

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060008
參展科別 植物學
作品名稱 囊中之物~探討台灣藜抗鹽耐旱的可能原因及
囊狀細胞角色
得獎獎項 大會獎 四等獎

就讀學校 高雄市立明華國民中學
指導教師 蘇育弘、李冠徵
作者姓名 蔡昕哲、倪羽安、鍾承希

關鍵詞 台灣藜、抗氧化酵素、囊狀細胞

作者簡介



我們是高雄市立明華國中三年級的學生，分別是蔡昕哲(中)、倪羽安(右)、鍾承希(左)。

很幸運有這個機會可以從事專題研究，在實驗的過程中，經常遇到一些令我們感到手足無措的事情，所幸在許多人的協助下，讓我們的實驗得以順利完成，也讓我們對研究的熱情更加提升。一路上我們成長了許多，思考的面向更多元、更嚴謹，實力也大幅上升。感謝一年多來提供我們幫助的人，讓我們這段科學的奇幻旅程收穫滿滿。

摘要

台灣藜為原生種作物，本實驗探討其抗逆的可能原因，並發現囊狀細胞的不同功能。台灣藜種子發芽率與幼苗生長，隨鹽度及乾旱程度上升，受到很大抑制；發展至第一對葉，台灣藜才展現較好抗逆能力。不論子葉或第一對葉，鹽度越高或越乾旱，花青素與類黃酮含量均較高。但 POD 與 CAT 活性，子葉時活性變化不大；生長至第一對葉時，POD 在 2%鹽處理組及乾旱 w40%組，活性分別上升 10.8 及 3.6 倍，而 CAT 在 2%鹽處理組及乾旱 w40%組，活性上升 5.2 及 3.8 倍，酵素活性上升的結果與抗逆關鍵時期相符。刷除囊狀細胞後，發現台灣藜在鹽逆境下生長較差；2%鹽處理後，刷除囊狀細胞的葉片，其 CAT 活性下降約 64%。收集囊狀細胞，進行 CAT 活性分析，囊狀細胞組及其去除活性組(加入去除 CAT 活性的 Stop solution)，兩者間的 OD 值相差達 7.9 倍。顯示台灣藜的囊狀細胞不僅有儲鹽的能力，還具有抗氧化酵素協助抗逆。

Abstract

Chenopodium formosanum Koidz (e.g., red quinoa) is an indigenous crop of aborigines in Taiwan. This experiment investigates red quinoa's tolerance to salt and drought stresses. While previous studies indicate the role of epidermal bladder cell (EBC) is salt dump for external sequestration of sodium, our study also reveals some new function of EBC.

It has been observed that germination rate of seeds and the growth of seedlings are inhibited, as the degree of salinity and drought increase, until the primary leaves are grown when the ability of stress endurance tolerance is significantly enhanced.

Regardless of cotyledon or primary leaves, both anthocyanin and flavonoid increase with the degree of salinity and drought. However, in cotyledon phase, the activity of peroxide and catalase did not change significantly under stress. Comparatively in the phase of primary leaves, peroxide activity increased by 10.8 times at 2% NaCl, and by 3.6 times at the drought group (w40%). In the meantime, catalase activity increased by 5.2 times at 2% NaCl, and by 3.8 times at the drought

group (w40%). By removal of EBC, the growth in salinity became worse - at 2% NaCl, catalase activity decreased 64% in leaves with EBC brushed off. Furthermore, by collecting EBC from leaves under salinity stress for catalase activity assay, a significant 7.9X difference on catalase activity is identified between EBC and EBC-deactivated groups (deactivation by Stop solution for catalase). These studies show that EBC serves not only as salt storage, but antioxidant enzyme as well to help endure stresses.

壹、研究動機



圖1 種植在校園的原生台灣藜

我們在速食店吃到紅藜米漢堡，對這種作物產生好奇。查閱相關資料，台灣紅藜是台灣原生種作物，2008年正名為台灣藜，紅藜的營養價值豐富，所以文獻多是探討紅藜的營養成份。資料中也發現紅藜具多重抗逆的能力，我們由種子開始，

於鹽及乾旱逆境下記錄他們的生長，初步觀察卻發現幼苗時期並不具備抗逆能力，這與網路及文獻的資料不同，讓我們感到疑惑，台灣藜是否要發展至某個時期才具較好的抗逆境能力？而顯微鏡下明顯的囊狀細胞，在逆境下扮演了什麼樣的角色？希望藉這一系列實驗，解開台灣藜抗逆的謎團。

貳、研究目的

- 一、觀察台灣藜在不同逆境(鹽、乾旱)下的生長情形
- 二、探討較能抵抗逆境的生長時期
- 三、探討較能抵抗逆境的可能原因
- 四、探討鹽逆境下囊狀細胞的角色



圖2 逆境下，囊狀細胞的角色？

參、研究器材與設備

一、種植相關

台灣藜(*Chenopodium formosanum*)，莧科藜亞科藜屬，一年生作物，為台灣原生種植物，是原住民的傳統作物。為了解台灣藜在不同逆境(鹽及乾旱)下的生長情形，我們取得屏東來義部落原住民的台灣藜種子(圖 3)，以土耕方式種植。

1. 光照條件：室內 LED 白燈 4 呎*12，光照 12 小時，照射距離約 25cm。(圖 4)
2. 土耕條件：黑土及培養土 2：1 混合。鹽逆境以育苗盆；乾旱逆境以紅色小盆種植。
3. 鹽逆境處理：以氯化鈉調製成不同濃度的鹽逆境，每日澆灌至育苗盆底部流出為止。
4. 乾旱逆境處理：以土壤水分感測器(圖 5)，調控不同土壤濕度的乾旱逆境來進行種植。

二、測量器材及設備

1. 不同逆境生長觀察

台灣藜種子、培養土、育苗盆、紅色小盆、室內種植 LED 燈組、電子天平、電子游標尺、IMAGE J 軟體、洗滌瓶

2. 探討逆境適應可能原因~型態部份

測微軟體、複式及解剖顯微鏡、解剖器具、筆電、玻片組

3. 探討逆境適應可能原因~生理部分(色素及酵素)

分光光度計、比色管、高速離心機、液態氮、研鉢、微量吸管、離心管、甲醇、乙醇、雙氧水、愈創木酚、磷酸緩衝液

4. 探討鹽逆境下囊狀細胞的角色

BioVision catalase assay kit (分析囊狀細胞過氧化氫酶活性)



圖 3 紅藜種子



圖 4 室內 LED 種植情形



圖 5 土壤水分感測器~乾旱



圖 6 育苗盆進行鹽逆境處理



圖 7 光度計測定色素含量

肆、研究過程及方法

◎查閱相關文獻

(一) 逆境與台灣藜

耕作百年以上的台灣原住民紅寶石~台灣藜，與近親南美洲藜麥相同，具優良的多重抗逆境能力及高度營養價值，本篇對台灣藜面對鹽及乾旱逆境的生長進行研究，探討在逆境下的外部及內部生理變化，最後探討上胚軸後開始出現的囊狀細胞，於逆境下所扮演的角色。

(二) 文獻一、不同生長條件對台灣藜機能性成份的影響(2017，中華民國雜草會刊)

台灣藜幼苗在高溫下，次級代謝物(類黃酮、花青素)含量最高，鹽分逆境試驗結果顯示適度鹽分濃度可有效增加作物生理表現、機能性成分含量及抗氧化能力。

(三) 文獻二、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)

小米在鹽逆境下，藉由累積較高花青素及過氧化物酶、過氧化氫酶活性提升耐鹽能力。

(四) 文獻三、探討番杏的抗鹽方式與鈣離子對抗鹽能力的影響(中華民國第 58 屆中小學科展)

台灣原生植物番杏，具抗鹽耐旱能力，鹽逆境會使新長出的葉子囊狀細胞增大。

(五) 研究流程



一、觀察台灣藜在不同逆境(鹽、乾旱)下的生長情形

台灣藜為南部及東部原民部落常見的作物，但逆境下的生長記錄較為少見，我們由種子開始種植，來記錄型態變化，並了解不同逆境對幼苗生長造成的影響。

(一) 觀察不同逆境下的發芽率

1. 鹽逆境發芽率

(1) 鹽逆境條件設定：以氯化鈉配製不同濃度鹽水模擬鹽逆境，分別設定如下：

ctrl (0%)	0.5%	1%	2%	3%
-----------	------	----	----	----

(2) 將台灣藜種子，分別浸泡在不同濃度鹽水的培養皿內(圖 9)，待 5 天後計算各培養皿內的種子發芽數量。種子數 N=30，進行四重覆取平均值。

2. 乾旱逆境發芽率

(1) 乾旱條件設定：利用土壤水分感測器(圖 10)來調控不同土壤乾旱程度，設定如下：

ctrl	w80%	w60%	w40%	w20%
控制組 (<u>最大含水量*80%</u>)	控制組之含水量 *80	控制組之含水量 *60%	控制組之含水量 *40%	控制組之含水量 *20%

註：經測定乾旱實驗用之小紅盆，土壤最大體積含水量為 49.86%。

由查詢文獻(屏科大)，將控制組(ctrl)的土壤水含量設定為最大含水量之 80%。

(2) 種植台灣藜種子後，每 2 日測定土壤含水量，將各盆的土壤含水量維持在設定範圍內。

(3) 5 天後仔細清理土壤，計算各盆發芽的數量。種子數 N=30，進行四重覆取平均。

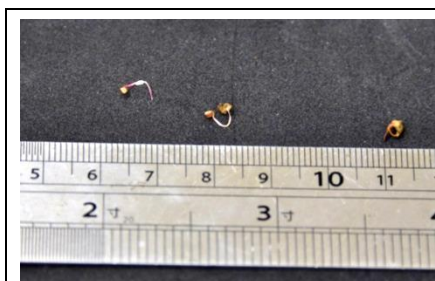


圖 8 台灣藜種子的發芽情形



圖 9 不同濃度鹽水發芽實驗



圖 10 感測器調控土壤含水量

(二) 探討不同逆境下，台灣藜的生長情形

了解台灣藜在逆境下的發芽情形後，接著想知道逆境對生長究竟會造成什麼樣的影響？

因此我們分別由不同的時間點：D7(第 7 天)、D14(第 14 天)、D21(第 21 天)來進行記錄

1. 鹽逆境下的生長情形：將台灣藜種子直接種於育苗盆內，並以不同鹽濃度進行處理，每日定時以鹽水處理至育苗盆底部流出為止，每隔 7 天記錄一次。植株數 N=4，三重覆取平均

(1) 根、莖長：於不同時間點，將植株洗去土壤後，以電子游標尺量測根、莖長(圖 11)

(2) 生物質量：取不同時間點植株，洗去土壤後吸取多餘水分，置電子天平秤鮮重。

(3) 最大葉面積：於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，置於尺

規旁拍照後以 image J 軟體進行葉面積計算(圖 12)。

- 乾旱逆境下的生長情形：將種子種於不同乾旱程度小紅盆(圖 13)，每 2 日測定含水量，維持原本設定的乾旱程度，每隔 7 天記錄一次。相關記錄與鹽逆境同。N=4，三重覆取平均。



圖 11 電子游標尺記錄莖長



圖 12 以 image J 軟體量測面積



圖 13 不同乾旱下生長情形

二、探討較能適應逆境的生長時期

由實驗一的初步結果，台灣藜並不如文獻指出具有良好的抗逆能力，逆境下有明顯的抑制。我們由此了解台灣藜並非從小就開始適應逆境，因此進一步探討由哪個時期開始較能抵抗。

(一)鹽處理下，較能抵抗逆境的生長時期

研究一的結果，較高鹽濃度(2、3%)，台灣藜生長情形並不好，因此選取較高濃度 2、3% 鹽逆境，探討逆境對不同時期的影響。

- 分別選取生長至子葉以及第一對葉的幼苗，開始以 ctrl (0%)、2%、3% 鹽水處理，每日進行鹽澆灌至底部流出為止(圖 14)。



圖 14 第一對葉時進行鹽處理

- 於第 7 天及第 14 天，記錄生物質量與新生葉葉面積。各組 N=4，三重覆取平均。

(二)乾旱處理下，較能抵抗逆境的生長時期

研究一的結果，除了不適應較高鹽度外，較低水份的土壤也抑制了生長，因此我們選取了 ctrl 組*40%及 ctrl 組*20% 兩種不同乾旱程度的土壤，探討對不同生長時期台灣藜的影響。

- 分別選取生長至子葉及第一對葉的幼苗，移入小紅盆內，並將土壤乾旱程度維持在 ctrl、w40%、w20% 等三種(圖 15)。



圖 15 第一對葉移至乾旱處理

- 於第 7 天、第 14 天，記錄生物質量與新生葉葉面積。各組 N=4，三重覆取平均。

三、探討較能適應逆境的可能原因

由研究二的初步結果，台灣藜幼苗可能生長至第一對葉時，具有較好的適應逆境能力，

這讓我們很好奇第一對葉與子葉，有了什麼樣的差異？我們選取了研究二的鹽逆境濃度(2、3%)及乾旱程度(w40%、w20%)來進行討論。由外部型態觀察發現葉上具有明顯的囊狀物，在植株的內部，莖及葉背有明顯的紅色累積，這是否和逆境有關？

這個部分我們將針對台灣藜的內部生理物質與外部型態變化探討，比較子葉與第一葉的差異，以釐清為何生長至第一對葉時，開始有了較好的抗逆能力。

(一) 探討內部生理與逆境適應的關聯



圖 16 葉背明顯的花青素

觀察到台灣藜的莖及葉背明顯的色素(圖 16)，查詢為花青素，具很強抗氧化能力。文獻查詢並與老師討論，了解生物在代謝過程會產生許多的活性氧化物，逆境則會使得這些活性氧化物大量產生，此時會藉由抗氧化物質來清除，植物的抗氧化物可分為醱

素型的抗氧化醱素(POD、CAT)及非醱素型的抗氧化物質(植物色素)。生長至第一對葉時具較好的抗逆能力，與色素或醱素有關呢？在附近大學(光度計及高速離心機)的協助下，開始植物色素與抗氧化醱素的探討。色素與醱素萃取前的相關逆境處理如下：

分別取不同生長時期(長到子葉及第一對葉)台灣藜，進行以下逆境處理		
鹽逆境	濃度：ctrl、2%、3%	取樣天數：處理後第 2 天、第 4 天
乾旱逆境	程度：ctrl、w40%、w20%	取樣天數：處理後第 4 天、第 8 天

1. 非醱素型抗氧化~植物色素與逆境關聯

由文獻查詢，了解除花青素外，葉內含有的類黃酮也具有很強的抗氧化能力，為抗氧化指標之一。我們針對花青素及類黃酮的含量，來比較生長至子葉及第一對葉時的含量，藉以釐清為何第一對葉具有較好的抗逆能力。

◎花青素：

- (1) 取不同處理條件下之樣本，以液態氮磨成粉末。(圖 17a)
- (2) 將含有 1% HCl 的甲醇溶液 3 ml 加入研鉢中進行萃取。
- (3) 將萃取液吸取至離心管，並以 4°C、2000rpm 離心 15 分鐘。(圖 17b)
- (4) 吸取上清液至比色管，以光度計測定波長 530、657 nm 之吸光值。(圖 17c)
- (5) 計算花青素含量:花青素含量 (μmol / g)=(A530-0.33 x A657/31.6) x 萃取液(ml) / g

◎類黃酮：

- (1) 取不同處理條件下之樣本，以液態氮磨成粉末。
- (2) 將含 1% HCl 的乙醇溶液 3ml 加入研鉢中萃取。
- (3) 萃取液吸取至離心管，4°C、3000rpm 離心 10 分，移至比色管，測定 540nm 之吸光值
- (4) 計算類黃酮含量，計算公式如下：類黃酮含量(A540/g) = OD 540 x 萃取液體積(ml)/g



圖 17a 以液態氮進行研磨

圖 17b 於低溫下進行離心

圖 17c 以光度計測量吸光值

2. 酵素型抗氧化~抗氧化酵素與逆境關聯

除了非酵素型的植物色素外，抗氧化酵素也扮演了重要的角色，選取常作為抗氧化指標的過氧化物酶及過氧化氫酶，試著比較生長至子葉及第一對葉的活性是否有所差別。

◎蛋白質萃取

- (1) 稱量不同處理條件處理下之葉，以液態氮磨成粉末。
- (2) 加入 400 μ l 磷酸緩衝液(pH7.4，含 1：1000 稀釋之蛋白質酶抑制劑)，均勻混合。
- (3) 將萃取液吸至 1.5ml 離心管，以 4°C、17600rpm 離心 10 分鐘(圖 18a)。
- (4) 將上清液吸取至新的 1.5ml 離心管內(圖 18b)，置於冰上備用。

◎過氧化物酶(POD)活性測量

- (1) 於比色管內加入 500 μ l 磷酸緩衝液、250 μ l 蒸餾水與 100 μ l 5%愈創木酚。
- (2) 加入 4 μ l 蛋白質樣本，混合均勻，最後加 10mM 過氧化氫溶液 100 μ l，置入光度計。
- (3) 以 470nm 測量吸光值在第一分鐘變化。以(OD470 / 鮮重)作為活性比較

註：乾旱逆境樣本，因酵素活性偏低，第 1 分鐘無法看出變化，以反應 5 分鐘作為比較。

◎過氧化氫酶(CAT)活性測量

- (1) 於石英比色管內加入 50mM 過氧化氫溶液 990 μ l。
- (2) 加入 10 μ l 蛋白質樣本，混合均勻，置入光度計(圖 18c)。
- (3) 以 240nm 測量第一分鐘吸光值變化。以(OD240 / 鮮重) 作為活性比較。



圖 18a 蛋白質萃取液離心



圖 18b 離心後抽取上清液



圖 18c 紫外光度計~測量 CAT

(二) 探討外部型態與抵抗逆境的關聯

台灣藜生長至第一對葉之後，顯微鏡下可明顯看到顆顆囊狀細胞，而蒸散作用主要通道的氣孔，也讓我們好奇這些外部型態會因逆境而有所變化嗎？

1. 氣孔開關與逆境關聯：

(1) 分別取不同條件，下表皮製成玻片(圖 19c)，計算單位視野(100x)內氣孔關閉比例。

(2) 乾旱處理：於第 4 天、第 8 天進行記錄，記錄方式與鹽逆境相同。(N=3，三重覆平均)

2. 囊狀細胞與逆境關聯 (逆境設定資料，鹽逆境(ctrl、2、3%)、乾旱逆境(ctrl、w40%、w20%))

(1) 鹽逆境處理：分別將生長至子葉及第一對葉之植株，鹽處理後第 2、4 天進行觀察。

(2) 記錄葉面葉背在顯微鏡單位視野下，囊狀細胞密度及面積(圖 19ab)。

(3) 乾旱處理：於第 4 天、第 8 天進行記錄，方式與鹽逆境相同。(N=3，三重覆平均)



圖 19a 葉背下完整囊狀細胞

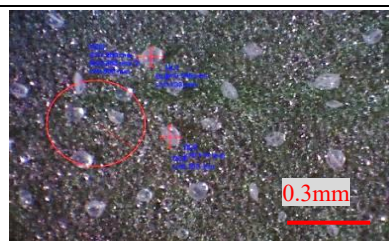


圖 19b 鹽逆境密度、面積減少

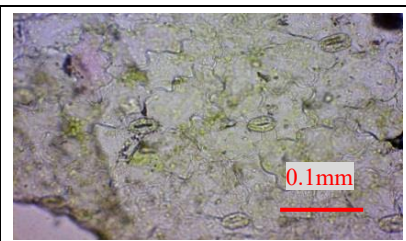


圖 19c 計算氣孔開關比例

四、探討鹽逆境下囊狀細胞的角色

在研究三，發現鹽逆境下，囊狀細胞密度、面積均有下降趨勢，顯示囊狀細胞的存在可能與協助抗逆有關。為進一步了解囊狀細胞功能，將其刷除(圖 20)，比較有無囊狀細胞在逆境下的反應，並探討囊狀細胞的功能與角色。



圖 20 刷除囊狀細胞後，鹽處理

(一) 探討刷除囊狀細胞是否對生長造成影響

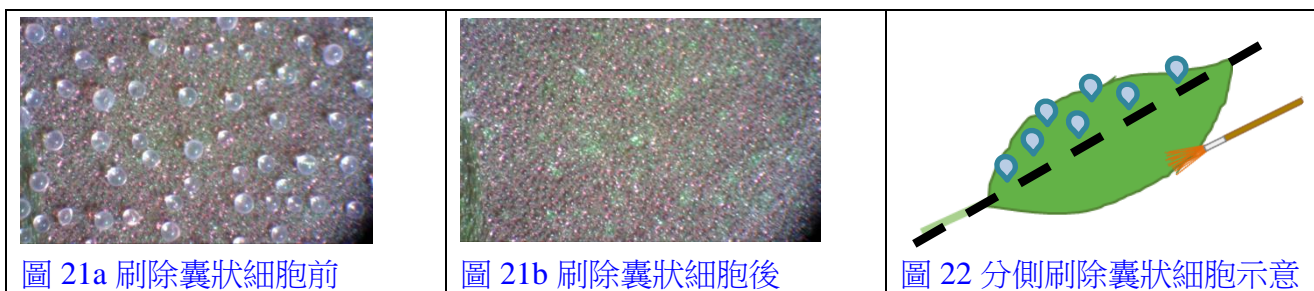
為避免刷除囊狀細胞造成傷害，先在無逆境(以水澆灌)狀態下，比較兩者生長情形。

刷除第一對葉的囊狀細胞，4 天後與對照組比較生物質量及葉面積。N=6，二重覆

(二) 鹽逆境下，刷除囊狀細胞對生長的影響

了解刷除囊狀細胞，對台灣藜的幼苗不會造成顯著影響後，接著進行鹽處理，來確認鹽逆境下，囊狀細胞的有無，是否會對生長造成影響。

1. 刷除第一對葉的囊狀細胞後，再以 2%、3% 鹽處理。
2. 鹽處理 4 天後，與對照組比較生物質量及葉面積。N=6，二重覆



(三) 刷除囊狀細胞對抗氧化酵素活性的影響

1. 將生長至第一對葉的台灣藜，分別進行鹽逆境(2%、3%)處理，2 天後取樣。
2. 取同一葉片，均分為兩側，各秤量 0.1g，一側刷除囊狀細胞，另一側保留(圖 22)。
3. 立即以液態氮均質磨碎，加入 assay buffer 0.2ml。
4. 在 4°C，以 16500rpm 進行離心 15min 後，分別取出上清液 35 μ l 至另兩離心管，一管為 High control、另一管為 sample 組。處理流程如下：

4-1 High control 組(HC，停止 CAT 活性)

- (1) 加入 43 μ l 的 assay buffer 至上清液離心管中，使總體積為 78 μ l。
- (2) 加入 10 μ l 的 stop solution(對過氧化氫酶具專一性)至管內，在 25°C 下，反應 5min，以終止酵素反應(圖 23a)。
- (3) 加入 12 μ l 1mM H₂O₂ 至上述離心管內，並置於 25°C 水浴槽內，反應 1hr。

4-2 sample 組(2%、3% 鹽處理組)

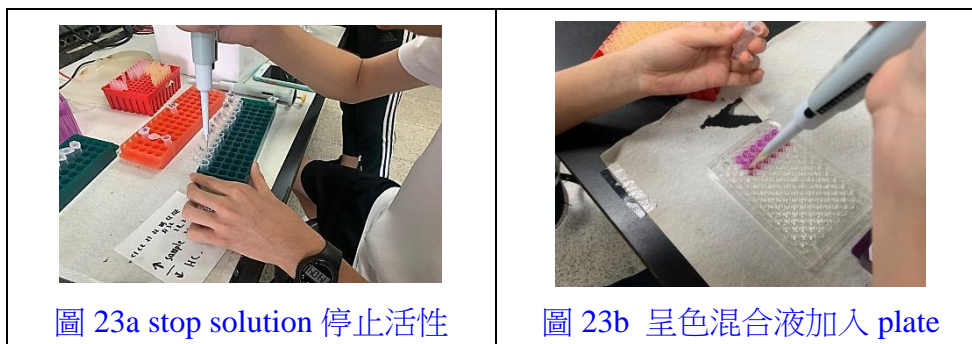
- (1) 分別加入 43 μ l 的 assay buffer 至上清液離心管中，使總體積為 78 μ l。
 - (2) 加入 12 μ l 1mM H₂O₂ 至上述離心管內，並置於 25°C 水浴槽內，反應 1hr。
 - (3) 加入 10 μ l 的 stop solution 至管內，在 25°C 下，反應 5min。
5. 分別加入呈色反應液 50 μ l (46 μ l Assay Buffer、2 μ l OxiRed™ Probe、2 μ l HRP solution)，於 HC 組及 sample 組之離心管內，並在 25°C 下，反應 10min。

6. 分別將 HC 組及 sample 組內的混合液，各取出 100 μ l 至 96 Wells ELISA Plate 中(圖 23b)，並以微盤分析儀(ELISA reader)OD570 進行測量(圖 23c)。

計算過氧化氫酶活性如下：

$$\Delta A = A_{HC} - A_{sample}$$

註：HC 及 sample 之差值，即為過氧化氫酶的活性改變，數值愈大，表示 CAT 活性愈大

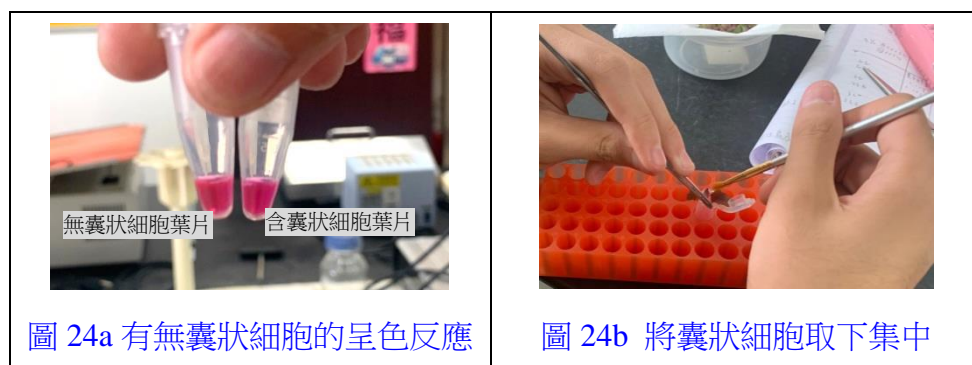


(四)探討囊狀細胞的功能與角色

上個實驗中，藉由刷除囊狀細胞，來比較有無囊狀細胞的葉片，CAT 活性變化的差別，發現有刷除囊狀細胞的葉片，CAT 活性明顯較含有囊狀細胞的組別少，離心管內的呈色反應也較淺(圖 24a)。

我們推測囊狀細胞可能具有 CAT，具有清除過氧化氫的活性存在。接著，進一步將鹽逆境下的囊狀細胞取出，直接測定 CAT 活性表現的情形。

1. 將生長至第 5 對葉之台灣藜，分別以 2、3%鹽逆境處理，2 天後取樣。
2. 將囊狀細胞刷下，並集中於離心管內，秤量約 0.05g (圖 24b)。
3. 加入 assay buffer 0.2ml 後，以離心管研磨杵磨碎。在 4°C，以 16500rpm 進行離心 15min 後，分別取出上清液 35 μ l 至另兩離心管，一管為 High control、另一管為 sample 組。
4. HC 組及 sample 組之 CAT 活性分析方式同上個實驗。



伍、研究結果

一、觀察台灣藜在不同逆境(鹽、乾旱)下的生長情形

(一)探討不同逆境下的種子發芽率

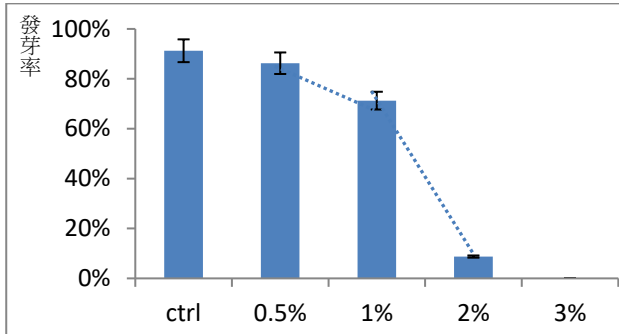


圖 25a 不同鹽逆境下的發芽率

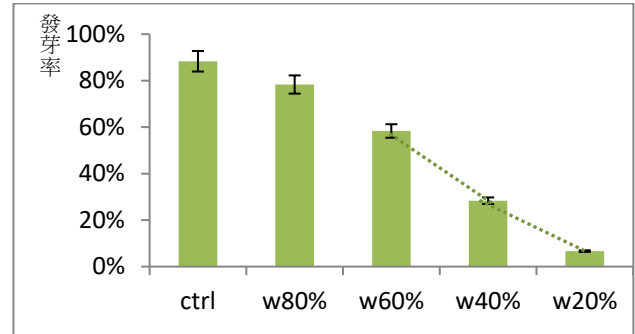


圖 25b 不同乾旱逆境下的發芽率

在不同鹽逆境下的發芽率結果，當鹽濃度上升至 1%時可看出發芽率受到抑制。而提升較高的鹽逆境至 2%時，發芽率大幅下降(低於 10%)。在不同乾旱逆境下的結果，當乾旱程度降至 w40%時，發芽率大幅下降，乾旱程度最重的 w20%組別，仍有約 6.6%發芽率。

(二)探討不同逆境下，台灣藜的生長情形

文獻上關於逆境的型態記錄不多，因此我們由發芽開始記錄不同時間點的生長情形。

1. 鹽逆境下的生長情形

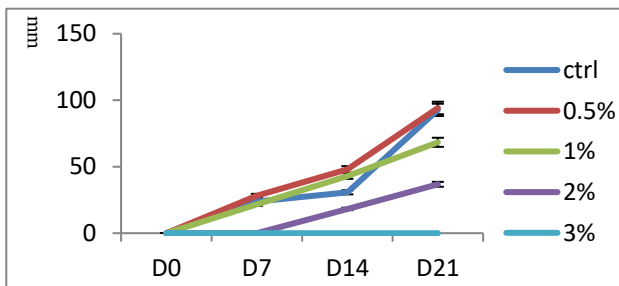


圖 26a 不同鹽逆境下的根長

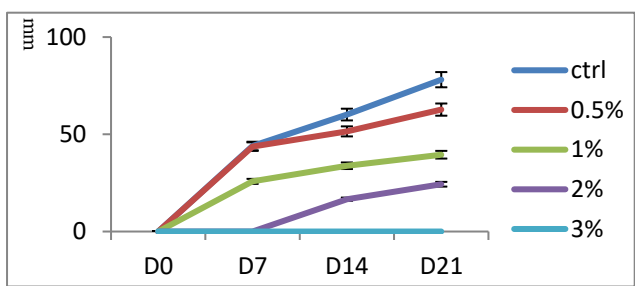


圖 26b 不同鹽逆境下的莖長

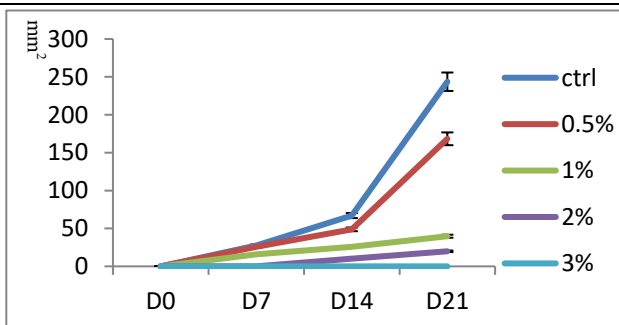


圖 26c 不同鹽逆境下的最大葉面積

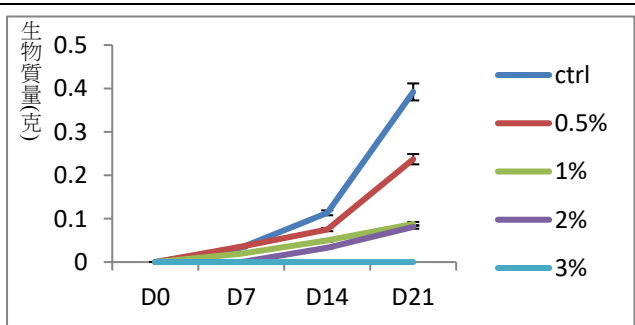


圖 26d 不同鹽逆境下的生物質量

台灣藜幼苗的生長，隨著鹽逆境程度提升，被抑制生長也隨之上升，尤其高濃度 2%組別。

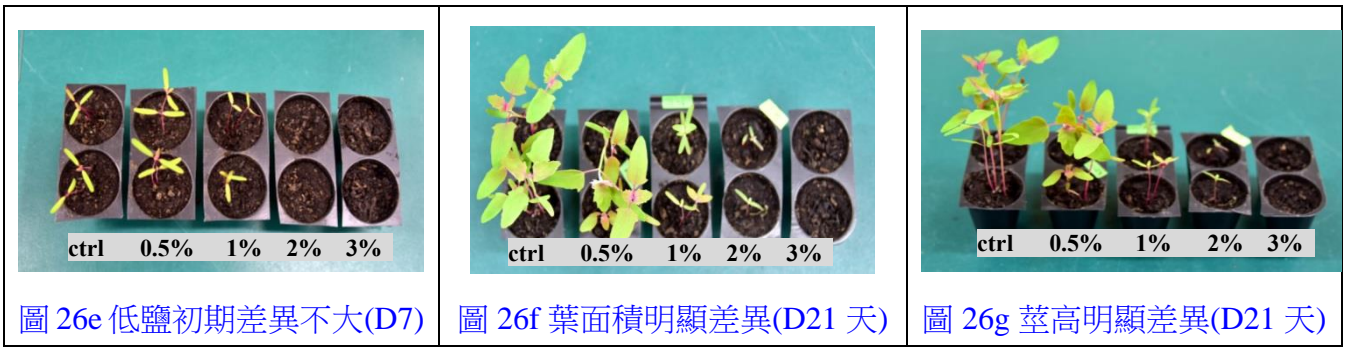


圖 26e 低鹽初期差異不大(D7)

圖 26f 葉面積明顯差異(D21 天)

圖 26g 莖高明顯差異(D21 天)

2. 乾旱逆境下的生長情形

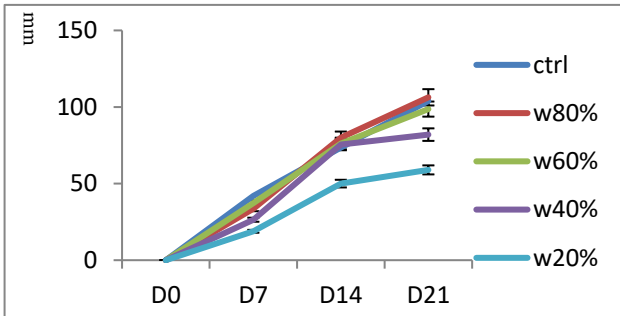


圖 27a 不同乾旱逆境下的根長

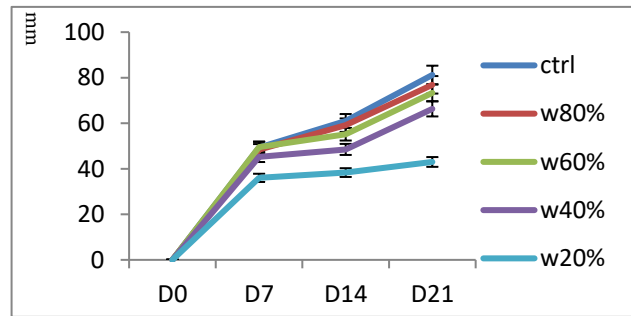


圖 27b 不同乾旱逆境下的莖長

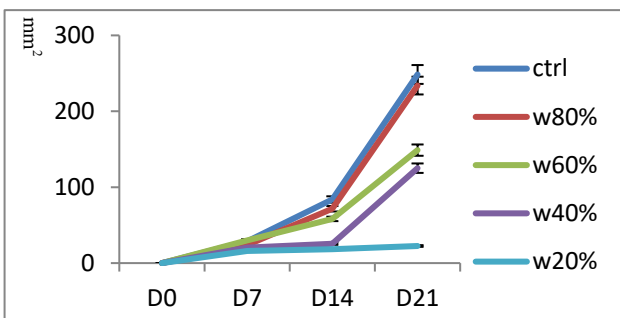


圖 27c 不同乾旱逆境下的最大葉面積

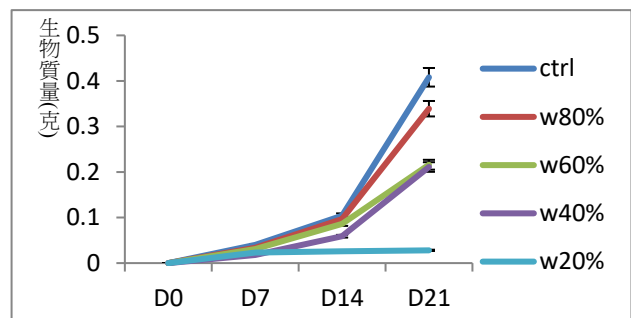


圖 27d 不同乾旱逆境下的生物質量

乾旱逆境，不同時間的生長結果發現，整體而言，隨著乾旱程度的加深，生長受到抑制的情形也隨之加重。尤其土壤含水量最低的 w20%組別，除了根之外，生長情形幾乎停滯。



圖 27e 生長初期差異不大

圖 27f w20%組莖長明顯較小

圖 27g 葉面積 ctrl 及 w80%類似

由研究一的生長結果，令我們納悶，資料查詢表示台灣藜具很強抗逆能力，但逆境下的種植結果並非如此，這是否暗示著台灣藜生長初期，可能還沒發展出較為成熟的抗逆能力呢？

二、探討較能抵抗逆境的生長時期

由上個實驗的結果暗示，台灣藜可能需生長至某個時期才開始發展出抗逆能力，因此接下來，我們將探討台灣藜在哪個生長時期(子葉、第一對葉...)，開始較能適應逆境。

(一)鹽處理下，較能抵抗逆境的生長時期

為了解鹽逆境對不同生長時期影響，選用研究一中，生長較不利的高鹽(2、3%)環境作為比較。

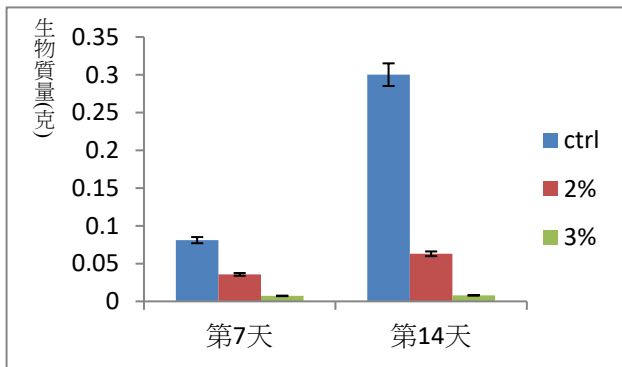


圖 28a 長到子葉，鹽處理 7、14 天生物質量

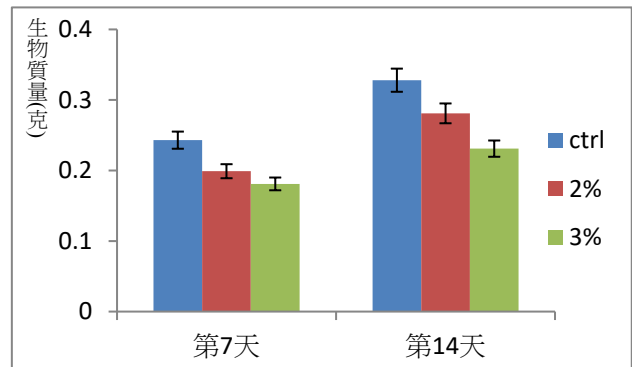


圖 28b 長到第一對葉，鹽處理後生物質量

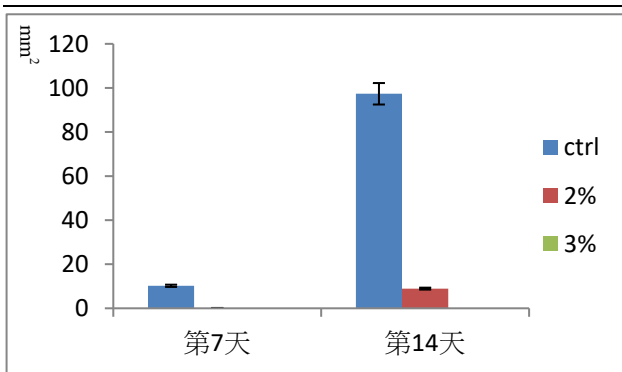


圖 28c 長到子葉，鹽處理 7、14 天之新葉面積

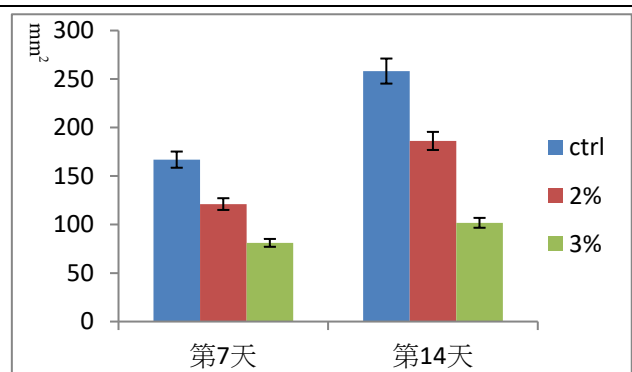


圖 28d 長到第一對葉，鹽處理後之新葉面積

結果顯示，生長至子葉開始進行的鹽處理，此時已具有抗逆能力，但發展尚未成熟，生長情形受大幅度抑制，尤其 3% 逆境，整個生長幾乎停滯；而生長至第一對葉時，相對於子葉，已具有相當不錯的抗逆境力，暗示著此時期開始發展出較為成熟的抗鹽能力。

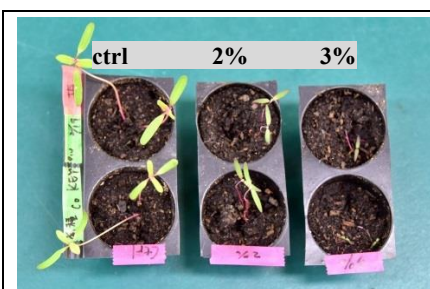


圖 28e 子葉，鹽處理後第 7 天

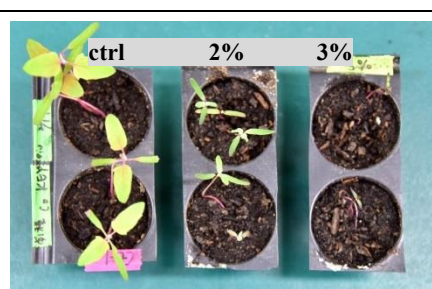


圖 28f 子葉，鹽處理後第 14 天

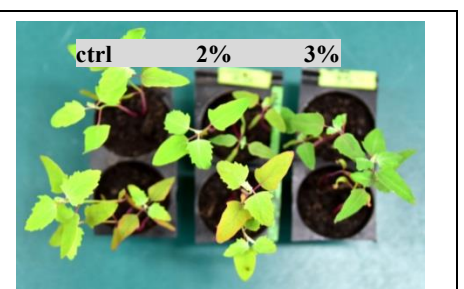


圖 28g 第一對葉，鹽處理後 7 天

(二)乾旱處理下，較能抵抗逆境的生長時期

這個部份，我們選用研究一中乾旱程度較高，生長較不良的 w40%、w20%，進行比較。

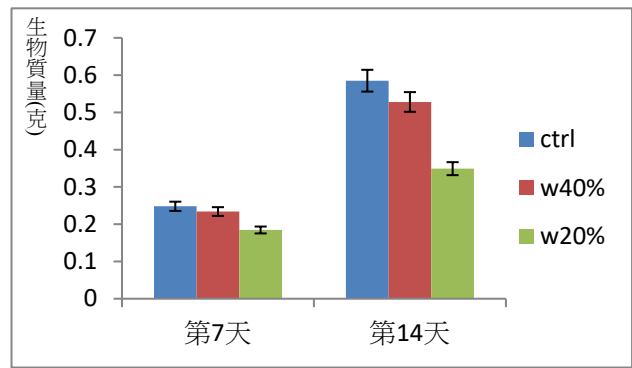
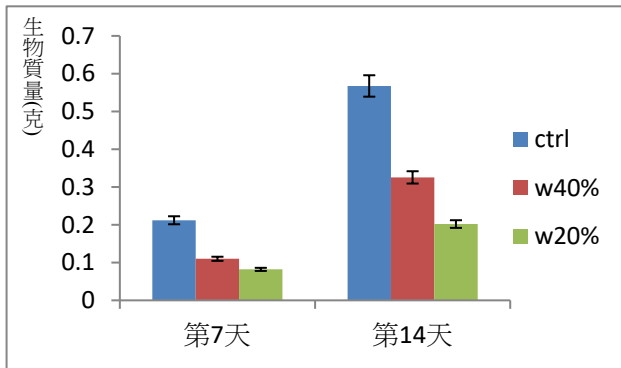


圖 29a 長到子葉，乾旱處理 7、14 天生物質量

圖 29b 長到第一對葉，乾旱處理後之生物質量

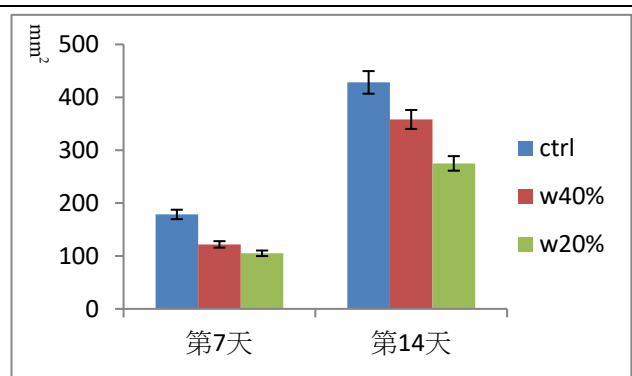
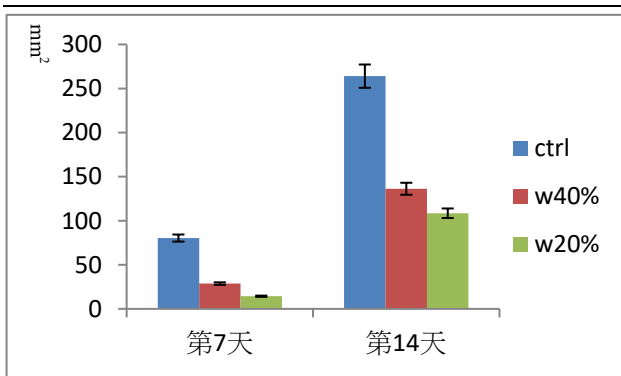


圖 29c 長到子葉，乾旱處理 7、14 天新葉面積

圖 29d 長到第一對葉，乾旱處理後之新葉面積

乾旱逆境對不同生長時期的結果，生長到子葉開始進行的乾旱處理，生物質量及葉面積均受到一定程度的抑制，尤其 w20%的組別與 ctrl 相比生物質量及葉面積分別下降 60.9%與 58.2%；而與生長到第一對葉進行處理的組別比較，第一對葉組的對抗旱能力顯著優於子葉組，暗示著在乾旱程度較高的環境下，第一對葉可能發展出較為良好的抗逆能力。

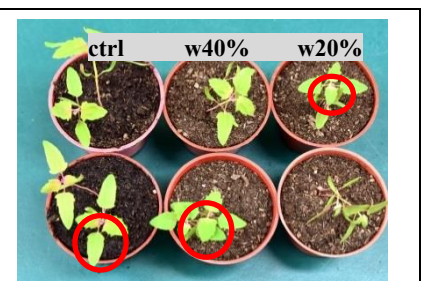
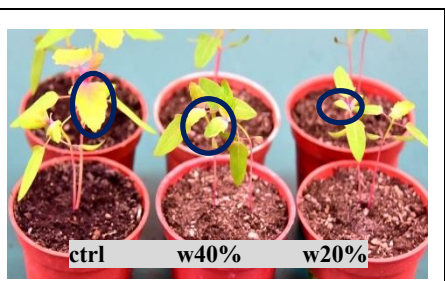
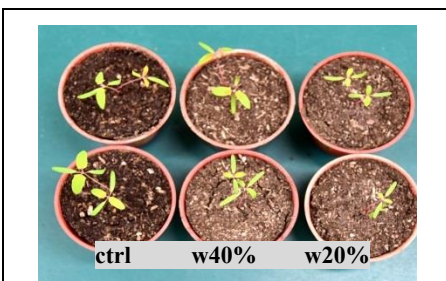


圖 29e 子葉，乾旱處理後 7 天

圖 29f 子葉，乾旱處理後 14 天

圖 29g 第一對葉，乾旱後 7 天

在探討發展至哪個生長時期較能抗逆的結果上，子葉在鹽、乾旱均可發現受到相當大程度的抑制，而生長至第一對葉後，不論是鹽或是乾旱逆境，都發展出較為成熟的抗逆能力。
生長到第一對葉後，究竟台灣藜出現了什麼樣的變化，使得這個時期較能適應逆境呢？

三、探討較能抵抗逆境的可能原因

這個部份，我們比較生長至子葉以及第一對葉時，在內部生理及外部型態出現什麼變化。

(一) 探討內部生理與抵抗逆境的關聯

1-1 鹽逆境下，非酵素型抗氧化 ~ 植物色素含量比較

種植過程，台灣藜葉背有醒目的花青素累積，除花青素外，類黃酮也是植物抗氧化的重要指標。這個部份我們將針對植物色素進行探討，以釐清第一對葉為何具有較好的抗逆能力。

(1) 花青素含量比較

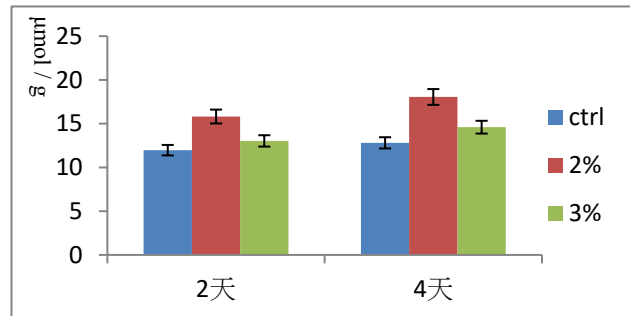
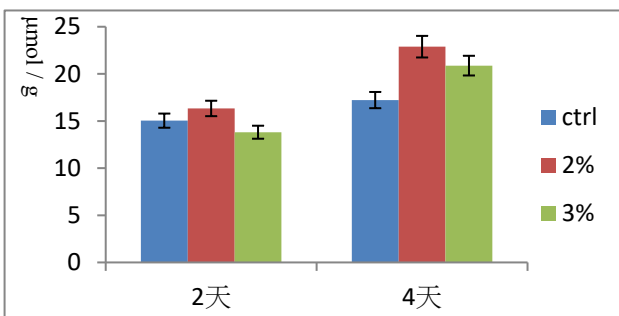


圖 30a 長到子葉時，鹽處理下之花青素比較

圖 30b 長到第一對葉，鹽處理下之花青素比較

在花青素的比較結果上，不論是子葉或是第一對葉，大致上 2% 組別均較 ctrl 的花青素多。結果顯示花青素在子葉及第一對葉時期，均有協助抵抗逆境的能力。

(2) 類黃酮含量比較

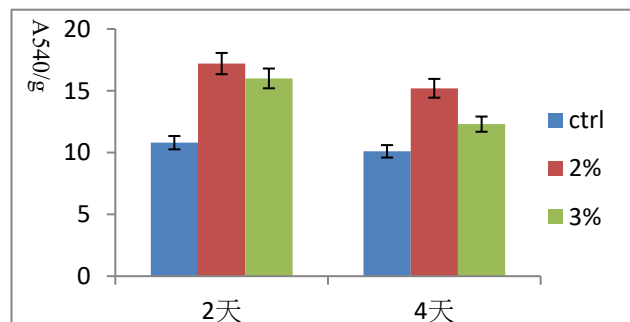
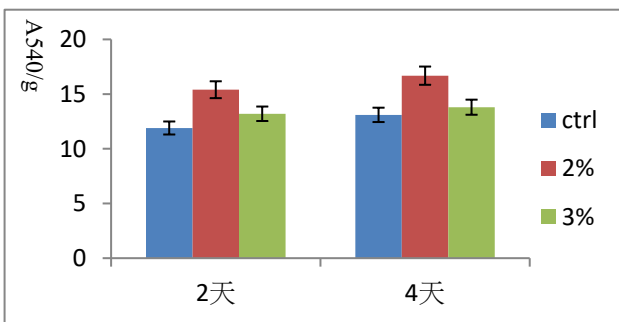


圖 30c 長到子葉，鹽處理下之類黃酮比較

圖 30d 長到第一對葉，鹽處理下之類黃酮比較

在類黃酮的比較結果上，發現不論是子葉時期或是第一對葉，2% 的組別均較 ctrl 組的類黃酮多。在兩種植物色素抗氧化部份，顯示在鹽逆境的刺激下，子葉及第一對葉均有增加的趨勢。

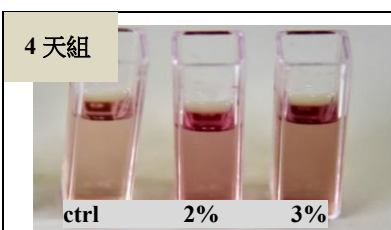


圖 30e 鹽逆境，子葉花青素

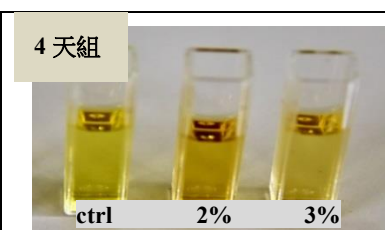


圖 30f 鹽逆境，子葉類黃酮

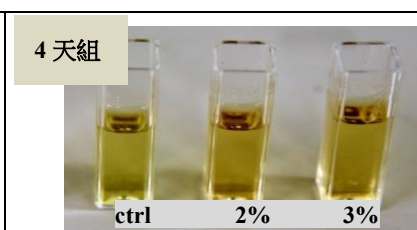


圖 30g 鹽逆境，第一對葉類黃酮

1-2 鹽逆境下，酵素型抗氧化 ~ 抗氧化酵素活性比較

上個實驗結果，顯示在逆境下由子葉開始，就有較多的植物色素出現，那第一對葉的較好抗逆能力還有其它可能原因嗎？我們進行了常見的抗氧化酵素 POD 及 CAT 來進行比較。

(1)過氧化物酶(POD) 活性比較

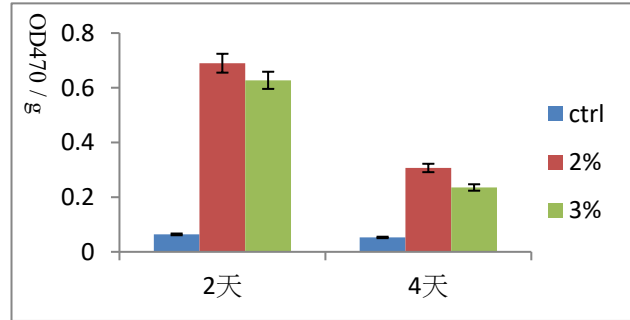
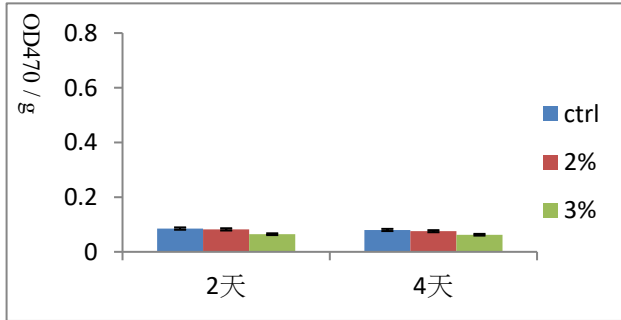


圖 31a 長到子葉時，鹽處理之 POD 活性比較

圖 31b 長到第一對葉，鹽處理 POD 活性比較

於子葉時期，ctrl 與 2%組的活性類似，隨鹽度上升，活性有下降趨勢；但生長至第一對葉時，明顯看出 POD 在 2%逆境下大幅上升，達到 ctrl 的 10.8 倍左右，隨鹽度升高及逆境時間加長，活性有明顯下降狀態。顯示生長至第一對葉時，POD 可能具有協助抗鹽保護的能力。

(2)過氧化氫酶(CAT)活性比較

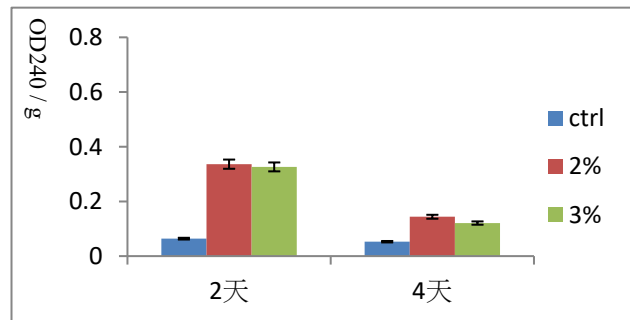
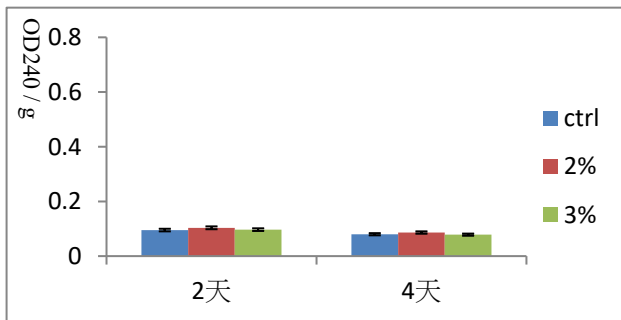


圖 31c 長到子葉，鹽處理下之 CAT 活性比較

圖 31d 長到第一對葉，鹽處理 CAT 活性比較

CAT 的部分，與 POD 類似，子葉時期的活性與 ctrl 組相比無太大差異；當生長至第一對葉時，2%、3%組別與 ctrl 相比，CAT 活性上升達 5.26 倍及 5.12 倍左右，隨逆境時間加長，活性下降，但 2%組別仍有 ctrl 組的 5.82 倍。生長至第一對葉時，CAT 也可能具有協助抗鹽能力。

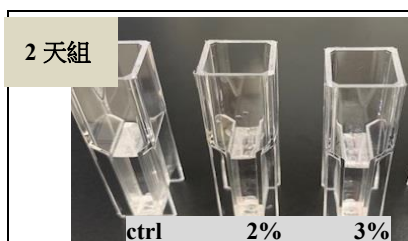


圖 31e 鹽處理，子葉 POD 活性

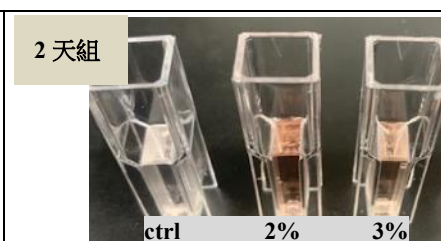


圖 31f 鹽處理，第一對葉 POD 活性

2-1 乾旱逆境下，非酵素型抗氧化 ~ 植物色素含量比較

上個實驗中，得知抗氧化酵素(CAT 及 POD)在第一對葉生長後，提供了台灣藜在鹽逆境下的保護能力，而在乾旱的結果如何呢？我們比較了植物色素及抗氧化酵素。

(1)花青素含量比較

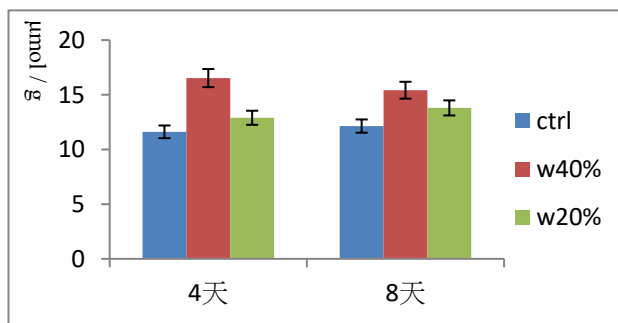
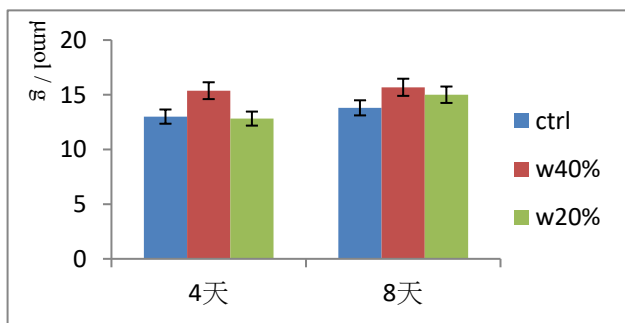


圖 32a 長到子葉時，乾旱處理之花青素比較

圖 32b 長到第一對葉，乾旱處理之花青素比較

由花青素的結果來看，子葉時的 w40% 與 ctrl 之 $p < 0.05$ ，達顯著差異，顯示花青素在子葉時期就會被乾旱逆境刺激，使得含量增加來協助抵抗逆境，但較高乾旱程度的 w20% 則與 ctrl 相差不大，推測可能超過耐旱的程度或是作物抗氧化物的花青素被消耗較多所致。

(2)類黃酮含量比較

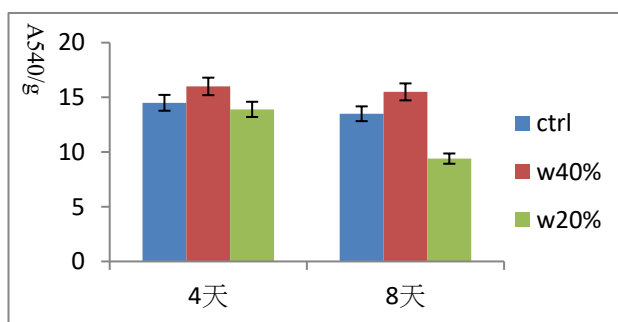
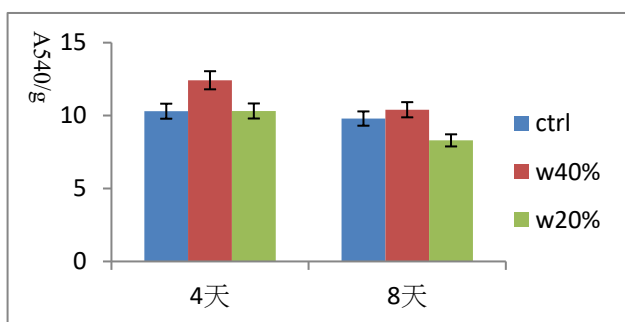


圖 32c 長到子葉，乾旱處理下之類黃酮比較

圖 32d 長到第一對葉，乾旱處理之類黃酮比較

類黃酮的含量比較與花青素也有類似的情形，由子葉開始遭遇乾旱逆境，就會產生高於 ctrl 組的類黃酮，生長至第一對葉才遭遇乾旱的情形也類似。與鹽逆境進行比較，乾旱逆境也有相同的趨勢，在子葉時期，不論是花青素還是類黃酮，皆有較高的含量以協助抵抗逆境。

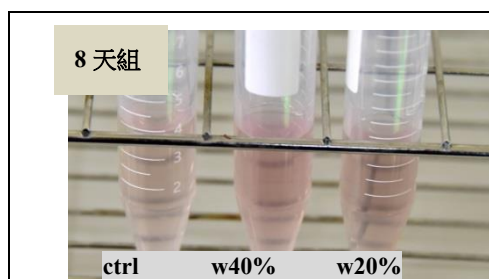


圖 32e 乾旱處理，離心後子葉花青素

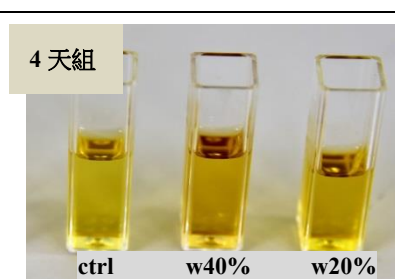


圖 32f 乾旱處理，第一對葉類黃酮

2-2 乾旱逆境下，酵素型抗氧化 ~ 抗氧化酵素活性比較

上個實驗結果與鹽逆境類似，植物色素由子葉即開始協助抵抗乾旱逆境，那第一對葉的較好抗旱能力會和鹽逆境相同，由抗氧化酵素來協助嗎？

(1) 過氧化物酶(POD)活性比較

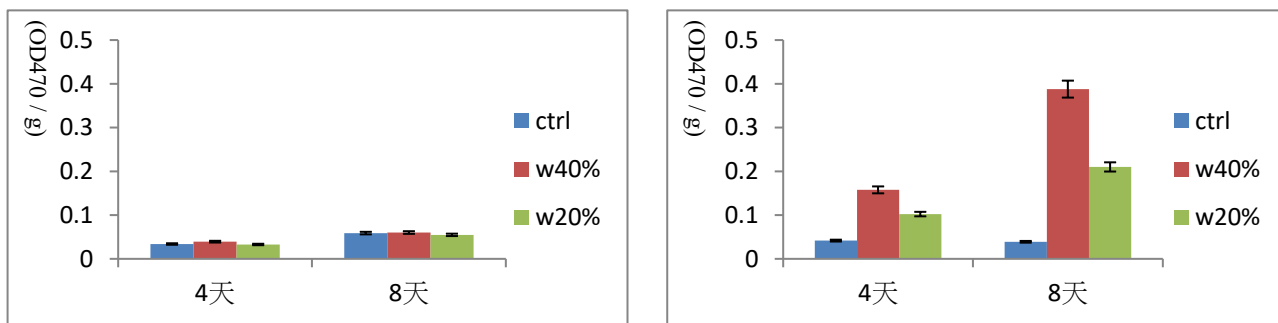


圖 33a 長到子葉時，乾旱處理之 POD 活性比較 圖 33b 長到第一對葉，乾旱處理 POD 活性比較

子葉時期的 POD 活性，似乎還沒發展成熟，當遭遇 w40%或是更乾旱的 w20%時，與 ctrl 比，酵素的活性變化不大，當生長至第一對葉時，可看出相當明顯的變化，處理 4 天時的 w40% 組與 ctrl 相比，活性上升約 3.6 倍，隨乾旱時間加長，POD 的活性均隨之上升。

(2) 過氧化氫酶(CAT)活性比較

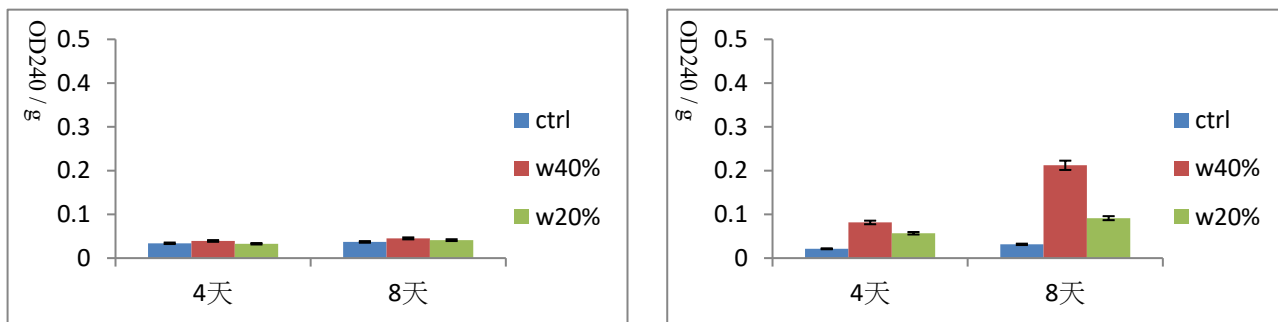


圖 33c 長到子葉，乾旱處理之 CAT 活性比較 圖 33d 長到第一對葉，乾旱處理 CAT 活性比較

子葉時期的 CAT 與 POD 的活性變化情形類似，台灣藜幼苗長至第一對葉時，才明顯看出 CAT 在乾旱逆境下的變化情形，尤其 w40%組，在乾旱處理 4 天與 8 天的 CAT 活性變化，分別是 ctrl 的 3.8 倍及 6.9 倍，而 w20%的活性有顯著的下降，但仍較 ctrl 組高。

在比較不同生長時期(子葉、第一對葉)，具有較好的抗逆能力可能原因，發現鹽逆境及乾旱處理下的結果類似，在內部生理方面，長至第一對葉時，可能因內部的抗氧化酵素較為成熟而發展出較好的抗逆能力，除了內部物質的協助抗逆之外，台灣藜的外部型態方面，是否也有協助抗逆的能力呢？

(二) 探討外部型態與抵抗逆境的關聯

首先，我們探討了氣孔的關閉率，水分缺乏的狀態會使得氣孔關閉，此外由子葉之後(上胚軸)可觀察到明顯囊狀細胞，這會與逆境相關嗎？與第一對葉的較強抗逆能力有關嗎？

1. 外部型態~氣孔關閉率與不同逆境

(1) 氣孔關閉率與鹽逆境

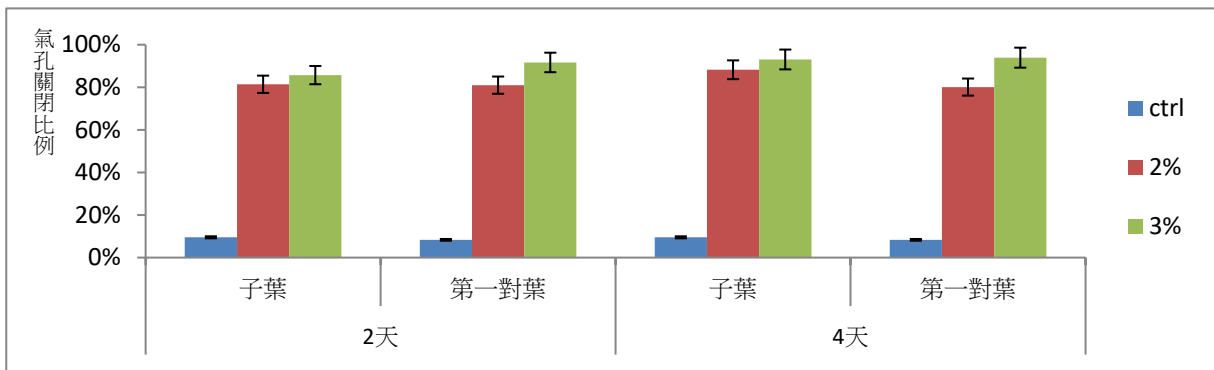


圖 34b 不同鹽逆境對不同生長時期之氣孔關閉率

實驗結果發現不論子葉或第一對葉，在鹽刺激下，有極高的比例氣孔關閉。這也顯示了第一對葉抗鹽能力較好與氣孔關閉較無關。

(2) 氣孔關閉率與乾旱逆境

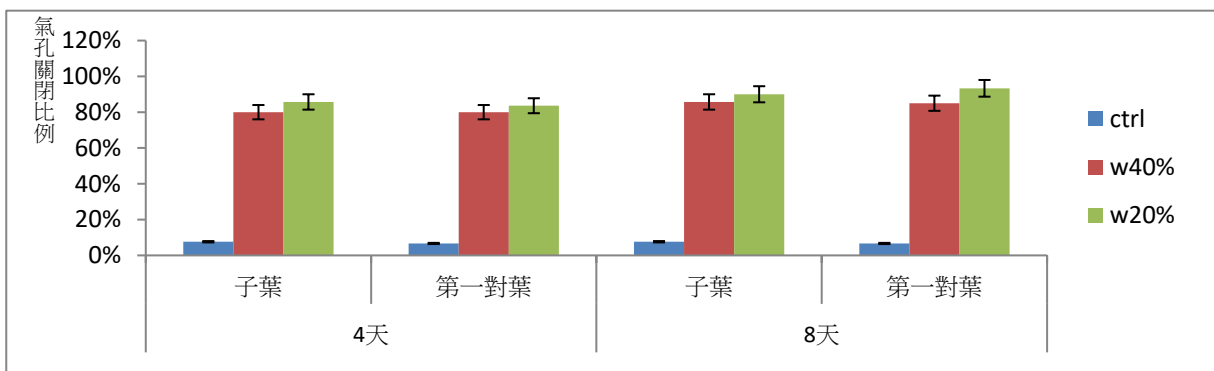


圖 34b 不同乾旱程度對不同生長時期之氣孔關閉率

不論是長到子葉或是第一對葉時期，氣孔均較 ctrl 組有極大幅度的關閉，與鹽逆境相同乾旱缺水的環境大多數氣孔呈現關閉。顯示第一對葉的抗逆能力較強可能與氣孔關閉度無關



圖 34c 第一對葉，氣孔多張開

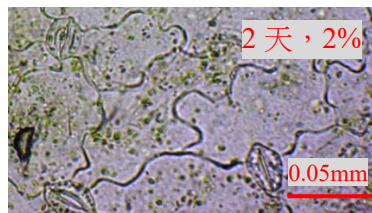


圖 34d 第一對葉，氣孔多關閉

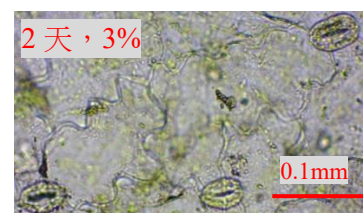


圖 34e 第一對葉，氣孔多關閉

2. 外部型態~囊狀細胞密度、面積與不同逆境

(1)囊狀細胞密度、面積與鹽逆境

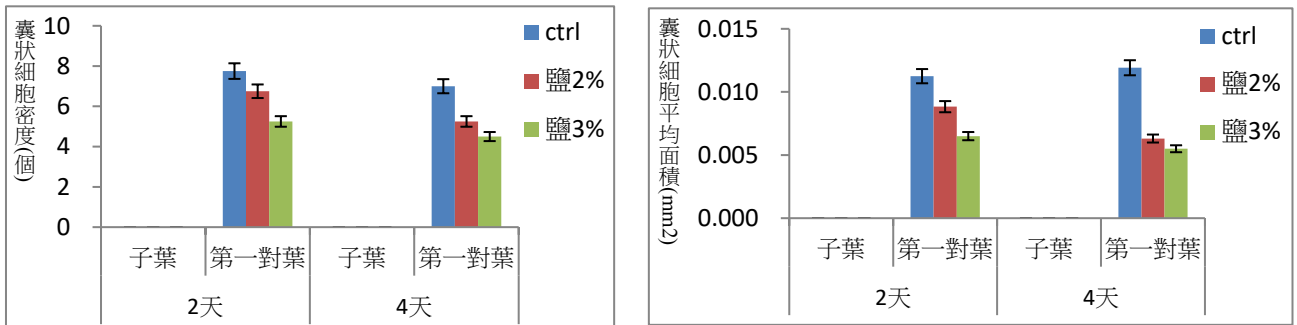


圖 35a 不同鹽逆境及處理天數，對不同生長時期的囊狀細胞密度及面積影響

顯微鏡下觀察，發現子葉無囊狀細胞。結果顯示生長至第一對葉，無論是囊狀細胞的密度或是面積，會隨著鹽度上升而下降(密度和面積的 ctrl 與 2%組， $p < 0.05$ 皆達顯著差異)，顯示生長至第一對葉時可能藉由囊狀細胞的密度下降及面積縮小來協助抗逆。

(2)囊狀細胞密度、面積與乾旱逆境

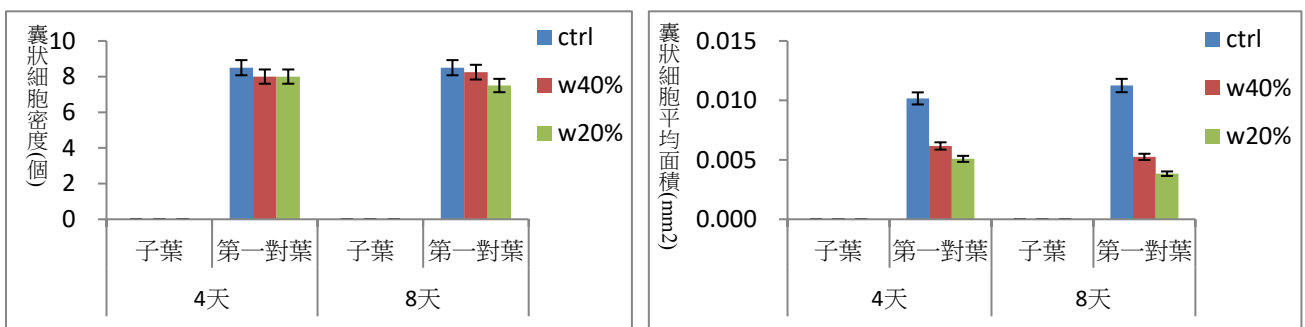


圖 35b 不同乾旱逆境及處理天數，對不同生長時期的囊狀細胞密度及面積影響

乾旱逆境下的結果顯示，密度方面差異不大(ctrl 與 w40%組， $p > 0.05$)，但面積有顯著性的縮小，這與鹽逆境同時造成囊狀細胞的密度及面積縮小不同。

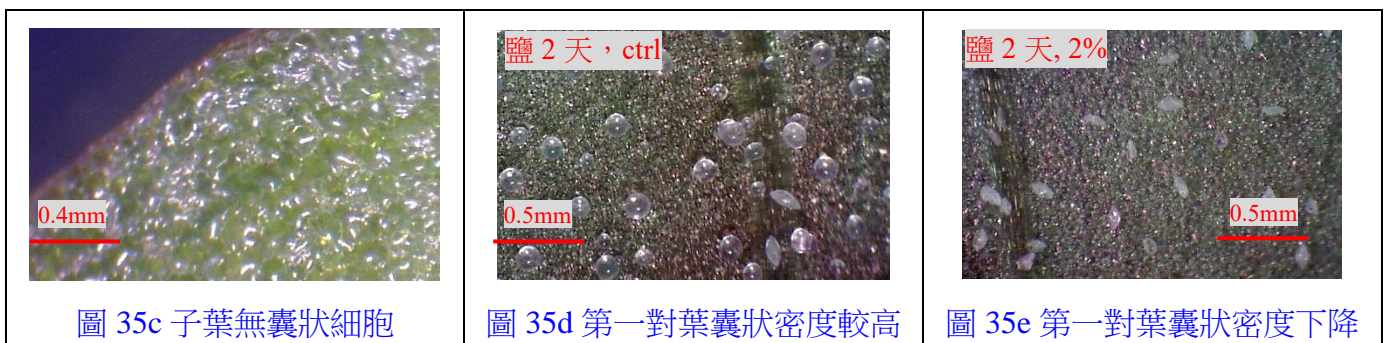


圖 35c 子葉無囊狀細胞

圖 35d 第一對葉囊狀密度較高

圖 35e 第一對葉囊狀密度下降

外部型態結果方面，囊狀細胞似乎與逆境之間有所關聯，尤其鹽逆境下，不論是密度或是面積均下降，這讓我們很好奇囊狀細胞在鹽逆境下扮演了什麼樣重要的角色與功能？

四、探討鹽逆境下囊狀細胞的角色

由研究結果三，了解生長至第一對葉之後的抗逆能力，可能與較成熟的抗氧化酵素及囊狀細胞有關，這個部份，將探討鹽逆境下，囊狀細胞的功能以及與抗氧化酵素之間的關聯。

(一) 探討刷除囊狀細胞是否影響生長

研究過程，發現囊狀細胞可被刷除，當刷除細胞後，是否抗鹽能力會受到影響？為避免刷除可能造成幼苗生長的傷害，我們先比較未遭遇逆境下，刷除囊狀細胞對生長的影響。

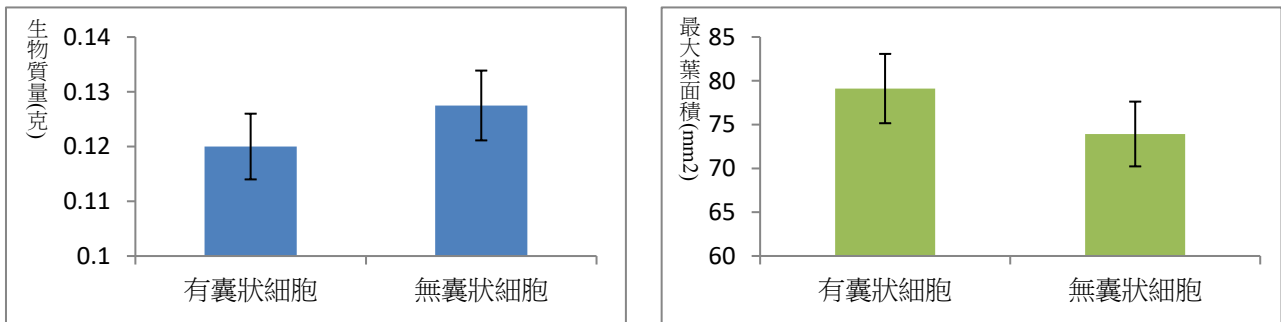


圖 36a 無逆境下，有無囊狀細胞對生長的影響

生物質量、葉面積，有無刷除囊狀細胞均未達顯著差異($p>0.05$)，顯示未遭遇逆境時，刷除囊狀細胞對台灣藜生長影響不大。接著將囊狀細胞刷除，以鹽逆境處理，了解囊狀角色。

(二) 鹽逆境下，刷除囊狀細胞對生長的影響

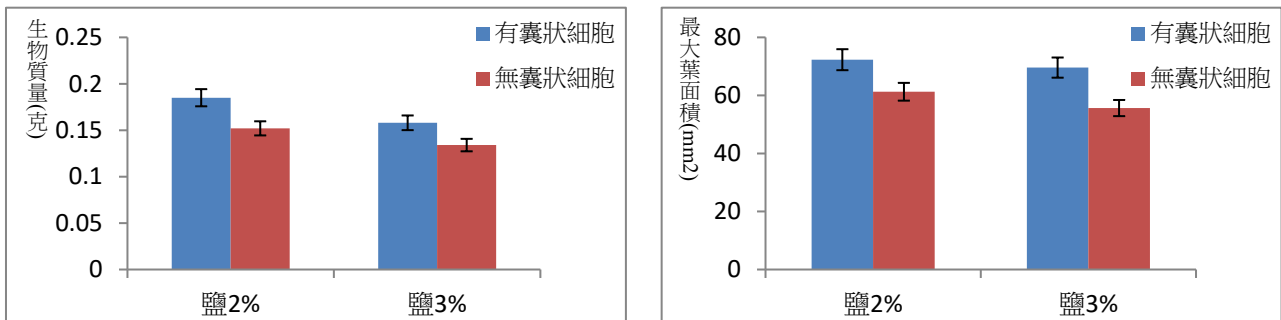


圖 36b 鹽逆境下，有無囊狀細胞對生長的影響

刷除囊狀細胞後，以鹽逆境處理，與無刷除相比，生物質量、葉面積分別達顯著差異 ($p<0.05$)，顯示囊狀細胞的存在，在鹽逆境下扮演了相當重要的角色，可能與排鹽有關。

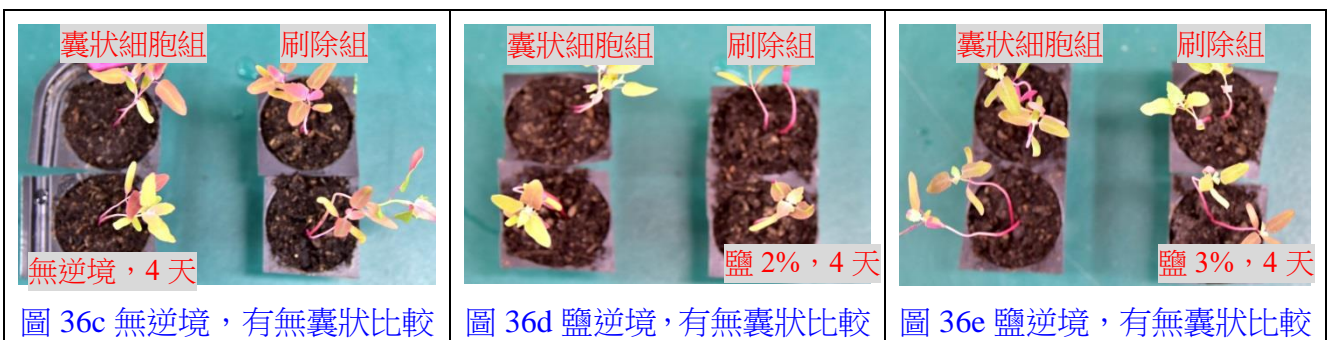


圖 36c 無逆境，有無囊狀比較

圖 36d 鹽逆境，有無囊狀比較

圖 36e 鹽逆境，有無囊狀比較

(三) 刷除囊狀細胞對抗氧化酵素活性的影響

由上個實驗中，我們了解在鹽逆境下的囊狀細胞，可能扮演了排鹽有關的角色，在研究結果三，也認知抗氧化酵素在逆境下的重要功能，接著我們想進一步探討囊狀細胞除了作為排鹽儲存外，還會有其它的功能嗎？是否與抗氧化酵素有關呢？

我們將鹽逆境處理後的植株，取同一片葉，均分為左右兩側，一側刷除囊狀細胞，另一側則無刷除。比較有無囊狀細胞的葉片，對過氧化氫酶(CAT)活性的影響。

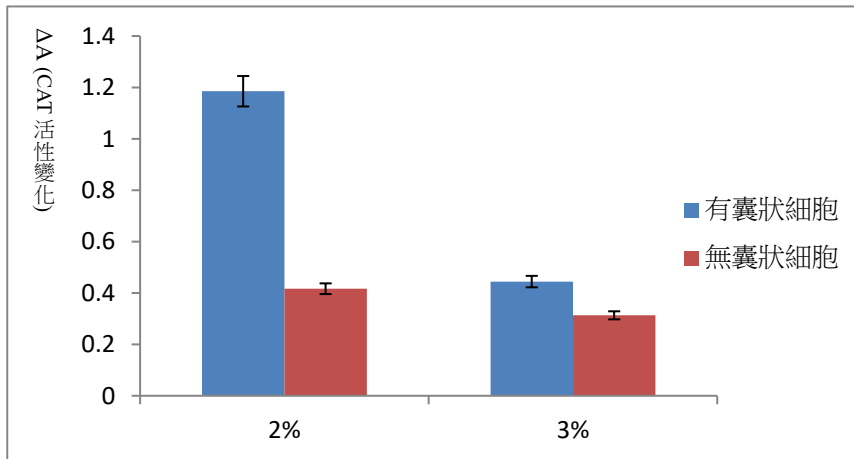


圖 37b 葉上有無囊狀細胞的 CAT 活性分析

a~2%含有囊狀細胞之葉片

b~2%刷除囊狀細胞葉片

圖 37b 鹽逆境處理後，刷除囊狀細胞對 CAT 活性變化比較

在 ΔA (CAT 活性變化)的數值上， ΔA 愈大，表示 CAT 的活性變化愈大，能分解較多的過氧化氫。在 2%鹽逆境處理，刷除囊狀細胞組之 CAT 活性變化，與未刷除組別相比，下降約 64%；而 3%鹽逆境處理，刷除囊狀細胞組別之 CAT 活性變化，則下降約 29%。顯示在刷除囊狀細胞的過程中，CAT 的活性有大幅下降的趨勢。

鹽處理後的台灣藜，不論是 2%或 3%，均可發現刷除囊狀細胞的組別(僅有葉片)，活性變化相對較小，而未刷除囊狀細胞的組別(葉片+囊狀細胞)，擁有較高的清除過氧化氫能力，即擁有較高的 CAT 活性。

CAT 活性變化的結果，顯示囊狀細胞可能具有較多的 CAT 活性能力，這顯示囊狀細胞可能有儲存抗氧化酵素(CAT)，協助清除過氧化氫的能力。

(四) 探討囊狀細胞的功能與角色

由刷除葉上的囊狀細胞實驗，發現未刷除的組別，CAT 活性變化較大，顯示含有囊狀細胞的葉子，可能有較大的抗氧化酵素活性。為進一步確認囊狀細胞協助抗逆的功能，將鹽逆境處理後的囊狀細胞刷取集中，進行酵素活性分析。

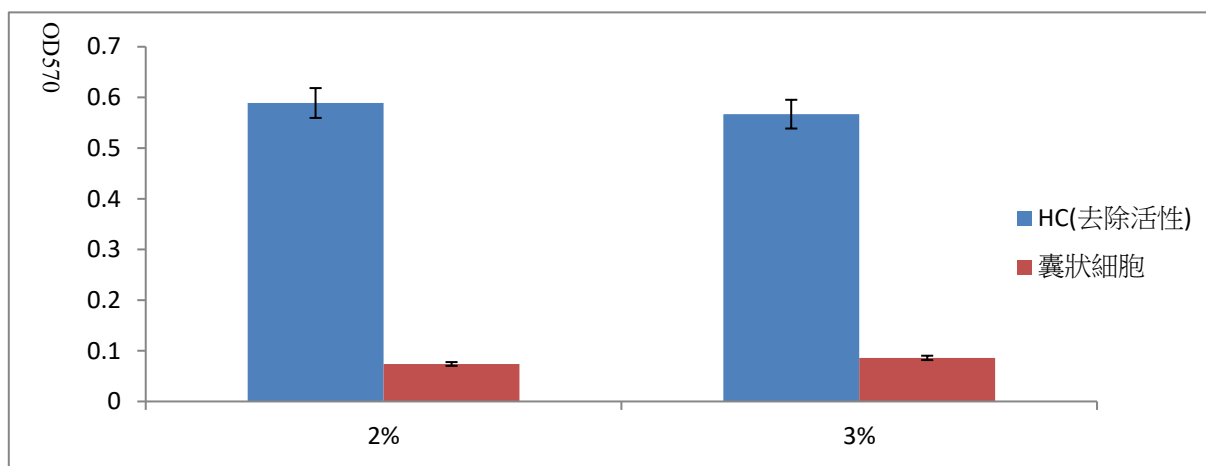


圖 38a 鹽逆境處理後，囊狀細胞內 CAT 活性變化比較

囊狀細胞 CAT 活性分析結果，OD570 數值愈大，表示 CAT 的活性愈低，過氧化氫被清除較少，使得 probe 的呈色反應較大。HC(High Control)則表示先以 stop solution 處理，停止 CAT 的活性，再進行分析。

鹽逆境 2% 下，囊狀細胞組將過氧化氫大量分解，使得 OD570 的數值大幅下降，與 HC 組的 OD 值相較，下降約 88%；而鹽逆境 3%，囊狀細胞與 HC 組相較，則下降約 84%。顯示在鹽逆境下，囊狀細胞內的 CAT 活性，具有大量清除過氧化氫的能力，這也是囊狀細胞除了作為排鹽儲存之外，具有不同協助抗逆能力的新面向。



圖 38b 囊狀細胞的 CAT 活性分析

a~2% 囊狀細胞；b~2% 囊狀細胞(HC)

c~3% 囊狀細胞；d~3% 囊狀細胞(HC)

在探討台灣藜囊狀細胞的角色方面，發現除了文獻的排鹽功能外，也由刷除囊狀細胞進行 CAT 活性分析，得知囊狀細胞內具有抗氧化酵素活性以協助抗逆、清除逆境產生的大量活性氧化物。子葉之後的上胚軸及第一對葉，開始佈滿了囊狀細胞，此時也是台灣藜發展出較良好抗逆的主要時期。

台灣藜的抗逆能力提升，可能與囊狀細胞所扮演的多重協助抗逆角色有關。

陸、討論

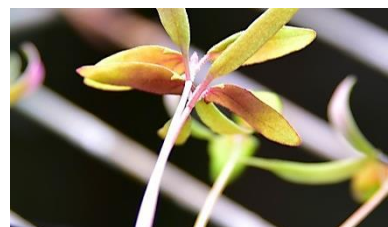
極端氣候的出現似乎成為常態，暖冬少雨導致連續乾旱，使得農作物收成大受影響，台灣更是全球排名第 19 的缺水國(2018)，據農委會資料指出 2019 年初乾旱造成的農作物損失



約 7.3 億元；而鹽害問題也造成農作物很大的威脅，據估計全球有 1/3 土地存在鹽害問題，過度施肥、地層下陷、颱風造成的海水倒灌等皆會造成土壤鹽化。當乾旱及鹽害發生的頻率逐漸上升時，探討具有較強抗逆能力的作物就顯得格外重要。

台灣藜種子深具高度營養及機能性成份，關於台灣藜在逆境下的生長情形及抗逆方式則相對較少，因此我們想要由逆境下的生長情形開始探討起。

首先是逆境的部份。依劉玉山(2009)將植物對鹽害反應，分為三大類：(1)鹽土植物，NaCl 濃度在 1.2~3%之間仍能生長，如紅樹林；(2)高鹽容忍非鹽土植物，如番茄；(3)淡土植物，NaCl 濃度在 0.3%左右即會對植物造成鹽害。因此我們將鹽害濃度依序設定為 ctrl(0%)、0.5%(淡土作物上設)、1%、2%、3%；屏科大古明萱農藝學教材指出，田間保水量約 60~80% 對作物的生長最佳，因此我們以實驗用的小紅盆最大的體積含水量*80%做為控制組(ctrl)，並依序設定 w80%(ctrl 含水量*80)、w60%、w40%、w20%等不同乾旱程度來進行探討。



在逆境下種植的結果卻發現，台灣藜耐鹽抗旱的能力並不如文獻所述，這引起了我們的好奇與疑惑，開始探討生長時期與逆境間關聯，以及較能抗逆的可能原因。植株上的囊狀細胞，會與逆境間有什麼樣的關聯呢？當逆境同時發生時，鹽逆境下的台灣藜是否能提升抗旱能力呢？以下是關於我們這一系列的討論：

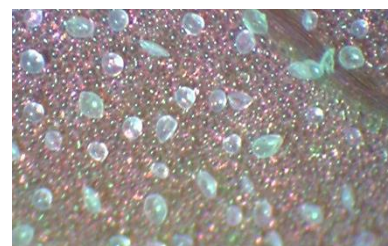


圖 40 台灣藜的花青素(上)與囊狀細胞(下)，抵抗逆境？

一、觀察台灣藜在不同逆境(鹽、乾旱)下的生長情形

1. 發芽率：缺水環境對發芽的抑制相對較少，w20%組別的含水量極低(接近土壤本身濕度)，但仍有少數能發芽，可見台灣藜具有極好的耐旱能力。比較張伶禕(2018)報告中，另一種台灣原生種抗逆植物番杏，在鹽逆境下發芽率(2%及 3%)，分別為 16%、7.8%，顯示台灣藜種子對逆境的忍受度相對較低。

2. 生長情形：在不同逆境下持續生長的幼苗，隨鹽及乾旱程度上升，造成很大的抑制。台灣藜在鹽逆境下生長以 ctrl(0%)最好，而乾旱逆境下則是 ctrl 與輕微乾旱的 w80%生長較好。



圖 41 0.5%鹽刺激，造成抑制

多數耐鹽作物，在輕微鹽逆境下有較好的生長情形，如張伶禕(2018)研究耐鹽作物番杏，0.5%下生長較好，而陳亮萱(2017)研究耐鹽冰花，也在 0.5%下生長較好，此外，黃蒼臻(2017)研究報告中，提及同為藜屬的藜麥，在 0.5%~1.2%鹽度，有最好的生物質量，這與我們研究的台灣藜結果不同，0.5%鹽逆境下，生長情形並不良，除了品種差異外，推測可能與台灣藜逆境適應的生長時期有關，

二、探討較能抵抗逆境的生長時期

在逆境下的生長結果與網路資料及文獻並不相同，我們推測台灣藜可能需生長至某個時期才發展出較成熟的抗逆能力，研究結果也顯示當生長至第一對葉時，發展出較能抵抗逆境的能力，



圖 42 第一對葉，抗逆開始？

此時期的生物質量與新生葉面積雖然均有下降趨勢，但與子葉時期相比，第一對葉抵抗逆境的能力相對較強。張伶禕(2018)研究原生種番杏報告，也提及番杏發展至第 3 對葉時，較能抵抗逆境，相較之下，台灣藜在較小的生長時期即開始發展抗逆能力。

三、探討較能抵抗逆境的可能原因

我們很好奇為何第一對葉時同時具備了抗鹽及耐旱的能力，發展至第一對葉與子葉時，除了外觀上的差別外，還有什麼發展使得抗逆能力出現差異。

(一)比較內部生理~非酵素抗氧化(植物色素)及酵素抗氧化(POD、CAT)

子葉即具有明顯花青素累積，文獻查詢後，了解花青素屬於類黃酮化合物，而類黃酮具有很強抗氧化能力，能清除代謝產生的活性氧分子，常作為抗氧化指標。黃蒼臻(2017)指出，台灣藜在種植 5 天之幼苗，低鹽度(0.5%)刺激下，會增加花青素及類黃酮含量。這與我們

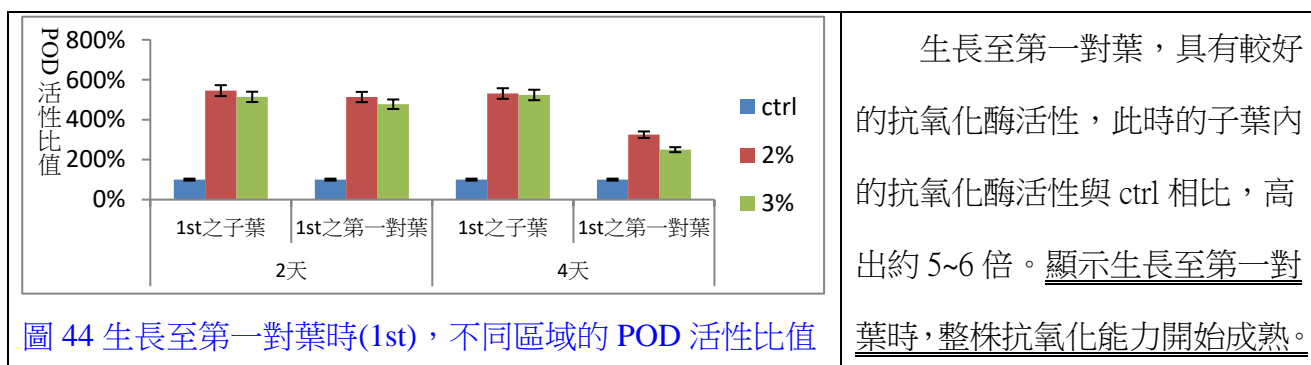


圖 43 新生葉花青素含量多

的結果類似，但比較子葉及第一對葉時，植物色素在逆境下的含量差異不大，並觀察到台灣藜新生葉具有明顯色素(圖 43)，推測台灣藜的植物色素在不同時期皆扮演了協助抗逆的角色。

我們探討了子葉與第一對葉的抗氧化酵素活性，發現生長至第一對葉時，遭遇鹽及乾旱逆境

下，不論是過氧化物酶(POD)或是過氧化氫酶(CAT)，均較 ctrl 組高出許多倍，這與薛貽恩(2017)報告相似，台灣藜幼苗的抗氧化酶活性，會在鹽逆境刺激增加。比較鹽及乾旱逆境，發現隨著鹽處理時間增加，而抗氧化酶活性下降，乾旱則隨著處理時間增加，而活性上升，可能是因為乾旱對台灣藜的影響較緩慢，尚未超過台灣藜對逆境的忍受程度。



(二)比較外部型態(氣孔關閉率、囊狀細胞密度、面積)

王定澤(2017)研究小米耐鹽報告，指出小米較稻米耐鹽，因小米對鹽較為敏感，在較低鹽刺激下能提早關閉氣孔。台灣藜在鹽與乾旱逆境下，子葉及第一對葉都有極高的關閉比例來避免水散失。比較子葉及第一對葉，在逆境下的氣孔關閉率相差不大。

台灣藜長至第一對葉時，有為數不少的囊狀細胞。在鹽及乾旱逆境中，囊狀細胞的面積均會下降，而囊狀細胞密度僅有鹽逆境下會顯著下降。這與張伶禕(2018)指出番杏的囊狀細胞，不會因鹽逆境而改變數量的結果不同。

子葉時期遭遇逆境時，仰賴植物色素(花青素、類黃酮)的保護，而待生長至第一對葉時，抗氧化酵素才逐漸成熟加上囊狀細胞的協助，也大幅提升了台灣藜的抗鹽耐旱能力。

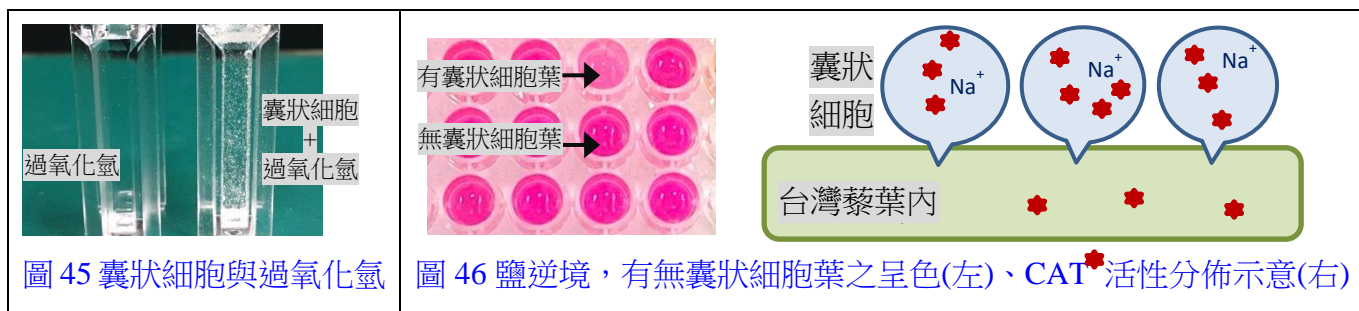
四、探討鹽逆境下囊狀細胞的角色

由研究二、三的結果發現，當囊狀細胞出現時，台灣藜的抗逆能力有較好的提升，顯示囊狀細胞可能在逆境下扮演了特別的角色。由文獻中得知，南美近親的藜麥，利用囊狀細胞的儲鹽功能來協助抵抗逆境，Ali Kiani-Pouya(2020)指出藜麥的抗鹽機制，是將鈉離子隔離在囊狀細胞內；Ali Kiani-Pouya(2017)的研究中，藜麥的囊狀細胞，除了作為鹽的儲存區域外，也調節了鉀離子的堆積，此外 Edgar Bonales-Alatorre(2017)在液泡膜通道與藜麥耐鹽研究也指出，囊狀細胞能隔離大量來自細胞液胞中的鈉離子。

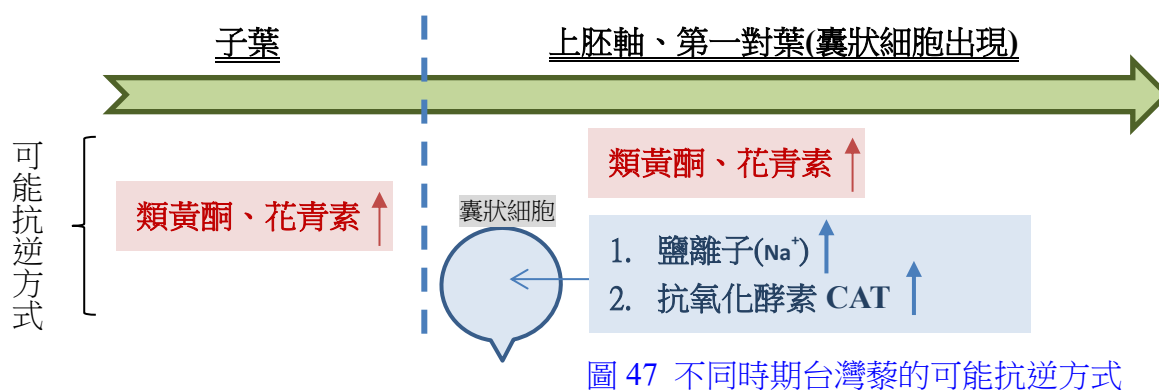
文獻資料顯示囊狀細胞在藜麥抗逆上，扮演了儲鹽的關鍵功能，那台灣藜的抗逆與囊狀

細胞間的關聯是怎麼呢？我們將囊狀細胞刷除，結果顯示生長情形不良，這與薛貽恩(2017)的研究，台灣藜可能藉由葉片之鹽囊貯存鹽離子以減少毒害結果相仿。

進一步探討囊狀細胞的其它功能與面向，發現刷除後，葉的過氧化氫酶(CAT)活性下降，顯示囊狀細胞具有抗氧化酵素存在，接著取下囊狀細胞，置入過氧化氫液中，出現冒泡的現象(圖 45)，再進行 CAT 活性分析，發現囊狀細胞具有很高的活性。這顯示囊狀細胞除了文獻指出的鹽儲存功能外，還有著清除過氧化物的能力，在協助抗逆上扮演了不同功能的角色。



在探討台灣藜抵抗逆境的研究中，由研究二的結果，得知第一對葉是發展出抗逆的關鍵期，接著在研究三的實驗，發現生長至第一對葉，具有較好的抗氧化酵素活性，而在此時出現的囊狀細胞則演了關鍵的角色，並進一步在研究四的酵素活性分析，發現囊狀細胞的抗氧化新功能，囊狀細胞的出現、較好的抗氧化活性與抗逆能力的提升，呈現了密切的關聯，我們將台灣藜的可能抗逆的模式整理如下：



在這一系列的實驗，我們逐步解開台灣藜生長與抗逆發展之謎，藉由刷除囊狀細胞了解其扮演的關鍵角色，發現囊狀細胞不僅儲鹽，還具有抗氧化酵素活性的新功能，能協助清除逆境下所產生的過氧化物。但同時也有許多新的疑問出現，抗氧化酵素是在哪製造的？若不是在囊狀細胞，那又是如何由葉運送呢…… 台灣藜囊狀細胞在逆境協助的角色上，具有多重面向及功能，期待有機會能持續探討囊狀細胞內抗氧化酵素的其它謎團。

柒、結論

全球藜科植物共約 110 屬，約 1500 種，廣泛分布歐亞大陸、南北美洲、非洲和大洋洲的半乾旱及鹽鹼地區。「台灣藜」(*Chenopodium formosanum Koidz*) 屬於藜麥的一個品系，為台灣的原生種。「台灣藜」含許多機能成分，如：抗氧化的總酚、類黃酮、SOD(超氧歧化酶) 等等，被稱為「穀物的紅寶石」。然而，我們初步觀察台灣藜於鹽及乾旱逆境下的生長情形，卻發現其發芽與生長情況與文獻資料不同。於是我們重新設計系列實驗，希望能進一步探討出台灣藜抗逆的情形與可能機制，並進一步探討囊狀細胞的角色，以下為我們的實驗結論：

1. 在不同鹽逆境下的發芽率結果，ctrl(0%)與低鹽度刺激(0.5%)的相差不大(發芽率分別為 91.8%與 86.3%)，鹽濃度上升至 2%時，發芽率低於 10%，鹽濃度 3%時，則無法發芽。
2. 不同乾旱逆境下的發芽率結果，土壤含水量為 ctrl 的 80%(w80%組)，與 ctrl 組發芽率較類似(分別為 88.3%、79.6%)，當土壤乾旱程度升高至 w40%時，發芽率大幅下降，而乾旱程度最重的 w20%組別，仍有約 6.6%發芽率。
3. 台灣藜在鹽逆境下生長以 ctrl(0%)最好，鹽逆境(2%)雖然能生長，但長至第一對葉需 16 天，ctrl 組約需 8 天；乾旱程度最重的 w20%，生長至第一對葉則需 18 天，顯示在不同逆境下持續生長的幼苗，隨鹽度及乾旱程度上升，造成很大的抑制。
4. 不同時期的鹽處理中，發現於第一對葉時進行鹽處理，相對於子葉時，具有大幅提升的抗逆能力；而在乾旱處理也顯示類似結果。暗示著第一對葉為發展抗逆能力的關鍵時期。
5. 在花青素與類黃酮的比較結果上，發現不論是子葉時期或是第一對葉，2%鹽處理的組別均較 0%鹽處理組的多。乾旱逆境也有相同趨勢，逆境處理皆有較高的含量以協助抗逆。
6. 台灣藜生長至第一對葉時，明顯看出 POD 在 2%鹽處理組別大幅上升，達到 0%鹽處理的組別的 10.8 倍左右。顯示生長至第一對葉時，POD 可能具有協助抗鹽的保護能力。CAT 的部分，子葉時期的活性變化不大；但當生長至第一對葉時，2%與 0%鹽處理組別比，CAT 活性上升達 5.2 倍。
7. 台灣藜子葉時期遭遇 w40%或是更乾旱的 w20%時，與 ctrl 比，POD 活性變化不大；當生長至第一對葉時，乾旱處理 4 天時的 w40%組與 ctrl 相比，POD 活性上升約 3.6 倍。在乾旱處理 4 天時的 w40%組與 ctrl 相比，CAT 活性上升 3.8 倍。

8. 不論子葉或第一對葉，分別在鹽及乾旱刺激下，有極高的比例氣孔關閉。這也顯示了第一對葉抗鹽耐旱的能力較好與氣孔關閉較無關。
9. 台灣藜子葉尚未有囊狀細胞出現；第一對葉的囊狀細胞會隨著鹽度上升，密度及面積下降，顯示生長至第一對葉時可能藉囊狀細胞的改變來協助抗逆，乾旱逆境也有類似情形。
10. 刷除囊狀細胞後，以鹽逆境處理，生物質量及葉面積均較對照組下降，顯示若無囊狀細胞的存在，可能無法排除過多的鹽分。囊狀細胞在鹽逆境下扮演重要的角色。
11. 鹽處理後的台灣藜，刷除囊狀細胞的組別(僅有葉片)，與未刷除囊狀細胞的組別(葉片+囊狀細胞)相比，CAT 的活性有大幅下降的趨勢(2%組別，下降約 64%；3%組別，下降約 29%)。顯示囊狀細胞與 CAT 的活性表現有關。
12. 為確認囊狀細胞的抗氧化功能，將逆境處理的囊狀細胞取出進行 CAT 活性分析，囊狀細胞組與去除 CAT 活性組(加入 Stop solution)，兩者間的 OD 值相差達 7.9 倍，顯示囊狀細胞具有相當高的 CAT 活性。囊狀細胞的新功能及扮演的多重角色，可能與台灣藜的抗逆能力提升有著密切的關聯。

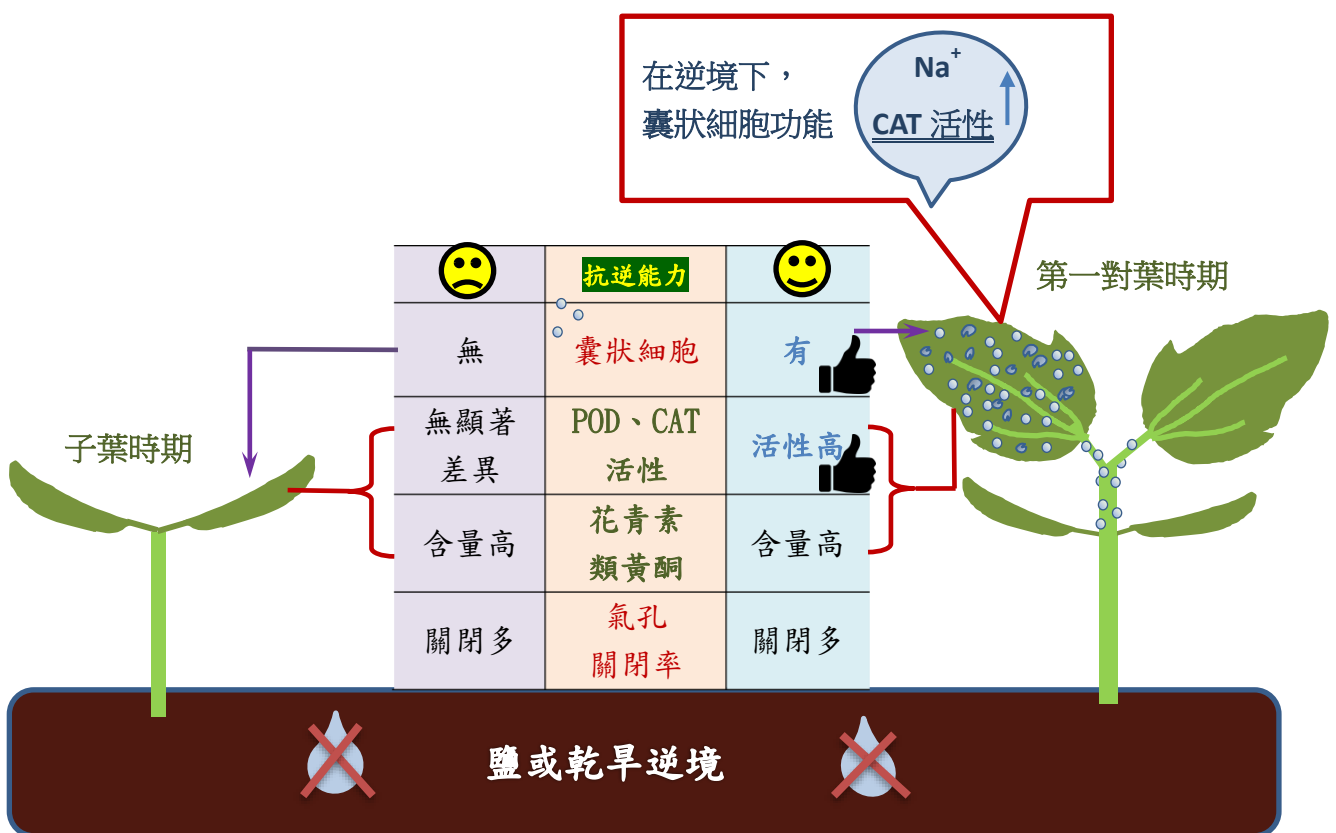


圖 48 比較台灣藜生長第一對葉時，具有較好抗鹽耐旱能力的可能原因

註：子葉時期、第一對葉時期抗逆能力，分別與對照組比較

捌、參考資料

1. 鄭伊娟(2009)。台灣藜之開發應用成果介紹。取自 <https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=21684>
2. 古明萱。屏東科技大學園藝學教材。取自：<http://cec.npust.edu.tw/e-learning/agronomy/>
3. 台灣藜資料，取自台東農改場：<https://www.ttdares.gov.tw/ws.php?id=2040>
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. 王定澤 (2016)，探討小米不為人知的耐機密。中華民國第 56 屆中學學科學展覽作品。
6. 黃薈臻(2017)。不同生長條件對台灣藜幼苗機能之影響。臺灣大學農藝學研究所學位論文
7. 薛貽恩(2018)。台灣藜耐鹽逆境生理機制之研究。屏東科技大學農業科學學門碩士論文。
8. 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。
9. 解衛海(2015)。Na⁺吸收對乾旱導致的棉花葉片光合損傷緩解。生態學報，35 卷，19 期
10. 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>
11. 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。
12. 張伶禕、黃紫璇、王駿愷(2018)。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。中華民國第 58 屆中小學科學展覽作品
13. Ali Kiani-Pouya (2020). Understanding the role of root-related traits in salinity tolerance of quinoa accessions with contrasting epidermal bladder cell patterning. *Planta volume 251, Article number: 103*
14. Ali Kiani-Pouya(2017).Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and Atriplex species. *Plant Cell Environ. 2017 Sep;40(9):1900-1915.*
15. Edgar Bonales-Alatorre(2017).Reduced Tonoplast Fast-Activating and Slow-Activating Channel Activity Is Essential for Conferring Salinity Tolerance in a Facultative Halophyte, Quinoa. *Plant physiology 162(2):940-952*

【評語】 060008

1. 本篇報告分析台灣藜對鹽及乾旱逆境之反應，發現隨著鹽處理時間增加，而抗氧化酶活性下降，乾旱則隨著處理時間增加，而活性上升，並發現台灣藜的囊狀細胞不僅有儲鹽的能力，還具有抗氧化酵素協助抗逆。研究內容豐富並獲初步研究結果。太多實驗數據，未能深入統計量化，單純說明高低，未能說明其重要性或是代表的意義，降低研究報告的可讀性。此外，酵素活性測試，需將原理說明清楚。
2. 刷除囊狀細胞的葉片，CAT 活性明顯較含有囊狀細胞的組別少，離心管內的呈色反應也較淺(圖 24a)。推測囊狀細胞可能具有 CAT，具有清除過氧化氫的活性存在，肉眼觀察差異不大，用比色定量較具說服力(圖 37b)。
3. 研究主題有鄉土性，研究步驟也尚稱合理；但對植物逆境生理的分析尚屬粗淺且不夠完整。
4. 第一對葉的囊狀細胞的囊狀細胞會隨鹽度上升而發生密度及面積下降的結果與吾人對囊狀細胞的功能認知似有衝突，作者並未予以合理解釋。
5. 控因及變因適當完整。

6. 有系統地收集數據及分析。
7. 數據須加統計分析，以判明差異。
8. 囊狀細胞抗逆境相關基因之數據相當完整，結果能數據化，再行結論，多用形容詞解釋結果。
9. 討論說明新理論。
10. 囊狀細胞抗旱機制已有報導，故創新性稍不足。
11. 相關研究已有報告，到底有何創見要說明清楚。