

2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060005

參展科別 植物學

作品名稱 利用多元實驗技術從川七莖體生長素的分子結構及成分探討碰觸引發的非對稱性生長

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學(附設國中)

指導教師 馬瑪宣

作者姓名 勞志毅、陳倪甄

關鍵詞 川七(Madeira Vine)、

有活性的生長素(Active Auxin)、

非對稱性生長(Asymmetrical Growth)

作者簡介



我是陳倪甄，目前就讀國中三年級，平常喜歡畫畫、游泳、聽音樂。對於植物本來沒有太大的興趣，但是經過這次科展才發現原來連小如向觸性的現象都能研究出一門學問！做科展已經兩年了，很榮幸這次能夠參加國際科展，不只是大幅提升自己的實力，更有機會能讓我們長時間的努力換來美麗的成果。必須感謝一路上協助我們、指導我們的所有的人，真的辛苦了！



我是勞志毅，目前就讀高中二年級。在國中時開始對生物有興趣，並開始參加了生物的培育計畫和大學先修。雖然做實驗很累人，常常一做就要花掉一個禮拜，通時還要兼顧學校的課業，但是我還是很喜歡做實驗時的感覺。我從實驗裡學到許多，包括做任何事應該要有的態度以及謹慎。我希望運用這次參加國際科展的機會來報告我們的研究，並且向更多人學習。

摘要

本研究以X光繞射、吸收光譜、拉曼散射、光學顯微影像、氣相層析質譜儀、高效液相層析儀等跨領域多元實驗技術，探討川七生長素由頂芽向植物體輸送過程中生長素活性變化的行為，以及向觸性(thigmotropism)對生長素分子組態的影響。Indole-3-acetic acid (IAA)是植物生長素中最主要，而且是自然生長中含量最豐富的分子。不論是由川七莖萃取的IAA粉末或活體川七莖的實驗結果，我們發現：(1)川七捲曲莖中活性IAA分子在非接觸面的含量明顯高於接觸面者約10%之多；(2)IAA分子在莖部運輸時發生串接成整齊排列的現象，非接觸面IAA的整齊串接個數為接觸面IAA的2.4倍之多；(3)活性IAA由頂芽運輸到捲曲徑非接觸面時僅剩2/3具有活性，而運輸到接觸面時則僅剩1/2具有活性。另外，我們的研究結果也證實了川七的無性繁殖構造-零餘子，其粉末有顯著的抑菌效果。

Abstract

In this research, we used X-ray diffraction, Absorption spectrum, Raman Scattering, photomicrography, gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to examine how auxin activity of Madeira Vine altered plant growth while auxin is transported down from the apex. Also, we discussed the effect of thigmotropism on auxin molecular configuration. Indole-3-acetic acid (IAA) is the major and the most abundant, natural occurring plant hormone in the auxin family. In both data from Madeira Vine's extracted IAA and living Madeira Vine stem, we discovered that: (1) Madeira vine's active IAA concentration is 10 % higher on the noncontact side than the contact side; (2) IAA molecule will be arranged orderly when IAA molecule is transported down from the stem, where noncontact side have 2.4 times more unit cells arranged orderly than the contact side; (3) when active IAA is transmitted down from apex to the curled stem, only 2/3 of the IAA is active in the noncontact side; and when IAA is transmitted down to the contact side, only 1/2 remains active. In addition, our research result also investigated that the powder of Madeira Vine's asexual reproductive organ, aerial tubers, have significant antibacterial effect.

一、前言

(一)、研究背景

1. 向觸性

藤蔓植物由頂芽向植物體輸送生長素以刺激生長，生長素在細胞間運送管道及其在分子層面的組成變化，至今尚待釐清。向觸性 (thigmotropism) 是植物向性 (tropism) 的一種，植物在接觸外物或受外來機械刺激時，感觸此刺激的一連串訊息傳導及訊號放大，導致接觸面與非接觸面會表現出生長速率的差異，而攀附上所接觸之外物，此種現象稱為向觸性 (C. Alex *et al.*, 2005)。在有關向觸性的基因研究方面，1990年Bramm and Davis進行阿拉伯芥對於機械性刺激所產生相關反應的分子檢測，他們發現四個與向觸性相關的基因，並命名為 *TOUCH* (TCH) family。其中 *TCH1* 為製造鈣調節素的基因 (calmodulin, CaM)；*TCH2* 及 *TCH3* 為產生類似於鈣調節素的基因 (calmodulin-like genes) (Sistrunk *et al.*, 1994)。研究數據顯示 *TCH3* 會與 PINOID (PID) 結合，PID 是一種蛋白質激酶，與生長素的訊息傳導相關。與 *TCH1*、*TCH2*、*TCH3* 不同，*TCH4* 是產生木葡聚糖基轉移酵素 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) (XTH) 的基因，在接受機械性刺激後的30分鐘就會開始表現，1~3小時之後表現量就迅速下降 (Braam and Davis 1990)。但是這四個向觸性相關基因的功能，仍然有待更進一步的研究。目前向觸性的形成機制仍不明朗，相對於向光性與向地性，向觸性相關的研究報告少許多。一般認為，向觸性會引起生長素在接觸面與非接觸面的分布不均，在接觸面施加外來的 IAA 或 IAA 抑制劑 NPA，皆會引起非對稱性生長 (asymmetrical growth)，使得植物朝向受刺激方向彎曲 (Scorza and Dornelas, 2015)。

2. 川七

俗稱川七(圖1)的中文名稱為洋洛葵，學名 *Anredera cordifolia*，屬洛葵科 (Basellaceae) 洋洛葵屬之多年生常綠藤本植物，莖攀附力強，生長迅速且適應環境能力佳。分布在南美熱帶地區以及中國的雲南、福建、浙江、四川等地，目前已由人工引種在台灣普遍栽培。一般利用其長於莖上的膨大構造「零餘子」(圖2)，或扦插等無性繁殖方式繁殖。川七零餘子，好像是多餘的「種子」或多餘的「孩子」，但其實零餘子是長在植物的葉腋處的無

性繁殖構造，吸水力強，如果澆水頻繁則會加速零餘子膨大。此外，川七葉片可以當作一般的青菜烹調，選擇葉片較大的營養價值較高，營養成分以維生素 A 含量較高。川七的藥用方面研究有以其根莖（rhizome）或零餘子萃取出來的一種蛋白質-Ancordin，有抑制胰蛋白酶的作用，以及刺激一氧化氮的生成（Mao-Te Chuang *et al.*, 2007）；川七的零餘子曬乾之後的粉末，具有抗菌的功效，並且經由猴子腎臟的臨床測試，毒性相對比其他的藥用植物低（Tshikalange *et al.*, 2005）。



圖 1. 川七植株攀附上物體。 圖 2. 川七的無性繁殖構造-零餘子。

（二）、研究動機

生物課堂上老師介紹了植物的向性，有向光性（phototropism）、向地性（gravitropism）、及向觸性（thigmotropism）。其中向光性與向地性的行為及機制，有較仔細地說明，但又說教科書上對於向觸性形成機制及生長素（例如 IAA）濃度關係的解釋依然不明，不同版本參考書卻有不同的說法。一查文獻報告，發現自從達爾文於 1881 年發現植物的向性以來，向觸性的形成機制仍然欠缺確切的實驗數據佐證，一直是未解之謎，即使是 IAA 的運輸方式與管道，也只是推測。IAA 分子在植物體內的濃度極低，活體內的 IAA 夾雜在大量的其他物質內，更是難以測量。我們想找到一個具有高度靈敏，再配合特殊實驗設置，尋找向觸性對生長素在植物體內刺激生長的主控機制。本研究結合跨領域的實驗技術，設計實驗，藉由分開測量川七莖頂、捲曲莖接觸面、捲曲莖非接觸面、平直莖的 IAA 分子結構與濃度，來探索 IAA 由莖頂輸送到捲曲莖（受向觸性影響）或平直莖（未受向觸性影響），過程中 IAA 分子活性與濃度的改變。

(三)、研究方法

1. 觀察、比較川七捲曲莖與平直莖的生長情形，找出最適合的IAA取樣位置。
2. 選定川七莖體的四個部位為取樣點
 - (1) 頂芽（稱為頂芽）：從莖頂點部位以下 1 cm
 - (2) 捲曲莖接觸面（稱為接觸面）：從接觸點開始往下算有碰觸物體的部位 3 cm
 - (3) 捲曲莖非接觸面（稱為非接觸面）：從接觸點開始往下算無碰觸物體的部位 3 cm
 - (4) 未曾捲曲川七的平直莖（稱為平直莖）：從頂部至根皆未纏繞物體
3. 觀察向觸性對川七莖部細胞生長的影響，推測IAA於莖部的作用位置。
4. 染色觀察川七莖部的解剖型態，結合X光繞射（X-ray diffraction, XRD）及吸收光譜（absorption spectroscopy）實驗，推測IAA的運輸路徑，以及輸送中IAA分子活性的改變。
5. 以生化實驗技術常用的高效液相層析法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）、氣相層析質譜分析儀（Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer, GC-MS）、吸收光譜，量測川七莖體中4個選定部位的IAA濃度及含量。
6. 結合X光繞射、拉曼散射（Raman scattering, RS）、表面增益拉曼散射（surface enhanced Raman scattering, SERS），探討IAA於川七莖體中4個選定部位的分子結構的差異及濃度。

(四)、實驗技術原理

1. 以 X 光繞射（X-ray diffraction）解析 IAA 分子結構

Indole-3-acetic acid（IAA）是植物生長素裡最常見且含量最多的一種天然的植物賀爾蒙，負責植物細胞的生長以及伸長。IAA由多數組分子式為 $C_{10}H_9NO_2$ 的原子方塊所組成。 $C_{10}H_9NO_2$ 中各原子（10個C、9個H、1個N、2個O）以特定的方式鍵結排列，組合成一種雜環化合物，其原子排列情形示於圖3。IAA則由兩兩（ $C_{10}H_9NO_2$ ）原子方塊以面對面方式結合而成，其原子排列情形示於圖4。這些 $C_{10}H_9NO_2$ 原子群，雖然很複雜，但以特定的方式重複排列，會建構出許多等距離的原子層面（稱為晶格面，lattice plane）。當X光入射到這些等距離的原子層面，會發生干涉，並改變前進方向，X光轉彎的角度與原子層面間的距離

有關(圖5)。原子排列的情形，可以透過 X 光繞射，運用布勒格定律(Bragg law) $\lambda = 2d \cdot \sin\theta$ 來解析，其中 λ 為入射 X 光波長， d 為原子間距， θ 為半散射角。透過獲得這些原子間距的資訊，就能反推出原子排列的情形，稱為晶體結構 (crystalline structure)。

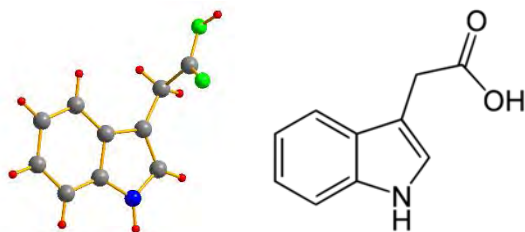


圖 3. 組成 IAA 的 $C_{10}H_9NO_2$ 原子方塊中原子的排列情形。圖中銀色代表 C 離子、紅色代表 H 離子、藍色代表 N 離子、綠色代表 O 離子。

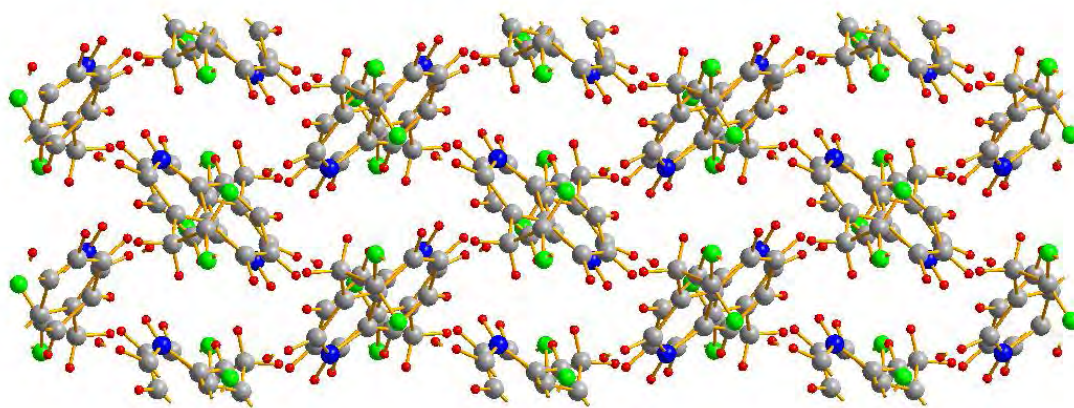


圖 4. IAA 的原子排列情形，是由多組 $C_{10}H_9NO_2$ 面對面組合而成。

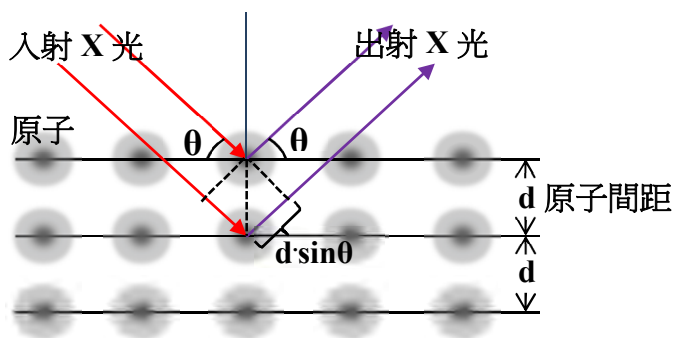


圖 5. 入射 X 光被原子層繞射示意圖。

由圖 3 及圖 4 觀察 IAA 的原子結構，可以看出其中 COOH 的鍵結相對較弱，比較容易脫離。原本呈白色的粉末狀 IAA，照射紫外光就會轉變成黃色，其中就是 COOH 已經脫離。已知 IAA 運用許多不同結構形式存在於植物體內，而不同結構的 IAA 就會有不同的

功效，其中具有 COOH 鍵的 IAA 是有活性的 IAA，而 COOH 脫離就會失去活性 (David A. Korasick et al., 2013)。生化量測技術常用的 GC-MS 以及酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，都只能測得沒有修飾過的 IAA 分子，而無法得知是否有結構上的差異。我們運用 X 光繞射技術來研究川七頂芽、接觸面、非接觸面、平直莖裡 IAA 的分子結構差異，以探究捲曲莖在攀附外物生長時，其 IAA 的分子是否會被外界的機械壓力所影響，並藉由量測川七各部位中 IAA 分子裡 COOH 的含量，來判定各部位中 IAA 分子的活性。植物體中 IAA 的含量相當少，需要特殊的實驗架設，才能觀測到 IAA 的訊號。

2. 以吸收光譜 (absorption spectrum) 解析 IAA 中 COOH 的含量

物質被光照射時，可以藉由吸收部分的光，使得電子從較低能態躍遷到較高能態，或是引發分子的振動和轉動。物質因結構或化學成分的差異，會表現在只吸收特定波長的光以及吸光效率上。吸收光譜是測量光通過物質後被吸收，使得光強度減弱的情形 (圖 9)，光的吸收量常用由比爾-朗伯定律 (Beer - Lambert law) 所定義的吸光度 (absorbance) A 來表示：

$$A \equiv -\log(I/I_0),$$

其中 I 與 I_0 分別為入射光與出射光的強度。每一種分子有其特有的化學成分與原子結構，會吸收不同波長的光，有其特有的吸收光譜，根據吸收峰的位置和強度，可以推知分子的結構與成分的信息。

3. 以拉曼散射 (Raman Scattering) 偵測萃取的 IAA 中 COOH 的振動能量

以光照射分子，分子可以吸收部分的光，引發分子振動。分子振動所需能量，與分子間鍵結的強度有關。鍵結較強，則分子振動的能量較高，鍵結較弱則能量較低。偵測分子振動的能量，就可以推知分子間鍵結的強度。光束入射到分子後，有一小部分的光子會與分子交換能量，其能量由光子能量轉換為分子振動或轉動能量，出射光會與入射光有一能量差，這種非彈性散射 (inelastic scattering) 稱為拉曼散射。拉曼散射實驗以單色雷射光入射物質，偵測光出射後能量的改變情形，解析分子的振動能量，但拉曼散射的強度常非常

微弱，不易偵測。拉曼峰的能量以 cm^{-1} 為單位，稱為拉曼位移，1 個拉曼位移（即 1 cm^{-1} ）單相當於 0.124 meV (毫電子伏特)的能量。

4. 以表面增益 (surface enhanced) 拉曼散射偵測川七莖體 IAA 中 COOH 的振動能量

我們嘗試直接偵測川七莖體內的 IAA，植物活體的 *in vivo* 研究可以直接觀測到 IAA 在川七莖體中的情形。但 IAA 在川七莖體的含量極少，無法直接偵測到拉曼訊號。上世紀 70 年代，Fleischmann 等人開始發展以激發銀薄膜表層上的表面電漿波 (surface plasmon wave) 與分子的拉曼訊號發生共振，來放大拉曼訊號，這技術稱為表面增益拉曼散射 (Surface-enhanced Raman Scattering, SERS)，實驗證實可以放大拉曼訊號數萬到數百萬倍，利於偵測微弱拉曼訊號 (M. C. Chen et al., Phys. Rev. B 51, 4507, 1995)。

表面電漿共振增益拉曼訊號的實驗技術，開啟了直接 *in vivo* 觀測川七莖體內 IAA 拉曼訊號的可行性。我們以激發金奈米顆粒 (nanoparticle) 的表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR)，來放大活體川七內極微量 IAA 的拉曼訊號。此方法若實驗證實可行，就可以跳過繁雜的生化萃取步驟，不依靠萃取，而以川七活體實驗，直接比對川七各部位裡 IAA 的濃度與活性。

二、研究過程及方法

(一)研究設備及器材

實驗生物材料	<p>野生川七：採集自文山區樟山寺步道</p> <p>野生川七零餘子：採集自文山區樟山寺步道</p> <p>P1 級大腸桿菌：K12 (貨號：NCTC10538)</p>
實驗器皿及耗材	<p>培養皿、小花盆、大花盆(64×24×18)、寶特瓶、燒杯(500ml)、鏢子、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 H₂O), 藍: 3% Alcian Blue in 3% Acetic Acid) IAA (購自 sigma), 酒精(95%、70%), MeOH(80%), 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% H₂O, pipetman, 氣密針, GC-MS 專用瓶, 接種環、培養基 TSA(REF292652, LOT6020798)、EMB(CMP0100821, LOT708230)、冷凝管、過濾瓶、橡皮管、蒸餾瓶、鐵架、量筒、酒精燈、溫度計、打火槍、Ampicilin 抗菌貼片(BBL231264)、針筒過濾器(小飛碟)(SAR16534K)</p>
實驗儀器	<p>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</p> <p>SpeedVac 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)、電磁攪拌加熱器(AC110V)</p>
軟體	<p>GSAS (用於擬合 X-Ray 繞射譜圖, 得出原子位置座標)</p> <p>Diamond (用於畫出原子結構圖)</p> <p>Origin (用於繪製及分析實驗數據圖)</p>

(二) 研究方法

1. 川七莖部的生長，解剖型態及接觸面、非接觸面細胞之酸鹼度比較

- (1) 紀錄 5 株川七捲曲莖的生長，從頂芽下方 5 mm 以無毒原子筆作一標記，每天早上 7:00、傍晚 5:00 各記錄一次頂芽的生長情形。
- (2) 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。
- (3) 步驟
 - (a) 取川七捲曲莖，先以白膠標示非接觸面。
 - (b) 從捲曲處開始往下算 3cm 在解剖顯微鏡下將莖縱切成四片，取第四片。
 - (c) 在複試顯微鏡下任意選取接觸面與非接觸面各 30 個近維管束壁細胞，做細胞長度測量，並做數據統計分析。
- (4) 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。
 - (a) 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。
 - (b) 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。
 - (c) 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。
- (5) 接觸面、非接觸面細胞之酸鹼度測量
 - (a) 取 10 株川七捲曲莖，從捲曲處開始往下算 3cm，對切成接觸面與非接觸面。
 - (b) 以研鉢搗碎，再加 1c.c.的ddH₂O用 pH meter 測其 pH 酸鹼值。
 - (c) 實驗重複三次。

2. 高效液相層析法萃取川七中 IAA

目的：直接搗碎川七莖溶解於酒精中物質很多，X光繞射訊號複雜，增加分析的困難度，我們以 HPLC 純化川七捲曲莖，提高樣本純度，減少雜訊。IAA 粉末萃取步驟如下：

(1) 處理、乾燥

- (a) 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 $133 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 以下。
- (b) 取出川七樣品，計算樣品數量後，放入已事先標記好的圓底離心瓶中秤取鮮重。將液態氮加入離心瓶中直至液面高於樣本以確保樣本完全降溫，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。
- (c) 加入液態氮後不得鎖緊離心瓶，有氣爆危險。
- (d) 冷凍乾燥瓶外需包錫箔紙避光。
- (e) 冷凍乾燥約兩天後下機，秤乾重，並將川七放入 -20°C 冰箱保存備用。

表1. HPLC 秤重資訊：C 為接觸面(contact side)，NC 為非接觸面(uncontact side)，A 為頂芽部分(apex)

代 號	瓶重 (g)	瓶+鮮 (g)	瓶+乾 (g)	鮮重 (g)	乾重 (g)
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

(2) 萃取

- (a) 事前準備：離心機需事先降溫至 $4\sim 9^{\circ}\text{C}$ ，且使用前離心管需對稱平衡。80% MeOH 需預先放入 -20°C 預冷。
- (b) 將川七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 $5\sim 10\text{ mL } -20^{\circ}\text{C } 80\% \text{ MeOH}$ 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。
- (c) 第一次離心： 18000 rpm 在 4°C 下離心 10min，將上清液(川七甲醇萃取液)倒入大試管(20x150mm)中，加入抗氧化劑及內標，吹氮氣。離心瓶再加入 $5\sim 10\text{ mL } -20^{\circ}\text{C } 80\%$

%MeOH，置入5°C 冰箱震盪萃取2hr。

- (d) 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，川七萃取液用氮氣吹乾到約剩1mL左右。我們把80%的MeOH完全吹乾，但是為了避免萃取液很難回溶，沒有把剩下的20%H₂O完全吹乾。

(3) 添加抗氧化劑及內標

- (a) 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，自然回溫。

表2. 抗氧化劑與內標添加量

抗氧化劑	BHT	20 μ L
	Ascorbic Acid	100 μ L
內標	IAA	100 ng
註：內標添加時使用電子 pipetman，且至少需要一人在旁確認		

(4) Partition

- (a) 事前準備：pH meter 使用前先校正。0.5M pH2.0 K-Pi buffer 自 4°C 冰箱取出回溫。
- (b) 20x150mm 大試管中的川七萃取液加入約 14mL 0.05M pH8.5 K-Pi buffer，磁石攪拌至樣品完全溶解。
- (c) 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。
- (d) 調整萃取液 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)。
- (e) 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 隻試管(12x 75mm)中，用 SpeedVac 乾燥，共重複 3 次。

(5) 1st HPLC (column：RP-18e) 層析純化

- (a) 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。

(b) 樣品萃取液(5管)各用200 μ L 100%MeOH溶解，以1mL的塑膠針筒抽取濾過syringe filter (0.45 μ m)，重複3次後，用SpeedVac完全乾燥。

(c) 取60 μ L 0.1% HOAc -100% MeOH加入樣品tube中vortex待其溶解，再加入140 μ L 0.1% HOAc -100%H₂O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

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

(b) MeOH用SpeedVac乾燥。瓶中剩下來的粉末便是IAA。

(7) 甲基化

(a) 事前準備：甲基化前如樣品瓶有水氣，需先乾燥 2~5min。需在 Hood 內操作；使用前需先確定氮氣裝置安裝是否正確，氮氣是否充足。Diazomethane 請依照 Diazomethane 製作流程配置，使用前須先確定 Diazomethane 是否充足。Diazomethane 有毒性，務必戴手套及口罩。

(b) 將樣品 tube 依照 GAs 分類，每管用 60 μ L pure MeOH 清洗三次於 GC-MS 專用瓶 (IAA 用棕色瓶，其他用透明瓶)內，用 SpeedVac 將其完全乾燥。

(c) 甲基化：各加 30 μ L 100% MeOH 於玻璃瓶中，震盪溶解，加 1~1.5ml Diazomethane 後瓶蓋旋緊，輕拍搖晃。

(d) 靜置 1 分鐘以上。

(e) 樣本一滴一滴慢慢加入約 20 μ L HOAc(冰醋酸)，輕微搖晃瓶身(有些樣品激烈反應時會產氣，請小心)，待溶液澄清透明後即可用氮氣吹至乙醚完全揮發，剩下的 MeOH 可用 SpeedVac 乾燥。

(8) 矽化

- (a) 事前準備：GA₉、GA₁₅、GA₂₄、GA₁₂、GA_{12A}、IAA、ABA、PA、DPA 不須矽化，可暫存於-20°C 冰箱。矽化操作前，要將 sample 乾燥 30min，以確保矽化時沒有水分的存在。需在 Hood 內操作。BSTFA-1%TMCS 自 4°C 冰箱取出常溫靜置，防止水氣產生。全程戴手套及口罩。
- (b) 玻璃瓶內加入 50 μ L pyridine (吡啶)，vortex，再加入 100 μ L BSTFA-1%TMCS 輕輕 pipetting 混勻，瓶蓋旋緊，放入試管加熱器(設 93°C)中反應 30min，取出開蓋，用 EYELA SpeedVac 乾燥 30 min(取出時要注意，具有刺鼻味)。

(9) GC-MS

- (a) 加 10 μ L 吡啶於玻璃瓶內，震盪輕刮管壁將樣本洗出，移入小套管內、瓶蓋旋緊，使用 Autosample 抽取 1 μ L 打入 GC-MS。

3. 以 X 光繞射解析 IAA 分子結構

同一個分子，但鍵結的官能基有些不同，會反映在 X 光繞射峰強度上。比較繞射峰的相對強度，可以計算出分子中有多少比例的原子脫離分子或被其他官能基所取代。IAA 分子裡部分 COOH 脫離，會反映在 X 光繞射峰的強度上。量化檢視繞射峰的相對強度，可以提供分子中各原子的相對含量比，其相對比例提供週期性排列的分子中，是否有部分原子脫離的資訊。

我們以美國 Los Alamos 國家實驗室開發，用以計算繞射譜圖的 General Structure Analysis System (GSAS, A. C. Larson and R. B. Von Dreele, ANL Report, 1990, LA-UR-86-748) 程式來計算 IAA 的 X 光繞射譜圖。發現 COOH 脫離(圖 6)會明顯反映在標示為(102)、(200)、及(300)繞射峰的強度上。圖 6 右圖繪製以 IAA 中 COOH 含量為 100%、50%、及 10%計算所得的 X 光繞射譜圖，明顯看出因為 COOH 脫離對繞射峰強度的影響。我們藉由量測川七 4 個選定部位中，IAA 的 X 光繞射峰的相對強度，分別計算(300)及(102)繞射峰相對於(200)繞射峰的相對強度，就可以依據圖 6 所示曲線，來判斷各部位的 IAA 中 COOH 脫離的量，藉以判斷川七莖體各部位 IAA 分子的活性。

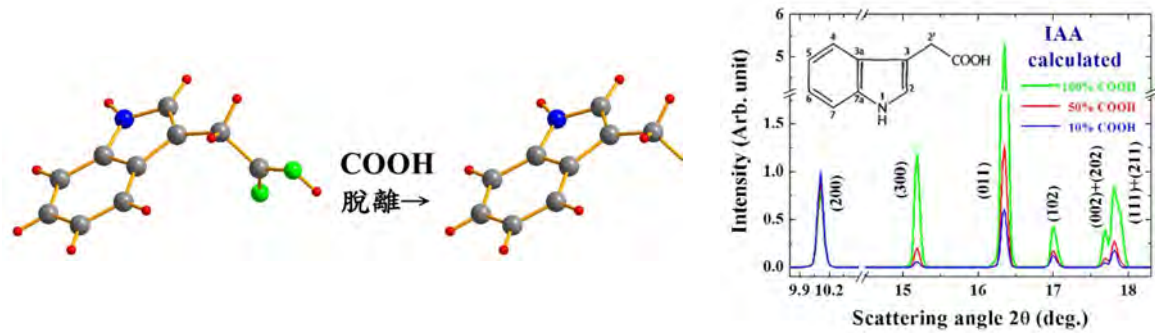


圖 6. 左圖為 COOH 自 IAA 主體結構脫離的示意圖。右圖為以 IAA 分子中不同 COOH 含量，以 GSAS 程式計算所得 X 光繞射譜圖。

X 光繞射實驗架設：本實驗量測 (1) 商購 IAA 粉末、(2) HPLC 萃取的 IAA 粉末、(3) 川七莖實體的 X 光繞射實驗，實驗在 Bruker D8-Advanced diffractometer 上進行，採用反射式架設，樣品必須放置在 X 光管-偵測器所組成的平面上，以準確決定散射角。

(1) 以 HPLC 萃取的 IAA 粉末 X 光繞射實驗 (圖 7)：萃取的粉末(約 1 毫克)集中放置在載台中央部位，實驗以 X 光的入射角與出射角為相等的架設進行，稱為 θ - θ scan，將 X 光集中在放置在載台中央部位的粉末樣品上。實驗進行時，先調整載台高度，使樣品確實放置在 X 光機的「光源-偵測器」平面上，X 光管及偵測器以相同的角度一齊移動，讀取散射角為 5 到 60 度的繞射譜圖。

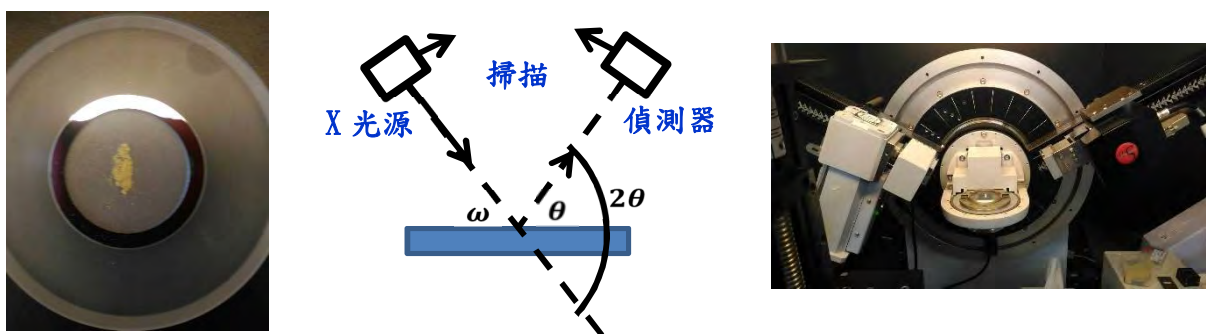


圖 7. 左圖為萃取的 IAA 粉末放置在 X 光機樣品載台上，進行實驗。中圖為以 X 光入射角與出射角相等的實驗架設示意圖。右圖為實驗量測的 Bruker X 光繞射儀。

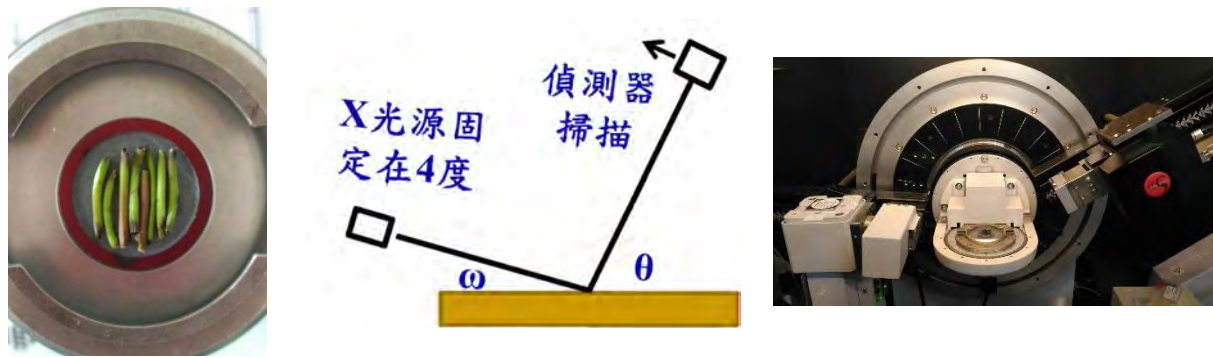


圖 8. 左圖為川七莖放置在 X 光機樣品載台上，進行實驗。中圖為以 X 光以掠角入射的實驗架設示意圖。右圖為實驗量測的 Bruker X 光繞射儀。

(2)川七莖實體 X 光繞射實驗(圖 8):繞射實驗也可以將 X 光的入射角固定在一小角度，稱為掠角入射，而移動偵測器的角度來改變散射角，稱為 ω - θ scan。進行川七莖實體的 X 光繞射實驗時，採用掠角入射，調整載台高度後，將 X 光入射角固定在 4 度，讓 X 光能夠投射到載台上較大的面積區域，來放置較多的樣本在載台上。實驗進行時，X 光管固定不動，只移動偵測器來改變散射角。IAA 在川七莖實體含量很少，實驗時必須盡量多放置樣品，平坦鋪滿載台，以較長的積分時間來累積較弱的 IAA 訊號，並先行計算出所選定繞射峰，例如(102)、(200)、及(300)繞射峰，出現的散射角位置，實驗只掃過選定的角度，集中實驗積分時間在較小區域，以利收集微弱的 IAA 訊號。

4. 以吸收光譜解析 IAA 中 COOH 的含量

本實驗使用 Jobin Yvon 公司生產之 TRIAX SERIES 190 吸收光譜儀，架設為穿透模式量測，其中光源可選擇鎢鹵燈（可見光區）和氬燈（紫外光區），三段光柵根據需求做選擇，可以涵蓋紅外光區到紫外光區。本實驗量測波長範圍 250 ~ 400 nm，偵測器為光電倍增管，加速電壓為 600 V（圖 9）。

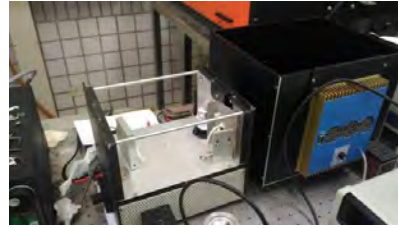
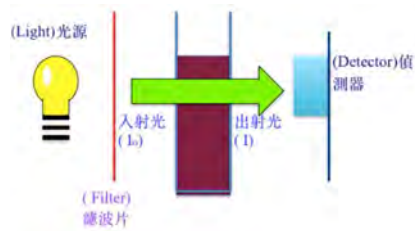


圖 9. 左圖為吸收光譜實驗量測示意圖。右圖為吸收光譜實驗所採用的 TRIAX SERIES 190 吸收光譜儀。

吸收光譜實驗架設：本實驗進行 (1) 商購 IAA 粉末及室溫曝光 1 個月的商購粉末、(2) HPLC 萃取的 IAA 粉末、(3) 川七莖實體擠碎後溶於酒精的吸收光譜。實驗採用穿透式架設，樣品容於酒精後，放置在內部空間厚度為 2 毫米的扁平石英容器。 I_0 ：光源穿透過無樣品酒精的強度； I ：光源穿透過樣品溶於酒精的強度。量測波長範圍為 200~400 nm，屬紫外光區。

(1) 粉末溶於酒精實驗：取 IAA 粉末適量溶於酒精，調配成質量濃度為 10 ppm 的溶液，置入內部空間厚度為 2 釐米的扁平石英容器，以穿透式架式量測 IAA 粉末的吸收光譜。我們發現在質量濃度為 10~30 ppm 範圍內，吸光度隨濃度增加呈線性增大 (圖 10)，顯示在 10~30 ppm 質量濃度範圍內，多重吸收 (multipole absorption) 並不明顯，吸光度足以代表。

(2) 川七莖實體擠碎後溶於酒精：(a) 將川七樣品 2 克，輕輕擠碎，融入 4 毫升 99% 酒精中，呈現黏稠狀，靜置於酒精中 5 小時 (圖 11)。(b) 取中段溶液數滴，置入扁平石英容器，測定樣品質量。(c) 以穿透式架式量測光穿透川七後，減弱的程度，量測吸收光譜。

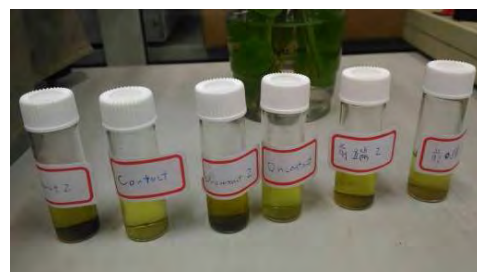
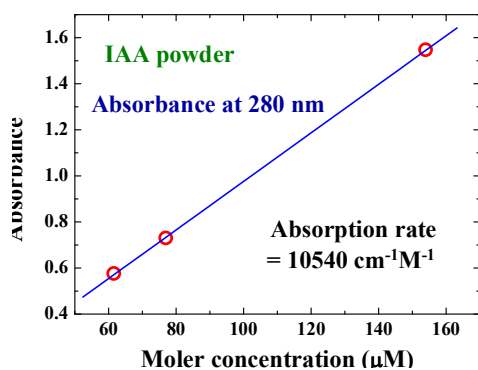


圖 10. 吸光度隨粉末質量濃度變化圖。

圖 11. 川七莖實體擠碎後置於酒精內靜置。

5. 以拉曼散射偵測萃取的 IAA 中 COOH 的振動能量

IAA 的拉曼訊號已經有詳細報導 (R. M. Lobayan et al., J Mol. Model 17, 1381, 2011), Lobayan 等人共找到了 54 個拉曼峰, 其中在 1250 cm^{-1} 的拉曼峰為 IAA 的 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ 原子方塊中 C-COOH 間的振動能量 (圖 12)。本研究主要探討向觸性對 IAA 分子活性的影響, 拉曼散射實驗就集中在偵測 1250 cm^{-1} 拉曼位移區域, 利用 CCD 一次讀取 1250 cm^{-1} 拉曼位移區域的訊號, 並以較長的積分時間 (2~3 小時) 搜尋微弱的拉曼訊號。探索 4 個部位的川七樣品中, 其 COOH 振動模式的差異, 再與 X 光繞射及吸收光譜的結果相互比對。

本實驗使用 JOBIN YVON T64000 Micro-Raman Spectrophotometer, 架設為反射式微拉曼, 以顯微鏡將雷射光源聚焦至光點直徑約為 0.5 微米, 光譜訊號由 3 個全向光柵 (1800 grooves/mm) 進行分光, 使用電荷耦合元件 CCD (Charge-coupled Device) 為偵測器, 一次讀取 200 個拉曼位移寬度的訊號。圖 13 為拉曼光譜實驗所用 JOBIN YVON T64000 光譜儀。

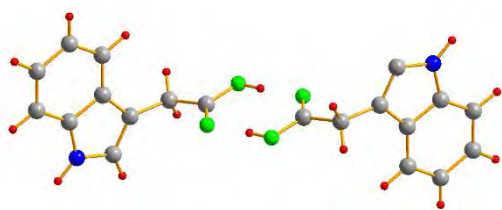


圖 12. IAA 中兩 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ 的鍵結情。



圖 13. 拉曼光譜實驗所採用的 JY 光譜儀。

已知 IAA 會吸紫外光, 並發出強烈藍光區段的螢光, 分別以 514.5 nm、632.8 nm、785 nm 雷射光來激發商購 IAA 粉末的拉曼譜圖, 發現以 514.5 nm 及 632.8 nm 為激發光源, 會出現蠻強的螢光成為背景訊號, 不利於讀取拉曼訊號。

- 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 cm^{-1} 清楚觀測到 IAA 的特徵拉曼峰 (圖 14a)。
- 我們用這些 IAA 特徵峰, 來標示川七捲曲莖拉曼譜圖中 IAA 的訊號。
- 以 514.5 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 14b)。
- 以 632.8 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。

(e) 我們選用波長 785 nm 強度 10 mW 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。

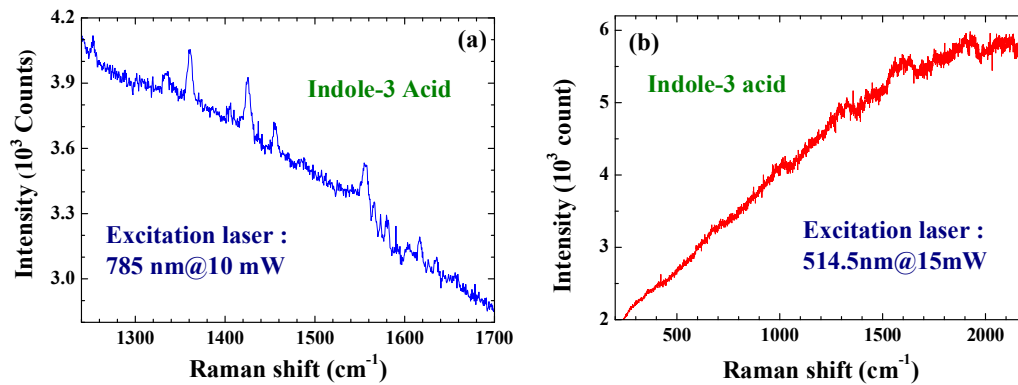


圖 14. IAA 粉末以(a) 785 nm 及(b) 514.5 nm 雷射作為激發光源的拉曼譜圖。

6. 以表面增益拉曼散射偵測川七莖體 IAA 中 COOH 的振動能量

表面增益拉曼散射實驗架設：

- 以熱蒸鍍冷凝法將 Au 奈米顆粒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，圖 15)。
- 取一滴 (約 5ml) 量測過吸收光譜的川七酒精溶液，滴在 Au 奈米顆粒薄膜表面。
- 靜置讓酒精蒸發，川七則沉澱在 Au 奈米顆粒薄膜表面。
- 圖 16 為實驗架設以激發 SPR 及 SERS 的共伴裝置示意圖。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 奈米顆粒，激發 Au 奈米顆粒的 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 奈米顆粒的 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。

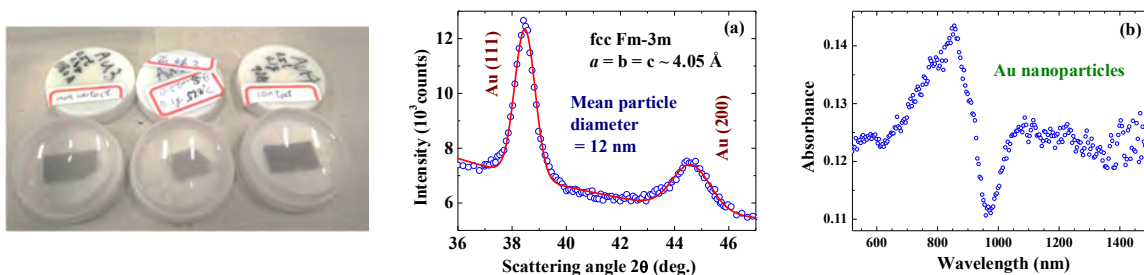


圖 15. 為用以產生表面電漿波共振，附著在玻片上的 Au 奈米顆粒（左圖），其 X 光繞射譜圖（左圖）及吸收光譜（右圖）。

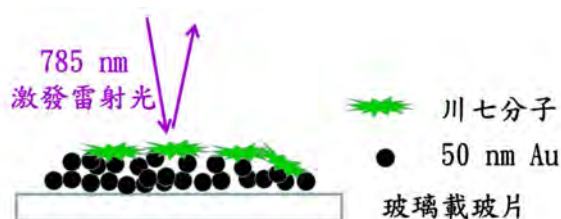


圖 16. 以 785 雷射光激發 Au NPs 的 SPR 之實驗架設示意圖。雷射光從樣品上方入射，穿過川七分子後進入 Au 奈米顆粒。

7. 川七零餘子粉末的抗菌實驗

以 HPLC 萃取的 IAA 粉末中，經 X 光繞射分析，我們看到了一個比例相當的第二分量，經過 X 光繞射數據分析，知道其化學式為另一分量初步判斷為 $C_{15}H_{22}O_8$ ，artsioside，一種 iridoids 環烯醚，且非接觸面是接觸面強度的 1.7 倍。已知環烯醚具有緩和神經、抗癌、抗老化、抗氧化、消炎、抗菌、抗病毒、護肝、降血糖的功效(The benefits of irinoids, 2014)。此外，川七的莖上常結有膨大的無性繁殖構造 - 零餘子，是一種常見的中藥材。我們想先測試零餘子粉末的抗菌功效，之後再進一步發展研究川七的藥理方面應用。



圖 17. 以蒸餾法萃取川七零餘子粉末抗菌物質裝置圖。



圖 18. 左圖為川七的零餘子。右圖為磨成粉末狀的零餘子

(1) 川七水溶液萃取物

- (a) 用 400 ml 去離子水加熱 10 g 川七零餘子粉末，以冷凝管降溫汽化蒸發物質，經冷凝導管收集凝集的萃取液。
- (b) 以減壓濃縮裝置將水溶液萃取液過濾，濃縮。
- (c) 將殘餘物溶解於 1%DMSO (極性)，假設不稀釋的濃度是 100%，使之最終濃度調整至 10%、20%、50%。

(2) P1 級大腸桿菌(K12)，細菌培養序列稀釋：

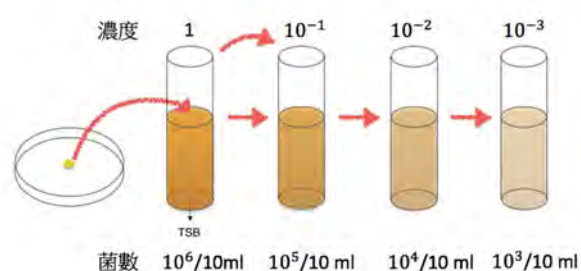


圖 19. 細菌培養序列稀釋

- (a) 以無菌接種環挑起單一個菌落，種入含 10ml Tryptic Soy Broth (TSB)之試管。
- (b) 估計 1 個直徑 2mm 的菌落，菌數約為 1 百萬，將之稀釋至 10^3 倍。
- (c) 將每一個稀釋的菌液吸取 500 μ l 至 TSA 培養基。
- (d) 選取 10^1 稀釋倍率，做後續的抗菌實驗。

(3) 抑菌環測試實驗：

- (a) 以無菌棉棒沾取(2)所調配好之適當濃度菌懸浮液，接種培養基上，分別在三個方向平均塗抹。(先在培養基上劃十字，再將整面培養基塗滿，後轉 60° 重複將培養基塗滿，再轉 60° 重複將培養基塗滿，即達到三個方向塗抹之標準)。
- (b) 蓋上培養基蓋子，靜置 3~5 分鐘(為上菌液收乾，但不可超過 15 分鐘)。
- (c) 川七零餘子粉萃取液以 3 種不同濃度檢測：10%、20%、50%川七萃取液。檢測前先以 0.22μ m 針筒過濾以去除細菌。將 2ml 過濾除菌後的 3 個濃度的川七根粉粹取液，以空白貼片吸取，作為川七抗菌貼片。

(d) 將 Ampicilin 貼片(positive control)、3 個濃度川七萃取液貼片、1%DMSO(positive control)，放入 TSA 培養基中央，每一個濃度檢測，皆做三重複。培養 16-18 小時測量抑菌環大小，並作數據統計分析。

三、研究結果與討論

(一) 研究結果

➤ 川七莖部的生長及解剖型態比較

1. 川七平直莖與捲曲莖的生長速率比較

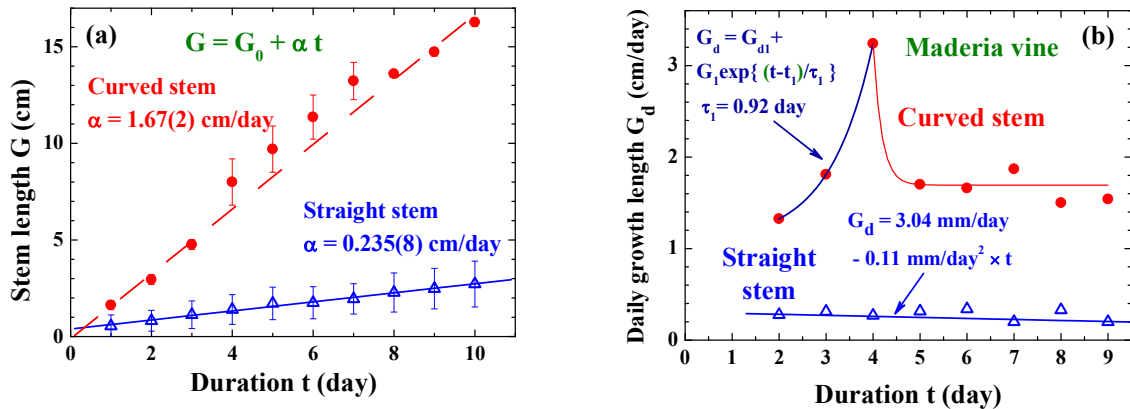


圖 20. 每天早上 7 點量測所得，(a)川七平直莖與捲曲莖長度比較圖，(b) 川七平直莖與捲曲莖日生長長度比較圖。

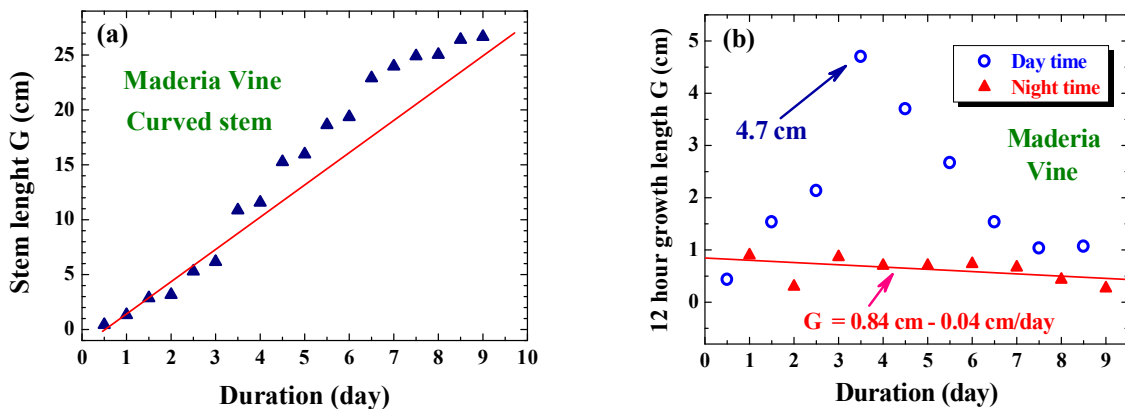


圖 21. (a)每天清晨 7 點與晚間 7 點量測所得，川七捲曲莖生長長度圖，顯現出捲曲莖在夜間的生長長度明顯低於日間者。(b)川七捲曲莖日間生長長度與夜間生長長度比較圖，最高日生長率為 4.7 cm，最低日生長率為 0.84 cm。

圖示說明：

- (1) 川七平直莖(straight stem)與捲曲莖(curved stem)的生長率截然不同。(圖20a)
- (2) 平直莖的生長率相當穩定，平均每天生長0.235 cm。(圖20a中藍色直線的斜率)
- (3) 捲曲莖的生長速率在接觸後明顯變快，第7~8天後趨平穩。(圖20a及圖21a)

- (4) 長期觀之，捲曲莖生長率為平直莖的 $1.67/0.235=7.1$ 倍。(比較圖20a中藍與紅直線斜率)
- (5) 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20b)
- (6) 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20b中綠色實線)
- (7) 第4天後生長率極速下降。(圖20b及圖21b)
- (8) 捲曲莖日間與夜間生長率截然不同，日間生長率明顯高出甚多，最高可達 $4.7/0.84 = 5.6$ 倍。(圖21a及圖21b)
- (9) 捲曲莖的夜間生長率，比平直莖生長率高 $(0.84 \times 2)/0.235 = 7.2$ 倍。(圖20a及圖21b)

主要結論：

- (1) 綜合生長實驗觀測結果：碰觸提高川七莖體生長率達7.1倍之多。
- (2) 捲曲莖的日間生長率比夜間生長率高出許多，最高可達5.6倍之多
- (3) 綜合白天與晚上觀測結果：捲曲莖的夜間生長率，仍然比平直莖生長率高7.2倍之多。
- (4) 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具活性生長素IAA。
- (5) 陽光日照會大幅增強機械性刺激所引起的川七莖體增長。

2. 川七捲曲莖表皮細胞生長測量

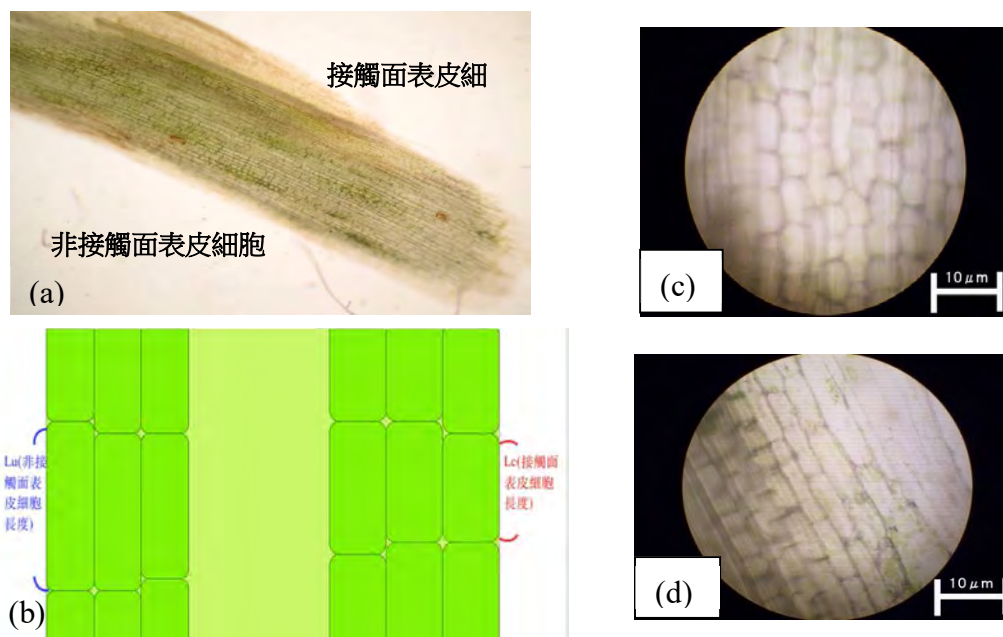


圖 22. (a)接觸面與非接觸面表皮細胞顯微切片。(b)接觸面與非接觸面表皮細胞示意圖。(c)接觸面表皮細胞顯微切片放大。(d)非接觸面表皮細胞顯微切片放大。

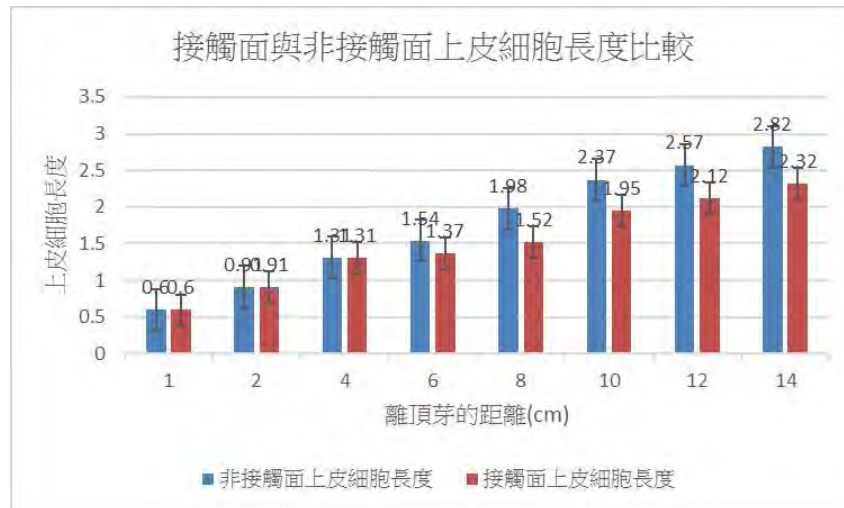


圖 23. 川七捲曲莖接觸面與非接觸面的表皮細胞長度隨離頂芽距離的改變圖。

圖示說明：

- (1) 從頂芽至往下 4 公分處，植株兩側的表皮細胞長度一樣，源於該植株段未接觸竹子。
- (2) 頂芽下方 4 公分以上開始纏繞竹子，於莖部 6、8、10、12、14 公分處測表皮細胞長度，非接觸面皆比接觸面長。
- (3) 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***。
- (4) 隨著離頂芽的距離越遠，表皮細胞長度越長(圖 23)。

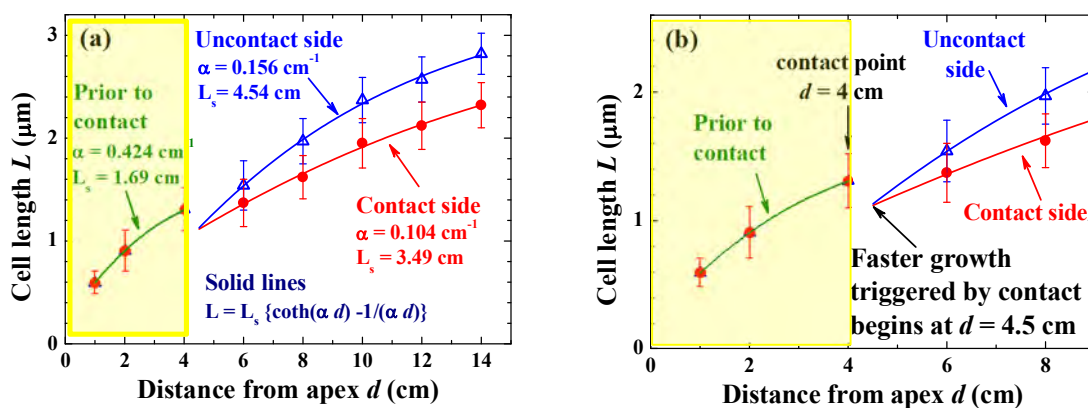


圖24. (a)川七莖部接觸面與非接觸面表皮細胞長度的定量分析圖。(b)圖(a)的局部放大圖，顯示接觸前後表皮細胞長度生長率的改變。

圖示說明：

- (1) 離頂芽越遠，頂芽段、非接觸面段、及接觸面段的表皮細胞長度均越長。(圖24a)
- (2) 頂芽段、非接觸面段、及接觸面段的表皮細胞長度之增長率截然不同。(圖24a中綠色、藍色、與紅色曲線相比較)
- (3) 符號說明：LA = 頂芽段的表皮細胞長度，LC = 接觸面段的表皮細胞長度，LU = 非接觸面段的表皮細胞長度， d = 離頂芽距離。
- (4) 接觸後皮細胞長度的增長率有明顯改變。LA、LC、及LU 都有極大值。(圖24a)
- (5) 接觸後細胞增長率先減緩，一段時間T以後，接觸及非接觸兩面再以高於未接觸前的增長率增長。(圖24中 $d = 4\sim 6$ cm的數據)
- (6) 圖24中非接觸曲線(藍色)與接觸曲線(紅色)交會在 $d = 4.5$ cm處，是細胞增長加速的起點。接觸點在 $d = 4$ cm處，顯示接觸後莖體生長0.5 cm後，細胞開始加速生長。
- (7) T可以估算如下：接觸後第一天長長3.24 cm (圖20a)， $T = (0.5/3.24) \times 24\text{hr} \approx 4\text{hr}$ 。
- (8) 表皮細胞最終長度：非觸面段為觸面段的 $(4.54/3.49) = 1.3$ 倍；非觸面段為未接觸段的 $(4.54/1.69) = 2.7$ 倍。
- (9) LU 明顯比 LC 長，推測接觸後較多具活性的IAA輸送到非接觸面。

主要結論：

- (1) 接觸面 LC 的增長速率明顯比非接觸面 LU 的增長速率小許多。
- (2) 接觸後較多具活性的IAA輸送到非接觸面，推測接觸會增生IAA輸送到莖體，但增生的IAA較多輸送到非接觸面。
- (3) 接觸後細胞增長率先減緩，一段時間T以後，再以高於未接觸前的增長率增長。
- (4) 表皮細胞最終長度：非觸面段為觸面段的1.3倍；非觸面段為未接觸段的2.7倍。
- (5) 捲曲莖兩側表皮細胞長度的和隨離頂芽越遠呈線性增長，推測接觸所引發的刺激具時效延續性，並非莖體捲曲後刺激效應就消失。
- (6) 接觸面 LC 的增長速率明顯比非接觸面 LU 的增長速率小許多。
- (7) LU 明顯比 LC 長，推測接觸後較多具活性的 IAA 輸送到非接觸面。

3. 川七運輸 IAA 之近維管束薄壁細胞長度測量

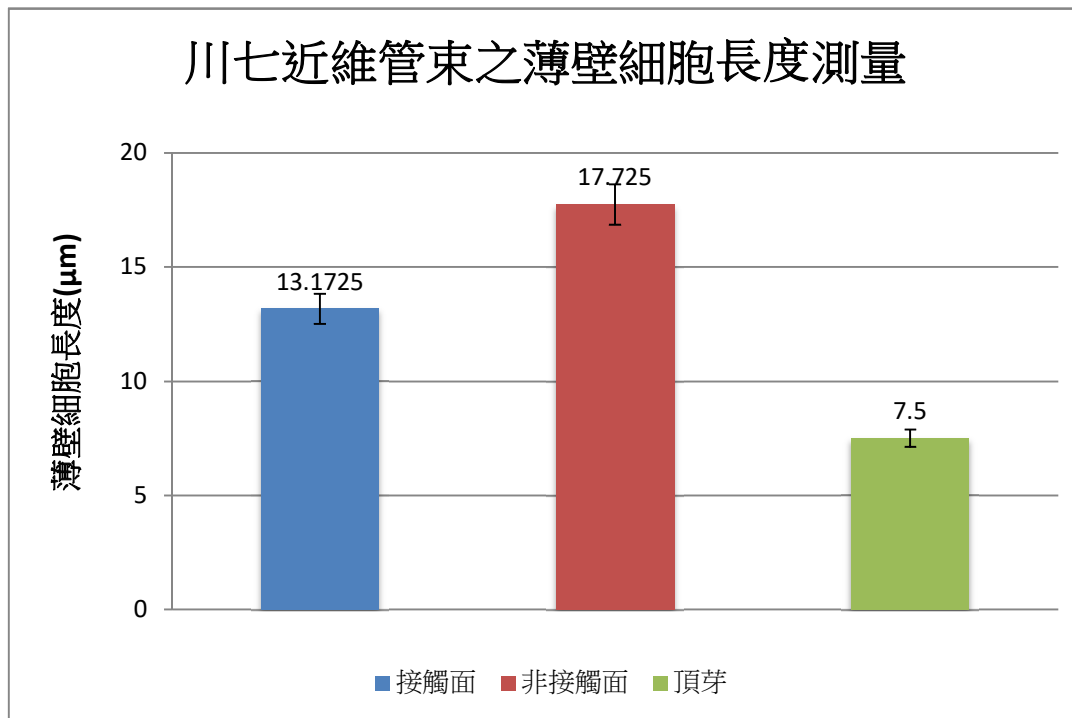


圖 25: 川七捲曲莖頂芽、接觸面與非接觸面的維管束之薄壁細胞長度比較圖。

圖示說明：

- (1) 從捲曲莖接觸物體處往下 1 公分之間，測量 30 個近維管束之薄壁細胞長度，結果顯示非接觸面>接觸面>頂芽(圖 25)。
- (2) 非接觸面具有活性的 IAA 較多，此區域細胞生長速率較快，細胞長度拉長。
- (3) 頂芽處薄壁細胞最小，推測為近生長點，細胞分裂完成後生長時間較少，細胞較小。
- (4) 以 t-test 雙尾檢定計算，接觸面與非接觸面近維管束之薄壁細胞長度比較達顯著差異：
p value = 0.00076 ***。

(5) IAA 除了使非接觸面的表皮細胞拉長，運輸 IAA 的近維管束薄壁細胞長度也拉長。

主要結論：

- (1) 接觸引起的非接觸面細胞生長速率較快，使表皮及近維管束薄壁細胞均較長。

4. 平直的莖、捲曲的莖解剖型態比較

切片植株描述：

- (1) 平直莖：總長 43 cm，前端有頂芽，取莖的部位離頂部 5~9 cm 處，節在 7 cm 處。
- (2) 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。用指甲油標記莖的非接觸面，節的上端 2 cm 以藍色指甲油標記，節的下端 2 cm 以紅色指甲油標記。

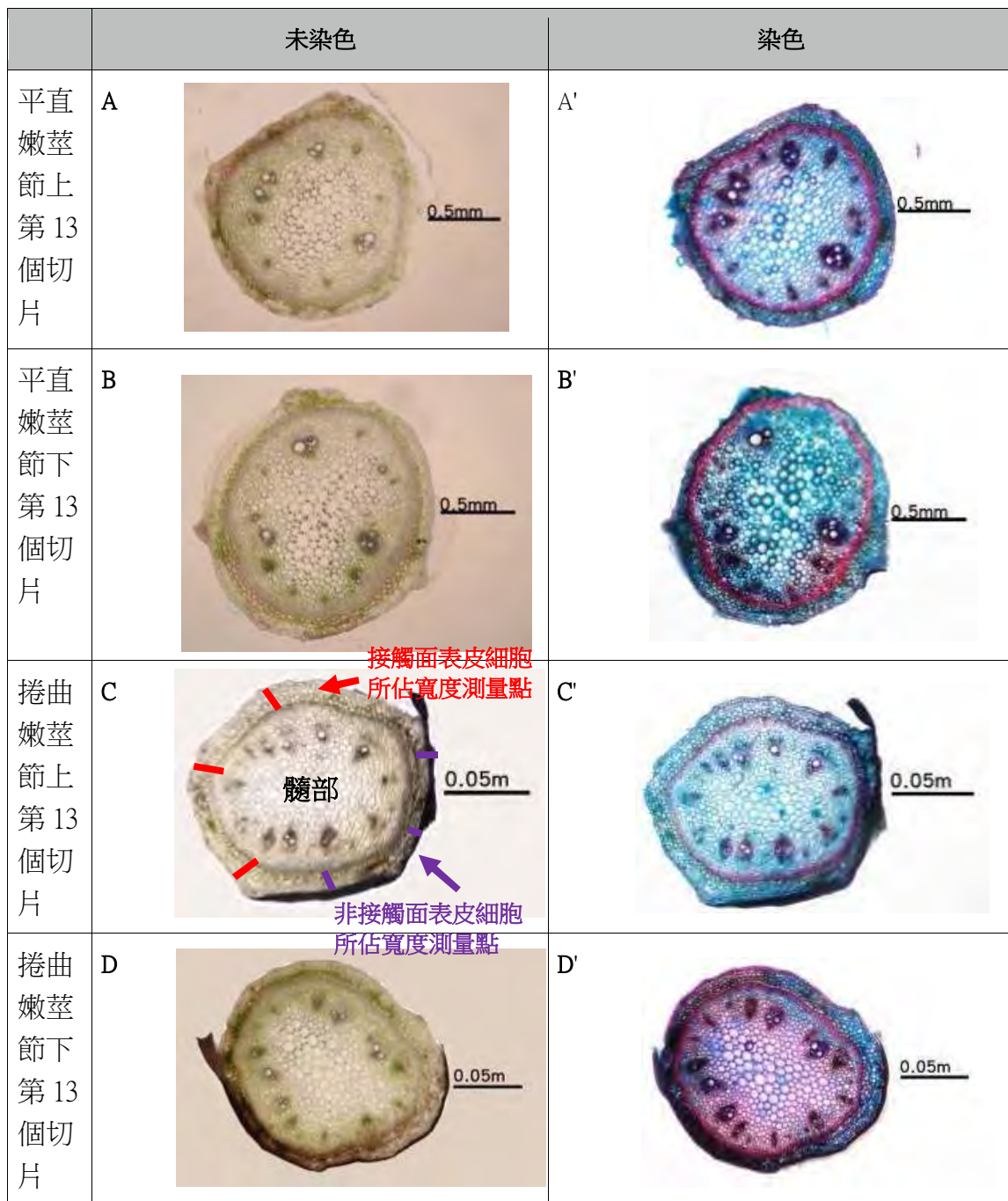


圖26. 川七莖4處選定部位的橫切光學顯微影像比較圖。

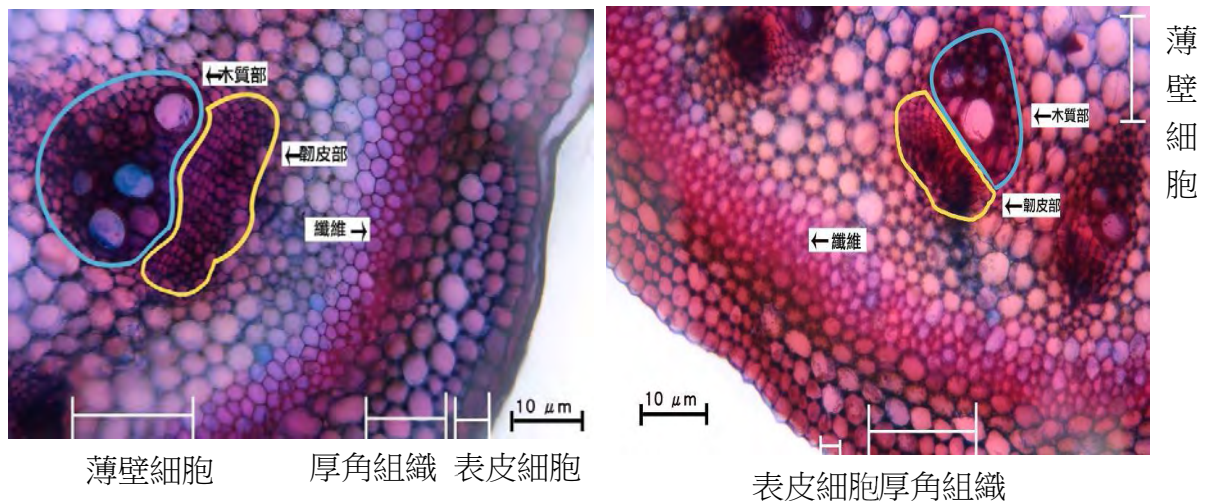


圖 27. 川七捲曲莖(a)非接觸面與(b)接觸面的光學顯微放大圖。

圖示說明：

- (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。(圖 27a 及圖 27b)
 - (2) 一個直徑為 0.25 公分的川七莖，有大小不一的維管束約 13~15 個，這數量在平直莖或在捲曲莖並無明顯差異。
 - (3) 捲曲莖接觸面與非接觸面的維管束型態，在這微米尺度解析下，無明顯差異。
 - (4) 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。
- (圖 27a 及圖 27b)

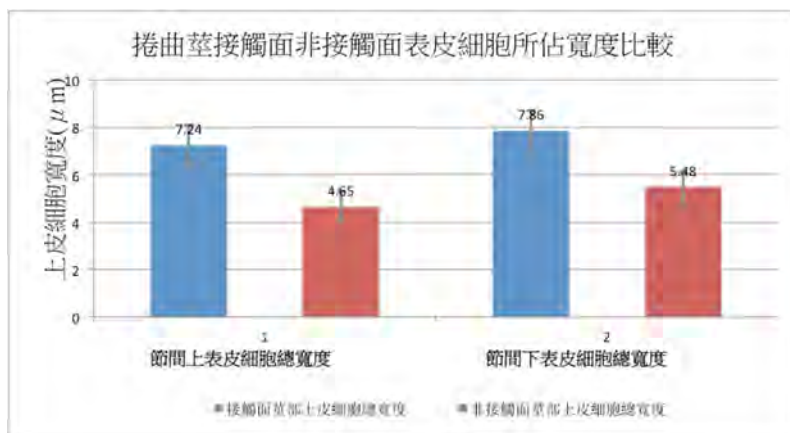


圖 28. 捲曲莖接觸面與非接觸面表皮細胞所占寬度比較圖。

圖示說明：

- (1) 不論是節間上方或節間下方的表皮細胞所占寬度，皆是接觸面比非接觸面者大。
- (2) 以 t-test 雙尾檢定計算，皆達顯著差異：節間上方接觸面與非接觸面表皮細胞總寬度比較 p value = 0.0000010752 ***；節間下方接觸面與非接觸面表皮細胞總寬度比較 p value = 0.0000091308 ***。
- (3) 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者小。

主要結論：

- (1) 川七莖中維管束的數量在平直莖或在捲曲莖並無明顯差異。
- (2) 接觸面表皮細胞的寬度，明顯比非接觸面的寬，差異可達到45~55%。
- (3) 接觸引起的川七莖體非對稱生長，主要表現在細胞變長變寬，而非表現在分裂出較多細胞上。

5. 捲曲的莖頂芽、接觸面、非接觸面pH值比較

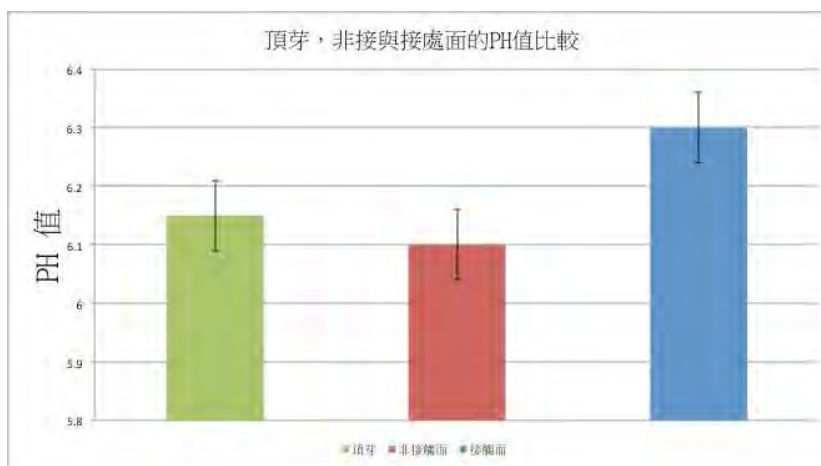


圖29. 頂芽、捲曲莖接觸面、與非接觸面的酸鹼pH值。

表3. 捲曲的莖頂芽、接觸面、非接觸面pH值比較

	頂芽	非接觸面	接觸面
pH 值	6.13	6.1	6.3

圖示說明：

- (1) 比較接觸物體之後，捲上物體莖定型時三處捲曲莖的pH值：非接觸面 < 頂芽 < 接觸面，也就是 H^+ 濃度為非接觸面 > 頂芽 > 接觸面 (圖29、表3)。
- (2) 一開始接觸物體時，細胞受到壓力而稍微擠壓彼此之間的距離而空間變小，細胞間隙物質密度變大，濃度變大， H^+ 濃度變大，所以由接觸面流向非接觸面。
- (3) 接觸之後的結果，使得非接觸面累積較多的 H^+ ，我們測的是莖捲上物體的pH值，所以是非接觸面最小。
- (4) 非接觸面較多的細胞間 H^+ 濃度，可以帶動 $IAA + H^+ \rightarrow IAAH$ ，始得IAA進入細胞的cotransport變多，因此非接觸面IAA運輸的效率較接觸面佳。
- (5) 接觸面與非接觸面因為 H^+ 濃度差異，建立了電化學濃度梯度。

主要結論：

- (1) 一開始川七莖接觸物體時， H^+ 濃度為接觸面>非接觸面， H^+ 會由接觸面擴散到非接觸面，而捲曲上物體之後，非接觸面 H^+ 濃度累積，兩側之間建立電化學濃度梯度，非接觸面IAAH多，IAA在非接觸面運輸的效率較佳。

➤ 以吸收光譜探討川七莖部IAA的活性

1. IAA 中 COOH 脫離在吸收光譜的特徵反映

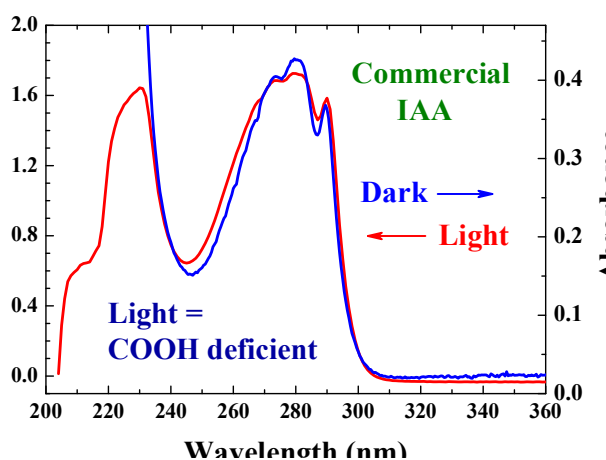


圖 30. 市售 IAA 粉末(藍色)及該粉末置於室溫照光 30 天後(紅色)的吸收光譜。

圖示說明：

- (1) 已知 IAA 照光後 COOH 會脫落，因為 COOH 對於 IAA 分子而言是一個重要的官能基，如果失去被其他的官能基取代，會因而喪失活性。(David A. *et al.*, 2013).
- (2) IAA 的吸收光譜在 200~300 nm 區段，而 200~230 nm 區段的吸收來至 COOH。
- (3) IAA 置於室溫照光 30 天後照光後，200~230 nm 區段的吸收大幅降降低，而在 230 nm 出現吸收峰。

2. 從 HPLC 萃取 IAA 粉末的吸收譜圖探討 IAA 的活性

選定川七莖體的 3 個部位為取樣點：頂芽、捲曲莖接觸面（稱為接觸面）、捲曲莖非接觸面（稱為非接觸面），以 HPLC 萃取 IAA 粉末。將萃取粉末取出，用在其他實驗上，僅用殘留在原樣品瓶壁上的粉末，加入純度 99.99% 的酒精 2ml，置入吸收光譜石英樣品載瓶，進行量測，即可測得吸收光譜。

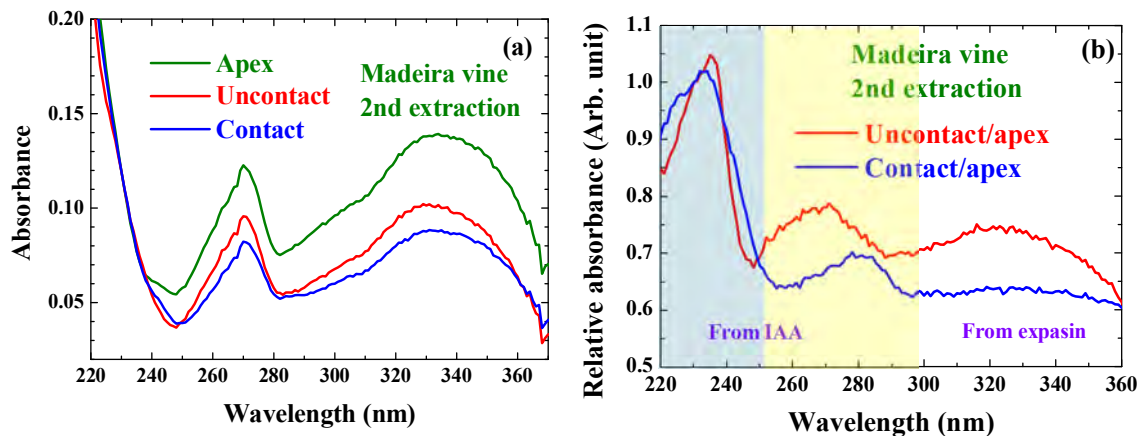


圖 31. (a)自頂芽(綠線)、捲曲莖非接觸面(紅線)、捲曲莖接觸面(藍現)所粹取出 IAA 粉末的吸收譜圖。(b)非接觸面粉末(紅線)及接觸面粉末(藍線)相對於頂芽粉末的吸收譜圖。

圖示說明：

- (1) 自川七 3 個部位所萃取的粉末，除了在 200~300 nm 區段出現 IAA 的特徵吸收光譜外，在 280~370 nm 出現另一吸收區段，顯示所萃取的粉末中尚有第二分量。(圖 31a)

(2) 280~370 nm 吸收光譜區段與胞壁擴張酶(expansin)的吸收光譜區段吻合。(A. Tabuchi., *et al*, *Plant Journal*, 68, 546, 2011)

(3) 萃取的粉末中含有胞壁擴張酶的分量，胞壁擴張酶利於合成使細胞伸長增寬的分子。

(4) 接觸面粉末及非接觸面粉末相對於頂芽粉末的吸收光譜，在 230 nm 處(圖中藍色區域)均出現吸收峰。(圖 31b)

→ 非接觸面及接觸面的 IAA 中 COOH 較少。

→ IAA 從頂芽輸送到接觸面及非接觸面後，具活性的 IAA 量均減少。(圖 30)

(5) 250 至 300 nm 區域為 IAA 主結構的吸收範圍(圖中黃色區域)，此區域內非接觸面的吸收峰結構，比接觸面的吸收峰結構明顯許多。(圖 31b)

→ 非接觸面的 IAA 總量比接觸面的多。

(6) 非接觸面粉末胞壁擴張酶的吸收峰結構，比接觸面的吸收峰結構明顯許多。(圖 31b)

→ 非接觸面的胞壁擴張酶的含量明顯較接觸面的含量多。

3. 從川七莖的吸收譜圖探討 IAA 的活性

選定川七莖的 4 個部位為取樣點：頂芽、捲曲莖接觸面、捲曲莖非接觸面，分別輕壓磨碎後，取 0.1g 浸泡在 1 ml 99 %酒精中，靜置 2 小時，莖碎塊沉澱於底部，取溶液中上段 3ml，量測吸收光譜。

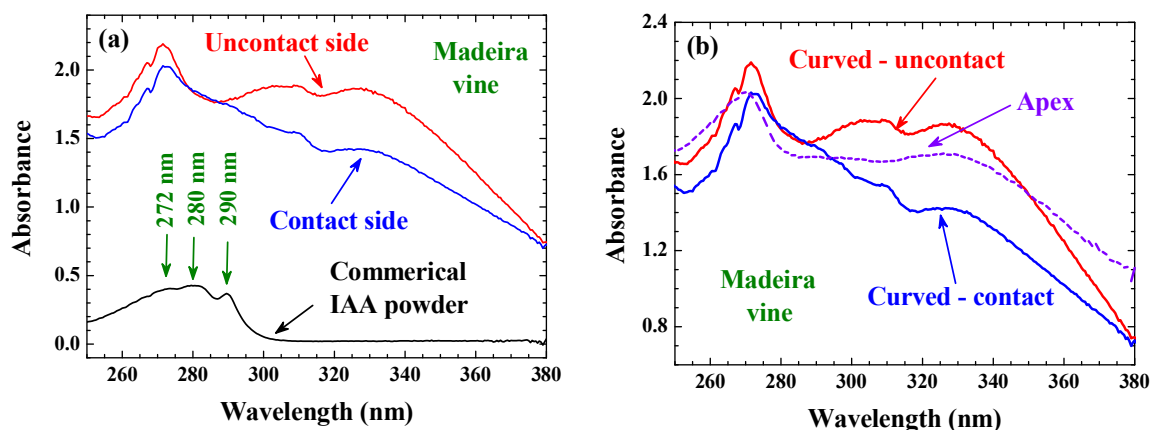


圖 32. (a)商購 IAA 粉末(黑色曲線)、捲曲莖非接觸面(紅色曲線)、捲曲莖接觸面(藍色曲線)的吸收光譜。(b)川七頂芽(紫色虛曲線)、捲曲莖非接觸面(紅色曲線)、捲曲莖接觸面(藍色曲線)的吸收光譜比較圖。

圖示說明：

- (1) 圖31a中黑色曲線為商購IAA粉末(10.8 ppm，酒精中)，量測所得的吸收譜圖。
→ IAA的特徵吸收峰在 272、280、290 nm，用以標示莖體吸收譜圖中IAA的訊號。
- (2) 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的短波特徵吸收峰(272 nm)比長波吸收峰(280及290 nm)明顯。(圖32a)
→ 川七莖體中的IAA，其分子鍵結強度較商購IAA粉末者為弱。
- (3) 比較捲曲莖非接觸面與接觸面源自IAA的吸收譜圖：兩吸收譜圖在278~290 nm區段基本上重疊，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32a)
- (4) 川七捲曲莖非接觸面(紅色曲線)與接觸面(藍色曲線)的吸收譜圖，最顯著的區別在於源自胞壁擴張酶的280~380 nm 區段，其以330 nm吸收峰為代表。(圖32)
- (5) 川七捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶分子濃度，明顯較接觸面的濃度高出甚多。(圖32a)
- (6) 比較捲曲莖非接觸面、捲曲莖非接觸面、頂芽源自胞壁擴張酶的吸收譜圖：捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶濃度最高，頂芽者次高，捲曲莖非接觸面者最少。(圖32b)

主要結論：

- (1) IAA從頂芽輸送到接觸面及非接觸面，具活性的IAA量均減少。
- (2) 川七捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶分子濃度明顯較接觸面的濃度高出甚多。
- (3) 非接觸面的IAA濃度高於接觸面者。
- (4) 捲曲莖非接觸面的胞壁擴張酶濃度最高，平直莖者次高，捲曲莖非接觸面者最少。
推測接觸驅使胞壁擴張酶自接觸面轉移到非接觸面。
- (5) IAA及胞壁擴張酶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，利於合成更多使細胞變寬伸長所需要的分子等。

➤ 以生化技術研究向觸性與生長素 IAA 的關係

1. HPLC and GC-MS

表 4. 以 GC-MS 定量 IAA 濃度的結果

	樣品乾重 (g)	萃取 IAA 重 (ng/g)
接觸面 IAA _(C)	0.3328	203
非接觸面 IAA _(UC)	0.3210	210
捲曲莖頂芽 IAA _(A)	0.2796	198
平直莖 IAA _(S)	0.3127	164

表格說明：

- (1) 比較接觸面與非接觸面的 IAA 濃度， $IAA_{(UC)} > IAA_{(C)} - 3\%$ ，此結果與吸收光譜的結果吻合，但是推測 GC-MS 無法偵測到 IAA 分子結構的改變，因此濃度雖在兩側略有差異，主要是由於有活性 IAA 的比例不同，造成莖部兩側生長的差異。
- (2) 比較捲曲莖頂芽與平直莖的 IAA 濃度， $IAA_{(A)} > IAA_{(S)} \sim 20\%$ ，推測接觸刺激川七捲曲莖合成較多 IAA，因此生長速度變快，與川七莖的生長實驗吻合。
- (3) 比較捲曲莖頂芽與非接觸面的 IAA 濃度， $IAA_{(UC)} > IAA_{(A)} \sim 5\%$ ，推測因為頂芽組的 IAA 尚在合成的階段，再向下運輸的過程中才會陸續代謝為 IAA，繼而引發非對稱性的生長效應，因此濃度略低於非接觸面的 IAA。
- (4) 根據川七莖活體 X 光繞射的結果，川七頂芽中 IBA 含量約為 IAA 含量的 2.3 倍。

主要結論：

- (1) $IAA_{(UC)} > IAA_{(C)} - 3\%$ ； $IAA_{(A)} > IAA_{(S)} \sim 20\%$ ； $IAA_{(UC)} > IAA_{(A)} \sim 5\%$ 。
- (2) 川七頂芽中 IBA 含量約為 IAA 含量的 2.3 倍。

➤ 以 X 光繞射分析川七莖體 IAA 的含量及活性

1. 實驗對照組 IAA 及 IBA 的 X 光繞射譜圖

生長素 IAA 學名為 Indole-3-acetic acid，由多數個化學式為 $C_{10}H_9NO_2$ 的分子團(圖 32a)組合而成(圖 4)。生長素 IBA 學名為 Indole-3-butyric acid，由多數個化學式為 $C_{12}H_{13}NO_2$ 的分子團(圖 33a)組合而成。圖 32b 與圖 33b 分別為商購 IAA 與 IBA 的 X 光繞射譜圖，藉以比對川七莖體及萃取粉末的 X 光繞射譜圖，從中找出來自於 IAA 及 IBA 的訊號。

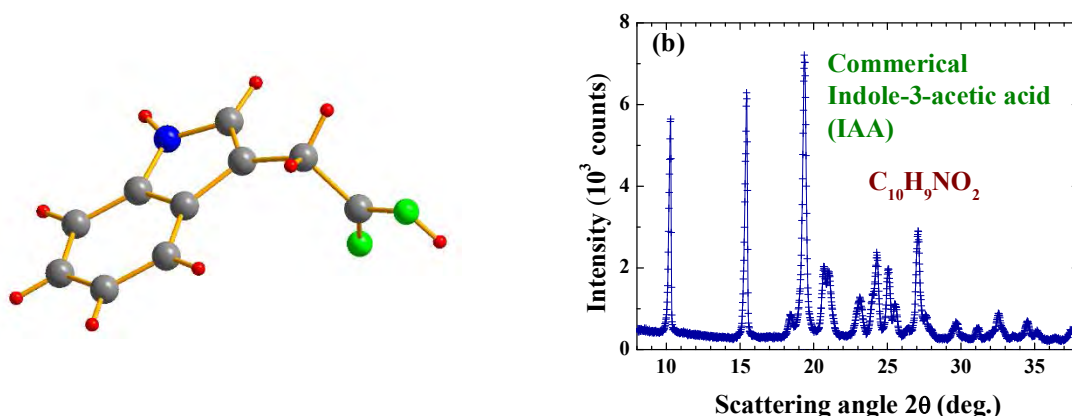


圖 33. (a)組成 IAA 的基本分子團結構，其化學式為 $C_{10}H_9NO_2$ 。(b)商購 IAA 粉末標準品的 X 光繞射譜圖。

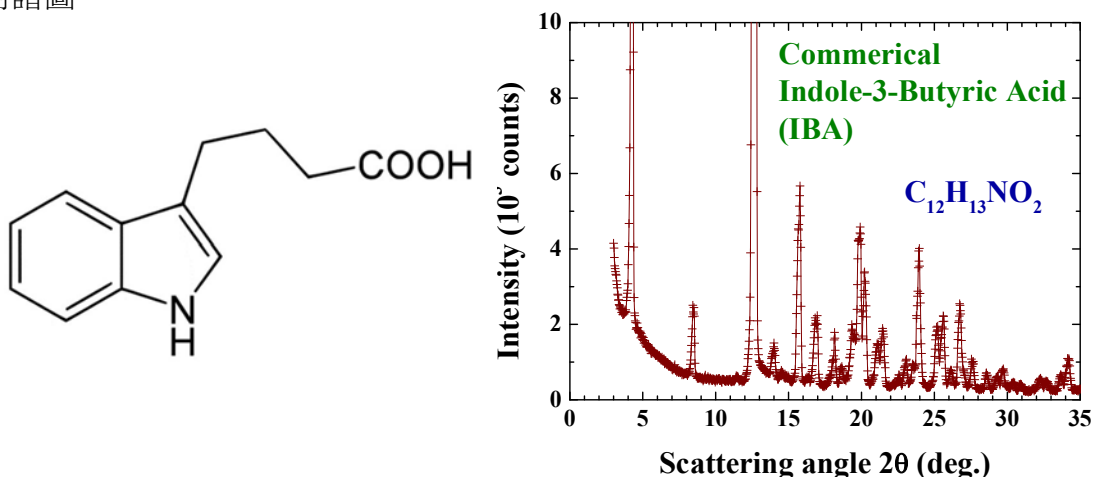


圖 34. (a)組成 IBA 的基本分子團結構，其化學式為 $C_{12}H_{13}NO_2$ 。(b)商購 IBA 粉末標準品的 X 光繞射譜圖。

圖示說明：

- (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。

- (2) 根據文獻，IAA的分子化學學名為 Indole-3-acetic acid，由繪示於圖33a的 $C_{10}H_9NO_2$ 基本結構，以特定對稱型態組合而成。
- (3) 根據文獻，IBA的分子化學學名為 Indole-3-butyric acid，由繪示於圖34a的 $C_{12}H_{13}NO_2$ 基本結構，以特定對稱型態組合而成。

2. 川七頂芽及捲曲莖中IAA與IBA的相對含量

取川七(1)頂芽起往下0~1 cm，樣品12株，總重178 mg，(2)捲曲莖起往下0~1 cm，樣品12株，總重198 mg，(3)捲曲莖往下13~14 cm，樣品12株，總重245 mg，直接平舖在樣品台上，如圖8所示，以掠角架設，將X光入射角固定在4度，從事繞射實驗，收集散射角範圍6~35度的繞射譜圖。掠角架設使得平舖成1.5 cm寬的頂芽樣品，都可照射到X光，且散射角改變時，入射X光照射到樣品的量維持不變。經多次測試後，發現偵測器以50分鐘掠掃過散射角1度的數據收集速度，即可收集到可以用於分析的繞射譜圖(圖34a)。由於X光繞射的強度，在高散射角度會弱化，需要較多的數據收集時間，但所提增加提供的資訊並不多，沒有必要花費儀器時間收集角高散射角的譜圖。

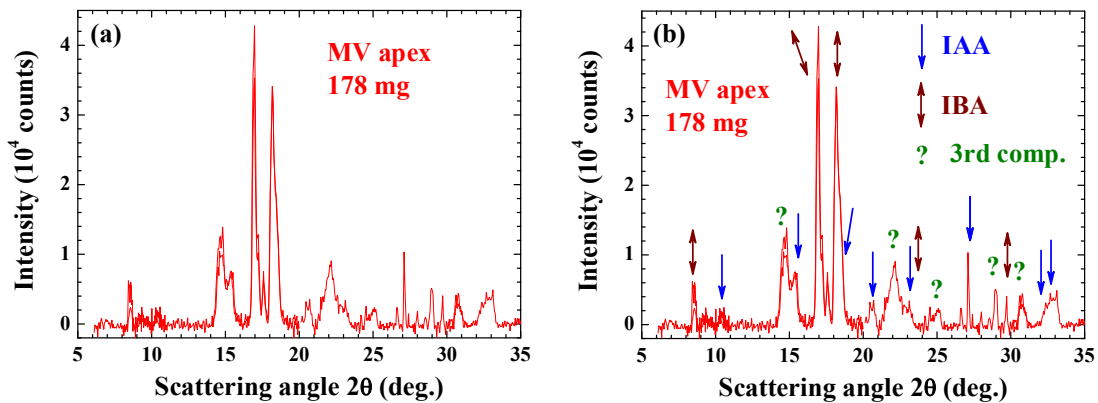


圖35. (a) 川七頂芽莖體的X光繞射譜圖，實驗以掠角架設，將X光入射角固定在4度進行。(b) 標示有各繞射峰來源的繞射譜圖，顯示除IAA及IBA外，繞射譜圖尚出現一待解分量。

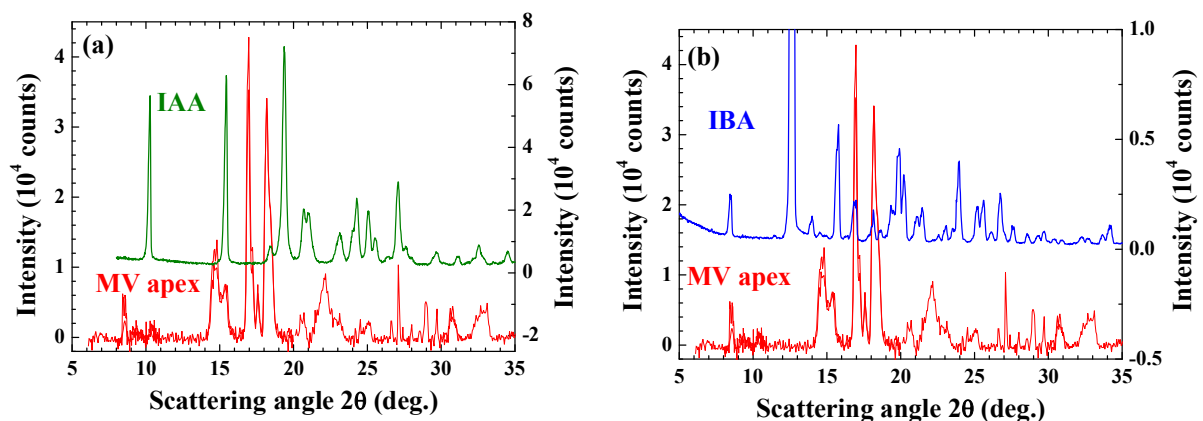


圖 36. 川七頂芽莖體的 X 光繞射譜圖與(a)IAA 及(b)IBA 的光繞射譜圖相比較。

表 5. X 光繞射量測所得川七頂芽及捲曲莖中 IAA 與 IBA 的含量

	IBA 質量(%)	IAA 質量(%)
頂芽起往下 0~1 公分	70	30
捲曲莖起往下 0~1 公分	15	85
捲曲莖起往下 13~14 公分	10	90

圖示說明：

- (1) 本實驗結果證實直接以川七莖體為樣品讀取X光繞射譜圖的實驗是可行的。
- (2) 散射角為8.4度的IBA特徵散射峰，明顯出現在川七頂芽的X光繞射譜圖。(圖35a)
- (3) 散射角為10.2度的IAA特徵散射峰，明顯出現在川七頂芽的X光繞射譜圖。(圖35a)
- (4) 川七頂芽的X光繞射譜圖(紅色曲線)與IAA的繞射譜圖(綠色曲線)做疊圖比較，可以看出頂芽譜圖出現一系列的IAA特徵峰。(圖36a)
- (5) 川七頂芽的X光繞射譜圖(紅色曲線)與IBA的繞射譜圖(藍色曲線)做疊圖比較，可以看出頂芽譜圖出現一系列的IBA特徵峰。(圖36b)
- (6) 圖32b中標示出IAA(藍色箭頭)及IBA(紫紅色雙箭頭)的特徵繞射峰群，但仍有一系列的繞射峰不是源於IAA或IBA。
- (7) 川七頂芽的X光繞射譜圖顯現出3個分量，IAA、IBA、未知分量。(圖35b)

(8) 源自於IBA的繞射強度明顯比源自於IAA者強許多 → IBA含量高於IAA含量。

(9) 以繞射峰的面積強度計算：(表5)

(a) 川七頂芽起往下0~1公分莖體中，質量比IBA：IAA = 70：30。

(b) 川七捲曲莖起往下0~1公分莖體中，質量比IBA：IAA = 15：85。

(c) 川七捲曲莖起往下13~14公分莖體中，質量比IBA：IAA = 10：90。

主要結論：

(1) 直接以川七莖體為樣品讀取X光繞射譜圖的實驗是可行的。

(2) IBA為長素的 storage form，可以透過 β -oxidation轉置成活性IAA。(E. Zaziĭmalovaĭ, 2014).

(3) 川七頂芽起往下0~1公分莖體中，IBA含量約為IAA含量的2.3倍，顯示IAA在頂芽被合成之後，大部分的IAA先轉換為storage form 的IBA。

(4) 川七捲曲莖體中，IBA的含量大幅減少，顯示IBA已轉換成IAA，使細胞增長。

(5) 受到接觸的刺激後，IBA會轉換回IAA，使細胞增長。

3. 接觸引發川七莖體裡環烯醚的非對稱分佈

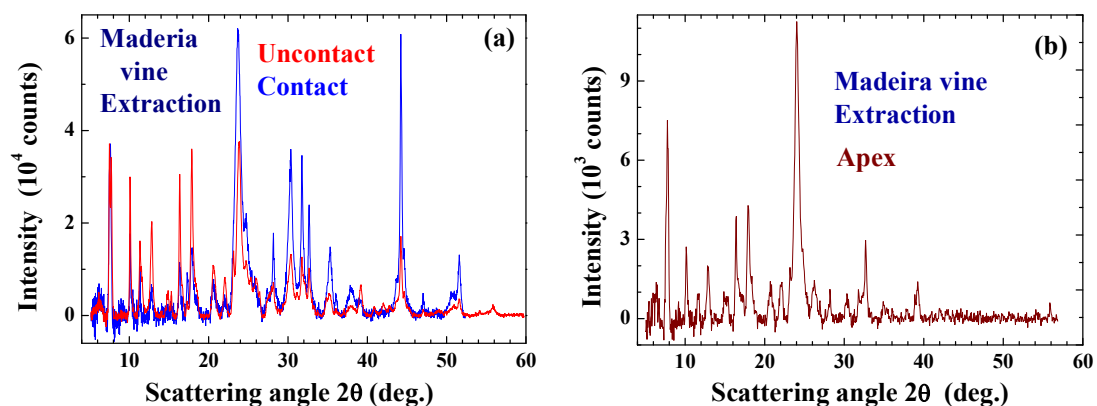


圖37. (a)萃取自捲曲莖接觸面(藍色曲線)與非接觸面(紅色曲線)所得粉末的X光繞射譜圖。

(b) 萃取自頂芽所得粉末的X光繞射譜圖。

圖示說明：

- (1) 圖36a的繞射譜圖已依7.5度峰的強度歸一化，用以比較繞射峰的相對強度。
- (2) 接觸面、非接觸面、頂芽萃取粉末中，除源自IAA的繞射峰外(以位於10.2及11.3度的峰為代表)，還出現另一分量(以位於7.5度的峰為代表)。(圖37a及圖37b)
- (3) 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。(Nan Z. D. *et al.*, 2016)
- (4) 接觸面與非接觸面的X光繞射峰出現的位置相近，顯示分子結構相同。(圖37a)
- (5) 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。(圖37b)
- (6) 比較接觸面與非接觸面 $C_{15}H_{22}O_8$ 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。(圖37a)

主要結論：

- (1) 接觸面與非接觸面的IAA中原子數目的含量不同。
- (2) 非接觸面的環烯醚 $C_{15}H_{22}O_8$ 含量比接觸面的含量明顯高出許多，可達1.7倍。

4. 接觸的刺激會減弱IAA的活性

IAA的基本結構間的連結組態，可看出COOH與主體分子間的化學鍵結相對較弱，符合已知IAA照光會局部分解，而呈現黃色的特性。原子在結構中部分脫落離，會反映在繞射峰的強度上。我們以GSAS程式計算IAA分子的X光繞射譜圖，發現IAA中COOH脫離的量明顯反映在(102)及(300)相對於(200)繞射峰的強度。我們藉由量測川七4個選定部位中，IAA的X光繞射峰的相對強度，分別計算(300)及(102)繞射峰相對於(200)繞射峰的相對強度，就可以依據圖37a及圖37b所示曲線，來判斷各部位的IAA中COOH脫離的量，藉以判斷川七莖體各部位IAA分子的活性。

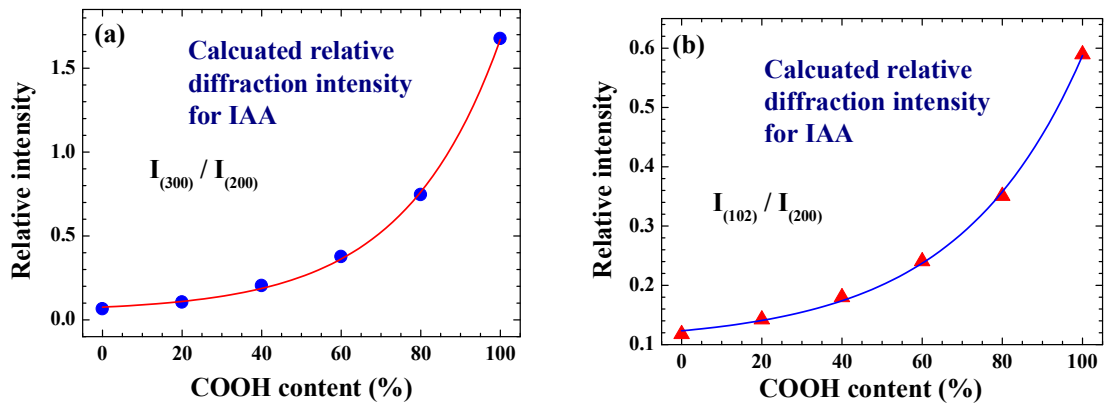


圖 38. 以 GSAS 程式計算 IAA 的(a)(300)與(b)(102)峰相對於(200)峰的繞射強度隨 COOH 含量改變圖。

圖示說明：

- (1) IAA 結構中，COOH 容易脫落，已知照光就會造成 COOH 脫落。
- (2) 圖 37 為依 IAA 分子結構計算，當只有一部分 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。(圖 38a 與圖 38b)
- (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。

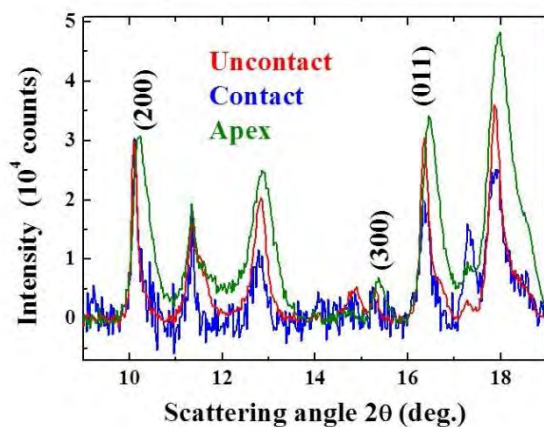


圖39. 自穿七頂芽(綠線)、捲曲莖接觸面(藍線)、捲曲莖非接觸面(紅線)所萃取粉末的X光繞射譜圖。

圖示說明：

- (1) 圖39將已將3繞射譜圖，依IAA (200)繞射峰的強度歸一化，用於直接比較相對強度。
- (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。(圖39)
- (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 的 X 光繞射峰強度(200)、(300)、(011)計算：
 - (a)頂芽的 IAA 分子中，60 % 含有 COOH。
 - (b)向下往非接觸面運送時，剩下 40% IAA 分子有 COOH。
 - (c)而向下往接觸面運送時，剩下 30% IAA 分子有 COOH。
 - (d)由頂芽向下運送時，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。

主要結論：

- (1) IAA由頂芽向下運送時，皆有部分IAA的COOH丟失。
- (2) 往接觸面運送丟失的COOH的比例較大。
- (3) 頂芽、非接觸面、接觸面中IAA具活性的比例分別為60%、40%、30%。

5. 接觸縮短IAA分子間的串接長度

分子間整齊串接：分子會藉由彼此間的作用力，而鍵結串接在一起，稱為晶體化(crystallization)。以IAA為例，其中相鄰近的 $C_{10}H_9NO_2$ 分子間，藉由C-環外圍的氫離子(圖39中紅色小球)間的極化電磁力，以及COOH中的氧離子(圖39中綠色小球)與另一分子的COOH中氫離子間的極化電磁力，鍵結成整齊串接排列，而串聯在一起。圖40為 $C_{10}H_9NO_2$ 分子，在沿晶體的a-軸方向有4個單位晶格，且沿晶體的c-軸方向有2個單位晶格，整齊串接排列的示意圖。川七莖體中的IAA， $C_{10}H_9NO_2$ 分子間串聯的大小，相信與在細胞質液或運輸的囊泡IAA分子濃度以及周遭酸鹼值有關，如果細胞越小，或運輸囊泡越小，就不利於IAA

分子間的串接程度。

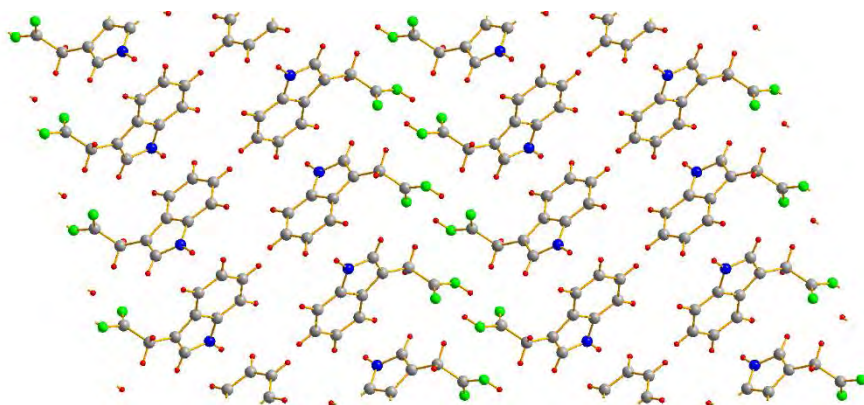


圖40. 組成IAA的 $C_{10}H_9NO_2$ 分子間鍵結情形。

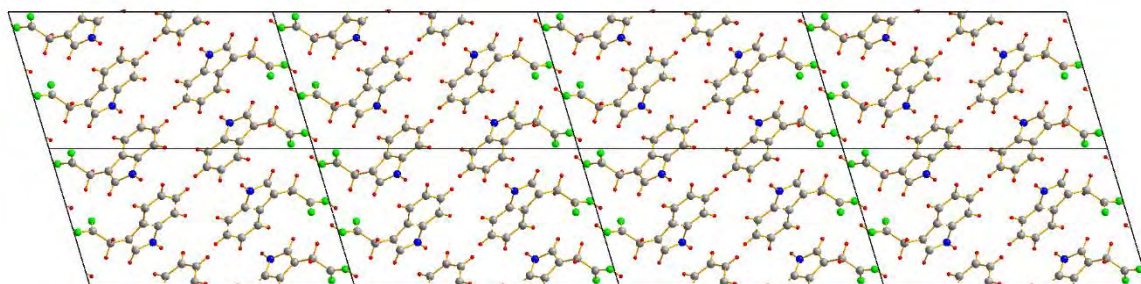


圖 41. 組成 IAA 的 $C_{10}H_9NO_2$ 分子，在沿晶體的 a-軸方向有 4 個單位晶格，且沿晶體的 c-軸方向有 2 個單位晶格，整齊串接排列的示意圖。

表 6. IAA 的 3 個選定部位中 IAA 成週期性整齊排列，所串接的個數。

IAA size	(200) a 軸方向繞射峰	(011) b-c 軸方向繞射峰	(002) c 軸方向繞射峰
Uncontact	29 nm	24 nm	17 nm
Contact	28 nm	19 nm	10 nm
Apex	10 nm	10 nm	8 nm

圖示說明：

- (1) 組成 IAA 的 $C_{10}H_9NO_2$ 分子間，藉由外圍氫原子間的作用力相互吸引，形成整齊串接再一起。(圖 41)

- (2) 分子間整齊串接一起的長度會反映在 X 光繞射峰的峰寬，串接較短繞射峰較寬。由 X 光繞射峰的寬度，以斯瑞爾公式就可以計算出分子串接的長度。
- (3) 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 向下輸送時會串接成整齊的排列。(表 6)
- (4) 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。
- (5) IAA 晶格常數：a = 1.795 nm, b = 0.527 nm; c = 0.961 nm ; b-c = 1.096 nm 。
- (6) IAA 串接數：頂芽 $(10 \times 10 \times 8) / (1.795 \times 1.096 \times 0.961) \approx 420$ 個串一起。
- (7) IAA 串接數：接觸面 $(28 \times 19 \times 10) / (1.795 \times 1.096 \times 0.961) \approx 2,800$ 個串一起
- (8) IAA 串接數：非接觸面 $(29 \times 24 \times 17) / (1.795 \times 1.096 \times 0.961) \approx 6,300$ 個串一起。
- (9) 非接觸面 IAA 的體積為接觸面 IAA 體積的 $6300/2800 \approx 2.3$ 倍。

主要結論：

- (1) 川七頂芽滋生的 IAA 僅 60% 有 COOH 鏈。
- (2) IAA 向下輸送到非接觸面時，約 6,300 個 IAA 週期性串接在一起，但具活性的 IAA (接有 COOH 鏈) 僅剩 40%。
- (3) IAA 向下輸送到接觸面時，約 2,800 個 IAA 週期性串接在一起，但具活性的 IAA (接有 COOH 鏈) 僅剩 30%。
- (4) IAA 有 COOH 鏈，為有活性的狀態。川七莖體中有活性的 IAA 含量為：頂芽 > 非接觸面 > 接觸面。

➤ 以拉曼散射及表面增益拉曼散射探討 IAA 中 COOH 的鍵結

1. 以拉曼散射探討萃取粉末 IAA 中 COOH 的鍵結

圖 42 為 IAA 中 $C_{10}H_9NO_2$ 原子團間的排列情形，其中兩 $C_{10}H_9NO_2$ 原子團間並無化學鍵結。若 COOH 脫離 $C_{10}H_9NO_2$ 原子團，C8-C9 間的鍵結會減弱，而反映在 C8-C9 間分子振動

模式上。C8-C9間分子振動模式出現在 1253 cm^{-1} 拉曼峰(R. M. Lobayan et al., J Mol. Model 17, 1381, 2011)。我們比較自頂芽、接觸面、非接觸面萃取的粉末在 1250 拉曼位移區的譜圖，以 C8-C9 間的振動能量(拉曼峰位移)及拉曼振動峰寬來探討 3 部位的 IAA 中 COOH 的鍵結。

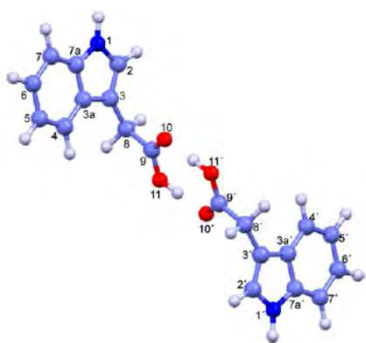


圖 42. IAA 中 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ 原子團間的排列情形，淺藍色小球標示 C 原子，深藍色小球標示 N 原子，紅色小球標示 O 原子，白色小球標示 H 原子。圖中數字為對各原子的標號，便於討論。

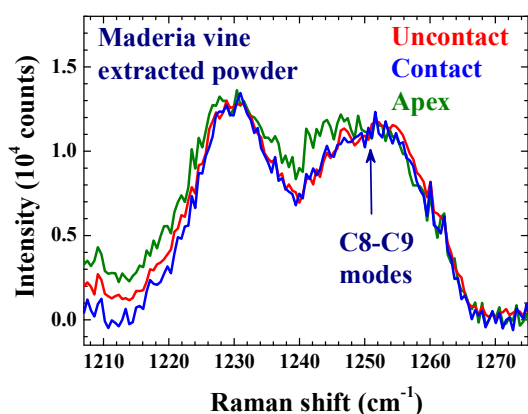


圖 43. 自川七頂芽(綠色)、捲曲莖接觸面(藍色)、捲曲莖非接觸面(紅色)萃取的粉末在 C8-C9 的分子模比較圖。

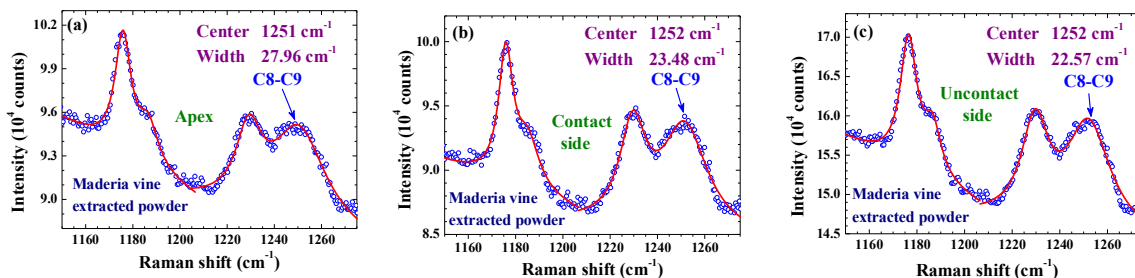


圖 44. 自川七(a)頂芽、(b)捲曲莖接觸面、(c)捲曲莖非接觸面萃取粉末在 1200 cm^{-1} 拉曼位移區的拉曼譜圖。圖中曲線為以羅倫斯曲線(Lorentzian curve)擬合所得的拉曼峰型。

圖示說明：

- (1) 圖 43 及圖 44 為以 785 nm 雷射光為激發光的以 IAA 為內標所萃取粉末的拉曼譜圖。
- (2) 1253 cm^{-1} 拉曼峰是 COOH 中的 C(標示為 C9)與相鄰的 C(標示為 C8)間振動的頻率。
- (3) 頂芽的 C8-C9 拉曼峰明顯較接觸面與非接觸面的拉曼峰寬。(圖 43)
- (4) 圖 44 為以羅倫斯曲線(Lorentzian curve)擬合拉曼峰所得結果。
- (5) C8-C9 拉曼峰振動能量：頂芽為 1251 cm^{-1} 、接觸面與非接觸面均為 1252 cm^{-1} 。(圖 44)
→ 川七 3 個部位的 IAA 中 C8 與 C9 間鍵結強度，並無明顯差異。
- (6) C8-C9 拉曼峰寬：頂芽 27.96 cm^{-1} 、接觸面 23.48 cm^{-1} 、非接觸面 22.57 cm^{-1} 。(圖 44)
→ 相對於非接觸面的峰寬：頂芽寬 25%，接觸面寬 4%。
→ 拉曼分子振動較容易被阻斷，影響振動頻率，而非集中於某個頻率。
→ 頂芽的 IAA 串接的 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ 原子團數目較少。

主要結論：

- (1) 頂芽的 IAA 串接的 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ 原子團數目較少。
- (2) IAA 往莖體向下運輸中，會串接成整齊排列，顯示運送中川七莖體的分子環境利於 IAA 分子間的作用吸力。

2. 以表面增益拉曼散射(SERS)探討接觸面與非接觸面中 IAA 的相對濃度

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。將川七不同部位樣本磨碎，靜置於 95% 酒精中 2 小時，讓塊狀莖沉澱到底部。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。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。透射雷射光除激發 Au 奈米顆粒的 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，以透鏡將拉曼訊號收集入光譜儀，讀取拉曼訊號，得以偵測到。

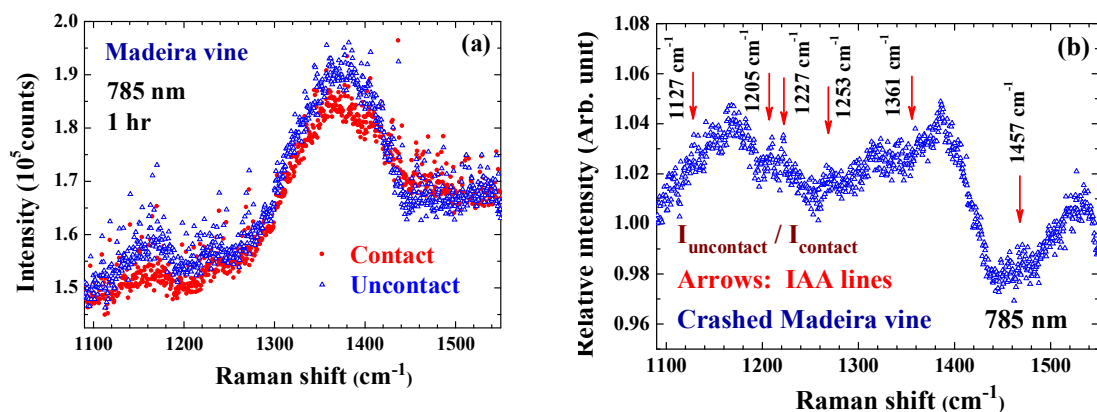


圖 45. (a)川七捲曲莖非接觸面與接觸面的表面增益拉曼譜圖。(b)川七捲曲莖非接觸面相對於接觸面的表面增益拉曼譜圖。

圖示說明：

- (1) 785 nm 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。
- (2) 以高拉曼位移區域($>1600 \text{ cm}^{-1}$)作為訊號么正化(normalization)的對準區。
- (3) 將川七捲曲莖非接觸面的拉曼譜圖與接觸面的拉曼譜圖相除，即可顯現出非接觸面與接觸面拉曼訊號的差異。(圖 45b)
- (4) 非接觸面的 IAA 拉曼訊號，明顯較接觸面者強許多。(圖 45b)
- (5) 圖 44b 中紅色箭頭指處，為 IAA 的特徵拉曼峰位置，可以看出微弱但清晰的峰。
 - 該拉曼區段可以看出 6 個 IAA 的拉曼特徵峰。
 - 川七捲曲莖非接觸面中 IAA 的含量比接觸面者高。

➤ 川七零餘子粉末的抗菌實驗

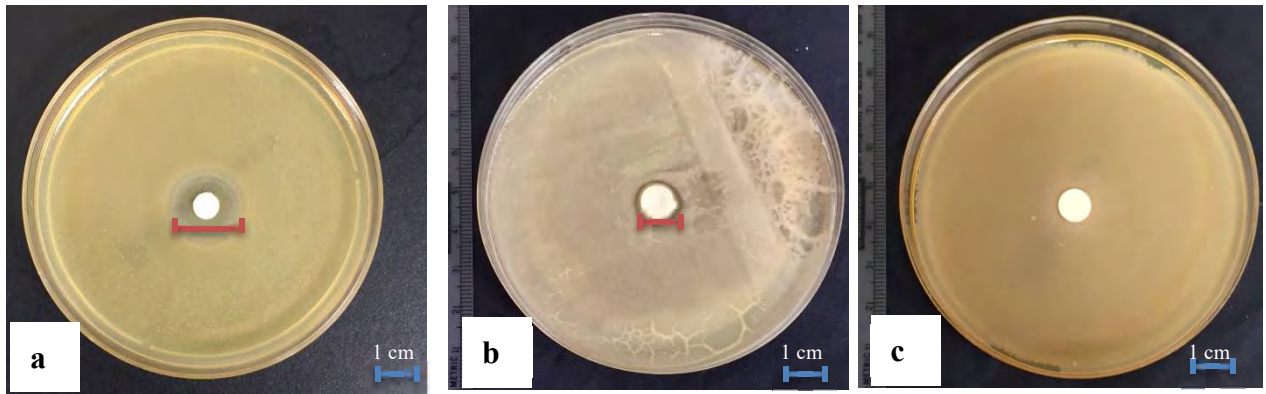


圖 46. (a) Ampicilin disk 抑菌環(positive control)，直徑 18 mm。(b) 100% 川七零餘子萃取液 抑菌環，直徑 12 mm。(c) 1% DMSO 無抑菌環產生(negative control)。

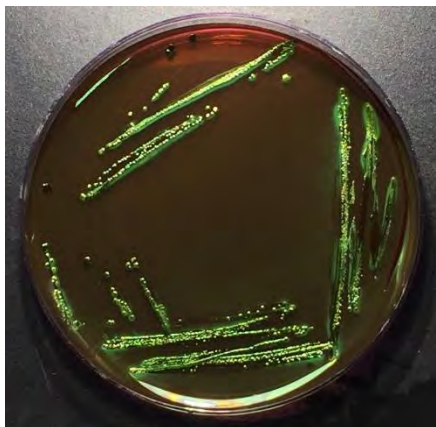


圖 47. 以 E.M.B 培養 K12 大腸桿菌，呈現金色光澤，確認此菌株是大腸桿菌。

圖示說明

(1) 圖 46a、圖 46b 紅色標為抑菌環

(2) 以 TSA+Ampicilin 抗菌貼片、3 種濃度川七零餘子萃取液貼片或 1% DMSO 貼片培養細菌 16-18hr 後，測抑菌環直徑，直徑 $>10\text{mm}$ ，表示對貼片為 Sensitive，有抗菌效果；直徑 $<10\text{mm}$ 表示對貼片為 Resistant，無明顯抗菌效果。初步抗菌實驗結果顯示，100%的川七零餘子萃取液有明顯的抗菌效果。

(二) 討論

川七的頂芽幼莖才有纏繞能力(圖 47)，會自發性的做左旋旋繞擺盪搜尋目標物(圖 48)，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，才能在無攀附物的狀況之下繼續莖生長。



圖 48. 川七主莖纏繞藤本示意圖



圖 49. 川七幼莖自發性的做左旋旋繞擺盪搜尋目標物。

1. 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20)

以長期整體觀之，捲曲莖的生長率為平直莖的生長率的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。

(3) 陽光日照會大幅增強機械性刺激所引起的川七莖體增長。

2. 川七捲曲莖表皮細胞及運輸 IAA 的近維管束薄壁細胞長度測量

(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遠而漸減，非接觸面的表皮細胞增長率則漸增。

- (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。(圖23)
- (4) 表皮細胞長度的增長率，接觸前與接觸後並無明顯區別，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。(圖24)
- (5) 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。
- (6) 運輸 IAA 的近維管束之薄壁細胞長度，非接觸面>接觸面>頂芽(圖 25) ，非接觸面具有活性的 IAA 較多，細胞生長速率較快，細胞長度拉長，而頂芽處薄壁細胞最小，推測為近生長點細胞較小。

3. 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，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)

4. 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(F. 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。

5. 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。細胞頂部生長素運進細胞的載體蛋白為 AUX/LAX，底部的生長素運出細胞載體蛋白為PIN，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(expansin)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23)

6. 以 X 光繞射直接測量川七莖體 IBA 及 IAA 濃度

- (1) 植物會以時間及空間分配有活性的 IAA(free IAA)，如此的機制對於調節植株的生長及發育非常重要(Enders ., *et al*, 2013)。
- (2) IBA 是一種植物可自行合成的儲存形式生長素，農業上以 IAA 加上 IBA 以及 GA，促進馬鈴薯的發根(Khalid Mahmood Khawar, 2014)。

- (3) 頂芽之 IBA: IAA = 7:3，推測 IAA 於莖頂合成之後，在細胞質中經由 IBA 合成酶先轉換成為儲存形式的 IBA(Zazlimalova, Eva. 2014)，如此使頂芽細胞的 IBA>IAA。
- (4) 捲曲莖之 IBA: IAA = 1:9，川七莖受到物體碰觸的刺激後，IBA 於細胞內過氧化氫酶體經由 β -oxidation，轉換為 IAA(Zazlimalova, Eva. 2014)，促使細胞的生長。

7. 川七莖部三個取樣點的濃度、活性、串接個數比較及實驗主要結果

分析項目 (單位)	IAA濃度 (ng/g)	IBA:IAA	IAA活性 -COOH含量 (%)	胞壁擴張酶 濃度	運輸IAA的薄 壁細胞大小 (μm)	IAA 串接個數	pH值
分析工具	GC-MS SERS	X光繞射	X光繞射	吸收光譜	光學顯微鏡	X光繞射 拉曼散射	pH儀
頂芽	198	7:3	60	中	7.5	420	6.15
接觸面	203	1:10	30	低	13.2	2800	6.3
非接觸面	210	1:10	40	高	17.7	6300	6.1

1. 捲曲莖生長率為平直莖的7.1倍。(圖20)
2. 陽光日照會大幅增強機械性刺激所引起的川七莖體增長。(圖21)
3. 接觸後細胞增長率先減緩，約4小時後，接觸及非接觸面再以高於未接觸前的增長率增長。(圖24)
4. 運輸IAA的薄壁細胞變長，非接觸面為接觸面的1.3倍。(圖22、圖24)
5. 接觸引起的川七莖體非對稱生長，主要表現在細胞變長變寬，而非表現在分裂出較多細胞上。(圖27、圖28)
6. 川七捲曲莖最終 H^+ 濃度：非接觸面>頂芽>接觸面；非接觸面較高濃度的 H^+ 會帶動IAAH cotransport，提升IAA的運輸效率。(表3)
7. 非接觸面的活化胞壁擴張酶基因，胞壁擴張酶合成量較多。(圖31)
8. 非接觸面有活性的IAA比例比接觸面大10%。(圖36、圖42)
9. IAA分子串接個數非接觸面為接觸面的2.3倍，與運輸IAA分子的薄壁細胞大小成正比關係，細胞大，IAA分子濃度高，推測運輸IAA的囊泡也較大。
10. 川七頂芽中IBA含量約為IAA含量的2.3倍。(圖34、圖35)
11. IAA濃度：IAA (C) + IAA(UC) = 2× IAA(A) (表4)；頂芽IBA濃度是IAA的2.3倍(圖34、表5)；捲曲莖體中IBA的濃度已大幅減少(表5)。推測IAA於頂芽被合成之後，先轉換為IBA，受到接觸的刺激，再轉換回IAA。IAA因應環境刺激的變化而轉換，為植物調節生長與發育的重要方法。
12. IAA分子串接個數非接觸面為接觸面的2.3倍(圖36)，與運輸IAA分子的薄壁細胞大小成正比關係，細胞大，IAA分子濃度高，推測運輸IAA的囊泡也較大。

8. IAA 於川七捲曲莖三個取樣部位運輸示意圖(川七莖部縱切)

依據實驗結果推測機械性刺激於川七向觸性表現的綜合影響：

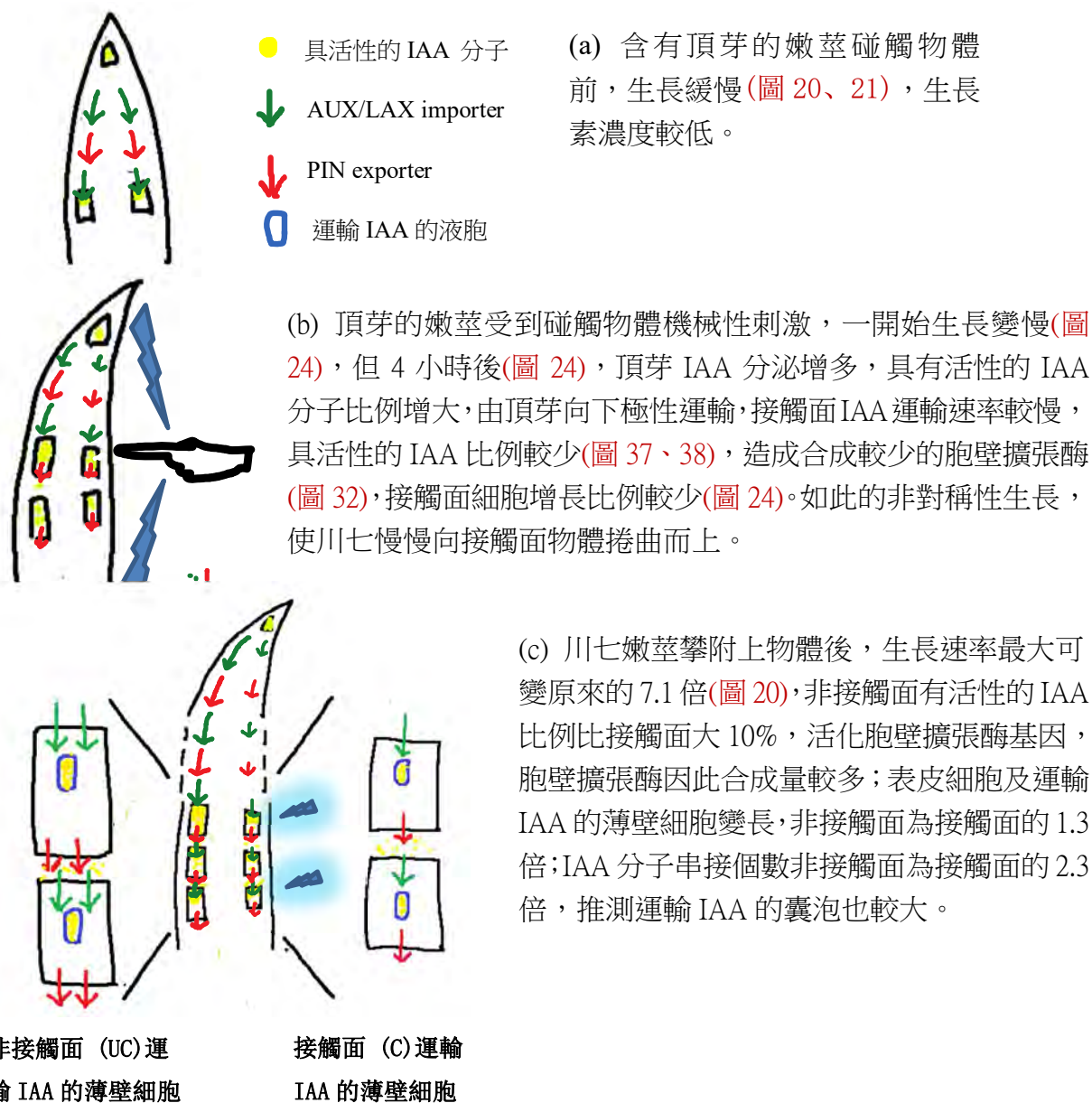


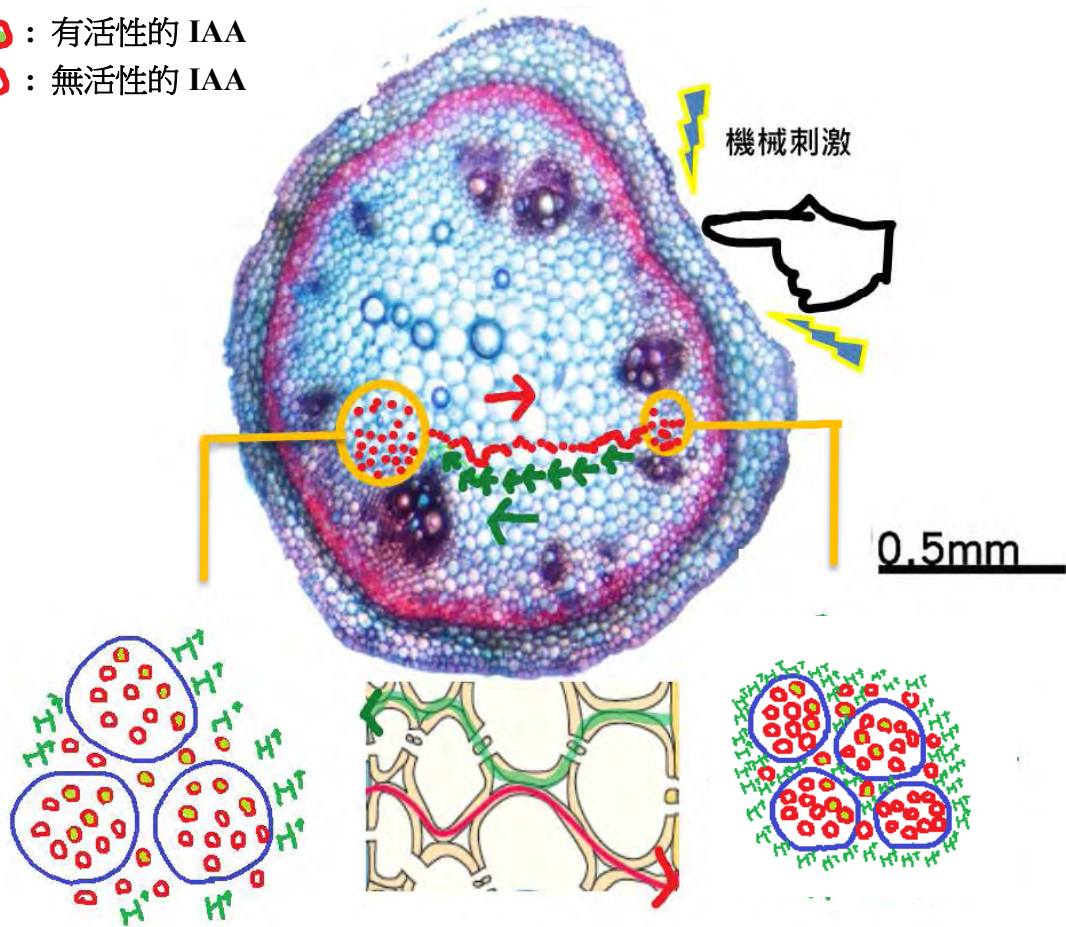
圖 50. IAA 受外來機械刺激，引起 IAA 非對稱下莖體運輸的過程示意圖。

圖片說明：

圖中只顯示部分運送 IAA 的進維管束薄壁細胞，綠色實線代表將 IAA 運進細胞 AUX/LAX 膜上運輸載體，紅色實線代表將 IAA 運出細胞的 PIN 膜上運輸載體，因為必為 AUX/LAX 在近頂芽端，PIN 遠離頂芽端，因此 IAA 為由頂芽往下的極性運輸方式。植物細胞以調整 AUX/LAX 及 PIN 的數量，控制 IAA 運輸的速率。

9. IAA 於接觸面、非接觸面運輸示意圖(川七莖部橫切)

- H⁺：氫質子濃度
- ：有活性的 IAA
- ：無活性的 IAA



非接觸面	H ⁺ ：低	←	高	接觸面(C)
(UC)運輸	有活性的 IAA：高	→	低	運輸 IAA 的
IAA 的薄	無活性的 IAA：高	→	低	薄壁細胞
壁細胞	電化學梯度：低	←	高	

圖 51. 一開始接觸物體時川七莖表現向觸性的過程示意圖。



圖 52. 川七莖體碰觸物體所引起生長效應示意圖。

四、結論與應用

(一) 結論

1. 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。
2. 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%。
3. 接觸引起的非接觸面生長速率較快，使表皮及近維管束薄壁細胞均較長。
4. 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%。
5. 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。
6. 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。

(二) 應用

1. 以 X 光繞射法直接測川七莖體樣本，比對 IAA、IBA 標準品 X 光繞射特徵鋒，除了可以檢測樣本裡特定部位的 IAA、IBA 相對濃度，進一步可以確認 IAA、IBA 分子層次的改變，此方法確實可行。可以降低以 HPLC、GC-MS 樣本檢驗法的複雜程序及時間消耗，也可減少樣本流失率。此法可做為日後檢驗生物樣本裡微量物質濃度及分子組態之參考。
2. 川七零餘子之粉末萃取物質有抗菌的顯著效果，日後可以進一步確認此抗菌物質成分為何，以及其其他藥用功效等等。

五、未來展望

以 X 光繞射法直接測川七莖體樣本，測定莖體中 IAA 與 IBA 的比例，已證實可行。以吸收光譜直接量測川七莖體樣本，測定莖體中活性 IAA 以及細胞擴張酶的相對含量，已證實可行。以拉曼譜圖直接量測川七莖體樣本，亦已證實可觀測到 IAA 中 COOH 的振盪模組。但目前 X 光繞射、吸收光譜、以及 SERS 的數據分析還在初步階段，尚待進一步分析出數據所含的資訊。但這些實驗均非 in vivo 活體實驗，我們規劃精進實驗技術，進一步進行川七植物活體 in vivo 實驗：

- (1) 設計特殊樣品載台，進行活體川七莖體各段的 X 光繞射實驗，解析從頂芽向下各段川七莖體中 active from IAA 與 storage from IBA 的比例。除了可以檢測樣本裡特定部位的 IAA、IBA 相對濃度，進一步可以確認 IAA、IBA 分子成分的改變。(目前是將川七切斷進行實驗，且僅進行 3 區段的實驗)
- (2) 本實驗區分非接觸面與接觸面的樣品，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。
- (3) 陽光日照會大幅增強機械性刺激所引起的川七莖體增長，其主因雖可推測為陽光利於催促 β -oxidation，使 IBA 轉換成 IAA。其中分子層面的運作機制，尚無數據可用。
- (4) 接觸後細胞增長率先減緩，約 4 小時後，接觸及非接觸面再以高於未接觸前的增長率增長。值得設計實驗，做深層探討。
- (5) 川七莖部接觸面與非接觸面除了 IAA 的濃度及活性不同之外，還有哪些組成分子有差異，來主導向觸性，值得進一步研究。
- (6) 川七莖體觀測到的環烯醚 $C_{15}H_{22}O_8$ ，且非接觸面的環烯醚含量比接觸面的含量明顯高出許多。本實驗中環烯醚相關數據資訊，尚未能收集到足夠的實驗數據，做進一步瞭解。可規劃從吸收光譜中，在獲取較多資訊，做進一步分析。
- (7) 川七零餘子的抗菌實驗，嚴格說起，應該僅是初步測試階段與結果。川七零餘子的應用以及藥用分析，也是一個值得繼續研究的主題。

六、參考文獻

1. Badot, P. M., Millet, B. & Melin, D. (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.
2. Braam J. & Davis R. W. (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*. Feb 9;60(3):357-64.
3. Chen, M. C., Chen M. R., Lee, K. C., Li, W. H., Ou, S. Y. & Tsai, S. D. (1995) Effect of silver-nanoparticle aggregation on surface-enhanced Raman scattering from benzoic acid. *Phys. Rev. B* 51, 4507-4515.
4. Chuang, M. T., Hou, W. C. & Lin, Y. S. (2007) Ancordin, the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions. Elsevier Inc doi:10.1016/j.peptides.2007.04.011
5. Cosgrove, D. J., Li, L. C. & Tabuchi, A. (2011) Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *The Plant Journal* 68, 546–559.
6. Enders, T. A., Korasick, D. A. & Strader, L. C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 9, pp. 2541–2555, doi:10.1093/jxb/ert080 Advance Access publication 10 April, 2013
7. Esmon, C. A., Liscum, E. & Pedmale, U. V. (2005) Plant tropisms: Providing the power of movement to sessile organism *Int. J. Dev. Biol.* 49: 665-674.
8. Graham, E. T. & Joshi, P. A. (1995) Novel Fixation of Plant Tissue, Staining through Paraffin with Alcian Blue and Hematoxylin, and Improved Slide Preparation.
9. Huberman, M. & Jaffe, M. J. (1986) Thigmotropism in organs of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany* 57, 133-137.
10. Hussein, A. A., Meyer, J. J. M. & Tshikalange, T. E. (2005) Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases *Journal of Ethnopharmacology* 96 515–519

11. Jaffe, M. J., Leopold, A. C. & Staple, R. C. (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *American journal of botany*. 89(3), 375-382.
12. Jiang, Y., Nan, Z. D., Tian, S. H., Tu, P. F., Wang W. N., Zeng K. W. & Zhao M. B. (2016) Anti-inflammatory iridoids from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim Desert. *Chin J Nat Med*. 2016 Jan; 14(1), 61-5. doi: 10.3724/SP.J.1009.2016.00065.
13. Kumlay, Ahmet Metin. (2014). "Combination of the Auxins NAA, IBA, and IAA with GA3 Improves the Commercial Seed-Tuber Production of Potato (*Solanum Tuberosum*L.) Under In Vitro Conditions." *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014, pp. 1–7., doi:10.1155/2014/439259.
14. Larson, A. C. & Von Dreele, R. B. (2004) General Structure Analysis System (GSAS). LANL Report 2004, LA-UR-86-748.
15. Rosana Maria Lobayan, María Celia Pérez Schmit, Alicia H. Jubert, and Arturo Vitaleet, (2011) *Mol. Model* 17, 1381.
16. Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1992) *Plant Physiology* Fourth edition p.363-364.
17. Zazilmalova, Eva. (2014). *Auxin and Its Role in Plant Development*. New York: Springer Wien.
18. Health, Nutrition, Lifestyle (2014) The benefits of irinoids. Retrieved October 31th, 2017, from <http://healthsourceiridoids.wordpress.com/2014/07/06/the-benefits-of-iridoids/>

【評語】 060005

1. 本研究主題有深度而且有創意，資料的呈現有很高的水準，值得肯定。
2. 本研究以高端的化學及物理分析技術，如 X 光繞射、吸收光譜、拉曼散射、光學顯微影像、氣相層析質譜儀、高效液相層析儀等，探討川七生長素 IAA，由頂芽向植物體輸送過程中，因碰觸引發非對稱性生長的現象與生長素在活體內之濃度、活性及分子結構變化的相關性。由偵測及分析的結果，可以深入解析非對稱性生長與 IAA 生長素之濃度分佈、活性及分子結構變化的相關性。本研究有非常高的技術及分析水平，論文的架構規劃及結果解析均為一流，已達發表在國際期刊的水準，超過大部分研究生的研究水準。
3. 本研究作品只要再加以確認分析結果之正確性及重現性，加上圖及表之優化，及強化重要創新成果的論述，應可發表在國際高端的學術期刊。
4. 文獻引用不確實及格式不一致，內文中有多篇引用文獻沒有蒐錄在參考文獻中。