

# 中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 植物學科

佳作

052101

從分子層面探究藤蔓植物川七向觸引發快速攀  
附生長

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高一 李浩熏	指導老師： 馬瑪宣
---------------	--------------

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

## 摘要

川七為藤蔓植物，以 3.5~4 小時週期逆時針迴旋盤轉，碰觸物體後即以該物體為支撐快速攀附生長，速率可提升達 30 倍之多。本實驗探究川七啟動向觸生長的生長素機制。活體 (*In vivo*) X 光繞射，發現川七莖體中含多量的 IAA，以及較少活性極高的 4-Cl-IAA 及 6-Cl-IAA，且生長素並非以分子的形態，而是串接成週期性排列的晶體形態存在。攀附後，頂芽增生 109% 的 IAA 及 191% 的 4-Cl-IAA+6-Cl-IAA，激發快速生長，且較多數的 4-Cl-IAA+6-Cl-IAA 被輸送到莖的非接觸面，形成彎曲莖體，纏繞支撐體。pH 值測量顯示非接觸面氫離子濃度較高，吸收光譜則顯示非接觸面含有較多擴張蛋白，利於細胞壁的延長。本實驗由分子層面了解川七受到機械刺激時，如何引發向觸快速生長以及不對稱性生長。

## 壹、前言

### 一、研究背景

#### (一) 向觸性

向觸性(Thigmotropism)為植物向性(Tropism)的一種，在植物的藤蔓(Vine)表現尤其明顯。當植物接觸物體表面或受到機械刺激時，莖的兩側會出現生長速度的差異，使植株向接觸面彎曲，進而攀爬於物體表面(Braam, 2005)。達爾文(Charles Darwin, 1809~1882)是最早研究植物根部向觸性的科學家之一(Darwin & Darwin, 1881)。

植物表現向觸性時，細胞的生長速度由生長素(auxin)濃度調控。當生長素濃度出現非對稱性差異(Asymmetric auxin distribution)時，莖部會表現出快速生長(Fast growth)以及非對稱性生長(Differential growth)(Michniewicz et al., 2007)。

#### (二) 生長素(Auxin)與極性運輸(Polar transport)

生長素(Auxin)為植物賀爾蒙種類之一，主要功能為控制植物生長(Growth)與形態生成(Morphogenesis)。植物能嚴密的控制生長素的生成(Biosynthesis)、活化(Activation)、去活化(Inactivation)、與運輸(Transport)。在天然植物中常見的生長素有 Indole-3-acetic acid (IAA)、Indole-3-butyric acid (IBA)、Phenylacetic acid (PAA)、與 4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA)。其中，具高活性的 4-Cl-IAA 在特定生長

發育階段扮演重要角色(Reinecke, 1999)。

表 1：生長素分子及其功能舉例(Korasick et al., 2013)

植物	具活性	吲哚-3-乙酸(IAA)、4-氯吲哚-3-乙酸(4-Cl-IAA)、苯乙酸(PAA)
天然合成	去活性	吲哚-3-丙酮酸(IPyA)、吲哚乙醯胺(IAM)、吲哚-3-乙醛肟(IAOx)、吲哚-3-乙腈(IAN)、吲哚-3-乙醛(IAAld)
	儲存用	吲哚-3-丁酸(IBA)、甲基-吲哚-3-乙酸(MeIAA)
人工合成		2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、1-萘乙酸(NAA)、汰克草(Dicamba)、畢克爛(Picloram)

生長素的運輸機制特殊，主要為極性運輸(Polar transport)。根尖及頂芽可分泌生長素，藉由一個個細胞依序運輸至所需部位。其機制如下：IAA 在細胞質中易解離成 IAA<sup>-</sup> 及 H<sup>+</sup>。IAA<sup>-</sup> 藉由載體蛋白主動運輸離開細胞膜，H<sup>+</sup> 藉由幫浦蛋白初級主動運輸離開細胞膜。由於細胞質與質外體的 H<sup>+</sup> 濃度的差異，IAA 可以與 H<sup>+</sup> 藉由同向協同運輸(Cotransport)進入下一個細胞。(Rayle & Cleland, 1992)

### (三) 酸生長假說(Acid-growth hypothesis)與擴張蛋白(Expansin)

IAA 無法直接造成細胞壁的延長，而是藉由活化氫離子幫浦，降低質外體 pH 值，進而活化擴張蛋白改變纖維素間的連結(Duan et al., 2018)。在質外體酸性環境下，擴張蛋白能使微纖維絲(Cellulose micelle)上的多醣類之間的氫鍵鬆脫，使其結構變得鬆散；再由細胞自身吸水膨脹，造成細胞壁的延長。

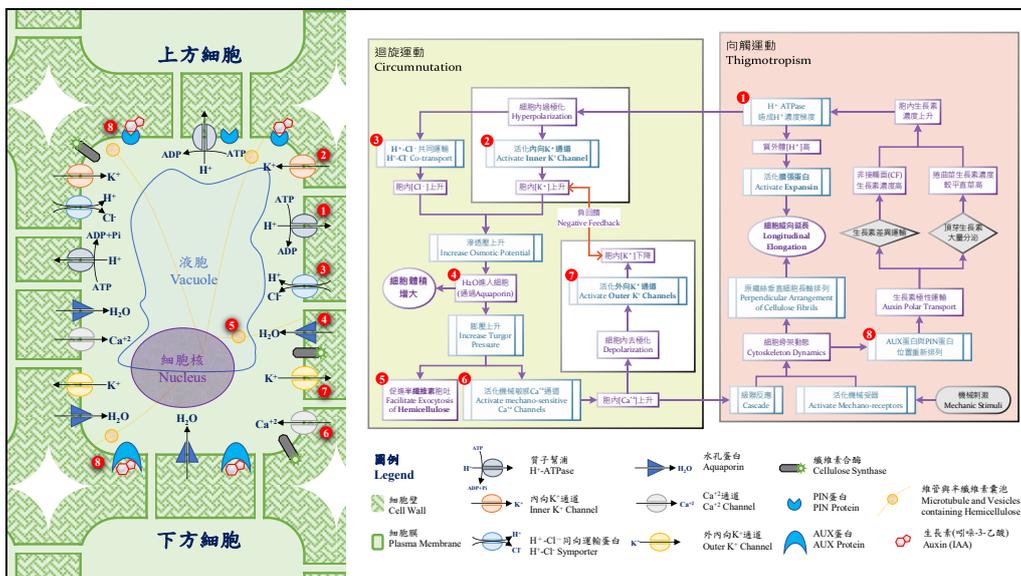


圖 1：迴旋運動與向觸運動關聯的機制(Stolarz, 2009)

## 二、研究動機

不像部分的動物具有神經系統，可以整合與控制其生長以及對環境的反應，植物依然能夠協調各個細胞表現出「傾性(Nastic)」及「向性(Tropism)」運動。達爾文在晚年研究植物時，提出了 Root-Brain hypothesis 即是在探討植物中像大腦一樣發出指令的部位。其中，由生長素所調控的向觸性，機制較未明確。因此，本實驗欲藉由分子層面的分析，探討造成向觸受激生長的因素。

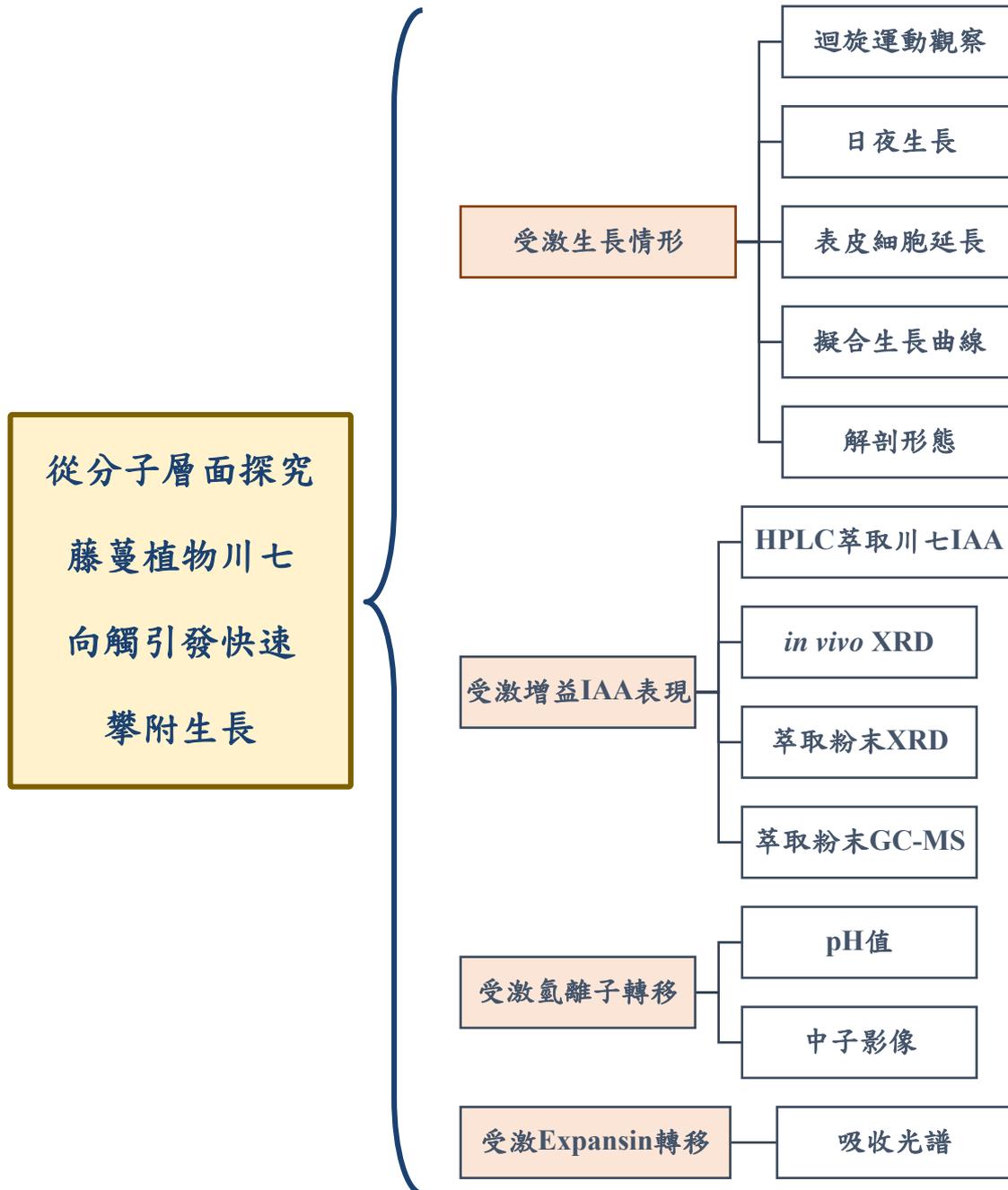


圖 2：實驗設計。

### 三、研究目的

- 觀察與採集野外川七，並分析其生長情形
- 觀察川七的表皮細胞以及截面解剖形態
- 利用 *in vivo* X 光繞射分析活體川七中的 IAA 情形
- 以 HPLC 萃取川七中的 IAA 及其衍生物
- 運用 X 光繞射及 GC-MS 對川七 IAA 萃取做定性及定量分析
- 測量川七不同部位的 pH 值並分析其氫離子濃度
- 以吸收光譜分析川七中的 IAA 與擴張蛋白(Expansin)

## 貳、研究設備及器材

表 2：研究設備及器材

川七採集於台北市信義區及新北市樹林區													
藥品	番紅 O(Safranin O)、艾爾遜藍(Alcian Blue)、酒精、甲醇(MeOH)、IAA (SIGMA)、抗氧化劑 (BHT、Ascorbic acid)、己烷(Hexane)、乙酸乙酯(EtOAc)												
儀器	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">X 光繞射儀(Bruker D8)</td> <td style="width: 50%;">SpeedVac 離心機</td> </tr> <tr> <td>吸收光譜(SPEX 1682A)</td> <td>分液收集器(GILSON)</td> </tr> <tr> <td>pH 測定儀(RADIOMETER COPENHAGEN)</td> <td>電磁加熱攪拌器</td> </tr> <tr> <td>冷凍乾燥機(LABCONCO)</td> <td>複式顯微鏡</td> </tr> <tr> <td>分液收集器(GILSON)</td> <td>顯微側微器</td> </tr> <tr> <td>微量天秤(HENGX600)</td> <td>石英容器</td> </tr> </table>	X 光繞射儀(Bruker D8)	SpeedVac 離心機	吸收光譜(SPEX 1682A)	分液收集器(GILSON)	pH 測定儀(RADIOMETER COPENHAGEN)	電磁加熱攪拌器	冷凍乾燥機(LABCONCO)	複式顯微鏡	分液收集器(GILSON)	顯微側微器	微量天秤(HENGX600)	石英容器
X 光繞射儀(Bruker D8)	SpeedVac 離心機												
吸收光譜(SPEX 1682A)	分液收集器(GILSON)												
pH 測定儀(RADIOMETER COPENHAGEN)	電磁加熱攪拌器												
冷凍乾燥機(LABCONCO)	複式顯微鏡												
分液收集器(GILSON)	顯微側微器												
微量天秤(HENGX600)	石英容器												
耗材	培養皿、花盆、燒杯、試管、剪刀、木枝、載玻片、蓋玻片、組織刀片、鑷子、指甲油、棉花棒、吸水紙巾												
軟體	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Lapse It (縮時攝影)</td> <td style="width: 50%;">Diamond (模型繪製)</td> </tr> <tr> <td>OriginPro 9.5 (圖表繪製)</td> <td>GSAS (XRD 分析)</td> </tr> <tr> <td>Tracker (影片分析)</td> <td></td> </tr> </table>	Lapse It (縮時攝影)	Diamond (模型繪製)	OriginPro 9.5 (圖表繪製)	GSAS (XRD 分析)	Tracker (影片分析)							
Lapse It (縮時攝影)	Diamond (模型繪製)												
OriginPro 9.5 (圖表繪製)	GSAS (XRD 分析)												
Tracker (影片分析)													

## 一、川七

### (一) 簡介

洋落葵(Madeira vine, 簡稱 MV), 學名 *Anredera cordifolia*, 俗名川七、藤三七、熱帶皇宮葉, 落葵科洋落葵屬, 多年生草本植物。原產於熱帶美洲巴西, 在台灣為外來種, 分布於低拔地區。喜歡高日照與高濕度環境, 為陽性植物。

川七為藤蔓植物, 肉質莖多分支且生長迅速。新生的莖為淺綠色, 老莖為木質褐色。葉片呈卵形, 單葉互生。全緣, 肉質且厚, 表面光滑具有光澤。將葉子捏碎可感受到黏液。

川七於夏末秋初開花, 小型白色穗狀, 但果實鮮見。主要行無性繁殖, 其莖上之肉芽「零餘子」可長成新的植株。(Eriksson, 2007)

### (二) 採集地點

野外的川七多生長於山壁上, 本實驗採用的川七則採集自台灣台北市信義區信義路六段 76 巷 8 弄南側(N25.0341447°, E121.5770157°)的山坡旁, 以及台灣新北市樹林區大安路 386 巷 9 號大棟山、大同山、青龍嶺步道旁(N24.9911546°, E121.4146073°)。

### (三) 採集方法

由於向觸性使然, 川七生長時會沿著圍欄、枯枝、其他樹木等物體攀爬, 或是兩條川七藤互相纏繞。

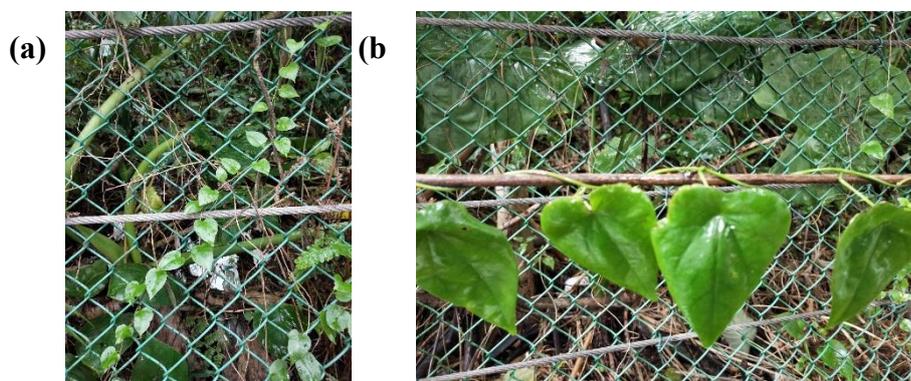


圖 3：(a)攀附於圍牆上的野生川七。(b)攀附於樹枝上的野生川七。

採樣的川七分為兩類, 分別為：

(1) 平直莖(Straight, 簡稱 ST)：未接觸到物體, 自然向上生長的莖。

(2) 捲曲莖(Curly)：一側接觸到物體，明顯攀藤彎曲生長的莖。

包含：接觸面(Contact，簡稱 **CT**)與非接觸面(Contact-free，簡稱 **CF**)。

其中，捲曲莖的收集需連同其攀附之物體一併取回。

欲採樣的川七，用剪刀於頂芽下方約 20 cm 處剪斷，連枝葉一併裝入塑膠袋內。採下後，需於一小時之內將其放入裝有自來水的大燒杯中，使其切口處泡水而頂芽不可泡水。底部泡水的川七可保存五天，若莖開始變軟、頂芽萎縮、葉子下垂，則不可繼續使用該株樣本。

## 叁、研究過程或方法

### 一、川七生長觀察

#### (一) 種植

##### 1. 扦插法

- (1) 剪下川七莖，連帶數片葉子及頂芽。
- (2) 將川七莖浸入混有些許泥土的水，至於照光處 2~3 週。
- (3) 等待到切口處及葉芽處長出白色的不定根。
- (4) 移入土壤中種植。

##### 2. 壓條法

- (1) 將較粗長的川七莖頂芽剪去，以降低頂芽優勢。
- (2) 把莖彎曲，並選一個葉子較大的節(node)埋入土中。
- (3) 在埋入土中的節處多澆水並照光，在 1~2 週後可見側芽冒出，且白色不定根長出。
- (4) 待側芽葉子長出後，將節的兩側的莖剪斷，留下中間的一個新植株。

##### 3. 無性繁殖－零餘子

顧名思義，「零餘子」就像是「多餘」的「孩子」，是部分植物特有的無性繁殖構造。川七的零餘子是老莖結成瘤狀的構造，在 4~5 月可大量發現於川七藤上。將零餘子埋入土中，1 週內會冒出根及莖，只要注意濕度不可過低，即能長成完整的植株。(圖 4a)

#### 4. 攀藤架製作

為了觀察川七生長的方向，在川七盆栽旁放置了供其攀爬的支架。

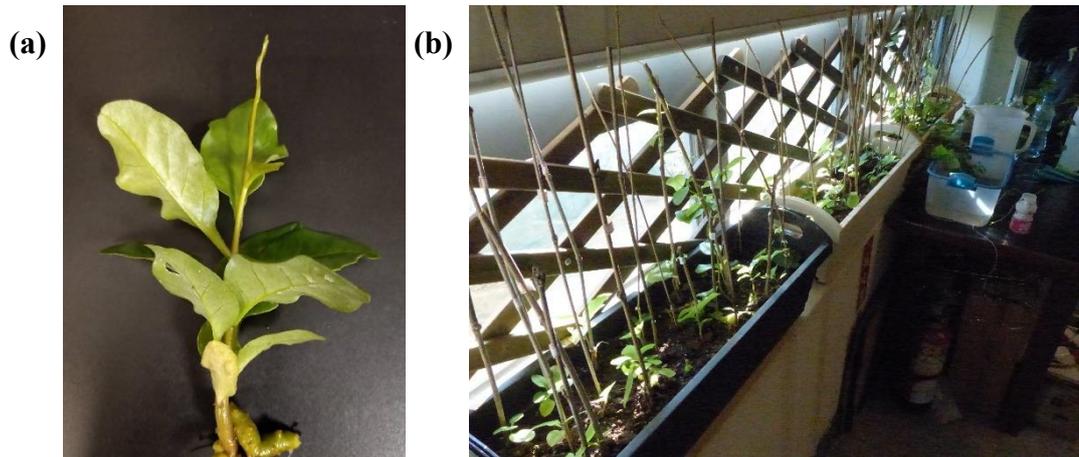


圖 4：(a)無性繁殖構造「零餘子」長出新的川七植株。(b)實驗室內川七種植剪影。

#### (二) 迴旋運動觀察

##### 1. 莖部標示

為了方便標示一固定點觀察莖部生長情形，以一條白色的細線鬆綁於頂芽下方 1 cm 處。

##### 2. 生長紀錄

- (1) 挑選頂芽以下長度大於 5 cm，為捲上任何物體的川七植株，種植於花盆中。
- (2) 架設手機腳架，運用 Lapse It 手機 APP 進行縮時錄影：每半小時 1 張，連續拍攝 24 小時。

##### 3. 生長分析

以 Tracker 軟體對莖上辨識點進行移動路徑分析，繪製移動曲線。

#### 二、縱切川七藤並顯微量測細胞長度

##### (一) 縱切切片觀差表皮細胞

向觸運動可視為迴旋運動的延伸(Darwin & Darwin, 1881)；而迴旋運動時，以膨壓變化造成運動的細胞群（或組織）被稱為「Motor cells (tissue)」，存在於表皮(Epidermal cells)與近表皮的皮層薄壁細胞(Parenchymal-subepidermal Cells)(Stolarz, 2009)。因此，我們測量最外層的表皮（單層細胞）之長度，觀察在向觸受激之後 Motor cells 推動迴旋運動或向觸受激生長情形的長度延長差異。製備表皮細胞玻片

的方法有以下兩種：

(1) 撕片法：用刀片在表皮上切出一個缺口，再用鑷子將其輕輕撕下，留下完整的表皮。

(2) 薄片弦切片(Tangential section)法：將刀片沿著表皮輕輕劃下，使一層表皮細胞分離。(Yeung, 1998)

## (二) 實驗步驟

1. 取頂芽下方 1 cm 處，製作表皮細胞切片水埋玻片。
2. 距離頂芽 2 cm 處製作玻片，重複至距離頂芽 14 cm 處。
3. 將玻片置於複式顯微鏡上以 400x 觀察。
4. 隨機取樣 60 個表皮細胞，測量其長度。

## 三、橫切川七藤染色並測量

### (一) 橫切切片

川七為雙子葉草本植物，莖的構造由外而內可分為表皮(Epidermis)、皮層(Cortex)、維管束(Vascular bundle)、及髓(Pith)。表皮具有排列緊密的表皮細胞(Epidermal cell)以及數個氣孔(Stomata) (保衛細胞(Guard cell)及副衛細胞(Subsidiary cell))，外層有角質層包覆。皮層具有支持功能厚角細胞(Collenchymatous cell)，儲存水分和養分的薄壁細胞(Parenchyma cell)。維管束則包含運輸養分的韌皮部(Phloem)、維管形成層(Vascular cambium)、及運輸水分的木質部(Xylem)。髓則由薄壁細胞組成，功能為儲存養分。

### (二) 染色

川七的橫切切片以番紅(Safranin O)及艾爾遜藍(Alcian blue)雙重染色。

Safranin O 為橙紅色染劑，可染木質化的細胞。

Alcian blue 為藍色染劑，可染具有纖維素的細胞。

### (三) 實驗步驟

1. 取平直及捲曲川七莖，並在捲曲莖的非接觸面塗一層指甲油用以標示。
2. 在解剖顯微鏡下，將川七泡在裝有自來水的培養皿中，用刀片切下縱切薄片。

3. 製作成水埋玻片，觀察未染色的構造。
4. 不可按壓蓋玻片，否則破壞切片的立體結構。
5. 在樣本上滴一滴 Alcian blue 染劑，等待 30 秒。
6. 用吸水紙巾將染劑吸除，滴水沖洗樣本 3 次並吸乾。
7. 以 75%酒精沖洗樣本 3 次並吸乾，再滴水沖洗樣本 1 次並吸乾。
8. 在樣本上滴一滴 Safranin O 染劑，等待 30 秒。
9. 用吸水紙巾將染劑吸除，滴水沖洗樣本三次。
10. 以 75%酒精沖洗樣本 3 次並吸乾，再滴水沖洗樣本 1 次並吸乾。
11. 製作成水埋玻片，觀察染色後的構造。

#### 四、*in vivo* X 光繞射

##### (一) 原理

IAA 分子式為  $C_{10}H_9NO_2$ ，結構為一芳香雜環吲哚(Indole)於 3 號碳位置加上羧甲基(Carboxymethyl group)。每個原子皆有其固定的位置和鍵結，形成一定堆疊方式的晶體，故 X 光繞射會有特定的繞射封。

X 光繞射的原理，可用布拉格定律(Bragg's law)解釋 (圖 5)：

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

( $n \in \mathbb{N}$ ； $\lambda$ ：入射波長； $d$ ：晶格內的平面間距； $\theta$ ：入射波與散射平面之夾角)

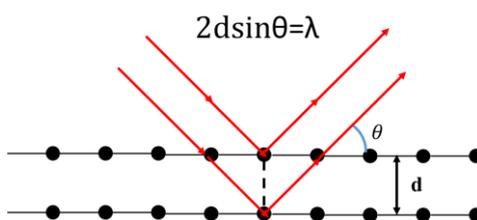


圖 5：布拉格繞射(Bragg diffraction)示意圖

##### (二) 實驗方法

1. 將待測物置於載台上。
2. 以每小時 1 度的測量不同 $\theta$ 時的繞射強度。
3. 以 GSAS 軟體擬合分析數據(Toby & Von Dreele, 2013)。

## 五、吸收光譜

### (一) 實驗原理

原子和分子在吸收能量後會產生狀態的改變，由電子在軌域的位置決定。電子在吸收與其躍遷(Jump)所需能量相同的光子時，就可以發被激發到較高能階的軌域上。因此，由於每一種原子與分子之電子組態的差異，產生出的光譜譜線不盡相同。原子的譜線可使用芮德柏公式(Rydberg Formula)計算，分子的譜線則可用分子軌域理論(Molecular Orbital Theory)推算。

當光源發出的光線穿透物質實，物質會吸收特定波長的光，使得光強度減弱。光的吸收率 $A$ 可用比爾－朗伯定律表示(Beer-Lambert Law)來表示。

$$A = -\log_{10} \frac{I_t}{I_0}$$

( $A$ ：吸光度； $I_t$ ：透射光的強度； $I_0$ ：入射光的強度)

藉由比對不同波長時的吸光度 $A$ ，即可得知樣本內是否含有 IAA、IAA 衍生物、或擴張蛋白(Expansin)。

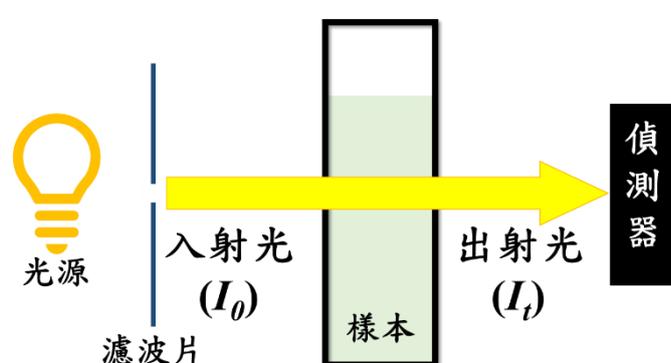


圖 6：吸收光譜架設示意圖。

### (二) 實驗方法

1. 將待測物溶於 99.5%酒精。
2. 置於內部空間 2 mm 厚的石英容器中。
3. 用穿透式架設測量待測物的吸收光譜。
4. 比對數據，分析待測物中有無 IAA、IAA 衍生物、或其他與向觸有關之生長因子。

## 六、pH 值測量

### (一) 實驗目的

由酸生長假說可知，在細胞延長的部位，其質外體  $H^+$  濃度應較高，方能軟化纖維素，並活化擴張蛋白催化纖維素的重組、延長。因此，由向觸受激生長情形的兩個層面切入，可推測：

- (1)快速生長：捲曲莖  $H^+$  濃度 > 平直莖  $H^+$  濃度；
- (2)差異生長：非接觸面  $H^+$  濃度 > 接觸面  $H^+$  濃度。

### (二) 實驗步驟

1. 取川七頂芽下方 1 cm 處。
2. 在離心管中 100 個樣本浸泡於 500  $\mu$ l 中性雙蒸餾水(ddH<sub>2</sub>O)。
3. 浸泡 10 分鐘。
4. 以 pH buffer 校準 pH meter。
5. 以 pH meter 測量川七浸泡液的 pH 值。

## 七、以高效液相層析法(HPLC)萃取川七樣本 IAA

### (一) 實驗原理

高效液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, abbreviated as HPLC)為定性與定量分析常用的方法，運用層析的方法分離帶測物中的物質。移動相為液體，固定相為固體。待測物溶液在 HPLC 系統中，在進樣裝置與移動相（溶離液）混合，由送液幫浦打入固定相管柱之中。在移動相推動待測物向前時，部分物質與固定相有更強的相互作用，造成其滯留力較強，較慢抵達偵測器；相反地，與移動相有較強相互作用的溶液則較易移動，較快抵達偵測器。不同的滯留力，造成待測物中不同的物質分離。可針對某一特定時刻偵測器偵測到的物質收集，就能達到純化的效果。(Malviya et al., 2010)

### (二) 實驗步驟

1. 乾燥
  - (1)將器材使用 MeOH 及中性洗劑清洗，放入烘箱烘乾備用。

- (2) 取川七樣品，放入離心瓶中秤取鮮。
  - (3) 以液態氮覆蓋川七，使其降溫。
  - (4) 放入事先預冷-50°C 的冷凍乾燥機中乾燥。
2. 萃取
- (1) 將川七放入研鉢中，加入液態氮並等其揮發，加入海砂研磨。
  - (2) 用 80% MeOH 溶解粉末，置於離心瓶中。
  - (3) 在 4°C 下以 18000 rpm 離心 10 min，將上清液倒入試管中。
  - (4) 離心瓶內加入 10 ml 80% MeOH，在 4°C 下以 18000 rpm 離心 10 min。將上清液倒入試管中。
  - (5) 吹入氮氣，使 MeOH 揮發至約剩下 1 ml。
3. 添加抗氧化劑（20  $\mu$ l BHT + 100  $\mu$ l Absorbic Acid）與內標（100 ng IAA）。
4. 分配(Partition)
5. 第一次 HPLC：打入 50 ng IAA 標準品，測試層析時間
6. 第二次 HPLC：打入樣品萃取液，使用分液收集每 1 min 一管並乾燥。
7. 收集
- (1) 以 MeOH 清洗 HPLC 收集之樣本。
  - (2) 乾燥，MeOH 蒸發，剩下的即是萃取 IAA 粉末。

## 八、氣相層析質譜法(GC-MS)

### (一) 實驗原理

氣相層析質譜法(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, abbreviated as GC-MS)為化學定性定量分析的一種方法，結合氣相層析法(Gas Chromatography)以及質譜法(Mass Spectrometry)。氣相層析法運用物質與氣態移動相與液態固定相交相互作用不同，分離出物質及其含量。質譜法則將物質氣化後離子化，在外加電場使力子偏轉，藉由偏轉角度得各個化合物的荷質比，進而計算出分子量。

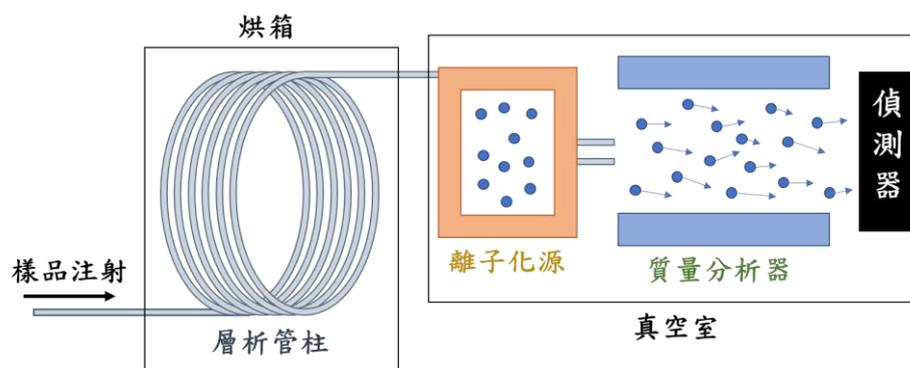


圖 7：氣相層析質譜儀(GC-MS)架設示意圖。

## (二) 實驗步驟

### 1. 甲基化

- (1) 加入 30  $\mu\text{l}$  100% MeOH 至玻璃瓶中，溶解樣本。
- (2) 加 1 ml Diazomethane 後靜置 1 min。
- (3) 加入 20  $\mu\text{l}$  HOAc，與 Diazomethane 反應產生乙酸甲酯(MeOAc)。

### 2. 矽化

- (1) 玻璃瓶內加入 50  $\mu\text{l}$  吡啶(Pyridine)與 100  $\mu\text{l}$  BSTFA-1%TMCS 混合均勻，在 93°C 下反應 30 min。

### 3. GC-MS

- (1) 加入 50  $\mu\text{l}$  吡啶入樣本，移入小套管內。
- (2) 用 Autosample 收取 1  $\mu\text{l}$  打入 GC-MS 分析。

## 肆、研究結果

### 一、向觸受激快速生長

#### (一) 日夜生長差異

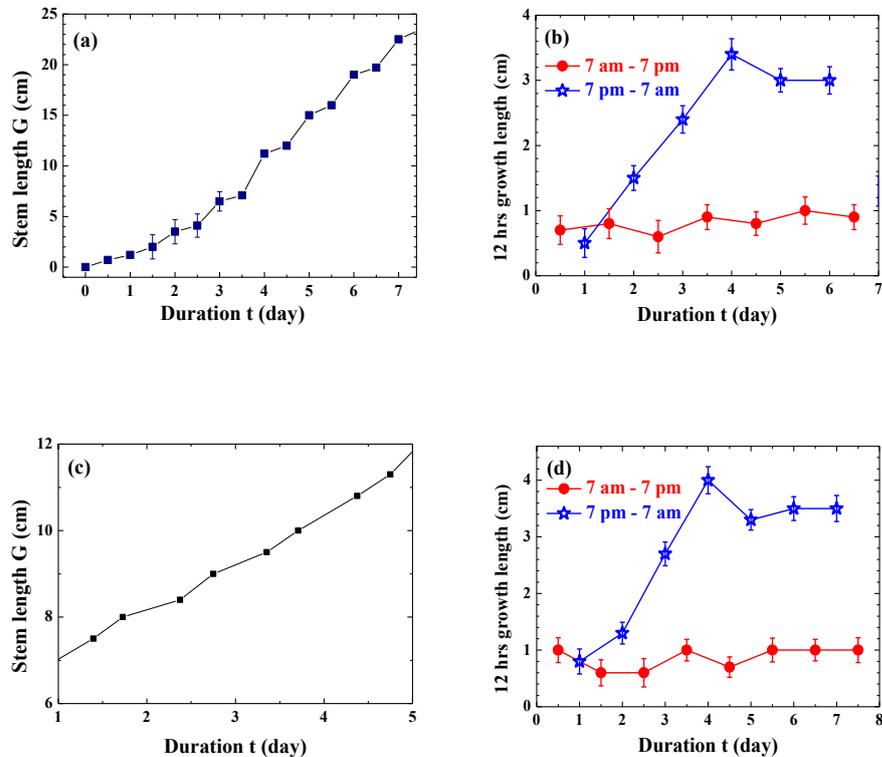


圖 8：川七的生長情形。每日 7 am 與 7 pm 各測量一次長度，連續紀錄一週。(a)(c)為兩株川七的長度與生長時間的關係。(b)(d)為兩株川七的日間(7 am ~ 7 pm)與夜間(7 pm ~ 7 am)的生長率比較。

1. 川七莖每日約可加長 3 cm，一週約加長 25 cm。
2. 川七的生長，夜間較日間快。(圖 8b、8d 藍色與紅色曲線)
3. 夜間生長速率最高可達日間的 $(4/0.7 =)5.71$ 倍。

#### (二) 迴旋運動

1. 為了尋找物體攀附，尚未攀附生長的川七會進行迴旋運動，使頂芽以圓形軌跡掃過周圍區域。
2. 無論在何處的川七，皆進行左旋（逆時針）迴旋運動。
3. 根據生長縮時攝影，迴旋運動的週期約為 3.5~4 小時。

4. 未攀附生長的莖會漸漸木質化，以支撐植株繼續延長；已攀附生長的莖則較不易木質化，會保持綠色並在非接觸側長出葉子。

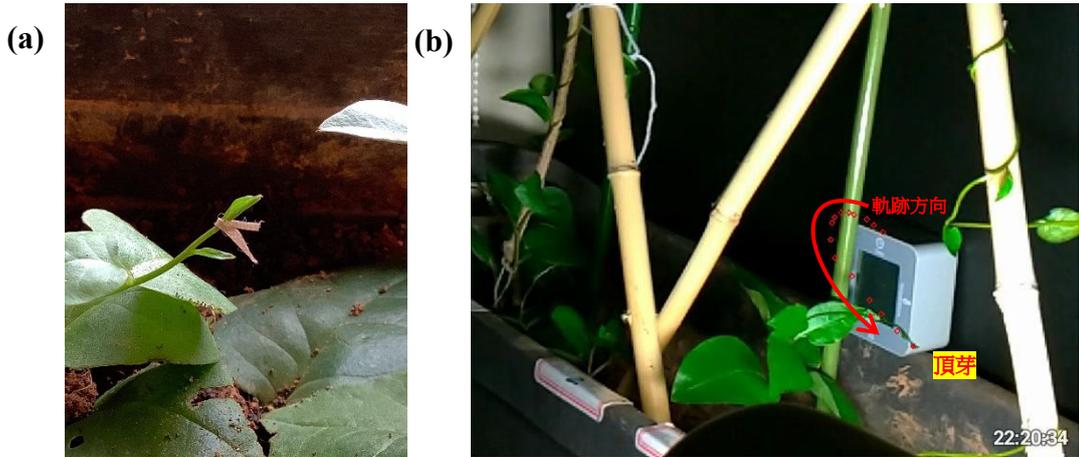


圖 9：(a)以細繩標示的川七頂芽。(b)迴旋運動軌跡剪影。

## 二、向觸受激表皮細胞增長

### (一) 表皮細胞長度

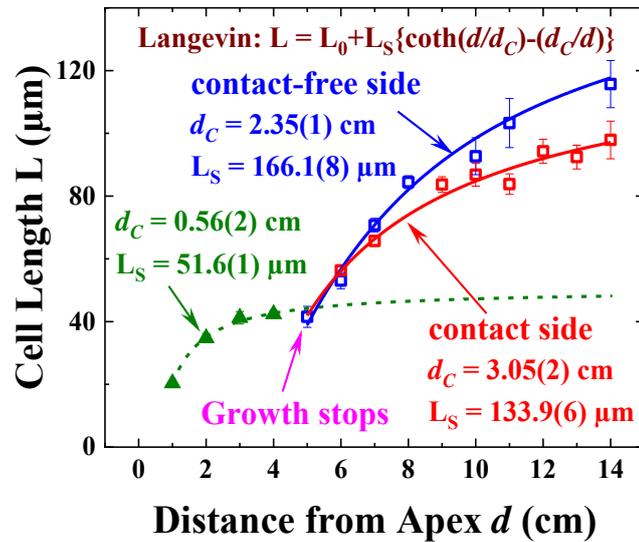


圖 10：川七莖的不同部位之表皮細胞長度及擬合曲線

1. 從頂芽(Apex)為開始，向下每 1 cm 取一個樣本點，以顯微影像分析測量表皮細胞長度。
2. 無論是何部位的川七莖，距離頂芽越遠表皮細胞的長度皆增長。
3. 不受外力影響的生長時，與頂芽的距離對莖部表皮細胞的長度的關係，可以使用朗之萬函數(Langevin function)來表示(Coffey & Kalmykov, 2011)：

$$L = L_0 + L_s \times \left\{ \coth\left(\frac{d}{d_c}\right) - \left(\frac{d_c}{d}\right) \right\}$$

當與頂芽距離 $d$ 極遠時， $L$ 趨近於 $L_0 + L_s$ 。

4. 頂芽為新生成之部位，傾向於向上延展，表現攀纏的向觸性較弱，故歸類為直莖。(圖 10 中綠色曲線)
5. 接觸後表皮細胞的長度有明顯提升，高於直莖預測長度。
6. 非接觸面(CF)的表皮細胞長度明顯較接觸面(CT)的長，以最大長度估算，約為 1.24 倍。(圖 10 中紅色曲線與藍色曲線比較)

## (二) 解剖形態比較

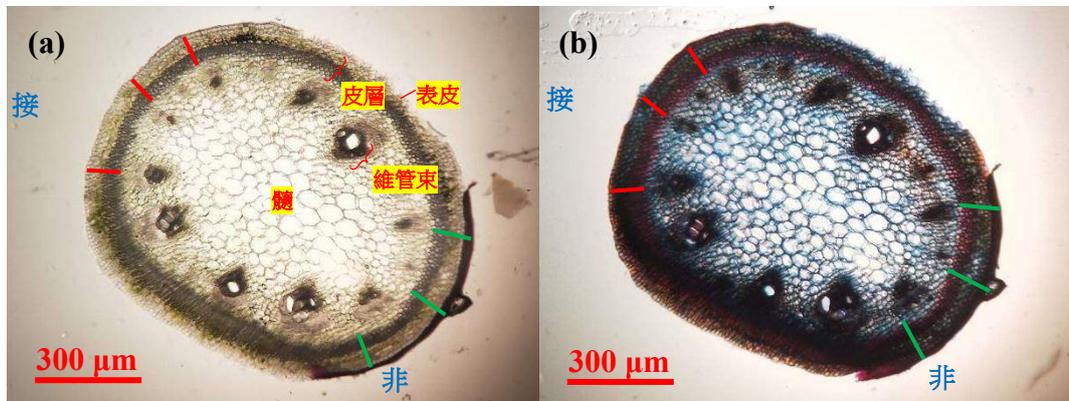


圖 11：(a)未染色的川七捲曲莖截面。(b)以 Alcian blue 染劑及 Safranin O 染劑染色的川七捲曲莖截面。

1. 川七為雙子葉草本植物，在莖的截面可觀察到表皮、皮層、維管束、及髓等構造。(圖 11a)
2. 紅色薄膜（右下角）為以指甲油標記之捲曲莖非接觸面。
3. 染色後，可見皮層細胞中，有一圈較紅的區域，是 Safranin O 所染出的木質化細胞。定義：皮層木質化帶細胞之外的的部分，稱之為「外皮層」。
4. 非接觸面的外皮層厚度大於非接觸面，並達顯著差異， $P < 0.01^{**}$ 。

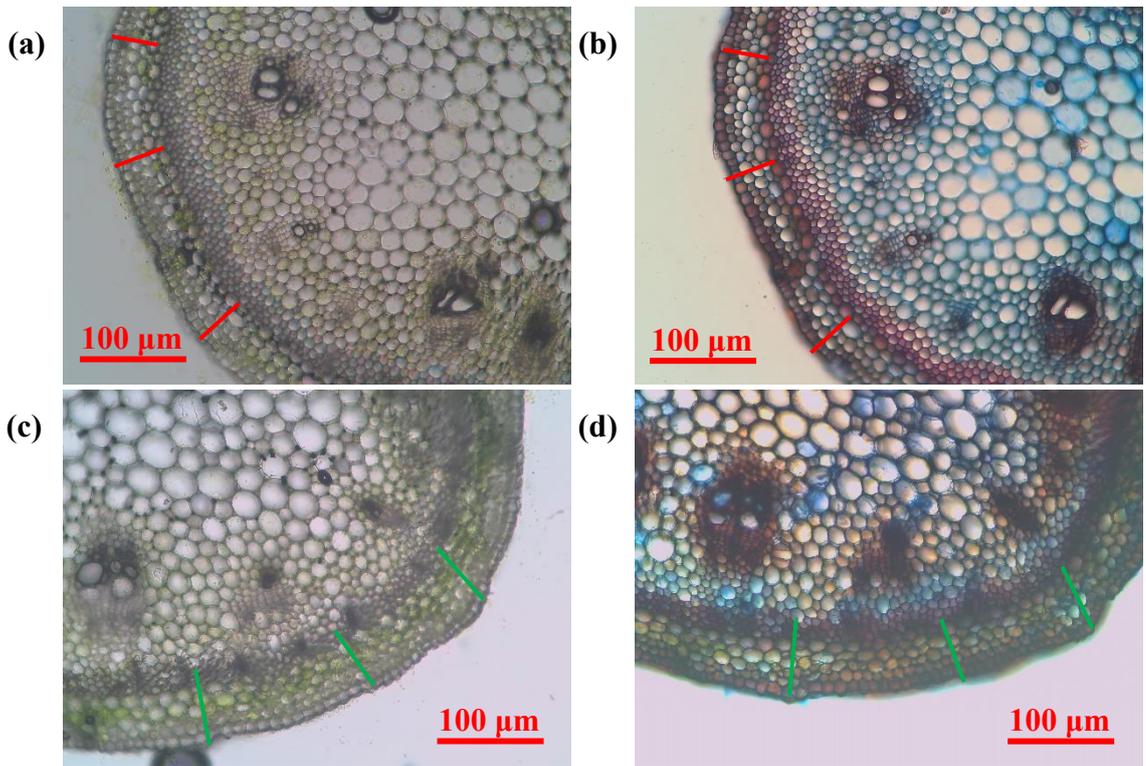


圖 12：(a)未染色接觸面。(b)染色接觸面。(c)未染色非接觸面。(d)染色非接觸面。

### 三、向觸受激增益 IAA 表現

#### (一) *In vivo* X 光繞射比較莖部不同部位的 IAA 差異

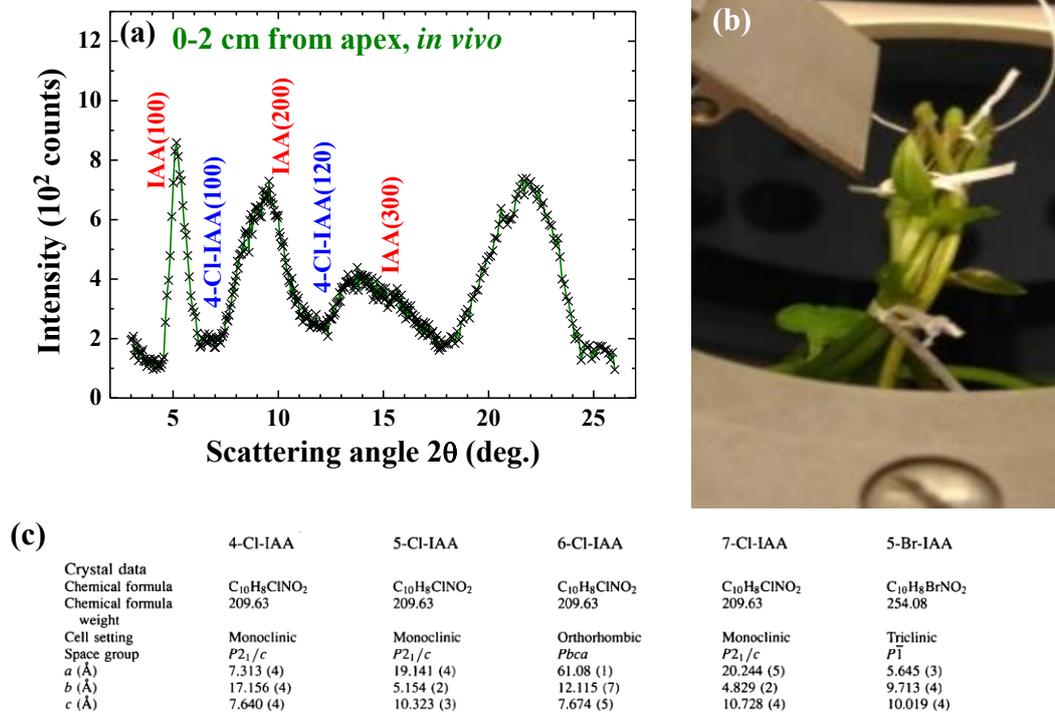


圖 13：(a)捲曲莖非接觸面的 *in vivo* X 光繞射譜圖。紅色標示為 IAA 繞射峰，藍色標示為 4-Cl-IAA 繞射峰。(b)*In vivo* XRD 架設。(c)根據參考資料論文(Nigović et al., 1996)，IAA 及其

鹵化物的 X 光繞射峰值資料及晶格模型。

1. 川七 *in vivo* X 光繞射採用特殊架設。(圖 13b)
2. 對照參考資料的 X 光繞射峰資料(圖 13c)，可得知在未接觸的川七莖 *in vivo* X 光繞射譜圖可見 IAA 及 4-Cl-IAA 繞射峰。
3. IAA 的峰形明顯較 4-Cl-IAA 為明顯，兩者有強度上的差異。

## (二) 川七萃取粉末 X 光繞射譜圖

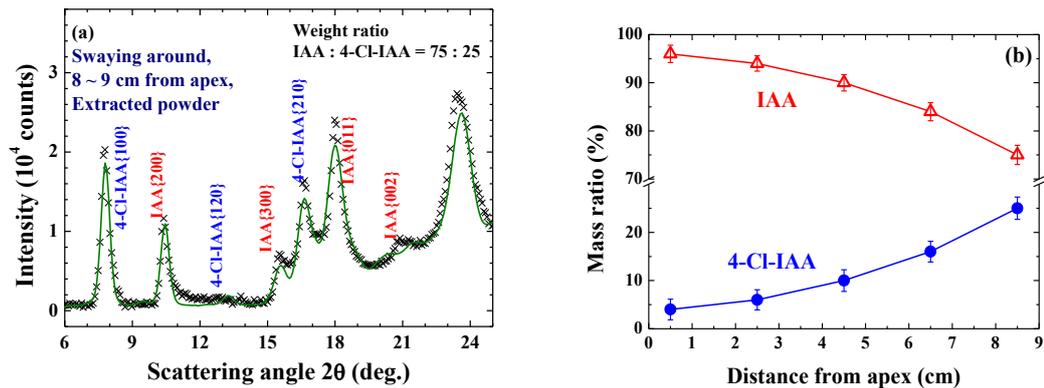


圖 14：(a)自然旋轉生長(未引發向觸性)的川七之萃取粉末之 X 光繞射譜圖。紅色標示為 IAA 繞射峰，藍色標示為 4-Cl-IAA 繞射峰。(b)具離頂芽不同長度的部位之 IAA 與 4-Cl-IAA 比例。

1. 未接觸的川七莖之萃取粉末，可觀察到 IAA 及 4-Cl-IAA 的繞射峰。
2. 對於不同位置的莖，其 IAA 與 4-Cl-IAA 的比例不同。
3. 距離頂芽越遠，4-Cl-IAA 所佔比值上升。(圖 14b)
4. 4-Cl-IAA 具有較高活性，能促進生長。因此，距離頂芽越遠，IAA 所表現的促進作用越顯著。

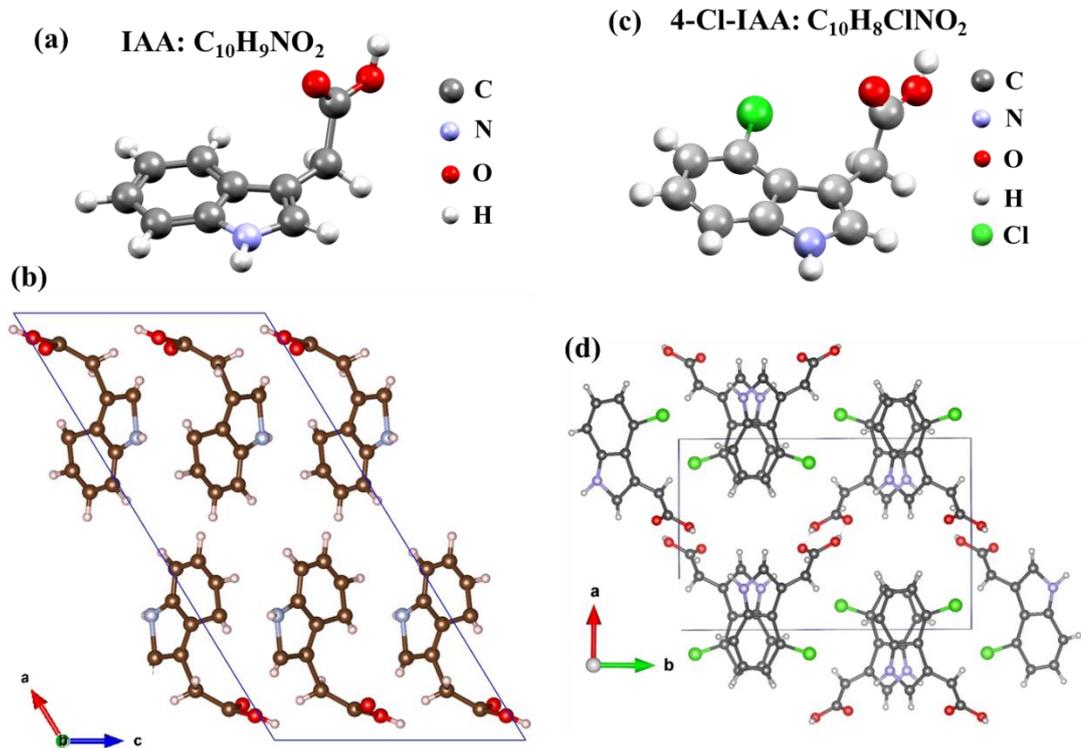


圖 15：(a) IAA 之分子結構模型。(b) IAA 之晶格結構模型。(c)4-Cl-IAA 之分子結構模型。(d)4-Cl-IAA 之晶格結構模型。

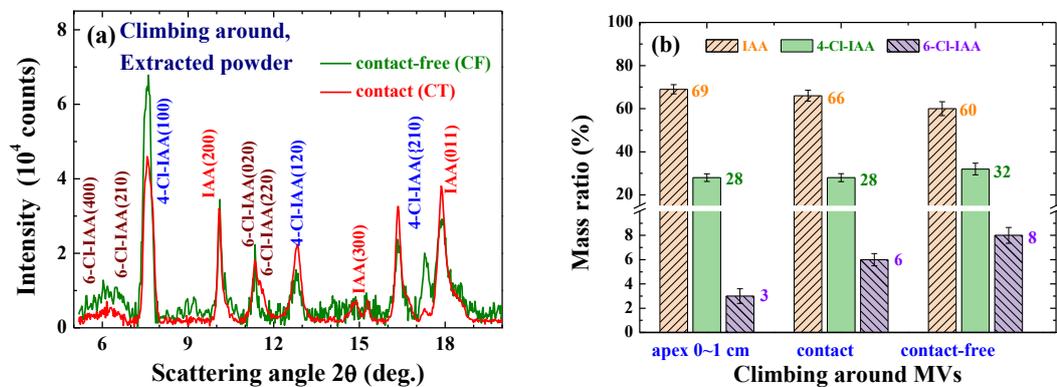


圖 16：(a)捲曲莖萃取之 IAA 的 X 光繞射譜圖。(b)根據 X 光繞射譜圖峰形的高度，得知的 IAA 及其衍生物之質量比例。

1. 紅色為捲曲莖的接觸面(CT)萃取 IAA 之 X 光繞射譜圖，綠色為非接觸面(CF)萃取 IAA 之 X 光繞射譜圖。(圖 16a)
2. IAA 的繞射峰（紅色標示）在接觸面表現較明顯；4-Cl-IAA（藍色標示）及 6-Cl-IAA（綠色標示）在非接觸面表現較明顯。
3. 從比例上來看，4-Cl-IAA 及 6-Cl-IAA 在非接觸面比例較高，佔約 40%。(圖

16b)

(a) 6-Cl-IAA:  $C_{10}H_8ClNO_2$

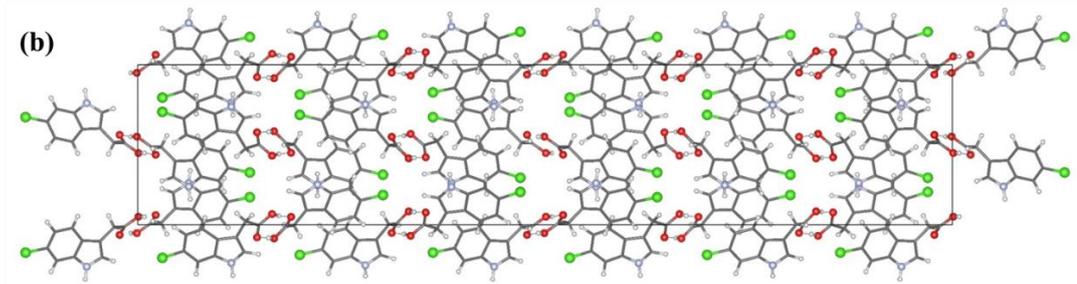
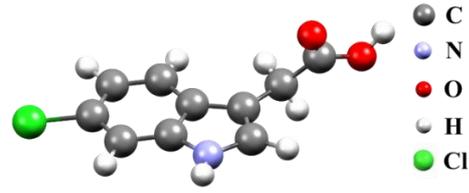


圖 17：(a)6-Cl-IAA 之分子結構模型。(b)6-Cl-IAA 之晶格結構模型。

(三) GC-MS 之 IAA 定量分析

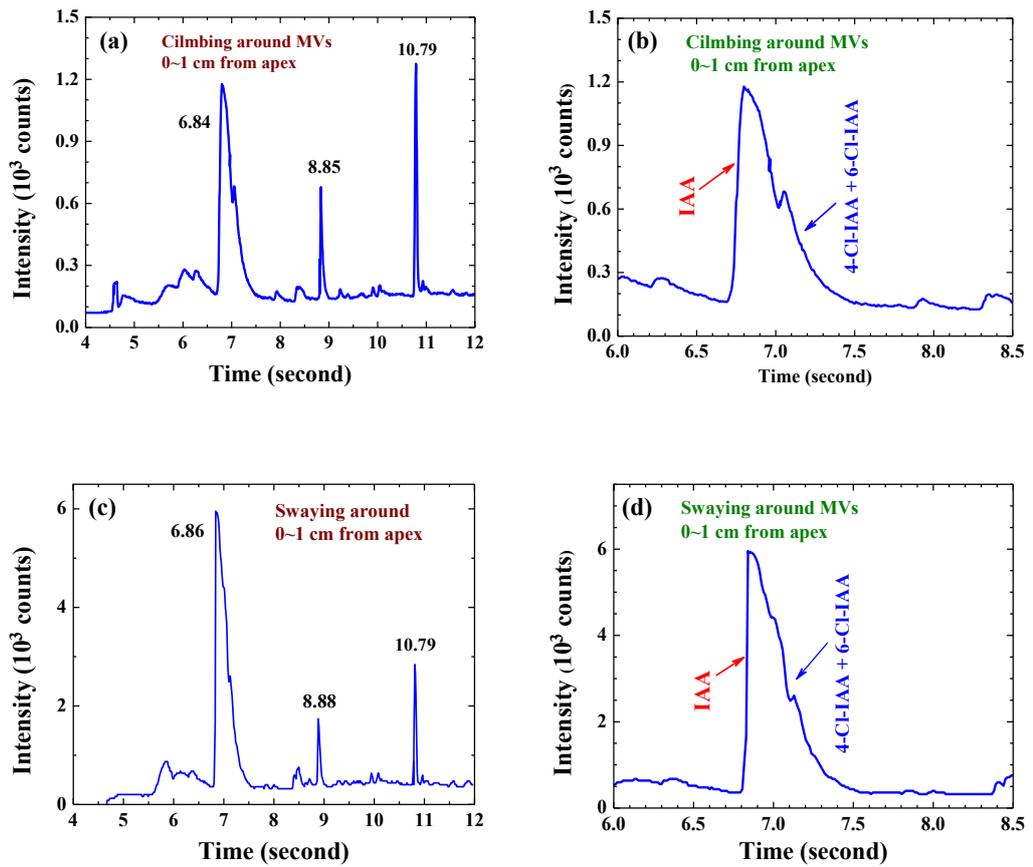


圖 18：不同川七部位的 GC-MS 結果

1. 捲曲生長時，頂芽多分泌了 9% 的 IAA 及 91% 的 4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA。

- IAA 濃度在非接觸面(CF)最高，達到頂芽的 1.38 倍。
- 4-Cl-IAA 及 6-Cl-IAA 佔 IAA 的比例在非接觸面(CF)最高，為頂芽的 1.92 倍。

表 3：GC-MS 之川七 IAA 含量定量分析

	IAA (ng)	4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA (ng)	Total (ng)
	每公克乾燥川七莖		
迴旋運動川七 頂芽下 0~1 cm	141	23	164
攀附生長川七 頂芽下 0~1 cm	153	44	197
接觸面(CT) 接觸點下 0~5 cm	177	32	209
非接觸面(CF) 接觸點下 0~5 cm	159	61	226

#### 四、向觸受激氫離子轉移

##### (一) 實驗結果

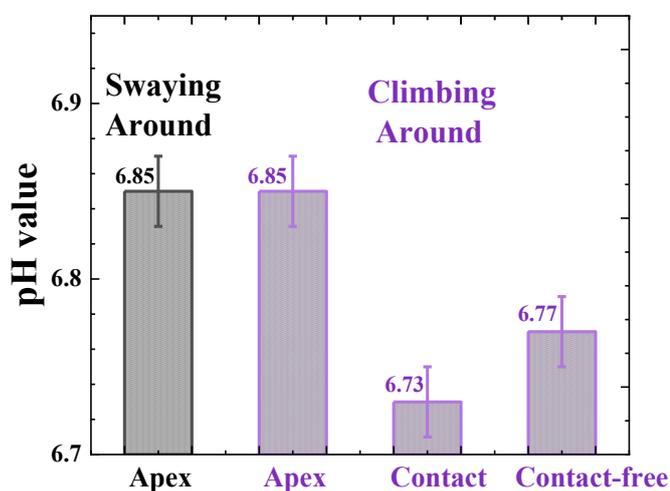


圖 19：川七不同部位的 pH 值

- 各部位的 pH 值皆小於 7.0，呈現酸性。
- 其中以接觸面及非接觸面（延長較快的兩個部位）低於頂芽（生長素作用較低的部位），顯示捲曲生長時氫離子濃度較高，約為 1.2 倍。

## 五、向觸受機擴張蛋白(Expansin)轉移

### (一) 實驗結果

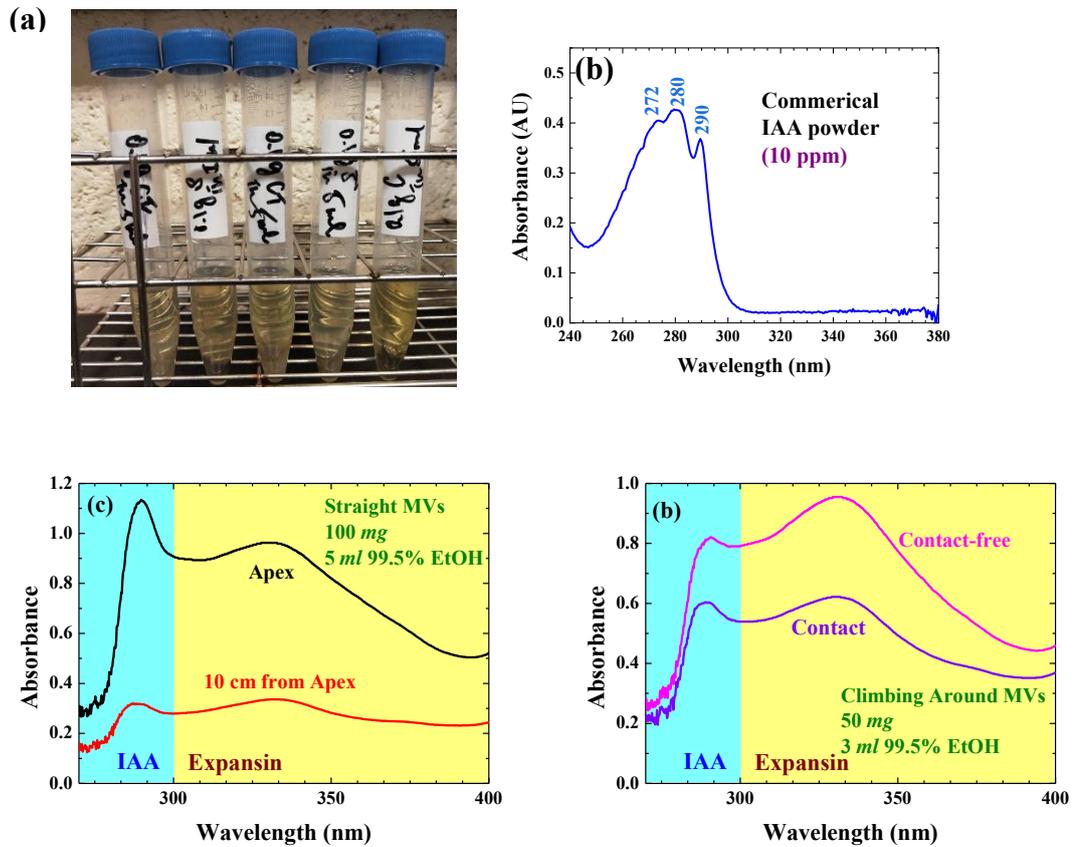


圖 20：(a)川七之酒精溶液。(b)商購 IAA 粉末的吸收光譜譜圖。(c)未接觸而自然生長的川七莖之壓碎的吸收光譜譜圖。(d)有接觸捲曲的川七莖之壓碎的吸收光譜譜圖。

1. 從吸收光譜圖可知，川七自由生長與攀附生長相比，攀附生長時能觀察到 IAA 的差異較大。
2. 其中，攀附生長捲曲莖的非接觸面(CF)能看見 IAA 與 Expansin 吸收峰的呈現。

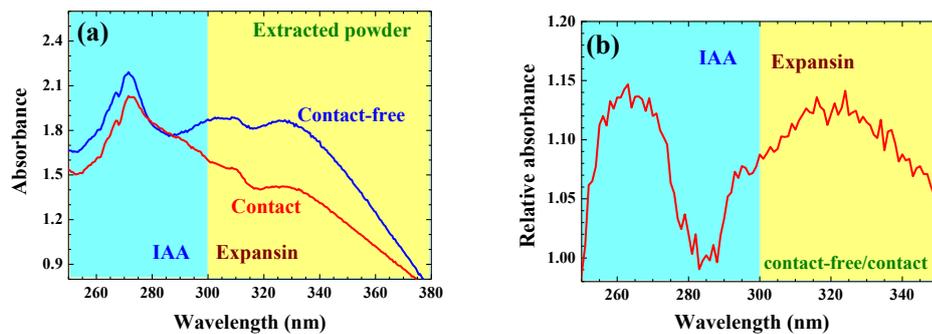


圖 21：(a)捲曲莖 HPLC 萃取之 IAA 的吸收光譜譜圖。(b)吸收峰差異

1. 捲曲莖之萃取粉末可更加看出 IAA 與 Expansin 在接觸面(CT)與非接觸面(CF)的差異。
2. 由圖 16b 可明顯看出 IAA 與 Expansin 在非接觸面有大幅提升。

## 伍、討論

### 一、川七生長方向

#### (一) 川七生長觀察

1. 從一週間的生長觀察，川七莖在夜間生長速率較日間快。推測其原因為植物日間主要能量用於吸收與儲存養分，夜間則用於生長及增長；增長的莖有利於迴旋運動，增加旋轉半徑。
2. 關於阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)葉子的生長情形研究(Pantin et al., 2013)，也曾有相符的結果：夜間的生長速率大於日間的生長速率。

#### (二) 迴旋運動的表現

1. 無論是在北半球或是南半球，川七始終以逆時針(Counter clockwise)的方向盤旋生長。
2. 關於全球不同地區植物生長的旋轉方向，推測可能與植物細胞中的細胞骨架維管(Microtubule)有關(Edwards et al., 2007)。

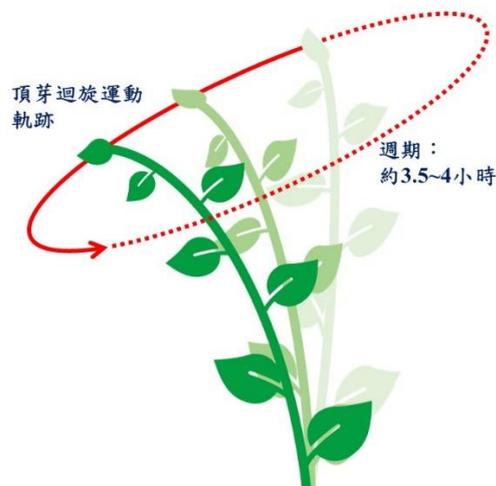


圖 22：川七頂芽迴旋運動示意圖。頂芽沿傾斜橢圓軌道進行逆時針迴旋運動，週期為 3.5~4 小時。

## 二、受激生長的解剖形態

### (一) 「外皮層」意義

1. 在莖的橫切染色切片中，可在皮層內發現一圈被 Safranin O 染成紅色的木質化細胞。定義此區為「外皮層」(見結果部分及圖示)。
2. 迴旋運動是由 Motor cells 改變膨壓驅動的，而 Motor cells 包含部分表皮細胞 (Epidermal cells)及皮層薄壁組織外側(Parenchymal-subepidermal cells)(Stolarz, 2009)。
3. 在量測時，發現木質化細胞外側的「外皮層」在同一橫切面中寬度變化較明顯，推測：外皮層就是可以驅動迴旋運動和向觸攀附生長的 Motor cells (tissue)。

## 三、IAA 在莖部延長扮演的角色

### (一) IAA 及其衍生物激發生長比較

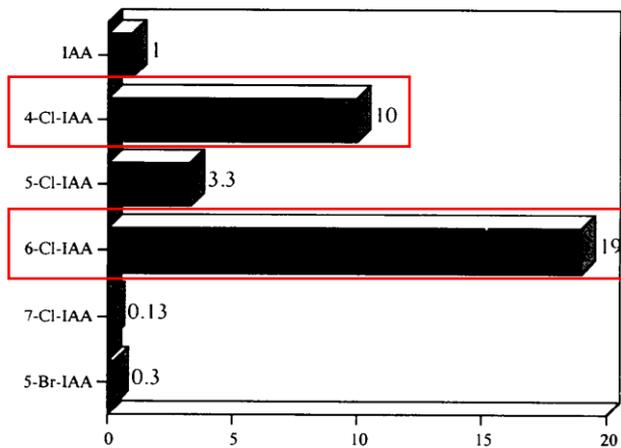


Fig. 7. Relative activity of monohalogenated indole-3-acetic acids according to Böttger, Engvild & Soll (1978); it is expressed as the concentration of IAA ( $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ) needed to give half the maximum elongation, divided by the concentration of the substituted IAA giving the same elongation.

Table 1. Relative activity of a number of substituted indoleacetic acids and a few other well known auxins

Compound	Relative activity
IAA	1
4-Cl-IAA	10
4-Cl-IAA methyl ester	1.2
5-Cl-IAA	3.3
6-Cl-IAA	19
7-Cl-IAA	0.13
4,6-Cl <sub>2</sub> -IAA	0.11
4,7-Cl <sub>2</sub> -IAA	<0.01
5,7-Cl <sub>2</sub> -IAA	<0.01
6,7-Cl <sub>2</sub> -IAA	0.11
5-Cl,7-Me-IAA	0.07
5-F-IAA	0.2
5-Br-IAA	0.3
7-Br-IAA	0.08
5-Hydroxy-IAA	<0.01
5-Methoxy-IAA	0.12
2,4-D	1.0
NAA	0.4

圖 23：參考資料論文(Böttger et al., 1978; Nigović et al., 1996)中，IAA 及其衍生物的活性比較。

1. IAA 的衍生物中，其中一大類是鹵化的 IAA。
2. 活性以達到最大增長(Maximum elongation)的一半所需之濃度的倒數表示，並以 IAA 作為 1。
3. 活性最高的兩種鹵化 IAA 分別為 4-Cl-IAA 以及 6-Cl-IAA。

4. 過去的研究曾認為調控向觸性的關鍵在於活化型 IAA 與儲存型 IBA 之間的轉換(Luo & Chen, 2018)。此研究則得知在攀附生長時，頂芽會滋生較多激發生長效率高的 4-Cl-IAA 及 6-Cl-IAA，且  $H^+$  及擴張蛋白會由接觸面(CT)轉移至非接觸面(CF)，並使得 IAA、4-Cl-IAA、6-Cl-IAA 進入細胞，觸發向觸生長。

## (二) 川七未接觸莖中的 IAA 情形

1. 未接觸莖的 *in vivo* X 光繞射實驗，發現莖部含有 IAA 及 4-Cl-IAA，但峰形並非很明顯。相較於粉末或晶體的 X 光繞射實驗，將川七直接測量必定有其他化合物造成的干擾。
2. 若能建立背景值去除模型，將纖維素、木質素、其他蛋白質及有機物質的 X 光繞射峰扣除，將能得到更完整的 X 光譜圖。
3. 將川七莖以 HPLC 萃取後，能分離出 IAA 與其衍生物，減少定性與定量分析中其他物質的干擾。
4. HPLC 萃取之川七未接觸莖 IAA 的 X 光繞射譜圖，與 *in vivo* X 光繞射譜圖的結果相符，皆表現 IAA 及 4-Cl-IAA 的繞射峰。
5. 由於極性運輸，植株上半部分的 IAA 由頂芽分泌，向下運送至莖的延長部位。從不同部位的 X 光繞射峰值強度分析，4-Cl-IAA 佔比隨距離頂芽越遠而增加，表示生長素的延長主要作用於距離頂芽較遠之部位。
6. 從 X 光繞射峰形大小比較與 GC-MS 定量分析，可發現最多的兩種生長素為 IAA 及 4-Cl-IAA。從頂芽到距離頂芽遠的生長部位，4-Cl-IAA 的佔比提升。在捲曲莖部分，非接觸(CF)部位的 4-Cl-IAA 佔比達到最高，同時能發現 6-Cl-IAA 的存在。
7. 非接觸(CF)部位的表皮細胞為最長，4-Cl-IAA 和 6-Cl-IAA 的佔比也最高，去測兩者有正相關。

## 四、川七向觸受激生長與攀附的機制

### (一) 酸生長假說探討

1. pH 值測量實驗發現所有部位皆  $pH < 7.0$ ，符合酸生長假說中質外體(Apoplast)的  $H^+$  濃度高的敘述。

- 然而，有文獻指出實驗中測量到的 pH 值可低至 5 以下(Cleland, 1976)。推測測量之方式也會影響 pH 值的結果。如果將所有組織搗碎一併測量，可能參雜到細胞內的其他物質，進而影響酸鹼值的準確性。

## (二) 擴張蛋白(Expansin)的作用

- 從吸收光譜可以得知，延長較快的捲曲莖非接觸面部位，不但有 IAA 的增加，還有擴張蛋白的表現。
- 由擴張蛋白含量的不同，推論向觸性除了 IAA 與生長素等植物賀爾蒙調控之外，還需基因轉錄轉譯或蛋白質修飾層次的配合。

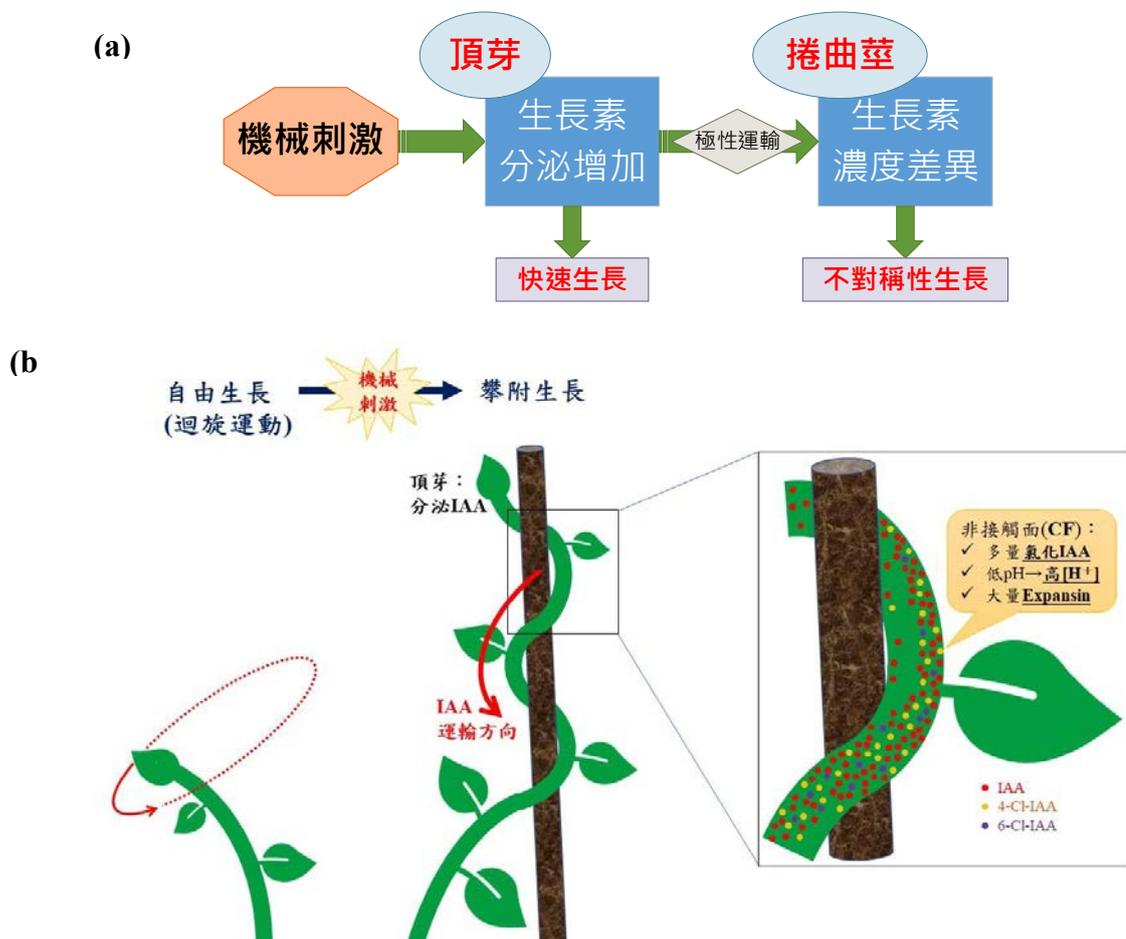


圖 24：(a)機械刺激後川七的向觸受激反應。(b)攀附生長時造成不對稱性生長的生長素濃度差異及高活性生長素（4-Cl-IAA+6-Cl-IAA）比例差異。

## 陸、結論

- 未攀附生長的川七會進行傾斜橢圓軌道迴旋運動，週期為 3.5~4 小時。
- 川七在攀附於物體的刺激之下，生長速度可提升達 30 倍。

3. 川七 *in vivo* 及萃取粉末的 X 光繞射可得知莖內含有 IAA、4-Cl-IAA、以及 6-Cl-IAA。
4. 距離頂芽越遠，4-Cl-IAA 佔比提高；又以捲曲莖非接觸面 4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA 比例最高，達 40%。
5. GC-MS 定量分析 IAA 發現，接觸時，頂芽多分泌 9%的 IAA 以及 91%的 4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA。
6. pH 值測量顯示接觸莖捲曲部位之氫離子濃度較其他部位高約 1.2 倍。
7. 吸收光譜同時呈現 IAA 及擴張蛋白(Expansin)的吸收峰，推論兩者具有機制系統之關聯。

## 柒、未來展望

1. 探討不同程度的接觸刺激對川七生長之影響。  
在野外，川七會面臨的環境不只有單一種竿子的攀爬；它可能攀附於直徑各異、表面材質不一的樹枝上，或是只因接觸平面（如牆壁）而引發向觸運動。
2. 以中子斷層掃描分析川七內的氫離子分佈情形。
3. 以 *in vivo* pH 測量準確分析不同部位的氫離子分布情形。
4. 架設磁場，檢測磁場作用於離子型態 IAA 時，對於川七迴旋運動以及日夜生長的影響。

## 捌、參考文獻資料

- Böttger, M., Engvild, K. C., & Soll, H. (1978). Growth of Avena Coleoptiles and pH Drop of Protoplast Suspensions Induced by Chlorinated Indoleacetic Acids. *Planta*, 140(1), 89-92. <http://www.jstor.org/stable/23373387>
- Braam, J. (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol*, 165(2), 373-389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01263.x>
- Cleland, R. E. (1976). Kinetics of Hormone-induced H Excretion. *Plant Physiology*, 58(2), 210-213. <https://doi.org/10.1104/pp.58.2.210>
- Coffey, W. T., & Kalmykov, Y. P. (2011). *The Langevin Equation* (Vol. Volume 27) [doi:10.1142/8195]. WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/doi:10.1142/8195>
- Darwin, C., & Darwin, F. S. (1881). *The power of movement in plants*. Appleton. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/57092>
- Duan, Y., Ma, Y., Zhao, X., Huang, R., Su, R., Qi, W., & He, Z. (2018). Real-time adsorption and action of expansin on cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 317.

<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1318-2>

- Edwards, W., Moles, A. T., & Franks, P. (2007). The global trend in plant twining direction [<https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00326.x>]. *Global Ecology and Biogeography*, 16(6), 795-800. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00326.x>
- Eriksson, R. (2007). A Synopsis of Basellaceae. *Kew Bulletin*, 62(2), 297-320. <http://www.jstor.org/stable/20443356>
- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot*, 64(9), 2541-2555. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Luo, C.-I., & Chen, N.-J. (2018). 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. 2018 年臺灣國際科學展覽會優勝作品專輯. <https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2018/pdf/TISF2018-060005.pdf>
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O., & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 22-26.
- Michniewicz, M., Brewer, P. B., & Friml, J. Í. (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The arabidopsis book*, 5, e0108-e0108. <https://doi.org/10.1199/tab.0108>
- Nigović, B., KojicProdic, B., Antolic, S., Tomić, S., Puntarec, V., & Cohen, J. (1996). Structural Studies on Monohalogenated Derivatives of the Phytohormone Indole-3-acetic Acid (Auxin). *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION B-STRUCTURAL SCIENCE*, 52, 332-343. <https://doi.org/10.1107/S010876819500838X>
- Pantin, F., Fanciullino, A.-L., Massonnet, C., Dauzat, M., Simonneau, T., & Muller, B. (2013). Buffering growth variation against water deficits through timely carbon usage. *Frontiers in plant science*, 4, 483. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00483>
- Rayle, D. L., & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4), 1271-1274. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1271>
- Reinecke, D. M. (1999). 4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth. *Plant Growth Regulation*, 27(1), 3-13. <https://doi.org/10.1023/A:1006191917753>
- Stolarz, M. (2009). Circumnutation as a visible plant action and reaction: physiological, cellular and molecular basis for circumnutations. *Plant Signal Behav*, 4(5), 380-387. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8293>
- Toby, B. H., & Von Dreele, R. B. (2013). GSAS-II: the genesis of a modern open-source all purpose crystallography software package. *Journal of Applied Crystallography*, 46(2), 544-549. <https://doi.org/doi:10.1107/S0021889813003531>
- Yeung, E. (1998). A beginner's guide to the study of plant structure. *Tested Studies for Laboratory Teaching*, 19.

## 【評語】 052101

1. 本研究在探討藤蔓植物川七經觸發引起快速攀附生長之原因。
2. 實驗發現川七經攀附後，引發頂芽增生 IAA 及 4-Cl-IAA+6-Cl-IAA，且多數被輸送到莖的非接觸面。此外亦發現非接觸面氫離子濃度較高且含有較多擴張蛋白，上述結果皆有利於細胞壁的延長，亦可解釋川七經觸發引起快速攀附生長之原因。
3. 本研究結果對川七攀附之原理可提供有用的資訊。
4. 在向觸受激擴張蛋白(Expansin)部分之材料方法與結果的連結較不清楚，例如，以吸收光譜偵測擴張蛋白，如何確定擴張蛋白的訊號，應提供確效及更為具體的說明。

## 作品簡報

# 從分子層面探究藤蔓植物川七 向觸引發快速攀附生長

組別：高級中等學校組

科別：植物學科

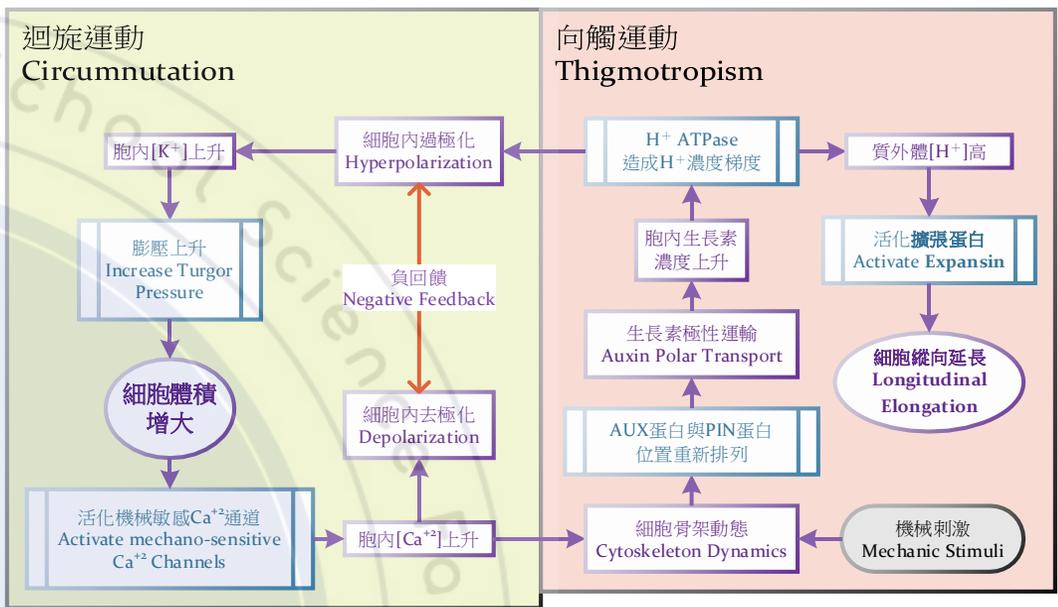
# 前言

## ◎迴旋運動(Circumnutation)與向性運動(Tropism)

- **迴旋運動**：莖頂週期性圓周運動，廣泛存在於植物
- 可能機制：外皮層的「**Motor Tissue**」細胞膨壓的改變
- 達爾文提出：向性運動是受到刺激後，迴旋運動的延伸

## ◎向觸性(Thigmotropism)

- 植物受到機械刺激的反應
- 目的：攀附物體獲得支撐，向上延伸接收陽光
- 表現：莖部延長時向接觸面彎曲
- 觸發：差異生長 + 快速生長
- 位置：根、莖、捲鬚等
- 機制：生長素濃度差異？運輸差異？



未攀附 (迴旋運動)



➤ 2018 TISF作品曾推測，藉IAA⇌IBA(去活化)調控；新研究則發現，IAA⇌CI-IAA(活化)扮演重要角色

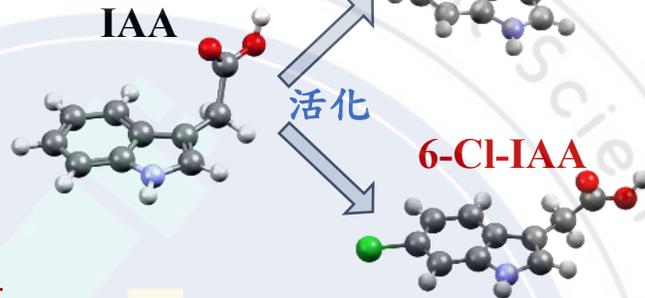
➤ 達爾文為最早紀錄此現象的科學家之一，曾發表於《The Power of Movement in Plants》(1881)。至今其機制仍未有一致性的見解。本研究透過分子層面分析植物賀爾蒙及相關蛋白質，了解向觸生長機制。



# 前言

## ◎向觸運動的調控激素：生長素(Auxin)

- 植物賀爾蒙，能促使細胞延長、組織生長
- 分泌：根尖、莖頂、芽等分生組織
- 形式：IAA、IBA（儲存）、氯化IAA（活化）



### 迴旋運動(未攀附)



機械刺激

## 欲解問題

### ◎向觸相關之植物生長情形？

- 觀察植株尋找攀附物體時的迴旋運動
- 向觸引發之快速生長及差異生長

### ◎植物體調控向觸生長的分子機制？

- 向觸受激之IAA、4-Cl-IAA、6-Cl-IAA差異分布
- 氫離子濃度、Expansin表現量影響向觸生長

### 攀附生長



頂芽

川七莖

# 研究方法

## ◎ 川七生長觀察



攝影機



川七

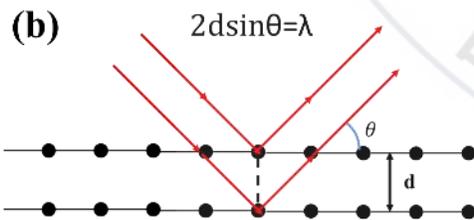
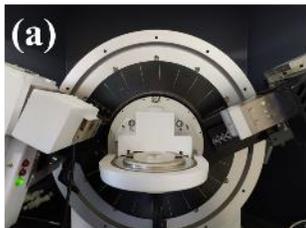


## ◎ 高效液相層析法HPLC純化川七IAA

- 藉由各分子具不同質量及帶電量，在電場中移動速率的差異，分離出各種分子
- 樣本乾燥→萃取→層析→收集

## ◎ X光繞射 (*In vivo* / 萃取IAA粉末)

- 初步定量IAA及測量晶格結構與大小



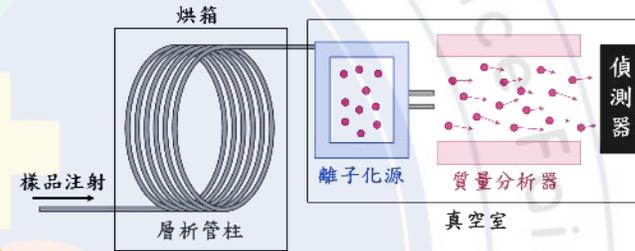
(a) XRD 架設

(b) Bragg's Law

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

## ◎ 氣相層析質譜儀GC-MS

- 區分不同分子量 (荷質比) 之物質
- 定性及定量分析IAA及氯化IAA



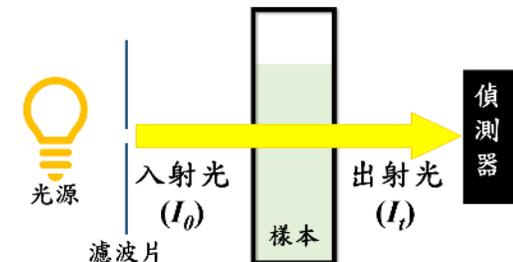
1. 樣本通過層析管柱
2. 離子化
3. 通過磁場發生偏轉
4. 偵測時間訊號強度

## ◎ pH值測量

- 秤重→pH=7.0 Buffer研磨→測量
- 質外體pH值推算細胞壁氫離子濃度

## ◎ 吸收光譜測量

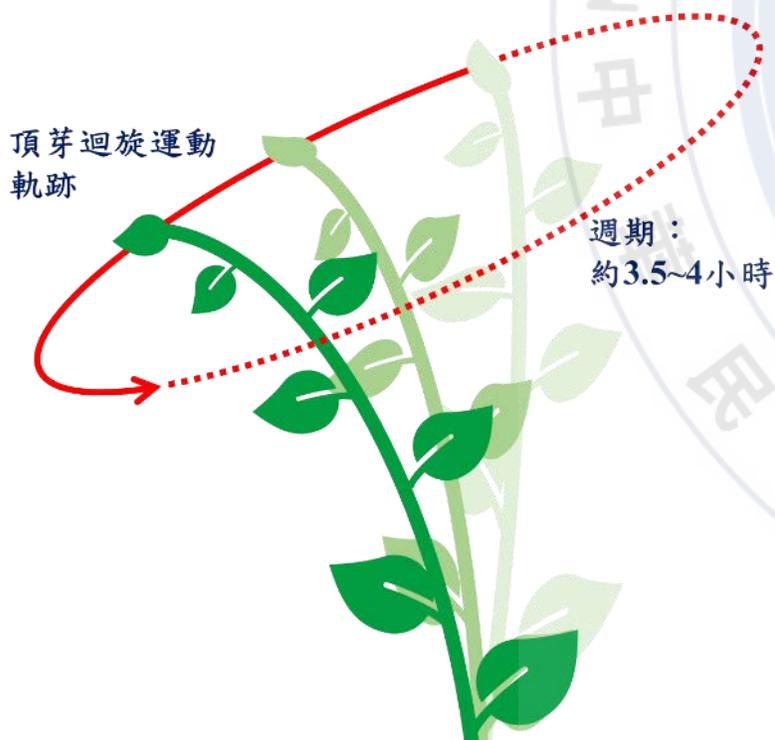
- 秤重→99.5%酒精研磨→離心取上清液→測量
- 吸光率  $A = -\log I_t / I_0$



# 受激快速生長

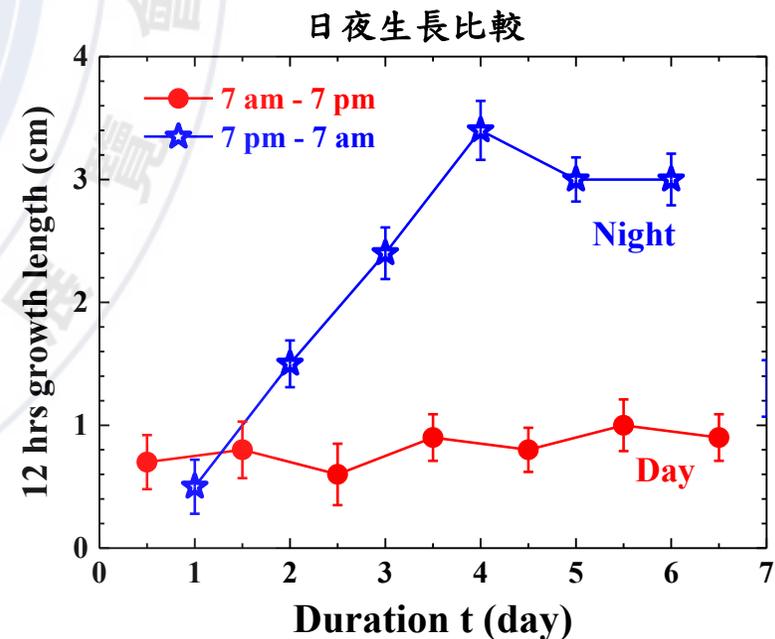
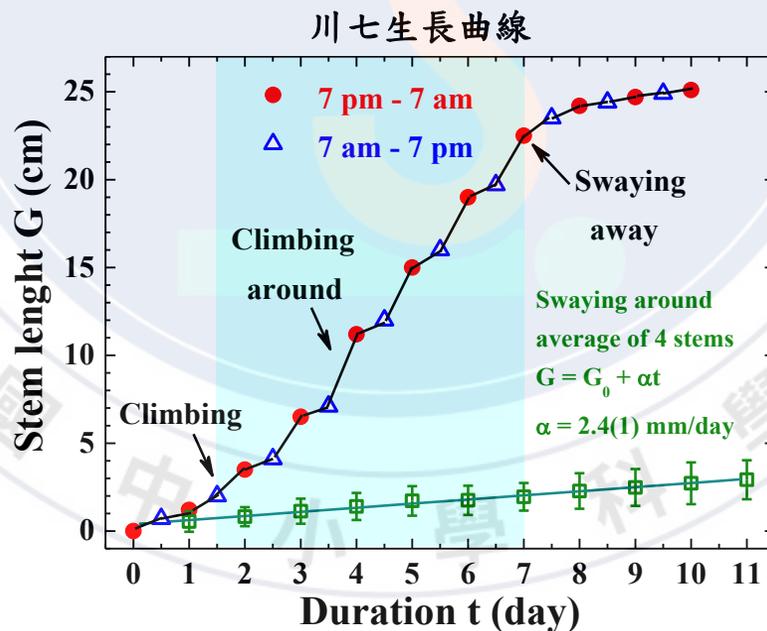
## ◎未攀附→迴旋運動

- 川七草質莖具有彈性，可彎曲改變方向
- 為了尋找物體攀附，在尚未攀附生長的川七頂芽會進行迴旋運動，以圓形軌跡掃過周圍區域
- 觀察的川七嫩莖皆進行左旋（逆時針）迴旋運動
- 根據生長縮時攝影，迴旋運動的週期約為3.5~4小時



## ◎生長速率改變

- 相較於未接觸生長（2.4 mm / day），受機械刺激時生長速率（70 mm/day）大幅提高，可達約30倍
- 儘管川七在攀附時生長速率提高，然而一旦不再接觸物體表面，生長速率旋即下降
- 川七的生長速率在夜間大於日間，推測其原因為日間光合作用代謝產生的能量與營養，於夜間可消耗使莖與葉生長



# 受激表皮細胞延長

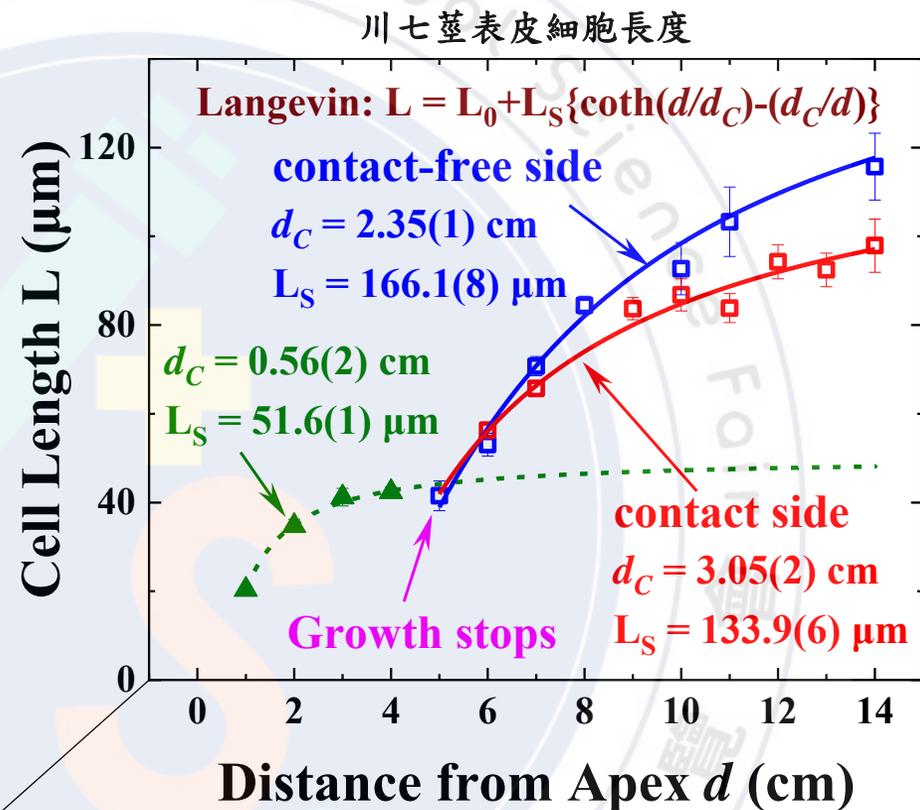
## ◎表皮細胞長度

- ▶ 表皮細胞的長度隨著距離頂芽越來越遠而增長，並存在最大值，到達時成長趨於平緩
- ▶ 朗之萬函數(Langevin Equation)：  

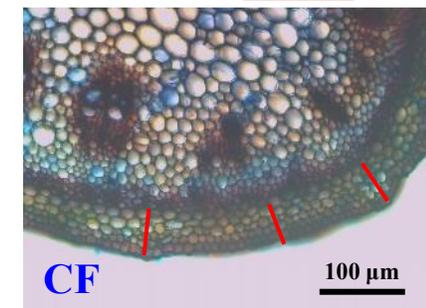
$$L = L_0 + L_S \{ \coth(d/d_c) - (d_c/d) \}$$
- ▶ 擬合數據，描述不受外力影響時，川七表皮細胞生長的長度趨勢
- ▶ 接觸之後表皮細胞長度隨距離的增長率上升
- ▶ 以細胞長度最大估算，在捲曲莖非接觸面(CF)的細胞長度為接觸面的1.2倍

## ◎縱切形態差異

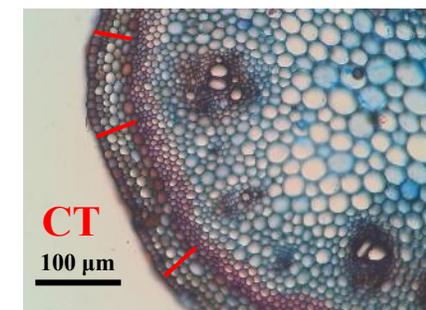
- ▶ 定義外皮層細胞：木質化纖維組織(染色呈紅色)外側，改變膨壓驅動迴旋運動的組織
- ▶ 外皮層寬度：非接觸面(CF) < 接觸面(CT)
- 外皮層細胞被拉展，而寬度減小(P=0.00041)



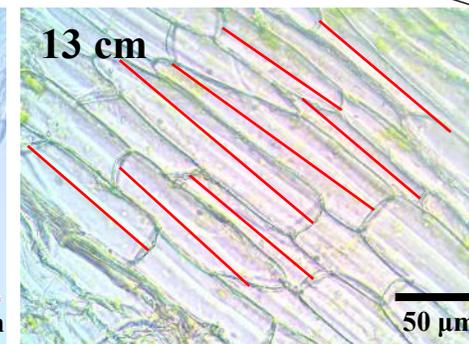
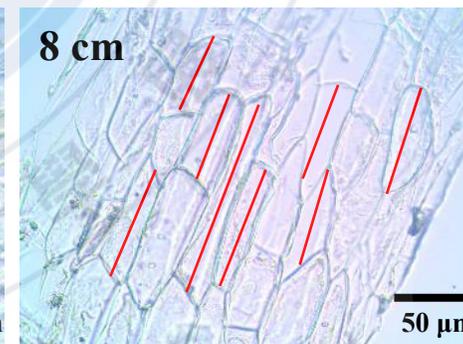
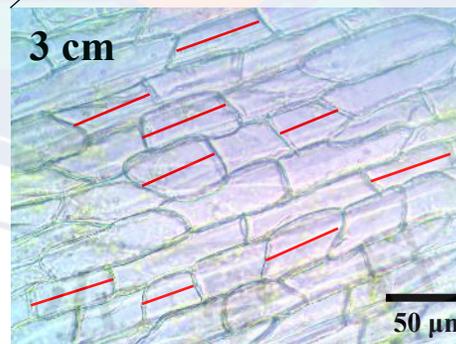
紅色線段標示內皮層寬度



外皮層平均寬度 = 45.9(3)  $\mu\text{m}$



外皮層平均寬度 = 52.1(6)  $\mu\text{m}$

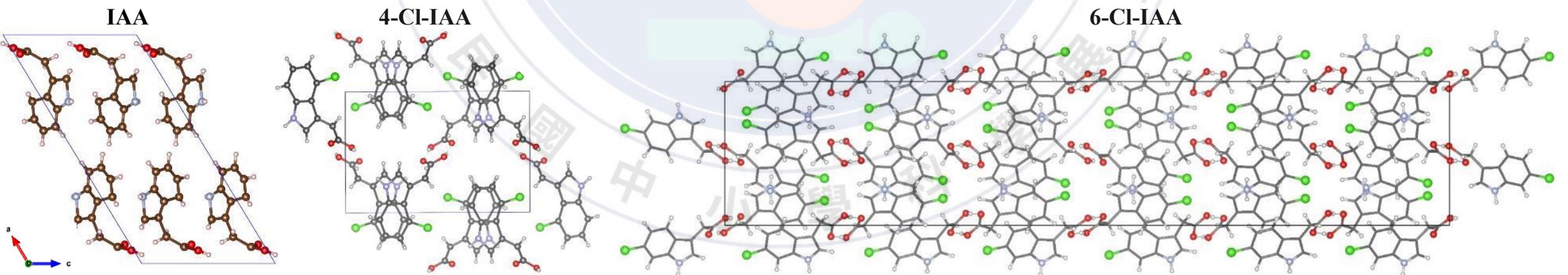
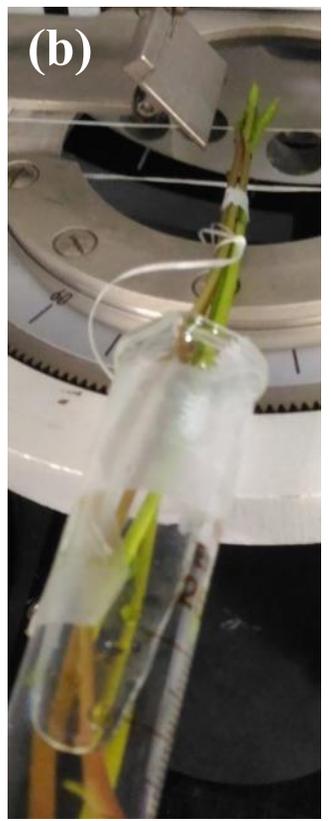
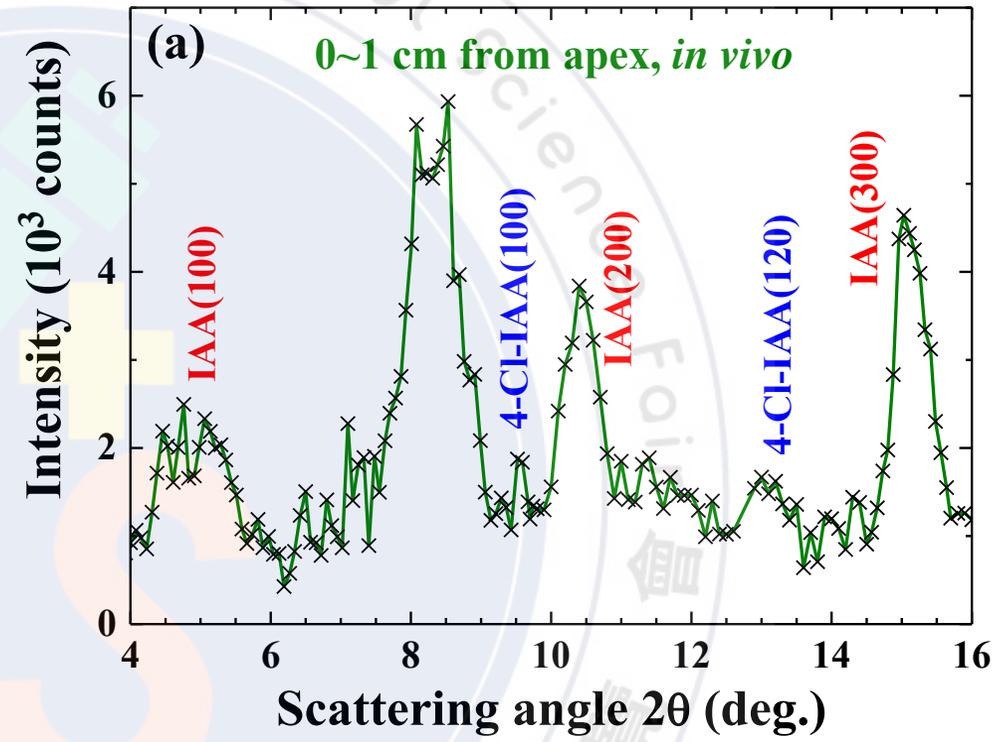


紅色線段標示表皮細胞長度

# 川七莖 *in vivo* X光繞射

- 未接觸莖的 *in vivo* X光繞射實驗，發現莖部含有 **IAA** 及 **4-Cl-IAA**，但峰形並非很明顯
- 相較於粉末或晶體的X光繞射實驗，將川七直接測量必定有其他化合物造成的干擾
- 三種IAA在川七莖中皆表現繞射峰，可見其串接成 **具週期性的晶體形式** 存在，固可依X光繞射峰形推斷其晶格結構
- 然而，作用於細胞的IAA為晶體或游離形式，仍有待實驗釐清
- *In vivo* X光繞射分析方法可並獲得 **活體川七** 當下的生長素分布情形，進行初步判斷

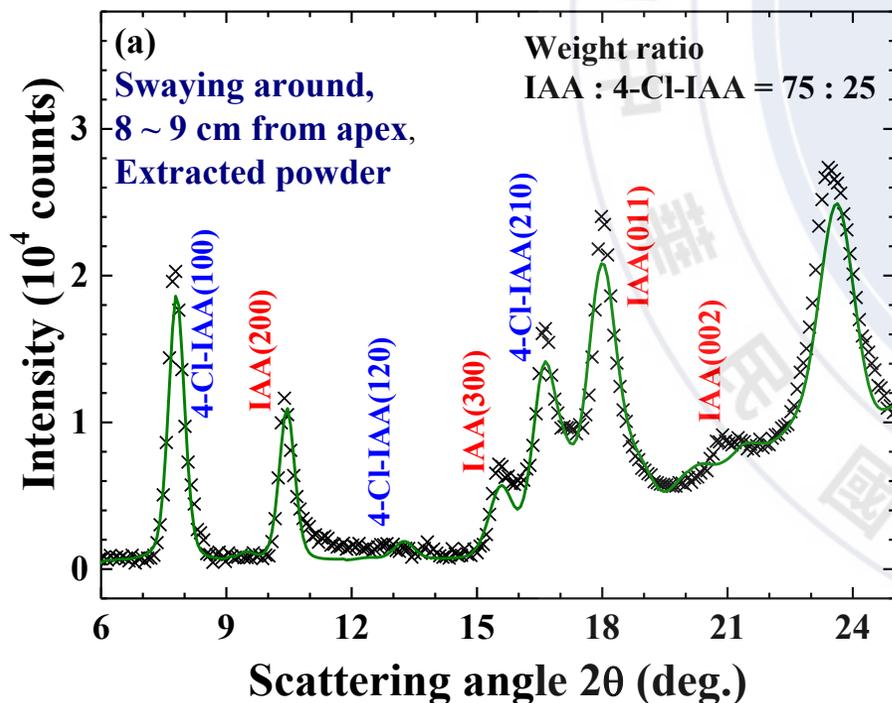
川七莖 *in vivo* X光繞射



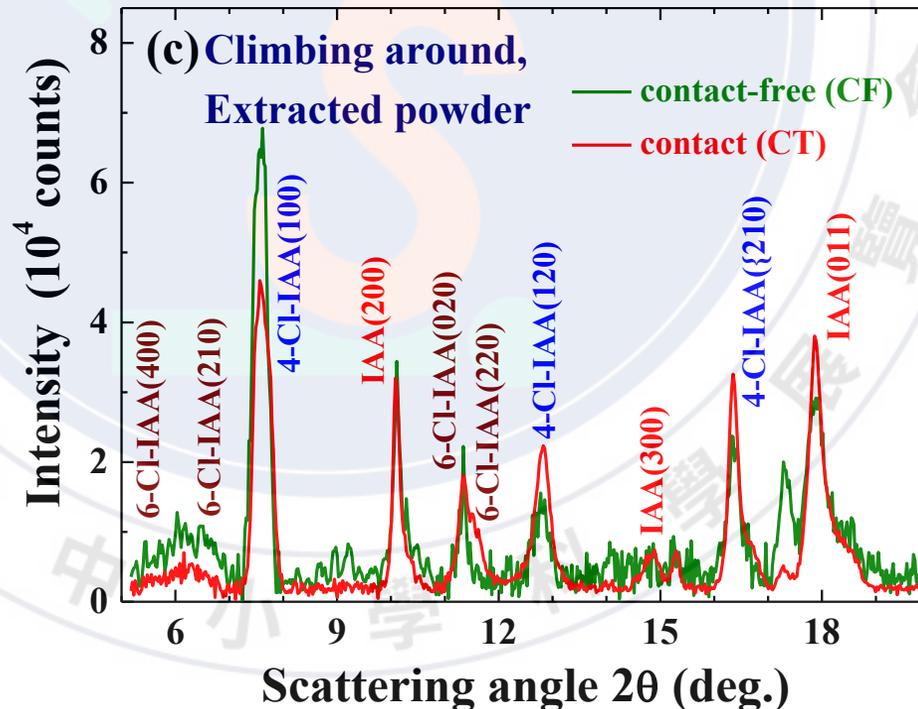
# 川七莖萃取IAA粉末X光繞射

- 萃取IAA之X光繞射譜圖，與in vivo X光繞射譜圖的結果相符，皆表現IAA及4-Cl-IAA的繞射峰
  - 運輸時，與頂芽之距離影響IAA活化程度
  - 4-Cl-IAA具有較高活性，能促進生長。距離頂芽越遠，IAA所表現的促進作用越顯著
  - 非接觸面(CF)的表皮細胞為最長，4-Cl-IAA和6-Cl-IAA的佔比也最高
- 細胞長度與4-Cl-IAA+6-Cl-IAA比例呈正相關

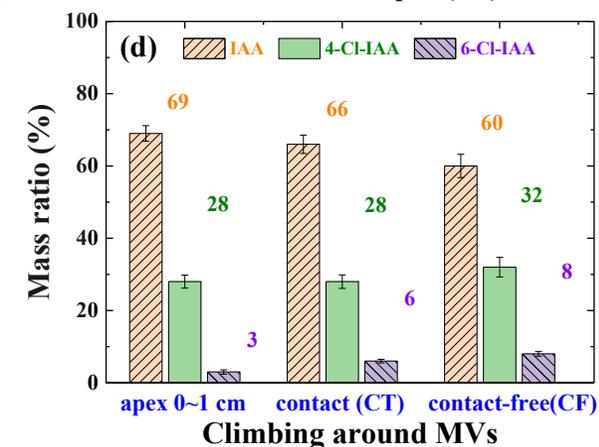
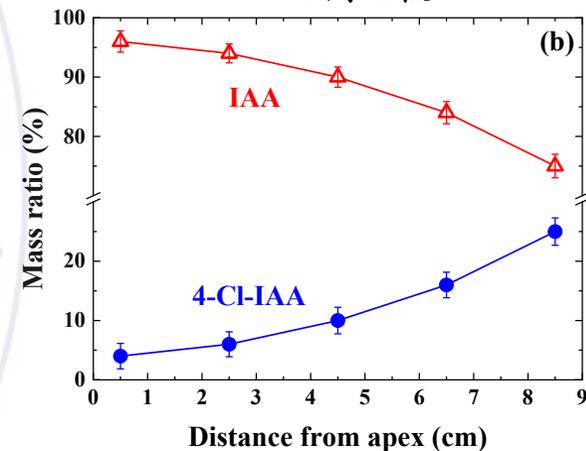
平直莖(ST)萃取粉末X光繞射



捲曲莖萃取粉末X光繞射

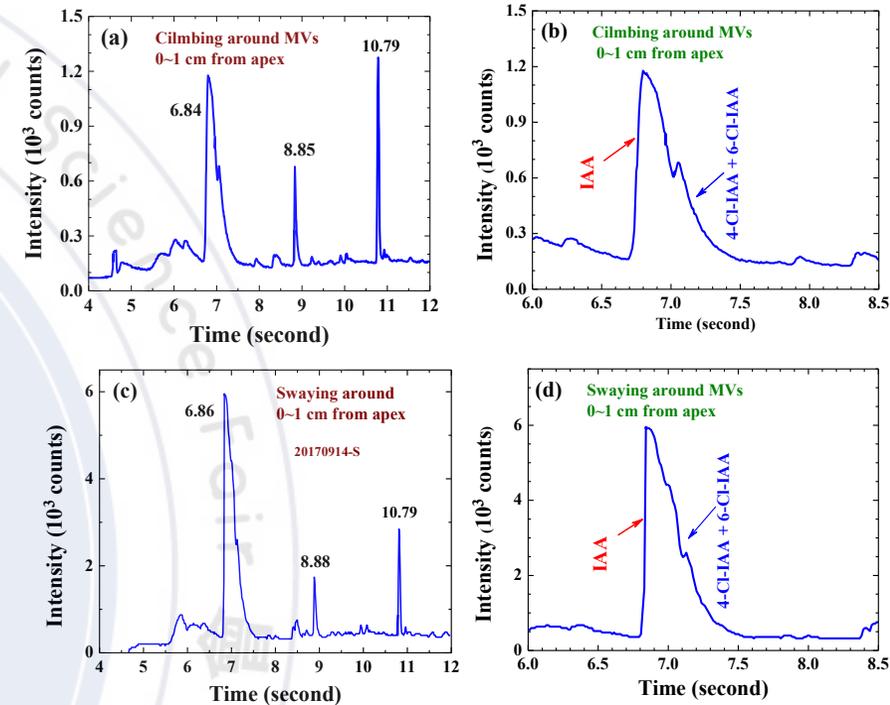


IAA比例比較



# 以GC-MS定性定量分析IAA

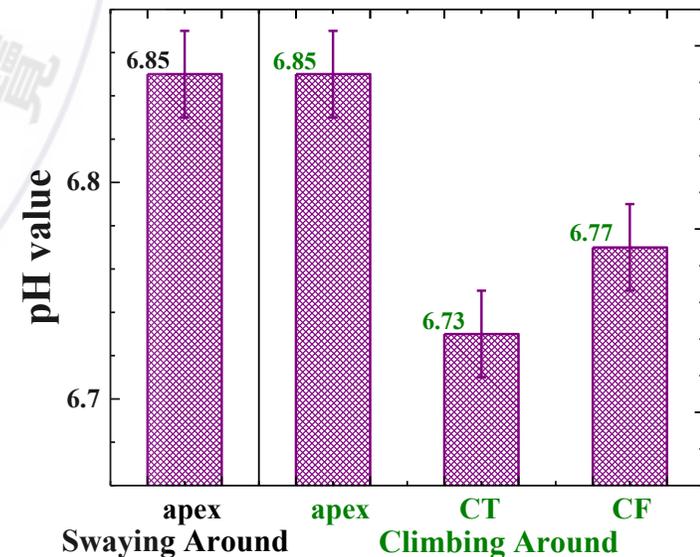
- 攀附生長時，IAA濃度較高，以攀附生長的非接觸面(CF)濃度最高
- 攀附生長時，其頂芽多分泌9% IAA及91% 氯化IAA
- 由於GC-MS依照分子量分離物質，故無法分辨4-Cl-IAA及6-Cl-IAA



	IAA (ng)	4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA (ng)	總量 (ng)
	每克乾燥川七莖		
迴旋運動川七頂芽下0~1公分	141	23	164
攀附生長川七頂芽下0~1公分	153	44	197
接觸面(CT)頂芽下5公分	177	32	209
非接觸面(CF)頂芽下5公分	159	61	226

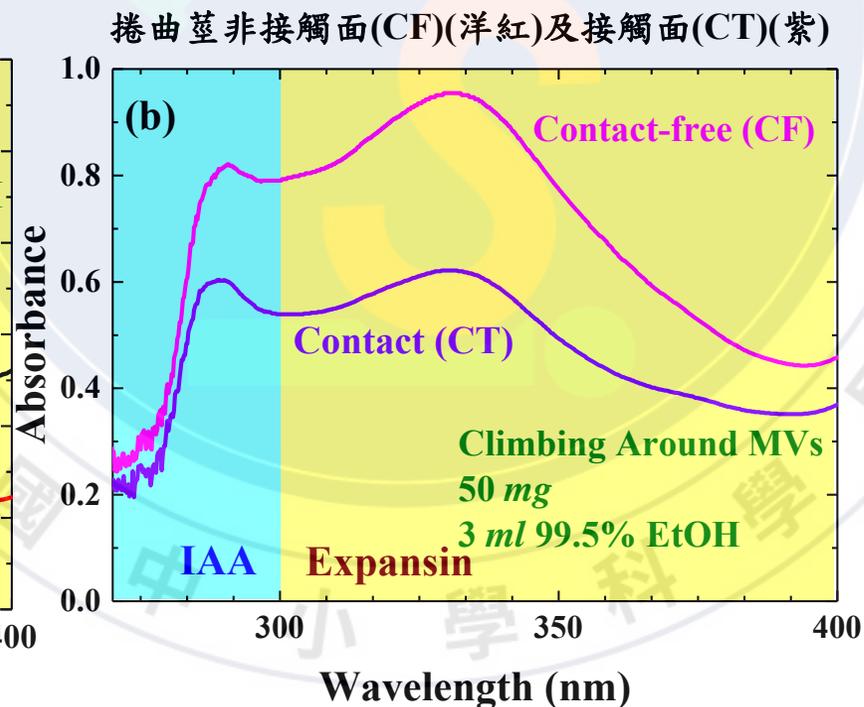
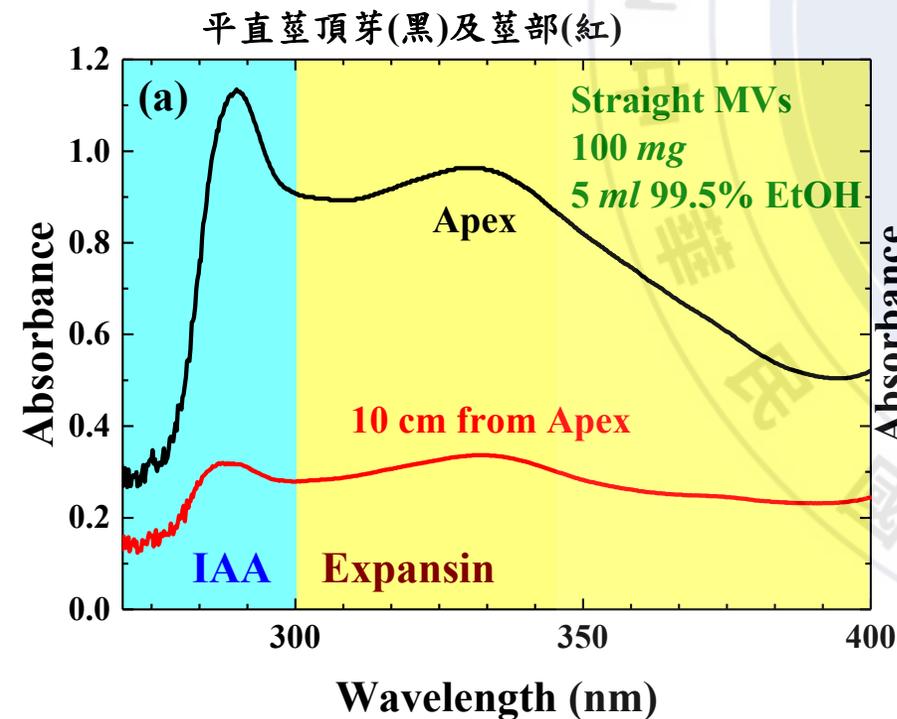
## 向觸受激部位氫離子濃度

- IAA使細胞壁延長的作用機制，與質外體氫離子濃度有關
- 接觸後引發差異生長的部位（接觸面CT及非接觸面CF），pH值較低
- 經計算後，其氫離子總濃度可達頂芽的1.2倍

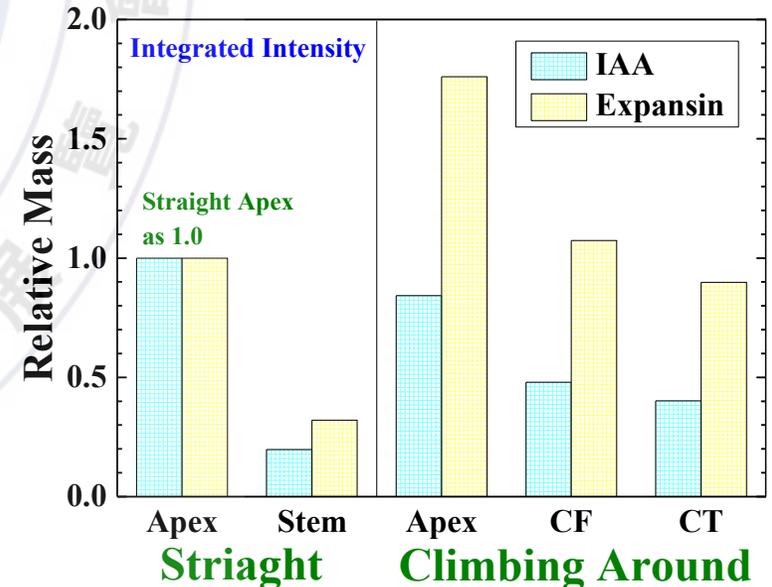


# 川七莖吸收光譜

- 壓碎的川七莖中除了呈現**IAA**的吸收峰，還有**擴張蛋白(Expansin)**的吸收峰
- 在平直莖中，IAA以頂芽濃度較高，**越遠離頂芽，IAA濃度下降**
- 在捲曲莖中，可明顯看見擴張蛋白的吸收峰IAA及擴張蛋白的峰值，**非接觸面(CF) > 接觸面(CT)**
- 吸收峰積分 $\propto$ 濃度，知**IAA及擴張蛋白(Expansin)**濃度在非接觸面(CF) > 接觸面(CT)，分別為**1.20**和**1.74**倍
- IAA並不能直接使植物細胞壁延長，而是需要其他蛋白的協同作用。擴張蛋白吸收峰較高之部位，其IAA也較高。推測兩者作用機制相關



不同部位IAA及擴張蛋白(Expansin)質量比較  
(峰下面積(積分) $\propto$ 質量)



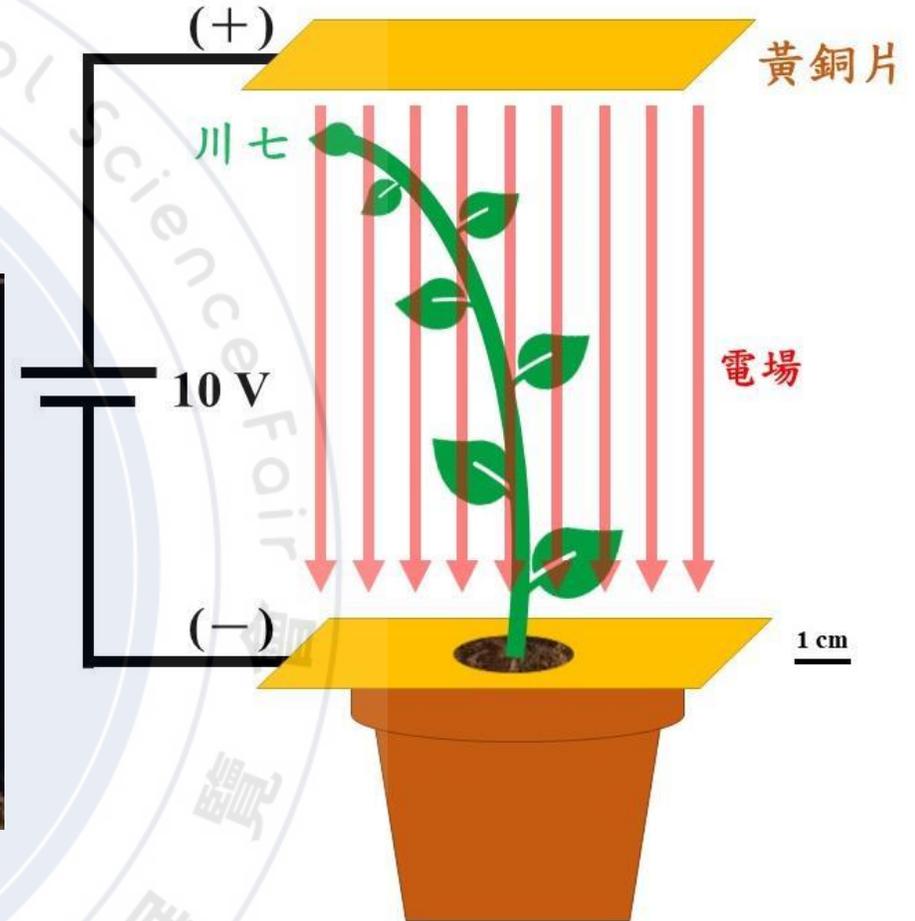
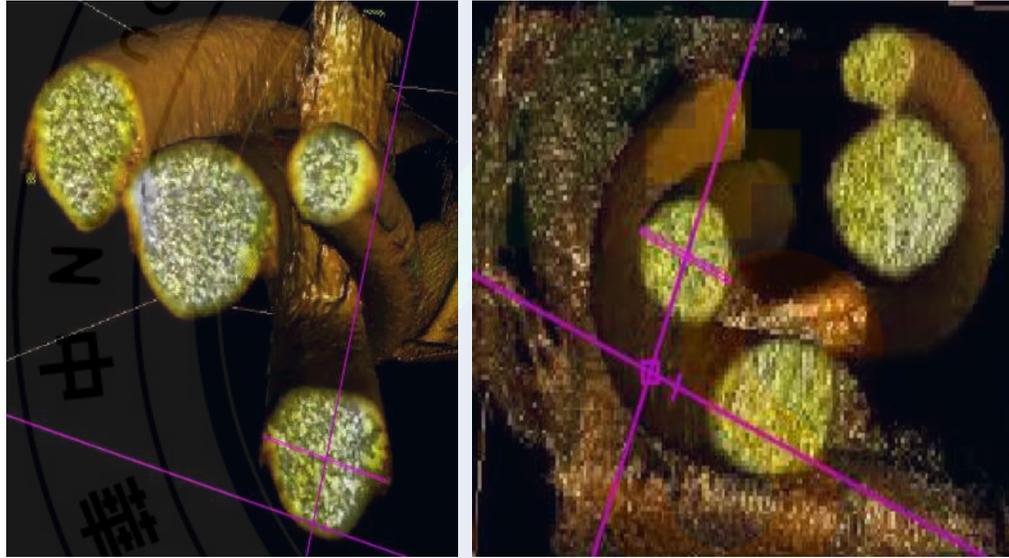
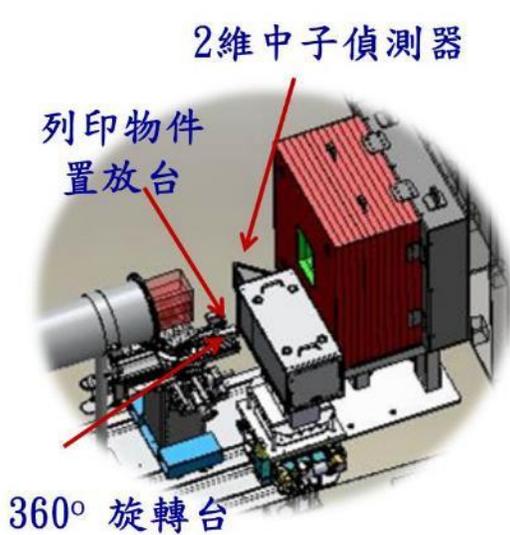
# 結論

- 未攀附生長的川七會進行傾斜橢圓軌道迴旋運動，週期為3.5~4小時
- 川七在攀附於物體的刺激之下，生長速度可提升達30倍
- 川七 *in vivo* 及萃取粉末的X光繞射可得知莖內含有IAA、4-Cl-IAA、以及6-Cl-IAA
- 距離頂芽越遠，4-Cl-IAA佔比提高；又以捲曲莖非接觸面4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA比例最高，達40%
- GC-MS定量分析發現接觸時，頂芽多分泌9%的IAA以及91%的4-Cl-IAA + 6-Cl-IAA
- pH值測量顯示接觸莖捲曲部位之氫離子濃度較其他部位高約1.2倍
- 吸收光譜同時呈現IAA及擴張蛋白(Expansin)的吸收峰，推論兩者具有機制系統之關聯



## 未來展望

1. 以 中子斷層掃描 分析川七內的氫離子分佈情形
2. 以 in vivo pH測量 準確分析不同部位的氫離子分布情形
3. 架設 電場，檢測電場輔助IAA極性運輸，對於川七生長的影響



## 參考文獻

Böttger, M., Engvild, K. C., & Soll, H. (1978). Growth of Avena Coleoptiles and pH Drop of Protoplast Suspensions Induced by Chlorinated Indoleacetic Acids. *Planta*, 140(1), 89-92. <http://www.jstor.org/stable/23373387>

Luo, C.-I., & Chen, N.-J. (2018). 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. 2018年臺灣國際科學展覽會優勝作品專輯. <https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2018/pdf/TISF2018-060005.pdf>

Stolarz, M. (2009). Circumnutation as a visible plant action and reaction: physiological, cellular and molecular basis for circumnutations. *Plant Signal Behav*, 4(5), 380-387. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8293>