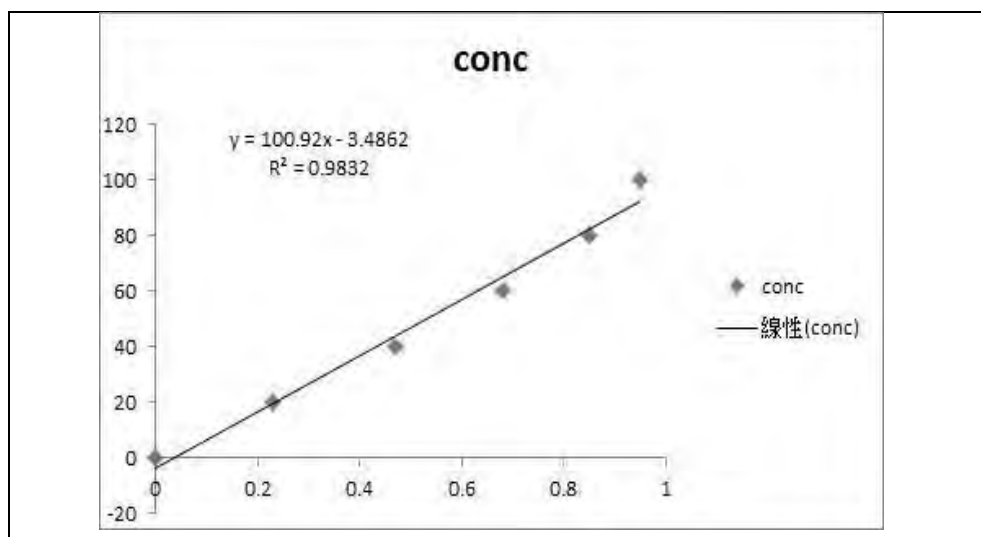
五、 下降含量以及下降率

(表九)所示，當橙黑(橙綠的 DPPH 自由基抑制率從 0ppm 的 87.36%(83.25%)到 200ppm 的 78.34%(61.91%)，橙黑的 DPPH 自由基抑制率下降了 9.02%，而橙綠的 DPPH 自由基抑制率下降了 21.34%(皆四捨五入)。得橙黑的 DPPH 自由基抑制率仍高於橙綠。

(表九)DPPH 自由基抑制率 與下降率

品種/濃度	DPPH 自由 基抑制率	下降含量	下降率
橙黑(0ppm)	87.35818	無	無
橙綠(0ppm)	83.2523	無	無
橙黑(200ppm)	78.33603	9.02215	10.32776747
橙綠(200ppm)	61.91248	25.44571	30.56456846

六、 總酚量化合物分析



(圖四十一) 吸光值與濃度關係

如(圖四十一)、(表十) 所示，可以從吸光值換算成總酚量的濃度。當吸光值愈高，向日葵的總酚量化合物也跟著變多，意味著抗氧化力較高。

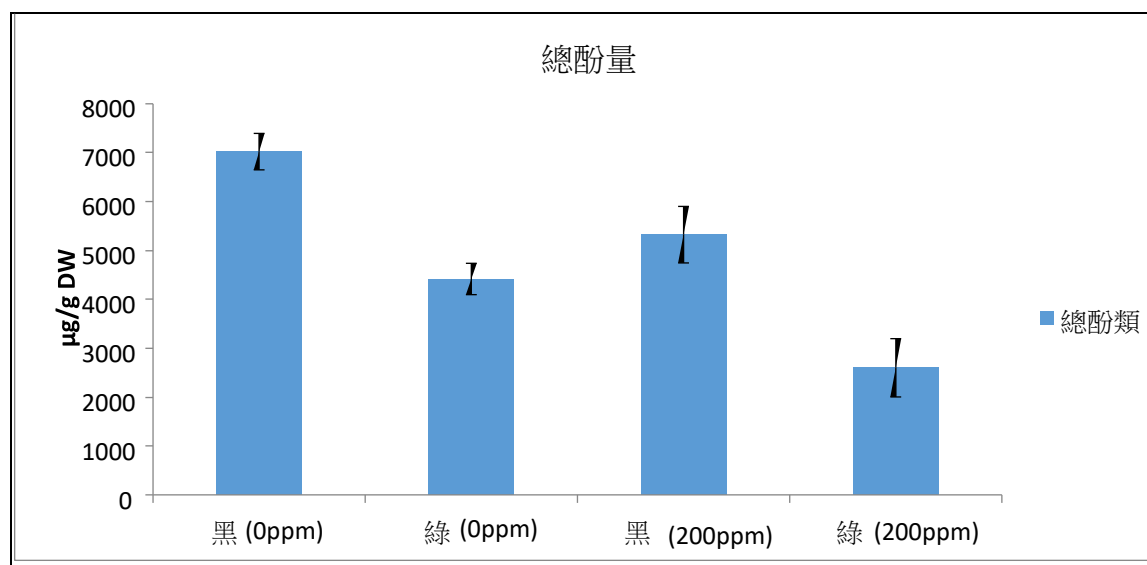
(表十)由吸光值轉換成濃度

ABS	0	0.23	0.47	0.68	0.85	0.95
conc	0	20	40	60	80	100

七、 探討總酚類與降解含量、降解率：如表十一所示

(表十一)總酚量

品種(濃度)	總酚量($\mu\text{g/gDW}$)	誤差值($\mu\text{g/gDW}$)	降解含量	降解率
橙黑(0ppm)	7021.244	372.6977	無	無
橙綠(0ppm)	4416.369	320.70027	無	無
(200ppm)	5322.615	578.13637	1698.63	24.19%
(200ppm)	2599.09	596.428	1817.28	41.15%



(圖四十二)不同品種以及濃度向日葵之總酚量

1. 如(表十一)及(圖四十二)，橙黑的總酚量化合物在 200ppm 下減少了 1698.629($\mu\text{g/gDW}$)(24.19%)；而橙綠的總酚量化合物在 200ppm 下減少 1817.279($\mu\text{g/gDW}$)(41.15%)可見橙黑的總酚量化合物減少的量小於橙綠，可得知橙黑的總酚量化合物比橙綠多。

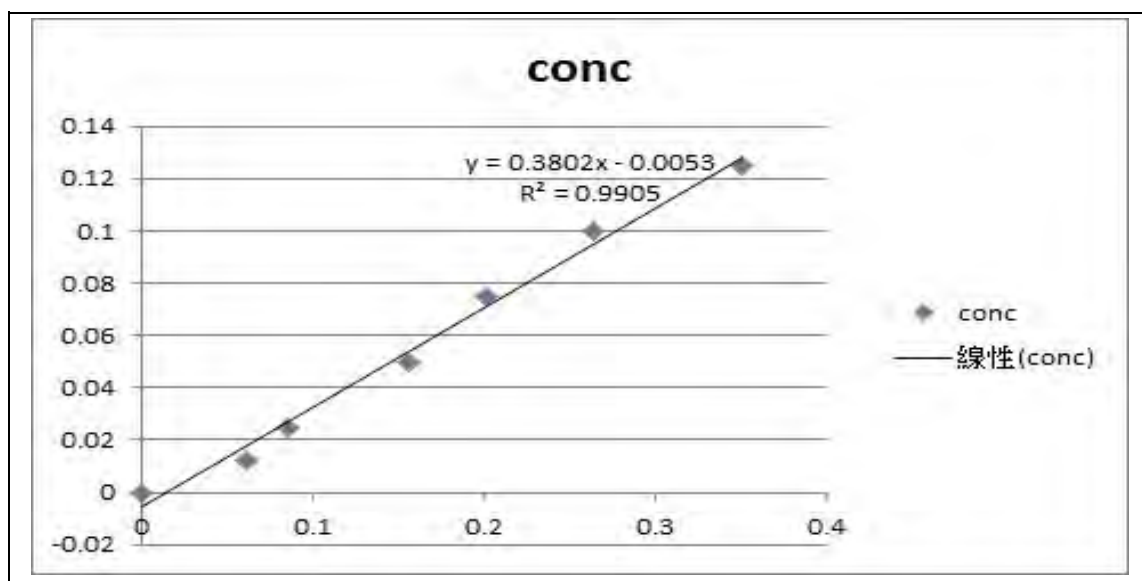
2. 已知總酚量愈多，抗氧化能力愈好，可得橙黑因總酚量化合物較橙綠多，橙黑的抗氧化能力就會比橙綠更佳。

九、可溶性蛋白質含量測定

(表十二)可溶性蛋白質

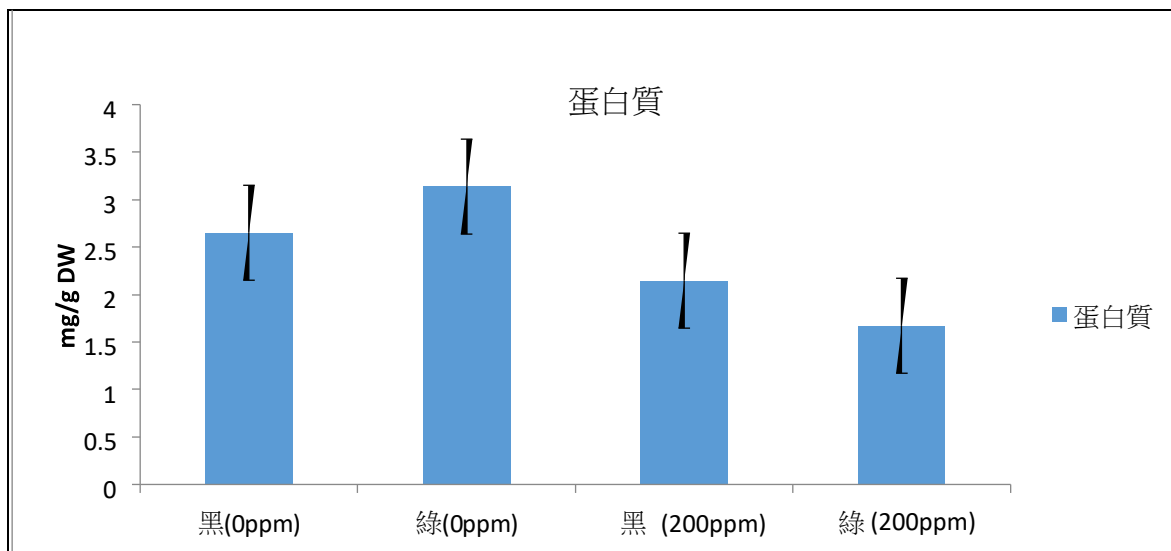
品種 (濃度)	蛋白質 (mg/g DW)	誤差值 (mg/g DW)	下降含量	下降率
橙黑(0ppm)	2.650810	0.5123567	無	無
橙綠(0ppm)	3.136604	0.6797864	無	無
橙黑(200ppm)	2.146291	0.2887637	0.504518403	19.03%
橙綠(200ppm)	1.671479	0.9783918	1.465124163	46.71%

1. 由(表十二)看出，橙黑(橙綠)的對照組可溶性蛋白質含量約為2.650810(3.136604)(mg/g DW)，可見橙綠幼苗本身的可溶性蛋白質含量較橙黑多。
2. 在 200ppm 的部分，橙黑(橙綠)相較對照組的可溶性蛋白之下降率為19.03%(46.71%)，得到橙綠因為較橙黑易受銅離子影響，所以橙綠的可溶性蛋白質含量下降的比橙黑多。
3. 已知植物的可溶性蛋白質愈高，其抗氧化性愈佳，所以可得到橙黑品種的抗氧化性比橙綠來的好之結論。



(圖四十三) 可溶性蛋白質吸光值與濃度線性關係

由(圖四十三)可看出，可溶性蛋白質濃度(縱軸)與吸光值(橫軸)呈正相關。因為可溶性蛋白質對植物來說是好的物質，所以量愈多對向日葵會有更多的好處。而此處可溶性蛋白質愈多，代表吸光值愈高且抗氧化能力較佳



(圖四十四)不同品種以及濃度向日葵的可溶性蛋白質質量

1. 由(圖四十四)中，可以清楚由長條圖看到橙黑、橙綠的差異，0ppm 的狀態下，橙綠的可溶性蛋白質含量高於橙黑，但可在 200ppm 時明顯看出橙綠可溶性蛋白質含量下降幅度遠大於橙黑品種。
2. 從橙黑可溶性蛋白質含量高於橙綠的現象便可看出:橙黑的抗氧化能力比橙綠高，衍伸出來的說法為，高抗氧化能力的橙黑較能在有銅離子的環境下生長。

十、下降率與可溶性蛋白質、總酚量化合物、DPPH 自由基抑制率之關係

(表十三)下降率針對不同測量的主題整理(0ppm 與 200ppm 下)

下降率	DPPH 抑制率	總酚類	總蛋白
橙黑	9.02%(10.32%)	1698.62(24.19%)	0.504(19.03%)
橙綠	25.44%(30.56%)	1817.27(41.14%)	1.465(46.71%)

根據(表十三):

1. DPPH 抑制率的下降率

橙黑可溶性蛋白質含量的下降率約 19.03%；橙綠可溶性蛋白質含量的下降率約為 46.71%。可得，橙黑可溶性蛋白質含量在銅離子環境下高於橙綠。

陸、討論

一、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率

在實驗的過程中，一開始本團隊發現了兩種向日葵種子在 20ppm、40ppm、60ppm 及 80ppm 的時候沒有出現發芽率的抑制效果，進而又做了第二次 100ppm、150ppm、200ppm、300ppm 的角色，發現硫酸銅有殺菌的功用。於是實驗後來主要以第二次的濃度探討兩種向日葵的生長抑制率。

二、探討橙黑及橙綠向日葵幼苗的生長抑制率

在兩種向日葵生長抑制率的數據中可觀察到了隨著濃度的增加，兩種向日葵的莖和根的長度與濃度呈負相關。在根長上，大部分橙綠比橙黑長；在莖長上特別以 150 和 200ppm 兩品種差異較大，結合 DPPH 抑制率等指標結合推測橙黑消耗較多原以用來生長的能量去產生酶來對抗自由基，

三、秤出向日葵種子在吸收銅離子後的重量

以第二次的濃度逐項進行秤量，並看出向日葵幼苗於吸收銅離子後會伴隨濃度的增加而在重量上產生遞減的現象，因此，幼苗在吸收愈高的銅離子濃度後，生長情況愈不佳並反映在幼苗本體的重量上。

四、觀察銅離子在向日葵幼苗體內的累積部位

(1) 幼苗時期:

在進行兩種不同品種在軸的比較，發現累積的部位都在根部的皮層無法進入木質部，我們推論植物吸收銅離子能力低，然而生長在高濃度之下因為皮層大量累積銅離子阻礙其他元素之吸收造成植物生長衰弱。

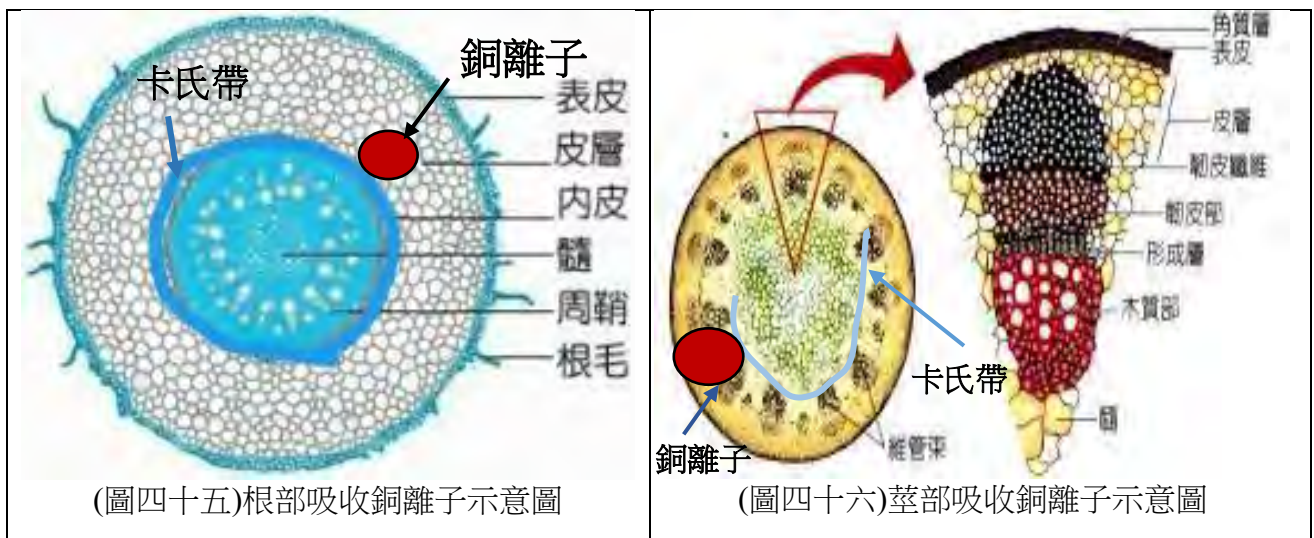
(2) 成株時期:

1 根部:

兩個品種中，發現累積的地方，與幼苗時期相同，都在皮層的地方，無法進入木質部，只有部分銅離子通過向上運輸，同時，成株時期的兩個品種，在 1000ppm 的硫酸銅水溶液中都呈現乾枯的狀態，代表著累積在皮層的銅離子阻礙了其他銅離子的吸收而導致了植物體衰落。

2. 莖部:

部分的銅離子從根部通過卡氏帶來到莖部後，兩個品種所累積的地方，可以清楚的看見累積在維管束，而植物體本身是需要銅離子來維持體內的機制，明顯的顯示於木質部，因此我們可以推測剖面圖中較深褐色的部位是維管束中的木質部，但除了木質部外，其餘維管束還是有少量褐色的呈現，代表銅還是會繼續向上運輸。



五、清除 DPPH 自由基能力測定

本團隊透過此實驗間接測量出橙綠及橙黑的抗氧化性，而橙綠抗氧化性的結果比橙黑高，故推測出橙黑吸收銅離子效果較好的原因和抗氧化性強度有關。除此以外，在不同品種之比較之下也發現橙綠之 DPPH 清除能力以降 30.56% 而橙黑只降 10.32%。推測橙黑比橙綠耐銅離子。

六、測量總酚量

總酚類為一種抗氧化物，可以阻擋自由基破壞植物，抗氧化物質高，吸收重金屬就越多，橙黑比起橙綠的抗氧化物顯然較多，因此可看出橙黑比起橙綠較能在有銅離子的環境下生長。

七、可溶性蛋白質含量測定

植物的可溶性蛋白質含量愈多，代表其抗氧化能力愈強，而在本實驗的檢定中測得橙黑在有銅離子的環境下，可溶性蛋白質含量高於橙綠，表示橙黑的抗氧化能力大於橙綠，所以橙黑比橙綠較能生存在有銅離子的環境中。

柒、結論

- 一、向日葵種子在 0~300ppm 的硫酸銅水溶液濃度中，發芽率還是維持著高達 100%。經查資料後發現，硫酸銅水溶液具有強效的殺菌功效，可能是導致第一批與第二批的實驗結果相同的原因。
- 二、硫酸銅的濃度在到達一定的程度後便能夠抑制向日葵生長，隨著濃度的增減，其根、莖長度都有著明顯的減短，因此可以推測其生長抑制率與濃度成正比。
- 三、在高濃度的硫酸銅中，向日葵的重量比較輕，隨著濃度遞增而重量遞減。
- 四、銅離子進入幼苗時期的向日葵後，大部分堵塞在韌皮部外的卡氏帶，無法藉由木質部往上運輸，任何物質儘管是水，都無法自由通過，必須藉由細胞上的特殊管道進入細胞；成株時期的向日葵，根部吸收銅離子，與幼苗時期一樣，大部分被堵塞於卡氏帶外的皮層，進而導致植物死亡，而少部分通過的銅離子，在進入莖部後累積在維管束，因此表示銅離子還是會繼續往上運輸。
- 五、橙黑的 DPPH 自由基抑制率下降程度較橙綠小，得橙黑的 DPPH 自由基抑制率仍高於橙綠。發現橙黑 DPPH 自由基抑制率高於橙綠，得到橙黑吸光值比橙綠低，且抗氧化能力比橙綠好。

六、橙黑的總酚量化合物減少的量小於橙綠，可得知橙黑的總酚量化合物比橙綠多；得知橙黑的總酚量比橙綠多，所以得到橙黑的抗氧化能力比橙綠好。

七、橙綠因為較橙黑易受銅離子影響，所以橙綠的可溶性蛋白質含量下降的比橙黑多。植物的可溶性蛋白質愈高，其抗氧化性愈佳，所以可得到橙黑品種的抗氧化性比橙綠來的好

捌、參考資料

- 一、Andrenelli, M., Maienza, A., Genesio, L., Miglietta, F., Pellegrini, S., Vaccari, F., & Vignozzi, N. (2016) copper influence on germination and growth of sunflower (*helianthus annuus*)
- 二、方博政(2015)。探討生物碳舒緩銅離子對綠豆生長的毒性。國立清華大學生物資訊與結構生物研究所碩士論文。
- 三、林易署、陳俊桀、楊純明(2013)。簡介農地之重金屬汙染及其復育。農業試驗所技術服務第 93 期。
- 四、汪志威(2014)。阿拉伯芥於過量銅離子下與結球白菜於不同鎳離子濃度生長環境之代謝物分析。臺北市立大學應用物理暨化學系碩士論文。
- 五、劉玉山、張永達 (2009)。植物對重金屬的反應。科技部高瞻自然科學教學資源平台－科學 online。

【評語】 052104

1. 本研究利用組織染色切片技術，定位出銅離子影響的位置，可以看出銅離子在根與莖的吸收差異。
2. 研究主題明確，但國內外已有相關的實驗報導，創新稍顯不足。
3. 僅由 DPPH、總酚含量、可溶性蛋白質含量之高低推斷品種間對重金屬耐受度之高低，所得之結論仍有加強空間，鼓勵宜再做深入的探討。

銅離子對不同品種的向日葵成長影響之研究

摘要

本研究結果顯示，硫酸銅水溶液對向日葵種子發芽率並無影響，反而有幫助於向日葵種子的成長；硫酸銅水溶液濃度達到300ppm會抑制向日葵生長，隨著濃度增減，其根、莖長度都有著明顯的減短，結果顯示其生長抑制率與濃度成正比。高濃度的硫酸銅水溶液，會使向日葵重量變輕，隨著濃度遞增而重量遞減。銅離子進入幼苗時期的向日葵後，堵塞在韌皮部的外側，無法藉由木質部往上運輸，而堵住銅離子金屬的正是卡氏帶，任何物質儘管是水，都無法自由通過，必須藉由細胞上的特殊管道進入細胞。從DPPH、總酚量、可溶性蛋白質，皆可推算其抗氧化物以及降解率，從這兩樣數據可見橙黑重金屬耐受度高於橙綠。

壹、研究動機

高一的時候，生物課本有提到植物的水分循環，油然想起當初國小自然課時，我們曾經做過將芹菜放入紅墨水中，觀察其在芹菜中的循環流動，這是一個簡單又基礎的實驗，然而此時如果將紅墨水換成含有重金屬的水溶液，情況會如何？接著我們請教了學校師長們的想法，上網查了資料，得知現今有許多關於其他物質在植物體內運輸的相關資料，卻少有針對重金屬方面的文獻，好奇心驅使下，我們想找出重金屬在植物體內的運輸，而在千迴百轉的考慮下，最終決定我們以向日葵作為實驗的對象。

貳、實驗目的

- 一、測量出向日葵種子的發芽率是否受到影響
- 二、吸收重金屬離子後的向日葵生長是否受到影響
- 三、比較出在不同濃度硫酸銅下植株的長度與重量
- 四、觀察銅離子在向日葵幼苗內的累積部位
- 五、比較橙綠及橙黑對銅離子的耐受度

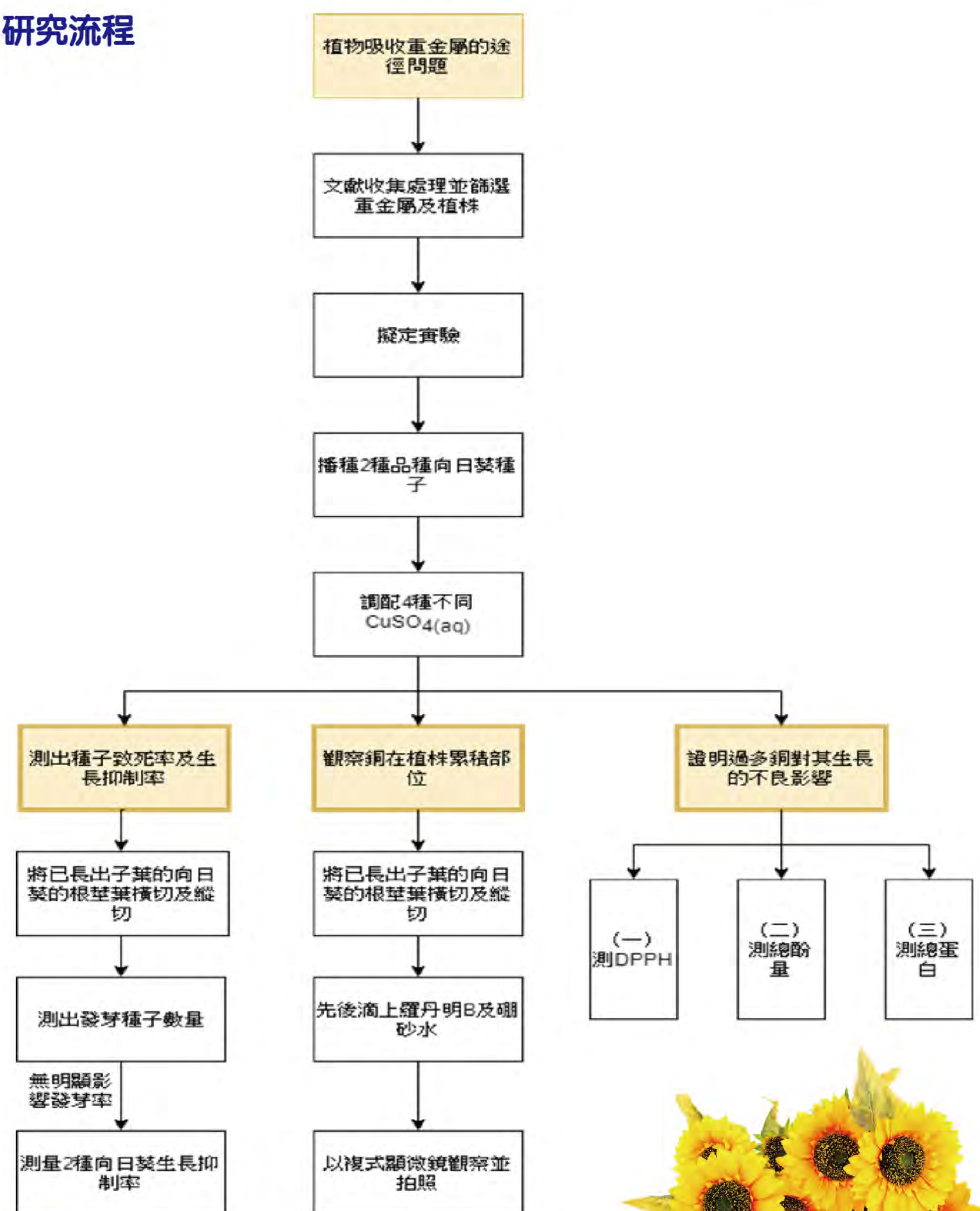
參、研究設備與器材

編號	物品	數量	用途
一	筆記型電腦	2 台	撰寫電子檔
二	筆記本鉛筆	1 本 1 支	撰寫實驗日誌
三	智慧型手機	2 台	拍攝紀錄實驗流程
四	分析天平	1 台	秤量藥品重量
五	複式顯微鏡	2 台	觀察植物體內流動
六	顯微拍攝	1 台	將顯微鏡的結果拍攝
七	解剖刀	3 片	將植物切片
八	擦手紙	2 包	種植向日葵
九	培養皿	15 個	種植
十	手套	3 雙	保持手部清潔
十一	超純水製造機	1 台	實驗用水
十二	酵素免疫分析儀	1 台	清除 DPPH 自由基能力測定
十三	微量滴管	1 支	滴取溶液

編號	物品	數量	用途
一	向日葵(橙、黑)	5 包	種植觀察
二	向日葵(橙綠)	5 包	種植觀察
三	酒精	1 瓶	配置染劑
四	Rhodamine B (C28H31ClN2O3)	1 瓶	配置染劑
五	硼砂	1 瓶	洗去多餘染劑
六	含水硫酸銅	1 瓶	可溶性蛋白質含量測定(A 試劑)
七	三哩甲基氨基甲烷 (Tris-HCl buffer(pH7.4))	1 瓶	清除 DPPH 自由基能力測定
八	DPPH-ethanol 溶液	1 瓶	清除 DPPH 自由基能力測定
九	乙酸緩衝劑 (acetate buffer)	1 瓶	總酚量化合物分析
十	福林試劑 (folin reagent)	1 瓶	總酚量化合物分析 可溶性蛋白質含量測定(試劑 B)
十一	碳酸鈉(Na2CO3)	1 瓶	總酚量化合物分析 可溶性蛋白質含量測定(試劑 A)
十二	咖啡酸(caffeic acid)	1 瓶	總酚量化合物分析
十三	酒石酸鉀鉍 (Potassium Tartrate)	1 瓶	可溶性蛋白質含量測定 (K2C4H4O6) 定(試劑 A)
十四	氫氧化鈉 (NaOH)	1 瓶	可溶性蛋白質含量測定(試劑 A)

肆、研究過程與方法

一、研究流程



二、文獻資料

(一)向日葵種類

向日葵 sunflower (學名: Helianthus annuus) 原產於美洲西部，是一年生草本植物，菊科(compositae)向日葵屬(Helianthus)，其盤型花序可寬達 30 釐米，因花序會隨太陽轉動而得名。最適合栽種的溫度是 21°C~24°C，因此全台都適合栽種。在品種上有極多種類，在花形上有分單瓣、重瓣或單花、多花之分，在花色上主要以黃色以及橘色系為主，另外還有深紅色鑲有金黃邊、銅紅、白色等特殊品種，常見的有高達 150 cm 的高莖型向日葵還有 30~50cm 的矮型向日葵。

表三、向日葵實驗種類說明

照片	橙黑	橙綠
品種	又名光輝，台灣花卉市場中最主要的品種，花期、插花壽命較長，無花粉。花序呈黑色。	又名香吉士，台灣花卉市場的次要品種，與光輝特性大致相同，不同的地方是，花瓣較長而且較多，花序呈現綠色。
特性		

(二)植物吸收重金屬及累積的機制(過程共分為三個階段，以吸收鎳為例)

第一階段：植物根部釋出[H+] 酸化土壤，以利植物吸收鎳或分泌植物金屬螯(PC)或土壤中螯合以力嵌住土壤中的金屬，螯合物發生氧化還原反應，以利鎳的吸收。

第二階段：鎳在植物體內的運輸：鎳→根→木質部→莖鎳到達木質部有以下兩種方法
1.直接穿過根中無生命部分，如：細胞間隙，及利用非原生體系進入木質部。
2.直接進出層層相連細胞，此一方法需消耗能量穿過皮層到達木質，就是利用原生體系進入木質部。

第三階段：植物細胞加以解毒：鎳進入根細胞後，可能的解毒方式有兩種：
1.鎳和植物性螯合物結合，再送入液泡中累積，或是進入細胞後再與植物性重金屬螯合物結合。
2.經由輸導組織向上運輸鎳，在到達運輸終點後再與植物性金屬螯合物結合累積在液泡中。

(三)銅離子於農業上的應用

銅離子可以有效的抑制細菌與真菌的生長，所以現今農民所使用的農藥部分都含有銅離子，由於噴灑在植物葉片上的銅元素不具有流動性，所以並不會被植物給吸收。在遇到弱酸性露水或是雨點時，銅元素會以+1或+2價的離子型態存在，當銅離子接觸到細菌、真菌或者是他們的孢子時，會穿透他們的細胞壁，繼而干擾細胞體內酶的活性，破壞細胞的生長。

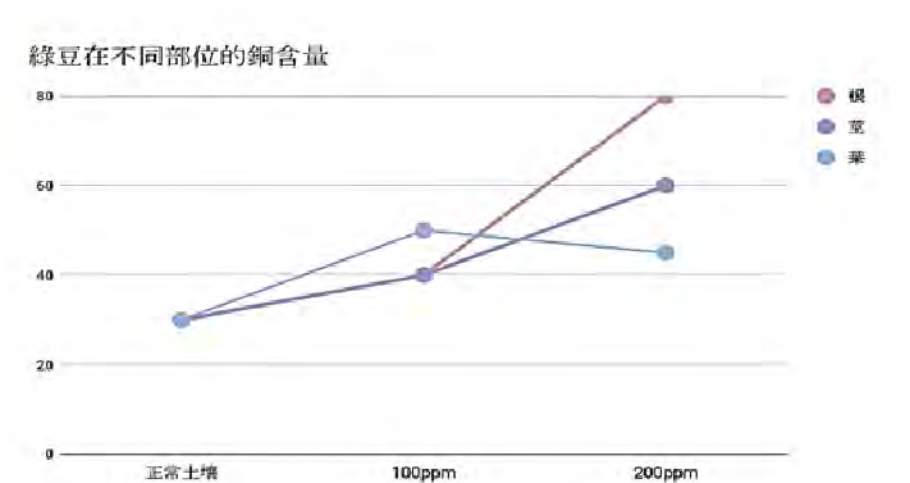
農藥的成分中，銅可能以下列方式存在：氫氧化銅、硫酸銅、氧氯化銅、氧化銅等等，而不同的存在方式有不同的效果時間，就雨水和膠水流失性而言，氧化銅的效果是最為優異的。

最近最為新型的殺菌劑-新型波爾多液是硫酸銅、生石灰、水混和後發生化學反應生成氫氧化銅，他對植物的好處有許多，不僅能夠進行殺菌，還能夠提供植物所需要的銅離子以及鈣離子，更能改變土壤中的 PH 值。

其他植物在吸收銅離子後不同部位的銅含量(以綠豆為例)

	表四、綠豆吸收銅離子的抑制率		
	根(銅含量 μg/gDW)	莖(銅含量 μg/gDW)	葉(銅含量 μg/gDW)
正常土壤	<30μg/gDW	<30μg/gDW	<30μg/gDW
100ppm	40μg/gDW	40μg/gDW	50μg/gDW
200ppm	80μg/gDW	60μg/gDW	45μg/gDW

(發現：400ppm 之後，植物因銅濃度過高而死亡)



(圖二)綠豆在不同部位的銅含量

(四)銅離子對植物的影響

銅在植物中扮演的角色為光合作用和呼吸作用的氧化酶成分，且可以促進植物對蛋白質的利用。

- (1)缺乏：在生長過程中會產生抑制，幼葉則會呈現黃白化且出現捲曲變形，嚴重的話，還會呈黑色並枯萎，對開花也會受到相當程度的影響。
- (2)過量：葉片的部分會出現濃綠色之後會有缺鐵黃化的現象，而且葉片也會變得比原本厚了許多，根則會有刺鐵絲的形狀，並且會使分蘗受阻。

(五)DPPH 簡易介紹

DPPH 自由基清除能力測試是在測試一個成分是否具有抗氧化性。而 DPPH 是較為安定的自由基，其在波長 517nm 處具高吸光值且呈現藍紫色。若 DPPH 自由基與式樣反應，顏色會轉為黃色，其吸光值會降低，此處吸光值愈低表示試樣清除 DPPH 自由基的能力越強，意即抗氧化能力越高。

(六)總酚量簡易介紹

酚類化合物是植物體內抗氧化成分的來源。總酚量是測試樣本裡酚的含量，常用方法為 Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，樣本裡若有酚類化合物即會跟 Folin-Ciocalteu 反應呈色，而其呈色可利用分光光度計測量其吸收值。此處吸光值越高抗氧化能力越佳。至於對照之標準品常用沒食子酚或沒食子酸以標準品做出減量線即可對應其酚的含量。總酚量的多寡可代表抗氧化能力的高低。

(七)可溶性蛋白簡易介紹

植物體的可溶性蛋白大多為參與代謝的酶類，測其含量是為了作為植物總代謝與抗氧化性的一個指標，常見方法為考馬斯亮藍法 G-250染料結合法及 LOWRY 法。前者穩定而後者簡便。但兩者的缺點分別為前者在蛋白質含量較高時線性關係稍偏低，且不同蛋白質與色素結合狀況有差異，至於後者會受植物體內存在的酚類物質干擾。

三、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率

- (一)準備十個培養皿，取數張擦手紙沿培養皿邊緣裁剪，鋪在培養皿上並兩種向日葵種子以十顆為一組放在各個培養皿上，並在每顆種子中取適當間隔。
- (二)依各種濃度分別各取 5cc 滴於每組向日葵，放進 27.8°C 的生長箱內並在培養皿上覆蓋鋁箔紙以防止水分快速散失且每天更換擦手紙，且兩天後觀察發芽率，共分為兩次：
第一次：發現發芽率為 100%
第二次：發芽率也為 100%(決定測量生長過程中的抑制率)



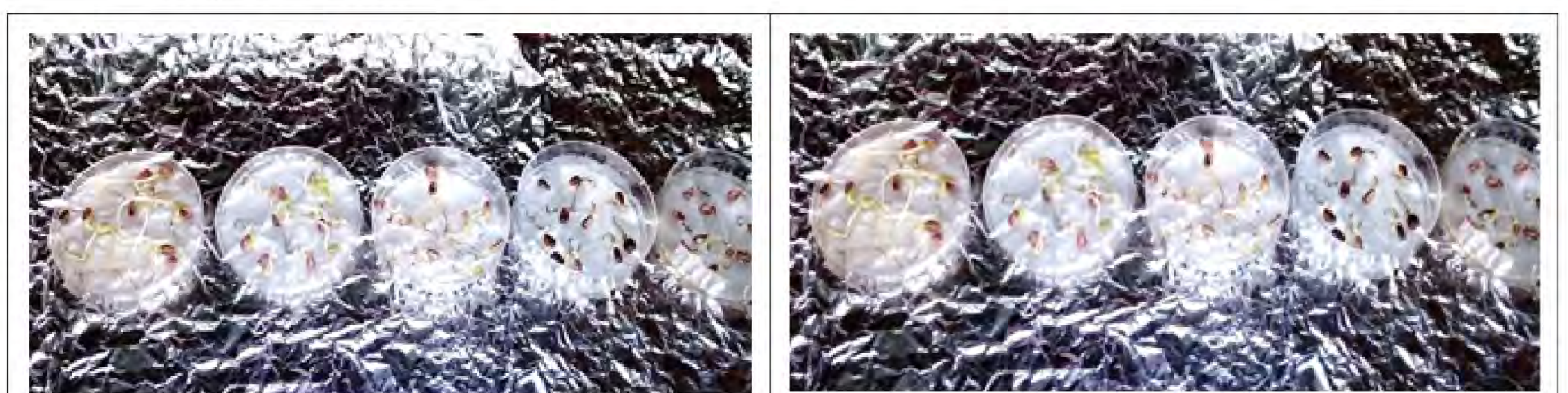
(圖五)五種不同硫酸銅濃度的橙綠



(圖六)五種不同硫酸銅濃度的橙黑

四、探討橙黑及橙綠向日葵的生長抑制率

- (一)利用第二次的四種濃度，加上一組對照組持續以 5cc 的量，滴在各組的向日葵上並於種子發芽後，第十四天進行觀察向日葵在各種濃度中生長情形，並將其差異且與對照組進行比較。



(圖七)觀察向日葵的生長

- (二)量出各組濃度的向日葵長度並和對照組進行比較
1.以尺量出各向日葵幼苗的長度並做出統計。
2.將結果作成圖表形式，以長條圖呈現根、莖長度因濃度不之差異並比較不同品種間對銅離子的耐受度。

五、秤出向日葵幼苗在吸收銅離子後的重量

- (三)將每株幼苗放到電子秤上並記錄所有的重量，且將數字做出統計並統整結果。
- (四)將統計出來的結果利用圖表的形式呈現，觀察出隨著濃度的增加，向日葵幼苗的重量會出現遞減的現象。

六、觀察銅離子在向日葵幼苗內的累積部位

- (五)在測量長度的結果中發現向日葵幼苗在 150ppm 的時候，生長的情形還算尚可，所以本團隊要用顯微鏡觀察對照組及 150ppm 在這兩種品種中的累積部位。
- (六)利用顯微鏡觀察銅離子累積部位：
利用羅丹明 B(Rhodamine B)配製染劑方法：
取 1 克的羅丹明 B(Rhodamine B)加上 95%的酒精 100cc

1.將做好的切片置於載玻片上，並滴入些許羅丹明 B(Rhodamine B)的染劑，然後放入 70°C 的烘箱中九分鐘
2.在載玻片上滴入硼砂(主要公用為去除多餘的羅丹明 B)
3.在顯微鏡下可以觀察到植物在滴入染劑後，銅離子累積的部位會呈現棕色的情況，其餘則是以粉紅色呈現。



(圖八)羅丹明



(圖九)製作切片過程

- 4.在顯微鏡下以 40 倍率觀察各個部位，並以肉眼方式比較不同品種對銅離子的吸收程度。

(三)顯微鏡觀察結果
以顯微鏡的結果推測向日葵在幼苗時期對銅離子的吸收以向日葵的軸的剖面圖仔細觀察銅離子的累積部位，並將剖面圖進行對照且統合不同品種向日葵對銅離子的吸收。

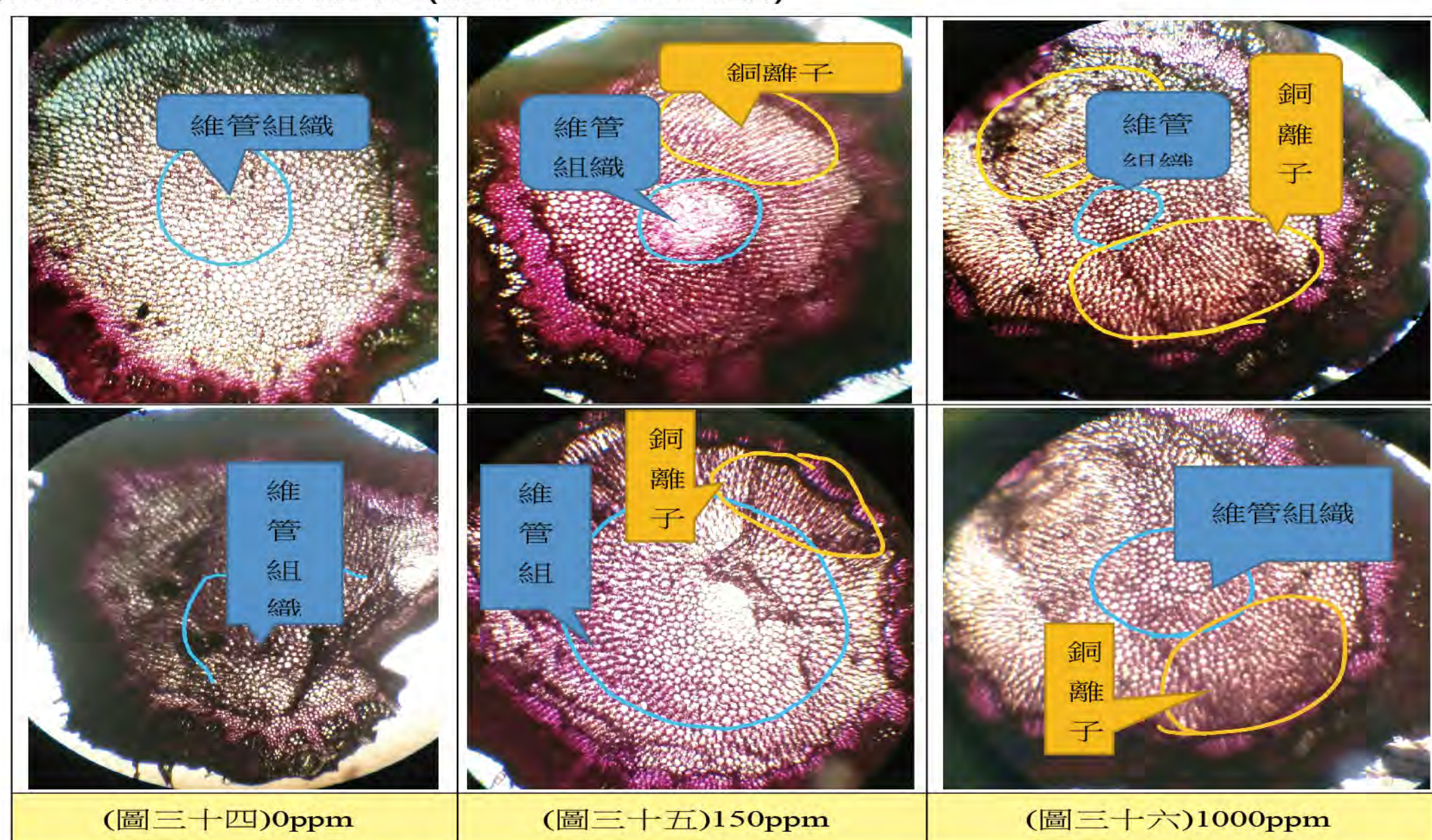


(圖十)顯微拍攝

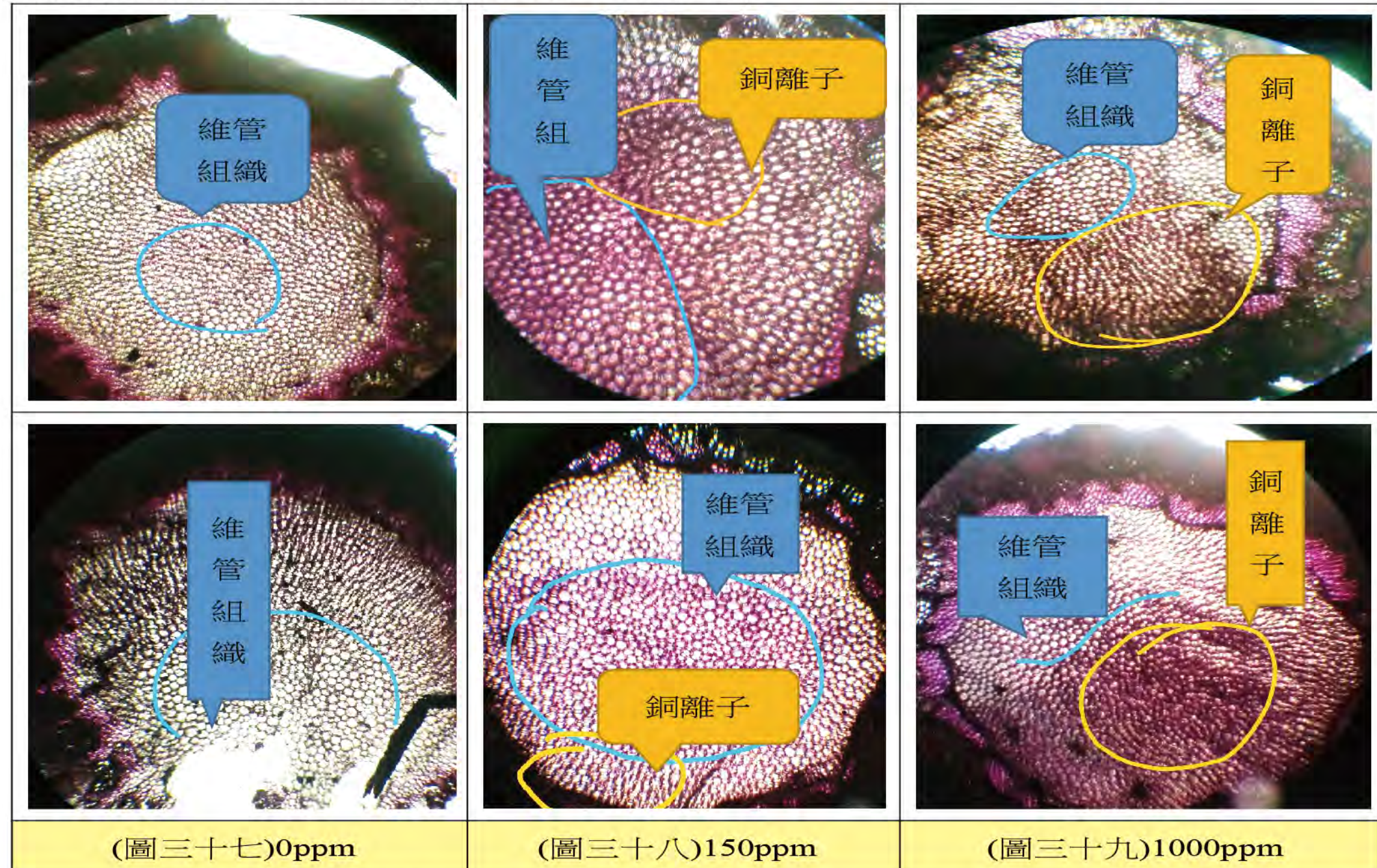
說明:

吸收一個星期後的硫酸銅水溶液成株，不論是橙黑還是橙綠，他們的根部在含銅的地方都呈現了深褐色，並且在越往高的濃度中，褐色越來越深，代表著進入的銅離子越多，但是大部分的銅離子與幼苗時期相同，無法進入卡氏帶，留在皮層繼續累積，僅有部分的銅離子通過了卡氏帶，再繼續莖部的運輸，而這是需要透過消耗能量的方式才能夠進行。

(五)成株時期橙黑莖的剖面圖(物鏡40倍，目鏡2倍)



(六)成株時期橙綠莖的剖面圖(物鏡40倍，目鏡2倍)



通過根部卡氏帶的銅離子，再向上運輸到了莖部，由剖面圖可清楚見到，含銅的地方呈現顯眼的棕色堆積，在橙黑橙綠的體內都一樣，而其累積的地方，是維管束，越往高濃度的剖面圖，含有銅離子的地方呈現的褐色越深。

(七)清除 DPPH 自由基能力測定

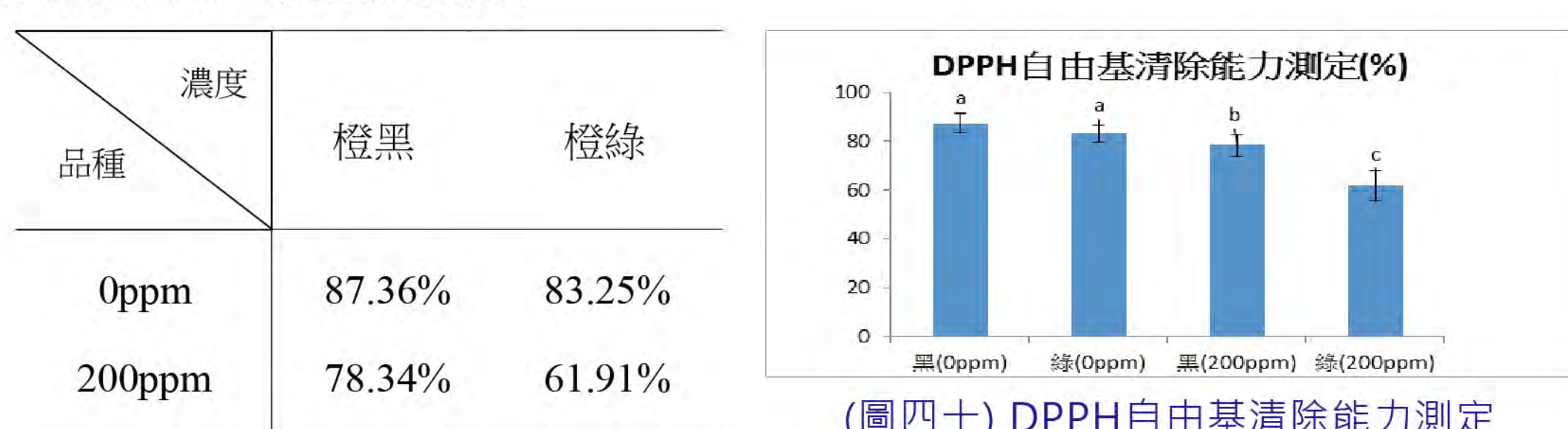


Table with 4 columns: Concentration (濃度), Variety (品種), 0ppm, 200ppm. Rows for orange black (橙黑) and orange green (橙綠).

- 1. 在DPPH自由基抑制率的表現上(表七.)，從0ppm中可看出橙黑的DPPH自由基抑制率約為87.36%，而橙綠的DPPH自由基抑制率約為83.25%，所以橙黑的DPPH自由抑制率比橙綠高；當濃度到了200ppm，橙黑的DPPH自由抑制率78.34% > 橙綠的DPPH自由抑制率61.91%。已知DPPH自由抑制率愈高，其吸光值愈低，可得到橙黑吸光值較橙綠低。
2. 已知此處的吸光值愈低，抗氧化能力愈強。因為橙黑的DPPH自由抑制率高且吸光值低，所以其抗氧化能力比橙綠好。經由(表八)更加確定不同濃度及品種有無差異。

由(圖四十)中，不同品種以及濃度的向日葵，可以看出其 DPPH 清除率有著明顯的變化，尤其是在橙綠 200ppm 時，明顯少了一大截，可見其耐重金屬能力差。

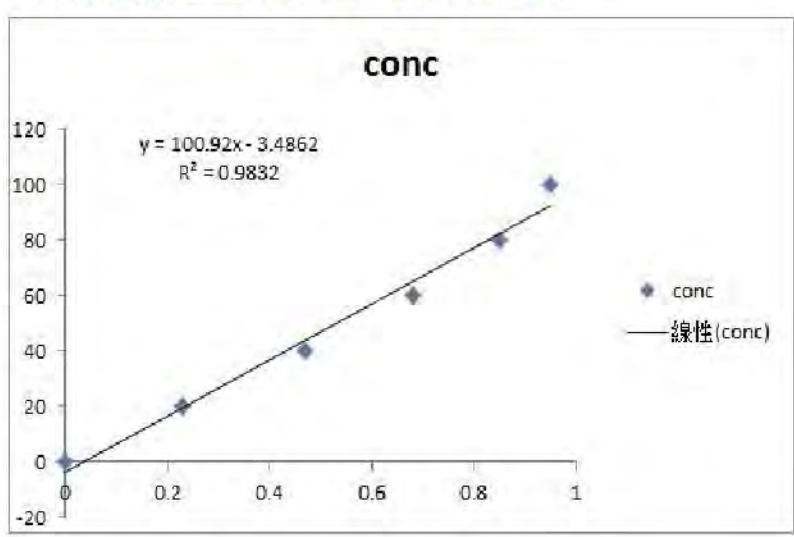
五、下降含量以及下降率

(表九)所示，當橙黑(橙綠的DPPH自由抑制率從0ppm的87.36%(83.25%)到200ppm的78.34%(61.91%)，橙黑的DPPH自由抑制率下降了9.02%，而橙綠的DPPH自由抑制率下降了21.34%(皆四捨五入)。得橙黑的DPPH自由抑制率仍高於橙綠。

Table 9: DPPH free radical inhibition rate and decrease rate. Columns: Variety/Concentration, DPPH free radical inhibition rate, Decrease content, Decrease rate.

(表九)DPPH自由抑制率與下降率

六、總酚量化合物分析



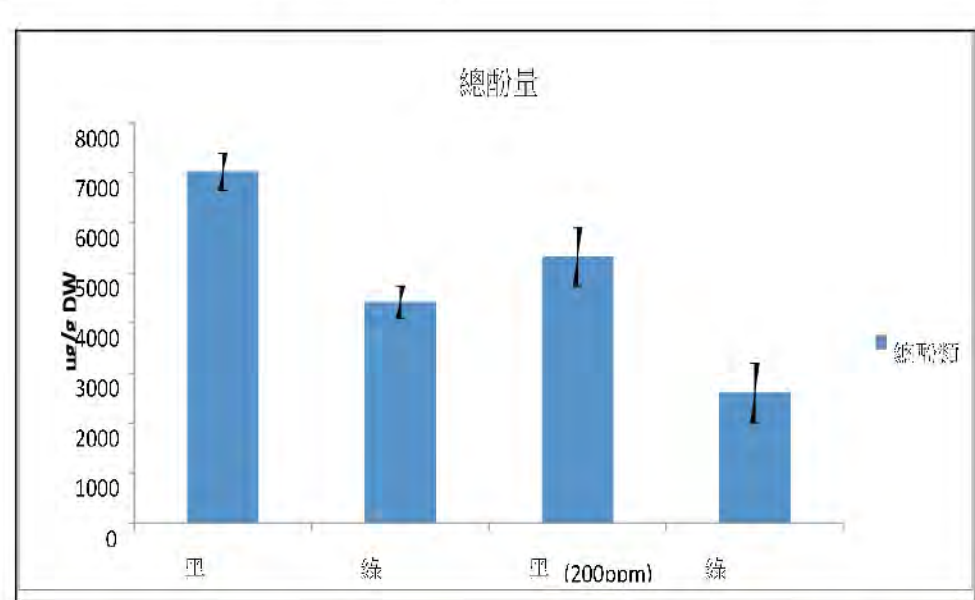
如(圖四十一)、(表十)所示，可以從吸光值換算成總酚量的濃度。當吸光值愈高，向日葵的總酚量化合物也跟著變多，意味著抗氧化力較高。

Table 10: Conversion of absorbance to concentration. Columns: ABS, conc, 0, 0.23, 0.47, 0.68, 0.85, 0.95.

(表十)由吸光值轉換成濃度

七、探討總酚類與降解含量、降解率：如表十一所示

Table 11: Total phenol content and degradation rate. Columns: Variety (Concentration), Total phenol content (µg/gDW), Error value (µg/gDW), Degradation content, Degradation rate.



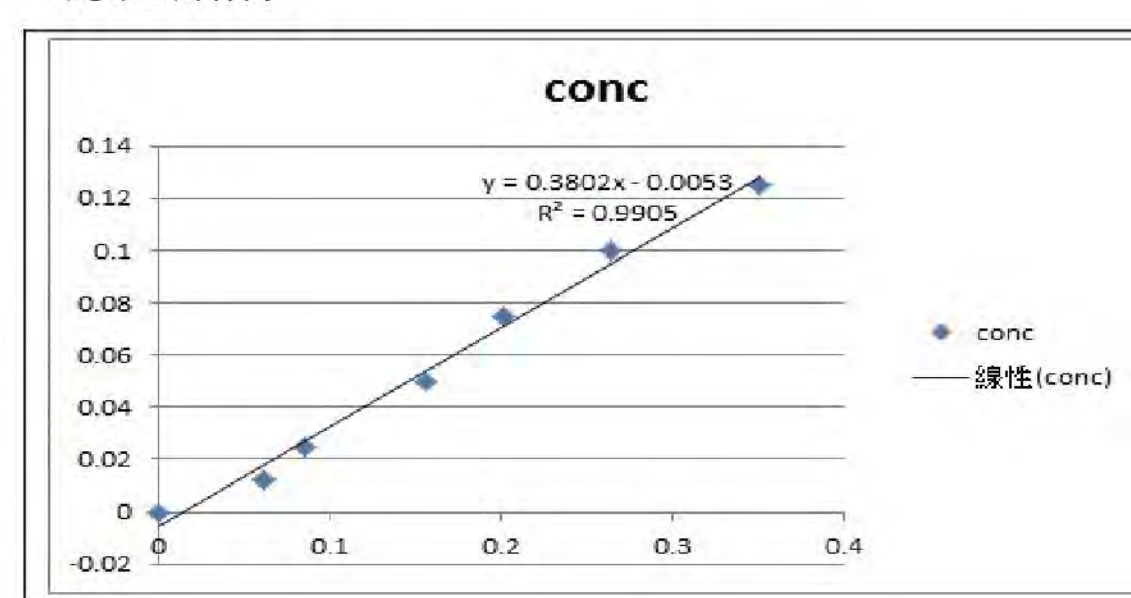
(圖四十二)不同品種以及濃度向日葵之總酚量

- 1. 如(表十一)及(圖四十二)，橙黑的總酚量化合物在200ppm下減少了1698.629(µg/gDW)(24.19%)；而橙綠的總酚量化合物在200ppm下減少 1817.279(µg/g-DW)(41.15%)可見橙黑的總酚量化合物減少的量小於橙綠，可得知橙黑的總酚量化合物比橙綠多。
2. 已知總酚量愈多，抗氧化能力愈好，可得橙黑因總酚量化合物較橙綠多，橙黑的抗氧化能力就會比橙綠更佳。

八、可溶性蛋白質含量測定

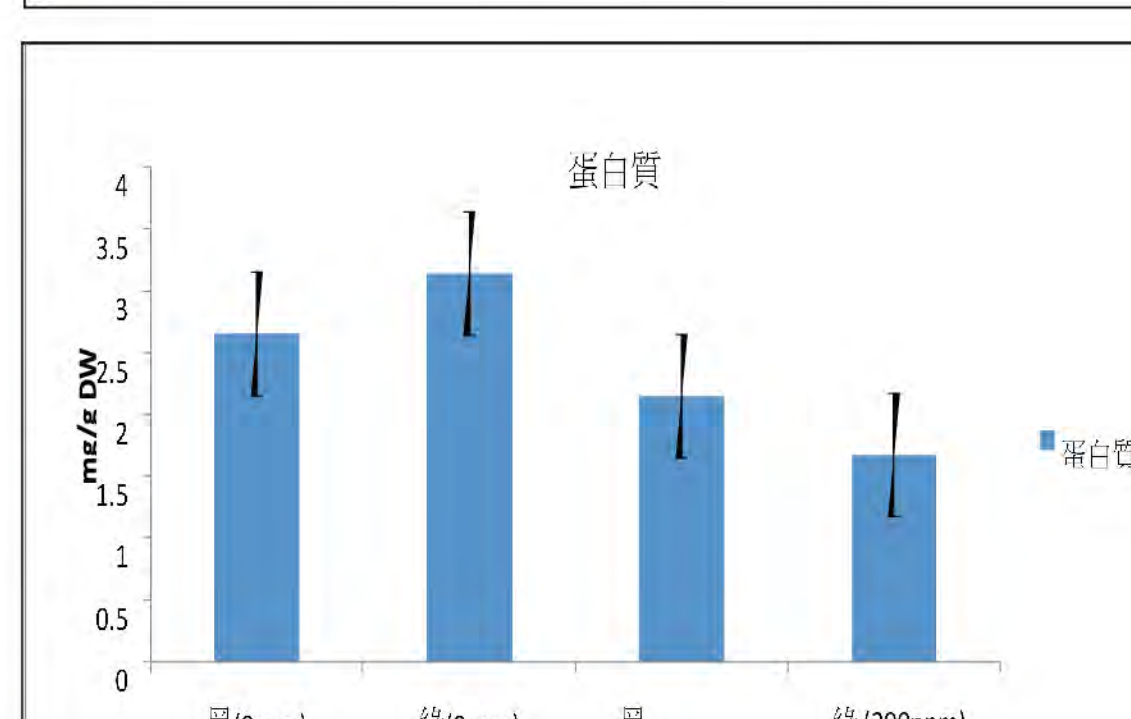
Table with 5 columns: Variety (Concentration), Protein content (mg/g DW), Error value (mg/g DW), Decrease content, Decrease rate.

- 1. 由(表十二)看出，橙黑(橙綠)的對照組可溶性蛋白質含量約為2.650810(3.136604)(mg/g DW)，可見橙綠幼苗本身的可溶性蛋白質含量較橙黑多。
2. 在200ppm的部分，橙黑(橙綠)相較對照組的可溶性蛋白質下降率為19.03%(46.71%)，得到橙綠因為較橙黑易受銅離子影響，所以橙綠的可溶性蛋白質含量下降的比橙黑多。
3. 已知植物的可溶性蛋白質愈高，其抗氧化性愈佳，所以可得到橙黑品種的抗氧化性比橙綠來的好之結論。



由(圖四十三)可看出，可溶性蛋白質濃度(縱軸)與吸光值(橫軸)呈正相關。因為可溶性蛋白質對植物來說是好的物質，所以量愈多對向日葵會有更多的好處。而此處可溶性蛋白質愈多，代表吸光值愈高且抗氧化能力較佳

(圖四十三)可溶性蛋白質吸光值與濃度線性關係



- 1. 由(圖四十四)中，可以清楚由長條圖看到橙黑、橙綠的差異，0ppm的狀態下，橙綠的可溶性蛋白質含量高於橙黑，但可在200ppm時明顯看出橙綠可溶性蛋白質含量下降幅度遠大於橙黑品種。
2. 從橙黑可溶性蛋白質含量高於橙綠的現象便可看出：橙黑的抗氧化能力比橙綠高，衍伸出來的說法為，高抗氧化能力的橙黑較能在有銅離子的環境下生長。

(圖四十四)不同品種以及濃度向日葵的可溶性蛋白質質量

九、下降率與可溶性蛋白質、總酚量化合物、DPPH自由基抑制率之關係

Table with 4 columns: Decrease rate, DPPH inhibition rate, Total phenols, Total protein.

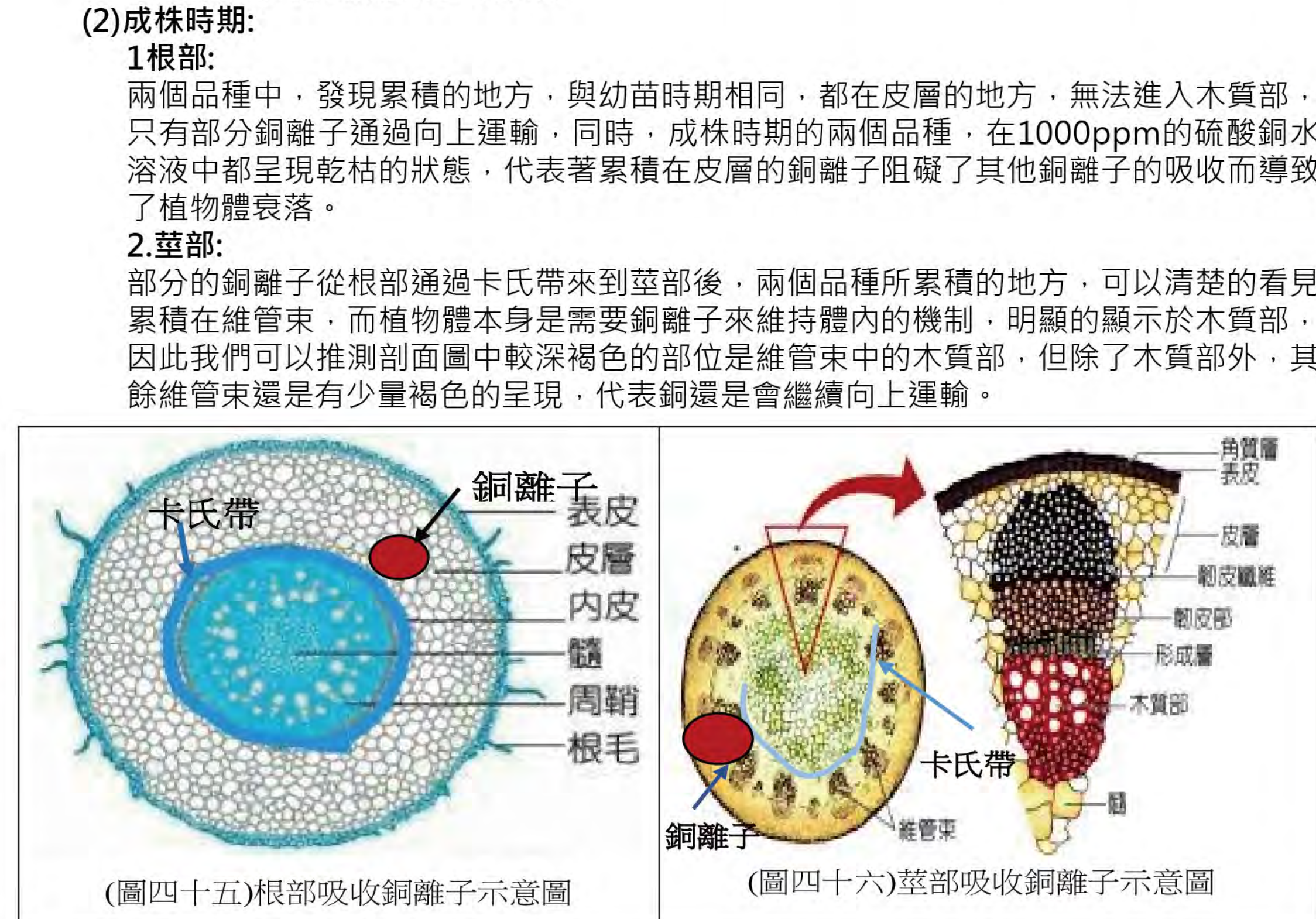
(表十三)下降率針對不同測量的主題整理(0ppm與200ppm下)

根據(表十三):

- 1. DPPH抑制率的下降率
橙黑可溶性蛋白質含量的下降率約19.03%；橙綠可溶性蛋白質含量的下降率約46.71%。可得，橙黑可溶性蛋白質含量在銅離子環境下高於橙綠。

陸、討論

- 一、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率
在實驗的過程中，一開始本團隊發現了兩種向日葵種子20ppm、40ppm、60ppm及80ppm的時候沒有出現發芽率的抑制效果，進而又做了第二次100ppm、150ppm、200ppm、300ppm的角色，發現硫酸銅有殺菌的功用。於是實驗後來主要以第二次的濃度探討兩種向日葵的生長抑制率。
二、探討橙黑及橙綠向日葵幼苗的生長抑制率
在兩種向日葵生長抑制率的數據中可觀察到了隨著濃度的增加，兩種向日葵的莖和根的長度與濃度呈負相關。在根長上，大部分橙綠比橙黑長；在莖長上特別以150和200ppm兩品種差異較大，結合DPPH抑制率等指標結合推測橙黑消耗較多原以用來生長的能量去產生酶來對抗自由基。
三、秤出向日葵種子在吸收銅離子後的重量
以第二次的濃度逐項進行秤量，並看出向日葵幼苗於吸收銅離子後會伴隨濃度的增加而在重量上產生遞減的現象，因此，幼苗在吸收愈高的銅離子濃度後，生長情況愈不佳並反映在幼苗本體重量上。
四、觀察銅離子在向日葵幼苗體內的累積部位
(1)幼苗時期：
在進行兩種不同品種在軸的比較，發現累積的部位都在根部的皮層無法進入木質部，我們推論植物吸收銅離子能力低，然而生長在高濃度之下因為皮層大量累積銅離子阻礙其他元素之吸收造成植物生長衰弱。
(2)成株時期：
1.根部：
兩個品種中，發現累積的地方，與幼苗時期相同，都在皮層的地方，無法進入木質部，只有部分銅離子通過向上運輸，同時，成株時期的兩個品種，在1000ppm的硫酸銅水溶液中都呈現乾枯的狀態，代表著累積在皮層的銅離子阻礙了其他銅離子的吸收而導致了植物體衰落。
2.莖部：
部分的銅離子從根部通過卡氏帶來到了莖部後，兩個品種所累積的地方，可以清楚的看見累積在維管束，而植物體本身是需要銅離子來維持體內的機制，明顯的顯示於木質部，因此我們可以推測剖面圖中較深褐色的部位是維管束中的木質部，但除了木質部外，其餘維管束還是有少量褐色的呈現，代表銅還是會繼續向上運輸。



- 五、清除 DPPH 自由基能力測定
本團隊透過此實驗間接測量出橙綠及橙黑的抗氧化性，而橙綠抗氧化性的結果比橙黑高，故推測出橙黑吸收銅離子效果較好的原因和抗氧化性強度有關。除此以外，在不同品種之比較之下也發現橙綠之 DPPH 清除能力以 30.56% 而橙黑只降 10.32%。推測橙黑比橙綠耐銅離子。
六、測量總酚量
總酚類為一種抗氧化物，可以阻擋自由基破壞植物，抗氧化物質高，吸收重金屬就越多，橙黑比起橙綠的抗氧化物顯然較多，因此可看出橙黑比起橙綠較能在有銅離子的環境下生長。
七、可溶性蛋白質含量測定
植物的可溶性蛋白質含量愈多，代表其抗氧化能力愈強，而在本實驗的檢定中測得橙黑在有銅離子的環境下，可溶性蛋白質含量高於橙綠，表示橙黑的抗氧化能力大於橙綠，所以橙黑比橙綠較能生存在有銅離子的環境中。

柒、結論

- 一、向日葵種子在0~300ppm的硫酸銅水溶液濃度中，發芽率還是維持著高達 100%。經查資料後發現，硫酸銅水溶液具有強效的殺菌功效，可能是導致第一批與第二批的實驗結果相同的原因。
二、硫酸銅的濃度在到達一定的程度後便能夠抑制向日葵生長，隨著濃度的增減，其根、莖長度都有著明顯的減短，因此可以推測其生長抑制率與濃度成正比。
三、在高濃度的硫酸銅中，向日葵的重量比較輕，隨著濃度遞增而重量遞減。
四、銅離子進入幼苗時期的向日葵後，大部分堵塞在韌皮部外的卡氏帶，無法藉由木質部往上運輸，任何物質儘管是水，都無法自由通過，必須藉由細胞上的特殊管道進入細胞；成株時期的向日葵，根部吸收銅離子，與幼苗時期一樣，大部分被堵塞於卡氏帶外的皮層，進而導致植物死亡，而少部分通過的銅離子，在進入莖部後累積在維管束，因此表示銅離子還是會繼續往上運輸。
五、橙黑的DPPH自由抑制率下降程度較橙綠小，得橙黑的DPPH自由抑制率仍高於橙綠。發現橙黑DPPH自由抑制率高於橙綠，得到橙黑吸光值比橙綠低，且抗氧化能力比橙綠好。
六、橙黑的總酚量化合物減少的量小於橙綠，可得知橙黑的總酚量化合物比橙綠多；得知橙黑的總酚量比橙綠多，所以得到橙黑的抗氧化能力比橙綠好。
七、橙綠因為較橙黑易受銅離子影響，所以橙綠的可溶性蛋白質含量下降的比橙黑多。植物的可溶性蛋白質愈高，其抗氧化性愈佳，所以可得到橙黑品種的抗氧化性比橙綠來的好。

捌、參考資料

- 一、Andrenelli, M., Maienza, A., Genesio, L., Miglietta, F., Pellegrini, S., Vaccari, F., & Vignozzi, N. (2016) copper influence on germination and growth of sunflower (helianthus annuus)
二、方博政(2015)。探討生物碳緩銅離子對綠豆生長的毒性。國立清華大學生物資訊與結構生物研究所碩士論文。
三、林易著、陳俊傑、楊純明(2013)。簡介農地之重金屬汙染及其復育。農業試驗所技術服務第 93 期。
四、汪志威(2014)。阿拉伯芥於過量銅離子下與結球白菜於不同鎳離子濃度生長環境之代謝物分析。臺北市立大學應用物理暨化學系碩士論文。
五、劉玉山、張永達(2009)。植物對重金屬的反應。科技部高瞻自然科學教學資源平台 - 科學Online。

七、清除 DPPH 自由基能力測定試驗步驟：

- 使用酵素結合免疫分析法(ELISA)96well(最大容量為 300μL)進行試驗
- (一)1g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)研磨。
- (二)取 100μL 樣本+200μL 濃度為 0.1mM DPPH-ethanol 溶液。
- (三)30分鐘後以酵素結合免疫分析法(ELISA) 測定位於波長 517nm 之吸光值 DPPH 自由基抑制率=(1-實驗組吸收值/對照組吸收值)x100。



(圖十一)酵素分析光譜儀

八、總酚量化合物分析試驗步驟：

- (一)1g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)
- (二)過濾後取上清液
- (三)再加上 0.1 mL 福林試劑(folin reagent)及 0.2 mL 碳酸鈉(Na₂CO₃)
- (四)加上 8.7 mL 的水混合均勻
- (五)沸水三分鐘後冷卻
- (六)用 660nm 的波長分析，標準品以 100ppm 的咖啡酸(caffeic acid)



九、可溶性蛋白含量測定分為試劑 A 及試劑 B：

- (七)試劑 A：
2g 碳酸鈉(Na₂CO₃)+1 mL 2%酒石酸銨鉀(Potassium Tartrate)(K₂C₄H₄O₆)+1 mL 1% 硫酸銅(CuSO₄·4.5H₂O)+10 mL 1N 氫氧化鈉(NaOH)+90 mL H₂O
- (八)試劑 B：福林試劑(folin reagent)：H₂O 以 1：1 混合試驗步驟：
(一)0.5g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)
(二)過濾後取上清液
(三)0.1 mL 上清液+1.9 mL H₂O
(四)加 5 mL 試劑 A 混合均勻並靜置十分鐘
(五)加 0.5 mL 試劑 B 混合均勻並靜置十分鐘
(六)用 600nm 波長分析，標準品以 0.2mg/ mL 牛血清白蛋白(BSA)
(六)用 660nm 的波長分析，標準品以 100ppm 的咖啡酸(caffeic acid)



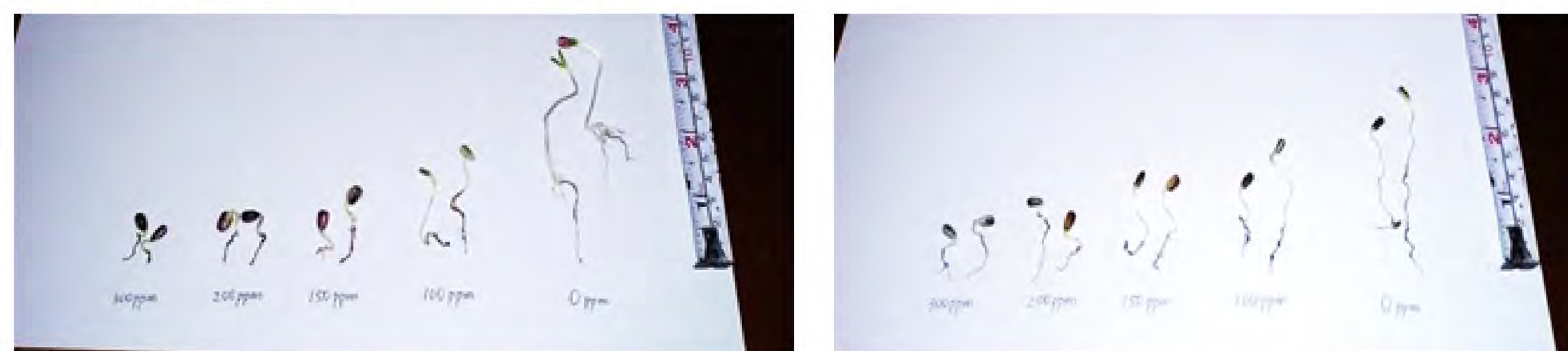
伍、研究結果

一、探討橙黑及橙綠向日葵吸收銅離子時的發芽率



(圖十二)觀察種子發芽

二、探討橙黑及橙綠向日葵的生長抑制率

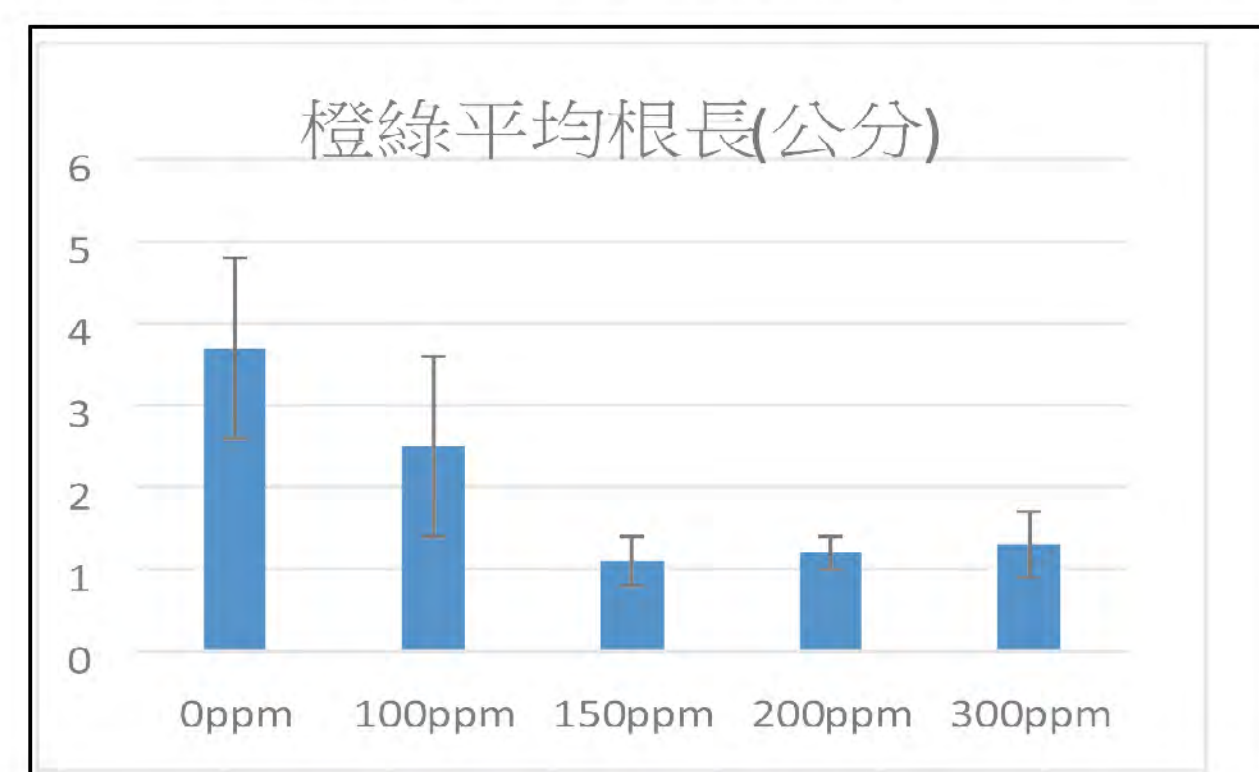


(圖十三)橙黑的根、莖部測量

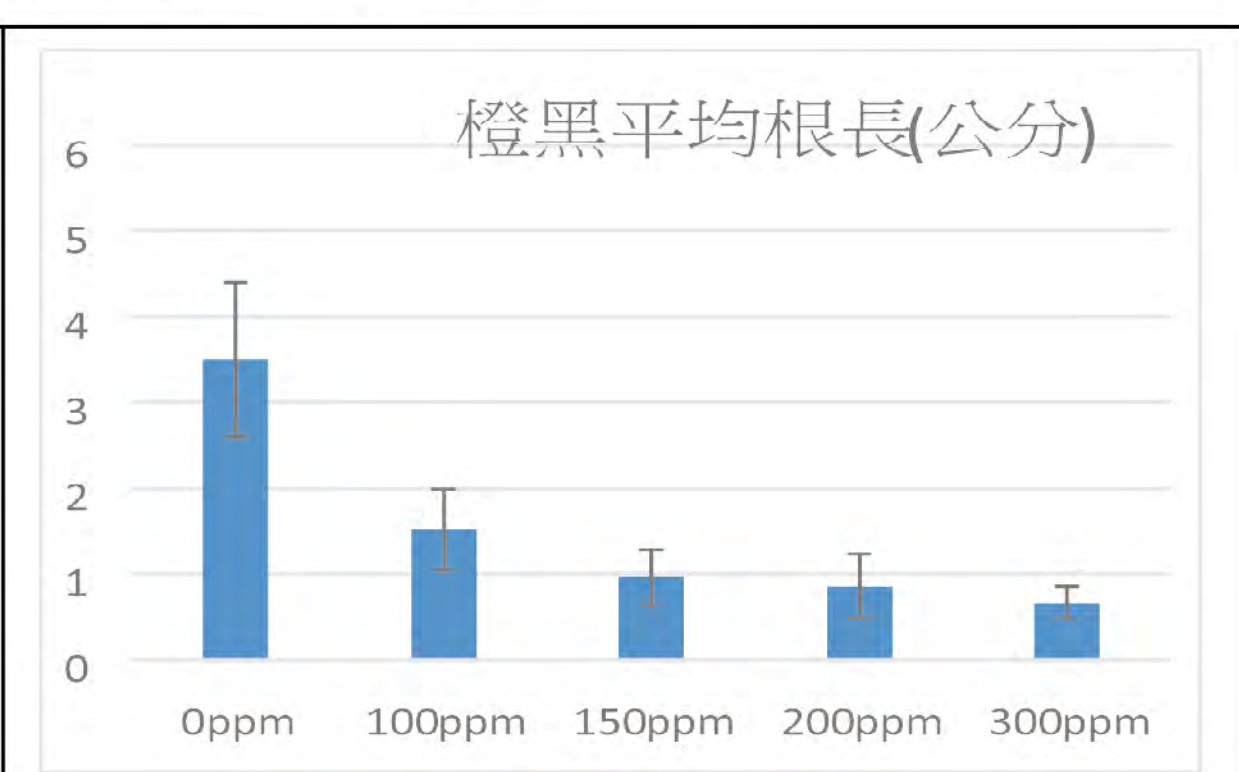


(圖十四)橙綠的根、莖部測量

- 於兩星期後進行觀察，由橙黑(圖十三)及橙綠(圖十四)的比較圖中可看出：隨著濃度的增加，植株的根、莖部都有變短趨勢，尤其是與對照組相較下，更顯出其差別。
- 得出一個結論：銅離子的濃度與橙綠、橙黑植株的根、莖長呈現反比關係。



(圖十五)橙綠平均根長

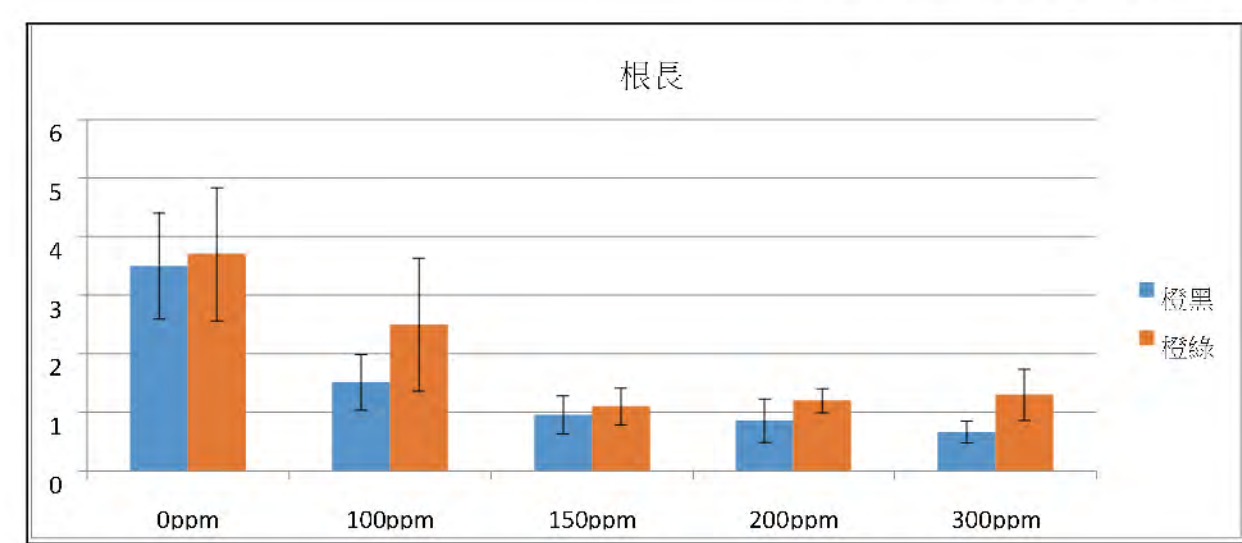


(圖十六)橙黑平均根長

由(圖十五)、(圖十六)的平均根長長條圖中(已將數據取平均值並刪去誤差最大之數據)明顯觀察出：橙綠0ppm(3.70cm)與其他四組濃度的根長差異約為0.20cm~2.40cm。橙黑0ppm與其他四組濃度的根長差異約為1.99cm~2.83cm皆呈現大幅縮短的現象且橙黑根部影響較明顯。

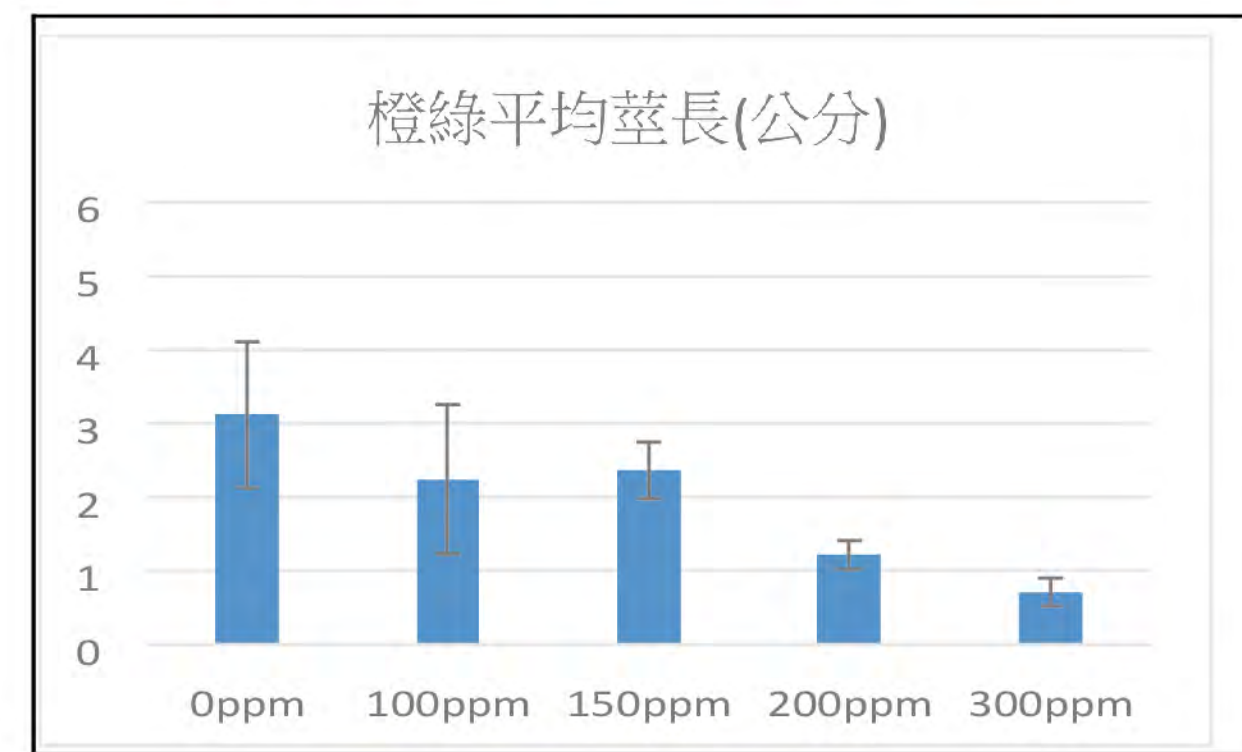
品種 \ 濃度	0ppm	100ppm	150ppm	200ppm	300ppm
橙黑	3.50cm	1.51cm	0.96cm	0.86cm	0.67cm
橙綠	3.70cm	2.50cm	1.10cm	1.20cm	1.30cm

表五、向日葵在不同濃度時的平均根長

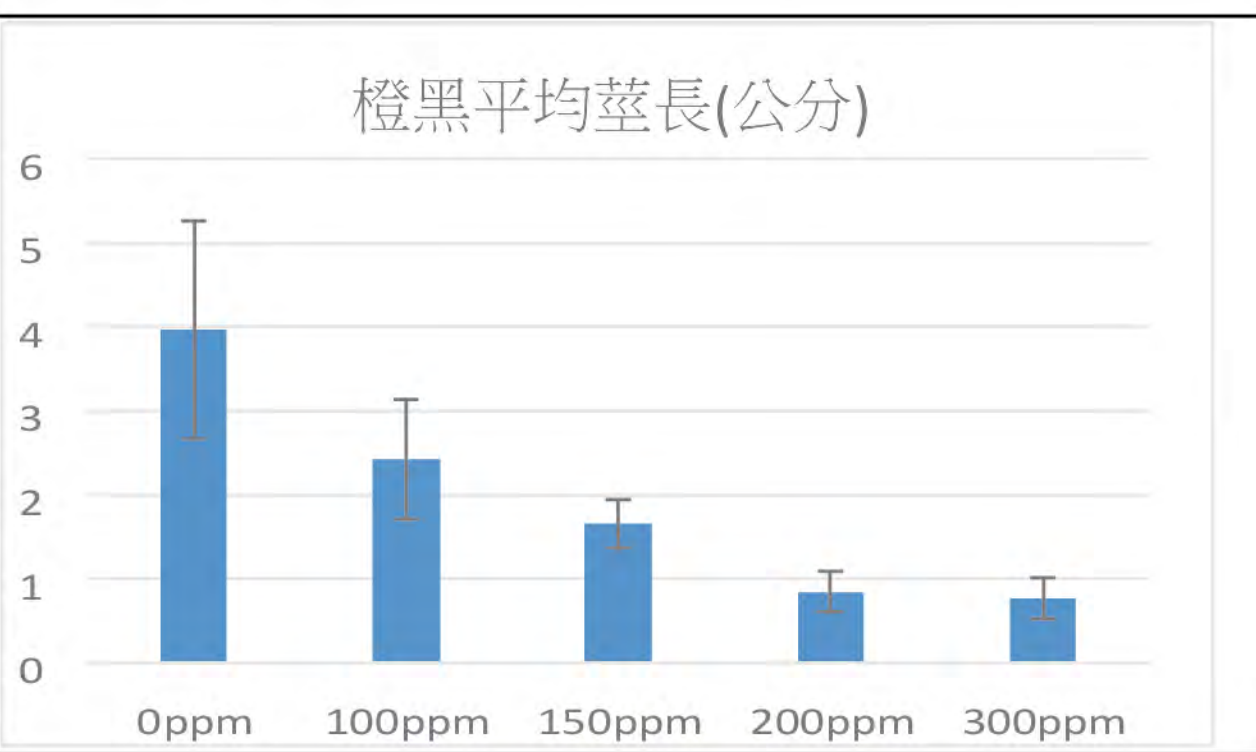


(圖十七)橙黑以及橙綠兩種品種下不同濃度的根長比較

由(圖十七)，更可證明：無論在哪个濃度下，橙綠根部生長狀況較橙黑良好，且橙綠根部受銅離子影響的幅度比橙黑還明顯，推論橙綠根部可能較橙黑還不受銅離子的影響，根部生長抑制狀況較不明顯。



(圖十八)橙綠平均莖長

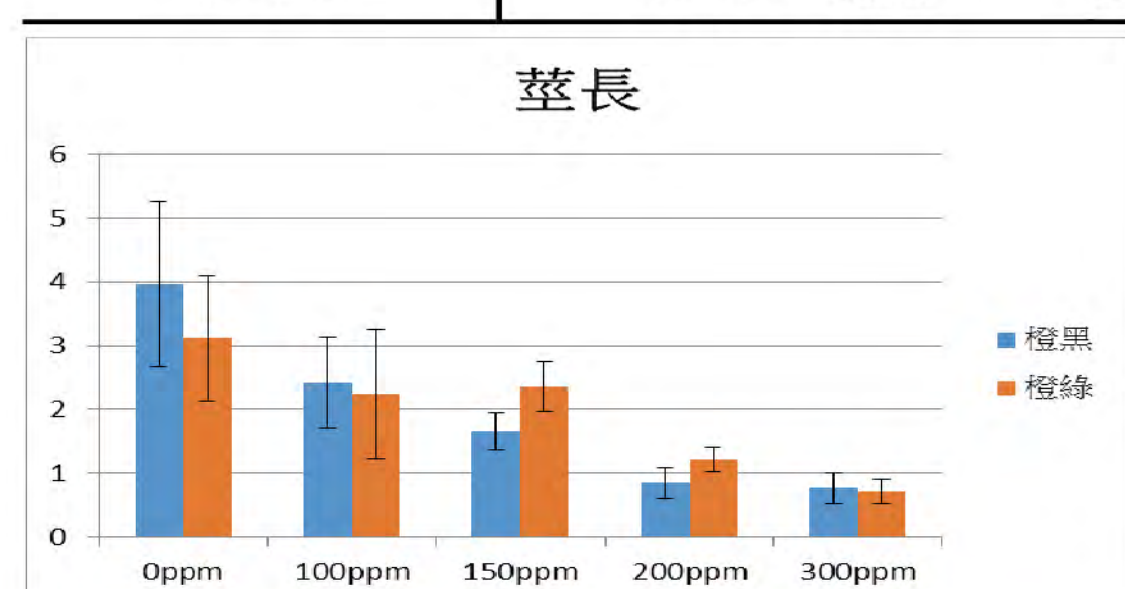


(圖十九)橙黑平均莖長

由(圖十八)以及(圖十九)的平均莖長長條圖中(已將數據取平均值並刪去誤差最大之數據)觀察出：橙綠0ppm與其他四種濃度的莖長差異約為1.54cm~3.20cm。橙黑0ppm與其他四種濃度的莖長差異約為0.88cm~2.41cm和根部情形相同皆呈現大幅縮短的現象，而橙黑莖部影響仍然較為明顯。

表六、橙黑橙綠的莖於不同濃度的長度

品種 \ 濃度	0ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	300 ppm
橙黑	3.97 cm	2.43 cm	1.66 cm	0.85 cm	0.71 cm
橙綠	3.12 cm	2.24 cm	2.36 cm	1.21 cm	0.77 cm

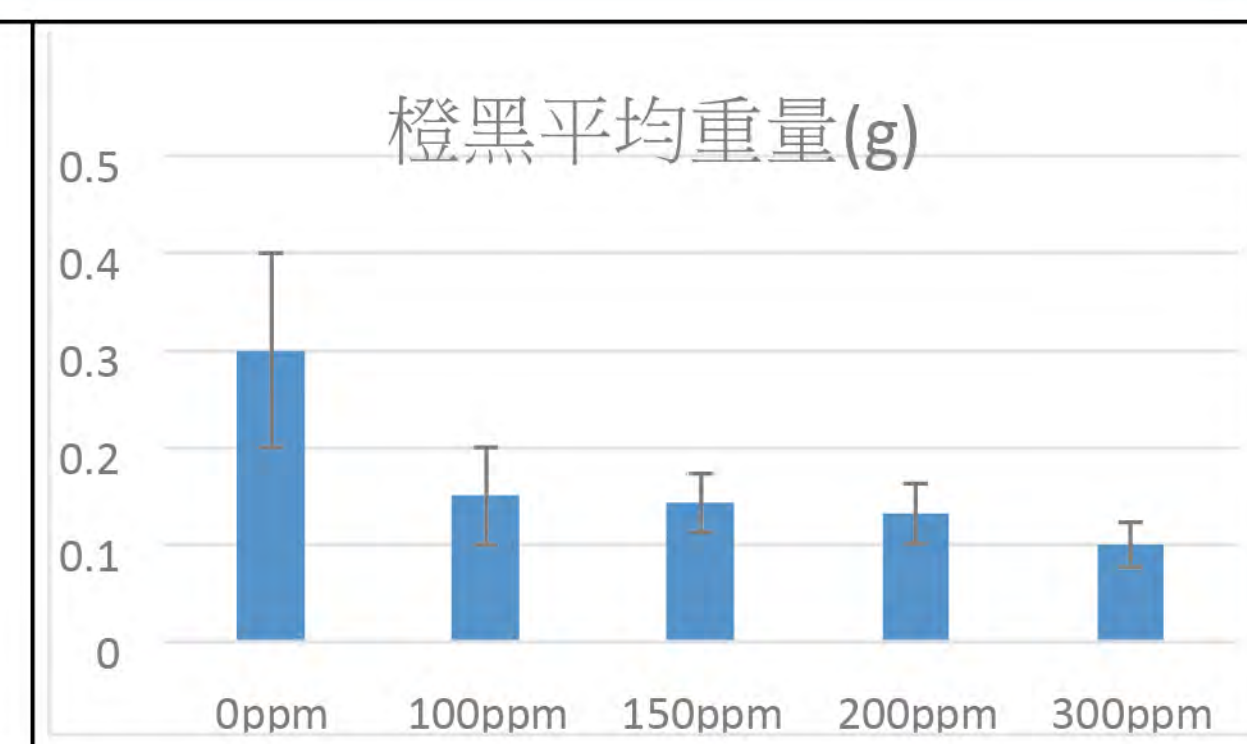
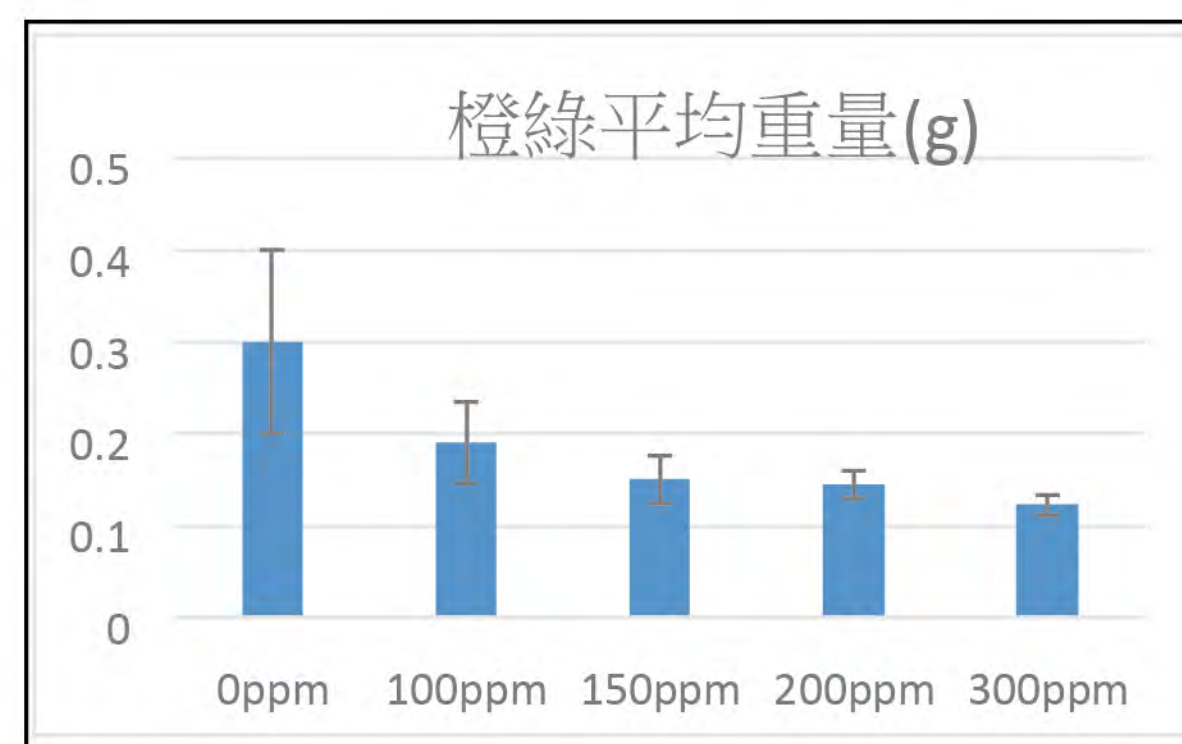


(圖二十)橙黑橙綠兩個品種不同濃度的長度比較

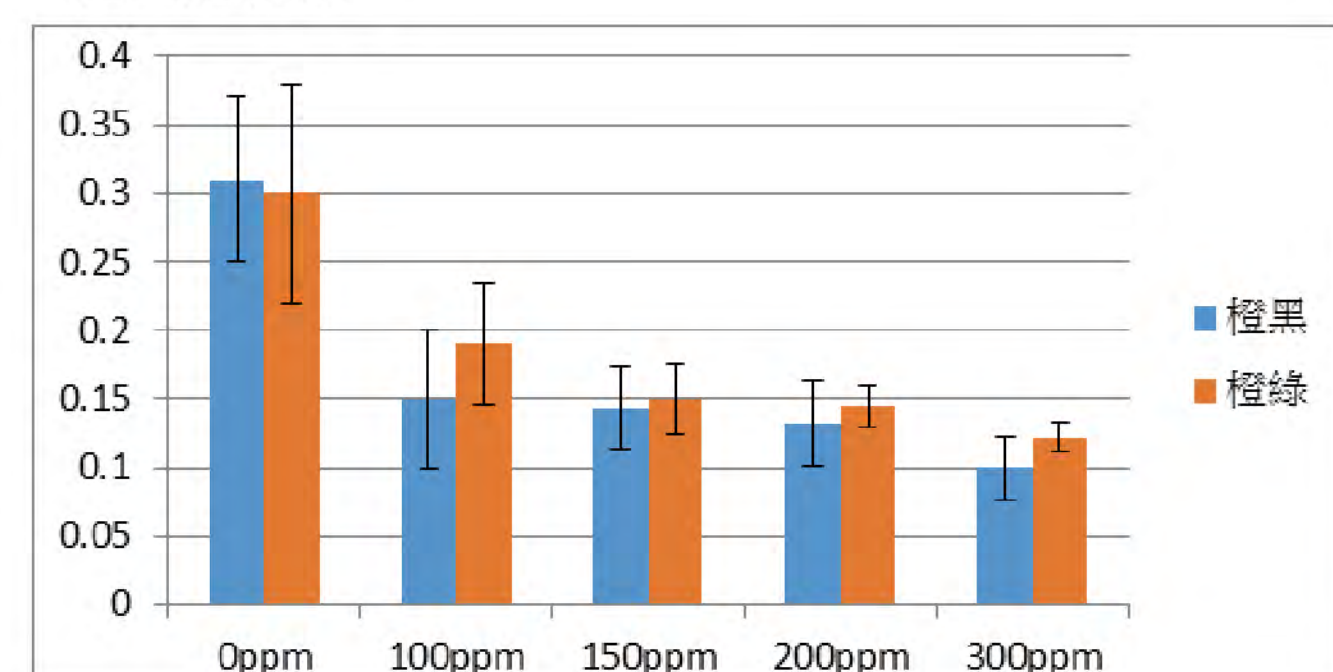
由(圖二十)清楚看出：無論在哪个濃度下，橙黑幼苗的平均莖長皆比橙綠長。隨著濃度增加，橙黑莖長遞減的幅度大於橙綠，兩者差異尤其在150ppm(橙黑:2.36cm 橙綠:1.66cm)與200ppm(橙黑:1.21cm 橙綠:0.85cm)之間最為明顯，橙黑的平均莖長縮短了1.15cm，而橙綠的平均莖長則是縮短0.81cm。

三、向日葵幼苗在吸收銅離子後的重量

- 使用酵素結合免疫分析法(ELISA)96well(最大容量為 300μL)進行試驗
- (一)1g 樣本+5 mL 乙酸緩衝劑(acetate buffer)研磨。
- (二)取 100μL 樣本+200μL 濃度為 0.1mM DPPH-ethanol 溶液。
- (三)30分鐘後以酵素結合免疫分析法(ELISA) 測定位於波長 517nm 之吸光值 DPPH 自由基抑制率=(1-實驗組吸收值/對照組吸收值)x100。



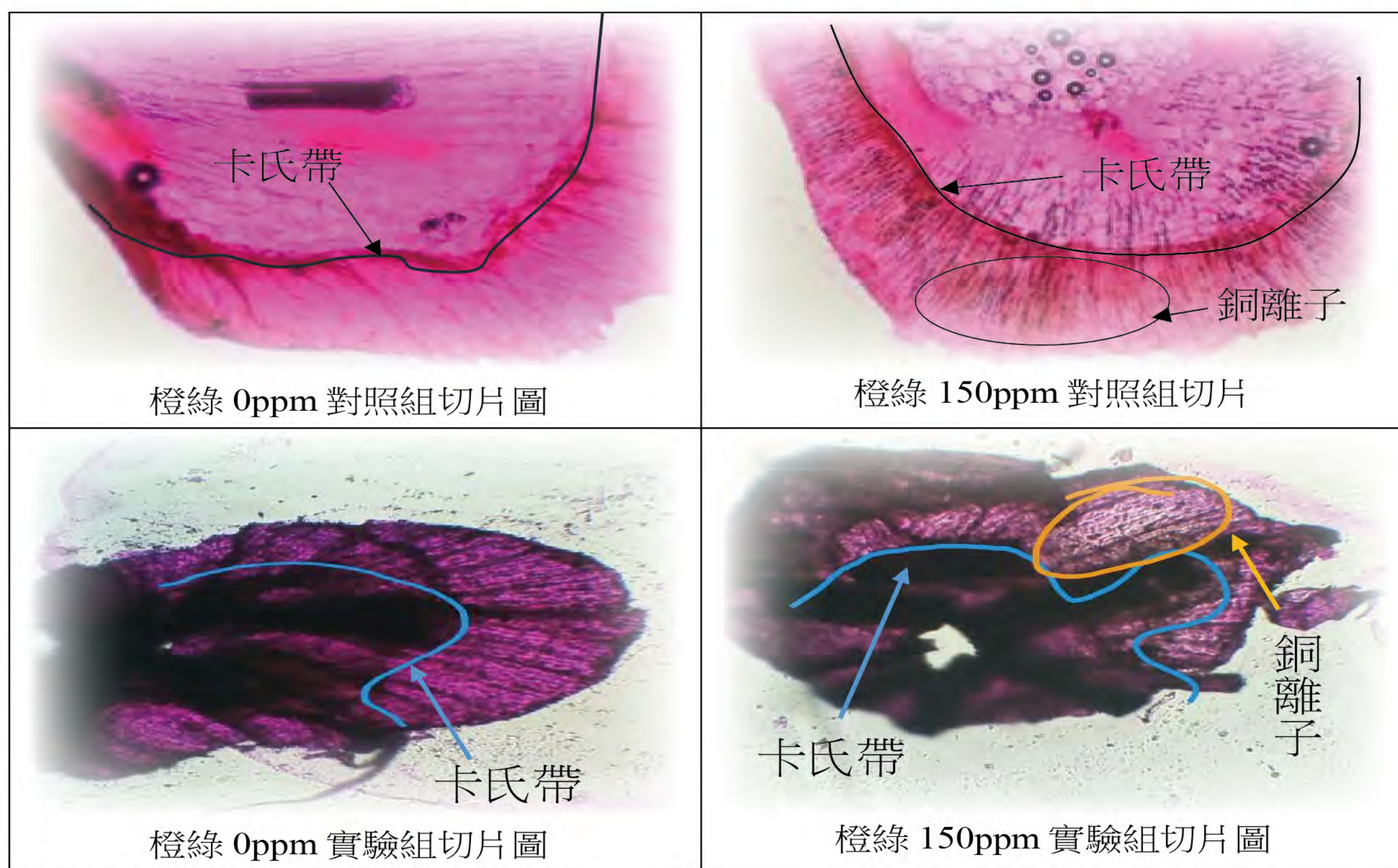
- 在重量上的變化，向日葵的成長與濃度成反比。
- 橙黑及橙綠在0ppm時重量位在範圍0.2~0.4g，這是每種植株在基因上的生長差異。
- 以0ppm及100ppm相較，兩種品種重量急遽下降，這是因為植物在體抗過程中需要能量，原本供應向日葵生長的能量被轉用來合成酵素。
- 到了150、200、300ppm重量下降的程度變緩，此為植物能用的能量以消耗完剩下單純的植物體所產生的結果。



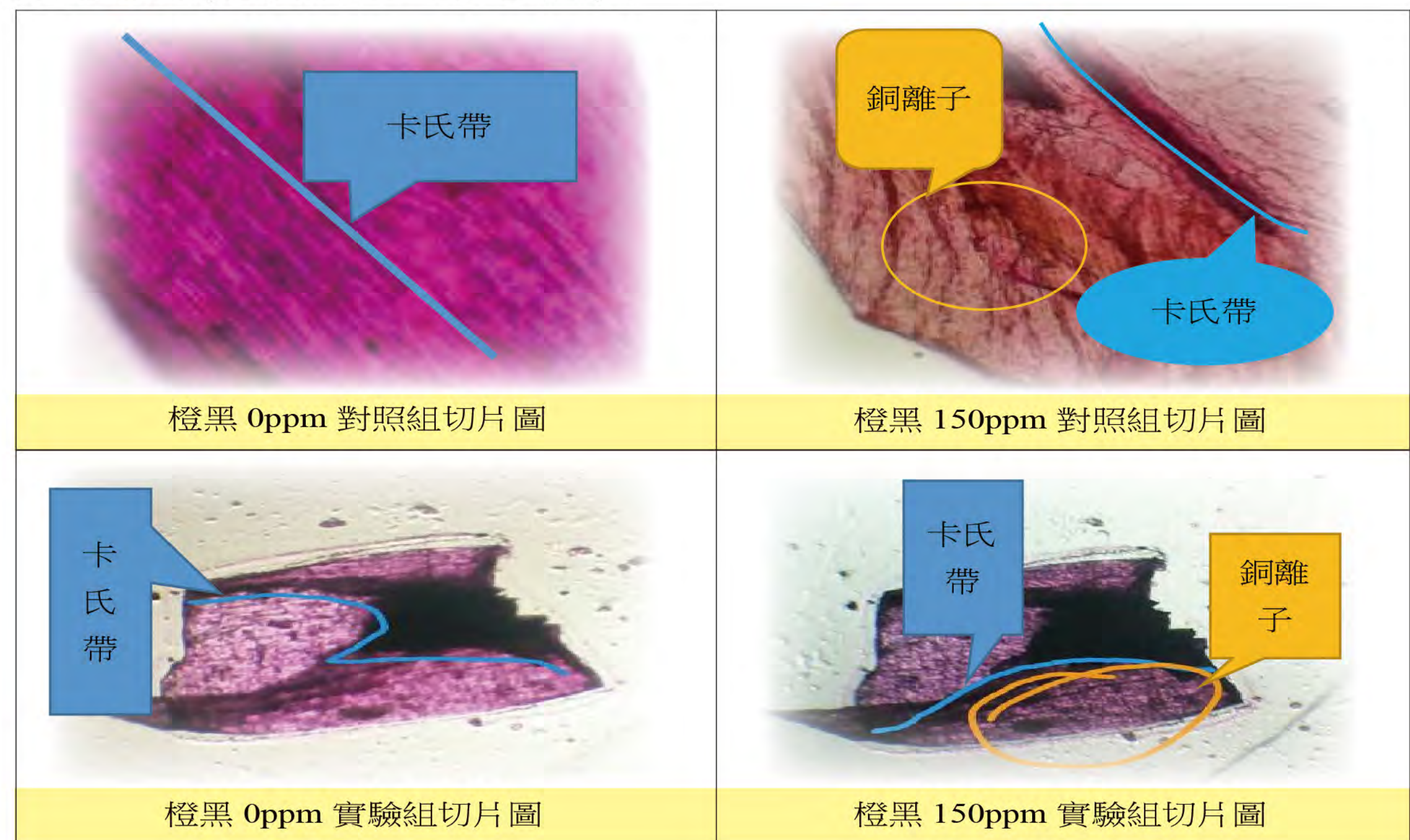
由(圖二十三)的0ppm和100ppm，可得知橙黑平均重量的下降量—0.15g，和橙綠—0.10g，而作為推測成黑消耗較多的能量在合成酵素上的根據，且可以結合後面的化學劑量在做進一步的解釋。

四、向日葵幼

(一) 幼苗時期的橙綠(物鏡 40 倍率、目鏡 2 倍率)：



(二) 幼苗時期橙黑(物鏡 40 倍率、目鏡 2 倍率)：

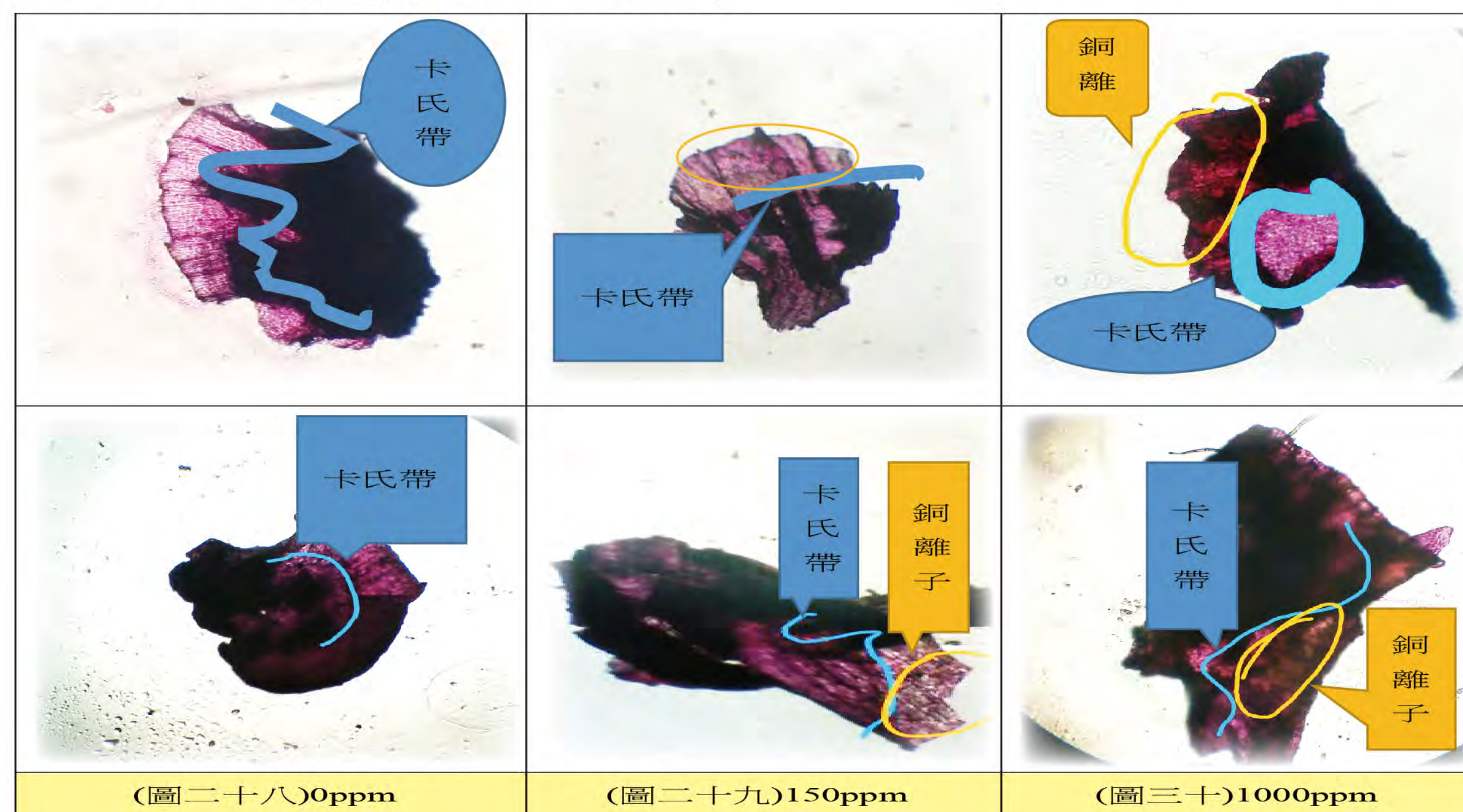


(圖二十五)0ppm切片圖

(圖二十六)150ppm切片圖

於吸收一星期的硫酸銅水溶液後，橙黑及橙綠向日葵含 150ppm 硫酸銅水溶液含銅離子與純水之切片圖比較，明顯的，含有銅離子的幼苗在染色後，呈現了深棕色的情況，並且發現累積的部位經維管束吸收後都滯留在皮層且無法進入維管束，而擋住大部分銅離子向上運輸的正是卡氏帶，大部分植物如向日葵，其根部具有卡氏帶，其功用是阻擋物質進出細胞，包刮水，主要是防止物質倒流出植物體，而其剛好也阻擋了大部分銅離子進入木質部，使其滯留於皮層。

(三) 成株時期橙黑根的剖面圖(物鏡10倍，目鏡4倍率)

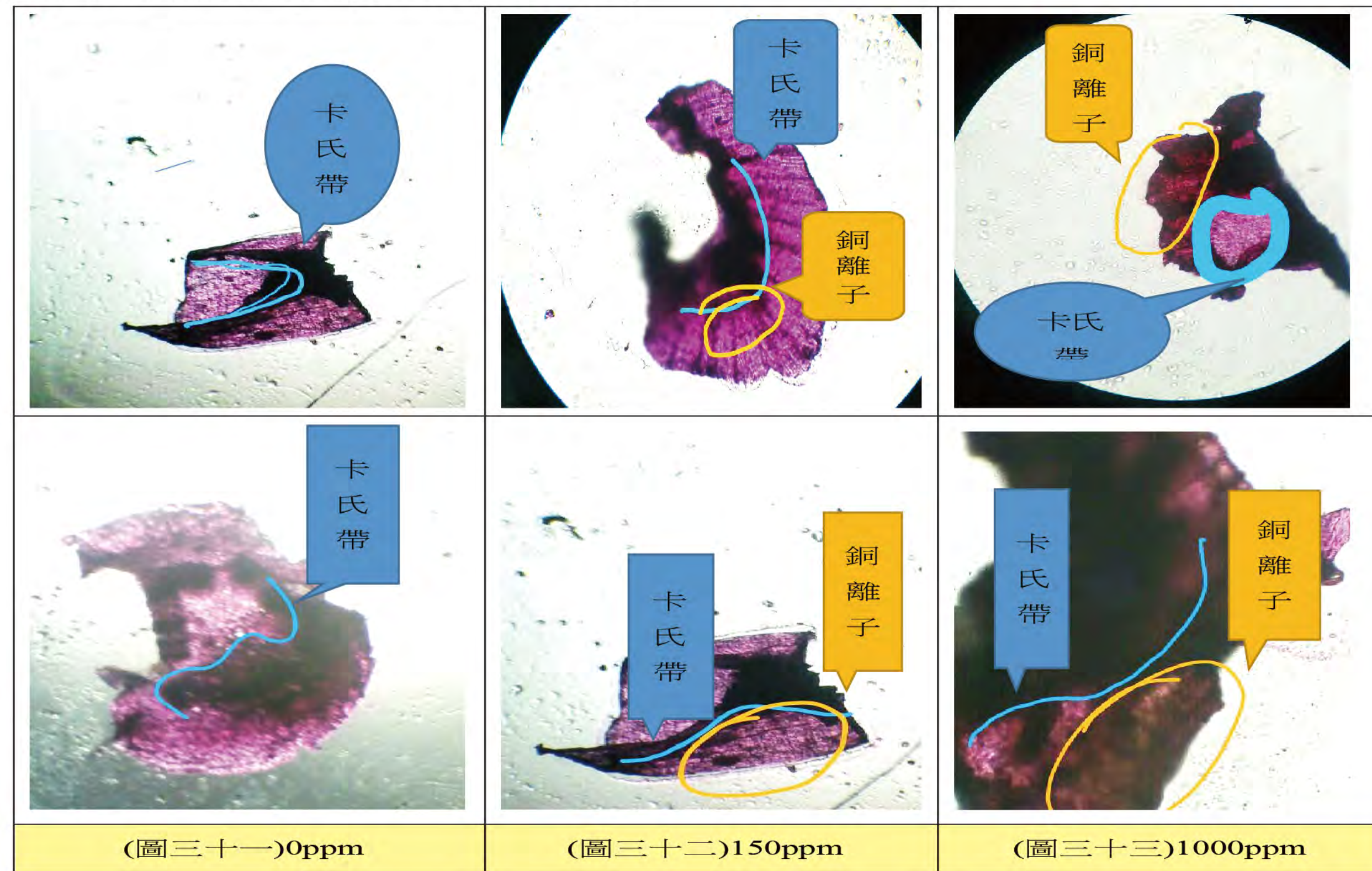


(圖二十八)0ppm

(圖二十九)150ppm

(圖三十)1000ppm

(四) 成株時期橙綠根的剖面圖(物鏡10倍，目鏡4倍)



(圖三十一)0ppm

(圖三十二)150ppm

(圖三十三)1000ppm