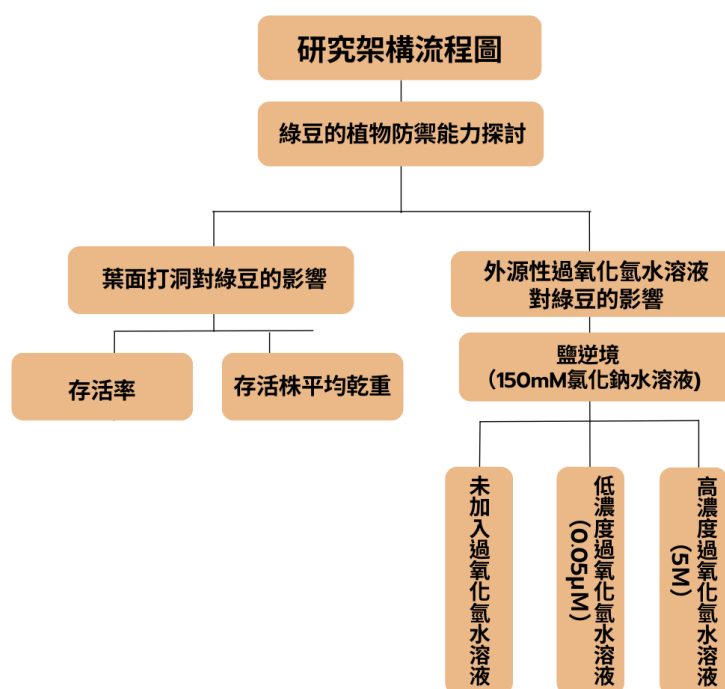


2023 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

普高組 成果報告表單

題目名稱： 以葉面打洞及外源性雙氧水探討綠豆之植物防禦機制
一、摘要
糧食危機是隨著全球人口成長無法避免的問題，然而極端氣候使此問題更加棘手，但是近幾年科學家指出植物防禦機制或許可以為全人類帶來一線曙光。本研究以綠豆為實驗對象，探討綠豆物理、化學性植物防禦機制。發現在葉面打洞後會提高綠豆死亡率，但是成功存活下來的株數，之後的生長情形和未打洞的接近。而外源性過氧化氫水溶液會協助綠豆對抗鹽逆境，提高綠豆存活率，其中 $0.05\mu\text{M}$ 和 5M 皆造成顯著影響，而以 $0.05\mu\text{M}$ 效果最佳。
二、探究題目與動機
小時候外公常說，果樹像人一樣，拍斷手骨顛倒勇（台）。許多農民會在植物的莖劃上淺淺的刀痕，利用受傷刺激讓植物長得更茂盛。在經過蒐集文獻過後，我們發現如此奇妙的現象稱為植物防禦。因此我和組員決定以容易取得、生長期快速的綠豆作為研究對象，施加物理性化學性傷害，分別以在葉面打洞以及添加外源性過氧化氫，觀察其經過傷害後，生長狀況是否因此改善。
三、探究目的與假設
探究目的：探討綠豆物理、化學性植物防禦
一、實驗（一）探討在葉面打洞對綠豆的影響
過往的研究曾指出，由於植物與食草昆蟲共同進化了數百萬年，它們開發了一系列防禦基因，以保護自己免受各種咀嚼和吸吮昆蟲的侵害。（Zhu-salzman et al., 2005）因此，實驗（一）以綠豆作為實驗對象，在葉面打洞模擬綠豆葉被昆蟲嘶咬，並提出以下假設
實驗（一）假設：
1. 葉面打洞之綠豆存活株數高於未打洞者
2. 葉面打洞之綠豆整株乾燥後平均重量高於未打洞者
二、實驗（二）探討不同濃度外源性過氧化氫水溶液，對綠豆抗衡鹽逆境之影響
發表於 2010、2016 年的論文分別指出外源性過氧化氫對於幫助小麥（Li et al., 2010）和水稻（Roy et al., 2016）。抗鹽產生正面影響
我們推論猜測綠豆可能會具有相似現象，因此提出以下假設。
實驗（二）假設
1. 外源性過氧化氫有助於綠豆抗衡鹽逆境。
四、探究方法與驗證步驟



圖一：研究架構流程圖

二、實驗（一）探討在葉面打洞對綠豆的影響

（一）實驗器材與設備

- 1.材料：綠豆
- 2.實驗藥劑：蒸餾水
- 3.實驗器材：43cm(L)×35cm(W)×11cm(H)密林盆、托盤、噴霧瓶、優植土、直徑5mm 打洞器、培養皿、烘箱、電子秤、燒杯

（二）、研究方法與實驗步驟

研究方法：以打洞器將葉面打洞，並觀察其生長

實驗步驟：

1.綠豆種植

- (1)將相同數量綠豆置於 2 個培養皿泡水三小時
- (2)以土耕方式將綠豆種植於 2 個密林盆
- (3)每日中午以噴霧瓶噴灑水澆灌綠豆

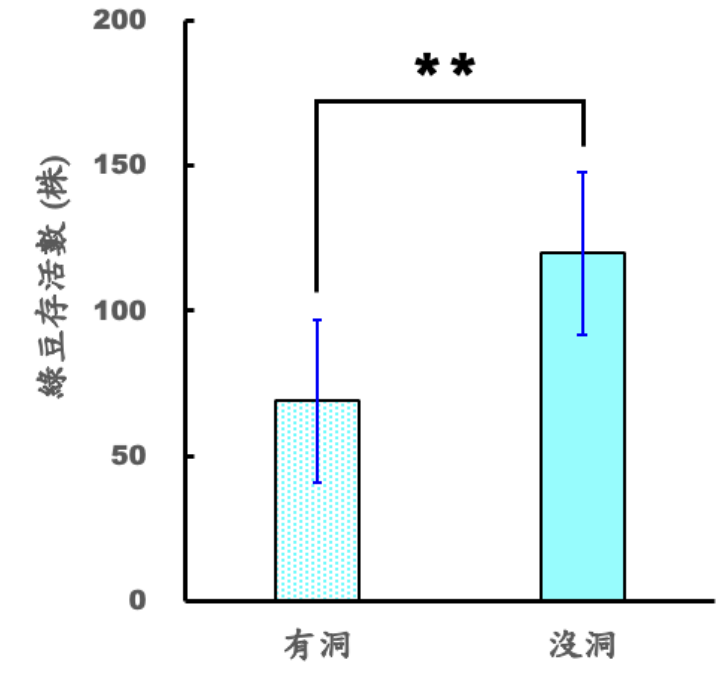
2.打洞處理

- (1)種植一周後，觀察綠豆生長情況，並將其中一盆綠豆葉打洞（打洞時須避開葉脈）。另一盆不打洞作為對照組。

3.採收時間、生長情形評估

- (1) 每日中午以噴霧瓶噴灑水澆灌綠豆
 - (2) 一週後觀察生長情形，並將綠豆留根拔起，分類後將以水沖洗清除根部餘
 - (3) 洗淨後將兩組綠豆放入烘箱乾燥
 - (4) 乾燥後分別計算兩組綠豆株數並且分別秤重，計算每株平均重量
- (三) 實驗結果：

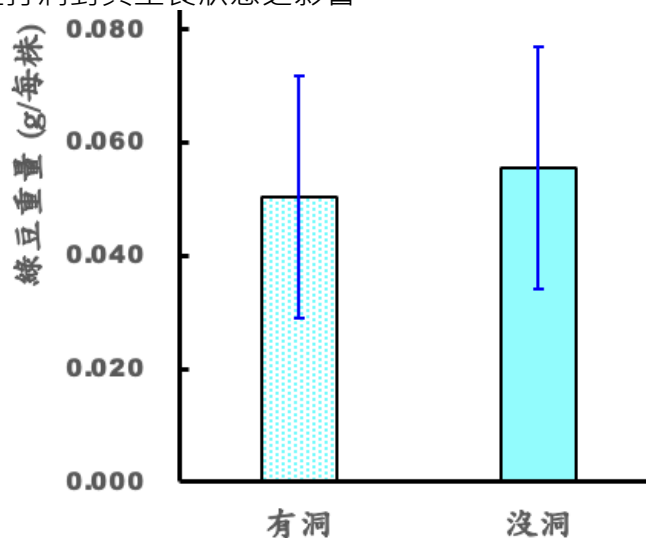
1. 探討綠豆葉面經打洞對其存活之影響



圖二、綠豆葉面有洞與沒洞存活株數

根據圖二，定量各組綠豆種子，比較綠豆葉面經打洞對其對其存活株數之影響，根據獨立樣本 t 檢定，發現打洞會降低存活株數，且顯著性 (p value) 的值為 0.01，因該數值大於 0.05，差異顯著。

2. 探討綠豆葉面經打洞對其生長狀態之影響



圖三、葉面有洞與沒洞每株平均乾燥後重量

根據圖三，定量各組綠豆種子，比較綠豆葉面經打洞對其每株平均乾燥後重量之影響，根據獨立樣本 t 檢定，發現打洞後的平均重量低於未打洞的綠豆，但因顯著性 (p value) 的值為 0.36，大於 0.05，差異不顯著。

3. 實驗一 (探討在葉面打洞對綠豆的影響) 討論

我們的打洞後綠豆存活株數低於未打洞者與以上論述和一開始的假說違背，推測原因可能是打洞快速巨大的破不同於蟲咬，蟲咬時可能會釋放化學物質刺激植物，故本實驗未能成功模仿蟲咬。綠豆可能因角質層破壞損失過多水分乾死，抑或受到細菌感染死亡。

而成功存活的綠豆，防禦系統未受角質層破壞干擾、復元力極高，因此生長狀況、乾燥後的重量，和未打洞的接近。

三、實驗 (二) 探討外源性過氧化氫對耐鹽能力之影響

(一) 實驗器材與設備

1. 材料：綠豆
2. 實驗藥劑：氯化鈉、10M 過氧化氫水溶液、蒸餾水
3. 實驗器材：500ml 燒杯、200ml 量筒、秤量紙、電子秤、直徑 14cm 盆栽、滴管、無粉低過敏乳膠手套、噴霧瓶、43cm(L)×35cm(W)×11cm(H)密林盆、托盤、優植土、玻棒

(二)、研究方法與實驗步驟

研究方法：以不同濃度之過氧化氫溶液處理各組綠豆，並觀察其抗鹽能力。

實驗步驟：

1. 綠豆種植

- (1) 取約 150 顆綠豆，泡水約 4-6 小時
- (2) 將優質土倒入一寸盆栽填約滿 15 公分深
- (3) 泡水後的綠豆分別播種於三盆 1 寸盆栽中，一盆 50 顆
- (4) 每天固定使用噴霧澆水器澆水

2. 過氧化氫水溶液處理

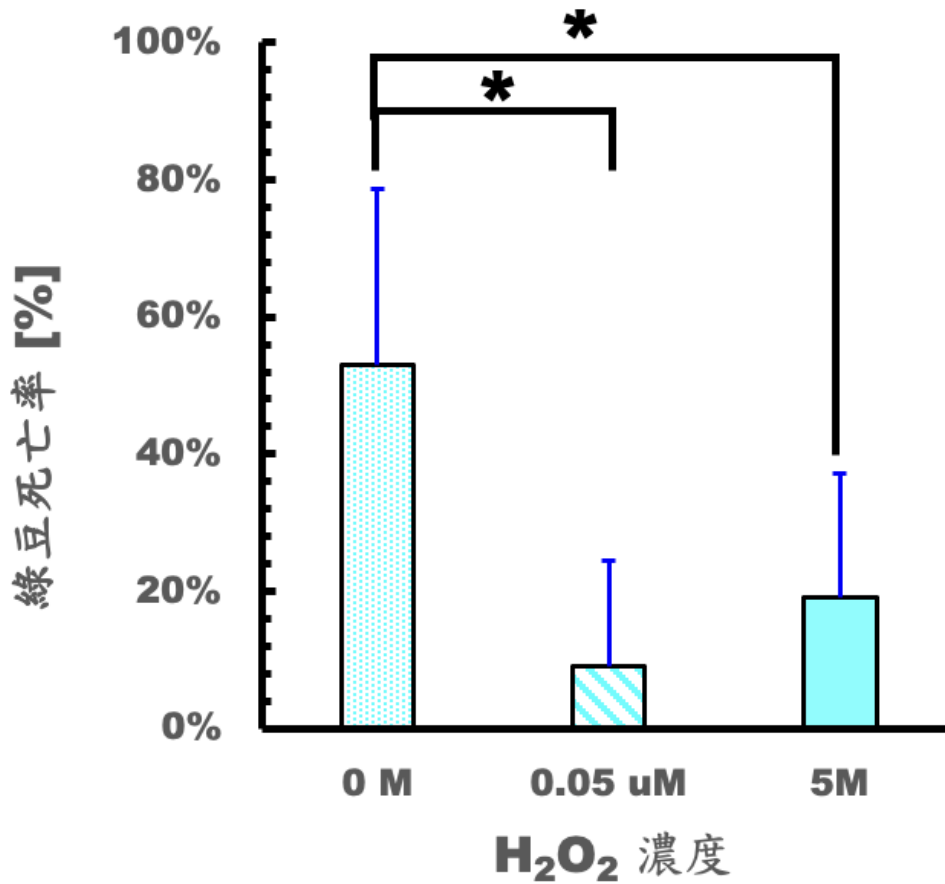
- (1) 將種植兩週後三盆綠豆盆栽，分為對照組、低濃度雙氧水處理組、高濃度雙氧水處理組。
- (2) 配置雙氧水溶液 0.05 μ M、5M
- (3) 取 100 毫升 0.05 μ M 過氧化氫水溶液加入低濃度雙氧水處理組
- (4) 取 100 毫升 5M 過氧化氫水溶液加入高濃度雙氧水處理組
- (5) 配置氯化鈉水溶液 150mM
- (6) 配置氯化鈉水溶液 150mM
- (7) 每天固定使用噴霧澆水器澆水

3.採收時間、生長情形評估

(1) 於分組後兩週觀察其生長情形，並記錄其存活率

(三) 實驗結果：

1.探討綠豆經各濃度過氧化氫溶液處理對耐鹽能力之影響



圖四、葉面經不同濃度外源性雙氧水處理後死亡率

根據圖四，定量各組濃度氯化鈉溶液，進行低濃度與高濃度雙氧水對於綠豆死亡率之比較。根據單因子變異數分析 (oneway ANOVA)，發現未加入過氧化氫水溶液、低過氧化氫水溶液 (0.05 μ M) 和高濃度過氧化氫水溶液 (5M)，三者對於升綠豆耐鹽能力達顯著影響 ($p=0.027<0.05$)，且低濃度雙氧水效果優於高濃度雙氧水。根據獨立樣本 t 檢定，未加入過氧化氫水溶液、低濃度過氧化氫水溶液 (0.05 μ M)，對於提升綠豆耐鹽能力達顯著影響 ($p=0.003<0.05$)。根據單因子變異數分析 (oneway ANOVA)，未加入過氧化氫水溶液、高濃度過氧化氫水溶液 (5M)，對於升綠豆耐鹽能力達顯著影響 ($p=0.016<0.05$)。根據單因子變異數分析 (oneway ANOVA)，低濃度過氧化氫水溶液 (0.05 μ M)、高濃度過氧化氫水溶液 (5M)，對於升綠豆耐鹽能力達顯著影響 ($p=0.28>0.05$)。

(二) 實驗二 (探討外源性過氧化氫對耐鹽能力之影響) 討論

實驗結果符合假說，加上一篇 2020 年發佈於 Nature 的論文，首次發現了植物細胞表面過氧化氫受體 (HPCA1)，提高過氧化氫對植物造成影響的信賴度。(Wu et al., 2022)

五、結論與生活應用

一、結論

(一) 在未受任何逆境威脅下，葉面打洞後的綠豆存活株數低於未打洞的綠豆，且達顯著差異；而葉面打洞後的綠豆整株乾燥後平均重量低於未打洞的綠豆，但兩者數值接近，差異不顯著。

(二) 在 $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化鈉水溶液鹽逆境威脅下，外源性 $0.05\mu\text{M}$ 過氧化氫水溶液、外源性 5M 過氧化氫水溶液皆提升了綠豆存活率，且達顯著影響。且 $0.05\mu\text{M}$ 過氧化氫水溶液提升綠豆存活率效果優於 5M 過氧化氫水溶液，但未達顯著影響。

二、生活應用

綠豆在面對逆境的情況下，會促發複雜的植物防禦機制，細部的運作方式有待後人探討。然而，本實驗明確表明綠豆絕非坐以待斃，亦不是僅靠外在屏障 (例如：角質層) 的防禦，而是會經由一系列內部的機制 (推測為釋放不同訊號分子、激素等) 對抗環境的挑戰。而植物防禦是牽一髮而動全身的整体性協調，從打洞實驗可以看出，任一防禦機制的嚴重破壞，都會造成死，但是一旦活過劇烈威脅後，綠豆的恢復力驚人。外源性過氧化氫實驗，指出綠豆受到不致命的挑戰，反而會讓他更容易活過鹽逆境，因此我們可以藉由掌控植物防禦的機制，增強植物的存活率，甚至應用於農業科技，在氣候變遷劇烈的時代，植物防禦相關的研究值得更多投入。

參考資料

- Li, J.T., Qiu, Z.B., Zhang, X.W., & Wang, L.S. (2010). Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33, 835-842.
- Roy, Roy, P. R., Tahjib-Ul-Arif, M., Akter, T., Rani Ray, S., & Abu Sayed, M. (2016). Exogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide alleviates salt-induced oxidative stress in rice (*Oryza sativa* L.) by enhancing antioxidant enzyme activities and proline content. *Advances in Environmental Biology*, 10(10), 148–155.
- Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., Pei, J. (2020). Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature*, 578(7796), 577–581.
- Zhu-salzman, K., BI, J.L., & LIU, T.-X. (2005). Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Science*. 12(1), 3-15.