

作品名稱：由眼點大小探討團藻群體的極性

縣市：臺北市

作者： 林暉翔、張皓牧

陳義雄、鄭丁晟

校名：臺北市立建國高級中學

指導教師： 湯炳垣

關鍵詞：團藻、眼點、極性

由眼點大小探討團藻群體的極性

壹. 研究動機：

團藻 (Volvox)，又稱大團藻，是一種由上百，甚至上千個細胞組成的綠藻。它的體制介於多細胞生物和單細胞群體之間，所以我們可以稱一個團藻是一個「群體」(colony)，也可以稱一隻團藻是一個「個體」(organism)。台灣在彌陀以及中南部養殖場都曾經有發現之紀錄。

團藻細胞雖然分布呈中空球體，但細胞已有分化的現象，它擁有形態類似衣藻的「體細胞」(somatic cells)，和體積較大、無鞭毛的「無性生殖細胞」(gonidia) [1]。先前的研究者根據觀察，粗略地將團藻體細胞的差異現象區分為：眼點較大的體細胞，分布於團藻運動時的前端；反之，靠近後端的眼點則較小，這種現象稱為「極性」(polarity)[2]，極性形成的過程稱為「極化」(polarization)。

眼點是藻類運動的重要依據之一，藻類眼點的成份包括了胡蘿蔔素(carotene)及其他種類的脂質，其中胡蘿蔔素是由葉綠體合成再後運到眼點中。眼點含脂質的多少與細胞內狀態有密切的關係，目前我們已經知道：在一些藻類衰老的細胞當中，眼點的體積會逐漸減小。[3]
但是有關團藻眼點的大小的問題，目前尚未有相關的研究。

我們推測，因為團藻是一種趨光性的綠藻[4]，所以其運動情形的「極化」可能也與眼點的「極化」有密切的關係。本次實驗利用共軛焦點顯微鏡 (confocal microscope)，對於團藻標本中各個體細胞的眼點大小做出定量的測量，並運用數學模型和統計學，來分析不同位置體細胞的眼點是否有顯著的大小差異，以了解團藻個體中眼點極化的情形。

團藻被許多發育生物學家視為一種有趣的模式生物，探討並證明其極化的現象，也算是讓我們對它的發育過程有進一步的認識。

貳. 研究目的：

1. 探討團藻眼點大小的分布情形。
2. 探討團藻的眼點分布是否具有極性？
3. 探討團藻運動的情形。
4. 探討團藻趨光性的行為。

參. 研究器材：

(一)培養：

1. *Volvox global*
2. 土壤萃取液
3. 微量元素培養液 (成分參見研究過程)
4. 二次蒸餾水
5. pH 儀
6. 三角錐瓶、試管、培養皿
7. 解剖顯微鏡、微量滴管 (pipetment)
8. 滅菌用烤箱、無菌操作臺
9. 恆溫培養箱、冰箱

(二)觀察：

1. 光學顯微鏡、顯微鏡外接 CCD 鏡頭、電視、錄影機、電腦
2. 甲基纖維液
3. 懸滴玻片

(三)實驗：

1. 共軛焦點顯微鏡 (confocal microscope)、電腦
2. 電腦軟體：Zeiss LSM 410，Excel 2000，Photoshop 5.0，Visual Basic 6.0
3. 團藻固定液 (福馬林(formalin)：甘油(glycerine) = 2：98)
4. 加強圈、封片膠

肆. 研究過程與方法：

(一)培養：

(二)

1. 表(1-1)：團藻培養液成分：

成份	ml/ L
土壤萃取液 (P.S.1)	200 ml
蒸餾水	799 ml
微量元素 (P.S.2)	1 ml
pH 值：6.9 至 7.0	

P.S.1：將無污染之土壤與水，以體積 1：4 混合煮沸 30 分鐘後，靜置 48 小時，取其上清液，以 120 °C，15 分鐘高溫滅菌後保存。

P.S.2：微量元素成份：

成份	g/500 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.44
MnSO ₄ · H ₂ O	0.85
H ₃ BO ₃	0.31
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.19
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.12
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01

2. 培養環境：

將藻種以團藻培養液作無菌培養於三角錐瓶中。三角錐瓶置於恆溫培養箱：

溫度：20°C

光度：約 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$

光照：每天 8：00 至 22：00 （日：夜=14：10）

3. 觀察：

團藻培養期間，每隔 6～12 小時觀察其生長情形；並於無菌操作下抽出數滴藻液觀察團藻生長情形，以及是否有其他藻類污染。

4. 純化：

有其他藻類污染時，將團藻培養液倒入無菌培養皿，並以日光燈從側面單向照光，利

用團藻的趨光性來分離其他藻類。照光 15 分鐘後，團藻已在培養皿照光處邊緣聚集。此時從培養皿照光的邊緣用滴管吸取 10 至 20 ml 藻液，並加入團藻培養液重新培養，可得較純之團藻藻種。必要時，以上步驟可重複多次以獲得純種之團藻。

以上全程操作在無菌操作環境下進行。

（二）活體觀察：

1. 將團藻置於懸滴玻片上，必要時加入甲基纖維液以減緩其移動，觀察其外表型態及運動情形。
2. 用光學顯微鏡外接電視及電腦，將影像拍攝成錄影帶或動畫檔。
3. 由檔案觀察團藻活動的情形及運動方式。

（三）團藻標本製作：

1. 在玻片上黏貼加強圈(如圖)。吸出若干隻團藻，置於加強圈內。
2. 用團藻固定液（福馬林(formalin)：甘油(glycerine)=2：98）滴數滴於加強圈內，靜置十分鐘。
3. 待團藻被固定後，蓋上蓋玻片，並以封片膠封片保存。



圖(四-1) 團藻標本示意圖

（四）顯微鏡使用方法：

本次實驗是使用 ZEISS Axioplan 2 共軛焦點顯微鏡，具有相位差光學顯微鏡之功能，並以用氬雷射(Ar-Laser, 488nm)來掃描標本，可以得到比一般光學顯微鏡更為清晰的影像。

1. 打開顯微鏡和裝有 Zeiss LSM 410 以供數據分析用電腦的開關，熱機 30 至 60 分鐘。
2. 同時打開水銀燈開關及雷射光源。
3. [相位差光學顯微鏡用法] (影像：正常彩色影像。解像力中等。)

將濾鏡(filter)轉至空白，在視野下找出適合的團藻，確定位置後用接下來各方法進行觀測。

4. [共軛焦點顯微鏡用法] (影像：特殊螢光色影像。解像力較差。)

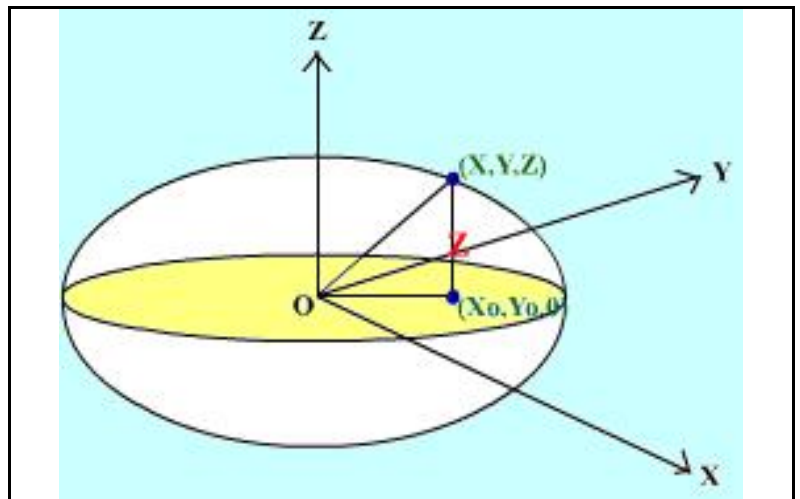
將濾鏡(filter)轉至雷射，以 488nm 的氬雷射作為吸收光源，並調整濾鏡裝置為 LP570、BP515-525 的濾鏡，分別針對體細胞葉綠體、眼點所放出的螢光波長。兩者在經雷射激發後分別放出紅光及黃綠光。將螢幕上所得到的影像存檔，供日後參考之用。

5. [干涉相位差顯微鏡用法] (DIC 影像：灰階影像。解像力最佳。)

將濾鏡(filter)轉至雷射，光圈調至 DIC(differential-interference contrast)，打開雷射光源，使用雷射光源掃描標本，並將螢幕上所得到的影像做加強清晰度之處理，並存檔以分析眼點之位置及大小，及其他參考之用。

(五)眼點位置的定量

1. 建立模型：在低倍率下觀察時，團藻的形狀近似球型；但在高倍率觀察時，我們發現：固定後團藻的形狀實際上更接近一個橢球體。為了求精準，我們以團藻的對稱中心為原點，平行載玻片的平面為 XY 平面，建立一個三維座標系。如此一來，各個眼點的位置就可以使用座標(X,Y,Z)來表示。
2. 以干涉相位差顯微鏡在氬雷射光源下分別用 400x、1000x、4000x 倍率下觀察並儲存團藻照片。(若視野無法容納整隻團藻，則用多張照片重疊覆蓋住整隻團藻)。
3. 用存檔的照片判定原點位置(團藻對稱中心)及橢球體的三軸長度。其中 XY 方向的長度可參考 400x 的照片，Z 方向的長度可以由多張照片焦距的清晰度來得出。
4. 由 1000x 照片可以確定各個眼點的 XY 座標，再代入橢球方程式求出各個眼點的 Z 座標。

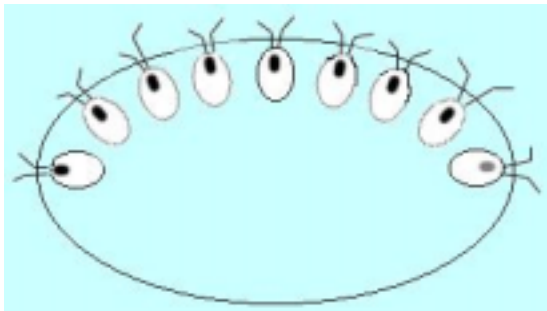


圖(四-2)

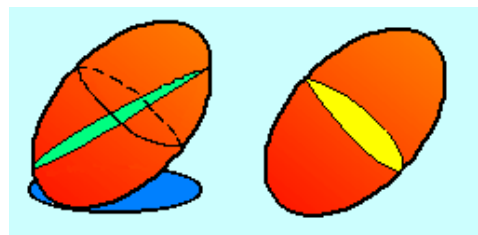
X_0 、 Y_0 即為觀測所得的眼點座標，又 X_0 、 Y_0 也是點(X,Y,Z)在 XY 平面上投影的 XY 座標，所以 $X_0=X$, $Y_0=Y$ ，再將 XY 代入橢球方程式即可得到 Z 座標值

(六) 眼點大小的定量

1. 建立模型：我們使用共軛焦點顯微鏡，從不同角度觀察團藻細胞眼點的截面(如下圖)發現：團藻細胞眼點的形狀類似長型的橢球體。因此我們在往後的定量過程，使用橢球體性質來探討團藻細胞的眼點。
2. 利用程式(參見附錄二)計算照片下眼點的投影面積。
3. 經過觀察和上一點的模型，我們了解到，從不同角度觀測相同的眼點也會得到不同大小的截面積。而在 4000x 的顯微鏡下，我們只能從**垂直載玻片的角度**觀察眼點。所以我們建立了一套眼點的數學模型，所以我們可以使用它來幫助我們解決這一個問題：首先我們先建立以下兩個假設：
 - (1)所有眼點的長軸皆垂直該細胞上方膠質鞘的切面。
 - (2)所有眼點皆為相似的橢球體。



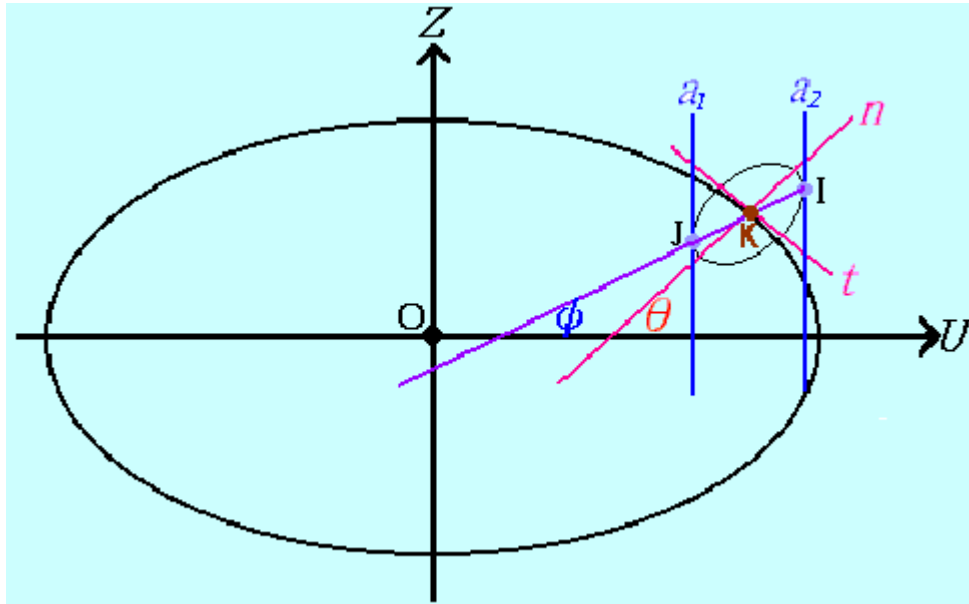
圖(四-3)：每個眼點在顯微鏡下觀測的角度都不同。因此就算是體積相同的眼點，也可能觀測到不同的大小。
(此圖為示意圖，事實上團藻細胞比圖上所畫出的要多)



圖(四-4)：從不同角度觀察到的團藻眼點：從照片上經程式計算而得的，是眼點不同角度下的**投影面積**(藍色)，我們將其換算為**斜截面積**(綠色) 後，再換算為**標準截面積**(黃色)，以作分析比較。

以上二個假設經過我們的觀察皆與事實極為接近。接下來，我們定通過眼點中心且與長軸垂直的截面為「標準截面」。(依照以上的眼點模型：標準截面也是通過眼點中心的所有截面中，最小的截面。) 我們可以使用「標準截面積」來表示眼點的大小，避免觀測角度差異造成的誤差，以利我們分析。

如果我們在觀測時，得到的照片並不是眼點的標準截面積，那我們就可以使用以下的公式，將它的大小換算成標準截面積：



圖(四-5)：標準截面積的換算過程

UZ 平面是通過眼點中心 K 與原點 O，且垂直 XY 平面的平面。

橢圓 O 代表團藻，橢圓 K 代表眼點，

a_1 、 a_2 是橢圓 K 的兩條鉛直切線， ϕ 為直線 OI 與 XY 平面的夾角；

n 、 t 分別為橢圓 O 在 K 點上的法線與切線， θ 為眼點長軸與 XY 平面的夾角

I、J 分別為鉛直線 a_2 、 a_1 與橢圓 K 的切點

標準截面積公式：

$$A_{std} = A' \times \left(1 / \cos \phi \times \sqrt{\cos^2(90^\circ - \theta + \phi) + k^2 \sin^2(90^\circ - \theta + \phi)} \right)$$

其中 k 為橢圓長軸和短軸的比值，經測量後得知 $k=1.6$ ，

A' 為原始測定之眼點投影面積，由程式計算而得。

(公式推導詳見附錄一)

(七) 眼點的位置與統計學相關檢定的分析方法

在團藻上挑出隨機、清晰的眼點數十顆進行分析。先定一特殊眼點(例如：標準截面積最大或最小)作為統計時的「原點」。計算 (1)其他眼點與「原點」的距離 (2)其他眼點的大小。兩者進行相關檢定分析：

1. 相關分析：

相關係數 r (correlation coefficient) 公式：

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

其中 x_i 為眼點大小， y_i 為相對距離， \bar{x} 、 \bar{y} 則分別為二者的平均。

2. 相關係數 r 顯著性測驗：

(1) $H_0 : \sigma = 0$

(2) $H_1 : \sigma \neq 0$

(3) 定顯著水準 α 為 0.05，

(4) 計算 t 值：

相關係數的標準誤差 SE (Standard error) 為

$$SE(r) = \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}}$$

由標準誤差 r ，及樣品數 n 及可求得實驗的 t 值為

$$t = r \times \sqrt{\frac{n - 2}{1 - r^2}}$$

對 t 值做統計上的分析可檢定其顯著水準 α 。定顯著水準 α 為 0.05，

若 $|t| > t_{\alpha/2, df}$ 即代表：相關的顯著水準在 α 以下。接受兩者有相關的假設 H_1 。

伍. 實驗結果

(一)團藻眼點極性的表現

本次實驗針對 7 隻團藻的眼點進行分析

表五-1：針對團藻最大與最小的眼點所做的眼點分析

團藻 編號	d f	與最大的眼點			與最小的眼點		
		r	t	$\alpha=0.05$ 時	r	t	$\alpha=0.05$ 時
a	20	-0.7768	-3.3313	✓	0.9546	4.0601	✓
b	27	-0.3715	-1.9256	✓	0.5447	2.8145	✓
c	23	-0.4492	-2.1446	✓	0.0949	0.4549	×
d	20	-0.3506	-1.5633	×	0.3743	1.6881	×
e	24	-0.4711	-2.2971	✓	0.5219	2.5420	✓
f	24	-0.4698	-2.2581	✓	0.5324	2.6685	✓
g	19	-0.4277	-1.8551	✓	0.6423	2.7690	✓

df：自由度 r：相關係數 t：t 值 α ：顯著水準

✓：代表接受有相關的假設 (H_1)

×：代表接受無相關的假設 (H_0)

表五-2：以眼點 a16(最大的眼點) 所做的分析檢定

相關係數 $r = -0.77678$ $t = -3.33126$ 顯現不完全負相關

(X、Y、Z=原始座標 dx、dy、dz= 相對眼點 a16 座標)

	X	Y	Z	眼點標準截 面積(μm^2)	dx	dy	dz	距原點 距離(μm)
a1	-32.801	0.182	23.278	0.150623	-12.676	23.384	-0.930	26.615
a2	-32.924	1.043	23.213	0.141962	-12.799	24.245	-0.995	27.434
a3	-33.663	6.089	22.594	0.100733	-13.538	29.291	-1.614	32.308
a4	-20.002	20.611	25.009	0.045794	0.123	43.813	0.801	43.821
a5	-25.909	17.904	23.872	0.033600	-5.784	41.106	-0.336	41.512
a6	-25.294	25.411	21.729	0.054650	-5.169	48.613	-2.479	48.950
a7	-20.986	25.657	23.115	0.062041	-0.861	48.859	-1.093	48.879
a8	-19.017	28.734	22.468	0.089572	1.108	51.936	-1.740	51.977
a9	-25.540	30.949	19.081	0.097485	-5.415	54.151	-5.127	54.662
a10	-17.663	33.041	20.803	0.137385	2.462	56.243	-3.404	56.400
a11	-10.525	15.442	27.996	0.096596	9.600	38.644	3.788	39.999
a12	-9.664	35.257	21.335	0.223762	10.461	58.459	-2.873	59.457
a13	-19.633	26.396	23.234	0.070706	0.492	49.598	-0.974	49.610

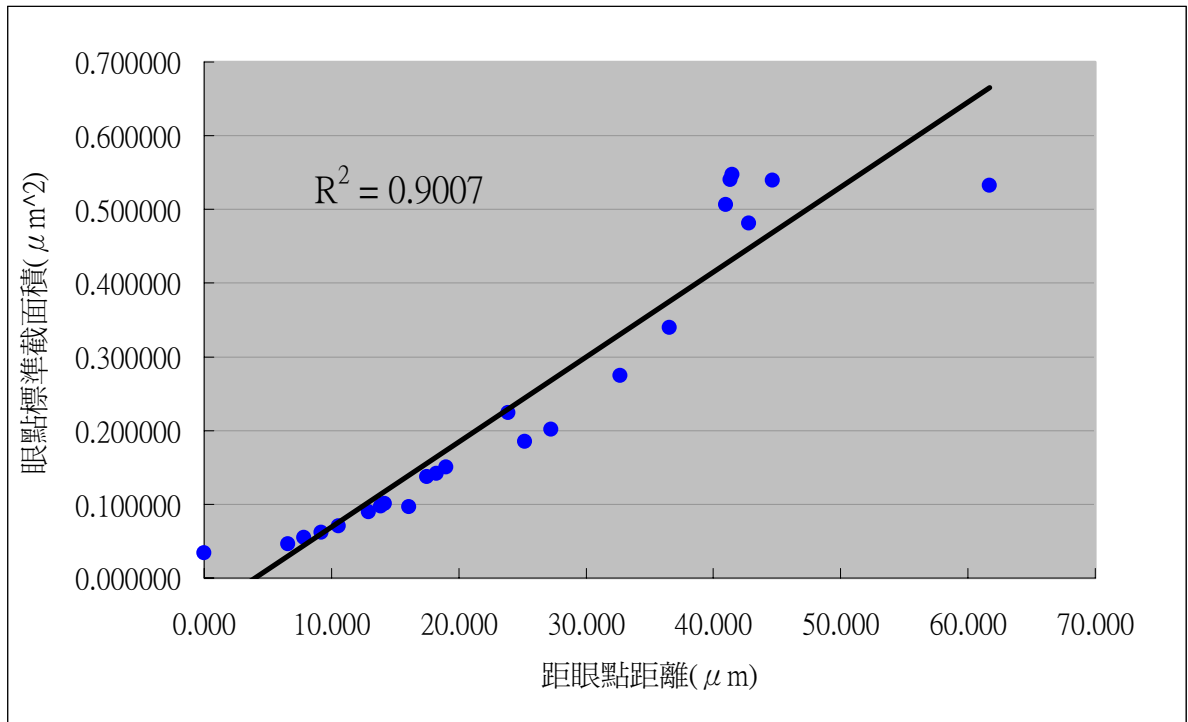
a14	-14.833	-21.479	25.946	0.506179	5.292	1.723	1.739	5.831
a15	-19.633	-22.955	24.420	0.540352	0.492	0.247	0.212	0.590
a16	-20.125	-23.202	24.208	0.547570	0.000	0.000	0.000	0.000
a17	0.059	-18.156	28Z.112	0.539293	20.184	5.046	3.904	21.168
a18	1.905	-14.218	28.836	0.480973	22.030	8.984	4.628	24.237
a19	9.781	-32.432	22.761	0.532697	29.906	-9.230	-1.447	31.331
a20	4.981	-0.680	29.859	0.339697	25.106	22.522	5.652	34.198
a21	0.920	0.305	29.995	0.274742	21.045	23.507	5.787	32.077
a22	-12.495	-2.772	29.077	0.184754	7.630	20.430	4.869	22.345
a23	-6.095	0.182	29.793	0.201453	14.030	23.384	5.585	27.836

表五-3：以眼點 a5(最小的眼點) 所做的分析檢定

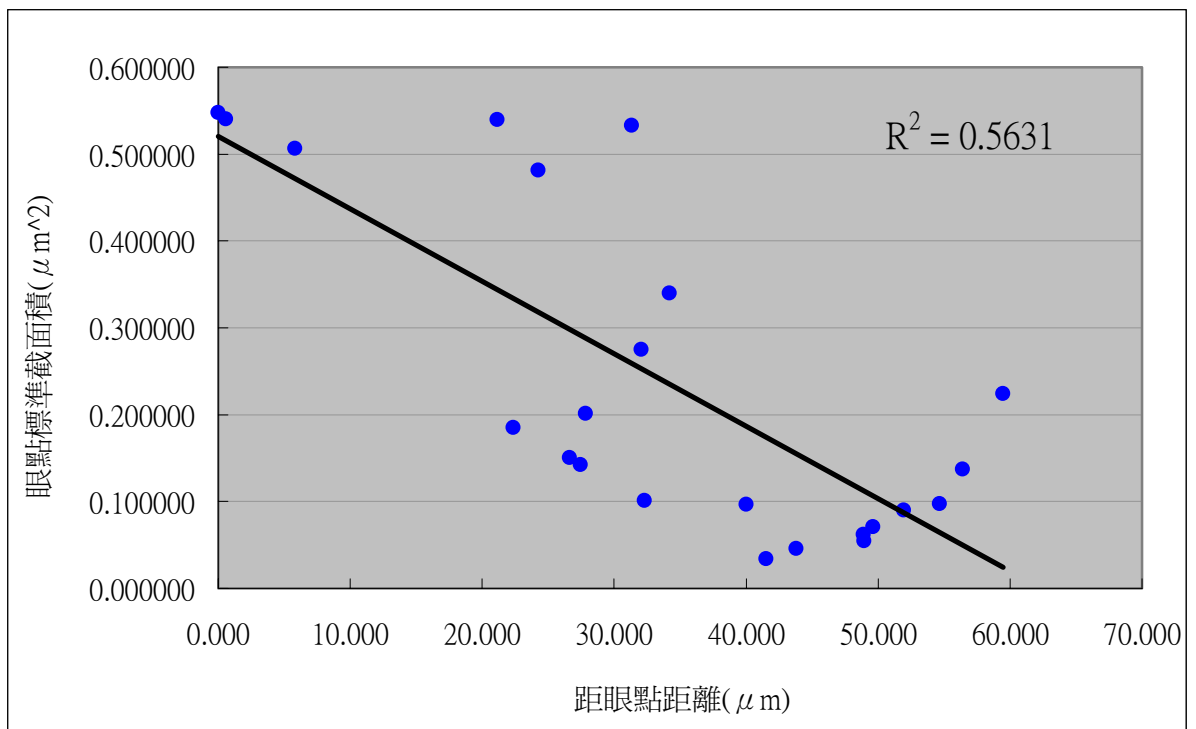
相關係數 $r=0.954614$ $t=4.060053$ 顯現不完全正相關。

(X、Y、Z=原始座標 dx 、 dy 、 dz = 相對眼點 a5 座標)

	X	Y	Z	眼點標準截面積(μm^2)	dx	dy	dz	距原點距離(μm)
a1	-32.801	0.182	23.278	0.150623	-6.892	-17.722	-0.594	19.025
a2	-32.924	1.043	23.213	0.141962	-7.015	-16.861	-0.659	18.274
a3	-33.663	6.089	22.594	0.100733	-7.754	-11.815	-1.278	14.190
a4	-20.002	20.611	25.009	0.045794	5.907	2.707	1.137	6.597
a5	-25.909	17.904	23.872	0.033600	0.000	0.000	0.000	0.000
a6	-25.294	25.411	21.729	0.054650	0.615	7.507	-2.143	7.831
a7	-20.986	25.657	23.115	0.062041	4.923	7.753	-0.757	9.215
a8	-19.017	28.734	22.468	0.089572	6.892	10.830	-1.404	12.913
a9	-25.540	30.949	19.081	0.097485	0.369	13.045	-4.791	13.902
a10	-17.663	33.041	20.803	0.137385	8.246	15.137	-3.069	17.508
a11	-10.525	15.442	27.996	0.096596	15.384	-2.462	4.124	16.116
a12	-9.664	35.257	21.335	0.223762	16.245	17.353	-2.537	23.905
a13	-19.633	26.396	23.234	0.070706	6.276	8.492	-0.638	10.579
a14	-14.833	-21.479	25.946	0.506179	11.076	-39.383	2.074	40.963
a15	-19.633	-22.955	24.420	0.540352	6.276	-40.859	0.548	41.342
a16	-20.125	-23.202	24.208	0.547570	5.784	-41.106	0.336	41.512
a17	0.059	-18.156	28.112	0.539293	25.968	-36.060	4.240	44.639
a18	1.905	-14.218	28.836	0.480973	27.814	-32.122	4.964	42.779
a19	9.781	-32.432	22.761	0.532697	35.690	-50.336	-1.111	61.715
a20	4.981	-0.680	29.859	0.339697	30.890	-18.584	5.987	36.543
a21	0.920	0.305	29.995	0.274742	26.829	-17.599	6.123	32.665
a22	-12.495	-2.772	29.077	0.184754	13.414	-20.676	5.205	25.190
a23	-6.095	0.182	29.793	0.201453	19.814	-17.722	5.921	27.235



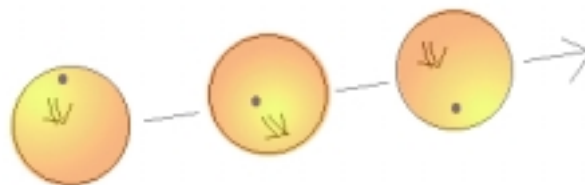
圖五-1：以眼點 a5(最小的眼點) 所做的分析檢定



圖五-2：以眼點 a16 (最大的眼點) 所做的分析檢定

(二)團藻運動時的極性表現

觀察影片時，我們發現(如圖片五-1)團藻會進行延著軸的順時針旋轉運動，所以我們可以推斷團藻實際上是沿著一假想軸前進，且在視野下是以順時針方向自轉。(以右手四指握拳，拇指方向為前進方向，而其餘四指方向為自轉方向。)



圖片(五-1)：團藻運動的行進路線

陸. 討論及應用：

1. 在 1000x 的顯微鏡下，我們已經可以直接看出團藻不同細胞的眼點有大小的差異。但是因為團藻遠大於視野，且觀察並不能做為有效力的證據，所以我們必須針對團藻的眼點作出定量的計量，並進行分析。
2. 在標定團藻的相對座標時，雖然團藻在低倍率觀察下近似於球體，但是在高倍率下並不是完美的球體，所以我們為求精準，採用橢球做為團藻的模型。從照片上的二維(x_0, y_0)座標，使用橢球體的方程式推回到三維的相對座標(x, y, z)。
3. 在我們分析的七隻團藻中，眼點大小與距最大、最小的眼點的距離的相關性共有 14 組數據。其中有 11 組的顯著水準 α 在 0.05 以下，表示數據的可信度在 95% 以上。我們發現：當以取樣中最大的眼點作為原點座標時，其他眼點的眼點大小，與距原點距離呈現不完全負相關($r < 0$)。而以取樣中最小的眼點作為原點座標時，其他眼點的眼點大小，與距原點距離呈現不完全正相關($r > 0$)。可見大小不同的眼點呈有規律的分布，且較大或較小眼點各有依序排列集中的現象，這和文獻上描述團藻的眼點有極化的現象相符合。
4. 因為測量時團藻被固定在顯微鏡下，只能看到半隻團藻；所以我們只能做局部的分析，不能做整隻團藻的眼點分布情形。不過這次實驗已經跨出了眼點定量化分析的第一步。

5. 這次眼點大小的分析是使用顯微鏡下的投影面積來分析，因為文獻上和我們的觀察都是觀察其面積。不過眼點的體積大小，實際上與含胡蘿蔔素及脂質的多寡有關，這點也是值得探討的。
6. 在培養團藻的過程中，我們以單向照光即發現團藻有向光亮處移動並聚集的現象；而在低倍顯微鏡下亦可看到團藻以順時鐘的特殊方式運動，且在自轉中有趨光移動現象，可見團藻的運動是一種具有極性並定向的行為。
7. 這次實驗觀察、分析的團藻主要為成熟的團藻。我們也曾以 3000 rpm, 5 分鐘的狀態離心團藻，並使成熟的團藻破裂，釋出包含在空腔中的子團藻。結果發現子團藻與成熟的團藻相同，也有運動趨光的現象。可見子團藻還在母團藻體腔內時，在運動上已有極化的現象。而子團藻極化的情形與成熟的團藻是否有程度上的差異，以及發育上的關聯，這也是值得我們探討的。

柒. 結論

1. 在團藻細胞眼點的極性部分，我們了解到團藻的眼點在排列上依大小來分布，雖然不是絕對的，但也有中度的相關性。在我們觀測的半個團藻中，眼點有較大的一端與較小的一端，中間並呈過渡分布。這點間接支持、並證明了文獻上描述眼點於前端較大，後端較小的極化情形。
2. 在團藻運動的極性部分，我們觀察了成熟與未成熟的團藻，發現團藻運動皆沿著一定的方向前進。因為團藻運動時沿一假想自轉軸自轉前進，且自轉軸與前進方向平行，貫穿前後兩端，所以以下稱團藻的運動方向的前方為「前端」，運動方向的正後方則稱為「後端」。團藻運動時是以沿著前後端所成的假想軸順時鐘自轉，並同時趨光前進。(以右手四指握拳，拇指方向為前進方向，而其餘四指方向為自轉方向。)
3. 因為眼點分布與團藻運動皆有極化現象。團藻是朝光源運動，而眼點又是辨別光源的胞器。所以我們推測眼點與運動有極密切的關係，並且同時構成了團藻的極性。這個假設也能夠解釋球狀對稱的團藻其眼點的功能，以及定向的運動問題。
4. 由於觀察眼點時必須先固定(殺死)團藻，而觀察運動時又無法記錄眼點大小。目前尚未提出直接的證據證明團藻的眼點極性和運動極性是一致的。這是我們有待探究的方向。此外，針對團藻極性的發育過程及發育機制，也是我們進一步探討的目標。

捌 .參考資料

一. 引用文獻：

- [1] **TI: Genetic, biochemical, and molecular approaches to Volvox development and evolution.**
AU: Kirk,-D.L.; Harper,-J.F.
SO: MOLECULAR-APPROACHES-TO-THE-STUDY-OF-PROTOZOAN-CELLS. Jeon,-K.W.-ed.
1986. vol. 99 pp. 217-289
- [2] **TI: Flagellar, cellular and organismal polarity in Volvox carteri.**
AU: Hoops,-H.J.
SO: J-cell-sci. Cambridge : The Company of Biologists Limited. Jan 1993. v. 104 (pt.1) p. 105-117.
- [3] **Algae** Linda E. Graham ,Lee W. Wilcox ,PRENTICE HALL
- [4] **TI: Two photophobic responses in Volvox carteri Algae.**
AU: Sakaguchi,-H.; Iwasa,-K.
SO: Plant-Cell-Physiol. Kyoto, Japanese Society of Plant Physiologists. Aug 1979. v. 20 (5) p.
909-916. ill.

二. 其他書籍：

生物統計學入門 (九州出版社；沈明來)

附錄一

公式推導：

由於團藻在高倍率觀察下並非理想的球體，所以我們在建立模型時，為求精準，選用了橢球的模型。

將顯微鏡和影像處理軟體所測得的二維座標(X_0, Y_0)代入橢球方程式：

$$\frac{X^2}{a^2} + \frac{Y^2}{b^2} + \frac{Z^2}{c^2} = 1, \text{ 其中 } a、b、c \text{ 分別為此橢球的三個半軸長, 每顆團藻}$$

不一定相同，可由照片測得。如此一來即可得出 Z 座標值

又因為眼點亦為一橢球體，所以眼點大小的測量值（即截面積的投影）會受到觀察角度的影響，為修正這個誤差，我們可以利用每顆眼點的傾斜的角度(θ)，和觀測到的投影與原截面之間的夾角(ϕ)，建立一套模型，將每一個測到的投影推算回原截面，再推算回標準截面積。

截面積的計算，可利用橢圓的參數式：

$$X = a \cdot \cos \omega$$

$$Y = b \cdot \sin \omega$$

原截面為一個橢圓，其長軸為 $\sqrt{a^2 \cos^2 \omega + b^2 \sin^2 \omega}$ ，短軸即為 a

我們定 $a = 1$ ， $b = k$ ，再根據橢圓的面積公式： $S = \pi a b$

可得知每個橢球的標準截面積和任一角度截面積的關係為：

$$\begin{aligned} & (\pi \cdot 1 \cdot 1) : (\pi \cdot 1 \cdot \sqrt{\cos^2 \omega + k^2 \sin^2 \omega}) \\ & = 1 : \sqrt{\cos^2 \omega + k^2 \sin^2 \omega} \\ & \therefore \text{標準截面積 } A_{std} = A_0 \times \left(\frac{1}{\sqrt{\cos^2 \omega + k^2 \sin^2 \omega}} \right), A_0 \text{ 為眼點的其中一個截面,} \end{aligned}$$

而 k 值經測量後發現約為 1.6

又： \therefore 投影面積 $A' = A_0 \cdot \cos \phi$ ， ϕ 為截面與 xy 平面的夾角

公式可進一步改寫為：

$$A_{std} = A' \times \left(\frac{1}{\cos \phi \times \sqrt{\cos^2 \omega + k^2 \sin^2 \omega}} \right)$$

再將 ω 用 θ 、 ϕ 來代換，即可得到投影面積和標準截面積的換算公式：

$$A_{std} = A' \times \left(\frac{1}{\cos \phi \times \sqrt{\cos^2 (90^\circ - \theta + \phi) + k^2 \sin^2 (90^\circ - \theta + \phi)}} \right)$$

附錄二

以下是我們用來計算 團藻細胞的眼點大小 所使用的程式。是我們自己以 Visual Basic 6.0 環境所寫的。因為在干涉相位差顯微鏡下觀察到的眼點影像都已經儲存成電腦檔案，所以我們只要匯入眼點的圖檔，就能使用這個軟體來計算各個顏色所佔的面積，並推算出眼點的大小。下面附上外觀及程式碼。

計算結果	佔有率(%)
計算結果A.	5554 16.0539
計算結果B.	0 .
其他	29042 83.9461
總面積	34596

Visual Basic 程式碼

```
Dim aa As Long
Dim num(10) As Long
Dim fn As Variant
Private Sub clearpre_Click()
    prea.Caption = "": preb.Caption = "": preo.Caption = "": pres.Caption = "": preap.Caption = "":
    prebp.Caption = "": preop.Caption = ""
End Sub
Private Sub clears_Click()
    Cls
End Sub
Private Sub cleartx_Click()
    txa.Text = 0: txb.Text = 0: tya.Text = 0: tyb.Text = 0: coa1.Text = 0: coa2.Text = 0: cob1.Text = 0: cob2.Text = 0
```

註：以下是有關於表單的功能

```

= 0
End Sub
Private Sub Form_DblClick()
txa = txa.Text: txb = txb.Text: tya = tya.Text: tyb = tyb.Text
shr.Visible = True: shr.Top = tya - 20: shr.Left = txa - 20: shr.Height = tyb - tya + 40: shr.Width = txb - txa + 40
End Sub

Private Sub Form_Load()
txa.Text = 0: tya.Text = 0: txb.Text = 0: tyb.Text = 0
End Sub

Private Sub pic_MouseDown(Button As Integer, Shift As Integer, X As Single, Y As Single)
pre.Text = pic.Point(X, Y) & "," & Hex(pic.Point(X, Y)) & "," & "X=" & X & "," & "Y=" & Y
'X = X + 200: Y = Y + 150: pre0.Caption = X & "," & Y
End Sub

Private Sub browse_Click()
Cls
dia.ShowOpen          註：以下是開啓圖檔的功能
fn = dia.FileName
'Print fn
pic.Picture = LoadPicture(fn)
L = Len(fn)
For N = L To 2 Step -1
LL = Mid(fn, N, 1)    'Print LL
Ln = "\"             'Print Ln
    If LL = Ln Then
        fnn = Mid(fn, N + 1, L - N + 1)
    Exit For
    End If
Next N
Print Spc(10); fnn
Print Spc(10); fn
End Sub

Private Sub calcu_Click()
ara = 0: arb = 0: aro = 0
coa1 = coa1.Text: coa2 = coa2.Text: cob1 = cob1.Text: cob2 = cob2.Text
txa = txa.Text: txb = txb.Text: tya = tya.Text: tyb = tyb.Text
'arx=area,coxx=color

```

For X = txa To txb 註：以下是依照像素數，測量眼點大小的功能

For Y = tya To tyb

aa = pic.Point(X, Y)

'Print aa

Select Case aa

Case coa1 To coa2

ara = ara + 1

Case cob1 To cob2

arb = arb + 1

Case Else

aro = aro + 1

End Select

Next Y

Next X

sig = (txb - txa + 1) * (tyb - tya + 1)

prea.Caption = ara

preb.Caption = arb

preo.Caption = aro

pres.Caption = sig

preap.Caption = Format((ara / sig) * 100, "##.####")

prebp.Caption = Format((arb / sig) * 100, "##.####")

preop.Caption = Format((aro / sig) * 100, "##.####")

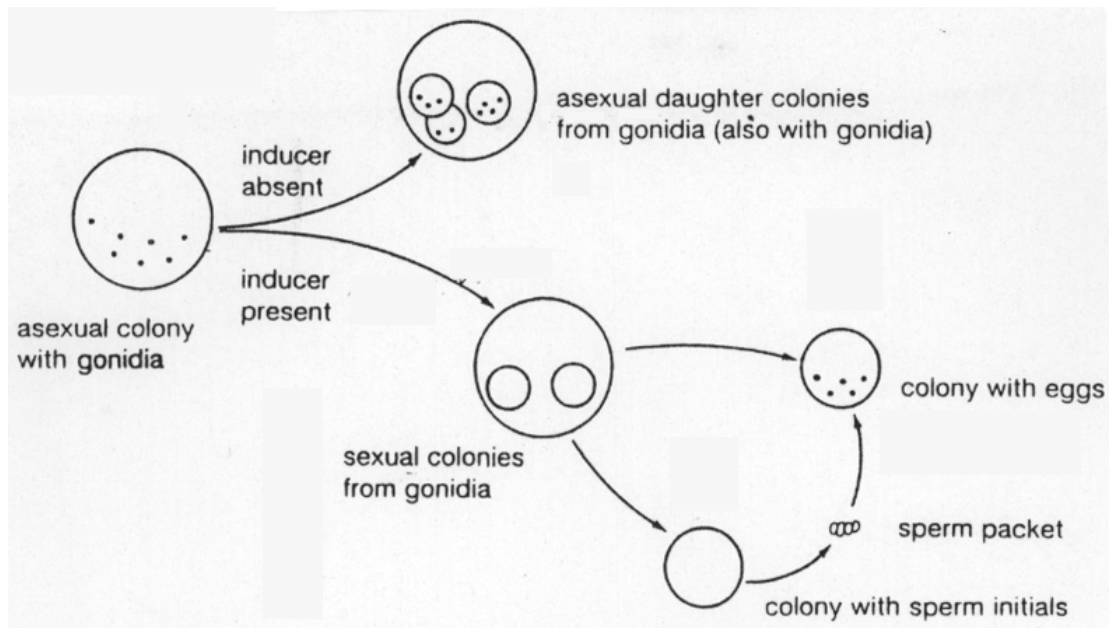
End Sub

Private Sub end_Click()

End

End Sub

附錄三：團藻的生活史



圖一：團藻的有性與無性生活史

圖二(下頁)：團藻生活史的細節：

無性生殖：

(a) 無性生殖細胞(gonadia)

(b) ~ (e) 團藻的胚胎

(f) ~ (h) 子團藻由細胞鞭毛向內，翻轉為細胞鞭毛向外

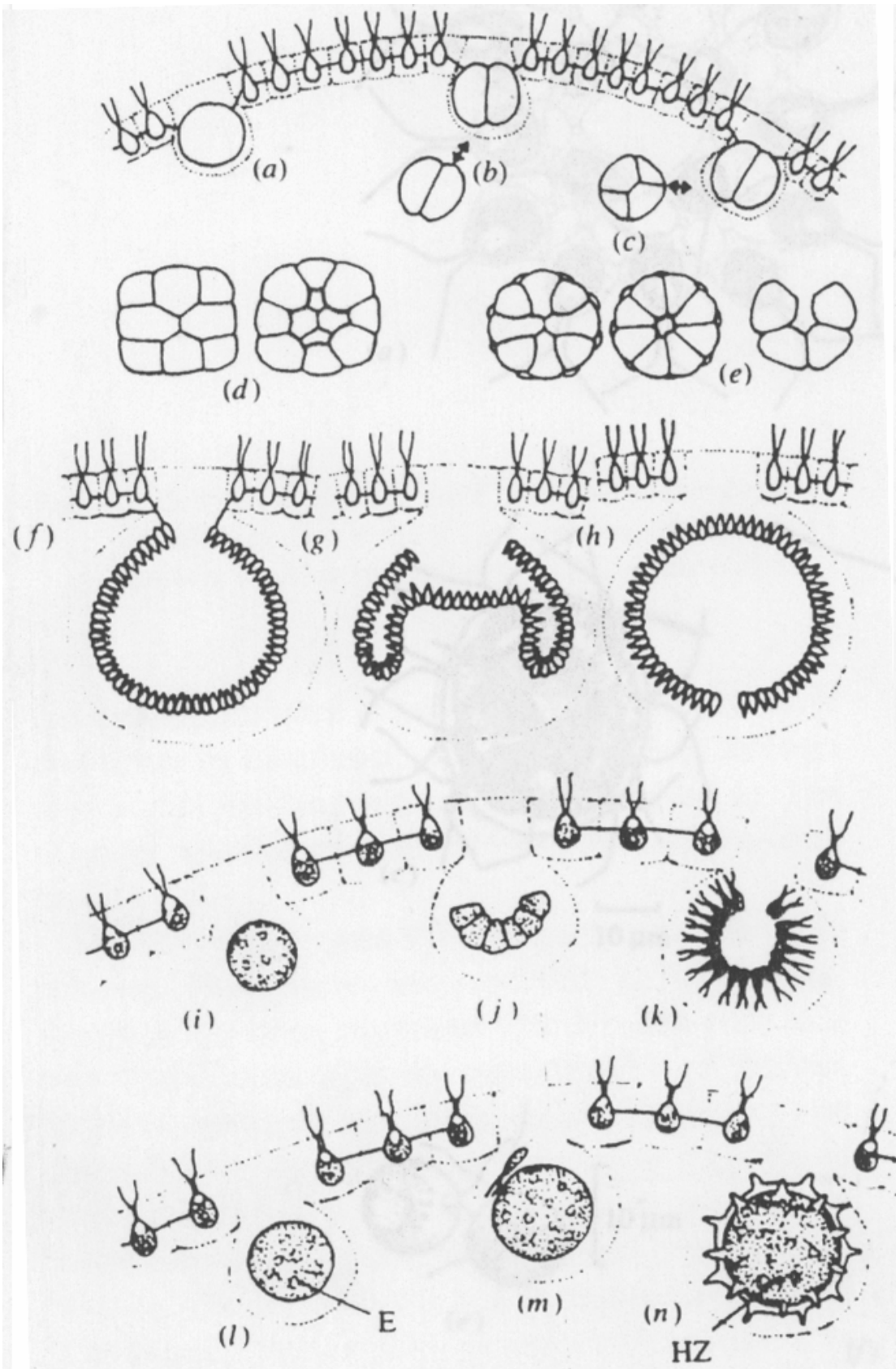
有性生殖：

(i) ~ (k) 團藻精細胞的形成

(l) 團藻卵細胞

(m) 受精的情形

(n) 合子(zygote)



原始數據

	眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)		眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)
a1	0.150623	26.615	19.02456	b1	0.204649	35.409	3.855957
a2	0.141962	27.434	18.27387	b2	0.178511	55.608	28.32123
a3	0.100733	32.308	14.18958	b3	0.333233	35.616	2.882386
a4	0.045794	43.821	6.596729	b4	0.124311	37.035	1.783104
a5	0.033600	41.512	0.00000	b5	0.184317	57.788	25.93138
a6	0.054650	48.950	7.83121	b6	0.122876	37.523	2.201072
a7	0.062041	48.879	9.215048	b7	0.230221	37.433	1.798953
a8	0.089572	51.977	12.91333	b8	0.206736	37.633	1.672891
a9	0.097485	54.662	13.90207	b9	0.17283	37.974	2.252434
a10	0.137385	56.400	17.50843	b10	0.315821	65.627	30.01078
a11	0.096596	39.999	16.11579	b11	0.216377	48.901	13.39738
a12	0.223762	59.457	23.90507	b12	0.326487	65.112	28.88306
a13	0.070706	49.610	10.57864	b13	0.090808	34.889	2.082296
a14	0.506179	5.831	40.96311	b14	0.206487	39.368	3.88007
a15	0.540352	0.590	41.34236	b15	0.407152	91.112	56.81177
a16	0.547570	0.000	41.51194	b16	0.409864	30.477	25.14272
a17	0.539293	21.168	44.63855	b17	0.225126	39.621	18.51495
a18	0.480973	24.237	42.77887	b18	0.088122	36.932	0.000
a19	0.532697	31.331	61.71483	b19	0.366673	60.910	26.05481
a20	0.339697	34.198	36.54347	b20	0.465985	38.612	13.21166
a21	0.274742	32.077	32.66531	b21	0.444696	42.316	38.33145
a22	0.184754	22.345	25.19005	b22	0.275404	41.345	17.8152
a23	0.201453	27.836	27.23487	b23	0.492127	7.708	29.86881
				b24	0.24853	21.257	15.9308
				b25	0.43117	6.358	30.67927
				b26	0.252652	32.392	7.975454
				b27	0.607764	0.000	36.93233
				b28	0.470758	26.906	36.38642
				b29	0.200585	35.693	6.128818

	眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)		眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)
c1	0.12303641	3.031	46.431	d1	0.254784	34.474	2.861
c2	0.1628058	30.668	75.915	d2	0.359308	34.680	2.593
c3	0.18226749	26.077	72.693	d3	0.254361	4.912	33.627
c4	0.15413473	5.592	47.502	d4	0.522056	0.000	36.369
c5	0.24495066	29.747	76.383	d5	0.204292	24.724	16.264
c6	0.19343026	4.036	50.175	d6	0.240855	50.388	16.587
c7	0.35473033	5.862	47.933	d7	0.221556	25.246	23.122
c8	0.24782605	36.751	15.006	d8	0.091046	36.369	0.000
c9	0.153694	19.940	28.251	d9	0.299216	29.227	43.006
c10	0.11988746	47.823	0.000	d10	0.248477	5.694	37.684
c11	0.1205342	19.533	28.673	d11	0.358198	30.208	7.663
c12	0.32996173	45.014	16.912	d12	0.250614	16.353	21.743
c13	0.27372257	33.081	48.753	d13	0.138064	62.542	28.704
c14	0.37983802	0.001	47.824	d14	0.508012	23.492	48.446
c15	0.24407618	14.786	46.610	d15	0.269039	27.532	19.437
c16	0.16150757	36.274	53.671	d16	0.489753	28.844	37.499
c17	0.36032883	13.788	44.823	d17	0.204592	24.468	16.394
c18	0.12663633	11.122	45.804	d18	0.238765	50.900	16.899
c19	0.14830428	47.611	65.320	d19	0.373218	74.722	39.621
c20	0.23096895	9.472	44.429	d20	0.167236	35.419	2.762
c21	0.24561671	26.495	55.015	d21	0.515904	23.351	49.352
c22	0.19746786	26.726	43.891				
c23	0.25571031	10.562	46.263				

	眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)		眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)
e1	0.40969239	23.195	18.33457	f1	0.152158	43.93595	6.466806
e2	0.42720936	23.128	18.45245	f2	0.269222	36.64374	39.60155
e3	0.044508	22.572	19.20115	f3	0.254499	45.04643	5.338264
e4	0.09246323	23.230	22.54144	f4	0.359552	46.53805	4.526053
e5	0.05846226	17.288	0.000164	f5	0.300246	34.20271	53.28891
e6	0.13380507	24.891	10.74636	f6	0.123215	50.18908	0.000406
e7	0.33726044	17.660	20.40247	f7	0.344188	66.43208	42.37553
e8	0.11289628	24.042	26.27329	f8	0.221612	49.54896	17.92286
e9	0.39059825	21.488	24.58954	f9	0.342064	73.04302	40.696
e10	0.12015171	21.568	10.76446	f10	0.522056	22.97988	37.2281
e11	0.06921039	9.898	9.146423	f11	0.204451	32.74555	18.12217
e12	0.16475452	9.085	10.23659	f12	0.240899	64.91061	15.27246
e13	0.06742295	9.329	10.50845	f13	0.352646	79.52311	34.98442
e14	0.37957993	18.942	20.45635	f14	0.524341	23.13383	32.66789
e15	0.72178258	9.815	19.39771	f15	0.685045	0.000261	50.18869
e16	0.26186929	19.343	21.61193	f16	0.282602	23.54962	27.11803
e17	0.08604906	14.376	14.41786	f17	0.419527	57.61185	35.51976
e18	0.4764938	14.327	14.67989	f18	0.237842	47.92337	19.49859
e19	0.17672918	14.476	14.30421	f19	0.559303	57.44676	40.87194
e20	0.07495303	26.765	13.96733	f20	0.265717	41.51672	17.64897
e21	0.74380037	0.000	17.28775	f21	0.636979	29.89237	47.07455
e22	0.2092586	0.220	17.19461				
e23	0.88337026	25.271	30.39826				
e24	0.72768805	24.754	29.92283				
e25	0.17830153	23.308	29.27407				
e26	0.31218497	23.039	29.0548				

	眼點標準 截面積 (μm^2)	與最大的 眼點距離 (μm)	與最小的 眼點距離 (μm)
g1	0.34821584	14.305	18.93264
g2	0.32947687	14.742	18.47378
g3	0.23317728	24.179	27.1395
g4	0.40942481	14.758	21.39223
g5	0.22715412	6.396	31.95168
g6	0.22100195	9.371	23.57646
g7	0.30207827	21.878	24.35561
g8	0.24257992	20.630	23.18166
g9	0.15677586	22.352	24.81293
g10	0.15548061	23.162	25.45978
g11	0.35344088	15.162	18.46701
g12	0.23135986	22.207	15.77999
g13	0.11882142	32.853	0.000449
g14	0.37682909	1.844	33.68111
g15	0.57623069	0.001	32.85172
g16	0.51192171	20.111	38.43735
g17	0.13280736	18.261	14.72623
g18	0.13636286	19.692	14.60738
g19	0.27203073	10.348	22.58796
g20	0.57319898	19.983	51.56463
g21	0.36478039	8.208	28.12977

評語：

此研究內容，所使用之方法及思考方式具原創性及整合性，使假說得以佐證，整個團隊具研究熱情及深度。這個實驗目的在確證團藻具極性之性質，而此性質是以眼點依大小排列形成，實驗方法包括形態觀察，**confocal microscope** 記錄，數學公式之導演，以統計建立相關性，是完整性相當好的研究。

作者簡介

林暉翔，目前就讀於建中數理資優班，曾參加五屆國內科展、中研院高中生生物輔導方案。從小就對科展充滿興趣，目前還在中研院進行專題研究。興趣是打球、聽音樂、有機化學及生物。未來希望能從事基礎生物學方面的研究。

張皓牧，目前就讀於建中數理資優班，參加中研院高中生生物輔導方案。對生命充滿著熱誠。這次科展和其他的同學一起找資料、做實驗、討論實驗結果，有時遇到瓶頸時，大家還會相約到球場休閒一下，走過這一段，收穫良多，真是不虛此行。

陳義雄，目前就讀於建中數理資優班，國小以來每次科展都有參加，並參加中研院高中生生物輔導方案。平時喜歡到戶外去走走，多親近大自然和多采多姿的生命。興趣是打籃球、聽音樂。未來希望能從事動物方面的研究。

鄭丁晟，高一、高二就讀於建中數理資優班，目前在英國 Cambridge Tutor College 就讀。曾參加中研院高中生生物輔導方案。對癌症醫學方面有濃厚興趣，希望將來能從事相關的研究。休閒時也聽聽音樂作為消遣。