

中華民國第 59 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

團隊合作獎

052103

董兒藏奧秘，一葉知千秋

學校名稱：雲林縣私立揚子高級中學

作者： 高二 許庭羽 高二 王婷卉 高一 沈晏如	指導老師： 陳尚民 王妍絜
---	-----------------------------

關鍵詞：斑葉(variegate)、葉綠體(Chloroplast)、
光合速率(pHotosynthetic rate)

摘要

非洲堇葉光合作用型態以 C3 為主，本研究植株 Eternal Orbit 品種，表皮細胞與葉肉組織間有一層花青素，其光合作用型態有別於其他品種而呈現 CAM。斑葉品系的葉綠素形成易受溫度影響，平均 21 ° C 為非洲堇成長最佳溫度，16 ° C 出斑面積最大；堇葉毛屬於單列細胞毛(uniseriate hairs)，毛內具葉綠體構造。上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。，葉面組織切片顯示斑葉(variegate)為化學型色素體變異，局部品種有較厚的儲水細胞(Water storage cell)，能耐較乾旱的環境。

壹、研究動機

在花市中，發現一種葉面絨毛，葉形多樣，且某些品系具有斑葉(variegate)，外加花色變幻無窮的植物，老闆稱其為非洲堇(African Violet)，身為植物愛好者的本人，買了數盆回去，過了一個冬天直到春天為止，植株都活得很強健，沒料到夏天葉面竟然退斑，且開始衰弱甚至死亡，驚慌之餘帶到學校請求老師援助，老師敘述非洲堇是生長在東非高原上的植物，後來的多樣性，由原生種雜交突變形成，至於堇葉的型態變化，目前尚無人研究，問我要不要找同學一起研究，於是本人招集兩位好友，以老師為顧問，開始堇葉科展之路。

貳、研究目的

本研究針對堇葉實驗目的分為下列幾點：

- 一、 非洲堇5種斑葉品種分析
- 二、 不同環境因子光合作用型態差異
- 三、 CO₂濃度與氣孔開合分析
- 四、 葉綠體在各實驗品系間的差異
- 五、 非洲堇葉著生毛狀物分析
- 六、 非洲堇斑葉分布、成斑與退斑的機制分析，找出耐熱與耐旱品種。

參、研究設備及器材

表(一)、研究設備及其用途

編號	物品	數量	用途
一	筆記本、筆	1 本 2 支	實驗日記，紀錄觀察結果
二	數位相機	2 台	拍攝實驗過程
三	筆記型電腦	1 部	撰寫與製作電子檔
四	複式顯微鏡	1 台	觀察用
五	超純水製造機	1 台	實驗用水
六	微量天平	1 台	測劑量
七	非洲堇	50 棵	5 種不同品系各 10 棵
八	植物生長箱	1 台	控制實驗溫度
九	藍燈管	1 組	實驗光度
十	白燈管	1 組	實驗光度
十一	紅燈管	1 組	實驗光度
十二	水苔	20 公斤	栽種材質
十三	肥料	5 包	5 種不同成分
十四	灑水設備	1 組	實驗用水量
十五	解剖顯微鏡	200 袋	觀察用
十六	冷凍切片機	1 台	組織切片
十七	灑水器	2 瓶	水分補充
十八	緩衝液	10 公升	葉錠緩衝液
十九	手套	數只	實驗用
二十	花盆	50 組	栽種用
二十一	pH 測量計	2 支	測酸鹼
二十二	解剖刀	1 支	解剖植物

肆、研究過程與方法

一、研究流程

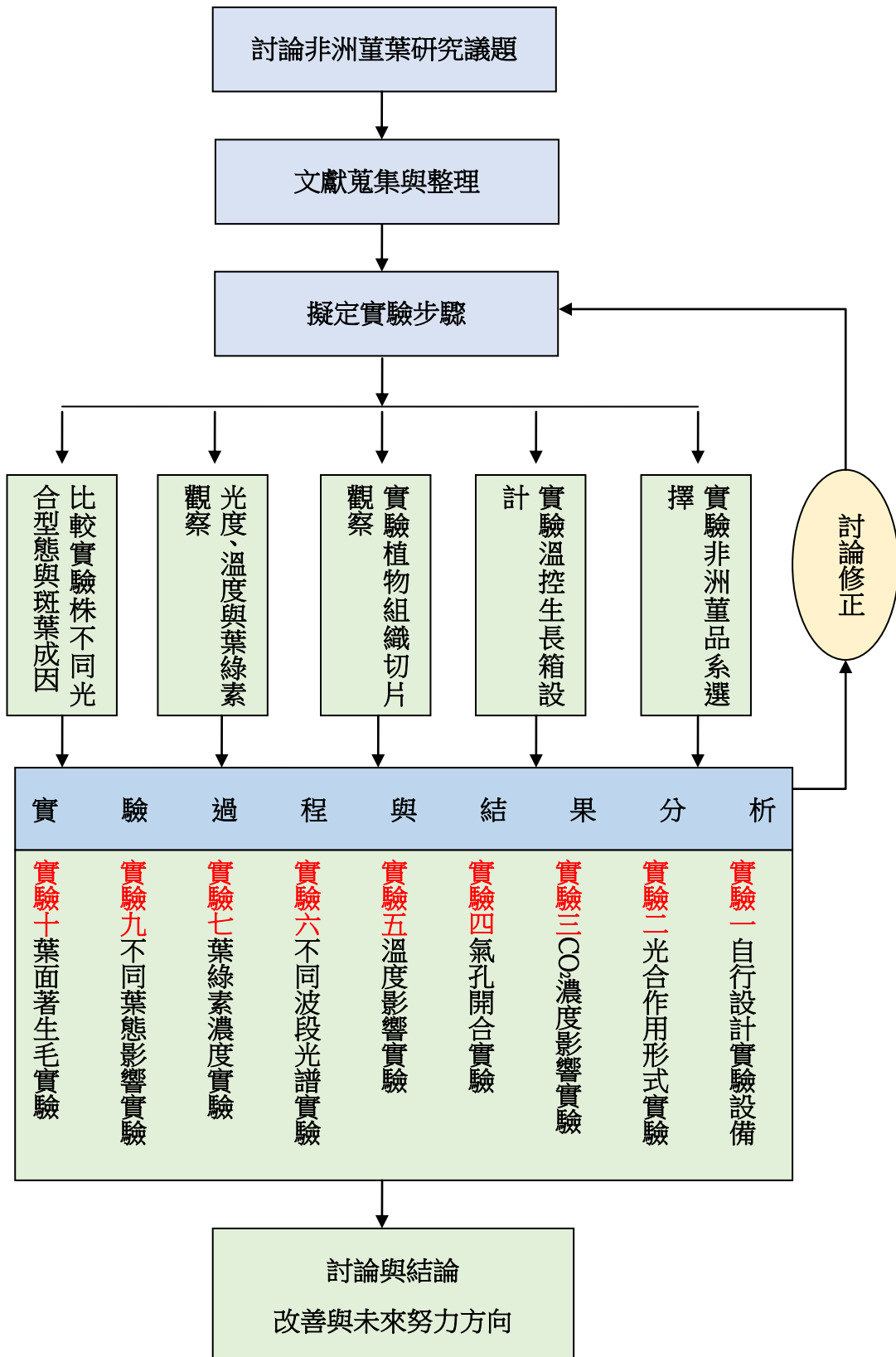


圖1 研究流程圖

二、文獻蒐集

植物葉的研究文獻並不多，國內外對非洲董葉的研究，目前還沒有出現任何一篇文章，基於研究方向相關文獻期刊，本團隊彙整以下數篇資料：

陳運萱(2015)：植物自然斑葉（foliar variegation）形成的主要原因有兩大類，一與色素相關（化學色）；另一則和葉片結構有關（物理色）。柏拉木與 *S. heterostemon* 斑葉白斑形成的原因，至少結合了表皮型、細胞間隙型與部分葉綠素缺乏型三種機制。

陳明男(2016)：10°C 以下之冷激溫度將造成嚴重之光抑制，對其光合構造影響大。斑光可有效地誘導樹種之光合作用，但低溫（10°C）時之光合能力稍低，雖增加去環氧化態色素之比例（DEPS），但仍需較長的時間發展 NPQ，以達到光保護之目的。氣孔導度非樹種光合速率之限制因子。

包尚弘(2012)：秋海棠科植物之葉片結構於同組內並沒有一致性的特徵，而是和生長環境較有關聯。例如生長在強光及乾燥地區的種類，其葉片表皮細胞多為平坦狀，並有發達的儲水細胞。其葉片上層的葉肉組織呈漏斗狀，葉綠體內具發達的葉綠餅，此為陰性植物的特徵。具斑葉的秋海棠是結構型的斑葉機制（structural variegation），是因在斑紋區塊內位在漏斗狀葉肉組織上層之細胞間隙反射光線所造成。

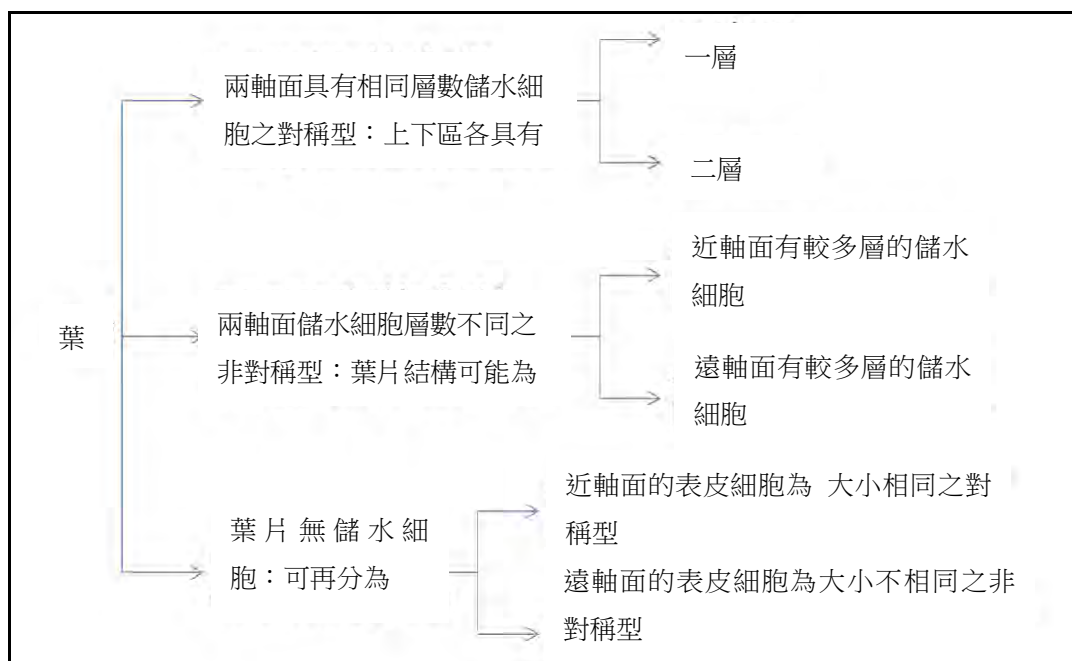


圖 2.秋海棠三種類型的葉片結構

本研究追溯非洲堇的發源地，其為 1892 年由德國聖保羅男爵，在東非坦尚尼亞高原所發現，其生長環境遮光性佳，通常會長在岩石峭壁背光面，或陰涼的森林下，當時男爵帶回 *S. ionantha* 和 *S. confusa* 兩種原生品系，因此現今的幾千種非洲堇雜交品系，皆與此兩種品系有關，其後在東非高原陸續又找到下列幾項原生品種：









			
<i>S. velutina</i>	<i>S. ionantha</i>	<i>S. confusa</i>	<i>S. difficilis</i>
			
<i>S. mather clone</i>	<i>S. tongwensis</i>	<i>S. grandifolia</i>	<i>S. nitida</i>

圖 3.非洲堇原生品種

目前非洲堇各項品系的葉形繁多，經整理過後大致可以分成下列數種：
















				
圓葉	少女葉	鋸齒	尖形	捲邊
				
波浪褶皺	褶皺斑葉	捲葉	黃冠斑	摺邊
				
斑葉(TL)	湯匙斑	馬賽克斑葉	粉紅斑葉	翻葉

圖 4.非洲堇葉形態

本研究以一組原生種為對照組(因原生種數量有限僅參與部分實驗)，實驗組則選秋季-春季斑葉明顯，夏季會退斑的 5 種品種實驗，以下為實驗與對照組的說明：

表(二)實驗植株種類描述

圖片	名稱	特徵	備註
	S. confusa	原生種標準型植株，圓葉非斑葉，小藍花由德國聖保羅男爵 1892 年帶回德國栽種的另一原生品系。	對照組
	Lazurnyi Bereg	俄系標準型植株，斑葉型的 Blue Mist(藍色重瓣沾染花)，2017 年引進的新花。	實驗組
	Eternal Orbit	半迷你型，圓葉縞花經典品種，冬季斑葉呈現粉紅斑，植株耐受度佳。	實驗組
	Ma's Arctic Sky	半重瓣白花滾藍色折邊堇型花。中綠色和白色組合成的波浪型鋸齒葉緣斑葉，葉脈向上氣狀突起。標準型。	實驗組
	JAN-Sultan	大型俄羅斯斑葉(圓葉)品種，藍色大沾染花易爆花的好花，2016 年引進。	實驗組
	SM-Shikarniy	俄系標準型植株，超大朵斑葉橘重瓣花，不易退斑，2017 年引進的新花。	實驗組

資料來源：本研究拍攝

三、實驗過程

本研究分析非洲堇原生種的生存環境，高原氣候外加季節乾溼分明，其強烈的對比環境，是否影響光合作用型態，其斑葉的成因與葉面絨毛作用皆為探討與研究的目標：以下為本研究之實驗步驟：

(一) 自行設計實驗設備

本研究先將實驗植株養殖在生長箱內，為符合實驗方式，本團隊自行設計實驗所需設備，參考中興大學生物系統工程研究室光合作用速率量測系統，加入之後所需實驗項目，本研究開發可控制溫度、光度、CO₂濃度、O₂濃度、濕度等植物實驗箱，以下為本研究設計圖與理念說明：為了進行植物光合作用速率研究，以臺灣光電工業提供之感測元件，製作光合作用速率量測同化箱一套系統，其示意圖如圖 1。應用原理為如下公式：

$$A_1 = \frac{u(C_e - C_i)}{\text{area}} \qquad R_1 = \frac{u(O_i - O_e)}{\text{area}}$$

$$A_2 = \frac{u(C_e - C_i)}{\text{area}} \times \frac{(1 - W_i)}{(1 - W_e)} \qquad u = M' \times G \text{ mol}$$

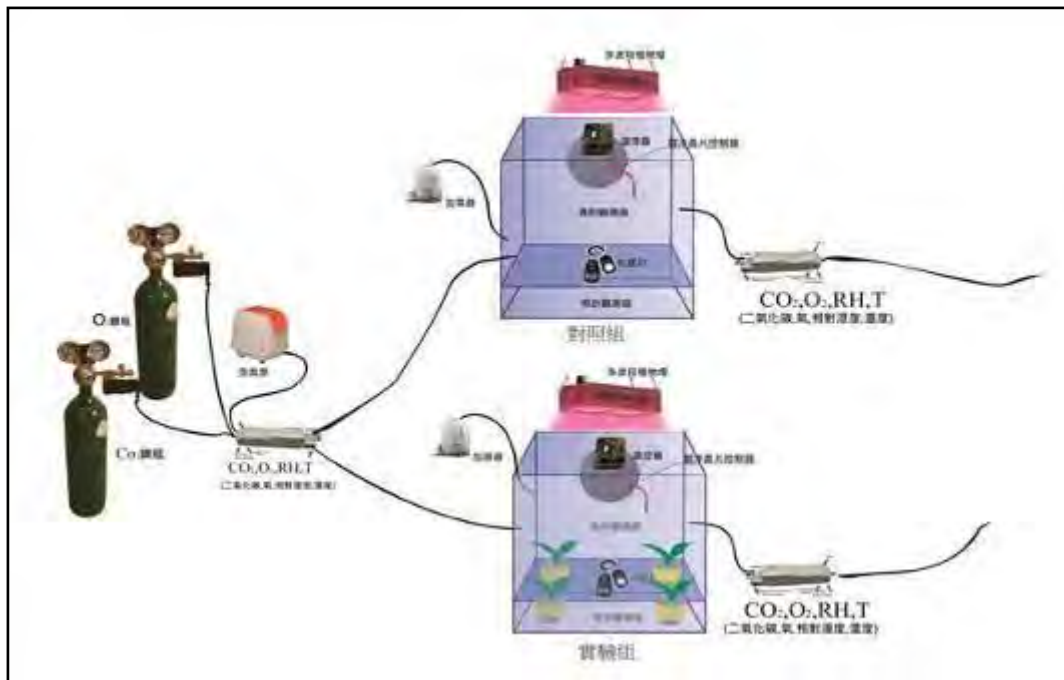


圖 5.自製光合效率實驗箱

在此 A1 與 A2 為二氧化碳釋出率，R1 為氧氣吸收率。u 為空氣流量，Ce 與 Ci 為送出與進入同化箱之空氣內二氧化碳濃度，Oe 與 Oi 為送出與進入同化箱內之空氣氧氣之濃度，Wi 與 We 為送出與進入同化箱之空氣絕對濕度，area 為樣本葉面積，M，為空氣流量，Gmol 為空器內氧氣或二氧化碳莫耳數。

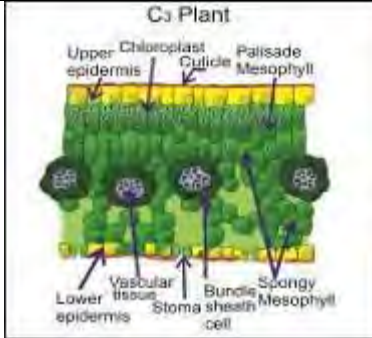
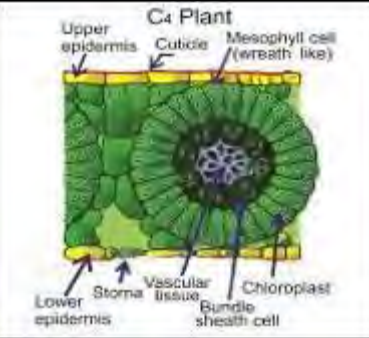
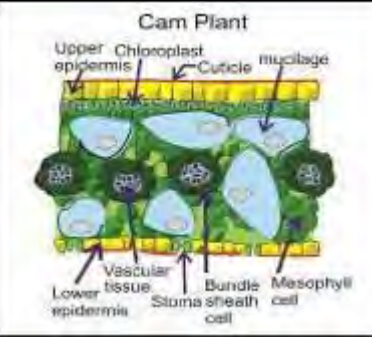

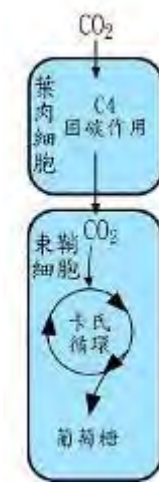



圖 6.光合實驗箱製作過程

(二) 光合作用型態實驗

本研究整理光合作用型態，以下為各類光合作用型態比較表：

表(三) C3-C4-CAM 比較

C3 葉組織與光合形態	C4 葉組織與光合形態	CAM 葉組織與光合形態
		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;">  </div> <div style="width: 45%;"> <p>Rubisco 與 CO₂ 結合，產生 PGA 在 CO₂ 濃度下降時，Rubisco 易與 O₂ 產生光呼吸作用</p> </div> </div>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;">  </div> <div style="width: 45%;"> <p>PEP 羧化酶與 CO₂ 結合，產生 OAA→MA (4C)，再進入維管束鞘細胞與 Rubisco 產生 PGA</p> </div> </div>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;">  </div> <div style="width: 45%;"> <p>晚上開起氣孔，PEP 與 CO₂ 結合成 OAA→MA 存於液胞，白天閉氣孔與 Rubisco 產生 PGA</p> </div> </div>

本研究整理三種不同光合作用型態其特徵如下所示：

表(四) C3-C4-CAM 特徵

光合型態	C3 植物	C4 植物	CAM 植物
代表植物	稻、麥、馬鈴薯、番茄、胡瓜、東亞蘭、拖鞋蘭	甘蔗、玉米、高粱、熱帶牧草、高粱、多數禾本科植物	仙人掌科、龍舌蘭、景天科等多肉植物、萬代蘭
主要分佈區	溫帶地區	熱帶、亞熱帶地區	乾燥沙漠地區
CO ₂ 固定效率最適溫度	20-30°C	30-40°C	35°C
最初發現者	1957 年 Calvin	1966 年 Hatch、Slack	19 世紀後期
葉解剖特性	1.維管束鞘細胞不含葉綠體。 2.葉肉細胞較分散	1.維管束鞘細胞含有葉綠體。(呈現花環狀) 2.葉肉細胞較密集	1.葉肉細胞呈海綿狀 2.有巨大液胞，儲水作用。
氣孔開放時間	白天	白天	晚上。PS：水分充足時氣孔白天開，變成類似 C3 植物模式。
光固定 CO ₂ 之途徑	PCR 循環	PCA 循環 + PCR 循環 (以空間分隔)	CAM 循環 + PCR 循環 (以時間分隔)
固碳位置	葉肉細胞	葉肉細胞	葉肉細胞
與 CO ₂ 結合的化合物	RuBP(5C)	葉肉細胞:磷酸烯醇丙酮 (PEP) (3C) 維管束鞘細胞: RuBP(5C)	白天:磷酸烯醇丙酮 晚上: RuBP(5C) (PEP) (3C)
固碳酵素	Rubisco	PEP 羧化酶+Rubisco	PEP 羧化酶+Rubisco
	CO ₂ 的親和力：PEP 羧化酶 > Rubisco → 在低 CO ₂ 環境下 C4 比 C3 固碳效率好		
固碳產物	3-磷酸甘油酸 (3-PGA) (3C)	草醋酸→蘋果酸 (OAA) →(MA)(4C)	晚上:草醋酸→蘋果酸 (OAA) →(MA) (4C) 白天: 3-磷酸甘油酸 (3-PGA)(3C)
卡爾文循環進行位置	葉肉細胞	維管束鞘細胞	葉肉細胞
光飽和點	全日照 1/3	無	全日照 1/4

本研究依葉組織細胞型態、CO₂ 濃度的日韻律變化、氣孔開合時間與 pH 性質，來分辨光合作用型態，以下為實驗過程：

(1) 葉組織細胞型態

組織觀察過程為清洗刀具、鑷子，將玻片擦拭乾淨，選擇新鮮葉片切下並且記錄切片部位，打開光學顯微鏡，開啟電源，培養皿洗淨，裝取適量的水放置一旁。切片部分，以刮鬍刀片較薄且利，適合用來進行切片動作，先切出欲觀察部分，再將之細切成片狀以利觀察，切片時捏著已經過裁切的葉片一端，一手拿著刀片快速多次削過，削切幾次後，將削下的薄片部分放入裝水的培養皿中，鑷子在水中撥弄仔細觀察切下的薄片組織，擇一最完整最薄且可透光的取出將摘選好的薄片放上玻片，與載玻片呈四十五度角蓋上蓋玻片，再用顯微鏡觀察，先使用最低倍數(4X)的物鏡進行觀察，調整好適宜的焦距後，開始觀察，並依所需觀察部分，逐漸加大倍數。

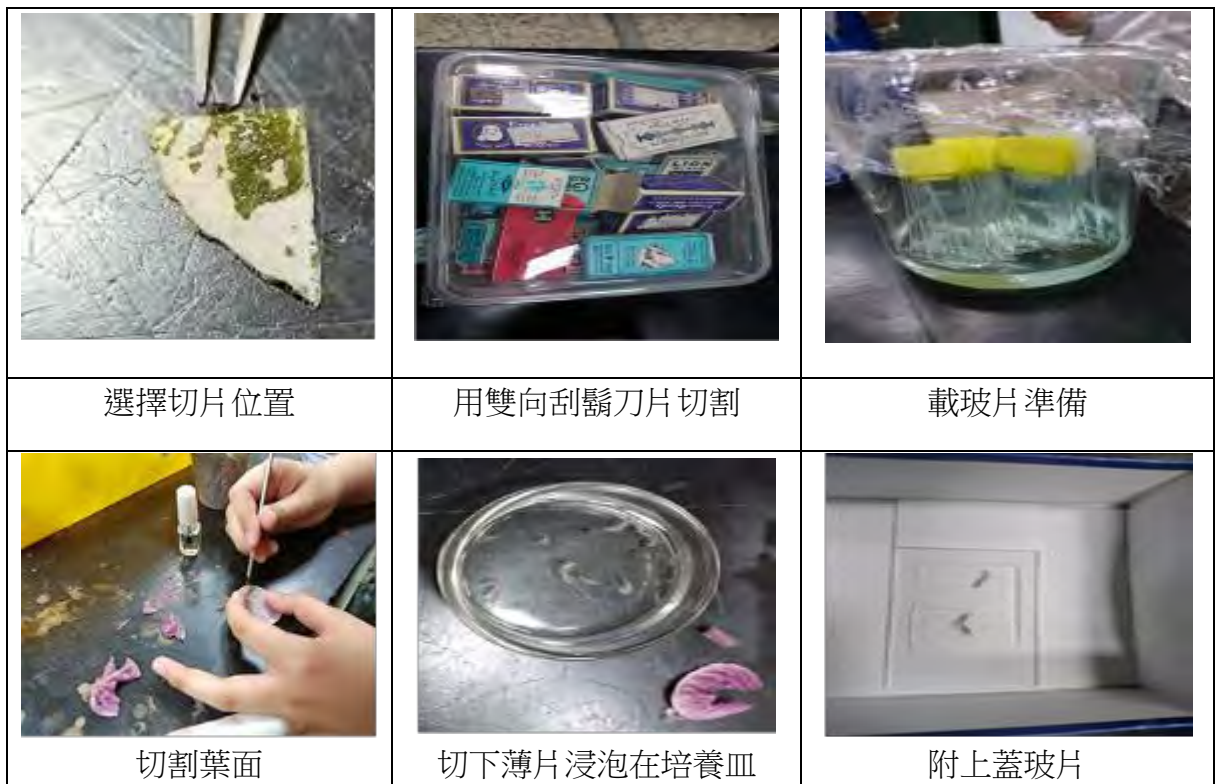


圖 7.葉組織切片過程

(2) 氣孔開合時間

本研究使用指甲油印模法（楊芳等，2010），其方法於葉背的邊緣塗一層指甲油，待指甲油乾後，黏上透明膠帶並撕下，直接黏於玻片上即可，然後再進行顯微鏡觀察。步驟如下：

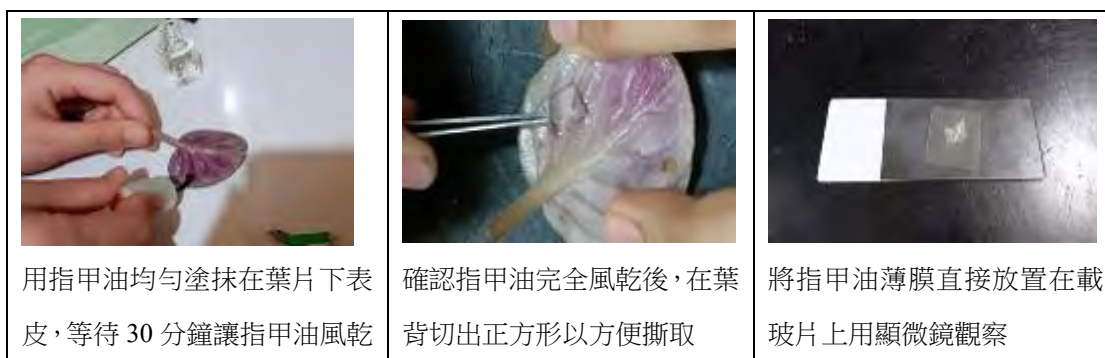


圖 8.指甲油氣孔觀測



圖 9.實驗植株葉背氣孔觀察

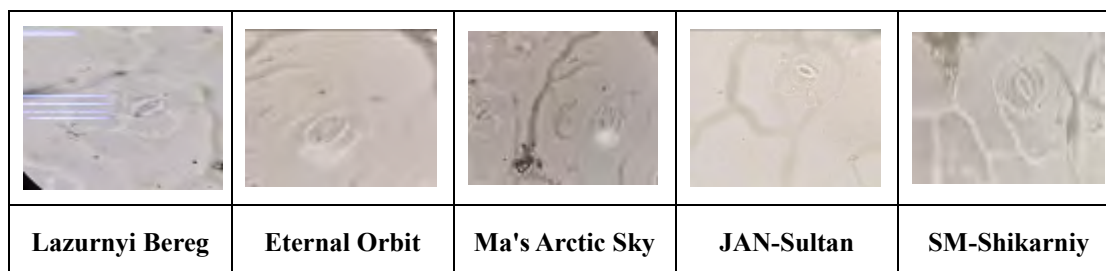


圖 10.實驗植株葉面氣孔觀察

1. 照光度影響氣孔開合測試

本研究模擬白天與黑夜狀況，測試光度氣孔開合情形；以白光模擬日光，參考非洲董日照時間設定 12 小時作日夜切換，並以 7:00、13:00、19:00 與凌晨 1:00 作觀察。



圖 11.實驗植株於生長箱模擬日光情形

2. 增加 CO₂ 濃度影響氣孔開合測試

主要設定 CO₂ 高濃度、低濃度變化於全日照、半日照與完全黑夜下，觀察氣孔開合情形。



圖 12. CO₂ 濃度測定設備

(3) CO₂ 濃度的日韻律變化

計算光下的 CO₂ 量，本研究使用自行設計之氣體交換式設備，可用量測單一葉片，整株或數株植物。其原理是將受測植物之樣本加以隔離，量測此隔離空間內的 CO₂ 氣體濃度變化。

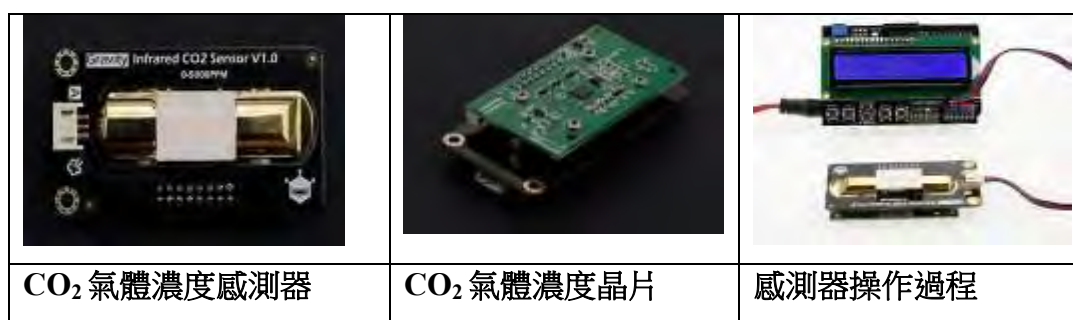


圖 13. CO₂ 氣體濃度變化感測器

(4) pH 值

將實驗植株依 7:00、13:00、19:00 與凌晨 1:00 的時間，剪取莖葉重量，約 15 克，用搗鉢取莖葉汁液，分別以 pH 廣用紙測試 pH 值。其步驟如下：

1. 廣用試紙

將非洲堇的葉片與葉柄放入磨鉢磨成汁，本研究原本用廣用試紙測試，但是測出的顏色太過接近中性，對照顏色盤酸鹼值大概落在 6 到 7 之間。

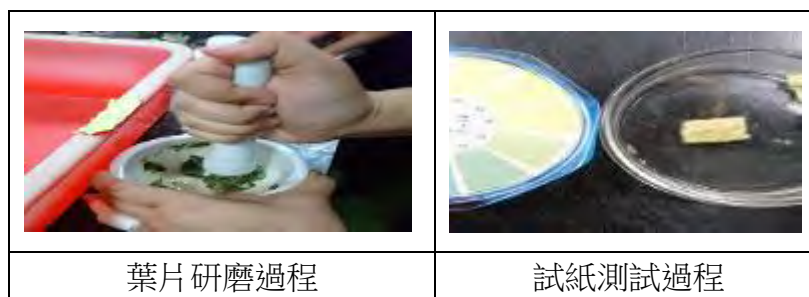


圖 14.pH 值檢測

2. pH 酸鹼度計:

pH 計是一種用於測量液體的 pH 值的電子儀器（也有特殊的探針來測量半固體物質），可以確認物質的酸鹼性。一個典型的 pH 計由一個特殊的測量探頭〔玻璃電極（glass electrode）〕連接到電壓表，量測並顯示 pH 讀數。其操作方法為植物檢測液必須淹過測量探頭，待螢幕測出酸鹼度數值後，數字會隨時間下降。



圖 15.pH 酸鹼度計檢測過程

(三) 檢測葉綠素 a，b 與類胡蘿蔔素含量

本研究為了解葉片的綠色部分與白斑部分中各類色素的含量有無差別，使用免疫酵素分析儀(分光光度計) 在某一特定波長下測定其吸光度，即可用公式計算出萃取液中各色素的含量。

首先從五個品種中每一品種挑選兩株做為檢測樣品，挑選有白斑的葉子，將白斑與綠色部分各量測 0.1 克.剪碎，把已剪碎的白斑與綠色部分分裝到標示為(W)、(G) 試管中，從量筒用滴管吸取丙酮滴入 2 毫升，快速用石臘膜封住管口。

分析儀使用方式：將一次吸取 100ul 的微量分注器裝上滴管尖，從試管分兩次吸取共 200ul 滴入孔微陣列盤，將陣列盤送入機器中，在操作面板上選取測量範圍

(行:A~F 列:1~12)，輸入測定所需波長(單位:奈米)，開始測定前，先震盪五秒，測定後，操作面板會按選取範圍跑出數據。

以下為吸光值導入公式算出葉綠素 a、b 及總類胡蘿蔔素的含量($\mu\text{g/g DW}$):

$$(1) \text{Ca} = 12.21A_{663} - 2.81A_{646} \quad (2) \text{Cb} = 22.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

$$(3) \text{Cc} = (1000 A_{470} - 3.27\text{Ca} - 104\text{Cb}) / 229$$

※Note: Ca = Chlorophyll a, Cb = Chlorophyll b, Cc = Total carotenoid

			
試管裝實驗液體	石臘膜封住管口	100ul 離心管	放入實驗儀器

圖 16. 檢測葉綠素過程

(四) 埋膠切片 (embedded section)實驗

採集新鮮葉片，切取適當大小，浸泡在前固定液 2.5%戊二醛(glutaraldehyde, GA) 4 小時，並抽氣使樣品內的空氣排除，接著以 0.1M 磷酸溶液清洗 2 次，每次 30 分鐘，然後浸泡在後固定液 1%銻酸(osmium) 4 小時，再以 0.1M 磷酸溶液清洗二次，之後以酒精做序列脫水，接著以丙酮：Spurr's resin (Spurr, 1969)序列 (丙酮：Spurr's resin = 3：1、1：1、1：3) 進行滲膠，純膠置換二次，一次放過夜，一次 4 小時，放進 70°C 烘箱 12 小時塑化成膠塊，待切片乾燥並黏附於載玻片上後，以 1%甲苯氨藍(toluidine blue) 染色 1 分鐘，蒸餾水洗淨、烘乾後，於光學顯微鏡下觀察，以外接式相機拍照記錄。

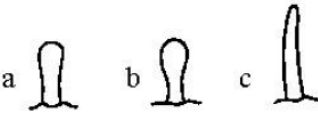

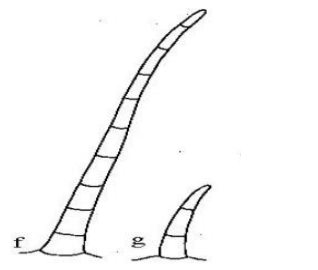

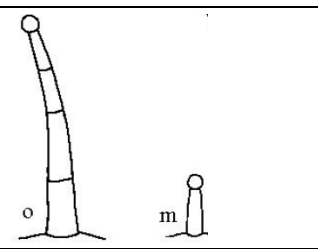
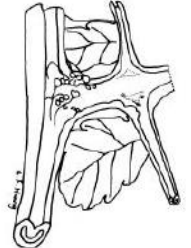
			
製成膠塊上機	轉動切片過程	修整膠塊形狀	蒸餾水洗淨、烘乾

圖 17. 埋膜切片過程

(五) 葉毛分析

本研究參考Theobald et al. (1979) 之研究，將葉毛整理其歸類如下：

表(五) 毛的形態特徵

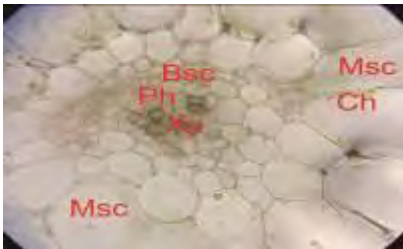
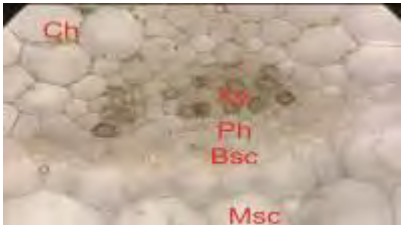


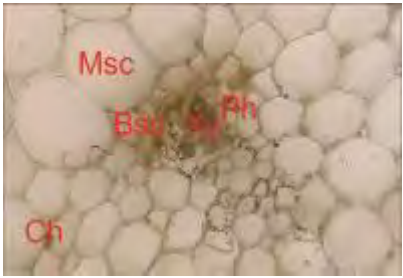
毛的型態	外觀	特徵
單細胞毛 unicellular hairs		由單一細胞所組成者。
棒狀單細胞腺體 club-like unicellular gland		由單一棒狀之細胞所組成，外包黃色分泌物。
單列細胞毛 uniseriate hairs		由一系列細胞所組成者，其頂端細胞鈍狀。
倒伏狀腺毛 appressed hairs with a glandular head		個單列細胞所組成之倒伏狀腺毛，偶而會有單細胞自基部的1 個或2 個細胞突出，稱為二次分支。
單列細胞腺毛 uniseriately glandular hairs		單列細胞毛，但其頂端具一腺體細胞者
疣狀物 verruca		僅見於貞蕨屬及軸果蕨，位於葉軸及羽軸交接處，就結構而言，應為具體而微之肉刺；發育上，疣狀物上部單列細胞早凋，而僅存基部細胞團、狀如疣

資料整理自Theobald et al. (1979)

伍、研究結果

一、植株葉脈部分做切片觀察結果：

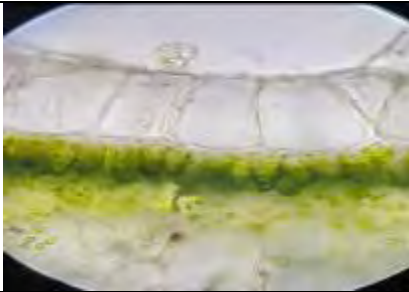
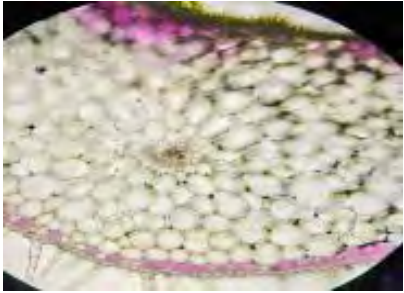
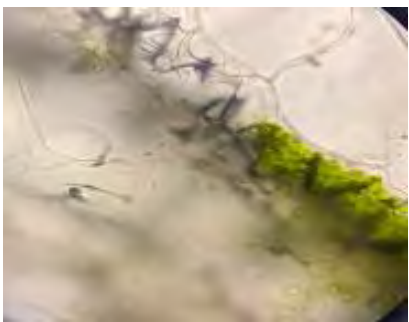
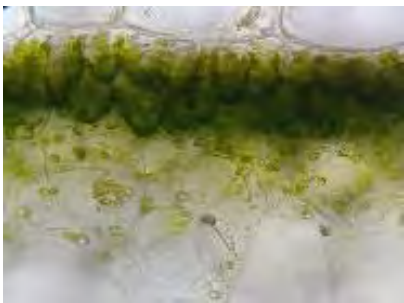

表(六) 葉脈橫切結果分析

植株名稱	葉脈縱切	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		維管束鞘細胞 Bundle sheath cell (Bsc): 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch)
		葉肉細胞 Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
Eternal Orbit		維管束鞘細胞 Bundle sheath cell (Bsc): 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch)
		葉肉細胞 Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
Ma's Arctic Sky		維管束鞘細胞 Bundle sheath cell (Bsc): 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch)
		葉肉細胞 Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
JAN-Sultan		維管束鞘細胞 Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch)
		葉肉細胞 Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
SM-Shikarniy		維管束鞘細胞 Bundle sheath cell (Bsc): 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch)
		葉肉細胞 Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造

備註: **Bsc** : Bundle sheath cell(維管束鞘細胞) ; **Msc** : MesopHyll cell(葉肉細胞) ;
pH : pHloem(韌皮部) ; **Xy** : Xylem (木質部) ; **Ch** : (Chloroplast)(葉綠素)

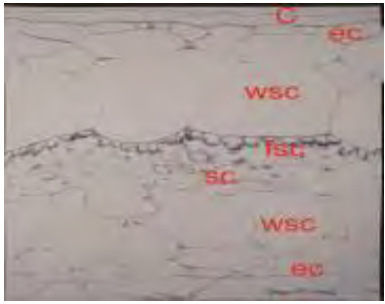
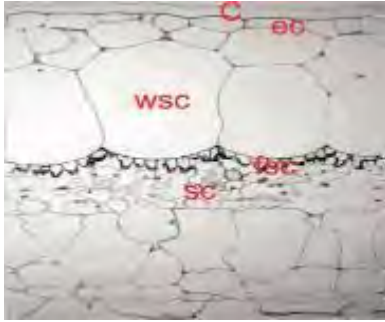
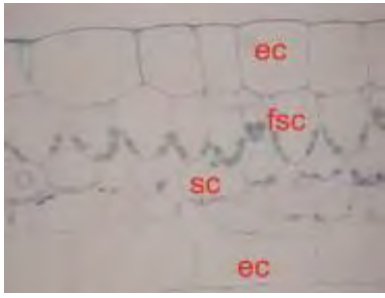
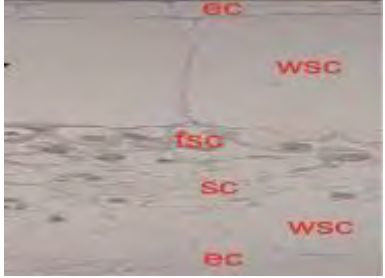
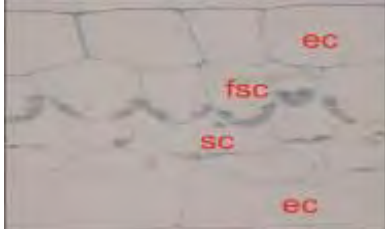
二、本研究以葉面橫切結果

表(七) 葉面縱切結果分析

編號	葉面縱切	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。
Eternal Orbit		葉的葉肉組織有含花青素，而葉綠素位在花青素上層。
Ma's Arctic Sky		中間段為白斑部分，可明顯看出其葉綠體的分布差異，，白斑部分明顯沒有葉綠體，放大後更明顯看出兩者明顯的顏色差異
JAN-Sultan		上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。
SM-Shikarniy		上表皮與葉肉細胞間有一儲水細胞相隔。

三、埋膠切片研究結果

表(八) 埋膠切片結果分析

編號	埋膠切片	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，初步判定可能為 C3，但儲水細胞很厚，又與 CAM 相似。
Eternal Orbit		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，儲水細胞異常厚，較接近 CAM。
Ma's Arctic Sky		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，柵狀細胞與海綿細胞明顯，初步判定可能為 C3。
JAN-Sultan		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，儲水細胞異常厚，較接近 CAM。
SM-Shikarniy		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，柵狀細胞與海綿細胞明顯，初步判定可能為 C3。

Cuticle(角質層)**C** ; Epidermal cell(表皮細胞) : **ec** ; Water storage cell(儲水細胞)**wsc** ; Funnel-shaped cell(漏斗狀細胞)**fsc** ; Sponge cell(海綿細胞)**sc**

四、葉綠素實驗結果

(1) 葉片在藍光、紅光、白光照射下顏色差異與內部實際色素含量比較

本研究挑選五種非洲堇(Rob's Outer Orbit、SM-Shikarniy Mak、Mas's Arctic Sky、Jan-Sultan、Lazurnyi Bereg)各十株作為實驗對象，而生長箱三層分別用不同波長的光照射，每層皆鋪上鋁箔紙防止光透到下一層影響實驗。其中品種 SM-Shikarniy Mak(以下簡稱 S)及 Jan-Sultan (以下簡稱 J)在外觀上有較明顯的變化。第一層使用藍光(450nm)照射，第二層使用紅光(650 nm)，第三層使用白光(400-700 nm)



圖 18. S 品種不同光線堇葉變化情形

由圖可見，S 品種在藍光(450nm)照射下整株葉片綠色最深，在紅光(650 nm)照射下最淺，在白光(400-700 nm)照射下的整株葉片顏色則介於中間。而三株 S 品種新長出的葉子，在藍光照射下的新葉白斑最多，在紅光照射下次之，在白光照射下新葉幾乎是全綠。



圖 19. S 品種葉綠素變化柱狀圖

由此圖表可看出，以紅光照射後的植株所含的葉綠素較少，以藍光照射者則明顯含有較多葉綠素。



圖 20. J 品種不同光線莖葉變化情形

J 品種在紅光照射下整株葉片明顯黃化，除了本就會逐漸黃化的最外層老葉以外，由外數第二層的葉片顏色變黑，最內層的新葉則由淺綠逐漸變深轉黑。藍光照射下綠色最深，在白光照射下整株的顏色變化則介於中間。而三株 J 品種新長出的葉子，在藍光照射下的新葉綠色最深，在白光照射下新葉幾乎是全綠。



圖 21. J 品種葉綠素變化柱狀圖

由此圖表更可看出，以紅光照射後的植株所含的葉綠素較少，以藍光照射者則明顯含有較多葉綠素。

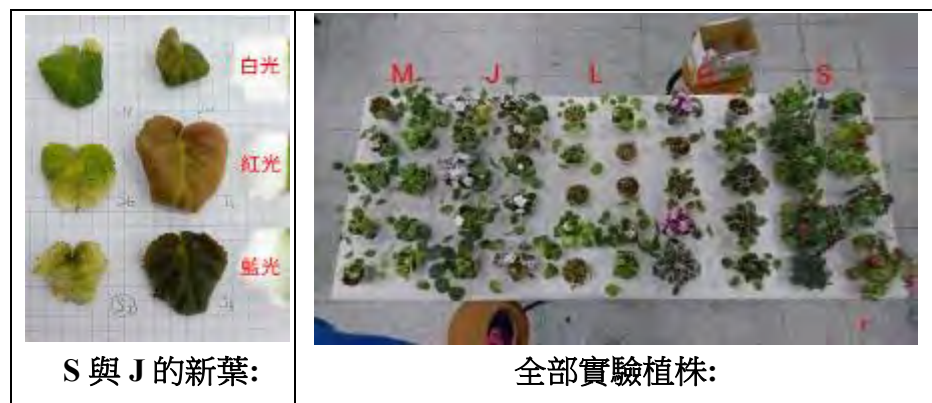


圖 22. 全部實驗植株總圖



圖 23.全部新葉樣本

(2) 不同溫度下葉片綠色部分與白斑的葉綠素 a(Ca)、b(Cb)含量變化

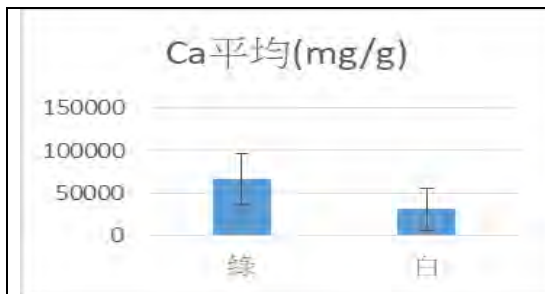


圖 24. 綠色與白色葉子 Ca 平均內含量

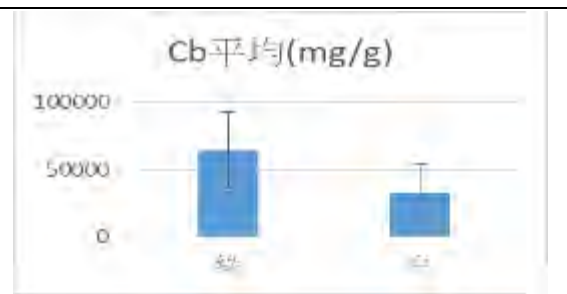


圖 25.綠色與白色葉子 Cb 平均內含量

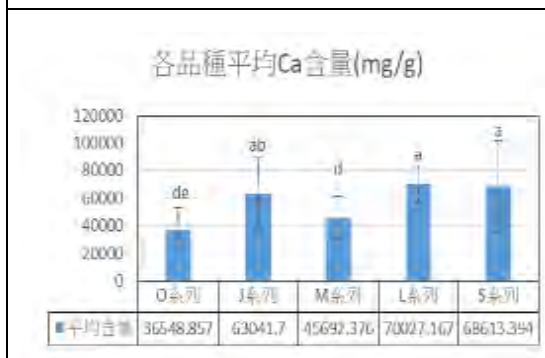


圖 26. 各品種 Ca 平均內含量

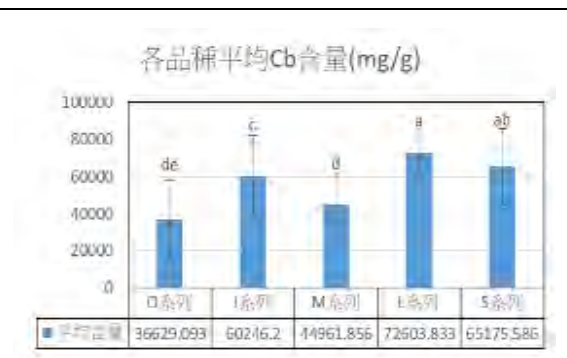


圖 27. 各品種 Cb 平均內含量



圖 28.不同溫度下 Ca 含量差異比較

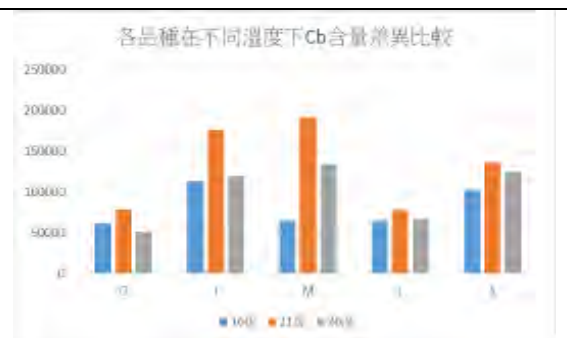


圖 29.不同溫度下 Cb 含量差異比較

根據上表，各品種在 16 度環境下，白斑較易生長，葉綠素含量較少，光合作效率可能較差；21 度適合植株生長，葉綠素含量最高，光合作用效率最佳；26 度不利於植株生長，故葉綠素含量下降。

表(九) 各品系葉綠素 P 值

p 值	Ca	Cb
O 系列	0.034983	0.0256487
J 系列	0.21497	0.513562
M 系列	0.047532	0.036231
L 系列	0.135314	基準
S 系列	基準	0.164863

五、CO₂ 濃度實驗結果

(1) 增加 CO₂ 濃度量

本研究有鑑於科學教育月刊第 357 期，題目「誘發特定 C₃ 及 CAM 植物氣孔開啟因素的探討」已有詳盡論述增加 CO₂ 濃度變化造成的影響，因此本研究則暫停此研究項目，朝向第二點植株 CO₂ 日韻律的研究。

(2) CO₂ 日韻律變化

本研究運用縮時攝影紀錄實驗過程，五種實驗植株內 CO₂ 濃度日韻律如下圖所示：

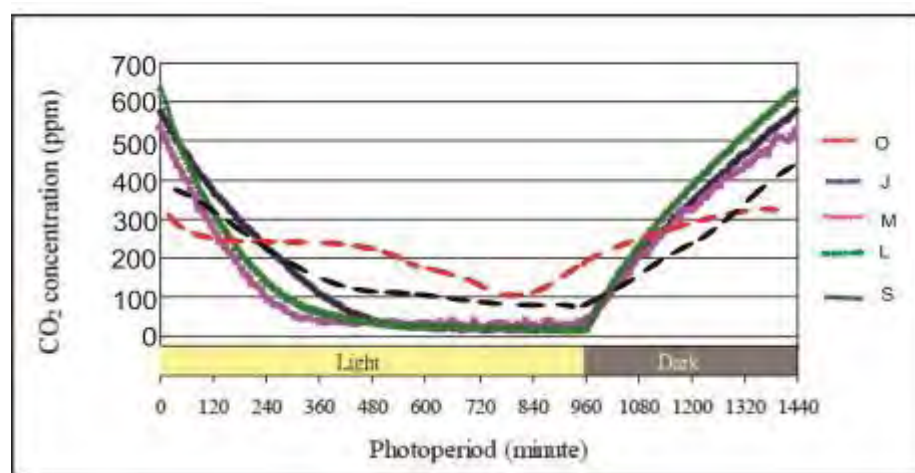


圖30. 五種實驗植株內CO₂濃度日韻律圖

由CO₂日韻律變化得知，只有O品種差異較大，其他品種則呈現C3型態，O品種應為CAM型態。

六、氣孔實驗結果

(1) 上下表皮氣孔數分析

本實驗使用了五個品種，分別為O、S、M、L、J，觀察其上下表皮的氣孔數，可觀察到非洲堇的下表皮氣孔數是比較多的，而上表皮的氣孔數較少。

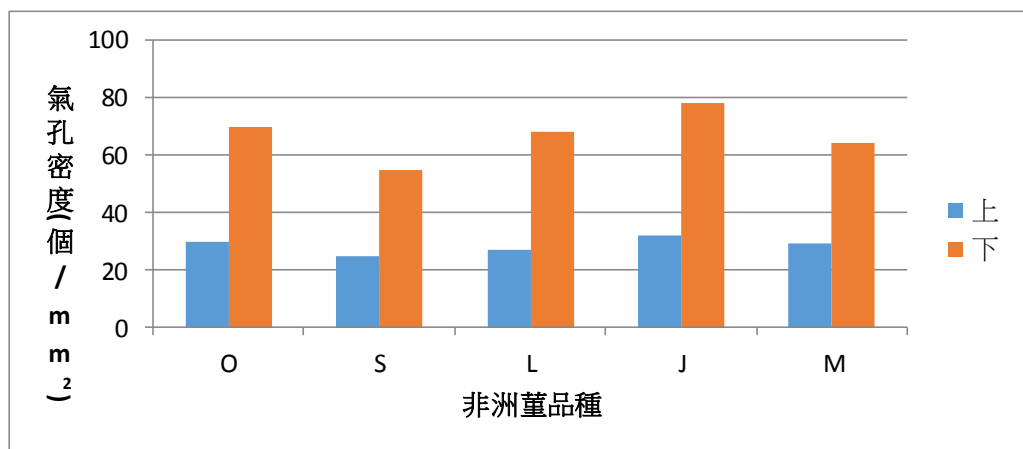


圖 31. 各品種上下表皮切片氣孔密度分析

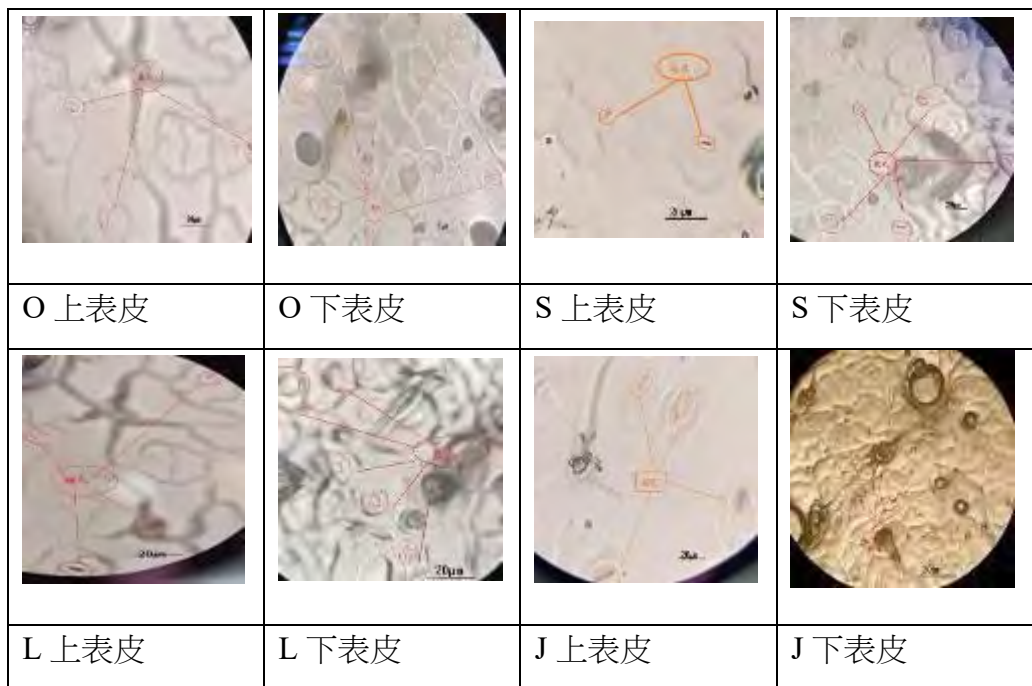


圖 32. 各品種上下表皮變化

(2) 氣孔開合變化

本研究氣孔開合程度以 image j 軟體計算 O 品種保衛細胞的面積及周長，並一天每隔 6 小時記錄一天氣孔開合的變化，如下所示：

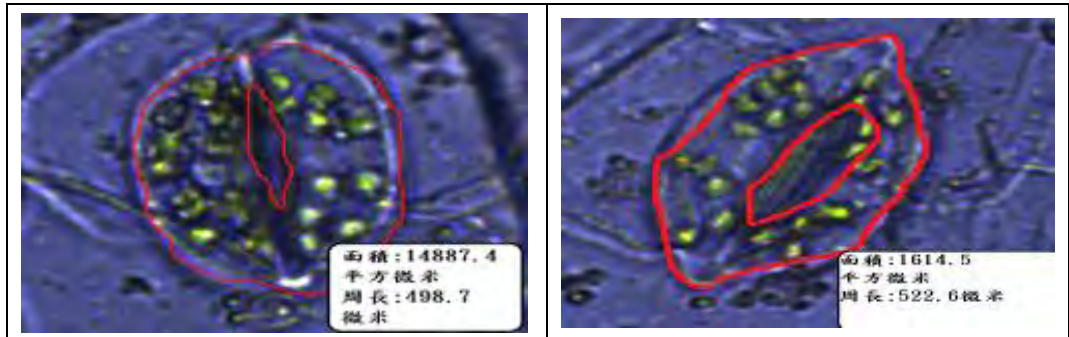


圖 33.氣孔開合計算方式

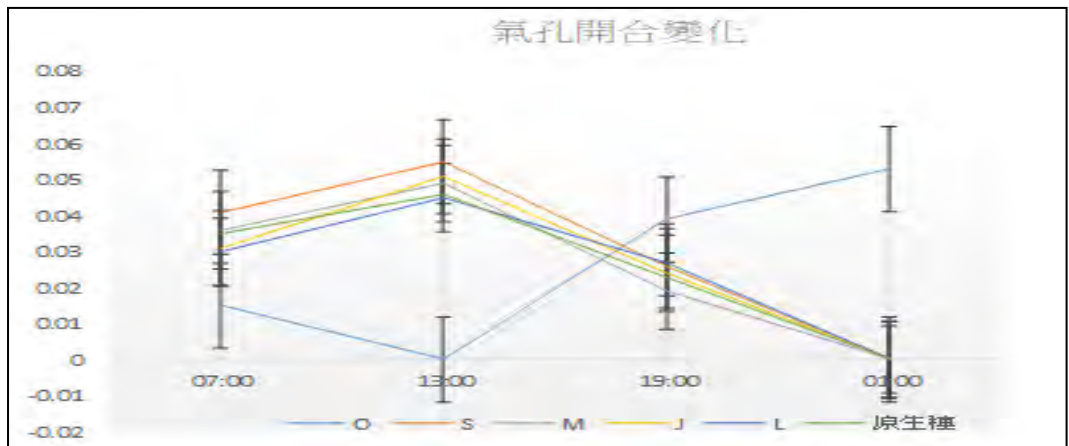


圖 34.各品種氣孔開合變化

表(十)各品種氣孔開合變化

氣孔開合時間	O	S	M	J	L	原生種
07:00	0.015	0.041	0.036	0.031	0.03	0.035
13:00	0	0.055	0.049	0.051	0.045	0.046
19:00	0.039	0.026	0.019	0.024	0.027	0.023
01:00	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000	0

我們在觀察了五種品種非洲堇的氣孔開合之後，發現只有 O 品種的氣孔開合時間比較接近 CAM 型植物，其餘皆為 C3 型，因此針對 O 品種進一步觀察其氣孔開合的情況。

七、O 品種(Eternal Orbit)分析

(1) O 品種不同葉態氣孔開合分析

我們觀察 O 品種的繁殖葉(從原植株拔下一片葉子作葉插)、扦插芽(從葉插的葉片中長出的小芽)、成熟葉(原植株)以及從側芽(從原植株長出的側芽)的氣孔開合時間及開合度做成下表：

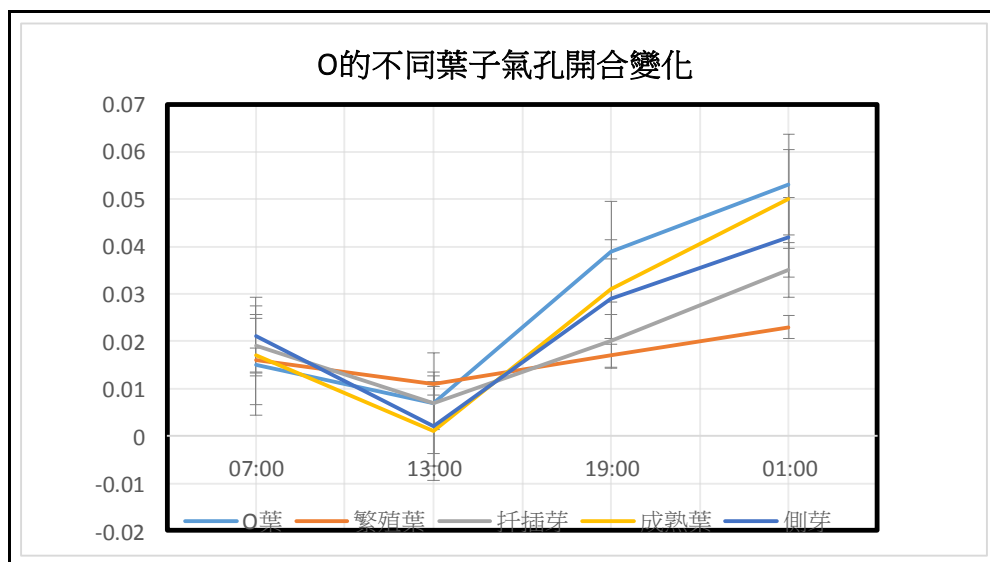


圖 35. O 品種氣孔開合變化

表(十一) O 品種各葉氣孔開合變化

O 不同葉子氣孔變化	O 葉	繁殖葉	扦插芽	成熟葉	側芽
07:00	0.015	0.016	0.019	0.017	0.021
13:00	0.007	0.011	0.007	0.001	0.002
19:00	0.039	0.017	0.02	0.031	0.029
01:00	0.053	0.023	0.035	0.05	0.042

以上為量化氣孔開放程度（氣孔面積/保衛細胞面積）

在這次的實驗中，我們發現側芽、繁殖葉及扦插芽呈現混亂狀態，成熟葉則是 CAM 形式，我們推論可能原因為繁殖葉取下後，若要繼續存活，需在葉柄處長根，而當根長出後，扦插芽的氣孔即可漸漸恢復成 CAM 形態。

(2) O 品系側芽與扦插芽斑葉型態分析

O 品系也分為外觀相似，僅斑色不同的兩個子品種，分別為 *External Orbit*(具有白斑)與 *Rob's outer orbit*(具有粉紅斑)，發現扦插芽白斑皆比側芽明顯，本研究認為葉插的繁殖葉需要長根，因此葉綠體中的類囊體可能會分解，先將養分運用在長根，也就是合成無色體(或稱白色體)，所以葉插後長出的扦插芽白斑會比從原植株長出的的側芽白斑數還多。

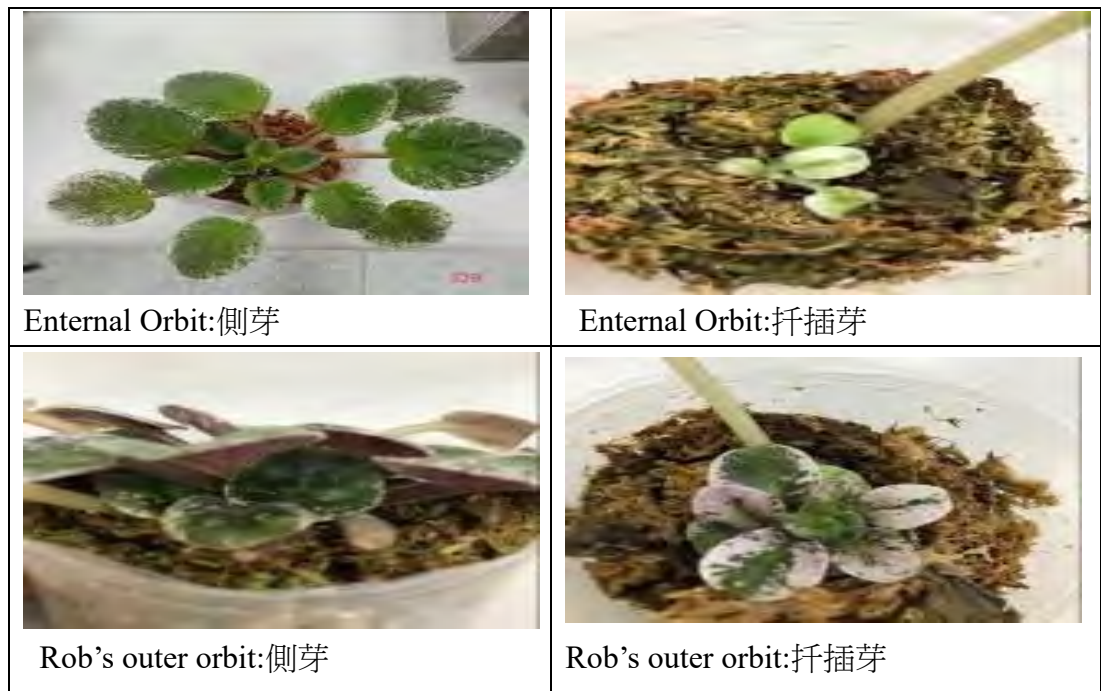


圖 36. *External Orbit* 和 *Rob's outer orbit* 的側芽與扦插芽照

八、葉表面著生毛狀物分析

本研究對照組與實驗組葉表面著生毛皆為單列細胞毛(*uniseriate hairs*)，其特徵由一系列細胞所組成者，其頂端細胞鈍狀。其中 *External Orbit* 品種，單列細胞毛中含有葉綠體，值得深入研究。

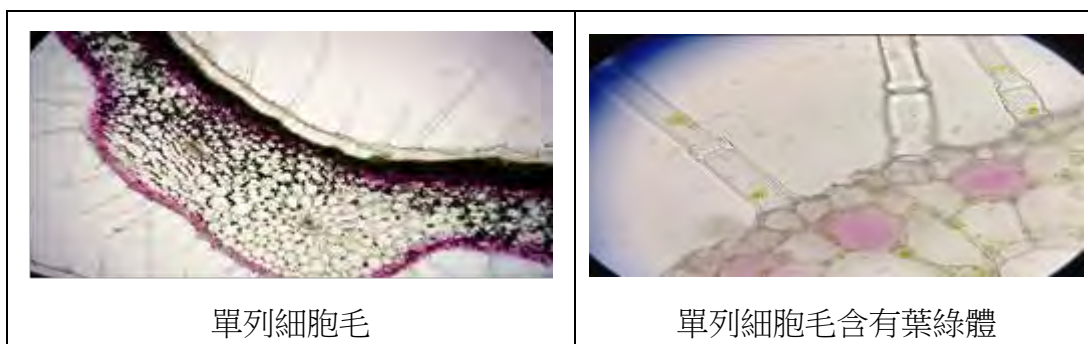


圖 37. Enternal Orbit 品種毛的型態

陸、討論

本研究分成下列幾個部分討論：

一、依原產地氣候型式對原生種型態討論

非洲堇是苦苣苔科，也算是多肉植物，生長於東非坦尚尼亞高原，迎風面低地降雨過後，剩餘高原氣候屬於季節性乾冷，雖有雨季，礙於地形雨後，高原降雨應不多，亦有旱季，符合 C3-CAM 形式的環境，目前棲息地被破壞，野外原生種瀕臨絕跡。



圖 38. 原生種非洲堇的棲息地

二、斑葉的成因討論

非洲堇是由 20 種原生種，(其特徵相似，皆為非斑葉的小藍花)，雜交產生，而雜交出現的變異很大，斑葉的形成初期可能是這個原因，後者有人用秋水仙素與其他化學物質，促使突變，因此斑葉的成因可能不只一種。

三、葉切片組織觀測討論

所有實驗植株皆無明顯花環狀(wreath like)或克蘭茲構造(Kranz anatomy)，中心又沒有大的細胞質構成「中心細胞質區」，(central cytoplasmic compartment, CCC)，因此初步排除 C4 形式。

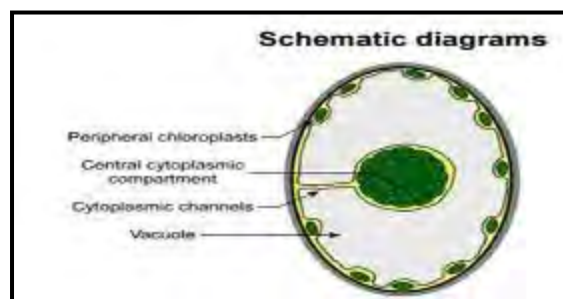


圖 39.特殊 C4 中心細胞質區(CCC)構造

四、 External Orbit 品種討論

從外觀來看，O 品種的葉表面含有花青素會呈現粉紅色，而花青素可抗 UV。本研究推測 O 品種在演化過程中某一時期可能持續遭到強光照射，在較強的日光照射下，水分蒸發量也變大，產生花青素的保護機制，讓葉表面有花青素的植株經過天擇能夠有較好的存活機會，且造成 O 品種後代分成兩種顏色的斑葉，後人再將它命名為 External Orbit 和 Rob's outer orbit。其側芽、繁殖葉及扦插芽氣孔開閉時間呈現混亂狀態的原因，應是植物葉未成熟或受到環境刺激。

五、非洲董著生毛狀物用途討論

原生種的東非高原，風力較大，葉毛會阻礙植物表面的空氣流動，減少蒸散。密集的塗層反射陽光，在高日照、乾燥且空曠的棲息地，葉毛可保護植株更細膩的組織。而 External Orbit 品種毛中的葉綠體可以幫助提供一些代謝物生產所需的碳和能量需求。

六、角質層分泌的腺體汁液作用討論

非洲董的角質層具有腺體分泌汁液，本研究推測此汁液滋潤葉片後，形成保護膜，抵禦乾旱的環境，減少蒸散作用，並且能夠抵禦外來的病菌，與毛共形成二層保護，以適應外在的惡劣環境。

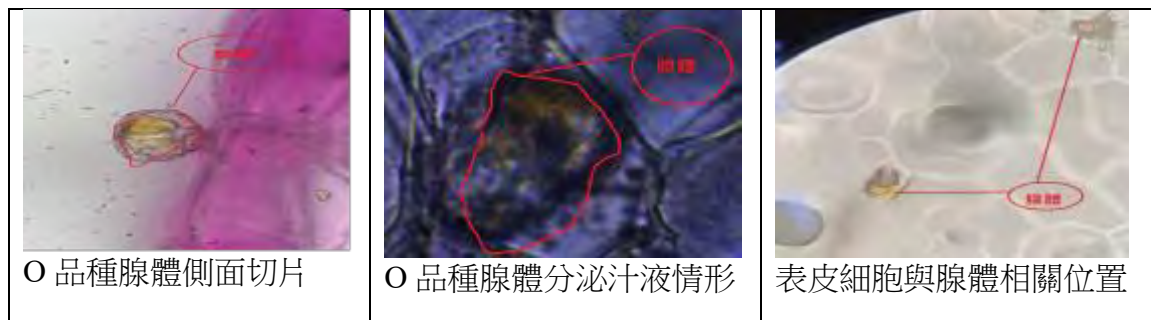


圖 40. 腺體相關位置圖

七、 External Orbit 品種光合作用型態從 C3 轉變為 CAM 型討論

本研究發現 External Orbit 品種的繁殖葉與扦插芽為 C3 型態，而側芽之後到成株逐漸轉換成 CAM 型態，其實影響 CAM 作用的因子除了光、水分、溫度和二氧化碳外，尚有「鹽度」（滲透壓）和「營養成份」（氮、磷、鉀、鈉、鎂、鈣等等）也會影響或誘導植物 CAM 作用的進行，因此正確成因還須深入探討。

柒、結論

綜合以上實驗結果與討論項目，本研究歸納出幾項結論如下所示：

- 一、由葉片表面切片組織與埋膠切片實驗結果，可得知非洲堇的白色斑葉部分，大都是沒有葉綠素造成，這屬於化學性色素體變異形成的斑葉。
- 二、SM-Shikarniy 品種在白、紅、藍波段照射下，差異顯著，藍光下葉色最深，且 Ca,b 葉綠素濃度最高，紅光則最淺色，相對葉綠素也最低，白光則會造成斑葉消失。JAN-Sultan 品種則在紅光下老葉偏黃，新葉則由綠葉建轉黑，藍光下為深綠，白光一樣造成斑葉消失。
- 三、實驗結果顯示大部分非洲堇為 C3 型植物，External Orbit 則為 CAM 成長型植物，其繁殖葉、側芽及扦插芽，氣孔開合狀況呈現混亂的 C3-CAM 過度型。
- 四、溫度會影響葉綠素生成量，21°C 時葉綠素含量最高，16°C 時葉綠素則含量最低，此時生成較多白斑，因此偏低溫時，白斑所占葉片面積最大。

五、 莖葉角質層的絨毛屬於單列細胞毛(uniseriate hairs)，其內具有葉綠體，值得深入探討其功用。

捌、未來展望

透過環境控制改變非洲莖光合作用型態，培養出較耐熱與耐旱的品種，並研究不同斑葉的型式，搭配雜交育種，培育出園藝界最具觀賞性的優良品系，提升台灣園藝水平，創造農業經濟。

玖、參考資料及其他

1. 陳運萱(2015)。柏拉木幼苗斑葉機制與生態生理意涵之探討，國立中興大學生命科系碩士論文。
2. 陳明男(2016)。低光環境下培育的四種羅漢松屬苗木之光合作用反應，國立中興大學森林學研究所博士論文。
3. 包尚弘(2012)。秋海棠科植物葉片結構、斑葉機制與特殊葉綠體的探討，國立嘉義大學生命科學院生物資源學系暨研究所碩士論文。
4. Lüttge U. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany* 2004; 93:629~652.
5. Dodd AN, Borland AM, Haslam RP, et al. Crassulacean Acid Metabolism: plastic, fantastic. *J of Expert Botany* 2002; 53(369):569-580.
6. Cushman JC. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic pPhotosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant pPhysiology* 2001; 127:1439-1448.
7. 國立中興大學-生物系統工程研究室. 蘭花量產與生理：光合作用. http://bse.nchu.edu.tw/new_page_90.htm
8. 蔡孟穎(2014)。「光」現 (photo) 合成 (synthesis) —植物與光之間的愛恨糾結，臺灣博物季刊 122 33卷·第2期
9. 陳加忠(2016)。國立中興大學-生物系統工程研究室—植物光合作用速率量測

【評語】 052103

1. 本研究主要目的在探討非洲堇葉之型態構造與生理功能之關係。結果發現斑葉品系的非洲堇其葉綠素形成會受溫度影響，在 16°C 出斑面積最大。此外亦發現斑葉為化學型色素體變異，局部品種有較厚的儲水細胞，能耐較乾旱的環境。
2. 以解剖觀察細部構造，方法及解果明確。
3. 本研究的實驗方式偏向單純性之型態觀察，可加強重要性之結論說明。

董兒藏奧秘，一葉知千秋

摘要

非洲董兒光合作用型態以C3為主，本研究植株Eternal Orbit品種，表皮細胞與葉肉組織間有一層花青素，其光合作用型態有別於其他品種而呈現CAM。斑葉品系的葉綠素形成易受溫度影響，平均21°C為非洲董兒最佳溫度，16°C出斑面積最大；董兒毛屬於單列細胞毛(uniseriate hairs)，毛內具葉綠體構造。上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。葉面組織切片顯示斑葉(variegate)為化學色素體變異，局部品種有較厚的儲水細胞(Water storage cell)，能耐較乾旱的環境。

壹、研究動機

在花市中，發現一種葉面絨毛，葉形多樣，且某些品系具有斑葉(variegate)，外加花色變幻無窮的植物，老闆稱其為非洲董兒(African Violet)，身為植物愛好者的本人，買了數盆回去，過了一個冬天直到春天為止，植株都活得很強健，沒料到夏天葉面竟然退斑，且開始衰弱甚至死亡，驚慌之餘帶到學校請求老師援助，老師敘述非洲董兒是生長在東非高原上的植物，後來的多樣性，由原生種雜交突變形成，至於董兒的型態變化，目前尚無人研究，問我要不要找同學一起研究，於是本人招募兩位好友，以老師為顧問，開始董兒科展之路。

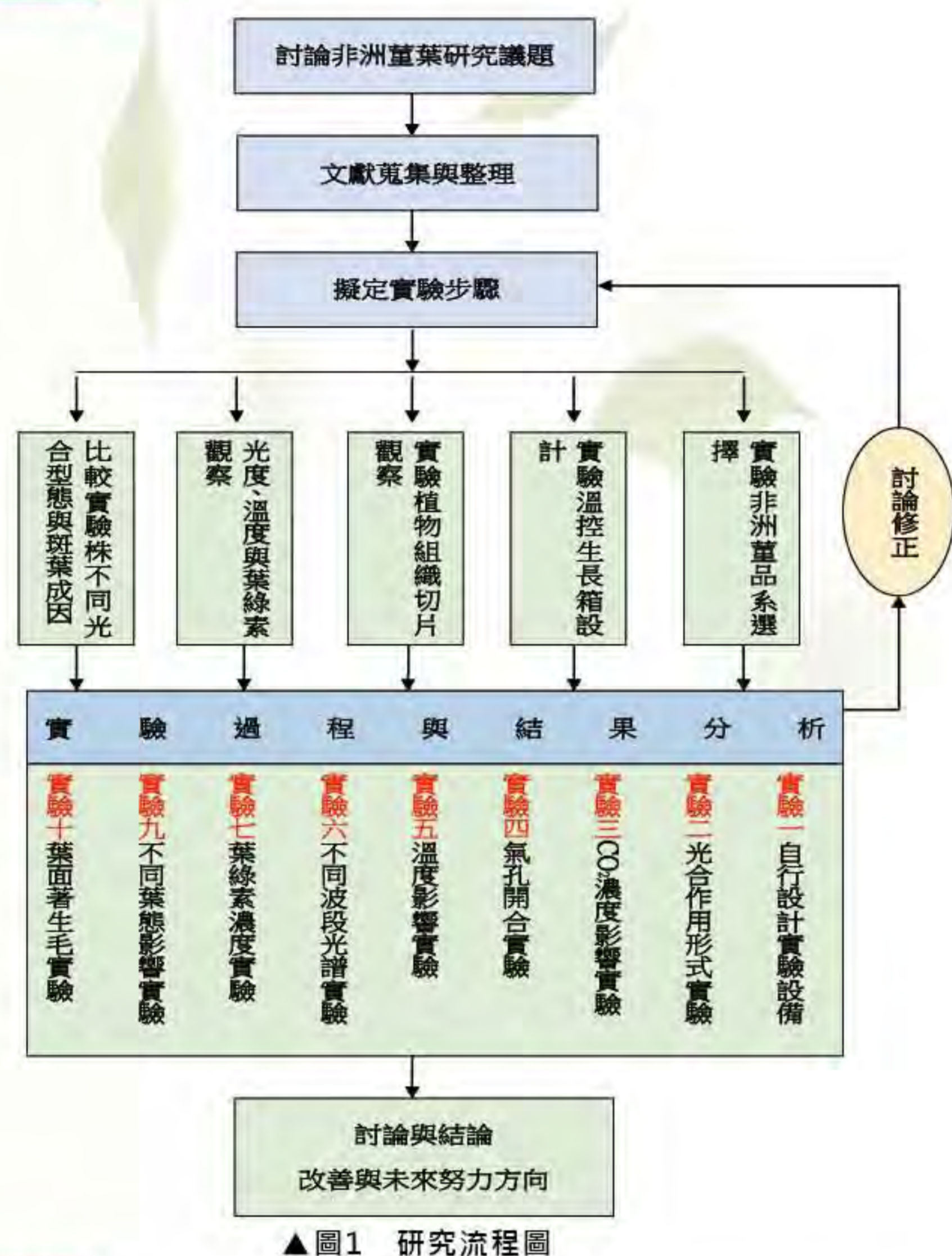
貳、研究目的

- 本研究針對董兒實驗目的分為下列幾點：
- 一、非洲董兒5種斑葉品種分析
 - 二、不同環境因子光合作用型態差異
 - 三、CO₂濃度與氣孔開合分析
 - 四、葉綠體在各實驗品系間的差異
 - 五、非洲董兒葉著生毛狀物分析
 - 六、非洲董兒斑葉分布、成斑與退斑的機制分析，找出耐熱與耐旱品種。

參、研究設備及器材(請參照書面資料)

肆、研究過程與方法

一、研究流程



▲圖1 研究流程圖

二、文獻蒐集

植物葉的研究文獻並不多，國內外對非洲董兒的研究，目前還沒有出現任何一篇文章，基於研究方向相關文獻期刊，本團隊彙整以下數篇資料：
 陳運萱(2015)：植物自然斑葉 (foliar variegation) 形成的主要原因有兩大類，一與色素相關 (化學色)；另一則和葉片結構有關 (物理色)。柏拉木與 *S. heterostemon* 斑葉白斑形成的原因，至少結合了表皮型、細胞間隙型與部分葉綠素缺乏型三種機制。
 陳明勇(2016)：10°C以下之冷激溫度將造成嚴重之光抑制，對其光合構造影響大。斑光可有效地誘導樹種之光合作用，但低溫 (10°C) 時之光合能力稍低，雖增加去環氧化態色素之比例 (DEPS)，但仍需較長的時間發展 NPQ，以達到光保護之目的。氣孔導度非樹種光合速率之限制因子。
 包尚弘(2012)：秋海棠科植物之葉片結構於同組內並沒有一致性的特徵，而是和生長環境較有關係。例如生長在強光及乾燥地區的種類，其葉片表皮細胞多為平坦狀，並有發達的儲水細胞。其葉片上層的葉肉組織呈漏斗狀，葉綠體內具發達的葉綠體，此為陰性植物的特徵。具斑葉的秋海棠是結構型的斑葉機制 (structural variegation)，是在斑紋區域內位在漏斗狀葉肉組織上層之細胞間隙反射光線所造成。



▲圖2.秋海棠三種類型的葉片結構

本研究以一組原生種為對照組(因原生種數量有限僅參與部分實驗)，實驗組則選秋季-春季斑葉明顯，夏季會退斑的5種品種實驗，以下為實驗與對照組的說明：

▼表(二)實驗植株種類描述

圖片	名稱	特徵	備註
	S. confusa	原生種標準型植株，圓葉非斑葉，小藍花由德國聖保羅男爵 1892 年帶回德國栽種的另一原生品系。	對照組
	Lazurnyi Bereg	俄系標準型植株，斑葉型的 Blue Mist(藍色重瓣沾染花)，2017 年引進的新花。	實驗組
	Eternal Orbit	半迷你型，圓葉繡花經典品種，冬季斑葉呈現粉紅斑，植株耐受度佳。	實驗組
	Ma's Arctic Sky	半重瓣白花滾藍色折邊型花。中綠色和白色組合成的波浪型鋸齒葉緣斑葉，葉脈向上氣狀突起。標準型。	實驗組
	JAN-Sultan	大型俄羅斯斑葉(圓葉)品種，藍色大沾染花易爆花的好花，2016 年引進。	實驗組
	SM-Shikarniy	俄系標準型植株，超大朵斑葉橘重瓣花，不易退斑，2017 年引進的新花。	實驗組

資料來源：本研究拍攝

三、實驗過程

本研究分析非洲董兒原生種的生存環境，高原氣候外加季節乾溼分明，其強烈的對比環境，是否影響光合作用型態，其斑葉的成因與葉面絨毛作用皆為探討與研究的目標；以下為本研究的實驗步驟：

(一)自行設計實驗設備

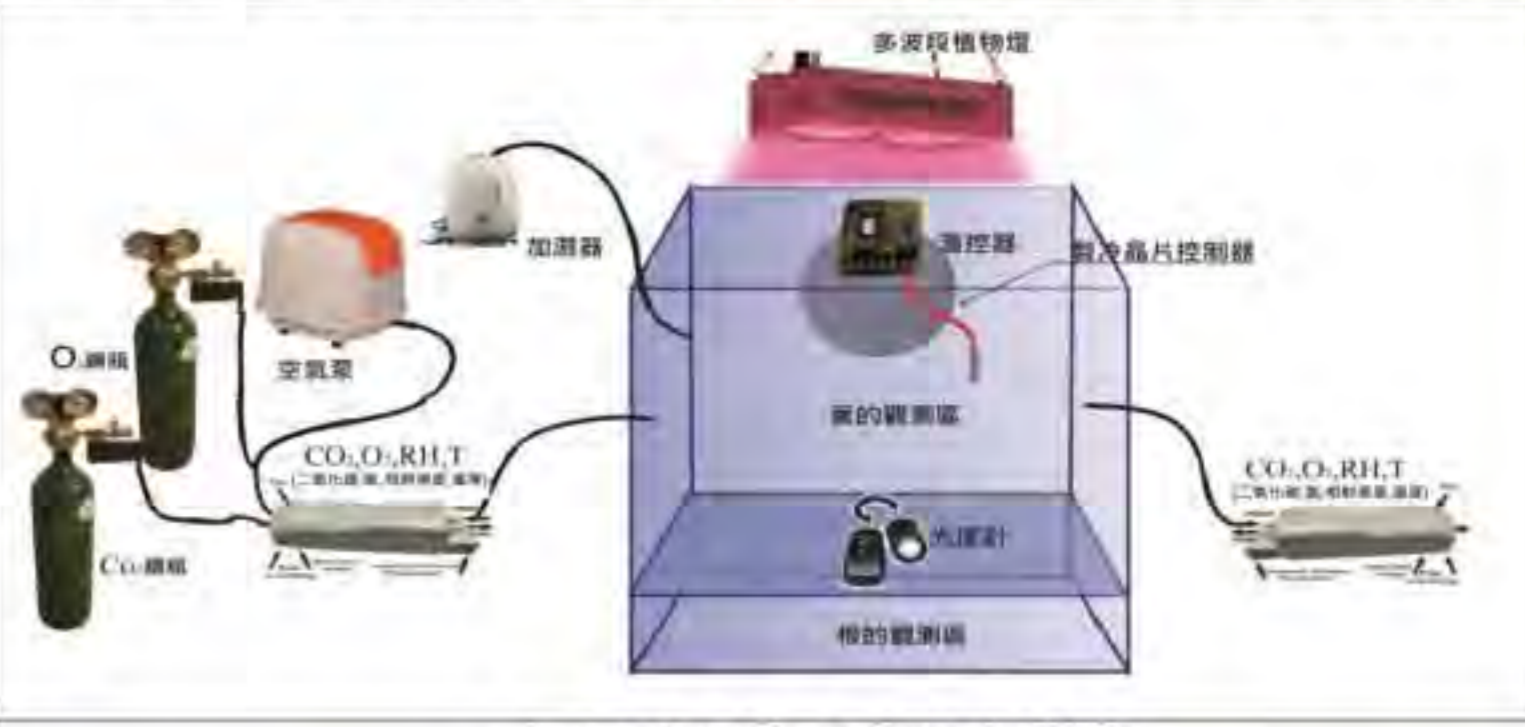
本研究先將實驗植株養殖在生長箱內，為符合實驗方式，本團隊自行設計實驗所需設備，參考中興大學生物系統工程研究室光合作用速率量測系統，加入之後所需實驗項目，本研究開發可控制溫度、光度、CO₂濃度、O₂濃度、濕度等植物實驗箱，以下為本研究設計圖與理念說明：為了進行植物光合作用速率研究，以臺灣光電工業提供之感測元件，製作光合作用速率量測同化箱一套系統，其示意圖如圖1。應用原理為如下公式：

$$A_1 = \frac{u(C_e - C_i)}{\text{area}}$$

$$A_2 = \frac{u(C_e - C_i)}{\text{area}} \times \frac{(1 - W_i)}{(1 - W_e)}$$

$$R_1 = \frac{u(O_2 - O_e)}{\text{area}}$$

$$u = M \times Gmol$$



▲圖5 自製光合效率實驗箱

在此A1與A2為二氧化碳釋放率，R1為氧氣吸收率。u為空氣流量，C_e與C_i為送出與進入同化箱之空氣內二氧化碳濃度，O_e與O_i為送出與進入同化箱內之空氣氧氣之濃度，W_i與W_e為送出與進入同化箱之空氣絕對濕度，area為樣本葉面積，M，為空氣流量，Gmol為空器內氧氣或二氧化碳莫耳數。



▲圖6 光合實驗箱製作過程

(二)光合作用型態實驗

本研究整理光合作用型態，以下為各類光合作用型態比較表：

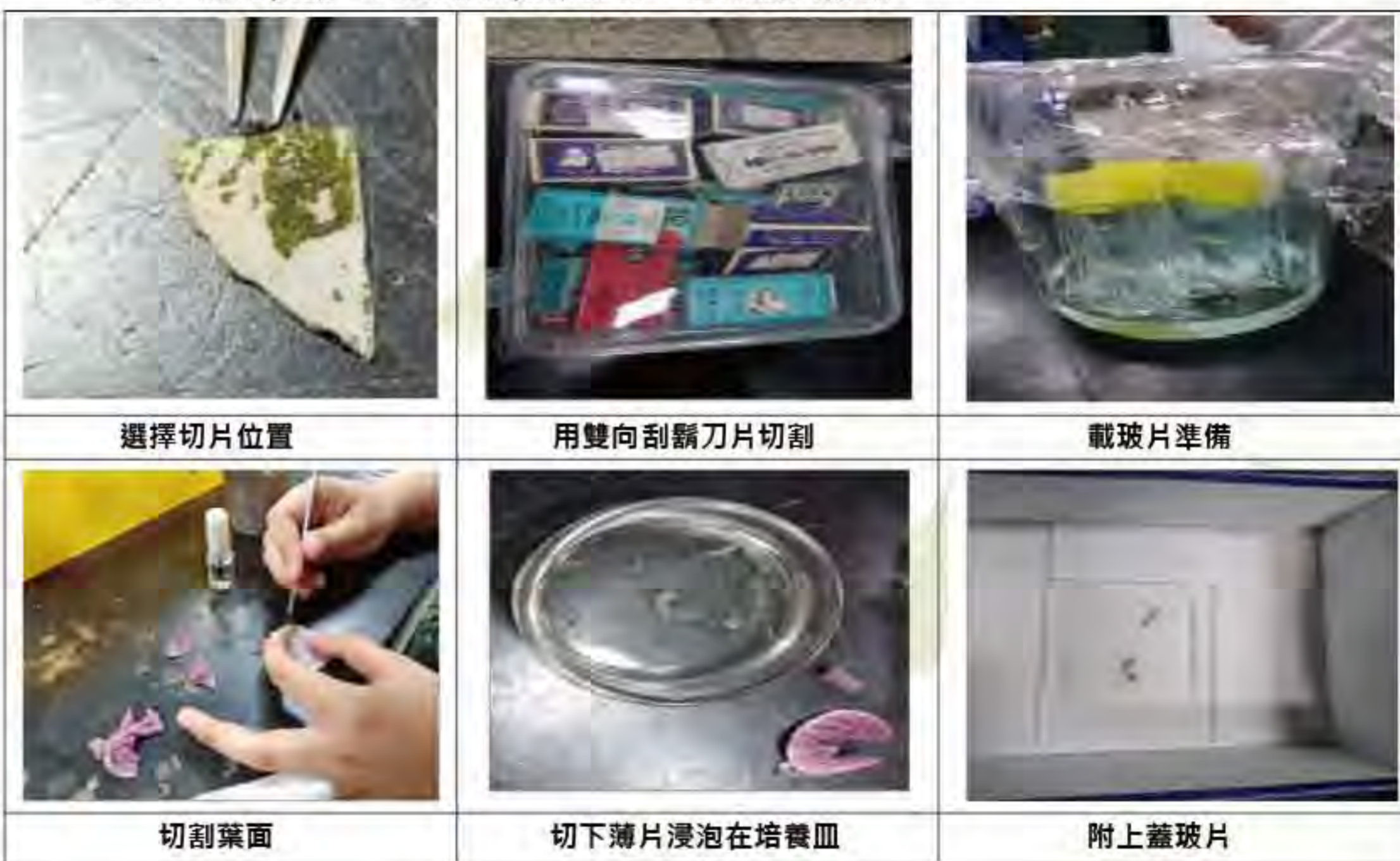
表(二) C3-C4-CAM比較

C3 葉組織與光合形態	C4 葉組織與光合形態	CAM 葉組織與光合形態
<p>CO₂ 或 O₂</p> <p>卡氏循環</p> <p>葉肉細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p>	<p>CO₂</p> <p>葉肉細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p>	<p>CO₂</p> <p>卡氏循環</p> <p>葉肉細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p> <p>葉脈鞘細胞</p>
<p>Rubisco 與 CO₂ 結合，產生 PGA 在 CO₂ 濃度下降時，Rubisco 易與 O₂ 產生光呼吸作用</p>	<p>PEP 羧化酶與 CO₂ 結合，產生 OAA→MA (4C)，再進入維管束鞘細胞與 Rubisco 產生 PGA</p>	<p>晚上開起氣孔，PEP 與 CO₂ 結合成 OAA→MA 存於液泡，白天閉氣孔與 Rubisco 產生 PGA</p>

本研究依葉組織細胞型態、CO₂濃度的日規律變化、氣孔開合時間與pH性質，來分辨光合作用型態，以下為實驗過程：

(1)葉組織細胞型態

組織觀察過程為清洗刀具、鑷子，將玻片擦乾拭淨，選擇新鮮葉片切下並且記錄切片部位，打開光學顯微鏡，開啟電源，培養皿洗淨，裝取適量的水放置一旁。切片部分，以刮鬚刀片較薄且利，適合用來進行切片動作，先切出欲觀察部分，再將之細切成片狀以利觀察，切片時握著已經過裁切的葉片一端，一手拿著刀片快速多次削過，削切幾次後，將削下的薄片部分放入裝水的培養皿中，鑷子在水中撥弄仔細觀察切下的薄片組織，擇一最完整最薄且可透光的取出將適好的薄片放上玻片，與載玻片呈四十五度角蓋上蓋玻片，再用顯微鏡觀察，先使用最低倍數(4X)的物鏡進行觀察，調整好適宜的焦距後，開始觀察，並依所需觀察部分，逐漸加大倍數。



▲圖7 葉組織切片過程

(2)氣孔開合時間

本研究使用指甲油印法(楊芳等, 2010)，其方法於葉背的邊緣塗一層指甲油，待指甲油乾後，黏上透明膠帶並撕下，直接黏於玻片上即可，然後再進行顯微鏡觀察。步驟如下：



▲圖8 指甲油氣孔觀測



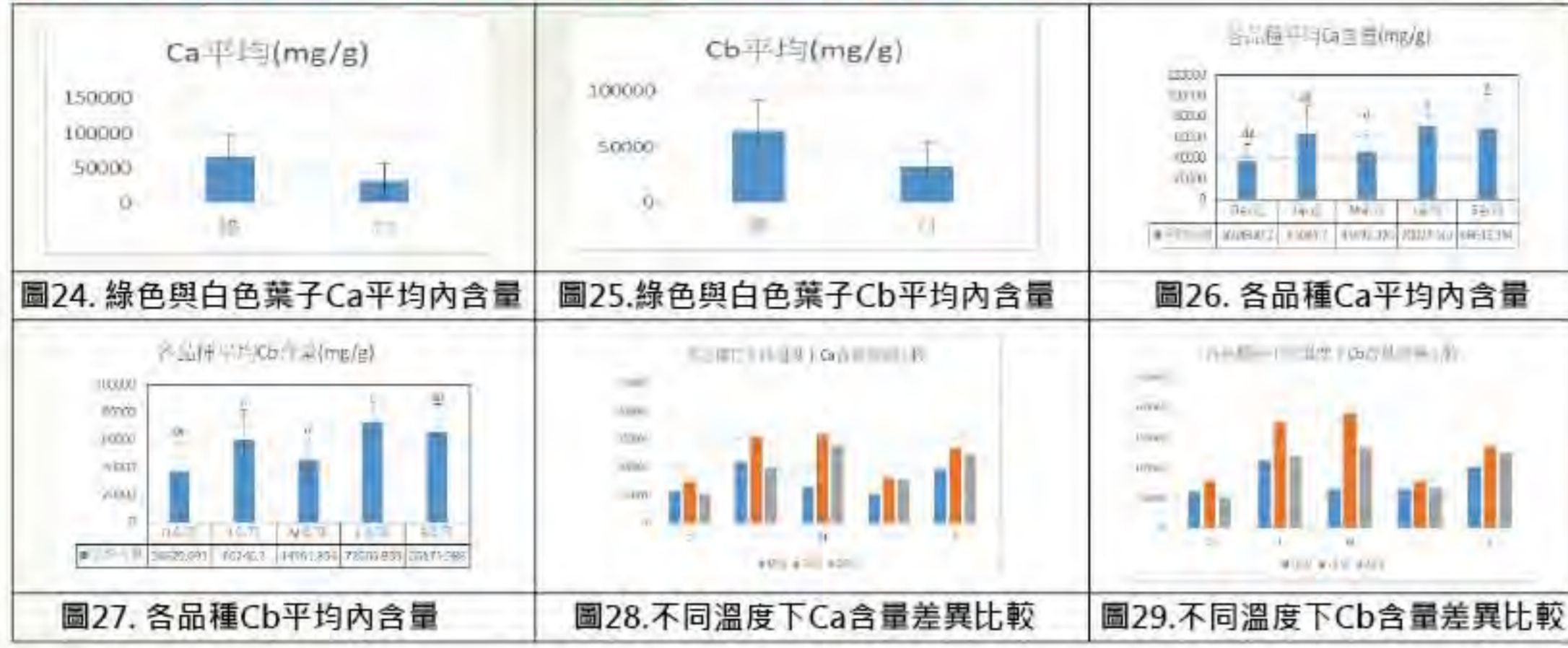
▲圖9 實驗植株葉背氣孔觀測

由此圖表更可看出，以紅光照射後的植株所含的葉綠素較少，以藍光照射則明顯含有較多葉綠素。



▲圖22 全部實驗植株總圖 ▲圖23 全部新葉樣本

(2) 不同溫度下葉片綠色部分與白斑的葉綠素含量變化



根據上表，各品種在16度環境下，白斑較易生長，葉綠素含量較少，光合作用效率可能較差；21度適合植株生長，葉綠素含量最高，光合作用效率最佳；26度不利於植株生長，故葉綠素含量下降。

p值	Ca	Cb
O系列	0.034983	0.0256487
J系列	0.21497	0.513562
M系列	0.047532	0.036231
L系列	0.135314	基準
S系列	基準	0.164863

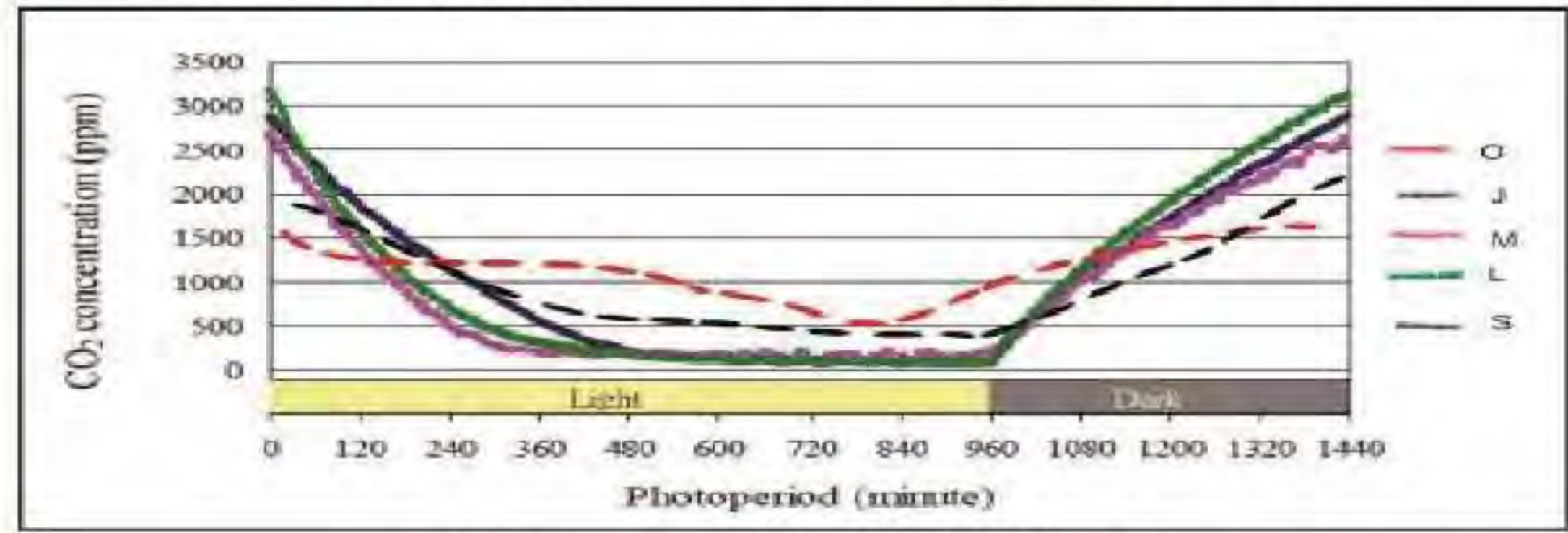
五、CO₂濃度實驗結果

(1) 增加CO₂濃度量

本研究有鑑於科學教育月刊第357期，題目「誘發特定C₃及CAM植物氣孔開閉因素的探討」已有詳盡論述增加CO₂濃度變化造成的影響，因此本研究則暫停此研究項目，朝向第二點植株CO₂日韻律的研究。

(2) CO₂日韻律變化

本研究運用縮時攝影紀錄實驗過程，五種實驗植株內CO₂濃度日韻律如下圖所示：



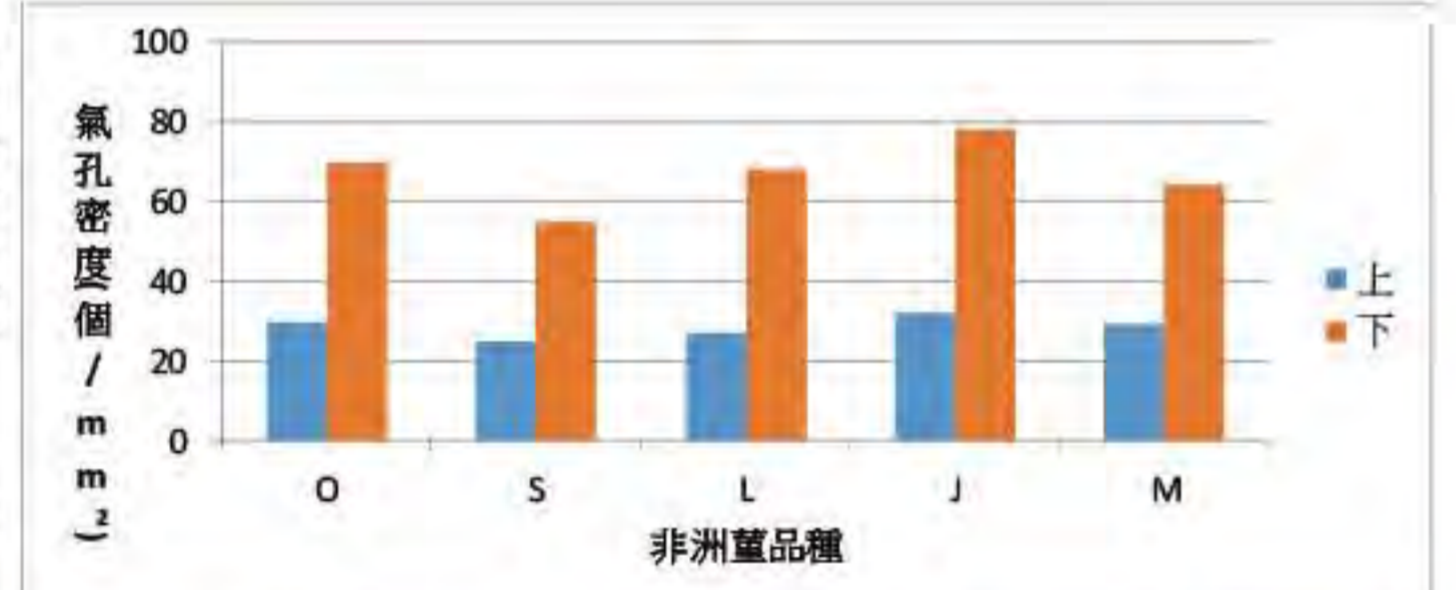
▲圖30 五種實驗植株內CO₂濃度日韻律圖

由CO₂日韻律變化得知，只有O品種差異較大，其他品種則呈現C₃型態，O品種應為CAM型態。

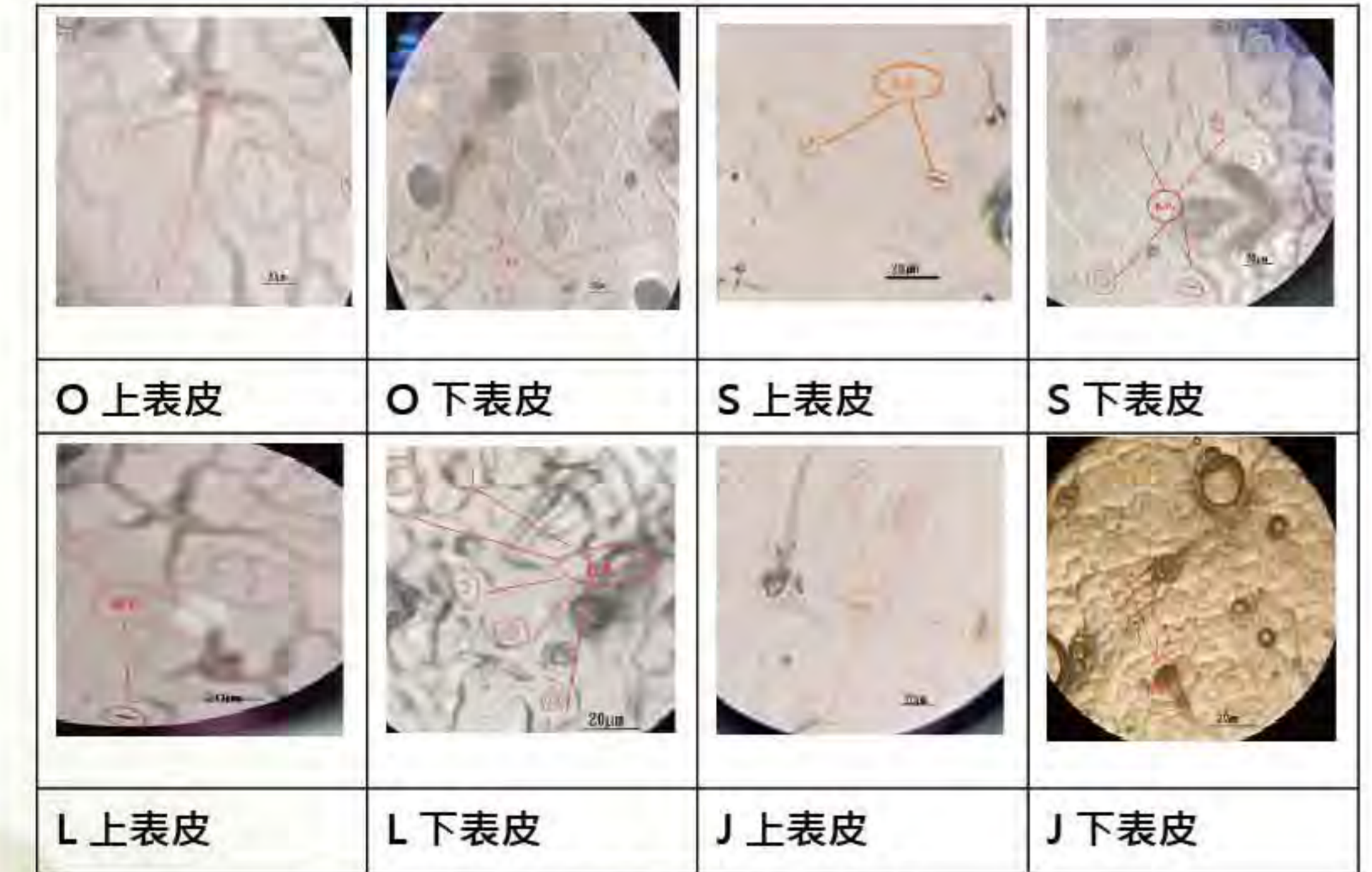
六、氣孔實驗結果

(1) 上下表皮氣孔數分析

本實驗使用了五個品種，分別為O、S、M、L、J，觀察其上下表皮的氣孔數，可觀察到非洲蕮的下表皮氣孔數是比較多的，而上表皮的氣孔數較少。



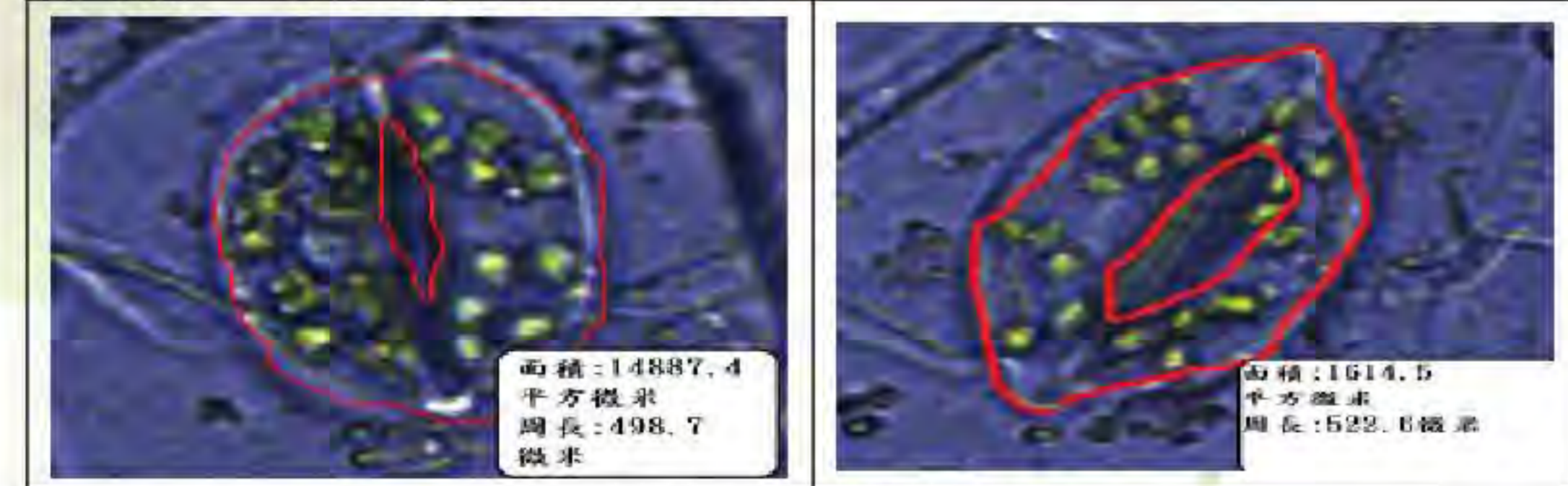
▲圖31 各品種上下表皮切片氣孔密度分析



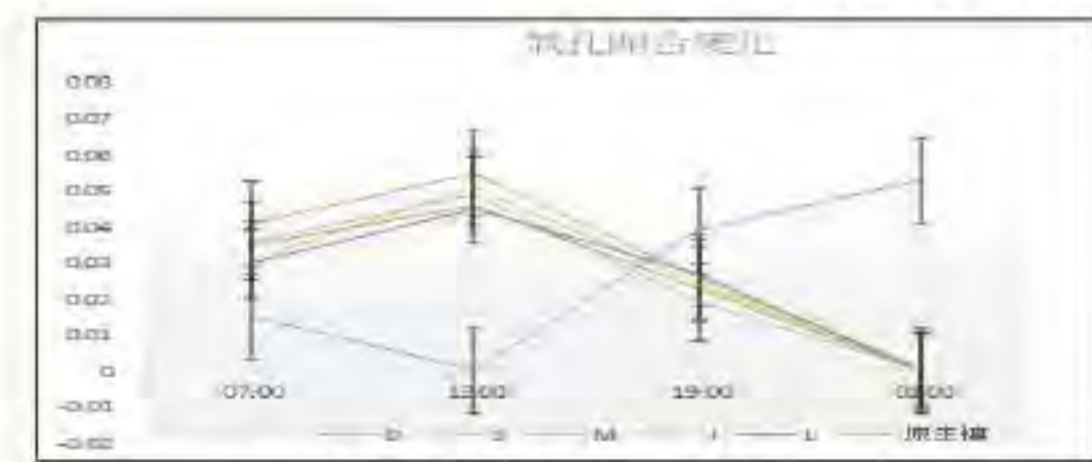
▲圖32 各品種上下表皮變化

(2) 氣孔開合變化

本研究氣孔開合程度以image j軟體計算O品種保衛細胞的面積及周長，並一天每隔6小時記錄一天氣孔開合的變化，如下所示：



▲圖33 氣孔開合計算方式



▲圖34 各品種氣孔開合變化

我們在觀察了五種品種非洲蕮的氣孔開合之後，發現只有O品種的氣孔開合時間比較接近CAM型植物，其餘皆為C₃型，因此針對O品種進一步觀察其氣孔開合的情況。

七、O品種(Eternal Orbit)分析

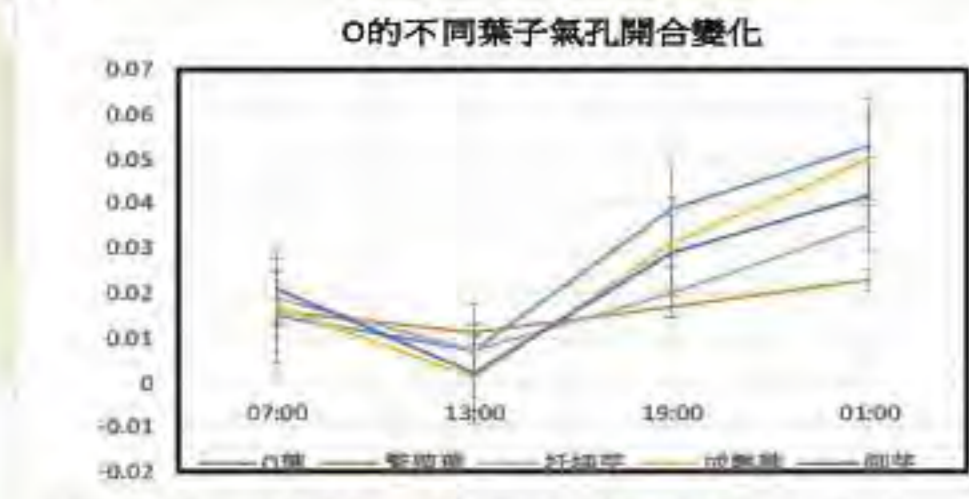
(1) O品種不同葉態氣孔開合分析

我們觀察O品種的繁殖葉(從原植株拔下一片葉子作葉插)、扦插芽(從葉插的葉片中長出的小芽)、成熟葉(原植株)以及從側芽(從原植株長出的側芽)的氣孔開合時間及開合度做成下表：

O不同葉子氣孔變化	O葉	繁殖葉	扦插芽	成熟葉	側芽
07:00	0.015	0.016	0.019	0.017	0.021
13:00	0.007	0.011	0.007	0.001	0.002
19:00	0.039	0.017	0.02	0.031	0.029
01:00	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000

以上為單位氣孔開放程度(氣孔面積/保衛細胞面積)

在這次的實驗中，我們發現側芽、繁殖葉及扦插芽呈現混亂狀態，成熟葉則是CAM形式，我們推測可能原因為繁殖葉取下後，若要繼續存活，需在葉柄處長根，而當根長出後，扦插芽的氣孔即可漸漸恢復成CAM形態。



▲圖35 O品種氣孔開合變化

(2) O品系側芽與扦插芽斑葉型態分析

O品系也分為外觀相似，僅斑色不同的兩個子品種，分別為External Orbit(具有白斑)與Rob's outer orbit(具有粉紅斑)，發現扦插芽白斑皆比側芽明顯，本研究認為葉插的繁殖葉需要長根，因此葉綠體中的類囊體可能會分解，先將養分運用在長根，也就是合成無色體(或稱白色體)，所以葉插後長出的扦插芽白斑會比從原植株長出的的側芽白斑數還多。



▲圖36 External Orbit和Rob's outer orbit的側芽與扦插芽照

八、葉表面著生毛狀物分析

本研究對照組與實驗組葉表面著生毛皆為單列細胞毛(uniseriate hairs)，其特徵由一列細胞所組成者，其頂端細胞鈍狀。其中External Orbit品種，單列細胞毛中含有葉綠體，值得深入研究。



▲圖37 External Orbit品種毛的型態

陸、討論

本研究分成下列幾個部分討論：

一、依原產地氣候型式對原生種型態討論

非洲蕮是苦苣苔科，也算是多肉植物，生長於東非坦尚尼亞高原，迎風面低地降雨過後，剩餘高原氣候屬於季節性乾冷，雖有雨季，礙於地形雨後，高原降雨應不多，亦有旱季，符合C₃-CAM形式的環境，目前棲息地被破壞，野外原生種瀕臨絕跡。



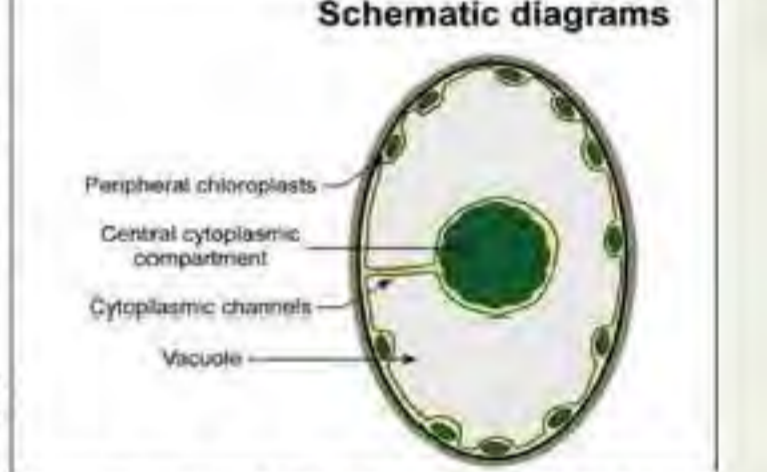
▲圖35 原生種非洲蕮的棲息地

二、斑葉的成因討論

非洲蕮是由20種原生種，(其特徵相似，皆為非斑葉的小藍花)，雜交產生，而雜交出現的變異很大，斑葉的形成初期可能是這個原因，後者有人用秋水仙素與其他化學物質，促使突變，因此斑葉的成因可能不只一種。

三、葉切片組織觀測討論

所有實驗植株皆無明顯花環狀(wreath like)或克蘭茲構造(Kranz anatomy)，中心又沒有大的細胞質構成「中心細胞質區」，(central cytoplasmic compartment, CCC)，因此初步排除C₄形式。



▲圖39 特殊C₄中心細胞質區(CCC)構造

四、External Orbit品種討論

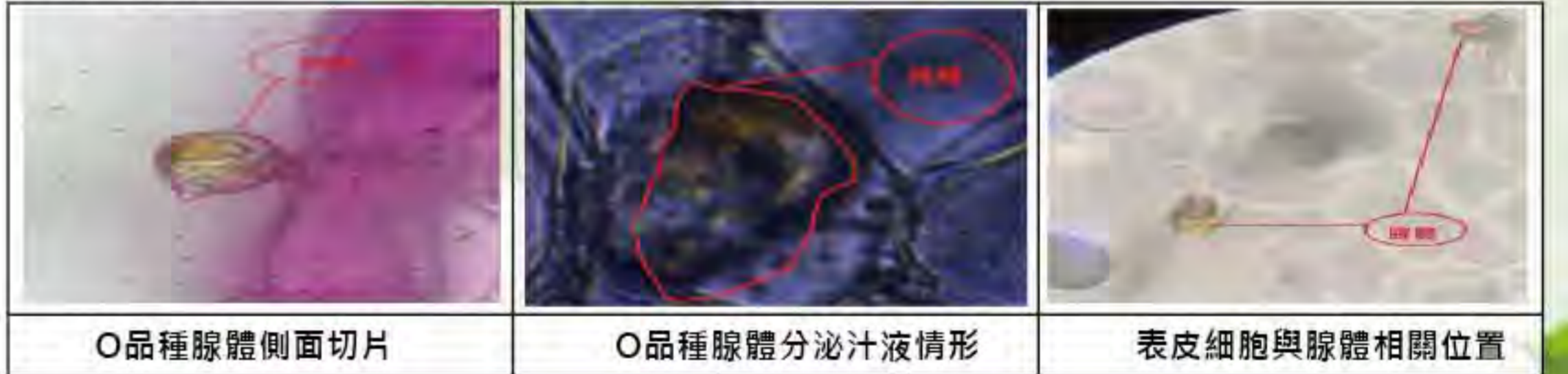
從外觀來看，O品種的葉表面含有花青素會呈現粉紅色，而花青素可抗UV。本研究推測O品種在演化過程中某一時期可能持續遭到強光照射，在較強的光照下，水分蒸發量也變大，產生花青素的保護機制，讓葉表面有花青素的植株經過選擇能夠有較好的存活機會，且造成O品種後代分成兩種顏色的斑葉，後人再將它命名為External Orbit和Rob's outer orbit。其側芽、繁殖葉及扦插芽氣孔開閉時間呈現混亂狀態的原因，應是植物葉未成熟或受到環境刺激。

五、非洲蕮著生毛狀物用途討論

原生種的東非高原，風力較大，葉毛會阻礙植物表面的空氣流動，減少蒸散。密集的塗層反射陽光，在高日照、乾燥且空曠的棲息地，葉毛可保護植株更細膩的組織。而External Orbit品種毛中的葉綠體可以幫助提供一些代謝物生產所需的碳和能量需求。

六、角質層分泌的腺體汁液作用討論

非洲蕮的角質層具有腺體分泌汁液，本研究推測此汁液滋潤葉片後，形成保護膜，抵禦乾旱的環境，減少蒸散作用，並且能夠抵禦外來的病菌，與毛共形成二層保護，以適應外在的惡劣環境。



▲圖40 腺體相關位置圖

七、External Orbit品種光合作用型態從C₃轉變為CAM型討論

本研究發現External Orbit品種的繁殖葉與扦插芽為C₃型態，而側芽之後到成株逐漸轉換成CAM型態，其實影響CAM作用的因子除了光、水分、溫度和二氧化碳外，尚有「鹽度」(滲透壓)和「營養成份」(氮、磷、鉀、鈉、鎂、鈣等等)也會影響或誘導植物CAM作用的進行，因此正確成因還須深入探討。

柒、結論

- 綜合以上實驗結果與討論項目，本研究歸納出幾項結論如下所示：
- 一、由葉片表面切片組織與埋膠切片實驗結果，可得知非洲蕮的白斑葉部分，大都是沒有葉綠素造成，這屬於化學性色素體變異形成的斑葉。
- 二、SM-Shikarniy品種在白、紅、藍波段照射下，差異顯著，藍光下葉色最深，且Ca、b葉綠素濃度最高，紅光則最淺色，相對葉綠素也最低，白光則會造成斑葉消失。JAN-Sultan品種則在紅光下老葉偏黃，新葉則由綠葉建轉黑，藍光下為深綠，白光一樣造成斑葉消失。
- 三、實驗結果顯示大部分非洲蕮為C₃型植物，External Orbit則為CAM成長型植物，其繁殖葉、側芽及扦插芽，氣孔開合狀況呈現混亂的C₃-CAM過度型。
- 四、溫度會影響葉綠素生成量，21°C時葉綠素含量最高，16°C時葉綠素則含量最低，此時生成較多白斑，因此偏低溫時，白斑所占葉片面積最大。
- 五、葉角質層的絨毛屬於單列細胞毛(uniseriate hairs)，其內具有葉綠體，值得深入探討其功用。

捌、未來展望

透過環境控制改變非洲蕮光合作用型態，培養出較耐熱與耐旱的品種，並研究不同斑葉的型式，搭配雜交育種，培育出園藝界最具觀賞性的優良品系，提升台灣園藝水平，創造農業經濟。

玖、參考資料及其他

- 陳運萱(2015)。柏拉木幼苗斑葉機制與生理生態涵義之探討，國立中興大學生命科系碩士論文。
- 陳明男(2016)。低光環境下培育的四種羅漢松屬苗木之光合作用反應，國立中興大學森林學研究所博士論文。
- 包尚弘(2012)。秋海棠科植物葉片結構、斑葉機制與特殊葉綠體的探討，國立嘉義大學生命科學院生物資源學系暨研究所碩士論文。
- Lüttge U. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Annals of Botany 2004; 93:629~652.
- Dodd AN, Borland AM, Haslam RP, et al. Crassulacean Acid Metabolism: plastic, fantastic. J of Expert Botany 2002; 53(369):569-580.
- Cushman JC. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic pPhotosynthetic Adaptation to Arid Environments. Plant Physiology 2001; 127:1439-1448.
- 國立中興大學-生物系統工程研究室 蘭花量產與生理：光合作用。http://bse.nchu.edu.tw/new_page_90.htm
- 蔡孟穎(2014)。「光」現(photo)合成(synthesis)——植物與光之間的愛恨糾結，臺灣博物季刊 122 33卷，第2期
- 陳加忠(2016)。國立中興大學-生物系統工程研究室-植物光合作用速率量測



▲圖10 實驗植株葉面氣孔觀察

1. 照光度影響氣孔開合測試

本研究模擬白天與黑夜狀況，測試光度氣孔開合情形；以白光模擬日光，參考非洲菫日照時間設定12小時作日夜切换，並以7:00、13:00、19:00與凌晨1:00作觀察。



▲圖11 實驗植株於生長箱模擬日光情形

2. 增加CO2濃度影響氣孔開合測試

主要設定CO2高濃度、低濃度變化於全日照、半日照與完全黑夜下，觀察氣孔開合情形。



▲圖12 CO2濃度測定設備

(3) CO2濃度的日韻律變化

計算光下的CO2量，本研究使用自行設計之氣體交換式設備，可用量測單一葉片，整株或數株植物。其原理是將受測植物之樣本加以隔離，量測此隔離空間內的CO2氣體濃度變化。



▲圖13 CO2氣體濃度變化感測器

(4) PH值

將實驗植株依7:00、13:00、19:00與凌晨1:00的時間，剪取莖葉重量，約15克，用搗鉢取莖葉汁液，分別以pH廣用紙測試pH值。其步驟如下：

1. 廣用試紙

將非洲菫的葉片與莖柄放入磨鉢磨成汁，本研究原本用廣用試紙測試，但是測出的顏色太過接近中性，對照顏色盤酸鹼值大概落在6到7之間。



▲圖14 PH值檢測

2. PH酸鹼度計

pH計是一種用於測量液體的pH值的電子儀器（也有特殊的探針來測量半固體物質），可以確認物質的酸鹼性。一個典型的pH計由一個特殊的測量探頭（玻璃電極（glass electrode））連接到電壓表，量測並顯示pH讀數。其操作方法為植物檢測液必須淹過測量探頭，待螢幕測出酸鹼度數值後，數字會隨時間下降。



▲圖15 PH酸鹼度計檢測過程

(三) 檢測葉綠素a、b與類胡蘿蔔素含量

本研究為了解葉片的綠色部分與白斑部分中各類色素的含量有無差別，使用免疫毒素分析儀(分光光度計)在某一特定波長下測定其吸光度，即可用公式計算出萃取液中各色素的含量。

首先從五個品種中每一品種挑選兩株做為檢測樣品，挑選有白斑的葉子，將白斑與綠色部分各量測0.1克，剪碎，把已剪碎的白斑與綠色部分分裝到標示為(W)、(G)試管中，從量筒用滴管吸取丙酮滴入2毫升，快速用石臘膜封住管口。

分析儀使用方式：將一次吸取100ul的微量分注器裝上滴管尖，從試管分兩次吸取共200ul滴入孔微陣列盤，將陣列盤送入儀器中，在操作面板上選取測量範圍(行:A~F 列:1~12)，輸入測定所需波長(單位:奈米)，開始測定前，先震盪五秒，測定後，操作面板會按選取範圍跑出數據。

以下為吸光值導入公式算出葉綠素a、b及總類胡蘿蔔素的含量(µg/g DW):

(1) $Ca = 12.21A663 - 2.81A646$

(2) $Cb = 22.13A646 - 5.03A663$

(3) $Cc = (1000 A470 - 3.27Ca - 104Cb) / 229$

※Note: Ca = Chlorophyll a, Cb = Chlorophyll b, Cc = Total carotenoid



▲圖16 檢測葉綠素過程

(四) 埋膠切片 (embedded section) 實驗

採集新鮮葉片，切取適當大小，浸泡在前固定液2.5%戊二醛(glutaraldehyde, GA) 4小時，並抽氣使樣品內的空氣排除，接著以0.1M 磷酸溶液清洗2次，每次30分鐘，然後浸泡在後固定液1%鉻酸(osmium) 4小時，再以0.1M 磷酸溶液清洗二次，之後以酒精做序列脫水，接著以丙酮: Spurr's resin (Spurr, 1969)序列(丙酮: Spurr's resin = 3:1:1:1:1:3)進行滲膠，純膠置換二次，一次放過夜，一次4小時，放進70°C烘箱12小時塑化成膠塊，待切片乾燥並黏附於載玻片上後，以1%甲苯藍(toluidine blue)染色1分鐘，蒸餾水洗淨、烘乾後，於光學顯微鏡下觀察，以外接式相機拍照記錄。



▲圖17 埋膠切片過程

伍、研究結果

一、植株葉脈部分做切片觀察結果：

植株名稱	葉脈縱切	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		維管束鞘細胞Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch) 葉肉細胞Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
Eternal Orbit		維管束鞘細胞Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch) 葉肉細胞Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造

Ma's Arctic Sky		維管束鞘細胞Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch) 葉肉細胞Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
JAN-Sultan		維管束鞘細胞Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch) 葉肉細胞Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造
SM-Shikarniy		維管束鞘細胞Bundle sheath cell (Bsc) : 沒有葉綠體(Chloroplast)(Ch) 葉肉細胞Mesophyll cell(Msc) : 無花環狀與克蘭茲構造

備註: Bsc : Bundle sheath cell(維管束鞘細胞); Msc : Mesophyll cell(葉肉細胞); Ph : Phloem(韌皮部)
Xy : Xylem(木質部); Ch : (Chloroplast)(葉綠素)

二、本研究以葉面縱切結果

植株名稱	葉面縱切	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。
Eternal Orbit		葉的葉肉組織有含花青素，而葉綠素位在花青素上層。
Ma's Arctic Sky		中間段為白斑部分，可明顯看出其葉綠體的分布差異，白斑部分明顯沒有葉綠體，放大後更明顯看出兩者明顯的顏色差異。
JAN-Sultan		上表皮與葉肉接觸部位，出現漏斗狀葉肉組織(funnel-shaped chlorenchyma)。
SM-Shikarniy		上表皮與葉肉細胞間有一儲水細胞相隔。

三、埋膠切片研究結果

植株名稱	埋膠切片	組織型態分析
Lazurnyi Bereg		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，初步判定可能為C3，但儲水細胞很厚，又與CAM相似。
Eternal Orbit		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，儲水細胞異常厚，較接近CAM。
Ma's Arctic Sky		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，柵狀細胞與海綿細胞明顯，初步判定可能為C3。
JAN-Sultan		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，儲水細胞上下對稱且厚，漏斗狀細胞取代柵狀細胞，海綿細胞分布在漏斗狀細胞之下，儲水細胞異常厚，較接近CAM。
SM-Shikarniy		角質層與表皮細胞，上下緊密結合，柵狀細胞與海綿細胞明顯，初步判定可能為C3。

Cuticle(角質層)C; Epidermal cell(表皮細胞): ec; Water storage cell(儲水細胞)wsc; Funnel-shaped cell(漏斗狀細胞)fsc; Sponge cell(海綿細胞)sc

四、葉綠素實驗結果

(1) 葉片在藍光、紅光、白光照射下顏色差異與內部實際色素含量比較

本研究挑選五種非洲菫 (Rob's Outer Orbit、SM-Shikarniy Mak、Mas's Arctic Sky、Jan-Sultan、Lazurnyi Bereg) 各十株作為實驗對象，而生長箱三層分別用不同波長的光照射，每層皆鋪上鋁箔紙防止光透到下一層影響實驗。其中品種SM-Shikarniy Mak(以下簡稱S)及Jan-Sultan(以下簡稱J)在外觀上有較明顯的變化。第一層使用藍光(450nm)照射，第二層使用紅光(650nm)，第三層使用白光(400-700 nm)



▲圖18 S品種不同光線葉變色情形

由圖可見，S品種在藍光(450nm)照射下整株葉片綠色最深，在紅光(650 nm)照射下最淺，在白光(400-700 nm)照射下的整株葉片顏色則介於中間。而三株S品種新長出的葉子，在藍光照射下的新葉白斑最多，在紅光照射下次之，在白光照射下新葉幾乎是全綠。



▲圖19 S品種葉綠素變化柱狀圖

由此圖表可看出，以紅光照射後的植株所含的葉綠素較少，以藍光照射者則明顯含有較多葉綠素。



▲圖20 J品種不同光線葉變色情形

J品種在紅光照射下整株葉片明顯黃化，除了本就會逐漸黃化的最外層老葉以外，由外數第二層的葉片顏色變黑，最內層的新葉則由淺綠逐漸變深轉黑。藍光照射下綠色最深，在白光照射下整株的顏色變化則介於中間。而三株J品種新長出的葉子，在藍光照射下的新葉綠色最深，在白光照射下新葉幾乎是全綠。



▲圖21 J品種葉綠素變化柱狀圖