

# 中華民國第 57 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

國中組 生物科

## 最佳創意獎

030302

藤本植物的傳奇 - 川七生活史及其向觸性與植物生長素(IAA)關係之探討

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者：  國二 黃芊華  國二 陳倪甄  國二 劉家妮	指導老師：  馬瑪宣
---	------------------

關鍵詞：川七(Madeira Vine)、生長素(IAA)、  
向觸性(Thigmotropism)

## 摘要

川七中文名稱為洋洛葵，學名 *Anrederacordifolia*，洛葵科(Basellaceae)洋洛葵屬之多年生藤本植物。本研究重點為攀附物體對川七生長速率的影響以及向觸性的形成機制探討。攀附物體前川七莖生長速度較緩慢且莖有日趨木質化的現象，攀附物體之後主莖生長速率是攀附前的 7.1 倍。本實驗以 X 光繞射、吸收光譜、表面增益拉曼射線，以及顯微照相的技術進行實驗，結果顯示，IAA 於川七莖部的分布並不平均，捲曲莖接觸面的 IAA 含量高於非接觸面 IAA 含量。由於植物生長素 IAA 在植物體內只有奈克(ng)的量且萃取不易，因此在向觸性與 IAA 關係研究方面，一直是未解之謎。本研究開啟了向觸性研究的新契機，也成功以物理的方法證實了 IAA 濃度在川七莖接觸面與非接觸面確實有分布、量及結構上的差異。

## 壹、研究動機

生物課堂上老師介紹了植物的向觸性，但卻說之前教科書上對於向觸性形成機制與生長素(以 IAA 為例)濃度關係的解釋有誤，因此目前不論是國中、高中的教科書，對向觸性的內容撰寫都採保留的態度。因此我們想挑戰這一個科學的瓶頸，設計實驗，得知到底接觸物體對於生長素分子於接觸面與非接觸面的分布影響為何?但是因為生長素濃度於植物體內太低，在尋找多方資源之後，我們決定利用物理學的方法，表面增益拉曼散射(SERS)，激發金奈米顆粒的表面電漿波共振，放大極微量川七捲曲莖 IAA 訊號，並以 X 光繞射檢測在接觸面及非接觸面的 IAA 分子結構是否有差異。

## 貳、研究目的

### 一、川七生活史的觀察

1. 觀察小苗生長階段的生活史。
2. 觀察零餘子生長階段的生活史
3. 設置樣區觀察川七的物候期。

## 二、向觸性的研究 -- 川七莖部的生長及解剖型態比較

1. 測量平直莖與捲曲莖的頂芽生長速度。
2. 比較川七莖部接觸面與非接觸面的細胞長度差異。
3. 比較川七莖部於植株節間上下解剖型態差異，包括平直的莖、捲曲的莖等。

## 三、向觸性的研究 – 植物生長素 (IAA) 於捲曲莖部的研究

1. 接觸面與非接觸面的 IAA 其濃度是否不同?
2. 接觸面與非接觸面的 IAA 其分子組態是否不同?
3. 接觸面與非接觸面的 IAA 其分子間鍵結強度是否不同?

## 參、研究設備及器材

實驗生物材料	野生川七~採集自文山區樟山寺步道 川七幼苗~購自吉園農場 川七零餘子~購自吉園農場 野生川七零餘子~採集自文山區樟山寺步道
實驗器皿及耗材	培養皿、小花盆、大花盆(64*24*18)、寶特瓶、燒杯 (500ml)、鏟子、載玻片、蓋玻片、指甲油、雙面刀片、紙箱、土(適量)、膠帶、竹枝、剪刀、標籤貼、棉線、染劑(紅: 0.5% Safarin O (in H <sub>2</sub> O), 藍: 3% Alcian Blue in 3%Acetic Acid) IAA(購自 sigma), 酒精(95%), 80% MeOH, 二次水, 冷凍乾燥劑, 圓底離心瓶, 液態氮, 離心管, 研鉢, 海砂, 藥勺, 大試管 (20*150mm), 抗氧化劑(BHT, Absorbic Acid)與內標, pH meter, 0.5M pH2.0 K-Pi buffer, 0.05M pH8.5 K-Pi buffer, 磁石攪拌器, Hexane(己烷), EtOAc (乙酸乙酯), 試管 (12*75mm), 1ml 塑膠針筒 syringe filter, 0.1% HOAc-100%MeOH, 0.1% HOAc-100% H <sub>2</sub> O, pipetman, 氣密針, GC-MS 專用瓶
實驗儀器	筆記型電腦 (AsusGIaKT730D15.4), (ACER E5-572 Z5WAW), 解剖顯微鏡 (MICROTECH S-730L-SY), 複式顯微鏡 (MICROTECH BL-150SY), 複式顯微鏡(OLYMPUS U-CTR30-2), 數位相機 (SONY DSC-RX100M3), (Canon S80), (Canon EOS 700D)顯微測微器, 微量天平 (Hengx600), X 光繞射儀 (BACKLASH U-S1-D0-X090447-A), 吸收光譜儀(SPEX 1682A), 拉曼光譜儀 (JOBIN YVON T64000), 具 Au NPs 吸附的玻璃材質載玻片 離心機(EYELA CVE-3100)(SORVALL RC26PLUS)Solvent 震盪, 冷凍乾燥器 (LABCONCO 6 LITER Benchtop Freeze Dry System), HPLC(Beckman System Gold 126 Programmable Solvent Module), 分液收集器(GILSON FC203B), vortex, autocal pH meter(RADIOMETER COPENHAGEN PHM83 )
軟體	GSAS (用於擬合 X-Ray 繞射譜圖, 得出原子位置座標) Diamond (用於畫出原子結構圖) Origin (用於繪製及分析實驗數據圖)

## 肆、研究過程及方法

### 一、生活史的觀察

(一) 觀察川七完成生活史各階段至開花所需時間

- 1.由樟山寺步道採集川七的零餘子 10 顆。
- 2.記錄川七零餘子至開花所需時間。
- 3.拍攝生活史各階段的照片：零餘子長根，第一片葉，及首次花芽的形成，開花。

(二) 野生川七物候期紀錄及植物型態觀察

- 1.設置物候期觀察樣區：台北市文山區的樟山寺步道。從 2016 年 8 月至 2017 年 2 月，每月紀錄一次，月平均溫度及雨量資料取自中央氣象局網站台北氣象站資料。

川七的物候期觀察分為七個生長期記錄：

- (1)莖、葉延長期－植株有形成枝芽，莖延長伸展，葉子肥厚大片。
- (2)花芽期－於莖節處長出花芽。
- (3)開花期－花芽開放。

### 二、向觸性的研究 -- 川七莖部的生長及解剖型態比較

(一) 紀錄川七捲曲莖的生長，從頂芽下方 5 mm 作一標記，每天記錄頂芽的生長情形。

(二) 從頂芽下方 1 - 14 cm 處，取下捲曲的莖部與攀附物接觸面與非接觸面的表皮細胞，任意選取 30 個表皮細胞，測量其長度數值，並作數據統計分析。

(三) 比較川七莖部於植株不同部分橫切解剖型態差異，包括平直的莖、捲曲的莖等。

1. 平直的莖：從頂芽開始計算，於頂芽下方第一個節處，往上及往下各 2 cm 處作記號，做 20 個橫切切片
2. 捲曲的莖：從頂芽開始計算，於頂芽下方第一個節處，往上及往下各 2 cm 處作記號，做 20 個橫切切片
3. 所有的切片皆要染色比較厚壁組織的厚度，以及維管束的分布。而捲曲莖的切片還要比較接觸面與非接觸面表皮細胞所佔寬度。

### 三、向觸性的研究 - 向觸性與生長素 IAA 的關係

向觸性 (Thigmotropism) 是向性的一種，植物在接觸物體或接受機械刺激時，其接觸面與非接觸面會表現生長速率的差異，因此攀附上所接觸之物體，此種現象稱為向觸性。目前向觸性的形成機制仍不明朗，且相關的報告稀少，一般認為，是接觸面與非接觸面的生長素分布不均所致。

因此我們選擇從藤蔓植物-川七，並由生長素 IAA 的分子層面來探討向觸性的形成機制，探究捲曲莖在攀附物體而生長時，其 IAA 的分子是否會扭曲而拉長，探究捲曲莖 IAA 分子間的結合力是否會較鬆散而拉伸。我們比較川七捲曲莖的接觸面及非接觸面的 IAA，其分子組態之異同，所採用的實驗技術包含：X 光繞射(x-ray diffraction)、吸收光譜(absorption spectrum)、及拉曼譜圖(Raman spectrum)。因為所能萃取的 IAA 量相當有限，拉曼量測是以表面電漿波共振(surface plasma resonance, SPR)來放大拉曼訊號，也就是以表面增益拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)技術，來獲取拉曼訊號。此部分研究主題聚焦在：接觸面與非接觸面的 IAA 其(1)濃度、(2)分子組態、(3)分子間鍵結強度是否不同？

從植物上所能萃取 IAA 的量相當少，從川七所能萃取 IAA 的量也不例外，一株 10 公分長的川七捲曲莖，只能各從接觸面及非接觸面萃取出約數個奈克(ng)的 IAA，難以直接觀測到所萃取 IAA 的特性。我們採用相互比較的方式，比較接觸面 IAA 與非接觸面 IAA 的 X 光繞射譜圖、吸收光譜、以及拉曼譜圖的峰值位置，查看是否有相對性偏移，來探討接觸面 IAA 與非接觸面 IAA 的異同。IAA 分子的特徵訊號，則以購買得的標準 IAA 進行 X 光繞射、吸收光譜、以及拉曼散射實驗取得，藉以比對、確認各實驗中來自 IAA 的特徵訊號。

(一) X 光繞射實驗：讀取純化的川七 IAA 粉末繞射譜圖，藉由已經知道 IAA 訊號在繞射譜圖出現的位置，比對頂芽，接觸面，與非接觸面三部分的差異。

1. 將川七純化 IAA 粉末樣品放置在樣品載台上。
2. 調整載台高度使樣品放置在 X 光機的「光源-偵測器」平面，如圖 1 右圖所示，讀取 X 光繞射譜圖。

3. X 光繞射譜圖中選出來自 IAA 的(300)繞射峰，三組樣品作比較。

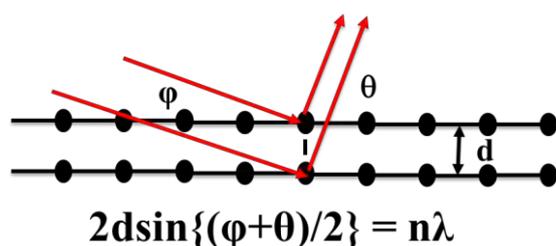


圖 1. 右圖為 X 光繞射實驗架設示意圖，實驗以反射式配合掠角入射進行。左圖顯示川七純化 IAA 粉末直接放置在 X 光機上，進行實驗。

(二) 吸收光譜實驗：

1. 將量測過 X 光繞射譜圖的川七樣品，輕輕擠碎，呈現黏稠狀，挑除碎片。
2. 將黏稠狀川七放置在內部空間厚度為 2 mm 的扁平石英容器，測定樣品質量。
3. 以穿透式架式量測光穿透川七後，減弱的程度，實驗架設示意於圖 2 左圖。
4. 圖 2 右圖為實際實驗量測裝置影像圖。

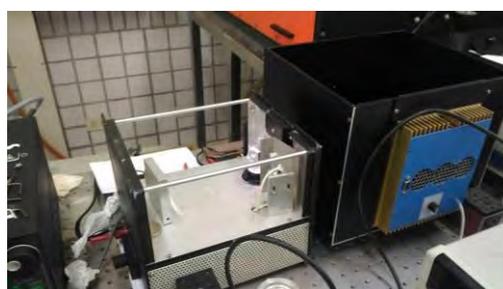
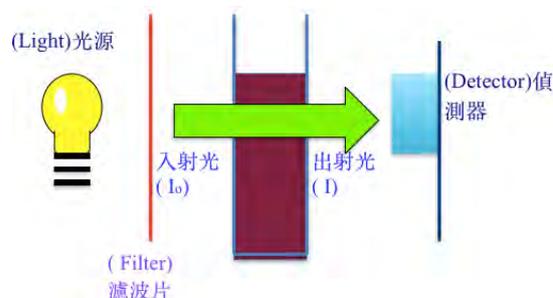


圖 2. 吸收光譜實驗以穿透式進行，左圖為實驗架設示意圖。右圖顯示搗碎後的液態狀川七放置在扁平石英容器內，進行吸收光譜實驗。

(三) 表面增益拉曼散射(SERS)實驗：以激發金奈米顆粒(nanoparticle, NP)的 SPR，來放大極微量川七捲曲莖非接觸面 IAA 與接觸面 IAA 的拉曼訊號。

1. 以熱蒸鍍冷凝法將 Au NPs 吸附在玻璃材質載玻片上，形成厚度約 50 nm 的顆粒薄膜(granular film)。
2. 取一滴(約 5ml)量測過吸收光譜的川七酒精溶液，滴在奈米金顆粒薄膜表面。
3. 靜置讓酒精蒸發，川七則沉澱在奈米金顆粒薄膜表面。

- 圖 3 為我們所採用的架設，來激發 SPR 及 SERS 的共伴裝置示意圖。
- 圖 3 架設中，雷射光從川七端入射，激發川七中分子的拉曼訊號，穿過川七入射到 Au NPs，激發金微粒的 SPR。
- 我們採用遠離紫外光區的 785 nm 雷射光為激發光源，減少激發螢光干擾拉曼訊號。
- 透射光除激發 Au NPs 的 SPR 外，也會激發川七 IAA 分子的拉曼振動，該拉曼訊號被 SPR 共振放大後，得以偵測到。
- 以透鏡將拉曼訊號收集入光譜儀，讀取拉曼訊號。
- 我們以微拉曼光譜儀解析 IAA 的拉曼訊號。
- 圖 4 為 SERS 實驗量測裝置圖。

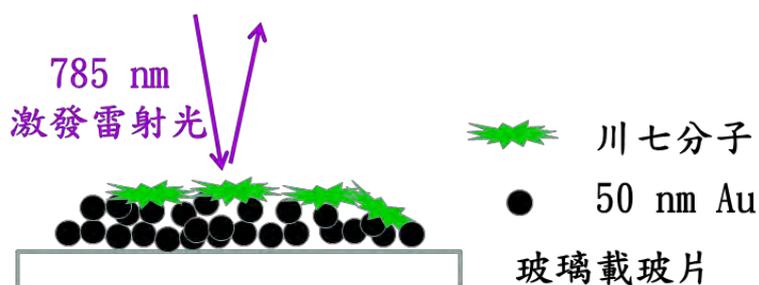


圖 3. 以 718 雷射光激發 Au NPs 的 SPR 之實驗架設示意圖。雷射光從樣品上方入射，穿過川七分子後進入 Au NPs。

圖 4. SERS 實驗量測裝置圖。

## 伍、研究結果

### 一、生活史的觀察

#### (一) 川七零餘子的成長

第一天 ( 12/13 )	種下零餘子
第二天 ( 12/14 )	零餘子長出根
第七天 ( 12/19 )	零餘子長出芽
第十一天 ( 12/23 )	長出第一片葉子
第十六天 ( 12/28 )	長出第一個分枝

#### 結果分析

- 將川七零餘子埋在淺盆裡後 1 天即可長出胚根，兩個禮拜內有一半的零餘子發芽，在發芽後 4 天會長出第一片葉子，9 天後會長出第一個分枝。
- 川七小苗長出第一片葉子時，長度約 0.7 公分，長出第一個分枝時，長度約 1.7 公分，如此我們可以推測，川七小苗一天約成長 0.2 公分。

## (二) 川七零餘子成長

觀察日期	零餘子編號									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12/13	種下零餘子									
12/19	0	0	0	0	0	冒芽			0	0
12/21	0	0	0	0	0	0.25	0	0.2	0	0
12/23	0	0	0	0	0	0.32	0.3	0.7	0	0
12/27	0	0	0.2	0	0	0.6	0.5	1.7	0	0.28
12/29	0	0	0.5	0	0	0.7	0.9	1.9	0	0.53
1/3	0	0	1.4	0	0.2	0.85	1.4	2.7	0	0.8
1/6	0	0	1.4	0	0.3	1.1	1.7	2.9	0	1.3

註：發芽後記錄之數字為小苗長度 (cm)

### 結果分析

1. 溫度攝氏 25-28 度，播種 10 顆零餘子，培養 25 天，共有 6 顆種子發芽為小苗，川七零餘子的萌發率約 60%。
2. 川七的種子種下後，約 4 天即可發芽。
3. 在無纏繞的情形下，川七的小苗平均可長至 0.87 公分，最長可達約 2.9 公分。

## (三) 台北市文山區樟山寺步道川七之物候期

日期	2016 年					2017 年				
	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月
莖延長期			VVV	VV	V	V	V	VV	VV	VV
花芽期	VV	VV	V				V		V	VV
盛花期	VVV	VVV	VV		V					V
零餘子				V	VV	VV	VV	VV	VV	V
平均溫度 (°C)	30.1	27.8	27.0	22.6	17.9	18.3	17.0	18.2	22.5	25.6
總雨量 (mm)	141.4	428.5	137.6	111.6	16.5	21.8	123.7	182.7	121.5	135.5

註：V 越多代表該情形發生越頻繁



圖 5、2016.9 月份於樟山寺步道觀察川七盛花期。川七葉互生、肉質肥厚呈心臟型、光滑無毛、葉柄短



圖 6、2016.10 月於樟山寺步道川七植株莖延長期。一年的新川七植株可長達 4~5m 以上，莖圓形，嫩莖綠色，老熟莖變成棕褐色。



圖 7、2017.2 月於樟山寺步道觀察川七莖延長期和花芽期。

#### (四) 川七型態觀察



圖 8 川七頂芽  
捲曲莖距離頂芽約 3~4cm，以左旋方向生長。



圖 9 川七花  
川七花為白色，花梗長 2-4mm，雄蕊比花被長，花絲基部寬。



圖 10 川七不定根

不定根是由植物其他營養器官長出的根，由這些營養器官長出且發育而成的鬚根組織，可由扦插、濕度控制誘發。



圖 11 花苞

花苞呈淡綠色，長約 1.5 mm。

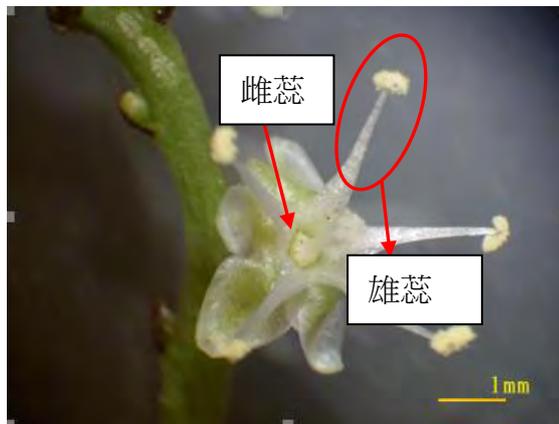


圖 12 川七雄蕊和雌蕊

雄蕊比花被長。



圖 13 川七零餘子

左側膨大圓形物體為川七零餘子，呈淡綠色，為川七無性繁殖的構造，由零餘子長出白色的根之後再發芽。

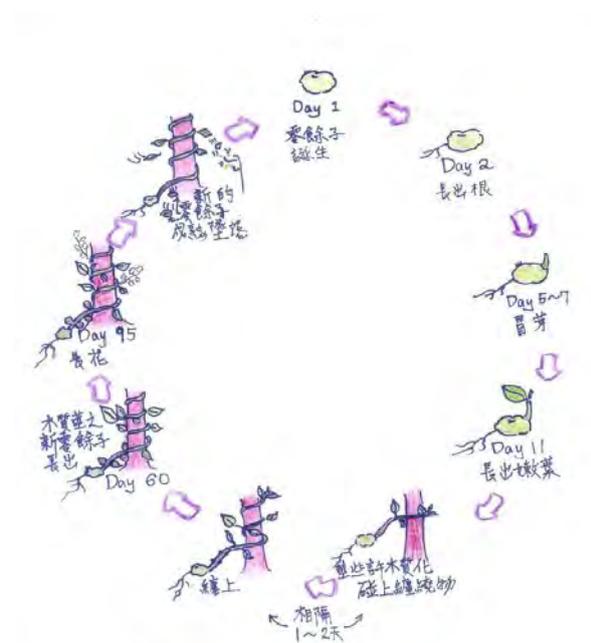


圖 14 川七生活史

## 二、向觸性的研究 -- 川七莖部的生長及解剖型態比較

### (一) 川七平直莖與捲曲莖的生長速率比較

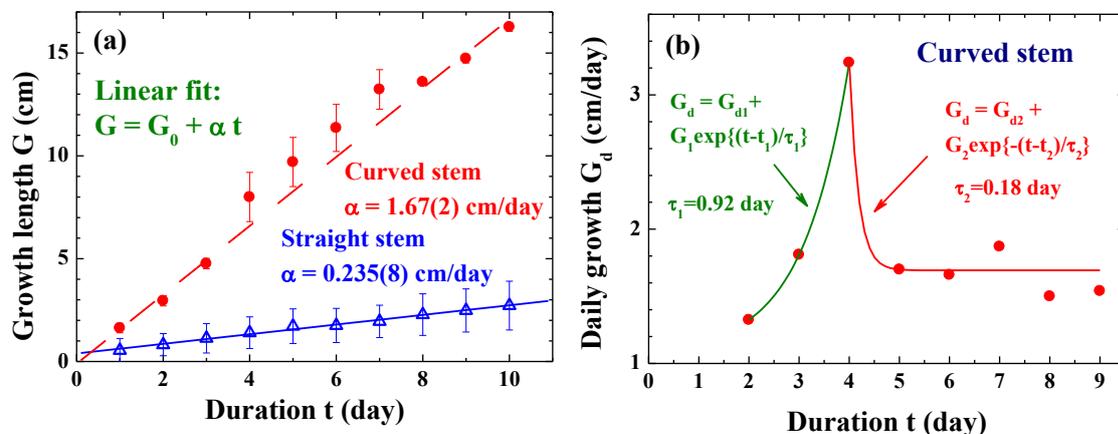


圖 15 (a)川七平直莖與捲曲莖的生長率比較。(b)川七捲曲莖的日生長率圖。

圖片說明：

1. 川七平直莖(straight stem)與捲曲莖(curved stem)的生長率截然不同。(圖15a)
2. 平直莖的生長率相當穩定，平均每天生長0.235 cm，如圖15a中藍色直線的斜率所示。
3. 捲曲莖的生長率並非平穩，尤其是接觸後初期，但後期則趨於穩定。以長期整體觀之，捲曲莖的生長率為平直莖的生長率的 $1.67/0.235=7.1$ 倍。
4. 捲曲莖的生長速率在接觸後明顯變快，第7天後趨平穩。
5. 捲曲莖的日生長率圖顯示，捲曲莖的日生長率在第3~4天達到最高值，一天就生長3.4 cm。(圖15b)
6. 接觸後初期川七的生長率越來越快，顯示接觸會刺激川七增生IAA。日生長率可以用自然指數函數描述，顯示每0.92天增長2.7倍。(圖15b中綠色實線)
7. 第4天後生長率極速下降，每0.18天就減緩63%。(圖15b中紅色實線)

## (二) 川七捲曲莖表皮細胞生長測量

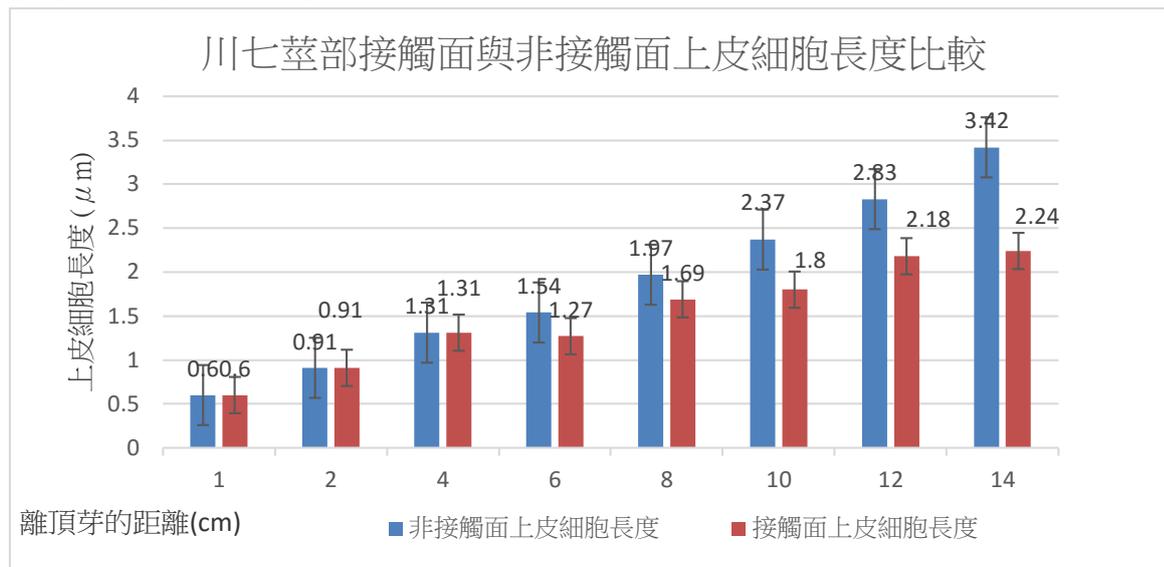


圖 16 川七莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度比較

圖片說明：因為川七頂芽攀附上竹子之後，從頂芽至頂芽下方 4 公分，並無接觸竹子，因此表皮細胞長度於植株的兩側一致。而與頂芽下方 4 公分以上開始纏繞竹子，於莖部 6、8、10、12、14 公分處測量表皮細胞長度，非接觸面皆比接觸面長，且以 t-test 雙尾檢定，皆達到統計上的顯著差異(6 cm 處: p value = 0.00468518\*\*；8 cm 處: p value = 0.03564225\*；10 cm 處: p value = 0.00446034\*\*；12 cm 處: p value = 0.00000012\*\*\*；14 cm 處: p value = 0.000000004181\*\*\*)。並且，隨著離頂芽的距離越遠，表皮細胞長度越長。

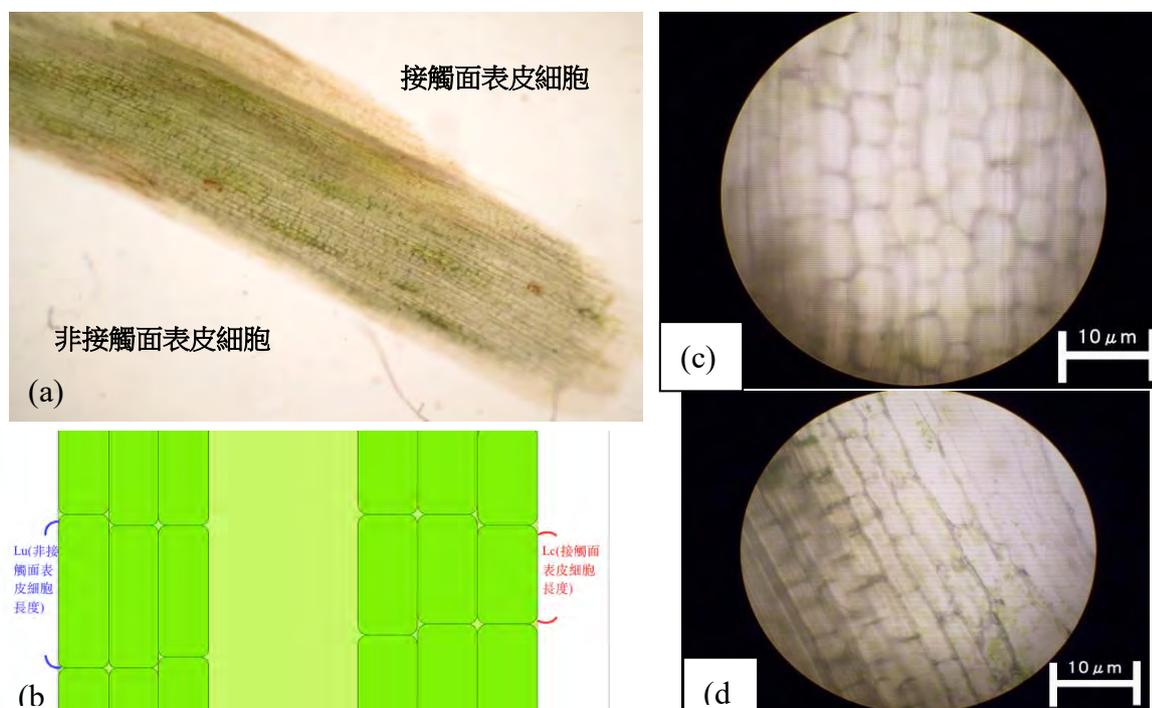


圖 17 (a)接觸面與非接觸面表皮細胞顯微切片 (b)接觸面與非接觸面表皮細胞示意圖  
(c)接觸面表皮細胞顯微切片放大 (d)非接觸面表皮細胞顯微切片放大

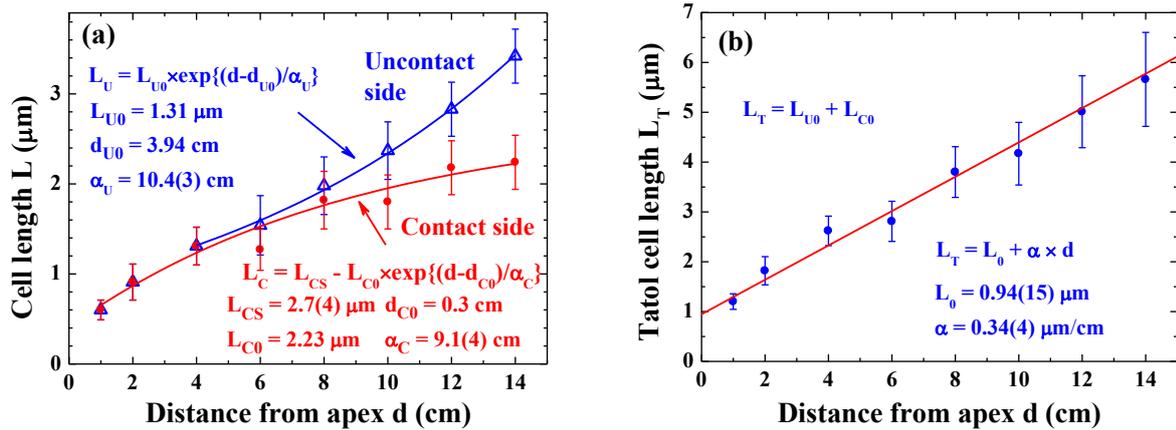


圖18 (a) 川七莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度的定量分析圖。(b) 接觸面表皮細胞長度與非接觸面表皮細胞長度和隨離頂芽距離變化關係圖。

圖片說明：

1. 隨著離頂芽越遠，非接觸面及接觸面的表皮細胞長度均越長，但兩面的表皮細胞長度隨離頂芽距離的變化卻截然不同。
2.  $L_C$ ：接觸面的表皮細胞長度； $L_U$ ：非接觸面的表皮細胞長度； $d$ ：離頂芽距離。
3.  $L_C$  的增長率隨  $d$  越大而漸減， $L_U$  的增長率則漸增，兩者的變化趨勢均可以用自然指數來描述，意思是說，每個IAA分子可以刺激細胞生長的長度是固定的。
4.  $L_C$  的增長率以指數函數漸減(圖18a中紅色擬合實線)，而  $L_U$  的增長率則以指數函數漸增(圖18a中藍色擬合實線)。離頂芽底邊3.94 cm後，兩面的增長率開始分離。
5. 非接觸面的  $L_U$  以  $d$  每增加 10.4 cm(圖18a中 $\alpha_U$ )， $L_U$  的增長2.73倍的倍率增長。
6. 接觸面  $L_C$  的增長速率明顯比非接觸面  $L_U$  的增長速率小許多。在離頂芽 12 cm 處， $L_C$  的生長速率僅是  $L_U$  的 40%。
7. 接觸面的  $L_C$  有極大值，最長僅可達 2.7  $\mu\text{m}$ (圖18a中 $L_{CS}$ )。
8.  $L_T = L_C + L_U$  隨  $d$  越大呈線性增長(圖18b)，顯示接觸並未明顯增加頂芽產生IAA的總量。接觸後  $L_U$  明顯比  $L_C$  長，顯示接觸使得較多IAA輸送到非接觸面，亦即接觸會抑制IAA輸送到接觸面，而轉移輸送到非接觸面。

### (三) 平直的莖、捲曲的莖解剖型態比較

#### 1. 切片植株描述

- A. **平直莖**：總長43 cm，前端有頂芽，取莖的部位為離頂部 5~9cm 處，節在 7 cm處。
- B. **捲曲莖**：總長32 cm，前端枯掉，取莖的部位為離頂部 24.5~28.5 cm 處，節在26.5 cm處。纏繞的蘆葦直徑為 0.3 cm。用指甲油標記川七的莖非接觸面，節的上端2cm以藍色指甲油標記，節的下端2cm以紅色指甲油標記。

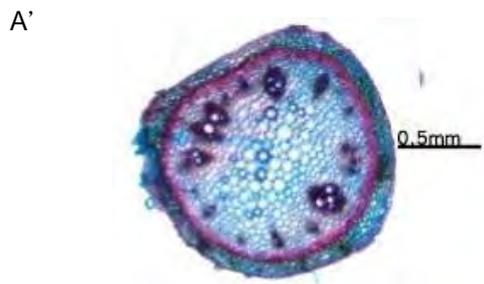
	未染色	染色
平直嫩莖節上第13個切片	<p><b>A</b></p> 	<p><b>A'</b></p> 
平直嫩莖節下第13個切片	<p><b>B</b></p> 	<p><b>B'</b></p> 
捲曲嫩莖節上第13個切片	<p><b>C</b></p> 	<p><b>C'</b></p> 
捲曲嫩莖節下第13個切片	<p><b>D</b></p> 	<p><b>D'</b></p> 

圖19 川七莖部橫切圖

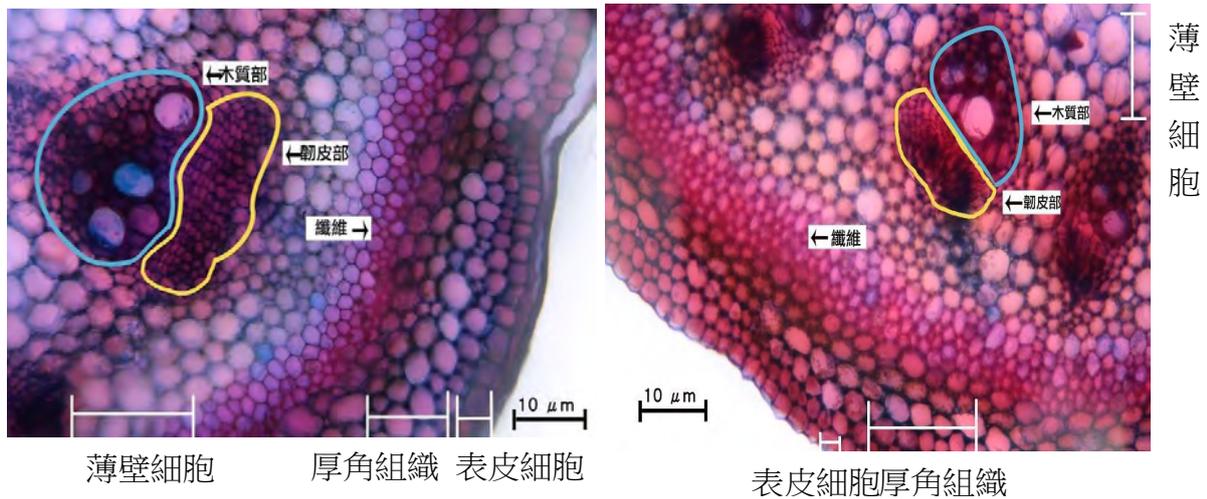


圖 20 捲曲莖非接觸面放大圖

圖 21 捲曲莖接觸面放大圖

圖片說明：

- (1) 平直莖與捲曲莖的解剖型態相似，由外部至內心的排列為：表皮組織→厚角組織→纖維→薄壁組織→維管束→髓部。
- (2) 一個直徑為 2.5 公分的川七莖，約有大小不一的維管束約 13-15 個，其數量與平直莖與捲曲莖無關，且捲曲莖接觸面與非接觸面的維管束型態無明顯差異。
- (3) 捲曲莖接觸面與非接觸面的表皮組織所占寬度不同，接觸面表皮細胞所占寬度較大，如圖 19(C)、20、21 所示，統計數值為圖 22 所示。

### 3. 捲曲莖接觸面與非接觸面表皮細胞所占寬度比較

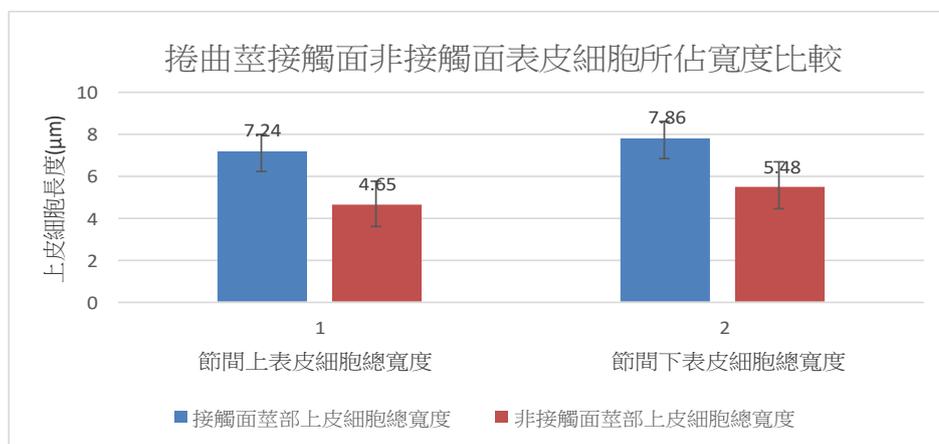


圖 22 捲曲莖接觸面與非接觸面表皮細胞所占寬度比較圖

圖片說明：

1. 不論是節間上或節間下的表皮細胞所占寬度，皆是接觸面比非接觸面大，以 t-test 雙尾檢定計算，皆達顯著差異(節間上接觸面與非接觸面表皮細胞總寬度比較  $p \text{ value} = 0.0000010752$  \*\*\*；節間下接觸面與非接觸面表皮細胞總寬度比較  $p \text{ value} = 0.0000091308$  \*\*\*)
2. 推測其原因，因為非接觸面表皮細胞生長速率較快，細胞長度拉長，因此整體的表皮細胞寬度就相對的比接觸面小。

### 三、向觸性的研究- 植物生長素 (IAA) 於捲曲莖部的研究

#### (一) 植物生長激素 IAA 的分子結構

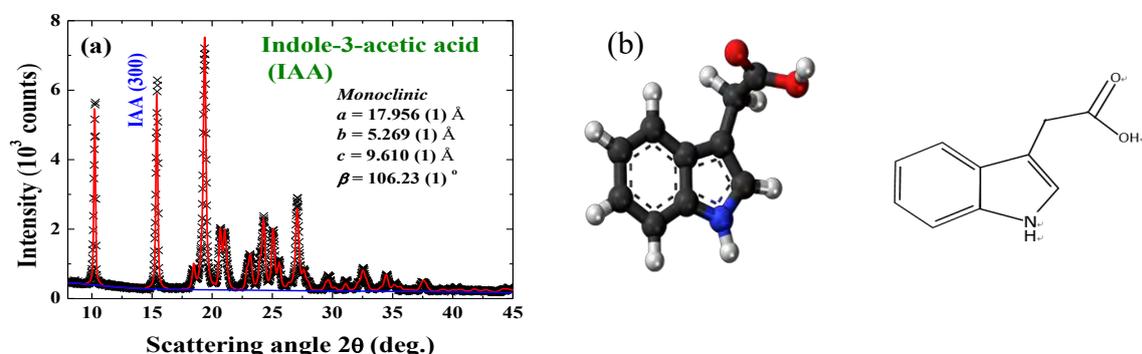


圖 23 向廠商購買的 IAA 粉末標準品的 X 光繞射實驗所得譜圖(a) (x 符號)，及以已知基本結構(b)(c)，化學式為  $C_{10}H_9NO_2$ ，IAA 由兩個苯環所組成，藉由 GSAS 軟體擬合得到圖(a) 譜圖 (實線)。

Indole-3-acetic acid (IAA)				
Monoclinic $P 1 21 / c 1$				
$a = 17.956 (1) \text{ \AA}$ , $b = 5.269 (1) \text{ \AA}$ , $c = 9.610 (1) \text{ \AA}$ , $\beta = 106.23 (1)^\circ$				
Atom	x	y	z	Occupancy
O1	0.022(1)	0.715(1)	0.423(1)	0.777(2)
O2	0.065(1)	1.054(1)	0.435(1)	0.777(2)
N1	0.283(1)	1.286(1)	0.311(1)	0.906(1)
C2	0.216(1)	1.158(1)	0.250	0.943(1)
C3	0.204(1)	0.940(1)	0.337(1)	0.723(3)
C4	0.296(1)	0.758(1)	0.562(1)	1.000
C5	0.372(1)	0.771(1)	0.654(1)	1.000
C6	0.424(1)	0.963(1)	0.635(1)	1.000
C7	0.401(1)	1.143(1)	0.524(1)	1.000
C8	0.134(1)	0.793(1)	0.294(1)	0.777(2)
C9	0.070(1)	0.898(1)	0.356(1)	0.777(2)
C31	0.271(1)	0.939(1)	0.449(1)	1.000
C71	0.325(1)	1.128(1)	0.432(1)	1.000

表二 由實驗數據擬合所得商購 IAA 粉末標準品的各原子相對位置座標

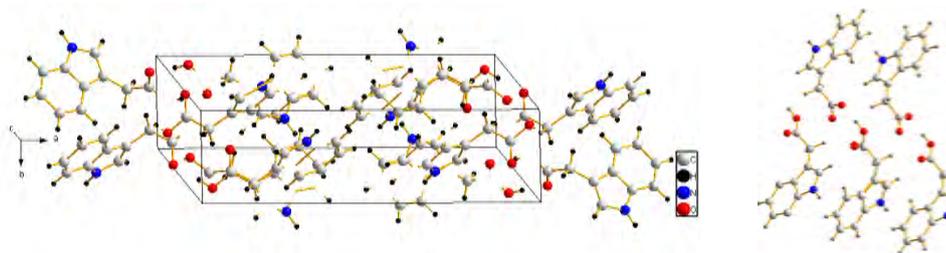


圖 24 以擬合所得原子位置座標，藉由 Diamonds 軟體所繪製 IAA 標準品的化學結構組成。左圖線框標示結構的單位晶格，右圖為局部放大圖，顯示 IAA 基本結構間的連結組態。圖片說明：

1. 讀取向廠商購買的 IAA 粉末標準品的X光繞射譜圖，據以標定代表IAA的特徵繞射峰位置。圖23顯示在低角度有3個較強的X光繞射峰。
2. 根據文獻，IAA的分子化學學名為 Indole-3-acetic acid，由繪示於圖24中右側圖的基本結構，以特定對稱型態組合而成。
3. 以General Structure Analysis System (GSAS)軟體擬合圖24中實驗所得IAA繞射譜圖，可以得到 IAA中各原子的相對位置座標。(表二)
4. 依據各原子的相對位置座標，即可藉由Diamonds 軟體繪製IAA的原子結構圖。(圖24)
5. 圖24右圖繪製IAA的基本結構間的連結組態，可看出基本結構間的化學連結相對較弱，符合已知IAA照光會局部分解，而呈現黃色的特性。

## (二) 川七 IAA 粉末純化步驟

### 1. 處理、乾燥

#### (1)事前準備

器材使用前後需用MeOH沖淋，再用中性洗劑清潔，經二次水清洗後再放入烘箱烘乾備用。冷凍乾燥機需預冷至-40°C 以下，真空度 $133 \times 10^{-3}$  Pa以下。

#### (2)實驗步驟

樣品自-80°C 冰箱取出，依特性處理、計算樣品數量後放入圓底離心瓶中秤取鮮重(離心瓶需標記清楚)。將液態氮加入離心瓶中(為確保樣本完全降溫，液面需高於樣本)，待液態氮揮發完全後將離心瓶瓶口鋪一層棉紙放入冷凍乾燥瓶內上機。

※加入液態氮後不得鎖緊離心瓶，有氣爆危險。

※冷凍乾燥瓶外需包錫箔紙避光。

冷凍乾燥約兩天後下機，秤乾重，並將sample放入-20°C 冰箱保存備用。

代 號	瓶 重	瓶+鮮	瓶+乾	鮮 重	乾 重
C	15.1394	19.6155	15.6553	4.4761	0.5159
NC	14.5483	18.9969	15.1083	4.4486	0.5600
A	14.3183	23.8456	15.2750	9.5273	0.9567

表格說明：(a)秤到小數點4位 (b) C為接觸面，NC為非接觸面，A為頂芽部分(Apec)

### 2. 萃取

#### (1)事前準備

離心機需事先降溫至4~9°C，且使用前離心管需對稱平衡。80% MeOH需預先放入-20°C 預冷。

#### (2)實驗步驟

將樣本置入研鉢中加入液態氮待其揮發後添加適量海砂研磨(萃取)後再將粉末移回離心管。以5~10mL -20°C 80%MeOH分次清洗溶解研鉢及藥勺上之樣本，將清洗溶解液

加回離心瓶中，Solvent震盪混合後置入-5°C 冰箱震盪萃取2hr。

第一次離心：18000rpm在4°C下離心10min，將上清液(樣品甲醇萃取液)倒入大試管(20×150mm)中，加入抗氧化劑及內標，吹氮氣。離心瓶再加入5~10mL -20°C 80%MeOH，置入5°C 冰箱震盪萃取2hr。

第2次離心：18000rpm在4°C下離心10min，將上清液倒入原本的大試管中，樣品萃取液用氮氣吹乾到約剩1mL左右。我們把80%的MeOH為全吹掉，但是為了避免萃取液很難回溶，沒有把剩下的20%H<sub>2</sub>O完全吹乾。

### 3. 添加抗氧化劑及內標

#### (1)事前準備

抗氧化劑自4°C 冰箱取出，內標自-20°C 冰箱取出，常溫靜置30min回溫。

#### (2)實驗步驟

抗氧化劑添加量：

抗氧化劑	添加量(μL)
BHT	20
Ascorbic Acid	100

內標添加量

內標	添加量(ng)
IAA	100

※內標添加時使用電子 pipetman，且至少需要一人在旁確認。

### 4. Partition

#### (1)事前準備

pH meter使用前需先校正。0.5M pH2.0 K-Pi buffer自4°C 冰箱取出回溫。

#### (2)實驗步驟

20×150mm大試管中的樣品萃取液加入約14mL 0.05M pH8.5 K-Pi buffer，磁石攪拌至樣品完全溶解。調整pH值到8.50~8.60之間，再加入15mL Hexane(己烷)進行partition，用磁石攪拌3min，靜置30min(第2.3次視清澈度約靜置10min)後將上層液Hexane抽出丟棄，保留下層液，重複3次。調整樣品萃取液pH值到3.00~2.90之間(即加入5mL 0.5M pH2.0 K-Pi buffer，使pH值能降低至約3.0，再調整pH值為3.0)。再加入15mL EtOAc(乙酸乙酯)進行partition，用磁石攪拌3min，靜置30min(第2.3次視清澈度約靜置20min)後，抽取上層液EtOAc平均分配於5隻tube(12×75mm試管)中，用speedVac乾燥，共重複3次。

### 5. 1st HPLC(column：RP-18e)層析純化

#### (1)事前準備

HPLC開機：包含電腦、螢幕、去氣泡機(讀值應在50以下)、HPLC、螢光光譜儀(需開Lamp)、分液收集器。趕A、B solvent管線內之氣泡。A、B solvent依序各以每0.6mL/min流速流10~20min，紀錄pump壓力讀值。HPLC打入50ng IAA 標準品，測試層析時間(層析誤差不得超過1min)關機前需跑30min A solvent，清洗column。

## (2)實驗步驟

樣品萃取液(5管)各用200  $\mu$  L 100%MeOH溶解，以1mL的塑膠針筒抽取濾過syringe filter (0.45  $\mu$  m)，重複3次後，用SpeedVac完全乾燥。之後取60  $\mu$  L 0.1% HOAc -100% MeOH加入樣品tube中vortex待其溶解，再加入140  $\mu$  L 0.1% HOAc -100% $H_2O$ 輕輕pipetting混勻，用氣密針抽取樣品萃取液打入HPLC中，使用分液收集每1min收集1管，分管收集，用SpeedVac將其完全乾燥。

## 6. 收集

每管用100  $\mu$  L pure MeOH清洗三次收集於GC-MS專用瓶(IAA用棕色瓶)

MeOH用 SpeedVac 乾燥。瓶中剩下來的粉末便是 IAA。

## (三) 以X光繞射偵測川七接觸面及非接觸面的純化後IAA濃度

(a)

(c)

(b)

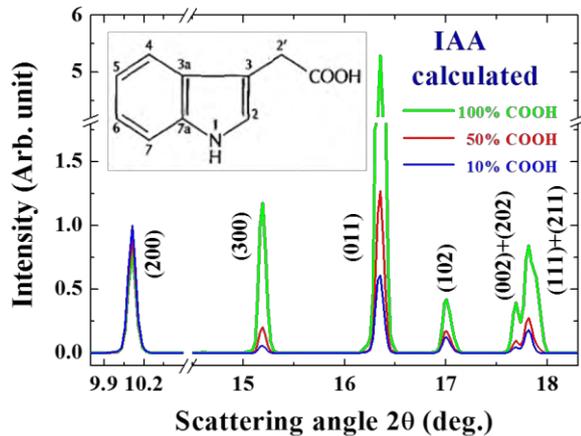
圖25 川七IAA純化粉末X-Ray繞射圖。圖(a)為川七頂芽IAA粉末照射結果，圖(b)紅線代表非接觸面IAA粉末，藍線代表接觸面IAA粉末，圖(c)為標準市售IAA粉末照射譜圖。

圖片說明：

1. 接觸面、非接觸面、頂芽萃取物中，除IAA外(以位於10.1及11.3度的峰為代表)，還有另一分量(以位於7.5度的峰為代表)。
2. 另一分量初步判斷為 $C_{15}H_{22}O_8$ ，環烯醚。經由文獻資料查證，已知環烯醚為某種藥用植物的萃取物成分，具有消炎功效。
3. 接觸面與非接觸面的X光繞射峰(圖b)出現的位置相近，分子結構(原子的排列)相同。但接觸面與非接觸面繞射峰相對強度不同，顯示原子數目的含量不同，相信應該是來自接觸面與非接觸面的IAA中，OH、O、NH含量不同。
4. 比較兩面 $C_{15}H_{22}O_8$ 的含量比例，非接觸面明顯較高，初略以11.3度的峰強度比較，非接觸面為接觸面的 $3008/1770=1.7$ 倍。(譜圖已依7.5度峰的強度歸一化)

#### (四) 以X光繞射偵測川七純化後IAA粉末：頂芽、接觸面及非接觸面結構分析

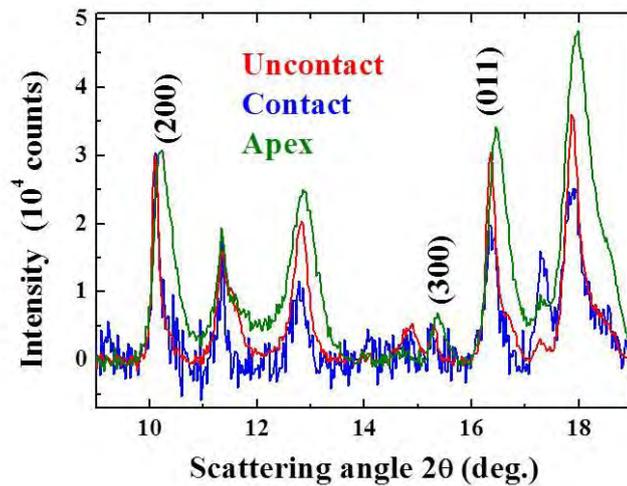
圖26 以X光繞射峰強度分析 IAA 分子中含 COOH 的比例



圖片說明：

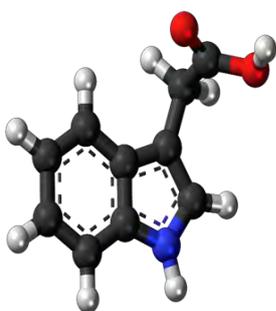
1. IAA 結構中，COOH 容易脫落，已知照光就會造成 COOH 脫落。
2. 上圖依 IAA 分子結構計算只有一部分 IAA 有 COOH 時，在 X 光繞射譜圖顯現出的表徵效應。
3. IAA 分子中 COOH 越少，使得(300)、(011)、(102)繞射峰強度越弱。
4. 比較(200)、(300)、(011)繞射峰的相對強度，可以用來計算 IAA 中 COOH 鏈缺陷的百分比。

圖 27 IAA 的 X 光 繞射峰  
 (300)、(011)峰強度可以計算各部位的 IAA 中 COOH 鏈缺陷的百分比。綠線為頂芽(A)，紅線為非接觸面(NC)，藍線接觸面(C)。



圖片說明：

1. 本圖將已依 IAA (200)強度歸一化，比較 IAA 的(300)、(011)峰強度可以計算各部位的 IAA 分子中含 COOH 的百分比。
2. 非接觸面(紅線)的(300)、(011)強度比接觸面(藍線)者強，顯示非接觸面的 IAA 中含較多 COOH。
3. 頂芽(綠線)的(300)、(011)強度與非接觸面(紅線)較為相近，顯示這兩處的 IAA 含 COOH 比例較接近。
4. 依照 IAA X 光繞射峰強度(200)、(300)、(011)計算，頂芽的 IAA 分子中，60 % 含有 COOH，向下往非接觸面輸送時，剩下 40% IAA 分子有 COOH；而往接觸面輸送時，剩下 30% IAA 分子有 COOH，代表由頂芽向下運輸時，不論是接觸面與非接觸面，皆有部分 IAA 的 COOH 丟失，而接觸面丟失的比例較大。



IAA size	(200)	(011)	(002)
Uncontact	29 nm	24 nm	17 nm
Contact	28 nm	19 nm	10 nm
Apex	10 nm	10 nm	8 nm

圖28 IAA 的串接個數分析

圖片說明：

1. IAA 沿晶體軸向的大小，(200) 為沿 a 軸方向，(002)是沿 c 軸方向，(011)是沿 b-c 軸方向。IAA 個數就是用表上值除以各軸向的晶格常數所得。
2. IAA 晶格常數：a = 1.795 nm, b = 0.527 nm; c = 0.961 nm。
3. 頂芽的 IAA： $(5 \times 19 \times 8) = 2,300$  個串一起。
4. 接觸面的 IAA： $(15 \times 36 \times 10) = 5,400$  個串一起。
5. 非接觸面的 IAA： $(16 \times 45 \times 18) = 13,000$  個串一起。
6. 非接觸面 IAA 的體積大小/接觸面 IAA =  $13000/5400 = 2.4$  倍。

結論：川七頂芽滋生的 IAA 僅 60% 有 COOH 鏈，向下輸送 IAA：

- (1) 到非接觸面時，約 13000 個 IAA 週期性串接在一起，但 IAA 僅剩 40% 接有 COOH 鏈
- (2) 到接觸面時，約 5400 個 IAA 週期性串接在一起，但 IAA 僅剩 30% 接有 COOH 鏈
- (3) 因為 IAA 有 COOH，代表為有活性的狀態，因此有活性的 IAA 含量比為：

頂芽 > 非接觸面 > 接觸面

(五) 以紫外區吸收光譜探討川七捲曲莖接觸面及非接觸面的 IAA

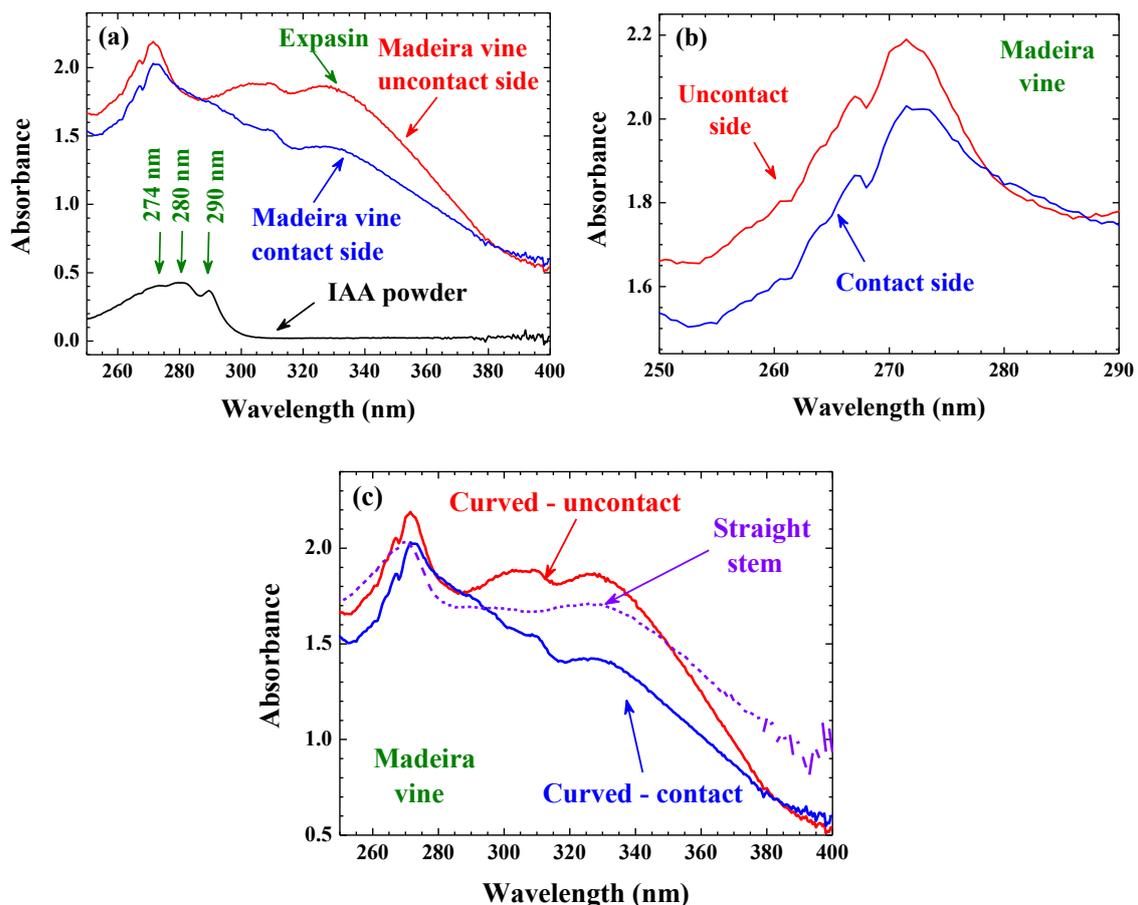


圖 29 (a) IAA 粉末(黑色曲線)、川七捲曲莖非接觸面(紅色曲線)、川七捲曲莖接觸面(藍色曲線)的紫外區吸收光譜。(b)川七捲曲莖非接觸面及接觸面吸收光譜的局部放大圖。(c)川七平直莖(紫色虛曲線)、川七捲曲莖非接觸面(紅色曲線)、川七捲曲莖接觸面(藍色曲線)的吸收光譜比較圖。

圖片說明：

1. 圖29(a)中黑色曲線繪示IAA粉末以10.8 ppm濃度浸泡在酒精中，量測所得的吸收光譜。  
→IAA在240到310 nm的特徵吸收光譜，在特徵吸收峰出現在 274、280、290 nm，可以用來標示川七捲曲莖吸收光譜中IAA的訊號。
2. 圖29(a)中紅色與藍色曲線，分別繪示川七捲曲莖非接觸面與接觸面輕壓磨碎後浸泡在酒精中，量測所得的吸收光譜。
3. 比較川七捲曲莖中的IAA與IAA粉末的特徵吸收峰：川七捲曲莖中IAA的特徵吸收峰藍位移到較短波長，而最強吸收分別出現在272 與 280 nm。
4. 川七捲曲莖非接觸面與接觸面的吸收光譜，最顯著的區別在285~380 nm區間，以330 nm 吸收峰為代表，該區間的吸收源自胞壁擴張酶(expasin)。
5. 川七捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶(expasin)分子濃度明顯較接觸面的濃度高出甚多。  
[圖29(a)]
6. 比較捲曲莖非接觸面與非接觸面源自IAA的吸收譜圖：  
→ 兩吸收譜圖在278~288 nm區基本上重疊，但非接觸面短波長的吸收強度明顯比接觸面者最高許多，顯示非接觸面的IAA濃度高於接觸面者。[圖29(b)]
7. 比較捲曲莖非接觸面、捲曲莖非接觸面、平直莖源自胞壁擴張酶(expasin)的吸收譜圖：  
→ 捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶(expasin)濃度最高，平直莖者次高，捲曲莖非接觸面者最少。[圖29(c)]
8. IAA的濃度在捲曲莖非接觸面與接觸面不同，除了造成川七捲曲莖非接觸面與接觸面的生長差異，也使細胞裡的微環境改變，例如使胞壁擴張酶(expasin)含量也增多，以合成更多使細胞伸長所需要的物質等。

## (六) IAA 的拉曼光譜(Raman spectrum)

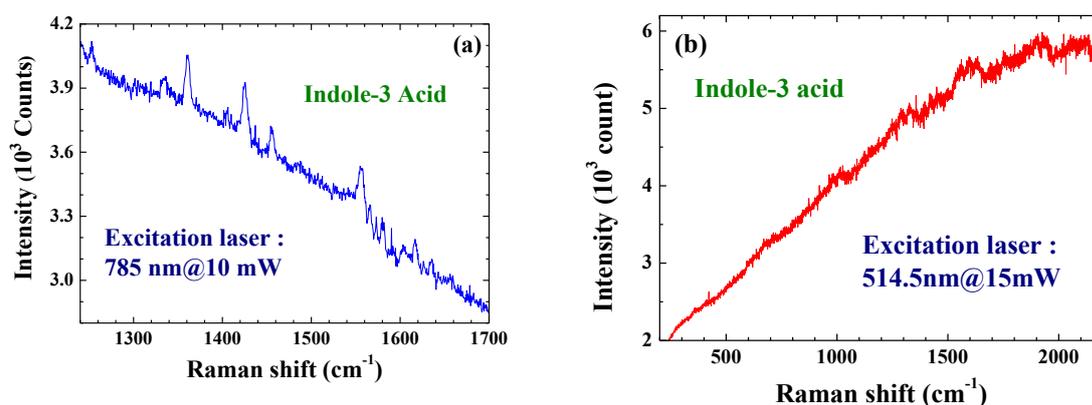


圖 30 IAA 粉末以(a) 785 nm 及(b) 514.5 nm 雷射作為激發光源的拉曼譜圖。

圖片說明：

1. 以785 nm 雷射光作為光源，激發IAA粉末的拉曼譜圖，在1200~1700拉曼位移間，可以在 1360、1425、1455、1555  $\text{cm}^{-1}$  清楚觀測到 IAA的特徵拉曼峰。[圖30(a)]
2. 我們用這些IAA特徵峰，來標示川七捲曲莖拉曼光譜中IAA的訊號。
3. 以514 nm 雷射作為激發光源，會同時激發 IAA 的螢光，使拉曼訊號不易從螢光譜圖中區分出來。[圖30(b)]
4. 以632 nm 雷射作為激發光源，也會同時激發 IAA 的螢光，使拉曼訊號不易從螢光譜圖中區分出來。
5. 我們選用785 nm 雷射光作為光源，激發川七捲曲莖的拉曼譜圖，再從其中識別出來自IAA的訊號。

(七) 用於激發表面電漿波共振(Surface plasma resonance, SPR)的奈米金微粒

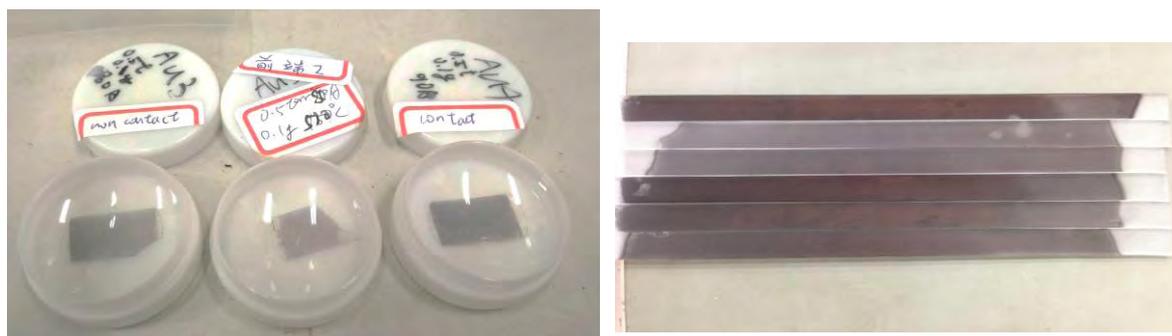


圖 31 用以產生表面電漿波共振，附著在玻片上的金奈米微粒。

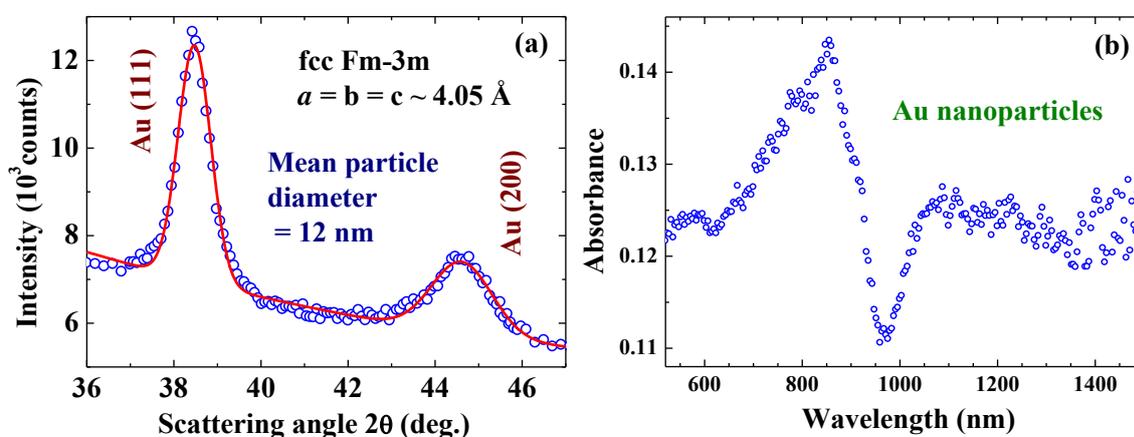


圖 32 示於圖 24 中附著在玻片上的金奈米微粒的(a)X 光繞射譜圖及(b)吸收光譜。

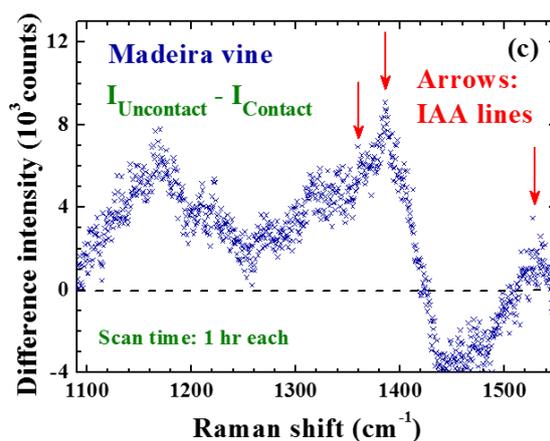
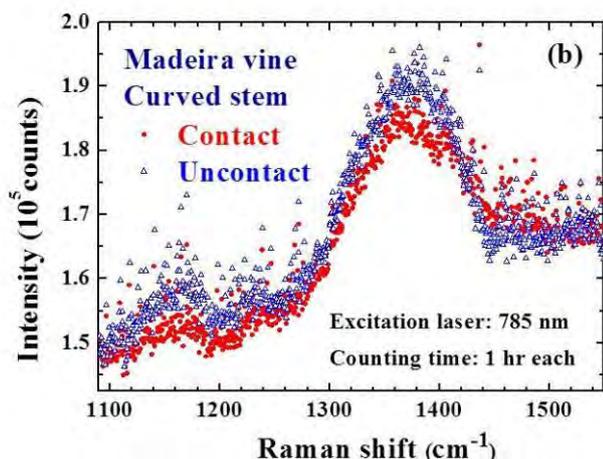
圖片說明：

1. 讀取吸附在玻片上金微粒的X光繞射譜圖，觀測到(111)及(200)繞射峰。[圖32]
2. 以繞射峰寬度，依據斯瑞爾計算方法，獲得所製作的奈米金微粒平均直徑為12 nm。
3. 以穿透式設置，量測所製作的奈米金微粒的吸收光譜，顯示500~1400 nm間均有吸收，而在850 nm有稍強的吸收峰，且適合以785 nm來激發表面電漿波。[圖32]

(八) 以表面增益拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS)測川七捲曲莖接觸面及非接觸面的生長素 IAA 濃度是否有不同



圖 33 (a)將川七不同部位樣本磨碎，靜置於 95% 酒精中 2 小時。(b)川七捲曲莖非接觸面與接觸面的表面增益拉曼譜圖 (c)川七捲曲莖非接觸面與接觸面的表面增益拉曼譜圖的相減圖



圖片說明：

1. 把川七IAA粉末靜置於酒精中20小時，讓較粉末沉澱到底部。取中段溶液一滴，至奈米金玻片上，靜置讓酒精蒸發後，量測拉曼光譜 圖31(a)。
2. 雷射光從樣品上方入射，通過川七IAA粉末後進入奈米金顆粒層，同時激發川七IAA的拉曼光譜及奈米金顆粒的表面電漿共振，放大川七IAA的拉曼訊號，而被偵測到。
3. 以高拉曼位移區域( $>1600 \text{ cm}^{-1}$ )作為訊號么正化(normalization)的對準區，將川七捲曲莖非接觸面的拉曼譜圖減去川七捲曲莖接觸面的拉曼譜圖，即可顯現出非接觸面與接觸面拉曼訊號的差異。[圖33, (b)]
4. 圖34(b)中紅色箭頭指出IAA的特徵拉曼峰的位置，在清楚觀測到非接觸面來是IAA的訊號，明顯較接觸面者強許多，顯示川七捲曲莖非接觸面中IAA的含量比接觸面者高。

## 陸、討論

### 一、生活史的觀察

川七(Madeira-vine)為洛葵科洋洛葵屬之多年生蔓性植物，每年秋冬及早春為盛產期，而以 9-10 月為盛花期，此時山林步道較陰暗處到處可見川七一串串白色的花。零餘子為川七營養繁殖的構造，常於莖上可見的綠色膨大橢圓型凸起，墜落之後可成長為另一個新植株。

川七具有頂芽幼莖才有纏繞能力，會自發性的做左旋旋繞擺盪搜尋目標物，接觸竹竿之後，川七莖皆以左旋纏繞上物體。在無纏繞的情形下，川七的平直莖生長緩慢，且日漸有木質化的現象，推測應為強化莖的支撐力，如此才能在無攀附物的狀況之下繼續莖的生長。

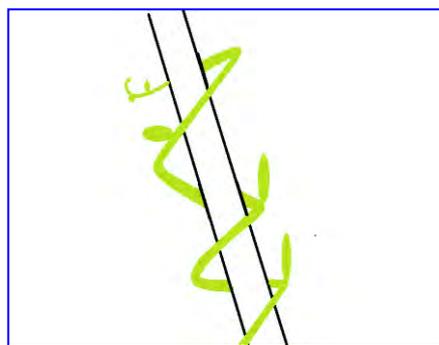


圖 34 川七幼莖自發性的做左旋旋繞擺盪  
搜尋目標物

### 二、

### 向觸性的研究 -- 川七莖部的生長及解剖型態比較

#### (一) 川七平直莖與捲曲莖的生長速率比較

1. 川七平直莖(straight stem)與捲曲莖(curved stem)的生長率截然不同。(圖15a)  
以長期整體觀之，捲曲莖的生長率為平直莖的生長率的 $1.67/0.235=7.1$ 倍。  
捲曲莖的生長速率在接觸後明顯變快，第7天後趨平穩。捲曲莖的日生長率圖顯示，捲曲莖的日生長率在第3~4天達到最高值。
2. 接觸後初期川七的生長率越來越快，顯示接觸會刺激川七增生IAA。

#### (二) 川七捲曲莖表皮細胞生長測量

1. 隨著離頂芽越遠，非接觸面及接觸面的表皮細胞長度均越長，但兩面的表皮細胞長度隨離頂芽距離的變化卻截然不同，且達到顯著差異( $P \ll 0.001$ , \*\*\*)。
2. 接觸面的表皮細胞增長率隨離頂芽距離越大而漸減，非接觸面的表皮細胞增長率則漸增，兩者的變化趨勢均可以用自然指數來描述。也就是說，每個IAA分子可以刺激細胞生長的長度是固定的。
3. 將接觸面與非接觸面兩邊表皮細胞長度相加做圖，發現距離頂芽越遠，則表皮細胞越長，且呈線性增長(圖18b)，顯示接觸並未明顯增加頂芽產生IAA的總量，只是改變IAA在莖部的分布。接觸後非接觸面明顯比接觸面長，顯示接觸使得較多IAA運送到非接觸面，亦即接觸會使得非接觸面的IAA含量較多。

### (三) 平直的莖、捲曲的莖解剖型態比較

1. 平直莖與捲曲莖的解剖型態相似，維管束分布或型態不會因平直莖與捲曲莖、捲曲莖接觸面與非接觸面而有明顯差異。
2. 捲曲莖接觸面與非接觸面的表皮組織所占寬度不同，接觸面表皮細胞所佔寬度較大，推測其原因，因為**非接觸面表皮細胞**生長速率較快，細胞長度拉長，因此整體的表皮細胞寬度就相對的比接觸面小。[圖 22]

### 三、向觸性的研究— 植物生長素 (IAA) 於捲曲莖部的研究

1. 根據文獻，IAA 運移很慢，由頂芽往莖部運輸，運送的速率約 1.0 cm / hr，但是還是比擴散速率快10倍(Frank B. Salisbury., *et al*, 1992)。
2. 川七捲曲莖非接觸面與接觸面的吸收光譜，最顯著的區別在290~380 nm區間。該曲間的吸收來自IAA以外的其他物質，顯示非接觸面引發該吸收的分子濃度明顯較高。
3. IAA的濃度不同除了造成川七捲曲莖非接觸面與接觸面的生長差異，也使細胞裡的微環境改變，例如使某種酵素含量(胞壁擴張酶)增多，以合成更多使細胞伸長所需要的物質等。
4. 吸收光譜與X光繞射實驗均顯示，非接觸面與接觸面IAA的濃度及結構皆有差異，可能因此使其生長速率不同而引發向觸性。
5. 以表面增益拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS)測川七捲曲莖接觸面及非接觸面的生長素IAA濃度是否有不同，IAA特徵拉曼峰的位置清楚觀測到非接觸面來自IAA的訊號，明顯較接觸面者強許多，顯示**川七捲曲莖非接觸面中IAA的含量比接觸面者高**。

### 四、IAA 在向觸性中扮演的角色

1. IAA 由頂芽的分生組織分泌，一般推測IAA是由維管束周邊的薄壁細胞以極性運輸的方式，一個細胞一個細胞往下運輸。主要因為植物細胞底部擁有頂部所沒有的攜帶生長素的載體蛋白，因此生長素只能從上面一個細胞經此種蛋白質帶出再進入下面的一個細胞。(Perrineau F.,*et al*, 2016)
2. 生長素在生長方面的作用為促進細胞伸長，而非促進細胞分裂。(C. Alex Esmon.,*et al*, 2005)
3. 川七的頂芽會產生迴旋運動 (Millet, B.,*et al*, 1988)，一但碰觸到物體，則使川七產生向觸性。推測其原因，此一機械性刺激可能使得頂芽下方的嫩莖接觸面與非接觸面的IAA重新分配，**IAA於非接觸面含量較多**，因此非接觸面(1)細胞伸長較多，(2)表皮細胞的寬度因此變得較窄，如此可以攀附上所接觸的物體，但是IAA的總量並未改變。
4. IAA對於接觸面與非接觸面兩側的作用，可能為啟動某些基因的表現，例如活化生成胞壁擴張酶(expasin)的基因，產生胞壁擴張酶，使非接觸面表皮細胞的細胞壁被軟化(Akira Tabuchi., *et al*, 2011)，但是並非均等的擴張，長方形狀的表皮細胞左右側細胞壁軟化程度較大，因此吸水膨脹之後，細胞被拉長。[圖17]

## 5. IAA推測作用示意圖

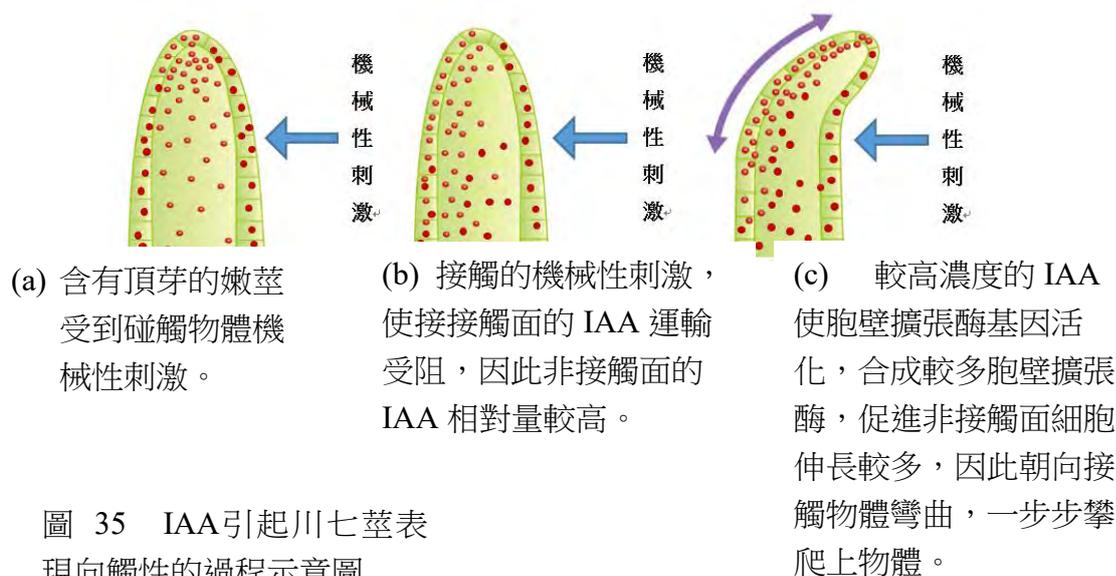


圖 35 IAA引起川七莖表現向觸性的過程示意圖

## 柒、結論

- 一、接觸物體會刺激川七莖的生長，捲曲莖的生長率為平直莖的生長率的7.1倍。
- 二、接觸的機械刺激使IAA於接觸面與非接觸面分布不均，非接觸面表皮細胞增長較快，在離頂芽 12 cm 處，接觸面的生長速率僅是非接觸面的40%。但IAA總量並未改變，如圖17(b)所示，IAA使川七捲曲莖接觸面與非接觸面的總生長量呈線性增長。
- 三、X光繞射及吸收光譜結果顯示，川七捲曲莖非接觸面IAA的含量高於接觸面 IAA的含量，且非接觸面IAA分子含有COOH的比例比接觸面高約10%。
- 四、IAA的濃度不同除了造成川七捲曲莖非接觸面與接觸面的生長差異，也使細胞裡的微環境改變，例如使某種酵素含量(胞壁擴張酶)增多，以合成更多使細胞伸長所需要的物質等。
- 五、表面增益拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS) 的結果顯示，川七捲曲莖非接觸面IAA的含量高於接觸面IAA的含量。

## 捌、未來展望

目前 X 光繞射、吸收光譜以及 SERS 的數據分析還在初步區分非接觸面與接觸面的階段，希望能夠克服將川七不同區段萃取下來的定量技術，可以有更精準的數據分析。也希望能夠進一步研究川七莖部接觸面與非接觸面除了 IAA 的不同之外，還有哪些組成分子有差異，造成其向觸性。

## 玖、參考文獻

- 一、 Alex Esmon C., Ullas V . Pedmale and Emmanuel Liscum (2005) Plant tropisms: providing the power of movement to sessile organism *Int. J. Dev. Biol.* 49: 665-674
- 二、 Akira Tabuchi, Lian-Chao Li and Daniel J. Cosgrove (2011) Matrix solubilization and cell wall weakening by  $\beta$ -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *The Plant Journal* 68, 546–559
- 三、 Effin Graham T. and Priyavadan Joshi A. (1995) Novel Fixation of Plant Tissue, Staining through Paraffin with Alcian Blue and Hematoxylin, and Improved Slide Preparation
- 四、 Frank Salisbury B., Cleon Ross W. (1992) *Plant Physiology* Fourth edition p.363-364
- 五、 Huberman M. and Jaffe M. J. (1986) Thigmotropism in organs of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany* 57, 133-137.
- 六、 Jaffe M. J., Leopold A. C., Staples R. C. (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *American journal of botany.* 89(3), 375-382.
- 七、 Millet, B., Melin, D. and Badot, P. M. 1988. Circumnutation in *Phaseolus vulgaris*. I. Growth, osmotic potential and cell ultrastructure in the free-moving part of the shoot.- *Physiol. Plnt.* 72: 133-138
- 八、 Perrineau F, Wimalasekera R, Effendi Y, Scherer GF. (2016) Inhibition of auxin transport and auxin signaling and treatment with far red light induces root coiling in the phospholipase-A mutant *ppla-I-1*. Significance for surface penetration? *J Plant Physiol.* Jun 1;196-197:53-9. doi: 10.1016
- 九、 Scorza L.C, Dornelas M.C. (2015) Exploring the role of auxin in the androgynophore movement in *Passiflora*. *Genet Mol Biol.* Jul-Sep;38(3):301-7. doi: 10.1590/S1415-475738320140377.

## 【評語】 030302

1. 本科展研究作品的主旨在於探討川七植物的莖對攀附物體生長速率的影響，莖內 IAA 生長激素與向觸性的關係機制，研究主題是很有趣的。生活史的觀察與探討主題無直接關聯，屬填充資料。而莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度比較資料與文獻已知內容雷同，屬 me-too study。
2. 實驗設計以尖端物理儀器設備探討分子層次的研究方法，可惜似乎已超乎一般國中生作者的程度。川七萃取物與 IAA 標準品的繞射光譜差異很大(圖 25)，顯示比較基準不確切；莖部接觸面與非接觸面樣品的拉曼光譜(圖 33b)是否真有差異，值得商榷，結論因此顯得過度推論了。
3. 另外，植物學無「上皮細胞」的用詞(p.10, fig.16)，應改為表皮細胞。p.25 的 4.圖 34b 應改為 33b。
4. 所採用的實驗設計及方法雖大致合理可行，但是如何確認經 HPLC 純化後的樣品確實是 IAA，所提供之圖譜顯示，其與市售標準品有很大的差異；此外，純度又是如何。若是純化的 IAA 不純，將會影響後續分析結果的解讀。此外，建議可進行 IAA 的 ELISA 或免疫組織化學染色實驗，以評估並驗

證 IAA 的量及活性。需留意部分圖片說明與圖不一致的情形。

5. 建議研究結果中，川七 IAA 粉末純化步驟的部分(第 16-18 頁)宜移至研究方法中陳述。
6. 關於莖內環境對 IAA 分子構造改變及分布上，可以做微觀的觀察研究，結合形態、生理、分子技術的研究會使研究更加完整。
7. 調查川七在台北市文山區樟山寺步道之物候期，資料很齊全，氣溫及雨量資料將可分析川七的生長週期。
8. 研究的結論與 Mordecai (2002) *American Journal of Botany*. 89: 375-38. 的較新見解(單側的生長抑制)不同。
9. 對作品內容尚稱清楚，表達亦有條理。

## 作品海報

# 摘要

川七中文名稱為洋洛葵，學名Anrederacordifolia，洛葵科(Basellaceae)洋洛葵屬之多年生藤本植物。本研究重點為攀附物體對川七生長速率的影響以及向觸性的形成機制探討。攀附物體前川七莖生長速度較緩慢且莖有日趨木質化的現象，攀附物體之後主莖生長速率是攀附前的7.1倍。本實驗以X光繞射、吸收光譜、表面增益拉曼射線，以及顯微照相的技術進行實驗，結果顯示，IAA於川七莖部的分布並不平均，捲曲莖接觸面的IAA含量高於非接觸面IAA含量。由於植物生長素IAA在植物體內只有奈克(ng)的量且萃取不易，因此在向觸性與IAA關係研究方面，一直是未解之謎。本研究開啟了向觸性研究的新契機，也成功以物理的方法證實了IAA濃度在川七莖接觸面與非接觸面確實有分布、量及結構上的差異。

## 研究方法、結果與討論

### 一、生活史的觀察

(一)觀察川七完成生活史各階段至開花所需時間和野生川七物候期紀錄及植物型態觀察

(二)台北市文山區樟山寺步道川七之物候期、川七型態觀察

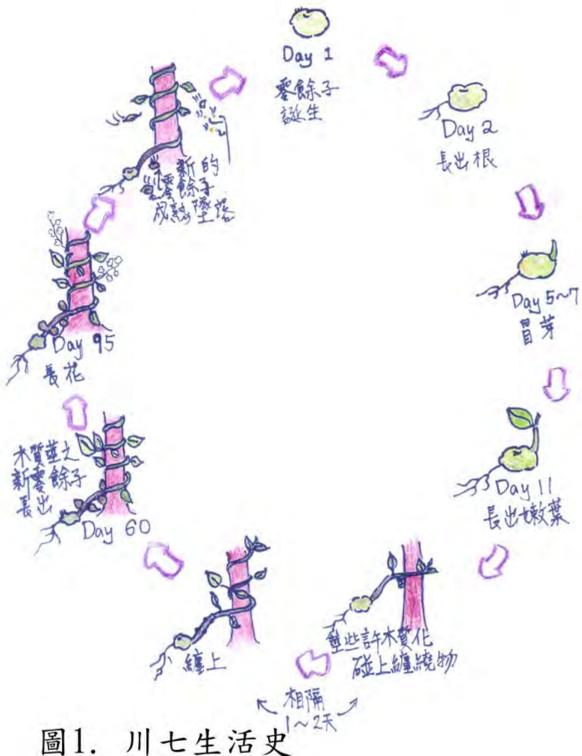
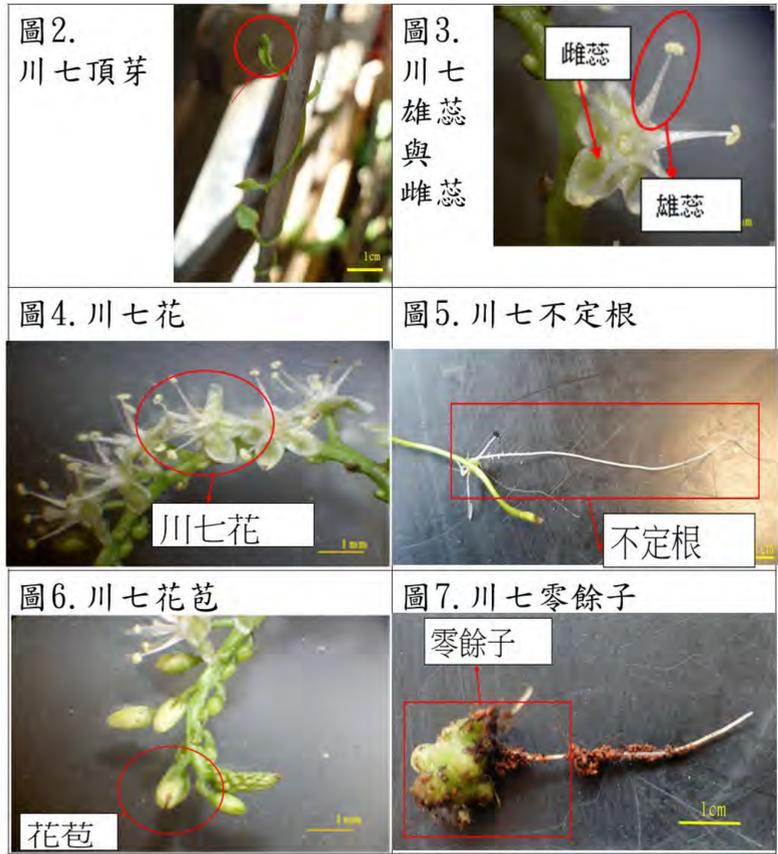


圖1. 川七生活史



### 二、向觸性的研究--川七莖部的生長及解剖型態比較

(一) 川七捲曲莖表皮細胞生長測量

(二) 川七平直莖與捲曲莖的生長速率比較

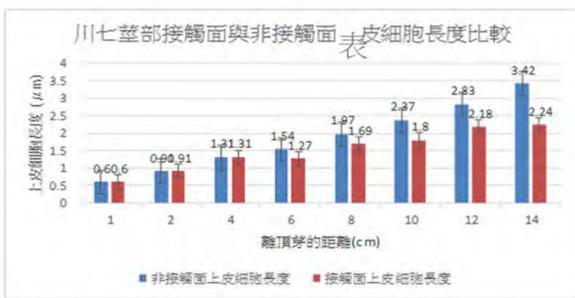


圖8. 川七莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度比較圖。

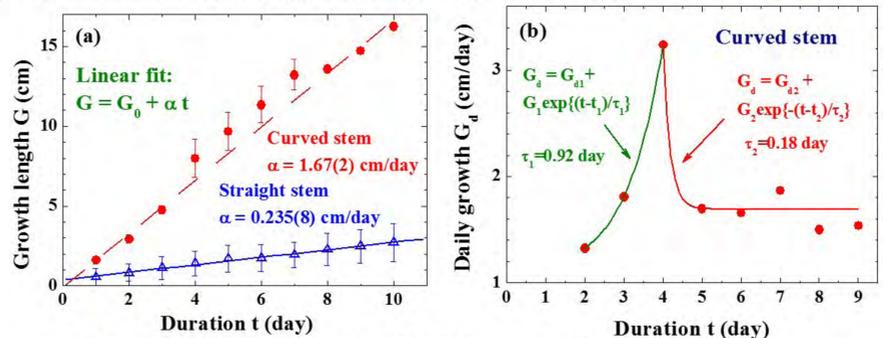


圖9. (a)川七平直莖與捲曲莖的生長率比較。(b)川七捲曲莖的日生長率圖。

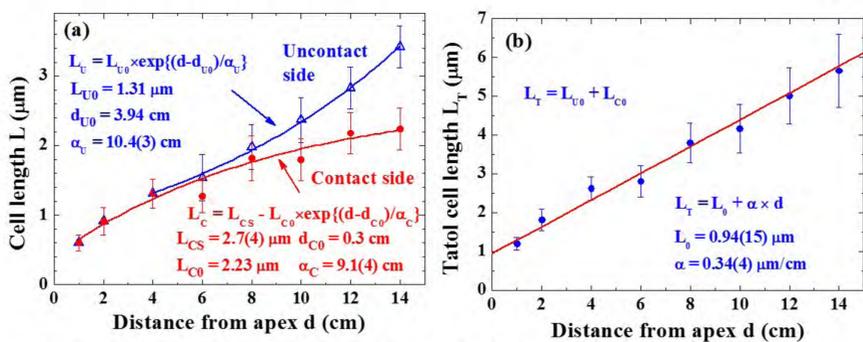


圖10. (a)川七莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度的定量分析圖。(b)接觸面表皮細胞長度與非接觸面表皮細胞長度和隨離頂芽距離變化關係圖。

(三) 平直的莖、捲曲的莖解剖型態比較

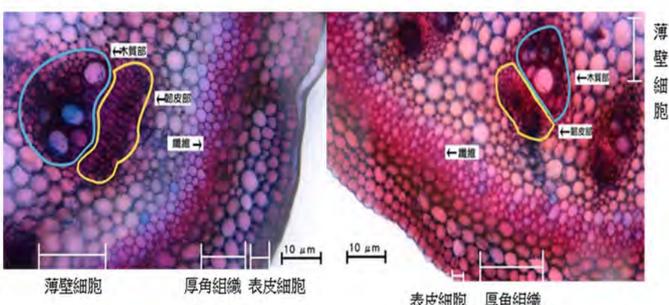


圖11. 川七莖部橫切圖

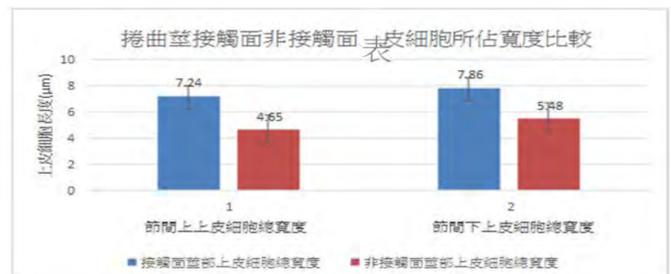


圖12. 捲曲莖接觸面與非接觸面表皮細胞所佔寬度比較圖

### 三、向觸性的研究 - 植物生長素 (IAA) 於捲曲莖部的研究

(一) 植物生長素IAA的分子結構

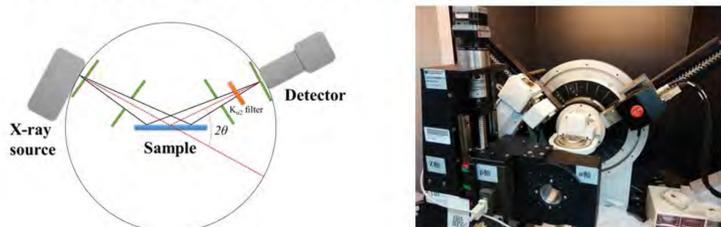


圖13. 左圖顯示X光繞射實驗反射式架設示意圖。右圖為X光繞射實驗儀器圖。

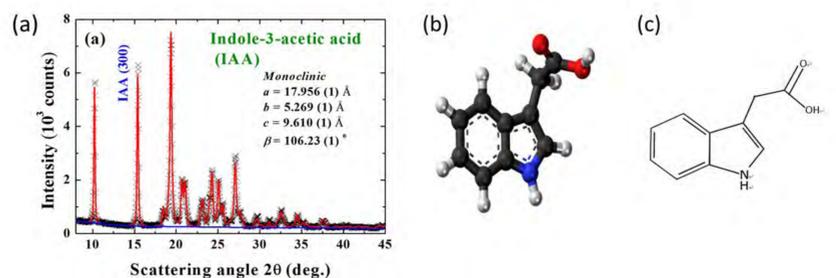


圖14. (a)購買IAA粉末標準品的X光繞射譜圖。(b)及(c)為組成IAA的基本單位結構。

(三)以X光繞射偵測川七頂芽、接觸面及非接觸面IAA分子成分分析

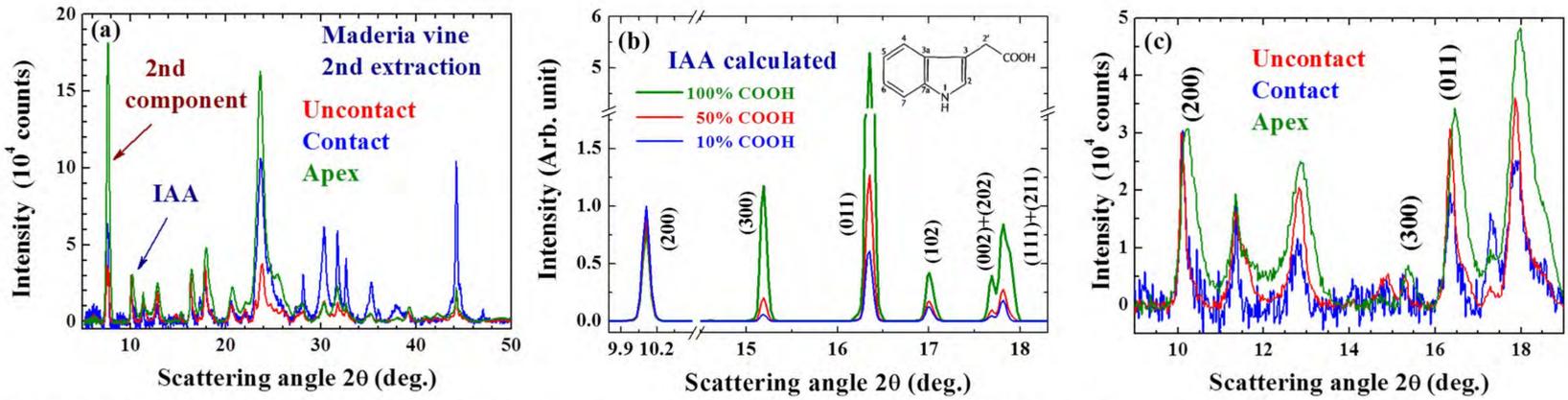


圖15 (a)粹取自川七頂芽(綠線)、接觸面(藍線)、非接觸面(紅線)IAA的X光繞射譜圖。

(b)以IAA中不同COOH鏈含量，計算所得的X光繞射譜圖。顯示(300)及(011)峰的強度，反應出IAA中COOH的含量。

(c)為(a)的X光繞射低角度放大圖。顯示川七3部位粹取的IAA，除繞射峰的強度相異外，頂芽的繞射峰明顯較寬。

- 接觸面、非接觸面、頂芽萃取物中，除IAA外(以位於10.1°及11.3°的峰為代表)，還有另一分量(以位於7.5°的峰為代表)。
- 非接觸面(紅線)的(300)、(011)強度明顯比接觸面(藍線)者強，顯示接觸面的IAA中較多COOH鏈缺陷。
- 頂芽(綠線)的(300)、(011)強度與非接觸面(紅線)相近。
- 圖15(b)計算只有一部分IAA有COOH鏈時，在X光繞射譜圖顯現出的表徵效應。
- COOH鏈越少，使得(300)、(011)、(012)繞射峰強度越弱。
- 比較(200)、(300)、(011)繞射峰的相對強度，可以用來計算IAA中COOH鏈缺陷的百分比。
- 依照IAA X光繞射峰強度(200)、(300)、(011)計算，頂芽的IAA分子中，60%含有COOH，向下往非接觸面輸送時，剩下40% IAA分子有COOH；而往接觸面輸送時，剩下30% IAA分子有COOH。顯示由頂芽向下不論是往接觸面或往非接觸面輸送時，皆有部分IAA的COOH會丟失，而接觸面丟失的比例較大。
- 頂芽的繞射峰明顯比非接觸面或接觸面者寬，顯示頂芽的IAA向下輸送時會串成整齊排列的IAA數目比較少。
- IAA的COOH鏈容易脫落，且失去COOH的IAA變成無活性的形式。

IAA size	(200)	(011)	(002)
Uncontact	29 nm	24 nm	17 nm
Contact	28 nm	19 nm	10 nm
Apex	10 nm	10 nm	8 nm

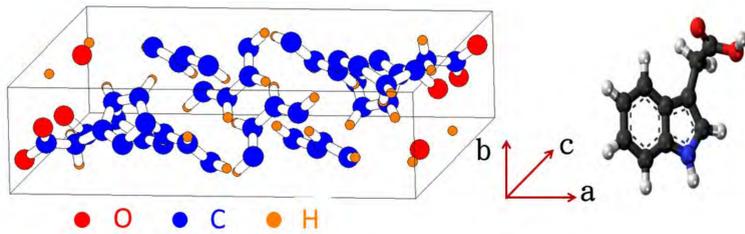


圖16. 川七頂芽、接觸面、非接觸面沿晶體結構三軸向的串接長度。

- IAA沿晶體軸向的大小，(200)為沿a軸方向，(002)是沿c軸方向，(011)是沿b-c軸方向。
- 表上的數值為以斯瑞爾公式依據X光繞射峰半高寬計算所得。IAA個數就是用表上數值除以各軸向的晶格常數所得。  
IAA晶格常數：a = 1.795 nm, b = 0.527 nm; c = 0.961 nm  
頂芽的IAA：(5×19×8) = 760 個串一起  
接觸面的IAA：(15×36×10) = 5,400 個串一起  
非接觸面的IAA：(16×45×18) = 12,960 個串一起。
- 非接觸面IAA的整齊串接個數為接觸面IAA的12960/5400 = 2.4倍。

川七頂芽滋生的IAA僅60%具有活性接有COOH鏈，向下輸送IAA：(1)到非接觸面時，約12960個IAA週期性串接在一起，但IAA僅剩40%接有COOH鏈；(2)到接觸面時，約5400個IAA週期性串接在一起，但IAA僅剩30%接有COOH鏈。接有COOH的IAA為有活性的IAA，也就是說，非接觸面有活性的IAA比例比接觸面高。

(四)以紫外區吸收光譜探討川七捲曲莖接觸面及非接觸面的IAA

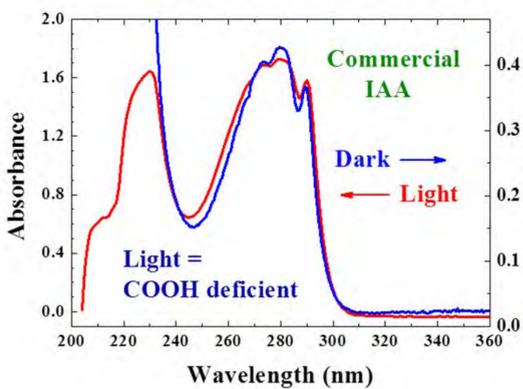


圖17. 市售IAA無照光(藍色)及照光(紅色)的吸收光譜。

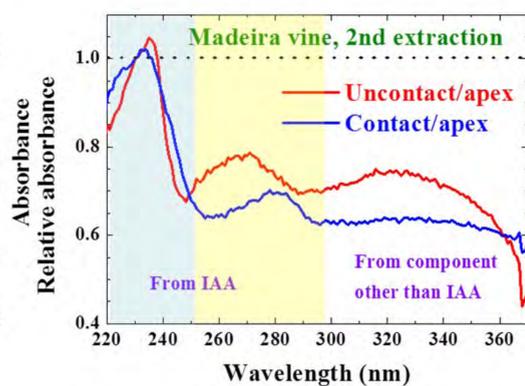
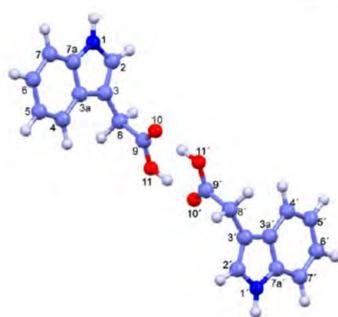
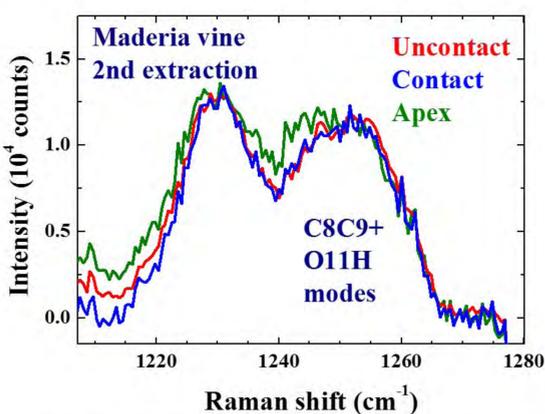


圖18. 粹取IAA非接觸面(紅色)及接觸面(藍色)相對於頂芽的吸收光譜。

- IAA照光後，吸收光譜在230 nm出現吸收峰。
- 接觸面及非接觸面相對於頂芽的吸收光譜，在230 nm處均出現吸收峰(圖中藍色區域)，顯示IAA從頂芽輸送到接觸面及非接觸面，具活性的IAA量均減少。
- 250至300 nm區域為IAA的吸收範圍(圖中黃色區域)，此區域內非接觸面的吸收明顯比接觸面的吸收高出許多，顯示非接觸面的IAA總量比接觸面的多。
- 高於300 nm區域的吸收，來自第二分量。

(五)以拉曼散射偵測川七頂芽、接觸面及非接觸面IAA中COOH的振動模式



- 此圖為以785 nm雷射光為激發光源的IAA粹取拉曼譜圖。
- 1250 cm<sup>-1</sup>拉曼峰是來自於COOH中的C(標示為C9)與相鄰的C(標示為C8)間振動的頻率。[註3]
- 於左圖中，頂芽的1250 cm<sup>-1</sup>拉曼峰明顯較接觸面與非接觸面寬，顯示頂芽的IAA串接的數目較少，分子振動容易被阻斷，影響振動頻率，而非集中於某個頻率。

圖19. 左圖為粹取IAA的部份拉曼譜圖，右圖為組成IAA的分子單元中各原子，我們所採用的標示符號。

#### (四) IAA的拉曼光譜(Raman spectrum)

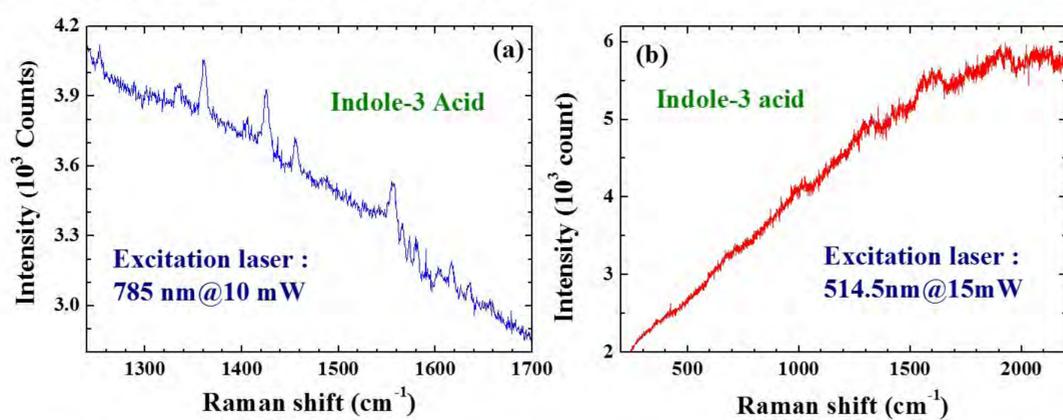


圖20. 購買IAA粉末以(a)785 nm及(b)514.5 nm雷射作為激發光源的拉曼譜圖。圖(a)清楚顯示出8條IAA的拉曼譜線。圖(b)中514.5 nm雷射光所激發出的拉曼譜線，幾乎埋沒在同時激發出的螢光譜圖裡。IAA的拉曼光譜量測應採用紅外光為激發光源。

#### (五) 用於激發表面電漿共振(Surface plasma resonance, SPR)的奈米金微粒



圖21. 用以產生表面電漿共振，附著在玻片上的金奈米微粒。金奈米微粒係以熱蒸鍍法直接蒸鍍在玻片上。

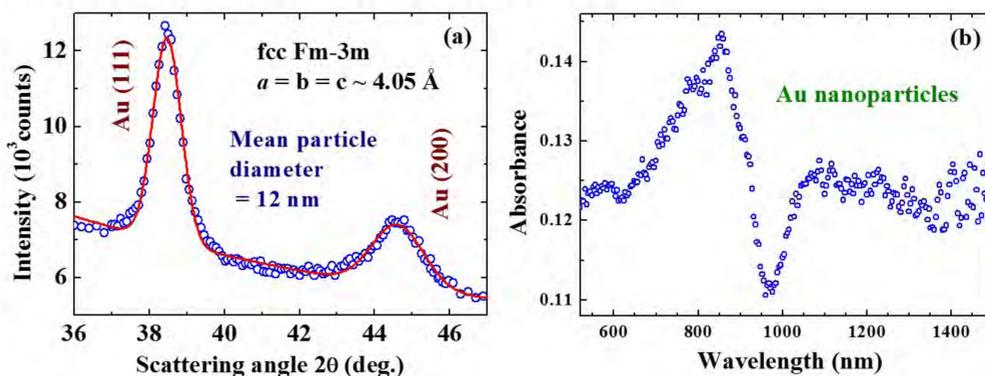


圖22. 附著在玻片上的金奈米微粒的(a)X光繞射譜圖及(b)吸收光譜圖。由圖(a)中X光繞射線的峰寬，計算出金微粒平均直徑為12 nm。圖(b)顯示該12nm金微粒的吸收峰出現在850nm。

#### (六) 以表面增益拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering, SERS)測川七捲曲莖接觸面及非接觸面的生長素IAA濃度是否有不同

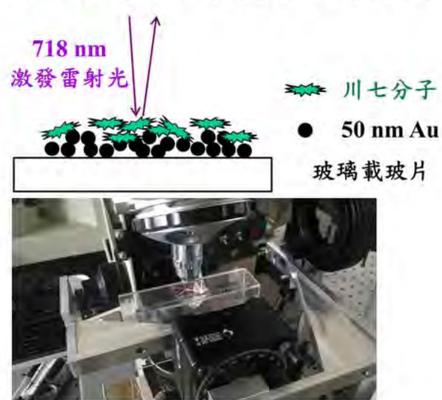


圖23. 上圖為表面增益拉曼散射(SERS)的實驗架設示意圖，顯示以718 nm雷射光激發川七的拉曼光譜，再藉50奈米金顆粒的表面電漿波放大訊號。下圖為SERS實驗的儀器裝置。

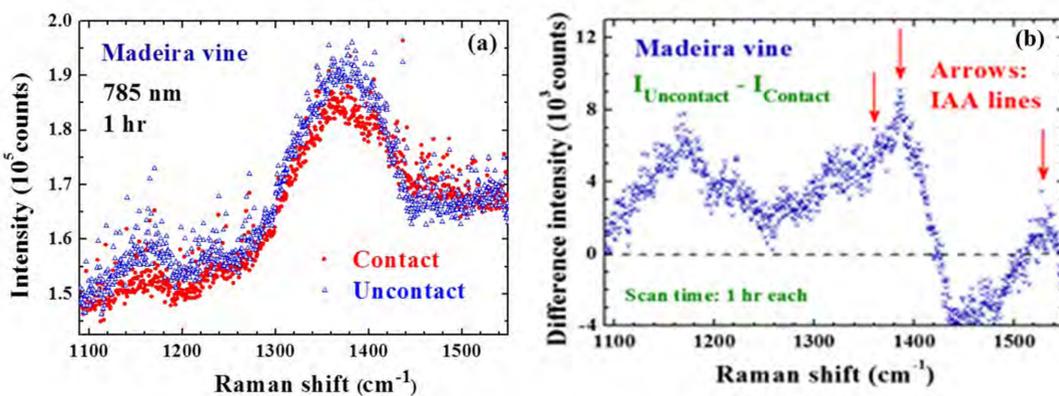


圖24. (a)以高拉曼位移區域(>1500  $\text{cm}^{-1}$ )作為訊號修正化(normalization)的對準區，將川七捲曲莖非接觸面的拉曼譜圖減去川七捲曲莖接觸面的拉曼譜圖，即可顯現出非接觸面與接觸面拉曼訊號的差異。(b)紅色箭頭指出IAA的特徵拉曼峰的位置，顯示非接觸面IAA的訊號，明顯較接觸面者強許多，該結果指出川七捲曲莖非接觸面中IAA的含量比接觸面者高。

#### (七) 具活性IAA於頂芽、接觸面與非接觸面作用示意圖

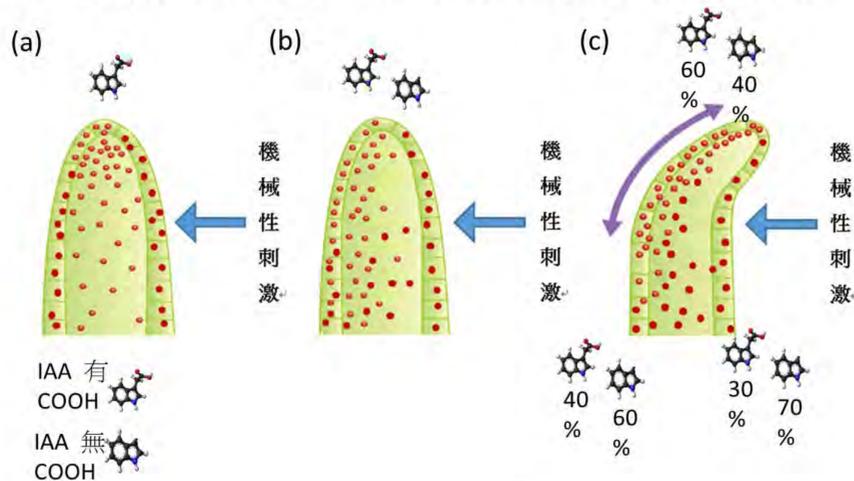


圖25. (a)含有頂芽的嫩莖受到碰觸物體機械性刺激。(b)接觸面的機械性刺激，使IAA往非接觸面的運輸量較高，而往接觸面運輸較少，因此非接觸面的IAA含量相對較高。在運輸過程中IAA的COOH會丟失，成為非活化的IAA型態，且接觸面IAA的COOH丟失比例較高。(c)較高濃度且為活化狀態的IAA才能使胞壁擴張酶基因活化，促進非接觸面細胞伸長較多，因此朝向接觸物體彎曲，一步步攀爬上物體。

## 結論

- 一、接觸物體會刺激川七莖的生長，捲曲莖的生長率為平直莖生長率的7.1倍。
- 二、接觸的機械刺激使IAA在接觸面與非接觸面分布不均，非接觸面表皮細胞增長較快，在離頂芽12 cm處，接觸面的生長速率僅是非接觸面的40%。但IAA總量並未改變，IAA使川七捲曲莖接觸面與非接觸面的總生長量呈線性增長[圖10(b)]。
- 三、X光繞射及吸收光譜結果顯示，川七捲曲莖非接觸面IAA的含量高於接觸面IAA的含量，且非接觸面的IAA中具活性的IAA分子(含有COOH)比接觸面者高約10%。
- 四、IAA的濃度不同除了造成川七捲曲莖非接觸面與接觸面的生長差異，也使細胞裡的微環境改變，例如使某種酵素含量(胞壁擴張酶)增多，以合成更多細胞伸長所需的物質等。
- 五、表面增益拉曼散射(SERS)的結果顯示，川七捲曲莖非接觸面IAA的含量高於接觸面IAA的含量。

## 參考文獻

1. Perrineau F, Wimalasekera R, Effendi Y, Scherer GF. (2016) Inhibition of auxin transport and auxin signaling and treatment with far red light induces root coiling in the phospholipase-A mutant ppla-I-1. Significance for surface penetration? J Plant Physiol. Jun 1;196-197:53-9. doi: 10.1016
2. Scorza LC, Dornelas MC. (2015) Exploring the role of auxin in the androgynophore movement in Passiflora. Genet Mol Biol. Jul-Sep;38(3):301-7. doi: 10.1590/S1415-475738320140377.
3. Rosana Maria Lobayan & Maria Celia Pérez Schmit & Ilicia H. Jubert & Arturo Vitale Model (2011) J Mol 17:1381-1392