

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060013

參展科別 植物學

作品名稱 台灣萍蓬草兩型葉發育與植物激素 ABA 與
GA 關係之研究

得獎獎項 大會獎：四等獎

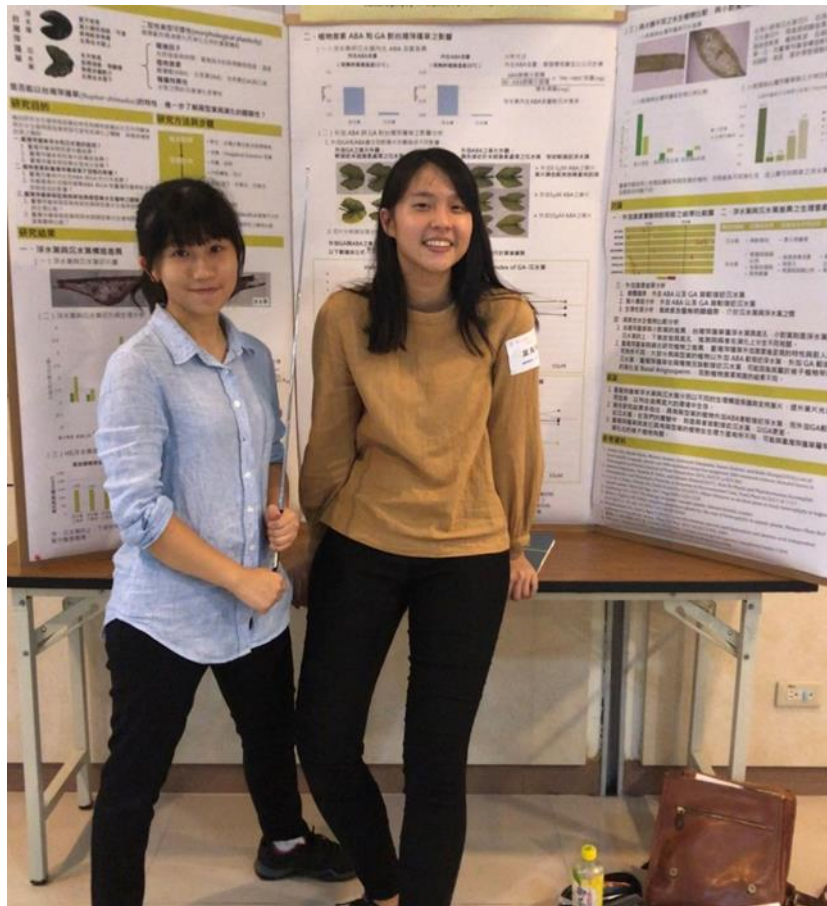
就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 吳雅嵐、楊健志

作者姓名 葉禹彤、尹唯柔

關鍵詞 台灣萍蓬草、植物激素、演化

作者簡介



我是北一女中高三數資班的尹唯柔（左），這是我做過的第三個專題研究，也是收穫最多的一次。在過程中我不僅學習到如何與同伴互助合作，更學習到遇到困境時如何換個方向思考，轉個彎後總能看見另一片天。很高興有這個機會與同樣喜愛科學的同學們進行交流，謝謝所有路上指導和幫助我們的人，讓我有幸能參與台灣國際科展。

我是北一女中高三數資班的葉禹彤（右）。我和唯柔的體驗很像。很開心專題研究的路可以走到這裡，某種程度上證明這些堅持和努力非常值得。和志同道合的朋友與師長討論過往覺得很遙遠的東西、找出一些激發我好奇心的答案，大概就是我最大的收穫。

摘要

台灣萍蓬草為台灣原生種水生植物，其葉片因應環境變化改變型態的現象稱為兩型葉（heterophylly leaves），本研究旨在探究此植物的兩型葉性質差異與演化脈絡。我們比較野生型與實驗室培養的台灣萍蓬草兩型葉間形態與生理差異，而後對其外加植物激素，比較不同刺激下葉片之生成形態。

我們發現台灣萍蓬草水上與水下葉為了適應不同的環境，發展出許多不同的特性。接著藉由實驗我們得知水上葉的內生 ABA 含量較水下葉高。在外加激素實驗中，我們發現在其他植物常呈拮抗的 GA 與 ABA，對台灣萍蓬草的影響為：外加兩種激素後生長出來的葉片構造皆趨近於水下葉，而外加兩種激素雖皆會抑制葉片中的葉綠素 a 含量，但並未趨近水上葉或水下葉。

過去的論文顯示，水生植物並非在水中獨立演化，而是在水陸之間多次交替演化，我們期望以台灣萍蓬草於 Nuphar 屬之特性，並透過兩型葉作為種屬特異性的比較工具，進一步了解這段演化過程。

Abstract

Heterophylly is a widespread morphological plasticity trait in plants responding to the altering environment. In this research, we investigated the heterophylly in *Nuphar shimadae*, a native species in Taiwan. We observed the morphological traits and the physiological properties of submerged and floating leaves to compare the alterations in different conditions. We also measured the endogenous abscisic acid and added exogenous abscisic acid and gibberellin to examine the regulation of plant hormones on heterophylly.

Through our investigation, the structural and physiological differences between the heterophyllous leaves are observed. We measured the density of astrosclereids and the proportion of palisade and aerenchyma cells by examining the tissues under the microscope. We also measured the endogenous volume of chlorophylls and abscisic acid. These traits can be associated with protection, increase of rate of photosynthesis, and enhancement of gas exchange, which can support growth of the plant under varying circumstances.

In the exogenous plant hormone experiments, we found out that hormones inducement is more profound morphologically. By calculating the percentage of alteration with the compare groups, we indicate the effects of the exogenous plant hormones on the structural, cellular, and physiological basis. Exogenous gibberellin treatment induces the growth of submerged leaves, whereas abscisic acid treatment does not have a clear impact.

The results of our research are different from studies on higher plants, which suggest that gibberellin and abscisic acid treatment induce the growth of submerged and floating leaves respectively. This can be considered as the result of the evolutionary pattern of angiosperms, since the Nuphar family is a part of basal angiosperms that diverged from the lineage leading to most flowering plants having been studied. These results suggest that investigation on the heterophylly of *Nuphar shimadae* can shed the light on the unsolved problems of the angiosperm phylogeny tree.

一、前言

(一)、研究動機

在關渡自然公園進行服務學習時看見台灣特有種——台灣萍蓬草，水下葉與水上葉有明顯的型態差異。查詢臺灣水生植物圖誌之後得知，台灣萍蓬草夏天時的葉片顏色深綠、平滑、具有較多角質，生長在水面上；冬天時的葉片則呈現淺綠、有皺褶、角質含量較少，且生長在水面下；而春天與秋天時，這兩種葉片是並存的。

許多生物都具有不同的機制來應對環境的變化，植物因為無法像動物一樣可以靠遷徙、避寒等等方式度過逆境，因此需要衍生出更多機制以存活 (Bradshaw, 1965)。其中一個適應逆境的方式，便是產生具可塑性的形態，上述植物產生兩種形態的葉片便是其中一個例子

(Minorsky 2003; Sculthorpe 1967, Wells and Pigliucci 2000)。過去的研究指出，這種葉型態轉變的過程出現在具有稱作二型性表型可塑性 (morphological plasticity) 的水生植物中。這些水生植物過去生長在經常淹水的陸地上，兩型性是適應劇烈環境變化而演化出來的重要機制 (Satoko Lida, et al, 2016)。

和環境變化相關的因子包含光照強度與時間、氧氣與水的取得難易程度和溫度等。離層酸(ABA)、生長素(IAA)、吉貝素(GA)與乙烯等植物激素已被發現與部分水生植物兩型性相關 (Hokuto Nakayama, et al, 2017)，其中 ABA 和 GA 具有拮抗的現象，但此兩種激素對具有兩型葉的不同水生植物影響也不盡相同。舉例來說，竹葉眼子菜

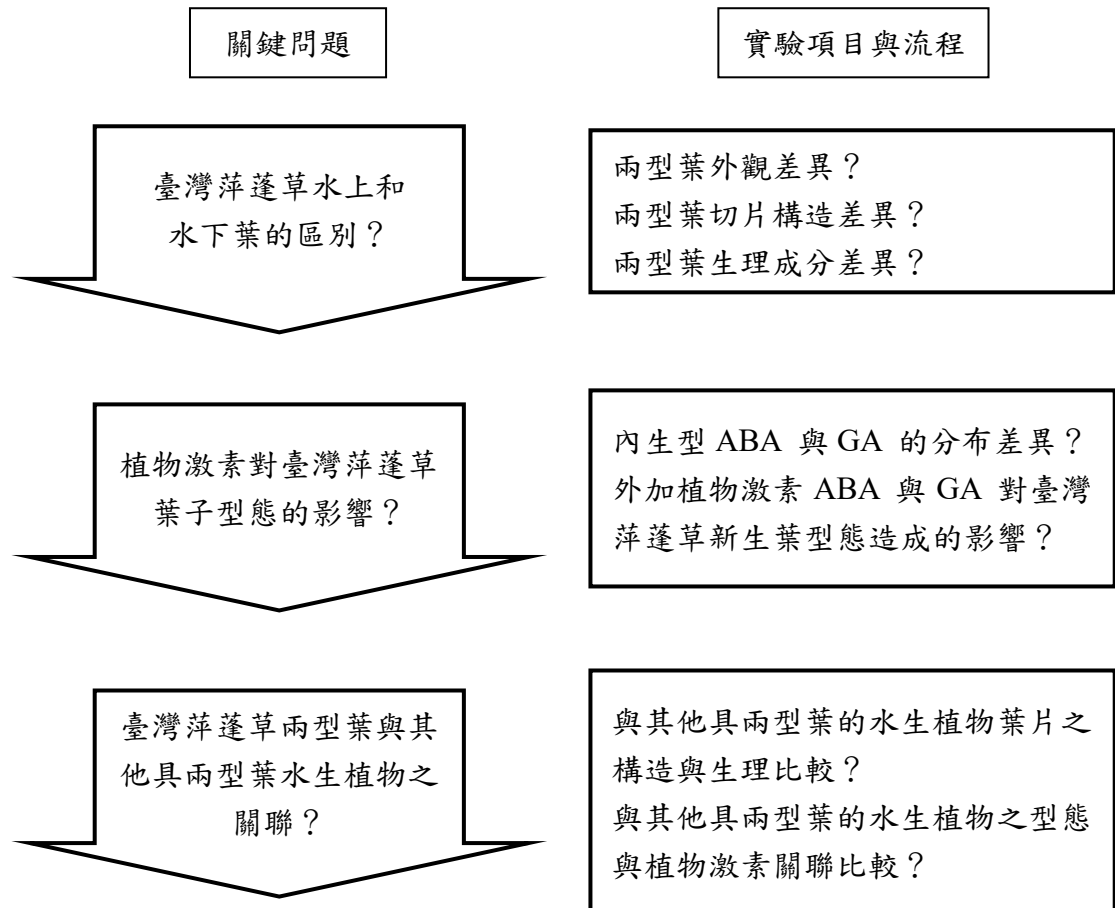
(*Potamogeton wrightii*) 與穿葉眼子菜 (*Potamogeton perfoliatus*) 是兩種親緣關係相近但生長在不同地方的水生植物，竹葉眼子菜生長在淺水或陸地上，穿葉眼子菜則是生長在較深的水中，兩種植物生長出來的葉

子並不相同，以 10 μ MABA 處理後，竹葉眼子菜會長出具有氣孔的水下葉（水生植物的水下葉大部分不具氣孔，只有水上葉具有氣孔），而穿葉眼子菜則是會生長出和原生葉片型態類似但具有氣孔的葉片（Satoko et al., 2016）

植物的演化歷經多次水生型態與陸生型態的互相轉換，而非一路由水生植物演化為陸生植物，而不同時期演化出的水生植物或陸生植物，具有不同的特徵及性狀，被子植物早期的演化樹至今仍是謎團，透過水生植物生理與型態的比對，可能有助於了解其演化過程。在此研究中，我們以臺灣萍蓬草探討兩型葉在性質上的差異，並研究影響其產生兩型葉的原因。最後與小對葉（又名過長沙，*Bacopa monnieri*，屬菊類植物（Asterids）演化支），以及過去研究中的植物比較，進而推論兩型葉與被子植物演化的相關性。

(二)、研究目的

藉由研究水生植物兩型葉的特性，與植物激素和兩型葉生成之關聯，探討水生植物兩型葉表型可塑性和演化的脈絡，也了解植物應對逆境之機制。



二、 研究方法或過程

(一)、研究設備與器材

1、 植物樣本培養

設備：恆溫植物生長室、日光燈、盆栽、膠帶、滴管

藥品：Hoagland Solution、RO 水

2、 葉片型態觀察與分析

設備：Olympus BX50 顯微鏡、數位照相機、組織均質機、鋸

珠、單面刀、玻璃切割版、載玻片、蓋玻片、鑷子、離心管

軟體：DP-controller、ImageJ

藥品：番紅 Safranin O、甲苯胺藍 Toluidine Blue

3、 外加植物激素分析

設備：微量滴管

藥品：ABA ((+)-Abscisic acid)、GA

4、 內生植物激素分析

設備：組織均質機、-4°C 冷房、vortex、Eppendorf 離心管、

控溫離心分離機、吹氮機、-80°C 冰箱、微量滴管

軟體：MassLynx V4.1

藥品：液態氮、d6-ABA、甲醇、異丙醇、濃鹽酸、二氯甲烷

(二)、研究過程及步驟

1、植物樣本與生長環境

(1) 植物樣本取得

台灣萍蓬草(*Nuphar pumila* (Timm) DC., 1821)樣本由台灣大學生態池取得，取出其地下莖後種在植物培養室水缸中，以植物培養土培養。製作葉片樣本方式為：將葉片擦乾並放入螺口尖底塑料離心管中，接著放入液態氮中冷凍 20 秒，拿出後放入-20°C凍箱中冷凍保存。

(2) 生長條件

溫度：植物生長室，恆溫 25°C

照度：170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

培養液：Hoagland's Solution，配方如下：

表一 Hoagland Solution 配方

名稱	mg/L	名稱	mg/L
KNO ₃	505	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.48
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1180	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
Fe-EDTA	36	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.051
MgSO ₄ · 7H ₂ O	493	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.12
NH ₄ NO ₃	80	KH ₂ PO ₄	68
H ₃ BO ₃	2.86		

由以上配方配出來的溶液再行稀釋三倍作為台灣萍蓬草的

培養液。

(3) 培養方式

將取得的台灣萍蓬草地下莖，每4到5公分一段切成小塊，泡在經稀釋的培養液中，其中每小塊必須包含至少兩個節。以激素處理的台灣萍蓬草置於25°C培養，在此溫度條件下，台灣萍蓬草可長出水下葉與水上葉。

(4) 型態觀察與分析

水上葉和水下葉的判別方式為觀察其外觀和葉片與水面之相對位置。

- a. 外部型態觀察：觀察水上和水下葉的葉形並測量其厚度。
- b. 切片與染色：取新鮮水上和水下葉各三片葉子，使用單面刀經過主葉脈橫切大約0.5公分的樣本，放到光學顯微鏡下觀察，接著使用番紅（safranin O）染色一分鐘後，再用甲苯胺藍（toluidine blue）染色一分鐘，置於顯微鏡下觀察並比較。
- c. 測量氣室比例：先選取寬度0.05mm的範圍，使用image j測量此範圍下葉片的面積，接著計算不包含氣室的葉片面積，相減後算出氣室占葉片面積的比例。
- d. 測量柵狀細胞比例：先選取寬度0.05mm的範圍，使用image j測量此範圍下柵狀細胞面積以及葉片面積，相除得比例。
- e. 測量星狀厚壁細胞密度：先選取寬度0.05mm的範圍，

計數在此範圍下星狀厚壁細胞的數目，再除此範圍下的葉片面積。

(5) 葉片表皮細胞與氣孔觀察

每片葉子皆隨機選取十個細胞計算，取其平均後紀錄並比較。

a. 表皮細胞密度：

取水上和下水葉各三片葉子，上表皮使用折撕法將表皮撕下，製作水埋玻片後置於顯微鏡下觀察；下表皮較難與葉片分離，因而使用透明指甲油塗抹，等待其固化後再將其撕下，置於載玻片上再放到顯微鏡下觀察，接著隨機選取視野範圍 $200 \times 200 (\mu\text{m})^2$ 的正方形區塊，計算氣孔數量和表皮細胞數量，視野範圍內若有被切割的氣孔或表皮細胞，無論視野範圍內佔多少比例皆視為半個氣孔或表皮細胞。

b. 氣孔指數：

計算水上和下水葉上下表皮的氣孔指數（氣孔數目/總細胞數目），計算其平均值，紀錄並比較。

c. 表皮細胞平整度：

計算單個表皮細胞的周長與面積，套入公式

$$\frac{\text{細胞周長}}{\sqrt{\text{細胞面積}}} \text{——計算表皮細胞平整度。}$$

(6) 葉綠素含量

取水上和水下葉各三片，每片葉子各取 20mg 不包括主葉脈部分的葉片，置入微量離心管中，加入白鋸研磨珠後，放置於液態氮中約 3 分鐘，使用均質機（10sec, 10x100rpm）重複搗碎葉片數次直到其變成粉末，室溫下靜置 30 秒後取出研磨珠，加入 80%的丙酮後上下搖晃數十下，直至粉末均勻分布在微量離心管中，再以 120rpm 離心 3 分鐘，取出上清液 250 μ L，放入比色管中，再加入 80%丙酮 750 μ L，以 80%丙酮作為基準，測量樣本的吸光值並計算樣本所含的各種葉綠素量值。

公式：

$$\text{葉綠素 a (1mg/L)} = 1.27 A_{663} - 0.269 A_{645}$$

$$\text{葉綠素 b (1mg/L)} = 0.29 A_{663} - 0.468 A_{645}$$

$$\text{總葉綠素含量 (1mg/L)} = 2.02 A_{663} + 0.802 A_{645}$$

(Measurement of chlorophylls by spectrophotometer)

2、植物激素 ABA 與 GA

(1) 內生激素分析

取新鮮台灣萍蓬草葉片擦乾後，取水上和水下葉各 200mg（誤差值在百分之三）。與鋸珠一起放入均質機專用之強化型 2ml 微量離心管內，以液態氮冷卻後使用均質機以 10rpm 處理三次(每次 15 秒)，將其粉碎。加入 50 μ L 含 2ng d6-ABA 內標物的 Working Solution（甲醇）和 500 μ L 萃取液（2-propanol :H₂O :Concentrated HCl= 2:1:0.002），。在 4°C 黑暗下劇烈搖動樣品 30 分鐘後，加入

1ml 二氯甲烷，再於 4°C 黑暗下劇烈搖動樣品 30 分鐘。4°C 下以 13000g 離心 5 分鐘，植物殘渣會出現在兩層液體中央。將離心所得下層溶液放入新的微量離心管中，以吹氣機揮發二氯甲烷溶液後，在 -80°C 冷凍保存。將樣本送至中央研究院農生中心代謝體核心實驗室，以液相層析三段四級柱質譜儀進行樣品的測定，取得樣品在 ABA 與 d6-ABA 峰積分，並以換算公式計算出葉片中原含有的 ABA 量。

$$\frac{\text{ABA 峰積分面積}}{\text{d6-ABA 峰積分面積}} \times \text{d6-ABA 含量}(\text{ng}) / \text{樣本濕重}$$

(2) 外加激素

取 3 到 5 公分的台灣萍蓬草地下莖，泡在加入 ABA 的培養液中(每組三段)，以及加入 GA 的培養液中(每組三段)，每三天換一次培養液，十天後移回水缸中種植，觀察其生長出來的葉子並加以分析，進行三次重複試驗。

ABA 實驗組分為 0.1µM、1µM、10µM 三種濃度；GA 實驗組分為 0.1µM、1µM、10µM 三種濃度。其中因為 ABA 較不易溶於水，實驗組以 55%DMSO 溶解，故 ABA 的對照組培養液中也加入 DMSO 使三者等量。

紀錄結果後我們對數據進行以下檢驗

- a. T 檢驗：計算外加三種不同激素濃度後的數據與未經激素處理的水上和下水葉之 P 值。

b. ANOVA 分析：對外加 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 激素的數據進行統計，並記錄激素濃度是否對其葉片構造具有影響。

其他水生植物實驗中，由相同方法進行培養：用三到五公分的植物體，標示原生葉片後培養，進行後續觀察與比較。

3、被子植物早期演化樹之推測

根據前人之論文以及在本研究中實驗的小對葉，將台灣萍蓬草之型態與生理，與他種具有兩型葉之植物進行葉片型態與生理性質的比較。

三、研究結果

(一) 水上葉和 underwater 葉型態之異同

觀察生長於台灣大學生態池的台灣萍蓬草，由葉片和水面的相對位置定義水上葉及水下葉。

1、外形



圖一 台灣萍蓬草水上葉正、背面

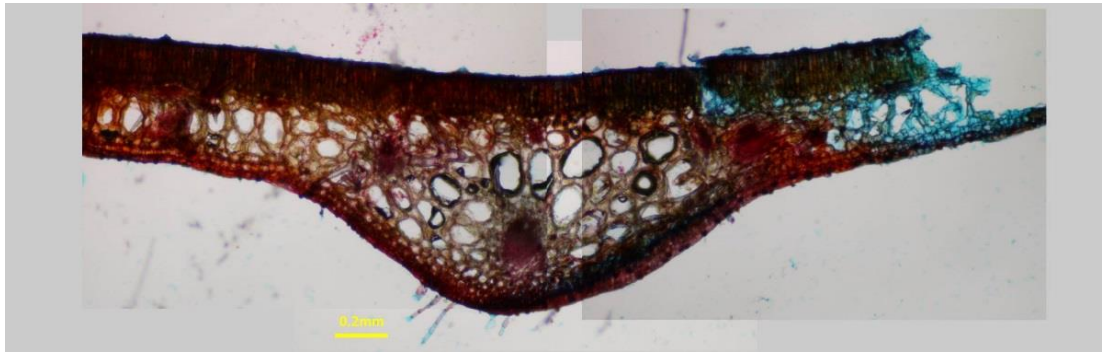


圖二 台灣萍蓬草水下葉正、背面

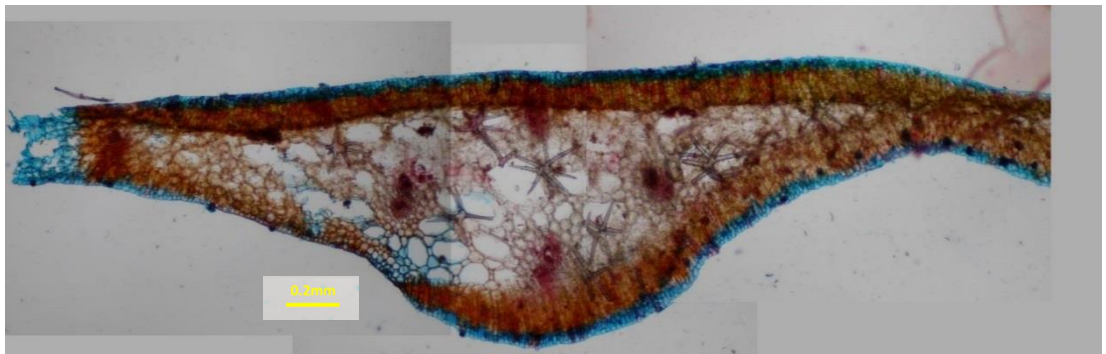
表二 台灣萍蓬草葉片外觀比較

	葉形	平整度	顏色	透光度
水上葉	橢圓形，葉片底端具凹槽	較平整	較深	不透光
水下葉	橢圓形，葉片底端具凹槽	較不平整	較淺	透光

2、切面構造



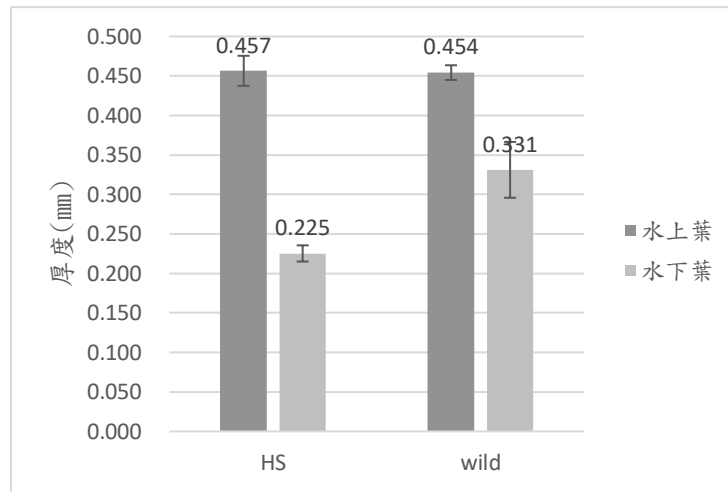
圖三 台灣萍蓬草水上葉切片



圖四 台灣萍蓬草水下葉切片

圖三與圖四為以培養液培養的台灣萍蓬草切片，以下由培養液培養的葉片皆以 HS (Hoagland's Solution) 葉片稱之。由圖三與圖四可知水上與水下葉切片皆可觀察到星狀厚壁細胞、維管束，以及不同比例的柵狀組織與氣室。

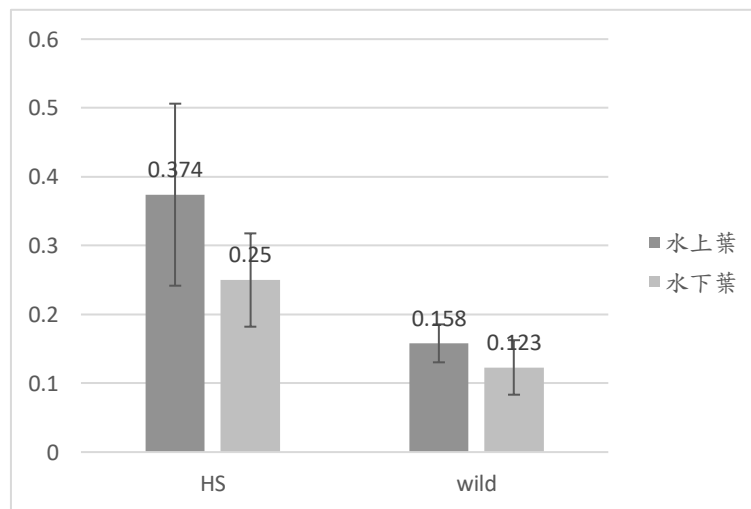
(1) 葉片厚度



圖五 水上葉與水下葉葉片厚度比較 (n=8)

由圖五可知，無論是 HS 葉片或是野生型台灣萍蓬草，水上葉皆較水下葉厚，其中 HS 葉片的水上與水下葉型態差異較顯著，水上葉的葉片厚度較水下葉多出約 103%，野生的僅約為 37%。

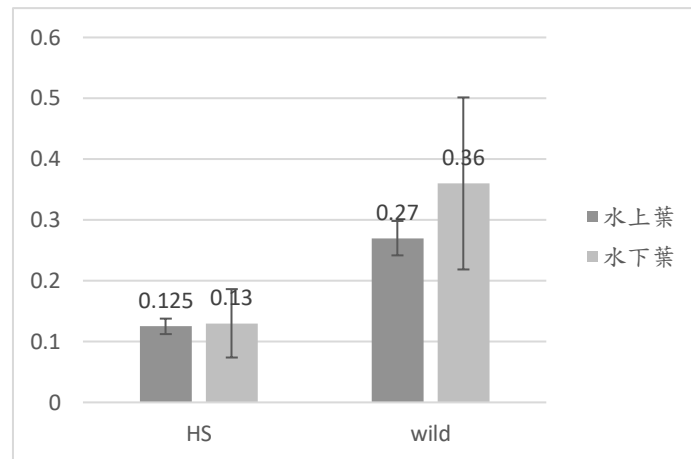
(2) 氣室比例



圖六 水上葉與水下葉氣室比例分析 (n=8)

圖六結果顯示，無論是以植物培養液培養的或是野生型萍蓬草，氣室比例皆是水上葉較高，HS 葉片水上葉與水下葉間的差異較為顯著，水上葉氣室比例約較水下葉多出 50%，野生則約多出 28%。

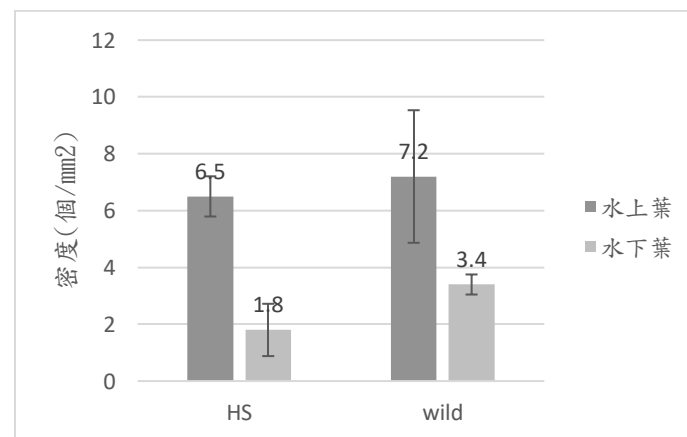
(3) 柵狀組織比例



圖七 水上葉與水下葉柵狀組織比例分析 (n=8)

由圖七可知，無論是 HS 葉片或野生型台灣萍蓬草，柵狀組織佔葉片橫切面總面積比例，皆是水下葉較水上葉大。其中以 HS 葉片水上葉與水下葉間差異較小，水上葉僅較水下葉多出約 4%，野生萍蓬草差異則較顯著，水上葉較水下葉高出約 25%。

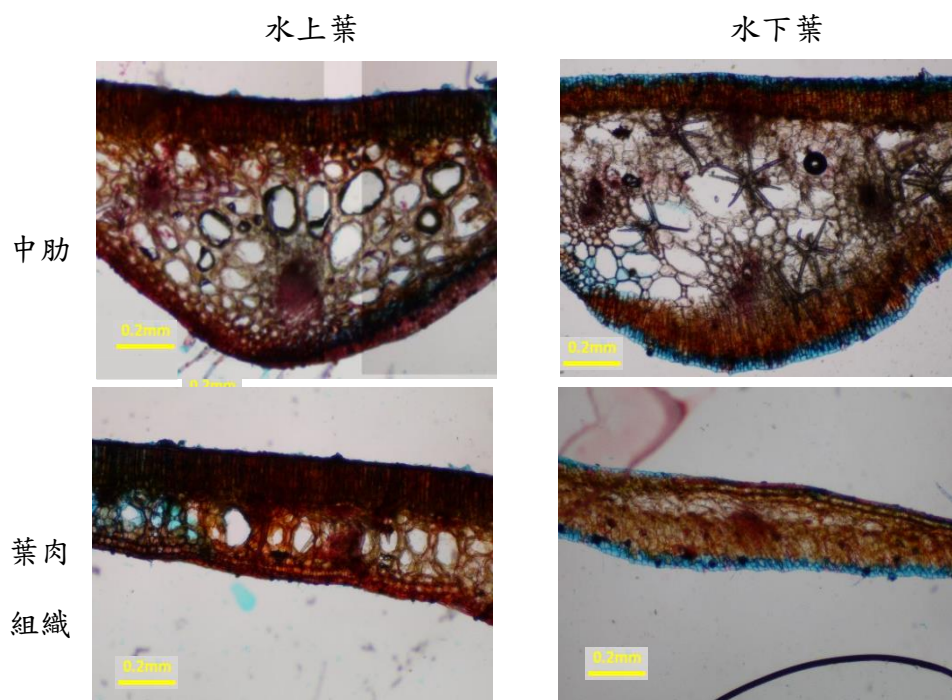
(4) 星狀細胞密度



圖八 水上葉與水下葉星狀細胞密度比較 (n=8)

根據圖八，無論是 HS 葉片或是野生型臺灣萍蓬草水上葉的星狀厚壁細胞含量皆較水下葉高。其中 HS 葉片的星狀細胞在水上葉與水下葉間的差異較為顯著，水上葉較水下葉密度高出約 261%，而野生型態則是水上葉僅較水下葉多出約 112%。

(5) 其他構造比較

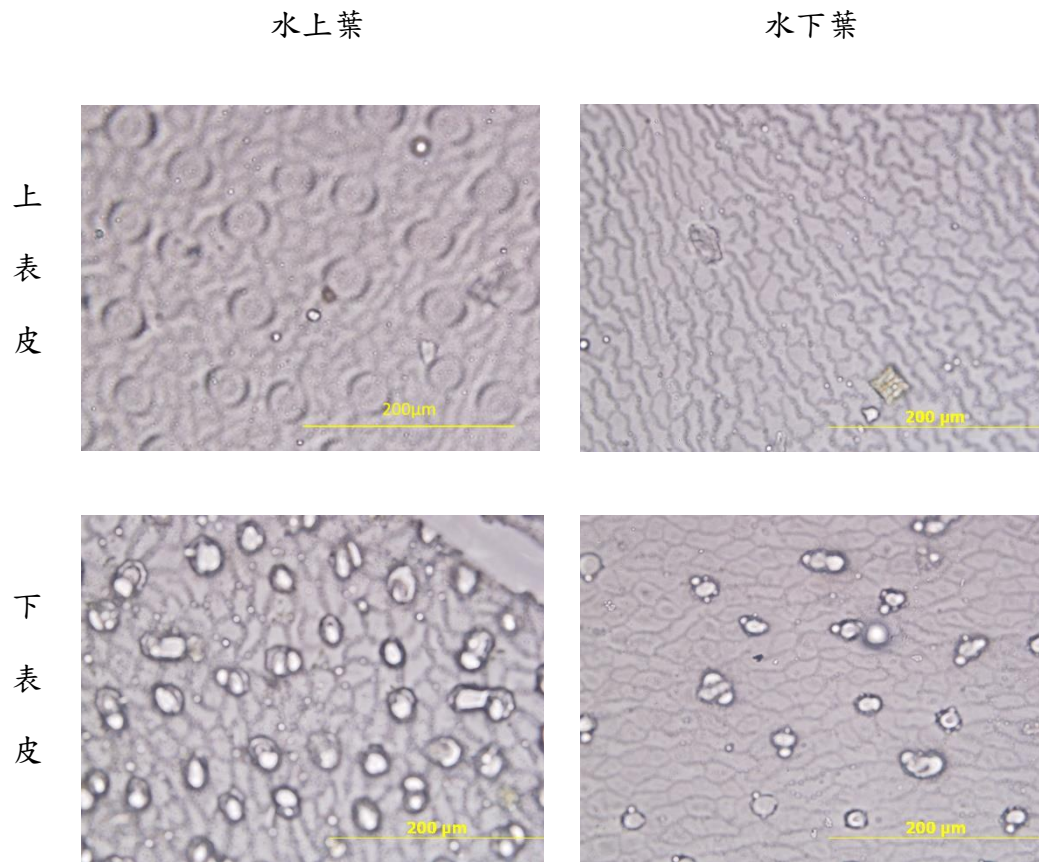


圖九 染色橫切面

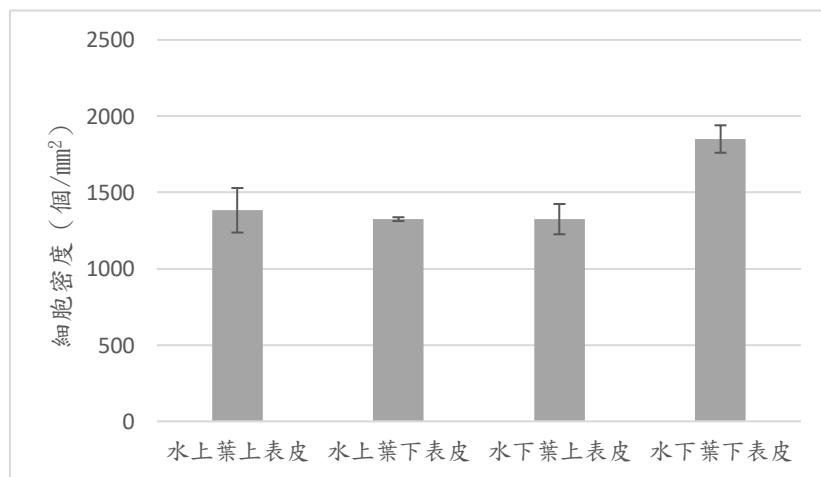
由圖九可知，在水下葉外層有被 Toluidine Blue 染色成藍色的多層細胞，為含大量多醣的細胞壁。而由第二列的兩張圖能明顯看出水上葉葉片較水下葉為厚，氣室佔單位面積的比例也明顯較大。

3、表皮細胞及氣孔觀察

(1)表皮細胞



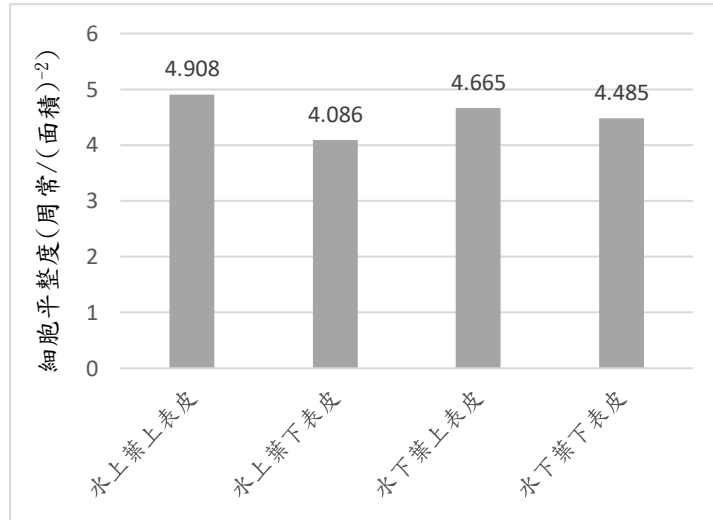
圖十 水上葉與水下葉之上、下表皮



圖十一 台灣萍蓬草表皮細胞密度

由圖十、圖十一可知，水上葉上、下表皮與水下葉上表皮的表皮細胞密度差異不大，差異在4%以內，水下葉下表皮的表皮細胞密度則明顯較

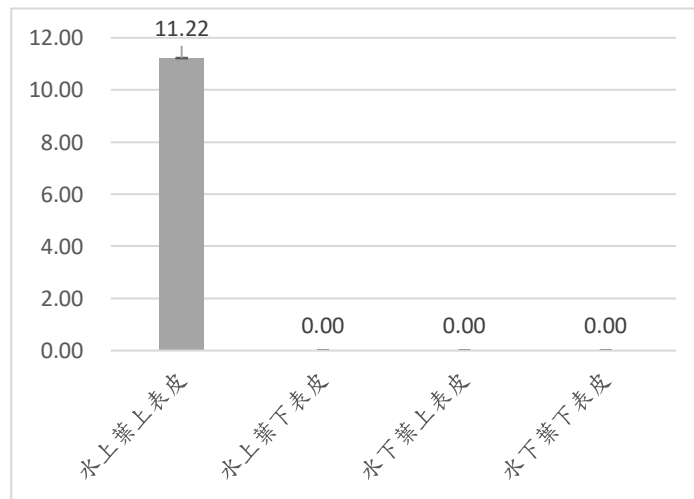
高，約較其他三者高出 40%，而由水上葉與水下葉上表皮 P 值為 0.6，水上葉與水下葉下表皮 P 值為 0.008 可知，兩種型態葉片的上表皮之間並沒有顯著差異，下表皮則有。



圖十二 台灣萍蓬草水上葉與水下葉表皮細胞平整度

由圖十二可以得知，水上葉與水下葉的上、下表皮細胞中，細胞形狀最不規則的為水上葉上表皮細胞，水上葉下表皮則最為平整。

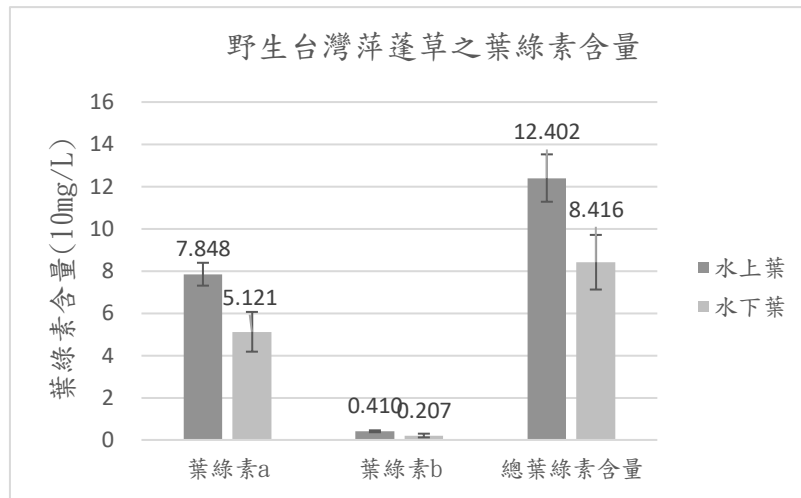
(2) 氣孔指數



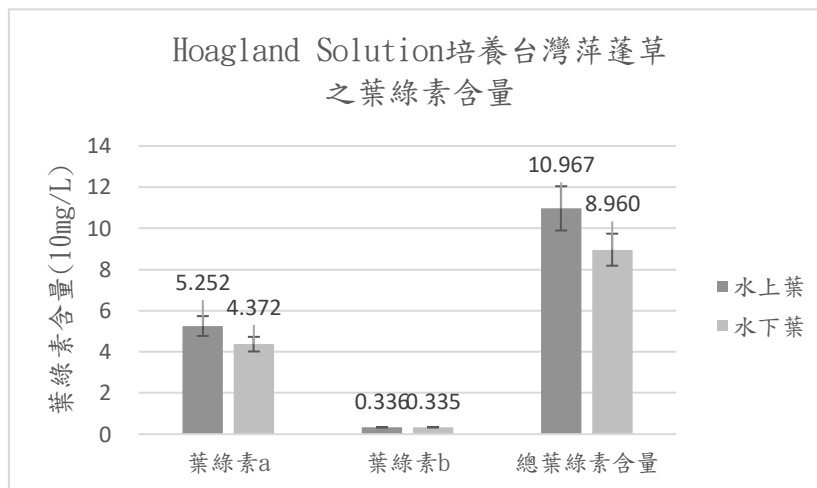
圖十三 台灣萍蓬草氣孔指數

在台灣萍蓬草的水上與水下葉之上、下表皮中，僅水上葉上表皮具有氣孔。

(二) 水上葉和 underwater 葉生理之異同-葉綠素含量



圖十四 野生台灣萍蓬草水上葉與水下葉葉綠素含量比較

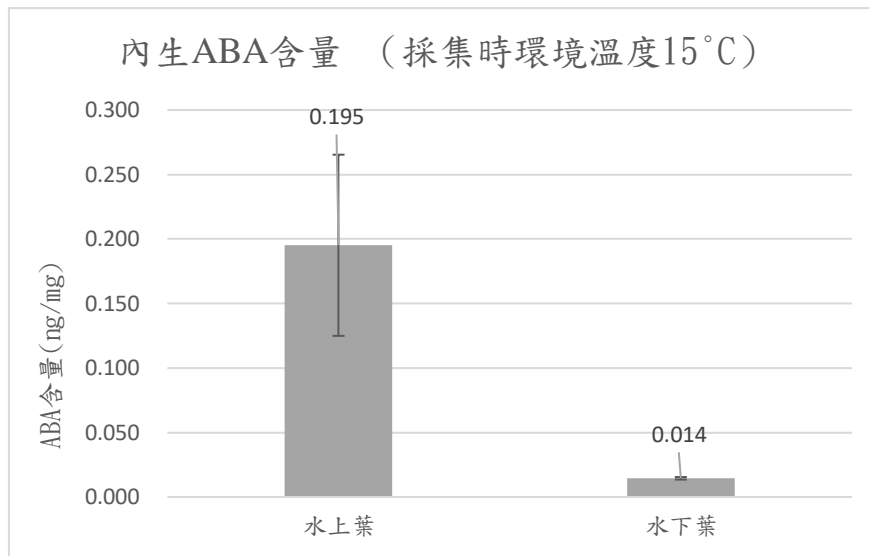


圖十五 HS 台灣萍蓬草水上葉與水下葉葉綠素含量比較

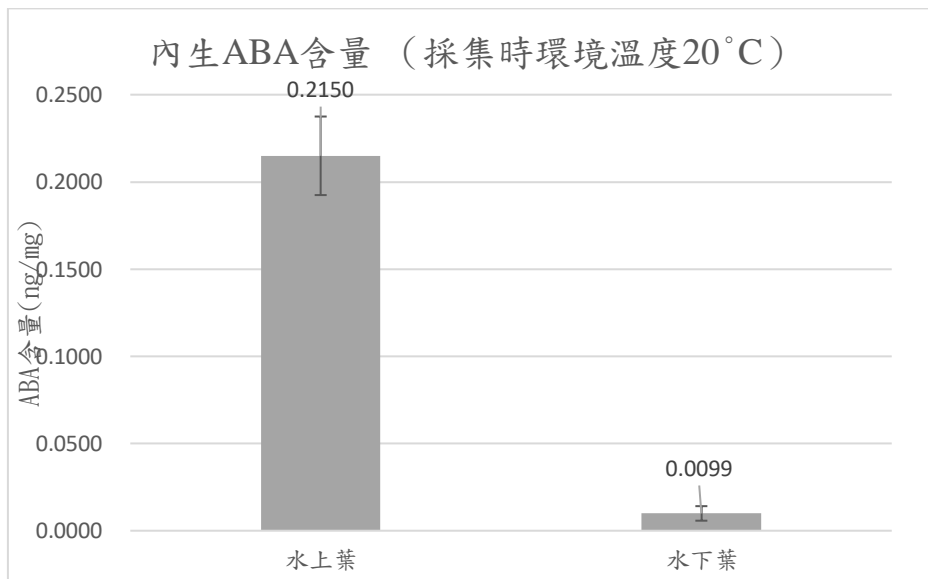
由圖十四可知，在野生台灣萍蓬草中，水上葉所含的總葉綠素、葉綠素 a、葉綠素 b 含量皆較水下葉高，其中水上葉的葉綠素 a 含量較水下葉多出約 53%，葉綠素 b 水上葉較水下葉多出約 98%，總葉綠素含量約多出 47%。而由圖十五可知，HS 葉片趨勢與野生型態是一樣的，其中水上葉的葉綠素 a 含量較水下葉高出 20%，葉綠素 b 含量較不明顯，水上葉較水下葉高出 0.3%，總葉綠素含量則是多出 22%。比較野生型與 HS 葉片，無論是葉綠素 a、葉綠素 b 或是總葉綠素含量，野生型水上葉與水下葉之間的差異，皆較 HS 葉片高。

(二) ABA 與 GA 對兩型葉發育的影響

1. 內生 ABA 的比較



圖十六 環境溫度 15°C 內生 ABA 含量



圖十七 環境溫度 20°C 內生 ABA 含量

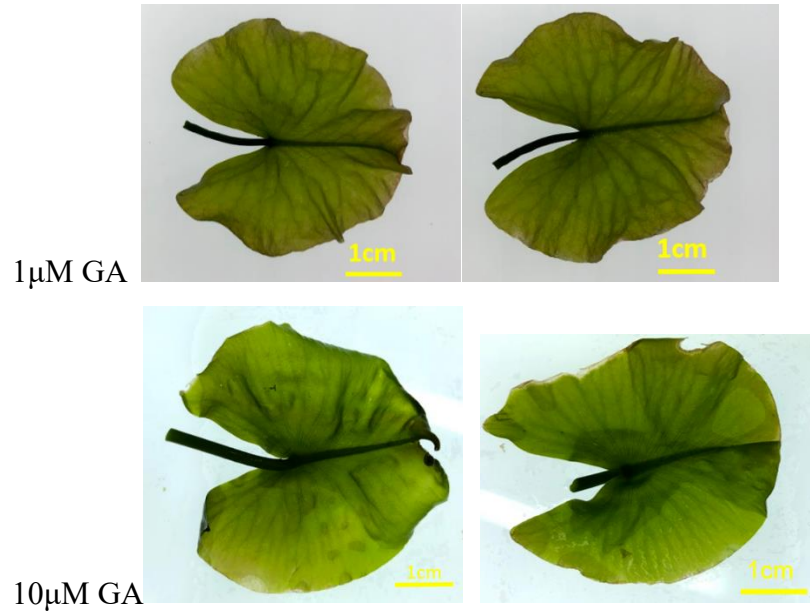
(百分比率—時間圖中的訊噪比皆達 26，達到定量比較標準的 10)

由圖十六與圖十七可以發現，15°C 時野生的台灣萍蓬草水上葉的內生 ABA 含量遠大於水下葉，約為其 14 倍；20°C 時水上葉為水下葉的 21 倍。兩種溫度下，水上葉內生 ABA 含量皆遠大於水下葉。

2. 外加 GA 與 ABA 的影響

(1) 外加 GA

A. 葉型



圖十八 外加 GA 十日後長出的台灣萍蓬草葉片

由圖十八可發現，外加 10μM GA 的葉片外型相似於未加激素的水下葉。

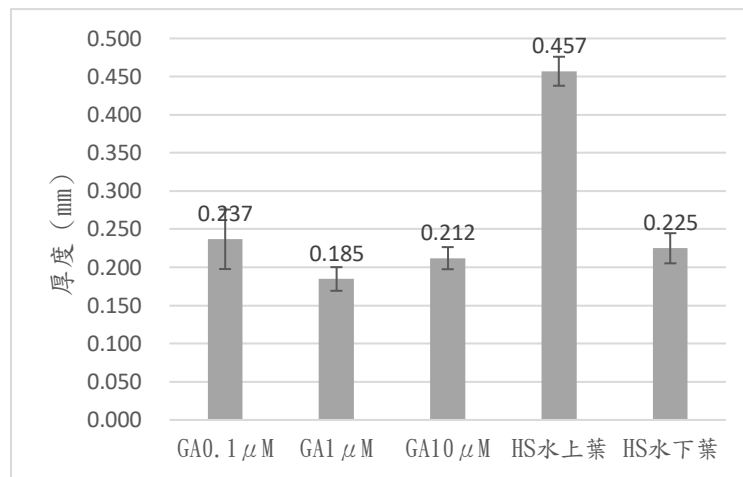
B. 切面構造



圖十九 外加不同濃度 GA 的台灣萍蓬草葉片切面

由圖十九與圖九比較，可以發現外加 GA 的葉片氣室比例明顯較未加激素者（包含水下葉與水上葉）來的少，柵狀細胞則無法直接看出明顯的區別。

(a) 葉片厚度



圖二十 外加不同濃度 GA 的葉片厚度

由圖二十可以發現，外加不同濃度 GA 之葉片厚度，皆與未加激素之水下葉相近，但葉片厚度與外加 GA 濃度並無明顯的趨勢關係。

表三 不同濃度 GA 的葉片厚度與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
HS 水上葉	**p<0.01	***p<0.001	***p<0.001
HS 水下葉	p>0.05	p>0.05	p>0.05

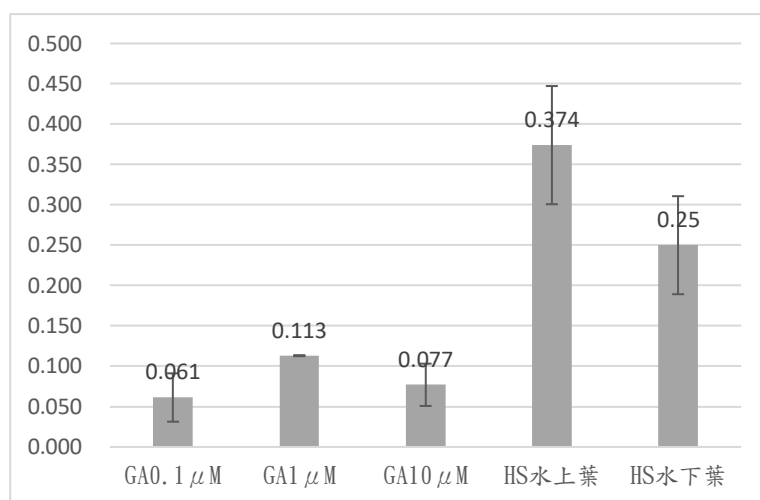
由表三可知，三種葉片皆與水上葉具有很顯著到非常顯著的差異，而三者皆較接近水下葉，無顯著差異。

表四 GA 濃度對葉片厚度影響之 ANOVA 分析 (

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.005419	2	0.002709	4.702817	0.033422	3.982298
組內	0.006337	11	0.000576			
總和	0.011756	13				

由表四 F 值 > 臨界值，*P<0.05 可知 GA 濃度不同對葉片厚度有顯著影響。

(b) 氣室比例



圖二十一 外加不同濃度 GA 的氣室比例

根據圖二十一，加入不同濃度 GA 後生長出的葉片，氣室比例皆較未加入激素時的水上葉與水下葉少，可知外加 GA 對於葉片之氣室發育可能具有抑制效果，但外加 GA 濃度與氣室比例並無明顯趨勢關係。

表五 不同濃度 GA 的葉片氣室比例與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
HS 水上葉	***p<0.001	***p<0.001	***p<0.001
HS 水下葉	***p<0.001	***p<0.001	***p<0.001

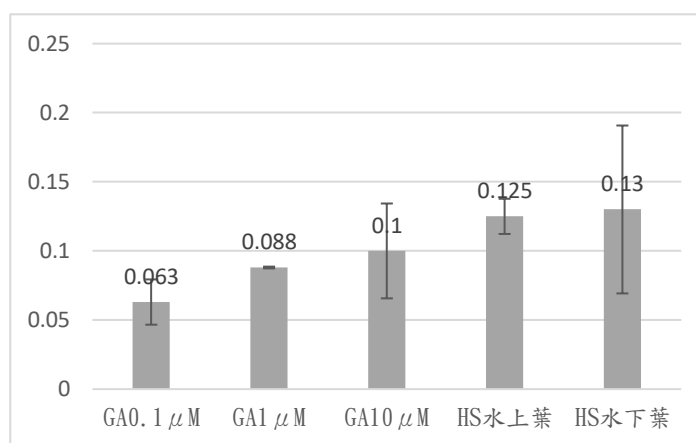
由表五可知外加不同濃度 GA 後氣室比例，皆與未經激素處理的水上葉和 underwater 葉具有非常顯著的差異。

表六 GA 濃度對氣室比例影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.00435	2	0.002175	3.616324	0.062085	3.982298
組內	0.006616	11	0.000601			
總和	0.010965	13				

由表六 F 值 < 臨界值，P>0.05 可知 GA 濃度變化對氣室比例影響不顯著。

(c) 柵狀組織比例



圖二十二 外加不同濃度 GA 的柵狀組織比例

根據圖二十二，外加 GA 後生長出來的葉片，柵狀組織比例皆較未加激素之台灣萍蓬草低，但隨著外加 GA 濃度愈高，柵狀組織比例愈高，外加 GA 濃度與葉片柵狀組織比例呈正相關。

表七 不同濃度 GA 的葉片柵狀組織比例與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
HS 水上葉	p>0.05	p>0.05	p>0.05
HS 水下葉	*p<0.05	p>0.05	p>0.05

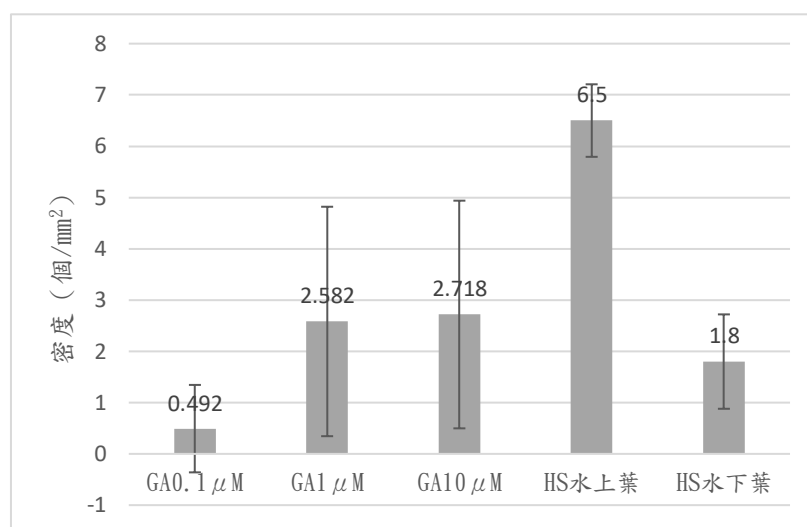
由表七可知外加不同濃度 GA 後葉片柵狀組織比例與未經激素處理之葉片柵狀組織比例大部分沒有顯著差異，僅外加 0.1μM 之葉片與水下葉具顯著差異。

表八 GA 濃度對柵狀組織比例影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.002539	2	0.001269	1.589627	0.247495	3.982298
組內	0.008784	11	0.000799			
總和	0.011322	13				

由上表 F 值 < 臨界值，p>0.05 可知不同濃度 GA 對柵狀細胞比例並無顯著影響，故濃度雖與柵狀組織比例雖呈正相關，影響卻並不顯著。

(c) 星狀細胞密度



圖二十三 外加不同濃度 GA 的星狀細胞密度

由上圖可知外加 GA 後之葉片，星狀厚壁細胞密度皆較 HS 葉片之水上葉少，與水下葉則較接近。

表九 不同濃度 GA 的葉片星狀細胞密度與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
HS 水上葉	***p<0.001	***p<0.001	***p<0.001
HS 水下葉	**p<0.01	*p<0.05	*p<0.05

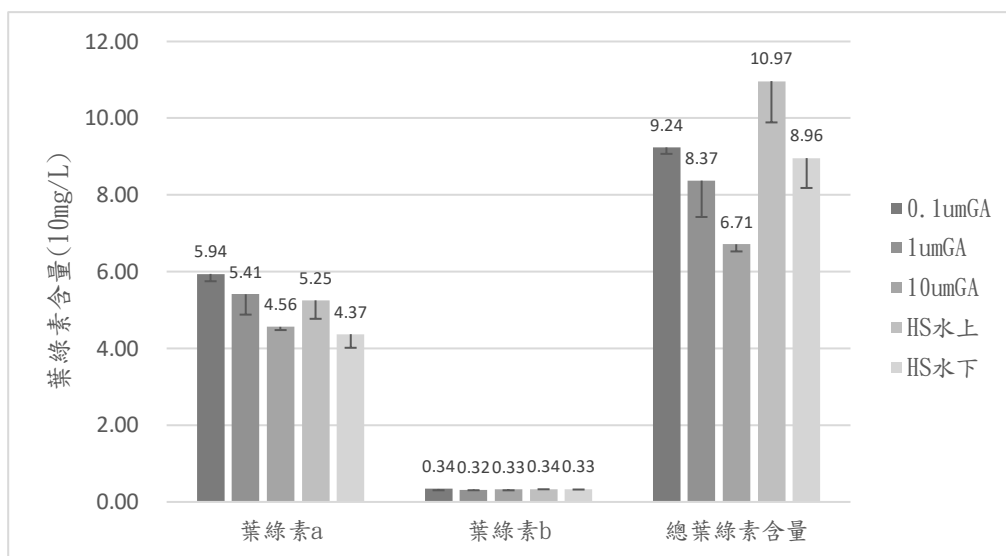
由上表可知外加不同濃度 GA 之葉片與水上葉之星狀細胞密度具有非常顯著的差異，與水下葉之差異則較小。

表十 GA 濃度對星狀細胞密度影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	11.32978	2	5.664892	1.355696	0.297654	3.982298
組內	45.96445	11	4.178586			
總和	57.29423	13				

由上表 F 值 < 臨界值，p>0.05 可知不同濃度對星狀厚壁細胞影響並不顯著。

C. 色素含量



圖二十四 外加不同濃度 GA 對葉綠素含量比較

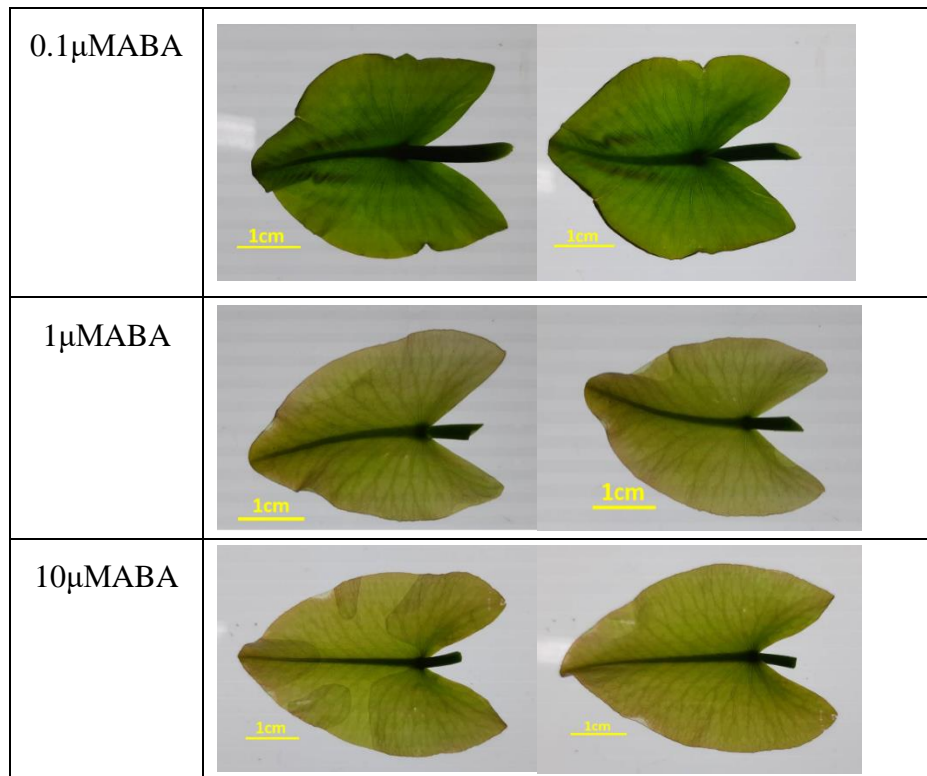
表十一 外加各濃度 GA 與葉綠素含量值(10mg/L)

	葉綠素 a	葉綠素 b	總葉綠素含量
GA0.1µM	5.94	0.34	9.24
GA1µM	5.41	0.32	8.37
GA10µM	4.56	0.33	6.71
HS 水上葉	5.25	0.34	10.97
HS 水下葉	4.37	0.33	8.96

由圖二十四與表十一可以發現，隨著外加 GA 濃度愈高，葉綠素 a 含量愈低，推論 GA 對葉片葉綠素 a 合成可能具有抑制效果；葉綠素 b 含量在外加激素後，則與未加激素前含量差異不大；隨著外加 GA 濃度愈高，總葉綠素含量愈低，主要差異應該來自葉綠素 a。

(2) 外加 ABA

A. 葉型

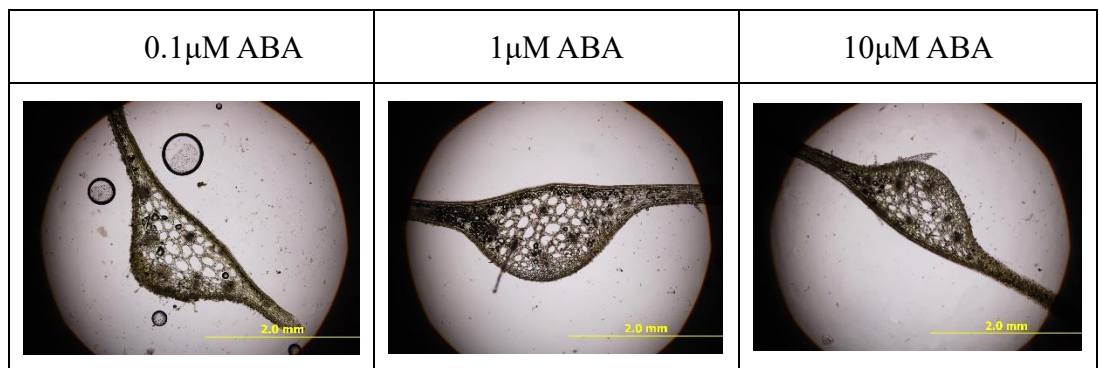


圖二十五 外加不同濃度 ABA 處理十天之葉片外觀

由圖二十五可以發現經 0.1 μ M ABA 處理的葉片顏色明顯較 1 μ M、10 μ M 者深，顏色較接近未經激素處理的水上葉，1 μ M、10 μ M 顏色則較接近水下葉。

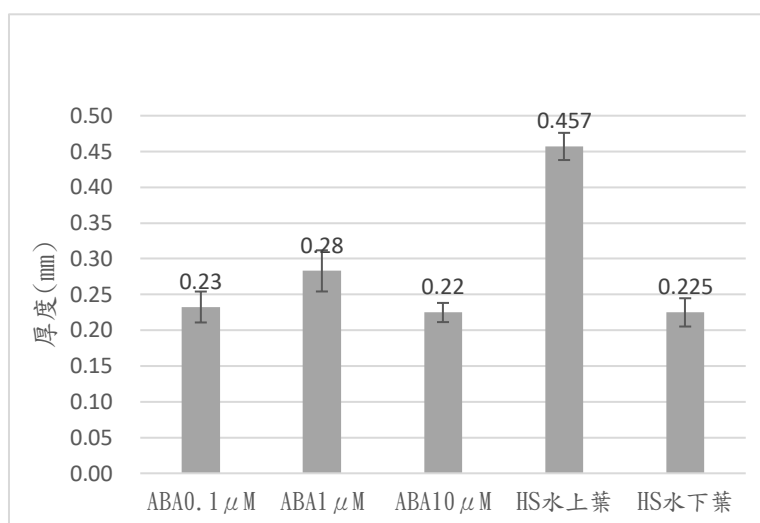
經 0.1 μ M ABA 處理的葉片葉緣較不平整，外型與水下葉較相似。1 μ M、10 μ M 顏色雖接近水下葉，卻沒有皺褶，形狀較接近水上葉。

B. 切面構造



圖二十六 外加不同濃度 ABA 台灣萍蓬草葉片切片

(a) 葉片厚度



圖二十七 外加不同濃度 ABA 對葉片厚度比較

由上圖可以發現，外加不同濃度 ABA 之葉片厚度，皆與未加激素之水下葉較相近。

表十二 不同濃度 ABA 的葉片厚度與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1 μM	1 μM	10 μM
水上葉	***p<0.001	***p<0.001	***p<0.001
水下葉	p>0.05	*p<0.05	p>0.05

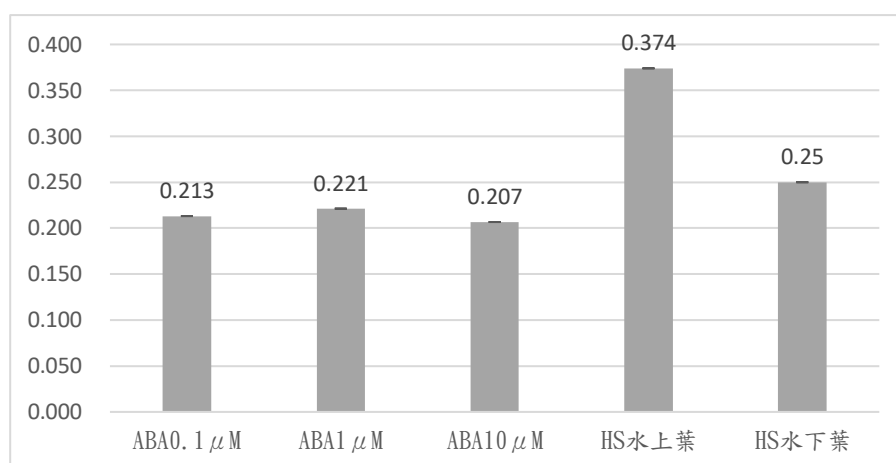
由上表可知外加不同濃度 ABA 生長出來的葉片厚度，與未經激素處理的水上葉葉片厚度具有顯著差異，與水下葉差異則較不顯著。

表十三 ABA 濃度對葉片厚度影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.011985	2	0.005992	12.19563	0.000716	3.68232
組內	0.00737	15	0.000491			
總和	0.019355	17				

由上表 F 值 > 臨界值，***p<0.001 可知外加不同濃度 ABA 對葉片厚度具有非常顯著的影響。

(b) 氣室比例



圖二十八 外加不同濃度 GA 對氣室比例之影響

由上圖可以發現外加三種濃度之葉片氣室比例皆接近 HS 水下葉，濃度與氣室比例變化趨勢並無明顯相關。

表十四 不同濃度 ABA 的葉片氣室比例與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
水上葉	***p<0.001	***p<0.001	***p<0.001
水下葉	p>0.05	p>0.05	p>0.05

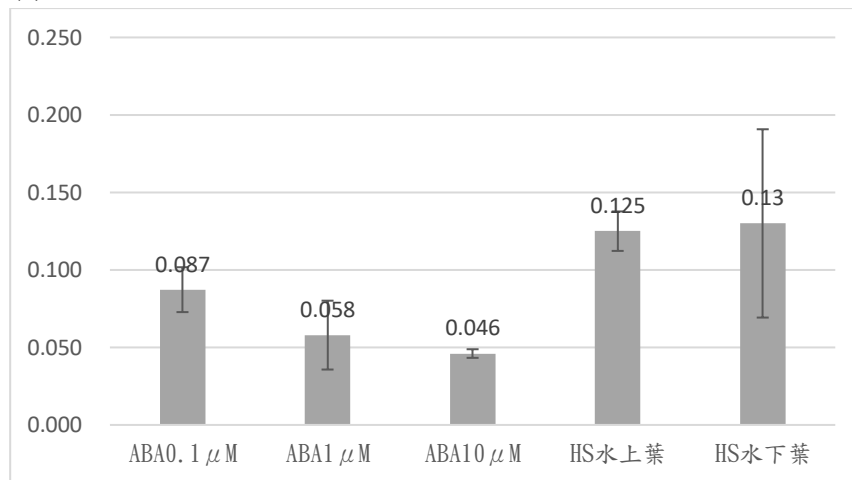
由上表可知外加不同濃度的 ABA 生長出來的葉片氣室比例皆與未經激素處理水上葉有非常顯著的差異，與水下葉則皆無顯著差異。

表十五 ABA 濃度對氣室比例影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.00032	2	0.00016	0.037401	0.963512	5.143253
組內	0.025673	6	0.004279			
總和	0.025993	8				

由上表 F 值 < 臨界值，p>0.05 可知 ABA 濃度不同對氣室比例並無顯著影響。

(c) 柵狀組織比例



圖二十九 外加不同濃度 ABA 對柵狀組織比例之影響

由圖二十九可以發現，ABA 對於葉片之柵狀組織比例可能具有抑制效果，不同濃度 ABA 的葉片柵狀組織比例，皆較未經激素處理之水上葉與水下葉低，且外加 ABA 濃度愈高，抑制效果愈顯著。

表十六 不同濃度 ABA 的葉片厚度與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
水上葉	p>0.05	p>0.05	*p<0.05
水下葉	p>0.05	p>0.05	*p<0.05

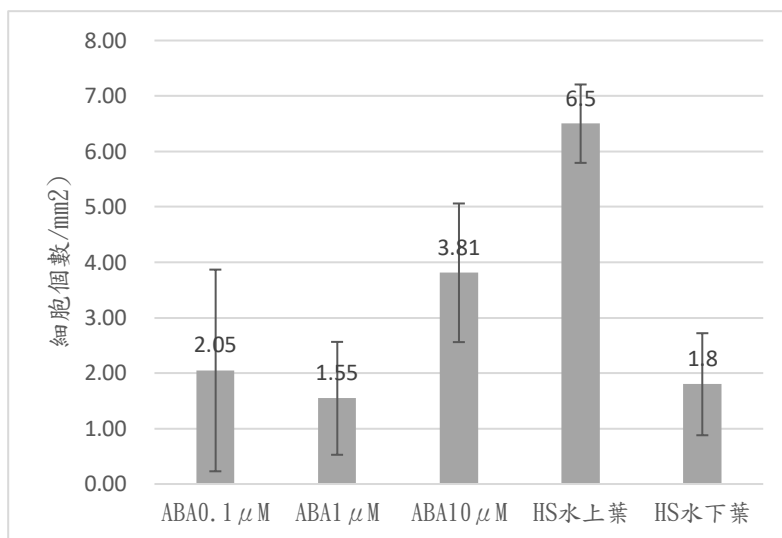
由上表可知外加不同濃度 ABA 後生長出來的葉片柵狀組織比例與水上水下葉之差異大部分不顯著，僅外加 10μM ABA 之葉片與水上水下葉有顯著差異。

表十七 ABA 濃度對柵狀組織比例影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.002701	2	0.00135	5.730099	0.040579	5.143253
組內	0.001414	6	0.000236			
總和	0.004114	8				

由上表 F 值 > 臨界值，*p<0.05 可知 ABA 濃度不同對柵狀組織比例具有顯著影響。

(d) 星狀細胞密度



圖二十九 外加不同濃度 ABA 對星狀厚壁細胞密度影響

由上圖可知外加 ABA 後之葉片，星狀細胞密度皆較 HS 葉片之水上葉少，與水下葉相比較則無顯著差異。

表十八 不同濃度 ABA 的星狀厚壁細胞密度與水上、水下葉比較之 P 值

	0.1μM	1μM	10μM
水上葉	p>0.05	p>0.05	p>0.05
水下葉	p>0.05	*p<0.05	*p<0.05

由上表可知外加不同濃度的 ABA 生長出來的葉片因數據標準大，與水上葉無顯著差異，與水下葉相比則是 1μM 與 10μM 之差異較顯著。

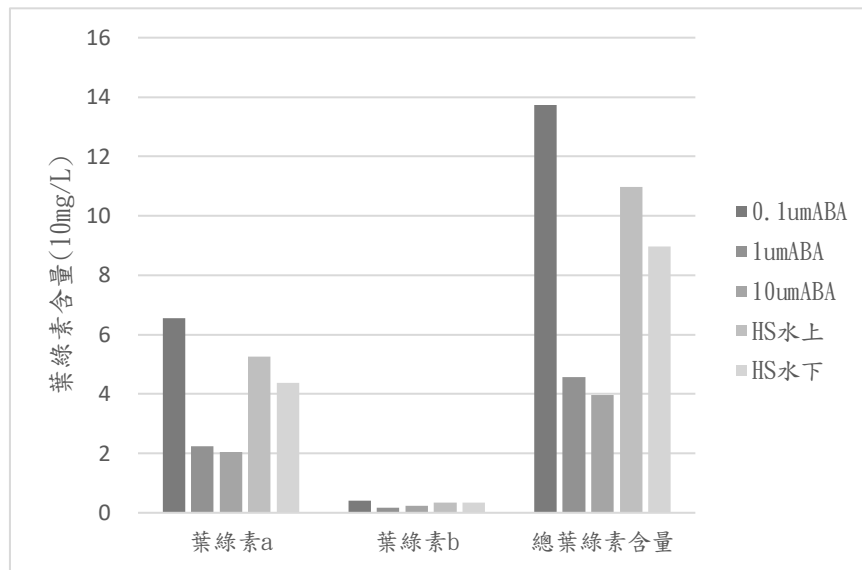
表十九 ABA 濃度對星狀厚壁細胞密度影響之 ANOVA 分析

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	8.482766	2	4.241383	2.153459	0.197273	5.143253
組內	11.81741	6	1.969568			
總和	20.30017	8				

由上表 F 值 < 臨界值，p>0.05 可知 ABA 不同濃度對星狀厚壁細胞密

度並無顯著影響。

C. 色素含量



圖三十 外加不同濃度 ABA 對葉綠素含量比較

表二十 外加各濃度 ABA 與葉綠素含量值(10m/L)

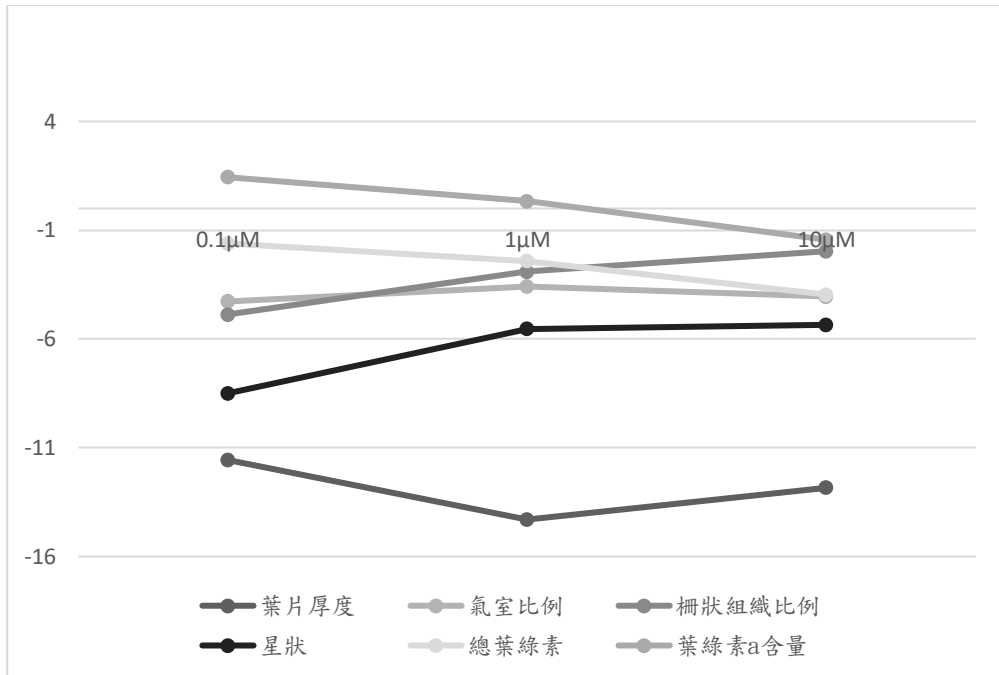
	葉綠素 a	葉綠素 b	總葉綠素含量
ABA0.1μM	6.55	0.40	13.73
ABA1μM	2.23	0.17	4.58
10μMABA	2.04	0.22	3.97
HS 水上葉	5.25	0.34	10.97
HS 水下葉	4.37	0.33	8.96

由圖三十與表二十可以發現，隨著外加 ABA 濃度愈高，葉綠素 a 含量愈低，推論外加 ABA 對於葉綠素 a 合成可能具有抑制效果；葉綠素 b 含量則差異不大；隨著外加 ABA 濃度愈高，總葉綠素含量愈低，主要影響於葉綠素 a 含量。

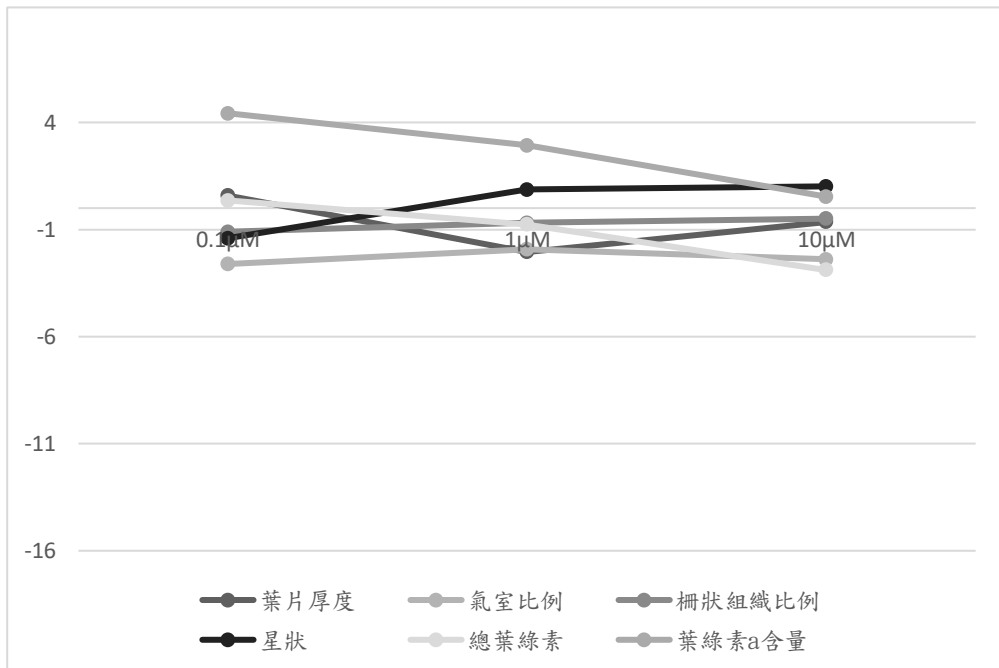
3. 結果統整：

以下數據的計算公式為：

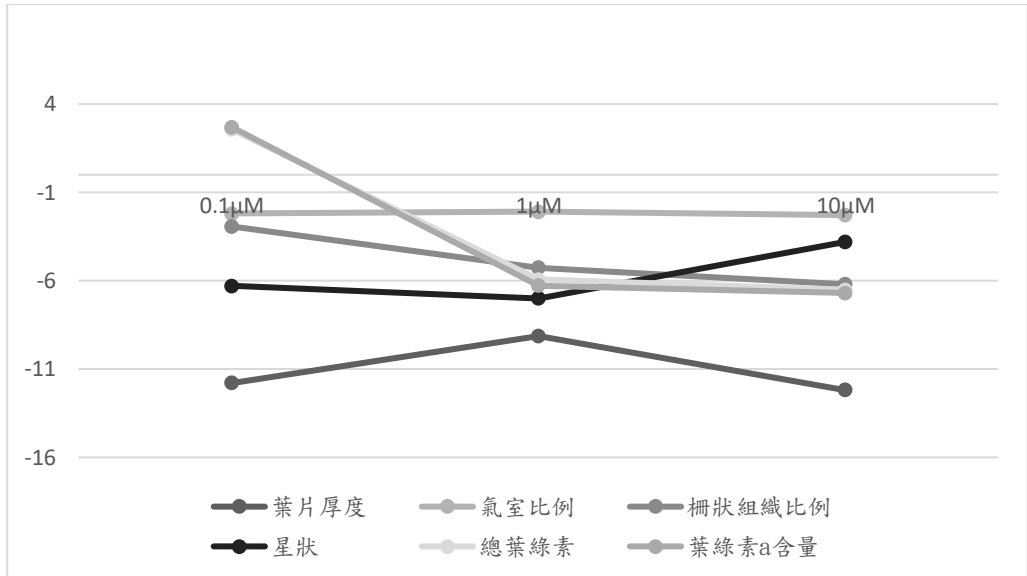
實驗組葉片數據算術平均數 - 對照組數據算術平均數
對照組數據標準差



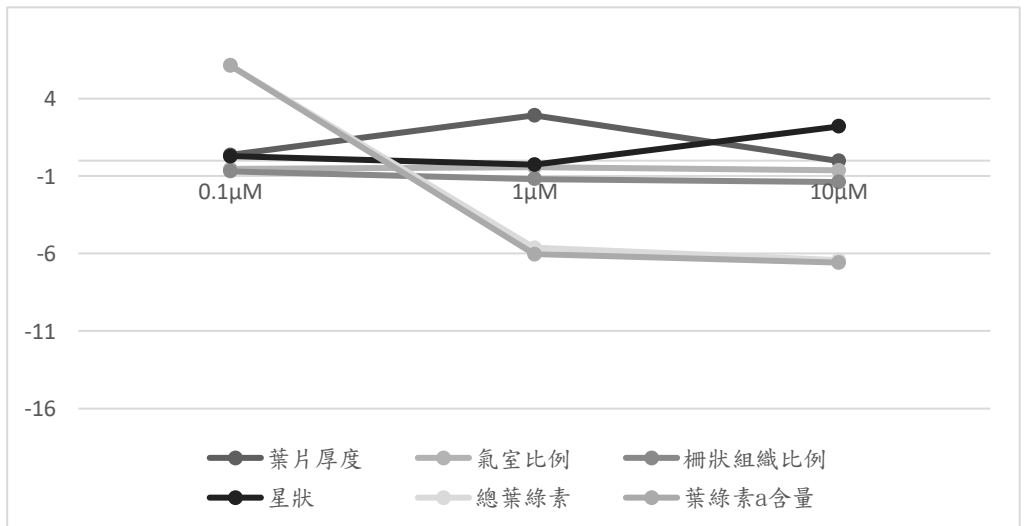
圖三十一 GA treatment index (水上葉)



圖三十二 GA treatment index (水下葉)



圖三十三 ABA treatment index (水上葉)



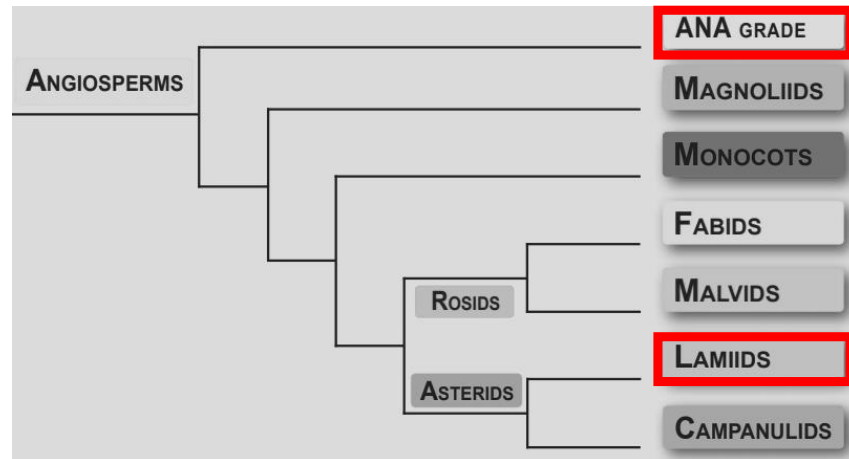
圖三十四 ABA treatment index (水下葉)

由圖三十一到圖三十四的結果，整體而言，外加 ABA 以及 GA 葉片，其構造相關的 index 數值與未經激素處理的水下葉較接近(趨近於 0)，且以 GA 為甚。

前述圖二十四、圖三十中，可以看見葉綠素含量在外加植物激素 GA 與 ABA 時，皆具有明顯的抑制效果。然在經 index 計算比較後可以發現，外加植物激素 GA 與 ABA 對於葉綠素含量的影響並沒有明顯趨近於水上或水下葉的趨勢。

(四)、與不同分類之水生植物比較

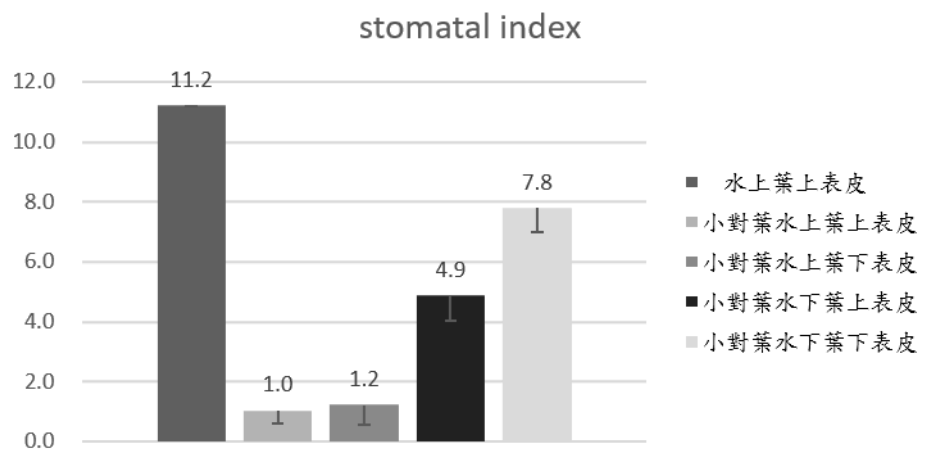
小對葉 (*Bacopa monnieri*，又名過長沙) 為同樣具有葉型兩型性的台灣原生水生植物，屬菊類植物 (Asterids) 中唇型類 (Lamiids) 演化支，而臺灣萍蓬草屬 Basal Angiosperm (基部被子植物，又被稱為 ANA grade) ，以下為小對葉與臺灣萍蓬草之兩型葉比較。



圖三十五 被子植物演化樹

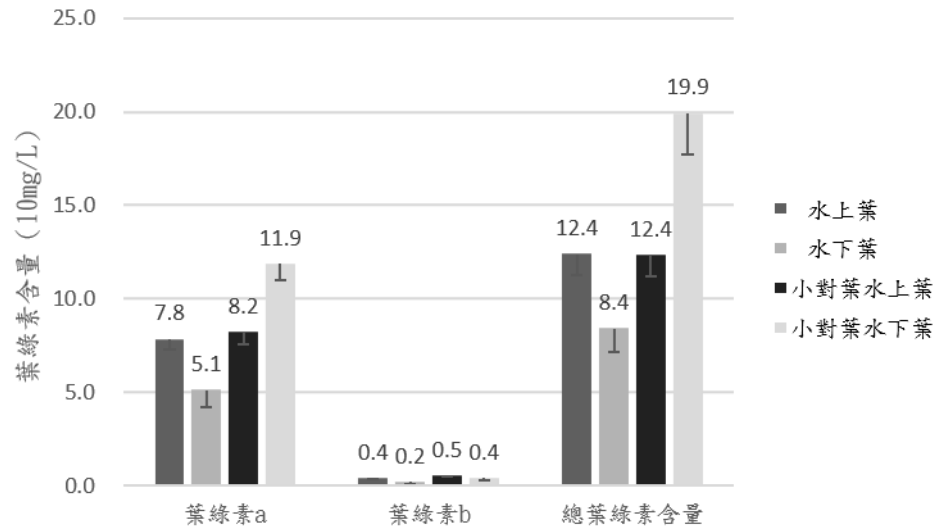
*引用自 Theodor C. H. Cole, Hartmut H. Hilger, Peter F. Stevens (2019) Angiosperm Phylogeny, Flowering Plant Systematics

(1) 與小對葉 (*Bacopa monnieri*) 之差異



圖三十六 小對葉與台灣萍蓬草表皮氣孔指數比較

台灣萍蓬草僅水上葉上表皮具有氣孔，且氣孔指數相當高，小對葉則是上下表皮皆具氣孔，其中以水下葉下表皮指數最高。



圖三十七 小對葉與台灣萍蓬草之葉片葉綠素含量比較(10mg/L)

由上圖可知，台灣萍蓬草水上葉的葉綠素含量（包含葉綠素 a、葉綠素 b，及總葉綠素含量）皆是水上葉較水下葉來的高，而小對葉則相反，皆是水下葉較水上葉高。

四、討論

(一)台灣萍蓬草兩型葉的比較:

台灣萍蓬草 (*Nuphar shimadae Hayata*) 所屬的蓮科植物多有在夏冬交際時葉子型態轉變的情狀，其因素包含光線、氣溫、日照長短等，其中，經過觀察與查詢資料，當生長環境的溫度較高（約 30°C）時生成水上葉；氣溫漸降時則可以觀察到生成的水上葉較小，且水面下開始形成水下葉。因此我們將植物生長室恆溫於 25°C 進行培養。

氣室是水生植物生長時具重要意義的構造，除了有利氣體交換和光合作用，也給予植物浮力和支持力。其中常出現在水生與濕生植物葉片中的裂生性組織具有種屬特異性，由細胞規律分離、分化形成。是以水上葉相較水下葉有超過 25% 的氣室含量，可為生長在水面上葉片提供比水下葉更強的支持力與浮力。

少許水生植物具有角質層，目的為保持氣室的功用與構造。由此推測台灣萍蓬草水上葉具有水生植物少見之角質層，目的為維持氣室以支持水上葉的生長，也防止水周圍環境污垢和微生物污染水上葉葉片表面。

下表為本研究進行水上葉與水下葉生理與構造分析後，推測其代表在不同環境中台灣萍蓬草適應的生理意義。

表二十一 水上葉與水下葉差異之生理意義

機制	保護與支持	促進光合作用速率	利於氣體交換
水下葉	<ul style="list-style-type: none">• 柔軟質地	<ul style="list-style-type: none">• 葉片具皺褶	
水上葉	<ul style="list-style-type: none">• 高通氣組織比例• 多星狀細胞• 具角質層	<ul style="list-style-type: none">• 高葉綠素含量• 具氣孔• 高通氣組織比例	<ul style="list-style-type: none">• 高通氣組織比例• 氣孔

(二)內生型 ABA 在台灣萍蓬草兩型葉之間分布差異甚大

一開始針對台灣萍蓬草的 ABA 萃取方法尚未完善，兩型葉中除了原始分布的不同之外，也可能因為兩型葉質地差異大，基質效應 (Matrix effect) 不相同造成測量結果的偏差。由於各實驗組中原本加入的 d6-ABA 量接近，質譜分析後的結果卻不如預期，在水上葉與水下葉測出的含量相異。由此推測，水上葉基質對於 ABA 的普遍基質抑制效應較強。為了減少基質效應可能造成的影響，我們多次改變萃取配方以求精準。而根據同位索性質相近的原理，d6-ABA 和 ABA 於樣品中的含量仍然可以透過倍數比例計算。

在相異環境溫度下採集台灣萍蓬草葉片，可能造成內生 ABA 含量不同的情形。植物體中的 ABA 含量會在高溫及脫水狀態時，因為生產量增加而上升；低溫、水分在補充時則會因為降解而含量減少

(Roychoudhury A1, Paul S, Basu S. 2013)。在兩次分別採集於 15°C 及 20°C 的葉片中，水上葉及水下葉在 15°C 時的含量相對於 20°C 時分別減少 9% 和增加 40%。

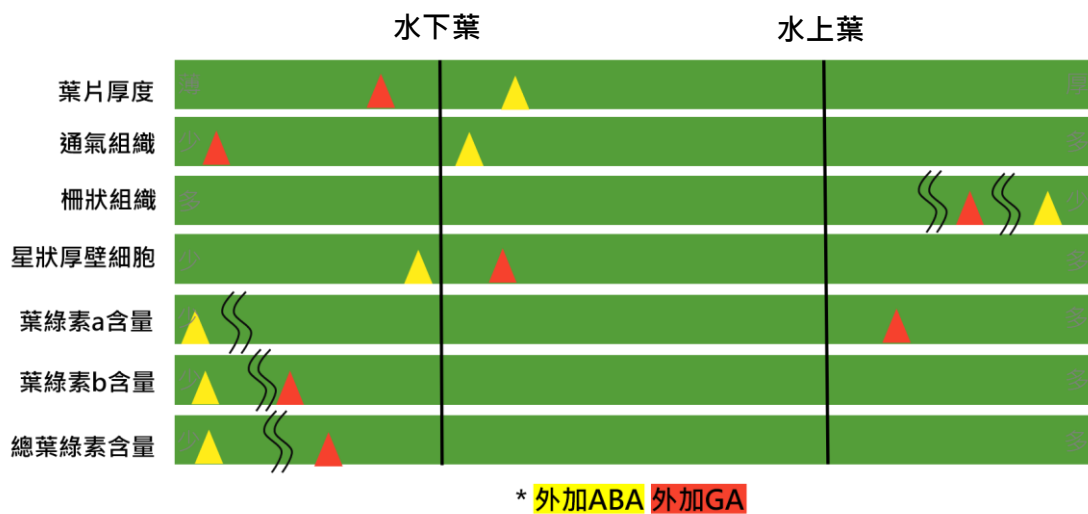
ABA 的含量在水上葉明顯較高，其中未發育完成之幼葉含量明顯較高，推測 ABA 在決定形成葉片型態過程中，具有傳遞訊息的效果，且分子在幼葉成熟的過程中會被降解。過去的研究中指出，部分具有兩型性特性的植物，葉片發育過程中不同時段對其外加植物激素刺激，則會有相異的結果。舉例而言，針對原始環境應會發育成水下葉的幼葉作處理外部 ABA 刺激，會使葉片發育結果接近水上葉；針對成葉則不會有葉型轉換的效果。推測台灣萍蓬草中的葉片發育機制亦有相似機制，植物激素 ABA 與 GA 作用於幼葉而決定葉型發育方向，發育成成葉後，激素即降解。實驗中以水上葉幼葉進行萃取及質譜分析，發現幼葉中的 ABA 含量和成葉有近二倍的差異，支持上述假設。

植物體內 GA 種類有超過 126 種，具有生物活性者種類各異，目前技

術難以質譜分析進行各別 GA 含量測定與比較。過去研究的論文中

(Satoko et al., 2016)，對於植物兩型葉的調控，GA 與 ABA 多有拮抗的效果。由以上研究及外加 GA 實驗結果推測，台灣萍蓬草葉片內 GA 含量也與葉型相關，且水下葉及具有部分水下葉特性葉片中的 GA 含量較高。

(三)外加激素實驗與對照組之結果比較圖



圖三十八 外加激素實驗與對照組之結果比較圖

外加激素結果分析

1. 總體趨勢：外加 ABA 以及 GA 皆較接近水下葉
2. 葉片構造分析：外加 ABA 以及 GA 皆較接近水下葉
3. 生理性質分析：葉綠素含量無明顯趨勢，推測其生成量與外加激素 ABA 與 GA 無關

(四)與其他水生植物比較分析

1. 台灣萍蓬草與小對葉的差異：台灣萍蓬草僅水上葉具氣孔，小對葉則是水上葉與水下葉的上、下表皮皆具氣孔，推測與兩者在演化上分支不同有關。
2. 臺灣萍蓬草與過往研究植物之差異：臺灣萍蓬草外加激素後呈現

的特性與前人研究有所不同，大部分具兩型葉的植物以外加 ABA 較接近水上葉，外加 GA 較接近水下葉。臺灣萍蓬草在兩種情況皆較接近水下葉，可能因為其屬於被子植物早期的演化支 Basal Angiosperm，對植物激素刺激產生的反應與較高等植物不同所致。

五、結論與應用

- (一)、臺灣萍蓬草水上葉與水下葉分別以不同的生理構造保護與支持葉片、提升葉片光合作用效率，以利在差異甚大的環境中生存。
- (二)、過往研究結果多指出，具有兩型葉的植物外加 ABA 者較接近水上葉，而外加 GA 較接近水下葉。在我們的實驗中，則是葉片構造分析方面兩者皆較接近水下葉，以 GA 更甚；而在生理性質方面較無明顯趨勢。
- (三)、臺灣萍蓬草與其它具有兩型葉的植物在生理方面有所不同，可能與臺灣萍蓬草屬早期演化出的被子植物有關。

六、參考文獻

- (一)、臺灣水生植物圖誌修訂版, 2019 年 2 月 1 日
- (二)、 Chhabil Dass(2007), Fundamentals of contemporary mass spectrometry
- (三)、 Daphne J. Osborne, Michael T. McManus. (2005) Hormones,
- (四)、 Signals and Target Cells in Plant Development
- (五)、 David S. Ingram, Daphne Vince-Prue and Peter J. Gregory(2016). Science and the Garden: The Scientific Basis of Horticultural Practice, Third Edition. Diversity in the Plant World, The plant environment: light and water.
- (六)、 Erich Grotewold, Joseph Chappell, Elizabeth A. Kellogg(2015), Plant Genes, Genomes and Genetics.
- (七)、 Hokuto Nakayama, Neelima R. Sinha, and Seisuke Kimura(2017). How Do Plants and Phytohormones Accomplish

Heterophylly, Leaf Phenotypic Plasticity, in Response to Environmental Cues, *Front Plant Sci* 2017; 8: 1717.

- (八) 、 Li G, Hu S, Yang J, Schultz EA, Clarke K, and Hou H (2017). Water-Wisteria as an ideal plant to study heterophylly in higher aquatic plants. *Plant Cell Rep.* 2017 Aug;36(8):1225-1236
- (九) 、 Offwell Wetland Survey, 2019 年 2 月 8 日
http://www.countrysideinfo.co.uk/wetland_survey/wslinks.htm
- (十) 、 Roychoudhury A1, Paul S, Basu S (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress..., *Plant Cell Rep.* 2013 Jul;32(7):985-1006.
- (十一) 、 Satoko Iida, Miyuki Ikeda, Momoe Amano, Hidetoshi Sakayama, Yasuro Kadono, and Keiko Kosuge(2016). Loss of heterophylly in aquatic plants: not ABA-mediated stress but exogenous ABA treatment induces stomatal leaves in *Potamogeton perfoliatus* *Journal of Plant Researches* 2016, Vol129, p 853-862
- (十二) 、 Sculthorpe CD (1967) *The biology of aquatic vascular plants.* Edward Arnold, London
- (十三) 、 Tracy Lawson and James IL Morison(2004). *The evolution of Plant Physiology. Stomatal function and physiology*
- (十四) 、 Theodor C. H. Cole, Hartmut H. Hilger, Peter F. Stevens (2019) *Angiosperm Phylogeny, Flowering Plant Systematics*
- (十五) 、 Wells C, Pigliucci M (2000). Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 3:1–18. doi: 10.1078/1433-8319-00001
- (十六) 、 William C. Dickison(2000), *Integrative Plant Anatomy. Ecological Anatomy*
- (十七) 、 <http://subject.forest.gov.tw/species/aquaplants/index-1.htm>

附錄:

沉、水上葉之葉片型態與差異整理表

	葉型	星狀厚壁細胞	角質層	表皮細胞形狀	表皮細胞密度	顏色	葉綠素含量	柵狀細胞比例	氣孔	氣室比例	內生 ABA
水上葉	橢圓、平整	多	有	不規則	浮水葉上表皮次之	較深	多	多	有(上表皮)	高	多
水下葉	橢圓、具皺褶	少	無	規則	沉水葉下表皮最高	較淺	少	少	無	低	少

【評語】 060013

本研究針對植物賀爾蒙對台灣萍蓬草的兩型葉發育進行探討，內容具基礎學術研究價值。作者對評審的問題也很清楚，可惜本作品雖已有 GA 與 ABA 對兩型葉發育影響的初步資料，但不足以確定明確的結論，需再進一步探討。