

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：榕樹粗萃取液對種子萌發及生長之影響

得獎獎項：大會獎第二名

加拿大正選代表:參加加拿大 2005 年科學展覽會

學 校：臺北市立建國高級中學

作 者：汪書平、舒偉傑

評語與建議事項：

作者分離了榕樹萃取液，並分析對植物生長的抑制，此作品並結合 DNA array 及蛋白質表達的差異，闡述此抑制的機制，作者的認真與熱忱令人感受，以後有相當的發展。



人類因夢想而偉大卓越
生活因夢想而多采多姿
眼界因夢想而無遠弗屆

我叫汪書平
我因夢想而踏上這條國際科展的旅途

建國中學數理班
切磋和歡笑的樂園

中研院
知識和探索的殿堂

沿途的收穫、相遇的緣分
使這段旅途更添風采
在愉快的付出中
自己逐步朝夢想前進
也深刻地了解
要感謝的人實在難以計數，怎能不心存感激？
需學習的事永遠沒有止境，如何不更加謙虛？
最重要的是

我因逐夢而豐富了自己的人生



我是舒偉傑，一個開朗的射手寶寶，天生的好奇心，使我總是對世界充滿了疑問，而做科展就是讓我去探究的最好法門。我喜歡站在靠近天的頂端，張開手擁抱自然，思索著夢的答案；我知道只有努力的追逐，才能讓自己發光發亮。福和國中數理班、建國中學資優班，都是一場華麗的旅程，而最為動人的，大概就是國際科展了吧！逐夢，對我來說，是一場未完成的進行式。

中文摘要

相剋作用是指植物在代謝過程中釋放出有毒物質以抑制本身或鄰近植物種子萌發及植株發育生長的過程。一般認為，榕樹是具有相剋作用的常見植物，但很少見到相關的文獻探討。本實驗利用榕樹不同組織萃取液，以小白菜、結球白菜與阿拉伯芥作材料，探討該萃取液對上述植物發芽與生長之影響，結果顯示榕樹葉萃取液所造成之影響較顯著，不同榕樹組織的萃取液、不同濃度的萃取液對不同植物所產生的效果不盡相同，針對不同生長期的植物進行處理所造成的影響亦有差異。進一步以管柱層析法與高壓液相層析法 (HPLC) 分離葉萃取液，結果發現以正己烷和乙酸乙酯 75 : 25 為沖提液的條件下，於 HPLC 的層析圖中分離時間約 8 分時所流出的物質具最明顯的抑制作用。電泳剖面分析顯示處理與未處理間有些許蛋白質條帶差異，此變化蛋白可能與植物幼苗對該萃取液之耐受性有關。利用核酸微陣列 (microarray) 對榕樹萃取液處理之阿拉伯芥植物進行基因表現分析，發現榕樹萃取液對植物部分基因表現也有促進和抑制的情形，經由基因體與蛋白質體分析法可推論出一些受影響之相關基因。

Abstract

Allelopathy was defined as a phenomenon which certain plant species, by secreting metabolites to the environment, can suppress the growth of themselves, seed germination and/or growth of other plants in the same habitats. Banyan (*Ficus microcarpa* L.f.) is a plant species in our campus likely to have allelopathy effect. However, documents describing such action on allelopathy were rare. In this study, we applied the crude tissue extracts including leaves, stems, roots of banyan onto the germinating seeds of Pai-Tsai (*Brassica rapa* L.ssp.chinensis (Rupr. (Olsson))), Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.) and Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0) to study the effects of such plant extract on the germination and seedling growth of other plants. It is found that allelopathic effects on seed germination vary among different tissues used for extract preparation. Different concentration of the extract also yield various degree of allelopathic effects. It is also noted that the application of extract onto the post-germinated sprouts has less effects on plant growth. The extract of leaves was subsequently chromatographed over silica gel using hexane/EtOH gradient solvent system and HPLC. The result showed that there was one fraction about 8 min in the chromatography of HPLC eluted with 25% EtOAc in hexane had the most inhibitory effect. SDS-PAGE analysis on the electrophoretic profiles of water soluble proteins has explored a different band pattern between the treated and non-treated sprouts. The observed band difference might provide a clue for exploring proteins which reacted differently upon the application of extract. DNA microarray analysis on the effect of banyan extract on *Arabidopsis* gene expression has also been employed to characterize genes responsive to the allelopathic treatment. Cross-comparison between the differential transcript and protein profiles will reveal key regulators in plants experiencing allelopathic condition.

壹、前言

一、研究動機：

榕樹是台灣鄉土民俗植物中最為人所熟知的樹種。若要選出最能代表台灣的樹種，非榕樹莫屬。但相對於其他陰暗處長滿了陰濕性植物的樹種，在榕樹的樹蔭下，實在少有其他生物生長。經過查詢資料及相互討論後，得到的可能解釋是：某些樹種的樹皮或樹葉，會分泌抑制其他生物生長的物質，經由雨水沖刷或落葉腐化後釋放到土壤中，進而影響其他植物，稱為植物間的「相剋作用」。在尋找參考文獻的同時，發現這類的研究不在少數，然而對於榕樹的相剋作用，卻似乎還未見到較深入的相關探討。於是我們決定針對這個主題，著手進行研究。

二、榕樹簡介：

榕 樹 *Ficus microcarpa* L.f.

桑 科 Moraceae

別 名：正榕、榕烏松、老公鬚

性 狀：大型常綠喬木，幹多分枝，枝幹上長出細長的氣根，具乳汁。

葉 　：單葉，互生，倒卵形或橢圓形，全緣，革質，具托葉痕。

產 地：臺灣、日本、琉球、中國大陸、印度、菲律賓、馬來西亞、澳洲等地。

用 途：藥用、觀賞用、行道樹。

繁殖法：可用種子播種或扦插法繁殖，生性強健，生長快速，栽培容易。

(榕樹 http://www.chps.ptc.edu.tw/school_plant/page_9.htm；榕樹 http://www.cc.nhctc.edu.tw/~n9099129/new_page_1213143.htm)

三、相剋作用簡介：

植物相剋作用 (allelopathy) 取自希臘字的 Allelon (兩個相對因子，或植物) 及 pathon (有害的) 兩字結合而成，是指植物在代謝過程中釋放有毒物質以抑制本身或其鄰近植物之種子萌發、根生長、植株的發育及開花乃至結果 (Chou, 1982; Chou, 1981; Kuo, 1983)。在自然生態系的植物交互影響中相剋作用扮演相當重要的一環。

植物生長過程中一直進行生理及生化上的代謝，並產生次階代謝物質如酚類 (phenolics)，松烯類 (terpenoids)，植物鹼 (alkaloids)，類黃素 (flavonoids) 及其他有機化合物。植物的次階代謝物質過去被認為是植物不需要的廢物而排出體外 (王子定, 1982; 王世中, 1965; 周昌弘, 1973; Muller, 1966; Tukey, 1969; Whittaker, 1970)。近年來，學者已指出這些次階代謝物質具有防禦，引誘，刺激，攻擊或拒斥等作用。植物次階代謝物質中具抑制植物生長者謂植物毒物質。它在植物體內不斷地產生並堆積於植物細胞間質，液胞或組織液，同時也不斷地滲出或被排出體外。其釋出體外的方式有以下四種 (周昌弘, 1987; Chang-Hung Chou, 1999; M.Olofsdotter, 1998; Ravinder K.Kohli, 2001; Weidner S., 2002)：

(一) 揮發作用：

在氣候乾旱的地區，如地中海型氣候區、沙漠地區或熱帶雨水少的地區，大氣中之水勢能較植物體內之水勢能為低，藉植物之揮發及蒸散作用，將植物代謝

物質釋放出來。

(二) 淋溶作用：

植物的次階代謝物質常累積於植物組織間隙或液胞裡，經雨水淋洗，這些次代謝物質就被淋溶到植物外表而釋放到土壤或環境中。這些被淋溶的物質為水溶性的酚類化合物、氨基酸、核醣體的類黃素或植物鹼 (Chou, 1974; Chou, 1982; Chou, 1975) 而對植物造成影響。

(三) 根的泌濾作用：

植物營生理作用時，根除了吸收水份及營養物資外，還會分泌及滲濾次階代謝物質。專家也指出，在許多作物中廣泛地發現根的泌濾作用。(蟛蜞菊相剋作用之研究 <http://www.khjh.kh.edu.tw/science40/高中/高中生物2/高中生物2.htm>)

(四) 土壤中植物殘渣分解作用：

植物的殘留物質遺置土壤後，因土壤腐生菌之作用逐漸腐爛，在腐爛初期會產生許多酚類化合物或其他有機化合物。大部分的有機化合物都對植物生長有害，故腐爛分解的時間若不夠長，則容易造成植物相剋作用，影響植物生長發育及產量至鉅。

而植物的相剋作用發生共有六個要件：

- (一) 一種植物之優勢性，或另一種作物的死亡，並非因光線、氧氣、土壤肥力、水分及其他物理因子所致。
- (二) 必須有一方能產生植物毒物質。
- (三) 所產生毒物質之量必須在棲地中累積到某一濃度足以危害到自己存活及其鄰近植物之生長。
- (四) 具受植物毒物質危害之植物。
- (五) 有些植物具適應性之自毒作用，此在演化上十分重要。
- (六) 植物產生之相剋物質必須配合環境的條件。(周昌弘, 1995)

四、研究目的：

1. 探討榕樹和其他植物(福木)萃取液對植物萌發生長有無相剋作用存在。
2. 不同榕樹組織萃取液，分別在不同濃度下對植物萌發生長的影響。
3. 探討榕樹萃取液對植物不同生長期處理之影響。
4. 分析榕樹萃取液中的主要產生相剋作用之物質。
5. 檢測榕樹萃取液對植物的蛋白質剖面及基因表現是否產生影響。

貳、研究方法與過程

一、器材與設備：

1. 器材：

- (1) 果汁機
- (2) 烘箱
- (3) 濾紙
- (4) 培養皿
- (5) 海綿
- (6) 冷凍離心機
- (7) 真空迴旋濃縮機
- (8) 展開槽
- (9) 高效率液相色層分析儀 (LC-10AS型，以折射率 (reflective index) 偵測器測定之)
- (10) 電泳槽
- (11) EIA reader
- (12) Typhoon-9200 scanner
- (13) GenePix 4000B scanner

2. 藥品：

- (1) 乙酸乙酯
- (2) 正己烷
- (3) 甲醇
- (4) 管柱色層分析矽膠 (Merck 7734 (70-230 mesh))
- (5) TLC矽膠 (Merck 55554 (Kieselgel 60 F254))
- (6) HPLC矽膠 (Phenomenex 250x10 mm 00G-4274-N0 Luna Silica (2) (5 μ m))
- (7) MS salts (4.4 g, GIBCO - BRL cat. # 10632-016)
- (8) plant cell culture agar (Sigma, 70K0884)
- (9) 電泳下層膠 (0.75 mm)

樣品	結球白菜和小白菜	阿拉伯芥
濃度	15%	10%
Total	30 ml	5 ml
30% acrylamide	15 ml	1.7 ml
1.5M Tris (pH8.8)	7.5 ml	1.3 ml
10% SDS	0.3 ml	0.05 ml
ddH ₂ O	7.05 ml	1.9 ml
10% APS	0.15 ml	0.05 ml
TEMED	0.0099 ml	0.002 ml

(10) 電泳上層膠 (0.75 mm)

樣品	結球白菜和小白菜	阿拉伯芥
濃度	5%	5%
Total	5 ml	2 ml
30% acrylamide	0.85 ml	0.33 ml
1.5M Tris (pH6.8)	0.625 ml	0.25 ml
10% SDS	0.05 ml	0.02 ml
ddH ₂ O	3.4 ml	1.4 ml
10% APS	0.05 ml	0.02 ml
TEMED	0.005 ml	0.002 ml

(11) 緩衝液一 (10% TCA 6.8g, 0.3% DTT 1.7g, acetone 定量至 20 ml)

(12) 緩衝液二 (0.3% DTT 0.06g, acetone 定量至 20 ml)

(13) 緩衝液三 (1% DTT 0.2g, 9M Urea 定量至 20 ml)

(14) 緩衝液四 (2X SSB)

Glycerol	15 ml
20% SDS	22.5 ml
1.0M Tris-HCl (pH6.8)	12.5 ml
ddH ₂ O	50 ml
使用前加入 5% 的 2-mercaptoethanol 和 2.5% 的 0.1%(w/v) Bromophenol Blue	

(15) 硝酸銀染色藥劑 (附錄一)

(16) coomassie blue 染色藥劑 (附錄二)

3. 生物材料：

(1) 榕樹 (*Ficus microcarpa* L.f.)

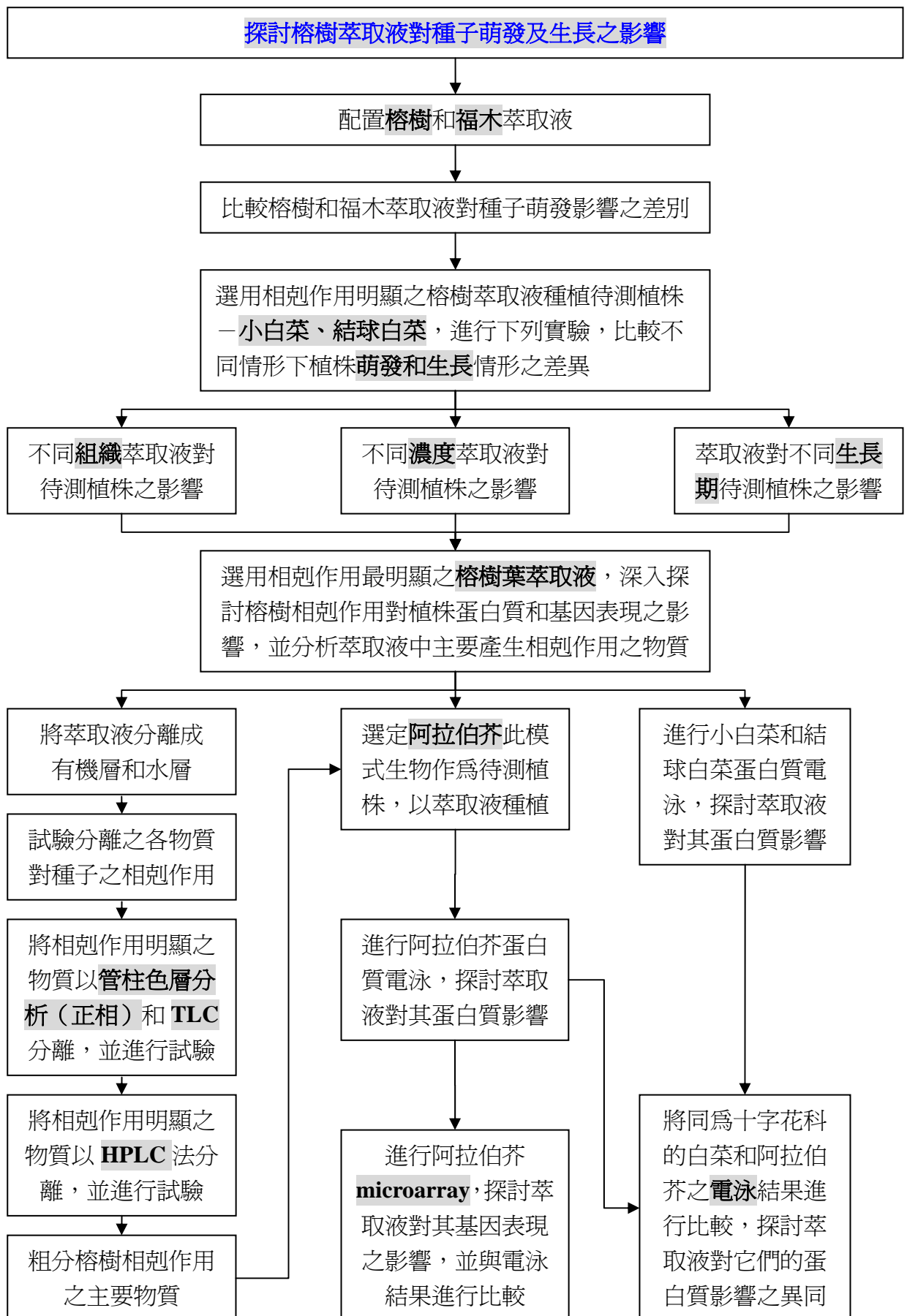
(2) 福木 (*Garcinia spicata* Hook f.)

(3) 小白菜種子 (*Brassica rapa* L.ssp.chinensis (Rupr. (Olsson)))

(4) 結球白菜種子 (*Brassica pekinensis* Rupr.)

(5) 阿拉伯芥種子 (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0)

二、實驗設計與流程：



配製植物萃取液

1. 取位於建中自強樓和資源回收室榕樹之根、莖（枝條）、葉各約 150 g。
2. 取位於建中麵食部旁福木之葉約 150 g。
3. 將根和枝條分別以剪刀、鉗子剪成許多 1.5 cm 的小段。
4. 將上述處理好之生物材料分別置入烤箱在 40°C 下烘 15 小時。
5. 分別秤取烘乾之榕樹根、莖、葉和福木葉 50 g 加水配成重量濃度 10% 的溶液，放入果汁機攪拌 10 分鐘。
6. 以紗布分別過濾其濾液。
7. 將各濾液離心（13000 rpm）30 分鐘，取其上清液至燒杯。
8. 將各燒杯以保鮮膜密封置入冰箱保存在 4°C 下。
9. 實驗中可取出部份溶液加水稀釋成 5%、2.5% 等各種濃度。

實驗一：榕樹和福木萃取液對結球白菜及小白菜萌發影響之差異

1. 取 7 個培養皿，分別鋪上摺成適當大小之擦手紙，再覆上一張濾紙。
2. 在培養皿中分別加入下列溶液各 10 ml：

編號	1	2	3	4	5	6	7
溶液	水	10%榕樹葉萃取液	5%榕樹葉萃取液	2.5%榕樹葉萃取液	10%福木葉萃取液	5%福木葉萃取液	2.5%福木葉萃取液

3. 於每個培養皿濾紙上平均放置 25 顆結球白菜種子。
4. 將培養皿加蓋，置入 25°C，光照 16 小時，黑暗 8 小時之生長室。
5. 將小白菜取代結球白菜，重複步驟 1~4。
6. 於 3 天後觀察兩種白菜，並紀錄各組培養皿之萌發情形（本實驗種子萌發的定義為胚根冒出）。
7. 重複本實驗 5 次，將得到的數據取其平均，並算出標準差。

實驗二：榕樹萃取液對結球白菜、小白菜萌發之影響

1. 取 10 個培養皿，分別鋪上摺成適當大小之擦手紙，再覆上一張濾紙。
2. 在培養皿中分別加入下列溶液各 10 ml：

編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
溶液	水	10%根萃取液	5%根萃取液	2.5%根萃取液	10%莖萃取液	5%莖萃取液	2.5%莖萃取液	10%葉萃取液	5%葉萃取液	2.5%葉萃取液

3. 於每個培養皿濾紙上平均放置 25 顆結球白菜種子。
4. 將培養皿加蓋，置入 25°C，光照 16 小時，黑暗 8 小時之生長室。
5. 將小白菜取代結球白菜，重複步驟 1~4。
6. 於 3 天後觀察兩種白菜，並紀錄各組培養皿之萌發情形（本實驗種子萌發的定義為胚根冒出）。
7. 重複本實驗 5 次，將得到的數據取其平均，並算出標準差。

實驗三：榕樹萃取液對結球白菜及小白菜莖、根之影響

1. 取 10 個培養皿，分別鋪上摺成適當大小之擦手紙，再覆上一張濾紙。
2. 在培養皿中分別加入下列溶液各 10 ml：

編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
溶液	水	10% 根萃 取液	5% 根萃 取液	2.5% 根萃 取液	10% 莖萃 取液	5% 莖萃 取液	2.5% 莖萃 取液	10% 葉萃 取液	5% 葉萃 取液	2.5% 葉萃 取液

3. 於每個培養皿濾紙上平均放置 25 顆結球白菜種子。
4. 將培養皿加蓋，置入 25°C，光照 16 小時，黑暗 8 小時之生長室。
5. 將小白菜取代結球白菜，重複步驟 1~4。
6. 分別於第 4 天、第 8 天觀察紀錄各組培養皿中莖、根長之生長情形。
7. 莖、根長的紀錄為將所有有萌發之種子測量後，取其平均值。
8. 生長率：加水對照之幼苗莖、根長設定為 1 時，實驗組幼苗莖、根長對其的比值。

實驗四：榕樹萃取液對結球白菜及小白菜不同生長期處理之影響

1. 取 3 個培養皿，分別鋪上摺成適當大小之擦手紙，再覆上一張濾紙。
2. 在培養皿中分別加入下列溶液各 10 ml：

編號	1	2	3
溶液	水	水（四天後改為 10%葉萃取液）	10%葉萃取液

3. 於每個培養皿濾紙上平均放置 25 顆結球白菜種子。
4. 將培養皿加蓋，置入 25°C，光照 16 小時，黑暗 8 小時之生長室。
5. 將小白菜取代結球白菜，重複步驟 1~4。
6. 4 天後，取兩個新的培養皿（編號依然為 2），各加入 10 ml 的 10%葉萃取液，將原 2 號培養皿內的小白菜和結球白菜分別移植到其內。
7. 於第 8 天觀察紀錄各組培養皿中莖、根長之生長情形。
8. 莖、根長的紀錄為將所有有萌發之種子測量後，取其平均值。
9. 生長率：加水對照之幼苗莖、根長設定為 1 時，實驗組幼苗莖、根長對其的比值。

實驗五：榕樹萃取液中的物質分析

（一）薄層層析法(TLC)初步分析

1. 10 cm x 10 cm 之 TLC 片以鉛筆畫上起始和終止線，並在起始線上相隔適當距離標明三個起始點。
2. 取毛細管沾取葉萃取液，在三起點處分別以 10 μ l 萃取液迅速沾染，控制直徑在 2 mm 之內，靜置使其乾燥。
3. 在展開槽中加入 30 mL 2%醋酸溶液作展開液，並於槽與蓋子相接處塗抹凡士林。蓋上蓋子並壓緊，防止溶劑揮發並使槽內之蒸氣迅速達到飽和。
4. 迅速將 TLC 片置入展開槽中，使起始端沒入液面下，但起始點不接觸展開液。立

刻將蓋子蓋上並壓緊。

- 待展開液上升至終止線後，將 TLC 片取出，並置於抽風櫥內乾燥。
- 在暗室中以 UV 燈照射 TLC 片，觀察其結果。

(二) 萃取與分離

- 配置大量重量濃度 10% 的葉萃取液。
- 將葉萃取液以一比一的水與乙酸乙酯，進行分配萃取，萃取三次，分得乙酸乙酯層約 65 g、水層約 13 g。
- 將兩層物質依下列濃度配置溶液，各取 5 ml 種植結球白菜，進行萌發生長試驗 1。

編號	1	2	3	4	5	6
溶液	5% 溶液	1% 溶液	0.5% 溶液	0.1% 溶液	0.05% 溶液	水

- 選取相剋作用明顯之乙酸乙酯層繼續進行分離。
- 以 91 g 矽膠吸附乙酸乙酯層，取 650g 的矽膠來充填管柱，進行管柱色層分析，沖提劑依序為正己烷、乙酸乙酯、甲醇及其混和液。
- 每 250 ml 毫升沖提劑收集一瓶，共收集 86 瓶，各瓶資料如下表：

瓶編	重量 (g)	沖提劑	瓶編	重量 (g)	沖提劑
1-2	0.042	H (100)	43-50	0.330	H : E (70 : 30)
3-10	0.148	H : E (98 : 2)	51-58	0.339	H : E (60 : 40)
11-18	1.133	H : E (96 : 4)	59-66	0.333	H : E (50 : 50)
19-26	0.631	H : E (94 : 6)	67-74	3.217	H : E (30 : 70)
27-34	1.380	H : E (90 : 10)	75-82	21.352	E (100)
35-42	0.991	H : E (80 : 20)	83-86	24.121	M (100)

註：沖提劑 H：正己烷，E：乙酸乙酯，M：甲醇

- 收集的樣品以薄層層析法 (thin layer chromatography, 簡稱 TLC) 檢視，合併類似的瓶，初步分得 29 瓶。資料如下：

瓶編	原瓶編	瓶編	原瓶編	瓶編	原瓶編	瓶編	原瓶編	瓶編	原瓶編	瓶編	原瓶編
1	1-8	6	21-22	11	33-35	16	43-44	21	54-57	26	73-74
2	9-12	7	23	12	36-37	17	45-46	22	58-65	27	75
3	13-17	8	24-25	13	38-39	18	47-48	23	66-67	28	76-82
4	18	9	26-29	14	40	19	49-50	24	68-69	29	83-86
5	19-20	10	30-32	15	41-42	20	51-53	25	70-72		

- 將各瓶物質配成濃度 0.1% 的溶液，各取 5 ml 種植結球白菜，進行萌發生長試驗 2。
- 選取相剋作用最明顯之物質，以適當極性之溶液當沖提劑，用高效率液相層析法 (high performance liquid chromatography, 簡稱 HPLC) 分離純化之。
- 將分離物質配成濃度 0.1% 的溶液，各取 5 ml 種植結球白菜，進行萌發生長試驗 3。
- 紀錄相剋作用最明顯物質之資料。

實驗六：榕樹萃取液對阿拉伯芥萌發之影響

(一) 種子春化

1. 以 70% 的酒精 1 ml 洗 5 分鐘，使離心管內的種子（約 3000 顆）與溶液充分均勻混和。
2. 加入 1ml 新鮮配置的 25% 漂白水與 0.025% SDS 混和液，劇烈地搖 15 分鐘。
3. 移至無菌操作台，以 1 ml 的無菌水清洗多次，直至 SDS 完全移除乾淨為止。
4. 將離心管直接以鋁箔紙包起，放入 4°C 的冰箱 3~4 天。

(二) 配置 Agar

1. 將一包 MS salts 加入 1900 ml MQ 水中。以 5N KOH 滴定使其 pH 值調整為 5.7。加水至體積為 2 L，配製成濃度為 1/2 的 MS。
2. 取出 250 mL 加入 plant cell culture agar 2.5 g，配製成濃度為 1% 的 agar，放入磁石使其均勻混和。
3. 高溫滅菌 20 分鐘。
4. 降溫至 60°C 同時以磁石充分攪拌。
5. 在無菌操作台中配製含各種濃度榕樹葉萃取液的 Agar：

編號	1	2	3	4
榕樹葉萃取液濃度	0%	0.05%	0.1%	0.5%
Agar (1%) 體積(ml)	25	24.375	23.75	18.75
萃取液 (2%) 體積(ml)	0	0.625	1.25	6.25
Total 體積(ml)	25	25	25	25

(三) 以 top Agar 播種

1. 先將 1% 的 agar 稀釋為 0.5%。
2. 在無菌操作台中配製與各組底層 agar 榕樹萃取液濃度相同且含阿拉伯芥種子之 agar 混和液：

編號	1	2	3	4
榕樹葉萃取液濃度	0%	0.05%	0.1%	0.5%
Agar (0.5%) 體積(ml)	2.5	2.425	2.35	1.75
種子體積(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
萃取液 (2%) 體積(ml)	0	0.075	0.15	0.75
Total 體積(ml)	3	3	3	3

3. 將配置好的 top Agar 分別加入各組培養基中。
4. 輕輕搖晃培養基，使得種子均勻分佈於底層 agar 之表面，用透氣膠帶將其密封，置入 25°C，光照 16 小時的生長室裡。
5. 於 7 天後觀察，並紀錄各組培養基之萌發情形（本實驗種子萌發的定義為胚根冒出）。

實驗七：榕樹相剋作用對小白菜、結球白菜和阿拉伯芥造成之蛋白質變異—電泳

(一) 電泳膠製作

1. 將跑電泳之裝置——玻璃片，夾板，固定架緊密架好。

2. 配置膠體下層（結球白菜和小白菜 15%，阿拉伯芥 10%），加入H₂O使其上端水平，放置等其凝固。
3. 倒掉電泳裝置的上層H₂O並沖洗，配置膠體上層（5%），插入間隔板，將膠體放置等其凝固。

（二） sample製作

A. 小白菜和結球白菜之電泳：

1. 取種植四天的結球白菜、小白菜為 samples。
2. 分組秤重，並用鋁箔紙包好，註明重量和名稱。
3. 分別倒入研鉢中，加入液態氮，研磨至呈白色粉末狀後加入離心管中。
4. 取粉末和緩衝液一體積 1：2（1 g 粉末加 2 ml 緩衝液）加入離心管中。
5. 將各離心管震盪後，置於-20°C 中 12~16 小時。
6. 將 sample 退冰後在 4°C 下離心（13000 rpm）30 分鐘，倒除上清液。
7. 取粉末和緩衝液二體積 1：2（1 g 粉末加 2 ml 緩衝液）加入離心管中。
8. 震盪後，置於-20°C 下 1 小時。
9. 離心（13000 rpm）30 分鐘，倒除上清液。
10. 重複步驟 7~9 共三次。
11. 將離心管置於 4°C 下抽氣，至沉澱物變成粉末狀。
12. 取粉末和緩衝液三體積 1：2（1 g 粉末加 2 ml 緩衝液）加入離心管中。
13. 於室溫下每 10 分鐘震盪一次，共震盪三次。
14. 將 sample 置於-20°C 保存。

B. 阿拉伯芥之電泳：

1. 取種植十四天大的阿拉伯芥為 sample。
2. 分組秤重，裝至離心管中，以液態氮冷卻（若未直接抽取蛋白質需在冷卻後放入-70°C 的冰箱中保存）並註明重量和名稱。
3. 將離心管浸泡在液態氮中，用研磨棒將 100 mg 之植物組織研磨至呈白色粉末狀。
4. 取粉末和緩衝液四（2XSSB）以體積 1：4（1 g 粉末加 4 ml 緩衝液）加入離心管中。
5. 將此混和液於 95°C 加熱五分鐘。
6. 在 4°C 下離心 15 分鐘（15000xg）。
7. 分裝 sample 上清液於另一離心管中，並置於-70°C 保存。

（三） 測定樣品濃度

A. 小白菜和結球白菜之電泳：

1. 取牛血清蛋白標準液（原液 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ） 20、10、5、2.5、0.5、0 μl 於離心管中，分別加無菌水到 800 μl ，再加入染劑 200 μl 。以製作標準濃度曲線。
2. 將配置好的牛血清蛋白注入到透明盤中，重複三次。
3. 取 sample 4 μl 加無菌水到 800 μl ，稀釋成兩百倍，再加入 200 μl 染劑。
4. 注入到透明盤中，重複三次。
5. 將透明盤以分光光度計測定吸光值，並用 KC junior 軟體針對標準液製作出標準濃度曲線，分析出各未知 sample 的蛋白質濃度。

B. 阿拉伯芥之電泳：

1. 將不同濃度的牛血清蛋白標準液（20、10、7.5、5、0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ）注入到透明盤中，

重複三次。

2. 取各 sample $1\ \mu\text{l}$ 加無菌水 $9\ \mu\text{l}$ ，稀釋 10 倍，注入到透明盤中，重複三次。
3. 將透明盤中各 sample 加入 Working Reagent $200\ \mu\text{l}$ ，於 37°C 下放置 30 分鐘使其反應。
4. 將透明盤以分光光度計測定吸光值，並用 KC junior 軟體針對標準液製作出濃度曲線，分析出各未知 sample 的蛋白質濃度。

(四) 電泳

1. 將染劑 $5\ \mu\text{L}$ 和計算好劑量的 sample、水加入小離心管混和。
2. 把小離心管放入 100°C 水中約 5 分鐘，破壞 sample 蛋白質結構。
3. $12000\ \text{xg}$ 離心約 1 分鐘，將管壁上之液體離下。
4. 將配置好的電解液注入至膠體的凹槽，將樣本和 Marker 注入凹槽中。
5. 把裝置放入電泳槽，開水冷卻並固定架子，倒入電解液。開始跑電泳。

(五) 染色

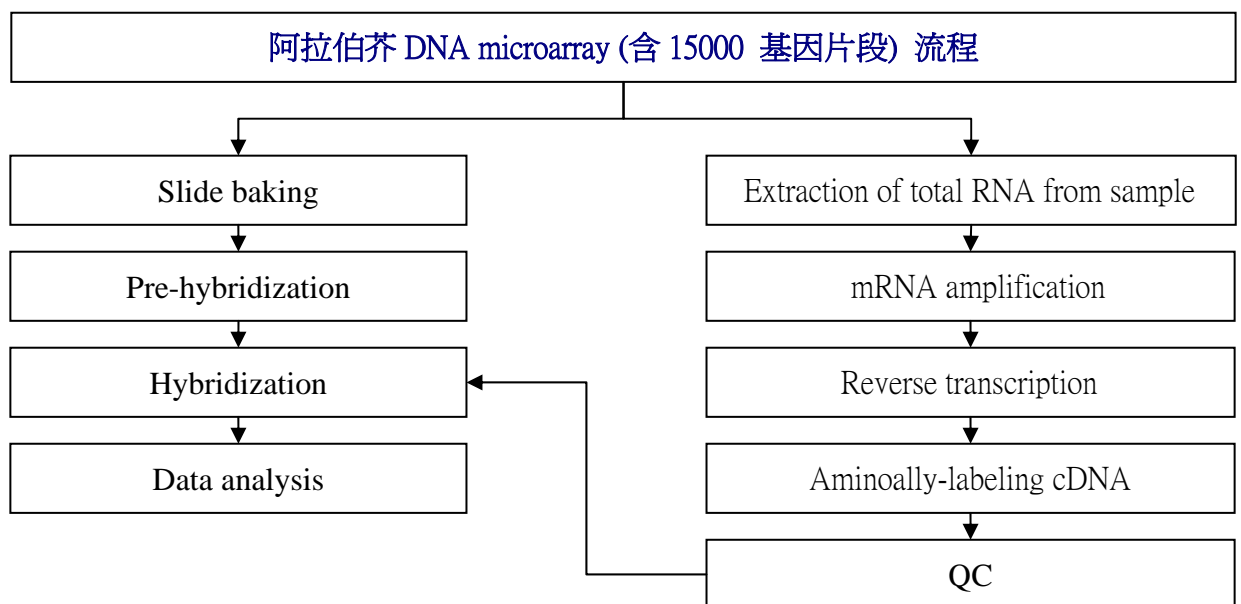
1. 電泳結束後，將玻璃和膠片拿出，於水中分離。
2. 將膠片放入底部平滑的塑膠盒中，以硝酸銀或 Commassie blue 染色(附錄一、二)。
3. 染色過程結束後，將膠片以掃描機掃描，運用電腦觀察各樣本間的蛋白質條帶差異。

(六) 封膠

1. 在水中將玻璃紙平鋪在玻璃板上，放上膠體並用另張玻璃紙把膠夾在中間(避免氣泡)。
2. 將多餘的玻璃紙邊緣折到背後，待乾。

實驗八：榕樹相剋作用對阿拉伯芥造成之基因表現變異—microarray

1. 收集以 Agar (代號：Agar (1)、Agar (2))、0.1% 葉萃取液(代號：0.1% 葉)、0.5% 葉萃取液(代號：0.5% 葉)種植 14 天的三組阿拉伯芥為 samples。利用 Microarray，進行基因表現分析。流程如下圖所示：

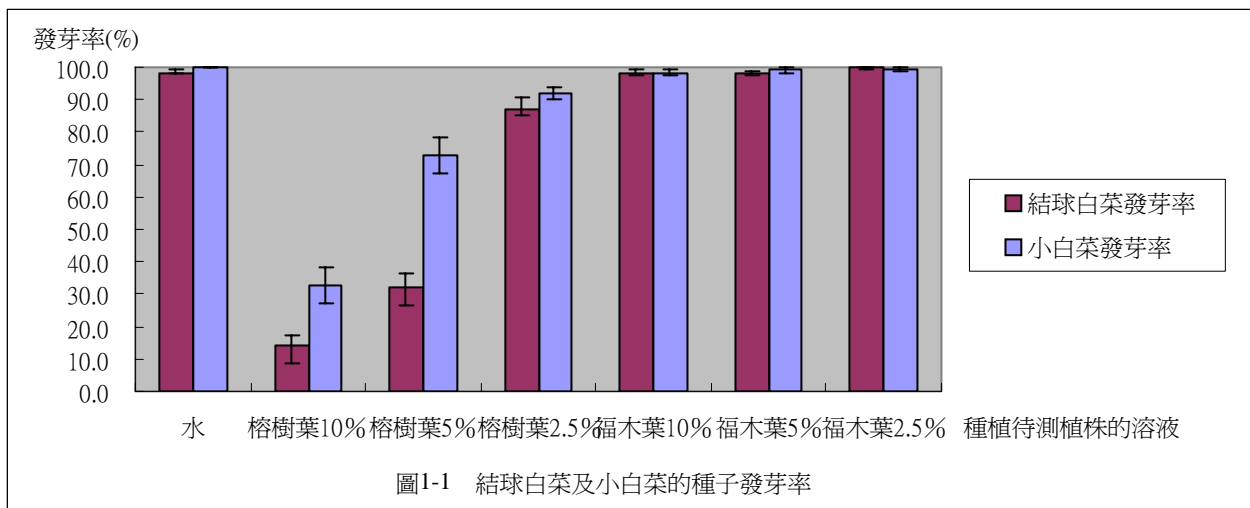


參、研究結果與討論

一、研究結果：

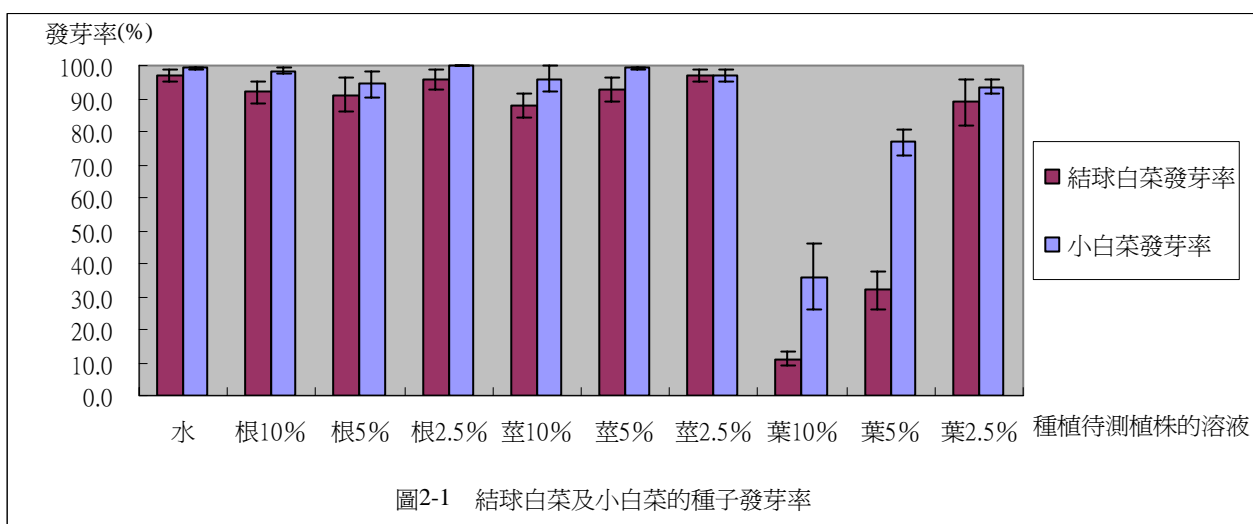
※各實驗的數據詳見附錄四

實驗一：榕樹和福木萃取液對結球白菜及小白菜萌發影響之差異



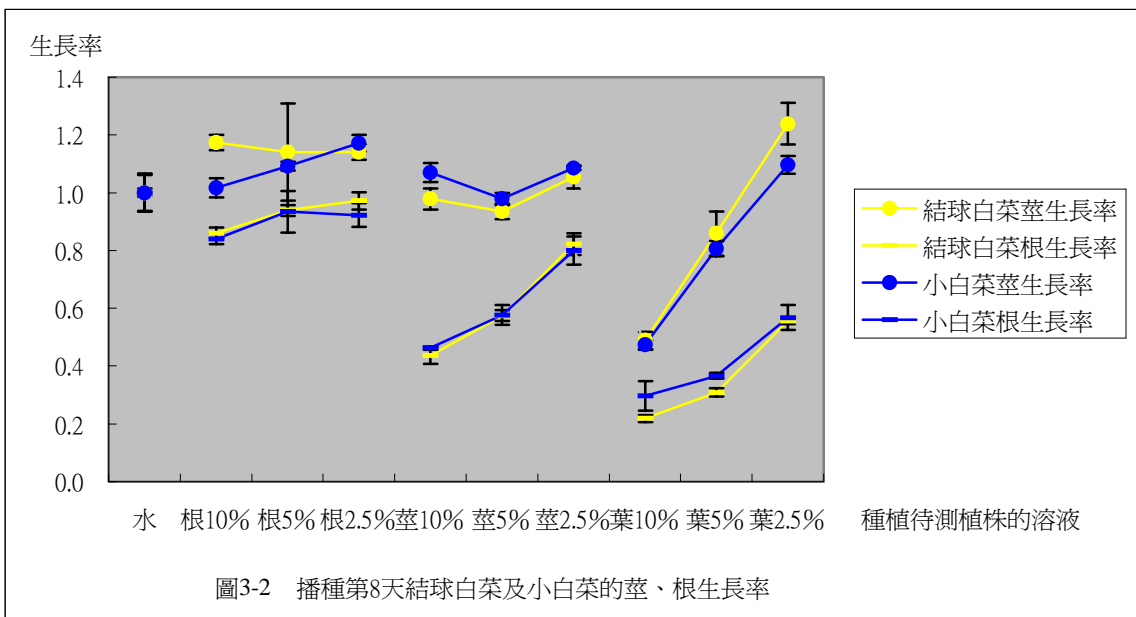
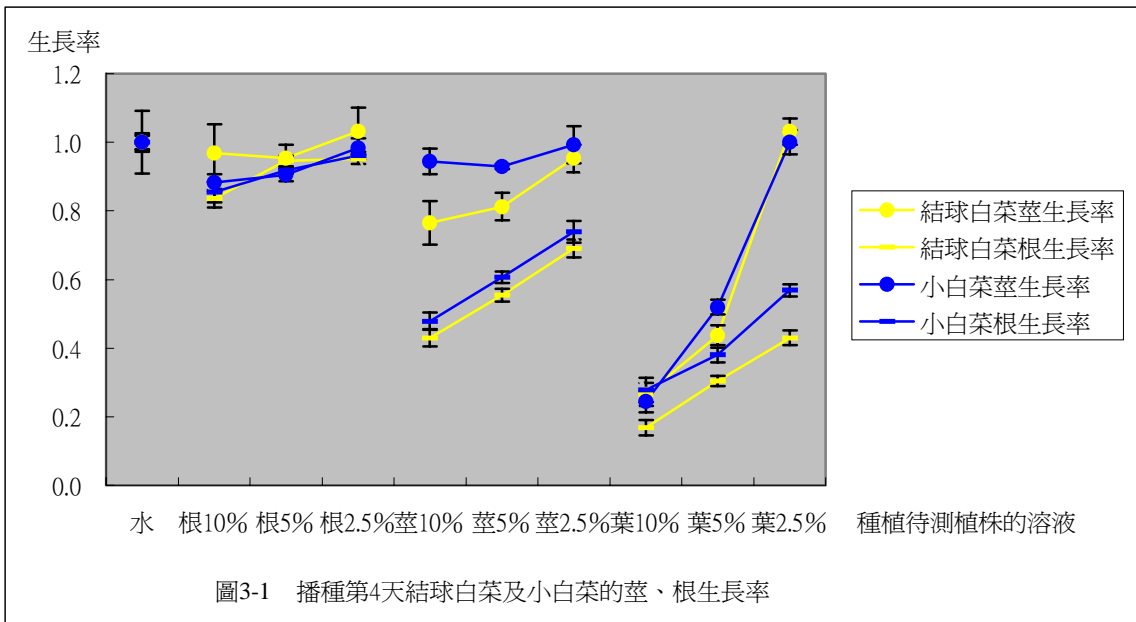
1. 根據圖 1-1，榕樹葉萃取液對兩種白菜的萌發皆有影響(結球白菜影響較為顯著)，且濃度愈大，抑制萌發的現象愈明顯。
2. 福木葉萃取液對兩種白菜的萌發較無抑制現象。

實驗二：榕樹萃取液對結球白菜、小白菜萌發之影響



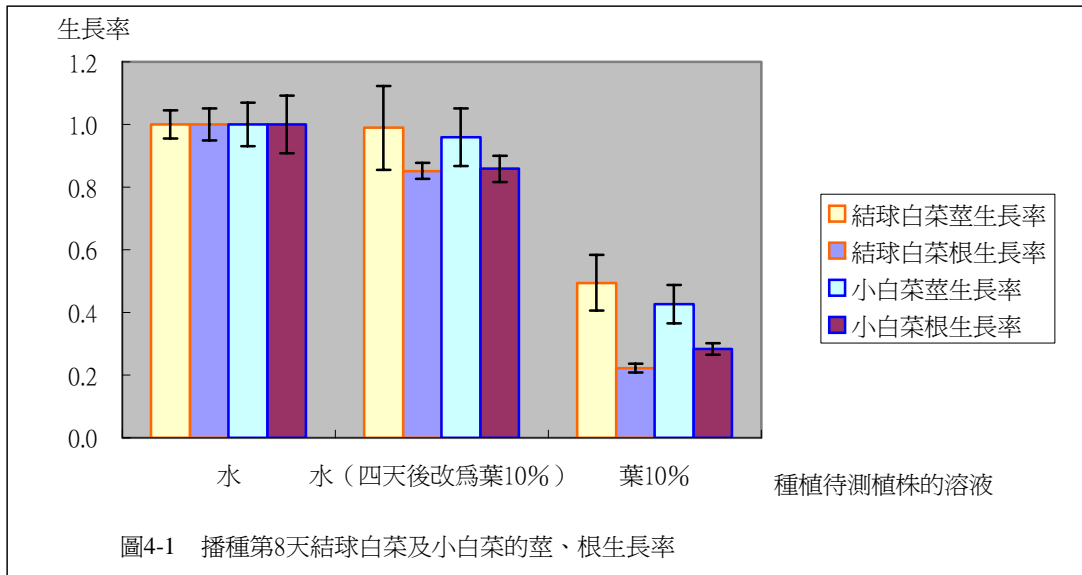
1. 根據圖 2-1，榕樹根、莖、葉萃取液中，以葉部萃取液對兩種白菜種子萌發的抑制最為明顯。
2. 榕樹葉萃取液的濃度愈大，對種子萌發的抑制愈明顯。

實驗三：榕樹萃取液對結球白菜及小白菜莖、根之影響



- 根據圖 3-1、3-2，榕樹萃取液對植株莖生長部份：
 - 葉部萃取液能明顯抑制兩種白菜的莖生長，影響隨濃度提高而加劇。
 - 莖部萃取液對結球白菜的莖生長在前四天有些微抑制，對小白菜則較無。
 - 根部萃取液對兩種白菜莖生長較無影響。
- 根據圖 3-2、3-2，榕樹萃取液對植株根生長部份：
 - 葉部和莖部萃取液對兩種白菜的根生長皆會產生抑制，影響隨濃度提高而加劇。其中以葉萃取液的影響最大。
 - 根部萃取液對植株的根生長較無影響。

實驗四：榕樹萃取液對結球白菜及小白菜不同生長期處理之影響



1. 根據圖 4-1，經過 4 天再加入葉萃取液的組別所受到的抑制較直接以葉萃取液種植的組別弱。只有根系略為受到影響。

實驗五：榕樹萃取液中的物質分析

(一) 薄層層析法(TLC)初步分析

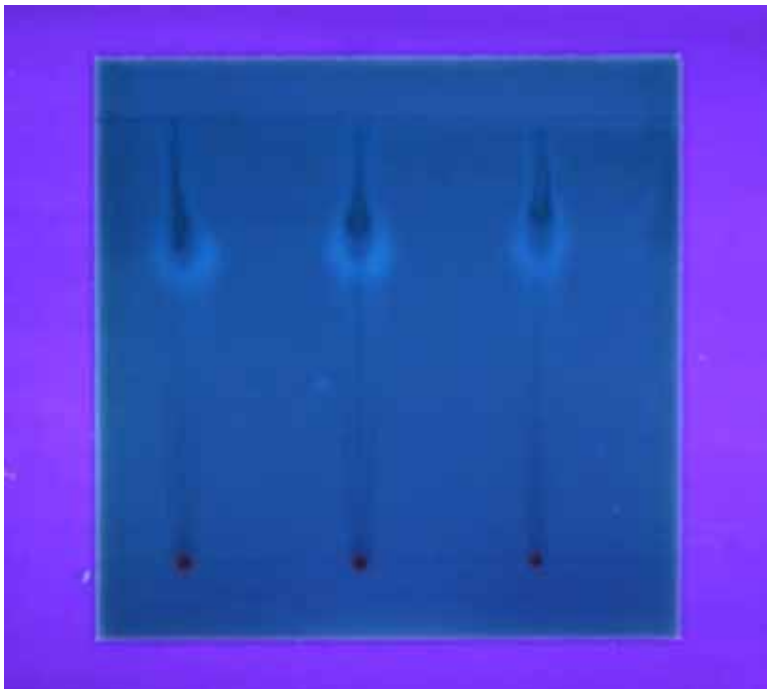
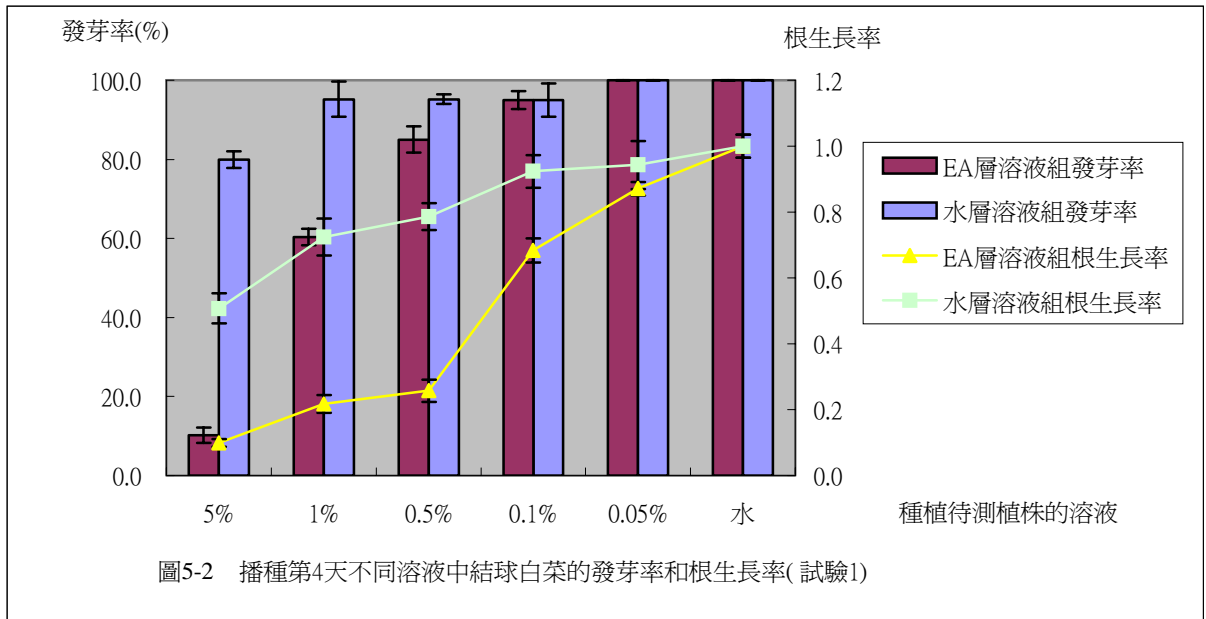


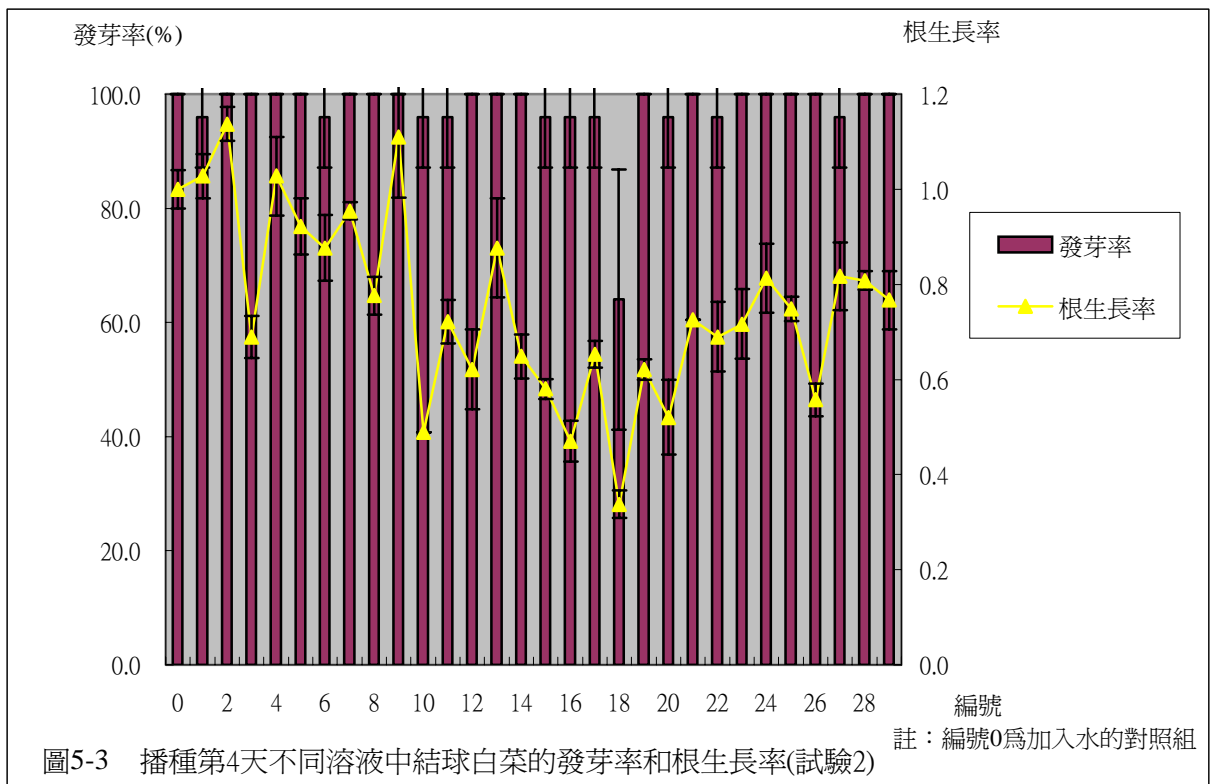
圖 5-1 葉萃取液的色層分析

1. 根據圖 5-1，TLC 片在紫外線燈的照射下，於 Rf 值 0.73 處呈現淡藍色螢光，表示榕樹葉萃取液中含具很長共軛結構的化合物。(Skoog, 2000)

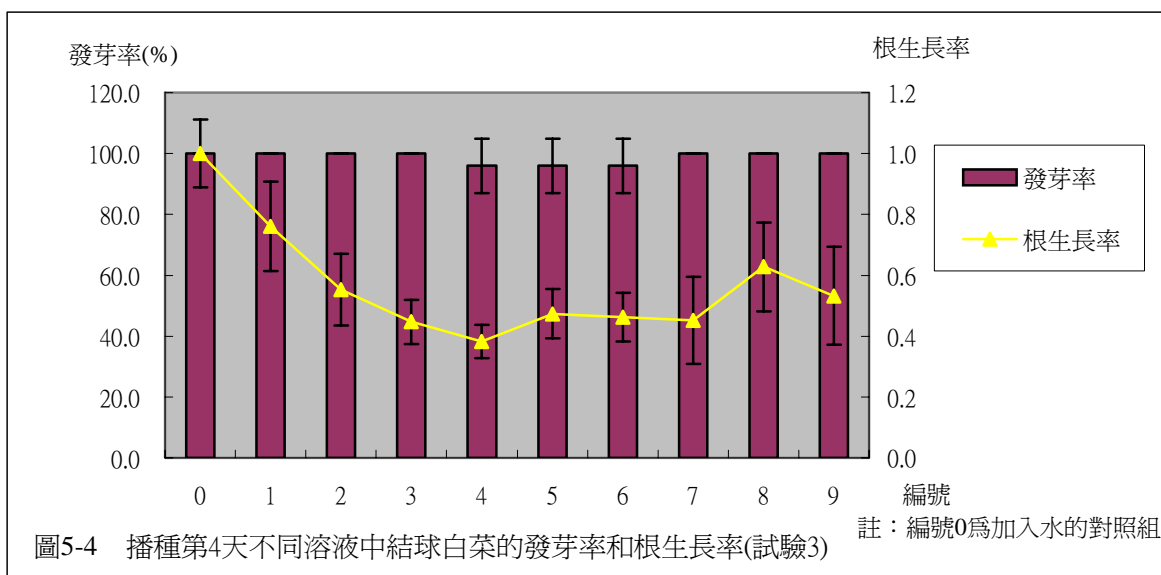
(二) 萃取與分離



1. 根據圖 5-2，EA 層和水層的物质皆有相剋作用，但 EA 層物质的相剋作用較水明顯。



2. 根據圖 5-3，榕樹能產生相剋作用的物质不只一種，但編號 18 瓶之物质的相剋作用較其他瓶明顯。



3. 根據圖 5-4，編號 18 瓶再分離出之各瓶（編號 1~9）的物質多有相剋作用。其中，第 4 瓶收集到的物質產生的相剋作用較明顯。各瓶收集時間和相對折射率如下圖、表所示：

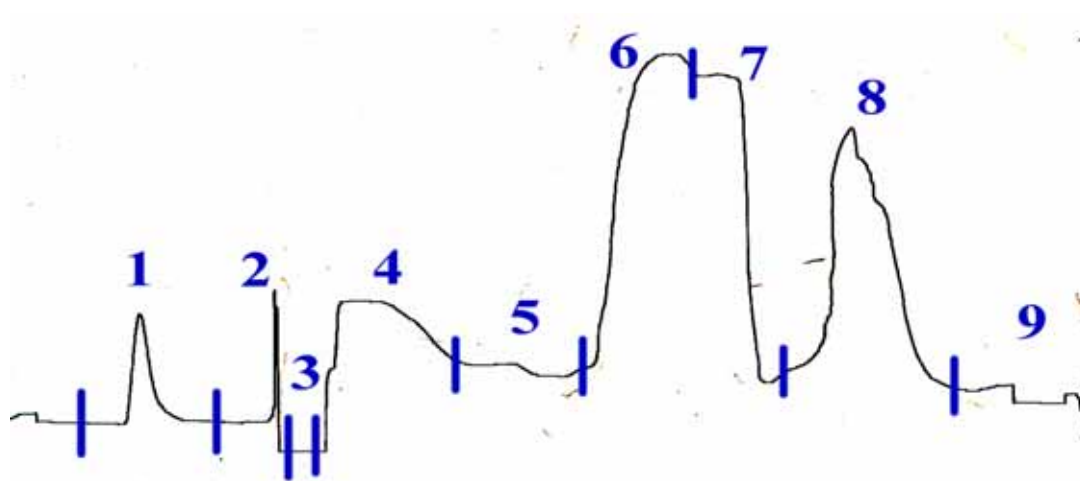


圖 5-5 HPLC 層析圖（橫軸為時間，縱軸為相對折射率）

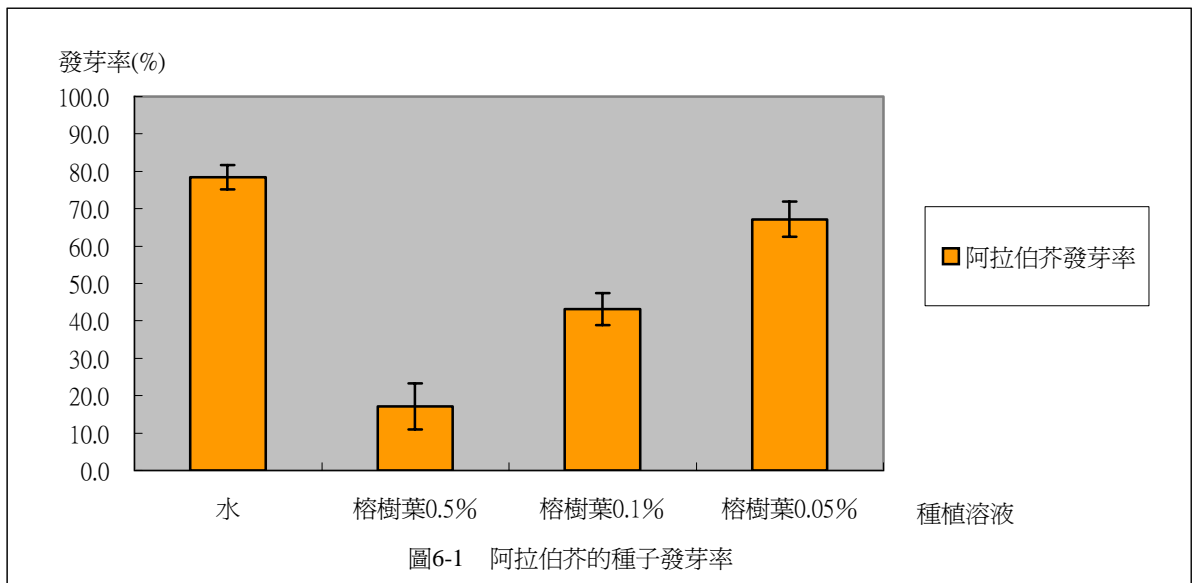
註：沖提劑為正己烷和乙酸乙酯 75：25。

瓶號	收集起始~終止時刻(分:秒)	收集總共時間(秒)	瓶號	收集起始~終止時刻(分:秒)	收集總共時間(秒)
1	3:48~5:49	121	6	13:10~15:14	124
2	5:50~7:30	100	7	15:15~17:00	105
3	7:31~8:21	50	8	17:01~21:30	269
4	8:22~11:56	214	9	21:31~28:20	409
5	11:57~13:09	72			



圖 5-6 HPLC 層析分離之各瓶一覽圖（由右至左分別為編號 1~9）

實驗六：榕樹萃取液對阿拉伯芥萌發之影響



1. 根據圖 6-1，榕樹葉部萃取液對阿拉伯芥種子亦含有抑制作用，且濃度愈大，影響愈明顯。

實驗七：榕樹相剋作用對小白菜、結球白菜和阿拉伯芥造成之蛋白質變異－電泳

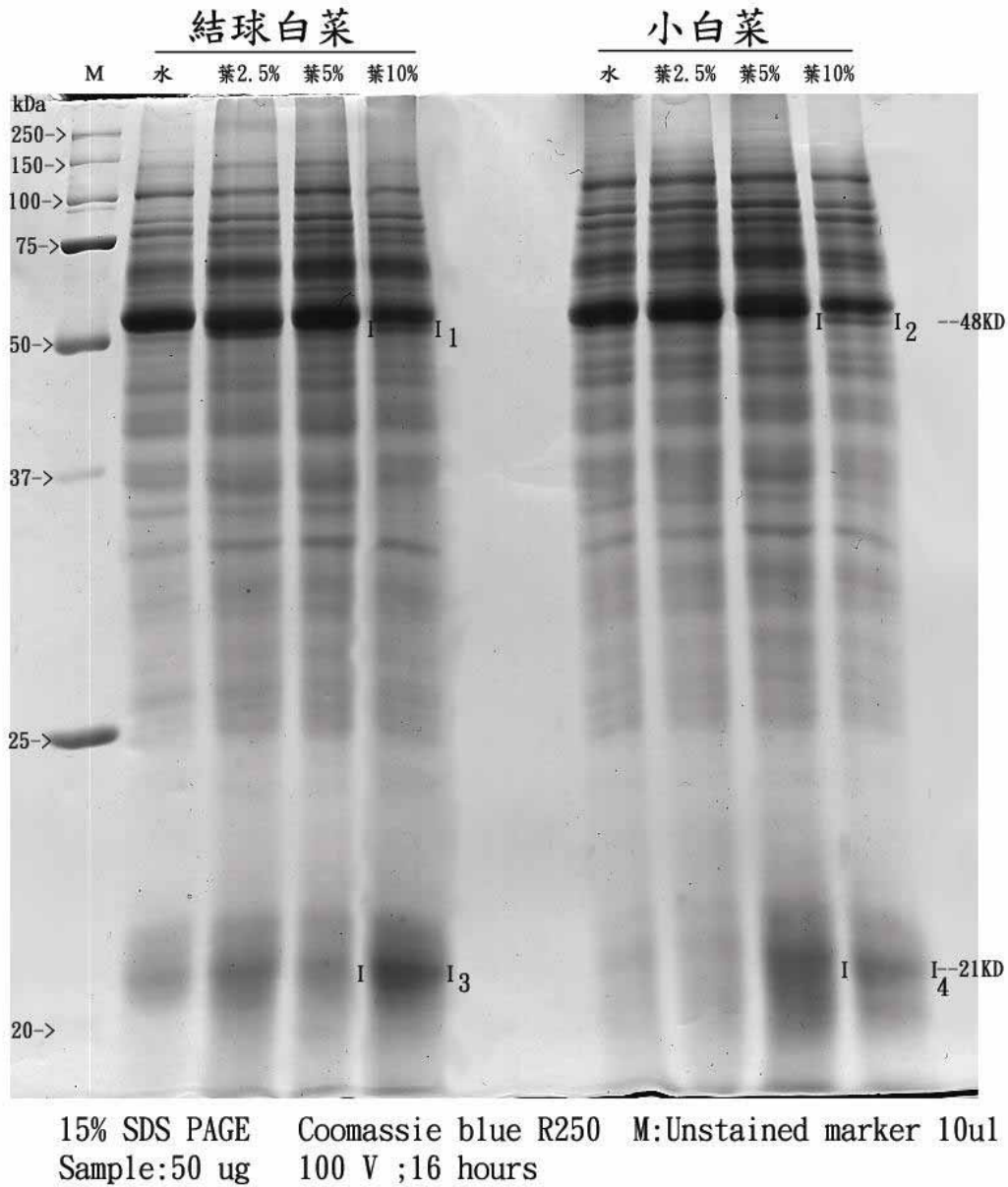


圖 7-1 結球白菜和小白菜（種植 4 天）蛋白質電泳膠

註：M—marker，水—以水種植的樣本，葉 2.5%—以葉 2.5% 萃取液種植的樣本，葉 5%—以葉 5% 萃取液種植的樣本，葉 10%—以葉 10% 萃取液種植的樣本。

1. 根據圖 7-1，結球白菜和小白菜電泳部份：

- (1) 以葉萃取液種植樣本的電泳結果，和以水種植的對照組相比，在條帶 1、2（分子量約 48 kDa）及 3、4（分子量約 21 kDa）四個條帶的蛋白質表現量有所差異，以葉萃取液處理的組別在這幾處蛋白質的表現量較對照組多。

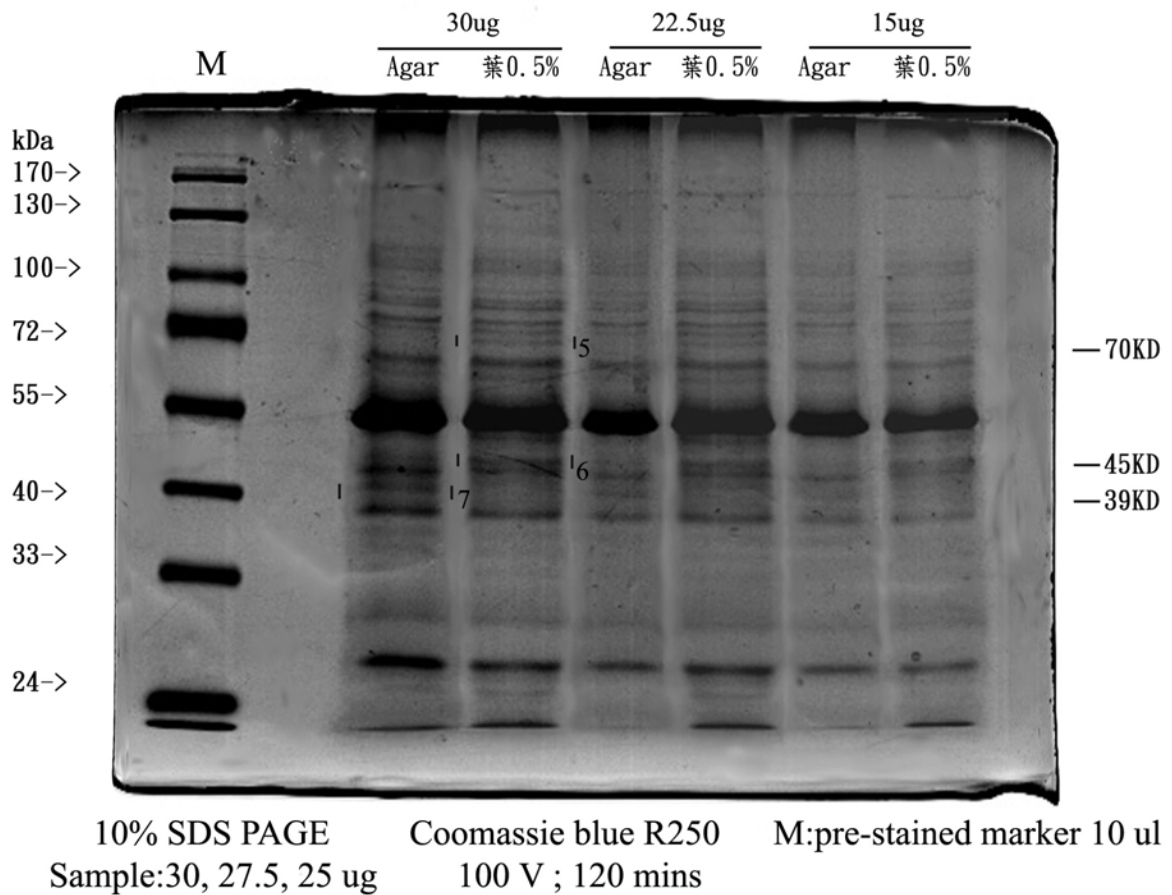


圖 7-2 阿拉伯芥（種植 14 天）蛋白質電泳膠

註：M—marker，Agar—以 Agar 種植的樣本，葉 0.5%—以葉 0.5% 萃取液種植的樣本。

2. 根據圖 7-2，阿拉伯芥電泳部份：

- (1) 以葉萃取液處理的組別明顯多出條帶 5（分子量約 70 kDa）、條帶 6（分子量約 45 kDa）。
- (2) 以葉萃取液處理的組別缺乏條帶 7（分子量約 39 kDa）。

實驗八：榕樹相剋作用對阿拉伯芥造成之基因表現變異－microarray

表 8-1 實驗組表現量為對照組一半以下之基因資料一覽表-1

編號	Function category	Locus	Clone ID	Calc Mr (kDa)	葉 0.1% normalized	葉 0.5% normalized
1	Transport	AT2G40300	81E1T7	29.0	0.443	0.483
2		AT2G04032	AT2G04032	39.4	0.429	0.39
3		AT5G04340	103P14T7	25.2	0.477	0.485
4		AT5G01600	110B4T7	28.2	0.407	0.354
5	Protein modification	AT2G31010	At2g31010	87.3	0.388	0.32
6		AT2G29400	142G13XP	36.3	0.461	0.34
7		AT4G13540	T6G15_90	24.9	0.430	0.451
8	Splicing	AT2G47580	38C6T7	28.1	0.289	0.228
9	Chlorophyll biosynthesis	AT1G58290	G4A8T7	59.5	0.318	0.452
10			179N10T7		0.391	0.483
11	SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting	AT4G19650	T16H5_10	64.6	0.377	0.15
12	Aging	AT3G47340	207C15T7	65.6	0.257	0.164
13			122C15T7		0.366	0.304
14		AT5G23030	AT5g23030	29.5	0.420	0.186
15	Photosynthesis	AT1G29930	140N10T7	28.2	0.489	0.249
16		AT1G31330	178K9T7	24.2	0.446	0.269
17		AT1G60950	179D11T7	15.5	0.423	0.363
18	Removal of superoxide radicals	AT4G25100	111G16T7	23.8	0.337	0.339
19			167K8T7		0.320	0.284
20	Stress response	AT1G29395	165H20T7	24.3	0.391	0.32
21	Unknown	AT5G21940	40B7T7	28.0	0.374	0.259
22		AT1G77220	G4B1T7	55.4	0.206	0.377
23		AT5G01590	AT5g01590	48.9	0.0557	0.436
24		AT5G66052	142H19T7	7.0	0.405	0.451

註：葉 0.1% normalized 為實驗組葉 0.1% 和對照組 Agar (1) 該基因的強度比值。
 葉 0.5% normalized 為實驗組葉 0.5% 和對照組 Agar (2) 該基因的強度比值。
 表格內容空白者表示和上一筆資料相同。
 藍色標示的資料表示該基因的表現可能為導致實驗七蛋白質電泳結果的原因。

表 8-2 實驗組表現量為對照組一半以下之基因資料一覽表-2

編號	Description
1	ferritin
2	metal transporter (ZIP7); member of the Zinc (Zn ²⁺)-Iron (Fe ²⁺) permease (ZIP) family
3	zinc finger (C2H2 type) family protein
4	ferritin 1
5	protein kinase family protein
6	serine/threonine protein phosphatase PP1 isozyme 1 (TOPP1) / phosphoprotein phosphatase 1
7	expressed protein
8	small nuclear ribonucleoprotein U1A
9	glutamyl-tRNA reductase 1
10	
11	mitochondrial transcription termination factor-related
12	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)
13	
14	senescence-associated family protein
15	chlorophyll A-B binding protein 2
16	photosystem I reaction center subunit III family protein
17	ferredoxin, chloroplast (PETF)
18	superoxide dismutase (Fe), chloroplast (SODB) / iron superoxide dismutase (FSD1)
19	
20	stress-responsive protein
21	expressed protein
22	expressed protein
23	expressed protein
24	expressed protein

註：表格內容空白者表示和上一筆資料相同。

藍色標示的資料表示該基因的表現可能為導致實驗七蛋白質電泳結果的原因。

表 8-3 實驗組表現量為對照組二倍以上之基因資料一覽表-1

編號	Function category	Locus	Clone ID	Calc Mr (kDa)	葉 0.1% normalized	葉 0.5% normalized
25	Transport	AT1G29020	G6E3T7	118.5	3.08	17.57
26		AT5G67330	AT5G67330	56.4	3.38	3.10
27		AT4G16370	AT4G16370	71.1	2.57	2.76
28		AT5G09720	AT5G09720	44.7	2.96	14.41
29		AT3G58810	AT3G58810	47.4	2.81	4.93
30		AT4G12470	311G6T7	16.7	3.87	3.94
31		AT2G30770	204L23T7	56.8	5.00	4.07
32		AT3G55090	AT3G55090	79.9	2.01	2.93
33		AT1G55910	AT1G55910	35.4	2.37	2.87
34		AT2G32270	AT2G32270	36.0	2.03	7.42
35	Anthocyanin biosynthesis	AT5G42800	AT5g42800	42.8	4.31	119.10
36	Protein metabolism	AT5G08180	AT5g08180	16.9	2.09	2.88
37		AT3G12700	MBK21.6	50.6	2.33	2.04
38	Transcription	AT5G13080	AT5g13080	16.8	2.61	2.85
39		AT1G66390	MYB90-Wu	28.1	2.21	76.10
40		AT5G43520	72D2T7	28.6	2.12	2.42
41		AT2G44370	181C13XP	28.0	2.52	3.41
42		AT2G27660	At2g27660	76.5	2.07	3.38
43	Protein modification	AT5G53450	MYN8_6	75.7	11.93	8.86
44	Sugar metabolism	AT3G13930	MDC16.18	58.5	2.56	3.66
45		AT5G66530	185G4T7	33.7	3.22	2.54
46	Ethylene biosynthesis	AT1G77330	61D2T7	34.9	2.32	4.89
47	Defense response	AT3G12500	92G1T7	34.6	2.61	4.50
48		AT2G43550	At2g43550	11.9	2.27	2.17
49	Pollen tube growth	AT3G22200	116G12XP	55.2	2.15	2.27
50	Unknown	AT5G48540	AT5g48540	29.0	2.12	2.49
51		AT3G18250	MIE15.4	7.4	3.83	3.38
52		AT2G33790	172M14T7	25.7	2.08	15.57
53		AT2G46050	At2g46050	66.3	2.25	4.87
54		AT1G70810	95L17T7	18.6	2.13	2.51

註：葉 0.1% normalized 為實驗組葉 0.1% 和對照組 Agar (1) 該基因的強度比值。
 葉 0.5% normalized 為實驗組葉 0.5% 和對照組 Agar (2) 該基因的強度比值。
 表格內容空白者表示和上一筆資料相同。
 藍色標示的資料表示該基因的表現可能為導致實驗七蛋白質電泳結果的原因。

表 8-4 實驗組表現量為對照組二倍以上之基因資料一覽表-2

編號	Description
25	calcium-binding EF hand family protein
26	NRAMP metal ion transporter 4 ; member of the natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) metal transporter family
27	oligopeptide transporter OPT family protein
28	Mg²⁺ transporter protein
29	zinc transporter
30	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
31	cytochrome
32	ATP-binding cassette-sub-family G-member 2
33	metal transporter; member of the Zinc (Zn ²⁺)-Iron (Fe ²⁺) permease (ZIP) family
34	zinc transporter
35	dihydroflavonol 4-reductase
36	ribosomal protein
37	aspartyl protease family protein, chloroplast nucleoid DNA binding protein
38	WRKY family transcription factor
39	myb family transcription factor, putative / production of anthocyanin pigment 2 protein
40	DC1 domain-containing protein
41	DC1 domain-containing protein
42	DC1 domain-containing protein
43	protein kinase family protein
44	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
45	aldose 1-epimerase family protein
46	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
47	basic endochitinase
48	trypsin inhibitor
49	4-aminobutyrate aminotransferase / gamma-amino-N-butyrate transaminase / GABA transaminase / beta-alanine--oxoglutarate aminotransferase
50	33 kDa secretory protein-related
51	expressed protein
52	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
53	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
54	C2 domain-containing protein

註：表格內容空白者表示和上一筆資料相同。

藍色標示的資料表示該基因的表現可能為導致實驗七蛋白質電泳結果的原因。

表 8-5 實驗組和對照組差異基因吸光值一覽表

編號	Intensity				編號	Intensity			
	Agar (1)	0.1% 葉	Agar (2)	0.5% 葉		Agar (1)	0.1% 葉	Agar (2)	0.5% 葉
1	24480.6	10833.0	25201.6	12175.0	25	214.0	659.0	61.6	1083.0
2	170.3	73.0	189.6	74.0	26	2520.0	8517.0	2542.1	7890.0
3	2838.8	1355.0	2283.6	1107.0	27	5448.9	13999.0	5113.4	14128.0
4	3514.0	1430.0	1834.5	650.0	28	149.6	443.0	14.0	201.0
5	2533.0	983.0	2215.5	708.0	29	489.5	1375.0	380.1	1874.0
6	7539.3	3477.0	6060.9	2058.0	30	2026.6	7848.0	1228.1	4834.0
7	770.3	331.0	725.7	327.0	31	637.6	3188.0	771.0	3137.0
8	16751.5	4836.0	17651.2	4026.0	32	191.7	386.0	270.9	794.0
9	67231.5	21369.0	75309.9	34038.0	33	572.8	1355.0	758.0	2173.0
10	53825.7	21058.0	61173.0	29533.0	34	984.9	2002.0	328.4	2436.0
11	1727.3	651.0	2742.7	411.0	35	117.0	504.0	10.0	1191.0
12	69306.6	17793.0	80915.0	13256.0	36	553.8	1159.0	539.2	1554.0
13	7973.3	2917.0	5648.9	1719.0	37	390.8	909.0	554.3	1131.0
14	778.0	327.0	1111.3	207.0	38	494.6	1290.0	339.1	965.0
15	14616.7	7152.0	11195.1	2790.0	39	97.9	216.0	10.0	761.0
16	23180.5	10333.0	15887.8	4267.0	40	5682.3	12031.0	6565.9	15916.0
17	10113.4	4276.0	8073.4	2934.0	41	7078.0	17823.0	7748.2	26402.0
18	7668.7	2584.0	3916.4	1326.0	42	1740.1	3601.0	1329.5	4493.0
19	9934.7	3181.0	5689.6	1614.0	43	1061.6	12669.0	1146.1	10151.0
20	17888.0	7003.0	23475.1	7503.0	44	388.0	994.0	351.9	1286.0
21	9947.3	3720.0	9757.6	2525.0	45	2892.8	9308.0	2908.4	7382.0
22	54787.6	11262.0	66269.1	24952.0	46	9068.4	21076.0	5813.4	28419.0
23	8147.0	454.0	112.3	49.0	47	5139.2	13409.0	4611.3	20755.0
24	3694.3	1497.0	3512.2	1585.0	48	247.4	561.0	113.0	245.0
					49	5544.0	11932.0	2655.7	6037.0
					50	776.8	1648.0	1308.9	3253.0
					51	2836.1	10852.0	4363.7	14727.0
					52	1624.4	3371.0	1415.3	22037.0
					53	328.8	741.0	253.4	1234.0
					54	9292.7	19751.0	10899.3	27398.0

註：本表之吸光值已扣除背景值。

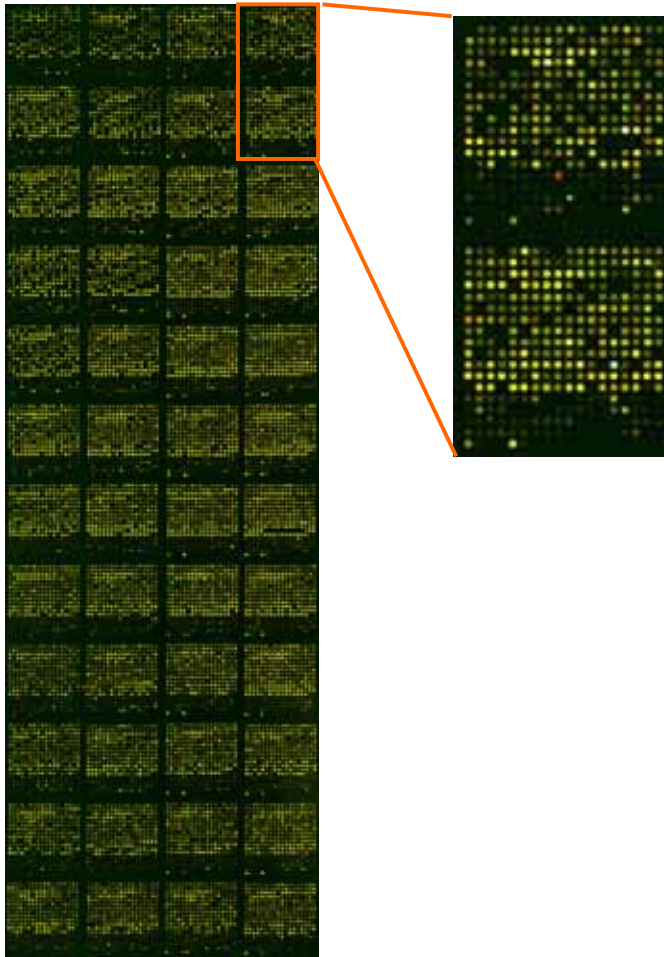


圖 8-1 阿拉伯芥 DNA microarray (含 15000 基因片段)

註：圖中紅點代表實驗組表現較強的基因，綠點代表對照組表現較強的基因，黃點代表實驗組和對照組表現接近的基因。

1. 根據表 8-1~8-4，榕樹葉萃取液對許多阿拉伯芥的基因表現皆有影響，其中與運輸有關的基因（1~4，25~34）被影響最大。
2. 根據表 8-1、8-2，榕樹葉萃取液可抑制阿拉伯芥和粒線體轉錄（SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting）（11）及光合作用（15~17）相關的基因表現，且葉萃取液的濃度越高，抑制越明顯。
3. 根據表 8-1、8-2，經榕樹葉萃取液作用下，其表現被抑制的基因中，基因 AT2G04032（2，39.4 kDa）和基因 AT2G29400（6，36.3 kDa）轉譯產生的蛋白質之分子量接近實驗七電泳結果中，變異蛋白質條帶 7（39 kDa）。基因 AT2G04032 轉譯出的蛋白質和鐵、鋅離子的運輸有關，基因 AT2G29400 轉譯出的蛋白質和蛋白質磷酸化有關。
4. 根據表 8-3、8-4，榕樹葉萃取液會使阿拉伯芥中與轉錄及物質合成（Anthocyanin biosynthesis、Ethylene biosynthesis）相關的基因大量表現，且葉萃取液的濃度越高，促進越明顯。
5. 根據表 8-3、8-4，經榕樹葉萃取液作用下，其表現被促進的基因中，基因 AT4G16370

(27, 71.1 kDa) 和基因 AT2G46050 (53, 66.3 kDa) 轉譯產生的蛋白質之分子量接近實驗七電泳結果中，變異蛋白質條帶 5 (70 kDa)。基因 AT4G16370 轉譯出的蛋白質和寡肽的運輸有關，基因 AT2G46050 的功能目前則是未知。

6. 根據表 8-3、8-4，經榕樹葉萃取液作用下，其表現被促進的基因中，基因 AT5G09720 (28, 44.7 kDa)、AT3G58810 (29, 47.4 kDa)、AT5G42800 (35, 42.8 kDa) 轉譯產生的蛋白質之分子量接近實驗七電泳結果中，變異蛋白質條帶 6 (45 kDa)。基因 AT5G09720 (28, 44.7 kDa) 轉譯出的蛋白質和鎂離子的運輸有關，AT3G58810 (29, 47.4 kDa) 轉譯出的蛋白質和鋅的運輸有關、AT5G42800 (35, 42.8 kDa) 轉譯出的蛋白質則是一種二氫葉酸還原酶。
7. 此外，葉萃取液對阿拉伯芥中一些其他功能的基因，如蛋白質修飾、物質代謝 (Protein metabolism、Sugar metabolism) 等等相關基因也都會產生影響。

二、討論：

1. 所選用生物材料的探討：
 - (1) 選用榕樹作為相剋作用中毒物質萃取來源的原因：
 - a. 因其為台灣鄉土常見植物，舉凡道路邊、校園內、公園都可見其蹤跡。且容易取得。
 - b. 植株龐大，摘取枝葉、剪取根部對植株本身影響不大。
 - (2) 選用結球白菜和小白菜為相剋作用中受到毒物質毒害對象的原因：
 - a. 生長週期短，萌發只須3~4天且萌發率高，易於觀察。
 - b. 易於取得且價格低廉。
 - c. 為較稚嫩的植物，受到環境因素的影響較深，易產生較顯著的生長變化，因此利於觀察。
 - (3) 選用阿拉伯芥為相剋作用中受到毒物質毒害對象的原因：
 - a. 生長週期短，易於觀察。
 - b. 為較稚嫩的植物，受環境因素影響較深，容易產生較顯著的生長變化，因此利於觀察。
 - c. 目前生物界對其蛋白質和和核酸序列有十分清楚的了解，相關研究資源眾多，為良好的模式生物，探討榕樹粗萃取液對其影響可分析萃取液對能哪些特定蛋白質和核酸產生作用。
 - d. 阿拉伯芥、結球白菜及小白菜均為十字花科的植物，有助探討榕樹萃取液對此類作物的影響。
2. 實驗一中，榕樹葉萃取液能有效影響小白菜和結球白菜種子的萌發，顯示其可藉由分泌化學物質來影響週遭植物的生長，具明顯的相剋作用。福木則較無此現象。
3. 榕樹不同組織產生的相剋作用不盡相同。實驗二、三中，發現葉部萃取液產生的抑制現象最為明顯，莖部其次，而根部萃取液幾乎沒有抑制效果。此外，發現稀釋過後成2.5%的葉部萃取液所呈現出的數據結果會和莖部萃取液接近。由此我們假設此相剋作用由「某物質」(暫稱為Ap)引發，其在植物體內的合成和輸送可能為以下兩種機制：

- (1) 主要的合成是在榕樹的葉部進行，並經由植物體內的運輸有少部分轉移到莖部甚至根系，而產生葉部較高而莖部較低的Ap濃度差異。
 - (2) 主要的合成是在榕樹的根部進行，但經由莖部的運輸大量轉移到葉部並產生累積，而產生上述的Ap濃度差異。
4. 不同的Ap濃度會產生不同程度的相剋作用：
- (1) 實驗二中，莖萃取液及2.5%葉部萃取液等Ap濃度較低或是根萃取液Ap濃度極低的組別中，兩種白菜的發芽率都接近100%；在濃度高（如10%、5%葉萃取液）的組別，則可發現發芽率隨濃度增高明顯降低。結球白菜對物質Ap的抵禦力較差，推測是其本身遺傳差異的結果。
 - (2) 實驗三顯現出Ap濃度差異對根部和莖部的生長產生不同的影響。在Ap高濃度下，兩種白菜根和莖的生長都明顯被抑制。在低濃度下，小白菜的莖生長率皆維持極高的狀態，而生長前四天時結球白菜莖的生長被榕樹莖萃取液稍微影響，在第八天時已克服。但根的生長率就不同了，除了葉部萃取液產生嚴重的抑制作用，Ap濃度較低的莖部萃取液也對其生長有明顯影響。實際觀察中發現，加入高濃度Ap萃取液組別，植株的根系短小蜷曲且根毛濃密。
5. 實驗三中，部分加入低Ap濃度溶液如根萃取液的組別，其莖生長率比只加水的對照組來的高。實際觀察中也發現，加入根萃取液的結球白菜和小白菜之葉片皆較加水之對照組來的肥大飽滿。我們認為是因為搗碎的植物組織中含有可利用的養分之緣故。
6. 實驗四中，經過4天再加入葉萃取液的組別所受到的抑制明顯較弱，植株除了根系的發育略為受到影響外，生長情形大致良好。顯示榕樹產生的相剋物質對尚未萌發的植株影響較大，對於已經在良好情形下萌發生長的植株影響較低。
7. 由實驗五的結果，推測葉萃取液中含具很長共軛結構的化合物。以管柱層析法與高壓液相層析法（HPLC）分離葉萃取液，發現其中能產生相剋作用的物質不只一種。用正己烷和乙酸乙酯75：25為沖提液的條件下，於HPLC的層析圖中分離時間約8分時所流出的物質具最明顯的抑制作用。榕樹的相剋作用應是多種次階代謝物質共同作用的結果，有待未來繼續深入分析。
8. 為了後續方便研究榕樹萃取液對阿拉伯芥種子蛋白質和核酸的影響，實驗六中直接採用相剋作用最明顯的葉部萃取液種植阿拉伯芥。且因其較小白菜和結球白菜稚嫩，故降低萃取液濃度，以達到適當的效果。
9. 蛋白質變異之探討：
- (1) 阿拉伯芥電泳膠片（圖7-2）部分，葉部萃取液處理的組別明顯多出的條帶5、6（分子量約70 kDa、45 kDa），條帶6與小白菜和結球白菜電泳膠片（圖7-1）中條帶1、2（分子量約48 kDa）可能為相同的蛋白質，是否為榕樹萃取液對十字花科植物產生的共同影響，有待進一步以二維電泳分析確認。這些蛋白質的變異可能是由於受到物質Ap的作用，植物細胞受到刺激而產生的適應蛋白質或逆境激素，甚至是某些基因的調控步驟受到干擾，而轉譯出有差異性的蛋白質。
 - (2) 阿拉伯芥電泳膠片（圖7-2）中的條帶7（分子量約39 kDa），則是用葉萃取液處理過的組別產生缺乏的現象。

(3) 榕樹相剋物質使這幾處蛋白質產生變異的機制，有待未來繼續的研究。

10. 基因表現變異之探討：

(1) 阿拉伯芥經榕樹葉萃取液的培養，其基因的表現，以物質運輸相關的基因被影響最多，且多為促進其表現，如基因AT4G16370 (27, 71.1 kDa)、AT5G09720 (28, 44.7 kDa)、AT3G58810 (29, 47.4 kDa)。這個結果也和實驗七蛋白質電泳中，條帶5 (約70 kDa)、6 (約45 kDa) 的蛋白質表現類似。此現象極可能是植物為了排除榕樹萃取液中的有毒代謝物質而大量表現這些基因。

(2) 榕樹葉萃取液使阿拉伯芥基因AT2G29400 (6, 36.3 kDa) 表現受到抑制，萃取液濃度越高，抑制越明顯。這個結果也和實驗七蛋白質電泳中，條帶7 (約39 kDa) 的蛋白質表現類似。其轉譯產生的蛋白質功能為serine/threonine protein的磷酸化，且表現在植物的根部 (Tair <http://www.arabidopsis.org/>)。這個結果也和實驗七蛋白質電泳的結果類似。此基因表現被壓抑的現象極可能是實際觀察中 (實驗三、四、五) 植物根部生長受到抑制的原因。

(3) 榕樹葉萃取液使阿拉伯芥基因AT5G42800 (35, 42.8 kDa) 大量表現，這個結果也和實驗七蛋白質電泳中，條帶6 (約45 kDa) 的蛋白質表現類似。其轉譯的蛋白質為一種二氫葉酸還原酶，其在生物體內可將二氫葉酸還原成具有生理活性的四氫葉酸，從而參與體內核酸和氨基酸的合成、花青素的合成等反應，為細胞生長和分裂所必需的物質 (葉酸 <http://www.medicchina.com/cmedicchina/yongyaozhinan/guanzhuotc/xiyi/weishengsu/008.htm>)。此現象可能是植物細胞受到榕樹相剋物質刺激而需大量產生此蛋白質以適應逆境。

(4) 榕樹葉萃取液使阿拉伯芥部分和光合作用有關的基因 (15~17) 的表現受到抑制，極可能抑制到植物的生長。但萃取液同時會促進一些和轉錄相關的基因 (38~42)。此現象可能是植物細胞受到榕樹相剋物質刺激而需大量產生蛋白質或逆境激素以適應逆境。這些基因表現被抑制或促進的程度，都與榕樹葉萃取液的濃度呈正相關。

(5) 榕樹葉萃取液使阿拉伯芥基因AT1G77330 (46, 34.9kDa) 的表現受到促進，此基因和逆境激素—乙烯的生物合成作用有關。此現象可能是植物細胞受到榕樹相剋物質刺激而需大量產生蛋白質或逆境激素以適應逆境。

11. 綜合以上論述，我們推演這些現象對於自然中榕樹本身的生理意義。基於根莖葉萃取液相剋效果的差異，可了解其分泌的機制並非「根的泌瀘作用」，而台灣高溫多雨的生長環境也使之無法經由「揮發作用」擴散出 (Muller, 1966)。配合葉中毒物質濃度最高的結果，可知「淋溶作用」(王世中, 1979; 周昌弘, 1990; Muller, 1974; Tukey, 1969; Whittaker, 1970)、「土壤中植物殘渣分解作用」為其分泌機制的可能性相當大。降雨使得葉部的毒物質得以落於地表，經由大量落葉的分解使毒物質泌出，亦或兩者並存。其次階段代謝物質產生的相剋作用會影響到植物許多基因和蛋白質的表現以及實際的生長。而其對根部的影響較大，則可能因為榕樹本身高大，可藉其茂密的枝葉阻擋被剋植物日光的獲取量，故分泌的物質主要影響被剋植物根系的發展。這些分析，都極待我們用更為直接的方法加以驗證。

肆、結論與應用

一、結論：

1. 榕樹可經由葉部產生化學物質，經由「淋溶作用」或「土壤中植物殘渣分解作用」影響週遭植物的生長。
2. 植物根部對此相剋物質較為敏感，低濃度即產生抑制。
3. 榕樹萃取液的相剋物質對尚未萌發的植物所產生的影響最大。
4. 榕樹葉萃取液的層析結果在紫外燈下發出螢光，應含有具共軛結構的化合物。
5. 用管柱層析法與高壓液相層析法（HPLC）分離葉萃取液，以正己烷和乙酸乙酯75：25為沖提液的條件下，於HPLC的層析圖中分離時間約8分時所流出的物質具最明顯的抑制作用。
6. 榕樹的相剋作用是多種次階代謝物質共同作用的結果。
7. 榕樹葉萃取液的相剋物質會使植物產生蛋白質和基因表現的差異，使植物體內的物質運輸、蛋白質修飾、光合作用、轉錄、物質合成等許多功能和反應受到影響。

二、應用：

1. 繼續利用化學方法分析萃取液的成分，定出引起抑制作用的主要物質，以合成「生物性除草劑」，可避免造成環境傷害，有別於有毒的化學藥劑。
2. 針對萃取液對於尚未萌發的植物所產生影響較大的特性，應用於栽培作物已順利生長的地區，可使作物以外的雜草無法長出，有助於作物的種植。
3. 榕樹具有栽培容易、生長快速、分布廣泛的特點，以其組織萃取而成的除草劑將可大量生產，並能擁有便宜的價格。
4. 從阿拉伯芥實驗中找出榕樹萃取液會造成植物哪些特定遺傳基因和蛋白質的改變而影響生長，並進一步探討是否對植物的產量和繁殖造成影響，將結果應用在實務的育種與改良方面。

伍、參考資料

1. 王子定，蘇學波，郭耀綸，1982，森林植物之毒他作用，中華林學季刊 15(4)：1-12
2. 王世中，1965，化學的互相影響在植物，東海大學印行 pp. 41-58
3. 王世中，1979，經營農業戰戰兢兢，興大土壤第五期 pp. 3-7
4. 周昌弘，1990，植物生態學.聯經出版事業公司 pp..252-265
5. 周昌弘等，1987，生物資賦優異教育.國立台灣師範大學科學教育中心.pp. 30-44
6. 周昌弘，1973，植物毒物質在植物生態上之地位 pp. 205-217。生長與分化研討會論文集。中央研究院生物研究中心專刊第1號，台北
7. 周昌弘，1995，生物多樣性：觀念、假說及研究.科學月刊 0307
8. Chang-Hung Chou etc. .1999. Biodiversity And Allelopathy. Academia Sinica.
9. Chou, C.H. and Y.T. Chung. 1974. The allelopathic potential of *Miscanthus floridulus*. Bot.

- Bull. Academia Sinica 15 : 14-27
10. Chou, C.H. and C.H. Yang. 1982. Allelopathic researches of subtropical vegetations in Taiwan. II. Comparative exclusion of understory by *phyllostachys edulis* and *cryptomeria japonica*. J. Chem. Ecol. 8(12) : 1498-1507.
 11. Chou, C.H. and M.H. Hou. 1981. Allelopathic researches of subtropical vegetations in Taiwan. I. Evaluation of allelopathic potential of bamboo vegetation. National Science Council. 5(3) : 284-292.
 12. Chou, C.H. and C.C. Young. 1975. Phytotoxic substances in twelve subtropical grasses. J. Chem. Ecol. 1 : 183-193.
 13. Kuo, Y.L., C.H. Chou and T.W.Hu. 1983. allelopathic potential of *Leucaena leucocephala*. In Allelochemicals and Pheromones, pp. 107-119. (C.H.Chou and Waller, eds.) Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 5, Taipei, Taiwan, R.O.C.
 14. Muller, C.H. 1966. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. Bull. Torrey Bot. club 93 : 332-351.
 15. Muller, C.H. 1974. Allelopathy in the environmental complex. In Handbook of Vegetation Science Part VI : Vegetation and Environment. pp.73-85. (B.R. Strain and W.D. Billings, eds.) The Hague, Dr. W. Junk B.V. Publisher.
 16. M.Olofsson. 1998. Allelopathy in Rice, IRRI (International Rice Research Institute)
 17. Ravinder K. Kohli etc. 2001. Allelopathy in Agroecosystems. Food Products Press
 18. Skoog, West, Holler. 2000. 基礎分析化學. 滄海書局
 19. Tukey, H.B., Jr. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. Bot. Rev. (Lancaster) 35 : 1-16.
 20. Weidner S., Krupa U., Amarowicz R., Karamac M., Abe S. 2002. Phenolic compounds in embryos of triticale caryopses at different stages of development and maturation in normal environment and after dehydration treatment. Euphytica 126 : 115-122
 21. Whittaker, R.H. 1970. The biochemical ecology of higher plants. In Chemical Ecology. Pp. 43-70, (E. Sondheimer and J.B. Simeone, eds.) Academic Press, N.Y.
 22. 螞蟥菊相剋作用之研究 <http://www.khjh.kh.edu.tw/science40/高中/高中生物2/高中生物2.htm>
 23. Tair <http://www.arabidopsis.org/>
 24. 葉酸 <http://www.medicchina.com/cmedicchina/yongyaozhinan/guanzhuotc/xiyi/weishengsu/008.htm>
 25. 榕樹 http://www.chps.ptc.edu.tw/school_plant/page_9.htm
 26. 榕樹 http://www.cc.nhctc.edu.tw/~n9099129/new_page_1213143.htm

陸、附錄

一、硝酸銀染色步驟：

步驟	溶液	總量	時間
1.固定 fixing	A.甲醇(Methanol) 150 ml 乙酸(acetic acid) 30 ml(用保鮮膜蓋住) 水->加到 300 ml	300 ml	30 分
2.培養 incubation	B.甲醇(Methanol) 75ml 水->加到 250 ml	250 ml	15 分
3.清洗 washing	水	250 ml	5 分*3 次
4.培養 incubation	C.海波($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 50 mg 水->加到 250 ml	250 ml	120 秒 確實
5.清洗 washing	水	250 ml	30 秒*3 次
6.銀染 silvering	D.硝酸銀 0.5 g 水->加到 250 ml	250 ml	25 分
7.清洗 washing	水	250 ml	60 秒*3 次
8.顯影 developing	E. Na_2CO_3 7.42 g 甲醛(formaldehyde)37% 0.125ml 溶液 C(參考 4.)5 ml 水->加到 250 ml	250 ml	不一定
9.清洗 washing	水	250 ml	Briefly
10.終止 stopping	F. $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 3.5 g 水->加到 250 ml	250 ml	10 分
11.清洗 washing	水	250 ml	

二、Coomassie blue 染色步驟：

步驟	溶液	總量	時間
1.染 色	A.coomasie blue 500ml	500mL	60 分
2.退 染	B.Methanol 400 ml Glacial acetic acid 70 ml 水->加到 1000 ml	500 mL	30 分*2 次
3.退 染	C.Methanol 50 ml Glacial acetic acid 70 ml 水->加到 1000 ml	500 mL	60 分

三、實驗相片：



相片一 榕樹



相片二 植物萃取液



相片三 結球白菜（水-種植 8 天）



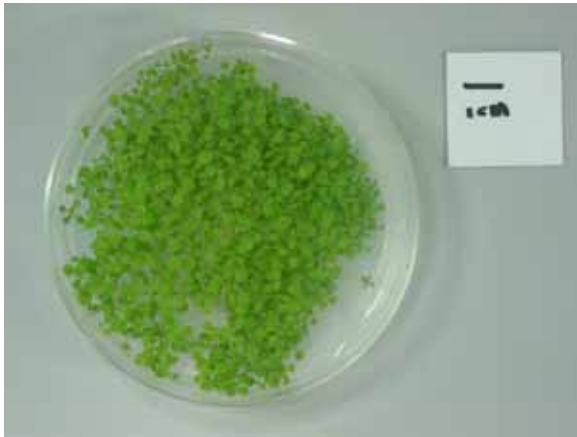
相片四 結球白菜（榕樹葉 10%-種植 8 天）



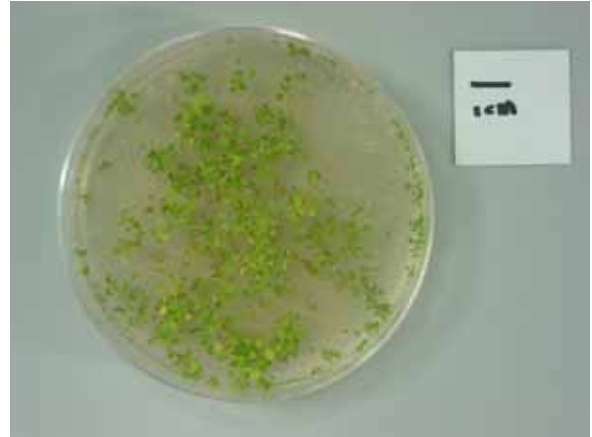
相片五 小白菜（水-種植 8 天）



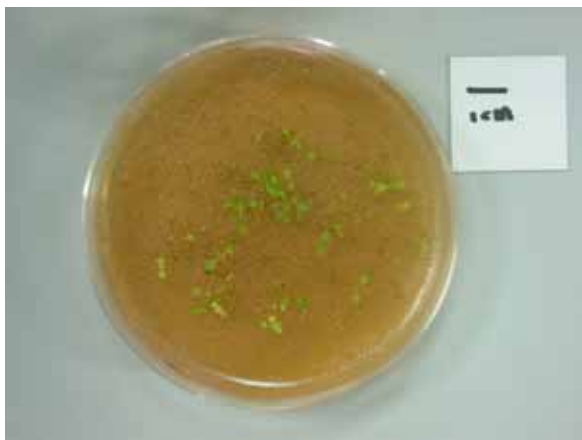
相片六 小白菜（榕樹葉 10%-種植 8 天）



相片七 阿拉伯芥 (Agar-種植 14 天)



相片八 阿拉伯芥 (榕樹葉 0.1%-種植 14 天)



相片九 阿拉伯芥 (榕樹葉 0.5%-種植 14 天)

四、實驗數據表：

表 1-1 結球白菜及小白菜的種子發芽率

編號	加入溶液	結球白菜平均發芽率 (%)	小白菜平均發芽率 (%)
1	水	98.4±1.0	100.0±0.0
2	榕樹葉 10%	14.4±2.9	32.8±5.7
3	榕樹葉 5%	32.0±4.7	72.8±5.7
4	榕樹葉 2.5%	87.2±3.3	92.0±1.9
5	福木葉 10%	98.4±1.0	98.4±1.0
6	福木葉 5%	98.4±0.3	99.2±1.0
7	福木葉 2.5%	100.0±0.0	99.2±0.7

表 2-1 結球白菜及小白菜的種子發芽率

編號	加入溶液	結球白菜平均發芽率 (%)	小白菜平均發芽率 (%)
1	水	96.8±1.9	99.2±0.3
2	根 10%	92.0±3.3	98.4±1.0
3	根 5%	91.2±5.0	94.4±3.8
4	根 2.5%	96.0±3.0	100.0±0.0
5	莖 10%	88.0±3.8	96.0±3.7
6	莖 5%	92.8±3.8	99.2±0.3
7	莖 2.5%	96.8±1.9	96.8±1.9
8	葉 10%	11.2±1.9	36.0±9.8
9	葉 5%	32.0±5.7	76.8±3.8
10	葉 2.5%	88.8±6.8	93.6±1.9

表 3-1 播種第 4 天及第 8 天結球白菜及小白菜的莖長和莖生長率

編號	加入溶液	結球白菜				小白菜			
		第 4 天		第 8 天		第 4 天		第 8 天	
		莖長 (mm)	莖生長率	莖長 (mm)	莖生長率	莖長 (mm)	莖生長率	莖長 (mm)	莖生長率
1	水	6.4±0.6	1.00±0.09	9.2±0.6	1.00±0.06	12.7±0.3	1.00±0.02	18.6±0.3	1.00±0.01
2	根 10%	6.2±0.5	0.97±0.08	10.8±0.2	1.17±0.03	11.2±0.3	0.88±0.02	18.9±0.6	1.02±0.03
3	根 5%	6.1±0.3	0.95±0.04	10.5±1.6	1.14±0.17	11.5±0.2	0.91±0.02	20.3±0.3	1.09±0.02
4	根 2.5%	6.6±0.5	1.03±0.07	10.5±0.2	1.14±0.03	12.5±0.4	0.98±0.03	21.8±0.5	1.17±0.03
5	莖 10%	4.9±0.4	0.77±0.06	9.0±0.3	0.98±0.04	12.0±0.5	0.94±0.04	19.9±0.6	1.07±0.03
6	莖 5%	5.2±0.3	0.81±0.04	8.6±0.2	0.93±0.03	11.8±0.1	0.93±0.01	18.2±0.4	0.98±0.02
7	莖 2.5%	6.1±0.3	0.95±0.04	9.7±0.4	1.05±0.04	12.6±0.7	0.99±0.05	20.2±0.1	1.09±0.01
8	葉 10%	1.7±0.4	0.27±0.03	4.5±0.3	0.49±0.03	3.1±0.7	0.24±0.03	8.8±0.3	0.47±0.02
9	葉 5%	2.8±0.2	0.44±0.03	7.9±0.7	0.86±0.08	6.6±0.3	0.52±0.02	15.0±0.5	0.81±0.03
10	葉 2.5%	6.6±0.2	1.03±0.04	11.4±0.7	1.24±0.07	12.7±0.5	1.00±0.04	20.4±0.6	1.10±0.03

表 3-2 播種第 4 天及第 8 天結球白菜及小白菜的根長和根生長率

編號	加入溶液	結球白菜				小白菜			
		第 4 天		第 8 天		第 4 天		第 8 天	
		根長 (mm)	根生長率	根長 (mm)	根生長率	根長 (mm)	根生長率	根長 (mm)	根生長率
1	水	18.4±0.5	1.00±0.03	42.1±2.6	1.00±0.06	23.4±0.5	1.00±0.02	56.5±3.7	1.00±0.07
2	根 10%	15.4±0.5	0.84±0.03	36.2±0.8	0.86±0.02	20±0.7	0.85±0.03	47.4±1.0	0.84±0.02
3	根 5%	17.4±0.3	0.95±0.02	39.5±0.8	0.94±0.02	21.5±0.2	0.92±0.01	52.8±4.1	0.93±0.07
4	根 2.5%	17.5±0.2	0.95±0.01	40.9±1.2	0.97±0.03	22.5±0.3	0.96±0.01	52.1±2.3	0.92±0.04
5	莖 10%	7.9±0.5	0.43±0.03	18.4±1.2	0.44±0.03	11.2±0.6	0.48±0.02	26.1±0.3	0.46±0.01
6	莖 5%	10.2±0.3	0.55±0.02	24.2±0.8	0.57±0.02	14.2±0.4	0.61±0.02	32.6±1.9	0.58±0.03
7	莖 2.5%	12.7±0.5	0.69±0.03	34.6±1.6	0.82±0.04	17.3±0.7	0.74±0.03	45.2±2.8	0.8±0.05
8	葉 10%	3.1±1.3	0.17±0.02	9.2±0.5	0.22±0.01	6.5±2.0	0.28±0.04	16.8±2.9	0.3±0.05
9	葉 5%	5.6±0.3	0.3±0.02	13.0±0.6	0.31±0.01	8.9±0.5	0.38±0.02	20.7±0.6	0.37±0.01
10	葉 2.5%	7.9±0.4	0.43±0.02	23.4±0.5	0.56±0.01	13.3±0.4	0.57±0.02	32.1±2.5	0.57±0.04

表 4-1 播種第 8 天結球白菜及小白菜的根長和根生長率

編號	加入溶液	結球白菜				小白菜			
		第 8 天				第 8 天			
		莖長 (mm)	莖生長率	根長 (mm)	根生長率	莖長 (mm)	莖生長率	根長 (mm)	根生長率
1	水	9.1±0.4	1.00±0.04	43.2±2.2	1.00±0.05	19.2±1.3	1.00±0.07	54.3±5.0	1.00±0.09
2	水（四天 後改為葉 10%）	9.0±1.2	0.99±0.13	36.8±1.1	0.85±0.02	18.4±1.8	0.96±0.09	46.6±2.3	0.86±0.04
3	葉 10%	4.5±0.8	0.49±0.09	9.6±0.6	0.22±0.01	8.2±1.2	0.43±0.06	15.4±1.0	0.28±0.02

表 5-1 播種第 4 天結球白菜種子發芽率（試驗 1）

編號	加入溶液	EA 層溶液組發芽率（%）	水層溶液組發芽率（%）
1	5%溶液	10.2±2.0	80.0±2.1
2	1%溶液	60.4±2.1	95.2±4.5
3	0.5%溶液	85.0±3.3	95.2±1.2
4	0.1%溶液	95.0±2.3	95.0±4.2
5	0.05%溶液	100.0±0.0	100.0±0.0
6	水	100.0±0.0	100.0±0.0

表 5-2 播種第 4 天結球白菜種子根長和根生長率（試驗 1）

編號	加入溶液	EA 層溶液組		水層溶液組	
		根長 (mm)	根生長率	根長 (mm)	根生長率
1	5%溶液	2.0±0.3	0.10±0.01	10.7±1.0	0.51±0.05
2	1%溶液	4.4±0.6	0.22±0.03	15.3±1.3	0.73±0.06
3	0.5%溶液	5.2±0.8	0.26±0.03	16.6±0.9	0.79±0.04
4	0.1%溶液	13.8±0.9	0.68±0.04	19.5±1.1	0.92±0.05
5	0.05%溶液	17.6±0.5	0.87±0.02	19.9±1.7	0.94±0.07
6	水	20.2±0.7	1.00±0.03	21.1±0.7	1.00±0.04

表 5-3 播種第 4 結球白菜種子發芽率（試驗 2）

編號	發芽率 (%)	編號	發芽率 (%)	編號	發芽率 (%)
0	100.0±0.0	10	96.0±8.9	20	96.0±8.9
1	96.0±8.9	11	96.0±8.9	21	100.0±0.0
2	100.0±0.0	12	100.0±0.0	22	96.0±8.9
3	100.0±0.0	13	100.0±0.0	23	100.0±0.0
4	100.0±0.0	14	100.0±0.0	24	100.0±0.0
5	100.0±0.0	15	96.0±8.9	25	100.0±0.0
6	96.0±8.9	16	96.0±8.9	26	100.0±0.0
7	100.0±0.0	17	96.0±8.9	27	96.0±8.9
8	100.0±0.0	18	64.0±22.8	28	100.0±0.0
9	100.0±0.0	19	100.0±0.0	29	100.0±0.0

表 5-4 播種第 4 結球白菜種子發芽率（試驗 2）

編號	根長 (mm)	根生長率	編號	根長 (mm)	根生長率	編號	根長 (mm)	根生長率
0	21.9±0.9	1.00±0.04	10	10.7±2.9	0.49±0.05	20	11.4±1.6	0.52±0.07
1	22.5±1.0	1.03±0.05	11	15.8±1.8	0.72±0.08	21	15.9±1.6	0.73±0.07
2	24.9±0.8	1.14±0.04	12	13.6±2.3	0.62±0.10	22	15.1±1.6	0.69±0.07
3	15.1±1.0	0.69±0.04	13	19.2±1.0	0.88±0.05	23	15.7±0.6	0.72±0.03
4	22.5±1.8	1.03±0.08	14	14.2±0.5	0.65±0.02	24	17.8±0.8	0.81±0.03
5	20.2±1.3	0.92±0.06	15	12.7±0.9	0.58±0.04	25	16.4±1.6	0.75±0.07
6	19.2±1.5	0.88±0.07	16	10.3±0.6	0.47±0.03	26	12.2±0.4	0.56±0.02
7	20.9±0.4	0.95±0.02	17	14.3±0.6	0.65±0.03	27	17.9±1.3	0.82±0.06
8	17.0±0.9	0.78±0.04	18	7.4±0.5	0.34±0.02	28	17.7±2.7	0.81±0.12
9	24.3±2.8	1.11±0.13	19	13.6±1.7	0.62±0.08	29	16.8±2.3	0.77±0.11

表 5-5 播種第 4 結球白菜種子發芽率 (試驗 3)

編號	發芽率 (%)	編號	發芽率 (%)	編號	發芽率 (%)
0	100.0±0.0	4	96.0±8.9	8	100.0±0.0
1	100.0±0.0	5	96.0±8.9	9	100.0±0.0
2	100.0±0.0	6	96.0±8.9		
3	100.0±0.0	7	100.0±0.0		

表 5-6 播種第 4 結球白菜種子發芽率 (試驗 3)

編號	根長 (mm)	根生長率	編號	根長 (mm)	根生長率	編號	根長 (mm)	根生長率
0	18.8±2.1	1.00±0.11	4	7.2±1.0	0.38±0.05	8	11.8±2.7	0.63±0.15
1	14.3±2.8	0.76±0.15	5	8.9±1.5	0.47±0.08	9	10.0±3.0	0.53±0.16
2	10.4±2.2	0.55±0.12	6	8.7±1.5	0.46±0.08			
3	8.4±1.3	0.45±0.07	7	8.5±2.7	0.45±0.14			

表 6-1 播種第 7 天阿拉伯芥的種子平均萌發率

編號	加入溶液	阿拉伯芥平均萌發率 (%)
1	水	78.4±3.3
2	榕樹葉 0.5%	17.1±6.2
3	榕樹葉 0.1%	43.1±4.3
4	榕樹葉 0.05%	67.2±4.7.

Exploring Genes Related to the Effects of *Ficus microcarpa* Extract on Seed Germination and Growth

Introduction

Allelopathy was defined as a phenomenon which certain plant species, by secreting metabolites to the environment, can suppress the growth of themselves, seed germination and/or growth of other plants in the same habitats. *Ficus microcarpa* is a plant species in our campus likely to have allelopathic effects. In this study, we applied the crude tissue extracts including leaves, stems, roots of banyan onto the germinating seeds of *Brassica rapa*, *Brassica pekinensis* and *Arabidopsis thaliana* to study the effects of such plant extract on seed germination and seedling growth.

Various chromatographic assays can be served for revealing possible compounds involved. Recent advance in genomic and proteomic studies also provide rapid tools for exploring genes and proteins related to different environmental stimuli. In the following, we reported the effects of *F. microcarpa* extract on plant seed germination and seedling growth. The exploration of possible genes correlated with the effect was also screened through DNA microarray and protein profile analyses.

Materials and Methods

Plant Materials

- (1) *Ficus microcarpa* L.f
- (2) *Garcinia spicata* Hook f.
- (3) *Brassica rapa* L. spp. chinesis(Rupr. (Olsson))
- (4) *Brassica pekinensis* Rupr.
- (5) *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0



Ficus microcarpa



Garcinia spicata



Brassica rapa



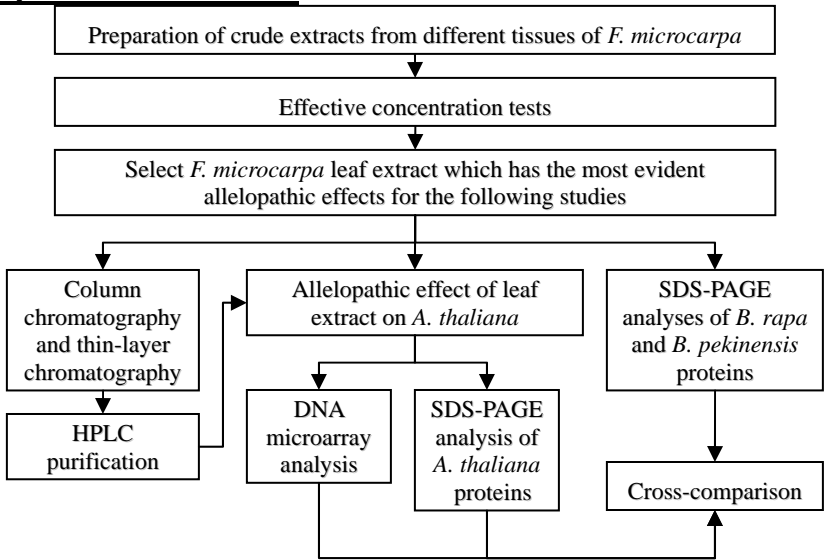
Brassica pekinensis



Arabidopsis thaliana

Fig. 1 Plant materials in this study.

Experimental Scheme



Results and Discussion

A. Allelopathic effects of *F. microcarpa* extract on seed germination and seedling growth.

- It is found that allelopathic effects on seed germination vary among different tissues used for extract preparation. Different concentrations of the extract also yield various degrees of allelopathic effects (Fig. 2, 3, 4). It is also noted that the application of extract onto the post-germinated sprouts has less effects on plant growth (Fig. 5).

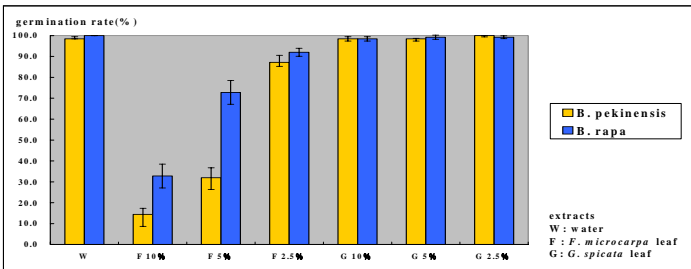


Fig. 2 Comparisons on seed germination rates of *B. pekinensis* and *B. rapa* with the *F. microcarpa* (an allelopathic species) and *G. spicata* (a non-allelopathic species) extracts.

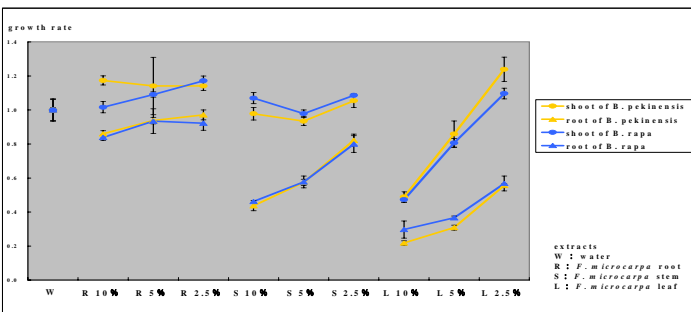


Fig. 3 Effects of concentrations and extracts from different tissues on the growth of seedlings 8 days post-germination in *B. pekinensis* and *B. rapa*.



Fig. 4 Growth of seedlings 8 days post-germination in *B. pekinensis* (Left: with the water. Right: with 10% *F. microcarpa* leaf extract.).

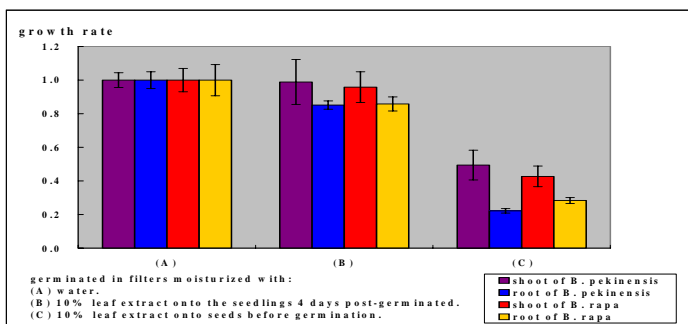


Fig. 5 Comparisons on shoot and root growth rate of *B. pekinensis* and *B. rapa* 8 days post-germination.

B. Chromatography of *F. microcarpa* leaf extract.

- The extract of leaf was divided into two fractions (**Fig. 6**). EA extracted fraction has more effects on inhibiting plant growth, and was subsequently chromatographed over silica gel using hexane/EtOH gradient solvent system and HPLC.

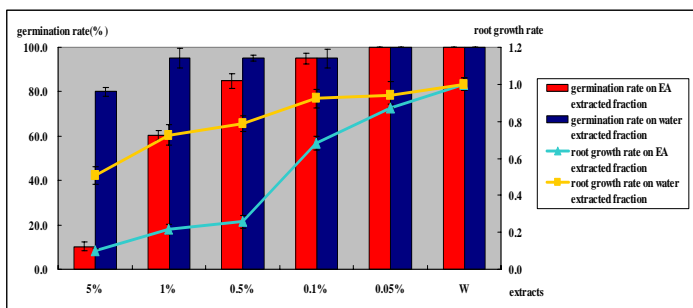


Fig. 6 Comparisons on seed germination rate and root growth rate of *B. pekinensis* with EA extracted fraction and H₂O extracted fraction. (EA: ethyl acetate.)

C. SDS-PAGE and DNA microarray analyze on proteins and genes related to the allelopathic responses.

- SDS-PAGE analyses on the electrophoretic profiles of water soluble proteins have shown different band patterns between the treated and non-treated sprouts. The observed band difference might provide a clue for exploring proteins which reacted differently upon the application of extract (**Fig. 7, 8**). DNA microarray analysis on the effect of *F. microcarpa* extract on *A. thaliana* gene expression has also been employed to characterize genes responsive to the allelopathic treatment (**Fig. 9, Table 1**).

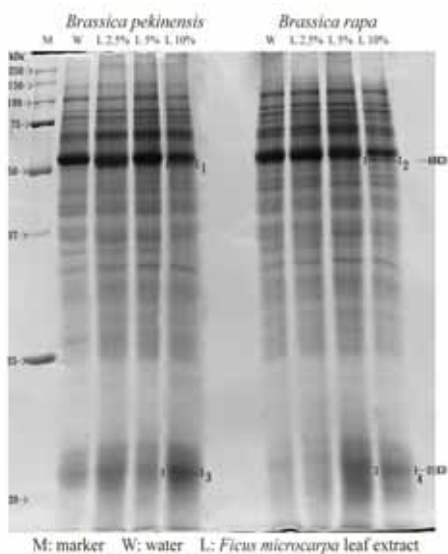


Fig. 7 SDS-PAGE protein profiles on the seedlings of *B. pekinensis* and *B. rapa* germinated under different concentrations of *F. microcarpa* leaf extracts.

Fig. 8 Comparison of the SDS-PAGE protein profiles on the *A. thaliana* seedlings germinated under 1% agar and 0.5% *F. microcarpa* leaf extract.

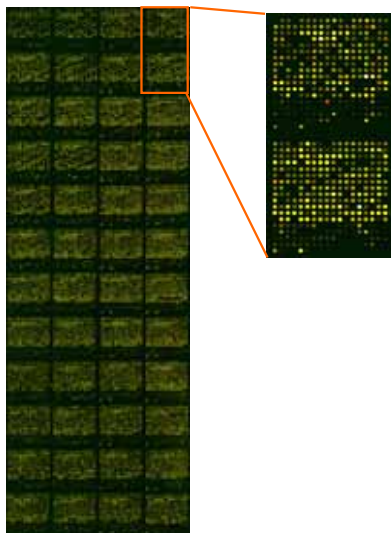
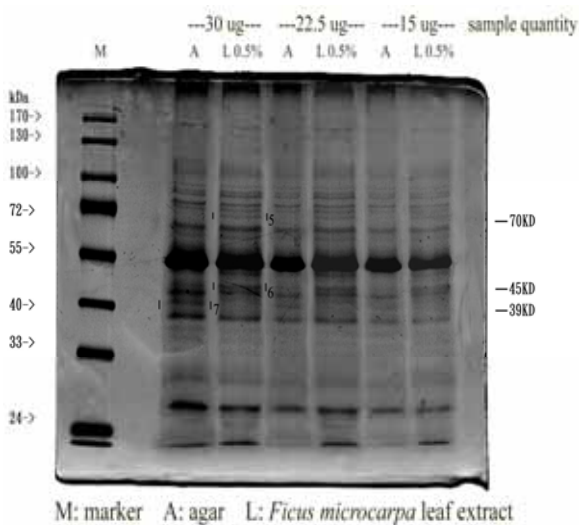


Fig. 9 DNA microarray assay on 15,000 genes for the effects of *F. microcarpa* extract on the transcript patterns of germinated *A. thaliana* seedlings. Red spots indicated up-regulated genes by the *F. microcarpa* extract treatment, green spots indicated down regulated, while yellow spots indicated genes with no significant differences.

Table 1 Candidate genes responsible for the allelopathic effects.

	Function category	Locus	Calc Mr (kDa)	Microarray data		Description
				Leaf 0.1%	Leaf 0.5%	
a	Transport	AT2G04032	39.4	0.429	0.39	metal transporter (ZIP7); member of the Zinc (Zn ²⁺)-Iron (Fe ²⁺) permease (ZIP) family
b	Protein modification	AT2G29400	36.3	0.461	0.34	serine/threonine protein phosphatase PP1 isozyme 1 (TOPP1) / phosphoprotein phosphatase 1
c	Transport	AT4G16370	71.1	2.57	2.76	oligopeptide transporter OPT family protein
d	Transport	AT5G09720	44.7	2.96	14.41	Mg ²⁺ transporter protein
e	Transport	AT3G58810	47.4	2.81	4.93	zinc transporter
f	Anthocyanin biosynthesis	AT5G42800	42.8	4.31	119.1	dihydroflavonol 4-reductase
g	Unknown	AT2G46050	66.3	2.25	4.87	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein

- There are 54 genes possibly related to the allelopathic response. The table has only listed 7 genes which encode proteins with resembling molecular weight of protein bands with differential pattern between the treated and non-treated sprouts in the SDS-PAGE protein profiles. Analyses of these genes/proteins are expected to reveal key regulators in plants experiencing allelopathic condition.

Conclusion

1. *F. microcarpa* extract did show the allelopathic effects on plant seed germination and seedling growth. However, variations in tissues and concentrations were noted.
2. Leaf extract was found to be more effective than the ones from stems or roots. Serious inhibition on germination rate, shoot elongation and root length were observed when seeds were grown with 10% *F. microcarpa* extract.
3. Application of *F. microcarpa* extract at post-germination stage was found to be less effective than directly applied in medium for germination.
4. SDS-PAGE protein profiles also indicated the differences exist between treated and non-treated seedlings.
5. DNA-microarray analyses revealed genes possibly related to the allelopathic response and some candidate genes responsible for these allelopathic effects were shown.

References

- [1] Chou, C.H. etc. 1999. Biodiversity and Allelopathy. Academia Sinica.
- [2] Ravinder K. Kohli etc. 2001. Allelopathy in Agroecosystems. Food Products Press.
- [3] Weidner S., Krupa U., Amarowicz R., Karamac M., Abe S. 2002. Phenolic compounds in embryos of triticale caryopses at different stages of development and maturation in normal environment and after dehydration treatment. Euphytica 126 : 115-122
- [4] Tair <http://www.arabidopsis.org/>

Exploring Genes Related to the Effects of *Ficus microcarpa* Extract on Seed Germination and Growth

Introduction

Allelopathy was defined as a phenomenon which certain plant species, by secreting metabolites to the environment, can suppress the growth of themselves, seed germination and/or growth of other plants in the same habitats. *Ficus microcarpa* is a plant species in our campus likely to have allelopathic effects. In this study, we applied the crude tissue extracts including leaves, stems, roots of banyan onto the germinating seeds of *Brassica rapa*, *Brassica pekinensis* and *Arabidopsis thaliana* to study the effects of such plant extract on seed germination and seedling growth.

Various chromatographic assays can be served for revealing possible compounds involved. Recent advance in genomic and proteomic studies also provide rapid tools for exploring genes and proteins related to different environmental stimuli. In the following, we reported the effects of *F. microcarpa* extract on plant seed germination and seedling growth. The exploration of possible genes correlated with the effect was also screened through DNA microarray and protein profile analyses.

Materials and Methods

Plant Materials

- (1) *Ficus microcarpa* L.f
- (2) *Garcinia spicata* Hook f.
- (3) *Brassica rapa* L. spp. chinesis(Rupr. (Olsson))
- (4) *Brassica pekinensis* Rupr.
- (5) *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0



Ficus microcarpa



Garcinia spicata



Brassica rapa



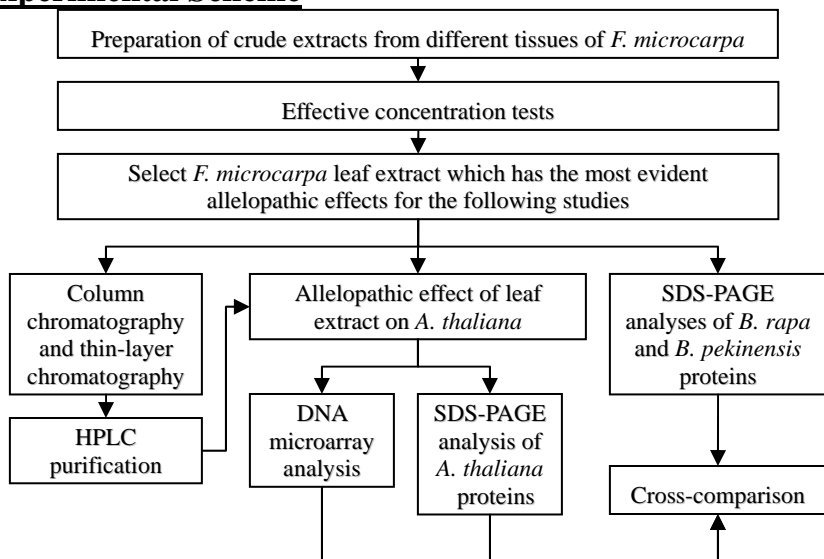
Brassica pekinensis



Arabidopsis thaliana

Fig. 1 Plant materials in this study.

Experimental Scheme



Results and Discussion

A. Allelopathic effects of *F. microcarpa* extract on seed germination and seedling growth.

- It is found that allelopathic effects on seed germination vary among different tissues used for extract preparation. Different concentrations of the extract also yield various degrees of allelopathic effects (Fig. 2, 3, 4). It is also noted that the application of extract onto the post-germinated sprouts has less effects on plant growth (Fig. 5).

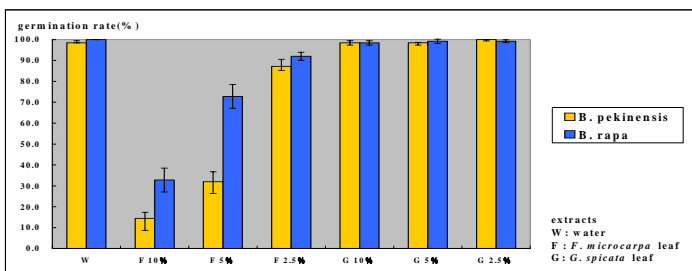


Fig. 2 Comparisons on seed germination rates of *B. pekinensis* and *B. rapa* with the *F. microcarpa* (an allelopathic species) and *G. spicata* (a non-allelopathic species) extracts.

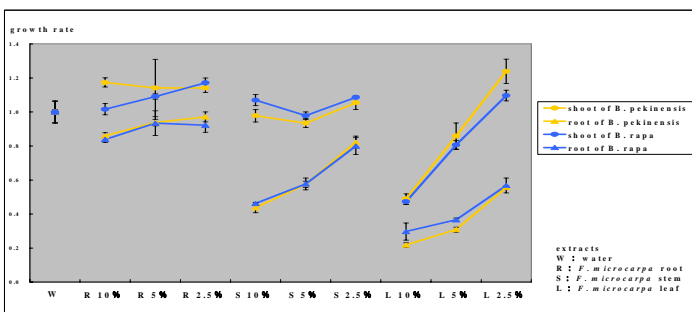


Fig. 3 Effects of concentrations and extracts from different tissues on the growth of seedlings 8 days post-germination in *B. pekinensis* and *B. rapa*.



Fig. 4 Growth of seedlings 8 days post-germination in *B. pekinensis* (Left: with the water. Right: with 10% *F. microcarpa* leaf extract.).

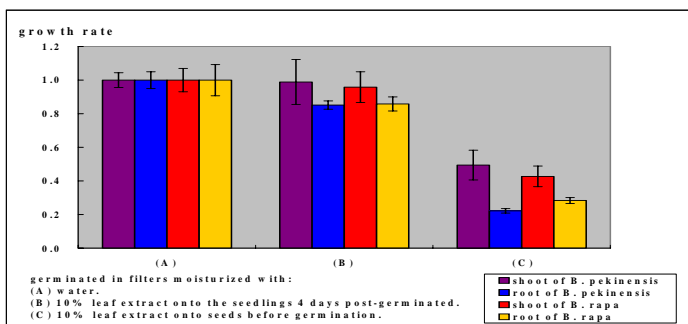


Fig. 5 Comparisons on shoot and root growth rate of *B. pekinensis* and *B. rapa* 8 days post-germination.

B. Chromatography of *F. microcarpa* leaf extract.

- The extract of leaf was divided into two fractions (**Fig. 6**). EA extracted fraction has more effects on inhibiting plant growth, and was subsequently chromatographed over silica gel using hexane/EtOH gradient solvent system and HPLC.

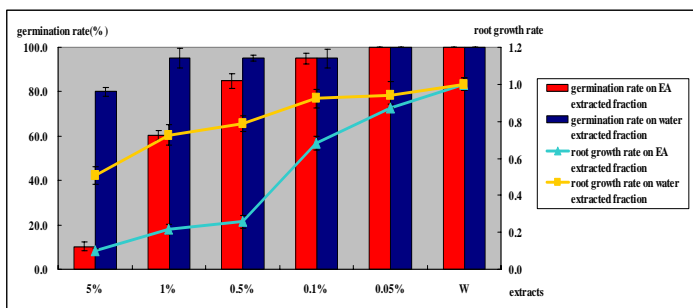


Fig. 6 Comparisons on seed germination rate and root growth rate of *B. pekinensis* with EA extracted fraction and H₂O extracted fraction. (EA: ethyl acetate.)

C. SDS-PAGE and DNA microarray analyze on proteins and genes related to the allelopathic responses.

- SDS-PAGE analyses on the electrophoretic profiles of water soluble proteins have shown different band patterns between the treated and non-treated sprouts. The observed band difference might provide a clue for exploring proteins which reacted differently upon the application of extract (**Fig. 7, 8**). DNA microarray analysis on the effect of *F. microcarpa* extract on *A. thaliana* gene expression has also been employed to characterize genes responsive to the allelopathic treatment (**Fig. 9, Table 1**).

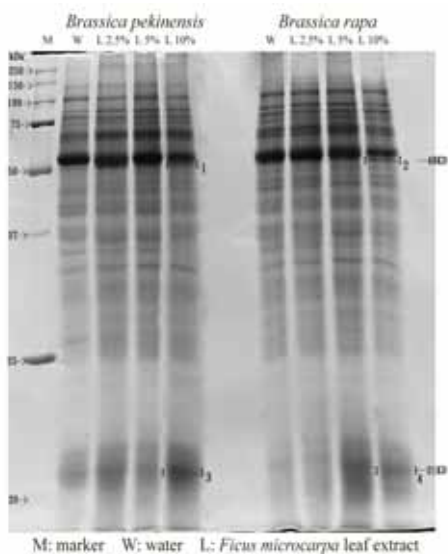


Fig. 7 SDS-PAGE protein profiles on the seedlings of *B. pekinensis* and *B. rapa* germinated under different concentrations of *F. microcarpa* leaf extracts.

Fig. 8 Comparison of the SDS-PAGE protein profiles on the *A. thaliana* seedlings germinated under 1% agar and 0.5% *F. microcarpa* leaf extract.

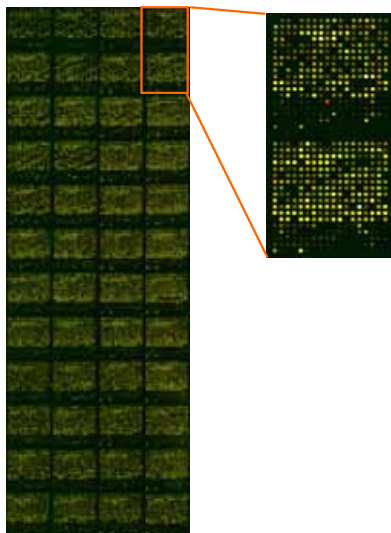
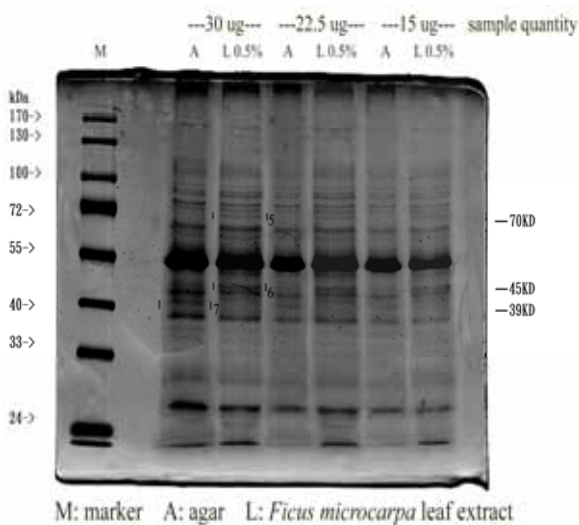


Fig. 9 DNA microarray assay on 15,000 genes for the effects of *F. microcarpa* extract on the transcript patterns of germinated *A. thaliana* seedlings. Red spots indicated up-regulated genes by the *F. microcarpa* extract treatment, green spots indicated down regulated, while yellow spots indicated genes with no significant differences.

Table 1 Candidate genes responsible for the allelopathic effects.

	Function category	Locus	Calc Mr (kDa)	Microarray data		Description
				Leaf 0.1%	Leaf 0.5%	
a	Transport	AT2G04032	39.4	0.429	0.39	metal transporter (ZIP7); member of the Zinc (Zn ²⁺)-Iron (Fe ²⁺) permease (ZIP) family
b	Protein modification	AT2G29400	36.3	0.461	0.34	serine/threonine protein phosphatase PP1 isozyme 1 (TOPP1) / phosphoprotein phosphatase 1
c	Transport	AT4G16370	71.1	2.57	2.76	oligopeptide transporter OPT family protein
d	Transport	AT5G09720	44.7	2.96	14.41	Mg ²⁺ transporter protein
e	Transport	AT3G58810	47.4	2.81	4.93	zinc transporter
f	Anthocyanin biosynthesis	AT5G42800	42.8	4.31	119.1	dihydroflavonol 4-reductase
g	Unknown	AT2G46050	66.3	2.25	4.87	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein

➤ There are 54 genes possibly related to the allelopathic response. The table has only listed 7 genes which encode proteins with resembling molecular weight of protein bands with differential pattern between the treated and non-treated sprouts in the SDS-PAGE protein profiles. Analyses of these genes/proteins are expected to reveal key regulators in plants experiencing allelopathic condition.

Conclusion

1. *F. microcarpa* extract did show the allelopathic effects on plant seed germination and seedling growth. However, variations in tissues and concentrations were noted.
2. Leaf extract was found to be more effective than the ones from stems or roots. Serious inhibition on germination rate, shoot elongation and root length were observed when seeds were grown with 10% *F. microcarpa* extract.
3. Application of *F. microcarpa* extract at post-germination stage was found to be less effective than directly applied in medium for germination.
4. SDS-PAGE protein profiles also indicated the differences exist between treated and non-treated seedlings.
5. DNA-microarray analyses revealed genes possibly related to the allelopathic response and some candidate genes responsible for these allelopathic effects were shown.

References

- [1] Chou, C.H. etc. 1999. Biodiversity and Allelopathy. Academia Sinica.
- [2] Ravinder K. Kohli etc. 2001. Allelopathy in Agroecosystems. Food Products Press.
- [3] Weidner S., Krupa U., Amarowicz R., Karamac M., Abe S. 2002. Phenolic compounds in embryos of triticale caryopses at different stages of development and maturation in normal environment and after dehydration treatment. Euphytica 126 : 115-122
- [4] Tair <http://www.arabidopsis.org/>