

---

# 誘發特定 C3 及 CAM 植物氣孔 開啟因素的探討

邱莉雯<sup>1</sup> 童美慈<sup>2</sup> 王暉絢<sup>2</sup> 劉水德<sup>2</sup> 房達文<sup>3</sup> 房樹生<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>國立臺南女子高級中學

<sup>2</sup>國立臺南家齊女子高級中學

<sup>3</sup>國立臺南第一高級中學

## 壹、前言

光合作用分為光反應及碳反應，在碳反應中進行 C3 循環的植物稱為 C3 植物，一般環境下的植物大多是如此，如水稻等溫帶植物。C4 植物，如甘蔗，為了適應亞熱帶及熱帶溫度較高而又比較缺水的地區，此區植物的葉包含有兩種構造，即葉肉細胞（mesophyll cell）及圍繞維管束鞘外圍的束鞘細胞（bundle sheath cell）。因此 CO<sub>2</sub> 的固定也分為二階段進行，第一階段在葉肉細胞中，即 CO<sub>2</sub> 與三碳化合物（3C）作用形成四碳化合物（4C），故稱為 C4 循環，而第二階段在束鞘細胞中進行。沙漠植物，如仙人掌、鳳梨等，為了適應極端乾旱的環境，氣孔於夜間溫度低時開啟，而在白天光照強，氣溫高時關閉，所以植物就利用夜間氣孔開啟時間，將 CO<sub>2</sub> 固定下來成為 4C 化合物貯存於液泡中，等到白天氣孔關閉時，4C 化合物再把 CO<sub>2</sub> 釋放出來，以進行 C3 循環產生澱粉等碳水化合物（施河等人，2006）。

在生物課上到植物的光合作用時，課文中提到一般 C3 及 C4 植物的光反應及碳反應皆發生於白天，因此氣孔亦於白天開啟，並與保衛細胞膜上的藍光受器受光線刺激有關，但是 CAM（Crassulacean acid metabolism，景天酸代謝，簡稱 CAM）植物為適應極端乾熱的環境，減少水分的蒸散，演化出晚上才將氣孔打開，並進行固碳作用，固碳所得的蘋果酸在晚上先暫時存於液泡中，待白天時再將 CO<sub>2</sub> 釋出，繼續進行卡爾文循環（Calvin Cycle）以產生葡萄糖（施和等人，2006）。

由於 C3 及 C4 植物氣孔都是白天開啟，可以想像可見光一定扮演很關鍵的角色，但是夜晚氣孔才開啟的 CAM 植物，誘發氣孔開閉的環境因子是甚麼呢？2010 年 Frommer 發表在 Science 上的文章指出（Wolf B. Frommer, 2010），植物可以利用碳酸酐酶（Carbonic anhydrase）做為 CO<sub>2</sub> 偵測器，CO<sub>2</sub> 與水化合後產生 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>，HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 可以活化保衛細胞膜上的陰離子通道，造成膨壓改變，使得氣孔關閉。H. Hu 等人利用模式生物阿拉伯芥（Arabidopsis

---

\* 為本文通訊作者

thaliana) 證實，缺乏碳酸酐酶的阿拉伯芥氣孔無法關閉。最有趣的是，如果將親緣關係很遠的哺乳動物的碳酸酐酶基因送入阿拉伯芥突變株中，則 CO<sub>2</sub> 濃度的改變又可影響阿拉伯芥的氣孔開閉。這代表植物與動物是用同一種酵素去偵測環境中 CO<sub>2</sub> 的變化 (H. Hu 等人, 2009)。

阿拉伯芥是 C3 植物，而且文章中提到 CO<sub>2</sub> 是誘發它的氣孔關閉，這讓我們聯想到 CO<sub>2</sub> 濃度的改變是否會造成 CAM 植物氣孔的開啟呢？我們嚐試以下列的實驗設計來證實我們的假設。在本實驗中，我們想探討的一系列問題是：誘發 CAM 植物氣孔開啟的因子是什麼？晚上缺乏光線，因此應該不是可見光，我們猜測光週期可能是影響的因子之一，因為如果氣孔的關閉是由生理時鐘控制的話，當我們改變光週期，應該可以看到 CAM 植物的氣孔在白天開啟。植物細胞白天進行卡爾文循環時會消耗大量的 CO<sub>2</sub>，到了晚上，保衛細胞內 CO<sub>2</sub> 濃度會上升，CO<sub>2</sub> 濃度的改變有可能會影響氣孔開閉，我們想嘗試改變環境中的 CO<sub>2</sub> 濃度，看看是否能影響氣孔開閉。植物在遇到缺水或高溫的逆境下，細胞會分泌離層酸 (ABA)，藉以減少體內水分流失及高溫對細胞所造成的傷害，我們也想了解高濃度 CO<sub>2</sub> 是否可拮抗 ABA 的生理作用，更進一步確認 CO<sub>2</sub> 濃度的改變對 CAM 植物氣孔開閉的重要性。

## 貳、材料及研究方法

本實驗植物 3 吋盆栽皆購自園藝店，

包括 C3 植物：綠精靈 (*Syngonium podophyllum cv.*)、長春藤 (*Hedera helix*)、黃金葛 (*E. aureum*)，CAM 植物：虎尾蘭 (*Sansevieria trifasciata*)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite subsp. Formosana*)、鳳梨 (*Ananas sativus*)、長壽花 (*Kalanchoe blossfeldiana*)、石蓮 (*Graptopetalum paraguayense*)。

### 一、選定合適的氣孔觀察方法及植物

#### (一) 指甲油印模法 (楊芳, 蒲訓, 2010)

1. 於葉背的邊緣塗一層指甲油
2. 待指甲油自然風乾後，黏上透明膠帶並撕下，直接黏於玻片上即可
3. 利用 Motic 數位顯微鏡 400X 觀察並拍照記錄。

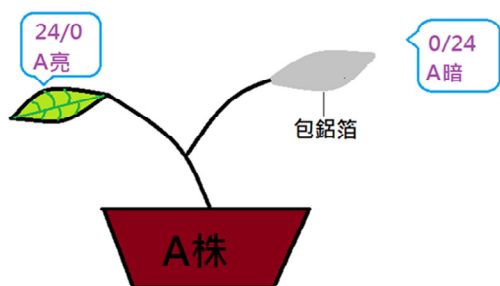
#### (二) 直接撕取法

1. 葉子背面朝內，從葉緣往內斜撕
2. 將葉下表皮(透明部分)滴水製成玻片
3. 利用 Motic 數位顯微鏡 (DM-B1) 400X 觀察並拍照記錄。

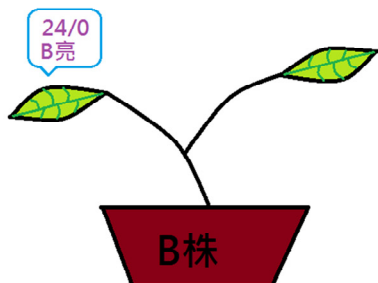
### 二、探討光周期對氣孔開閉的影響 (日/夜時間: 24/0、0/24、12/12)

(一) 依照上述實驗結果，我們選取三種植物：黃金葛 (C3)、長壽花 (CAM)、石蓮 (CAM)，分別施以三種光照條件，一為完全光亮 24/0 (A 株及 B 株，圖一 a 及 b)、一為完全黑暗 0/24 (C 株，圖一 c)、一為 12/12 (D 株及 E

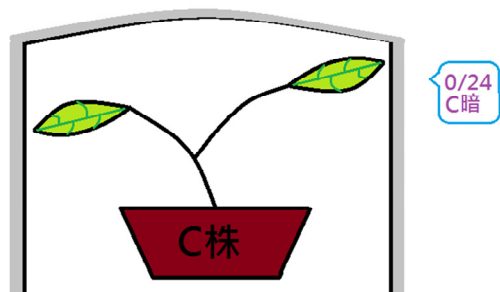
株，圖一 d 及 e)，並以包鋁箔來達成黑暗條件。實驗天數為 5 天，於第 1 天、第 3 天、第 5 天直接撕取葉下表皮製成玻片，隨機選取 3 個視野觀察，利用 Motic 數位顯微鏡觀察並計算出氣孔開啟程度（氣孔面積/保衛細胞面積）。



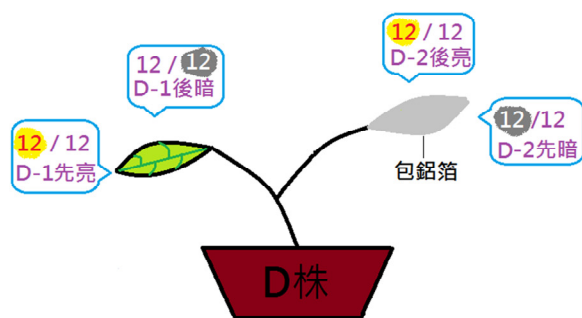
圖一 a



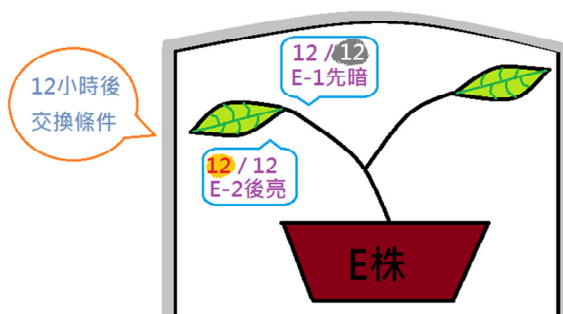
圖一 b



圖一 c



圖一 d



圖一 e

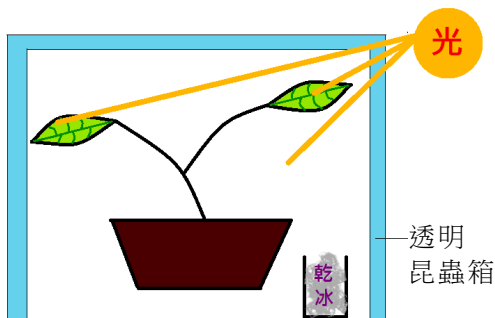


圖二、放入恆溫培養箱的情形

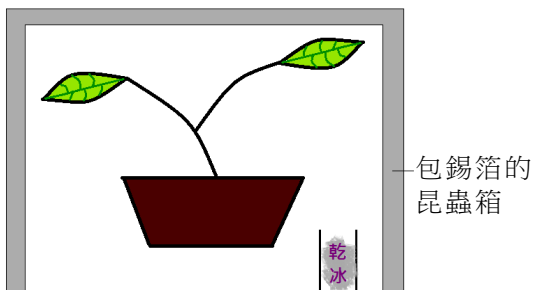
- (二) 恆溫培養箱生長條件為 CO<sub>2</sub> 濃度 600 ppm、溫度 25°C、照度 600 lux、濕度 25%。
- (三) 其中 D 株及 E 株植物各自經 12 小時後調換明暗條件，其餘處理皆相同。

### 三、觀察 CO<sub>2</sub> 濃度對氣孔開閉的影響

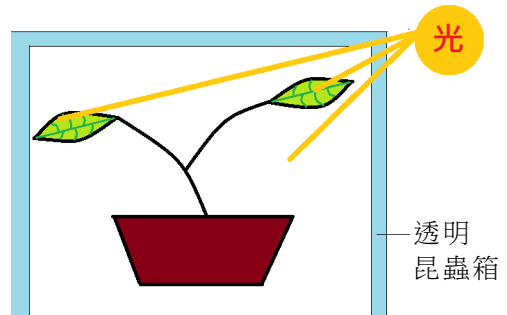
- (一) 將植物分成四組：第一組(光/高 CO<sub>2</sub>)、第二組(暗/高 CO<sub>2</sub>)、第三組(光/低 CO<sub>2</sub>)、第四組(暗/低 CO<sub>2</sub>) (如圖三)，高 CO<sub>2</sub> 是利用固定重量乾冰 (50g) 使其昇華後形成 (3000 ppm)，低 CO<sub>2</sub> 是指培養箱中的 CO<sub>2</sub> 濃度 600 ppm。
- (二) 於實驗開始後第一、二、三、四、五、八小時取植物葉下表皮觀察並量化氣孔開閉變化，在培養箱中放入 CO<sub>2</sub> 濃度偵測器，當 CO<sub>2</sub> 濃度低於 3000 ppm 便補充適量乾冰。
- (三) 恆溫培養箱生長條件為溫度 25°C、照度 600 lux、濕度 25%。



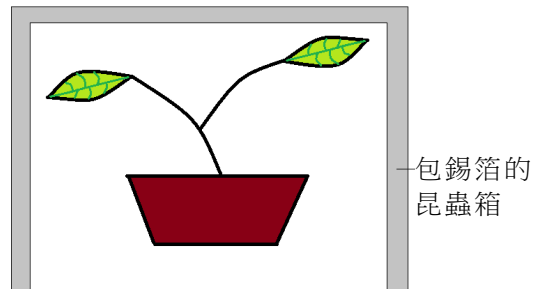
第一組



第二組



第三組

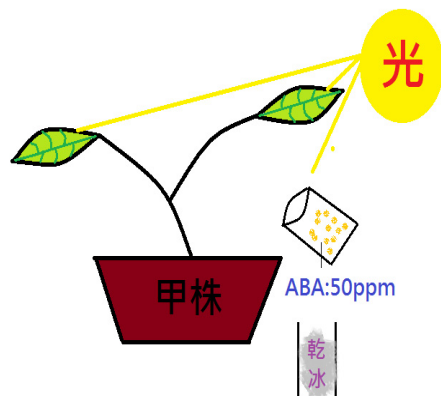


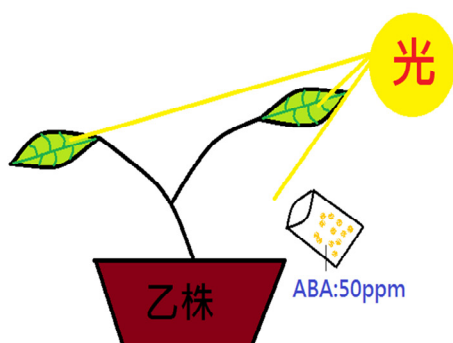
第四組

圖三、改變 CO<sub>2</sub> 濃度實驗設計圖示

### 四、觀察離層酸 (ABA) 對氣孔開閉的影響

- (一) 將植物分成二組：甲株 (50 ppm ABA/高 CO<sub>2</sub>)、乙株 (50 ppm ABA/低 CO<sub>2</sub>) (圖四)。





圖四、ABA 與 CO<sub>2</sub> 共同處理之實驗設計圖示

(二) 將 50 ppm 的 ABA 溶液，以澆灌方式一天三次，每次 20 毫升，於實驗前共澆灌兩天

(三) 於實驗開始後第一、二、三、四、五、

八小時取植物葉下表皮觀察並量化氣孔開閉變化，甲株植物當 CO<sub>2</sub> 濃度低於 3000 ppm 便補充適量乾冰。

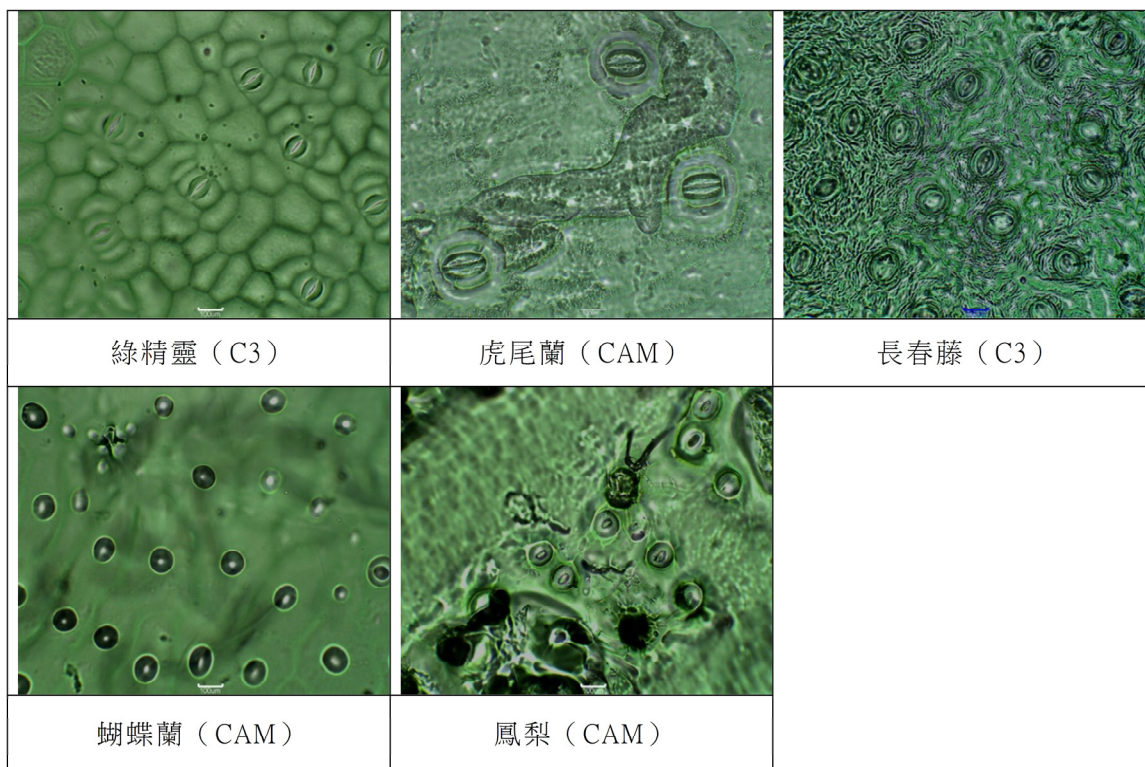
(四) 恆溫培養箱生長條件為溫度 25℃、照度 600 lux、濕度 25%。

## 參、研究結果

### 一、選定合適的氣孔觀察方法及植物

#### (一) 指甲油印模法

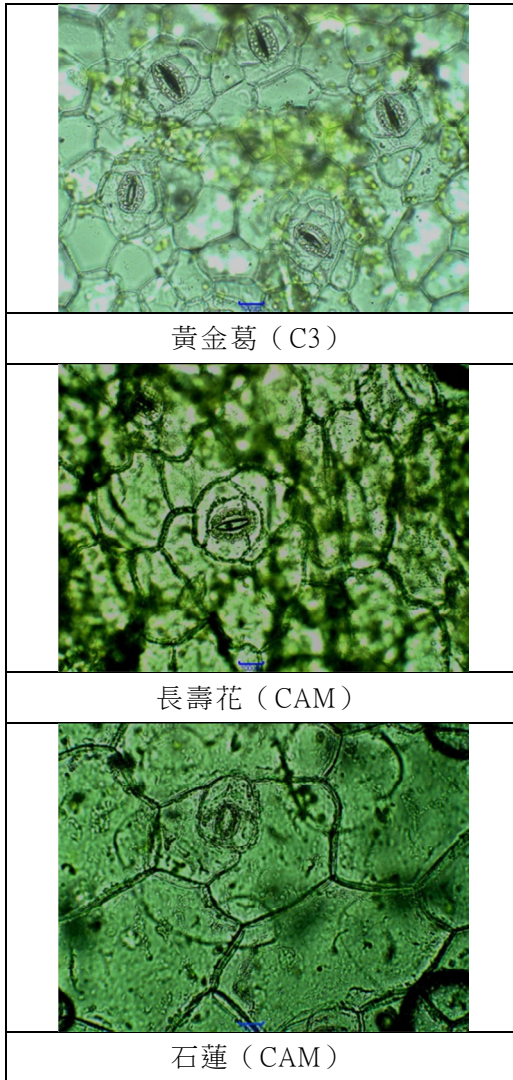
指甲油印模法無法清楚觀察氣孔及保衛細胞邊緣(圖五)，對量化氣孔開放程度有很大的誤差，因此我們放棄以此方法做後續實驗。



圖五、指甲油印模法結果，放大倍率皆為 400X

### (二)直接撕取法

有些葉片太厚無法直接撕取，經實驗測試結果，我們挑選出效果最好的長壽花、黃金葛及石蓮(圖六)作為後續實驗植物。

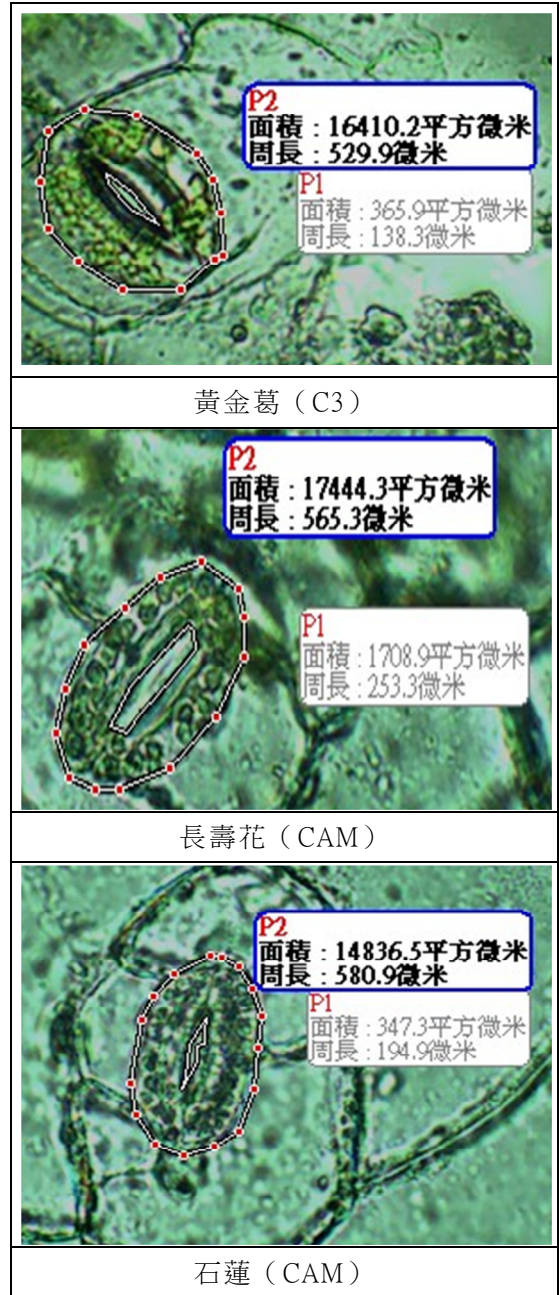


圖六、直接撕取法，放大倍率皆為 400X

### (三) 量化氣孔開啟程度

為了精確量化氣孔的開啟程度，我們利用 Motic 數位顯微鏡 (DM-B1) 所附軟體繪圖，分別求出氣孔面積及保衛

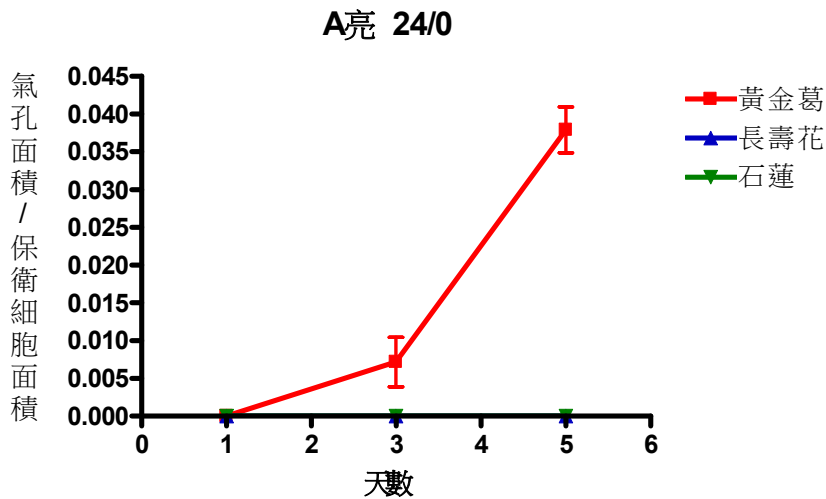
細胞面積，以兩者的相對值(氣孔面積/保衛細胞面積)，表示氣孔的開啟程度，結果請見圖七。



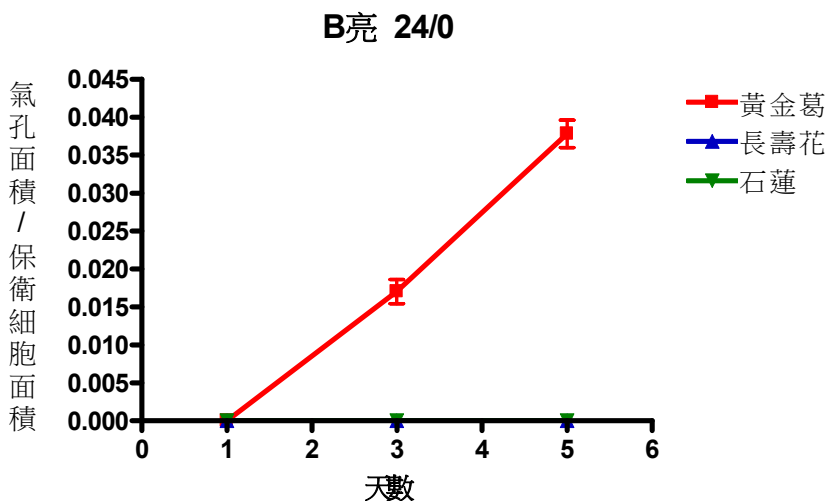
圖七、利用 Motic 軟體繪圖量化氣孔開啟程度(氣孔面積/保衛細胞面積)，放大倍率皆為 400X

## 二、探討光周期對氣孔開閉的影響（日/夜時間：24/0、0/24、12/12）

在日/夜時間：24/0（全亮）的條件下，連續觀察 5 天的氣孔開啟變化，得到結果如圖八及圖九。A 株（請見圖一 a，有部分葉片包鋁箔）及 B 株（請見圖一 b，無葉片包鋁箔）結果一致，只有 C3 植物黃金葛隨著天數增加，氣孔開啟程度也越來越大，而 CAM 植物長壽花及石蓮如預期般都不開啟。由此結果可推論：(1) CAM 植物在照光的情況下，氣孔確實會關閉。(2) C3 植物在 600 lux 照光量的情況下，氣孔確實會打開，以利光反應的進行。

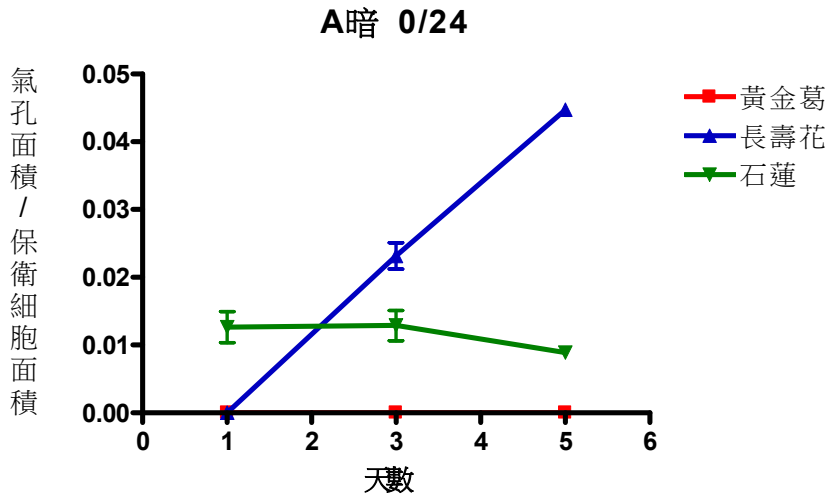


圖八、A 株植物在全亮（24/0）條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟（每個點皆為 3 個數值的平均值，以下皆相同）

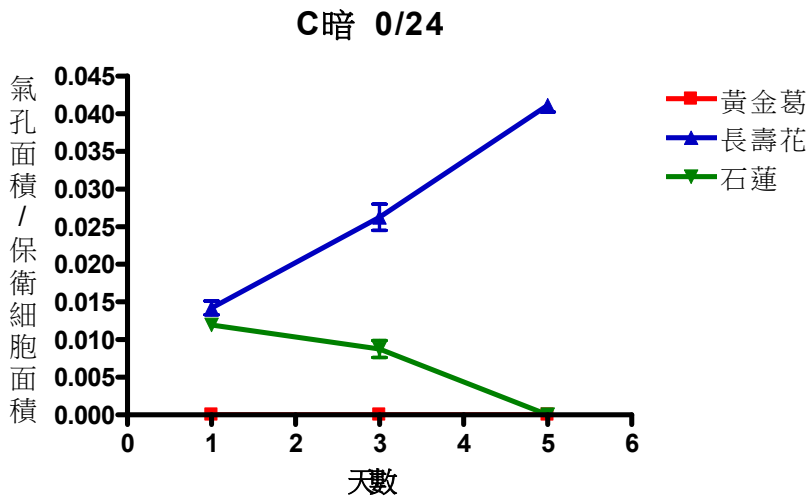


圖九、B 株植物在全亮（24/0）條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟。

在日/夜時間：0/24（全暗）的條件下（圖十及圖十一），A 株及 C 株結果一致，CAM 植物長壽花隨著天數增加，氣孔開啟程度加大，而 C 株 CAM 植物石蓮在第五天氣孔關閉可能與全暗條件造成植物死亡有關。由此結果可推論：(1) CAM 植物在黑暗的情況下，氣孔確實會打開。(2) C3 植物在黑暗的情況下，氣孔確實會關閉，以減少不必要的水分散失。(3)由於 A 株植物有葉片全亮，但黃金葛在 0/24（全暗）的條件下，葉片仍然關閉，呼應圖八及圖九的結果。



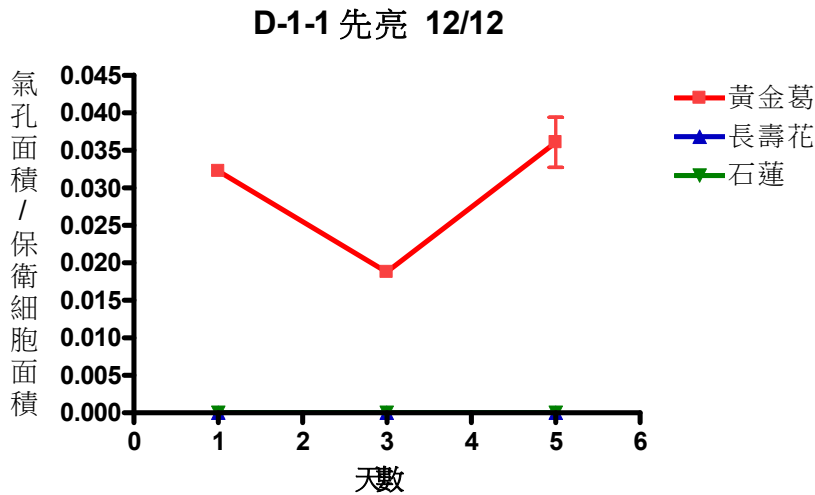
圖十、A 株植物在全暗（0/24）條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。



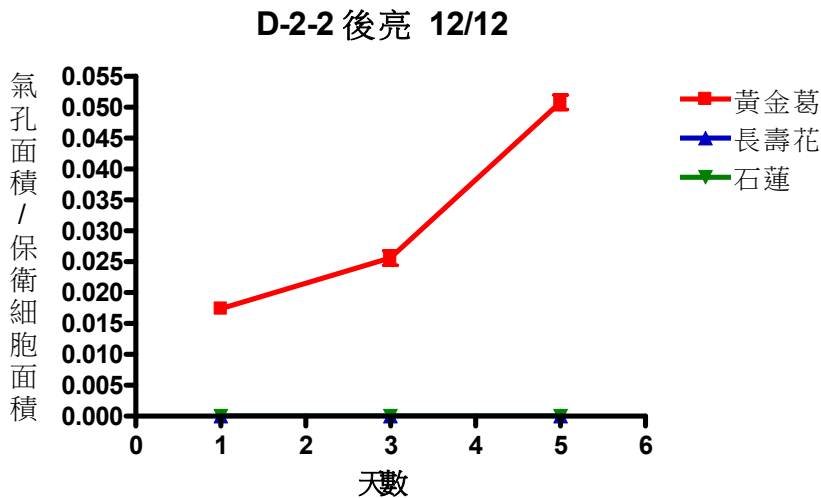
圖十一、C 株植物在全暗（0/24）條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。



改變光週期為日/夜時間：12/12 的條件，連續觀察 5 天的氣孔開啟變化，得到結果如圖十二~十四。D 株植物不論是先亮處理 12/12 (亮/暗) 或是後亮處理 12/12 (暗/亮)，以及 E 株植物後亮處理 12/12 (暗/亮)，都只有 C3 植物黃金葛隨著天數增加，氣孔開啟程度也加大，而 CAM 植物長壽花及石蓮都不開啟，此結果呼應圖八及圖九的結果。由此結果可推論：(1) C3 植物在照光的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會開啟 (2) CAM 植物在照光的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會關閉。

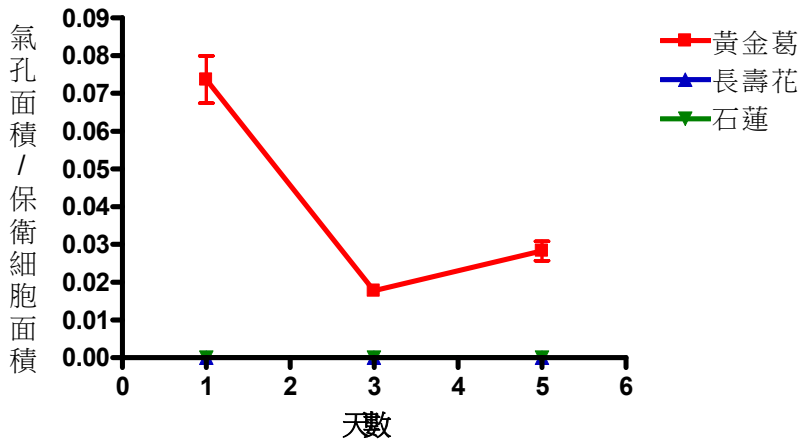


圖十二、D 株植物在 12/12 (亮/暗) 條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟。



圖十三、D 株植物在 12/12 (暗/亮) 條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟。

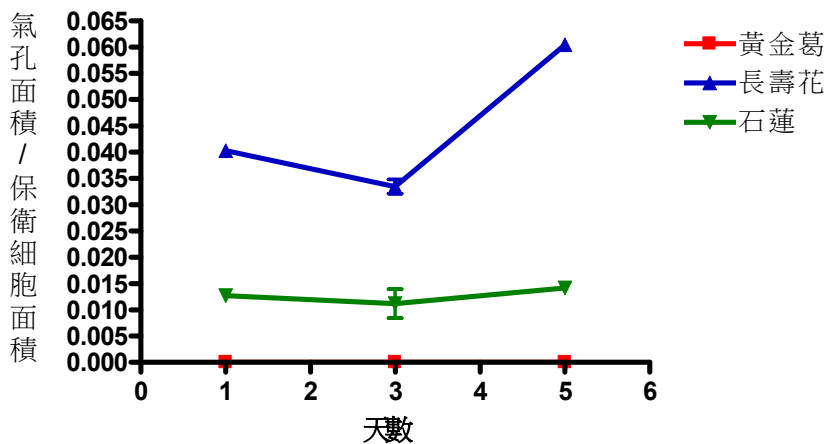
### E-2 後亮 12/12



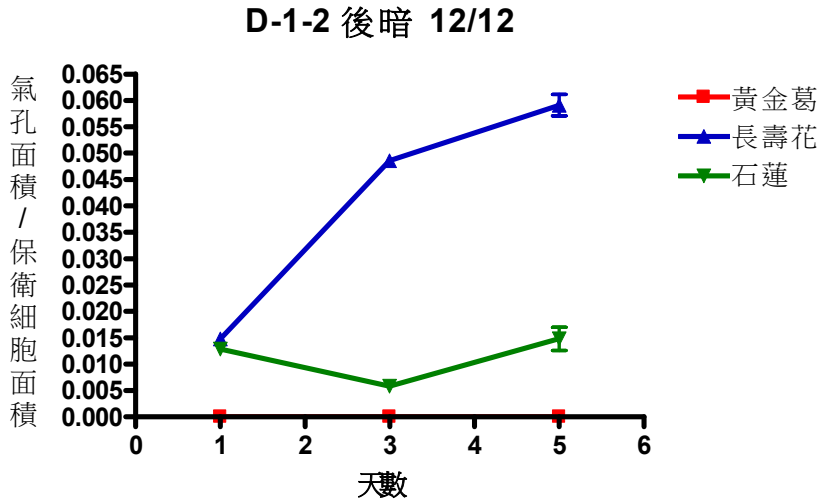
圖十四、E 株植物在 12/12 (暗/亮) 條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟。

另一方面，D 株植物不論是先暗處理 12/12 (暗/亮) 或是後暗處理 12/12 (亮/暗)，以及 E 株植物後暗處理 12/12 (亮/暗)，CAM 植物長壽花及石蓮隨著天數增加，氣孔開啟程度加大，C3 植物黃金葛都不開啟，此結果呼應圖十及圖十一的結果。由此結果可推論：(1) C3 植物在黑暗的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都不會開啟 (2) CAM 植物在黑暗的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會開啟。(3) 由於 D 株植物有葉片全亮，但黃金葛在 12/12 (先暗及後暗) 的條件下，葉片仍然關閉，呼應圖八及圖九的結果。

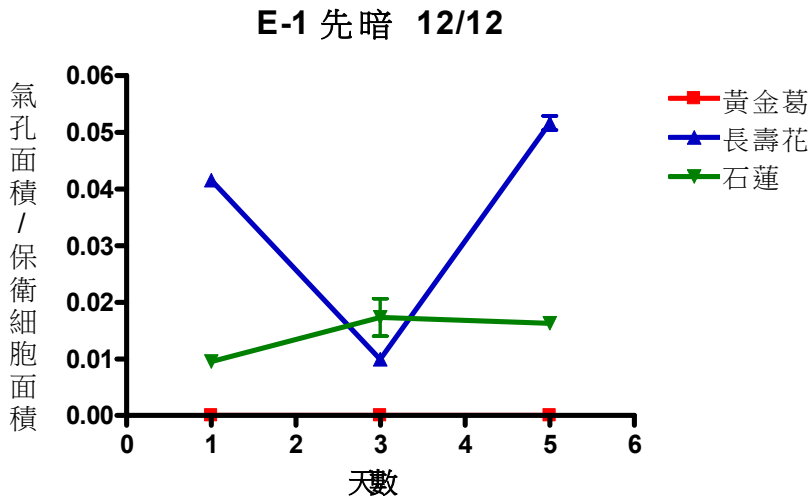
### D-2-1 先暗 12/12



圖十五、D 株植物在 12/12 (暗/亮) 條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。



圖十六、D 株植物在 12/12 (亮/暗) 條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。

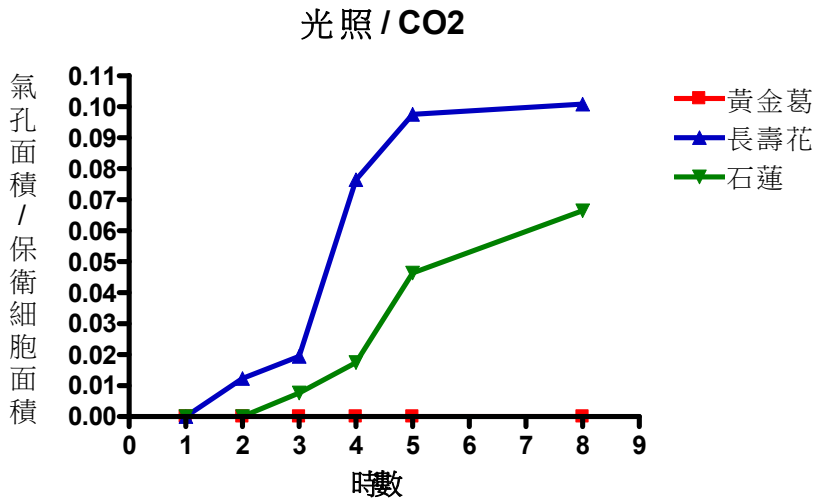


圖十七、E 株植物在 12/12 (暗/亮) 條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。

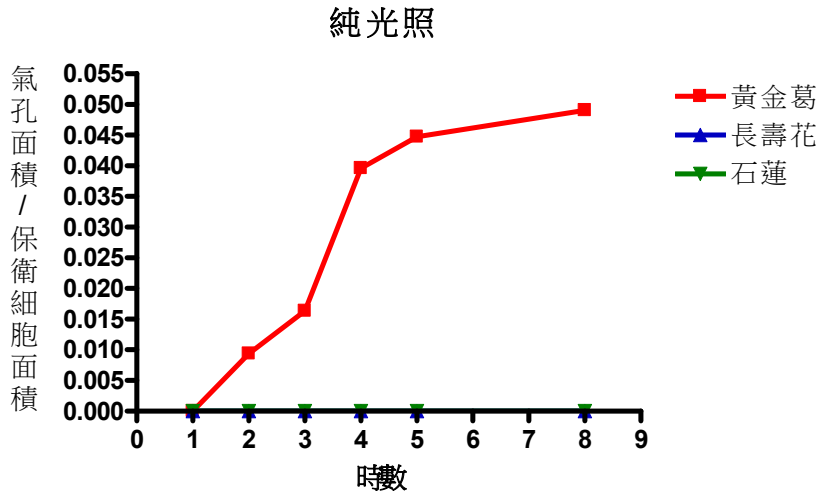
### 三、探討 CO<sub>2</sub> 濃度對氣孔開閉的影響

由上述的結果，我們已經得知光照會造成 C3 植物氣孔開啟，但會造成 CAM 植物氣孔關閉。接下來我們想進一步探討在黑暗的情形下，到底是何種環境因子造成 CAM 植物氣孔開啟。我們推測的因子是 CO<sub>2</sub> 濃度的變化。在只有照光的條件下 (圖十九)，黃金葛 (C3) 氣孔開啟而長壽花及石蓮 (CAM) 氣孔關閉；但同時給予照光/高濃度 CO<sub>2</sub>

的條件下（圖十八），長壽花及石蓮氣孔開啟而黃金葛氣孔關閉，我們的推論是：高濃度  $\text{CO}_2$  對植物氣孔的影響大於光照，也就是植物同時接受高濃度  $\text{CO}_2$  及照光的情形下，C3 植物氣孔會關閉，而 CAM 植物氣孔會開啟。



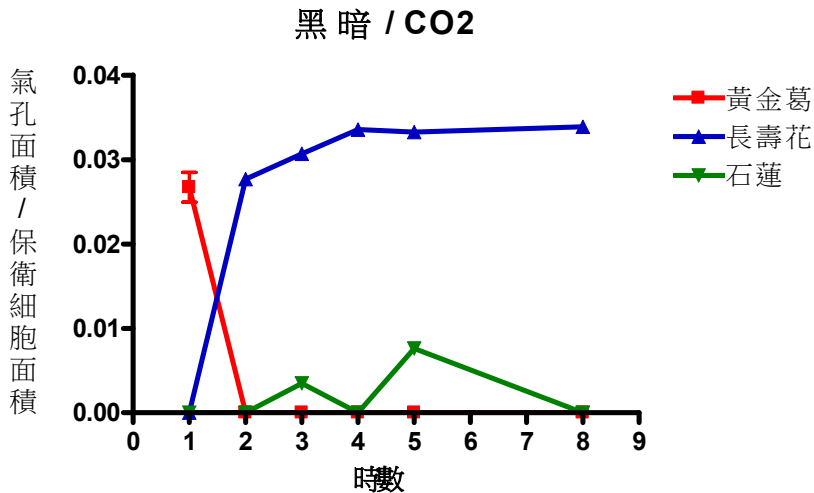
圖十八、光照/ $\text{CO}_2$  處理條件下氣孔開啟程度，黃金葛氣孔皆未開啟。



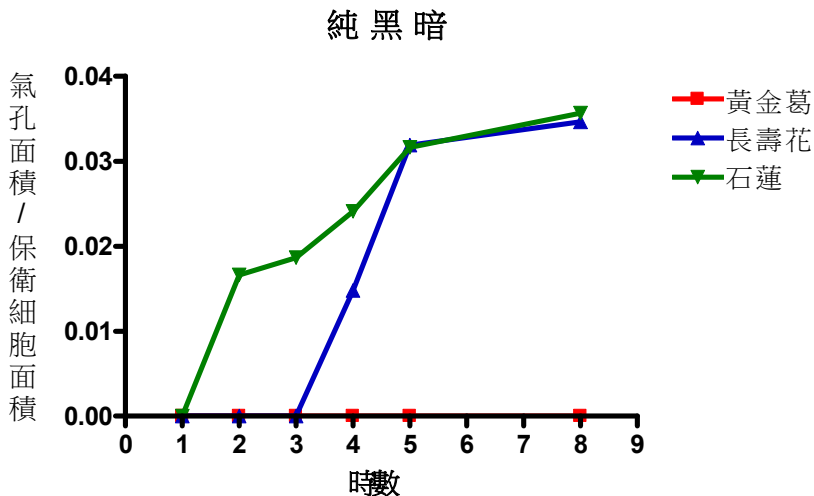
圖十九、光照處理條件下氣孔開啟程度。石蓮及長壽花氣孔皆未開啟。

為確認高濃度  $\text{CO}_2$  促進 CAM 植物氣孔開啟的機制，我們另外設計了黑暗/高濃度  $\text{CO}_2$  的實驗。在黑暗/高濃度  $\text{CO}_2$  的條件下（圖二十），長壽花的開啟時間比起只有純黑

暗條件下（圖二十一）縮短且開啟程度加大。但石蓮似乎沒有此趨勢。而黃金葛確實在黑暗狀態下是不開啟的。



圖二十、黑暗/CO<sub>2</sub>處理條件下氣孔開啟程度

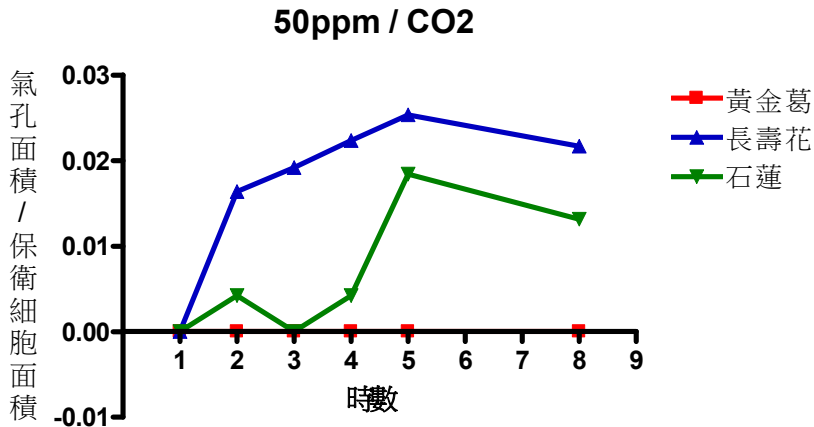


圖二十一、黑暗處理條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。

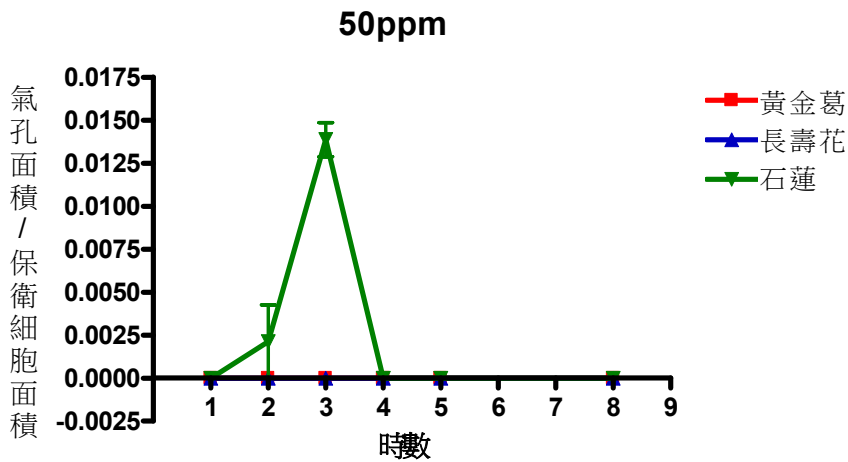
#### 四、觀察離層酸（ABA）對氣孔開閉的影響

正常情形下，當體內 ABA 濃度上升時，氣孔會關閉以抵抗缺水逆境。當同時給予高濃度 CO<sub>2</sub> 及 50 ppm ABA 時，植物會如何反應呢？由圖二十二可知，CO<sub>2</sub> 會抵消原來 ABA 對植物的影響，讓原本應該關閉的氣孔開啟（長壽花及石蓮），至於黃金葛則維持

原來關閉的狀態；如果只有給與 50 ppm ABA 時，C3 及 CAM 植物氣孔皆會關閉（圖二十三），至於石蓮在 2-4 小時氣孔的開啟原因不明。這個實驗更進一步地確認，CO<sub>2</sub> 濃度對 CAM 植物氣孔具有十分關鍵性的影響力，甚至可以拮抗照光及 ABA 的影響。



圖二十二、50ppm ABA/高濃度 CO<sub>2</sub> 處理條件下氣孔開啟程度。黃金葛氣孔皆未開啟。



圖二十三、50ppm ABA 處理條件下氣孔開啟程度。黃金葛及長壽花氣孔皆未開啟。

## 肆、討論

### 一、選定合適的氣孔觀察方法及植物

我們比較了兩種觀察氣孔的方法：

「指甲油拓印法」與「直接撕取法」。經 Motic 數位顯微鏡測試後，我們決定以顯微照片能輕易判斷出氣孔及保衛細胞的「直接撕取法」做為日後實驗觀察

氣孔的方式。

8 種植物經實驗的結果，我們選取 C3 植物黃金葛，及 CAM 植物長壽花與石蓮做為後續實驗植物，這三種植物的氣孔邊緣較清晰，可以減少後續實驗的誤差。

由於構成每個氣孔的保衛細胞大小不同，如果直接量取氣孔大小，無法表示實際的氣孔開啟程度，因此我們採用兩者的相對值（氣孔面積/保衛細胞面積），表示氣孔的開啟程度，如此可以去除保衛細胞大小不一所造成的誤差。

## 二、探討光周期對氣孔開閉的影響（日/夜時間：24/0、0/24、12/12）

為了確定氣孔的開閉是否會像開花一樣，有類開花素的物質在維管束內流動，造成同一植株上不同處理條件的葉片氣孔有相同的開闔情形，我們在同一植株的不同葉片設計了全亮及全暗的條件（如圖一 a 及圖一 d），由圖八及圖十的結果可知，氣孔的開啟並無類似開花素的物質造成。

另外，我們也想探討氣孔的開閉是否與植物本身的生理時鐘有關。由圖十二~圖十七的結果得知：

(一) C3 植物在照光的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會開啟；C3 植物在黑暗的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都不會開啟。

(二) CAM 植物在照光的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會關閉；CAM 植物在黑暗的情形下，不論是光週期 24/0 或是 12/12，氣孔都會開啟。以上結果說明植物氣孔的開閉，與內在的生理時鐘無關，應該是外界環境因子改變所造成。

## 三、探討 CO<sub>2</sub> 濃度對氣孔開閉的影響

由圖十八~十九的結果可清楚得知，對 C3 植物而言，在 600 lux 光照下，光照/高 CO<sub>2</sub> 會造成氣孔關閉；但只有光照的話，氣孔則會開啟，這代表 CO<sub>2</sub> 會拮抗光線對 C3 植物氣孔的開閉。對 CAM 植物而言，在 600 lux 光照下，光照/高 CO<sub>2</sub> 會造成氣孔開啟；但只有光照的話，氣孔則會關閉，這也代表高濃度 CO<sub>2</sub> 對植物氣孔的影響大於光照。以上結果明確說明 CO<sub>2</sub> 是氣孔開閉的重要決定因子，C3 植物對 CO<sub>2</sub> 的反應是關閉，但 CAM 植物對 CO<sub>2</sub> 的反應則是開啟。

由圖二十~二十一的结果可進一步確認 CO<sub>2</sub> 對氣孔開閉的影響力。在黑暗/高濃度 CO<sub>2</sub> 的條件下，長壽花的開啟時間比起只有黑暗條件下縮短且開啟程度加大，而黃金葛確實在黑暗狀態下是不開啟的。

## 四、探討離層酸（ABA）對氣孔開閉的影響

由圖二十二~二十三的結果得知，

若同時給予光線刺激及逆境激素 ABA 處理時，3000ppm 的 CO<sub>2</sub> 仍能拮抗兩者的影響，造成 CAM 植物氣孔的開啟，這代表 CO<sub>2</sub> 對於 CAM 植物氣孔的開閉，具有非常關鍵性的影響。但若只有 ABA 處理時，不論是 C3 或 CAM 植物氣孔皆會關閉，以適應逆境的發生。

### 參考文獻

- 呂洪飛 (2000) 紫竹梅、吊竹梅和鴨跖草氣孔分布與比較, 植物學通報, 17(4): 375~380
- 姚銘輝, 陳俊仁, 黃國祥 (2011) 經由碳平衡及二氧化碳通量之量推估蝴蝶蘭園之最佳溫度及光照條件, *Crop, Environ. Bioinform.* 8:172-180
- 施河主編 (2006), 南一版高三選修生物上冊第三章
- 楊芳, 蒲訓 (2010), 被子植物葉片氣孔製片方法研究, 現代農業科技, 22: 33-34
- Susan von Chemmerer and Howard Griffiths(2009) , Stomatal responses to CO<sub>2</sub> during a diel Crassulacean acid metabolism cycle in *Kalanchoe daigremontiana* and *Kalanchoe pinnata*, *Plant, Cell and Environment.* 32: 567-576
- Wolf B. Frommer (2010), CO<sub>2</sub> mmon Sense. *Science*, 327: 275-276
- Fred S.Harris and E. Martin(1991), Correlation between CAM-Cycling and Phtosynthetic Gas Exchange in Five Species of *Talinum*(*Portulacaceae*). *Plant Physiol*, 96: 1118-1124
- Chwen-Ming Yang and James L.Heilman(1991) , Short-term High Temperature Effects on Stomatal Behaviors of Rice Plants. Occuring at the Gram-filling Stage, *Jour Agric. Res China*(中華農業研究) 40(2): 243~247
- H. Hu et al. (2009), *Nat. Cell Biol.* 12: 87