

# 台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：植物學

作品名稱：馬纓丹 變！變！變！

學 校：高雄市立左營高級中學

作 者：陳建宇

## 作者簡介



我叫陳建宇，來自高雄左營，從小個性開朗、活潑好動，喜歡交朋友。從小生長於鄉下的我對自然的事物倍感興趣，認為自然界中的一切非常美好，且具有一股令人無法抗拒的力量。

上高中以後，有幸參與科展活動，與學長姐們共同研究問題，從研究中一點一滴的學習，慢慢的成長茁壯，累積了許多各方面的經驗。

今年很榮幸能幸運的通過初審，期盼能得到不錯的成績，並繼續進行更深入的研究。

作品名稱：馬纓丹 變！變！變！

#### 英文摘要(Abstract)

##### *Lantana* Keeps Changing Its Colors. Why?

*Lantana* is a very common plant in our lives. It grows easily and it has a long florescence and various colors. The colors of particular types of *Lantana* alter as the changing florescence. In this experiment, paper chromatography, high-performance liquid chromatography, SDS-gel electrophoresis, the measurement of petal cellular pH values, and the comparative study of forms of trichoma on the epidermal cells of petals are exerted in order to explore factors that change the colors of the *Lantana*.

The findings are as follows :

- (1)*Lantana's* colors have inseparable relationships with the compositions of anthocyanins and flavonoids, but not with the pH values of petal cells.
- (2)The anthocyanins of petal cells are cyanidin, with glycosides as well.
- (3)Besides the differences in the compositions of pigments, the forms of trichoma on the epidermis of the petals, cone-like or caniniform, can also be used to distinguish different types of *Lantana*, because the trichoma can influence the reflections of light from the epidermis of the petals and also affect colors of the flowers.
- (4)The result of SDS-gel electrophoresis shows that the biochemical pathways of petal cells in all species of *Lantana* are similar, so we assume that there is mutant in the series of synthesizing enzyme when the anthocyanins of petal cells are formed, and thus, there are no anthocyanins appearing in the yellow and white species of *Lantana*.

The results above are helpful for the understanding and discovering of *Lantana's* biological mechanisms, and can be used to create new types of *Lantana* and to make further study of the metabolism of *Lantana's* complete anthocyanin's biochemical pathways.

#### 中文摘要

##### 馬纓丹 變！變！變！

馬纓丹(*Lantana* spp.)是常見景觀植物，容易栽種、花期長、花色多，且有些品系花色會隨著花期而變化。本實驗利用濾紙色層分析、高效能液相層析、SDS-gel 電泳、細胞 pH 值測定及花瓣表皮細胞之毛茸(trichoma)形態之比較等方法探討馬纓丹花色之不同及變化的原因。結果顯示：(1)馬纓丹的花色及花色變化與花青素(anthocyanins)和類黃素(flavonoids)之組成有密切關係，而與花瓣細胞內 pH 值無關。(2)花瓣中所含花青素為矢車菊色素(cyanidin)，並且具有配醣基(glycoside)。(3)花瓣表皮細胞之毛茸形態，如圓錐形或犬牙形，會影響光的反射，進而影響花色，所以毛茸形態可作為區分馬纓丹品系之特徵。(4)SDS-gel 電泳的結果顯示，馬纓丹各品系的花瓣細胞生合成類似，推測花瓣細胞產生花青素的一系列酵素中，已有突變發生，而造成黃色、白色品系無花青素。以上結果有助於了解馬纓丹花色變化之機制，可將其應用於改良出新的馬纓丹之品系，或更深入研究馬纓丹花青素完整生合成代謝路徑。

# 馬纓丹 變！變！變！

## 壹、研究動機：

利用假日到校自習時休息的空檔，逛了校園一圈，赫然發現路邊常見的馬纓丹在校園裡竟然出現如此多種不同的顏色，我記得在高中的生命科學課本中曾提到花青素會影響花色變化，但我想事情一定沒有那麼單純，在和生物老師討論之後，仍然不得其解，於是心中升起一股疑問，到底是什麼因素，使馬纓丹有這等的變化？爲了一探究竟，找出使其變色的原因，於是開始著手研究這樣如此多變、奇妙的神祕花卉。

## 貳、研究目的：

調查馬纓丹各種品系花瓣的變色情形，進而探討其花瓣變色之原因，以求培養出更多品系之馬纓丹的方法。

## 參、研究材料與方法：

先觀察校園中不同品系的馬纓丹，並用相機定時拍照記錄花色變化及在顯微鏡下觀察各品系各花期花瓣的橫切面構造。並取各品系各花期新鮮花瓣數朵，用研鉢搗碎後，利用廣用試紙測其細胞 pH 值。

進行花青素的濾紙色層分析，先將新鮮花瓣烘乾，利用 0.1%鹽酸性甲醇萃取色素，以毛細管吸取色素萃取液，點著在濾紙下方 2 公分處(如圖一)，置於密閉的展開槽中，以 BAW、Forestal 及 FHW 三種溶媒(如表一)做一次元展開，測定  $R_f$  值(如圖二) 和顏色濃度。接著進行水解配醣基花青素之實驗，取色素萃取液，加入等量鹽酸，置於 80°C~100°C 的水中水浴 40~60 分鐘，待其冷卻後，加入蒸餾水至原溶液量，並滴入數滴異戊醇，強烈振盪後，靜置數分鐘，再以 8000rpm 離心 10 分鐘，取上層澄清液，以 BAW、Forestal、FHW 及 BuH 四種溶媒做濾紙色層分析。此外，取乾燥花瓣以 20%甲醇性 1.5%磷酸溶液抽取色素，過濾後，將其做高效能液相層析(HPLC)，使用 HITACHI L-7100 溶媒輸送幫浦在 L-7300 分離管恆溫箱中，利用 L-7420 紫外光檢測器以波長 530nm 及 350nm，測定花青素及類黃素，並以 L-7500 資料處理積分儀測其保持時間(Rt)、面積及濃度百分比。

最後再取馬纓丹新鮮花瓣及葉片放入研鉢中分別加入 1.5M Tris-Cl (pH 8.8)，研碎後倒入 1.5mL apperndrof 離心管中，然後在 4°C 下，以 12000rpm 離心 20 分鐘，取上層溶液 15  $\mu$ L 置入另一組離心管中，加入 5  $\mu$ L bromophenol blue 混和均勻後置入沸水中煮 5 分鐘，取 20  $\mu$ L 的溶液以 120 伏特的電力進行 SDS-gel 電泳，電泳 2~3 小時後，將膠片從電泳板上取下，置入 Stain Buffer 中染色，再以 Distain Buffer 褪染，用清水將膠片表面洗淨後將膠片裱好，待其乾燥後分析之。

#### 肆、結果：

在觀察校園中的馬纓丹後，發現有橙黃色變橙紅色、奶白色變粉紅色、黃色變桃紅色、黃色及白色等五種品系(如圖三)，而其中黃色品系與白色品系，花色在整個花期皆不改變，而其他三者在不同花期會呈現不同的顏色。在顯微鏡下觀察馬纓丹花瓣的橫切面構造時發現，各品系花瓣之上表皮皆具有圓錐形毛茸(trichoma)，而橙黃色變橙紅色品系、黃色變桃紅色品系則在下表皮多了一種犬牙形毛茸，而會變色的品系在後期不論何種毛茸均會出現色素(如圖四)。不論何種品系的任何花期之花瓣細胞，其 pH 值均在 6~7 之間(如表四)。

經由濾紙色層分析發現黃色品系、白色品系、奶白色變粉紅色初期及黃色變桃紅色初期皆沒有花青素出現，會變色的品系，越到後期顏色越深(如圖五、六)。由水解配醣基花青素結果，測得馬纓丹花青素之  $R_f$  值與矢車菊色素(cyanidin)相符(如表三)；比較水解配醣基前後的層析結果可知水解前之  $R_f$  值較矢車菊色素為低，而水解後之  $R_f$  值與矢車菊色素相符(如圖六)，因此推測馬纓丹之矢車菊色素具有配醣基。再由高效能色層分析結果(如表五、六)可知，花色呈白色或黃色時，細胞中僅含類黃素，不含花青素，而花色呈紅色或橙色時，細胞中含花青素與類黃素，另外，類黃素中以  $R_t$  9.32 含量最多，且各品系中  $R_t$  9.32 越多，黃色越深，而花青素中  $R_t$  6.26 含量甚高，其與花色呈紅色相關。當花色由淺變深時(如奶白色變粉紅色及黃色變桃紅色)，花青素總量增加 2.3~4 倍，類黃素未見顯著變化。

在 SDS-gel 電泳的結果中，葉片的蛋白質與各品系花瓣的蛋白質表現並不一樣，而各種品系花瓣的蛋白質表現相似，出現相似的條紋(如圖七)。

#### 伍、討論：

馬纓丹種類繁多，花色多樣，包括整個花期皆不變色的，如黃色、白色，及花期中會變色的，如：橙黃色變為橙紅色、奶白色變為粉紅色、黃色變為桃紅色...等。比較各品系花瓣橫切面，發現花瓣表皮細胞之毛茸形態與花色有關，其中橙黃色變為橙紅色品系及黃色變為桃紅色品系具犬牙形毛茸，毛茸可能影響光的反射，進而影響花色。各品系各花期的花瓣細胞 pH 值均為 6~7，所以花色不是因細胞 pH 值而變化。

經由分析水解花青素配醣基層析後，與標準品比對可知馬纓丹的花青素為矢車菊色素，再比較未水解與水解花青素配糖基層析結果，推測馬纓丹花瓣中之矢車菊色素可能帶有糖配基，再由 HPLC 之  $R_t$  出現時間與矢車菊色素比對分析推斷馬纓丹花瓣中之花青素可能為 cyanidin 3,5-diglucoside 及 cyanidin 3-monoglucoside。會變色的品系花青素的總量隨花期而增加約 2.3~4 倍，但類黃素總量之變化較小，因此推測花色的改變與花青素含量有關，當花青素含量愈多時花色愈深。



本實驗中之馬纓丹品系均來自同一種，經由枝條無性繁殖而獲得各種花色變化園藝栽培品系。花瓣細胞在進行花青素或類黃素之生合成時，應該會有參與花青素生合成路徑之酵素產生，會有別於其他組織細胞之代謝路徑。而酵素成分是蛋白質，故由 SDS-gel 電泳中發現，葉片的蛋白質表現與花瓣的蛋白質表現不同，表示葉片和花瓣的生化代謝路徑確實不同，但各品系各花期之花瓣的蛋白質表現類似，無明顯之差異，因此推測黃色、白色品系仍具有花青素代謝的一系列酵素，但是某些酵素已無功能。

#### 陸、結論：

一般植物花瓣之花色主要由複雜的類黃酮素(flavone)族分子形成，其中以花青素(anthocyanins)與類黃素(flavonoids)為主，而花瓣細胞內之 pH 值改變也會影響花青素之表現而改變花色。

由馬纓丹花瓣之構造、濾紙色層分析、HPLC 及 SDS-gel 電泳之結果，可將影響馬纓丹花色變化的原因歸納為(1)花瓣細胞中色素種類、各種色素之含量及色素在細胞中的分布；(2)花瓣之表皮細胞的毛茸形狀及分布；(3)花青素生合成酵素是否有突變。

其中淺色品系，如黃色品系、白色品系及奶白色變粉紅色品系，僅含圓錐形毛茸，深色品系，如橙黃色變橙紅色與黃色變桃紅色品系則兼具圓錐形與犬牙形毛茸，而犬牙形毛茸僅分布於下表皮。至於影響花色的色素包括花青素及類黃素，其中類黃素出現於各種品系的各花期，但花青素僅出現於橙黃色變橙紅色品系之各花期及奶白色變粉紅色和與黃色變桃紅色品系之過渡期與後期，且花瓣的顏色隨花青素總量的增加及分布的範圍增大而變深，並且花色變化與花瓣細胞之 pH 值無關。經由 SDS-gel 電泳的實驗結果可推測，在枝條無性繁殖時，細胞可能發生了突變，使花青素生合成代謝路徑的某些酵素產生變化，變為無功能的酵素，因而產生白色品系及黃色品系的園藝種，甚至使花瓣表皮的毛茸形態亦發生了改變。

#### 柒、參考資料：

- 一.王月雲 陳是瑩 童武夫 編著 植物生理學實驗 增訂本 藝軒圖書出版社
- 二.陶建英老師實驗 <http://www.sinica.edu.tw/~ibawww/ResearchPC/p5.html>
- 三.薛聰賢 編著 家庭園藝(第一輯)臺灣的觀賞花木 100 種 增訂再版 薛聰賢
- 四.齊藤規夫 嵯世寶 御巫由紀 1991 年 高等植物 Anthocyanin 的分布  
明治學院論叢第 486 號 pp.40~128
- 五.Harbone, J.B.(1967) : Comparative Biochemistry of the Flavonoids.  
Acad.press.London and New York.
- 六.Plant Physiology Third edition Frank B. Salisbury & Cleon W.Ross

# 附錄：

## 一、表：

溶媒	成份及比例	表一、各種溶媒之組成成分
BAW	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O 4 : 1 : 5 上層溶液	
Forestal	HOAc-HCl-H <sub>2</sub> O 30 : 3 : 10	
FHW	HCOOH-HCl-H <sub>2</sub> O 5 : 2 : 3	
BuH	n-BuOH-2N HCl 1 : 1 上層溶液	

色素	採用樣品	表二、各種色素之標準品
Cyanidin(矢車菊色素)	紅色玫瑰花瓣	
Petunidin(矮牽牛色素)	紫色矮牽牛花之花冠	
Malvinidin(錦葵色素)	立鶴花花瓣	
Peonidin(芍藥色素)	藍色銳葉牽牛花之花冠	
Delphinidin(飛燕草色素)	蝶豆花瓣	

溶媒	Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Cy	De	MI	Po	Pt
BAW	展開液高度(cm)	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3		14.3	14.7	14.3
	色素高度(cm)	7.6	7.6	—	7.6	7.5	—	7.7	7.6	—	—	7.6		7.1	7.8	6.8
	R <sub>f</sub> 值	53	53	—	53	52	—	54	53	—	—	53		50	55	47
Forestal	展開液高度(cm)	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9
	色素高度(cm)	7.0	7.0	—	6.8	6.7	—	6.7	6.7	—	—	6.7	4.4	8.3	8.8	6.1
	R <sub>f</sub> 值	50	50	—	49	48	—	48	48	—	—	48	32	59	63	44
FHW	展開液高度(cm)	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0
	色素高度(cm)	4.0	3.9	—	3.9	3.9	—	3.8	4.0	—	—	3.9	2.5	5.5	4.9	4.7
	R <sub>f</sub> 值	31	30	—	30	30	—	29	31	—	—	30	19	42	38	36
BuH	展開液高度(cm)	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8
	色素高度(cm)	5.1	5.1	—	5.0	4.9	—	4.9	4.8	—	—	5.0	1.8	2.9	3.6	4.1
	R <sub>f</sub> 值	51	51	—	51	50	—	50	49	—	—	51	18	30	37	42
表三、水解後花青素在各溶媒中之 R <sub>f</sub>																

品系	橙黃色變橙紅色		黃色變桃紅色			奶白色變粉紅色			黃色	白色
花期	前期	後期	前期	過渡期	後期	前期	過渡期	後期		
pH 值	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7	6~7
表四、各品系各花期之 pH 值										

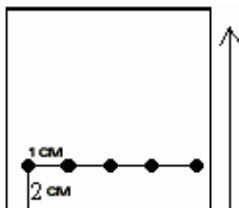
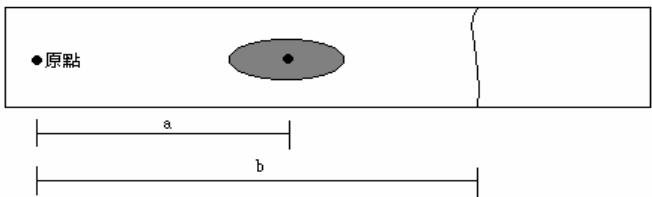
品系	橙黃色變橙紅色		奶白色變粉紅色		
	前期	後期	前期	過渡期	後期
色素出現時間(Rt)(min)	總量 1650081	總量 2372628	總量 2683951	總量 3406381	總量 2414735
3.52	0.5	0.6	0.6	6.8	0.9
5.82	14.2	14.6	3.5	3.5	4.7
8.00	24.8	24.4	21.9	21.4	28.0
9.32	48.8	46.6	41.0	37.3	18.2
13.34	1.9	1.8	19.4	23.2	24.5
15.02	3.8	3.9	1.0	0.8	0.9
品系	黃色變桃紅色			黃色	白色
	前期	過渡期	後期		
色素出現時間(Rt)(min)	總量 5559229	總量 6073124	總量 5317585	總量 2524846	總量 3956554
3.52	1.5	3.4	7.4	0.6	7.7
5.82	6.7	7.5	6.6	14.3	2.9
8.00	19.4	19.8	21.1	17.6	19.6
9.32	43.0	38.5	28.5	50.8	27.2
13.34	6.5	6.7	9.6	2.5	8.3
15.02	14.9	16.2	16.0	1.1	12.1

表五、以波長 350nm 檢測各品系花期前期、過渡期與後期之類黃素量(%)

品系	橙黃色變橙紅色		奶白色變粉紅色			黃色變桃紅色		
	前期	後期	前期	過渡期	後期	前期	過渡期	後期
色素出現時間(Rt)(min)	總量 32955	總量 132549	總量 0	總量 31839	總量 84005	總量 0	總量 136217	總量 313176
4.05	4.0	4.7	0	13.0	11.3	0	23.1	18.8
6.26	46.2	43.8	0	77.2	83.0	0	71.6	75.8
9.44	47.9	44.9						

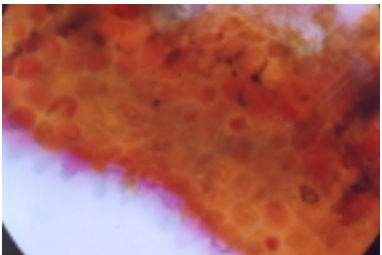
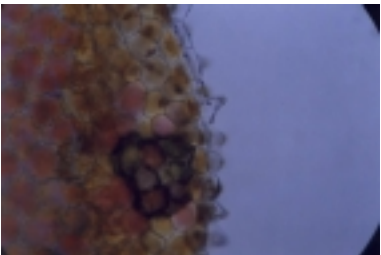
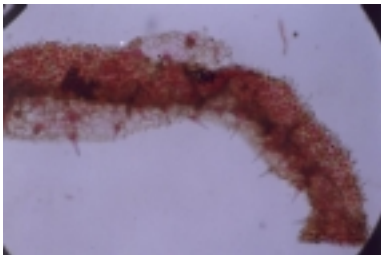
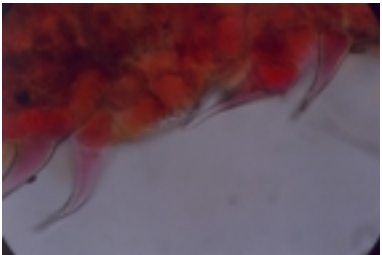
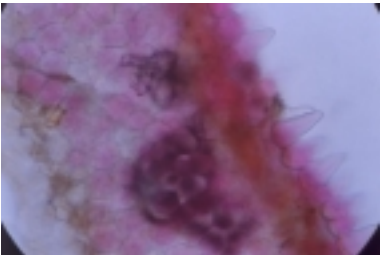
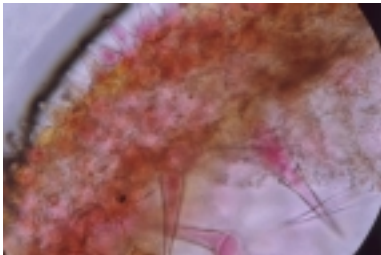
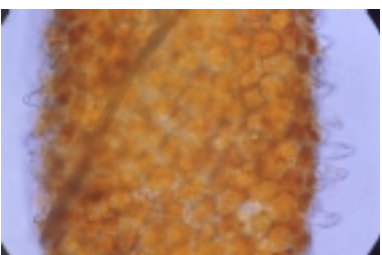

表六、會變色三品系以波長 530nm 檢測花期前期、過渡期與後期之花青素量(%)

## 二、圖

 <p>一次元展開</p>	
<p>圖一、濾紙色層分析</p>	<p>圖二、<math>R_f</math> 值之計算方法：<math>(a/b) \times 100 = R_f</math>  (a：色素從原點展開移動之距離 b：溶媒展開時上昇之距離)</p>



		
1.橙黃色變橙紅色品系	2.奶白色變粉紅色品系	3.黃色變桃紅色品系
		圖三、各品系之馬纓丹。
4.黃色品系	5.白色品系	

		
1a.橙黃色變橙紅色品系前期	2a.奶白色變粉紅色品系前期	3a.黃色變桃紅色品系前期
		
1b.橙黃色變橙紅色品系後期	2b.奶白色變粉紅色品系後期	3b.黃色變桃紅色品系後期
		1a.2a.3a.4.5 具有圓錐形毛茸 1b.2b.3b 具有犬牙形毛茸  圖四、馬纓丹各品系各花期花瓣之橫切面構造。
4.黃色品系前後期	5.白色品系前後期	

