

臺北市第 42 屆中小學科學展覽會

作品說明書封面

科 別：生物科

組 別：高中

作品名稱：挑食的稻子——有機氮源影響其表現

關 鍵 詞：有機氮源、植物表現

編 號：

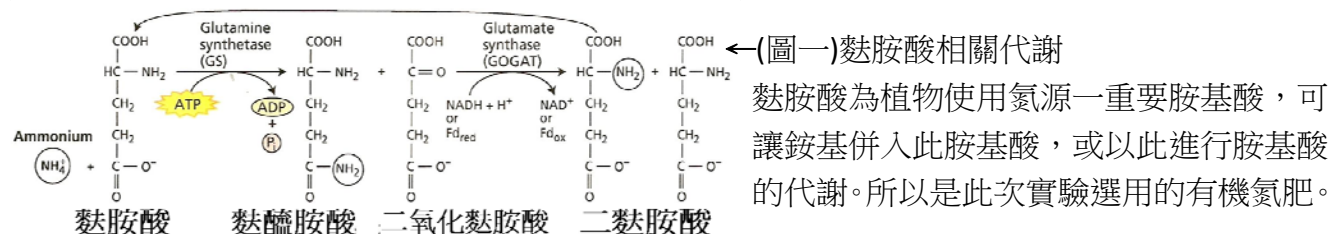
摘要

許多的研究發現，植物根部有「胺基酸運輸蛋白」，擁有主動運輸「有機」營養的能力。在短時間之內，關於此一運輸蛋白的研究，如雨後春筍般的出現，但不外乎是關於此蛋白結構的研究，或是其對應基因的位置，而在胺基酸進入植物體後，對植物體本身的影響的研究，卻是少之又少。我們在種植水稻時，常會加入無機“氮”肥，增加蛋白質的合成，這些鹽類在植物體中，是運用麩胺酸、麩醯胺酸的一連串”耗能”的代謝，將氮留在體內。既然植物擁有主動運輸有機養分的能力，若直接予以麩胺酸此一重要胺基酸，植物會不會長得比較好？答案是否！因為當麩胺酸進入水稻體內時，會對蛋白質代謝產生影響，一個環節的脫落，使的部分胺基酸難以代謝產生，並造成地下部逐漸縮短，而過短的地下部又將會對水稻個體造成諸多不良的影響。

本實驗利用常見的無機氮肥($\text{NO}_3^- \text{NH}_4^+$)和有機氮肥(麩胺酸)配置水耕培養基，分別在溫室中種植 14 後，觀察並討論其生長情形，並藉由檢測其葉綠素 a 含量及參與轉銨作用的酵素活性，探討適不適合以麩胺酸取代現在常用的無機氮肥，若當我們只予以麩胺酸為水稻植株的唯一氮源時，會對其胺基酸或蛋白質的代謝，產生哪些層面的影響。

壹 研究動機

在高中生物二年級上學期第二章(植物的營養)的教材中，曾介紹過植物根部的構造，但是僅闡述如何藉由根部，從環境中獲取「無機」的養分。近年的國外研究發現，植物根部亦有「胺基酸運輸蛋白」，可主動運輸「有機」營養。而我們在種植水稻時，常會加入“氮”肥，增加蛋白質的合成，使品質更好，但這肥料不外乎是銨鹽(NH_4^+)或硝酸鹽類(NO_3^-)。在植物體中，是運用麩胺酸、麩醯胺酸的一連串代謝，將氮留在體內。如果我們加入的不是平常的氮肥，而是麩胺酸(選用此種胺基酸原因如圖(一))，植物會不會長得更好？

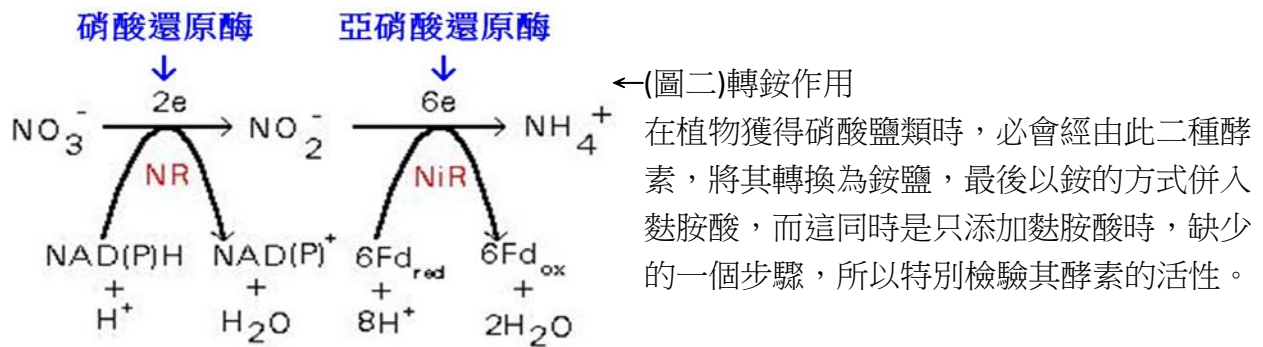


貳 研究目的

本實驗利用常見無機氮肥($\text{NO}_3^- \text{NH}_4^+$)和有機氮肥(麩胺酸)配置水耕培養基，分別在溫室中種植 14 天後，觀察並討論其生長情形，檢測其葉綠素 a 含量，並將不同的處理的水稻植株分為地上及地下部，檢測參與轉銨作用的酵素活性。藉由以上的檢測，我們欲探討的問題如下：

(一). 適不適合以麩胺酸取代現在常用的無機氮肥？

(二). 若只予以麩胺酸為水稻植株的氮源，會對其胺基酸或蛋白質的代謝，產生何種影響？



參 研究設備及器材

一、儀器

- | | | |
|------------|------------------------|----------|
| (一.) 分光光度計 | (四.) 溫室 | (七.) 電子秤 |
| (二.) 恆溫水浴場 | (五.) 冰箱(4°C and -80°C) | |
| (三.) 冷凍離心機 | (六.) 冷凍乾燥機 | |
| (八.) | | |

二、藥品

- | | | |
|---|---|---|
| (一.) KH_2PO_4 | (一〇.) Methyl viologen | (一九.) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
| (二.) KNO_3 | (一一.) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ | (二〇.) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
| (三.) 酒精(70%) | (一二.) 麩胺酸 | (二一.) H_3BO_3 |
| (四.) NADH | (一三.) 胱胺酸 | (二二.) $(\text{ZnSO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| (五.) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ | (一四.) 丙酮 90% | (二三.) $(\text{CuSO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |
| (六.) Sulfanilamide | (一五.) Bsa | (二四.) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
| (七.) N-1-naphthylethy | (一六.) 染色試劑 | (二五.) NaH_2PO_4 |
| (八.) 礦物油 | (一七.) KCl | (二六.) K_2SO_4 |
| (九.) NaNO_2 | (一八.) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | (二七.) CaCl_2 |

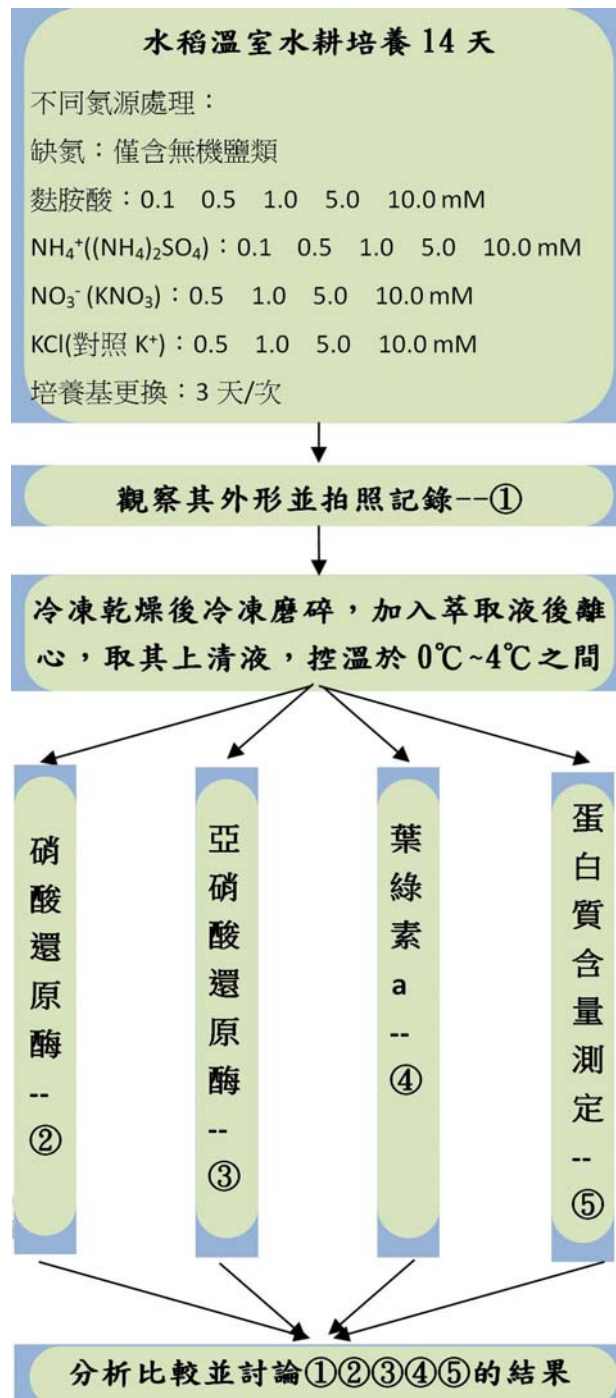
三、其它

- | | | |
|------------|-------------------|--------------------|
| (一.) 液態氮 | (四.) 水稻(台農 67 號) | (七.) 滅菌水 |
| (二.) 研鉢及杵 | (五.) 水耕瓶 | (八.) Whatman #1 濾紙 |
| (三.) 離心管數支 | (六.) 光電管(1 cm 光徑) | (九.) 試管數支 |

肆 研究過程和方法

一、研究過程：

↓(圖三)研究流程



二、實驗方法

(一.) 培養液 以 1N NaOH 將 pH 值調整至 5) ↓(表一) 培養液中無機鹽類

無機鹽類	化合物	最終濃度
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.48 μm
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.07 μm
B	H_3BO_3	18.88 μm
Zn	$(\text{ZnSO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 μm
Cu	$(\text{CuSO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16 μm
Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	35.61 μm
P	NaH_2PO_4	0.32 mM
K	K_2SO_4	0.51 mM
Ca	CaCl_2	1.00 mM
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.64 mM

(二). 葉綠素 a 含量測定

1. 將葉片 0.2 g 冷凍磨碎放入離心管，並加 5 mL 90% 丙酮溶液混合。
2. 將離心管置於 4°C 及黑暗下靜置 5 分鐘。
3. 將離心管放入離心機以 1000 g 離心 15 分鐘。
4. 離心後之上清液移入乾淨之離心管中。
5. 將步驟 4 萃取液放入 1 cm 光徑之樣品槽中，分別讀取其在波長 750、664、647 及 630 nm 之吸光值並記錄。
6. 90% 丙酮溶液其吸光為空白分析值，樣本吸光值須扣除空白分析值。
7. 取另一 0.2 g 重複以上步驟，重複數次，得其平均。
8. 濃度換算 $(C_a)(\text{mg/L}) = 11.85 * (\text{Abs}664 - \text{Abs}750 - \text{Abs}0) - 1.54 * (\text{Abs}647 - \text{Abs}750 - \text{Abs}0) - 0.08 * (\text{Abs}630 - \text{Abs}750 - \text{Abs}0)$
9. 用濃度回推其葉綠素 a 的含量。

(三). NO_3^- 呈色劑

1. 配置含 1 g sulfanilamide 與 12 mL 37% HCl 的水溶液 100 mL。
2. 將 0.02 g N-1-naphthylethy 溶於 50 mL 的水中，再加水至 100 mL。
3. 使用時，取待測液 1 mL，在依次加入 1.2. 的溶液各 1 mL，在分光光度計下，取在 540 nm 時的吸光值。

(四). 萃取液與酵素萃取

1. 配置含有 5 mM 胍胺酸且濃度為 10 mM KH_2PO_4 buffer(pH 7.5)。
2. 取欲測水稻的葉(根)0.5 g，加入液態氮使用冷凍磨碎法，加入 5 mL 的 KH_2PO_4 及胍胺酸水溶液，倒入乾淨離心管。
3. 放入冷凍離心機，使其恆溫在 4°C、15000 g 底下，離心 20 分鐘。
4. 離心後，其上清液，即為酵素溶液。

(五). 硝酸還原酶

1. 配置 2mL 的混合液，使其含有 105 μmol KH_2PO_4 buffer(pH 7.5)、20 μmol

KNO_3 、 $0.68 \mu\text{mol NADH}$ 以及 0.2 mL 酵素液。

2. 放入恆溫於 30°C 之水浴場，反應 20 分鐘。
3. 加入 0.1 mL 1 M 醋酸鋅溶液以及 1.9 mL 70% 酒精溶液，以中止反應。
4. 用步驟(三)之呈色方法，記錄其值。此 4 步驟重複數次，得其平均。

(六). 亞硝酸還原酶

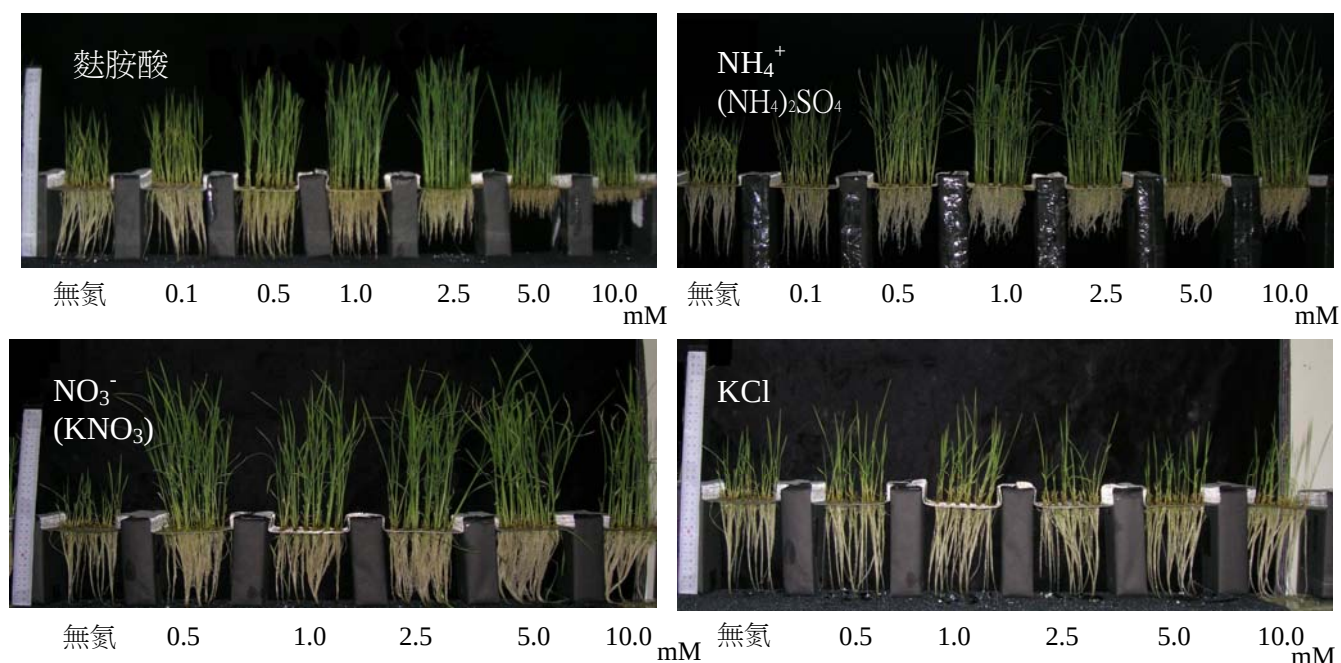
1. 配置 2 mL 的混合液，使其含有 $75 \mu\text{mol KH}_2\text{PO}_4$ buffer($\text{pH } 7.5$)、 $1.5 \mu\text{mol NaNO}_3$ 、 $0.6 \mu\text{mol Methyl viologen}$ 、 $7.5 \mu\text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 以及 0.2 mL 酵素液。
($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 最後加入，並開始計時 20 分鐘)
2. 加入礦物油在混合液之上。(不宜過多，約 2 mm 即可)
3. 20 分鐘時，搖晃試管 2~3 秒，直到藍色消退，反應結束。
4. 取出約 0.1 mL 用水稀釋至 1 mL ，用步驟(三)之呈色方法，記錄其值。此 4 步驟重複數次，得其平均。

(七). 蛋白質含量測定

1. 將染色試劑以四倍重之水稀釋，溶解後再以 Whatman#1 過濾。
2. 將 0.1 mL 的待測物與 5 mL 呈色劑混合，在室溫下 5 分鐘。
3. 在分光光度計下，取在 595 nm 時的吸光值，並計算出含量。

伍 研究結果

在(圖四)水稻 14 天培養照片中，無氮處理的植株，地上部對地下部的比值較低，在無機氮肥的處理中，地下部的生長情形較不會隨著濃度的變化而有明顯的改變，但是在麩胺酸的處理之中，地下部卻隨著麩胺酸濃度的增加而漸短，且在 10.0 mM 處理的地下部長度，約為 1.0 mM 或缺氮處理的地下部長度的 $1/5$ 。

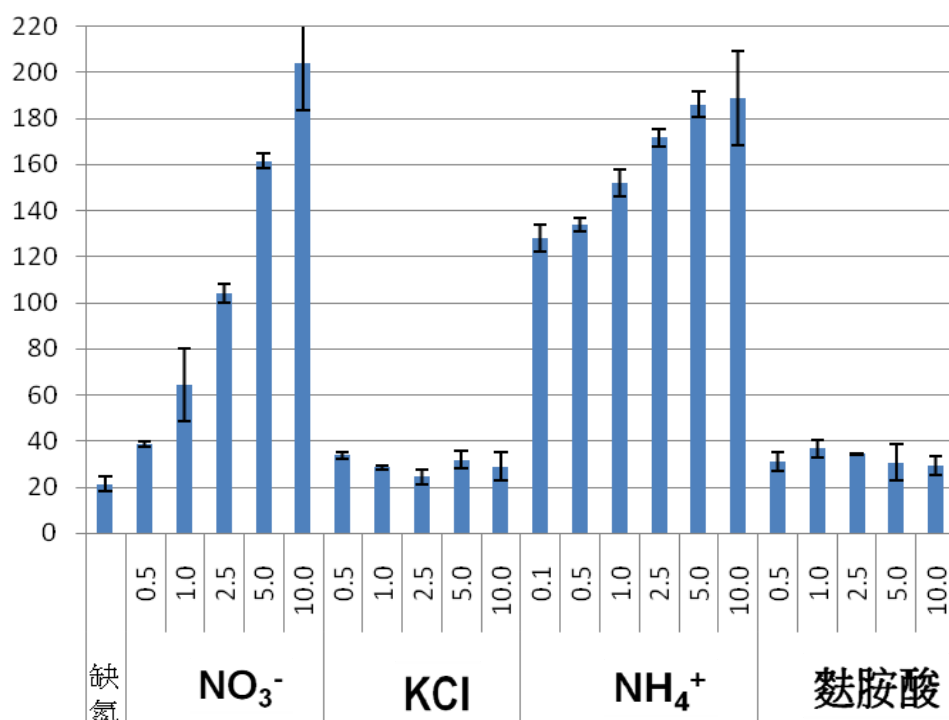


↑(圖四) 水稻 14 天培養照片

水稻在不同處理第 14 天時照片，處理方式及濃度如圖所標示。在麩胺酸處理的水稻植株中，地下部隨著麩胺酸濃度的遞增，而有顯著遞減的現象。(照片中每 36 株/格)

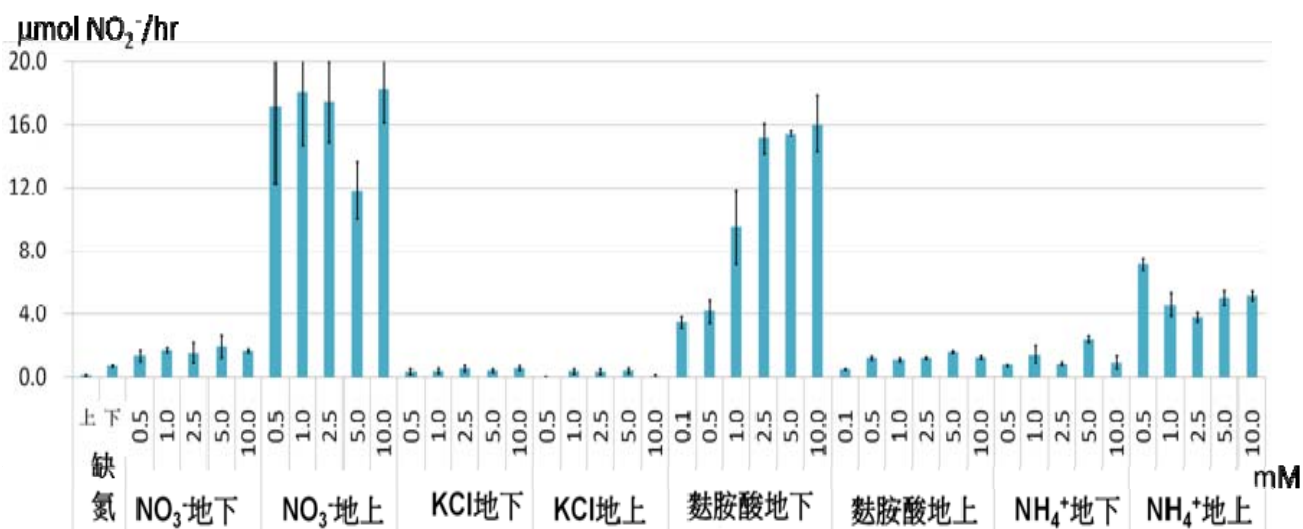
在(表二)中葉綠素 a 含量濃度隨硝酸鹽濃度上升而上升，最高約為最低的 5 倍，而銨鹽在較低濃度即有顯著的影響，而麩胺酸處理的植株偏低。

μg 葉綠素 a / g 樣本



↑ (表二)葉綠素濃度 a

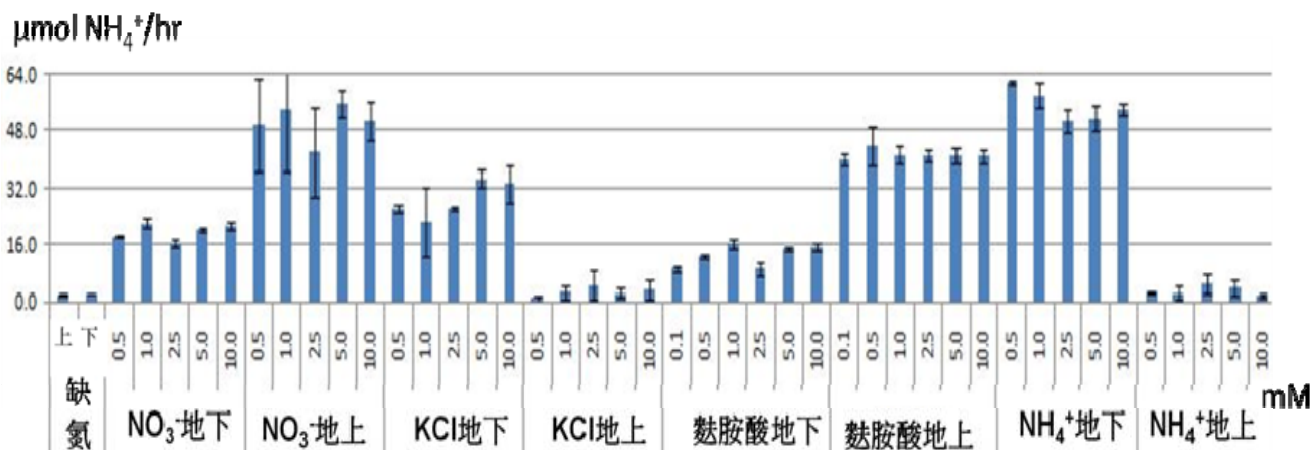
不同處理 14 天水稻植株，由其在 750、664、647 及 630 nm 之吸光值，推算其每公克地上部樣本所含多少微克葉綠素 a



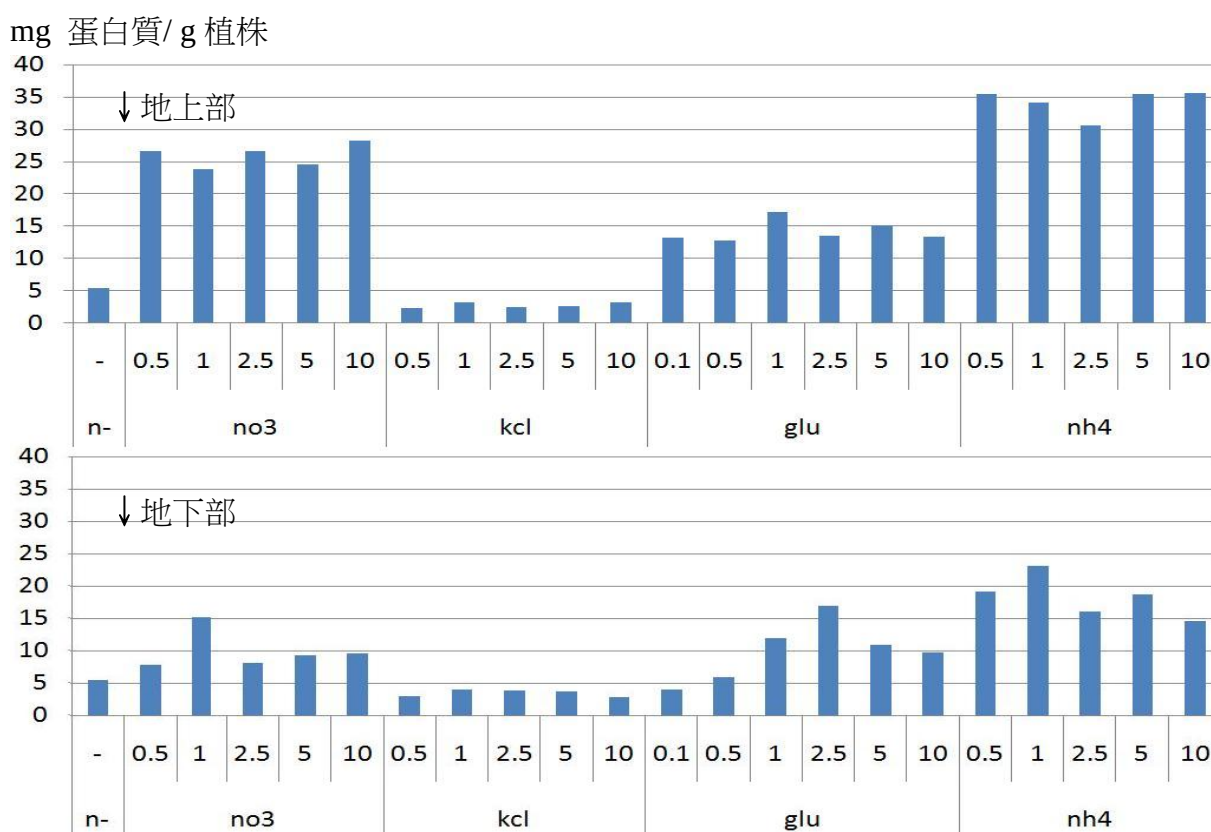
↑ (表三)硝酸還原酶活性 不同處理 14 天水稻植株，其每 0.2 mL 萃取液中硝酸還原沒，每小時還原 NO_3^- 之毫莫耳數(由於每一個 NO_3^- 被還原時，即產生一個 NO_2^- 所以檢測其產生量)

在硝酸鹽以及銨鹽的處理中，硝酸還原酶活性皆是地上部反應多於地下部如(表三)，而麩胺酸處理，則是在地下部中有明顯的變化，且約與濃度成正相關。

而在麩胺酸處理的植株中，其亞硝酸還原酶的反應，在地上部中約如在地下部中的表現，都無太大的差別如(表四)，硝酸鹽處理的活性，地下部與對照組差距不大，而在銨鹽處理中，則有地下部高於地上部的情形。



↑(表四) 亞硝酸還原酶活性不同處理 14 天水稻植株，其每 0.2 mL 萃取液中硝酸還源沒，每時還原 NO_2^- 之毫莫耳數(由於每一個 NO_2^- 被還原時，即產生一個 NH_4^+ 所以檢測其產生量)

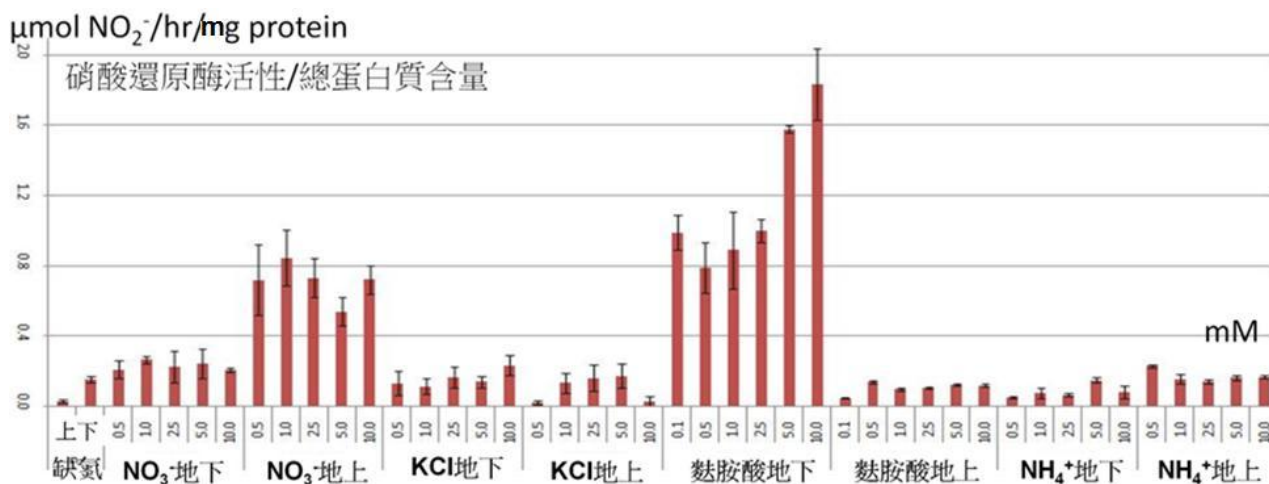


↑(表五、六) 蛋白質含量測定

蛋白質含量 取培養 14 天之水稻植株地上及地下部酵素萃取液，加入稀釋後之染色試劑，推得每公克水稻植株樣本，含有多少毫克蛋白質。

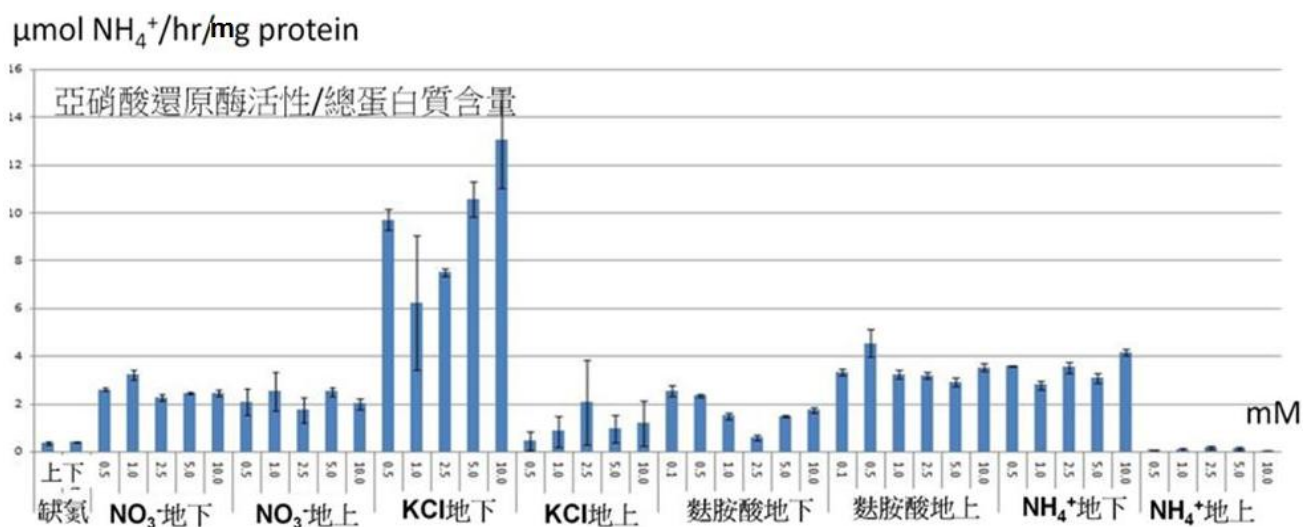
在無機氮肥的處理中，不論是其地上或地下部，都具有較高的蛋白質含量，而在麩胺酸處理的植株中，地上部處於在有氮肥與無氮肥之間，而在地下部，有先升後降的趨勢。

硝酸還原酶在麩胺酸處理的植株地下部中，有著較高的比例如(表七)，且濃度在 10.0 mM 時的比，約是其在 0.1 或 0.5 mM 中的 1.5~2 倍，但是在亞硝酸還原酶所占的比例如(表八)，其值與在硝酸鹽處理的比例大致相同。



↑(表七) 硝酸還原酶活性/總蛋白質含量

為每毫克蛋白質中，所含此酵素的活性。可表示該酵素在不同處理中，所佔的比例。

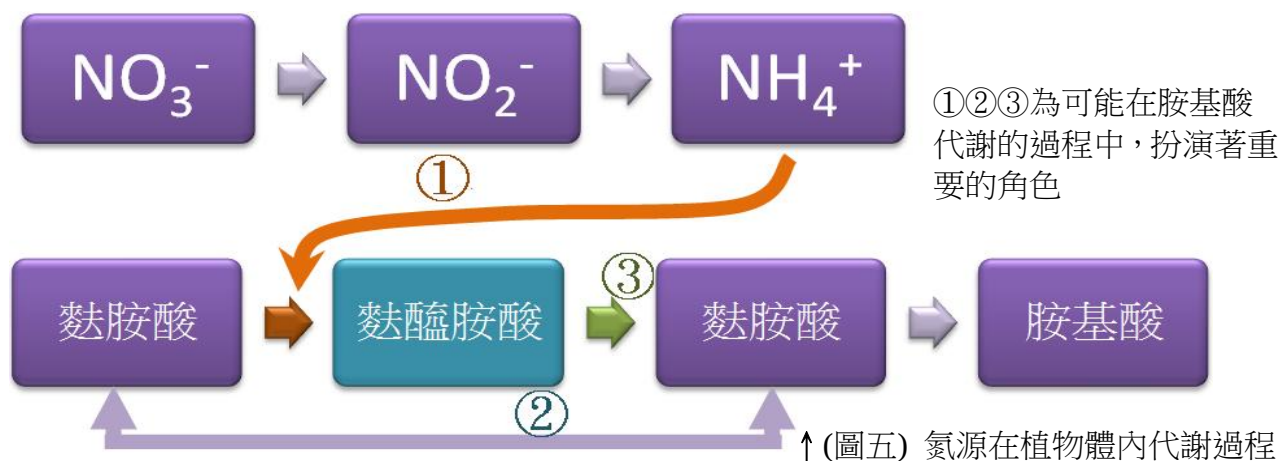


↑(表八) 亞硝酸還原酶活性/總蛋白質含量

為每毫克蛋白質中，所含此酵素的活性。可表示該酵素在不同處理中，所佔的比例。

伍 討論

- 一、當水稻在缺乏氮源時，會較著重於地下部的發展，試圖獲得較多的營養，而在水稻可從環境中獲得充足氮源時，地下部的生長情形變化差異較小，而著重於地上部的發展。但是在麩胺酸處理的植株中，地下部卻漸縮，以下討論根部過短可能造成的問題：
 - (一). 水稻植株會較容易倒伏，若在一般的農田之中，便會在水田之中壞死
 - (二). 很容易被連根拔起，較無法抵抗強風和大雨的沖刷
 - (三). 無法獲得較深層土壤的養分，缺乏生長優勢
- 二、葉綠素 a 為植物光合作用重要的色素，實驗中，也常以葉綠素 a 濃度來比較植株光合作用和生長的情形。在(圖四)中，此二處理植株之地上部一如葉綠素 a 含量的情形如(表二)，是十分翠綠。缺氮或 KCl(對照)處理的植株，地上部稍黃，葉綠素 a 濃度低亦低。雖然麩胺酸處理的地上部在(圖四)中看起來表現得一如無機氮肥的植株般良好，但在觀察其葉綠素 a 含量時，會發現其生長及光合作用，是遠不如施以無機氮肥的水稻。
- 三、而在亞硝酸還原酶活性測定中如(表四)，對照組 KCl 處理，地下部值高，所以推測環境中硝酸的有無對其地下部亞硝酸還原酶的活性影響不大，而在麩胺酸處理的植株中，其亞硝酸還原酶的反應，如同其在地上部中如硝酸還原酶在天上部中的表現，並無太大的差別，可是在地下部中，硝酸還原酶卻有漸增的趨勢，而同時在亞硝酸還原酶的活性中卻無如此的變化，麩胺酸應有能力影響前者而非後者。
- 四、硝酸還原酶活性/總蛋白質含量(表七)和亞硝酸還原酶活性/總蛋白質含量(表八)中，亦支持討論三的想法。此二表表是一酵素在該部分中所佔的比例，在(表七)中，發現硝酸還原酶在麩胺酸處理的植株地下部中，有著較高的比例，但是在亞硝酸還原酶所占的比例，其值與在硝酸鹽處理的比例大致相同。在(表八)中，KCl 地下部處理中特別偏高，應該是因為其蛋白質量(分母)較小所產生的結果。
- 五、綜合上述四點的討論，在水稻植株可從環境中獲得麩胺酸時，其地下部中，硝酸被還得量會隨麩胺酸濃度升高而漸增，推測是麩胺酸進入根部時回饋刺激硝酸還原酶造成，以期增加體內的銨，並藉此或是與麩醯胺酸相關的反應，刺激體內麩胺酸代謝為其他胺基酸如(圖五)。但是此時發育中的水稻面臨了三個問題：
 - (一). 由於植株本身是有從環境之中獲得而額外的氮源，所以並未如同正常缺乏氮源時的情形，減少地上部的生長，重於地下部的發展。
 - (二). 希望將麩胺酸代謝為其它的胺基酸，所以硝酸還原酶產量被刺激上升。
 - (三). 環境(培養液)之中並無任何無機氮源，所以麩胺酸並未如預計般的代謝為麩醯胺酸，更為被代謝為其它胺基酸。胺基酸的量並未大幅度的增加。並沒有實際胺基酸或蛋白質的增加，卻又同時必須維持地上部生長與硝酸還原酶的製造，發育中的水稻，不得不停止製造部分根部發育相關的酵素，以維持「收支平衡」，以至根長在麩胺酸濃度上升時漸縮。



柒 結論

- 一、由討論一，麩胺酸並不適合取代無機氮肥成為水稻最佳的肥料。
- 二、當麩胺酸為水稻能從環境獲得的唯一氮源，因為其代謝機制的影響，每吸收一單位麩胺酸，與吸收一單位無機氮肥，所製造出蛋白質的量，以後者為多。

捌 參考資料

- 一、Aspects of Nitrogen Metabolism in the Rice Seedling。
From Plant Physiol. 1976 June; 57(6): 923 - 927.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=542150>
- 二、BEEVERS, L. AND R. H. HAGEMAN. 1969. Nitrate reduction in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 20: 495-522.
- 三、CROY, L. I. AND R. H. HAGEMAN. 1970. Relationship of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. Crop Sci. 10: 280-285.
- 四、HAGEMAN, R. H. AND D. FLESHER. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. Plant Physiol. 35: 700-708.
- 五、LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 133: 265-275.
- 六、PEREZ, C. M., G. B. CAGAMPANG, B. V. ESMAMA, R. U. MONSERRATE, AND B. O. JULIANO. 1973. Protein metabolism in leaves and developing grains of rice differing in grain protein content. Plant Physiol. 51: 537-542.
- 七、LINCOLN TAIZ • Plant Physiology • EDUARDO ZEIGER • Ch 12 • P259~266 • Assimilation of Mineral Nutrients
- 八、Amino-acid influx at the soil-root interface of Zea mays L. and its implications in the rhizosphere From Plant and Soil 1994/2/25 p1-12
- 九、Amino-acid uptake in Arabidopsis From SLU libraries 2008/8/25 Svennerstam, Henrik (2008)
- 十、水中葉綠素 a 檢測方法－丙酮萃取法/分光光度計分析法
<http://www.niea.gov.tw/niea/doc/E50702B.doc>
- 十一、圖片來源：[生化]有關 Nitrite reductase
<http://tw.knowledge.yahoo.com/question/question?qid=1508032907990>
- 十二、王月雲 陳是瑩 童武夫。植物生理學實驗增訂本。藝軒圖書出版 p88~95