

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060004
參展科別 植物學
作品名稱 亞硝酸態氮作為葉菜氮源的可行性研究
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 國立臺中女子高級中學

指導教師 黃裕銘、陳玉珊

作者姓名 許雅涵、簡郁岫

關鍵字 亞硝酸態氮、硝酸態氮、葉菜

作者簡介



我是許雅涵，來自一個開明信任的家庭，使我在學習過程中能夠自由發揮與親近大自然。我喜歡動手做實驗，親身證明某些理論，也參加過國家人才培訓營接受密集的化學課程與實驗-於國立清華大學。我喜歡二胡、琵琶、書法、寫作，也常看各類小說，培養多元的思考。從小就是問題寶寶的我，總從動手解決生活中問題得到樂趣。



我是簡郁岫。我的興趣是閱讀與各種實作，但最大的嗜好是觀察周遭出現的各種現象，並探究它們發生的原因。平時我喜歡看科學人、國家地理雜誌等刊物，對科學有濃厚的興趣，也希望自己能對這個領域有更多接觸。期許參加這次國際科展能做出些許貢獻，並讓我離科學的領域更進一步。

摘要

氧化氮(NO)近來被發現是動植物的抗病機制之一，植物吸收的硝酸態氮需先還原成亞硝酸態氮才可能形成 NO 及還原成銨。本研究目的在了解葉菜作物能否利用亞硝酸態氮作為氮源。研究亞硝酸態氮對小白菜、油菜、青江菜、針葉萵苣、及菠菜的發芽和硝酸態氮的差異，進而水耕研究對小白菜及菠菜生長及吸收速率的影響。研究結果顯示亞硝酸態氮對小白菜、油菜及青江菜芽期的生長皆優於硝酸態氮；針葉萵苣芽期亞硝酸態氮處理與硝酸態氮處理差異不顯著；菠菜則顯示亞硝酸態氮顯著抑制芽期及栽培期生長，甚至芽長低於只加水處理。水耕研究小白菜吸收亞硝酸態氮的比率高於硝酸態氮，菠菜相反。提高亞硝酸態氮比率，降低小白菜陽離子鉀及鈣吸收，提高氯離子及硫酸根等陰離子吸收。幼苗時期提供高濃度亞硝酸態氮，成菜吸收氮重增加，這是值得更深入研究的主題。

Abstract

Recently the defence-related function of NO in animal and plant has been intensively studied. Most leaf vegetables uptake the nitrate as the main nitrogen source, which should be reduced into nitrite then may subsequently be reduced to NO or into ammonium form. The aim of this study was on the feasibility of nitrite used as nitrogen source for leaf vegetables. If well received, perhaps it may change the concentration of NO, and in turn improve the plant resistance to plant diseases and increase food safety. The first series of experiments were conducted to evaluate the effect of nitrite on the growth of five vegetable seedlings. Results showed that compared to the nitrate, the nitrite significantly increased the seedling growth of three cultivars of leaf vegetables including Pak choi (*Brassica campestris* L. Chinese Group), while having the same effect as nitrate on the growth of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.), however, significantly inhibited the growth of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Second series of experiment were conducted in hydroponic system to grow Pak choi and Spinach with partial substitution of nitrate with nitrite nitrogen source. Results showed that the uptake rate of nitrite by Pak choi was higher than nitrate, while reverse effect was found in Spinach. The higher rate of nitrate substituted with nitrite, the lower cations including K^+ and Ca^{2+} , and higher anions including Cl^- and SO_4^{2-} uptaken by Pak choi were found. The third series of experiment showed that if provided with nitrite in budding stage, plants would receive more nitrogen source compared to which is provided with water or nitrate. From this study so far the evidences illustrated that different vegetable species have different potential in using nitrite as nitrogen source. Therefore, it is worth to have further study on the disease resistance function of using nitrite for the plants which can use nitrite as nitrogen source.

一、前言

(一). 研究背景

1.NO 於植物體內扮演重要角色

氮是影響植物生長重要的元素，其不僅可合成植物需要的胺基酸、也是葉綠素的主成分之一，近年許多研究指出:植物體內的氮轉換機制中，一氧化氮對植物扮演了極重要的角色，例如:NO 調節植物防禦機制的訊息放大作用 (Delledonne, 2005)，調節植物細胞壁的木質化(Ferrer and Ros Barcelo, 1999)，控制保衛細胞中的鐵離子途徑(Garcia-Mata and Lamattina, 2002)。由於一氧化氮於植物體內，是由亞硝酸轉換而成的，因此我們感到好奇 :亞硝酸根於植物體中濃度的改變，是否會因此影響植物的生長甚或防禦、免疫作用?

2.NO₂於生物學中好壞評價參半

我們有興趣探討亞硝酸根之濃度改變對植物的影響，為了進一步了解其可能結果，我們做了關於亞硝酸根的查詢。

亞硝酸根對生物的重要性:其有益效應主要來自於轉化為氧化氮(NO)。包括免疫 : (酸化亞硝酸根可有效殺死許多一般皮膚病原菌(Weller *et al.*, 1998))、內皮細胞功能(在餵食高膽固醇小老鼠研究中補充亞硝酸根減輕其微血管發炎及內皮細胞的功能不良作用(Stokes *et al.*, 2009))、血壓(提供亞硝酸根也會降低血壓，氧化氮是由血管產生的(Lundberg and Weitzberg, 2005; Moncada *et al.*, 1988))。

亞硝酸根的毒性:亞硝酸根於傳統上用於殺死豬肉肉毒桿菌孢子。1970 年代多數研究指出其與癌症之相關性(德國的 Spiegelhalder (1976)和美國的 Tannenbaum (1976)指出理論上唾液中的亞硝酸根在酸化下產生的 N₂O₃ 會和食品中二級胺反應產生亞硝胺, Newberne (1979)發表老鼠餵食亞硝酸根造成淋巴瘤，雖然這些證據在流行病理學相對薄弱，卻也使我們質疑亞硝酸根是否能被植物吸收利用。

(二)研究動機

一氧化氮在植物體內扮演重要角色，我們由氮轉換機制得知其由亞硝酸根轉變而來，於是想探討亞硝酸根濃度改變對植物生長的影響。進一步搜尋 NO₂ 對植物之影響結果，得知部分文獻指出亞硝酸態氮對植物之毒害如下:

1. Oke (1966) 在 Nature 發表:亞硝酸態氮在低濃度對植物生長可能就有毒性。
2. Bingham *et al.* (1954)發現在 pH 4.0、5.0 及 6.0 時亞硝酸態氮對植物的毒害和其未解離型態有關，也就是亞硝酸。
3. Lahbers *et al.* (1988)利用水耕玉米幼苗，利用硝酸根及亞硝酸根誘發研究，發現硝酸態氮較亞硝酸態氮可以快速誘發根及葉的亞硝酸還原酵素(NiR) mRNA

但是 Galva¹ and Ferná¹ndez (2001) 文章整理光合作用的真核細胞其硝酸態氮的同化作用顯示需經過兩個脈，一為細胞膜，硝酸態氮進入原生質體中還原成亞硝酸態氮，亞硝酸態氮通過葉綠體脈在葉綠體中還原為銨(Crawford, 1995)。我們認為:在氮轉換機制中，硝酸根必須先經還原酶轉為亞硝酸根，再轉為銨離子(NH₄⁺)方能被轉化成植體內的有機氮，而此還原過程是需能的，由能量守恆定理，我們推測若是植物能直接利用亞硝酸根，便能將更多能量投入在生長上，對植物生長產生助益，為何反而會產生毒害呢?是否只是惡性環境抑制了土壤中亞硝酸根氧化作用，使亞硝酸根濃度上升，讓表像看起來像是亞硝酸根引起的毒害呢?或是不同植物間存在差異呢? 我們抱持相當大的好奇心，因此著手進行研究。

(三). 研究目的

由於一氧化氮能調節植物體重要機制，我們希望藉此研究能找出亞硝酸根的可利用性及其對植物生長的助益，更能將結果推廣至不同種類植物，找到更利於植物生長的優勢環境，提升農業產值及作物生產之品質。

主要研究目標:

- 1.探討 NO₂是否為植物可利用的氮源

- 2.探討 NO₂之吸收對不同種類植物生長情況的影響
- 3.探討植物吸收 NO₂的特性是否在幼苗時期及成熟期有階段式的差異
- 4.萌芽時期氮源的供給不同，是否影響其成菜吸收之氮源形式
- 5.觀察葉菜在不同比例之亞硝酸根/總氮源下之生長情形

二、研究方法或過程

(一)實驗設備及器材

1.植物來源

使用今年度採收之種子，經離子水洗淨後進行育苗及移植作業

2.研究及種植場地

(1)種植場地:陽光充足、且架設黑網遮蔭之地方

(2)研究場所:中興大學實驗室

3.實驗儀器

(1)離子層析儀(IC)，廠牌/型號: Metrohm 883

(2)桌上型酸鹼度計，廠牌/型號: Cyber Scan pH510

(3)離心機，廠牌/型號: Hermle Z83K

(4)烘箱，廠牌/型號: Cheng Hwel ST-120A

(5)粉碎機，廠牌/型號: 榮聰 RT-02B

(6)葉綠素指數測量計

4.實驗器材

(1)育苗盤：35x26.5x7 cm

(2)保麗龍箱：43x37x12 cm，加箱蓋

(3)培養皿

(4)海綿：2.5x2.5x2.5 cm

5. 養液基本配方

表一的養液配方，使用時取原液 1 ml 稀釋 1000 倍，即為水耕養液配方。

表一、養液基本配方(林，2012)

(1) 配方 1，藍字部分表可取代為 NO_2^-

化學藥品	劑量(g L ⁻¹)	化學藥品	劑量(g L ⁻¹)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236	K_2SO_4	86.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147	KCl	49.6
NH_4NO_3	125	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	365
EDTA-Fe	13.1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.08
$(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.006	H_3BO_3	2.86
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.20	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.88
KH_2PO_4	45.2		

表二、養液調整配方

(2) 配方 2(因為亞硝酸銨不常見，將配方 NH_4NO_3 換為 KNO_3 ，方便以 KNO_2 取代，使可更動為 NO_2^- 之比例上升)

化學藥品	劑量(g L ⁻¹)	化學藥品	劑量(g L ⁻¹)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	365
KNO_3	151.5	EDTA-Fe	13.1
NH_4Cl	36.17	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.08
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	47.7	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2
KH_2PO_4	45.2	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.88
K_2SO_4	14.5	H_3BO_3	2.86
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147	$(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.006

(二) 流程圖(圖一)



(三)實驗前置作業

為了得知 NO_2 在空氣中的氧化速率，以方便計算添加 NO_2 的養液中實際以 NO_2 的形式被植物吸收的氮源有多少，因此進行實驗來判斷是否有將 NO_2 在空氣中的氧化速率計入實驗數據的必要性。實驗方法為將 KNO_2 水溶液配好原始液並採樣測量其 NO_2 濃度，接著將之曝露於空氣中，待數日後採樣測量殘餘養液之 NO_2 濃度及體積，以推知 NO_2 在空氣中的氧化速率。本實驗分為原始液 10^{-3}M 及 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 兩種濃度，方便考慮濃度對氧化速率的影響。

(四) NO_2 對各類植物萌芽影響

- 1.目的:得知植物是否能以 NO_2 作為氮源，且不同種植物之間是否有差異。
- 2.植物選擇:選用喜硝酸態氮植物如小白菜、青江菜、油菜及菠菜，及喜銨植物如針葉萵苣
- 3.養液選擇:水、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 硝酸鉀溶液、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 亞硝酸鉀溶液。
- 4.實驗方式:將濾紙置於培養皿中，置入 20 顆種子並分組添加少量不同養液，成長至適當高度時量測。
- 5.觀測項目:發芽率、莖長、根長

(五) NO_2 對植物成菜生長之影響，及其吸收程度

- 1.目的:觀察植株在不同成長期對氮源的偏好，因此以成菜來進行實驗。
- 2.植物選擇:選幼苗時期喜 NO_2 之小白菜及被 NO_2 抑制生長的菠菜
- 3.試驗處理中亞硝酸態氮及硝酸態氮的配方比例:

幼時以水育苗，成菜分為 0、50 及 100 % $\text{NO}_3\text{-N}$ 三種處理。進行配方一(亞硝酸根濃度低，如表一)，在總氮量固定情況下，將養液配方中的 NO_3 部分置換為 NO_2 。未更動配方者記錄為 100% NO_3 ，若其中有 50%的 NO_3 -被 NO_2 -取代，則 NO_3 佔 50%，記錄為 NO_3 50%。配方 2(如表二)則大幅提升可取代為 NO_2 之比例， NO_3 被取代的計算方式同配方一，將成菜之養液濃度分為: NO_3 100%、50%、0%(以上標示皆為實驗代號，不代表實際濃度)。菠菜則採用配方 2，比較高濃度亞硝酸根及硝酸根環境的生長情形。表三養液實測資料顯示

配方 1 亞硝酸態氮占總硝態氮($\text{NO}_2\text{-N}/(\text{NO}_2\text{-N}+\text{NO}_3\text{-N})$)比率配方 1 最高 45.8%，配方 2 最高 80.3%。

表三、小白菜水耕液配方 1 及 2 檢測其亞硝酸態及硝酸態氮的濃度

處理代號	配方 1			配方 2		
	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}/(\text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N})$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}/(\text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N})$
	mg L^{-1}		%	mg L^{-1}		%
0% NO_3	17.78	21	45.8	25.62	6.27	80.3
50% NO_3	7.08	35.67	42.	13.48	18.33	42.4
100% NO	0.178	47.16	0.4	0.42	35.77	1.2

4. 種苗來源: 自行種植。

5. 測量: 前期於移植第二週採集部分植株測量植株根、莖長並測量植株與養液之離子濃度，第三週再採集其餘部分植株進行相同測量。後期則將第二次測量時間改為移植後第四週，以使各處理間的差異較明顯。

(六) 萌芽時養液不同是否使植物產生耐受性或對某一氮源的偏好

1. 目的: 藉此實驗觀察萌芽時期吸收養分的不同，是否使成熟植物產生耐受性或對某一氮源的偏好。

2. 植物選擇: 小白菜

3. 配方比例調整:

(1) 幼苗使用: 水、硝酸鉀溶液、亞硝酸鉀溶液。分為 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 及 10^{-3}M 兩種濃度。將水(A 處理)、亞硝酸根養液(B 處理)、硝酸根養液(C 處理)分別移植到 3 種不同成菜養液中。

(2) 成菜養液調整方式:

同成菜實驗，分為 0% NO_3 、50% NO_3 及 100% NO_3 三種處理。進行配方一(亞硝酸根濃度低，如表一)，在總氮量固定情況下，將養液配方中的 NO_3 部分置換為 NO_2 。未更動配方者記錄為 100% NO_3 ，若其中有 50% 的 NO_3 被 NO_2 取代，則 NO_3 佔 50%，記錄

為 NO₃⁻50%。配方 2(如表二)則大幅提升可取代為 NO₂⁻之比例，NO₃⁻被取代的計算方式同配方一，將成菜之養液濃度分為: NO₃⁻100%、50%、0%(以上標示皆為實驗代號，不代表實際濃度)。移植後共 9 盆，處理參見下表

育苗處理代號	硝態氮比率代號(實際濃度表三)		
	0NO ₃	50NO ₃	100NO ₃
A(以水育苗)	0A	50A	100A
B(以 NO ₂ ⁻ 育苗)	0B	50B	100B
C(以 NO ₃ ⁻ 育苗)	0C	50C	100C

4.實驗方法:在發芽階段分別以不同溶液育苗，在幼苗長出第 2 片真葉時，將此 3 組各取部分移植至三種不同 NO₂⁻濃度之養液

5.觀測項目:每日測量株高，於移植固定天數後取部分植株測量根、株高並測量植株與養液之離子濃度。

三、研究結果與討論

(一)NO₂⁻氧化速率的測定

在本實驗中得知 NO₂⁻溶液暴露在空氣中，其氧化速率極小，例如在 10⁻³M 之 KNO₂ 溶液中其氧化速率約為 2.4*10⁻⁷M/4 天，由於此數據小到足以忽略，因此在後續的實驗中將不會將 NO₂⁻的氧化速率列入計算(表四)。

表四、亞硝酸態氮及硝酸態氮在研究系統中濃度變化

	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N
	mg L ⁻¹	
NO ₂ ⁻ 10 ⁻³ M 原始	0.220	2.846
NO ₂ ⁻ 10 ⁻³ M 4 天後	0.223	2.95

(二)不同種類幼苗之生長差異

1.幼苗之芽長及根長比較

(1)青江菜培育 5 天結果:芽長三個處理間差異 F 值達極顯著水準，顯示菜苗可以利用硝酸態及亞硝酸態氮，對芽長以亞硝酸態氮最高(表五)。

表五、青江菜萌芽第 5 天芽長統計表 (單位:公分)

處理	平均		
water	1.30	F 值	178.61
NO ₂ ⁻	2.27	LSD 5%	0.24
NO ₃ ⁻	1.82	LSD 1%	0.32

(2)小白菜培育 5 天結果:芽長三個處理間差異 F 值未達著水準，但是進一步分析其處理間平均值差異性，發現亞硝酸態氮處理高出去離子水處理有 0.85 公分比 5%最低顯著水準(LSD 5%)的差異性達顯著水準 0.68 公分還高，顯示小白菜可以吸收利用亞硝酸態氮且比硝酸態氮高(表六)。

表六、小白菜萌芽第 5 天芽長統計表 (單位:公分)

處理	平均		
water	1.73	F	2.146
NO ₂ ⁻	2.58	LSD 5%	0.64
NO ₃ ⁻	1.46	LSD 1%	0.85

(3)油菜培育 5 天結果:油菜芽長三個處理間差異 F 值達極顯著水準，顯示菜苗可以利用硝酸態及亞硝酸態氮，對芽長以亞硝酸態氮最高，和青江菜及小白菜不同的是，在油菜硝酸態氮處理也顯著高於水處理(表七)。

表七、油菜萌芽第 5 天芽長統計表 (單位:公分)

處理	平均		
water	1.30	F	34.73
NO ₂ ⁻	2.43	LSD 5%	0.28
NO ₃ ⁻	2.06	LSD 1%	0.37

Bingham *et al.* (1954) 利用養液研究亞硝酸態氮對幾種植物的毒害作用。發現在 pH4.0、5.0 及 6.0 時亞硝酸態氮對植物的毒害和其未解離型態有關，也就是亞硝酸。提供植物硝酸態氮比銨態氮較不會有亞硝酸態氮的毒害。本實驗中亞硝酸態氮並未造成上述三種蔬菜之毒害，反而使幼苗生長速率提升。探究其原因，我們認為可能與此篇文中提到的亞硝酸態氮未解離型態亞硝酸有關，由於亞硝酸是弱酸，易以不帶電的分子形態存在，因此較易被植物吸收。而 Galvań and Fernándeز (2001)指出硝酸根須通過原生質膜為由質子 ATP 酵素產生能量讓質子和硝酸根主動運輸進入原生質中(McClure *et al.*, 1990, Glass *et al.*, 1992)。因此亞硝酸較易通過植物之細胞膜，且可能耗費較少能量。

(4) 針葉萵苣培育 8 天結果:針葉萵苣芽長三個處理間差異都達極顯著水準，顯示菜苗可以利用硝酸態及亞硝酸態氮(表八)。

表八、針葉萵苣萌芽第 8 天芽長統計表 (單位:公分)

處理	平均		
water	2.56	F	21.62
NO ₂ ⁻	4.02	ISD 5%	0.59
NO ₃ ⁻	4.37	ISD 1%	0.79

(5) 菠菜培育 9 天結果:菠菜芽長三個處理間差異 F 值達極顯著水準，菠菜和其他菜不同，顯示只能利用硝酸態氮，亞硝酸態氮處理芽長比加水處理低，顯示亞硝酸態氮會抑制

菠菜生長(表九)。進一步探討處理間平均值的差異，亞硝酸態氮處理和去離子水處理達顯著差異(LSD 5%)，低於硝酸態氮處理則達極顯著水準(LSD1%)。

表九、菠菜萌芽第 9 天芽長統計表 (單位:公分)

處理	平均		
water	2.46	F	9.59
NO ₂ ⁻	1.60	LSD 5%	1.00
NO ₃ ⁻	3.47	LSD 1%	1.37

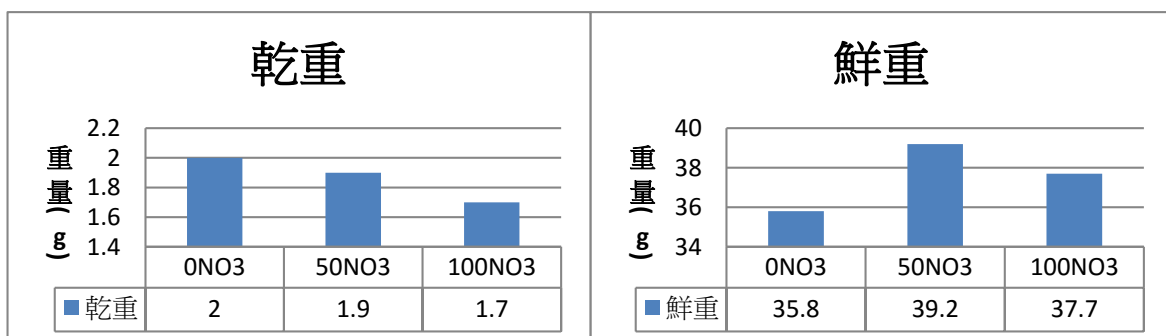
(三)小白菜成菜在 NO₂ 相對濃度不同環境之分析

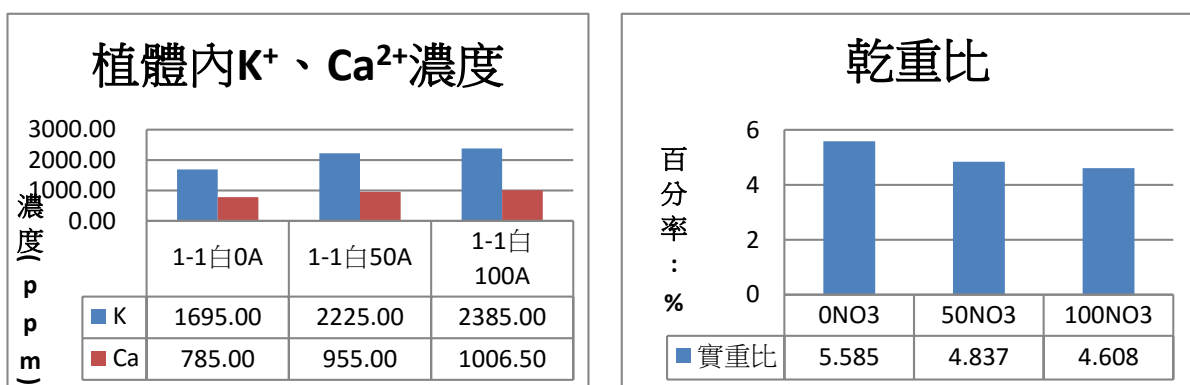
1. 配方中 NO₂ 相對濃度不同之植物生長情形比較

(1) 重量與養液濃度關係

乾重隨著養液中亞硝酸態氮濃度上升而上升，但鮮重在重複實驗中顯示並無顯著差異。(圖二)。計算可以得到乾重占總鮮重的比例，乾重比率越高表示水分含量越高，可以得知: 植物中水分的含量會隨吸收的硝酸根越多而比例越大。推測原因為: 因為硝酸態氮容易以離子形態存在，而亞硝酸態氮則相對而言更容易以分子形態存在。因此硝酸態氮的吸收必須伴隨質子或陽離子的吸收，導致植物內的 K⁺、Ca²⁺ 濃度隨配方中的 NO₃⁻ 比例上升而上升(如圖二)，因而導致植物內的滲透壓增高，吸收的水份增加。

而吸收亞硝酸態氮使植物的乾重有上升的趨勢，推測原因為: Galva¹ and Ferná¹ ndez (2001) 文章整理光合作用的真核細胞其硝酸態氮的同化作用顯示需經過兩個脈，一為細胞膜，硝酸態氮進入原生質體中還原成亞硝酸態氮，亞硝酸態氮通過葉綠體在葉綠體中還原為銨(Crawford, 1995)。在氮轉換機制中，硝酸根必須先經還原酶轉為亞硝酸根，再轉為銨離子(NH₄⁺)方能被轉化成植物內的有機氮，而此還原過程需經由光合作用產生的能量進行，因此亞硝酸態氮的吸收可以減少耗能，產生生長的助益。



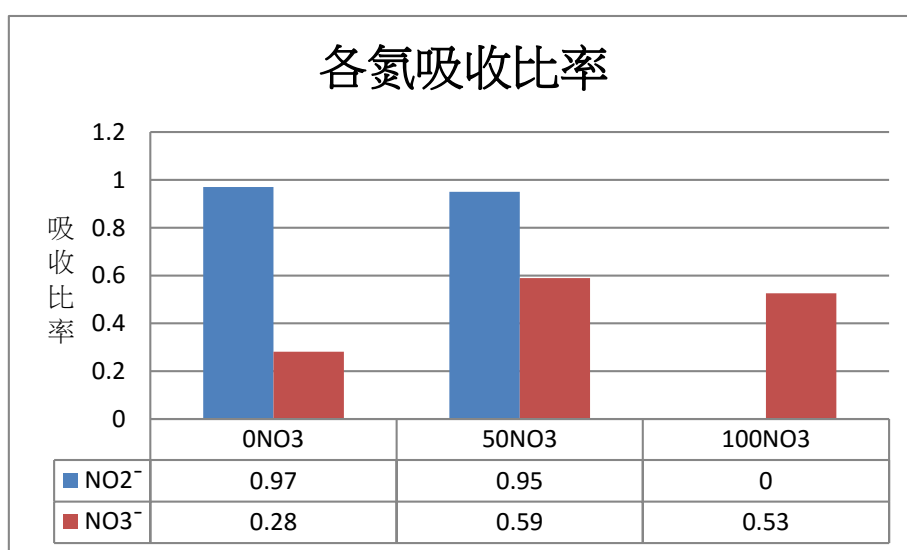


圖二、小白菜採收時部分園藝性狀及鉀鈣濃度

2. NO₂ 與 NO₃ 被吸收的氮重比較

(2) 亞硝酸態氮的吸收百分率大於硝酸態氮

此統計資料來自移植後前期的採樣，因為後期吸收率皆將近 100%。圖三資料顯示亞硝酸態氮在小白菜種植中吸收比值達 0.97 及 0.97(合 97%及 95%)可能原因為:亞硝酸態氮易以分子態存在，相較於帶負電的硝酸態氮，更易被吸收。



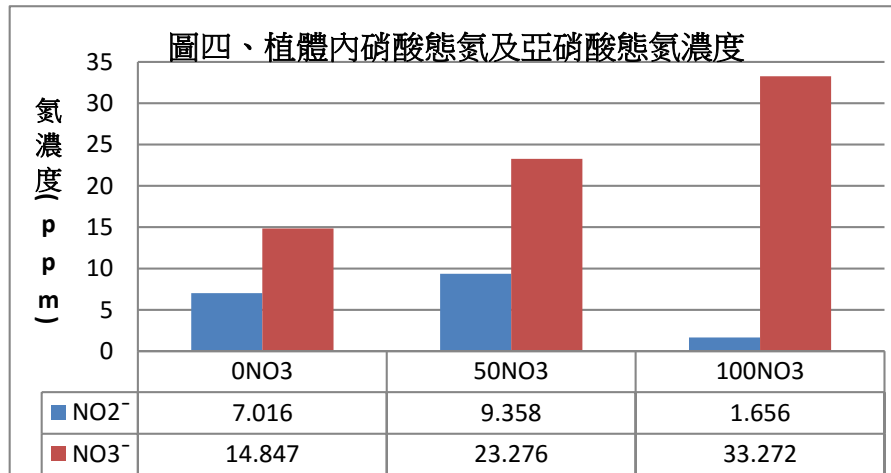
圖三、養液中不同亞硝酸態氮和硝酸態氮比對小白菜此兩離子的吸收

3. 養液中 NO₂ 相對濃度不同之植體內離子比較

(1) 植體內部之 NO₂ 濃度及 NO₃ 濃度

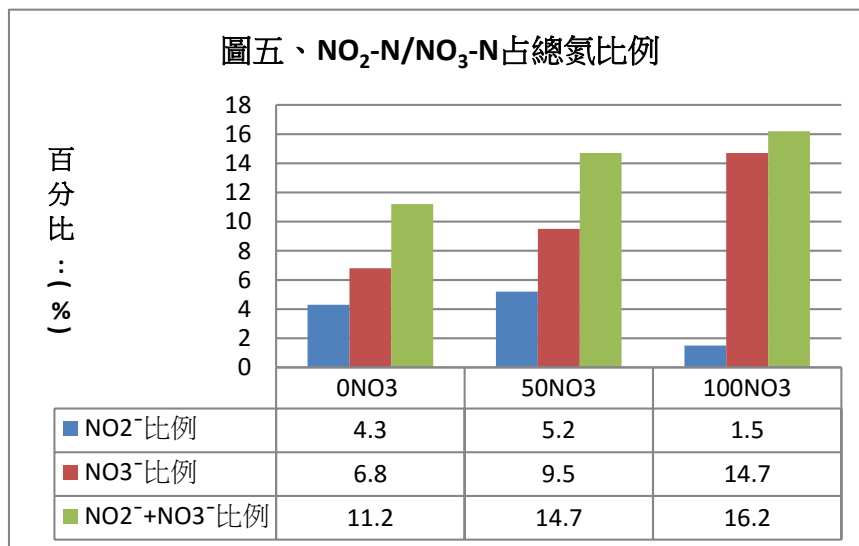
植體內硝酸態氮及亞硝酸態氮濃度會因採收時間而不同，而在我們多次採樣中，植體中大多時候 NO₂ 濃度保持相當低，硝酸態(NO₃⁻)濃度則依養液硝酸態氮相對濃度的提高而提高(圖四)。推論原因為: NO₂ 較容易被還原為 NO 或有機氮，因此在植體內濃度低，而硝酸態氮的還原則須耗費更多能量進行，因此吸收的量無法在短期盡數被還原，且硝酸根是植物

的滲透壓劑，常有大量濃度存在液胞中。但我們也曾觀測到植體內有大量 NO_2^- 存在，此說明亞硝酸態氮不會對小白菜產生毒害。

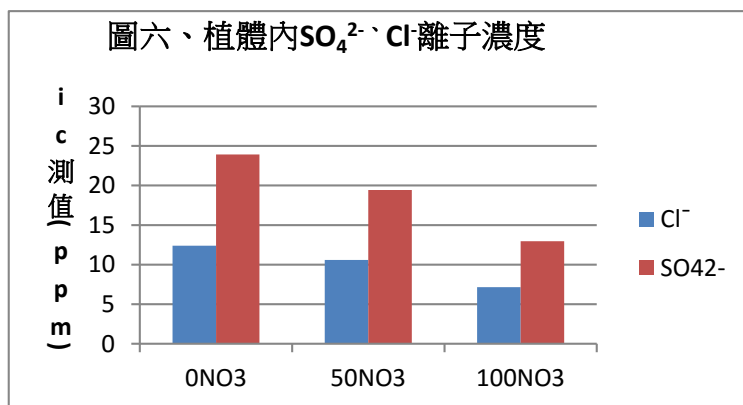


(2) $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ / 總氮之比例隨配方中 NO_3^- 濃度上升而上升

$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 在植體中比例為養液配方 $0\text{NO}_3^- < 50\text{NO}_3^- < 100\text{NO}_3^-$ ，因此在養液中加入適當亞硝酸根能有效降低硝酸鹽在植體中的堆積。推論其原因，因為亞硝酸態氮比硝酸態氮容易被還原為有機氮，因此體內離子態的硝酸態氮就會大幅降低，體內氮主要以有機氮形式存在(圖五)。



(2) SO_4^{2-} 、 Cl^- 離子的吸收隨硝酸態氮比例愈多而下降； K^+ 、 Ca^{2+} 離子的吸收隨硝酸態氮比例愈多而上升。圖二可見植體內的 K^+ 、 Ca^{2+} 濃度隨硝酸態氮比例愈多而上升；植體內 SO_4^{2-} 、 Cl^- 離子的濃度則隨硝酸態氮比例愈多而下降(圖六)。我們推論此為植體維持電荷的平衡產生的現象。



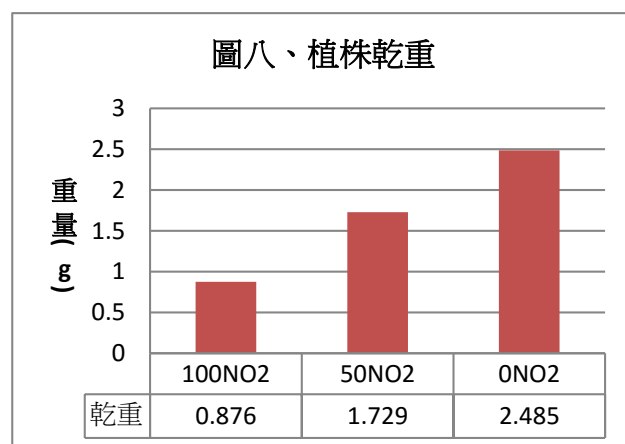
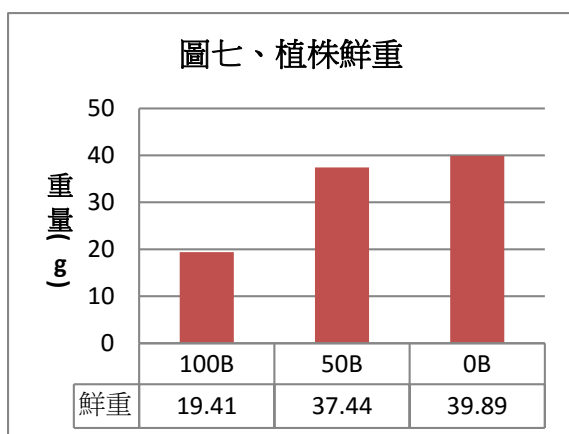
(四) 菠菜成菜實驗

1. 生長情形

由生長情形得知，當養液中 NO_2^- 濃度小於 50% 時植體仍然可以順利生長，但是當養液中 NO_2^- 濃度為 100% 時植株的生長明顯受到抑制。

Oke (1966) 在 Nature 發表一般相信在土壤中亞硝酸態氮是銨轉化成硝酸態氮的中間產物，亞硝酸態氮在低濃度對植物生長可能就有毒性。由前述實驗我們已經得到結果，亞硝酸態氮對植體的毒性不適用於各種植物。但是菠菜生長確實受到高濃度亞硝酸態氮的抑制。

(圖七、八)

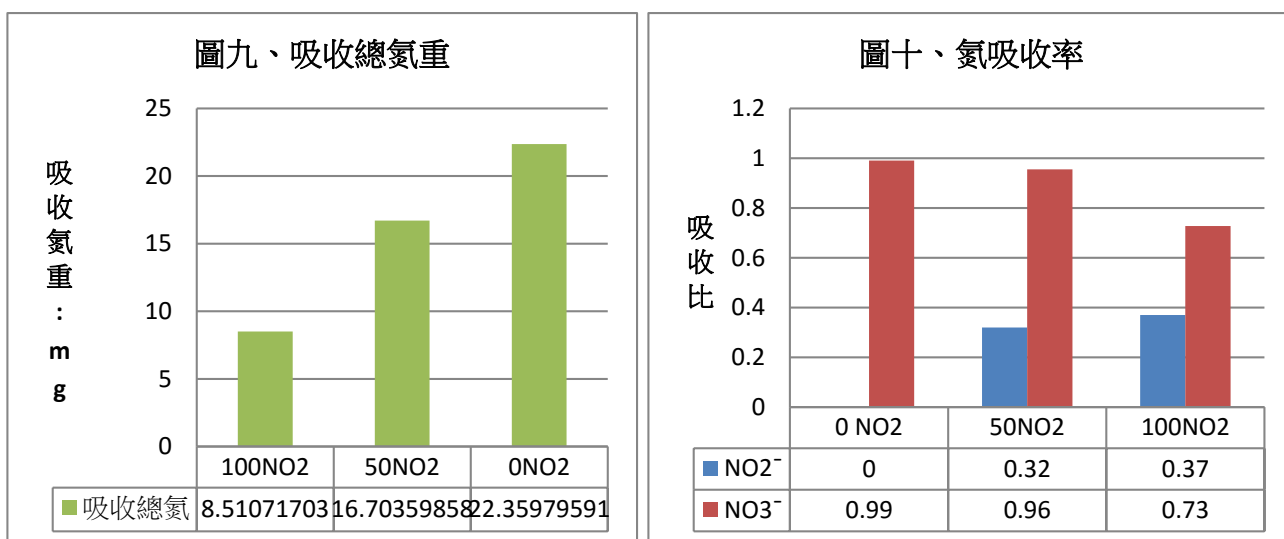


2.吸收氮重

(1) 菠菜較喜吸收 NO_3^-

由幼苗實驗我們得知菠菜生長受 NO_2^- 抑制。而成菜實驗中，吸收的氮總重隨養液中 NO_3^- 比例越高而上升(圖九)，亦支持菠菜較喜吸收 NO_3^- 。

同時，氮的吸收百分率硝酸根>亞硝酸根(圖十)吸收百分率為(吸收氮重/原養液含氮重)，由此圖可以看出硝酸根被菠菜吸收的率 0.99、0.96 及 0.73 合百分率為 99%、96 及 73% 接近 100%，只有在 100% NO_2^- 養液環境中吸收率較低，其原因來自於原養液硝酸根濃度太低；而亞硝酸根之吸收率最高只有 0.37(合 37%)。但是亞硝酸根以分子形態存在，且植體內濃度低，理應較易被植體吸收，因此推論菠菜體內可能存在機制抑制亞硝酸態氮的吸收。菠菜不喜吸收亞硝酸根，但是植體仍然必須吸收足量的氮供其生長，因此亞硝酸根依然以一定比例被吸收。

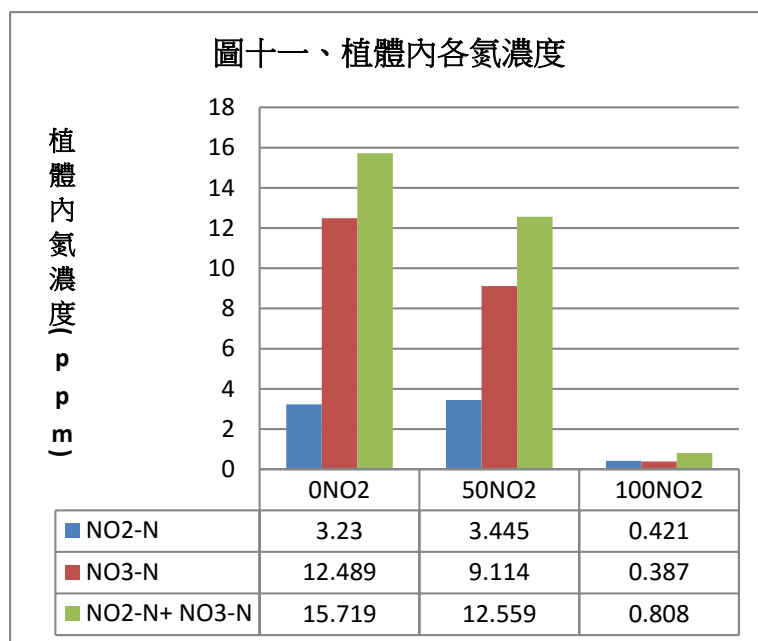


3.植體內氮濃度

(1) 植體中硝酸根及亞硝酸根濃度均隨配方中 NO_2^- 比例上升而下降

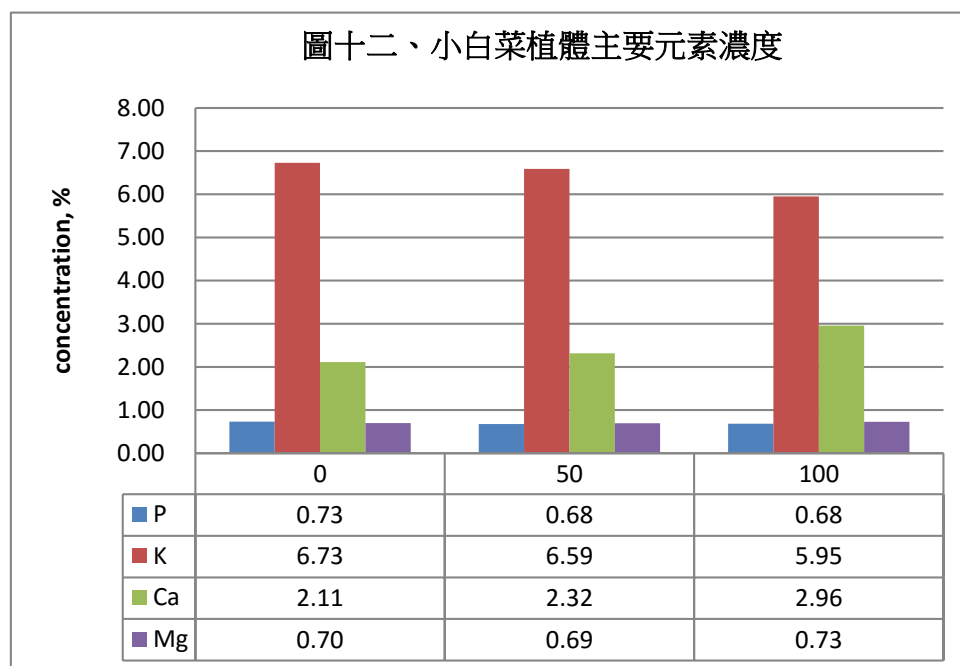
在植體內總氮濃度無顯著差異情況下，植體中硝酸根及亞硝酸根濃度隨配方中 NO_2^- 比例上升而下降(圖十一)。顯示在 100% NO_2^- 養液種植下，植體內的氮多被轉為有機氮形式。我們由吸收氮重分析得知菠菜不喜吸收 NO_2^- ，但是為了維持植體的生存，因此在 100% NO_2^- 養液中吸收的氮幾乎全被轉為有機氮，以 NO_2^- 及 NO_3^- 形式存在大量減少。

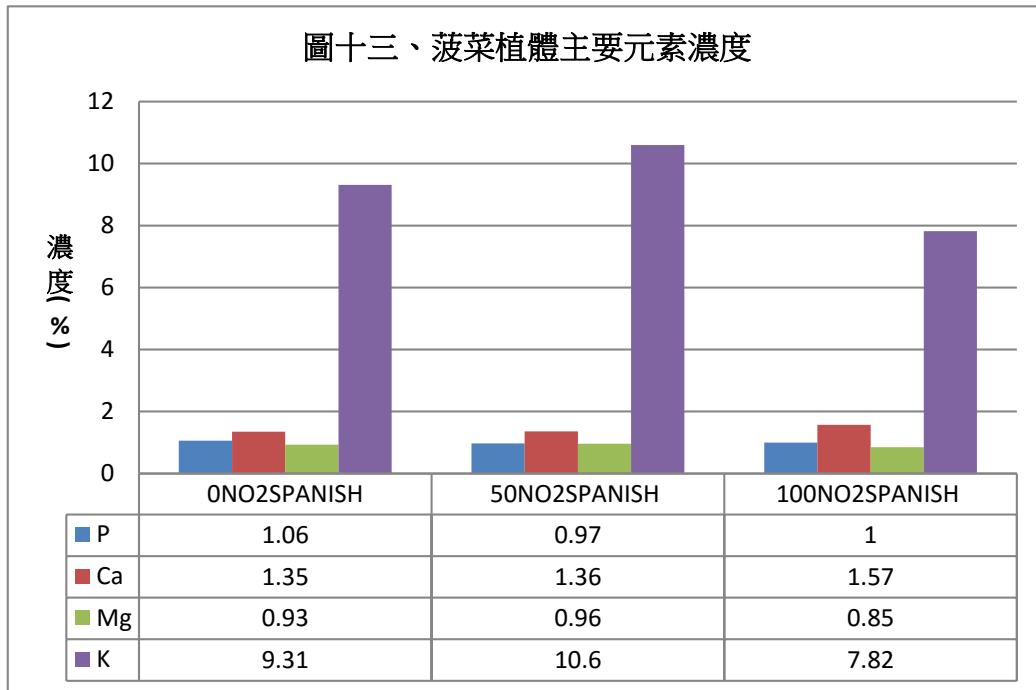
由於小分子 NO_2^- 及 NO_3^- 在植體仍有維持滲透壓的功能，因此可能造成植物膨壓不足以支撐植體的情況，影響生長情形。推測生長不良原因也可能來自總氮吸收的不足。



(2) 植體內部金屬離子

供給相同養液時，主要元素在菠菜植體中離子濃度皆高於小白菜植體，由於菠菜葉柄較小白菜細，因此菠菜可能需要較大膨壓支撐植體，體內離子濃度較高。前述提到 100NO2 組造成植體內硝酸濃度大量減少，因此可能膨壓不足以支撐植體生長。(圖十二、十三)





(3) 植體內部陰離子

趨勢與小白菜相同，Cl⁻皆隨養液中 NO₃⁻濃度上升而上升，推論與電荷平衡有關。

(五)小白菜於不同發芽環境之移植結果(A、B、C 處理濃度為:10⁻³M)

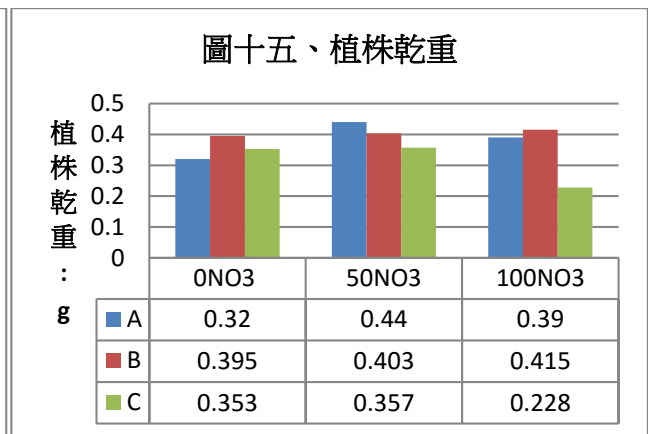
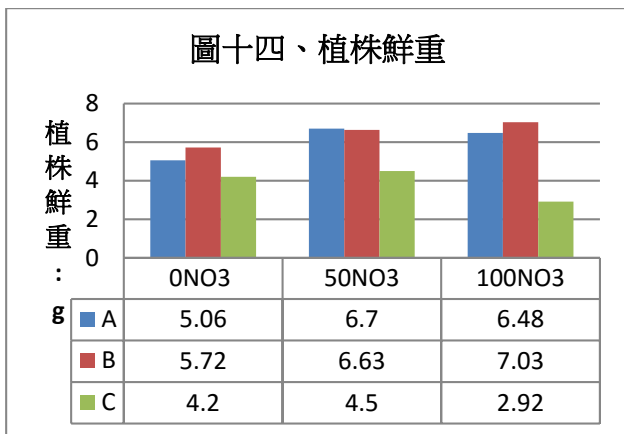
1.幼苗期長度比較表格

(1) 水(A)、NO₂⁻(B)、NO₃⁻(C)處理，育苗之根長比較

3 處理間芽長無差異，而根是以用水處理最長，硝酸根次之，亞硝酸根最短。可能是因為亞硝酸根較容易被吸收，而相對根就不會缺乏養分而促進根的生長。

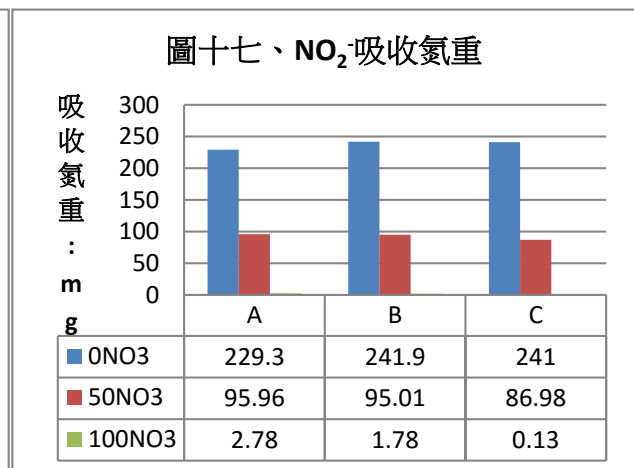
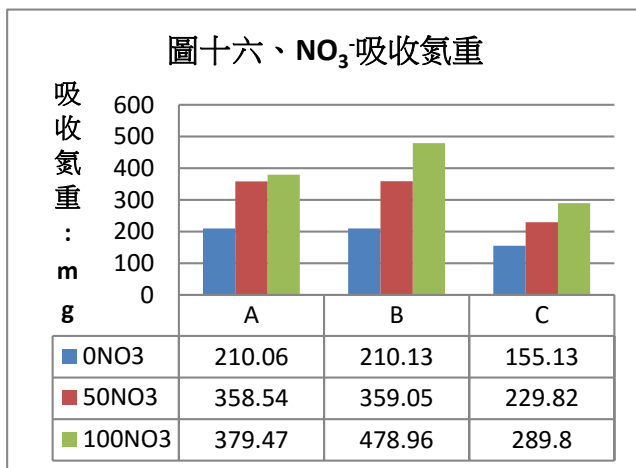
(2)移植後數天起 C 組開始生長顯著差於 A、B 處理

(1)移植後數天起 C 組出現生長遲緩的現象，植株長、鮮重及乾重皆不如 A、B 處理。(圖十四、十五)



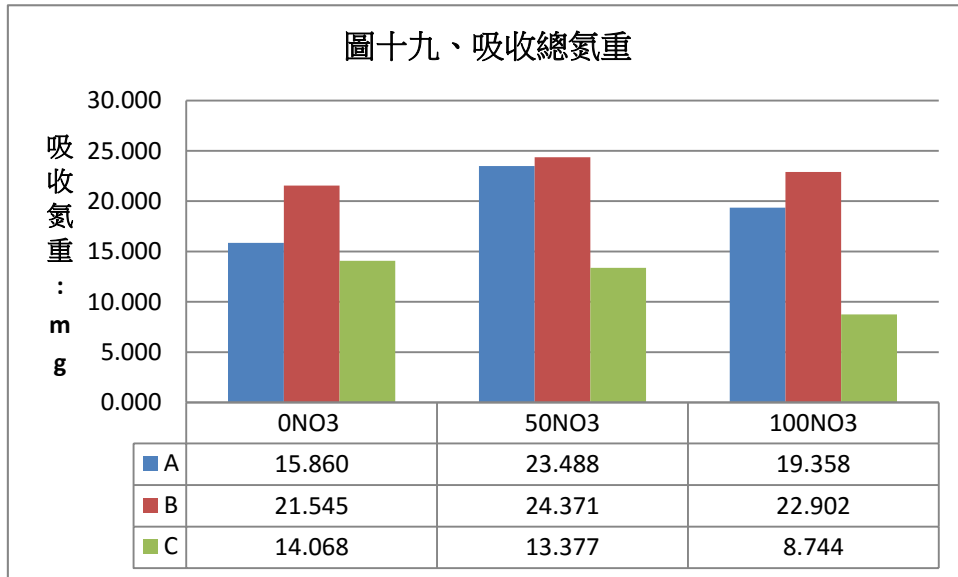
2.吸收情形

亞硝酸根在各處理下吸收皆高，吸收不受 A、B、C 處理所影響，隨養液中濃度上升而提升，且吸收率接近 100%；而硝酸根的吸收大致上與養液中硝酸根濃度成正相關，但是 C(幼時以硝酸根育苗)組卻吸收的量大幅下降。推論 C 組處理使成菜硝酸態氮的吸收大幅下降(圖十六、十七)，進而使生長受到抑制。



3.植體內氮濃度

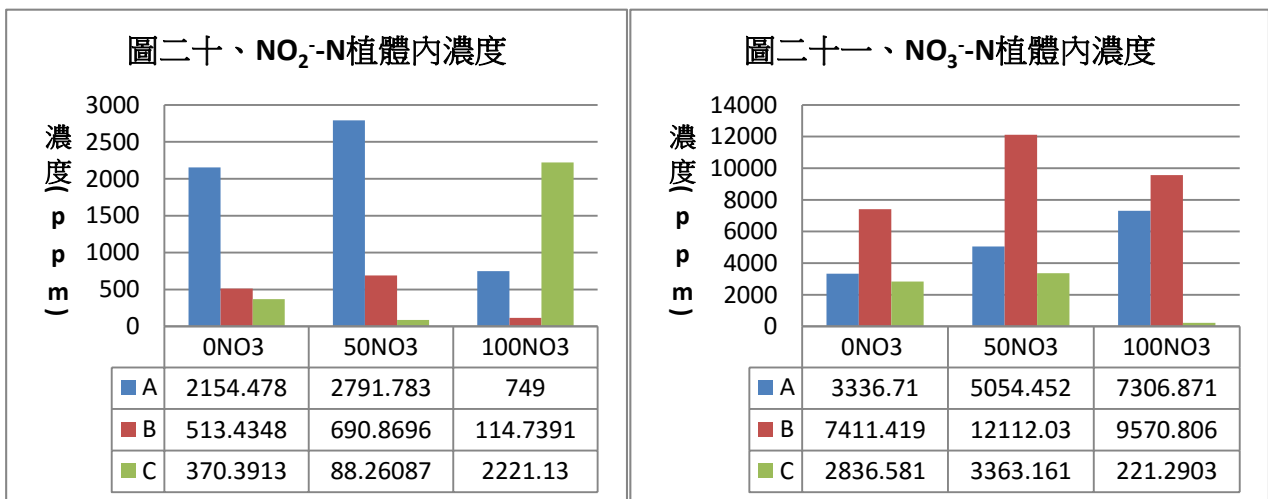
(1)吸收氮重:在三種養液環境中，皆以 B 組的吸收氮重最大，C 組最小(圖十九)。顯示幼苗時期以亞硝酸態氮育苗，會增加成菜吸收的氮量；而 C 組的吸收氮重較少，其中又以 100C 最少，但是也有可能是因為其生長不良所致。



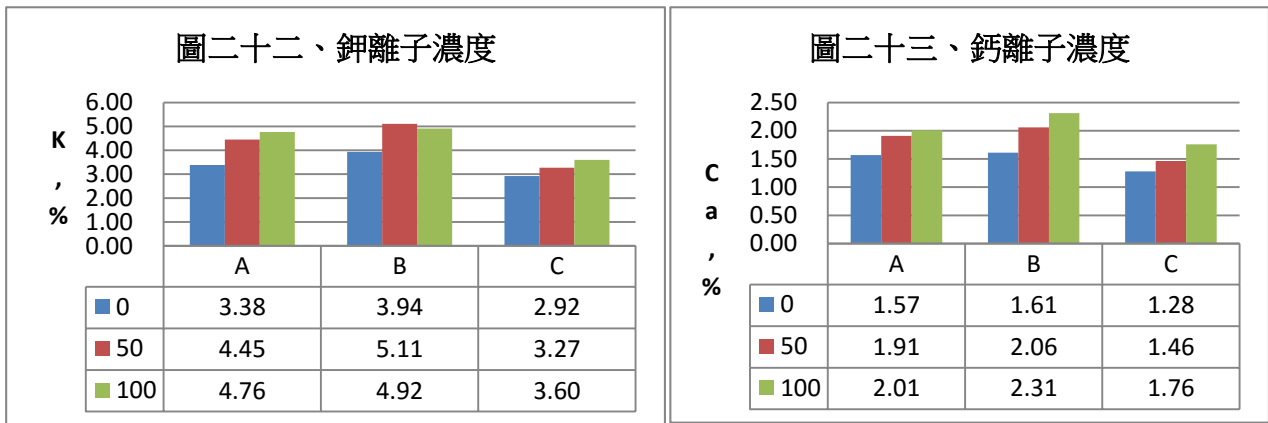
(2) 植體內 NO₂ 濃度及 NO₃ 濃度

植體內 NO₂ 濃度在不同養液中呈現 A 較高的趨勢(圖二十)，B、C 處理會降低植體的 NO₂ 濃度，但是 100C 有例外，由乾重結果得知 100C 在 C 組中生長較 50C、0C 差。而 A、B、C 處理在不同養液配方中有不同結果，顯示此兩處理可能有交感現象。

植體內 NO₃ 濃度在不同養液中呈現 B 較高的趨勢，C 處理則使體內 NO₃ 濃度降低(圖二十一)。



(3) K⁺、Ca²⁺ 離子在 A、B、C 處理皆大致呈現 100NO₃>50 NO₃>0 NO₃ 的趨勢，其結果與成菜實驗一致，推論為維持電荷平衡的機制。且 K⁺、Ca²⁺ 離子在 C 組吸收較少，或許由於硝酸態氮吸收減少，隨之被吸收的陽離子量也跟著減少(圖二十二、二十三)。



(六)小白菜於不同萌芽環境之移植結果(A、B、C 處理濃度為: $5 \times 10^{-4}M$)

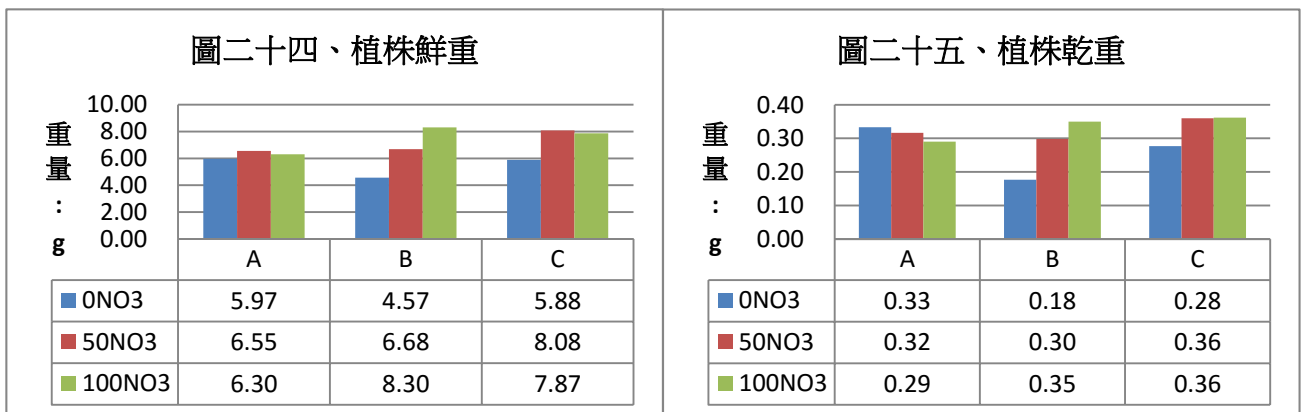
1.幼苗期長度比較

(1) 水、 NO_2^- 、 NO_3^- 育苗之根長比較

根長結果同高濃度處理(A、B、C 濃度: $10^{-3}M$)，3 處理間芽長無差異，而根是以用水處理最長， NO_3^- 次之， NO_2^- 最短。可能是因為 NO_2^- 較容易被吸收，而相對根就不會缺乏養分而促進根的生長。而此組根長較高濃度 A、B、C 處理長，或許可以說明根長的長短在幼苗期受養液容不容易吸收影響。

(2)移植後生長情形

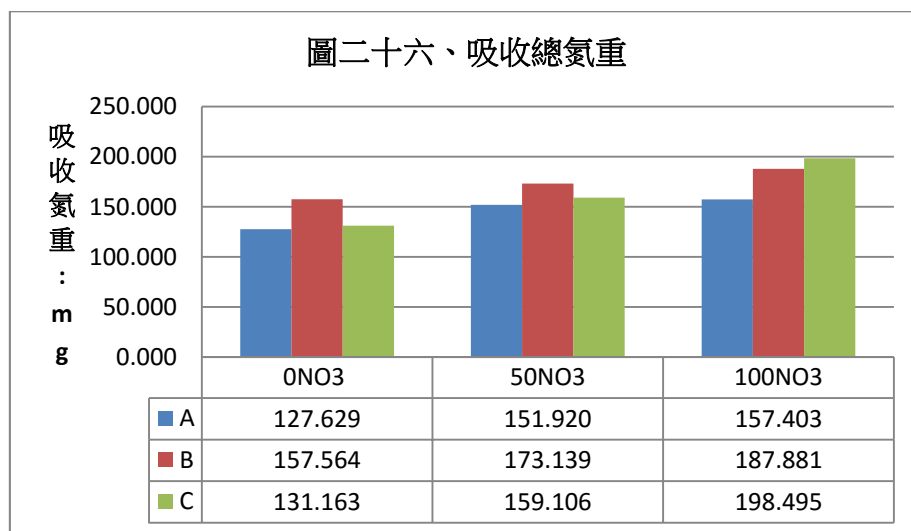
並未產生如高濃度 A、B、C 處理，C 組生長不良的情形，推論因為 A、B、C 濃度太低因此不造成此現象(圖二十四、二十五)。



2.吸收氮重

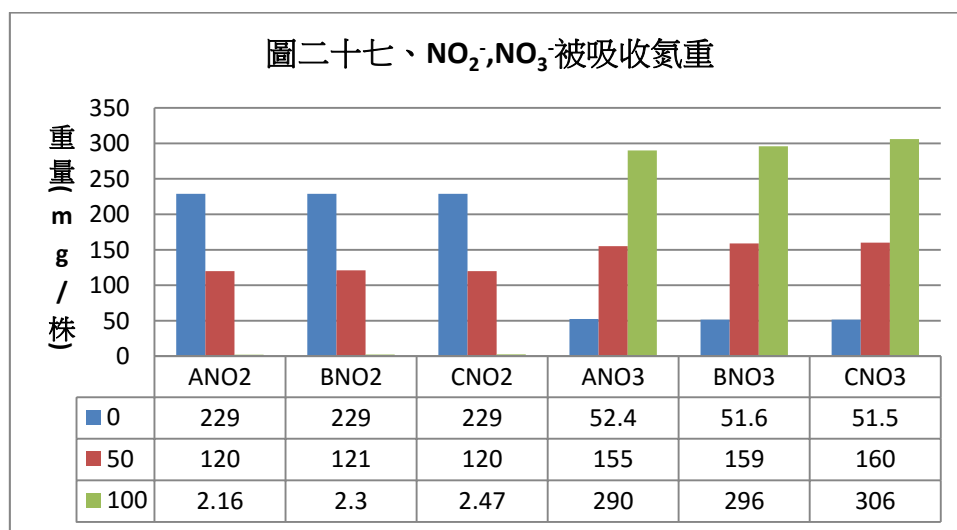
(1)吸收總氮重

由植體中所含總氮濃度及乾重計算，被吸收的總氮重在處理間無差異，並未在養液配方中 NO_2^- 濃度不同時有差異(圖二十六)。且並未出現如上一個實驗結果所述，C 組明顯吸收較少。其可能原因為當 A、B、C 處理濃度降低時，並未對幼苗造成如此巨大之影響。



(2)吸收情形

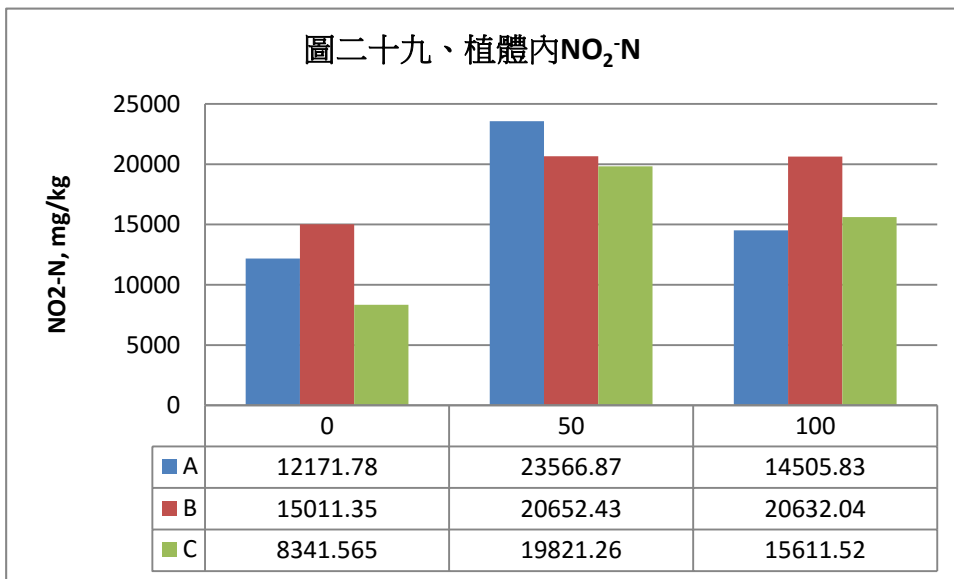
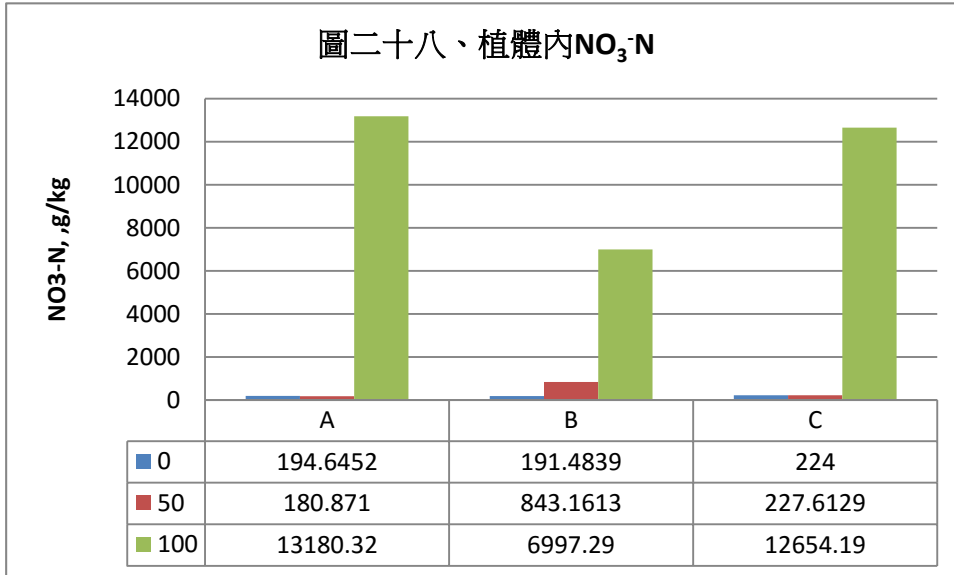
由養液體積及離子濃度計算得知:硝酸態氮及亞硝酸態氮之吸收氮重均與養液中濃度成正相關，吸收率均接近 100%(圖二十七)。



3.植體內離子

(1)NO₃結果與小白菜的成菜實驗一致，在 A、B、C 間無差異，差異主要存在於 0NO₃、50NO₃、100NO₃，體內的 NO₃濃度與養液中 NO₃濃度成正相關(圖二十八)。

(2) NO₂在植體內濃度則同時受 A、B、C 處理及 0NO₃、50NO₃、100NO₃影響(圖二十九)。



四、結論與應用

(一)實驗結論

1.對亞硝酸根利用情形於不同植物間存在差異:

(1)小白菜、青江菜，及油菜菜苗可以利用硝酸態及亞硝酸態氮，且對芽長及根長均以亞硝酸態氮最高。我們的實驗與 Bingham *et al.* (1954) 利用養液研究亞硝酸態氮對幾種植物的毒害作用實驗得到不同結果，亞硝酸根增加植物生長情形更好，推測原因為亞硝酸微弱酸較多以分子態吸收，且減少硝酸根還原為亞硝酸根所耗能量。

(2)針葉萵苣菜苗可以利用硝酸態及亞硝酸態氮，且二者對其生長情形無差異。

(3)菠菜芽長和其他菜不同，顯示只能利用硝酸態氮，亞硝酸態氮會抑制菠菜生長。這個實驗結果與諸多我們查到的文獻相符，亞硝酸根確實有類似毒害情形產生。

2.水耕研究植物吸收 NO_2^- 的特性是否在幼苗時期及成熟期有階段式的差異

水耕菠菜及小白菜，發現其結果與幼苗時期一致，小白菜較喜吸收 NO_2^- ，而菠菜較喜吸收 NO_3^- ，此結果可以從對氮的吸收比率看出，小白菜 NO_3^- 的吸收比例接近 100%，而 NO_2^- 則較低；菠菜則剛好相反，吸收 NO_2^- 比例極低，推論植體有抑制吸收的機制。

進一步發現小白菜植體乾重隨著養液中 NO_3^- 比例上升而上升，此情形與我們推測的結果類似，因為減少植體內 NO_3^- 還原為 NO_2^- 所耗的能量，對植體生長產生助益。菠菜則生長受高濃度亞硝酸態氮抑制，在 100 NO_3^- 環境中植體嚴重生長不良，且植體吸收氮重明顯下降。

植體內離子顯示， K^+ 、 Ca^{2+} 離子濃度隨養液中 NO_3^- 上升而上升， SO_4^{2-} 及 Cl^- 則隨 NO_3^- 上升而下降，推測此為植體維持電荷平衡產生的結果，是否進一步影響生理機能，值得深入探討。

由小白菜植體中陰離子濃度得知:植物體內的亞硝酸根濃度極低且恆定，可能是植物利用亞硝酸根於體內轉為一氧化氮作為防疫機制所以無論有沒有吸收都需保持在一定濃度

範圍之故。硝酸態氮(NO_3^-)濃度則依養液中硝酸態氮相對濃度的提高而提高，這結果似乎可以解釋植物不易以較不穩定的亞硝酸態氮形式儲存氮源(硝酸態氮往往是植物調整其滲透壓的重要成分之一)，所以吸收亞硝酸態氮後很快還原。

3. 移植實驗目的為觀察萌芽時期氮源的供給不同，是否影響其成菜吸收之氮源形式。

實驗結果顯示高濃度 A(以水育苗)、B(以 NO_2^- 育苗)、C(以 NO_3^- 育苗)處理(10^{-3}M)下移植後數天起 C 組出現生長遲緩的現象，植株長及鮮重皆不如 A、B 處理。但是當 A、B、C 處理濃度低($5 \times 10^{-4}\text{M}$)時就不造成此影響，各組間生長無差異。

由吸收的氮重可以看出，高濃度 A、B、C 處理下，亞硝酸態氮的吸收不受 A、B、C 處理所影響，隨養液中濃度上升而提升，且吸收率接近 100%，但是**硝酸態氮則出現 C 組吸收特別少的情形**，推論幼時期吸收高濃度硝酸態氮，會抑制成菜吸收硝酸根，此結果與其生長不良情形有關。當 A、B、C 處理濃度低時則吸收氮重無差異。**B 處理則在成菜時期增加其吸收的氮重**，此結果可能涉及體內酵素系統的影響，值得深入研究。

五、未來展望

此實驗對植物吸收亞硝酸態氮有了新的認識，並不完全如以往認知的：會對植物產生毒害，甚至可以提升植物的產量，及降低植體內硝酸鹽濃度。

(1) 期許可以由此實驗進一步探討亞硝酸態氮轉化酶於植物間之差異，藉此了解實驗結果與文獻差異的原因，並藉由促進或抑制其活性改變植物生長情形，深入探討亞硝酸態氮於植物的吸收、運輸，及利用機制。且觀測期是否對植體內 NO 濃度產生影響，進而影響體內的免疫機制。

(2) 部分植物之生長會受 NO_2^- 抑制，可能可以藉此抑制對 NO_2^- 有不良反應之雜草及外來植物種類，降低其蔓延速度及影響力。

六、參考文獻

- (一)林榮駿 2012 氮、鉀、鈣及鎂養分濃度對水耕小白菜感染炭疽病之影響。國立中興大學碩士論文
- (二)Bingham, F.T., H.D. Chapman, and A.L. Pugh. (1954) Solution-culture studies of nitrite toxicity to plants. doi:10.2136/sssaj.03615995001800030019x
- (三)Crawford N. M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859 – 868
- (四)Delledonne, M. (2005) NO news is good news for plants. *Plant Biology* 8:390 – 396.
- (五)Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C: Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998, 394:585-588.
- (六)Ferrer, M.A., Ros-Barceló, A., 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ.* 22, 891 – 897.
- (七)Galvn, A., and E. Fernández. (2001) Eukaryotic nitrate and nitrite transporters CMLs, *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 225 – 233. Glass A. D. M., J.E. (六)Garcia-Mata, C. and L. Lamattina. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128, 790 – 792
- (八)Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R., 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11116 – 11121.
- (九)Luis A. del Río, F. Javier Corpas and Juan B. Barroso(2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783 – 792
- (十)Lahers, K., V. Kranmer, E. Back, L. Privalle, and S. Rothstein (1988) Molecular Cloning of Complementary DNA Encoding Maize Nitrite Reductase. *Plant Physiol.* 88, 741-746
- (十一)Mark Stokes, Russell Thompson,2Rhodri Cusack,2and John Duncan(2009) Top-Down Activation of Shape-Specific Population Codes inVisual Cortex during Mental Imagery. *The Journal of Neuroscience*, February 4, 2009 • 29(5):1565 – 1572 • 1565
- (十二)Massimo Delledonne(2005) NO news is good news for plants. *Plant Biol.*

- (十三) McClure P. R., L.V. Kochian, R.M. Spanswick, and J.E. Shaff (1990) Evidence for cotransport of nitrate and proton in maize roots. I. Effect of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* 93: 281 – 289
- (十四) Oke, O.L. (1966) Nitrite toxicity to plants. *Nature* 212, 528.
- (十五) Scheible W. R., A. González-Fontes, M, Lauerer, B. Muller-Rober, M. Caboche and M. Stitt (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9: 1 – 17
- (十六) Scheible W. R., M. Lauerer, E.D. Schulze, M. Caboche and M. Stitt (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J.* 11: 671 – 691
- (十七) Shaff and L.V. Kochian (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* 99: 456 – 463
- (十八) Weller, J. I., J. Z. Song, D. W. Heyen, H. A. Lewin and M. Ron, 1998 A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* 150
- (十九) Zhang H. and B.G. Forde (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407 – 409

【評語】 060004

非常有系統地討論亞硝酸鹽對不同蔬菜的影響，只可惜無法深入探討幫助或抑制植物生長的可能原因。