

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

030308

一覽無遺 - 氣孔計數法的改良

學校名稱：臺中市私立新民高級中學(附設國中)

作者： 國二 葉恩彤 國二 廖涓岑 國二 李欣諭	指導老師： 林顯豪
---	------------------

關鍵詞：氣孔系、微距攝影、自動分析

摘要

傳統的氣孔計數法，必須在顯微鏡下計算一小塊表皮中的氣孔數，再用此樣區推測全葉的氣孔總數，過程繁瑣、應用也缺乏彈性。我們希望能簡化過程，也讓調查更有彈性，所以我們嘗試使用單眼相機直接對整片葉片微距攝影，希望能一覽無遺的將所有氣孔粒粒分明的紀錄在一張相片中，以利後續研究與應用。結果顯示，第一，直接用微距攝影拍照就可以拍出全葉的氣孔系了，不需要顯微鏡、不用撕表皮或做印膜，能大大的簡化流程；第二，可以在直拍照片中直接計數全葉氣孔，也可以在直拍照片中劃設位置精確的樣區，能用來任意分析比較各樣區，使調查更有彈性；第三，直拍照片可使用軟體自動分析來計數氣孔系數量，有望減輕人力負擔。

壹、研究動機

七年級自然課我們做過『計算葉的下表皮氣孔數』實驗，這個實驗是先撕取葉片前中後三區下表皮，在顯微鏡中計算其氣孔數，再用樣區法估計全葉氣孔數；我們發現此法撕下來的表皮充滿不確定性，無法精確的指定某一塊表皮，只能大概知道是屬於葉子的前中後哪一區，比如無法指定要撕葉片的基部或正中央區域，而且因為葉緣特別軟弱，表皮很難撕，都是撕靠近葉片內部，局限很大。查閱文獻的其他氣孔計算法，還包括指甲油印膜法、南寶樹脂印膜法等，也要撕印膜，也會有定位問題；另外還有人直接在顯微鏡下移動葉片位置來觀察氣孔，雖然不用撕皮，但顯微鏡下的視野很窄，定位也不容易，只能大概知道這是葉子邊緣還是葉脈附近。

這些傳統的計數法很像是瞎子摸象，在看不到整體樣貌的情況下，就用某些區域的數量來推測全部，不容易確定自己在看什麼。我們認為解決方法應該是要先看到全貌，也就是建立全葉的氣孔分佈地圖，有了地圖才有大局觀，也能快速精準的指定區域深入分析。因此，為了建立氣孔分佈地圖，我們想嘗試能不能直接拍攝出全葉的氣孔，希望在一張照片上就能看到所有氣孔，這樣就能很方便的利用這張照片來分析氣孔數量、密度或分佈等資訊，並且因為這是全葉完整的數位化影像資料，也有可能使用軟體來輔助分析。

(相關教學單元：細胞到個體、植物如何獲得養分、樣區採樣法)

貳、研究目的

- 一. 確認可行性：可用相機直接辨識氣孔系
 - (一) 在直拍照片中辨識出氣孔系位置
 - (二) 在直拍照片中辨識出全葉的氣孔系
- 二. 提高影像品質：尋找較佳的拍照方式，使氣孔系更容易辨識
 - (一) 瞭解光照影響
 - (二) 瞭解葉片固定方式的影響
- 三. 評估效果：實際應用在氣孔系計數時的效果
 - (一) 直拍照片中全葉直接計數
 - (二) 比較直拍法與撕皮法計數
- 四. 延伸應用：使用軟體自動計數
使用 ImageJ 自動分析照片中氣孔系的總數

參、研究設備及器材

- 一. 植物：紫錦草(紅葉鴨跖草 *Setcreasea purpurea* Boom)
- 二. 器材：複式顯微鏡、解剖顯微鏡、測微器、單眼相機 sony a6100、微距鏡頭 sony SEL90M28G
- 三. 軟體：影像分析軟體 ImageJ

肆、研究方法

一. 確認可行性：可用相機直拍辨識出氣孔系

- (一) 在直拍照片中辨識出氣孔系位置：將葉片直接放在微距鏡頭前，以最短對焦距離拍照，可取得最高放大倍率的照片。
- (二) 在直拍照片中辨識出全葉的氣孔系：由鏡頭最短對焦距離慢慢拉遠，直到看到全葉後拍下照片。

二. 提高影像品質：尋找較佳的拍照方式，使氣孔系更容易辨識

- (一) 瞭解光照影響：調整拍照時的光照來源與角度，比較背光、面光、斜射光與室外日光對氣孔辨識度的影響。
- (二) 瞭解葉片固定方式的影響：比較摘葉平放、壓平與活體觀察的差異。

三. 評估效果：實際應用在氣孔計數時的效果

- (一) 直拍照片中全葉直接計數：直接計數全葉照片中所有氣孔數量，評估此法效益。
- (二) 比較直拍法與撕皮法計數：以直拍法直接計數取得的實際值為準，比較撕皮法推估值與直拍法模擬樣區推估值的差異；過程是先選取 1 平方公分的平整葉片區作為樣本，以直拍法取得影像，直接計數此樣本氣孔系總數，以此做為實際值；接著是對此樣本使用撕皮法，撕下表皮後用複式顯微鏡計數，以顯微鏡鏡頭中視野數量推估此樣本氣孔係總數；直拍法模擬樣區推估則是在一開始的直拍照片上，模擬顯微鏡視野的面積，在照片正中央框選同面積的模擬樣區，以模擬樣區來推估樣本的氣孔系數量，比較撕皮法推估、直拍模擬樣區推估與實際值的差異。

四. 延伸應用：使用軟體自動計數

使用 ImageJ 自動分析照片中氣孔系的總數：利用 ImageJ 可自動計算顆粒數量的功能，原理是編輯照片使氣孔系看起來像是顆粒，再以軟體自動計數；步驟是先把照片轉為黑白，並反轉顏色、提高對比，使背景變白，而每一個氣孔看起來都像是一個黑色顆粒，最後使用軟體中的顆粒分析功能，就能自動計算照片中所有顆粒的數量，也就是氣孔系的數量。

伍、研究結果

一. 確認可行性：可用相機直接辨識氣孔

(一) 在直拍照片中辨識出氣孔位置

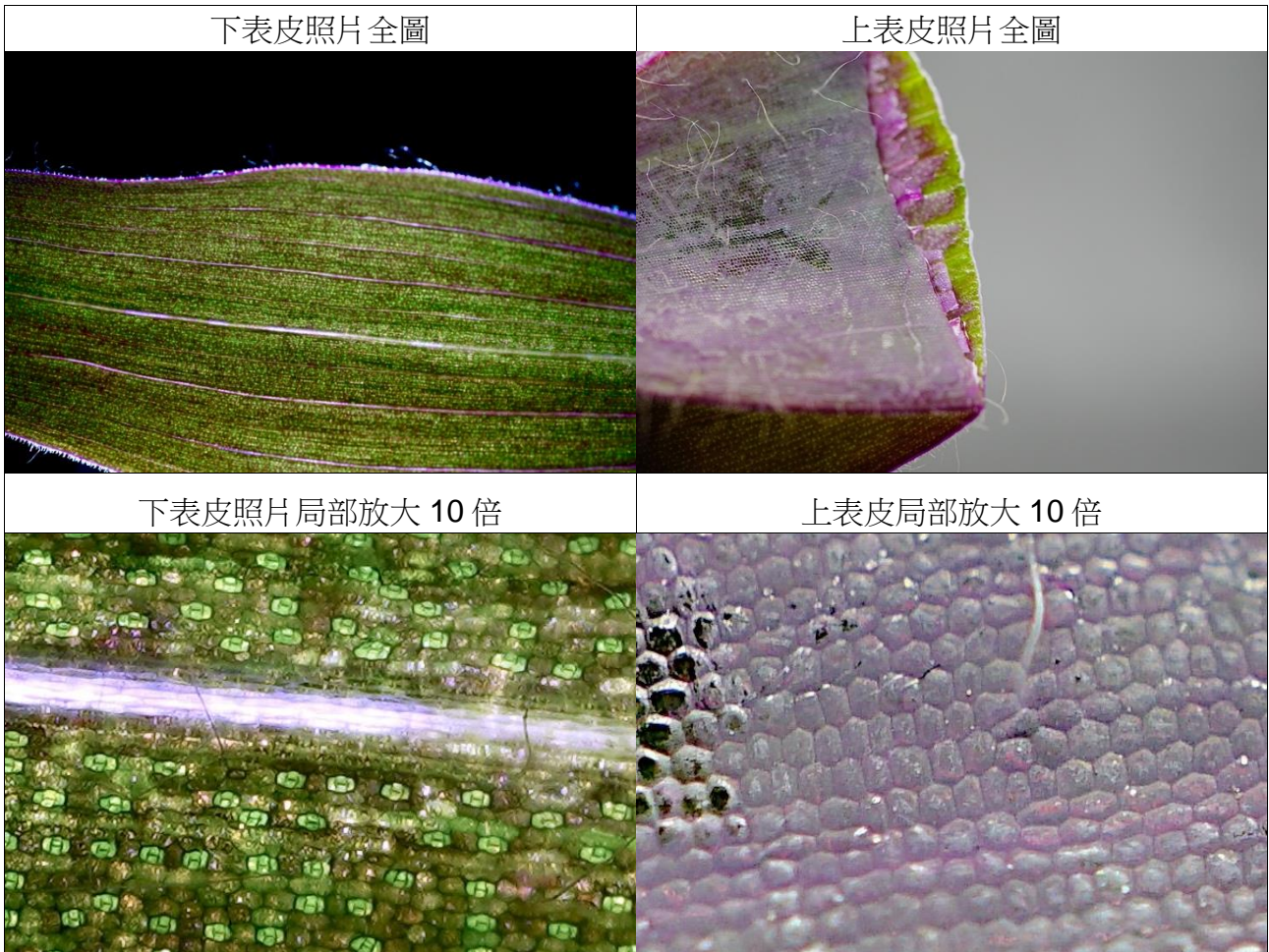


圖 1-1-1 紫錦草表皮的最近對焦距直拍照片
與上表皮只有表皮細胞對照，下表皮能清楚的辨識出數十個外觀比較明亮的氣孔系。

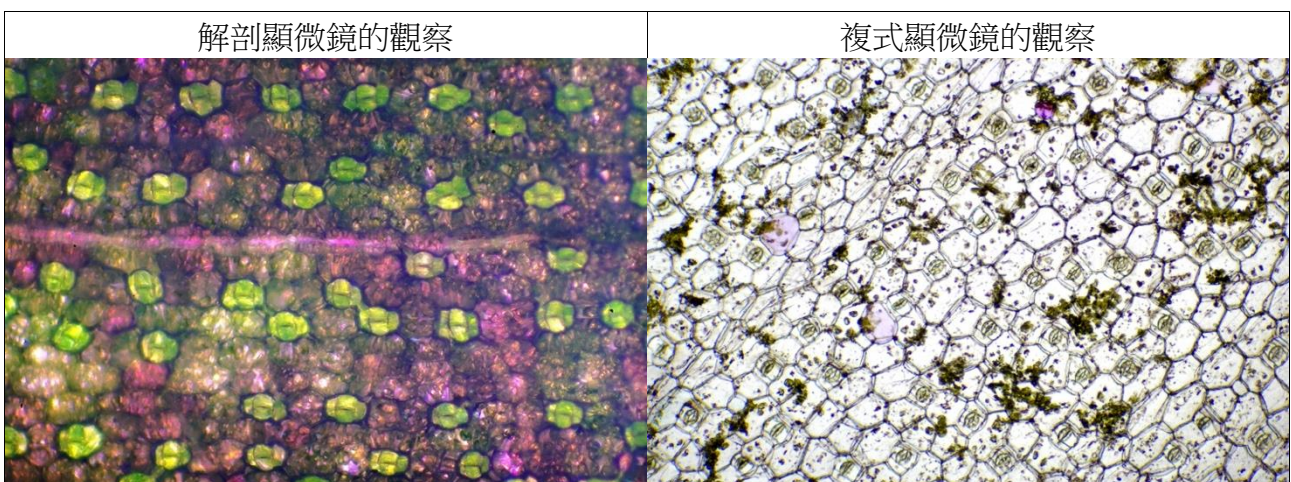


圖 1-1-2 傳統使用顯微鏡觀察的紫錦草下表皮
左圖實際長 x 寬為 2.38x1.59mm，右圖長 x 寬為 2.36x1.57mm。

(二) 在直拍照片中辨識出全葉的氣孔

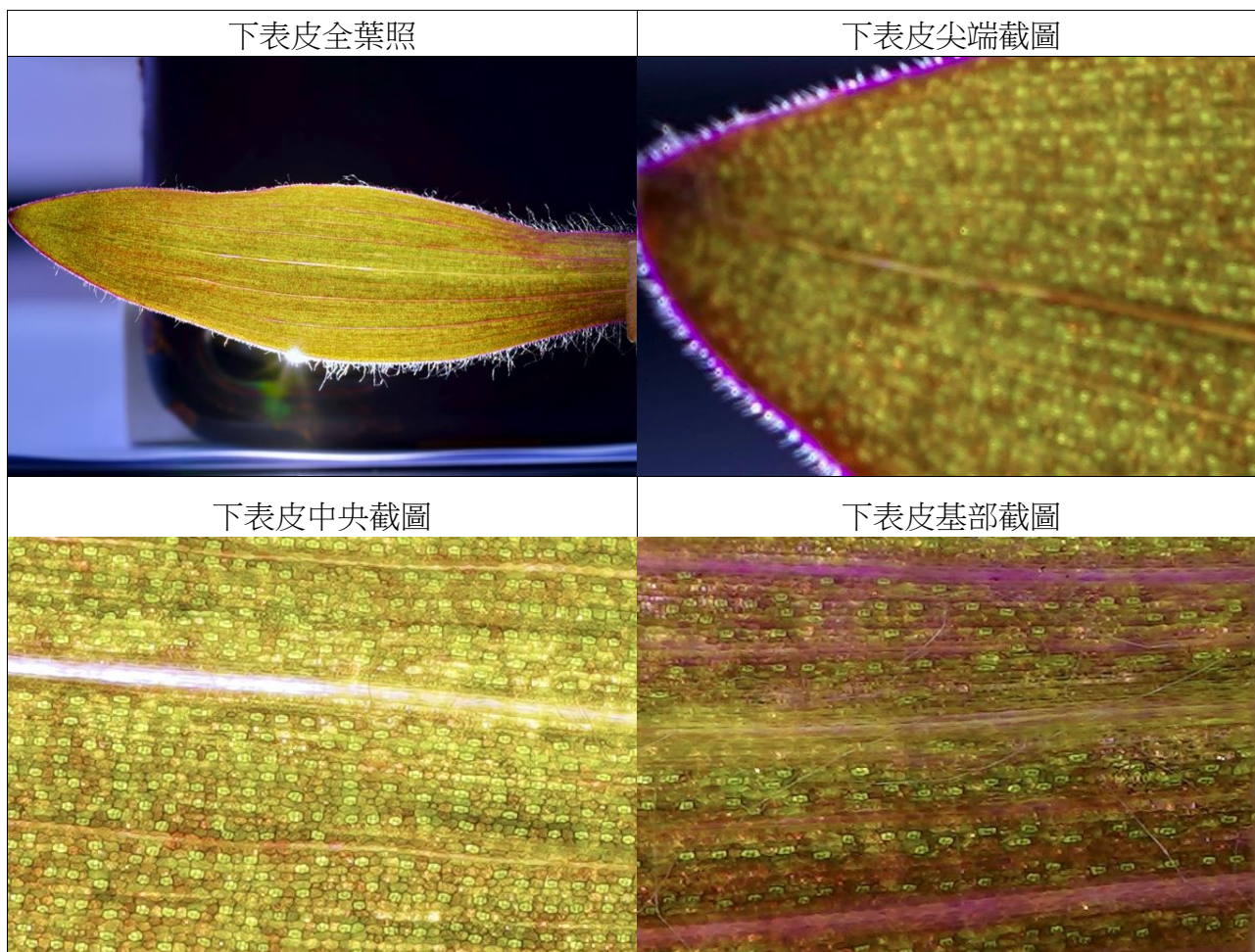


圖 1-2 全葉照與其局部截圖(長 x 寬=7.2x4.8mm)

微距攝影拍下葉長 7.2 公分的全葉照時，氣孔系在中央與基部各可辨識出 300 個與 127 個氣孔系，氣孔密度各為 868 與 367 個/cm²，尖端區模糊無法確認。

二. 提高影像品質：尋找較佳的拍照方式，使氣孔更容易辨識

(一) 瞭解葉片固定方式的影響

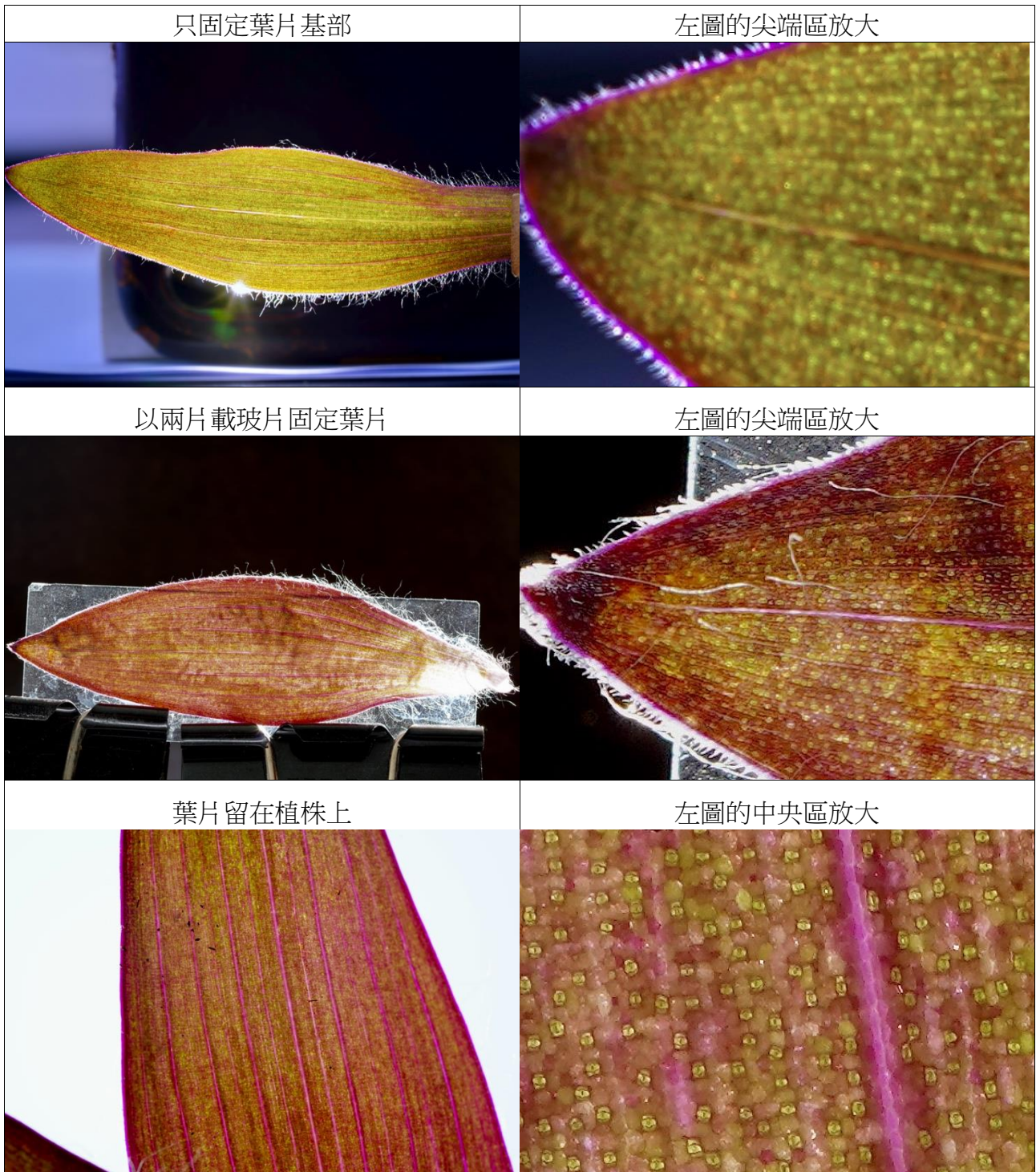


圖 2-1 葉片固定方式對照片的影響

相對於只固定基部，使用兩片玻片固定時，能平整葉片而有助辨識葉片尖端區的氣孔系，而葉片留在植株上拍照時較難取景，且容易晃動模糊，但仍有機會拍出可辨識的氣孔系。

(二) 瞭解光照影響

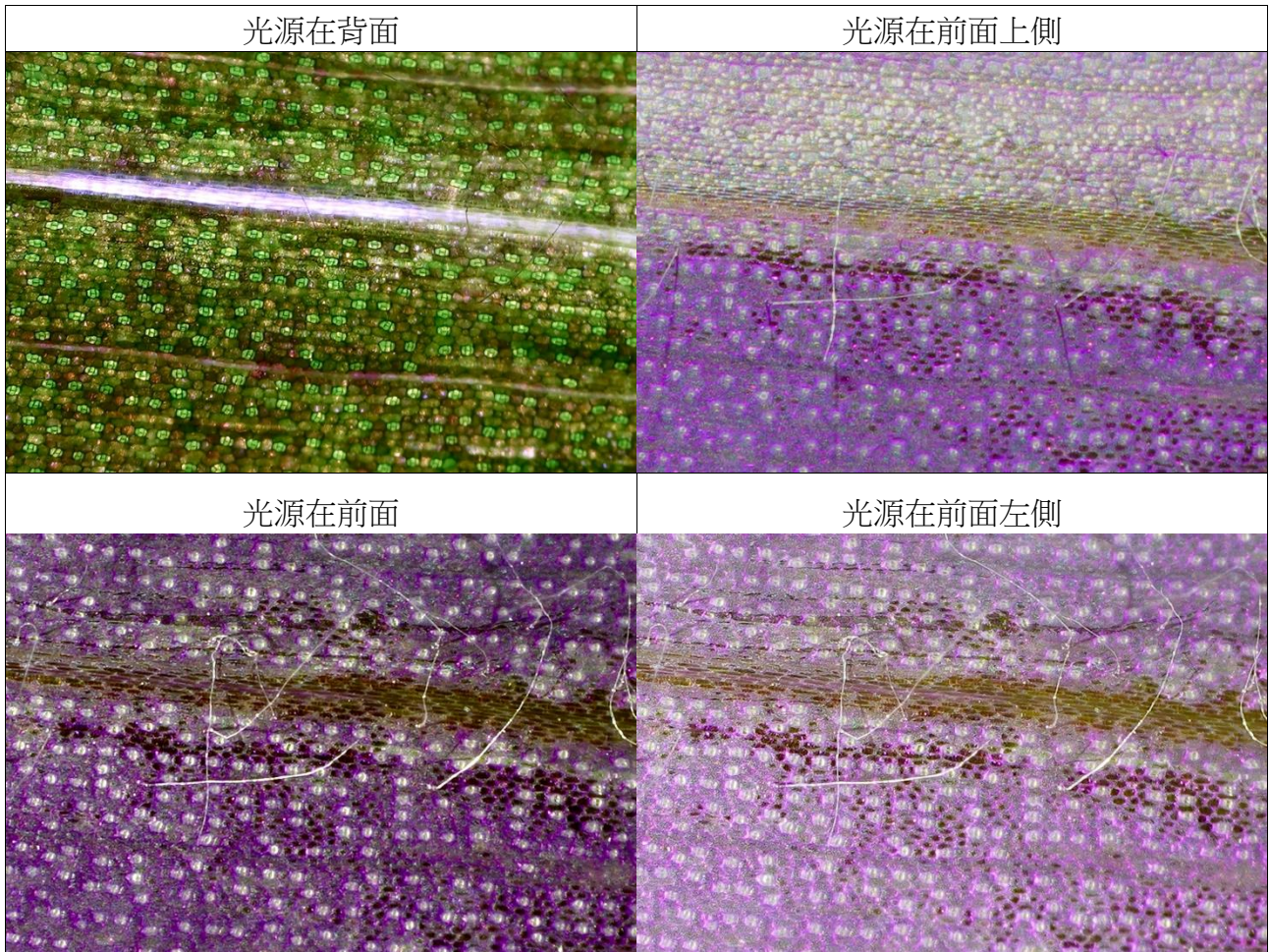


圖 2-2 紫錦草表皮在不同光源下的照片局部截圖

氣孔系最清楚的是背光照，其次是正面光，都能明確辨識氣孔數量，前上方光源則會使主脈上半部對比度低，不易辨識氣孔，光源在前左側則整體對比都降低，較難辨識。

三. 評估效果：實際應用在氣孔計數時的效果

(一) 直拍照片中直接全葉計數

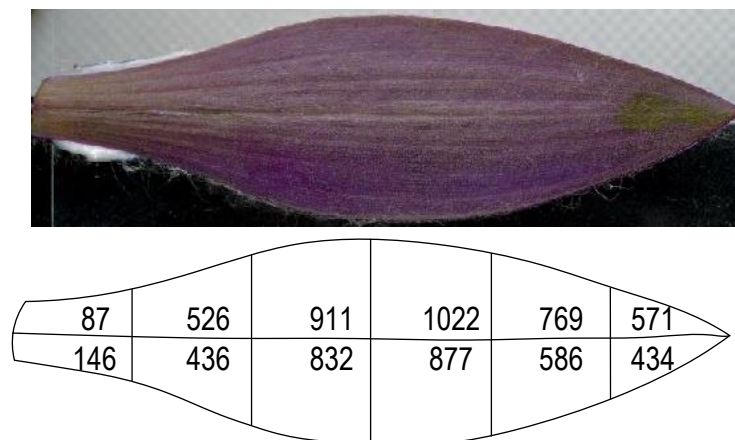


圖 3-1 在直拍照片中直接計數氣孔數量

直拍照片直接計數全葉，共有 7197 個氣孔系，密度 635 個/cm²，由於數量太多，故先分割為 12 區計數以利統計；撕皮法推估此葉則為 7228 個氣孔系，密度為 639 個/cm²。

(二) 比較直拍法與撕皮法計數：

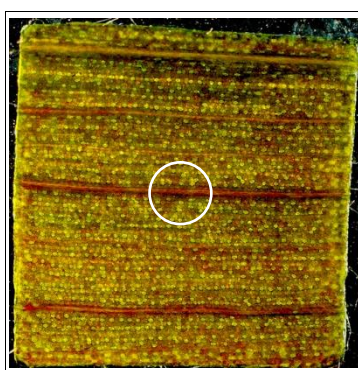


圖 3-2 在樣本上劃設模擬樣區的示意圖

模擬樣區半徑 0.913mm，與撕皮法視野大小相同。

	直接計數 實際值	撕皮法 推估	模擬樣區 推估
平均±SD	926±51	945±155	958±77

表 3-2 撕皮法與模擬樣區推估出的 1cm² 樣本氣孔總數

四. 延伸應用：使用軟體自動計數

使用 ImageJ 對樣本照片修圖，顏色反轉、提高對比，使其氣孔系外觀轉換成顆粒狀，再執行自動顆粒計數功能(analyze particles)，可得到此樣本中有顆粒 845 個，右圖上出現的數字，即為軟體辨識後做出的標記。

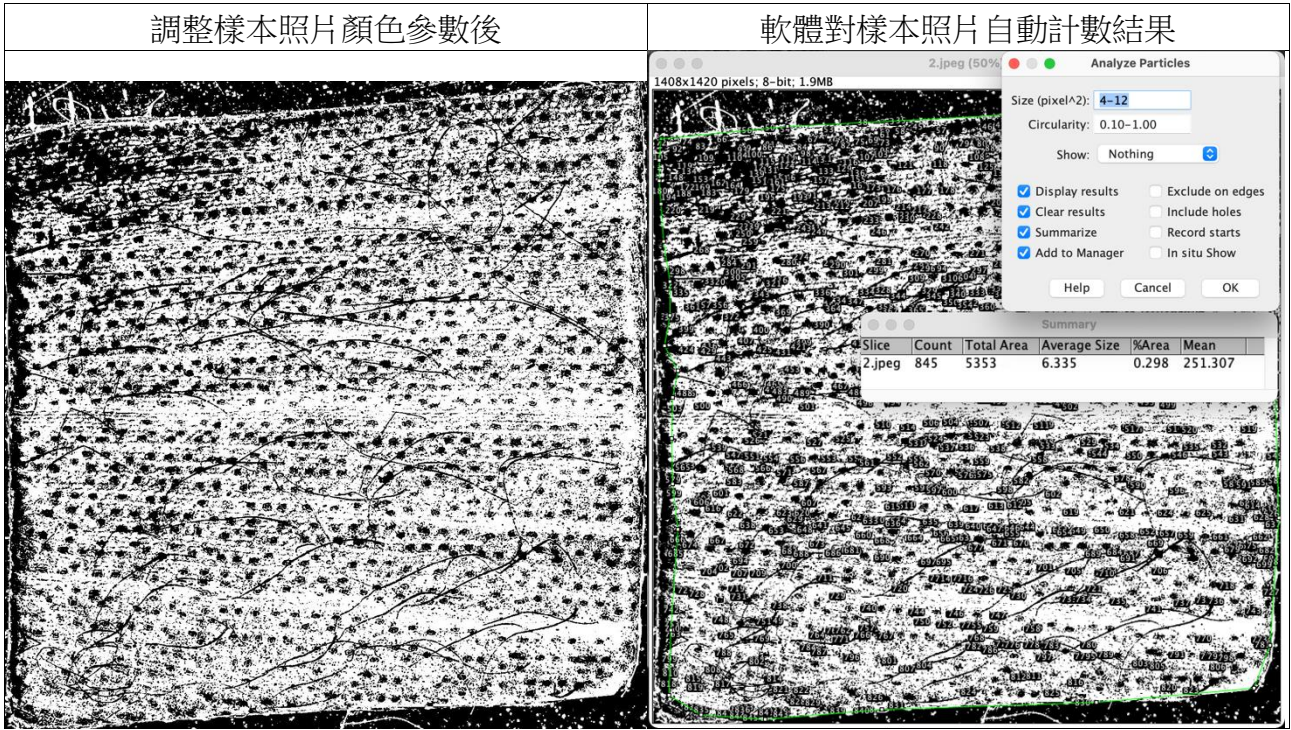


圖 4 葉片樣本修圖後以軟體自動計數氣孔

以此圖樣本為例，直接計數實際值為 867 個氣孔，當參數如圖右上的設定時，可得到最接近實際值的 845 個。

陸、討論

- 一. **確認可行性前**：我們查過文獻，氣孔相關研究都會使用到顯微鏡，但根據我們的結果(圖 1-1,1-2)，可以使用單眼相機加微距鏡頭直拍，就能清楚辨識出氣孔系，並且可以一目瞭然的看出其分佈位置，雖然對於更細微的觀察仍有困難，比如氣孔長度、寬度或開閉程度等，但已經大大提高研究的便利性了，而且其實這些更細微觀察也是有可能做到的，因為我們使用的只是普通 2400 萬像素的相機，現在早就有許多相機畫素是 4000 萬甚至 6000 萬以上了。
- 二. **提高影像品質**：最重要的是光照調整，我們發現失敗的照片多半都是光照角度不佳，導致局部不清楚(圖 2-2)，背光與正面光效果最好，斜射光最差，我們認為可能是因為葉片本身就有曲線，主脈區周圍就像山峰一樣凸出，使斜射光容易被主脈區擋住，而背光或正面光就沒有這個問題；另外表皮只有氣孔系有葉綠素，其他表皮細胞大都是透明與少量的紫色細胞(圖 1-1-2)，因此從後面打光的背光，會更凸顯氣孔系獨特的綠色而更好觀察；觀察時將葉片壓平也有助觀察(圖 2-1 中間)，理由同上，可以讓主脈區與其他區位在同一平面拍照，但是如果只需要觀察局部的氣孔系，甚至可以不用摘下葉子就能拍照(圖 2-1 下方)，如果有需要活體的觀察紀錄，也能使用本研究的直拍法，比如即時觀察葉片上的氣孔，在哪個區域的氣孔狀態，可以大大的增加研究的各種可能性。
- 三. **評估效果**：直拍法如我們預期的可以看到全葉氣孔系，可當成氣孔系地圖，用來認識氣孔分佈情形(圖 3-1)，並直接全葉計數，但是氣孔系數量實在太多了，我們是將照片切割 12 張再分工合作，耗費大量時間。使用撕皮法雖然也能推測出相近的氣孔總數(表 3-2)，但是標準差比較大，而且不容易做更進一步的分析。我們認為直拍法既然可以拍下全氣孔系，其實就可以取代撕皮法了，只要將直拍法結合樣區法，在照片中劃設樣區，用模擬樣區取代顯微鏡的視野，能更快速的推測出氣孔總數(表 3-2)，標準差還比較小，並且還能更進一步延伸，因為撕皮法很難精確的指定要撕下哪一個區域，但是在全葉照片上可以任意指定要哪一個角落來當模擬樣區，方便任意且精確的比較不同區域。
- 四. **延伸應用**：會想嘗試使用軟體自動計數，是因為既然直拍法可以拍下大量清楚的氣孔系，卻只使用樣區法來調查，不但效率較低，也浪費這個已經數位化的資料，而且氣孔系的外型在整片表皮是與眾不同的，也沒有不同氣孔系影像重疊的情形，因此我們認為可以把一個氣孔系看成一個細胞，模仿細胞自動計數法來計數；由於我們先直接計數知道了實際氣孔系總數，因此可不斷調整軟體參數，來得知參數要設定多大才會接近自動實際總數，但是這個方法目前仍有待改善，因為只要氣孔系與周圍表皮的影像對比不夠強，就不容易修圖修到只剩下氣孔系，會使某些氣孔系與背景混淆，導致軟體無法正確計數，如果能改善這個部分，那以後不但有可能快速處理大量葉片的調查，也能任意分割照片，做各分區詳細且快速的自動化分析。

柒、結論

我們的實驗顯示，不需要顯微鏡，只要注意光源角度與葉片固定方式，用相機直拍的方式，就能一目瞭然的看到整片葉子的氣孔系分布，建立氣孔系地圖，這個方法不只能取代撕皮法，也簡化了觀察流程，只要拍照不需撕皮不需要顯微鏡，在運用上還更有彈性，因為可以任意選取精確位置的樣區，並且未來還有希望利用軟體來完成自動計數，以更快速的獲得更詳盡的資料。

捌、參考資料

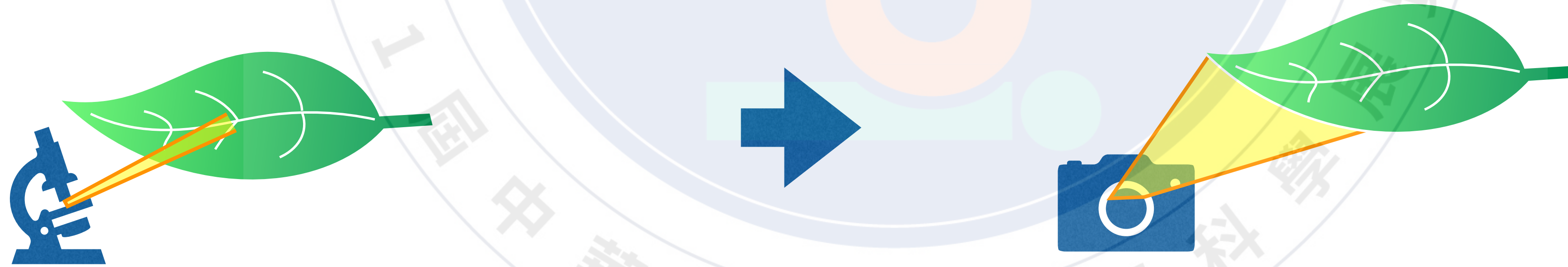
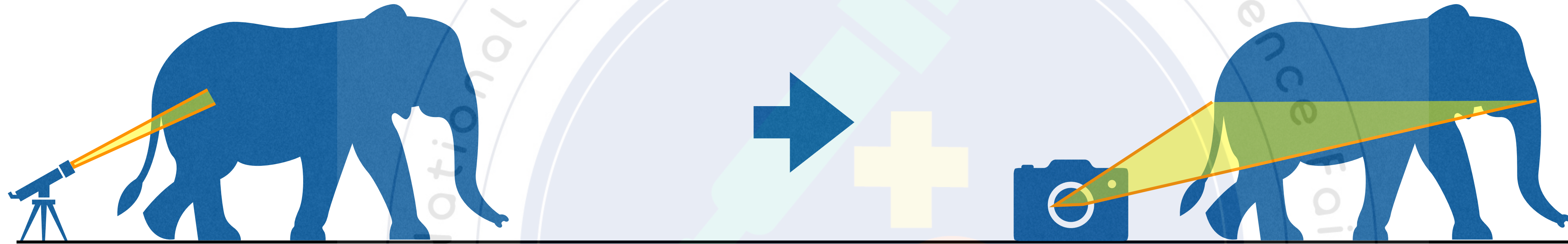
1. 楊宗翰、官大勝、李位仁、陸昱成、謝相宏(1982)。氣孔的大小及分布之研究。全國中小學科展第 22 屆生物科第一名。
2. 林英子(1982)。研究氣孔開閉的新技術及其應用。全國中小學科展第 22 屆生物科第一名。
3. 蘇禹銘(1989)。不同生態植物氣孔之比較研究。全國中小學科展第 23 屆生物科第二名。
4. 周俞宏、馬嘉南(1988)。灣裏地區空氣污染對榕樹氣孔的影響。全國中小學科展第 28 屆生物科第三名。
5. 張珮綺、陳奕伶、朱宜琳(2005)。看林葉繽紛-探索草本、木本植物氣孔與蒸散作用之研究。全國中小學科展第 45 屆生物及地球科學科最佳團隊合作獎。
6. ImageJ 實用技巧——自動細胞計數(解放雙手篇)(無日期)。民 109 年 12 月 19 日，取自：<https://www.getit01.com/p20190402454959707/>。

【評語】 030308

1. 作者利用簡單的單眼相機加微距鏡頭直接拍照，能清楚辨識出氣孔位置及數量，改進傳統的實驗方法，是很有創意的科展作品。
2. 研究主題的發想能妥善運用上課所學與生活知識結合，適切根據生物實驗課所面臨的問題與困難，加以改善實驗操作，增加計數植物氣孔的便利性，值得學習。
3. 本實驗僅以紫鴨跖草進行研究，但不同植物種的葉片質感、厚度、氣孔的分布...都有差異性，應多以其他植物樣本進行實驗，來證明此方法的極限與適用性。
4. 使用本改良方法，未知作者操作時是否每次都必須將葉片摘下？如果能在野外不摘取葉片僅做拍照動作(適度使用玻璃片夾住定型)，如此活體運用不傷害葉片就更能提高本改良方法的實用性。
5. 可善用生物統計分析比較數據間的差異。

作品簡報

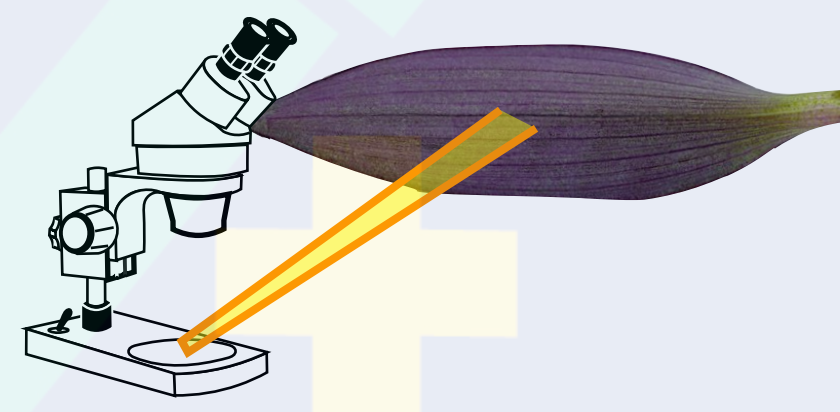
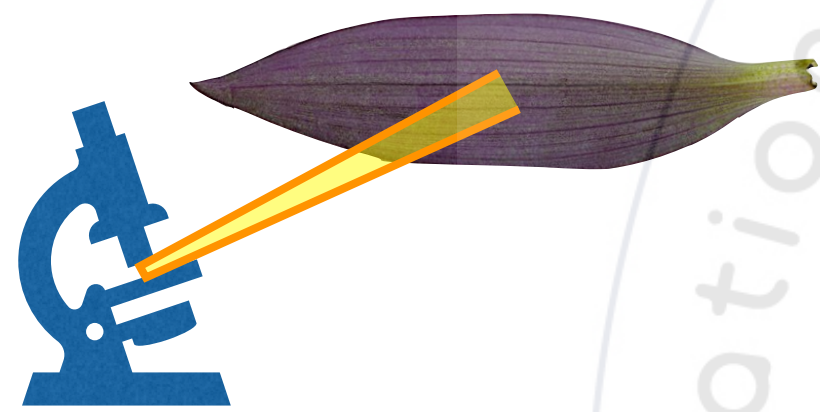
一覽無遺 - 氣孔計數法的改良



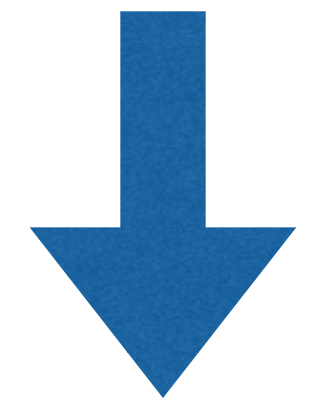
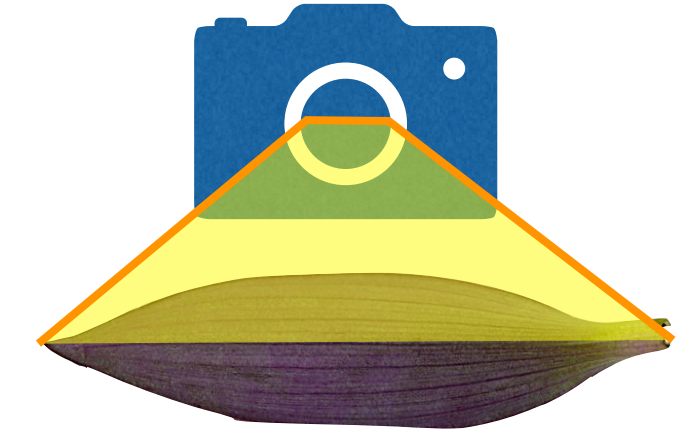
一覽無遺 - 氣孔計數法的改良

壹. 研究動機

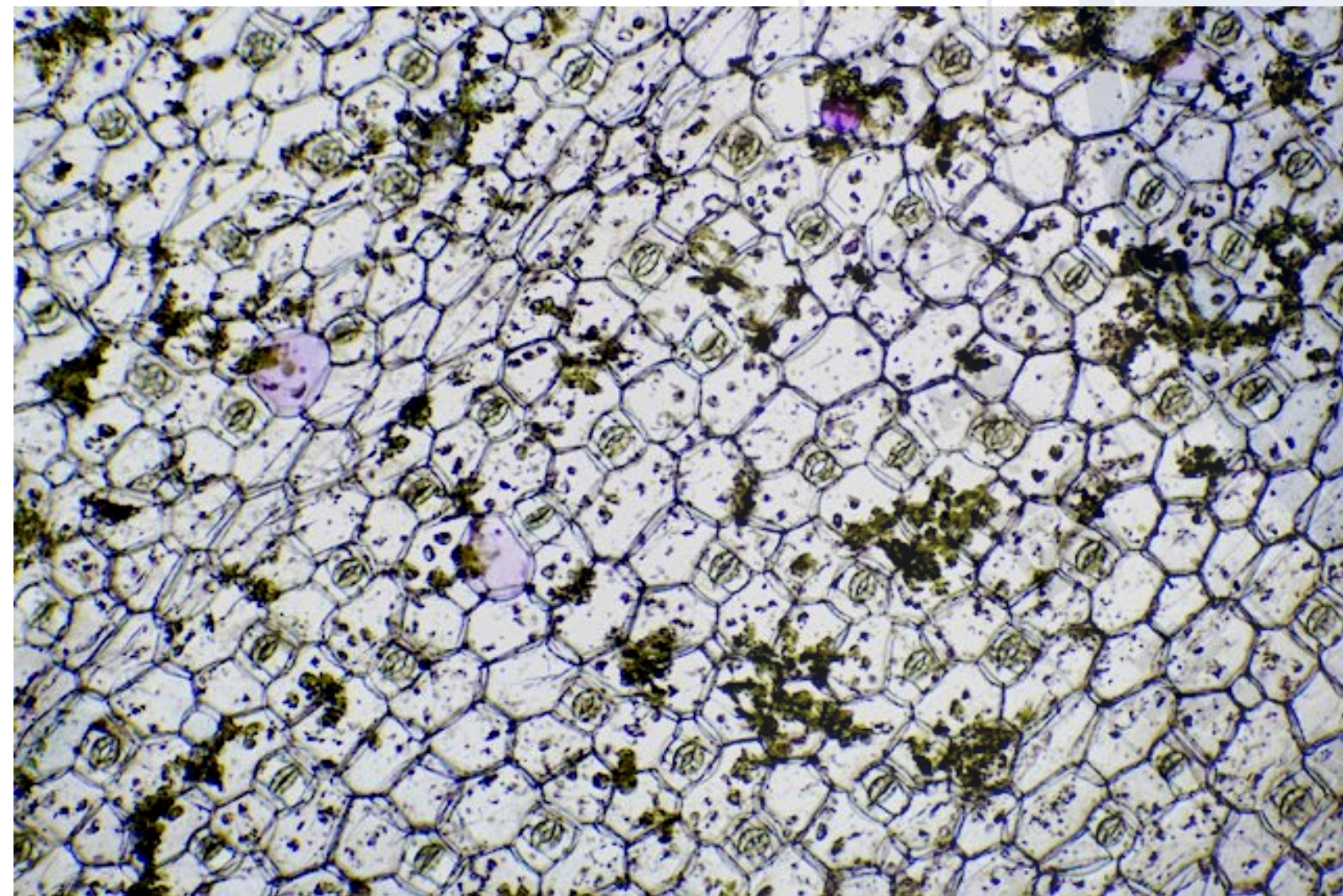
傳統方法



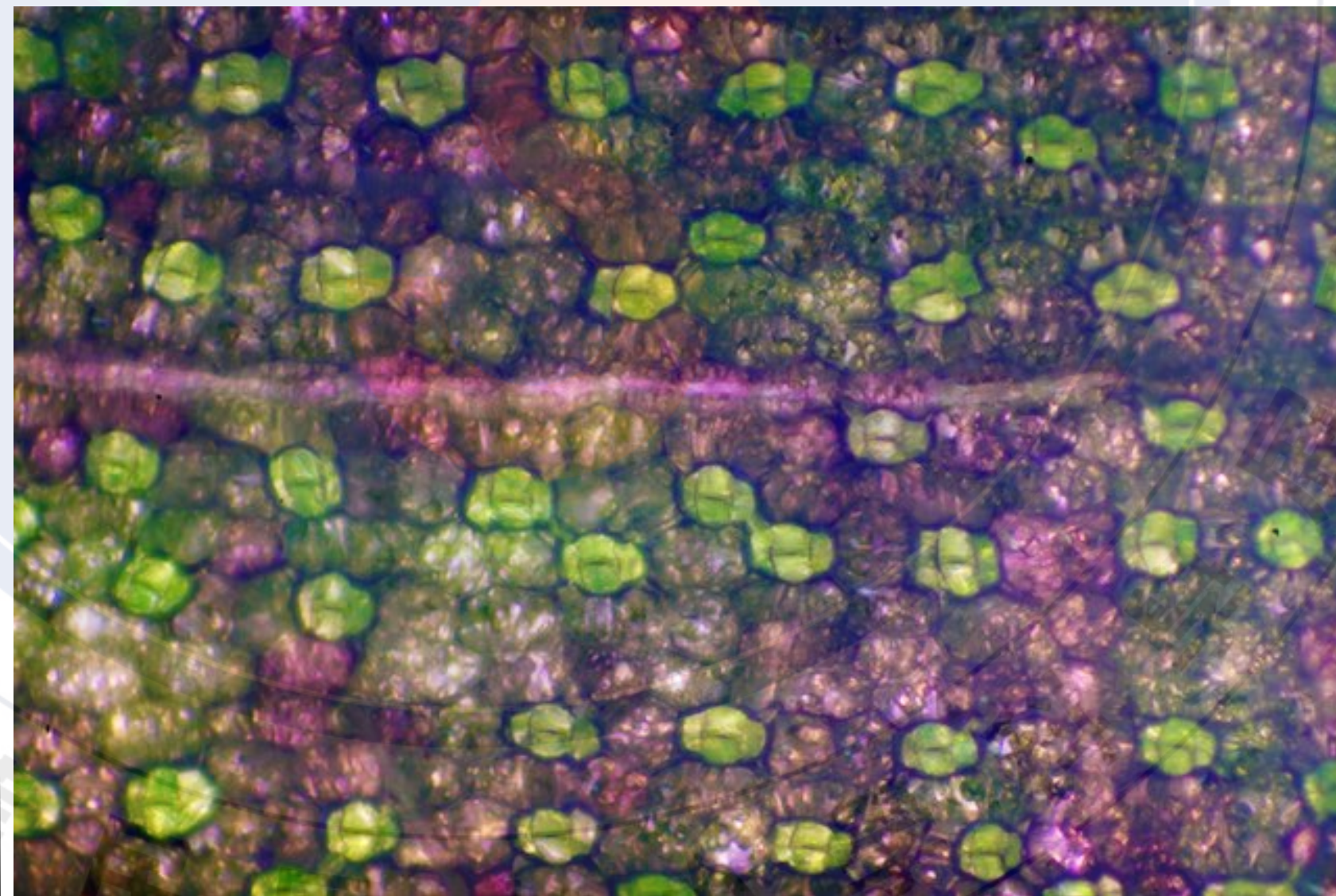
改良方法



大範圍觀察?
&
可計數氣孔?



1mm



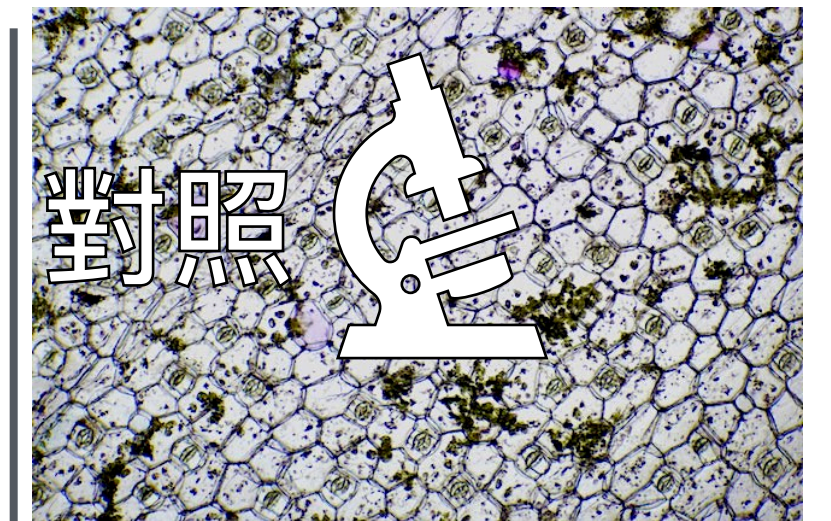
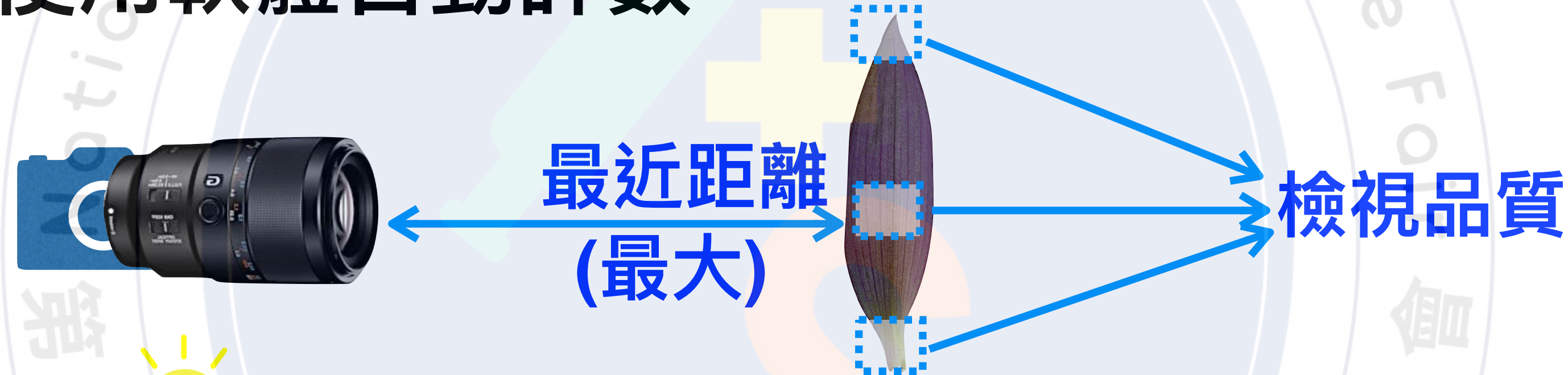
1mm

貳.研究目的

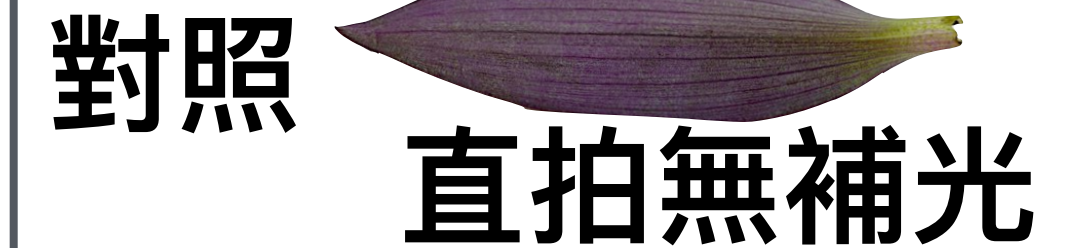
- 一.確認可行性：可用相機直拍辨識出氣孔系
- 二.提高影像品質：尋找較佳的拍照方式，使氣孔系更容易辨識
- 三.評估效果：實際應用在氣孔系計數時的效果
- 四.延伸應用：使用軟體自動計數

參.研究方法

一.確認可行性



二.提高影像品質



三.評估效果

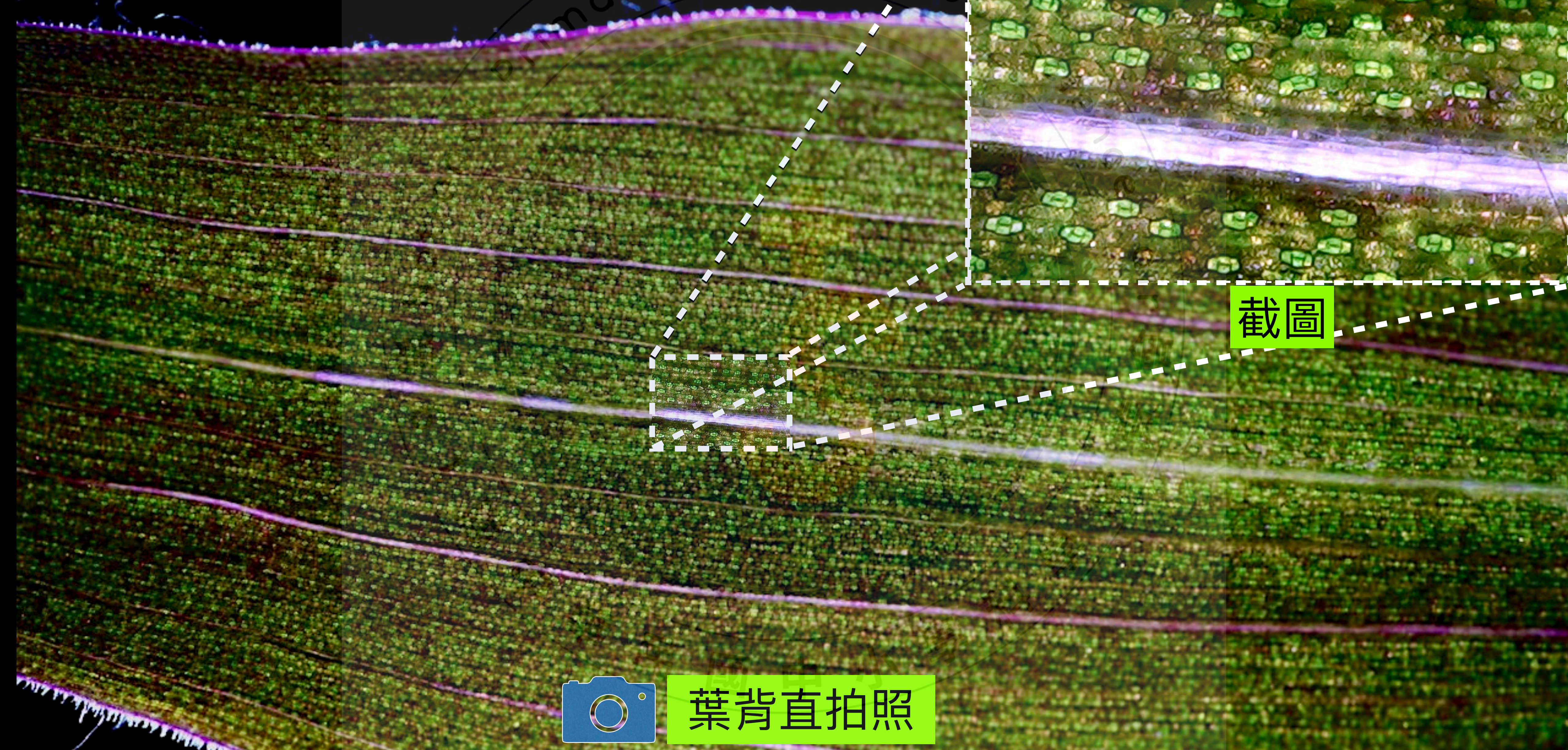


四.延伸應用



肆.研究方法與結果

一.確認可行性：可用相機直拍辨識出氣孔系



截圖

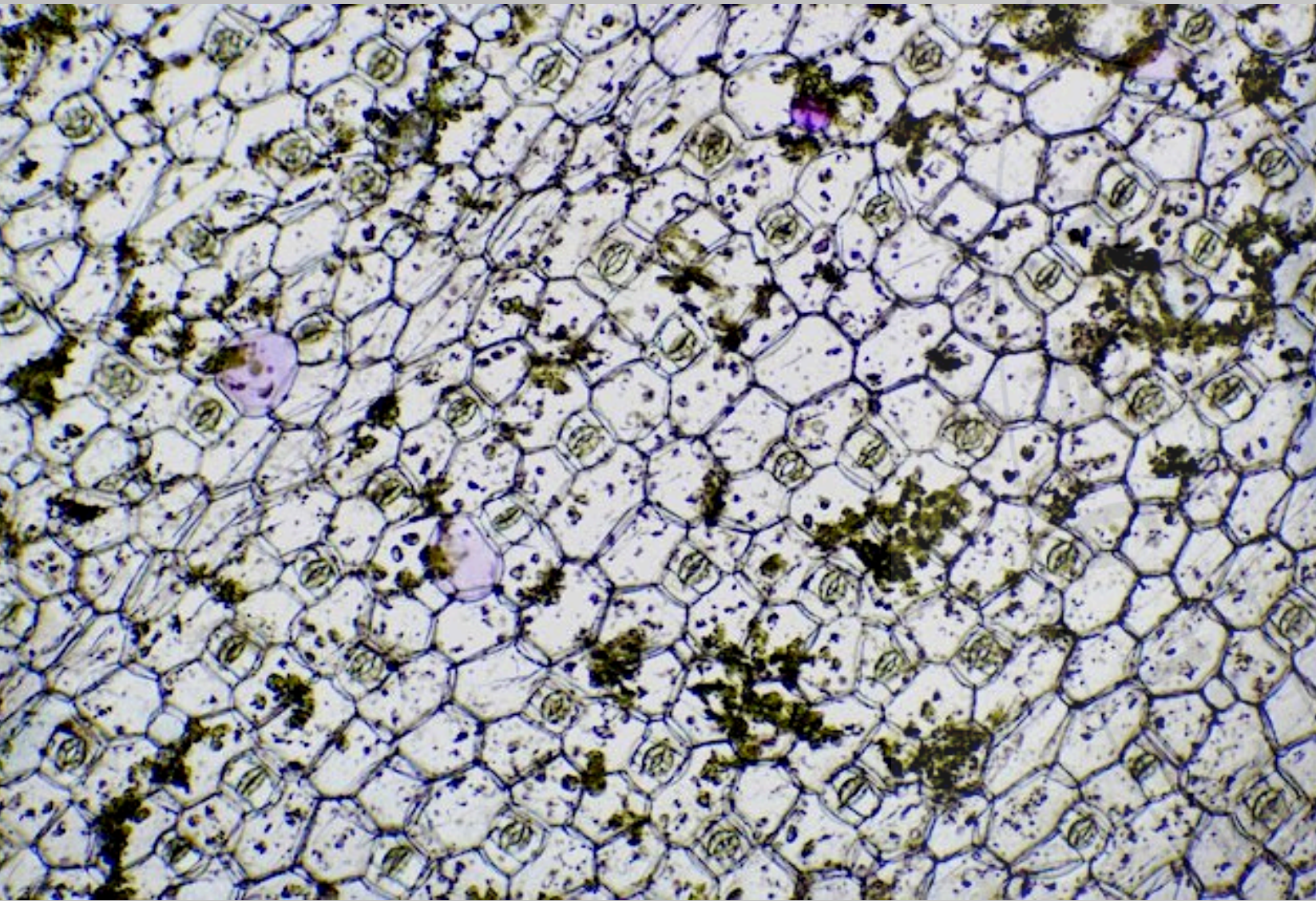
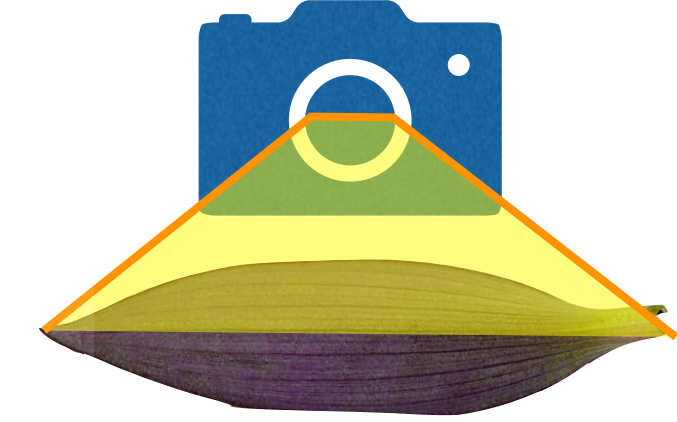
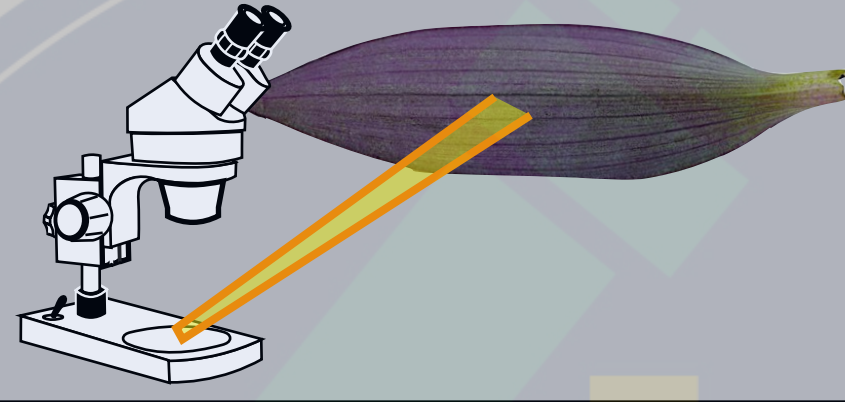
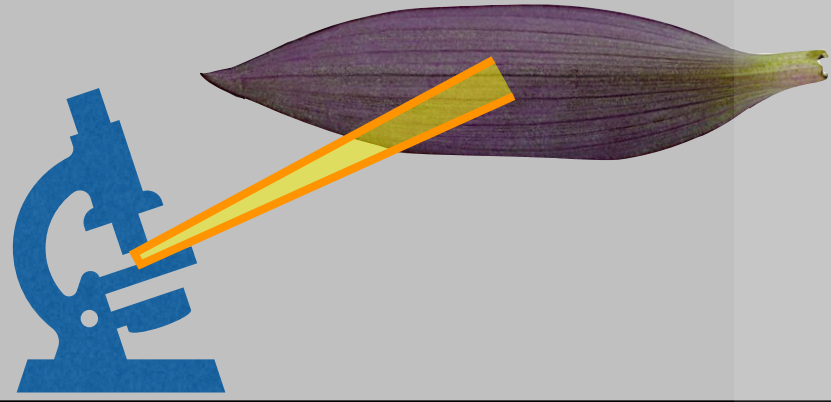


葉背直拍照

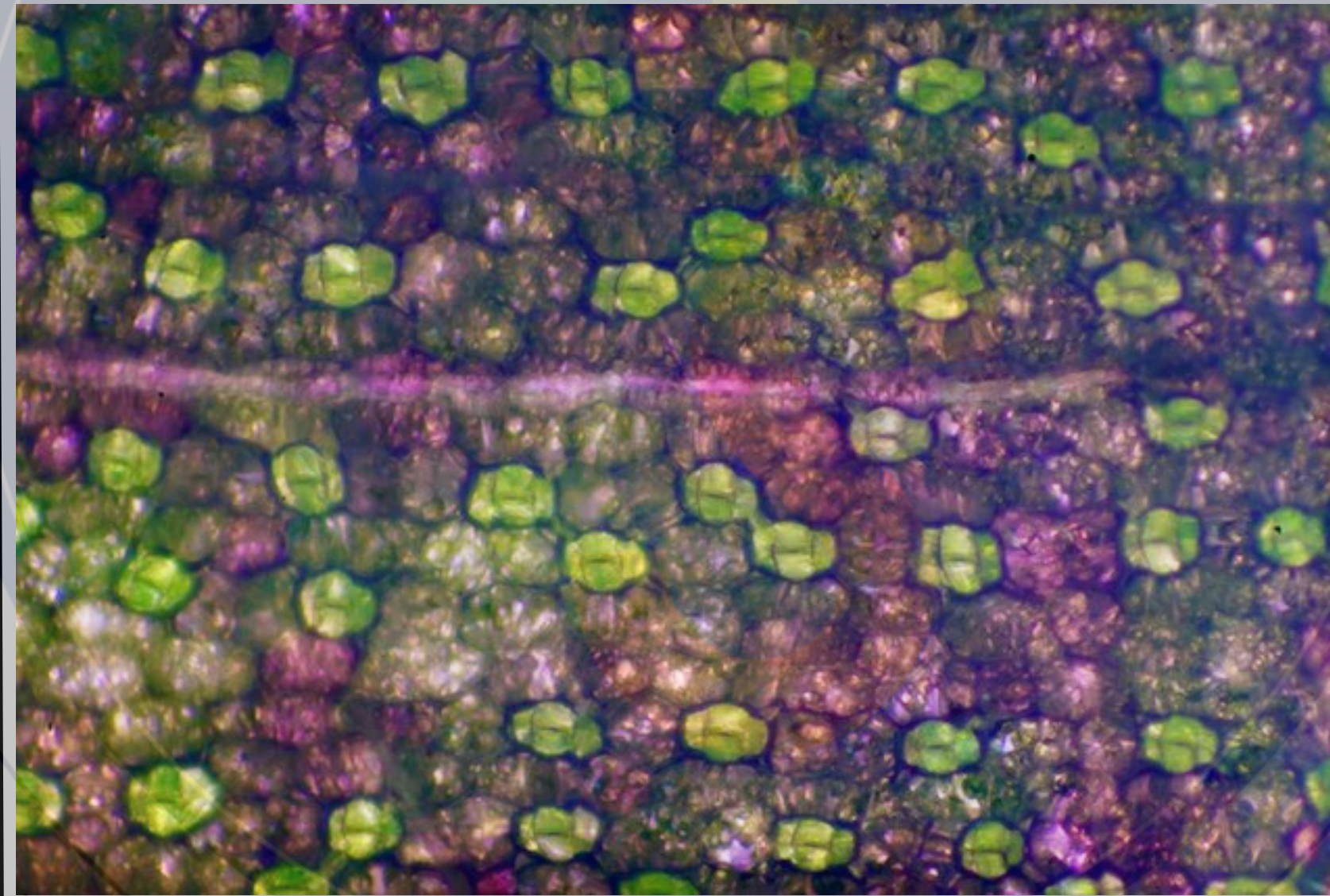
肆.研究方法與結果

一.確認可行性：可用相機直拍辨識出氣孔系

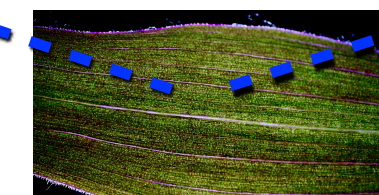
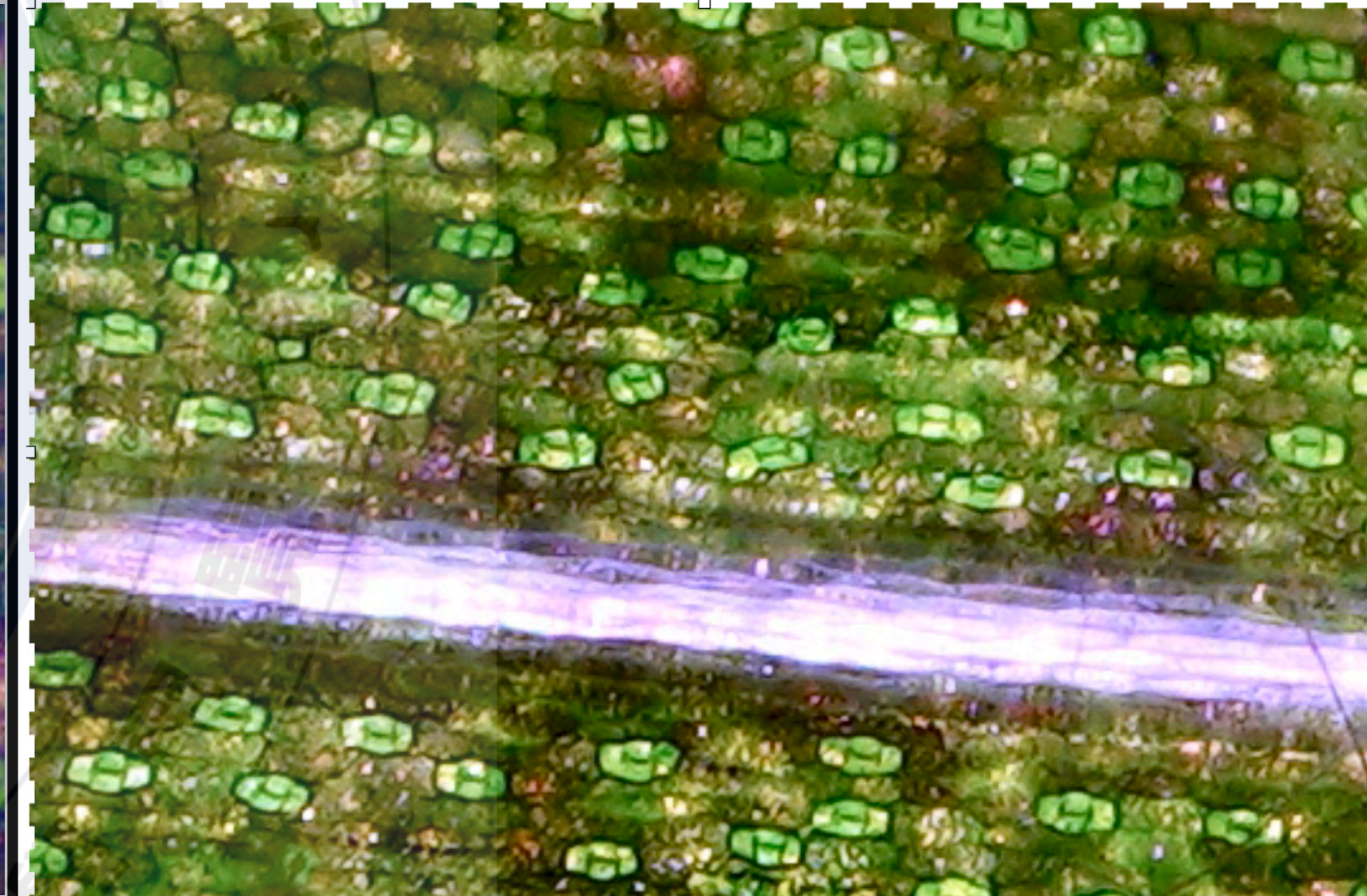
✓ 可行



1mm



1mm

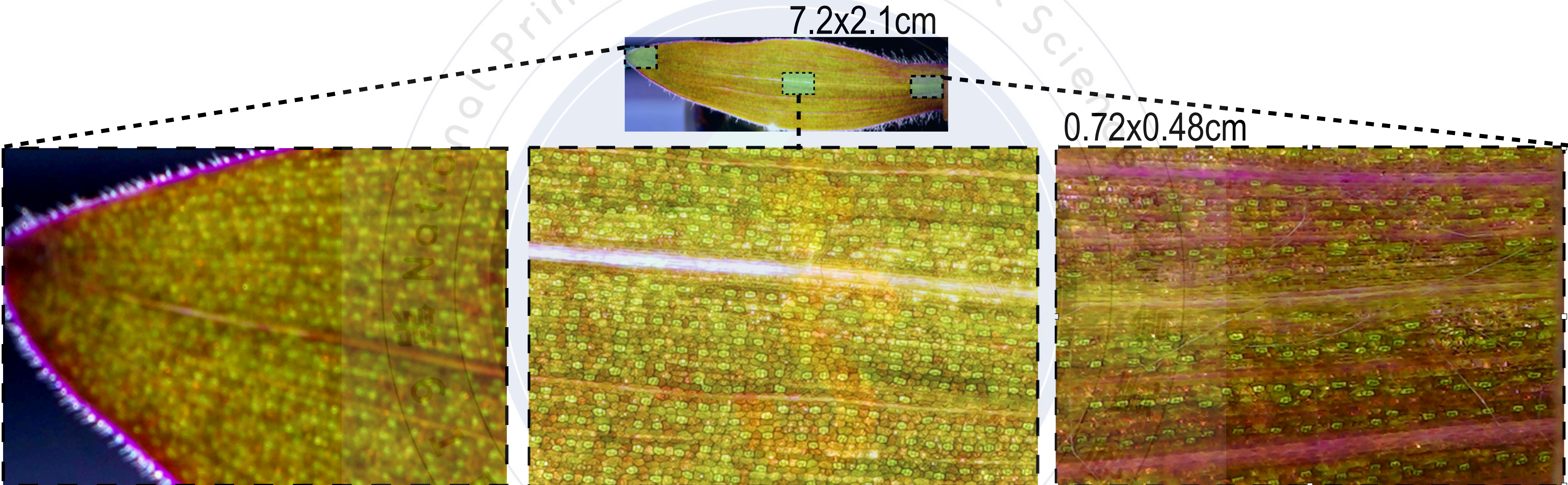


傳統方法

本研究

肆.研究方法與結果

一.確認可行性：可用相機直拍辨識出氣孔系



需加強

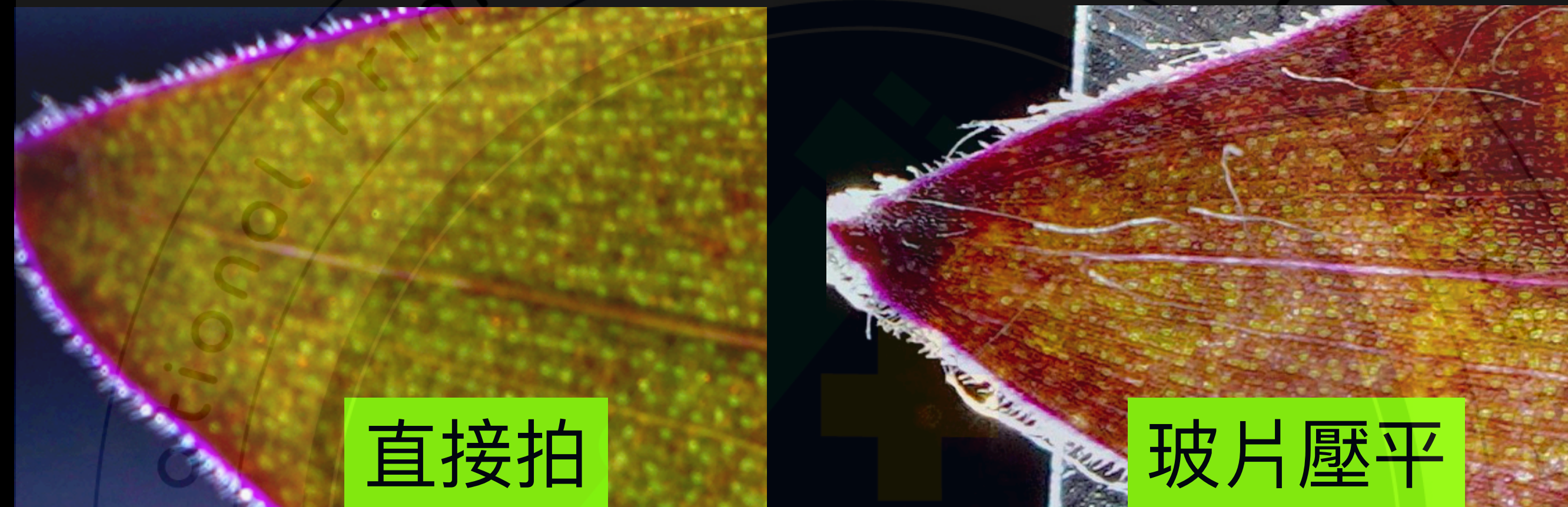
✓ 可行

可再改善

全葉照與其局部截圖

肆.研究方法與結果

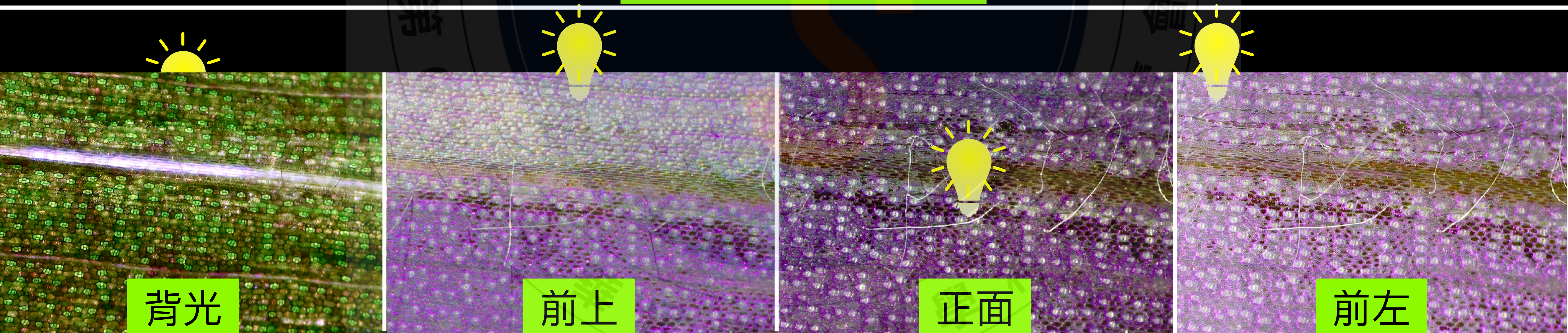
二.提高影像品質：尋找較佳的拍照方式，使氣孔系更容易辨識



直接拍

玻片壓平

不同固定方式的影響



背光

前上

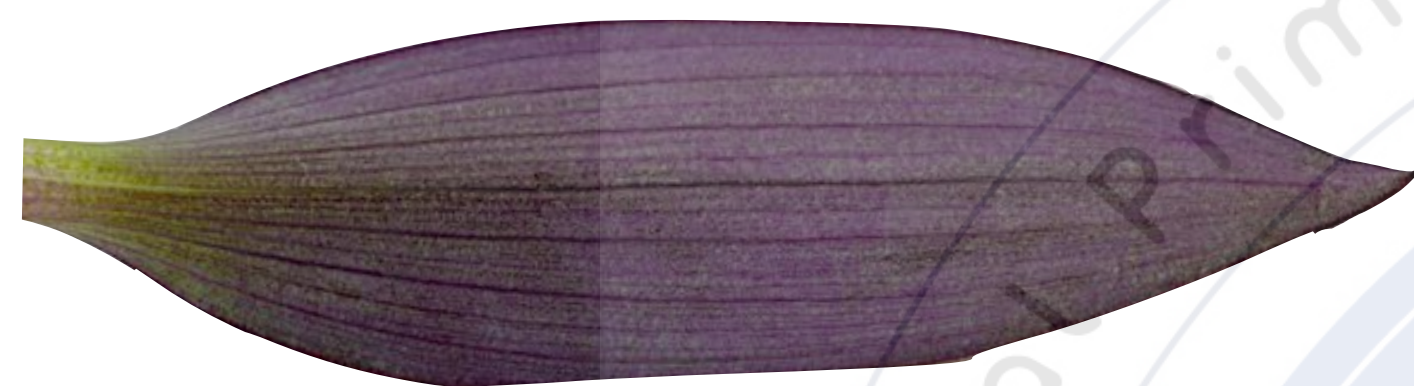
正面

前左

不同光源方向對拍攝的影響，皆為中央截圖(長寬為原圖10%)

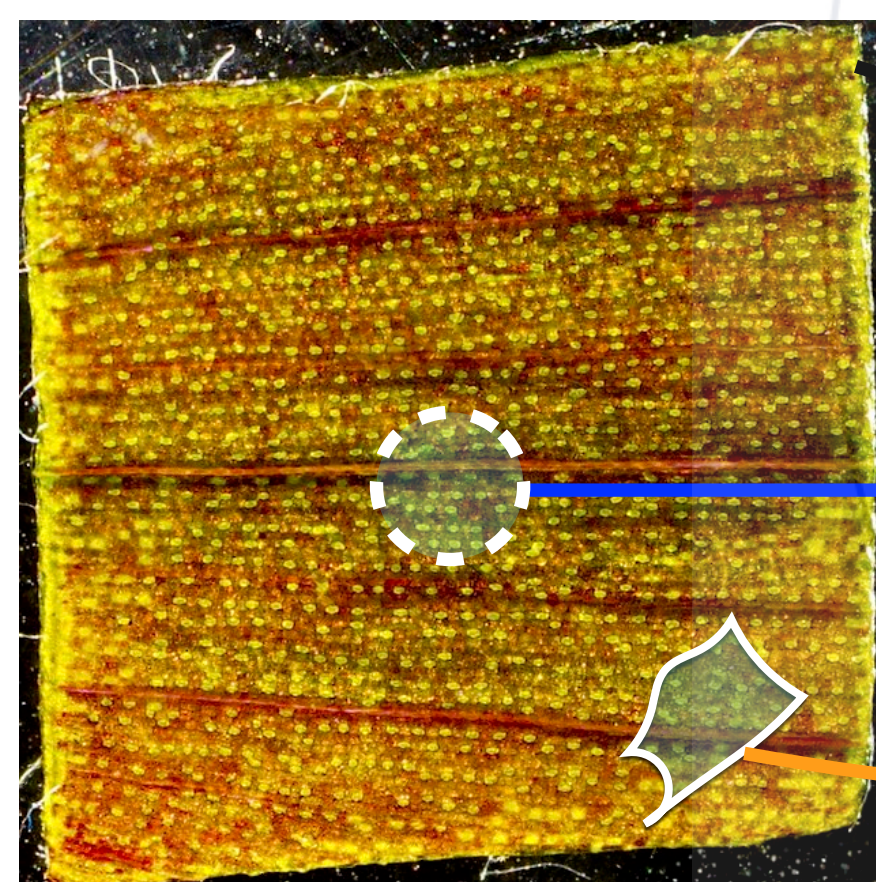
肆.研究方法與結果

三.評估效果：實際應用在氣孔系計數時的效果



87	526	911	1022	769	571
146	436	832	877	586	434

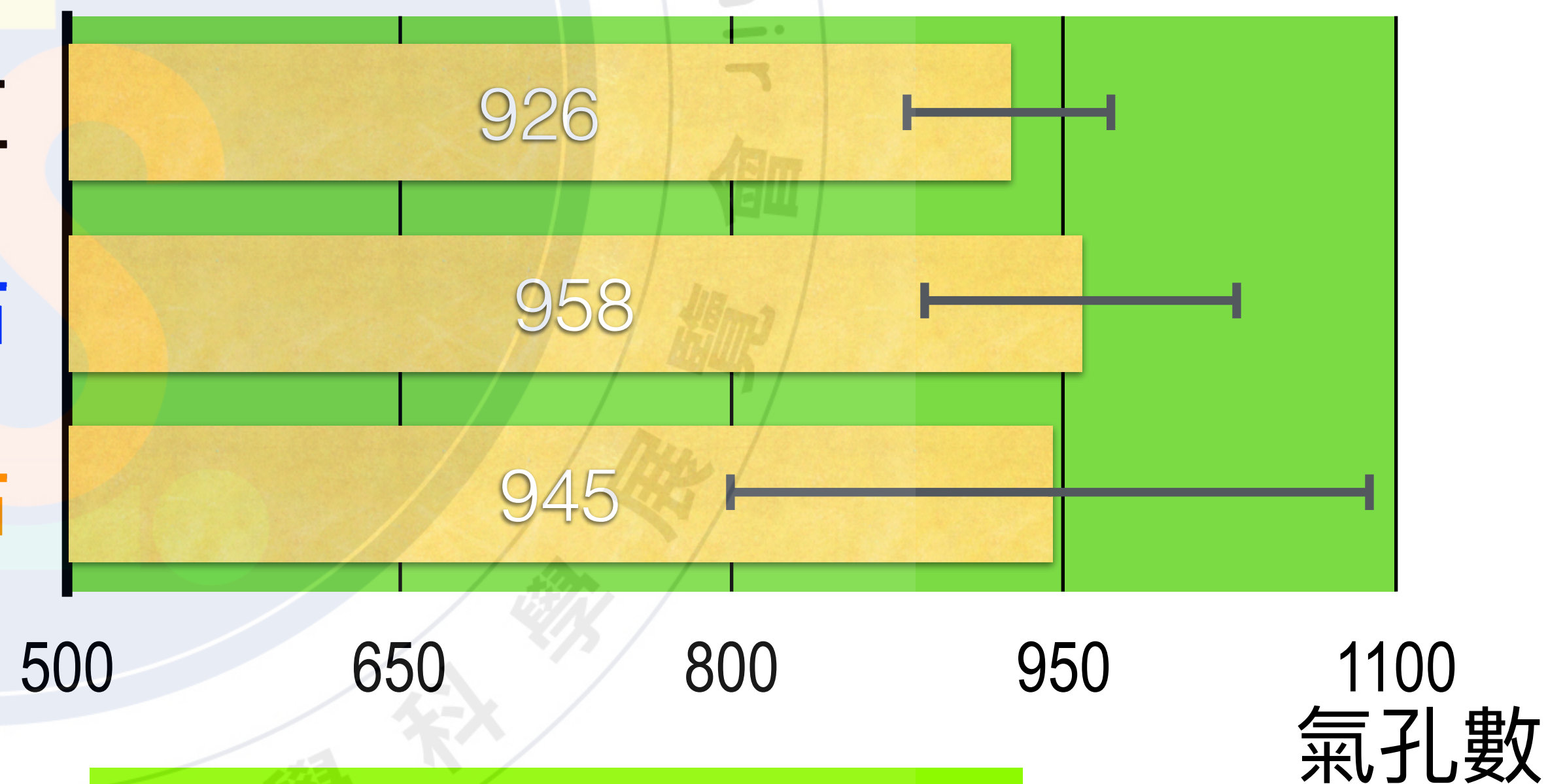
對直拍圖的氣孔系直接計數



直接計數實際值

模擬樣區推估

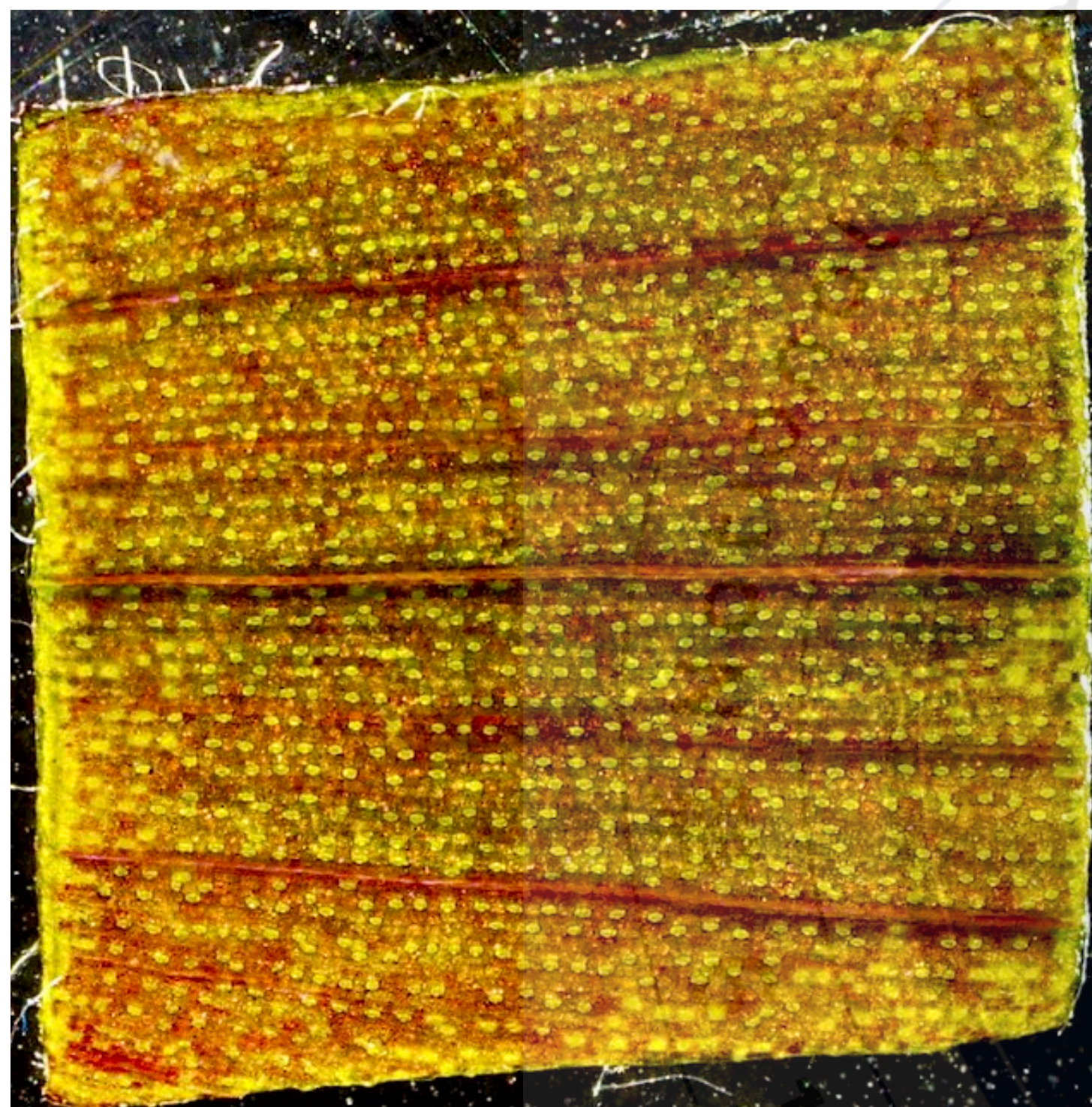
撕皮法推估



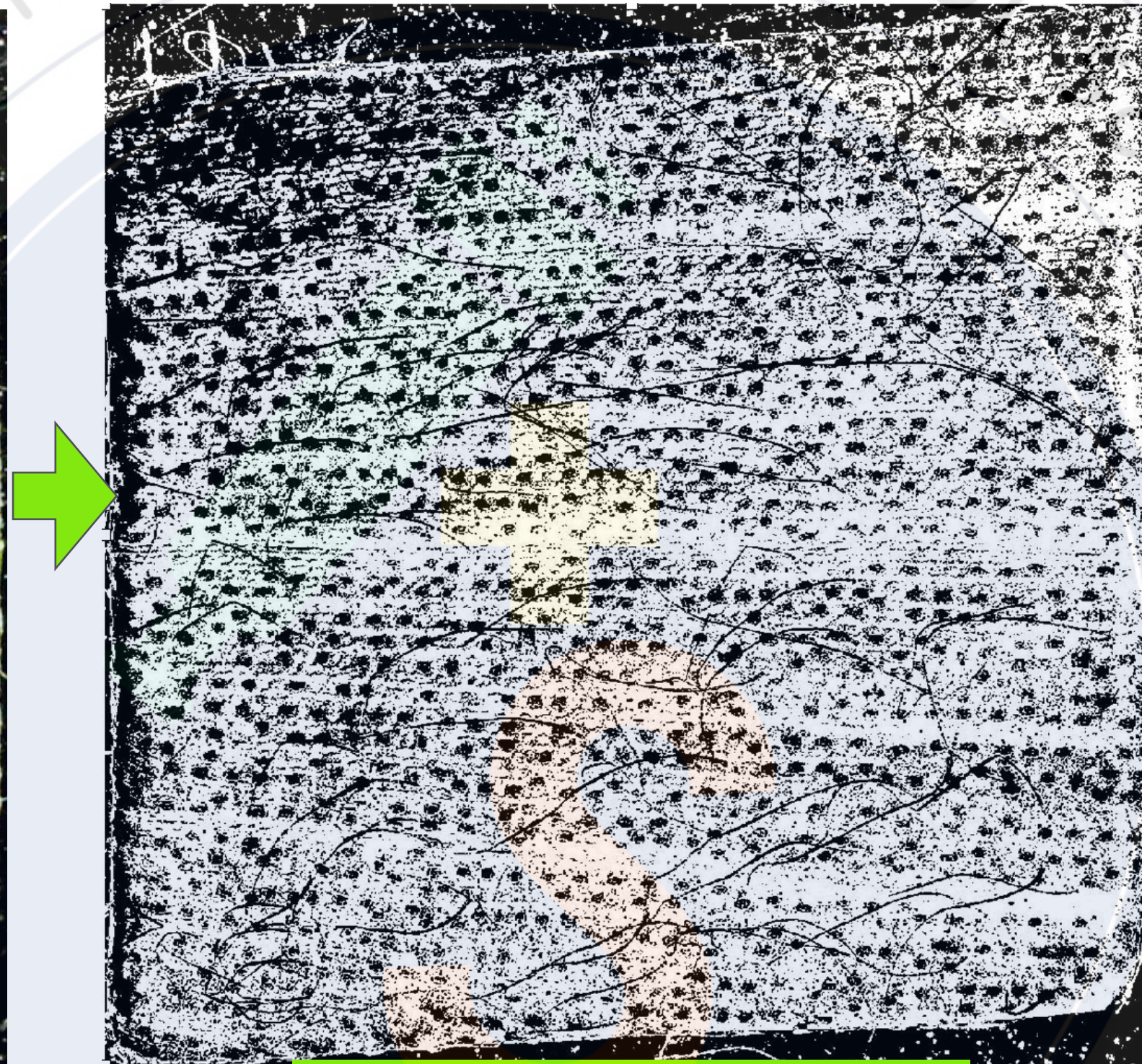
比較直拍法與撕皮法計數

肆.研究方法與結果

四.延伸應用：使用軟體自動計數



直拍照原圖
共867個氣孔系

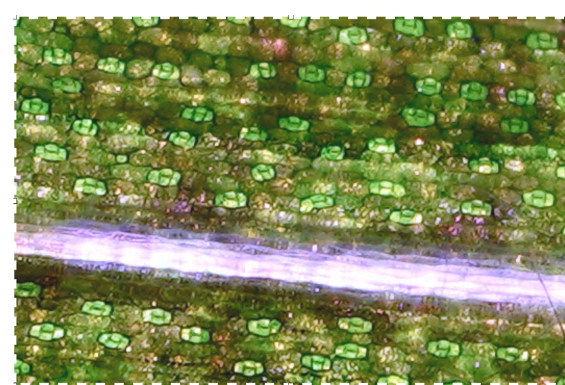


修圖提高對比
顆粒化氣孔系



軟體自動計數氣孔系
數出845個氣孔系

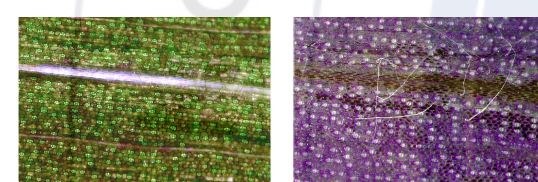
伍.討論



一.確認可行性

文獻的氣孔研究都需要用到顯微鏡，但其實使用單眼相機加微距鏡頭直拍，就能清楚辨識出氣孔系，且能一目瞭然的看出其分佈，雖然對於更細微的觀察仍有困難，比如氣孔開閉程度，但我們使用的只是一般2400萬像素相機，若使用6000萬像素高階相機或許還可以做更細微的觀察。

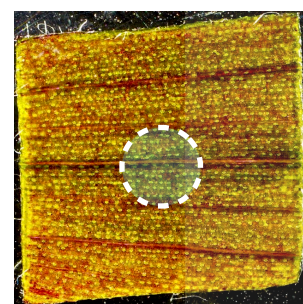
二.提高影像品質



背光與正面光效果最好，斜射光最差，可能是因為葉片本身就有曲線，主脈區周圍就像山峰一樣凸出，使斜射光容易被主脈區擋住，而背光或正面光就沒有這個問題；另外表皮只有氣孔系有葉綠素，背光等於從後面打光，會更凸顯它本身的綠色而更好觀察；觀察時將葉片壓平也有助觀察，可使主脈區與其他區位在同一平面拍照，但是如果只需要觀察局部的氣孔系，甚至可以不用摘下葉子就能拍照，適合需要保留葉片活體的觀察實驗。

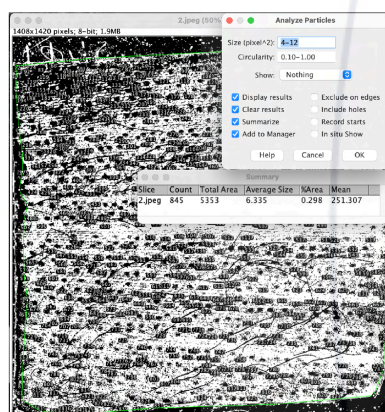
伍.討論

三.評估效果



直拍法可以建立全葉的氣孔系地圖，用來認識氣孔分佈情形，也以取代撕皮法，只要將直拍法結合樣區法，在照片中劃設虛擬樣區，用樣區取代顯微鏡的視野，並且可以精確的指定要葉片哪一個角落來詳細觀測，比如葉片邊緣0.1cm處或葉片正中央等，這種精準定位是撕皮法很難辦到的。

四.延伸應用



既然直拍法可以得到數位化的全葉氣孔系地圖，那應該可以用軟體來自動辨識，因為氣孔系的型態在表皮上是與眾不同的，也沒有彼此重疊，所以可以把一個氣孔系當成一個細胞看待，就能套用細胞自動計數法來計數，但可惜的是，氣孔系與周圍表皮的影像對比仍不夠強，不容易修圖修到看起來只剩下氣孔系，造成辨識時需要不斷調整軟體參數，如果能改善這個部分，那以後不但有可能快速處理大量葉片的調查，也能任意分割照片，做各分區的詳細調查。

陸.結論

便利、即時、少破壞、自動化

只要注意光源角度與葉片固定方式，不需要顯微鏡，只要用相機直拍，就能一目瞭然的看到整片葉子的氣孔系分布，這個方法不只能取代撕皮法，也簡化了觀察流程，在運用上還更有彈性，因為可以任意選取精確位置的樣區，並且未來還有希望利用軟體來完成自動計數，以獲得更詳盡的資料。

