

---

# 乾旱逆境下法國秋海棠(*Begonia coccinea*) 形成氣孔簇以減少水分蒸散的機制探討

顏佳怡 黃巧恩 高于鈞 喻雅庭 房樹生\*

國立臺南家齊女子高級中學

## 壹、前言

前人的研究發現了秋海棠在遭遇乾旱、高鹽、乙炔等逆境時，會形成大量的氣孔簇，且當逆境解除時，氣孔簇數量會下降成原來的水準。她們也進一步發現氣孔簇數量的增加是為了減少水分的蒸散，是一種陸生植物的特殊適應方式（邱相齡，2013）。

我們接下來想探討的問題是：為什麼氣孔簇數量的增加可以導致水分蒸散量的減少？氣孔簇的增加在直觀上反而是造成氣孔變多，但結果卻會減少水分蒸散，我們對此現象十分感興趣，氣孔簇的觀察利用指甲油印模法也相對簡單，在量化上很容易，十分適合高中生操作。

另一個想問的問題是：氣孔簇的形成與細胞骨架微絲蛋白有關嗎？高中基礎生物課本內提到氣孔內有許多微纖維，藉以協助氣孔的開啟與關閉（施河，2010；Campbell，2005），我們聯想到新形成氣孔簇時，微絲蛋白是否也扮演重要的角色。

氣孔由兩個保衛細胞及數個副保衛細胞包圍形成，是植物非常重要的構造，

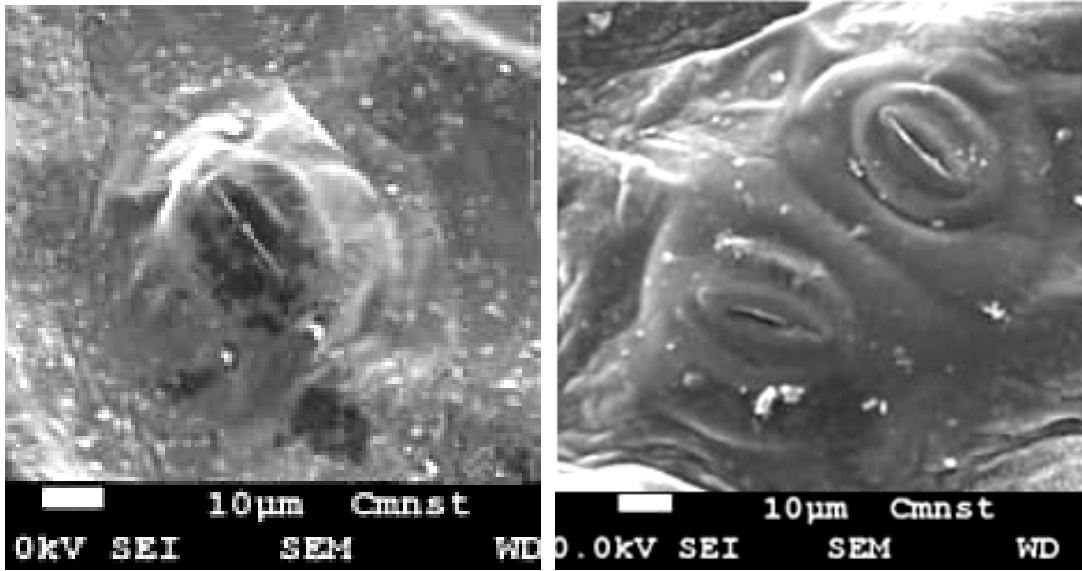
控制著植物水分運送以及氣體的進出，植物體可以藉著氣孔的開關來調節體內的水分，也可影響植物行光合作用。當陸生植物面臨到缺水的困境時，為了防止水分散失過快，有些植物形成了「氣孔簇」這個特殊的機制，目前已發現約有 60 多種植物有此特徵（GAN，2010）。與正常單一氣孔不同的是，氣孔簇是由兩個或兩個以上的氣孔聚集所構成的(圖一)。

秋海棠的氣孔簇數量在老葉比新葉多，且大多分布於靠近葉柄的葉基維管束附近（邱相齡，2013），因此，本實驗皆固定採樣由上而下數的第二片葉片，且觀察的部位集中在葉基部靠近維管束附近。

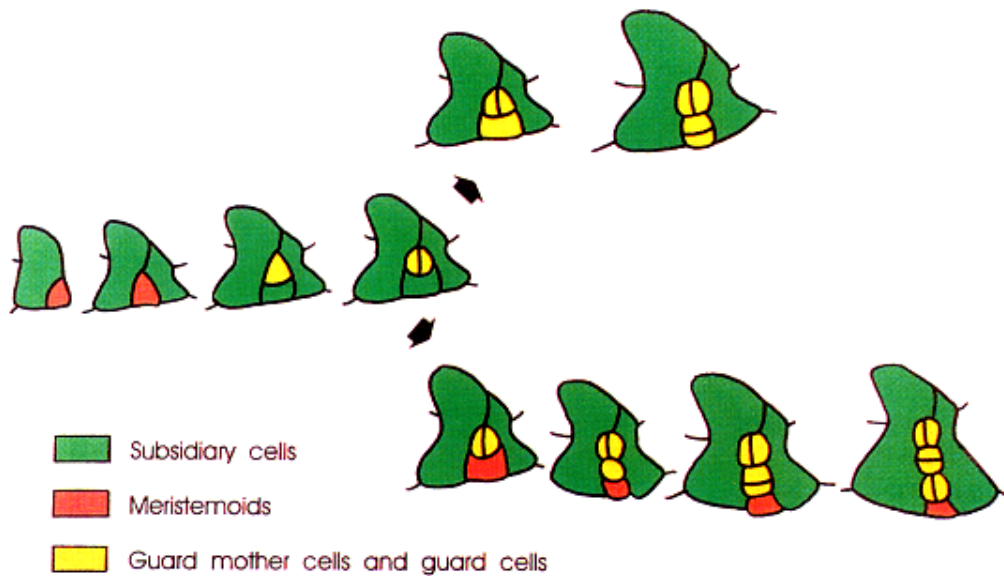
氣孔簇的發育形成過程如圖二所示（Serna，1997），一開始是由原皮細胞（protodermal cell; PC）分裂成一個大的副保衛細胞（subsidiary cell; SC）及一個小的擬分生組織（meristemoids; M），具分裂能力的 M 再分裂成一個 SC 及 M，M 最後分裂成一個 SC 及一個特化的保衛母細胞（guard mother cell; GMC），GMC 再分裂及分化成 2 個保衛細胞（guard cell; GC）。

---

\*為本文通訊作者



圖一 法國秋海棠的氣孔及氣孔簇。左為單一氣孔，右為氣孔簇。(攝於成大微奈米中心)



圖二 氣孔簇的發育過程圖示。綠色為副保衛細胞 (SC)，紅色為擬分生組織 (M)，黃色為保衛母細胞 (GMC) 或保衛細胞 (GC) (此圖取自 Serna, 1997)。(此圖為接觸型氣孔簇，秋海棠大多為非接觸型氣孔簇)

一般植物常見的單一氣孔到此就停止分化了，但具氣孔簇植物的那一個小的 SC 有 2 種可能，圖形上方的 SC 特化成

GMC，GMC 再分裂及特化成 GC，便形成了兩個氣孔聚集的氣孔簇。圖形下方的 SC 特化成 M，M 再分裂及分化成一個 M 及

一個 GMC，GMC 分裂產生兩個 GC，一直重複以上步驟即可產生三個以上氣孔聚集的氣孔簇。

微絲是由肌動蛋白 (Actin) 組成，直徑約為 7nm 的纖維結構，在高等植物的保衛細胞內可發現有微絲骨架的存在，而微絲骨架會隨著信號的不同形成不同的結構，微絲骨架能夠快速的影響刺激發生聚合及解聚的動態變化，此說明了保衛細胞的微絲骨架可能參與調節氣孔的開關。(尚玉梅，2003)

另有證據顯示微絲抑制劑 N-ethylmaleimide(NEM)會影響花粉管萌發與伸長(張學琴，2006)，我們也想利用 NEM 來探討微絲在氣孔簇形成時是否也扮演了重要的角色。

## 貳、研究目的

- 一、探討在乾旱逆境條件下，秋海棠形成氣孔簇以減少水分散失的機制為何。
- 二、探討微絲抑制劑 N-ethylmaleimide (NEM)是否會影響氣孔簇的形成。

## 參、研究設備及器材

- 一、生物材料：  
法國秋海棠 (以 5 吋塑膠盆培養)
- 二、儀器設備：  
照度計、光學顯微鏡 (NIKON E100)、電子磅秤、掃描式電子顯微鏡 (JSM-7001F, 成大微奈米中心)、量筒、燒杯、有刻度的塑膠滴管
- 三、其他器材及藥品：

N-ethylmaleimide(NEM)、載玻片、透明膠帶、剪刀、透明指甲油、標籤紙、秤量紙

## 肆、研究步驟與方法

### 一、乾旱逆境處理

1. 自園藝店挑選 4 盆 5 吋盆的法國秋海棠 (大小及生長狀態盡量一致)，置於學校生物實驗室中，室溫培養，600lux 的光照下，每天澆水 30mL，至少馴養一周以上。
2. 設計 4 種不同水量 20ml、15ml、10ml、5ml，每星期一、三、五澆水。
3. 分別於第 0 天、7 天、14 天，取由上而下數來第二葉的基部，以指甲油印模法製成玻片，再進行 SD、SI、CI 的測量及利用 imageJ 軟體進行氣孔開啟面積的測量。(相關的定義如下方所示)
4. 計算並觀察不同時間下，各植株 SD、SI 及 CI 與氣孔開啟面積相對值的變化百分比。(為了去除不同株植物之間的差異，我們的量化選用相對值的變化百分比而不是絕對的單一數值，以下實驗皆是如此。)

### \* 氣孔密度 (stomatal density; SD):

在顯微鏡下放大 400 倍之後，每平方公釐的氣孔數目。而實際在實驗時，是在顯微鏡放大下，計算在長寬各為 0.04 mm<sup>2</sup> 的面積內的保衛細胞數目 (Ns)，然後再乘以 2 (因為一個氣孔是由兩個保衛細胞圍繞而成)，接著除以 0.04，以換算得知每平方公釐有

多少個氣孔。

\* 氣孔係數(stomatal index; SI) :

指在每平方公釐內的保衛細胞數目與表皮細胞數目(Ne)總和中有多少個氣孔，所以是  $2Ns/(2Ns+Ne)$ 。

\* 氣孔簇發生率 (clustering index ; CI) :

分別在秋海棠的指甲油印膜上隨機取十個視野，計算共出現多少次氣孔簇，再除以十，以平均一個視野出現多少次氣孔簇。

\* 氣孔開啟面積相對值的計算

分別在秋海棠的指甲印模上隨機取十個單一氣孔和十個氣孔簇，利用 imageJ 軟體分別計算出單一氣孔與氣孔簇的氣孔開啟面積與保衛細胞面積，再將氣孔開啟面積除以保衛細胞面積，以測量單一氣孔及氣孔簇氣孔的開啟面積的相對比值 (氣孔開啟面積 / 保衛細胞總面積)。

## 二、先正常水分條件馴養，再以乾旱水量的不同濃度 NEM 處理

1. 將 NEM 以蒸餾水配置成 1000ppm 的儲存溶液，再稀釋成 1ppm、10ppm、100ppm、500ppm 溶液備用。
2. 選取 5 株法國秋海棠，兩週每一、三、五澆水 20ml，持續 2 周 (正常水分條件馴養)。
3. 每星期一、三、五分別以 0ppm、1ppm、10ppm、100ppm、500ppm 的 NEM 水溶液各澆 10ml。
4. 取第 0、7、14 天的葉子，利用指甲油

印模法做成玻片，再進行 SD、SI、CI 的測量，並利用 imageJ 軟體測量單一氣孔及氣孔簇氣孔的開啟面積的相對比值 (氣孔開啟面積 / 保衛細胞總面積)。

5. 比較不同乾旱時間及不同 NEM 濃度處理下，各植株 SD、SI、CI 及單一氣孔及氣孔簇氣孔的開啟面積的相對比值的變化趨勢。

## 三、先乾旱水分條件馴養，再以乾旱水量的不同濃度 NEM 處理

1. 選取 5 株法國秋海棠，兩週每一、三、五澆水 10ml，持續 2 周 (乾旱水分條件馴養)。
2. 其餘不同濃度的的 NEM 處理方式同上述二的步驟。

## 伍、研究結果

### 一、乾旱逆境處理

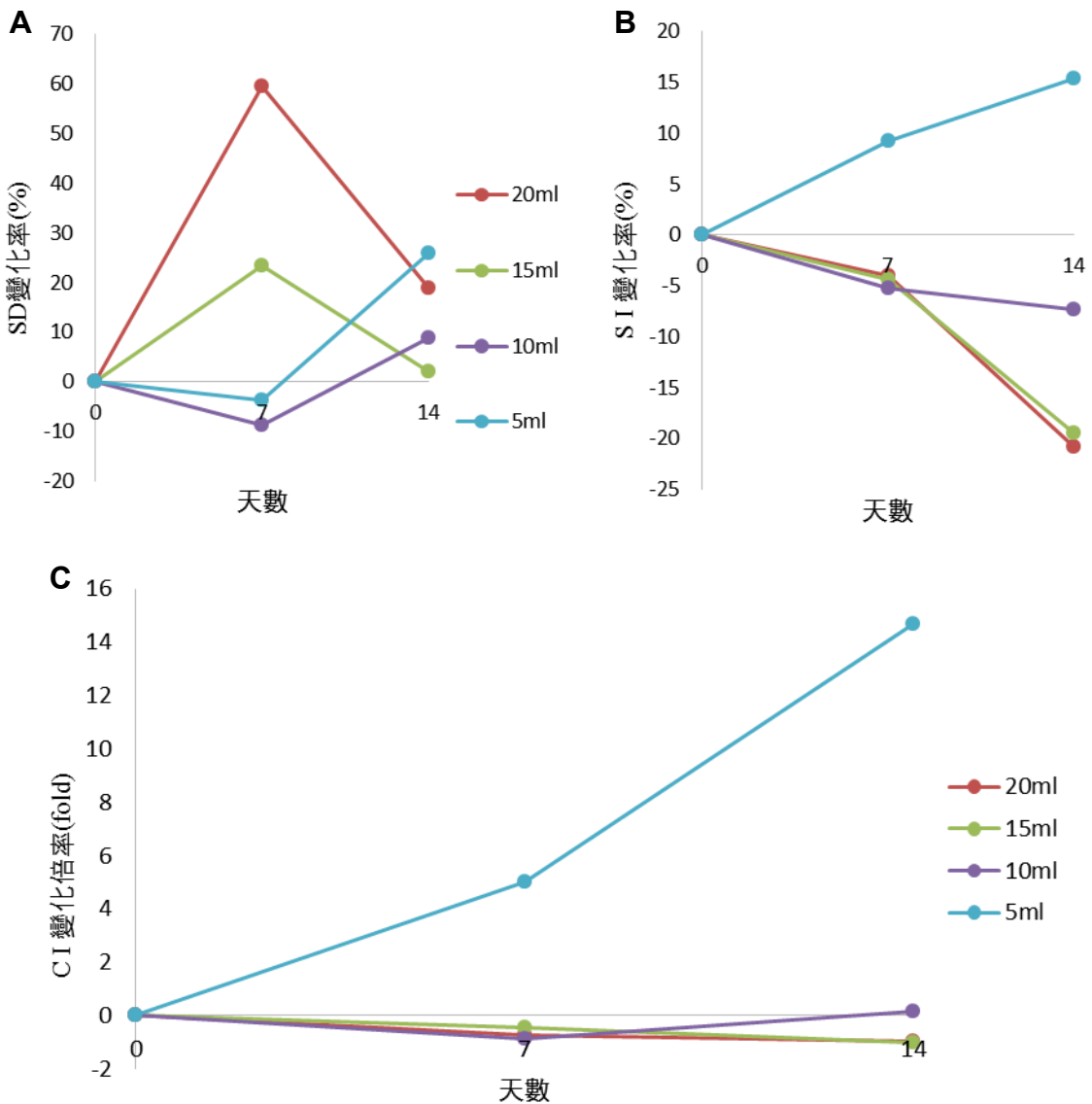
秋海棠的 SD 變化率大致可分為 20ml、15ml (水分多) 及 10ml、5ml (水分少) 兩種趨勢 (圖三 A)。20ml、15ml 在第 7 天的上升趨勢，推論其尚未能完全適應所給予的水分條件，造成單位面積下氣孔數目增加，而再經過一周後才呈現下降趨勢。而 10ml、5ml 在第 7 天亦在未完成適應的情況下呈現下降趨勢，不過一周後有大幅度上升，且 5ml 的氣孔數目最多。

SI 是在相同視野大小下所看到的氣孔數目與表皮細胞數目的比值。由圖三 B 可知，在乾旱的 5ml 水量處理下，SI 變化

率隨時間的增加一直變大，且皆為正值，其餘水量條件，SI 變化率皆為負值。這代表在 5ml 的處理下，氣孔的相對數量增加非常明顯，推測增加的氣孔可能轉變為氣孔簇聚集。

CI 值為固定視野下的氣孔簇數量的多寡。隨著時間的增加，水量最少的 5mL，

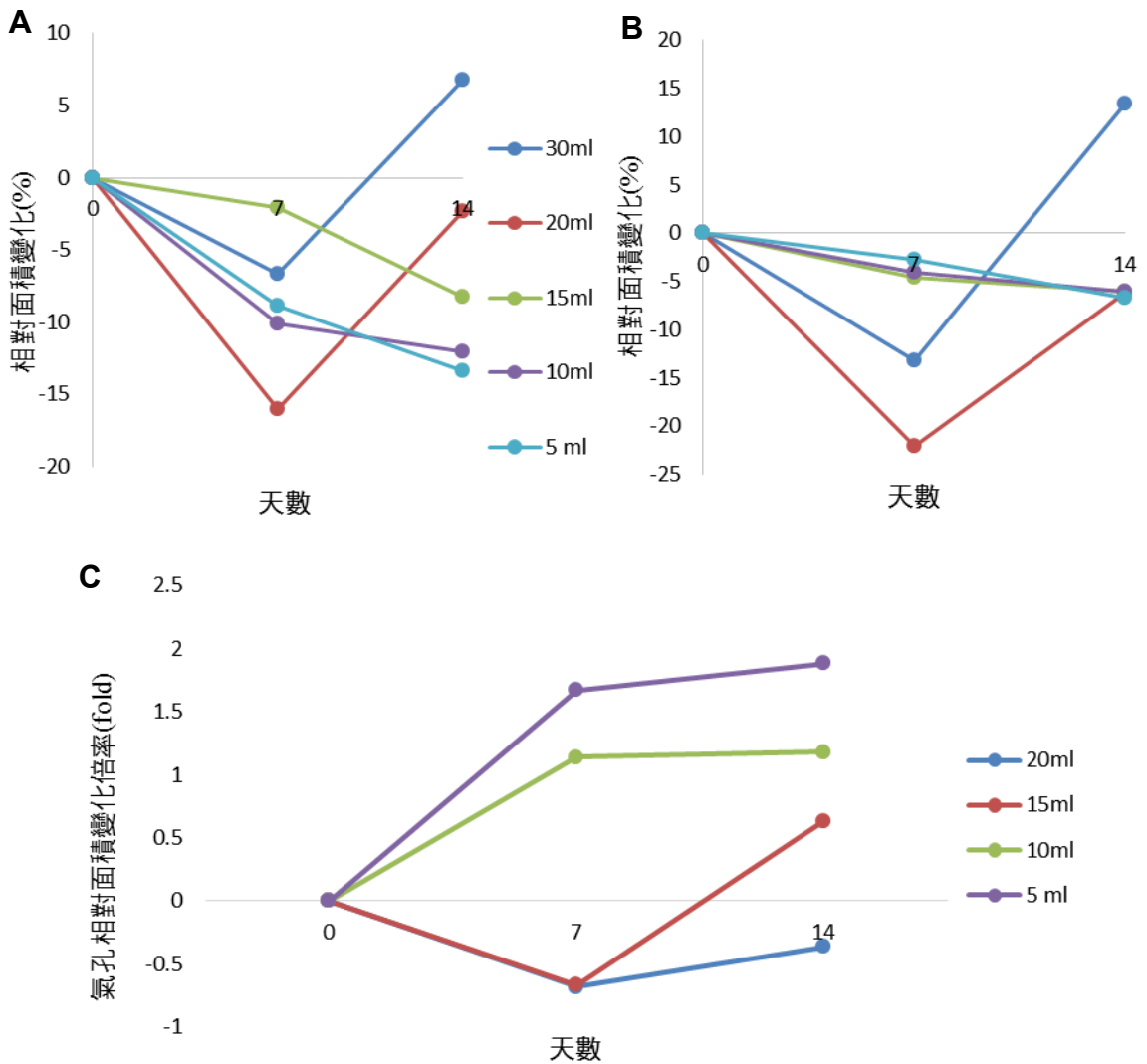
CI 變化倍率也大幅度上升（圖三 C），其餘水量條件的 CI 變化倍率不大，這個結果與 SI 變化率曲線完全吻合，代表在乾旱條件下，大量增加的氣孔大多聚集形成氣孔簇。這個結果也再次證實乾旱逆境確實會誘發氣孔簇數量的大量增加（邱相齡，2013）。



圖三 不同水分條件處理。A：SD 變化率；B：SI 變化率；CI 變化倍率

在邱相齡等人的研究中發現，氣孔簇數量增加的同時，水份的蒸散量也隨之下降。我們接下來感興趣的問題是，為何氣孔簇數量上升會導致水分蒸散量下降？由圖四 A、B 可發現，水分較多的 20ml，氣孔的開啟面積大小隨著時間的增加呈現先降後升的趨勢，水分較少的 5ml、10ml、

15ml 皆呈現下降的趨勢，把兩種類型氣孔的開啟面積大小差異來做圖比較，結果如圖四 C 所示，水分較少的 5ml、10ml 處理下，單一氣孔開啟的面積都比氣孔簇氣孔還要來的大（因為差異值為正），且隨著時間增加，差異會擴大。水分較多的 15ml、20ml 就沒有以上的趨勢。



圖四 不同水分條件處理下，氣孔開啟相對面積的變化。  
 A：氣孔簇氣孔的變化；B：單一氣孔的變化；C：氣孔簇氣孔與單一氣孔開啟面積的比較  
 [第 N 天 (單一氣孔-氣孔簇氣孔) / 氣孔簇氣孔 - 第 0 天] / 第 0 天

由圖四的結果，我們推論：隨著乾旱時間的增長，氣孔簇氣孔的開啟面積會越來越小，而單一氣孔則變化不大，也就是說，乾旱條件所大量誘發產生的氣孔簇，可以使得水分的蒸散量變少，增加陸生植物在陸地的生存優勢。

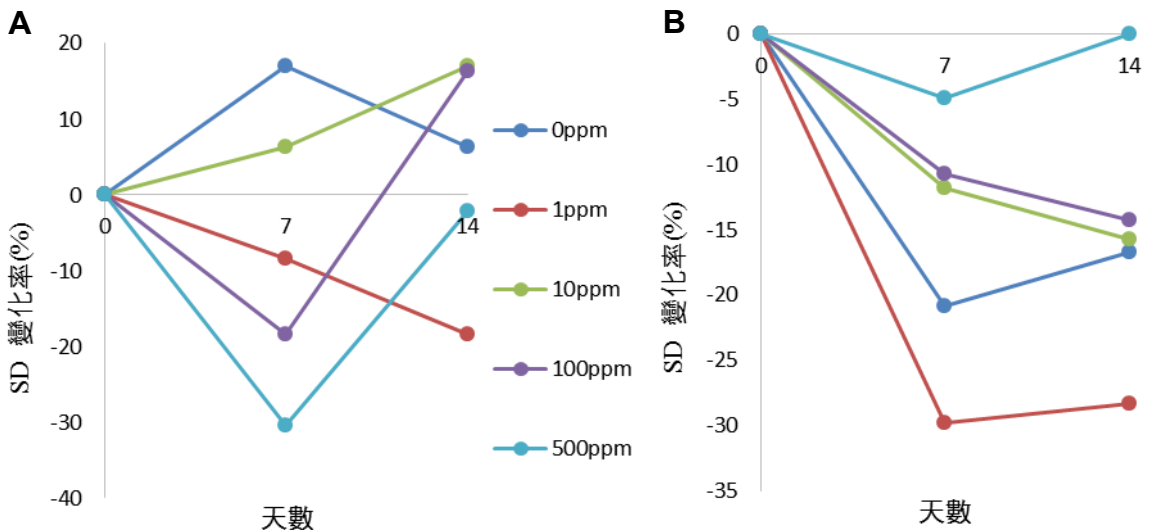
## 二、不同馴養條件下，以乾旱水量的 NEM 處理

上述圖三、四的實驗結果已經證實乾旱會誘發氣孔簇的生成，但若在乾旱的培養條件下加入微絲蛋白抑制劑 NEM，氣孔簇的數量是否也會受到抑制而減少呢？為了更加清楚知道 NEM 的影響效果，我們做了兩種實驗設計：正常水份馴養兩周後，再利用乾旱水量的 NEM 處理；以及乾旱水份馴養兩周後，再利用乾旱水量的

NEM 處理。我們預期第一種設計的各種量化指標，差異會比較顯著。

由圖五 A 可知，低濃度 0、1ppm 的 NEM 處理時，SD 變化率皆為正，代表氣孔數目隨著乾旱時間增加而增加，推測部分增加的氣孔會轉變形成氣孔簇。而 NEM 濃度較高的 100、500ppm 植株，SD 大多為負值，推測原本在乾旱條件應該大量產生的氣孔簇，可能受到 NEM 的影響而被抑制。

由圖五 B 可知，SD 變化率的值皆為負，且隨著 NEM 濃度的增加，SD 變化率負值越不明顯，我們推測是因為，先經乾旱處理 2 周後，已經有大量氣孔簇被誘發生成，氣孔數目偏高，再來的 2 周乾旱處理，新生成的氣孔就不會太多，因此隨著 NEM 濃度上升，抑制效果越不明顯。



圖五 不同 NEM 濃度處理下 SD 的變化率。A：正常水份馴養；B：乾旱水份馴養

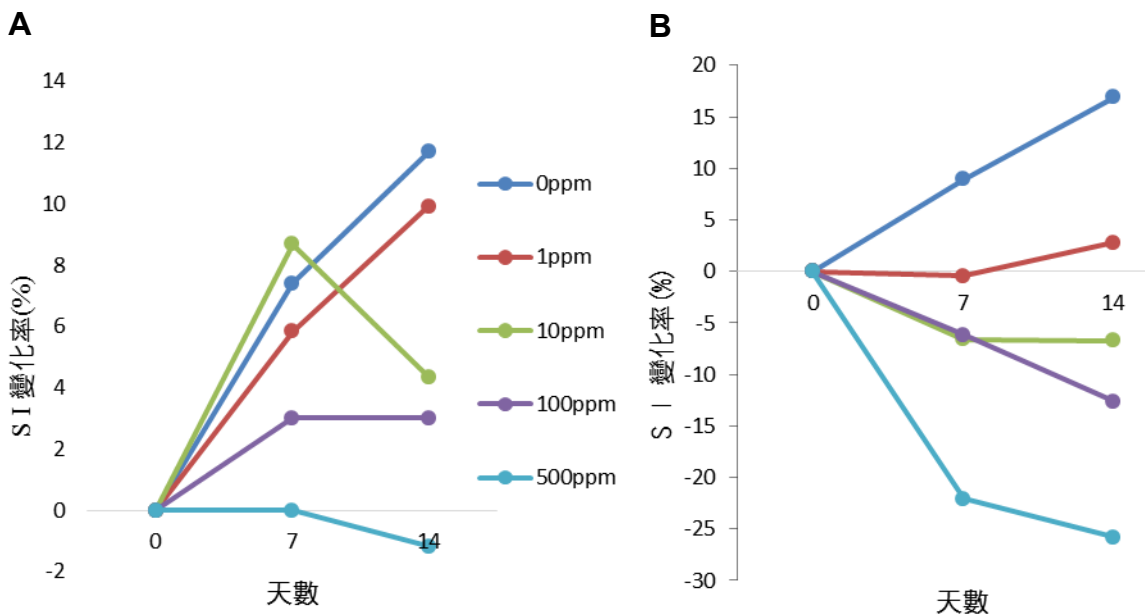
由圖六 A 可知，在各種 NEM 處理濃度下，SI 變化率值幾乎皆為正，但 SD 變化率在高濃度 NEM 處理下，幾乎皆為負（見圖五），這代表高濃度 NEM 不只會抑制氣孔形成，也會抑制表皮細胞的形成。

由圖六 B 可發現，在高濃度 NEM 濃度處理下，SI 變化率的值為負，低濃度的 SI 變化率值為正，這代表 NEM 抑制表皮的形成比抑制氣孔的形成更明顯。

由圖七 A 可知，秋海棠先置於正常水分條件（20ml）2 周後，再以乾旱水量（10ml）的不同濃度 NEM 處理後，對照組 0ppm 的曲線，乾旱效應非常明顯，氣孔簇被大量誘發，但隨著 NEM 濃度上升，原本應該大量出現的氣孔簇，不升反降，

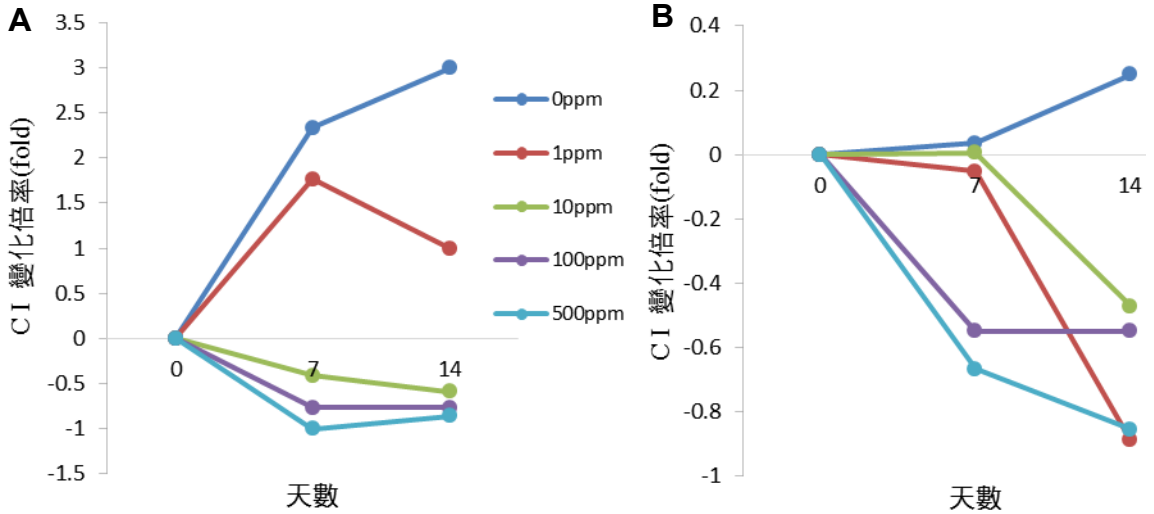
CI 的變化倍率曲線斜率轉為負值，代表氣孔簇的形成確實會被 NEM 所抑制，這暗示著氣孔簇的形成與微絲蛋白的生合成有密切相關。

由圖七 B 可知，除了對照組 0ppm 以外，在各種 NEM 濃度處理下，CI 變化倍率的值皆為負，且隨著濃度增加，CI 的負值越大。這代表 NEM 確實會抑制氣孔簇的生成。與圖七 A 相比，此圖的 CI 變化倍率差異變小，因為先經 2 周乾旱後，氣孔簇數量在第 0 天就已經達高峰，再經乾旱及 NEM 處理下，其 CI 變化倍率差異較小，但隨著 NEM 濃度上升，CI 變化倍率仍有下降的趨勢，這結果進一步確認了氣孔簇的生成與微絲蛋白有密切的相關性。



圖六 不同 NEM 濃度處理下 SI 的變化率。A：正常水分馴養；B：乾旱水分馴養



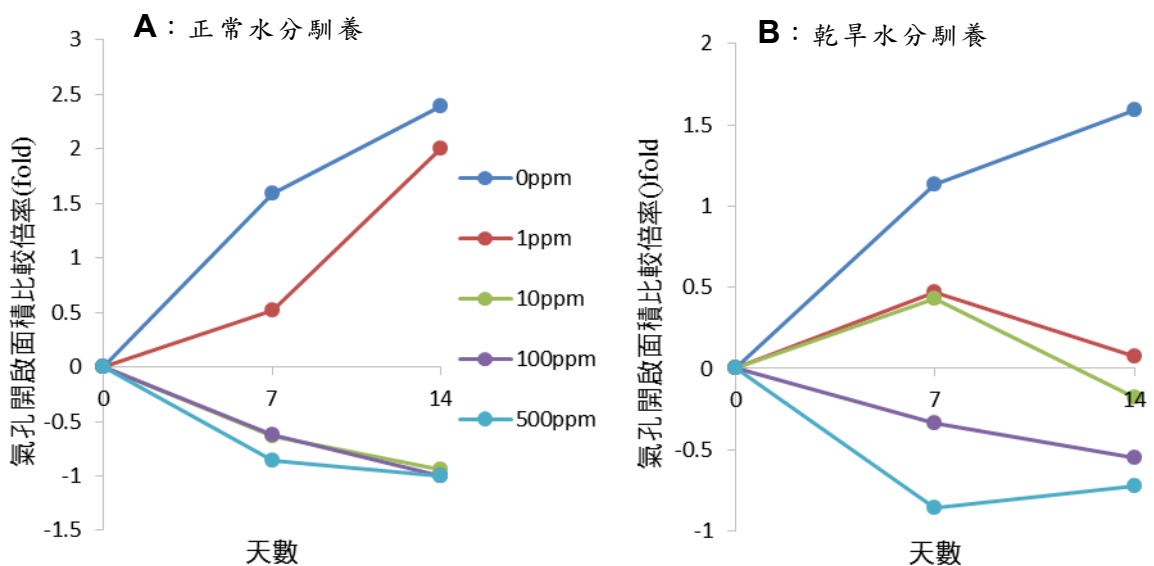


圖七 不同 NEM 濃度處理下 CI 的變化倍率。A：正常水分馴養；B：乾旱水分馴養

在乾旱的處理下，不論是氣孔簇的氣孔或是單一氣孔的開啟面積都應該隨著處理時間的增加而越來越小（見圖四）。但如果我們在乾旱的同時另外再加上不同濃度的 NEM，結果會如何呢？在圖八 A 可以看到，經 NEM 處理的秋海棠，其氣孔簇數量及氣孔的關閉會受到 NEM 的雙重抑制，因此 NEM 對於氣孔簇氣孔的開啟影

響比單一氣孔要來的大，高濃度 NEM 處理的面積差異數值為負，低濃度的 NEM 則數值為正。

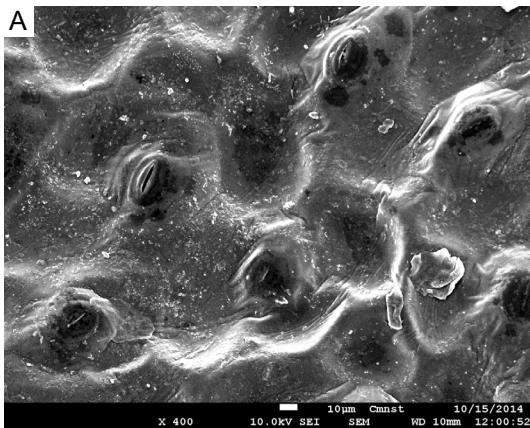
圖八 B 的結果與圖八 A 類似，可以更进一步確認，NEM 對於氣孔簇氣孔的開啟影響比單一氣孔要來的大，唯一的不同在於圖八 A 的面積差異值較大。



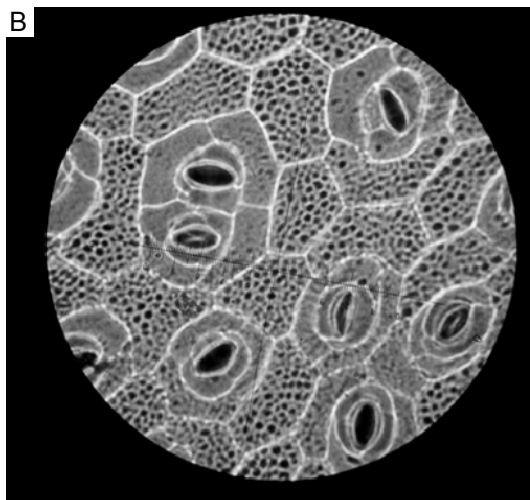
圖八 不同 NEM 濃度處理下，氣孔簇氣孔與單一氣孔開啟面積的比較。

## 陸、討論

一開始我們為了精確測定測定氣孔的開啟面積，想嚐試用 SEM 拍攝，但 SEM 拍攝前需將葉片脫水處理，造成下表皮及保衛細胞皺縮，細胞變形嚴重（圖九 A），影響面積測定，最後還是只好採用較不精確的印模法測定（圖九 B）。



A：SEM 400X



B：指甲油印模法 LM 400X

圖九 秋海棠氣孔及氣孔簇

氣孔簇的特徵目前已可在 60 多種陸生植物中發現（GAN, 2010），在邱相齡

（2013）的文章中，證實了乾旱逆境誘發產生的氣孔簇可以減少水分的蒸散量，本文想進一步探討，為何氣孔簇大量出現，可以協助秋海棠度過乾旱逆境，詳細機制到底為何。利用自由軟體 image J 測定氣孔面積，我們發現，隨著乾旱程度的加劇，氣孔簇內氣孔的開啟面積越來越小，而單一氣孔的開啟面積變化不大，造成兩者的差異越來越大（見圖四 C），這証實了我們原來的假設：氣孔聚集形成的氣孔簇會有空間的擠壓效應，造成氣孔簇越多，開啟面積則越小，以利陸生植物度過乾旱的逆境，而且這個特徵具有可逆性，一旦乾旱解除，氣孔簇數量會下降（邱相齡, 2013）。我們在文獻中發現，NEM 是一種微絲蛋白的抑制劑，可以用來抑制花粉管的萌發與伸長（張學琴, 2006），我們聯想到是否可以利用 NEM 來抑制微絲生成，影響保衛母細胞的分裂，進而影響氣孔簇的生成與數量。

我們設計了兩種實驗條件來證實 NEM 對於氣孔簇的影響：第一種是先正常水量（20ml）處理 2 周後，再以乾旱水量（10ml）的不同濃度 NEM 處理 2 周，結果一如我們的預期，由於低濃度 NEM（0、1ppm）對微絲蛋白影響不大，氣孔簇數量會隨著處理天數增加，但高濃度 NEM（10、100、500ppm）抑制微絲蛋白的效果顯著，嚴重影響氣孔簇生成，造成即使秋海棠處於缺水的乾旱逆境下，氣孔簇數量不但沒有增加，反而比加 NEM 處理前還低（圖七 A）。另外，經 NEM 處理的秋

海棠，其氣孔簇數量及氣孔的關閉會受到 NEM 的雙重抑制，因此 NEM 對於氣孔簇氣孔的開啟面積影響比單一氣孔要來的大（圖八 A），這也進一步證明了氣孔簇可以減少水分蒸散的機制是減少氣孔簇氣孔的開啟面積。

第二種實驗條件是先乾旱水分條件馴養 2 周，再以乾旱水量的不同濃度 NEM 處理 2 周，我們想利用不同的水分處理條件和第一種做對比。由於已經乾旱 2 周，因此再以乾旱水量的 NEM 處理時，其氣孔簇數量變化差距會縮小（圖七 B）。但仍可發現隨著 NEM 濃度的增加，氣孔簇數量會越來越少，甚至比 NEM 處理前還少。氣孔簇氣孔面積的影響部分，結果也和第一種實驗設計一樣，但與單一氣孔面積的差異也比較小（圖八 B）。

比較 NEM 對氣孔開啟面積改變以及氣孔簇數量的影響，可發現正常水分馴養的植株對於 1ppm 的 NEM 就有了比氣孔開啟面積還顯著的效果，也就是說形成氣孔簇與氣孔開啟面積的改變的 NEM 濃度閾值並不相同，且以前者對 NEM 較為敏感。

## 肆、結論

- 一、在乾旱逆境下，秋海棠下表皮基部會被誘發出大量的氣孔簇，此時會造成氣孔簇內的氣孔開啟面積縮小，以減少水分蒸散，有利植物度過乾旱逆境。
- 二、在乾旱逆境下，原本應該被誘發產生的氣孔簇會被(NEM 所抑制，這暗示著氣孔簇的形成與微絲蛋白有關。

## 參考文獻

- 施河（2010）。高中基礎生物上。台南市：南一書局。
- 邱相齡、童美慈、房達文、劉水德、房樹生（2013）。秋海棠 (*Begonia coccinea*) 在逆境生長條件下氣孔簇數量的變化關係。科學教育，365：38-53。
- 尚玉梅、陳玉玲、王學臣（2003）。保衛細胞中的微絲骨架。植物學通報，20(4)：489-494。
- 張學琴、陳玉玲、袁明、王學臣（2006）。NEM 對川百合花粉萌發與花粉管伸長的抑制效應。江蘇農業學報，22(4)：374-378。
- GAN, Y. ZHOU, L. SHEN, Z. J. SHEN, Z. X. ZHANG, Y. Q. & WANG, G. X. (2010). Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies*, 51: 325-336.
- Campbell (2005)。Biology 中譯本。台北市：偉明圖書。
- Serna, L. Fenoll, C. (1997). Tracing the ontogeny of stomatal clusters in *Arabidopsis* with molecular markers. *The Plant Journal*, 12(4)：747-755.