

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060003
參展科別 植物學
作品名稱 「醛」面啟動-探討肉桂醛提升綠豆耐鹽能力
之機制
得獎獎項 大會獎 三等獎

就讀學校 臺南市私立德光高級中學

國立臺南第一高級中學

指導教師 江芝韻、鄭楷騰

作者姓名 陳敬文、蕭崇彥、陳昱丞

關鍵詞 肉桂醛、抗氧化、鹽害

作者簡介



(左一：陳敬文、左二：陳昱丞、左三：蕭崇彥)

我是陳敬文，就讀德光中學高中二年級。雖然在一年級的探究與實作中，已經知曉進行研究時的大略流程，但在科展過程中，才發現完全不一樣，不論是實驗的精細度抑或是緊湊程度都大幅提升。與此同時，科展也教會我跳脫單一框架，並以多面向的角度思考，從不同的角度切入問題核心，或許就能看到另一番不同的風景。

我是蕭崇彥，德光中學高中二年級，這次參加科展的原因其中之一就是想挑戰看平常很少接觸的實驗項目，加上很享受在探索的過程中找出有趣的實驗結果的

那份喜悅，所以參加了科展。在這十幾個月中，我遇到的最大問題就是要在做實驗和兼顧課業之間保持適當的平衡。這次的科展不但讓我學到進行實驗的種種技巧以及團隊合作的精神，更讓我學習到支配時間的方法，使我獲益良多。

我是陳昱丞，台南一中三年級數資班。我樂愛研究，喜歡探尋生活周遭的新奇事物，這便是我參加科展的緣由，不同於記憶死板的知識，能活用所學進行邏輯思辯，探索未知並嘗試摸索真相。更重要的，是有一群志同道合的夥伴一起合作，分享巧思攜手築夢，在吸收課本知識的同時，為學術界盡自己微薄的貢獻。

摘要

濃厚氣味的中藥，吃了能讓人強健體魄，那植物服用後呢？研究發現，綠豆能感受肉桂粉中的氣味分子”肉桂醛”，並透過改變其生理與生長的發育來減緩其在鹽逆境下細胞死亡的程度，提高長期耐鹽能力。本研究顯示，熏完肉桂醛的綠豆能透過減少氣孔數、使澱粉代謝、增加根系來應對鹽逆境下的缺水問題，在生化研究方面，能透過在根部提前累積脯胺酸來應對滲透壓逆境。此外肉桂醛氣味能激發綠豆的抗氧化力，我們發現，肉桂醛能讓綠豆提前累積抗氧化物(脯胺酸、抗壞血酸)，另能提高抗氧化酵素活性(POD、APX)來應對鹽逆境下的氧化傷害。本研究發現綠豆能感受肉桂醛氣味並提升其長期耐鹽能力，期待未來能將研究成果用於農業，減少逆境對農業帶來的損失。

Abstract

Traditional Chinese medicine has been used for thousands of years in promoting human health. What if it is used on plants? The evidence in this study reveals that mung beans can sense "cinnamaldehyde(CA)" in cinnamon powder by altering its physiological, biochemical, and growth conditions to decrease cell death under salt stress, leading to higher long-term salt tolerance. In this study, the mung beans treated with CA have a lower number of stomata, more starch accumulation, and increasing root development to cope with the water shortage under salt stress. In the biochemical aspect, mung beans' roots show higher proline content to deal with the osmotic stress in advance. Moreover, mung beans pre co-cultured with CA volatile showed several antioxidant responses, including antioxidants accumulation(proline, ascorbic acid) and antioxidant enzyme activation(POD, APX) under salt stress. After all, our research indicates that mung beans could sense CA volatile substances from traditional Chinese medicine and thus increase its long-term salt tolerance. We hope that our study could be applied in future agriculture to decrease the impact of multiple stresses caused by global environmental changes

壹、研究動機

俗話說良藥苦口，中藥常帶有濃厚的氣味，人吃了卻能強身健體。我們上網查詢文獻，發現人體細胞竟然有感受中藥化學物質的受器，能接受中藥中化學成分後影響細胞生理，藉此舒緩疾病症狀。我們突發奇想，想知道植物能否像動物一樣可感受中藥材，並讓其強身健體呢？然而直接將中藥施灑在農田則擔心會造成環境汙染，我們想到在中醫裡面常利用蒸汽熏蒸來治療病人，我們好奇植物能否用相同的方式，透過感受中藥氣味來強健體魄，進而達到提升環境耐受性的能力呢？因此我們進行以下一連串實驗來探討此問題。

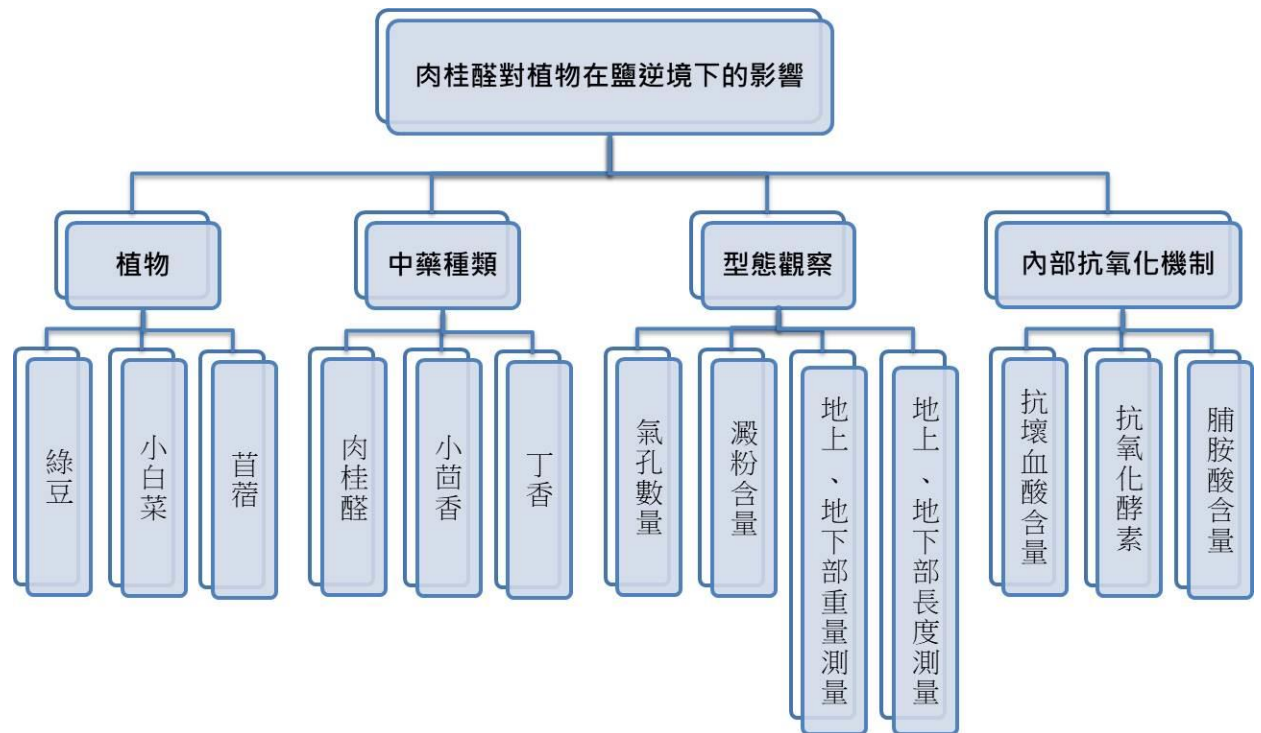
貳、研究目的

- 一、 科學中藥對植物種子萌發速率的影響
- 二、 科學中藥中揮發性物質對植物種子萌發速率的影響
- 三、 科學中藥中揮發性物質對綠豆小苗生長速率的影響
- 四、 科學中藥肉桂粉氣味對綠豆小苗抗鹽逆境能力的影響
- 五、 肉桂粉氣味成分分析
- 六、 肉桂醛處理綠豆的外表觀察
- 七、 肉桂醛處理綠豆在鹽逆境下的觀察
- 八、 處理肉桂醛後的綠豆在長時間鹽逆境下的觀察
- 九、 處理肉桂醛後的綠豆在長時間鹽逆境下的上、下胚軸觀察
- 十、 探討為何植物會耐鹽-地上部之氣孔
- 十一、 探討為何植物會耐鹽-地上部之澱粉含量變化
- 十二、 探討為何植物會耐鹽-地下部之重量與根系
- 十三、 探討為何植物會耐鹽-脯胺酸(Proline)
- 十四、 探討為何植物會耐鹽-抗壞血酸(Ascorbic acid)
- 十五、 探討為何植物會耐鹽-抗氧化酵素

參、研究器材與設備

- 一、 **研究材料**：綠豆、苜蓿、小白菜、水稻
- 二、 **實驗藥劑**：蒸餾水(ddH₂O)、丁香粉、小茴香粉、肉桂粉、肉桂醛、氯化鈉(NaCl)、退染溶液(50%甲醇+1%SDS)、乙醇、碘液、Evans blue、液態氫、DAB(3,3-二氨基聯苯胺)、MES(2-嗎啉乙磺酸)(pH6.5)、silwec77 界面活性劑
- 三、 **實驗器材**：培養皿、濾紙、鑷子、燒杯、量筒、虹膜剪、3M透氣膠帶、生長盒、共培養桶、石蠟膜、微量吸管、微量吸管尖、秤量紙、數位相機、電子精秤、六孔盤(退染容器)、防爆管、微量離心管、離心管、震盪儀、顯微鏡、保鮮膜、單槽乾浴器、加熱攪拌器、拭鏡紙、夾鏈帶、血清瓶、磁石

肆、研究過程與方法



一、科學中藥對植物種子萌發速率的影響

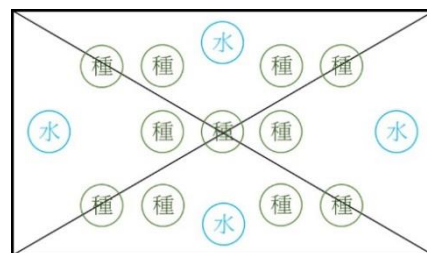
- (一)綠豆、苜蓿、小白菜種子泡水洗淨
- (二)取 36 個直徑 9cm 的培養皿上蓋放置一片濾紙並加水 15c.c
- (三)其中 12 個上蓋放入 6 顆綠豆種子
- (四)12 個上蓋中分別加入 0、1、2、3 克的肉桂、丁香、小茴香
- (五)剩下的 24 個培養皿仿照步驟(四)改為加入 10 顆苜蓿或 10 顆小白菜種子
- (六)使用 3M 透氣膠帶繞兩圈密封接合處
- (七)控制室溫 28°C

二、科學中藥中揮發性物質對植物種子萌發速率的影響

- (一)綠豆、苜蓿、小白菜種子泡水洗淨
- (二)取 36 個直徑 6cm 的培養皿上蓋放置兩片濾紙並加水 10c.c
- (三)其中 12 個上蓋放入 6 顆綠豆種子
- (四)剩下的 24 個培養皿仿照步驟(三)改為加入 10 顆苜蓿或 10 顆小白菜種子
- (五)準備 36 個直徑 9cm 的培養皿
- (六)每 12 個培養皿中分別加入 0、1、2、3 克的肉桂、丁香、小茴香
- (七)將 6 公分培養皿放入 9 公分培養皿中並蓋上 9 公分上蓋
- (八)使用 3M 透氣膠帶繞兩圈密封接合處
- (九)控制室溫 28°C

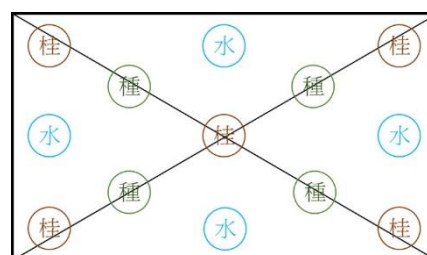
三、種植綠豆小苗

- (一)種子泡水洗淨約 3~5 分鐘
- (二)取 22 個 6cm 的培養皿上蓋放置兩片濾紙
- (三)取 22 個上蓋加水 10c.c 各放入 6 顆綠豆種子
- (四)取 8 個 6cm 的培養皿底蓋加水 15c.c
- (五)分別放入 2 個生長盒(每一盒各 11 盤綠豆、4 個水盤如右圖擺放)
- (六)放入生長箱 60hr，並控制照光和溫度 27°C



四、觀察肉桂粉對植株的影響

- (一)從各生長盒中篩選生長狀況良好的綠豆小苗
- (二)取 4 個 6cm 的培養皿上蓋，加入水 10c.c，放入綠豆小苗
- (三)取 5 個 6cm 培養皿加入肉桂粉
- (四)將 4 個 6cm 培養皿底蓋加水 15c.c
- (五)放入生長盒中(如右圖擺放)
- (六)放入生長箱，並控制照光和溫度 27°C



五、觀察肉桂醛對綠豆的影響

- (一)取 4 個共培養桶於底部放置 125mm 的濾紙，並加入 15ml 的水
- (二)從各生長盒中篩選生長狀況良好的綠豆(約 8~10 株)，並放置於各桶底層
- (三)各取 1 個 6cm 培養皿置於上層，放置一片濾紙，並以微量滴管分別滴入 0 μ l 和 2 μ l 肉桂醛
- (四)以石蠟膜密封接合處
- (五)放入生長箱培養 60 小時，並控制照光和溫度 27°C

六、鹽逆境處理

- (一)配置 NaCl 水溶液 0mM、200mM 各 55ml
- (二)將 55ml 各濃度的水溶液加入放有濾紙的 15cm 培養皿
- (三)將處理過的植株和 CTL 放在濾紙上，並確認根部浸泡於水溶液中
- (四)蓋上蓋子培養 3 小時

七、細胞死亡染色

- (一)配製 0.25% Evans blue 染劑
- (二)剪下植株根尖算起約 2 公分的長度後，置於六孔盤中
- (三)加入 Evans blue 溶液並淹沒樣品，並靜置 15 分鐘
- (四)用微量滴管將 Evans blue 吸出，並將根過蒸餾水稍微退染

- (五)將過完蒸餾水的根尖挑回六孔盤，並加入蒸餾水至八分滿退染 24hr
- (六)將退染後的根夾出，剪下植株根尖算起 1 公分的長度，置於培養皿上拍照紀錄
- (七)將根放入微量離心管中，並加入根數 100 倍 μl 之退染溶液(50%甲醇 +1%SDS)
- (八)在單槽乾浴器 50°C 下加熱 1 小時
- (九)取加熱後的溶液 $200\mu\text{l}$ 測量 OD595 時的吸光值

八、冷凍樣本

- (一)將鹽逆境後的植株剪下植株根尖算起約 1 公分的長度，並分別放入防爆管中
- (二)分別測量植株淨重並記錄於瓶身
- (三)將防爆管放入夾鏈袋中，並浸泡於液態氮中
- (四)將夾鏈袋放至 -80°C 的冰箱保存

九、澱粉染色測定

- (一)取土播後各組植株的葉片各兩片
- (二)將葉片置於酒精內隔水加熱
- (三)待葉綠色褪去後取出
- (四)將已褪色的葉片滴上碘液並觀察結果

十、蛋白質萃取與濃度測定

- (一) 取 0.05g 樣本利用液態氮磨碎
- (二) 加入 200 μl 蛋白質萃取液(501mM 磷酸鉀緩衝溶液,pH7.0)
- (三) 在 4°C 下利用 17800g 離心 10 分鐘
- (四) 吸取 $2\mu\text{l}$ 的蛋白質萃取樣本與 $100\mu\text{l}$ Reagent A(Bio Rad protein assay)混合
- (五) 在入 $800\mu\text{l}$ Reagent B，室溫下反應 15 分鐘
- (六) 利用 750nm 波長測量吸光值後換算蛋白質濃度

十一、脯胺酸(Proline)含量測定

- (一) 將樣本利用液態氮磨碎
- (二) 加入 3% 1.8ml 的黃基水楊酸(sulfosalicylic acid)並混和均勻
- (三) 在常溫下 5000g 離心 20 分鐘
- (四) 加入 0.4ml Ninhydrin(0.25g Ninhydrin+6ml 醋酸+4ml 6M 磷酸)、0.4ml 樣本液、0.4ml 醋酸混和均勻
- (五) 放入 95°C 水浴槽反應 1 小時
- (六) 加入 1.6ml 甲苯強力震盪 15 秒，並靜置 10 分鐘，測量上液 520nm 吸光值後換算濃度。

十二、抗壞血酸(Ascorbic acid)含量測定

- (一) 取 0.1g 植物組織加入 1ml TCA 萃取液(5%)
- (二) 常溫下 15000g 離心 20 分鐘
- (三) 200 μ l 萃取液+200 μ l Sodium phosphate buffer(150mM , pH7.4)+100 μ l DTT(10mM)靜置 15 分鐘
- (四) 加入 100 μ l N-Ethylmeimide(0.5%)+400 μ l TCA(10%)+400 μ l Phosphoric acid(44%)+400 μ l 2,2-Bipyridyl(4%)+200 μ l FeCl₃(3%)，37 度反應 1 小時
- (五) 常溫下 10000g 離心 5 分鐘，測上清液體 525nm 吸光值並換算濃度
- (六) 將步驟二中的 Sodium phosphate buffer 與 DTT 改成水的話則能單獨測得有活性的抗壞血酸

十三、過氧化酶(Peroxidase, POD)活性測量

- (一)取離心管，並加入 0.5ml 100mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH7.0)，在加入 0.25ml 的蒸餾水與 0.1ml 2.5%愈創木酚。
- (二)加入 2 μ l 的蛋白質萃樣本，混和均勻。
- (三)加入 0.1ml 10mM 過氧化氫。
- (四)快速將液體倒入比色管中，測量 470nm 在第一分鐘吸光值變化。
- (五)將讀值除以蛋白質濃度後，得活性。

十四、過氧化氫酶(Catalase, CAT)活性測量

- (一) 取離心管，並加入 990 μ l 50mM 過氧化氫溶液。
- (二) 加入 10 μ l 的蛋白質樣本，混合均勻。
- (三) 液體倒入比色管測量 240nm 第一分鐘吸光值變化。
- (四) 將讀值除以蛋白質濃度後，得活性。

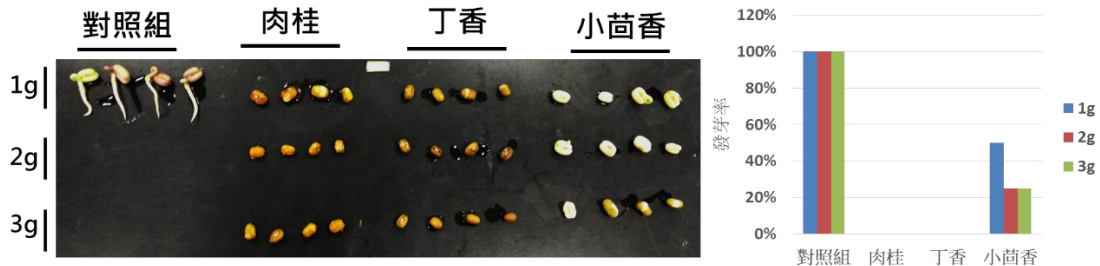
十五、維他命 C 氧化酶(APX)活性測量

- (一) 測量 0.02g 的冷凍樣本，並加入 1.8ml 的磷酸鈉緩衝溶液。
- (二) 在 4°C的環境下，以 12000g 離心 20 分鐘
- (三) 先分別為每管加入 0.25ml 的磷酸鉀緩衝溶液
- (四) 再加入 0.25ml 的 1.5mM 維他命 C 溶液與 0.1ml 的 0.75mM EDTA
- (五) 最後取出上清液 0.025ml 混合均勻
- (六) 然後一加入 0.125ml 的 6mMH₂O₂，混合均勻後便直接測量其吸光值(290nm)，且過一分鐘後再次測量
- (七) 最後用差值除以其蛋白質濃度

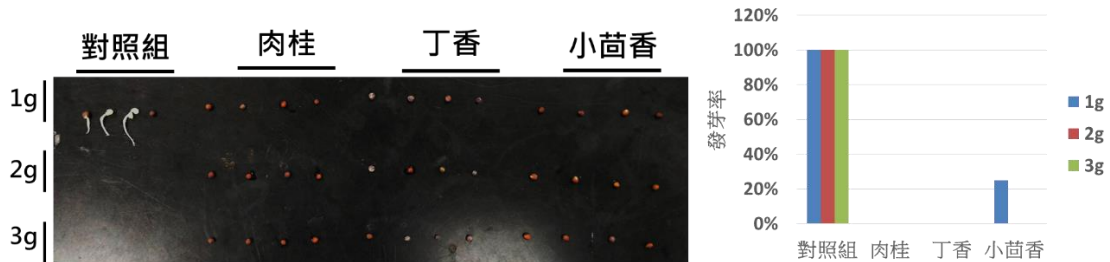
伍、研究結果

一、科學中藥對植物種子萌發速率的影響

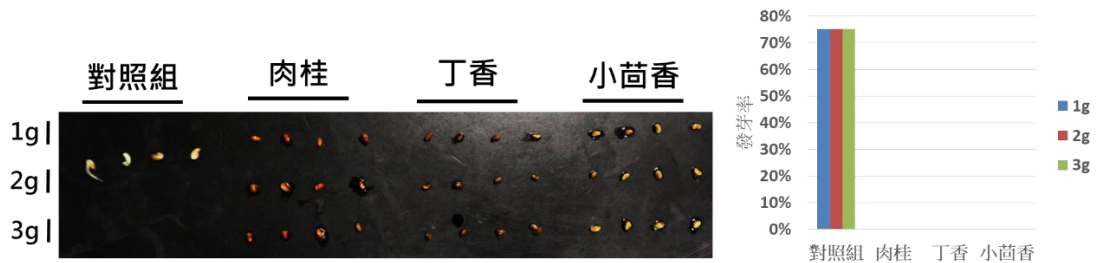
良藥苦口，卻能增強人的免疫力。文獻探討中得知，人體細胞具有感受中藥材的受器，能接收中藥成分並改善人體病徵，我們便好奇植物是否也跟人體一樣能感受中藥材呢？因此我們以綠豆、苜蓿、小白菜為植物代表，並選用肉桂、丁香、小茴香等中藥粉 1g、2g、3g，測試種子直接處理中藥三天後的發芽型態變化。



圖(1-1)綠豆處理中藥粉味後的發芽情形圖 圖(1-2)綠豆處理中藥粉後發芽率



圖(1-3)小白菜處理中藥粉味後的發芽情形 圖(1-4)小白菜處理中藥粉後發芽率

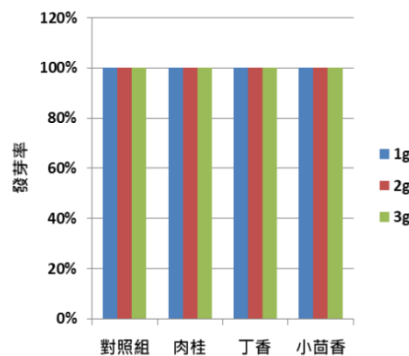


圖(1-5)苜蓿處理中藥粉味後的發芽情形 圖(1-6)苜蓿處理中藥粉後發芽率

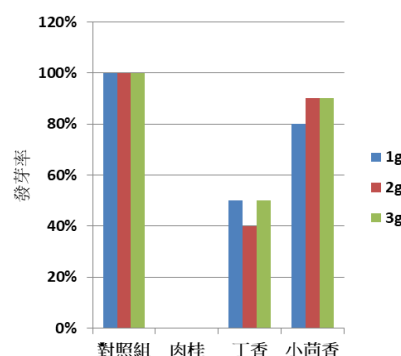
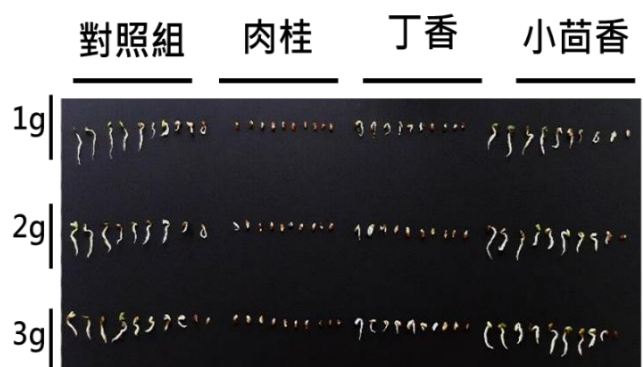
實驗結果顯示，植物吸收中藥後的生長明顯受到影響，在 1g 中藥粉處理下，所有植物的萌芽率皆不超過 50%，推測植物真的能感受中藥材，影響其生理變化。且考慮到未來應用方面，直接在土壤中加入中藥可能破壞環境，因此我們希望變換植物吸收中藥的方式。

二、科學中藥中揮發性物質對植物種子萌發速率的影響

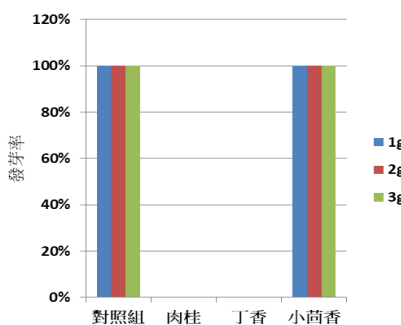
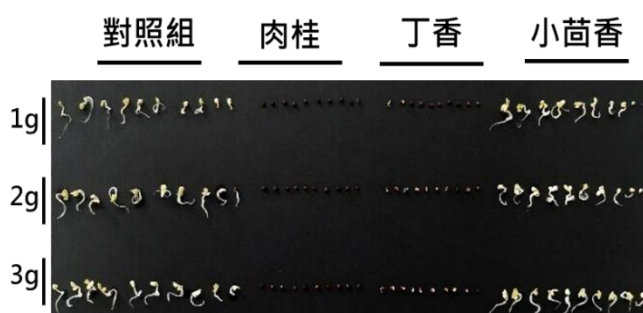
擔心未來應用不適合直接將中藥施灑於土讓，我們想到中醫常用熏蒸法給病患吸取中藥蒸氣，因此我們便好奇植物是否能感受中藥中的氣味分子？我們一樣以肉桂、丁香、小茴香這三種氣味較濃的中藥 1g、2g、3g，測試綠豆、苜蓿、小白菜吸收中藥氣味分子後的變化。



圖(2-1)綠豆吸收中藥氣味後的發芽情形圖 圖(2-2)綠豆吸收中藥氣味之發芽率



圖(2-3)首蓿吸收中藥氣味後的發芽情形圖 圖(2-4)首蓿吸收中藥氣味之發芽率



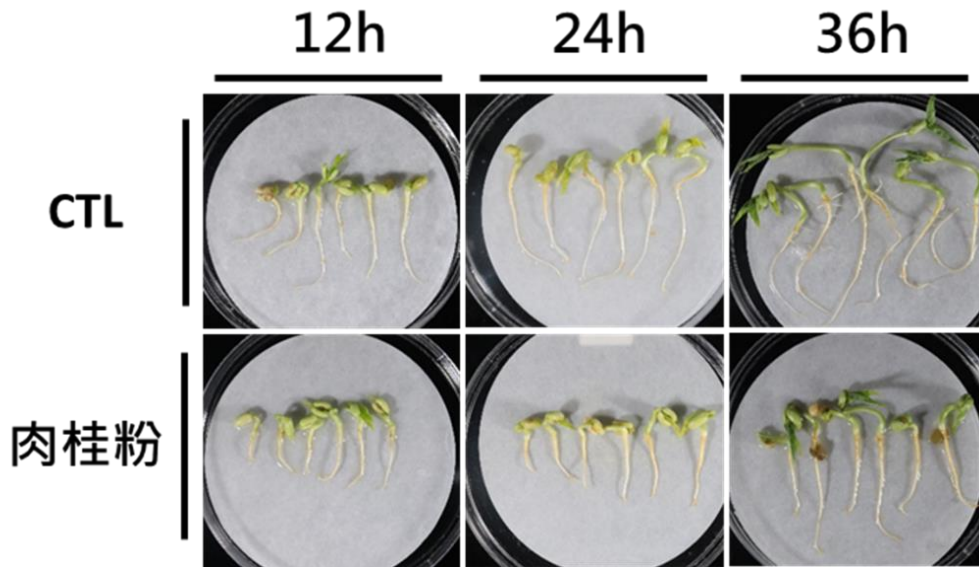
圖(2-5)小白菜吸收中藥氣味後的發芽情形 圖(2-6)小白菜吸收中藥氣味之發芽率

實驗結果我們發現植物對肉桂氣味的感受度最明顯，發芽率影響最大，其次是丁香，小茴香從外表型態看不出明顯變化，推測植物感受小茴香的能力最差。

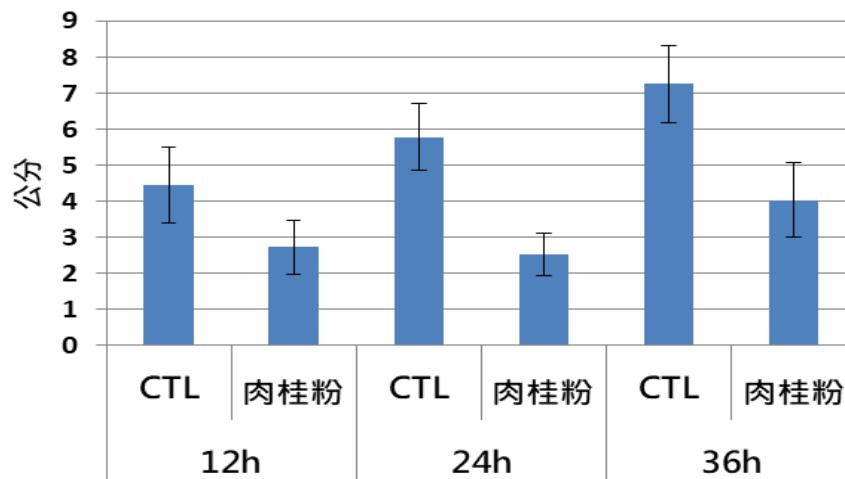
科學中藥粉中，肉桂對植物發芽的影響最大，推測植物種子能感受肉桂氣味，進而影響其生理變化，另外我們好奇種子長大成植株後，植物是否仍可繼續感受肉桂氣味並影響其生理變化呢？因此我們選用生長快速的綠豆作為實驗對象，觀察綠豆在其他生長階段對肉桂的反應。

三、科學中藥中揮發性物質對綠豆小苗生長速率的影響

我們用已在生長盒中培養 60 小時後的綠豆小苗，揀選出生長狀況相近的小苗進行肉桂氣味實驗。



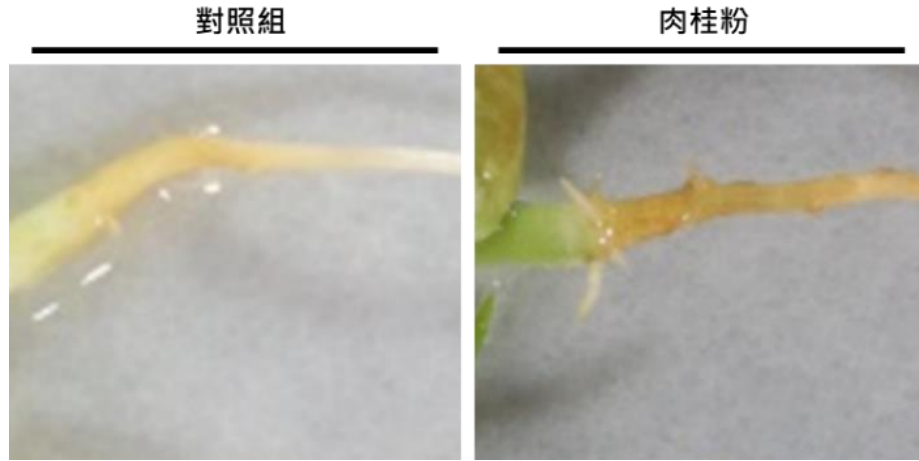
圖(3-1)綠豆小苗吸收肉桂氣味後的生長狀況



圖(3-2)綠豆小苗吸收肉桂氣味後的根長

從實驗結果我們發現經肉桂氣味處理後，綠豆小苗生長有著顯著差異。**根長雖然變短，但側根發育卻變得茂盛許多**，如圖(3-3)，在查閱資料後得知，植物側根有助於其對抗逆境！而地上部的部分也有著明顯的不同，熏過肉桂醛的綠豆地上部茂密度會下降，我們**推測可能是綠豆接受肉桂氣味後將能量用於啟動環境耐受機制**，進而造成植物根長縮短的現象。

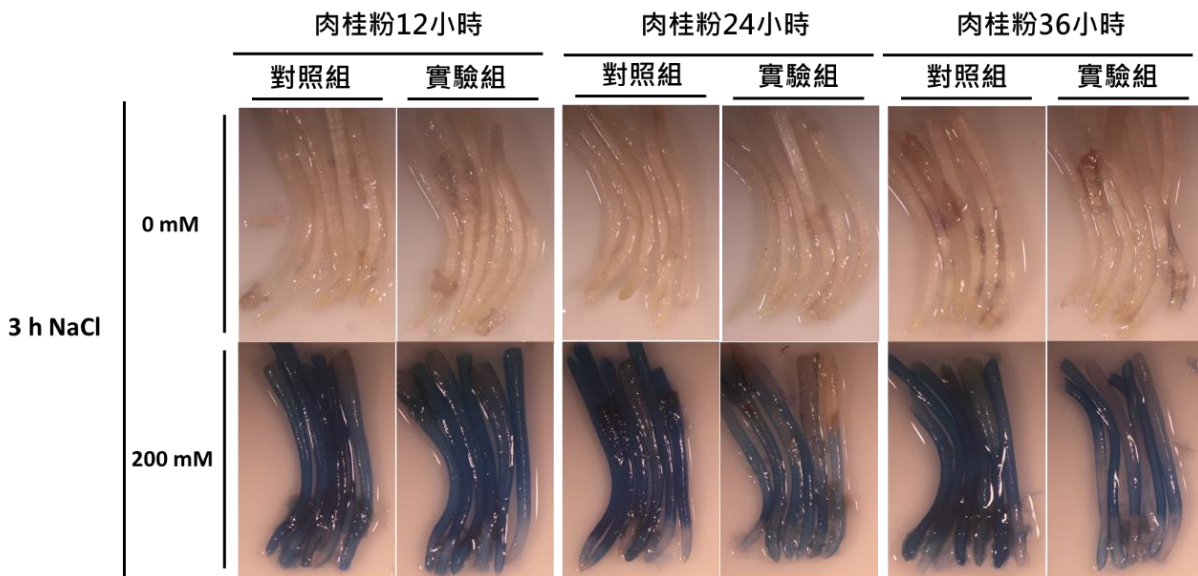
從上述實驗我們得知，**綠豆小苗能感受肉桂氣味，並改變其生長策略**，我們好奇這些改變是否有助於其抵抗環境逆境？因此我們著手進行逆境實驗。



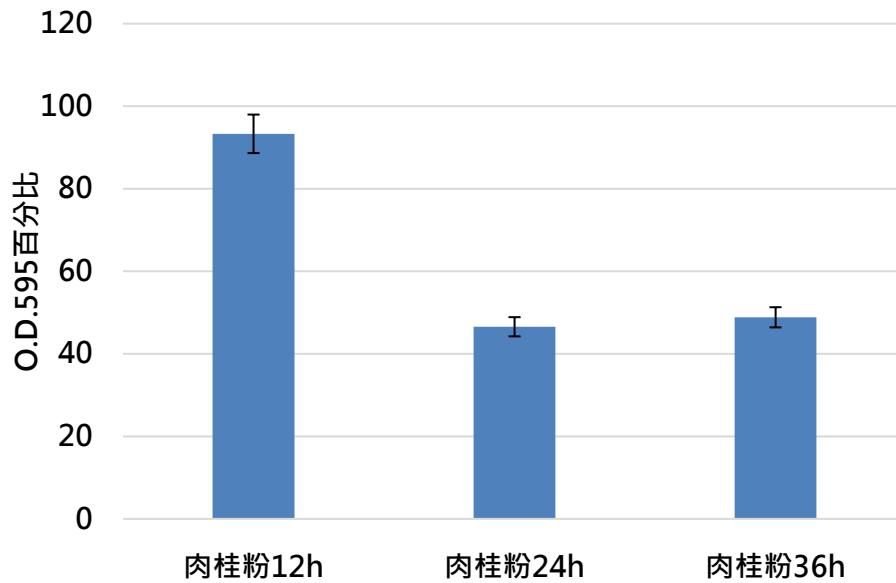
圖(3-3)綠豆小苗根部放大圖

四、科學中藥肉桂粉氣味對綠豆小苗抗鹽逆境能力的影響

前面實驗我們得知綠豆能感受肉桂氣味並改變其生長策略，我們好奇這些改變能否提高其逆境耐受性，我們選用常見的植物逆境-鹽害進行實驗，並觀察植物根部細胞死亡的程度。結果顯示，綠豆小苗熏肉桂氣味 12 小時後耐鹽能力提升幅度不明顯，但熏 24 小時後，細胞死亡程度降到對照組的一半以下，耐鹽能力明顯提升！



圖(4-1)綠豆小苗根尖 1 公分染 Evans blue



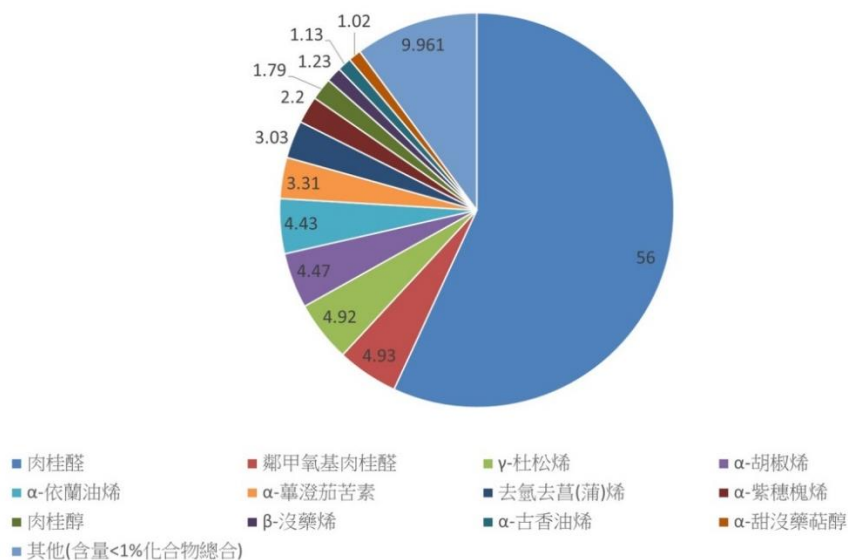
圖(4-2)退染 24 小時後在 O.D.595 的吸光值

實驗得知，綠豆能感受肉桂氣味後增加其耐鹽能力。肉桂粉是混和物，我們好奇，綠豆究竟感受到肉桂氣味中哪個物質進而提升其耐鹽能力呢？因此我們進一步查詢肉桂粉的成分。

五、 肉桂粉氣味成分分析

綠豆能感受肉桂氣味並提升其鹽害耐受性，為了了解綠豆是感受肉桂氣味中的何種成分，於是我們查詢並整理出肉桂粉的化學組成。

肉桂粉中化合物含量圖(%)

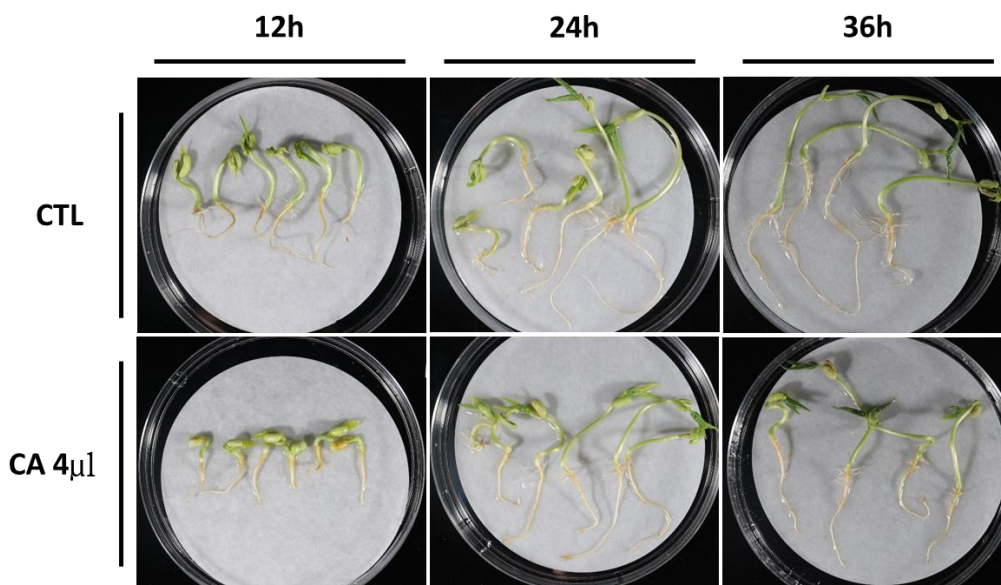


(圖 5-1)肉桂粉中化合物含量圖

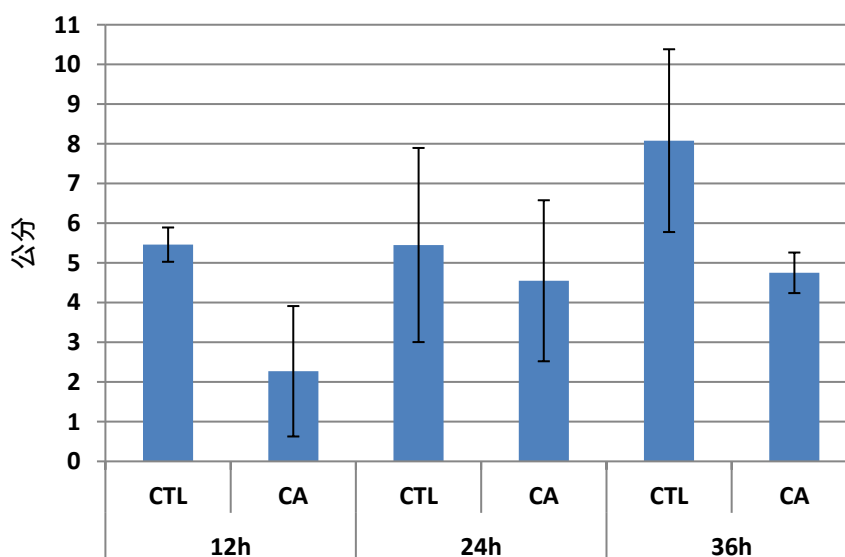
從上述的圖(5-1)中我們發現組成肉桂粉的三大成分分別為肉桂醛、鄰甲氧基肉桂醛、和 γ -杜松烯，其中肉桂醛占比 56%，含量極高，我們便大膽猜測，綠豆應該是感受肉桂醛後提升其鹽害耐受性，因此選用肉桂醛來進行以下實驗。

六、 肉桂醛處理綠豆的外表觀察

我們推測綠豆應該是感受肉桂醛後提升其鹽害耐受性，為了驗證此假設，我們使用肉桂醛取代肉桂粉，觀察並深入探討是否會有相同的效果。

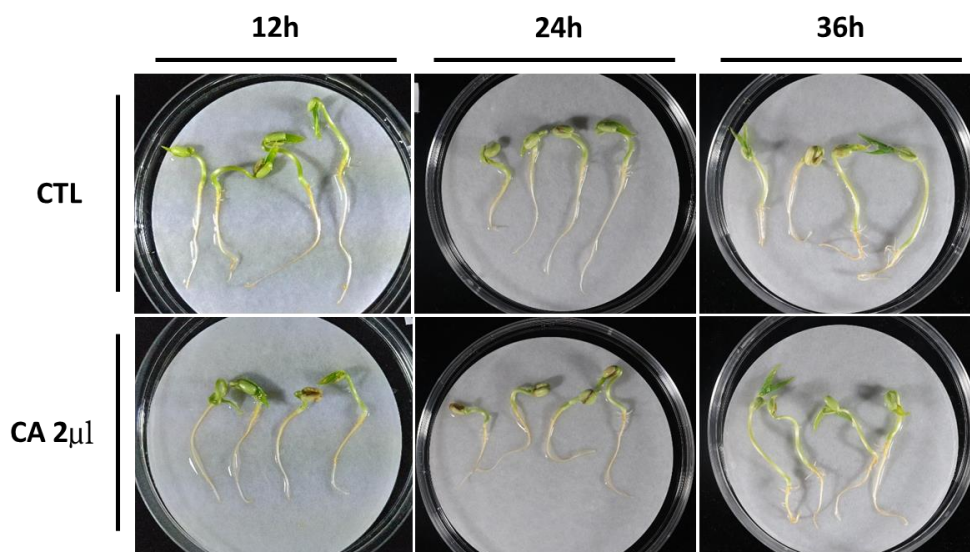


(圖 6-1)4 μ l 肉桂醛對綠豆生長影響照片

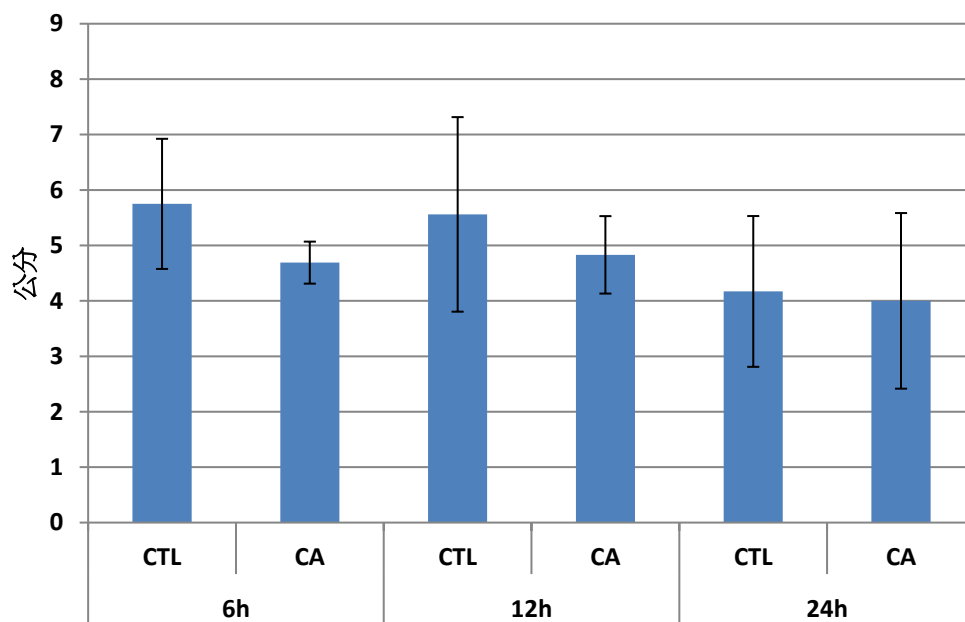


(圖 6-2)4 μ l 肉桂醛對綠豆根長生長的影響(對照組:CTL、肉桂醛:CA)

從圖(6-1)我們發現 4ul 肉桂醛對於綠豆生長情況和肉桂粉處理下有相似的趨勢！地上部發育減緩，根長變短，但根系會增加。於是我們將濃度下修，並觀察結果。



(圖 6-3)2ul 肉桂醛對綠豆生長影響

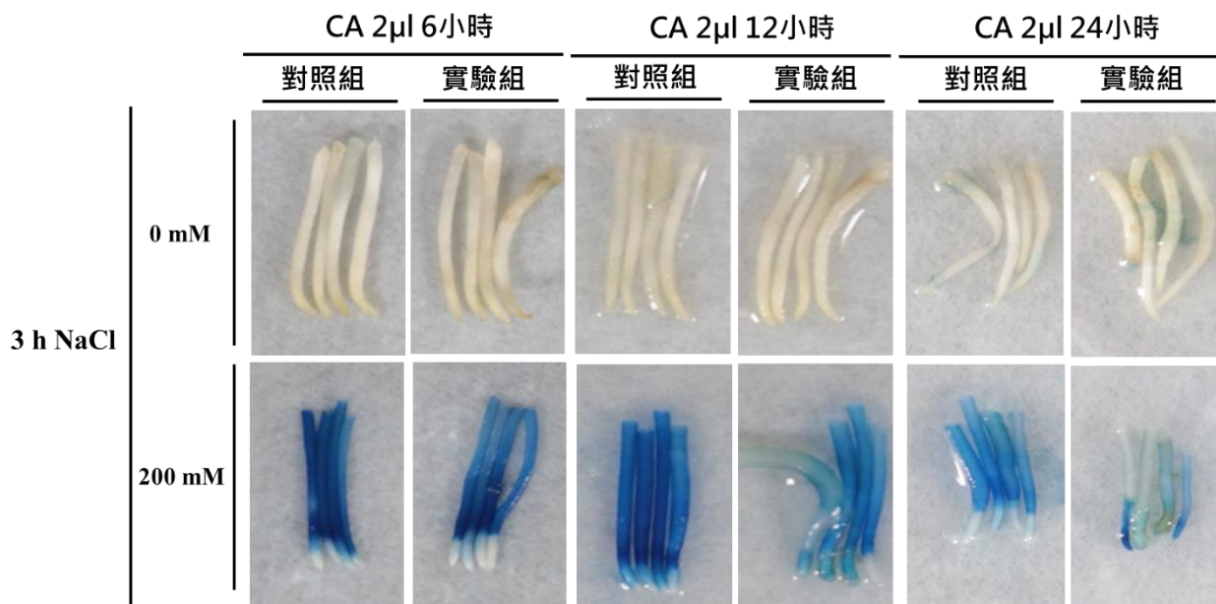


(圖 6-4)2ul 肉桂醛對綠豆根長生長的影響(對照組:CTL、肉桂醛:CA)

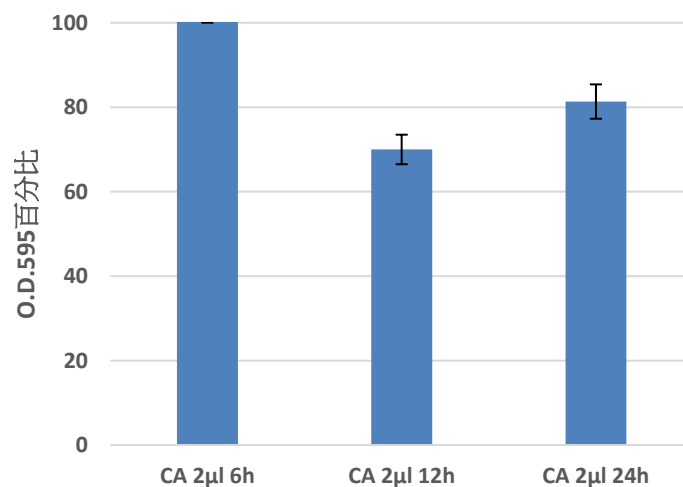
根據上述圖(6-3)，2ul 肉桂醛處理過後的綠豆和前面的 4ul 肉桂醛皆有相似的趨勢，低濃度的肉桂醛環境下，綠豆仍可感受到其存在，並改變其生長策略。我們好奇綠豆因為肉桂醛造成的生長策略改變是否一樣能提升其耐鹽能力？為了解開迷惑我們著手進行鹽害實驗。

七、肉桂醛處理綠豆在鹽逆境下的觀察

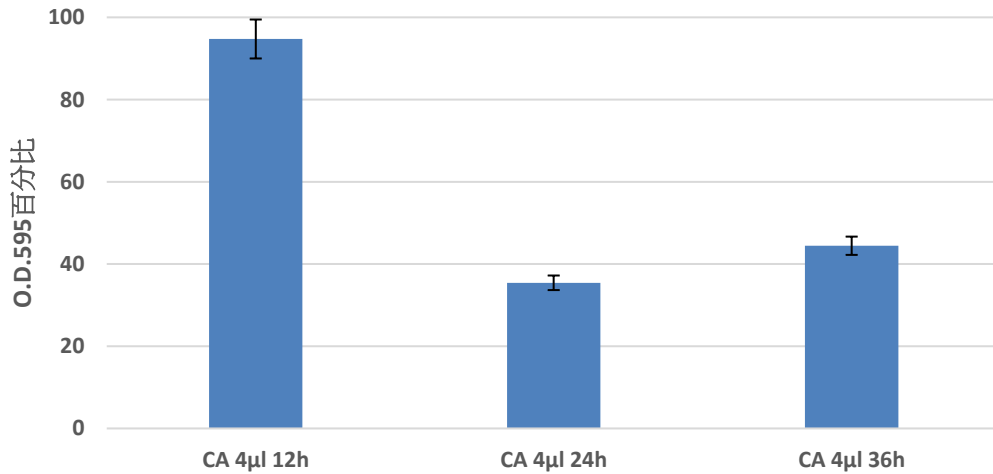
為了證明綠豆感受到肉桂醛後產生的改變能提升其鹽害耐受性，我們便將 2ul 和 4ul 處理過後的綠豆進行鹽逆境處理，觀察其根部細胞死亡的程度。



(圖 7-1)處理 2ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境下的細胞死亡染色



(圖 7-2) 處理 2ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境下的細胞死亡(肉桂醛:CA)

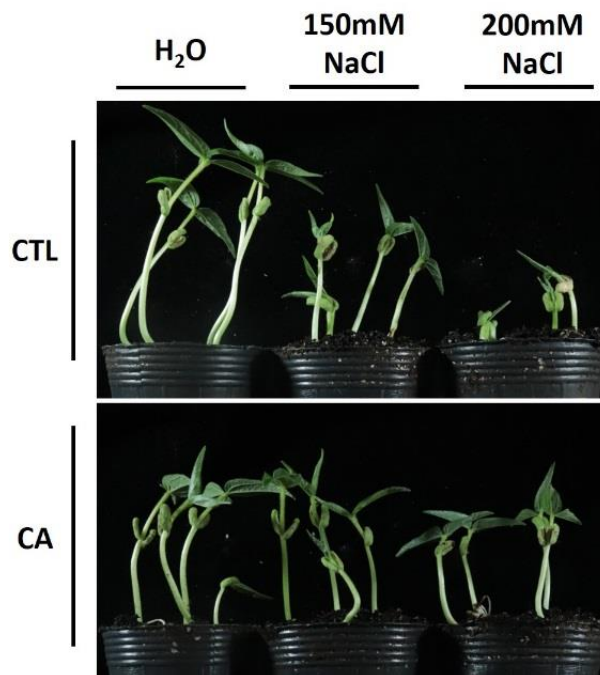


(圖 7-3)處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境下的細胞死亡(肉桂醛:CA)

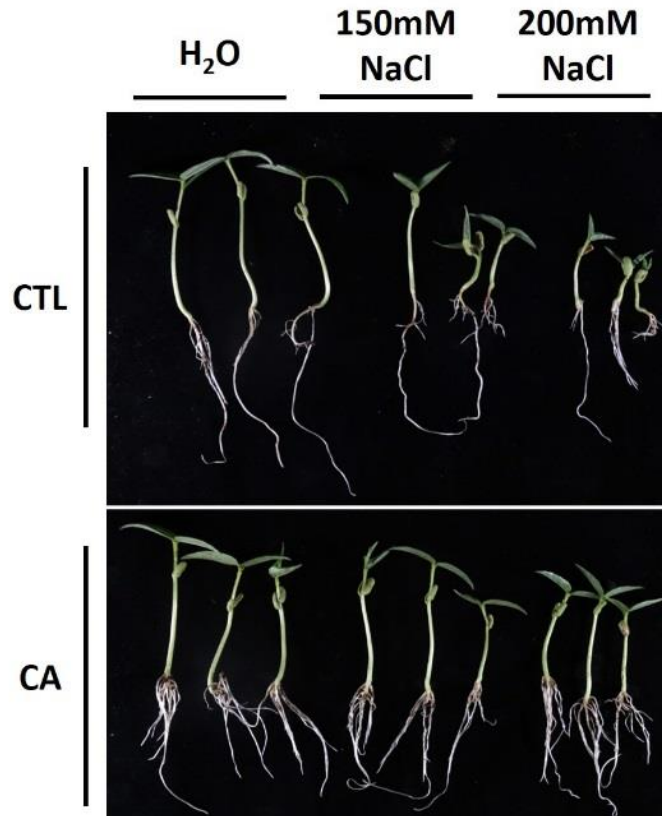
根據上述圖(7-1)，我們發現熏過肉桂醛的綠豆能減少鹽處理下細胞死亡，在低濃度 2ul 肉桂醛處理能可減少約 4 成，而高濃度 4ul 肉桂醛處理則約能減少 6 成。根據實驗結果我們得知，綠豆能感受肉桂中的肉桂醛氣味分子，並改變其生長和生理反應進而減少其在鹽逆境下細胞死亡的程度。

八、處理肉桂醛後的綠豆在長時間鹽逆境下的觀察

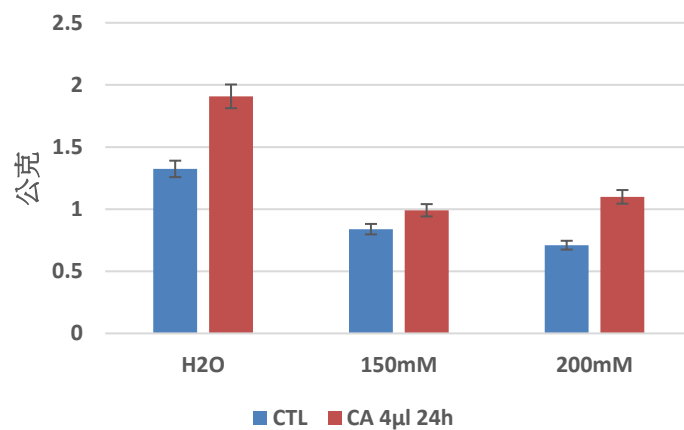
先前實驗中，我們都是進行短時間的鹽害處理，為了證明感受過肉桂醛氣味的綠豆能有效地增加在長期鹽逆境下的抗性，我們將綠豆處理 4ul 肉桂醛 24 小時後種植在土裡，並將鹽害時間延長至 3 天。



(圖 8-1) 處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境三天後的外表觀察(肉桂醛:CA)



(圖 8-2)處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境三天後的外表觀察(肉桂醛:CA)

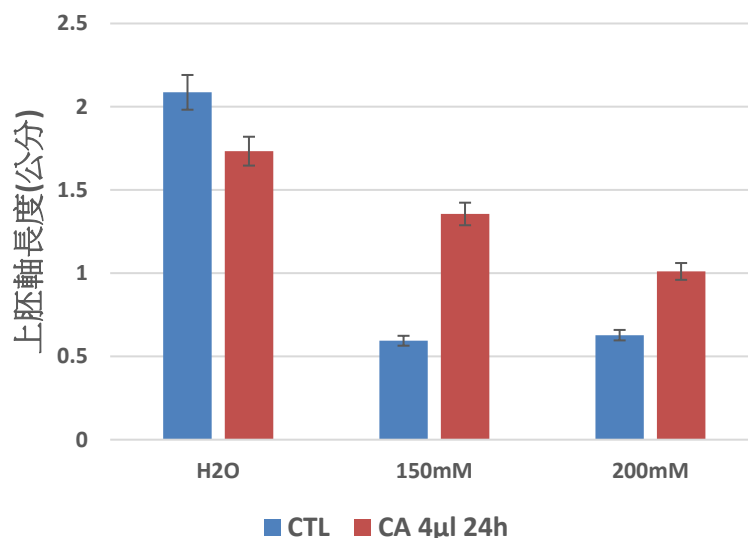


(圖 8-3)處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境三天後的鮮種(肉桂醛:CA)

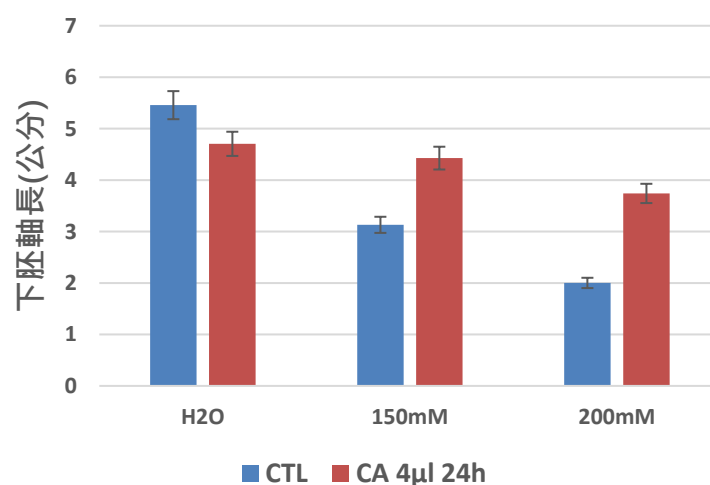
綜合從上述圖表，曾感受過肉桂醛氣味的綠豆能長期提升其耐鹽能力！從圖(8-2)中可見，在鹽害處理三天後，熏過肉桂醛的植物相較於對照組，其生長狀況明顯較佳，透過測量植株鮮種發現植株的重量也同樣有著明顯的差異，在未進行鹽害處理的組別中，熏過肉桂醛的綠豆相比對照組更重 3 成，生長在浸泡 200mM 鹽水土壤中的綠豆苗，差距更加明顯。總結前面實驗，綠豆能感受肉桂醛氣味，並改變其生長策略與生理反應，長期提升其耐鹽能力！

九、處理肉桂醛後的綠豆在長時間鹽逆境下的上、下胚軸觀察

從上面實驗我們發現，綠豆經肉桂醛處理過後能提升其耐鹽能力，此外也可明顯看出實驗組與對照組在地上部有著顯著不同，因此我們將地上部上、下胚軸的生長狀況進行量化。



(圖 9-1)處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境三天後的上胚軸長度

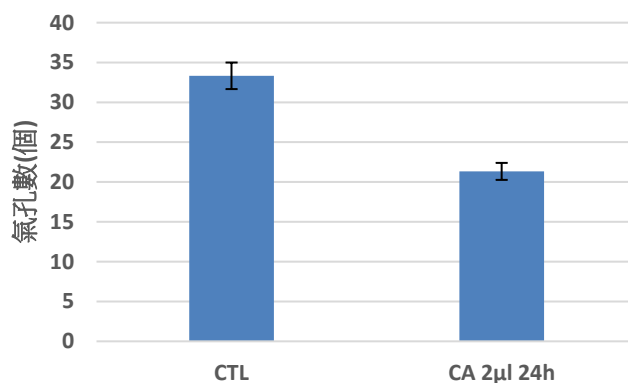


(圖 9-2)處理 4ul 肉桂醛的綠豆在鹽逆境三天後的下胚軸長度

我們發現，在未進行鹽害處理的組別中，有熏過肉桂醛的植物，其上、下胚軸長度會稍微降低，但遇到鹽逆境時卻能維持一定長度，下降幅度不明顯。但未處理肉桂醛的綠豆，在未經鹽害處理的實驗中，上、下胚軸雖然較長，但在遇到鹽逆境時，其生長受阻現象非常顯著，皆降低至一半。我們推測，當綠豆感受到肉桂醛後，細胞內的能量分配可能會產生變化，我們猜測其會將能量用於啟動對抗逆境的機制，使得生長稍微遲緩，但當遇到逆境時，即能立即產生抵抗，讓熏過的植物能更有效的抵抗鹽逆境。

十、 探討為何植物會耐鹽-地上部之氣孔

經過以上的實驗，我們發現綠豆能感受肉桂醛氣味並增加其對鹽逆境的能力。我們好奇，**接收到肉桂醛的綠豆是透過何種方法提升耐鹽能力？**植物在鹽水環境中，會透過關閉氣孔，減少水分蒸散，**我們猜測提升耐性的原因是否與氣孔有關？**於是我們進行了以下觀察氣孔變化的實驗。我們觀察肉桂醛處理 24 小時後葉片氣孔的數量，結果如下。



(圖 10-1) 處理 24 小時肉桂醛氣味後的氣孔數量(對照組:CTL、肉桂醛:CA)

我們發現經過**綠豆感受到肉桂醛氣味後會減少葉片氣孔數量約 3 成**，推測植物能藉此減少水分散失，進而增加綠豆耐鹽能力。

十一、 探討為何植物會耐鹽-地上部之澱粉含量變化

經過以上我們對於氣孔的觀察後，我們已確認「氣孔變化」的確是提升植株在鹽逆境下生存能力的其中一項原因，但我們開始思考有關地上部對抗鹽逆境的方法，是否真的只有因為氣孔變化而產生耐鹽效果？於是我們再次推測之所以提升抗性會不會和植物產生的某種物質變化量亦有所關聯，所以我們決定探討植物葉片產生的「澱粉」含量是否會因氣味處理而在面臨鹽逆境時有所變化，於是我們選用經肉桂醛氣味處理 24 小時後再面臨鹽逆境 200mM 的葉片進行以下澱粉染色測定實驗。

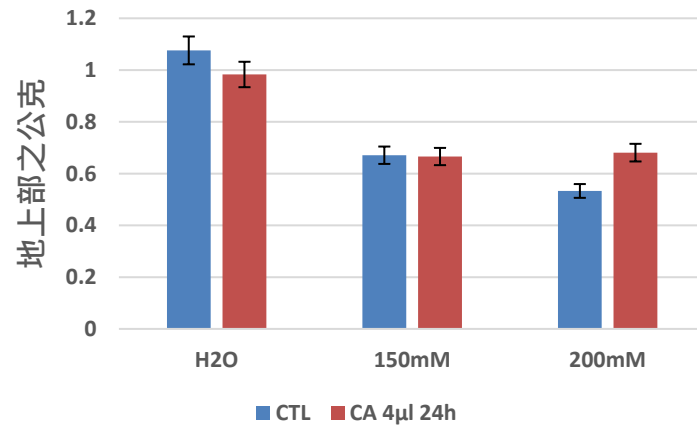


(圖 11-1)處理 24 小時肉桂醛氣味後在鹽逆境下的葉片澱粉含量差異

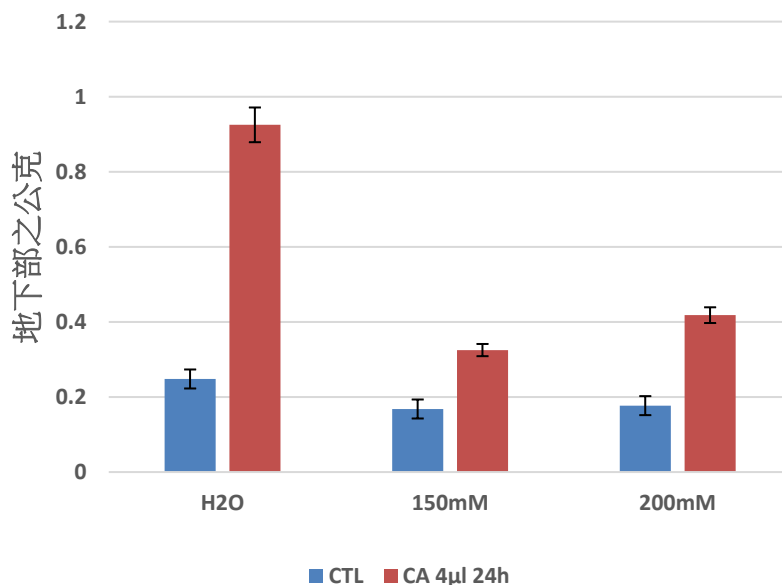
仔細觀察後我們發現經過肉桂醛氣味處理的葉片澱粉含量較高，但是熏過肉桂醛後再處理鹽逆境，澱粉含量卻會減少，我們推測經過肉桂醛氣味處理過後的植株可以提高澱粉的含量，而遇到鹽逆境時能促使澱粉的分解，產生可溶性的醣類，進而提升了植株的滲透壓和在鹽逆境下抗性。

十二、 探討為何植物會耐鹽-地下部之重量與根系

前面實驗我們發現接觸過肉桂醛的綠豆其全株鮮重會提升，我們進一步將綠豆地上部與地下部的重量分別進行測量，結果如圖(12-1、12-2)所示，我們發現肉桂醛誘導的綠豆增重主要是在地下部！實驗組的重量是對照組的 4 倍左右，在 150mM 鹽害處理下雖縮小為 2 倍，但仍可看出鹽水濃度增加到 200mM，實驗組與對照組的重量差距擴大。

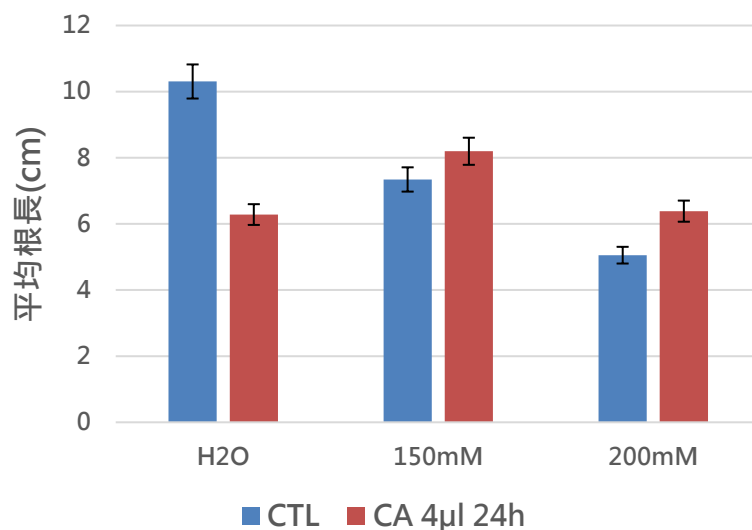


(圖 12-1)處理 24 小時肉桂醛氣味後在鹽逆境 3 小時下的地上部重量(肉桂醛:CA)

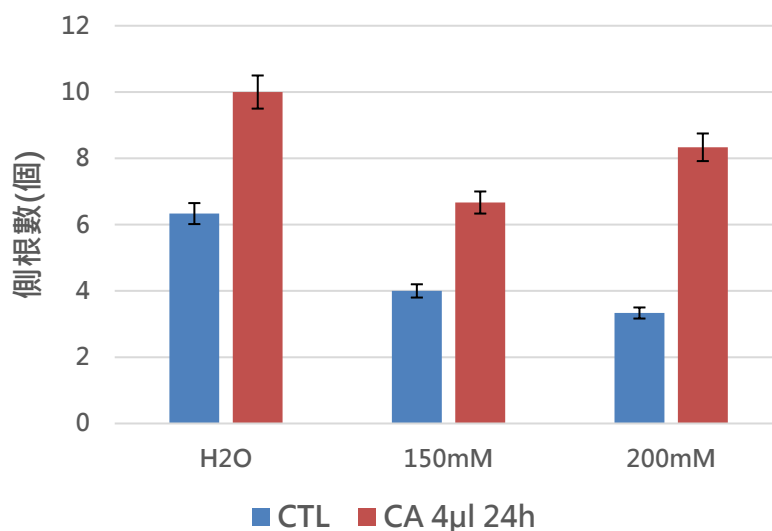


(圖 12-2)處理 24 小時肉桂醛氣味後在鹽逆境 3 小時下的地下部重量(肉桂醛:CA)

根據實驗結果我們推測，綠豆感受到肉桂醛後會將能量投入進地下部的生長發育，至於地下部增重是因為根變長還是根系變多呢？我們再進一步對地下部的長度和根系進行測量和觀察：



(圖 12-3) 處理 24 小時肉桂醛氣味後在鹽逆境 3 小時下的地下部根長(肉桂醛:CA)

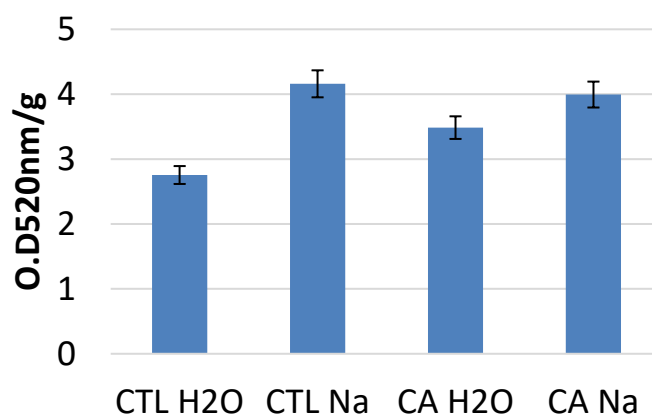


(圖 12-4) 處理 24 小時肉桂醛氣味後在鹽逆境 3 小時下的側根數(肉桂醛:CA)

根據測量和觀察結果，實驗組的根長與對照組相差不大，但側根數卻有明顯差異，在鹽逆境下，若有進行肉桂醛氣味處理，其側根數約比對照組多出兩倍。因此我們推測綠豆在感受到肉桂醛後，會將能量投入地下部發育，促使綠豆擴大根系來增加水分吸收能力，藉此提升鹽害耐受性。

十三、 探討為何植物會耐鹽-脯胺酸(Proline)

鹽害會使環境滲透壓過大而造成植株難以吸收水分，除了透過增加根系提升吸水力，查詢文獻後發現，脯胺酸(Proline)能幫助提升植株根部的滲透壓，藉此抵抗滲透壓逆境，我們猜想綠豆感受到肉桂醛的刺激後是否會透過脯胺酸途徑來提升綠豆耐鹽能力呢？因此我們檢測了植株的根部脯胺酸的含量變化。

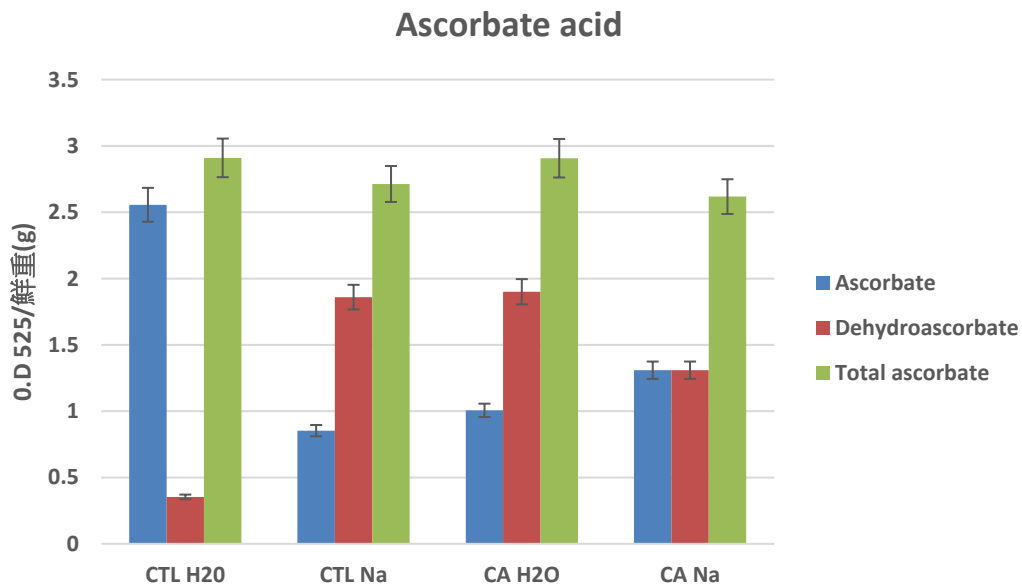


(圖 13-1)處理肉桂醛氣味後的綠豆在鹽逆境下的脯胺酸(Proline)含量變化

我們發現綠豆根部無論是否肉桂醛氣味處理，其 Proline 含量在鹽害處理後皆有上升的趨勢。特別的是，在鹽害處理前，有先熏過肉桂醛的綠豆，其根部 Proline 含量就有上升趨勢，因此我們可以推論，綠豆能在感受到肉桂醛後，可以提前在綠豆根部累積 Proline，提高植株本身的滲透壓，進而幫助植物抵抗鹽逆境。

十四、 探討為何植物會耐鹽-抗壞血酸(Ascorbic acid)

從文獻中得知，鹽逆境會讓植株體內會有過氧化物質(ROS)的累積，而植株為了要對抗過氧化物質，會啟動一系列的抗氧化機制。我們查詢到 Proline 不只單純扮演幫助提升植株滲透壓的角色，另一方面亦扮演了抗氧化劑的功能。因此我們開始思考，綠豆在感受到肉桂醛後，除了能在根部提前累積 Proline 來提升抗氧化力外，是否還會促使其他抗氧化物質累積。抗壞血酸是植物常見的抗氧化物質，因此我們測量了抗壞血酸含量。結果如圖(14-1)所示。



(圖 14-1)處理肉桂醛氣味後的綠豆在鹽逆境下的抗壞血酸(Ascorbic acid)含量變化

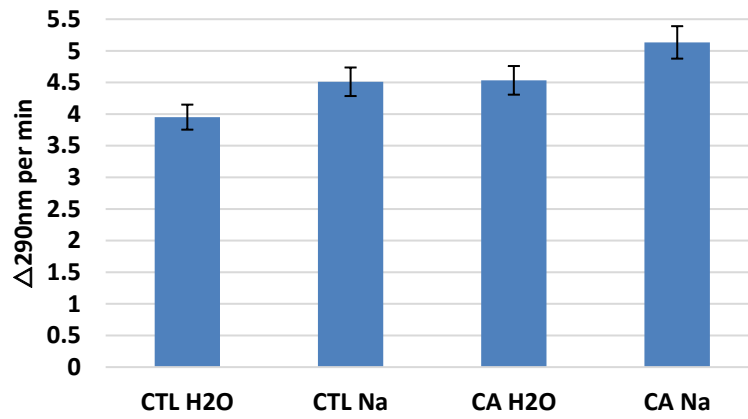
從實驗結果中我們發現，肉桂醛與鹽害處理對於綠豆根部抗壞血酸的總含量影響皆不明顯。沒有熏過肉桂醛的綠豆，在鹽害處理後，其有活性的抗壞血酸(Ascorbate)含量會下降 3 倍，而無活性抗壞血酸(Dehydroascorbate)則會大幅提升，推測可能是綠豆將其用於抗氧化而產生的消耗現象。但肉桂醛組裡的綠豆，在尚未進行鹽害處理前，其有活性的抗壞血酸(Ascorbate)含量就偏低，趨勢與 CTL Na 組別相似，而在處理鹽害後，其有活性的抗壞血酸(Ascorbate)又有些許提升，推測肉桂醛氣味能提高綠豆根部在鹽逆境下有活性抗壞血酸(Ascorbate)含量，能提升綠豆在鹽逆境下的抗氧化力，藉此提升其耐鹽能力。

但為何熏過肉桂醛的綠豆在尚未進行鹽害處理前，其有活性的抗壞血酸(Ascorbate)會偏低，經過文獻搜尋，發現植物體內抗壞血酸過氧化酶(APX)會消耗有活性的抗壞血酸來清除植物體內過氧化物。因此我們猜測，綠豆在感受到肉桂醛後會提前啟動 APX 酵素的活性，藉此增加抗氧化力，為了驗證我們的假設，我們進行了抗氧化酵素活性測定。

十五、 探討為何植物會耐鹽-抗氧化酵素

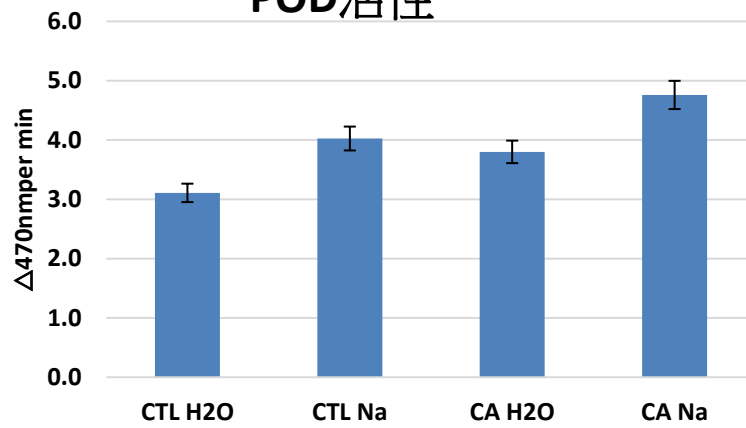
植株在鹽逆境中會造成過氧化物(ROS)累積，過氧化物會造成細胞傷害甚至死亡，而植株為了要對抗過氧化物，會啟動過氧化酵素來清除過氧化物。我們挑選了抗壞血酸過氧化酶(APX)、過氧化酶(POD)與過氧化氫酶(CAT)進行檢測，探討這些酵素經過肉桂醛氣味處理和鹽逆境後的活性變化。

APX活性



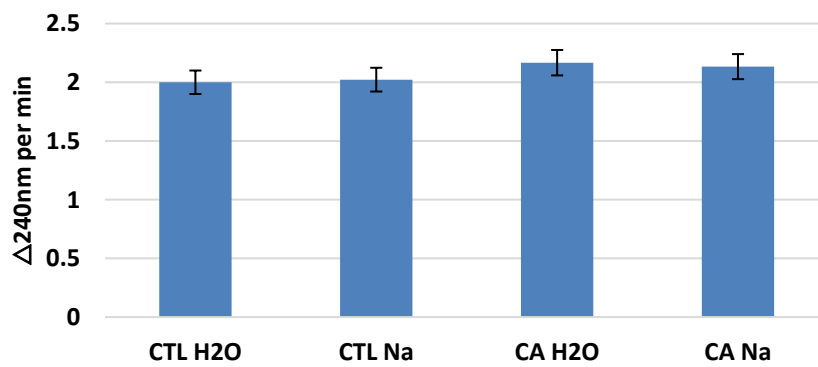
(圖 15-1)抗壞血酸過氧化酶活性變化

POD活性



(圖 15-2)過氧化酶活性變化

CAT活性



(圖 15-3)過氧化氫酶活性變化

我們發現當植株經過肉桂醛氣味處理後，體內的抗氧化酵素皆有上升的趨勢。在 APX 的方面更可明顯的觀察到經過氣味處理後酵素活性提升的情況，但特別的是，熏過肉桂醛的植物，在尚未處理鹽逆境前，其 APX 活性就有上升的趨勢，在比較抗壞血酸測定實驗結果後，我們發現 APX 活性與有活性抗壞血酸含量兩者有高度相關性，因此我們推測綠豆在感受到肉桂醛後，能提前啟動 APX 活性，讓其開始消耗有活性的抗壞血酸，藉此提升綠豆在鹽逆境時的抗氧化力。

在 POD 方面，當植株受到氣味處理後再處理鹽逆境時，酵素活性為最高，縱使不在鹽逆境處理下，經過肉桂醛氣味處理後的植株其 POD 活性就比沒有氣味處理過的來的高，推測與 APX 相同，綠豆感受到肉桂醛後，同樣能提前提升 POD 的活性；CAT 的活性雖在氣味處理過後仍有提升，但效果皆沒有那麼明顯，其活性提升的程度與 POD、APX 相比略顯遜色。

綜合以上三種過氧化酵素的活性變化，我們推測綠豆在感受到肉桂醛後能提前提升 POD 和 APX 的活性，提升綠豆的抗氧化力，待逆境來臨時，即可有效降低逆境下受到的氧化傷害。

陸、 討論

一、 植物可能具有肉桂醛受體

最近研究發現，動物細胞具有肉桂醛受體，能接受肉桂醛並且活化細胞的生理反應，此外，肉桂醛能幫助帕金森氏症等中樞神經疾病，透過減少細胞內 ROS 的累積來降低其對神經組織的傷害。在我們的研究中發現，綠豆同樣具有感受肉桂醛的能力，並改變其生長發育策略與生化機制，藉此提升其耐鹽能力。因此我們大膽推測，植物體內可能也具有肉桂醛受器，當綠豆受器感受到肉桂醛後，可透過促使 proline、抗壞血酸累積，提高 POD、APX 活性來排除體內的 ROS，藉此提升耐鹽能力。

二、 肉桂醛提升抗氧化性具有跨物種性

研究指出，帕金森氏症患者的神經細胞在感受到肉桂醛後，能提升其抗氧化力，減少細胞內 ROS 的累積來降低疾病對神經組織的傷害。從我們研究中發現，綠豆在感受到肉桂醛後，同樣能提升其抗氧化能力，藉此提高其耐鹽的效果，因此我們推測，肉桂醛提升抗氧化力的特性可能存在跨物種性。

三、 能量分配討論

從實驗結果中我們看到，在尚未進行鹽害處理前，若給予肉桂醛氣味處理，會發現綠豆外表型態發育會偏向遲緩，但仔細觀察會發現根系變多，並在生理上面產生明顯改變，綠豆在感受到肉桂醛氣味後內部抗氧化物質與脯胺酸含量都有提前啟動的現象。我們認為綠豆在感受到肉桂刺激後進行能量分配，將能量投入

根系發育，另外也會將能量投入抗氧化物質的合成，藉此提升其耐鹽能力，而能量分配的關係可能是造成其外表型態發育遲緩的原因之一。

四、 側根生長發育

我們的研究發現，綠豆感受到肉桂醛後會促進綠豆小苗的側根生長，擴大植物根系，藉此增加植物吸收水分的能力來提升耐鹽能力。文獻查詢後我們發現，植物側根的生長主要是受到 IAA 激素影響。我們推測感受到肉桂醛的綠豆能調節植物根部 IAA 的含量，藉此擴大植物根系來提升植物整體對鹽逆境的耐受性。

五、 Proline 的抗氧化力

植物可以在體內累積脯胺酸(proline)，提高細胞的滲透壓，也可以直接與抗氧化物質結合，減少植物在逆境下所受到的氧化傷害，此外過去研究指出脯胺酸(proline)也可透過代謝轉換成具有抗氧化力的谷胱甘肽(Glutathione)，藉此提升植物抗氧化的能力。我們的研究也發現肉桂醛能增加綠豆在體內累積的脯胺酸(proline)，推測使綠豆提高吸水力外，同時也能排除過氧化物。

六、 種子萌發時 H₂O₂ 的傳訊機

種子萌發受吉貝素(GA)影響，經文獻查詢得知，吉貝素合成是受到雙氧水含量所調控，雙氧水會促使吉貝素累積，進而讓種子萌發。本研究結果顯示，綠豆在感受到肉桂醛後會提升其抗氧化力，因此我們推測，肉桂醛可能是透過提升植物的抗氧化能力，進而導致吉貝素的累積受到影響，讓種子發芽受到抑制。

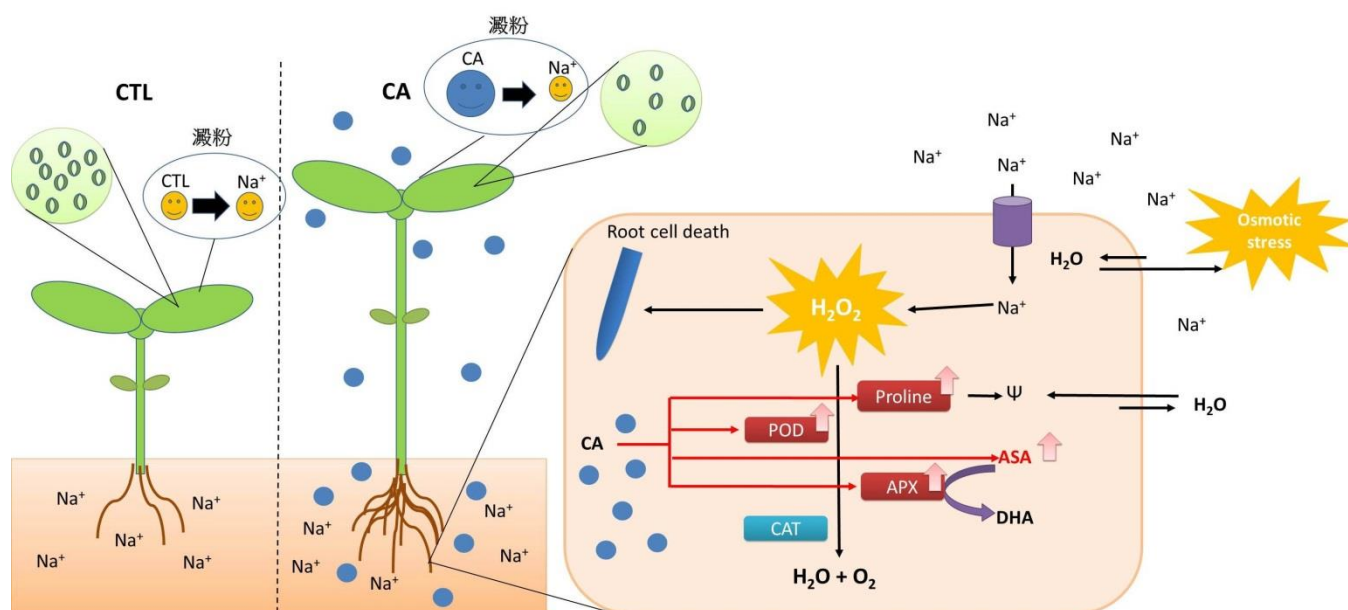
柒、 結論

從我們的研究中發現，綠豆能感受肉桂粉氣味後提升其耐鹽能力，降低綠豆在鹽逆境下的細胞死亡程度。從肉桂粉的成分分析與實驗結果得知，肉桂醛是提升綠豆耐鹽能力的關鍵物質。在鹽害處理前先熏過肉桂醛能讓綠豆在鹽逆境下維持一定的生長，除了上、下胚軸的生長較佳外，另能增加根系的發育，藉此提升吸水能力來應對鹽逆境下的缺水問題，此外熏過肉桂醛的綠豆不但有氣孔減少的現象，以藉此減少水分散失，還可以透過提前累積澱粉含量，使其在遇到鹽逆境時能促使澱粉的分解，進而產生可溶性的醣類，提升了植株的滲透壓和在鹽逆境下的環境耐受性。

生化方面，我們發現綠豆在感受到肉桂醛後能在根部提前累積脯胺酸(Proline)，藉此提升根部滲透壓，以克服鹽逆境下水分吸收的問題，此外脯胺酸的抗氧化特性亦能減少根部在鹽逆境下的氧化傷害。另一方面，在鹽逆境處理前先熏過肉桂醛，在鹽逆境來臨時，可有效提高其根部內有活性的抗壞血酸含量，

藉此提升綠豆根部的抗氧化力。酵素活性方面，肉桂醛氣味能提前提升綠豆根部的 APX、POD 酵素活性，減少綠豆在鹽逆境下所受到的氧化傷害，藉此減少細胞死亡並達到提升耐鹽能力的效果。

在我們研究結果中發現，綠豆能感受肉桂醛並提升其抗氧化能力，減少鹽逆境下的氧化傷害，另可改變其生長發育與累積脯胺酸來應對鹽逆境下的缺水問題，進而提升綠豆的耐鹽能力，期待未來我們能將研究結果運用於農業，藉此提升作物的環境耐受性，減少因環境變遷所帶來的農業損失。



捌、參考文獻及其他

1. 巴洛克、王定澤、楊茜雯(2017)·粟之高禾—探討小米不為人知的耐鹽機密·臺南市：天主教私立德光高級中學(附設國中)。
2. 邱琴、崔兆杰、韋棟樑、趙文強、張莉、劉廷禮(2003)·肉桂揮發油化學成分的研究·山東：山東大學環境科學與工程學院、山東省化工研究院
3. 高景輝(2005)·植物生理分析技術·臺北市：五南。
4. Amna Mhamdi, Frank Van Breusegem(2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development* . 2018 Aug 9;145(15)
5. Barbara Lieder, Julia Hoi, Nathalie Burian, Joachim Hans, Ann-Katrin Holik, Leopoldo Raul Beltran Marquez, Jakob P. Ley, Hanns Hatt, Veronika Somoza(2020). Structure-Dependent Effects of Cinnamaldehyde Derivatives on TRPA1-Induced Serotonin Release in Human Intestinal Cell Models. *J Agric Food Chem*. 2020 Apr 29 ;68(17) :5018.

6. Mohammad Anwar Hossain, Mohammad Golam Mostofa, Masayuki Fujita(2013).Cross Protection by Cold-shock to Salinity and Drought Stress-induced Oxidative Stress in Mustard (*Brassica campestris* L.) Seedlings. *Molecular Plant Breeding*, 2013,Vol.4, No.7, 50-70.
7. Rachana Singh, Samiksha Singh, Parul Parihar, Rohit K. Mishra, Durgesh K. Tripathi, Vijay P. Singh, Devendra K. Chauhan, Sheo M. Prasad.(2016). Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Front Plant Sci.* 27 September 2016
8. Robert W. Fulton(1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology* Vol. 24:67-81 (Volume publication date September 1986)
9. Xinwen Liang, Lu Zhang, Sathish Kumar Natarajan, Donald F. Becker(2013). Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Sep 20; 19(9): 998 – 1011

【評語】 060003

1. 由不同中藥對不同植物的影響，進而找出綠豆對肉桂醛的感受性，分別由型態、鹽逆境及相關酵素活性分析，推測可能的作用機制並獲初步結論。唯目標太大未能聚焦，許多實驗結果未能支持結論。
2. 15 個研究目的太多，應聚焦。相似的目的分項可以統整為同一個目的：例如：分析中草藥對植物生長之影響以及瞭解植物耐鹽機制，再就其中細項個別探討。實驗細節未詳細記錄，直接加中藥粉，植物全不發芽？用氣味則全發芽？如何證明氣味對植物有影響？或如何定量氣味？如何定量氣孔數量皆應詳細說明。
3. 「低濃度的肉桂醛環境下，綠豆仍可感受到其存在，並改變其生長策略。」但由實驗結果看不出此結論。
4. 本研究有應用潛力，但中藥粉的處理為複合成分，以致控制變因不夠確定，影響結論的明確性。
5. 具本土性，實驗目的明確。
6. 實驗設計完整，結論亦有創見。
7. 具本土性題材。
8. 不錯的作品。
9. 數據統計分析及差異是否顯著要標示。