

中華民國第 61 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

052102

種子酵素活性與營養回饋之淹水耐性研究

學校名稱：嘉義市私立嘉華高級中學

作者： 高一 謝子涵 高一 賴睿閔 高一 吳承翰	指導老師： 朱建豪
---	------------------

關鍵詞：水稻、淹水逆境、酵素活性分析

摘要

本研究分成三部份，首先比較水稻、玉米種子於空氣及淹水下發芽能力差異，測試粳稻 (TN67)、秈稻 (IR64)、寶石玉米 (GM) 和草莓玉米 (SM) 於空氣、淹水下的生長，並透過澱粉水解酶酵素活性分析，比對種子耐淹水能力與酵素活性變化關聯性。再於水中添加胚乳中已知的單一及複合營養源的搭配與濃度變化，模擬種子發芽之營養供應回饋機制，測試其對種子耐淹水能力的影響。

研究結果顯示：種子於淹水下的發芽能力為 TN67 > IR64 > SM > GM，與澱粉水解酶酵素活性高低呈正相關；外加醣類能明顯增強種子於淹水下的發芽能力；外加 1% 胺基酸則會明顯抑制種子的耐淹水能力；添加混合營養源，並沒有提升種子耐淹水能力，但降低外加胺基酸濃度 0.1%，則能減緩抑制發芽的現象。

壹、研究動機

近年來全球氣候變遷越來越嚴重，極端氣候的襲擊所造成的災害也越來越頻繁的今日，農作物的淹水損害日趨嚴重，因此糧食的問題逐漸受到關注。水稻是我們台灣主要的糧食作物，在糧食供應上扮演不可或缺的角色。在尋找相關資料時，我們得知不同品系間的水稻有不一樣的耐淹水性，可以因應全球暖化所帶來的災害。因此我們想要了解不同水稻間的耐淹水性有什麼差異？不同糧食作物之間的耐淹水性有什麼差異？甚至是否可以藉由改變其生長環境使其耐淹水性有所改變？於是便在老師的指導下開始了本次的研究。

貳、研究目的

- 一、探討不同品系水稻、玉米種子於空氣中或淹水下發芽生長的能力差異。
- 二、分析不同品系水稻、玉米種子於空氣中或淹水下發芽時，種子內澱粉水解酶酵素活性的變化與差異。
- 三、探討在水中人工添加不同的種子胚乳單一、複合及不同濃度的營養源是否能影響種子在淹水下的發芽能力。

參、研究設備及器材

一、實驗種子：

TN67 水稻種子、IR64 水稻種子、寶石玉米種子 (GM)、草莓玉米種子 (SM)。

二、實驗儀器：

無菌操作台、快速高壓滅菌器、旋轉混合器、離心機、電源供應器、電泳槽、試管、震盪混合器、乾式恆溫培養器、電動吸管、微量吸管、微量離心管、光板、研鉢、尺、相機、電腦。

三、實驗藥品：

Tris-HCl(pH8.8)、Tris-HCl(pH6.8)、4%Acrylamide、TEMED、10%APS、染劑(4X-dye)、 α -amylase buffer、界面活性劑 (TWEEN20)、75%酒精、3%漂白水、花寶 2 號、洋菜膠、氯化鈣(CaCl₂)、蛋白質萃取緩衝液(Protein extraction buffer)、甲醇、葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、礦物質、酵母萃取物(Yeast extract)、胰蛋白腺(Tryptone)。

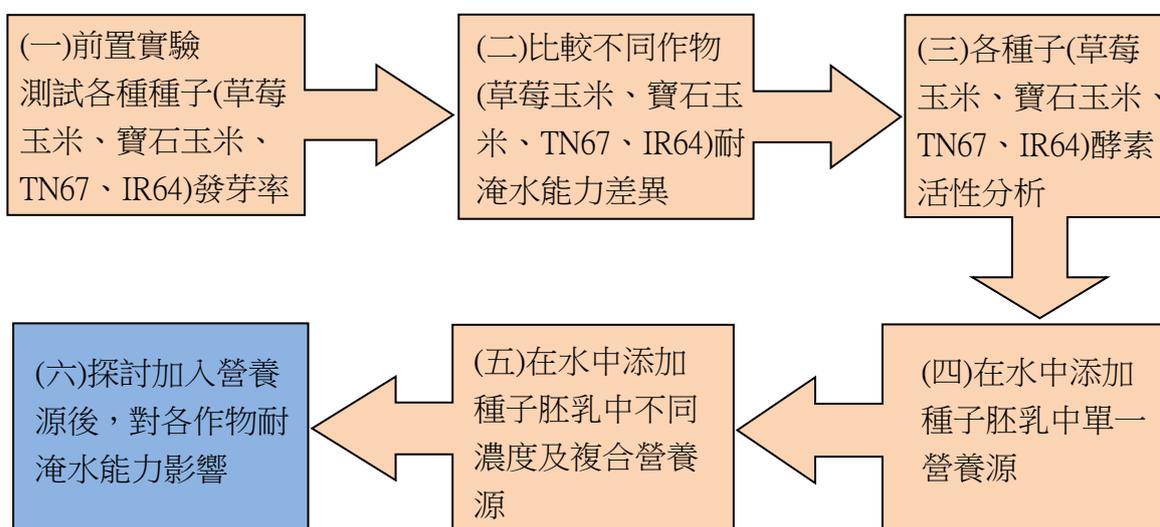
a. TN67 水稻種子(粳稻)	b. IR64 水稻種子(秈稻)	c. 寶石玉米種子
d. 草莓玉米種子	e. 無菌操作台	f. 快速高壓滅菌器
g. 恆溫培養箱	h. 電泳槽	i. 離心機

		
j. 電動吸管	k. 微量吸管	l. 旋轉混合器
		
m. 恆溫室(28°C)	n. 震盪混合器	o. 光板

圖 1. 研究設備及器材

肆、研究過程及方法

一、實驗流程(圖 2)



二、前置實驗：

1. 實驗說明：在實驗前先測試種子的發芽率，避免影響實驗結果。
2. 實驗器材：TN67(粳稻)、IR64(秈稻)、寶石玉米、草莓玉米、衛生紙、紙杯
3. 實驗步驟：(圖 3)
 - (1)取三張衛生紙並用水浸濕。
 - (2)將浸水後的衛生紙鋪至紙杯底部。
 - (3)將十顆種子夾至紙杯中。
 - (4)七天後計算種子的發芽率，並評估種子的適用性。

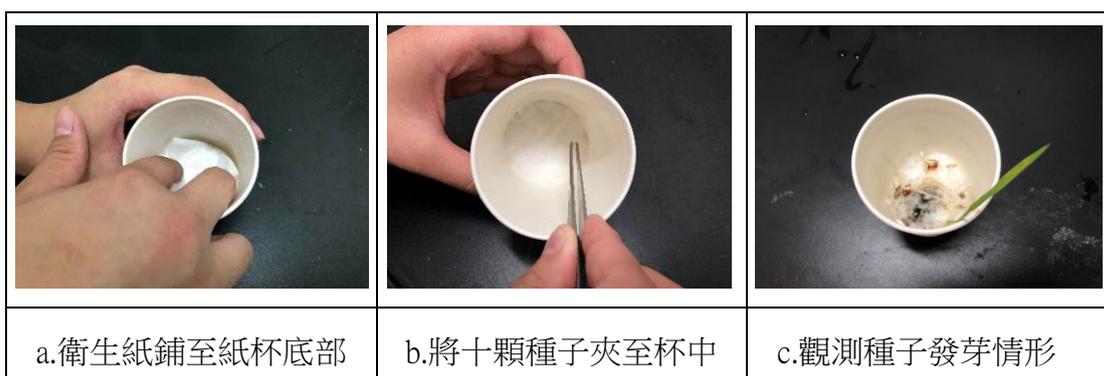


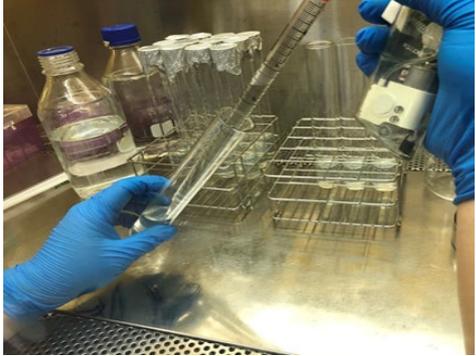
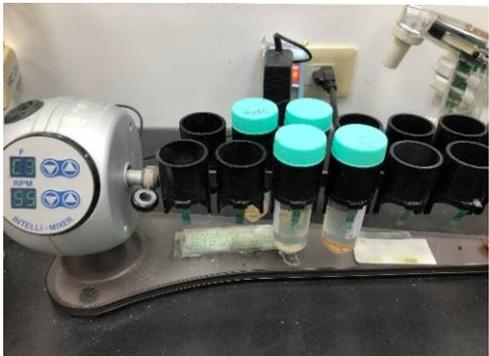
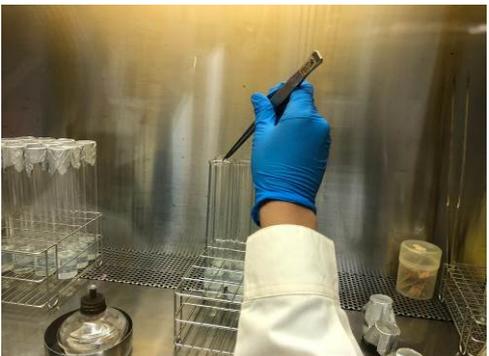
圖 3.種子發芽率測試實驗情形

第一部份：比較不同品種水稻與玉米間的耐淹水能力差異

【試驗一】觀測植物種子發芽情形

- 1.實驗說明：在無菌的環境下，分別在空氣與淹水的試管中種植四種作物(TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米、草莓玉米)，觀察 14 天後繪製生長曲線，並比較其生長差異。
- 2.實驗器材：TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米(GM)、草莓玉米(SM)、75%酒精、3%漂白水、界面活性劑(TWEEN20)、旋轉混合器、RO 水、滅菌水。
- 3.實驗步驟：(圖 4)
 - (1)配置下層膠(0.125 倍花寶 2 號、500mL 洋菜膠、2mL CaCl₂)，並靜置一天。
 - (2)將 TN67、IR64 剝殼 30 顆，並用水將各種子洗至無粉塵。
 - (3)加入 75%酒精消毒，再用 RO 水清洗至無泡沫。
 - (4)在每管加入 3%漂白水、界面活性劑(TWEEN20) 20mm，搖至起泡後放至旋轉混合器搖晃混合 30 分鐘。
 - (5)將漂白水倒出，用滅菌水洗至無氣泡。
 - (6)分別將十顆水稻種子與七顆玉米種子夾至平底試管中。
 - (7)將空氣組的管口用鋁箔紙蓋住，再用透氣膠帶將鋁箔紙封緊。
 - (8)在淹水組的試管中用電動吸管將 75mL 滅菌水加入，再用鋁箔紙將管口蓋

住，並用透氣膠帶將鋁箔紙緊封。
(9)每天記錄種子生長高度，連續十四天。
(10)繪製生長曲線。

	
a.配置下層膠	b.在試管加入配置完成的下層膠
	
c.加入 3%漂白水、TWEEN20 洗淨種子	d.旋轉混合器混合 30 分鐘
	
e.加入滅菌水洗淨搖晃至無泡沫	f.取十顆水稻、七顆玉米種子加入試管

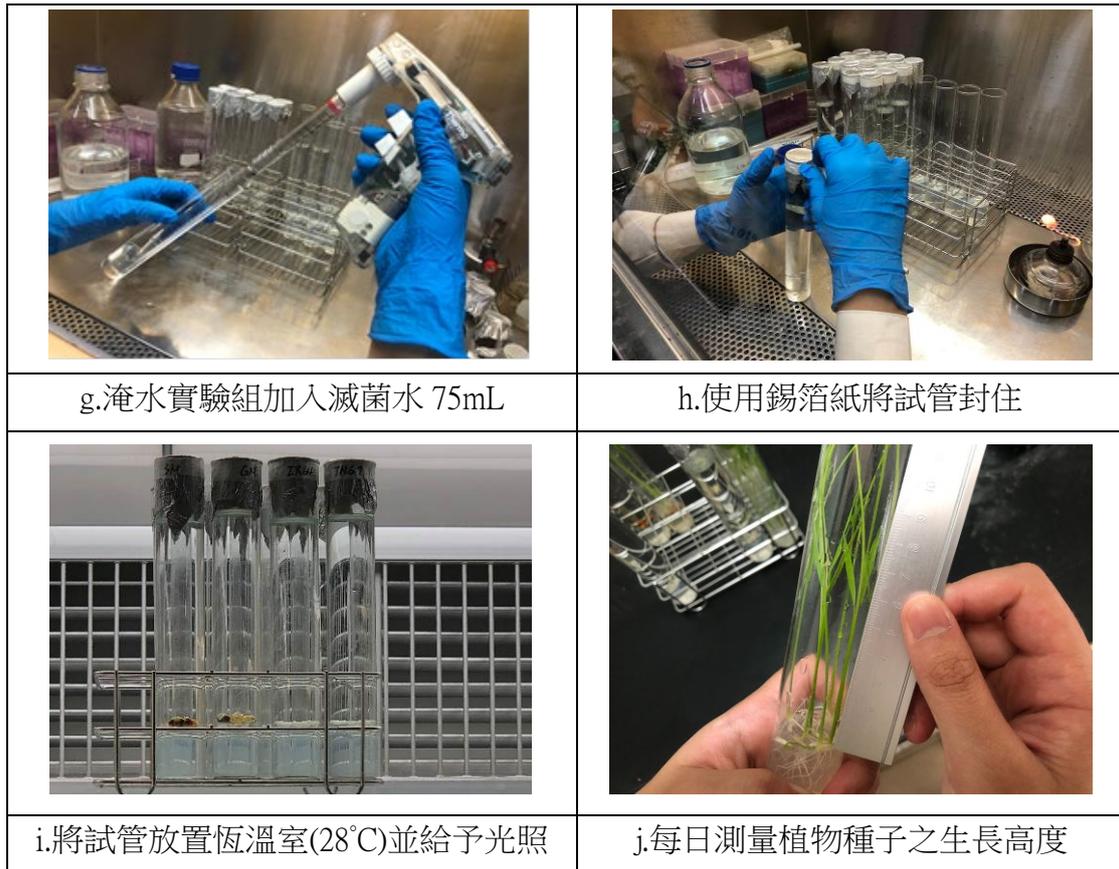


圖 4. 觀測植物種子發芽實驗情形

【試驗二】澱粉水解酶酵素活性分析

1. 實驗說明：從發芽生長 7 天後的種子植株 中萃取蛋白質樣本，再利用原態膠體電泳(Native-PAGE)的技術，分析並比較種子中的澱粉水解酶酵素活性差異。

2. 實驗器材：離心機、研鉢、電源供應器、電泳槽、微量離心管、ddH₂O、TEMED、Tris-HCl(pH8.8)、Tris-HCl(pH6.8)、4%Acrylamide、10%APS、甲醇。

3. 實驗步驟：

(一)製作樣本(圖 5)

(1)夾出樣本後，去掉其莖部與根部，留下種子，將種子放入微量離心管中。

(2)將種子置於研鉢並把 TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米、草莓玉米磨成粉末。

(3)在研鉢中加入 4c.c 蛋白質萃取緩衝液，將混合後的樣本放入微量離心管。

(4)於 4°C 中，高速離心 13000 轉，30 分鐘後，從微量離心管中取出 400 μL 的蛋白質樣本上清液。

(5)將配置好的樣本平均分裝到兩個微量離心管。

(6)將一組樣本加入 5mL 氯化鈣(1M CaCl₂)，加熱 65°C，15 分鐘，即為 α-Amylase 澱粉水解酶專一活性之蛋白質樣本。

(7)將兩組樣本放至 4°C 冰桶中保存。

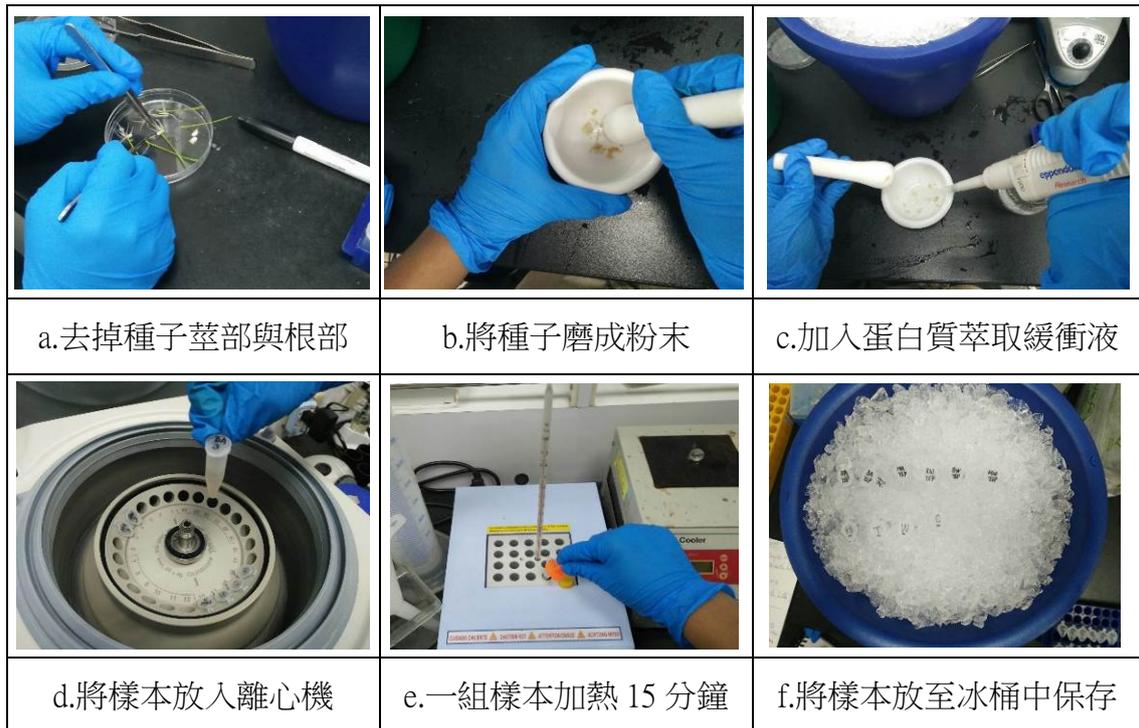


圖 5. 製作樣本實驗情形

(二)原態膠體電泳與澱粉水解酶酵素活性呈色(圖 6)

1. 配置下層膠：(1)~ (5)

- (1)加入 9.78mL 的 ddH₂O
- (2)加入 5mL 的 Tris-HCl(pH8.8)
- (3)加入 5mL 的 10%Acrylamide
- (4)加入 8mL 的 TEMED
- (5)加入 200ul 的 10%APS

2. 將配置好的下層膠吸取 3200mL 加入玻片中間。

3. 用 1mL 的甲醇將下層膠壓平，並等至凝固。

4. 將甲醇倒除，再用 ddH₂O 清洗，並用濾紙將下層膠上的水分吸乾。

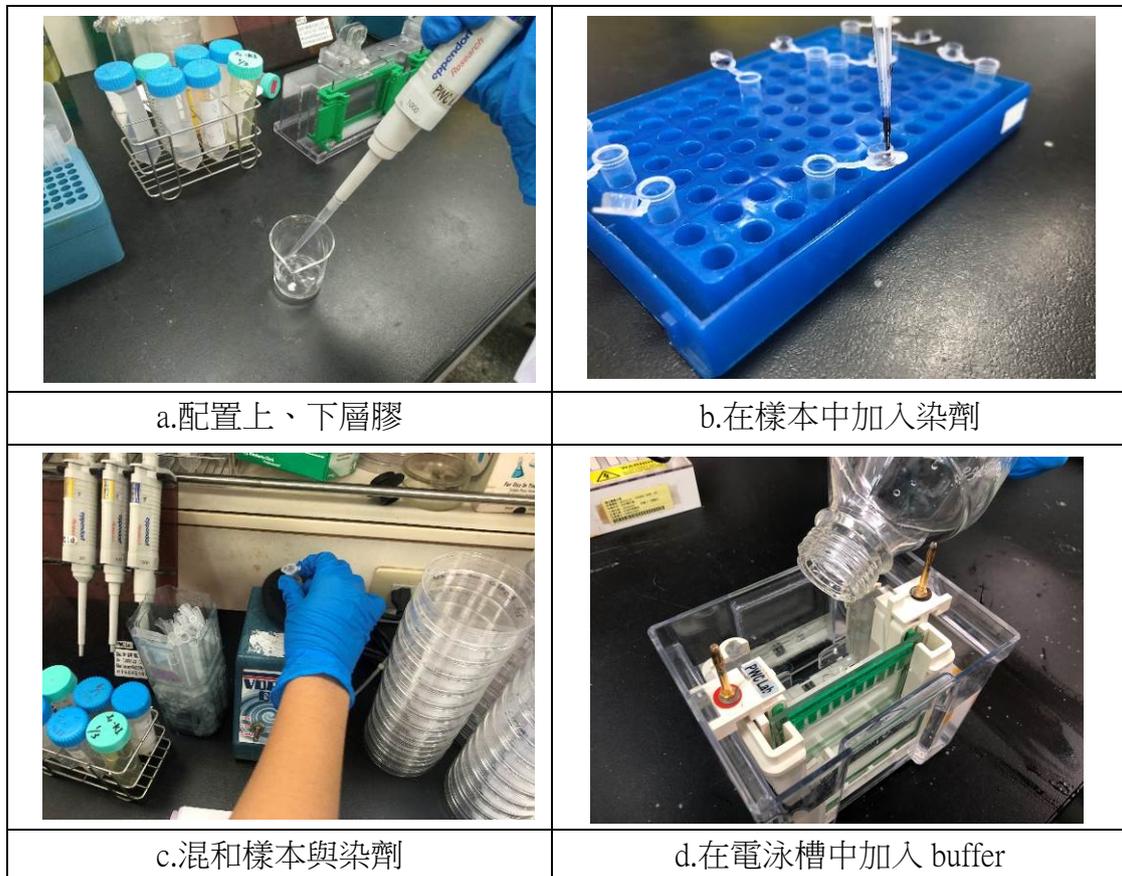
5. 配置上層膠：(1)~ (5)

- (1)加入 9.78mL 的 ddH₂O
- (2)加入 5mL 的 Tris-HCl(pH6.8)
- (3)加入 5mL 的 4%Acrylamide
- (4)加入 8mL 的 TEMED
- (5)加入 200ul 的 10%APS

6. 將配置好的下層膠加入玻片中間，並插入尺梳，等待至凝固。

7. 取 10 μ L 樣本加入 4 μ L 染劑(4X-dye)來配置蛋白質萃取液。

8. 配置 2g 緩衝液與 100mL α -amylasebuffer(4°C)作為 2% 運行緩衝液，加入泳槽中，並將蛋白質萃取液加入玻片間隙中。
9. 電泳先設定 70V 跑 1 小時過 stacking 線，marker 分開即可開始，再設定 100V 2 小時，直到染劑到底為止。
10. 將膠取出後，只保留下層，並以 RO 水清洗，將膠浸入 2% 馬鈴薯澱粉液再放進 37°C 培養箱 45 分鐘。
11. 倒掉 2% 馬鈴薯澱粉液，加入稀釋三倍的碘液(I₂-KI solution)以 50rpm 搖晃 1 分鐘後將碘液倒掉，用 RO 水洗掉碘液，並持續更換 RO 水退染，直到澱粉酶酵素活性之透明條帶清晰可辨。
12. 利用光板與單眼相機，拍攝清晰的已呈色之膠體相片。



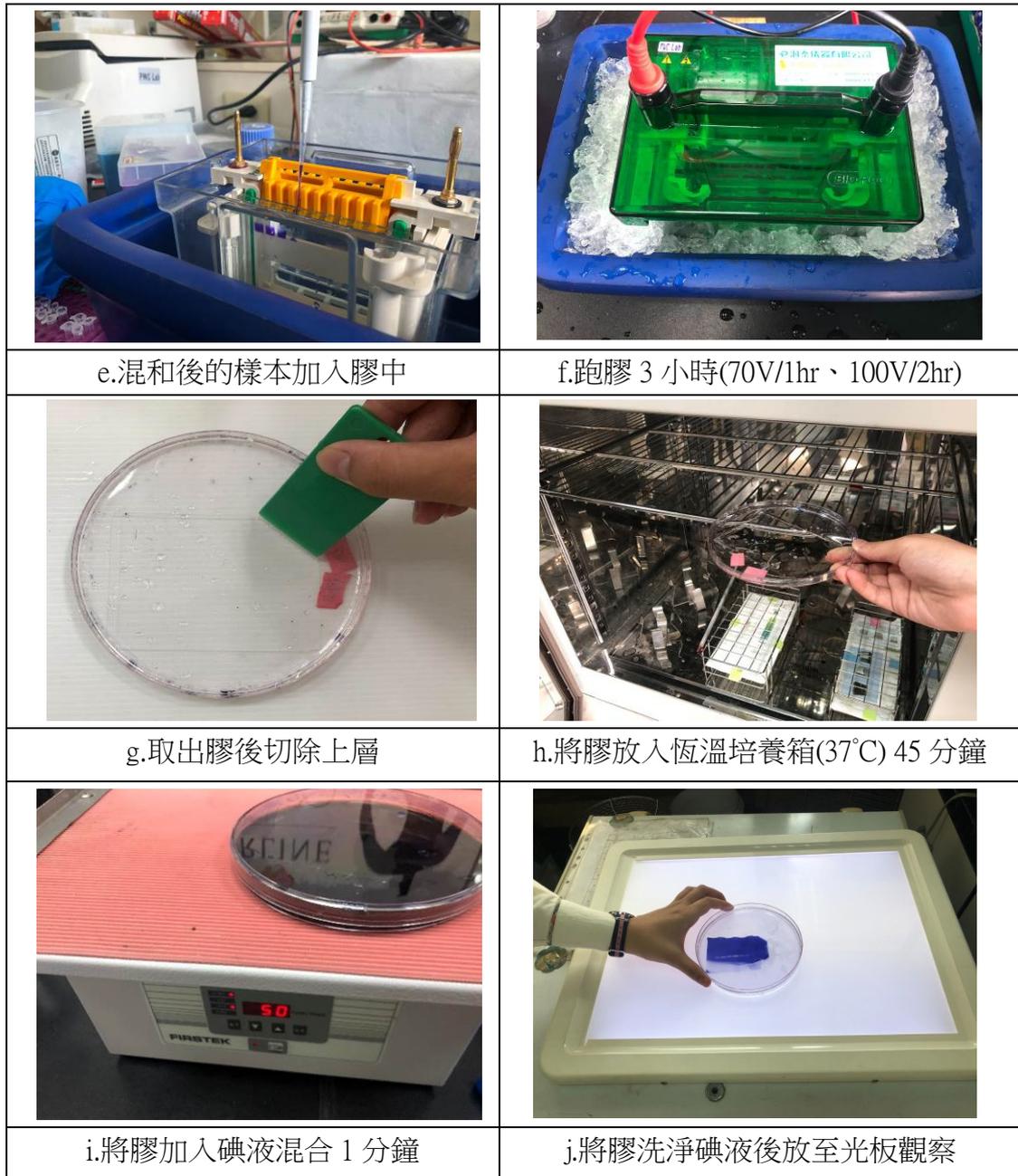


圖 6.原態膠體電泳與澱粉水解酶酵素活性呈色實驗情形

第二部份：比較不同單一營養成份的淹水下發芽之回饋反應

【試驗一】觀測植物種子加入單一營養源後發芽情形

1. 實驗說明：在無菌的環境下，分別在試管中加入配置並滅菌完成的營養源溶液：水（對照組）、3%葡萄糖、3%麥芽糖、3%蔗糖、礦物質（1xMS 培養基）、1%酵母萃取物（Yeast extract）、1%胰蛋白胨（Tryptone），觀察 7~14 天後進行生長統計，並比較其形態差異。

2. 實驗器材：TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米（GM）、草莓玉米（SM）、葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、礦物質（1xMS 培養基）、酵母萃取物（Yeast extract）、胰蛋白胨（Tryptone）、75%酒精、3%漂白水、界面活性劑（TWEEN20）、旋轉混合器。

3.實驗步驟：(圖 7)

- (1)配置下層膠(0.125 倍花寶 2 號、500mL 洋菜膠、2mL CaCl₂)，並靜置一天。
- (2)配置 3%葡萄糖、3%麥芽糖、3% 蔗糖、1%礦物質(1xMS 培養基)、1%胰蛋白胨 (Tryptone)、1%酵母萃取物 (Yeast extract)溶液，並放至滅菌器滅菌 20 分鐘。
- (3)將 TN67、IR64 剝殼 30 顆，並用水將各種子洗至無粉塵。
- (4)加入 75%酒精消毒，再用 RO 水清洗至無氣泡。
- (5)在每管加入 3%漂白水、界面活性劑(TWEEN20) 20mm，搖至起泡後放至旋轉混合器搖晃 30 分鐘。
- (6)將漂白水倒出，用滅菌水洗至無氣泡。
- (7)在淹水組的試管中用電動吸管將 75mL 滅菌水與配置好的溶液。
- (8)分別將十顆水稻種子與七顆玉米種子夾至平底試管中，再用鋁箔紙將管口蓋住，並用透氣膠帶將鋁箔紙緊封。
- (9)每天記錄種子生長高度，連續七天~十四天。
- (10)繪製生長曲線。

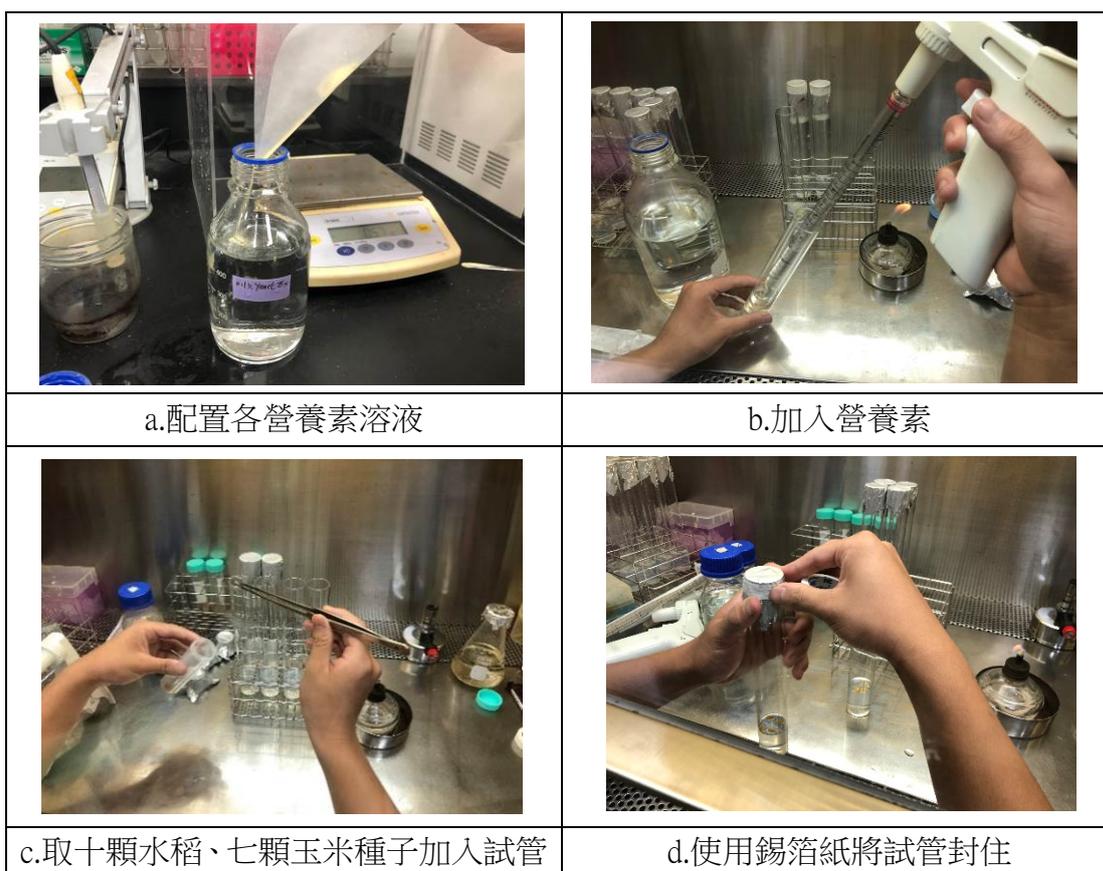




圖 7.觀測植物種子加入單一營養源後發芽實驗情形

第三部份：比較不同濃度及複合營養組成的淹水下發芽之回饋反應

【試驗一】觀測植物種子加入不同濃度及複合營養源後發芽情形

- 1.實驗說明：在無菌的環境下，分別在試管中加入配置好並滅菌的低濃度或不同混合營養源溶液：水（對照組）、0.1%酵母萃取物(Yeast extract)、0.1%胰蛋白胍(Tryptone)、三種醣類混合（1%葡萄糖 / 1%麥芽糖 / 1%蔗糖）、礦物質混合醣類（1xMS 培養基 / 3%麥芽糖），觀察 7~14 天後進行生長統計，並比較其形態差異。
- 2.實驗器材：TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米(GM)、草莓玉米(SM)、葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、礦物質(1xMS 培養基)、酵母萃取物(Yeast extract)、胰蛋白胍(Tryptone)、75%酒精、3%漂白水、界面活性劑(TWEEN20)、旋轉混合器。
- 3.實驗步驟：(圖 8)
 - (1)配置下層膠(0.125 倍花寶 2 號、500mL 洋菜膠、2mL CaCl₂)，並靜置一天。
 - (2)配置 0.1% Tryptone、0.1% Yeast extract、1% 葡萄糖 + 1% 麥芽糖 + 1% 蔗糖、1xMS+ 3% 麥芽糖溶液，並放至滅菌器滅菌 20 分鐘。
 - (3)將 TN67、IR64 剝殼 30 顆，並用水將各種子洗至無粉塵。
 - (4)加入 75%酒精消毒，再用 RO 水清洗至無氣泡。
 - (5)在每管加入 3%漂白水、界面活性劑(TWEEN20) 20mm，搖至起泡後放至旋轉混合器搖晃 30 分鐘。
 - (6)將漂白水倒出，用滅菌水洗至無氣泡。
 - (7)在淹水組的試管中用電動吸管將 75mL 滅菌水與配置好的溶液。
 - (8)分別將十顆水稻種子與七顆玉米種子夾至平底試管中，再用鋁箔紙將管口蓋住，並用透氣膠帶將鋁箔紙緊封。
 - (9)每天記錄種子生長高度，連續七天~十四天。
 - (10)繪製生長曲線。

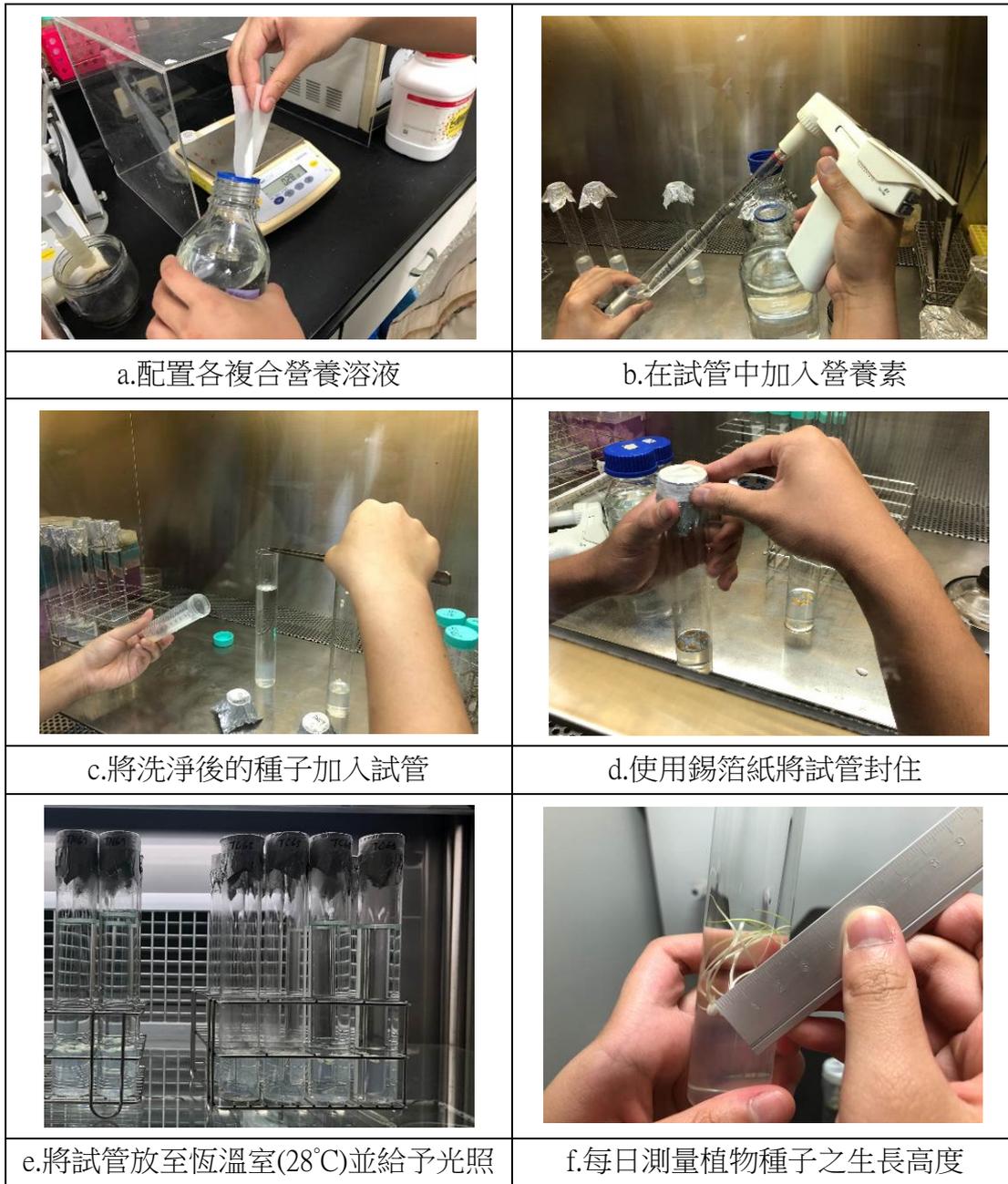


圖 8.觀測植物種子加入不同濃度及複合營養源後發芽實驗情形

伍、研究結果

一、前置實驗：(表 1)

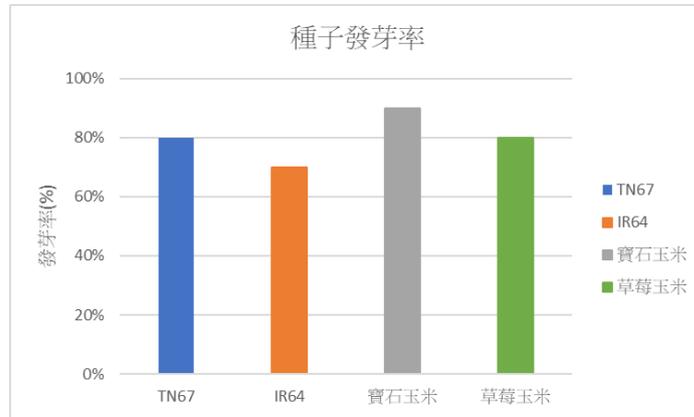


表 1.在非無菌環境下的種子發芽率

說明一：在非無菌環境下，TN67 水稻發芽率為 80%； IR64 水稻發芽率為 70%； 寶石玉米發芽率為 90%； 草莓玉米發芽率為 80%。

二、第一部分：比較不同品種水稻與玉米間的耐淹水能力差異(圖 9)(表 2)

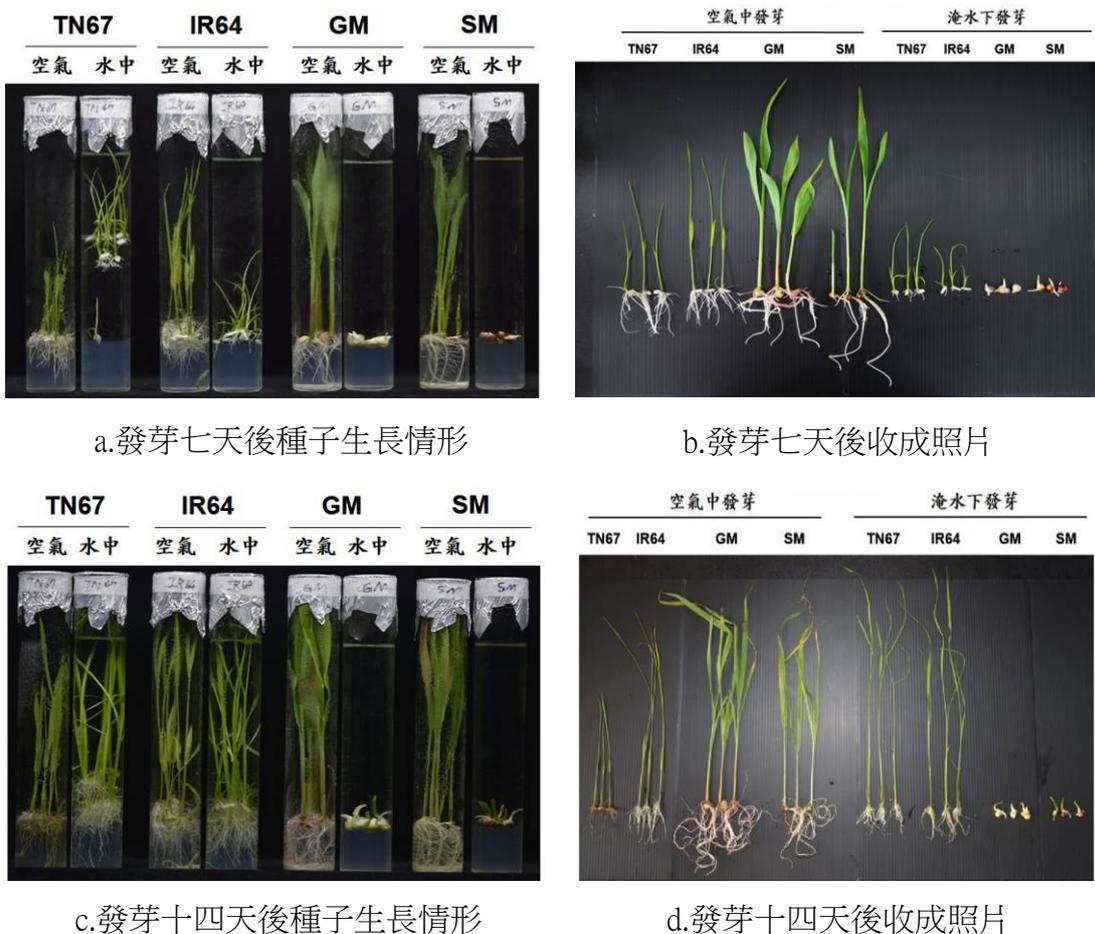
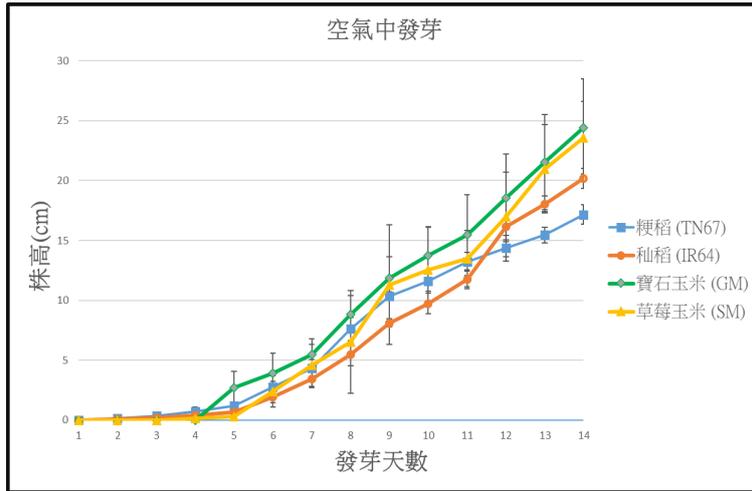
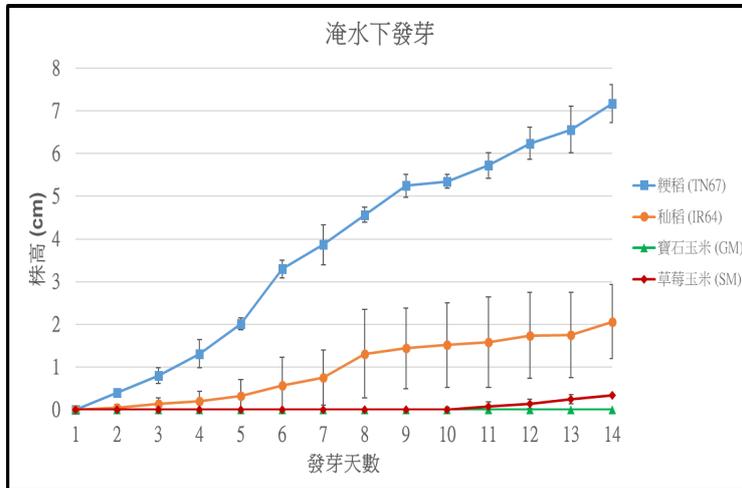


圖 9.種子發芽七天與十四天後生長情形



a. TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米、草莓玉米於空氣中發芽之生長曲線

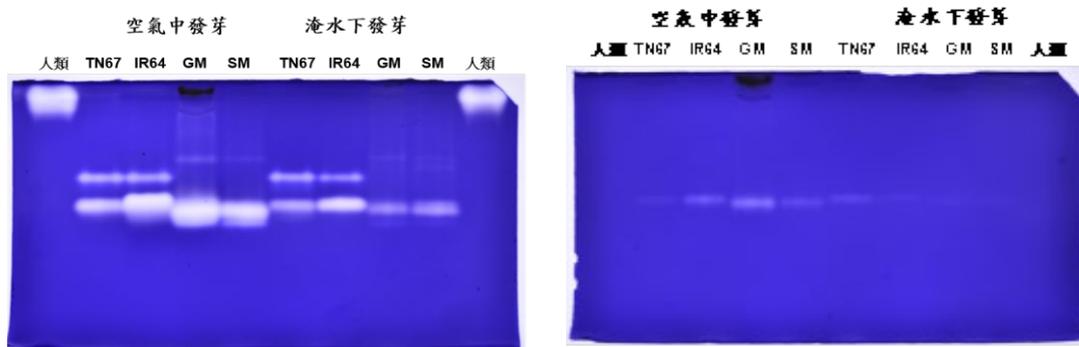


b. TN67 水稻、IR64 水稻、寶石玉米、草莓玉米於淹水下發芽之生長曲線

表 2.種子發芽十四天之生長曲線

說明一：

種子在空氣中發芽能力 $GM > SM > IR64 > TN67$ (圖 9)，玉米勝於水稻；而淹水中發芽能力則 $TN67 > IR64 > SM > GM$ (圖 9)，水稻勝於玉米。



a. 澱粉水解酶總活性結果

b. α -Amylase 澱粉水解酶專一活性結果

圖 10.澱粉水解酶活性分析電泳結果

說明二：

種子於空氣中發芽的澱粉酶總活性表現強弱：寶石玉米 (GM) > 草莓玉米 (SM) > 秈稻 IR64 > 粳稻 TN67 (圖 10 a)，玉米的酵素活性大於水稻；與前述的種子發芽能力 (說明一)，呈現正相關，這個結果顯示穀類種子於空氣中的發芽能力，可能與種子的澱粉水解酶總活性的強弱有關，酵素活性越強，發芽速度就越快；而穀類種子於淹水下發芽時 α -Amylase 澱粉酶專一活性表現強弱：粳稻 TN67 > 秈稻 IR64 > 草莓玉米 (SM) > 寶石玉米 (GM) (圖 10 b)，水稻的殘餘酵素活性遠高於玉米，因此我們推測，穀類種子的耐淹水能力，可能與 α -Amylase 澱粉水解酶專一活性有關，殘餘酵素活性越高，水中的發芽能力就越佳。

第一部份的實驗結果顯示，穀類種子水中發芽的能力強弱，可能與種子產生的澱粉酶酵素活性高低有關，我們推論胚乳中營養儲存成份的分解效率與營養源供應回饋機制，可能扮演重要的關鍵角色。因此，我們設計了第二部分的後續實驗「比較外加不同單一營養源成份，對種子淹水下發芽的回饋反應」，利用人工添加不同營養源成份來模擬胚乳的營養回饋供應，觀察其對種子水中發芽能力的實際影響性。

三、第二部分：比較不同單一營養成份的淹水下發芽之回饋反應(圖 11)(表 3)



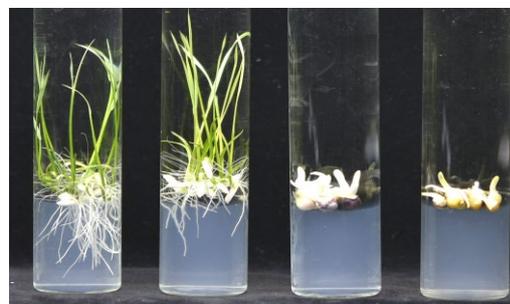
a. 水中發芽七天生長情形



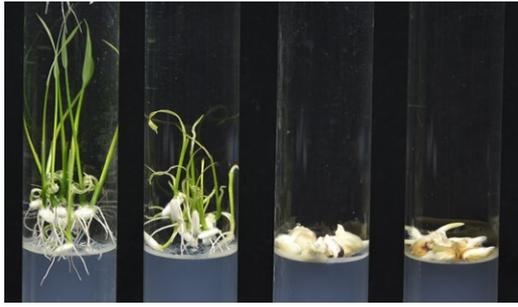
b. 3%葡萄糖溶液中發芽七天生長情形



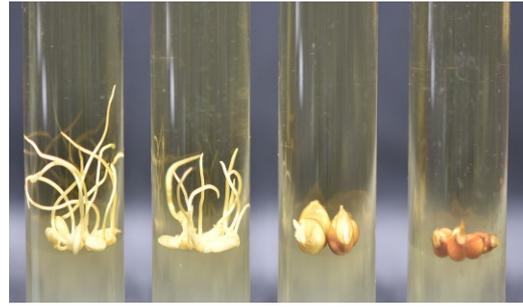
c. 3%麥芽糖溶液中發芽七天生長情形



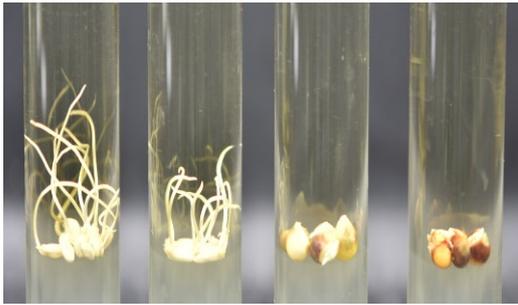
d. 3%蔗糖溶液中發芽七天生長情形



e. 礦物質溶液發芽七天生長情形

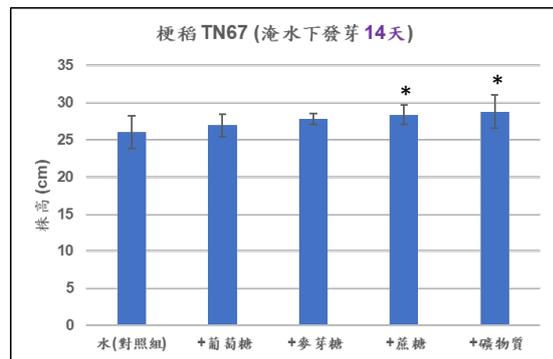
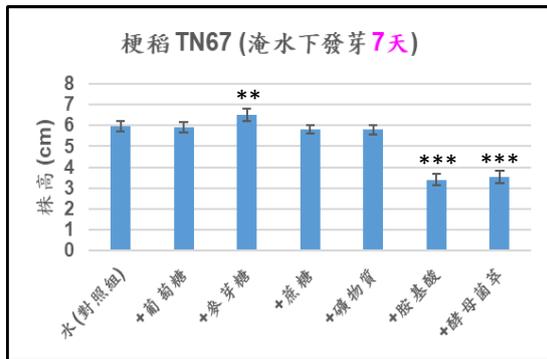


f. 1% Tryptone 溶液中發芽七天生長情形

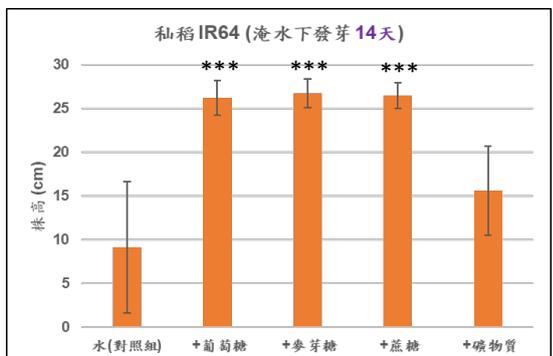


g. 1% Yeast extract 溶液中發芽七天生長情形

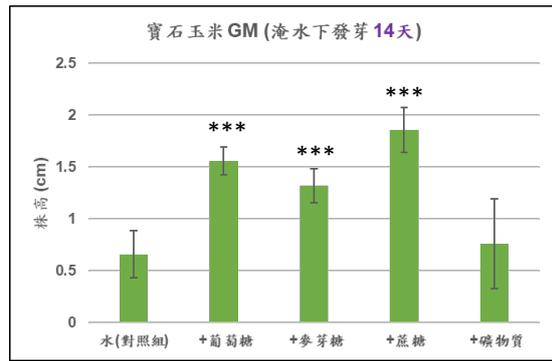
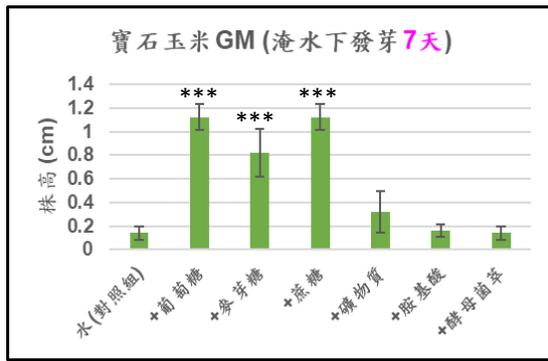
圖 11. 種子發芽七天後生長情形照片



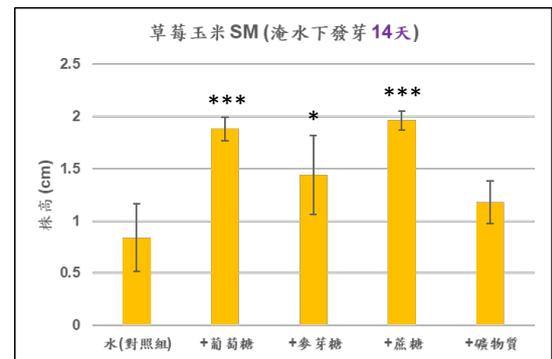
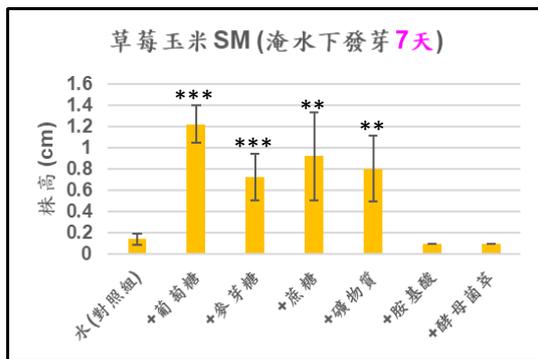
a. 梗稻 TN67 淹水下發芽生長高度



b. 秈稻 IR64 淹水下發芽生長高度



c. 寶石玉米(GM)淹水下發芽生長高度



(單因子變異數 ANOVA 統計分析: * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001)

d. 草莓玉米(SM)淹水下發芽生長高度

表 3.種子發芽七天、十四天之生長高度

說明一：

外加不同醣類，無論是 3%葡萄糖、3%麥芽糖或 3%蔗糖，對水稻或玉米種子水中發芽能力，均有增強效果；其中，對秈稻 IR64 的效果最顯著 (表 3b)，粳稻 TN67 較不明顯(表 3a)，寶石玉米 (GM) 與草莓玉米 (SM) 呈現較輕微的效果 (表 3c、d)。在水中外加礦物質，對秈稻 IR64 的水中發芽能力有部份的增強效果，對粳稻 TN67、寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 則影響不大。在水中外加胺基酸，無論是蛋白質分解產物：1%胰蛋白胨 (Tryptone) 或全細胞分解物：1%酵母萃提取物 (Yeast extract)，對水稻或玉米種子水中發芽能力，均有相當明顯的抑制作用，可造成原有耐淹水能力的喪失(圖 11)。

說明二：

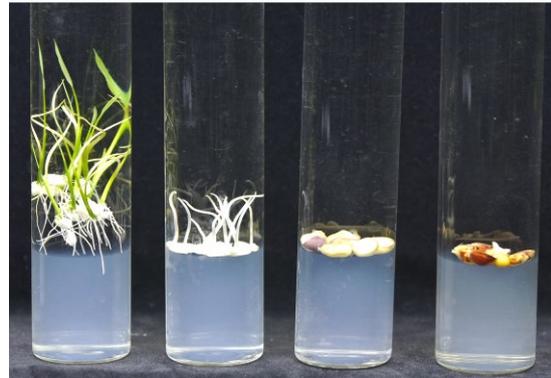
在水中外加各種醣類或礦物質，雖然對提升寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 的水中發芽能力有限，不像水稻種子的增強效果 (表 3a、b)；但是，醣類或礦物質對於 2 種玉米種子幼苗的綠化與發根，有明顯幫助(表 3c、d)。使用單因子變異數 ANOVA 統計分析: * P < 0.05 (略有差異，但不顯著); ** P < 0.01(有顯著差異); *** P < 0.001(差異非常顯著)。

第二部份的實驗結果顯示，穀類種子水中發芽的能力強弱，確實可透過胚乳中所儲存澱粉分解產物的醣類供應回饋機制，來提升種子的耐淹水能力。但是，我們卻意外發現，外加來自蛋白質分解物的胺基酸組成，不但無法提升，更會明顯抑制種子的水中發芽能力，我們懷疑是否使用了過高的濃度，才導致了負面的效果，因此，我們又設計了第三部分的後續實驗「比較外加不同濃度或複合營養源成份，對種子淹水下發芽的回饋反應」，透過外加濃度的降低或不同營養組成的混合設計，觀察其對種子水中發芽能力的影響性。

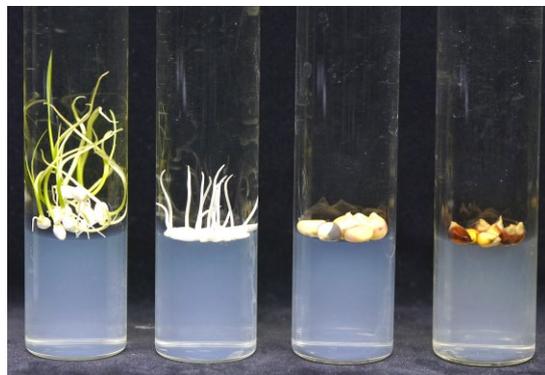
四、第三部分：比較不同濃度及複合營養組成的淹水下發芽之回饋反應(圖 12)



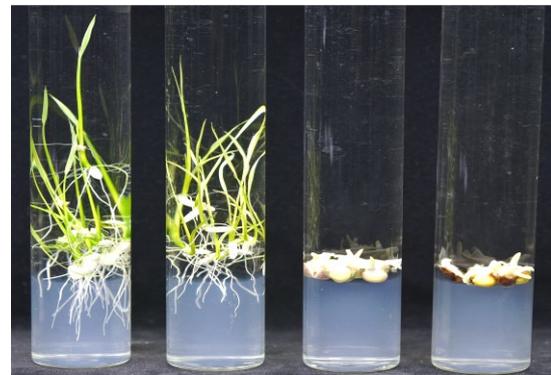
a. 水中發芽七天生長情形



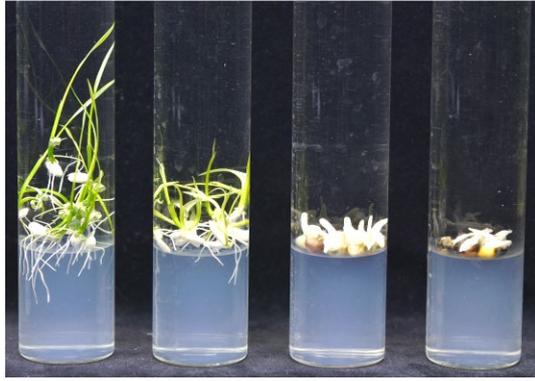
b. 0.1%胺基酸溶液中發芽七天生長情形



c. 0.1%酵母菌萃溶液中發芽七天生長情形

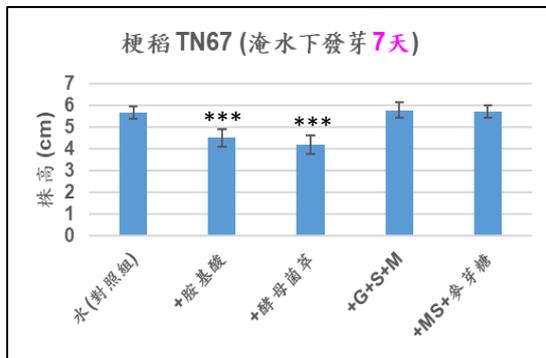


d. 醣類混合溶液中發芽七天生長情形
(1%葡萄糖+ 1%蔗糖+ 1%麥芽糖)

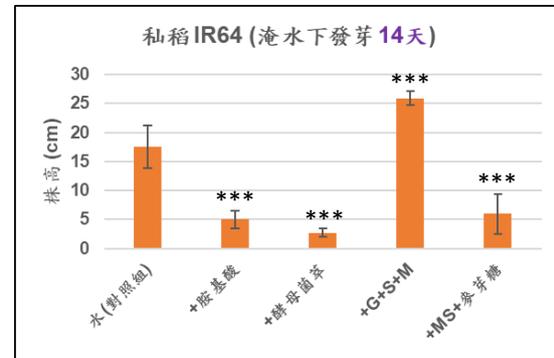
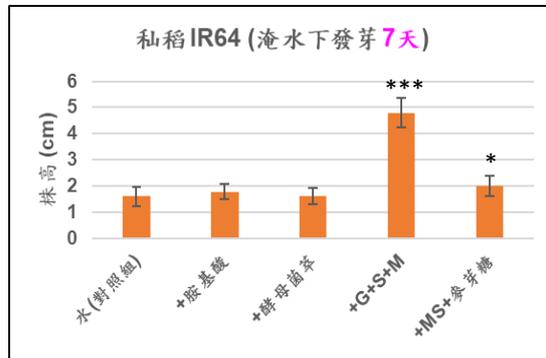


e.混合溶液中發芽七天生長情形 (礦物質(1xMS 培養基)+3%麥芽糖)

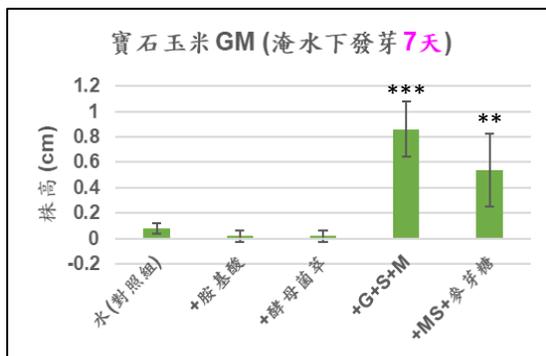
圖 12.種子發芽七天後生長情形



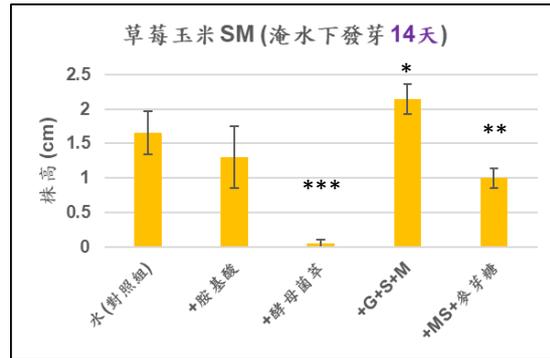
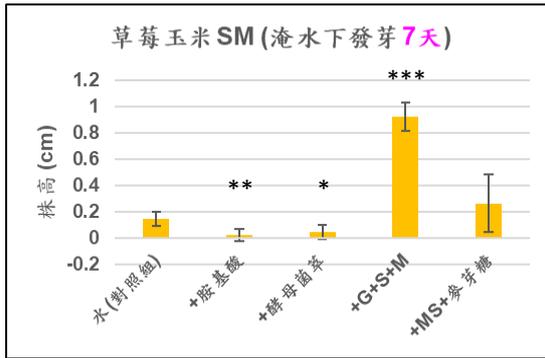
a.梗稻 TN67 淹水下發芽生長高度



b.秈稻 IR64 淹水下發芽生長高度



c.寶石玉米(GM)淹水下發芽生長高度



(單因子變異數 ANOVA 統計分析: * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001)

d. 草莓玉米(SM)淹水下發芽生長高度

表 4. 種子發芽七天、十四天之生長高度

說明一：

降低水中外加胺基酸的濃度 (第二部分實驗設計的 1/10)後,無論是蛋白質分解產物: 0.1%胰蛋白胨 (Tryptone) 或全細胞分解物: 0.1%酵母萃取物 (Yeast extract), 對粳稻 TN67 的發芽抑制效果較不明顯 (圖 12 a、b), 但其對秈稻 IR64、寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 的種子水中發芽能力, 還是有相當明顯的抑制作用, 可造成原有耐淹水能力的喪失(表 4c、d)。

說明二：

同時混合三種醣類 (1%葡萄糖+ 1%麥芽糖+ 1%蔗糖), 對水稻或玉米種子水中發芽能力的增強效果, 和單加任何一種 3%醣類的反應相比並無更明顯及更佳(圖 12)。

說明三：

同時混合外加礦物質 (1x MS 培養基) 和 3%麥芽糖, 可以增強粳稻 TN67 的水中發芽能力, 但對秈稻 IR64 的效果有限, 對寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 則影響不大 (圖 12)。使用單因子變異數 ANOVA 統計分析: * P < 0.05 (略有差異, 但不顯著); ** P < 0.01(有顯著差異); *** P < 0.001(差異非常顯著)。

陸、討論

一、前置實驗

在非無菌的環境下，種子發芽過程的發霉機率甚高，且無法順利生長，因而影響實驗的精確度。為了降低種子發霉機率，我們在後續實驗皆透過無菌操作播種確保種子能夠在無菌的環境下生長，以減少實驗結果的誤差。(前置實驗，表 1)

二、比較不同品種水稻與玉米間的耐淹水能力差異

本研究中的在消毒前水稻種子皆以剝殼的方式處理，除了挑出發育成熟的種子、減少發芽不完全的情況、能使種子較早發芽及有較明顯的實驗結果，並且能避免消毒不夠徹底，在生長的過程中產生汙染，使種子無法正常發芽。

從水稻及玉米的生長結果來看，其中秈稻 IR64 在空氣中的發芽能力較粳稻 TN67 好，但在淹水的情況下卻較差，顯示不同品系水稻有不同的耐淹水性，推測其中可能有其他影響的因素。(圖 9，表 2)

郭俊毅、郭威廷、陳鵬文(2013)指出 α -澱粉水解酵素基因的表現在水稻中不僅受到氧氣缺乏 (O_2 deficiency) 的誘導，也受到植物賀爾蒙吉貝素 (gibberellin) 及缺糖 (sugar starvation) 的誘導。(圖 13)

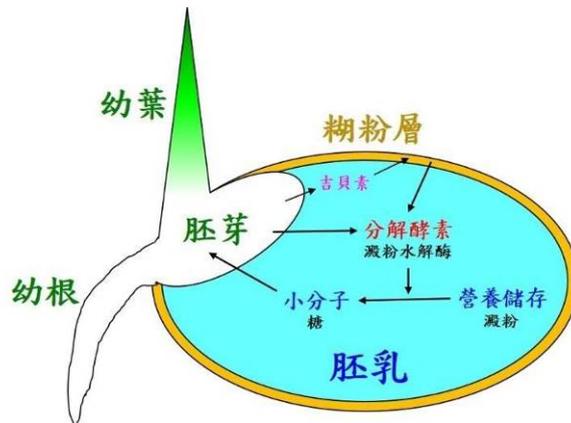


圖 13.水稻種子發芽期間營養回饋示意圖

蔡宜婷(2014)提到在水稻種子中，胚乳外圍糊粉層的 α -澱粉水解酵素，於淹水的環境下會受到低氧、缺糖和吉貝素的影響，並分解胚乳的儲存澱粉，釋出糖分供植物生長所需。而根據生長及電泳的結果，空氣中發芽的結果與澱粉水解酶總活性結果相似，所以空氣中發芽能力，可能與澱粉水解酶總活性有關；淹水下的結果則和 α -Amylase 澱粉水解酶專一活性大小相似，所以淹水下的發芽能力，可能與 α -Amylase 的活性有關。因此我們推測種子胚乳的營養供給，可以決定種子在淹水逆境下的發芽能力。(圖 10)

而我們在實驗中所使用的凝膠為原態聚丙烯醯胺凝膠，由上層膠和下層膠組成。在凝膠中，每種蛋白質的移動速度取決於其分子量與形狀大小。分子量小的

蛋白質可以很容易地通過凝膠中的孔；分子量大的蛋白質則很難通過。一段時間後，蛋白質會根據大小達到不同的距離，從而達到蛋白質分離的目的。膠體酵素活性分析法 (Zymography)，透過原態膠體電泳分離與酵素活性呈色法，可以實際測定某種酵素蛋白質種類與活性高低，本實驗所使用的是澱粉酶酵素活性分析，僅測定種子中的澱粉水解酶種類與活性的比較。

三、比較不同單一營養成份的淹水下發芽之回饋反應

從第二部分的實驗結果可知水稻在淹水下發芽能力粳稻 TN67 比秈稻 IR64 還好，但在水中加了外加澱粉的分解產物和礦物質後，秈稻 IR64 對營養物質的反應卻比粳稻 TN67 還大，其中又以葡萄糖的效果最為明顯。(圖 11，表 3) 因此我們推測在正常淹水情況下，秈稻 IR64 可能會因淹水而缺氧被抑制，較依賴外在營養物質供給，但外加礦物質，可以稍微提升其在淹水下的發芽能力，但會造成葉子生長變形 (圖 11 e)；粳稻 TN67 則原本對淹水逆境的耐受能力較強，本身較不需要外在供應營養物質，而可能是主要依靠 α -Amylase 分解澱粉供應養分。

李勇成、高銓宏、陳鵬文(2014)指出糖的利用在水稻種子發芽及子葉鞘伸長之耐淹水性上扮演重要的角色。我們的結果顯示種子胚乳中的澱粉分解與醣類供應回饋，在種子淹水逆境中為重要的一部分，推測植物本身對糖的吸收與利用，能影響種子在淹水下的發芽能力。

而寶石玉米和草莓玉米雖然在淹水下發芽能力仍被抑制，卻也在加入各種醣類和礦物質後，都可以稍微提升兩者在水中發芽的能力，幫助其發芽及綠化。(圖 11) 我們根據這個結果推測，在正常淹水情況下，玉米可能會因淹水而缺氧被抑制，需依賴外在營養物質供給，並且醣類和礦物質相比之下，葡萄糖、蔗糖和麥芽糖對玉米的生長影響較大。(表 3)

綜合水稻和玉米的實驗結果，加入 1%胺基酸 (Tryptone)或 1%酵母菌粹 (Yeast extract)，對粳稻 TN67、秈稻 IR64 或兩種玉米 GM 及 SM，均會嚴重抑制其水中發芽的能力，所以我們只討論種子發芽生長到第 7 天。(圖 11 f, g) 我們推測可能是濃度太高或植物本身不需要胺基酸 (Tryptone)和酵母菌粹 (Yeast extract) 所提供的營養，而醣類對兩种植物的生長則有較大的影響，1xMS 培養基則次之。

四、比較不同濃度及複合營養組成的淹水下發芽之回饋反應

從第三部分的實驗結果可知在正常淹水下，粳稻 TN67 仍會被 0.1%胺基酸 (胰蛋白胰 Tryptone)或 0.1%酵母菌萃 (Yeast extract)所影響，但影響的程度有限(圖 12 b,c)，推測可能 1%胺基酸 (胰蛋白胰 Tryptone)或 1%酵母菌萃 (Yeast extract) 對植物來說濃度太高而抑制其生長。結合第二部分的結果，我們也發現粳稻 TN67 在不不論是單一營養源，還是在混合營養物質之下，生長的結果相似，較不需要外

在供應營養物質，推測其可能依靠自己的 α -Amylase 分解澱粉供應養分。(圖 12，表 4)

秈稻 IR64 對胺基酸及酵母菌萃產生不良反應，結合第二部分的結果，推測可能是因為其本身缺乏所需要的醣類營養物質。(圖 12 b, c) 但對葡萄糖、蔗糖、麥芽糖混合的反應卻比粳稻 TN67 明顯，我們推測是因為秈稻 IR64 可能會因淹水而被抑制生長，仍然需依賴外在營養物質供給，所以對醣類的反應較好。(圖 12 d)

綜合水稻和玉米的實驗結果，加入 0.1%胺基酸 (Tryptone)或 0.1%酵母菌萃 (Yeast extract)，除了粳稻 TN67，其他均會嚴重抑制其水中發芽的能力。(圖 12 b, c) 而葡萄糖、蔗糖、麥芽糖混合，除了粳稻 TN67 之外，都有正面影響。(圖 12 d) 但與第二部分的實驗結果相比，顯示混合三種醣類與單一醣類相比造成的影響並沒有更明顯且更好。另外，複合營養物的相互搭配還有許多其他選擇，但因時間不足，我們將留待日後繼續深入探討。

柒、結論

一、種子胚乳的營養源供應決定其在淹水逆境下的發芽能力。水稻在空氣中的發芽能力，與澱粉水解酶總活性有關。但在淹水下的發芽能力，則與 α -Amylase 澱粉水解酶專一活性有關。

二、不同品種的穀類作物種子發芽時，分解酵素活性表現強弱，可決定其發芽能力的快慢，在淹水逆境下時，秈稻 IR64 和兩種玉米的澱粉酶酵素活性會被強烈抑制，導致減弱或喪失發芽能力；粳稻 TN67 酵素活性與發芽能力，卻不太會受到淹水所抑制，故能呈現其相對較強許多的淹水耐受能力。

三、透過外加各種醣類的回饋供應設計 (模擬胚乳澱粉分解產物)，我們成功的讓原本缺乏淹水耐受性的秈稻 IR64 品種，恢復成類似於粳稻 TN67 品種的水中成功發芽形態。

四、這種成功轉變，也進一步驗證了我們前述的假設，穀類種子發芽時澱粉分解酶酵素活性表現的調控，可以直接決定醣類營養源的回饋供應，進而掌控種子於水中發芽的淹水耐受能力。

捌、參考資料

- 一、呂坤泉、許志聖、楊嘉凌(2002)。世界水稻的分類。
- 二、高銓宏(2007)。水稻 α -澱粉水解酵素基因 α Amy3 在種子發芽及幼苗生長時期受缺氧/低氧調控之分子機制之研究。
- 三、張賀鈞(2021)。探討植物荷爾蒙生長素參與水稻水中發芽的基因調控與生理反應。

- 四、張玉瓏、徐乃芝、許素菁(2013)。生物技術。新文京開發，台北。
- 五、郭俊毅、郭威廷、陳鵬文(2013)。水稻澱粉水解酵素(α -Amy3 基因)表現於水稻幼苗中受到淹水的誘導及有氧的抑制。
- 六、蔡宜婷(2014)。水稻 α -澱粉水解酵素基因受低氧調控表現之分子機制研究。
- 七、李勇成、高銓宏、陳鵬文(2014)。糖的利用在水稻種子發芽及子葉鞘伸長之淹水耐受性上扮演重要的角色。嘉大農林學報第十一卷第一期，75-87 頁。
- 八、吳俊賢(2015)。水稻澱粉分解酵素受到淹水逆境調控表現之分子機制研究。
- 九、侯雅玲(2017)。淹水對水稻生長之影響。臺東區農業專訊，102，17-21。

致謝

本研究得以完成要感謝國立嘉義大學生物農業科技學系陳教授及李博士給予技術諮詢與提供儀器設備，更要感謝本校林老師於研究期間不辭辛勞的督導實驗與精神鼓勵。

【評語】 052102

1. 本研究主要在進行種子酵素活性與營養回饋之淹水耐性研究，主要目的在了解不同水稻玉米間的耐淹水性差異，以及探討藉由改變生長環境是否對其耐淹水性有所影響。
2. 澱粉水解酶跟發芽能力的因果關係仍須進一步確定。是發芽能力好才會讓澱粉水解酶的活性變高，還是相反是因為澱粉水解酶高才能夠讓種子有較佳的發芽能力呢？
3. 外加 1%胺基酸影響種子耐淹水能力的實際機制，仍待進一步分析。
4. 本研究假說及驗證過程尚待加強，如可進一步探討可能的原因，必可增加作品的深度。

作品簡報

種子酵素活性與營養回饋之淹水耐性研究

科 別：植物學科

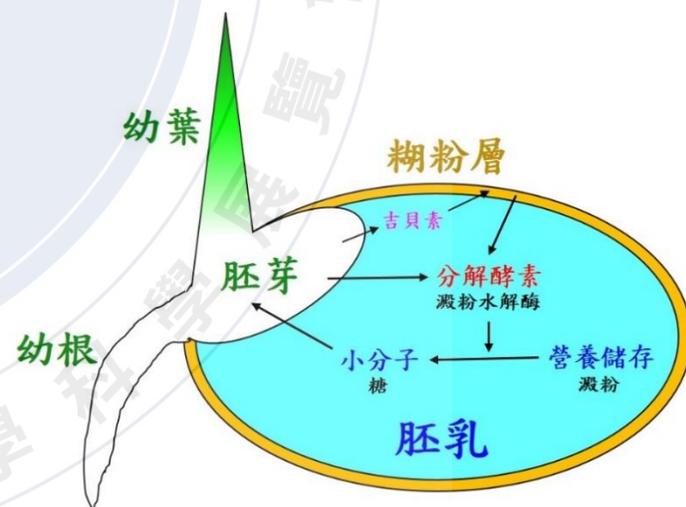
組 別：高級中等學校組

壹、研究動機

近年來全球氣候變遷越來越嚴重，極端氣候的襲擊所造成的災害也越來越頻繁的今日，農作物的淹水損害日趨嚴重，因此糧食的問題逐漸受到關注。水稻是我們台灣主要的糧食作物，在糧食供應上扮演不可或缺的角色。在尋找相關資料時，我們得知不同品系間的水稻有不一樣的耐淹水性，可以因應全球暖化所帶來的災害。因此我們想要了解**不同水稻間的耐淹水性有什麼差異？不同糧食作物之間的耐淹水性有什麼差異？甚至是否可以藉由改變其生長環境使其耐淹水性有所改變？**於是便在老師的指導下開始了本次的研究。

貳、研究目的

- 一、探討不同品系水稻、玉米種子於空氣中或淹水下發芽生長的能力差異。
- 二、分析不同品系水稻、玉米種子於空氣中或淹水下發芽時，種子內澱粉水解酶酵素活性的變化與差異。
- 三、探討在水中人工添加不同的種子胚乳單一、複合及不同濃度的營養源是否能影響種子在淹水下的發芽能力。



▲ 水稻種子發芽期間營養回饋示意圖

參、研究過程、方法及結果

實驗流程圖



(一)前置實驗

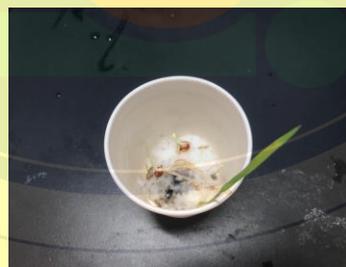
實驗說明：在實驗前先測試種子的發芽率，避免影響實驗結果。



a. 衛生紙鋪至紙杯底部

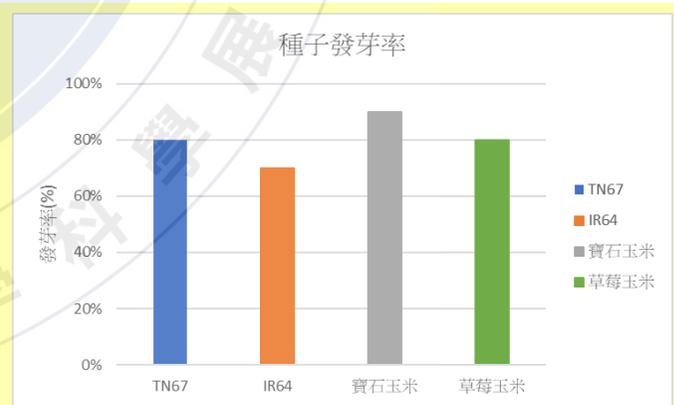


b. 將十顆種子夾至杯中



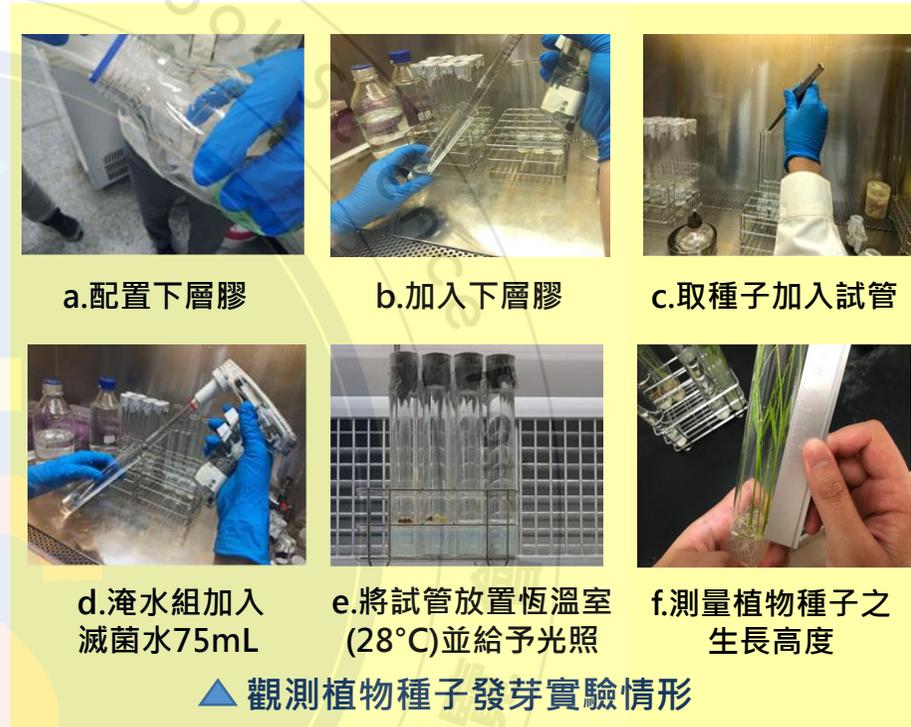
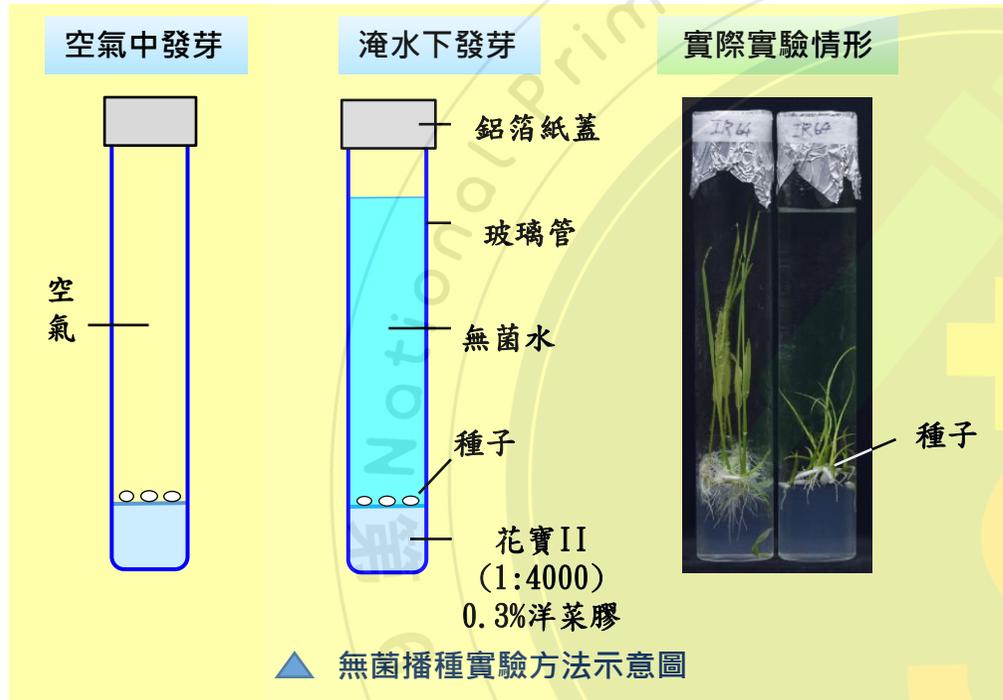
c. 觀測種子發芽情形

▲ 種子發芽率測試實驗情形



▲ 在非無菌環境下的種子發芽率

討論：在非無菌的環境下，種子發芽過程的**發霉機率甚高**，且無法順利生長，因而影響實驗的精確度。為了降低種子發霉機率，我們在後續實驗皆透過**無菌操作播種確保種子能夠在無菌的環境下生長，以減少實驗結果的誤差**。



第一部份：比較不同品種水稻與玉米間的耐淹水能力差異

【試驗一】觀測植物種子發芽情形

實驗說明：在無菌的環境下，分別在空氣與淹水的試管中種植四種作物(粳稻TN67、籼稻IR64、寶石玉米、草莓玉米)，觀察14天後繪製生長曲線，並比較其生長差異。

【試驗二】澱粉水解酶酵素活性分析

實驗說明：從發芽生長7天後的種子植株中萃取蛋白質樣本，再利用原態膠體電泳(Native-PAGE)的技術，分析並比較種子中的澱粉水解酶酵素活性差異。

(一)



a. 去掉種子莖與根部



b. 將種子磨成粉末



c. 加入蛋白質萃取緩衝液



d. 將樣本放入離心機



e. 將樣本加熱15分鐘



f. 將樣本放至冰桶中保存

▲ 製作樣本實驗情形

(二)



a. 配置上、下層膠



b. 在樣本中加入染劑



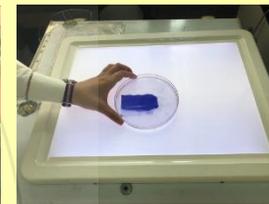
f. 跑膠3小時(70V/1hr、100V/2hr)



d. 將膠放入恆溫培養箱(37°C) 45分鐘



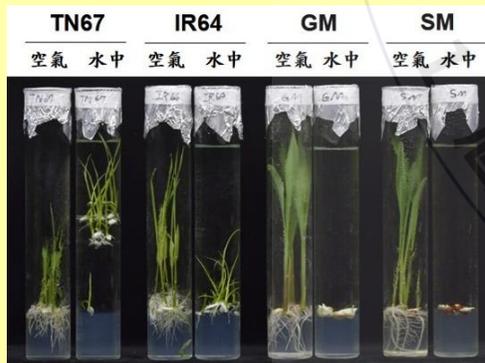
e. 將膠加入碘液混合1分鐘



f. 將膠洗淨碘液後放至光板觀察

▲ 原態膠體電泳與澱粉水解酶酵素活性呈色實驗情形

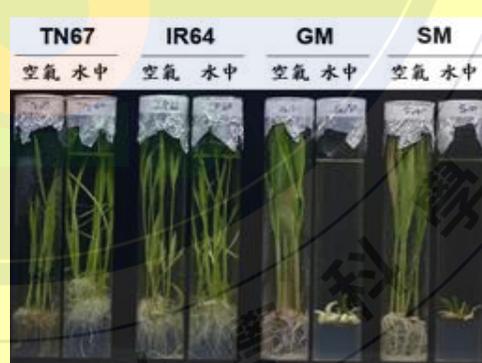
研究結果(第一部份)



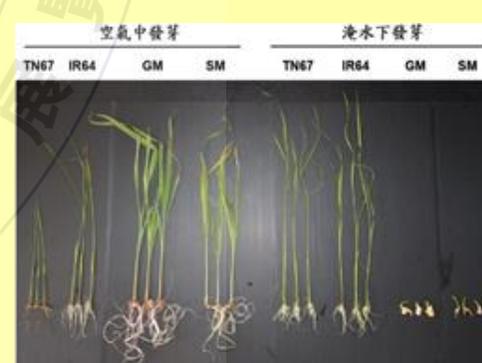
a. 發芽七天種子生長情形



b. 發芽七天後收成照片

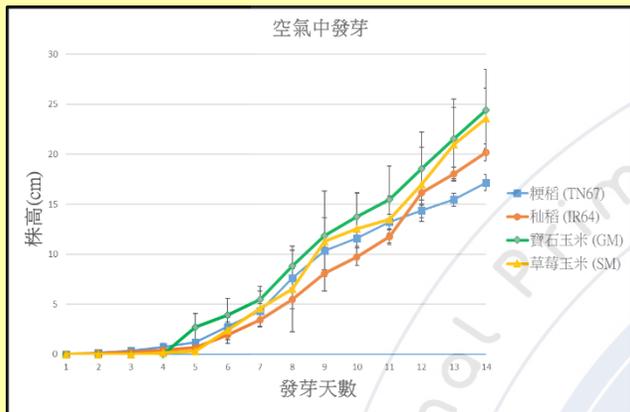


c. 發芽十四天後種子生長情形

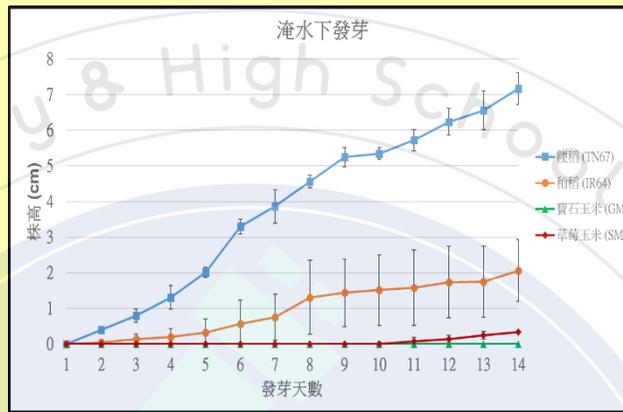


d. 發芽十四天後收成照片

▲ 種子發芽七天與十四天後生長情形



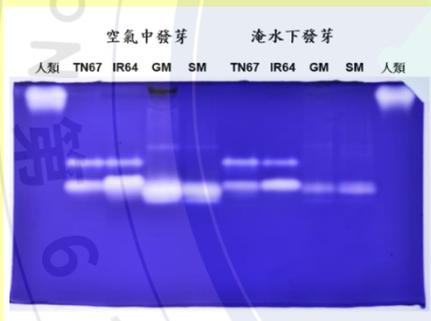
a. TN67水稻、IR64水稻、寶石玉米、草莓玉米於空氣中發芽之生長曲線



b. TN67水稻、IR64水稻、寶石玉米、草莓玉米於淹水下發芽之生長曲線

▲ 種子發芽十四天之生長曲線

說明一：
 種子在空氣中發芽能力：GM > SM > IR64 > TN67，**玉米勝於水稻**；而淹水中發芽能力則：TN67 > IR64 > SM > GM，**水稻勝於玉米**。



a. 澱粉水解酶總活性結果



b. α -Amylase澱粉水解酶專一活性結果

▲ 澱粉水解酶活性分析電泳結果

說明二：
 種子於空氣中發芽的澱粉酶總活性表現強弱：寶石玉米 (GM) > 草莓玉米 (SM) > 秈稻 IR64 > 稈稻 TN67，玉米的酵素活性大於水稻；與前述的種子發芽能力 (說明一)，呈現正相關，這個結果顯示**穀類種子於空氣中的發芽能力，可能與種子的澱粉水解酶總活性的強弱有關**，酵素活性越強，發芽速度就越快；而穀類種子於淹水下發芽時 α -Amylase 澱粉酶專一活性表現強弱：稈稻 TN67 > 秈稻 IR64 > 草莓玉米 (SM) > 寶石玉米 (GM)，水稻的殘餘酵素活性遠高於玉米，因此我們推測，**穀類種子的耐淹水能力可能與 α -Amylase 澱粉水解酶專一活性有關**，殘餘酵素活性越高，水中的發芽能力就越佳。

第一部份的實驗結果顯示，穀類種子水中發芽的能力強弱，可能與種子產生的澱粉酶酵素活性高低有關，我們推論胚乳中營養儲存成份的分解效率與營養源供應回饋機制，可能扮演重要的關鍵角色。因此，我們設計了第二部分的後續實驗「比較外加不同單一營養源成份，對種子淹水下發芽的回饋反應」，利用人工添加不同營養源成份來模擬胚乳的營養回饋供應，觀察其對種子水中發芽能力的實際影響性。

第二部份：比較不同單一營養成份的淹水下發芽之回饋反應

【試驗一】觀測植物種子加入單一營養源後發芽情形

實驗說明：在無菌的環境下，分別在試管中加入配置並滅菌完成的營養源溶液：水(對照組)、3%葡萄糖、3%麥芽糖、3%蔗糖、礦物質 (1xMS培養基)、1%酵母萃取物 (Yeast extract)、1%胰蛋白胨 (Tryptone)，觀察7~14天後進行生長統計，並比較其形態差異。

研究結果(第二部份)



a. 水中(對照組)



b. 3%葡萄糖溶液



c. 3%麥芽糖溶液



d. 3%蔗糖溶液



a. 配置各營養素溶液



b. 加入營養素



c. 取十顆水稻、七顆玉米種子加入試管

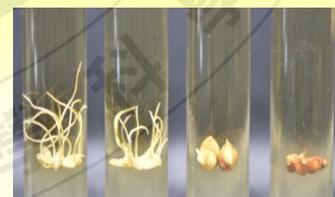


d. 每日測量植物種子之生長高度

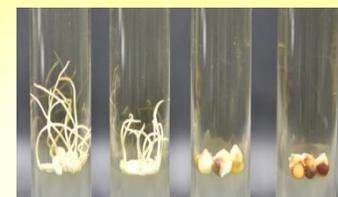
▲ 觀測植物種子加入單一營養源後發芽實驗情形



e. 礦物質溶液

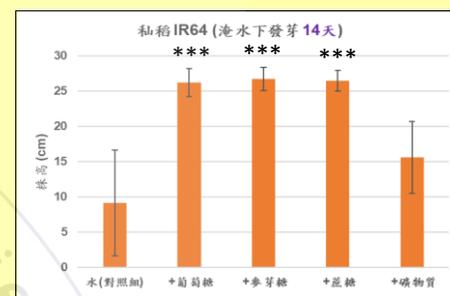
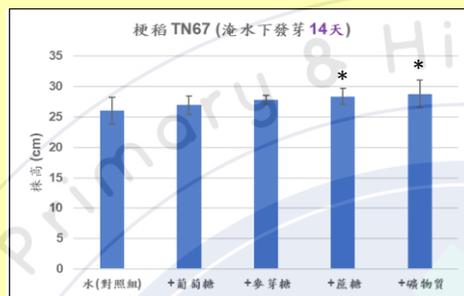
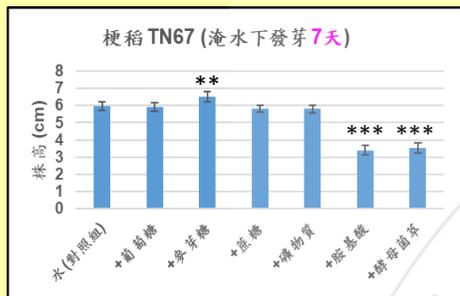


f. 1%Tryptone溶液



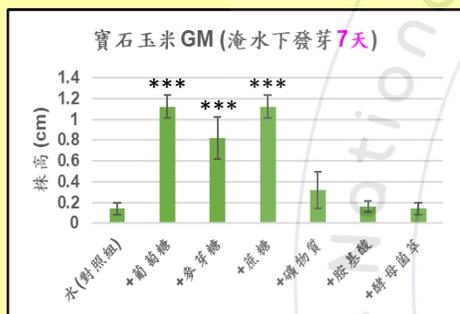
g. 1%Yeast extract溶液

▲ 種子發芽七天後生長情形

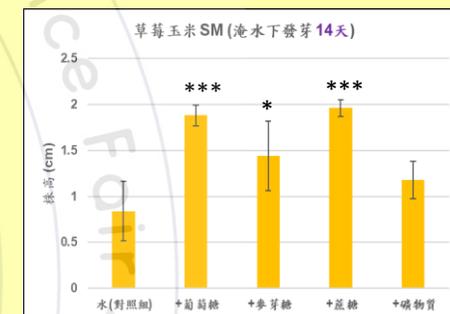
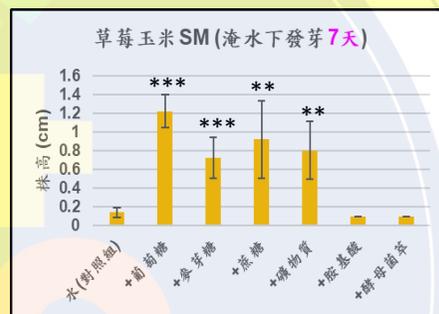


a. 粳稻 TN67 淹水下發芽生長高度

b. 秈稻 IR64 淹水下發芽生長高度



c. 寶石玉米(GM)淹水下發芽生長高度



d. 草莓玉米(SM)淹水下發芽生長高度

(單因子變異數ANOVA統計分析: * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001)

▲ 種子發芽七天、十四天之生長高度

說明一：

外加不同醣類，無論是3%葡萄糖、3%麥芽糖或3%蔗糖，對水稻或玉米種子水中發芽能力，均有增強效果；其中，對秈稻IR64的效果最顯著，粳稻TN67較不明顯，寶石玉米 (GM) 與草莓玉米 (SM) 呈現較輕微的效果。在水中外加礦物質，對秈稻IR64的水中發芽能力有部份的增強效果，對粳稻TN67、寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 則影響不大。在水中外加胺基酸，無論是蛋白質分解產物：1%胰蛋白胨 (Tryptone) 或全細胞分解物：1%酵母萃取物 (Yeast extract)，對水稻或玉米種子水中發芽能力，均有相當明顯的抑制作用，可造成原有耐淹水能力的喪失。

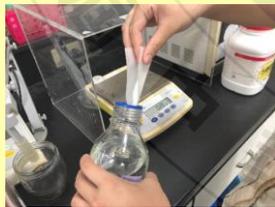
說明二：
在水中外加各種醣類或礦物質，雖然對提升寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 的水中發芽能力有限，不像水稻種子的增強效果；但是，**醣類或礦物質對於2種玉米種子幼苗的綠化與發根，有明顯幫助。**

第二部份的實驗結果顯示，穀類種子水中發芽的能力強弱，確實可透過胚乳中所儲存澱粉分解產物的醣類供應回饋機制，來提升種子的耐淹水能力。但是，我們卻意外發現，**外加來自蛋白質分解物的胺基酸組成，不但無法提升，更會明顯抑制種子的水中發芽能力**，我們懷疑是否使用了過高的濃度，才導致了負面的效果，因此，我們又設計了第三部分的後續實驗「**比較外加不同濃度或複合營養源成份，對種子淹水下發芽的回饋反應**」，**透過外加濃度的降低或不同營養組成的混合設計，觀察其對種子水中發芽能力的影響性。**

第三部份：比較不同濃度及複合營養組成的淹水下發芽之回饋反應

【試驗一】觀測植物種子加入不同濃度及複合營養源後發芽情形

實驗說明：在無菌的環境下，分別在試管中加入配置好並滅菌的低濃度或不同混合營養源溶液：水 (對照組)、0.1%酵母萃取物(Yeast extract)、0.1%胰蛋白胨 (Tryptone)、三種醣類混合 (1%葡萄糖 / 1%麥芽糖 / 1%蔗糖)、礦物質混合醣類 (1xMS培養基 / 3%麥芽糖)，觀察7~14天後進行生長統計，並比較其形態差異。



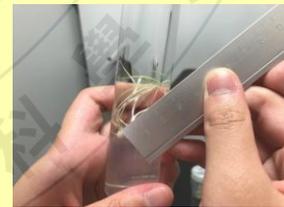
a.配置各營養素溶液



b.加入營養素



c. 將洗淨後的種子
加入試管



f.每日測量植物種子
之生長高度

▲觀測植物種子加入不同濃度及複合營養源後發芽實驗情形

研究結果(第三部份)



a. 水中(對照組)



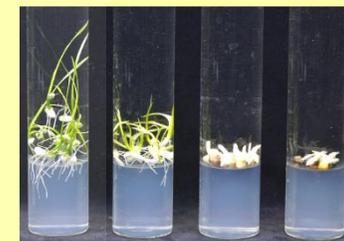
b. 0.1%胺基酸溶液中



c. 0.1%酵母菌萃溶液中



d. 醣類混合溶液中



e. 混合溶液中

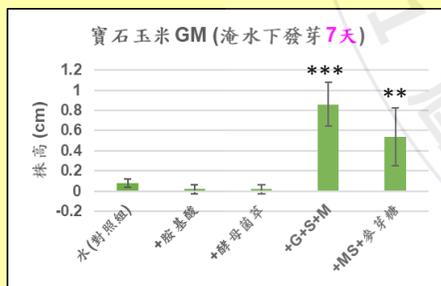
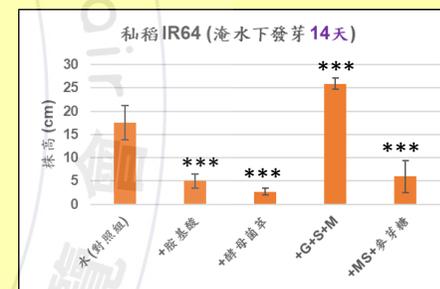
▲ 種子發芽七天後生長情形



a. 梗稻 TN67 淹水下發芽生長高度



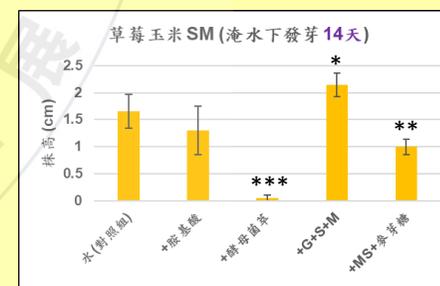
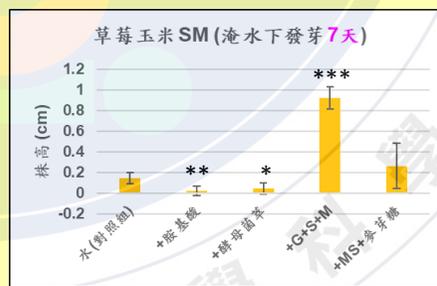
b. 籼稻 IR64 淹水下發芽生長高度



c. 寶石玉米(GM)淹水下發芽生長高度



d. 草莓玉米(SM)淹水下發芽生長高度



(單因子變異數ANOVA統計分析: * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001)

▲ 種子發芽七天、十四天之生長高度

說明一：

降低水中外加胺基酸、酵母菌萃的濃度 (第二部分實驗設計的1/10)後，對粳稻TN67的發芽抑制效果較不明顯，但其對籼稻IR64、寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 的種子水中發芽能力，還是有相當明顯的抑制作用。

說明二：

同時混合三種醣類 (1%葡萄糖 + 1%麥芽糖 + 1%蔗糖)，對水稻或玉米種子水中發芽能力的增強效果，和單加任何一種3%醣類的反應相比並無更明顯及更佳。

說明三：

同時混合外加礦物質 (1x MS培養基) 和3%麥芽糖，可以增強粳稻TN67的水中發芽能力，但對籼稻IR64的效果有限，對寶石玉米 (GM)、草莓玉米 (SM) 則影響不大。

肆、討論

本研究中的在消毒前水稻種子皆以**剝殼**的方式處理，除了挑出發育成熟的種子、減少發芽不完全的情況、能使種子較早發芽及有較明顯的實驗結果，並且能避免消毒不夠徹底，在生長的過程中產生汙染，使種子無法正常發芽。我們的實驗結果顯示，粳稻TN67的耐淹水性較強，推測其主要**依靠自身的 α -Amylase分解澱粉以供應養分**。另外，我們發現**外加胺基酸對四種作物皆有抑制效果**，因此在第二部分的實驗我們只討論種子發芽生長到第七天。但在降低濃度後，除了粳稻TN67之外，對其他三種作物的生長仍有抑制效果。而不論添加**單一或者是複合醣類營養源溶液**，都能**提升作物在淹水下的發芽能力**，因此我們推測**醣類在種子發芽過程中扮演重要角色**。而複合營養物的相互搭配還有許多其他選擇，但因時間不足，我們將留待日後繼續深入探討。

伍、結論

- 一、種子胚乳的營養源供應決定其在淹水逆境下的發芽能力。水稻在空氣中的發芽能力，與澱粉水解酶總活性有關。但在淹水下的發芽能力，則與 α -Amylase澱粉水解酶專一活性有關。
- 二、種子發芽時分解酵素活性表現強弱，可決定其發芽能力的快慢。
- 三、透過外加各種醣類的回饋供應設計 (模擬胚乳澱粉分解產物)，我們成功的讓原本缺乏淹水耐受性的秈稻IR64品種，恢復成類似於粳稻TN67品種的水中成功發芽形態。
- 四、穀類種子發芽時澱粉分解酶酵素活性表現的調控，可以直接決定糖類營養源的回饋供應，進而掌控種子於水中發芽的淹水耐受能力。

陸、參考資料

- 一、呂坤泉、許志聖、楊嘉凌(2002)。世界水稻的分類。
- 二、高銓宏(2007)。水稻 α -澱粉水解酵素基因 α Amy3在種子發芽及幼苗生長時期受缺氧/低氧調控之分子機制之研究。
- 三、張賀鈞(2021)。探討植物荷爾蒙生長素參與水稻水中發芽的基因調控與生理反應。
- 四、張玉瓏、徐乃芝、許素菁(2013)。生物技術。新文京開發，台北。
- 五、郭俊毅、郭威廷、陳鵬文(2013)。水稻澱粉水解酵素(α -Amy3基因)表現於水稻幼苗中受到淹水的誘導及有氧的抑制。
- 六、蔡宜婷(2014)。水稻 α -澱粉水解酵素基因受低氧調控表現之分子機制研究。
- 七、李勇成、高銓宏、陳鵬文(2014)。糖的利用在水稻種子發芽及子葉鞘伸長之淹水耐受性上扮演重要的角色。嘉大農林學報第十一卷第一期，75-87頁。
- 八、吳俊賢(2015)。水稻澱粉分解酵素受到淹水逆境調控表現之分子機制研究。
- 九、侯雅玲(2017)。淹水對水稻生長之影響。臺東區農業專訊，102，17-21。