



國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis

豆科植物綠豆、決明根際黃酮類化合物分泌

及其與根瘤菌的關聯性

Root exudate flavonoid compounds of leguminous plants *Vigna radiata* and *Senna tora*, and their association with rhizobia

何宗彥

Tsung-Yen Ho

指導教授：黃良得 博士

Advisor: Lean-Teik Ng, Ph.D.

中華民國 112 年 12 月

December 2023

謝誌



碩士的生涯即將結束，我想要向許多人致以最誠摯的謝意。首先感謝指導教授黃良得老師的指引和提攜，在研究過程中給予我很大的發揮空間，指導我如何進行邏輯性的論述並完成學術且嚴謹的論文，而各種提點與建議我將銘記於心。也感謝鍾仁賜老師、劉啓德老師和王尚禮老師在百忙之中前來擔任口試委員，提供許多建議與不同想法，使論文內容更加充實完整。

雖然一度在田間實驗遭受不良的天候條件與難以預期的病害影響，遭受挫折，但謝謝此次的經驗，讓我確信我是一個遭遇困難，仍喜歡種田的人，也感謝倫均在收成時的幫忙。而當我在田間根瘤難以分析後，感謝劉啓德老師指導我根瘤相關的知識與提供改善試驗方法的建議，且讓我可使用實驗室的空間進行根瘤菌的培養和盆栽實驗，也感謝劉啓德老師實驗室的同學指點，包含教我培養根瘤菌的小O學姊，與和我交流實驗方法的維崧和東澤等，使我獲益良多，受寵若驚。除此之外，由衷感謝老師對我的關心與無私，在整個研究過程中，不僅給予我專業的指導和建議，更在我遇到困難時給予鼓勵和支持。

特別感謝小而溫馨實驗室有親切貼心、溫暖包容與無私指導的家宜學姊、熱情助人且分享奇妙經歷的大師倫均、能和我拌嘴且願意接梗的小惟，有你們的照顧，讓我有溫馨的實驗室生活。也感謝世禔、溫元、承勳、寶修、Amanda、Lisa、靜遠和楚翰在這些日子的陪伴和包容相助，讓我的實驗室生活更順利。

最後，我想要深深感謝我的父母，在我求學的歷程中給予的無盡支持和陪伴。他們不僅提供了經濟上的支持，更是在我遇到挑戰和困難時給予我鼓勵和安慰。他們的信任與理解是我走過這個分水嶺的動力，使我能夠克服困難，堅持追尋自己的夢想。母親和父親的溫暖關懷與堅定支持讓我感到幸福且堅強，我深知一切的成就都離不開他們的支持與啟發。

在這段研究旅程中，雖然我嘗過苦澀，但也因為這份堅持與熱情而充實豐滿。

我學到了不少學術知識，更培養了堅持不懈的精神。這一切都讓我更加確信，人生的價值不僅在於結果，更在於過程。這段求學之路雖告一段落，但對於知識的追求和對專業的熱愛將伴隨我一生。

最後，感謝所有在我生命中出現的人，無論是在學術上的指導、實驗室的同窗，還是家人的陪伴，你們的支持都是我前進的動力。如果有人在未來閱讀這篇論文時，對於其中的任何內容有疑問或想進一步了解，歡迎隨時透過電子郵件 r09623015@ntu.edu.tw 與我聯繫。我將樂意回覆並分享更多關於這段研究旅程的心得。

謝謝大家的陪伴與支持，這是一段難以忘懷的學術歷程，讓我成長、讓我感激。願未來的日子中，我們都能繼續攜手前行，迎接更多的挑戰與成就。

摘要



固氮作用是豆科植物的主要特徵之一，然而經歷演化後，現今地球上並存不能固氮及能與根瘤菌共生固氮的豆科植物。當前已知豆科植物以黃酮類化合物作為吸引相容根瘤菌的共生信號分子，可藉由觀察特定黃酮類化合物的分泌，以瞭解豆科植物與根瘤菌及環境互動情形。因此，本研究目的有二，首先為改善根際黃酮類化合物萃取及分析方法，二為藉由種植能固氮與不能固氮的豆科植物，並為其接種不同根瘤菌，以探討豆科植物根際黃酮類化合物分泌與根瘤菌的關聯性。

本研究使用 70% 甲醇和超音波輔助對盆栽介質進行萃取，並在有無鹼水解的條件下，探討此方法對介質中黃酮類化合物及其糖苷的萃取成果。研究結果顯示，鹼水解有助於提高綠豆介質中 vitexin 和 isovitexin 相關化合物的萃取效果，但對 daidzein、genistein 和 coumestrol 等其他根際黃酮類化合物的影響不顯著。除此之外，本研究亦對總類黃酮測定普遍採用的氯化鋁比色法進行探討，過往研究中當量標準品多採用 rutin、quercetin 和 catechin，但豆科植物根際分泌物含有其它與根瘤密切相關黃酮類化合物，故本研究增加 coumestrol、genistein、naringenin 和 daidzein 作為分析參考標準品，以分析不同黃酮類化合物在氯化鋁比色法中的差異。結果顯示，不同黃酮類化合物與氯化鋁反應後形成的複合物具有顯著不同的吸光波長和吸收強度，且發現 daidzein 不與鋁螯合呈色，此說明必須選擇樣品中所含的主要黃酮類化合物作為標準參考物質，才能使氯化鋁比色法定量樣品中總類黃酮含量具有意義。

在豆科植物根際黃酮類化合物的研究中，選用決明 (*Senna tora*) 與綠豆 (*Vigna radiata*) 為植物材料，兩者分別屬於無法固氮及能夠固氮的豆科植物，其根際分泌物分析結果顯示，綠豆能分泌 genistein、coumestrol、isoliquiritigenin、naringenin 以及 daidzein 等根瘤相關黃酮類化合物；然而，決明僅分泌少量與根瘤相關的黃酮類化合物 apigenin。LC-MS/MS 定性分析結果亦檢測到綠豆根際分泌物中含有 genistein、daidzein 和 coumestrol 的苷元及糖苷，且發現 biochanin A 或



calycosin 的苷元和糖苷以及 luteolin 或 kaempferol 的糖苷。將綠豆與決明間種後發現，高氮環境下綠豆會妨礙決明生長，低氮環境下綠豆的固氮作用並未促進決明生長。綠豆與決明間種相較於兩株綠豆比鄰種植時，根瘤數目更多。為了驗證不同根瘤菌與豆科植物的互動關係是否相同，試驗進一步以 *Ensifer fredii* USDA 205、*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110、*Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 和 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 五種根瘤菌接種綠豆，觀察根瘤及黃酮類化合物分泌差異。結果顯示，綠豆的根瘤型態有大而少、小而多兩種型態。*B. arachidis* 和 *B. japonicum* 形成的是小而多的根瘤，而 *B. diazoefficiens* 和 *B. elkanii* 形成的則是大而少的根瘤。從栽培介質萃取之根際分泌物的分析結果顯示，根瘤小而多組別的 genistein 分泌量多於根瘤大而少組別，這可能是不同根瘤菌根瘤型態的關鍵。在高氮組中，用福林酚試劑測量的根際分泌物總還原能力明顯高於低氮組，相較之下，naringenin 濃度卻隨氮濃度的增加而減少，這表明 naringenin 可能是綠豆調控不同氮營養條件下根瘤形成的決定因素。根瘤誘導因子 isoliquiritigenin 的量少且在各接種組間沒有顯著差異，可能與綠豆根瘤形成的關係較小。

綜上所述，本研究證實不形成根瘤的決明與會形成根瘤的綠豆，其根際分泌黃酮類化合物的差異，及間種下對彼此生長的影響，並觀察到綠豆與不同根瘤菌形成不同型態的根瘤，而根瘤菌的根瘤型態以及不同氮條件下的根瘤數目，分別與特定黃酮類化合物相關。

關鍵字：綠豆 (*Vigna radiata*)、決明 (*Senna tora*)、根瘤、根際分泌物、黃酮類化合物、氯化鋁比色法

Abstract



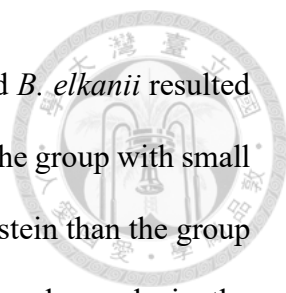
Nitrogen fixation is a fundamental trait of legumes. However, through evolutionary processes, some legumes can engage in nitrogen fixation via rhizobia symbiosis, while others cannot. Legumes employ flavonoids as signaling molecules to attract compatible rhizobia. Observing the secretion of specific flavonoid compounds enables a better understanding of interactions among legumes, rhizobia, and the environment. Therefore, this study has two main objectives: firstly, to improve the extraction and analysis of root-secreted flavonoid compounds; and secondly, to investigate the correlation between the secretion of flavonoids by leguminous plants and their interaction with rhizobia. This was achieved by planting both nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing leguminous plants and inoculating them with various rhizobia strains.

In this study, 70% methanol with ultrasonic assistance was employed for the extraction of compounds from the potting medium. The investigation focused on the effects of alkaline hydrolysis on the extraction of flavonoids and their glycosides within the medium. The findings indicated that alkaline hydrolysis extraction enhanced the yield of specific compounds, particularly those associated with vitexin and isovitexin. However, this method showed no significant impact on flavonoids such as daidzein, genistein, and coumestrol. In addition, we explored the widely-used aluminum chloride colorimetric method for determining the total flavonoid content. Traditionally, compounds like rutin, quercetin, and catechin have been commonly used as equivalent standards for quantification of total flavonoid content. However, our investigation revealed that leguminous plant root exudates contain additional flavonoids closely associated with rhizobia. Consequently, we introduced coumestrol, genistein, naringenin, and daidzein as reference standards for the quantification analysis. The results demonstrated that different flavonoid standards formed distinct complexes with aluminum, significantly influencing

the absorption wavelength and peak intensity of the analysis; furthermore, it was noted that daidzein failed to form a complex with aluminum. This observation highlights the critical importance of selecting appropriate primary flavonoids in the sample as equivalent standards to ensure the meaningful application of the aluminum chloride colorimetric method.

For the study of legume root-exuded flavonoids, *Senna tora* and *Vigna radiata* (mung bean) were selected as plant materials. These two plants belong to the categories of non-nitrogen-fixing and nitrogen-fixing legumes, respectively. The results showed that *V. radiata* can secrete nodule-related flavonoids such as genistein, coumestrol, isoliquiritigenin, naringenin, and daidzein. However, *S. tora* secreted only small amounts of apigenin, a flavonoid compound related to root nodules. LC-MS/MS qualitative analysis further identified aglycone and glycoside forms of genistein, daidzein, and coumestrol in the root exudate of *V. radiata*, along with the presence of biochanin A or calycosin aglycone and glycosides, and luteolin or kaempferol glycosides. Intercropping *V. radiata* and *S. tora* revealed that *V. radiata* hindered the growth of *S. tora* under high nitrogen conditions, and the nitrogen-fixing ability of *V. radiata* did not promote the growth of *S. tora* under low nitrogen conditions. Additionally, compared to planting each species separately, more nodules were observed when *V. radiata* and *S. tora* were interplanted.

To verify whether the interaction between different rhizobia and leguminous plants was similar, experiments were conducted with five rhizobia strains (*Ensifer fredii* USDA 205, *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110, *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76, and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6) inoculated into *V. radiata*. Differences in nodule formation and flavonoids secretion were observed. The findings indicated that *V. radiata* exhibited two distinct nodule patterns. Specifically, inoculation with *B. arachidis* and *B. japonicum* led to the formation of



numerous small nodules, while inoculation with *B. diazoefficiens* and *B. elkanii* resulted in larger and fewer nodules. Analysis of root exudates indicated that the group with small and numerous nodules secreted a significantly higher amount of genistein than the group with large and few nodules, suggesting that genistein might play a key role in the formation of distinct nodule patterns induced by different rhizobia. Additionally, the antioxidant capacity of root exudates, measured using the Folin-Ciocalteu reagent, was significantly higher in the high nitrogen group than in the low nitrogen group. While flavonoid compounds exhibited antioxidant capabilities, the concentration of naringenin decreased with increasing nitrogen levels. This implied that naringenin may be a determining factor in regulating nodule formation in *V. radiata* under varying nitrogen conditions. In contrast, a low concentration of the nodule-inducing factor isoliquiritigenin was observed, with no significant difference among the inoculation groups, indicating that it had a limited association with *V. radiata* root nodule formation.

In summary, this study demonstrated the differences in the secretion of flavonoid compounds by *S. tora*, which does not form nodules, and *V. radiata*, which does form nodules, and the effects of intercropping on their respective growth. It was also observed that *V. radiata* formed different nodule patterns with different rhizobia strains, and these nodule patterns and numbers under different nitrogen conditions were associated with specific flavonoid compounds.

Key words: mung bean (*Vigna radiata*), cassia seed (*Senna tora*), nodulation, flavonoids, root exudate, aluminum chloride assay

目次



謝誌	i
摘要	iii
Abstract.....	v
目次	viii
表次	x
圖次	xi
1 前言	1
2 前人研究	3
2.1 豆科植物與固氮功能的演化	3
2.2 決明與綠豆簡介	5
2.3 根瘤菌種類	7
2.4 根瘤形成的步驟	7
2.5 黃酮類化合物 (類黃酮) 分類	8
2.6 黃酮類化合物的生合成及運輸	8
2.7 黃酮類化合物在非生物逆境下的作用	12
2.8 黃酮類化合物對根圈通訊的影響	12
2.9 與根瘤形成相關的黃酮類化合物	15
2.10 總類黃酮含量的測定方法	21
2.11 黃酮類化合物的萃取與糖苷的去除	24
3 材料與方法	25
3.1 試驗作物	25

3.2 種植方法	25
3.3 根瘤菌菌株	30
3.4 根瘤菌的培養	30
3.5 豆血紅素含量測定	31
3.6 根瘤切片觀察	32
3.7 根際分泌物蒐集與鑑定	33
4 結果與討論	37
4.1 不同標準品的氯化鋁比色法比較	37
4.2 鹼水解對萃取物黃酮類化合物濃度的影響	48
4.3 綠豆接種不同根瘤菌效果——小型 pillow system 預試驗	50
4.4 決明與綠豆之相互作用及其根際黃酮類化合物分析——綠豆與決明之 pillow system 試驗	55
4.5 綠豆根瘤與根際黃酮類化合物的分泌——綠豆接種不同根瘤菌之三吋盆 試驗	59
4.6 根瘤菌種類、根瘤型態與根際分泌之黃酮類化合物的關係探討	61
4.7 LC-MS/MS 分析結果	74
5 結論	77
參考文獻	79
附錄	94

表次



表 2.1、採用氯化鋁法測定總類黃酮含量的文獻回顧	23
表 3.1、養液配方	28
表 3.2、HPLC 分析梯度條件	36
表 4.1、鹼水解前後黃酮類化合物含量之成對樣本 <i>t</i> 檢定	49
表 4.2、植物鮮重、根瘤數目及根瘤重量 (綠豆及決明 pillow system 試驗)	57
表 4.3、綠豆和決明 pillow system 生長介質中黃酮類化合物的濃度	58
表 4.4、綠豆接種根瘤菌之 SPAD 讀數、根瘤數、根瘤總重和單個根瘤均重 (三 吋盆試驗)	63
表 4.5、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的黃酮類化合物含量	73

圖次



圖 2.1、豆科植物固氮共生進化史概述	4
圖 2.2、黃酮類化合物的基本骨架	10
圖 2.3、部分黃酮類化合物的化學結構	11
圖 2.4、Isoflavonoid biosynthesis - <i>Vigna radiata</i> (mung bean)	17
圖 2.5、Flavonoid biosynthesis - <i>Vigna radiata</i> (mung bean)	18
圖 2.6、Flavone and flavonol biosynthesis - <i>Vigna radiata</i> (mung bean).....	19
圖 2.7、異黃酮在大豆中儲存與代謝示意圖	20
圖 2.8、總類黃酮含量測定——氯化鋁比色法原理	22
圖 3.1、Pillow system 概述.....	29
圖 3.2、根瘤菌 OD ₆₀₀ = 1 時的菌量	31
圖 4.1、不同黃酮類化合物在氯化鋁比色法下的顏色 (離心後)	40
圖 4.2、不同濃度的黃酮類化合物在氯化鋁比色法下的顏色	41
圖 4.3、氯化鋁比色法方法一：波長 415 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的 關係	44
圖 4.4、氯化鋁比色法方法二：波長 415 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的 關係	45
圖 4.5、氯化鋁比色法方法一：波長 510 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的 關係	46
圖 4.6、氯化鋁比色法方法二：波長 510 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的 關係	47
圖 4.7、黃酮類化合物在氯化鋁比色法下，波長 350 nm 至 600 nm 的吸光值	43
圖 4.8、不同根瘤菌接種預試驗之綠豆生長情形	51
圖 4.9、接種根瘤菌後綠豆地上部及地下部鮮重 (不同根瘤菌的接種預試驗).....	51
圖 4.10、不同根瘤菌接種對綠豆根瘤數目、單粒根瘤均重、單株綠豆根瘤重及	

根瘤內豆血紅素含量的影響 (不同根瘤菌的接種預試驗).....	52
圖 4.11、TBO (toluidine blue O) 染色的根瘤感染區.....	53
圖 4.12、不同根瘤菌接種對綠豆植株總類黃酮含量的影響 (不同根瘤菌的接種 預試驗).....	54
圖 4.13、接種 <i>B. arachidis</i> 後第 21 天，綠豆及決明 pillow system 的生長情形 ...	56
圖 4.14、綠豆接種根瘤菌試驗 (三吋盆) 根部特寫照片	69
圖 4.15、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的總酚含量	70
圖 4.16、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 isoliquiritigenin 含量.....	71
圖 4.17、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 coumestrol 含量	71
圖 4.18、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 genistein 含量.....	72
圖 4.19、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 naringenin 含量	72
圖 4.20、Isovitexin、vitexin 和 naringenin 的化學結構.....	76

前言



豆科是擁有 765 個屬和 19500 種植物的第三大被子植物科，由於具有固氮的能力，在經濟和生態上都扮演著重要角色，因此豆科植物的固氮和共生演化歷史一直是研究的熱門議題。近期 Zhao et al. (2021) 利用轉錄組和系統基因組學研究的方法，揭示了豆科植物演化初期是如何從與放線菌共生轉向與根瘤菌共生的共生體轉移。在後續演化過程中，固氮基因的不同程度丟失導致部分豆科植物喪失固氮能力，這種現象可能是由於這些植物的祖先生長在固定氮相對豐富的環境中所致。van Velzen et al. (2019) 提出，大氣中二氧化碳濃度的變化對植物的演化也有影響。因為形成固氮結瘤需要高碳和能源成本，所以只有在植物受到氮限制且共生固氮的好處超過共生根瘤菌的碳成本時，這種共生現象才會對植物有利。相反，當二氧化碳濃度下降並且光合作用減弱時，結瘤的碳成本超過其收益，結瘤就會被抑制，且這種抑制是可逆的。然而，如果結瘤持續被抑制，被抑制的基因會累積突變，最終導致植物失去形成結瘤的能力。

在豆科植物結瘤過程中，根系分泌的黃酮類化合物是負責豆科植物主動尋找根瘤菌結瘤的誘導物，低氮條件下，豆科植物根分泌特定黃酮類化合物 (Liu & Murray, 2016)，刺激相容的根瘤菌分泌特定脂殼寡糖信號化合物，稱為 nod 因子。Nod 因子會觸發宿主的信號級聯反應，使根部細胞結構改變開始形成根瘤。除了存在正向調控根瘤菌基因的黃酮類化合物外，也存在負向調控根瘤基因的黃酮類化合物，這使得植物得以調控根瘤形成的平衡狀態 (Liu et al., 2019)。黃酮類化合物除了在共生根瘤中扮演調控根瘤菌基因的角色，亦有部分黃酮類化合物在結瘤中扮演植物抗毒素的角色 (Novak et al., 1995)，以此控制微生物及宿主範圍。因此，分析豆科植物黃酮類化合物分泌是瞭解豆科植物與根瘤菌和環境互動情形的有效方法。本研究採用不結瘤豆科植物決明 (*Senna tora*) 與會結瘤的豆科植物綠豆 (*Vigna radiata*) 為研究目標，以此確認兩者是否分泌影響根瘤形成的黃酮類化合物，

並設定施氮肥與不施氮肥處理，以此創造出不同結瘤的效果。此外也會測試不同根瘤菌株接種於綠豆的效果，觀察不同根瘤菌能否造成根瘤與分泌物的改變。

實驗最初以田間試驗進行，但因綠豆根部產生許多假性根瘤，難以對根瘤進行分析，故轉而進行盆栽試驗，為使根瘤易於觀察，本研究嘗試 pillow system (Hayashi et al., 2005)，這個與眾不同的種植方式。首先，使用小型的 pillow system 種植綠豆，以評估其可行性並選擇適合接種的根瘤菌。第二，使用大型的 pillow system 進行決明和綠豆的「單種/間種」及「高氮/低氮」試驗，以研究兩種植物之間的相互影響，以及根際黃酮類化合物與根瘤形成的關係。最後，由於小型 pillow system 中，綠豆於不同根瘤菌接種時，根瘤型態存在差異，故本研究進一步設計綠豆接種不同根瘤菌的三吋盆試驗，除了增加重複數並複查根瘤型態再現性之外，亦對栽培介質中的黃酮類化合物進行深入探討。

在本研究中，根際化合物萃取是在盆栽移除植株後，將栽培介質整體粉碎，之後以溶劑進行萃取。由於不同的萃取方式可能影響黃酮類化合物的萃取效果，因此在超音波輔助萃取的基礎上，本研究進一步比較鹼水解對栽培介質中黃酮類化合物萃取效果的影響。除此之外，由於過往文獻的氯化鋁比色法總類黃酮測定，所檢測的樣品性質和當量標準品種類與本研究分析的豆科植物根際分泌物不同，因此本研究選用更多樣的黃酮類化合物以分析氯化鋁比色法適用性。

前人研究



2.1 豆科植物與固氮功能的演化

依據 Zhao et al. (2021) 發表的豆科植物固氮共生進化史研究報告 (圖 2.1) , 可以觀察到豆科植物祖先經歷一次或兩次由放線菌共生轉向根瘤菌結瘤共生的轉變, 隨後豆類的固氮結瘤能力經歷多次喪失, 現今無法形成根瘤的蝶豆花亞科植物有藤槐屬 (*Bowringia*)、棉糖豆族 (Tr. *Exostyleae*) (Tr. = tribe)、香槐族 (Tr. *Cladrastideae*)、鐵木豆族 (Tr. *Swartzieae*) 及蝶豆花最早的進化支 ADA clade, ADA clade 包含北鈴豆族 (Tr. *Angylocalyceae*)、香豆樹族 (Tr. *Dipterygeae*) 和香青豆族 (Tr. *Amburaneae*)。無法形成根瘤的雲實亞科植物 (*Caesalpinioideae*, 中文又名皂莢亞科、蘇木亞科) 有球花豆屬 (*Parkia*)、翅子豆屬 (*Newtonia*)、海紅豆屬 (*Adenanthra*)、甘馥楹屬 (*Tetrapleura*)、木英豆屬 (*Xylia*)、丁香檀屬 (*Burkea*)、盾柱木演化支 (*Peltophorum* clade)(註: 似離英豆族 Tr. *Schizolobieae*, 包含鳳凰木屬)、決明屬 (*Senna*)、臘腸樹屬 (*Cassia*)、蟬翼豆屬 (*Pterogyne*)、皂莢屬 (*Gleditsia*)、肥皂莢屬 (*Gymnocladus*)、長角豆屬 (*Ceratonia*) 與頂果木屬 (*Acrocarpus*)。其他無法形成根瘤的亞科有酸欖豆亞科 (*Dialioideae*)、山姜豆亞科 (*Duparquetioideae*)、甘豆亞科 (*Detarioideae*) 和紫荊亞科 (*Cercidoideae*)。

本研究所使用的研究材料之一決明 (*Senna tora*) , 為無法形成根瘤的雲實亞科決明屬, 其原生於中美洲的貝里斯及薩爾瓦多, 被引入到世界各地。另一個研究材料綠豆 (*Vigna radiata*) 起源於印度次大陸, 為蝶豆花亞科植物, 曾被歸類為菜豆屬 (*Phaseolus*), 現屬於豇豆屬 (*Vigna*) 下的角豆亞屬 (*Ceratotropis*) , 為可形成根瘤的豆科植物。

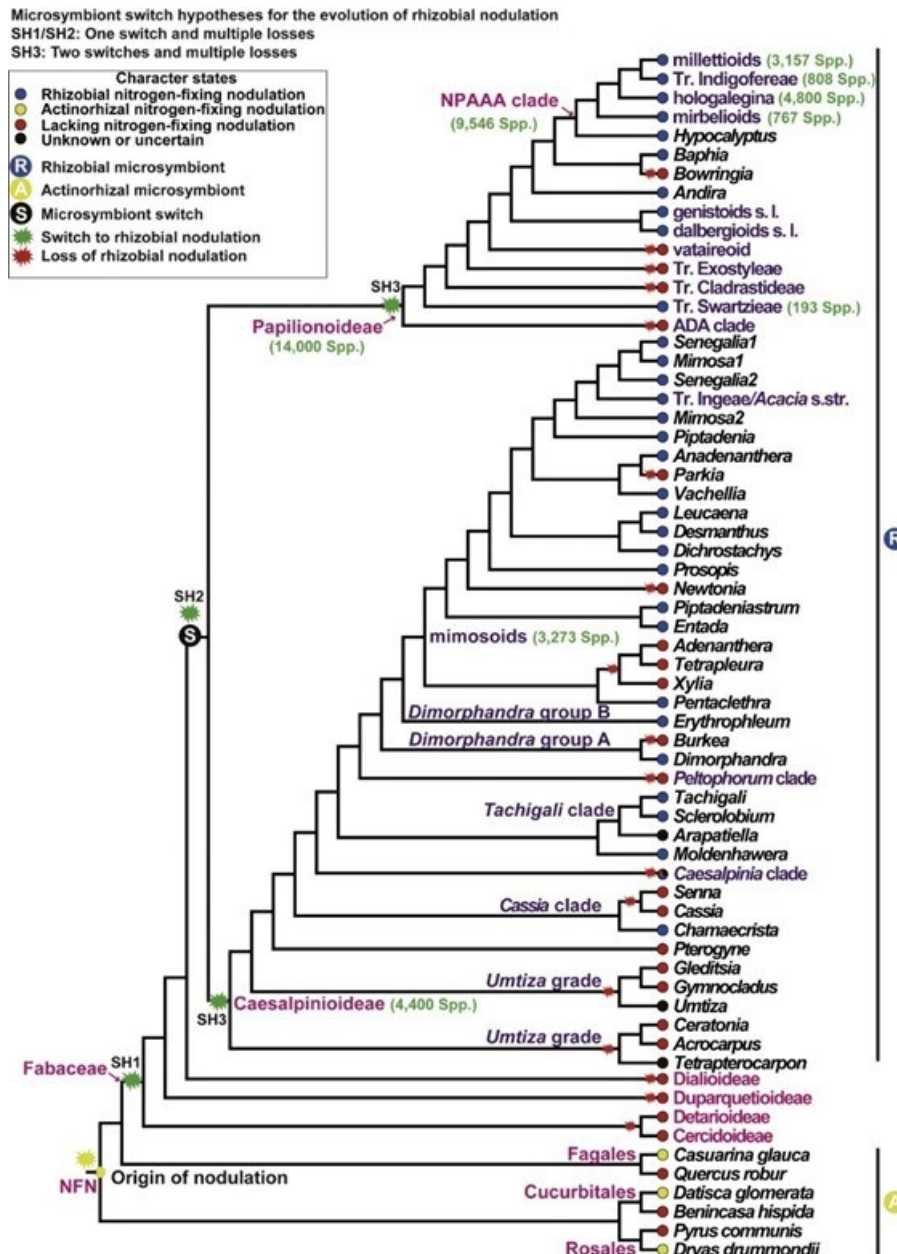


圖 2.1、豆科植物固氮共生進化史概述

Figure 2.1. An overview of proposed evolutionary histories of the rhizobial nitrogen-fixing symbiosis in Fabaceae (Zhao et al., 2021)

Three slightly different hypotheses for switch(es) from actinorhizal to rhizobial nodulation with subsequent multiple losses are marked as SH1, SH2, and SH3 next to the affected nodes. NFN indicates the nitrogen-fixing clade. The origin of rhizobial nodulation for the nitrogen-fixing clade and multiple losses of rhizobial nodulation are marked with green and red asterisks, respectively.



2.2 決明與綠豆簡介

決明 (*Senna tora*)

決明 (學名 *Senna tora*, 英文名 sickle senna、sickle pod、tora、coffee pod、foetid cassia、cassiae semen 和 cassia seed) 為豆科 (Fabaceae) 蘇木亞科 (Caesalpinioideae) 決明屬 (*Senna*) 植物, 中文別稱大號山土豆、草決明、假綠豆、馬蹄決明、小決明、還瞳子、狗屎豆、馬蹄子和千里光, 其常與近緣的 *Senna obtusifolia* 混淆。根據臺灣中藥典第四版 (2021) 所述, 中藥材決明子指的是豆科植物 *S. obtusifolia* 或 *S. tora* 的成熟種子。*Senna tora* 舊名 *Cassia tora*, *Senna* 和 *Cassia* 是兩個不同的屬, 但都是豆科 (Fabaceae) 中的一個大型植物屬, 且皆為亞熱帶和熱帶地區的樹木或灌木, 常開黃色花, 許多種類都具有藥用價值。在 1982 年之前, 許多作者沿用 Carl Linnaeus 的觀點, 並未將 *Senna* 和 *Chamaecrista* 從 *Cassia* 中劃分出來, 而是將它們納入廣義的 *Cassia* 屬中。然而, DNA 的系統發育分析顯示, *Chamaecrista*、*Cassia* 和 *Senna* 都是單系群, 雖這三個屬之間的關係尚未解決, 但它們在系統發育樹中為三歧群 (Marazzi et al., 2006)。

決明為一年生灌木狀草本植物, 株高 30 至 90 公分, 葉為互生偶數羽狀複葉, 小葉 3 對呈倒卵形, 葉背有柔毛, 在第一與二對小葉之間存有腺體, 托葉呈線形。花為腋生、總狀花序, 有柄; 花萼長卵形, 被毛; 花瓣黃色倒卵形共五片, 最上方三枚雄蕊退化, 極少數為完全雄蕊。果實為線形莢果, 內有種子 20-30 粒, 種子多, 為菱形或歪圓柱形, 具有黃褐色光澤, 熟果褐色 (Jain & Patil, 2010; Rambhau & Ashok, 2020)。春播或夏播均可, 春播於清明前後, 夏播於夏至之前, 花期七至九月, 果期九至十月, 適宜土壤 pH 為 5.5 至 6.0, 葉生長的低溫限制為 $13 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 能忍受各種環境逆境 (Mackey et al., 1997)。決明種子會從完全成熟的豆莢中脫落, 包括有小裂口下個生長季就會發芽的不休眠種子, 以及種皮較封閉且厚休眠期較長的種子, 此特色使其得以在田間長期逐步萌發 (Bhattacharya & Saha, 1997), 且最高每平方公尺達 2000 顆種子、單株 8000 顆的種子數量 (Mackey et al., 1997), 使其成為一旦入侵或栽種過一次後就難以根除的雜草。



在傳統醫學應用中，決明的不同部位（葉子、種子、根部）具有多種藥用價值。葉子被用於風濕症狀和通便；種子用於改善視力、治療肝臟問題，並具有降膽固醇和降血壓的效果；莖皮提取物用於改善皮膚問題和風濕疾病；葉子和花的煎湯可治療支氣管炎和哮喘。此外，決明全株也可治療其他疾病，包括消化問題、發燒、痔瘡等；種子還可用於飲料、染料和鞣製 (Bhandirge et al., 2016)。決明的活性成分主要為蒽醌類化合物（包括: cassiatorin、aurantio-obtusin、1-desmethyllaurantio-obtusin、chryso-obtusin、obtusin、chrysophanol、emodin、rhein 和 euphol) (Telrandhe & Gunde, 2022)、黃酮類化合物 (Khurm et al., 2021) 和多醣體 (Feng et al., 2018; Huang et al., 2012)。藥理學研究指出決明子具有降血脂、抗發炎、清除自由基、調節免疫、保肝、驅蟲、抗瘧疾、抗潰瘍、抗氧化、抗哮喘、催產作用、抗腫瘤、抗病毒、抗痢疾、降血壓、瀉藥活性、抗關節炎、抗痙攣和止痛等多種活性，故廣泛被研究 (Bhandirge et al., 2016)。

綠豆 (*Vigna radiata*)

綠豆 (學名 *Vigna radiata*，英文名 mung bean、moong bean、golden gram 和 green gram) 為豆科 (Fabaceae) 蝶形花亞科 (Faboideae) 豇豆屬 (*Vigna*) 植物，中文別稱萊豆、青小豆、植豆、文豆和吉豆，其曾被分類在菜豆屬 (*Phaseolus*)，以 *Phaseolus aureus* Roxb. 的名字為人所知。而後續在分子生物學驗證下，許多 *Phaseolus* 的物種改隸 *Vigna* 屬，綠豆也是其中之一 (Lambrides & Godwin, 2007)。

綠豆為一年生草本植物，屬於喜熱畏冷的短日照作物，適合在春季和夏季種植，生長周期約為 70 至 110 天。株高 20 至 150 公分，分支型態多樣，有直立叢生型、半蔓生型和蔓生型。葉為三出複葉，呈卵圓或闊卵圓形。花為總狀花序，通常為鮮黃色，並分佈於葉腋和頂端。每朵花的花梗上通常會有 10 至 25 朵花，行自花授粉。果實為細長圓筒形或扁圓筒形的莢果，每株植物 30 至 50 個莢果，內部則包含 12 至 14 粒隔膜隔開的種子。因綠豆能與根瘤菌行固氮作用，增加土壤肥力，故常與其他作物間作 (程和王，1993)。



綠豆營養豐富可作豆粥、豆飯、豆酒、燭食、麩食、作餌頓糕或發芽作菜等，為各地普遍種植的糧食作物。在中醫應用中，其可清熱解毒、消暑利尿和消癰腫，為醫食兩用的作物。除具有蛋白質、膳食纖維、礦物質、維生素外，綠豆也含有大量的生物活性物質，如：酚類、黃酮類化合物、丹寧、多醣和胜肽 (Hou et al., 2019)。現今綠豆已被證明具有抗氧化、抗菌、抗發炎、抗糖尿病、抗高血壓和抗腫瘤等作用 (Tang et al., 2014)。

2.3 根瘤菌種類

在十九世紀，學者發現豆科植物根系上有誘導氮固定與結瘤的細菌，其中第一個被成功分離並命名的是 *Bacillus radicola* (Beijerinck, 1888)，接著更名為 *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889)。從那時起，能夠在豆科根上產根瘤的細菌被稱為根瘤菌。直至 1982 年，根據 Jordan (1982) 等學者的研究，相對於生長速率較快的根瘤菌屬 (*Rhizobium*)，創建了生長速率較慢的慢生根瘤菌屬 (*Bradyrhizobium*)。自從使用 16S rRNA 基因序列分析後，根瘤菌屬和種的數量開始增加，目前包括 100 多個物種，分佈在 *Allorhizobium*、*Azorhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Ensifer* (以前是 *Sinorhizobium*)、*Mesorhizobium* 和 *Rhizobium* 和新創建的屬 *Neorhizobium* 和 *Pararhizobium*。此外，21 世紀起發現新的菌種攜帶共生、根瘤和固氮的基因而被認為是根瘤菌，包含 α -變形菌之 *Aminobacter*、*Devosia*、*Methylobacterium*、*Microvirga*、*Ochrobactrum*、*Phyllobacterium* 和 *Shinella* 以及 β -變形菌之 *Burkholderia*、*Paraburkholderia* (以前是 *Burkholderia*) 和 *Cupriavidus* (Velázquez et al., 2017)。

2.4 根瘤形成的步驟

新生的豆科植物根毛分泌黃酮類化合物，吸引相容的根瘤菌並刺激它們產生根瘤因子。根毛變形並形成一個囊袋，根瘤菌被困其中。感染絲結構在囊袋內形成，使根瘤菌進入植物。在無限根瘤 (indeterminate nodule) 中，首先觀察到細胞分裂

發生在內皮層，而在有限根瘤 (determinate nodule) 中則發生在次表皮細胞層。後續細胞層進一步分裂，形成瘤原基 (nodule primordium)。感染絲進展到瘤原基並釋放根瘤菌，接著根瘤菌分化為固氮菌體。在無限根瘤的瘤原基頂部，形成一個持續生成新細胞的分生組織。隨著這些新細胞成熟，許多細胞接著被感染，形成連續的根瘤菌入侵和分化區域。相比之下，有限根瘤不會發展持久性的分生組織，因此被感染的細胞都處於相似的發育階段 (Ferguson et al., 2010)。無限根瘤的豆科植物多分佈於溫帶地區，代表性的植物有紫花苜蓿、三葉草和豌豆。有限根瘤的豆科植物多分佈於熱帶及亞熱帶，代表性的植物有大豆、菜豆、豇豆、綠豆、水黃皮和百脈根。

2.5 黃酮類化合物 (類黃酮) 分類

廣義的黃酮類化合物為具有 C6-C3-C6 碳骨架的化合物，骨架上 chromene 或 chromane 的苯環部分為環 A，3,4-dihydro-2H-pyran 或 pyran 部分為環 C，環 C 上取代的苯基為環 B。根據 B 環的連接位置分為三類：狹義的類黃酮 (flavonoids)、異黃酮 (isoflavonoids) 和新類黃酮 (neoflavonoids)，除此之外，具有 C6-C3-C6 碳骨架的類黃酮化合物尚包括 aurones、pterocarpan 和 coumestans (Rauter et al., 2018)，其基本骨架如圖 2.2 所示。

2.6 黃酮類化合物的生合成及運輸

黃酮類化合物生合成之各種酶的複合物存在於內質網朝向細胞質的表面上，其生合成是從 phenylpropanoid pathway 中分支出來，始於脫氨反應，其中胺基酸 phenylalanine 通過 phenylalanine ammonia lyase (PAL) 轉化為 cinnamic acid。然後，cinnamate-4-hydroxylase (C4H) 將 cinnamic acid 氧化成 4-coumaric acid，進一步經 CoA ligase (4CL) 催化合成 4-coumaroyl-CoA。隨後，三分子 malonyl-CoA 與一分子 CoA ester 通過 chalcone synthase 縮合形成 chalcone。通過異構酶、羥化酶、氧化還原酶等多種酶以及糖基轉移酶、甲基轉移酶、醯基轉移酶等後修飾酶，可以從

chalcone 獲得超過 9,000 種黃酮類化合物 (Chouhan et al., 2017)。

在植物體中，黃酮類化合物生合成後會被轉運到液泡作為主要儲存場所，不過其仍可被轉運到其他細胞區室，甚至細胞外空間。學術界至今已提出三種不同的運輸機制，即囊泡運輸、膜轉運蛋白 [主要有 multidrug and toxin efflux (MATE) transporters 及 ATP-binding cassette (ABC) transporters] 和穀胱甘肽-S-轉移酶 (GST) 介導的運輸 (Zhao, 2015)。此外，研究指出部分黃酮類化合物會被釋放到根圈，並在土壤有機質動態吸附後，受到土壤微生物的快速降解 (Del Valle et al., 2020)；例如一項模擬 daidzein 在根圈分佈的研究顯示，其只分佈在距離根表面幾毫米的地方，從而表明 daidzein 的土壤遷移性可能會因土壤吸附而大大降低 (Okutani et al., 2020)。鑑於黃酮類化合物與土壤理化顆粒的相互作用，以及它們在生物相互作用中的角色，更多研究持續探索著植物根圈中黃酮類化合物介導功能的複雜性。

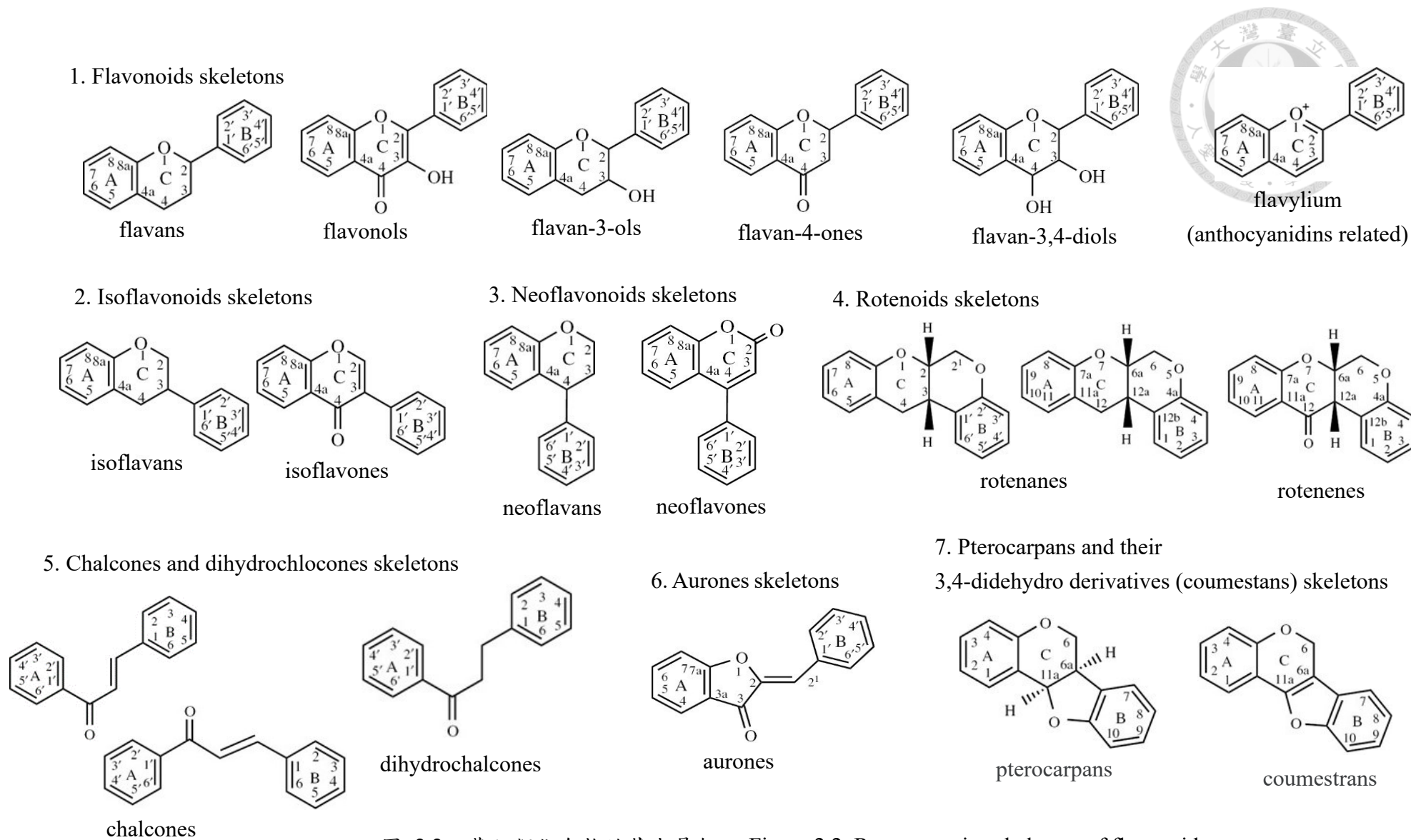


圖 2.2、黃酮類化合物的基本骨架 Figure 2.2. Representative skeletons of flavonoids

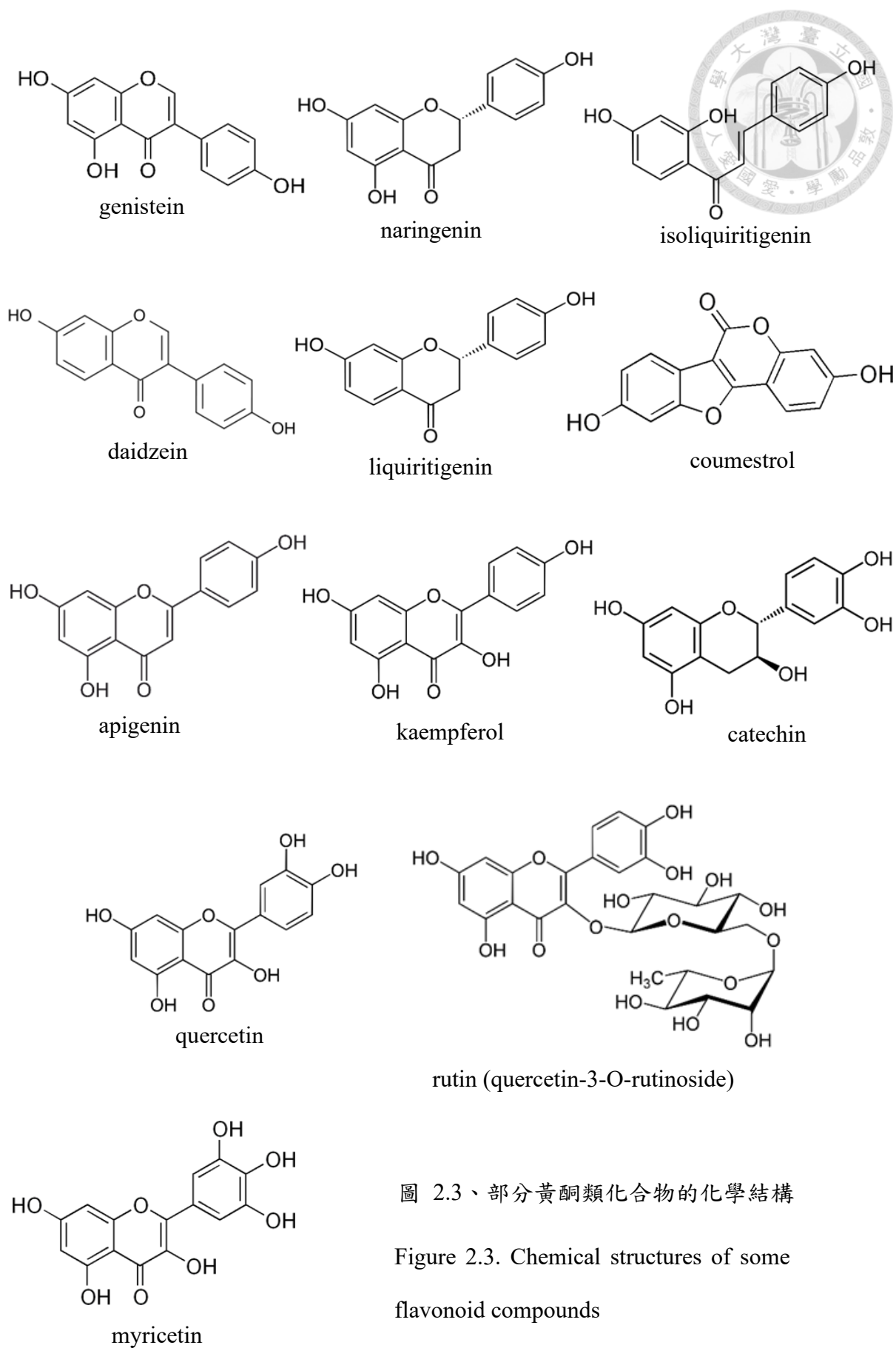


圖 2.3、部分黃酮類化合物的化學結構

Figure 2.3. Chemical structures of some flavonoid compounds



2.7 黃酮類化合物在非生物逆境下的作用

各種非生物威脅，包括溫度、光、紫外線、鹽害、營養缺乏、重金屬和乾旱等，這些環境逆境皆會誘發植物產生有害的活性氧，對細胞造成損害。黃酮類化合物能透過淬滅自由基分子、螯合過渡金屬、干擾與自由基生成相關的酶（例如：cyclooxygenase、lipoxygenase、monooxygenase 和 xanthine oxidase）以及活化植物的天然抗氧化酶，從而保護植物免受細胞過氧化的傷害 (Mierziak et al., 2014; Procházková et al., 2011; Shomali et al., 2022)。

2.8 黃酮類化合物對根圈通訊的影響

大多數的黃酮類化合物以糖苷的形式儲存在植物液胞內，其中一部份則由根部釋放到根圈。釋放到根圈的黃酮類化合物能參與生物通訊，包括與根瘤菌、叢枝菌根真菌、線蟲、病原體、植物生長促進菌以及植物間的相互作用 (Sugiyama & Yazaki, 2014)。

2.8.1 與叢枝菌根真菌的相互作用

部分黃酮類化合物可以誘導叢枝菌根菌孢子萌發和菌絲分枝，從而增加植物根部的定殖率 (Larose et al., 2002; Singla & Garg, 2017)，豆科作物中菌根定殖也受到類黃酮和多胺的影響 (Salloum et al., 2018)。此外，入侵植物透過更多的黃酮類化合物分泌，以促進叢枝菌根菌的定殖進而增加生存優勢 (Pei et al., 2020)。大多數草本豆科植物可以形成豆科植物-叢枝菌根菌-根瘤菌三方共生，且這種共生在固氮方面的有效性高於只有豆科植物與根瘤菌屬的共生作用 (Zhang et al., 2018)。除此之外，亦有抑制叢枝菌根菌發育的黃酮類化合物，例如羽扇豆 (*Lupinus albus* L.) 分泌多種 pyranoisoflavones 抑制芽管生長和菌絲分支 (Akiyama et al., 2010)。

2.8.2 與線蟲的相互作用

當植物寄生線蟲定位其宿主時，會遇到土壤中的黃酮類化合物。對於卵階段的線蟲，黃酮類化合物可以抑制卵孵化，例如 kaempferol 可以抑制 *Radopholus similis*

卵的孵化 (Wuyts et al., 2006)。對於幼年線蟲，黃酮類化合物可以通過減慢其運動來誘導靜止，從而導致可逆的不活動期，或通過排斥它們來改變它們向根部的遷移，再者，殺死它們；例如，kaempferol、quercetin 和 myricetin 可驅除並減緩南方根結線蟲幼蟲的生長速度 (Wuyts et al., 2006)，以及 patuletin、patulitrin、quercetin 和 rutin 能殺死 *Heterodera zae* 的幼蟲 (Faizi et al., 2011)。

一旦線蟲到達植物根部，造成植物組織機械損傷時，植物抗毒素就會產生和釋放。目前已知對線蟲的防禦物質有 isoflavonoids、pterocarpan (例如：coumesterol、glyceollin、formononetin 和 medicarpin) 以及 flavonols (例如：kaempferol 和 quercetin) (Chin et al., 2018)。植物遭取食部位所積累的黃酮類化合物可能會通過限制產蛋量或扭曲雄性與雌性的比例，進而影響線蟲的生育力和繁殖力，在營養豐富的情況下可能因上述理由形成更多的雌性 (Grundler et al., 1991)。

2.8.3 與病原體的相互作用

黃酮類化合物在植物抵抗病原細菌和真菌扮演非常重要的角色。部分為非特异性，由於其抗氧化特性，可以抑制植物因病原體感染而產生的活性氧物質。黃酮類化合物也會被轉運到感染部位並誘導過敏反應（這是受感染植物最早的防禦機制）和程序性細胞死亡 (Dai et al., 1996)。此外，黃酮類化合物也能融入壞死細胞和鄰近細胞的細胞壁中，並通過調節生長素活性來繃緊植物組織和結構，從而製造堅固的物理屏障，或導致組織分化，促進癒傷組織和毛細絲的形成以及維管束系統的閉合以防止病原體感染 (Beckman, 2000)。黃酮類化合物也能通過螯合病原體酶活性所需的金屬來直接參與抑制，特別是那些消化植物細胞壁的酶 (Treutter, 2005)。

抗真菌活性通常基於抑制孢子發育和菌絲體菌絲伸長 (Blount et al., 1992)。研究指出類黃酮的抗菌活性機制是基於阻止微生物粘附和細胞包膜轉運蛋白的能力 (Naoumkina et al., 2010; Plaper et al., 2003)。脂溶性黃酮類化合物能破壞微生物膜，改變其流動性，並擾亂呼吸鏈 (Haraguchi et al., 1998; Mishra et al., 2009)。此外，黃酮類化合物的 B 環可以嵌入核酸鹼基或形成氫鍵，進一步抑制細菌中 DNA

和 RNA 的生合成，影響 DNA gyrase 的活性 (Wu et al., 2013)，此為黃酮類化合物抗病毒特性的理論基礎——可藉由抑制病毒聚合酶活性並與病毒的核酸或衣殼蛋白結合 (Zakaryan et al., 2017)。

2.8.4 與其他植物的相互作用

植物釋放的化感物質，即根或葉分泌物以及植物凋落物分解的揮發性分子或滲濾液，即使在土壤中以低濃度 (10^{-5} 至 10^{-6} M) 甚至極低濃度 (10^{-10} M) 存在，仍能展現出生物活性，導致鄰近的敏感植物在發芽、生長和發育方面產生延遲或抑制 (Gniazdowska & Bogatek, 2005)。目前黃酮類化合物作為化感分子的作用已得到廣泛認可 (Kato-Noguchi, 2022; Mehal et al., 2023; Nakabayashi et al., 2022)，植物常會專門合成獨特的化合物，例如大麥產生的 saponarin (一種新發現的黃酮類化合物)，其能抑制雀麥的傳播 (Bouhaouel et al., 2019)。黃酮類化合物的累積也可能有助於植物成功入侵，例如，黃酮醇 (flavonols) 和黃酮 (flavones) 的化感作用被視為樹木入侵物種的特徵 (Borda et al., 2022)。

近年來，植物化感作用被用於雜草管理，通過種植化感作物或使用化感化學物質，從而減少農用化學品的使用 (Farooq et al., 2020)，例如使用 coumarin 減少主根長度並顯著增加側根數量 (Lupini et al., 2014)。在非洲，獨腳金 (striga) 是一種對作物造成巨大損害的寄生雜草，小農間作種植豆科植物 (*Desmodium uncinatum*) 以保護穀類作物免受獨腳金感染 (Khan et al., 2016)，*D. uncinatum* 會分泌黃酮類化合物 uncinanone B 促進獨腳金自殺性發芽，並分泌 uncinanone C 和幾種 di-C-glycosylflavones 阻止其附著在宿主根上 (Guchu et al., 2007)。後續研究中發現屬於 C-glycosylflavone 之 vitexin 和屬於 di-C-glycosylflavone 之 isoschaftoside 為 *D. uncinatum* 分泌物中具活性的化學成分 (Hooper et al., 2010)。

化感作用依賴於土壤水溶液中化感化學物質的濃度和持久性，這受到環境因素、土壤特性和植物生長階段的影響 (Scavo et al., 2019)。在白三葉草 (*Trifolium repens*) 生長期間，土壤中可以檢測到根分泌的 formononetin、medicarpin 和

kaempferol。將白三葉草作為綠肥施用到土壤中的一天內，可觀察到高濃度的 kaempferol 和 quercetin 的糖苷，然而在 16 天後，大多數黃酮類化合物都是苷元，其中，大量 kaempferol 殘留在土壤，其它黃酮類化合物則被降解 (Carlsen et al., 2012)。同樣，具有化感作用的水稻品種在根部組織中積累了兩種黃酮苷 (5,4'-dihydroxy-3',5'-dimethoxy-7-O- β -glucopyranosylflavone 和 7,4'-dihydroxy-3',5'-dimethoxy-5-O- β -glucopyranosylflavone)，一旦滲出，就會迅速轉化為苷元形式，更能抵抗微生物降解，並且在稻田土壤中不易移動，從而增強對稻田雜草的抑制效果，例如稗草 (Kong et al., 2007)。

黃酮類化合物在化感作用中的作用機制尚不清楚，有研究者認為其與 ATP 產生以及生長素運輸和降解有關，導致目標植物根形態發育程序改變 (Šoln & Dolenc Koce, 2021)。另有研究者認為黃酮類化合物能造成活性氧物質爆發，導致程序性細胞死亡；例如在被矢車菊 (*Centaurea maculosa*) 侵擾的土地上，觀察到相鄰植物的根系死亡現象，而這種影響是由雜草釋放的兒茶素所誘發的活性氧物質，其誘發的鈣離子波動改變了細胞離子平衡，使細胞 pH 失衡而導致細胞凋亡 (Bais et al., 2003)。

2.9 與根瘤形成相關的黃酮類化合物

豆科植物中存在豐富多樣的黃酮類化合物，這與這些化合物在結瘤過程中的作用密切相關。然而，儘管豆科植物能合成許多黃酮類化合物，但只有特定的化合物種類被作為誘導結瘤基因的信號被分泌到根圈中，進而參與結瘤作用。這些特定信號的產生與釋放對於實現寄主特異性至關重要。不同豆科植物分泌的根瘤相關黃酮類化合物不盡相同，例如大豆根部代謝物中的 isoliquiritigenin、liquiritigenin、apigenin、prunetin、amino-flavonoid、afroformosin、dihydrokaempferol、genkwanin、naringenin 和 biochanin-A (Brechenmacher et al., 2010)，以及其根分泌物中的 daidzein、genistein 與 coumestrol (Schmidt et al., 1994)；菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 根分泌物中的 genistein、daidzein、coumestrol、isoliquiritigenin、naringenin 和 liquiritigenin (Bolaños-Vásquez & Werner, 1997)；紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 根分

泌物中的 methoxychalcone、formononetin 和 medicarpin (Dakora et al., 1993)；救荒野豌豆 (*Vicia sativa*) 根分泌物中的 methoxychalcone、isoliquiritigenin、liquiritigenin、hesperitin、naringenin、7,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavanone、7,4'-dihydroxy-3'-methoxyflavanone 和 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavanone (Recourt et al., 1991)；地下三葉草 (*Trifolium subterraneum*) 根分泌物中的 dihydroxyflavone (Lawson et al., 1996)；豌豆 (*Pisum sativum*) 根分泌物中的 pisatin (Novák et al., 2004)。

圖 2.4、圖 2.5 和圖 2.6 分別為 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫中綠豆的異黃酮、類黃酮及黃酮和黃酮醇生合成路徑，其中綠色方框表示已有文獻發表從綠豆中找到的相關基因。在其中搜索與綠豆同屬菜豆亞族 (Subtr. Phaseolinae) 的菜豆根分泌之根瘤相關黃酮類化合物，發現皆有上述提及的 genistein、daidzein、coumestrol、isoliquiritigenin、naringenin 和 liquiritigenin 成分，如圖上紅色框線所示。但儘管兩植物物種親緣關係接近，兩者與根瘤相關的黃酮類化合物組成是否相似，且是否有一樣強度的分泌，仍需要試驗證明，這也是本研究的目標之一。

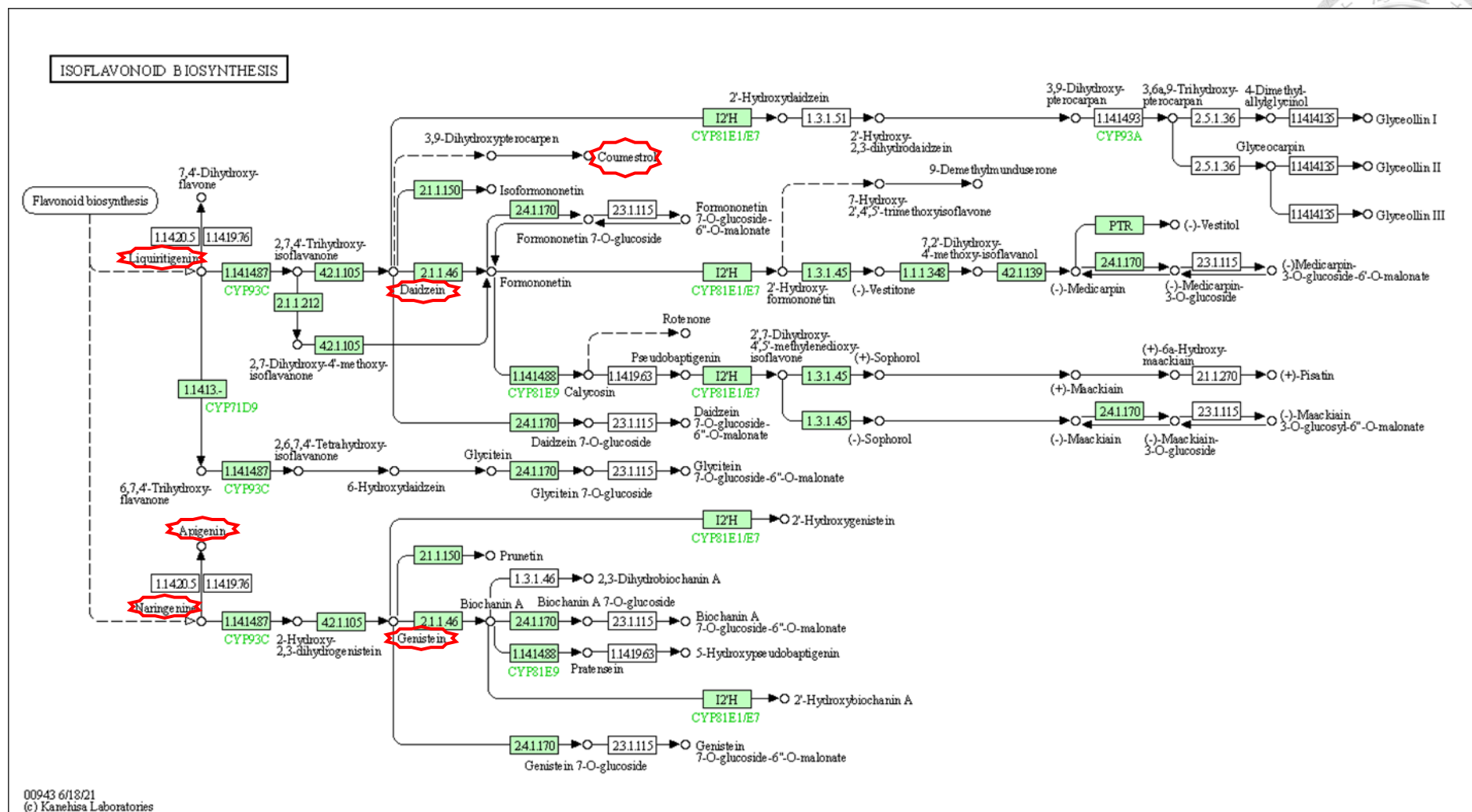


圖 2.4、Isoflavonoid biosynthesis - *Vigna radiata* (mung bean) (<https://www.genome.jp/pathway/vra00943>)

From KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

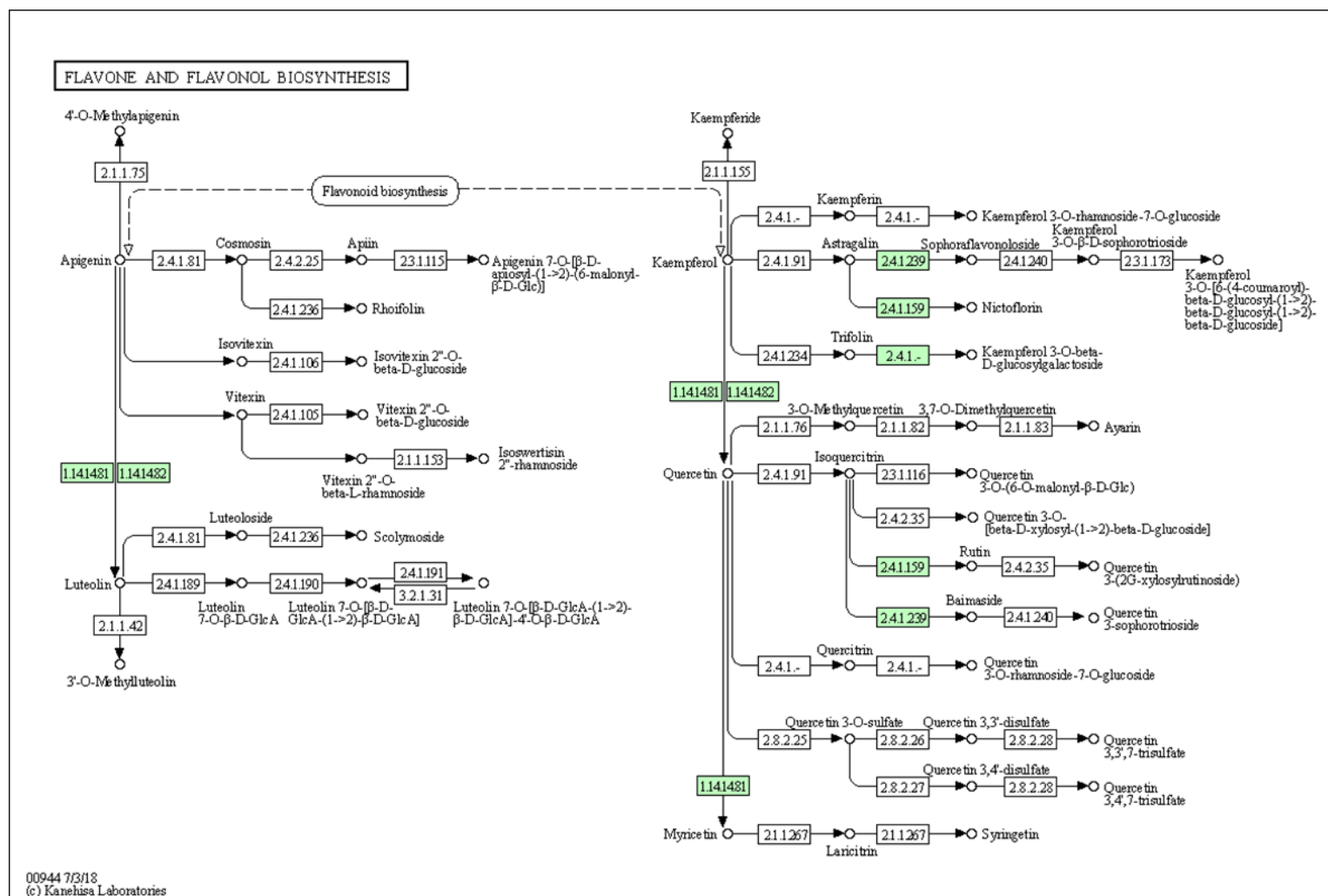
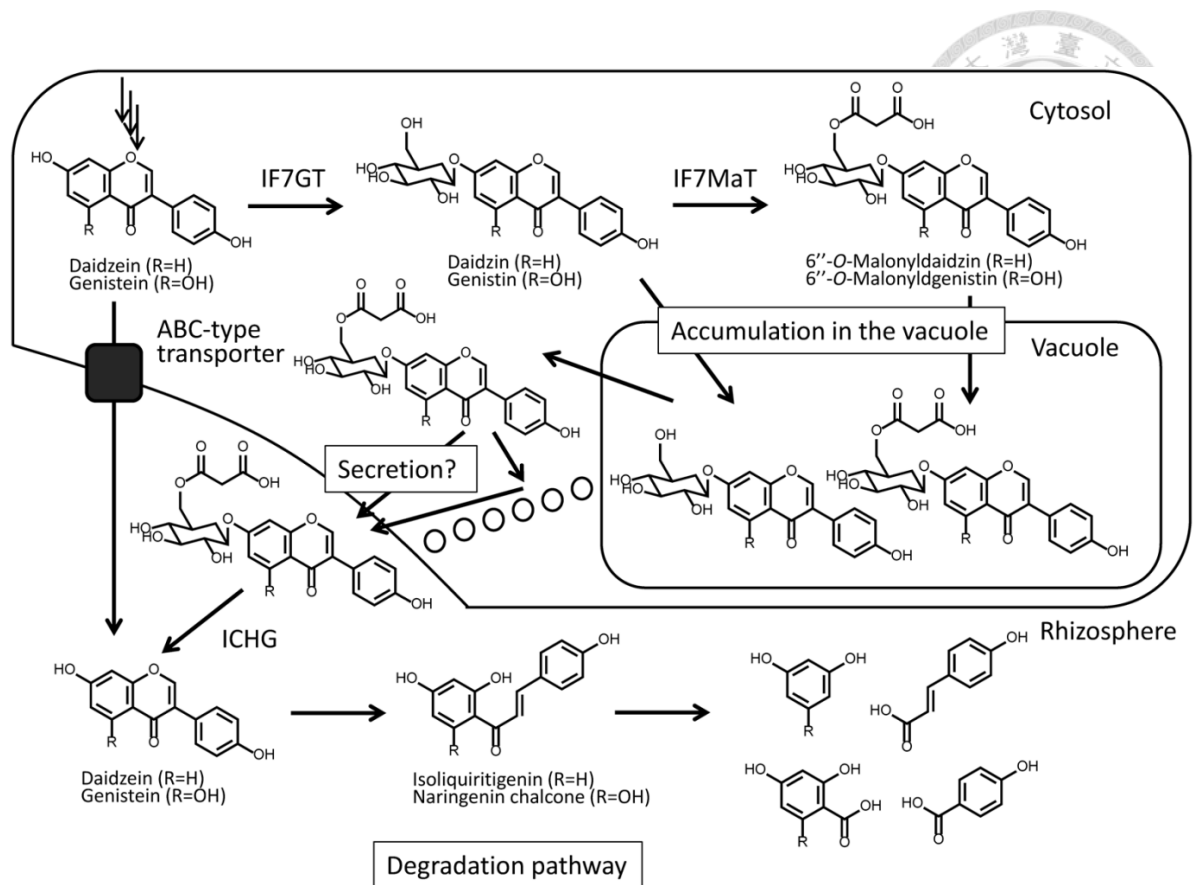


圖 2.6、Flavone and flavonol biosynthesis - *Vigna radiata* (mung bean) (<https://www.genome.jp/pathway/vra00944>)

From KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)



(Sugiyama & Yazaki, 2014)

圖 2.7、異黃酮在大豆中儲存與代謝示意圖

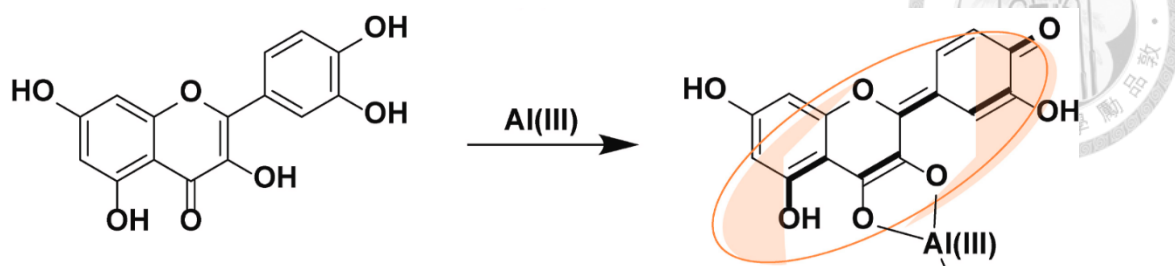
Figure 2.7. Schematic diagram of storage and metabolism of isoflavones in soybean

2.10 總類黃酮含量的測定方法

氯化鋁比色法 (aluminum chloride assay) 是廣泛用於測定植物萃取物中總類黃酮含量的方法，其中 Al (III) 用作錯合劑。該法最早由 Christ and Müller (1960) 提出，是基於 Al (III)-類黃酮螯合物的形成以測定草藥及茶製品中 flavonol 衍生物的含量。由於黃酮類化合物有許多氧代基 (oxo group) 和羥基 (圖 2.8，方法一)，黃酮類化合物結合金屬離子 (例如 Al (III)) 具有很強的親和力，主要以一比一的比例結合，但具體取決於 pH 值等的實驗條件。隨著時間的推移，原始方法經歷了幾次修改，例如在添加氯化鋁之前引入亞硝酸鈉。亞硝酸鈉作為硝化劑，對芳香族鄰位二醇具有選擇性 (Barnum, 1977)，生成 flavoniod-nitroxyl 衍生物 (圖 2.8，方法二)，並在約 500 nm 處出現新的吸收帶。

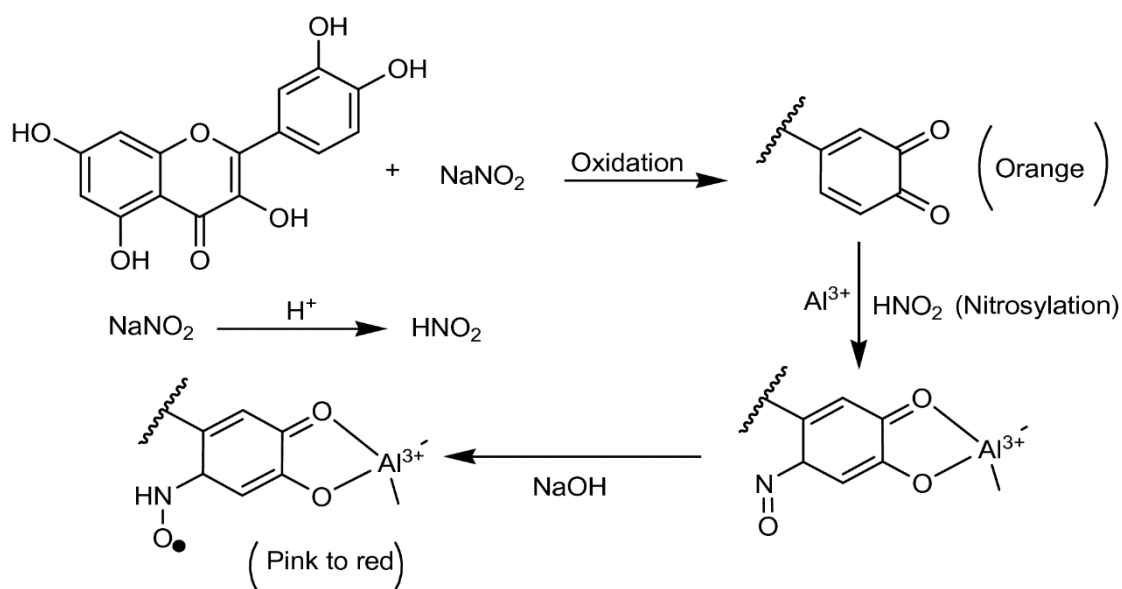
表 2.1 為 Shraim et al. (2021) 整理的有關採用氯化鋁比色法的文獻，詳舉出波長、有無採用亞硝酸鈉等條件，過往研究多採用 quercetin、catechin 和 rutin 作為計算總類黃酮濃度的當量用標準品，但鮮少採用其他種類的黃酮類化合物。然而，不同種類的黃酮類化合物是否也能有效及可靠地經由此法測出仍不清楚，因為此法的原理似乎對於黃酮類化合物環上的氧代基和羥基位置有嚴格要求，故本研究也嘗試使用其他標準品進行測定，以判斷各自的比色效果與代表性。

方法一



(Shraim et al., 2021)

方法二



(Mekonnen & Desta, 2021)

圖 2.8、總類黃酮含量測定——氯化鋁比色法原理

Figure 2.8. Illustration of aluminum chloride colorimetric assay

表 2.1、採用氯化鋁法測定總類黃酮含量的文獻回顧 (Shraim et al., 2021)

Table 2.1. Literatures on the determination of total flavonoid content using the aluminum chloride method

Flavonoid type	λ , nm	Use of other reagents	Solvent	References
Quercetin	415	CH ₃ COOK	MeOH-H ₂ O	Aryal et al. (2019)
Quercetin	415	CH ₃ COONa	MeOH- H ₂ O	Ondua, Njoya, Abdalla, and McGaw (2019)
Quercetin	415	CH ₃ COOK	MeOH- H ₂ O	Shah et al. (2019)
Quercetin	415	CH ₃ COOK	H ₂ O	Ab Rahman et al. (2018)
Quercetin	415	CH ₃ COONa	EtOH- H ₂ O	Sembiring, Elya, and Sauriasari (2017)
Quercetin	415	CH ₃ COOK	EtOH- H ₂ O	Chang et al. (2002)
Quercetin	440	CH ₃ COONa	EtOH- H ₂ O	Dahech et al. (2013)
Quercetin	520	CH ₃ COOK	MeOH-EtOH-H ₂ O	Engida et al. (2013)
Quercetin	415	–	MeOH- H ₂ O	Wang et al., (2019)
Quercetin	420	–	MeOH-H ₂ O	Chandra et al. (2014)
Quercetin	420	–	EtOH-H ₂ O	(Ordoñez, Gomez, Vattuone, & Isla, 2006)
Rutin	415	–	MeOH	Lazarova et al. (2020)
Rutin	415	CH ₃ COOK	MeOH-H ₂ O	Jaradat, Hussien, and Al Ali (2015)
Rutin	415	CH ₃ COOK	MeOH-H ₂ O	Madaan, Bansal, Kumar, and Sharma (2011)
Rutin	430	CH ₃ COONa	EtOH-H ₂ O	Cimpoi et al. (2011)
Rutin	410	CH ₃ COOK	EtOH-H ₂ O	Zhang et al. (2013)
Catechin	415	–	MeOH	Ramamoorthy and Bono (2007)
Catechin	510	NaNO ₂ -NaOH	H ₂ O	Munekata et al. (2020)
Quercetin	510	NaNO ₂ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Phuyal et al. (2020)
Quercetin	425	NaNO ₃ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Gomes et al. (2017)
Catechin	510	NaNO ₂ -NaOH	H ₂ O	Al-Rimawi et al. (2017)
Catechin	510	NaNO ₂ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Perez-Perez et al. (2014)
Catechin	510	NaNO ₃ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Jain Kassim et al. (2011)
Rutin	510	NaNO ₂ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Yan et al. (2021)
Rutin	510	NaNO ₂ -NaOH	MeOH-H ₂ O	(Wang, Luo, Wu, Liu, & Wu, 2018)
Rutin	450	NaNO ₂ -NaOH	MeOH-H ₂ O	Fu et al. (2010)
Rutin	510	NaNO ₃ -NaOH	EtOH-H ₂ O	Chen et al. (2019)



2.11 黃酮類化合物的萃取與糖苷的去除

黃酮類化合物的傳統萃取方法，如浸漬、滲濾和索氏萃取，這些方法已使用數十年，但所使用的溶劑量相對較大且所需的萃取時間較長，故並不經濟。近年來，為了減少萃取時間，發展出多種新式的萃取方法，如微波輔助提萃取、超聲輔助萃取、加壓液體輔助萃取和超臨界流體萃取 (Blicharski & Oniszcuk, 2017; Jurinjak Tušek et al., 2022)。本研究使用的是超聲波輔助萃取，以促進萃取被礦物吸附的化合物。

黃酮類化合物可以游離形式存在，但更常見的是糖基化、甲基化、乙醯化、異戊二烯化或聚合，其中最常見的是類黃酮糖苷，經糖苷化後的黃酮類化合物可提高跨細胞膜的運輸、改善溶解度、生物體分佈儲存和新陳代謝效率 (Kytidou et al., 2020)。甲基化類黃酮比游離形式或類黃酮糖苷稀有，甲基化可增強類黃酮進入細胞並防止降解 (Wen et al., 2017)。在根圈所收集到的黃酮類化合物不單是游離態，也可能是類黃酮糖苷 (Liu & Murray, 2016)。若要增加黃酮類化合物的萃取效率，可以使用水解方式去除糖苷，常見的水解方式有：酸水解、鹼水解、熱處理水解以及自然發酵 (Kazlauskaite et al., 2021)，故本研究嘗試鹼水解與不水解，比較此兩種處理方法對盆栽介質萃取效率的影響。由於過往文獻中，黃酮類化合物的萃取效果實驗多以食品及植體為對象，故本研究中，萃取溫度的控制、超音波輔助法的採用、溶劑種類的選擇及鹼水解法的條件，分別參考了 Rostagno et al. (2004) 於大豆的萃取實驗，以及 Kazlauskaite et al. (2021) 於紅菽草的萃取實驗。

材料與方法



3.1 試驗作物

決明 (*Senna tora*) 種子購自臺北市大安區福生堂中藥房，為鈺豐生物科技有限公司之決明子產品，生產日期為民國 110 年 6 月 4 日，批號 5228，產地臺灣。綠豆 (*Vigna radiata*) 種子購自新北市板橋區農會，為台南麻豆雜糧產銷第一班之產品——國產粉質綠豆台南五號，包裝日期為民國 110 年 7 月 23 日，產銷履歷追溯號碼 21072200022。

台南五號粉綠綠豆 (即 VC3890A) 是台南區農業改良場及亞洲蔬菜研究發展中心共同合作選育而成之高產量、高品質、抗白粉病綠豆品種，其雜交母本為亞蔬中心粉綠品系 VC2750A，為大粒種，成熟一致性及抗白粉病性優良；父本則為亞蔬中心油綠品系 VC2768A，為大粒種，早熟且適應性廣，產量高 (翁和賴，1992)。

3.2 種植方法

3.2.1 田間試驗

在 2022 年秋季開始於臺大實驗農場田間種植，採三種種植方式，分別為單種決明兩株、單種綠豆兩株以及間種決明與綠豆各一株，株距為 15 cm。另設有施氮肥與不施氮肥處理組，以尿素為氮肥。施氮量為 40 kg N ha⁻¹，基肥與追肥各為半量，追肥於開花後施用。基肥施用方法為在種植前，在兩株種植位置間挖寬 5 cm 長 60 cm 深 10 cm 的長條形坑，將尿素均勻撒布其中，隨後覆土填平。雖有產生有效的根瘤，但因為產生許多假性根瘤 (附錄二)，故無法對根瘤進行分析。

假性根瘤的可能原因為根瘤線蟲，病徵主要發生於地下根、莖部，其會造成根部形成大小不一的根瘤，後期根部腐爛，影響植株根部水份及養份的吸收，並造成地上部發育受阻，矮小、葉小、黃化且易脫落，嚴重時生長勢衰弱，生育停止，甚至全株死亡，故影響產量及品質甚鉅。植物根部因根瘤線蟲造成的傷口，可直接或間接引起其他病原菌之侵入，形成複合性病害 (陳，2009)。



3.2.2 盆栽試驗

盆栽試驗均於國立臺灣大學生物科技館四樓 R428 植物培養室進行，照度 5000 lx，溫度 22 至 25°C，種植時的圖片呈現於附錄三，層架上盆栽擺放順序於每次加水時，重新隨機放置。試驗主要有三階段，pillow system 第一階段小型接種預試驗於 2022 年 3 月 24 日至 2022 年 5 月 1 日進行，pillow system 第二階段綠豆決明試驗於 2022 年 4 月 8 日至 2022 年 5 月 30 日進行，三吋盆試驗於 2022 年 10 月 19 日至 2022 年 11 月 25 日進行。

Pillow system 盆栽試驗

為了使根瘤易於觀察，試驗採用 pillow system (Hayashi et al., 2005)，即用不織布茶包包裹蛭石與珍珠石混合物 (6:1, v/v) 以創造出一種「枕頭」，然後將植物種植在這些枕頭之間。這樣可以使植物不與蛭石接觸，同時施以養液以維持植物所需的養分。由於預試驗中發現根部會刺穿不織布，所以後續試驗為枕頭套上多層不織布茶包。為了能控制所施用的氮量，本研究微調原始配方不含氮的 Broughton and Dilworth nutrient solution (表 3.1)，並額外添加氮肥。高施氮組別的養液含有 5 mM 硝酸鈣，低施氮組別則含有 10 μ M 硝酸鉀，除了一開始將系統浸潤養液外，後續每天加水維持系統重量，並於每週加入定量的養液維持養分。

Pillow system 盆栽試驗分為兩階段。

第一階段為預試驗，於 1000 μ L Thermo® QSP 微量吸管尖盒 (tip 盒) 內進行，目的在測試 pillow system 的可行性及不同根瘤菌菌株對綠豆根瘤效果。在試驗中，每個 tip 盒內都種植了三顆綠豆，並且每一種根瘤菌菌株分別接種於一個 tip 盒，種植時養液採低氮配方，每周一次加入 50 mL 養液維持養分。

第二階段為選定菌株後的綠豆決明試驗，於較大的塑膠盒內 (CM1 1 號嬌點整理盒，聯府塑膠股份有限公司，桃園，臺灣) 進行 (圖 3.1)，塑膠盒內共並排放置六個枕頭，並於枕頭間種植植物，兩枕頭間為一排，共五排，每排種植兩株植物。單種決明者每排兩株決明，單種綠豆者每排兩株綠豆，間種決明與綠豆者則每排決明與綠豆各一株，並設有高低施氮組及是否接種組，不同處理各一盒。每週兩次加

入 50 mL 養液維持養分。

三吋盆盆栽試驗

經 pillow system 確立從介質中能分析到黃酮類化合物後，即設計較為普遍且方便增加重複數的盆栽種植方法。採用上直徑 9 公分 × 高 8 公分 × 底直徑 6.2 公分的黑色塑膠圓軟盆，盆內介質為蛭石與珍珠石混合物 (6:1, v/v)，前者經由滅菌釜濕式滅菌，後者則是泡在 0.5%次氯酸鈉溶液殺菌後以去離子水洗淨。於每盆內放入三顆綠豆，並於一周後接種菌液，接種菌液三天後，拔除兩株苗，留下最健壯的一株。養液亦使用微調後的 Broughton and Dilworth nutrient solution (表 3.1)，高施氮組別的養液含有 5 mM 硝酸鈣，低施氮組別則含有 10 μ M 硝酸鉀，除了一開始盆栽浸潤養液外，後續每週加入 25 mL 養液並補充適量水分維持盆內濕度和養分。

高施氮組別包含不接菌、接種 *B. arachidis* CCBAU 051107 及接種 *E. fredii* USDA 205，共三處理，各五重複。

低施氮組別包含不接菌、接種 *B. diazoefficiens* USDA 110、接種 *B. elkanii* USDA 76 與接種 *B. japonicum* USDA 6，共四個處理組，各五重複；以及接種 *B. arachidis* CCBAU 051107 和接種 *E. fredii* USDA 205 的兩個處理組，各 10 重複。

表 3.1、養液配方

Table 3.1. Composition of nutrient solution

Stock	Components	Concentration of stock solution (M)	Volume of stock solution per liter in final solution (μ L)	Final concentration (M)
A	CaCl ₂	1	1000	1
B	KH ₂ PO ₄	1	500	0.5
C	MgSO ₄	0.5	500	0.25
D	K ₂ SO ₄	0.5	500	0.25
E	Fe-citrate	0.01	1000	0.01
F	MnSO ₄	0.002	500	0.001
	H ₃ BO ₃	0.004		0.002
	ZnSO ₄	0.001		0.0005
	CuSO ₄	0.0004		0.0002
	Na ₂ MoO ₄	0.0002		0.0001
G	Co(CH ₃ COO) ₂	0.002	50	0.0001

Plastic tray
(24.2 cm x 15.1 cm x 13.9 cm)



Sterilize with bleach solution.

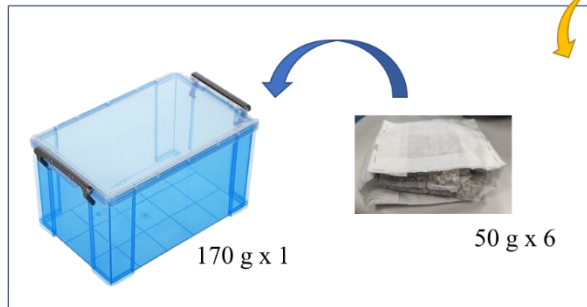
Vermiculite:perlite mix (6:1, v/v)
Pillow bags: polypropylene tea packs
(130 x 150 mm)



Pillowcase 12 cm x 10 cm



Autoclave



B&D nutrient solution (1250 g)
(Fully absorbed)

Added deionized water to a
total weight of 2000 g

Each 50 mL of nutrient solution was added twice a
week, and deionized water was added from time to
time to maintain a total system weight of 2000 g.



Sowed the seedlings in between
individual pillows (two plants per row.)

After 2 days



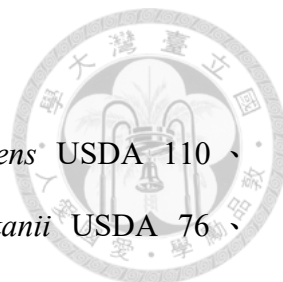
Inoculated roots with bacteria culture
at a cell density of 10^8 cells/mL.



Nutrient solution was added (10-15 mL) twice a week and
deionized water was added to a total weight of 2000 g.

圖 3.1、Pillow system 概述

Figure 3.1. Description of pillow system.



3.3 根瘤菌菌株

本次試驗使用五種菌株：*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110、*Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 和 *Ensifer fredii* USDA 205。上述前三個為臺灣大學生物科技研究所劉啟德老師實驗室提供，後兩個為國立臺灣大學植物科學研究所李承叡老師實驗室提供。

註 1：菌株 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 過去命名為 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110，但形態生理學、基因型和基因組等證據證明其與 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 等近緣的菌株不同，故被分類成新種 (Delamuta et al., 2013)。

註 2：本研究結果與討論中所指稱的 *B. diazoefficiens*、*B. arachidis*、*B. elkanii*、*B. japonicum* 和 *E. fredii*，即分別代表 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110、*Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 和 *Ensifer fredii* USDA 205。

註 3：本研究所用的菌株目前以等體積的 40% 甘油與 YEM (yeast extract medium) 液態培養菌液混合後，以細胞冷凍管保存在臺大農化系舊館 203 室 -80°C 冰箱內。

3.4 根瘤菌的培養

根瘤菌從 -80°C 冰箱取出後於 YEM agar 28°C 培養，待菌落形成後，將其轉至裝有 3 mL 液態 YEM 的試管，待菌液在波長 600 nm 吸光值達 0.5 以上後，取 30 μ L 菌液置入新試管中培養。吸光值再次達到 0.5 以上時，取 0.5 mL 菌液轉移至裝有 50 mL 液態 YEM 繼續培養，並接著用於接種。

(一) 菌量估算方法：為了推算吸光值與菌量的關係，先測量菌液在波長 600 nm 下的吸光值，後將菌液以 10 倍序列稀釋至 10^{-8} 濃度，每一稀釋倍率取 20 μ L 滴落於 YEM agar 培養基中 (多重複)，待幾分鐘後水分略乾，倒扣培養皿於培養箱培養，培養至菌落明顯後計算 CFU (colony-forming unit)，將菌落數據與吸光值相比較後

以吸光值為判斷菌量的標準 (圖 3.2)。

(二) YEM 培養基：NaCl 0.1 g、MgSO₄ 0.2 g、K₂HPO₄ 0.5 g、Mannitol 10 g、Yeast extract 1 g，加入去離子水 1 L 後，以 KOH 調整 pH 值至 6.8。固態培養基則加入 Agar 15 g。

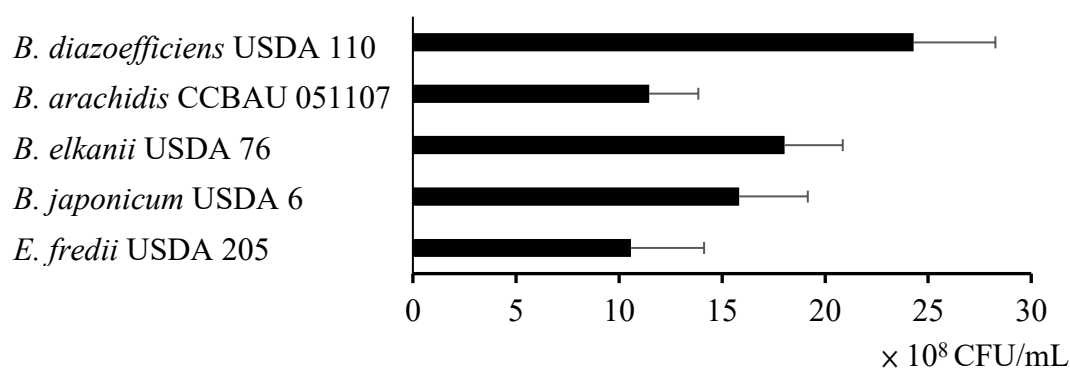


圖 3.2、根瘤菌 OD₆₀₀ = 1 時的菌量

Figure 3.2. Rhizobial counts when OD₆₀₀ = 1

3.5 豆血紅素含量測定 (Senthilkumar et al., 2021)

過去有文獻證明豆血紅素與固氮能力的高度線性相關 (Porter, 1983)，亦有文獻指出以乙炔還原活性 (acetylene reduction activity, ARA) 估算的固氮酶活性，會隨著豆血紅蛋白 (leghemoglobin, LHb) 和根瘤總可溶性蛋白的減少而下降，但 ARA 與 LHb 之間的相關性呈指數關係而非線性關係 (Becana et al., 1986)。本研究缺乏測試 ARA 的設備，故以豆血紅素進行參照。

原理：

血紅蛋白在強鹼中與吡啶 (pyridine) 反應生成血色素，可於 556 nm 下測量。

試劑：

磷酸鹽緩衝液：0.1 M sodium / potassium phosphate buffer (pH 7.4)。

鹼性吡啶試劑：將 0.8 g NaOH 溶解在 50 mL 水中並冷卻，接著加入 33.8 mL 吡啶，並用水稀釋至 100 mL，此時 NaOH 及吡啶的濃度分別為 0.2 M 及 4.2 M。

根瘤樣品萃取：



首先將新鮮或解凍的根瘤壓碎，接著與一至三倍體積的磷酸鹽緩衝液混合後，進行振盪並浸漬。過濾後，取濾液以 10000 g 離心五分鐘，獲得澄清的紅棕色濾液，以備後續分析。

豆血紅素測定：

將適當體積的萃取液與等體積的鹼性吡啶試劑混合，此時由於三價鐵血色素的形成，溶液呈現黃綠色。之後，將血色素均勻地分配於兩個試管。在其中一份中，加入 0.5 g 連二亞硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 晶體以還原血色素，反應 2-5 分鐘後，使用 556 nm 波長讀取吸光值 (A_{556})。在另一部分中，添加 0.5 g 六氰基鐵酸鉀 ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 晶體以氧化血色素，然後在 539 nm 波長下讀取吸光值 (A_{539})。

計算豆血紅素濃度：

$$\text{豆血紅素濃度 (mM)} = \frac{(A_{556} - A_{539}) \times 2D}{23.4}$$

$D = \text{第二步驟所取之適當體積} / \text{最初加入的磷酸緩衝液體積}$

基於連二亞硫酸鹽還原與鐵氰化物氧化的吡啶血色素 556 nm 減去 539 nm 的消光係數為 $23.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bergersen, 1980)。

3.6 根瘤切片觀察

試劑：

Formalin-Aceto-Alcohol (FAA) 溶液 (Rajewski, 2018)：取 95% 酒精 53 mL、乙酸 5 mL、甲醛 (37% ~ 40%) 溶液 10 mL 與 32 mL 去離子水混合。

樣品製備與觀察：

首先，將取下的根瘤浸泡於 FAA 溶液中，並將其放置在 4°C 的冰箱中保存。取出經 FAA 溶液固定後的根瘤，將其包裹於洋菜膠中進行切片。隨後，使用 0.05% 的 TBO (toluidine blue O) 對根瘤切片進行染色。完成染色後，利用乙醇和磷酸鹽緩衝液洗去多餘的染劑，最後使用光學顯微鏡進行觀察。



3.7 根際分泌物蒐集與鑑定

(一) 介質萃取液製備

1. 取 15 g 介質於錐形瓶內，加入 250 mL 70% 甲醇溶液，在 60°C 水浴下以 40 kHz 超音波振盪 30 分鐘。

※有鹼水解者進行步驟 2 和 3。無鹼水解者跳過步驟 2 和 3，直接進行步驟 4。

2. 以 25% 氫氧化鈉溶液調整瓶內 pH 值至 10.5，接著以超音波振盪十分鐘。

3. 使用醋酸調整 pH 值至 5.7。

4. 利用水流幫浦輔助，將萃取液以 ADVANTEC® 定性濾紙 No. 2 過濾兩次。

5. 取濾液進行減壓濃縮，濃縮後以 50 mL 甲醇回溶，並以 1600 g 離心十分鐘，去除沉澱物。

6. 再度減壓濃縮，取乾燥萃取物，秤重後以 1.5 mL 甲醇回溶。

7. 使用 0.45 μm 孔徑 PTFE 過濾萃取液，之後取濾液並保存於 -20°C 以備後續分析。

※測定回收率之方法與結果呈現於附錄六。

(二) 總酚含量測定

原理：

福林酚試劑 (Folin & Ciocalteus phenol reagent) 是一種由磷鉬酸鹽、磷鎢酸鹽和其他化學試劑混合而成的溶液，通常用於酚類的比色測定，以沒食子酸 (gallic acid) 作為當量標準。鉬酸鹽和鎢酸鹽能夠將化合物氧化，同時自身被還原 (W^{6+} 和 Mo^{6+} 分別還原成 Mo^{5+} 和 W^{5+})，形成藍色的化合物。儘管這種試劑主要用於測定酚類化合物，但它同時也與其他還原物質發生反應。因此，使用這種試劑測得的是樣品的總還原能力，而不僅僅是酚類化合物的含量 (Everette et al., 2010)。

試劑：

20% 福林酚試劑：取 10 mL 福林酚試劑原液 (Folin & Ciocalteus phenol reagent 2 M) 以去離子水定量到 50 mL。

測定步驟：



首先，取 100 μL 的萃取液置於 1.5 mL 的離心管中，再加入 100 μL 20% 福林酚試劑，之後在室溫下振盪混合並靜置 10 分鐘。接著，以 10000 g 離心樣品一分鐘，取上清液注入 96 孔盤中，然後使用波長為 735 nm 的光譜測定吸光值。以 0、5、10、20、30、40、50 mg L^{-1} 之 gallic acid 標準品溶液建立總酚濃度檢量線，並將樣品中總酚以相對含量的 gallic acid 當量表示。

(三) 總類黃酮含量測定

試劑：

30% 亞硝酸鈉：取 15 g 亞硝酸鈉粉末以去離子水定量到 50 mL。

7.5% 三氯化鋁溶液：取 3.75 g 三氯化鋁以去離子水定量到 50 mL。

20% 氫氧化鈉溶液：取 10 g 氫氧化鈉以去離子水定量到 50 mL。

測定步驟：

首先，取 200 μL 的萃取液置於 1.5 mL 的離心管中，加入 20 μL 30% 亞硝酸鈉溶液，混合振盪均勻，然後在室溫下靜置 10 分鐘。接著，加入 20 μL 7.5% 三氯化鋁溶液，再次振盪混合，並在室溫下靜置 10 分鐘後，加入 20 μL 20% 氫氧化鈉溶液，再次振盪混合，在室溫下靜置 10 分鐘，之後以 10000 g 離心一分鐘，取上清液注入 96 孔盤中，並進行吸光值測定。

標準品及樣品在波長 350 nm 至 600 nm 之間每隔 2 nm 讀取一次吸光值，並參考過往文獻於 415 nm 及 510 nm 讀取吸光值。總類黃酮含量以每公斤土壤樣品中所含等當量黃酮類化合物標準品毫克數表示。使用 0、5、10、20、30、40、50 mg L^{-1} 的 quercetin、catechin、genistein、coumestrol、rutin、naringenin 及 daidzein 的標準品溶液建立檢量線。

※上述步驟為方法二，過程中依次加入 20 μL 亞硝酸鈉溶液、20 μL 三氯化鋁溶液與 20 μL 氫氧化鈉溶液；而方法一則是改為依次加入 20 μL 水、20 μL 三氯化鋁溶液與 20 μL 水。

四、黃酮類化合物含量分析 (HPLC-DAD)

1. 取萃取液通過 0.45 μm 濾膜後，取濾液以逆向高效液相層析儀 (Reverse Phase

High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 串聯二極管陣列檢測器 (Diode array detector, DAD) 進行分析。



2. 分析條件：

(1) HPLC 系統：Pump (Hitachi L-2130, Japan)、Auto sampler (Hitachi L-2200) 及 Diode array detector (Hitachi L-2455)，另以層析管柱烘箱 (SUPER CO-150，益翔科技有限公司，新北，臺灣) 維持管柱溫度於 35°C。

(2) 管柱：C18 reverse phase column (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 nm, Kanto Chemicals, Tokyo, Japan)。

(3) 各化合物測定的波長：藉由全波長 190 nm 至 900 nm 下各化合物的特徵吸收峰，可以判斷化合物的種類是否與標準品相符，附錄七呈現各黃酮類化合物標準品的圖譜。以下是定量各化合物的波長：quercetin (槲皮素) 370 nm、isoliquiritigenin (異甘草素) 370 nm、myricetin (楊梅黃酮) 370 nm、kaempferol (山柰酚) (365 nm 和 370 nm)、coumestrol (香豆雌酚) 342.5 nm、apigenin (芹菜素) 336 nm、genistein (金雀異黃酮) (300 nm、260 nm 和 250 nm)、liquiritigenin (甘草素) 275 nm 及 daidzein (大豆異黃酮) 275 nm。

※為了瞭解是否有未選到的黃酮類化合物及類黃酮糖苷的存在可能性，本研究取根瘤菌 *B. arachidis* 接種之 pillow system 高氮決明組、*B. arachidis* 接種之三吋盆綠豆 (未水解 & 鹼水解萃取) 共三組介質萃取物樣品進行 LC-MS/MS 分析，分析條件請參閱附錄十四。

表 3.2、HPLC 分析梯度條件

Table 3.2. HPLC gradient condition

Program 1. pH 3.3, 37.5 min gradient program (for pillow system)

Time (min)	Flow rate (mL min ⁻¹)	Solvent A ¹ (%)	Solvent B ² (%)	Solvent C ³ (%)
0	1	70	30	0
25	1	30	0	70
30	1	30	0	70
32.5	1	70	30	0
37.5	1	70	30	0

¹Solvent A: pH 3.3 aqueous acetic acid; ²Solvent B: 100% methanol; ³Solvent C: 100% acetonitrile.

Program 2. pH 2.5, 60 min gradient program (for 3-inch pot experiment)

Time (min)	Flow rate (mL min ⁻¹)	Solvent A ¹ (%)	Solvent B ² (%)	Solvent C ³ (%)
0	1	100	0	0
12.5	1	60	40	0
37.5	1	30	0	70
42.5	1	0	0	100
44.5	2	0	0	100
53	2	0	0	100
54.5	1	100	0	0
60	1	100	0	0

¹Solvent A: pH 2.5 aqueous acetic acid (approximately equal to 2% aqueous acetic acid);

²Solvent B: 100% methanol; ³Solvent C: 100% acetonitrile.

結果與討論

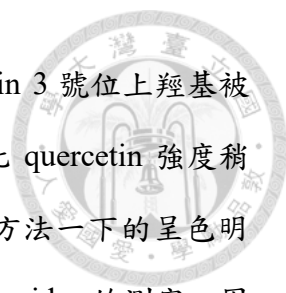


4.1 不同標準品的氯化鋁比色法比較

圖 4.1 及圖 4.2 為不同黃酮類化合物在不同氯化鋁比色法下的呈色情形，圖 4.3 為在 350 nm 到 600 nm 下的吸收光譜。方法一下明顯呈色的有 quercetin 和 rutin，其最高吸收峰分別在 416 nm 和 428 nm。方法二下較明顯呈色的有 catechin 和 naringenin，最高吸收峰分別位於 474 nm 及 400 nm，較不明顯呈色的有 coumestrol、quercetin、genistein 和 rutin，coumestrol 最高吸收峰在 382 nm，後三者最高吸收峰在吸收光譜上較不明顯。然而，daidzein 在方法一及方法二均未明顯呈色。由圖 4.1 可觀察到儘管部分經方法二處理的樣品有呈色，但在離心後帶有顏色的沉澱物很多，若這些沉澱物能被溶解，應該能增加吸光值。

基於文獻資料，方法一常用的吸光值波長為 415 nm，方法二則為 510 nm。本研究在這兩個波長下進行了吸光值的測量，並根據濃度繪製了線性迴歸線（見圖 4.4 至圖 4.7）。值得注意的是，在相同測量波長和方法下，各黃酮類化合物的迴歸線呈現出明顯不同的斜率，這些結果顯示若樣品中檢測到的黃酮類化合物種類與先前文獻選用的當量標準品（如 quercetin、catechin 和 rutin）不同，則類黃酮總量的測定將變得難以解釋和缺乏學術意義。值得強調的是，氯化鋁比色法在部分黃酮類化合物（如 daidzein）的測定上表現不佳，當樣品中含有此類化合物時，氯化鋁比色法將無法提供準確參考值。因此，在應用氯化鋁比色法時，須充分了解樣品中黃酮類化合物的種類，並評估它們是否適用於氯化鋁比色法的定量分析。除此之外，樣品間黃酮類化合物種類相同的情況下，方可採用氯化鋁比色法進行總類黃酮測定。例如，在本研究中，若同屬於綠豆處理組，則使用氯化鋁比色法具有參考價值；然而，若欲比較綠豆與決明根際分泌物，由於植物種類分泌的不同化合物，氯化鋁比色法僅能提供初步參考而非準確的總量分析。

黃酮類化合物種類繁雜，結構相異，能與鋁離子形成錯合物的位置也不盡相同。依據圖 2.8 所示的氯化鋁比色法原理，quercetin 因具有 C 環 4 號位上的羰基以及



3 號位上的羥基故能與鋁離子錯合並且呈色，而 rutin 為 quercetin 3 號位上羥基被芸香糖取代的糖苷，儘管羥基被取代，但經實驗結果確認，雖比 quercetin 強度稍差但仍能經方法一與鋁離子錯合呈色，然而其他五種化合物在方法一下的呈色明顯較差，由此推測方法一應該較適合 flavonols 和 flavanol 3-glycosides 的測定。因 catechin B 環在 4' 位和 5' 位上具有羥基，故能經圖 2.8 方法二所述的原理獲得顯著呈色，然而 quercetin 和 rutin 雖於 B 環有相似結構，呈色效果卻較 catechin 差。此外，coumestrol 和 naringenin 在方法二下呈色原理不明，尤其是 naringenin 的黃色呈色明顯，據試驗中的觀察，方法二下 naringenin 的呈色於添加氫氧化鈉溶液後才發生，故推測與 pH 值的變化相關。

氯化鋁比色法的反省與建議：

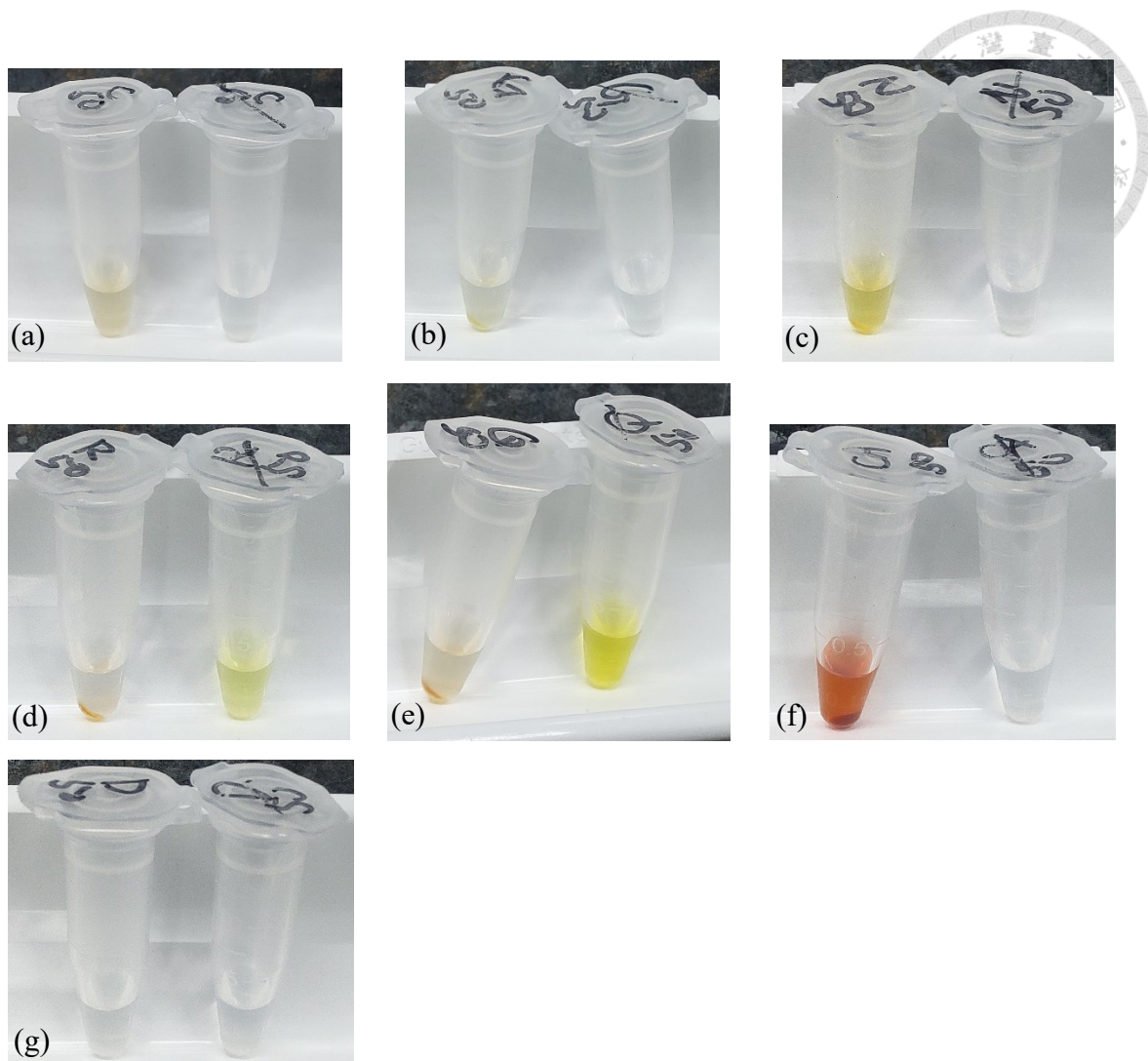
Christ and Müller (1960) 提出「氯化鋁比色法方法一」時，所針對的化合物僅是黃酮醇 (flavanol) (e.g. kaempferol 與 quercetin)，而並非其餘的黃酮類化合物。Barnum (1977) 發表加入亞硝酸鈉與金屬離子的比色方法，所針對的是 catechol、epinephrine、dopa、dopamine 等 aromatic vic-diols，甚至不是類黃酮，然而卻被延伸成氯化鋁比色法方法二。如今氯化鋁比色法被廣泛使用在測總類黃酮含量，但這個方法明顯沒有專一性，換言之，根本不準確。因此，本研究建議除非樣品中能與鋁螯合呈色的化合物已知為主要化合物，才能用氯化鋁比色法進行方便的測量，否則應以 HPLC 的方式挑選指標化合物進行測量，才能獲得有意義的結果。

如果仍欲使用比色法對黃酮類化合物進行定量，本研究推薦參考 Taniguchi et al. (2023) 建立的各種類黃酮吸收光譜資料庫。黃酮類化合物的吸收光譜通常包括兩個主要帶，即帶 I (300–380nm) 和帶 II (240–295nm)，前者產生黃色；在一些黃酮類中，吸收帶延伸至 400–450nm，該研究匯總 177 種黃酮類化合物和類似物的吸收光譜，包括各自的摩爾吸收系數，可在 <http://www.photochemcad.com> 查看。將來可依據所欲觀測黃酮類化合物的吸收區間直接測量，並不需要再加入金屬離子螯合改變呈色波長。



然而，由於黃酮類化合物本身就有螯合金屬離子的能力，樣品中的金屬離子也會影響吸光值測定。以三價鐵離子為例，Bijlsma et al. (2022) 曾發表探討富含鐵的食品中不良褪色現象的研究，該研究透過分光光度法和質譜技術，調查黃酮類化合物鐵介導複合物的形成、氧化以及由此引起的褪色過程。由此可推斷出，當不同金屬離子螯合於不同黃酮類化合物上時，會有各自的吸光特性，而土壤中的金屬離子確實能造成影響。因此，不同的土壤種類下，欲以吸光這一特性，作黃酮類化合物的定量與分析也可能面臨挑戰。另外，有研究指出酸性條件能稍微降低金屬離子在黃酮類化合物的螯合 (Chirug et al., 2021)，故 pH 值也是調整金屬離子在黃酮類化合物上螯合的重要因子，如果不加入金屬離子螯合改變呈色波長，則要選擇低 pH 值以降低影響。

對於無法事先了解樣品中的黃酮類化合物種類，又想要進行快速的比色法分析的研究者，我個人建議採用福林酚試劑測量總酚含量即可。雖然該試劑不僅測量酚類，還會與其他還原物質發生反應，故實際測量的是樣品的總還原能力。但即使如此，福林酚試劑能與大多數黃酮類化合物反應，勝過僅能與特定黃酮類化合物反應的氯化鋁比色法。



(50 mg/L)

圖 4.1、不同黃酮類化合物在氯化鋁比色法下的顏色 (離心後)

各圖中右管為方法一，左管為方法二

(a) Coumestrol、(b) Genistein、(c) Naringenin、(d) Rutin、(e) Quercetin、(f) Catechin 及 (g) Daidzein

Figure 4.1. Color of different flavonoid compounds under the aluminum chloride colorimetric method

In each figure, the tube on the right represents Method 1, while the tube on the left represents Method 2.

(a) Coumestrol, (b) Genistein, (c) Naringenin, (d) Rutin, (e) Quercetin, (f) Catechin, and (g) Daidzein.

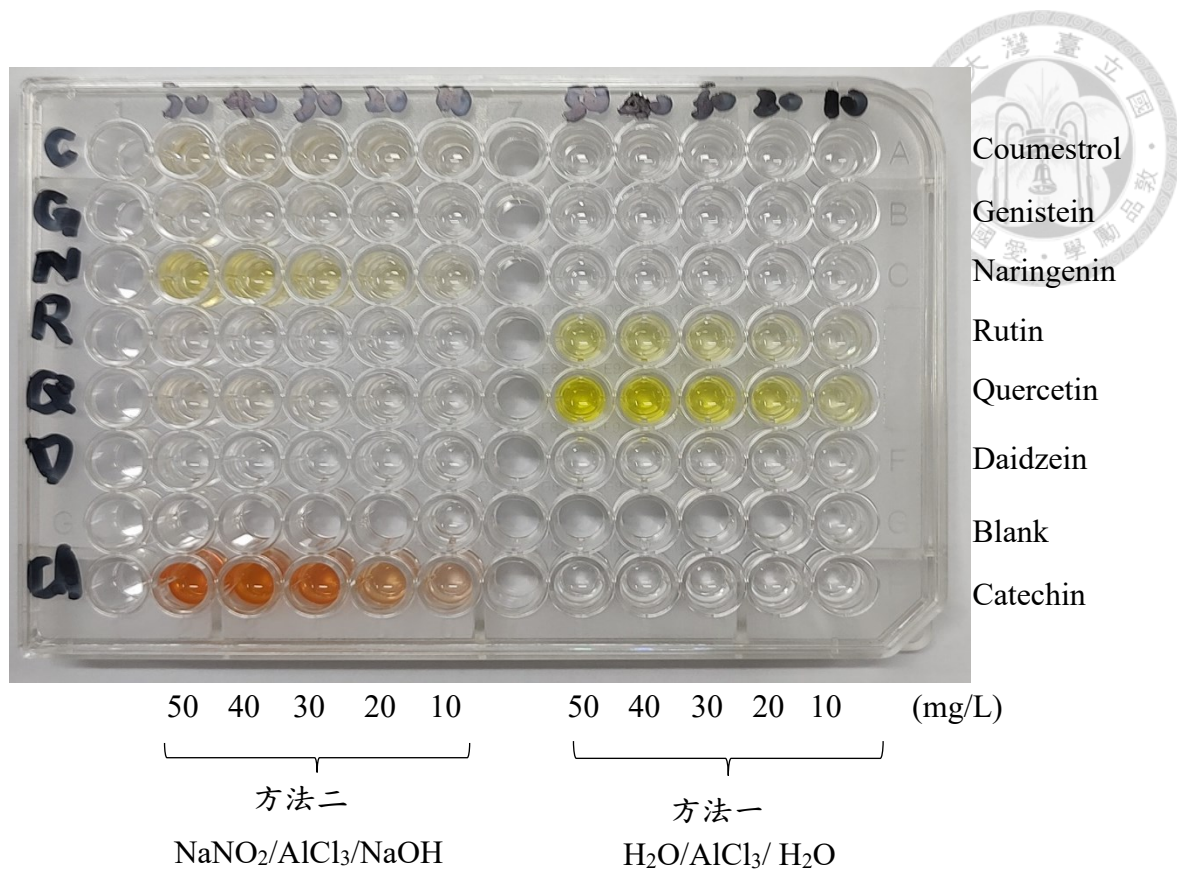
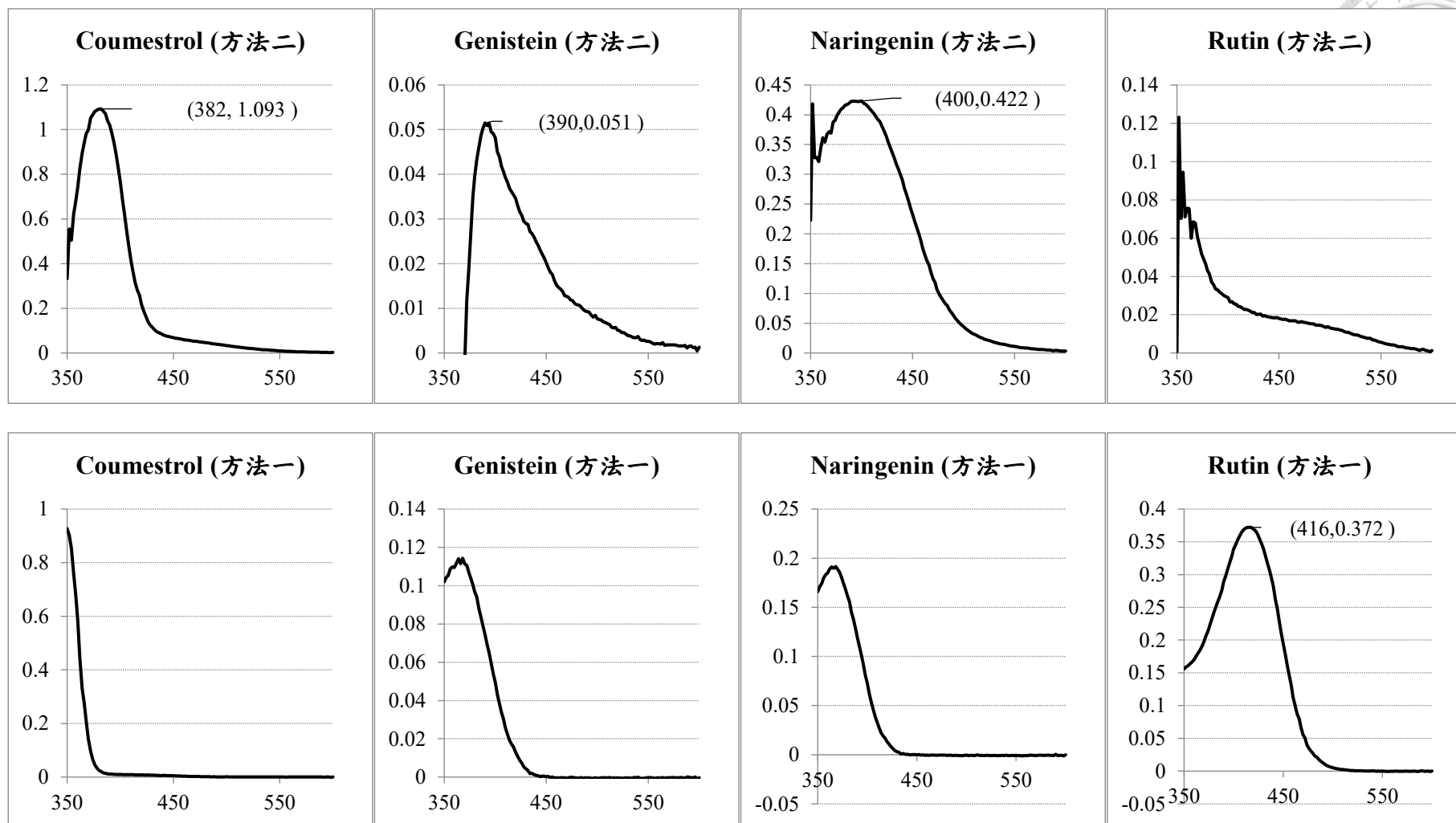


圖 4.2、不同濃度的黃酮類化合物在氯化鋁比色法下的顏色

Figure 4.2. Colors of different concentrations of flavonoid compounds under the aluminum chloride colorimetric method



橫軸為吸光波長，縱軸數值為樣品吸光值減去空白吸光值

(圖接續下頁)

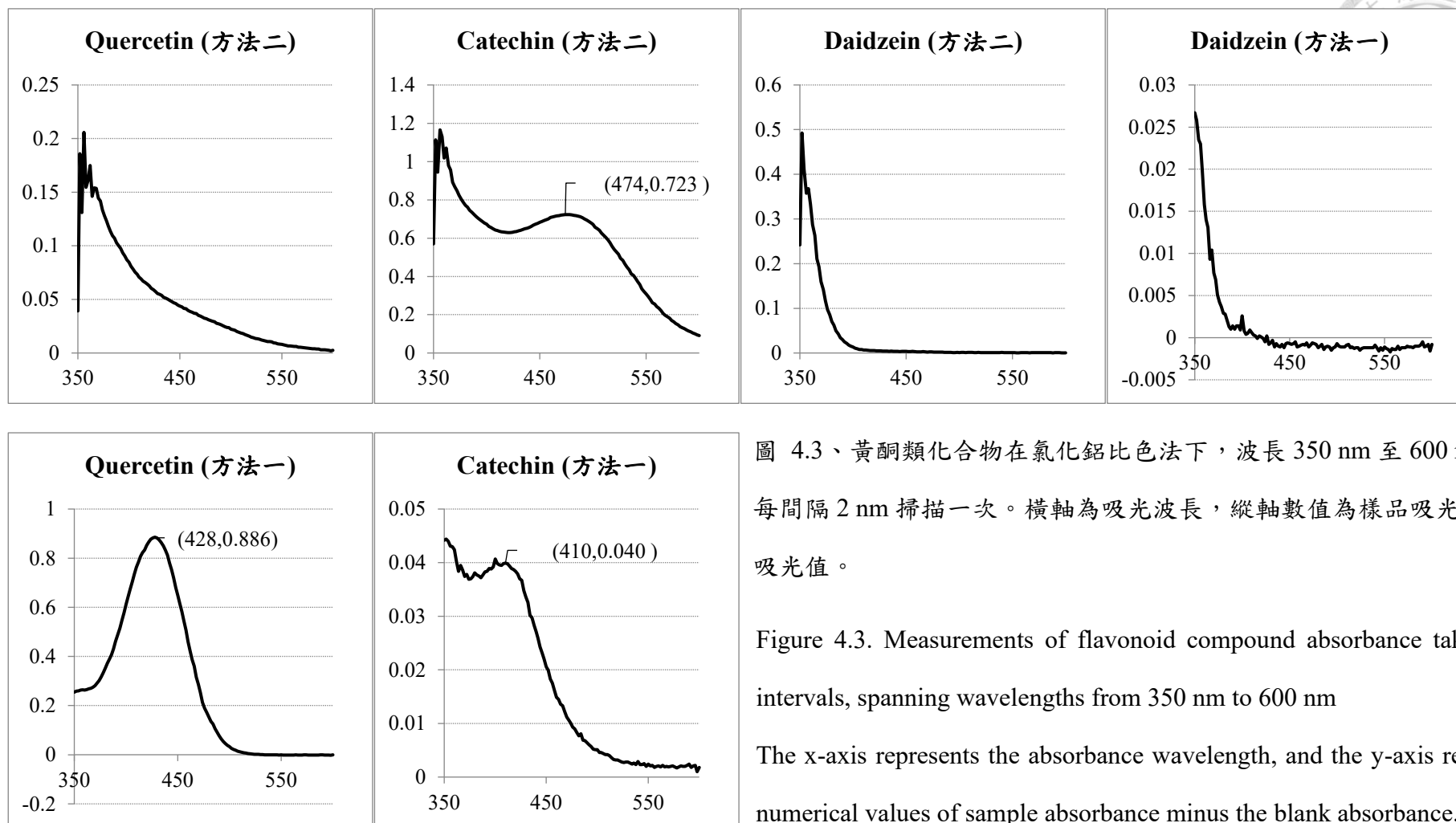
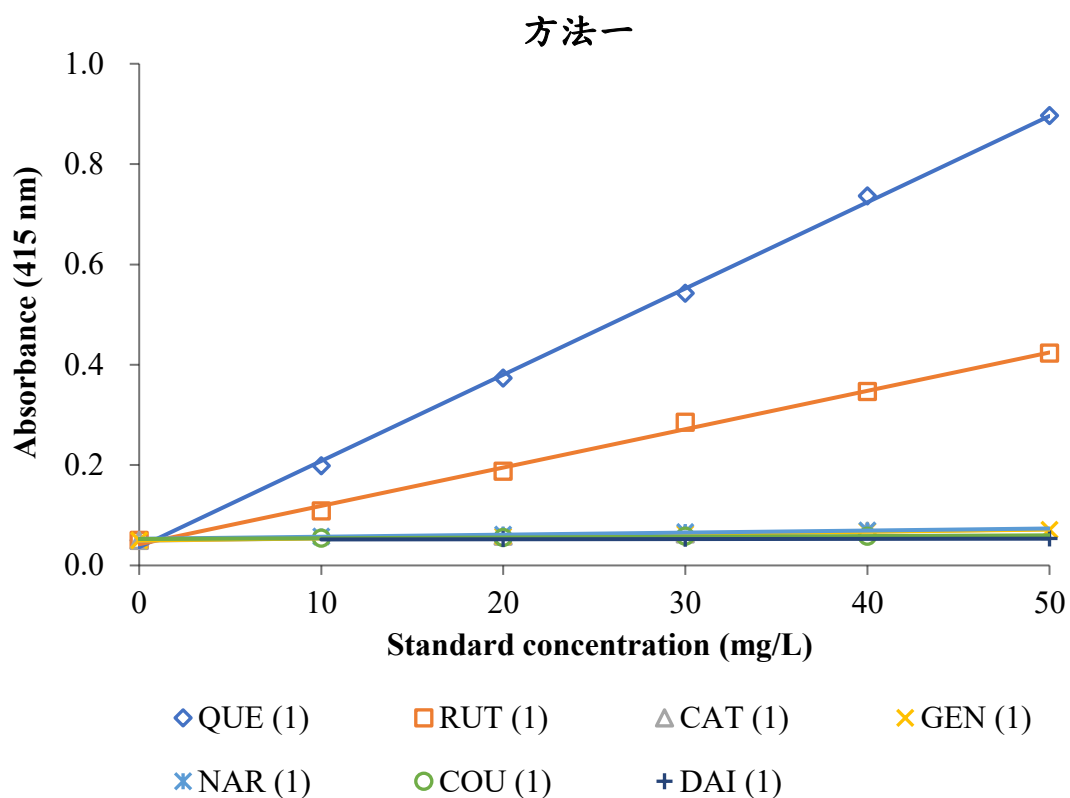


圖 4.3、黃酮類化合物在氯化鋁比色法下，波長 350 nm 至 600 nm 的吸光值每間隔 2 nm 掃描一次。橫軸為吸光波長，縱軸數值為樣品吸光值減去空白吸光值。

Figure 4.3. Measurements of flavonoid compound absorbance taken at 2 nm intervals, spanning wavelengths from 350 nm to 600 nm

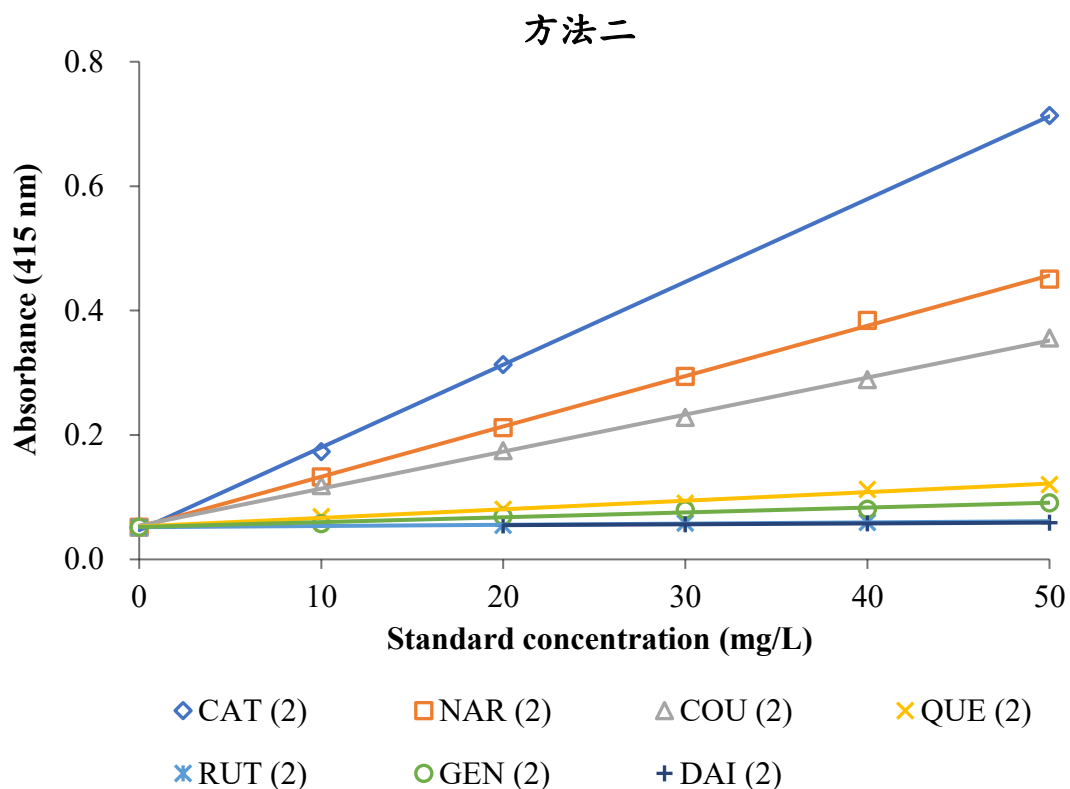
The x-axis represents the absorbance wavelength, and the y-axis represents the numerical values of sample absorbance minus the blank absorbance.



Quercetin	$y = 0.017191 x + 0.03628$	$R^2 = 0.9989$
Rutin	$y = 0.007646 x + 0.04218$	$R^2 = 0.9961$
Catechin	$y = 0.000457 x + 0.04931$	$R^2 = 0.9913$
Genistein	$y = 0.000434 x + 0.04975$	$R^2 = 0.9957$
Naringenin	$y = 0.000411 x + 0.05310$	$R^2 = 0.9922$
Coumestrol	$y = 0.000147 x + 0.05265$	$R^2 = 0.9229$
Daidzein	$y = 0.000039 x + 0.05136$	$R^2 = 0.9912$

圖 4.4、氯化鋁比色法方法一：波長 415 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的關係

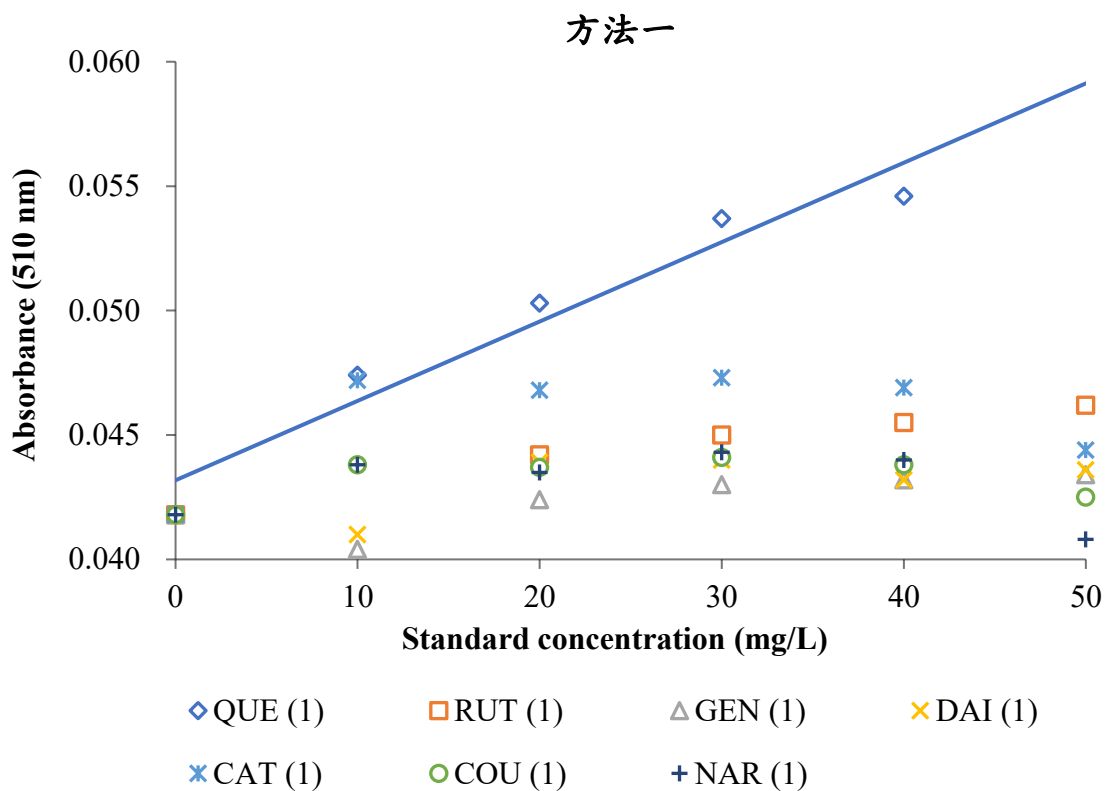
Figure 4.4. Aluminum chloride colorimetric method, Method 1: Relationship between absorbance values and concentrations of flavonoid compounds detecting at a wavelength of 415 nm



Catechin	$y = 0.013310 x + 0.04690$	$R^2 = 0.9997$
Naringenin	$y = 0.008090 x + 0.05199$	$R^2 = 0.9990$
Coumestrol	$y = 0.005948 x + 0.05434$	$R^2 = 0.9987$
Quercetin	$y = 0.001381 x + 0.05292$	$R^2 = 0.9872$
Genistein	$y = 0.000781 x + 0.05207$	$R^2 = 0.9702$
Rutin	$y = 0.000193 x + 0.05175$	$R^2 = 0.9516$
Daidzein	$y = 0.000138 x + 0.05227$	$R^2 = 0.9981$

圖 4.5、氯化鋁比色法方法二：波長 415 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的關係

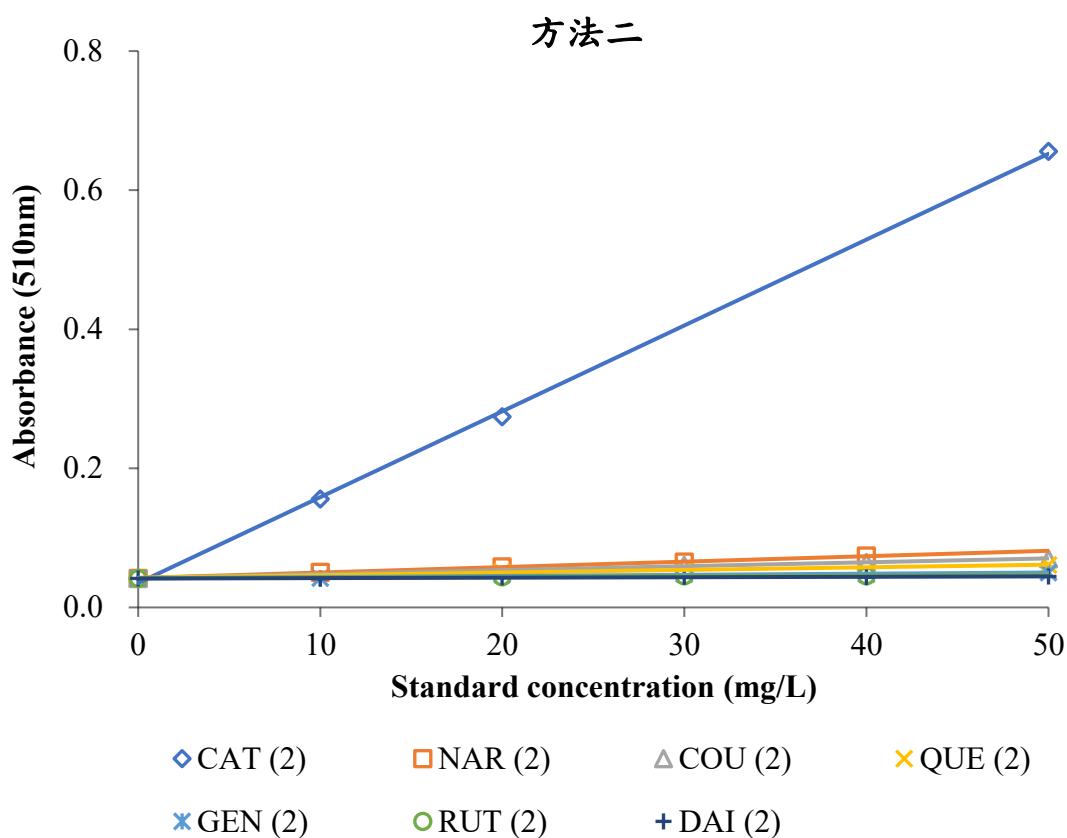
Figure 4.5. Aluminum chloride colorimetric method, Method 2: Relationship between absorbance values and concentrations of flavonoid compounds detecting at a wavelength of 415 nm



Quercetin	$y = 0.000319 x + 0.04318$	$R^2 = 0.9425$
Rutin	$y = 0.000087 x + 0.04211$	$R^2 = 0.9676$
Genistein	$y = 0.000049 x + 0.04115$	$R^2 = 0.6498$
Daidzein	$y = 0.000045 x + 0.04179$	$R^2 = 0.3313$
Catechin	$y = 0.000036 x + 0.04483$	$R^2 = 0.0931$
Coumestrol	$y = 0.000011 x + 0.04301$	$R^2 = 0.0519$
Naringenin	$y = -0.000010 x + 0.04329$	$R^2 = 0.0188$

圖 4.6、氯化鋁比色法方法一：波長 510 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的關係

Figure 4.6. Aluminum chloride colorimetric method, Method 1: Relationship between absorbance values and concentrations of flavonoid compounds detecting at a wavelength of 510 nm



Catechin	$y = 0.012345 x + 0.03510$	$R^2 = 0.9994$
Naringenin	$y = 0.000783 x + 0.04234$	$R^2 = 0.9985$
Coumestrol	$y = 0.000561 x + 0.04243$	$R^2 = 0.9936$
Quercetin	$y = 0.000379 x + 0.04255$	$R^2 = 0.9913$
Genistein	$y = 0.000165 x + 0.04193$	$R^2 = 0.8971$
Rutin	$y = 0.000098 x + 0.04200$	$R^2 = 0.9703$
Daidzein	$y = 0.000062 x + 0.04153$	$R^2 = 0.8097$

圖 4.7、氯化鋁比色法方法二：波長 510 nm 下，吸光值與黃酮類化合物濃度的關係

Figure 4.7. Aluminum chloride colorimetric method, Method 2: Relationship between absorbance values and concentrations of flavonoid compounds detecting at a wavelength of 510 nm

4.2 鹼水解對萃取物黃酮類化合物濃度的影響

表 4.1 顯示，有無經過鹼水解萃取處理下，綠豆三吋盆介質萃取物之總類黃酮、總酚、isoliquiritigenin、coumestrol、genistein 與 naringenin 的平均含量。

鹼水解萃取樣品的總類黃酮及總酚含量分別增加 23%及 71%。然而，個別黃酮類化合物在鹼水解後變化較小，其中 isoliquiritigenin 和 coumestrol 含量分別增加 16%和 4.6%，但 genistein 與 naringenin 含量卻分別減少 3%與 10%。萃取物中含量較多的 coumestrol 和 genistein，雖然分別呈現增加及減少，但相關係數達 0.945 及 0.974，足以見得鹼水解下不同黃酮類化合物的萃取效果存在顯著差異。

鹼水解的目的是增加游離黃酮類化合物的萃取，從而增加 HPLC-DAD 所測得的量。結果顯示，雖然總類黃酮含量有增加，但是個別黃酮類化合物則呈現分歧，尤其 genistein 與 naringenin 並沒有如預期般經鹼水解處理後增加。後續在章節 4.7 中，將以 LC-MS/MS 的分析結果，初步瞭解各類黃酮苷元和糖苷的相對含量變化，以及導致總黃酮類含量變化的化合物種類。

附錄六展示有無鹼水解步驟下，黃酮類標準品糖苷添加進含養液栽培介質(蛭石珍珠石混合物)後的萃取回收率。結果顯示，daidzein 和 isoliquiritigenin 在無鹼水解下回收率較差，其餘的黃酮類標準品則有 70%以上的回收率。然而，該結果僅反映栽培介質中游離形式的苷元在本研究萃取方法的回收率，不能代表根際分泌物樣品內多種糖苷及苷元的綜合效果。

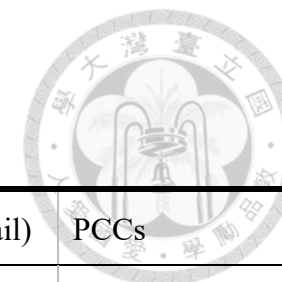


表 4.1、鹼水解前後黃酮類化合物含量之成對樣本 *t* 檢定

Table 4.1. Paired samples *t* test of flavonoid content with and without alkaline hydrolysis

Comparisons	Mean (mg per 3-inch pot)	Difference	<i>t</i> value	df	<i>P</i> value (one-tail)	PCCs
TFN _{UN} vs. TFN _{UAL}	58.60 vs. 72.07	+13.47 (23%)	-2.319	54	0.0121	0.777
TPG _{UN} vs. TPG _{UAL}	56.65 vs. 96.79	+40.14 (71%)	-8.937	54	1.56×10^{-12}	0.822
Iliq _{UN} vs. Iliq _{UAL}	0.03568 vs. 0.04128	+0.00556 (16%)	-4.800	53	6.68×10^{-6}	0.843
Cou _{UN} vs. Cou _{UAL}	4.326 vs. 4.526	+0.199 (4.6%)	-2.216	53	0.0155	0.945
Gen _{UN} vs. Gen _{UAL}	1.256 vs. 1.218	-0.038 (-3%)	1.661	53	0.0512	0.974
Nar _{UN} vs. Nar _{UAL}	0.2030 vs. 0.1819	-0.0211 (-10%)	2.835	52	0.00325	0.909

TFN: total flavonoid content (naringenin as chemical equivalent); TPG: total phenolic content (gallic acid as chemical equivalent); Iliq: isoliquiritigenin; Cou: coumestrol; Gen: genistein; Nar: naringenin; UN: without hydrolysis; UAL: with alkaline hydrolysis; PCCs: Pearson's correlation coefficient.



4.3 綠豆接種不同根瘤菌效果——小型 pillow system 預試驗

外觀描述：在接種後第二十天，*B. arachidis* 具最強的生長趨勢，*B. japonicum* 及 *E. fredii* 次之，*B. elkanii* 生長趨勢較弱且葉色黃 (圖 4.8)。

植體重量：於接種後第 40 天採收，*B. elkanii* 有較低的地上部和地下部重量，*E. fredii* 較其餘三者有較高的地下部重量 (圖 4.9)。

根瘤效果：在甲苯胺藍染劑染色下可以觀察到四種根瘤菌都有感染區，證明根瘤菌有確實感染 (圖 4.10 及圖 4.11)，且沒有觀察到假性根瘤。*B. arachidis*、*B. japonicum* 及 *E. fredii* 比 *B. elkanii* 具有較多的根瘤數，但是單株根瘤鮮重四者並無差異，因為 *B. elkanii* 根瘤較大。*B. elkanii* 具有顯著較高的根瘤豆血紅素含量，且超過一般豆科植物之平均值 [1-3 mg/g fresh nodule (Senthilkumar et al., 2021)]。接種的每株植物根瘤黃酮類化合物總量則是 *B. arachis* 最高，*B. elkanii* 最低，*B. japonicum* 及 *E. fredii* 約相等。

植體總類黃酮濃度：*B. arachidis* 及 *E. fredii* 具有各組中較高的總類黃酮濃度，而 *B. elkanii* 則最低 (圖 4.12)。

B. arachidis、*B. japonicum*、*B. elkanii* 及 *E. fredii* 四菌株經比較後，由於接種 *B. arachidis* 的綠豆有較多的根瘤及最好的生長勢，而且是最早從透明塑膠盒外觀察到根瘤，故選定其作為第二階段綠豆決明試驗的選定菌株。後續三吋盆的綠豆試驗會以較高的重複數進行 *B. diazoefficiens*、*B. arachidis*、*B. japonicum*、*B. elkanii* 及 *E. fredii* 五菌株接種綠豆的試驗。

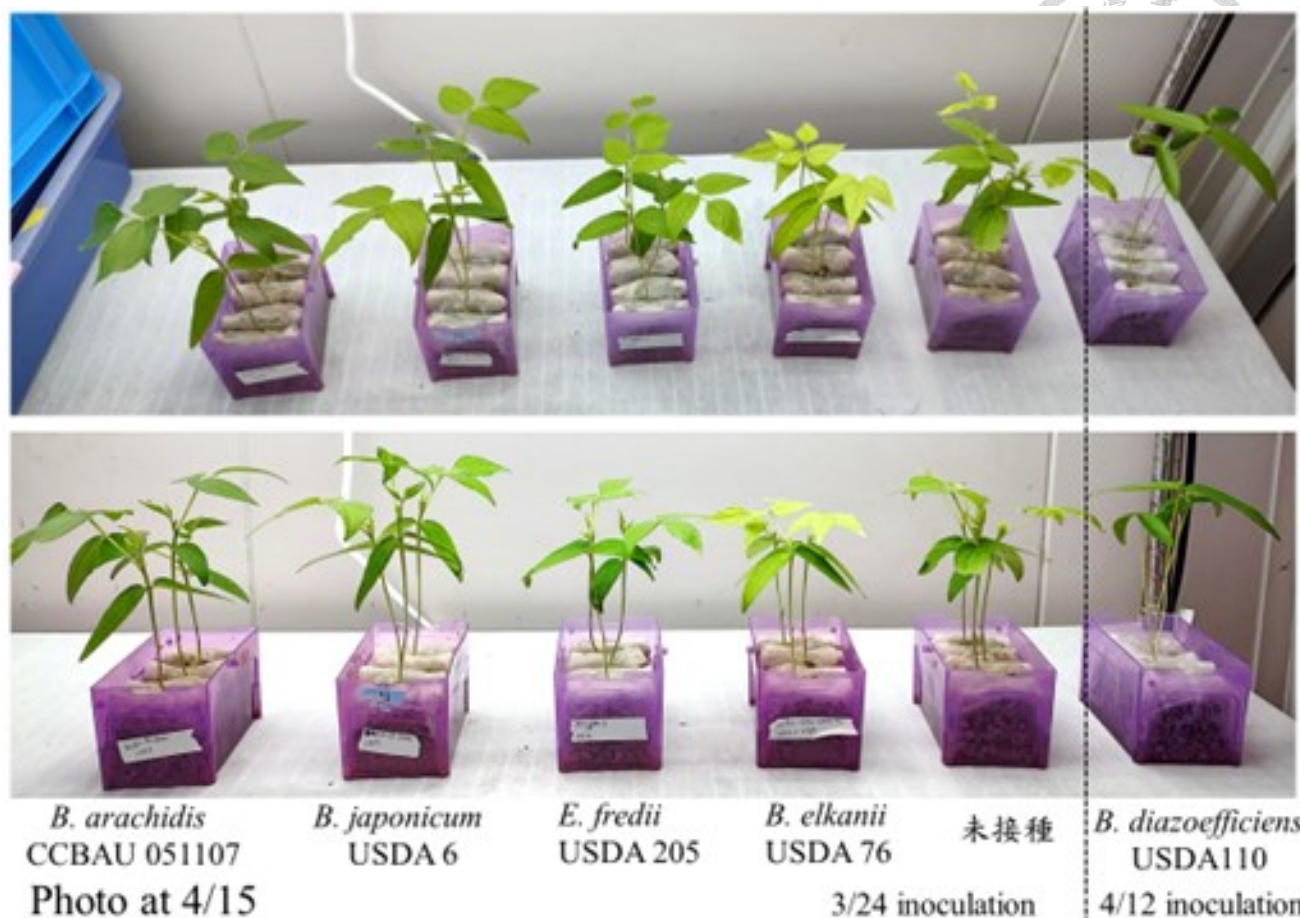


圖 4.8、不同根瘤菌接種預試驗之綠豆生長情形

Figure 4.8. Growth of mung beans in the preliminary inoculation experiment with various rhizobia strains.

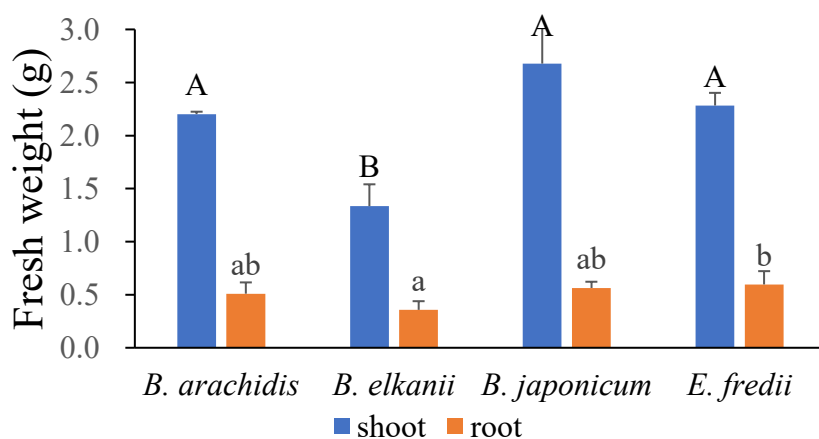


圖 4.9、接種根瘤菌後綠豆地上部及地下部鮮重 (不同根瘤菌的接種預試驗)

Figure 4.9. Effects of different rhizobia inoculation on the fresh weight of mung bean's shoot and root.

Error bars represent standard deviation ($n = 3$) and bars with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, LSD test).

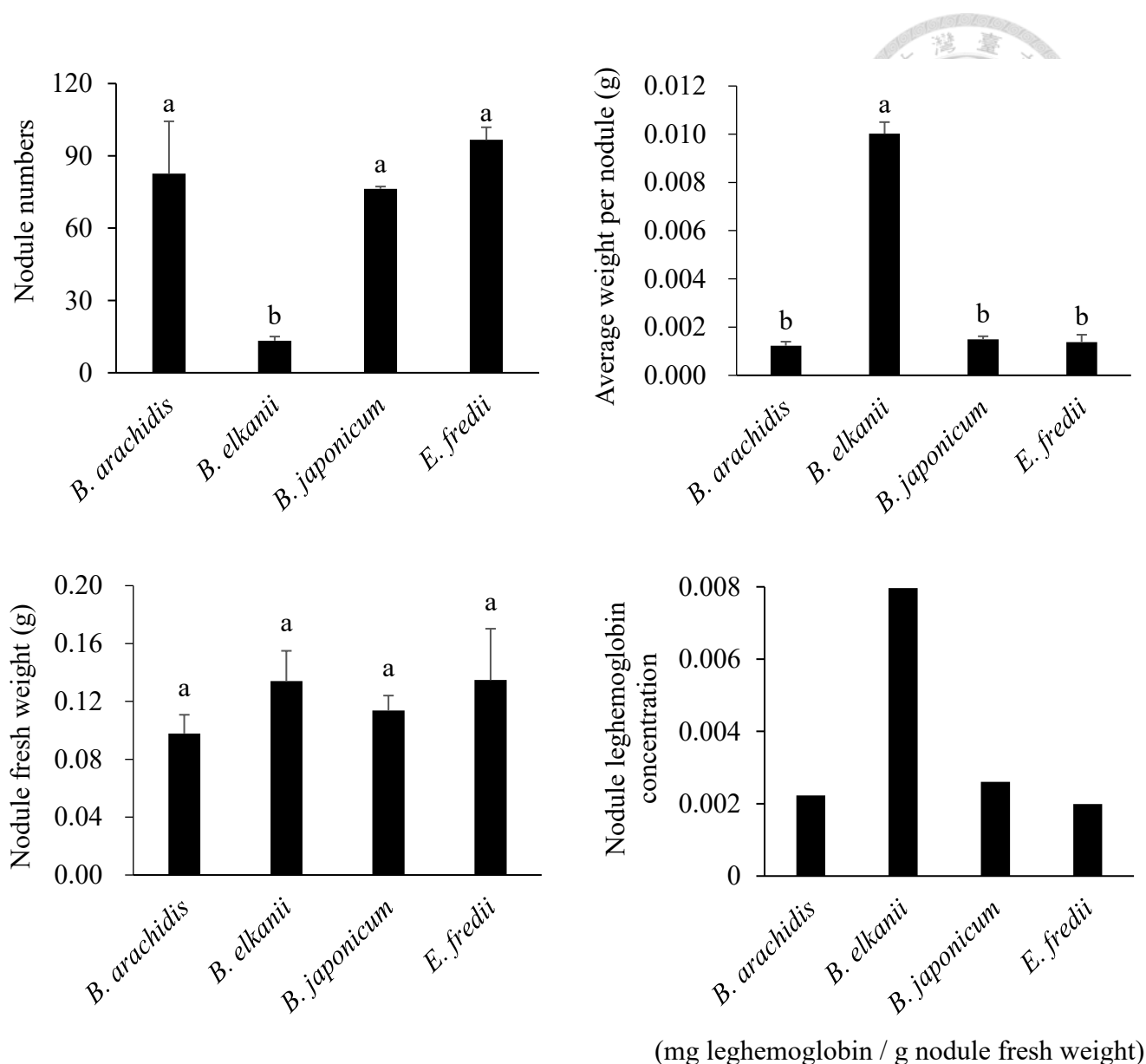


圖 4.10、不同根瘤菌接種對綠豆根瘤數目、單粒根瘤均重、單株綠豆根瘤重及根瘤內豆血紅素含量的影響 (不同根瘤菌的接種預試驗)

Figure 4.10. Effects of different rhizobia strain inoculation on the nodule numbers, average weight per nodule, nodule weight and the nodule leghemoglobin content of mung bean. Error bars represent standard deviation (n = 3) and bars with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, LSD test).

在此小型 pillow system 預試驗中，根瘤豆血紅素為混合萃取，n = 1。

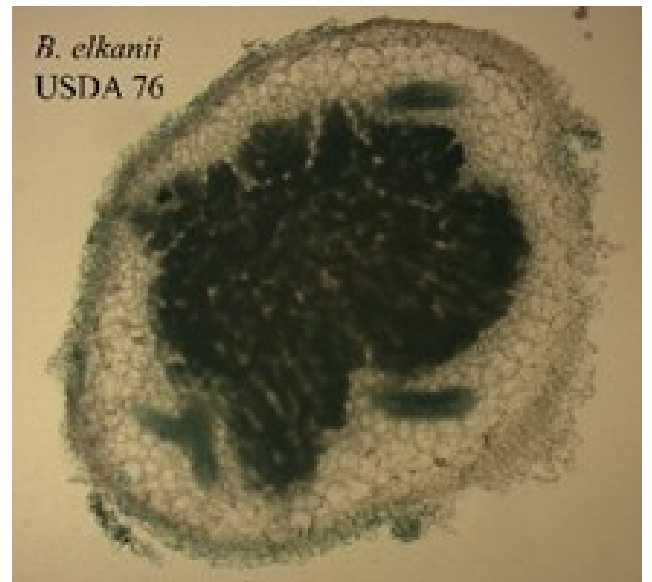
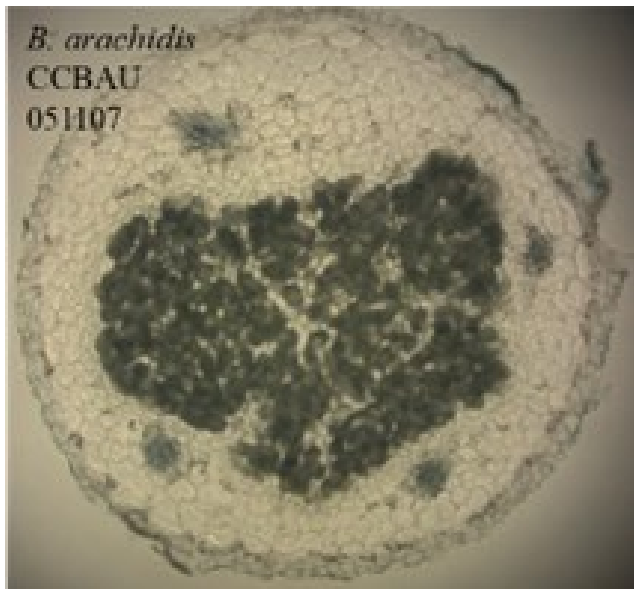


圖 4.11、TBO (toluidine blue O) 染色的根瘤感染區

Figure 4.11. The rhizobial infection zone stained with Toluidine Blue O (TBO).

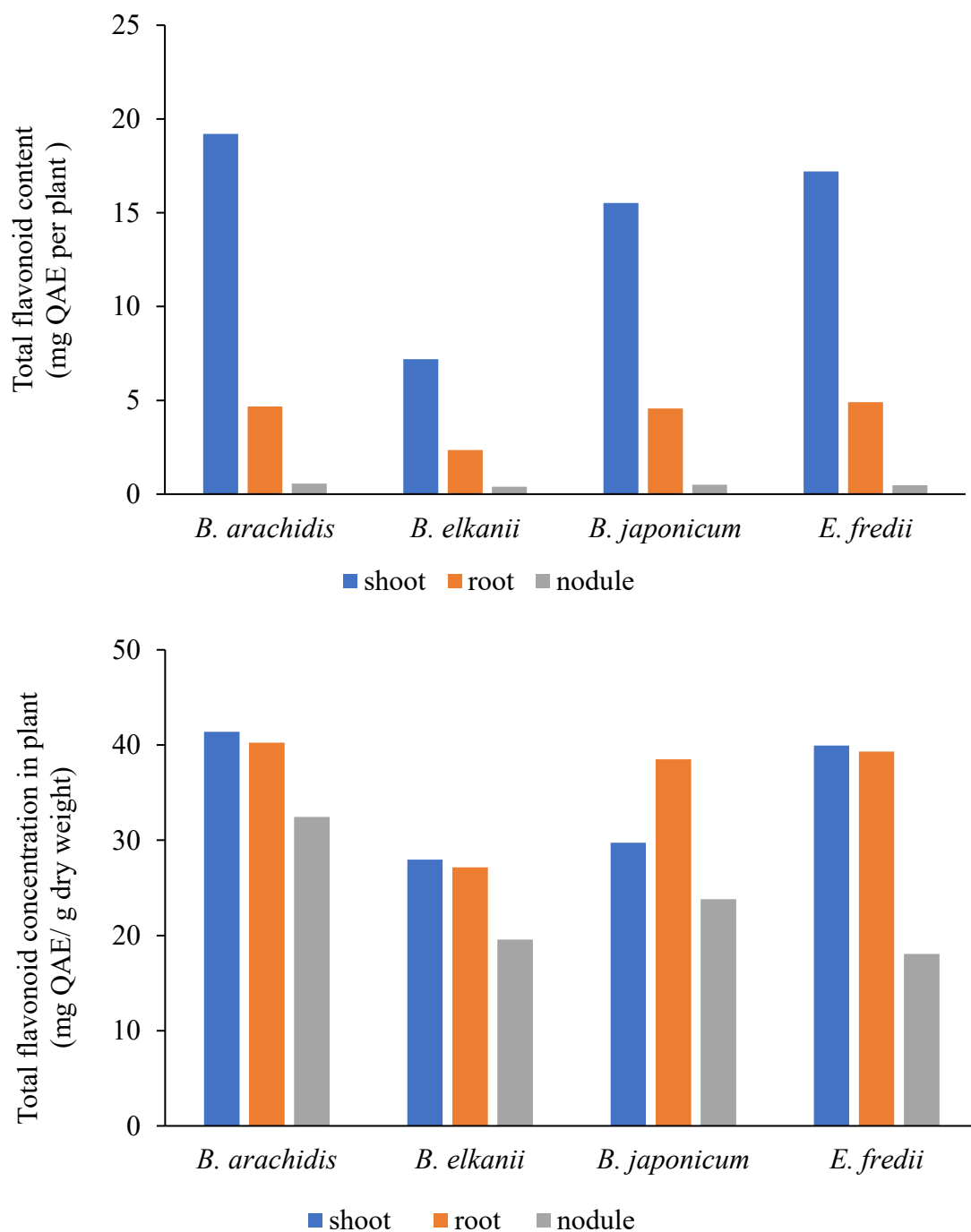


圖 4.12、不同根瘤菌接種對綠豆植株總類黃酮含量的影響 (不同根瘤菌的接種預試驗)

Figure 4.12. Effects of different rhizobia inoculations on total flavonoid content in mung bean plants

The total flavonoid content was determined by the aluminum chloride assay Method 2.

Total flavonoid content expressed as ng QAE; QAE: quercetin equivalents.

在此小型 pillow system 預試驗中，黃酮類化合物濃度及總量測定採用植體三重複的混合萃取， $n = 1$ 。

4.4 決明與綠豆之相互作用及其根際黃酮類化合物分析——綠豆與決明之 pillow system 試驗

分別以高氮和低氮處理的綠豆組、決明組以及間種組，在接種 *B. arachidis* 後 21 天的生長情形如圖 4.13 所示。於接種後第 45 至 50 天收成，其植株鮮重、根瘤數目以及根瘤總重呈現於表 4.2，而其栽培介質萃取物的黃酮類化合物分析結果顯示於表 4.3。

結果顯示於高氮處理下，間種組中的決明與單種決明組相比，決明生長受到綠豆的壓制，普遍矮小。但低氮處理下，間種組中的決明與單種決明組則無明顯生長差異，此說明綠豆與決明的間種，並不會因為綠豆的固氮作用而助益於決明生長。在間種組的綠豆可能因獲得更多的生長空間，或者是受決明根際分泌物的影響，單株其根瘤數目明顯較單種綠豆組更多。至於未加菌組也產生根瘤的原因，可能為種子攜帶有根瘤菌且未能被稀釋漂白水成功殺滅 (Pérez-Ramírez et al., 1998)，亦或是藉由飛蟲或空氣於盆間傳播 (Chialva et al., 2022)，不過由於其初期體量較添加菌少，故根瘤數會比較少。

黃酮類化合物分析結果顯示，盆內種植綠豆時可以檢測到 isoliquiritigenin、coumestrol、genistein 和 daidzein，而盆內有決明時可以檢測到 apigenin。然而，於 pillow system 介質萃取物中則未能檢測到 quercetin、naringenin 和 liquiritigenin。

如果將綠豆低氮加菌與混種低氮加菌相比，發現前者盆內綠豆株數為後者的兩倍，isoliquiritigenin 和 coumestrol 分別約為 2 倍和 1.6 倍，似乎與綠豆株數正相關。然而，genistein 和 daidzein 並未呈現此特點，daidzein 含量在綠豆低氮加菌組與混種低氮加菌組間相近，genistein 甚至是間種組較單種組高 1.4 倍。結合根瘤數目的結果判斷，此兩化合物與根瘤的相關性更大。

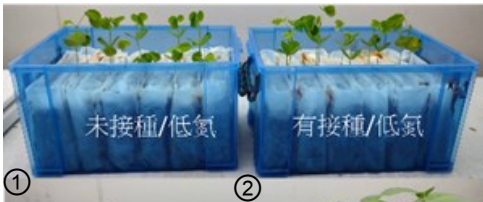
	Low N		High N	
	Without inoculation	Inoculation	Without inoculation	Inoculation
<i>Senna tora</i> only				
Mung bean only				
<i>Senna tora</i> & Mung bean				

圖 4.13、接種 *B. arachidis* 後第 21 天，綠豆及決明於 pillow system 的生長情形

Figure 4.13. Growth conditions of mung beans and *Senna tora* in the pillow system at 21 days post *B. arachidis* inoculation

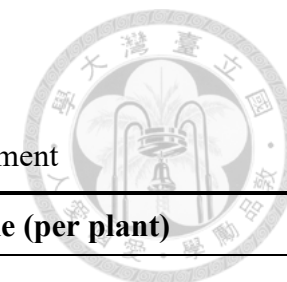


表 4.2、植物鮮重、根瘤數目及根瘤重量 (綠豆及決明 pillow system 試驗)

Table 4.2 Plant fresh weight, nodule number and nodule weight in the mung bean and *Senna tora* under pillow system experiment

	<i>S. tora</i> fresh weight (g)		Mung bean fresh weight (g)		Nodule (per plant)	
	Shoot	Root	Shoot	Root (exclude nodule)	Nodule number	Nodule weight
① 決明低氮無菌	0.1733 ± 0.0919	0.0566 ± 0.0410			-	-
② 決明低氮加菌	0.2462 ± 0.0939	0.0681 ± 0.0510			-	-
③ 決明高氮無菌	3.3239 ± 3.7149	0.6132 ± 1.0094			-	-
④ 決明高氮加菌	2.7749 ± 2.7314	0.5975 ± 0.8526			-	-
⑤ 綠豆低氮無菌			6.17 ± 2.39	0.81 ± 0.41	23.0 ± 11.1	0.1396 ± 0.0976
⑥ 綠豆低氮加菌			7.03 ± 1.88	0.84 ± 0.22	46.1 ± 10.9	0.3266 ± 0.3405
⑦ 綠豆高氮無菌			4.94 ± 1.90	1.17 ± 0.63	12.3 ± 5.1	0.0383 ± 0.0218
⑧ 綠豆高氮加菌			4.09 ± 1.65	1.21 ± 0.53	7.1 ± 4.3	0.0182 ± 0.0095
⑨ 混種低氮無菌	0.1761 ± 0.0977	0.0552 ± 0.0170	4.30 ± 1.80	0.69 ± 0.32	22.1 ± 7.3	0.1794 ± 0.0962
⑩ 混種低氮加菌	0.2342 ± 0.1403	0.0459 ± 0.0214	10.14 ± 5.15	1.35 ± 0.76	94.5 ± 35.8	0.4121 ± 0.1656
⑪ 混種高氮無菌	0.2917 ± 0.1495	0.1048 ± 0.0590	6.98 ± 3.55	2.45 ± 1.00	9.6 ± 7.6	0.0340 ± 0.0304
⑫ 混種高氮加菌	0.5252 ± 0.3453	0.0765 ± 0.0374	7.28 ± 1.36	2.08 ± 0.75	11.2 ± 5.6	0.0302 ± 0.0207

Values are expressed as means ± standard deviation. N = 10 for monocropped plant; N = 5 for intercropped plant. "-" means that *S.tora* did not have any nodule.



表 4.3、綠豆和決明 pillow system 生長介質中黃酮類化合物的濃度

Table 4.3. Concentration of flavonoid compounds in the growing medium of the mung bean and *Senna tora* pillow system

	TPG	TFN	370 nm Iliq	370 nm Que	342.5 nm Cou	336 nm Api	300 nm Gen	287 nm Nar	275 nm Dai	275 nm Liq
① 決明低氮無菌	1388	445	0.159	N.D.	18.99	5.613	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
② 決明低氮加菌	1019	862	0.280	N.D.	15.44	5.991	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
③ 決明高氮無菌	2868	5550	0.215	N.D.	16.01	16.18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
④ 決明高氮加菌	2479	5237	0.093	N.D.	22.24	20.72	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
⑤ 綠豆低氮無菌	3356	3230	7.582	N.D.	1214	N.D.	63.85	N.D.	7.812	N.D.
⑥ 綠豆低氮加菌	5070	5077	21.36	N.D.	4097	N.D.	105.9	N.D.	18.78	N.D.
⑦ 綠豆高氮無菌	2773	2716	3.207	N.D.	978.7	N.D.	67.46	N.D.	3.845	N.D.
⑧ 綠豆高氮加菌	2783	3556	5.020	N.D.	1895	N.D.	78.07	N.D.	5.658	N.D.
⑨ 混種低氮無菌	1801	1542	11.88	N.D.	239.3	-	14.71	N.D.	1.305	N.D.
⑩ 混種低氮加菌	3127	2723	10.63	N.D.	2517	-	149.3	N.D.	17.42	N.D.
⑪ 混種高氮無菌	4322	6209	8.638	N.D.	2433	1.987	151.8	N.D.	16.40	N.D.
⑫ 混種高氮加菌	2310	2355	3.665	N.D.	604.1	3.973	38.21	N.D.	3.607	N.D.
“每克介質”	ng GAE	ng NE	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng

ng: nanogram; N.D.: not detected; Iliq: isoliquiritigenin; Que: quercetin; Cou: coumestrol ; Api: apigenin; Gen: genistein; Nar: naringenin; Dai: daidzein; Liq: liquiritigenin; TPG: total phenolic content expressed as ng GAE; GAE: gallic acid equivalents; TFN: total flavonoid content expressed as ng NE; NE: naringenin equivalents; "-": trace amount.



4.5 綠豆根瘤與根際黃酮類化合物的分泌——綠豆接種不同根瘤菌之三吋盆試驗

圖 4.14 為綠豆接種不同根瘤菌處理，收成時的根部特寫照片。表 4.4 呈現綠豆 SPAD 讀數、根瘤數、根瘤總重及單個根瘤均重。依據根瘤大小可以分為兩個等級，其中，*B. arachidis* 和 *B. japonicum* 屬於小而多的根瘤，*B. diazoefficiens* 和 *B. elkanii* 屬於大而少的根瘤。雖然於 pillow system 預試驗中，*E. fredii* 的根瘤形成情況十分明顯，但在綠豆三吋盆接種試驗中，僅 20% 的盆栽成功形成根瘤，顯示此菌株對於臺南五號綠豆的根瘤形成成功率相對較低。

圖 4.15、圖 4.16、圖 4.17、圖 4.18 及圖 4.19 分別展示介質萃取物中的總酚、isoliquiritigenin、coumestrol、genistein 和 naringenin 含量，具體數值呈現於表 4.5。雖然在 HPLC 圖譜上可以觀察到 daidzein、kaempferol 及 apigenin 的訊號但是很小，而 liquiritigenin、myricetin 及 quercetin 則沒有測到。

Genistein 與 coumestrol 含量多寡在各組別間關係接近，「根瘤小而多的組別」其 genistein 分泌量較「根瘤大而少的組別」多。總酚含量在高氮組別顯著高於低氮組別，然而 naringenin 的濃度卻隨著氮濃度增加而減少，足以見得 naringenin 可能是綠豆調控氮營養下根瘤形成的決定因素。

Genistein 在多數研究中曾被報導其有誘導 nod gene 的活性，但即使是近緣的根瘤菌，同一黃酮類化合物對其 nod 基因的誘導活性也不盡相同 (Yokoyama, 2008)。前人研究指出 prunetin (genistein 7 號位從 hydroxyl group 取代為 methoxy group) 為 *Bradyrhizobium* 中相對強的選擇 Nod 基因誘導劑，而其不會誘導 *B. elkanii* USDA 31 及 USDA76 的 NodD (Yokoyama, 2008)，本研究雖未監測 prunetin，但有於綠豆中測到大量的前驅物 genistein；甚至有研究透過 QTL 分析，指出 genistein 可能是 *B. elkanii* USDA 94 的 nod 基因抑制物 (Ramongolalaina et al., 2018)。基於上述原因推測，*B. elkanii* 能使綠豆產生大而少的根瘤，可能與綠豆的 genistein 分泌有關。然而，令人訝異的是近緣關係的 *B. diazoefficiens* USDA 110 與 *B. japonicum* USDA 6，在 genistein 分泌量與根瘤數目上皆有顯著差異，過去文獻中 *B. japonicum* 的代

表菌株常為 USDA 110 而非 USDA 6，而本試驗的結果則揭示以 USDA 110 做的實驗成果不能夠類推到所有的 *B. japonicum* 菌株。

Coumestrol 作為一種植物抗生素。當植物受到昆蟲攻擊時，coumestrol 的量會增加，其在大豆葉片成熟或衰老過程中積累 (Mun et al., 2021)，有強大的 α -glucosidase 活性抑制能力 (Yuk et al., 2011)。在 Lee et al. (2012) 的研究中，大豆接種預處理 coumestrol 的 *B. diazoefficiens*，會增加根瘤數量。研究也指出 coumestrol 參與豆科植物-叢枝菌根菌-根瘤菌的三方共生 (Dong & Song, 2020)。在超累積 coumestrol 的蒺藜狀苜蓿突變體中，叢枝菌根菌共生體定殖特別強烈 (Morandi et al., 2009)。在本研究中可觀察到綠豆分泌 coumestrol，結瘤過程中植物生產大量的抗毒素，這發現符合前人研究結果，表明除了誘導 nod 基因的黃酮類化合物之外，結瘤過程中抗菌和抗真菌活性的植物抗毒素黃酮類化合物也會增加，這些化合物是在成功結瘤的過程中產生，而不是防禦根瘤菌的反應，且不一定具有 nod 基因誘導活性。因此有研究者提出，分泌這些植物抗毒素是宿主植物操縱根圈菌相以促進兼容的微生物的手段，例如在 *Rhizobium etli* 中鑑定出的抗性蛋白基因，賦予 *R. etli* 對黃酮類化合物 coumarate、naringenin、phaseollin 和 phaseollidin 的耐性，若失去這些基因將導致菜豆的結瘤減少 (González-Pasayo & Martínez-Romero, 2000)；此外，*B. japonicum* 的多重耐藥性外排泵 (multidrug efflux pump) 喪失導致與大豆共生固氮的活性明顯下降，但在替代宿主綠豆和豇豆中卻沒有此現象 (Lindemann et al., 2010)，這表明根瘤菌已經獲得對宿主根圈特定植物抗毒素的適應性。

Naringenin 被視為與根瘤效率正相關，並與氮肥施用負相關的因子 (Bandyopadhyay et al., 1996)，在本研究中獲得驗證，其在高施氮組中含量較低。不僅如此，genistein/naringenin 的比值，在 O、A、B、C、D、E、O+、B+和 E+組別 (代號參考表 4.5) 依序為 5.64、3.30、8.37、3.46、7.32、3.85、6.81、17.10 和 8.15 倍，藉由以 naringenin 分泌量為基準，更能清楚看到小而多的根瘤 (B、D) 與大而少 (A、C) 的根瘤，在特定黃酮類化合物組分比例有明顯差異。

Isoliquiritigenin 是部分黃酮類化合物生合成的中間產物以及其分解產物，據前

人分子實驗驗證，此化合物在 *B. japonicum* 是 *nod* 基因的強烈誘導物 (Kape et al., 1992)，也可在植物分泌物中被檢測到 (參考章節 2.9)。在本研究綠豆根際分泌物中 isoliquiritigenin 的濃度低，且各處理間變化小，由高氮組未加菌、高氮組施 *B. arachidis* 及低氮組施 *B. arachidis*，三處理的 isoliquiritigenin 濃度接近的結果可判斷，其濃度與根瘤多寡並沒有顯著關係，說明其不是為了調控根瘤狀態而分泌的化合物。

4.6 根瘤菌種類、根瘤型態與根際分泌之黃酮類化合物的關係探討

當根部同時存在多種根瘤菌株時，植物並非一定會根據這些菌株的固氮效能來做出選擇。有時，儘管某些根瘤菌株固氮效能較差，但由於其競爭優勢，仍可能會在與其他菌株競爭時取得優勢地位。這種情況在多年生豆科植物中特別常見，當這些植物沒有其他選擇時，它們可能與競爭力較差的根瘤菌株建立共生關係 (Mendoza-Suárez et al., 2021; Sachs et al., 2010)。本研究在一年生的綠豆中，觀察到 *B. arachidis* 和 *B. japonicum* 在數量與生長速度上明顯優於 *B. diazoefficiens* 和 *B. elkanii*，這似乎顯示其具有較強競爭力。然而，儘管 *B. arachidis* 和 *B. japonicum* 單一根瘤中血紅素明顯較低，且單株豆血紅素總量僅與 *B. elkanii* 相近，但在植物生長勢卻不輸 *B. diazoefficiens* 和 *B. elkanii*，這顯示 *B. arachidis* 和 *B. japonicum* 在具有強大結瘤競爭能力的同時，仍有足夠的固氮能力。有研究顯示，當根瘤首先被競爭力較弱的根瘤菌株佔據時，植物宿主仍可能會感染更有競爭力的根瘤菌株，然而，當豆科植物的根瘤先被最有競爭力的根瘤菌株佔據時，那麼即使其他菌株的密度更高，仍不太可能在根部形成新的根瘤 (Ji et al., 2017)。因此，一個好的田間接種劑，需要同時具備好的固氮能力和足以與田間現存根瘤菌競爭的能力，而本研究試驗中 *B. arachidis* 和 *B. japonicum* 展現出的強大根瘤能力，雖有待更多試驗驗證，但能說明這兩菌株適合作為台南 5 號綠豆接種菌的候選者。

根瘤菌對於黃酮類化合物的親和力不同，可能會影響根瘤菌在根系中的競爭力。研究指出，相對於非競爭性菌株，更具競爭力菌株對於黃酮類化合物和種子滲



出物的反應更加迅速 (Maj et al., 2010)，這可能是本研究中不同根瘤菌根瘤型態的原因之一。然而，雖然黃酮類化合物對根瘤的形成有促進作用，但也對根瘤菌有相當的毒性。根據研究，genistein 不僅誘導 USDA 110 的 nod 基因表達，同時也誘導多重耐藥性外排泵和 TetR 家族轉錄調控蛋白的表達，不同種類的黃酮類化合物（如 daidzein）則通過競爭性抑制的方式共同參與調控 (Han et al., 2020; Takeshima et al., 2013)；藉由調控黃酮類化合物的濃度，可以平衡黃酮類化合物作為 nod 基因誘導劑和毒素的雙重作用，這種調控能力可以在共生的早期階段發揮關鍵效果，進而影響根瘤菌的競爭能力。因此，本研究中不同根瘤菌對綠豆分泌的 genistein 及 coumestrol 等黃酮類化合物的耐受力差異，亦可能是影響根瘤型態與根瘤菌競爭力的原因之一。

補充註解：

相較於較多研究的 *B. diazoefficiens*、*B. japonicum* 及 *B. elkanii*，*B. arachidis* 的研究相對而言仍非常少，*B. arachidis* 是 Wang et al. (2013) 提出的新種，而 *B. arachidis* CCBAU 051107 是從中國河北省田間的花生有效根瘤中所分離出的菌株。除了能與花生共生之外，本研究也發現其能與台南 5 號綠豆產生很好的共生效果，產生小而多的根瘤，型態類似於 *B. japonicum* USDA 6，綠豆生長優於根瘤大而少的 *B. diazoefficiens* USDA 110 和 *B. elkanii* USDA 76。



表 4.4、綠豆接種根瘤菌之 SPAD 讀數、根瘤數、根瘤總重和單個根瘤均重 (三吋盆試驗)

Table 4.4. SPAD readings, nodule numbers, total nodule weight, and average nodule weight of mung beans inoculated with rhizobium (3-inch pot experiment)

Inoculation	Nodulation rate (number of pots)	SPAD meter value			Nodule numbers	Weight of nodules (mg)	Average weight per single nodule (mg)
		With nodules // Without nodules					
Non-inoculated	20% (1/5)	20.7	//	8.2 ± 1.7	2	96.6	48.3
<i>B. diazoefficiens</i>	80% (4/5)	16.3 ± 1.8	//	9	4.5 ± 1.7	102.4 ± 44.9	22.62 ± 2.33
<i>B. arachidis</i>	100% (10/10)	29.8 ± 4.6			124.2 ± 30.1	159.5 ± 24.4	1.33 ± 0.29
<i>B. elkanii</i>	80% (4/5)	27.8 ± 2.0	//	5.8	16.3 ± 5.5	149.3 ± 47.2	9.94 ± 2.07
<i>B. japonicum</i>	100% (5/5)	29.8 ± 3.6			111.2 ± 16.6	149.5 ± 26.6	1.36 ± 0.26
<i>E. fredii</i>	20% (2/10)	^{#1} 29.4 ^{#2} 8.2	//	6.8 ± 1.1	^{#1} 13 ^{#2} 1	^{#1} 165.0 ^{#2} 3.2	^{#1} 12.69 ^{#2} 3.2
Non-inoculated, high N	0% (0/5)	30.1 ± 5.5			-	-	-
<i>B. arachidis</i>	100% (5/5)	28.6 ± 2.2			96.6 ± 22.3	70.2 ± 36.2	0.69 ± 0.22
<i>E. fredii</i>	0% (0/5)	26.9 ± 1.6			-	-	-

Values are expressed as means ± standard deviation. "-" means the treatment did not have any nodule.

#1 and #2 means the first and second pot with nodules in this treatment, respectively.

以紅色箭頭標示根瘤



圖 4.14 a、綠豆接種 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110



圖 4.14 b、綠豆接種 *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107



圖 4.14 c、綠豆接種 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76



圖 4.14 d、綠豆接種 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6



圖 4.14 e、綠豆接種 *Ensifer fredii* USDA 205 (有根瘤)



圖 4.14 f、綠豆接種 *Ensifer fredii* USDA 205 (無根瘤)



圖 4.14 g、綠豆接種 *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107 高氮處理



圖 4.14 h、綠豆接種 *Ensifer fredii* USDA 205 高氮處理



圖 4.14 i、綠豆未接種根瘤菌



圖 4.14 j、綠豆未接種根瘤菌 (高氮處理)



圖 4.14、綠豆接種根瘤菌試驗 (三吋盆試驗) 根部特寫照片

Figure 4.14. Close-up images of mung bean roots inoculated with different strains of rhizobia (3-inch pot experiment)

(a) 接種 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110

Inoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110

(b) 接種 *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107

Inoculated with *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107

(c) 接種 *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76

Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76

(d) 接種 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6

Inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6

(e) 接種 *Ensifer fredii* USDA 205 (有根瘤)

Inoculated with *Ensifer fredii* USDA 205 (with nodules)

(f) 接種 *Ensifer fredii* USDA 205 (無根瘤)

Inoculated with *Ensifer fredii* USDA 205 (without nodules)

(g) 接種 *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107 高氮處理

Inoculated with *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107, high nitrogen treatment

(h) 接種 *Ensifer fredii* USDA 205 高氮處理

Inoculated with *Ensifer fredii* USDA 205, high nitrogen treatment

(i) 未接種根瘤菌

Without inoculation of rhizobium

(j) 未接種根瘤菌，高氮處理

Without inoculation of rhizobium, high nitrogen treatment

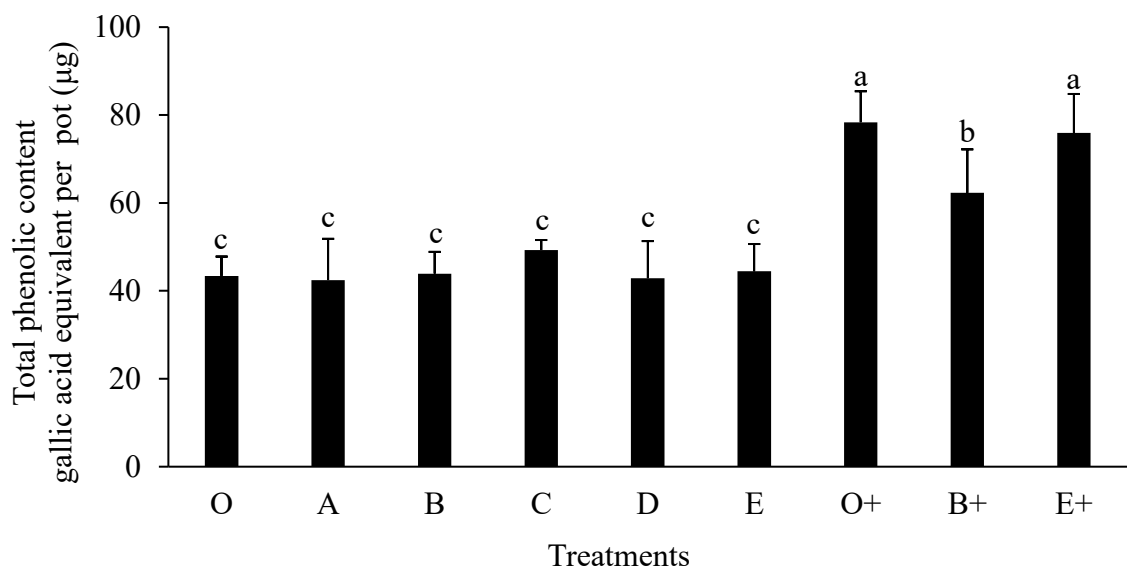


圖 4.15、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的總酚含量

Figure 4.15. Total phenolic content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

Error bars represent standard deviation (N = 10 for treatments with **B** & **E**. N = 5 for treatments with **O**, **A**, **C**, **D**, **O+**, **B+** and **E+**), and bars with the same letter are not significantly different between treatments ($p < 0.05$, LSD test).

Treatments in the horizontal axis:

O: Non-inoculated

A: Inoculated with *B. diazoefficiens* USDA110

B: Inoculated with *B. arachidis* CCBAU 051107

C: Inoculated with *B. elkanii* USDA 76

D: Inoculated with *B. japonicum* USDA 6

E: Inoculated with *E. fredii* USDA 205

O+: Non-inoculated, high nitrogen treatment

B+: Inoculated with *B. arachidis* CCBAU 051107, high nitrogen treatment

E+: Inoculated with *E. fredii* USDA 205, high nitrogen treatment

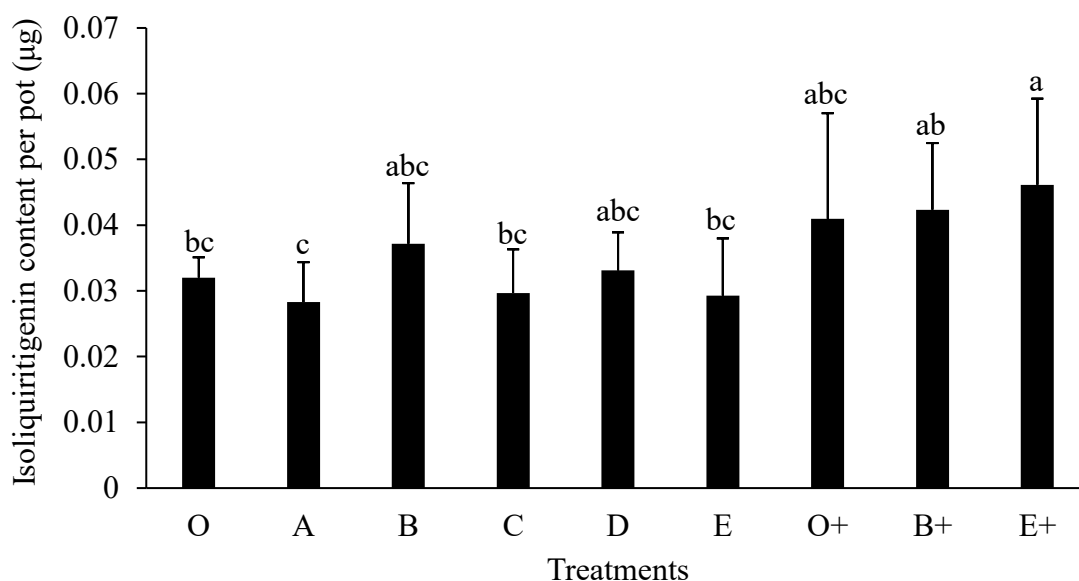


圖 4.16、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 isoliquiritigenin 含量

Figure 4.16. Isoliquiritigenin content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

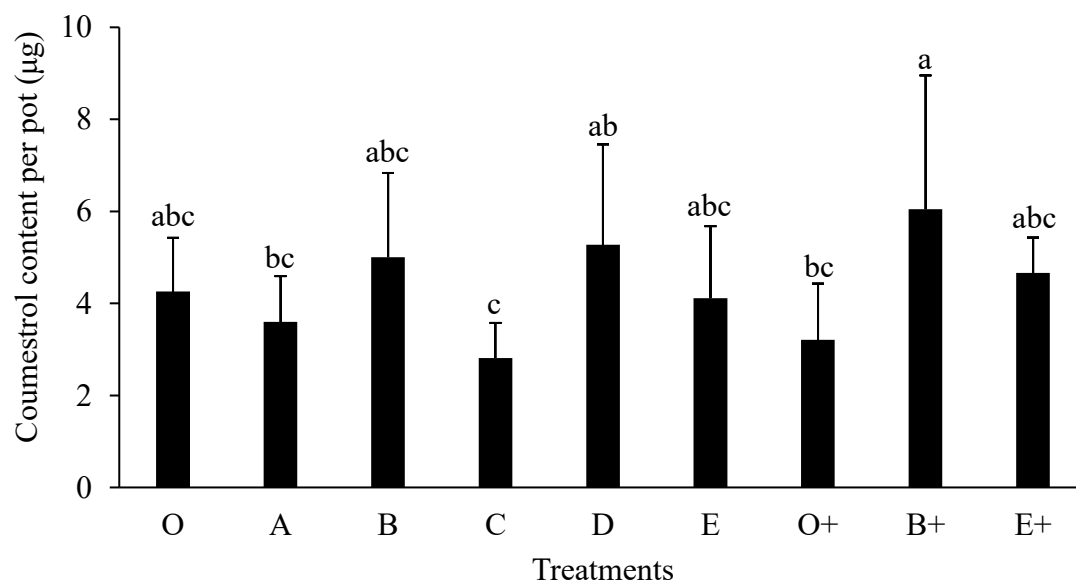


圖 4.17、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 coumestrol 含量

Figure 4.17. Coumestrol content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

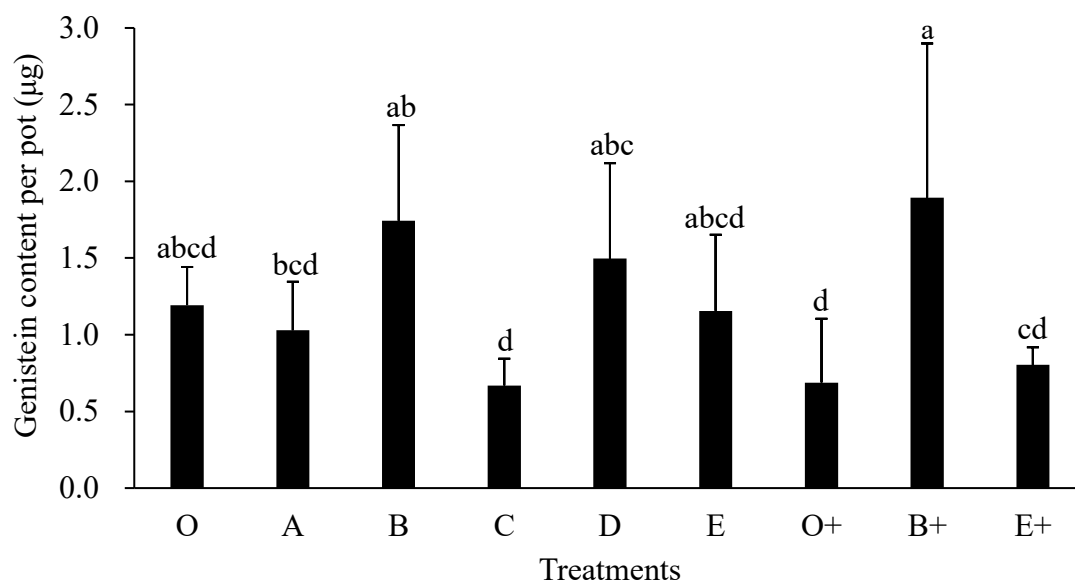


圖 4.18、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 genistein 含量

Figure 4.18. Genistein content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

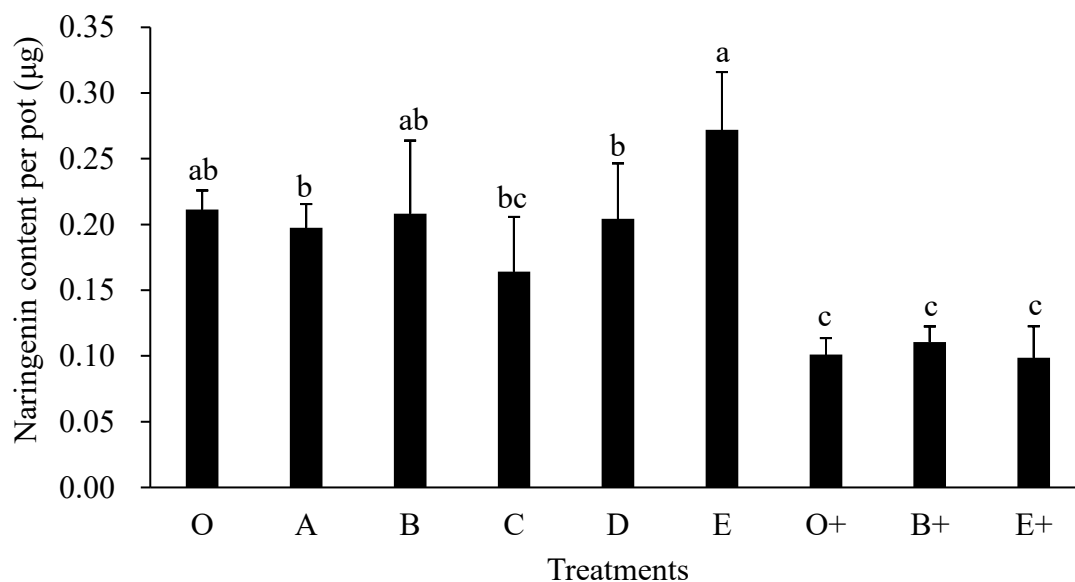


圖 4.19、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的 naringenin 含量

Figure 4.19. Naringenin content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

表 4.5、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的黃酮類化合物含量

Table 4.5. Flavonoid compound content in the potting media — three-inch pot experiment of mung bean with inoculation

(μg)	Iliq	Cou	Gen	Nar	TPG
O. Non-inoculated	0.03203 ± 0.00308	bc ± 1.169	4.256 ± 0.249	abc ± 0.2114	ab ± 4.41
A. Inoculated with <i>B. diazoefficiens</i>	0.02831 ± 0.00606	ac ± 0.997	3.596 ± 0.317	bcd ± 0.0521	b ± 9.39
B. Inoculated with <i>B. arachidis</i>	0.03717 ± 0.00922	abc ± 1.829	5.005 ± 0.624	ab ± 0.0555	ab 4.94
C. Inoculated with <i>B. elkanii</i>	0.02968 ± 0.00664	bc ± 0.762	2.813 ± 0.175	d ± 0.0415	bc ± 2.27
D. Inoculated with <i>B. japonicum</i>	0.03311 ± 0.00580	abc ± 2.178	5.277 ± 0.622	ab ± 0.0421	b ± 8.45
E. Inoculated with <i>E. fredii</i>	0.02928 ± 0.00870	bc ± 1.566	4.112 ± 0.496	abcd ± 0.0589	a ± 6.22
O+. Non-inoculated, high N	0.04096 ± 0.01607	abc ± 1.225	3.205 ± 0.416	d ± 0.0126	c ± 7.06
B+. Inoculated with <i>B. arachidis</i> , high N	0.04234 ± 0.01014	ab ± 2.907	6.047 ± 1.005	a ± 0.0118	c ± 9.91
E+. Inoculated with <i>E. fredii</i> , high N	0.04614 ± 0.01310	a ± 0.772	4.659 ± 0.114	cd ± 0.0240	c ± 8.85

Values are the total amount of compounds per pot (μg) and expressed as means ± standard deviation (N = 10 for treatments with **B** & **E**. N = 5 for treatments with **O**, **A**, **C**, **D**, **O+**, **B+** and **E+**). Means in the same column followed by the same letter are not significantly different between treatments ($p < 0.05$, LSD test)

4.7 LC-MS/MS 分析結果

4.7.1 黃酮類化合物糖苷種類

在標準品的輔助下，先前 HPLC 分析共鑑定出綠豆根際分泌物中有 coumestrol、genistein、naringenin、isoliquiritigenin 及 daidzein 等類黃酮苷元，而在不具備標準品的條件下，透過 LC-MS/MS 分析比對質譜圖的特徵，以推斷化合物的種類，如此也更容易地鑑別各化合物糖苷。於附錄十五中列出大致判別的化合物並標號，附錄十六至附錄二十四則分別呈現個別化合物相關的萃取離子層析圖及質譜圖。

綠豆根際分泌物中 daidzein 相關化合物共有四種，分別是 m/z 579.17 的 daidzein-4,7-diglucoside、 m/z 417.12 的 daidzin (daidzein 7-O-glucoside) 和 puerarin (daidzein-8-C-glucoside) 及 m/z 255.06 的 daidzein，糖苷化合物中僅 puerarin 訊號稍低，daidzein diglucoside 及 daidzin 兩者與 daidzein 相比之下訊號強度相當。綠豆根際分泌物中與 coumestrol 相關化合物有 m/z 593.15、431.09 及 269.04 的三種化合物，三者均有 coumestrol 的二次 MS 碎片特徵，據推測 m/z 431.09 和 269.04 分別為 coumestrin (coumestrol 3-O-glucoside) 和 coumestrol，而 m/z 593.15 可能為 coumestrin 上多一個糖基取代)($m/z+162$)，但並未見於文獻之中。另有兩個有二次 MS 母離子 m/z 269.04 且碎片與 coumestrol 相似的化合物，雖沒有證據判明，但可能是分子量更大的化合物的碎片。綠豆根際分泌物中與 genistein 相關的化合物共有三種，分別為 m/z 595.17 的 genistein 7,4'-di-O-glucoside、 m/z 433.11 的 genistin (genistein 7-glucoside) 及 m/z 271.06 的 genistein。

除了上述與先前 HPLC 分析中所見的類黃酮苷元相關的化合物之外，LC-MS/MS 分析也發現其他黃酮類化合物，分別有 apigenin C-glycosylated compound、luteolin / kaempferol 相關化合物以及 calycosin / biochanin A 相關化合物。Apigenin C-glycosylated compound 中 isovitexin (apigenin-6-C-glucoside) 與 vitexin (apigenin-8-C-glucoside) 的二次 MS 碎片不易區分，層析圖中 vitexin 滯留時間較 isovitexin 短。曾有文獻指出，透過觀察第一次失水對應的離子強度可以確定 C-glycosyle sugar

的位置，在正 ESI 模式下， $[M+H-H_2O]^+$ 離子是 MS/MS 圖譜中最豐富的碎片峰時，糖與苷元的 8 號碳連接，否則位於 6 號碳位置 (Ouedraogo et al., 2021)，但本次 LC-MS/MS 結果中單一峰在不同時間段的碎片相對強度會有變化，證據不足以判斷是否為同一化合物，故於附錄列表中，並沒有對 isovitexin 及 vitexin 進行區分。經比對判斷，apigenin C-glycosylated compound 有 m/z 505.14 的未知化合物、 m/z 579.17 的 isovitexin 2"-O-rhamnoside / vitexin 2"-O-rhamnoside 及 m/z 433.11 的 isovitexin / vitexin，其中 m/z 505.14 的化合物與 van Dooren et al. (2018) 所描述的 MS 碎片相同，雖分子量有差異，但仍判斷是 apigenin C-glycosylated compound，而這個 m/z 505.14 的化合物僅見於未水解萃取的樣品中，未見於鹼水解萃取的樣品中。在綠豆根際分泌物中額外找到的第二類化合物 calycosin 或 biochanin A，由於兩者有相似的質譜碎片，故不易區分。本研究在 LC-MS/MS 中有見到 m/z 285.07 的苷元，以及 447.12 ($m/z+162$) 和 609.15 ($m/z+324$) 的兩個糖苷，其中 m/z 447.12 與 609.15 的化合物並未被儀器選中進行二次 MS，但能透過一次 MS 的數據觀察到特徵碎片。在綠豆根際分泌物中額外發現的第三類化合物 luteolin / kaempferol 相關化合物，其中 m/z 611.18 的化合物可能是 luteolin diglucoside 或 kaempferol diglucoside， m/z 639.17 的化合物可能是 orientin (luteolin-8-C-glucoside) 相關化合物，雖然分子量不同，但碎片的特徵峰相似。

與綠豆根際分泌物中所找到的各種黃酮類化合物相比，決明組在上述化合物的滯留時間段，並沒有發現呈現黃酮類化合物特徵的化合物，但卻發現大量疑似帶有氨基特徵的化合物 (有 m/z 相差 17 的 MS 峰)，且分子量隨著滯留時間階梯式增加 (附錄二十五)。除此之外，在滯留時間大於黃酮類化合物的時間段，有發現屬於決明特有的蒽醌類化合物 emodin 和 chrysophanol；而皂苷類化合物 soyasaponin I 在綠豆和決明組都有出現。

4.7.2 鹼水解效果僅限部分黃酮類化合物

經 LC-MS/MS 判斷後確定，daidzein、coumestrol 和 genistein 在鹼水解前後，類黃酮糖苷種類與量的變化不明顯。但 apigenin C-glycosylated compound 在鹼水解

萃取下的差異較大，其中 compound 12 大幅增加，且多了 compound 14、15 兩種化合物，但少了 compound 11。因 isovitexin 和 vitexin 與 naringenin 有相似的羥基與羰基配置，在測定上具有相似的呈色性，又結合表 4.1 中以 naringenin 為基準的總類黃酮濃度 TFN_{UAL} 大於 TFN_{UN} 的結果，可以推測其差異可能源於 isovitexin / vitexin 化合物。

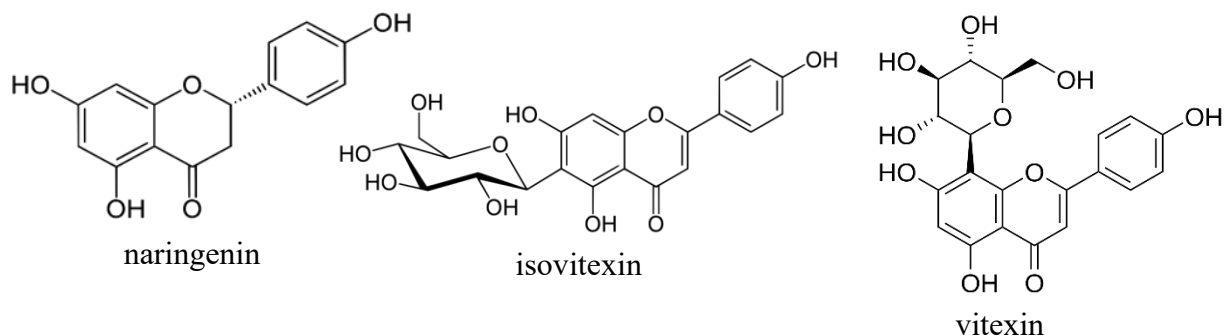


圖 4.20、Isovitexin、vitexin 和 naringenin 的化學結構

Figure 4.20. Chemical structures of isovitexin, vitexin and naringenin.

4.7.3 LC-MS/MS 所遇到的挑戰和困難

儘管 LC-MS/MS 具有不需要標準品，非標靶代謝體學分析等優點，但是其缺點也很明顯。本次分析中的黃酮類化合物僅占總體根際分泌萃取物中的一小部分，這些黃酮類化合物經常不是同一滯留時間下前三多的化合物，故無法被機器選中進行二次 MS。當為此啟用 smart exclusion 功能以挑選特定 m/z 撞碎時，亦會顧此失彼，喪失找到更多化合物的機會，且雖然已經挑選特定 m/z 進行二次 MS 撞碎，但其中的 naringenin 和 isoliquiritigenin 也未能於 LC-MS/MS 中見到。

結論



各黃酮類化合物擁有獨特的分子結構，因此它們在與氯化鋁發生反應時，可能形成不同的複合物，進而導致吸光波長和吸收強度上呈現顯著的變化。具體而言，某些特定的黃酮類化合物，如 daidzein，甚至可能無法與鋁形成螯合物而呈現顏色。在盆栽介質的萃取試驗中，儘管在超音波輔助鹼萃取條件下，總類黃酮含量呈現上升的趨勢，然而不同化合物的萃取表現卻不一致。以 genistein、naringenin 和 daidzein 為例，其萃取效果似乎不受鹼水解萃取程序的影響。相反地，isovitexin 和 vitexin 等化合物的萃取量在鹼水解的條件下則明顯增加，而其中的原因尚未完全釐清。

在綠豆及決明的間種中，高氮環境下綠豆對決明的生長產生不利影響；此外，在低氮環境下，綠豆的固氮作用對決明的生長也無幫助。然而，相對於單獨種植兩株綠豆，綠豆與決明的混種表現出更多的根瘤數量。值得注意的是，決明根際分泌物中僅檢測到一種與根瘤相關的黃酮類化合物，即 apigenin，但其含量並不多。相較之下，綠豆中則檢測到 genistein、daidzein、coumestrol、isoliquiritigenin、naringenin 和 biochanin A (或 calycosin) 等與根瘤相關的類黃酮苷元或糖苷，以及 apigenin C-glycosylated compound 和 luteolin / kaempferol 相關化合物。

進一步的研究表明，當綠豆接種不同根瘤菌時，結果有所不同。接種 *B. arachidis* 和 *B. japonicum* 後，根瘤較小但較多；而接種 *B. diazoefficiens* 和 *B. elkanii* 後，則產生較大但較少的根瘤。然而，*E. fredii* 與綠豆的親和性似乎較前四者弱，只在少部分觀察到根瘤。在這些不同的接種組別中，綠豆根際分泌物中 coumestrol 和 genistein 的含量波動相對接近。特別值得注意的是，在根瘤較小但較多的組別中，genistein 的分泌量明顯多於根瘤較大但較少的組別，這可能是不同根瘤菌根瘤型態的關鍵因素。此外，本研究觀察到由福林酚試劑測得的總酚當量在高氮組別顯著高於低氮組別。然而，naringenin 的濃度卻隨著氮濃度增加而減少，這表明 naringenin 可能在綠豆調控氮營養下根瘤形成中扮演決定性的作用。相對而言，

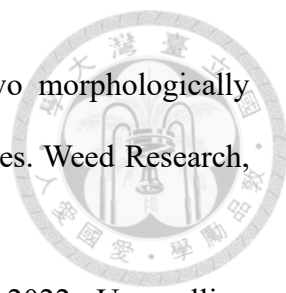
isoliquiritigenin 的含量較低，且在各接種組別之間沒有顯著差異，這表明其可能與綠豆根瘤形成的關聯性較小。

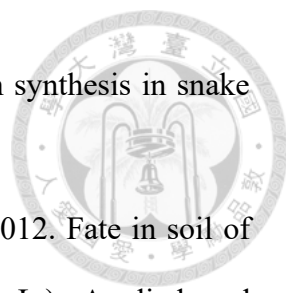
綜上所述，本研究結果的新穎發現，包括：(一) 探明氯化鋁比色法中，不同黃酮類化合物與氯化鋁反應後形成的複合物具有顯著不同的吸光波長和吸收強度，其揭示了在現行方法下氯化鋁比色法所適用的黃酮類化合物有諸多限制，故在使用此法時，不僅須要謹慎挑選當量標準品，以確保測定結果的精確性和可靠性，亦要確保樣品中所關注的黃酮類化合物適合用氯化鋁比色法分析，否則宜以 HPLC 法檢測代表性的黃酮類化合物；(二) 證明用超音波輔助萃取方法能夠從栽培介質中有效萃取黃酮類化合物，但僅部分黃酮類化合物的萃取效率會受到鹼水解條件的影響；(三) 揭示藥用植物決明和綠豆間種下的互動關係，雖盆栽中綠豆對決明生長不利，但決明可使綠豆產生更多根瘤，此結果可供後續試驗和種植時的參考；(四) 鑑定與分析綠豆和決明的根際分泌物，結果呈現產生根瘤與否的兩種豆科植物其根際黃酮類化合物分泌有明顯差異；(五) 發現綠豆會與不同的根瘤菌生成不同型態的根瘤，而不同的根瘤型態的綠豆，其根際分泌的特定黃酮類化合物存在差異；及 (六) 本研究所採用的 *B. arachidis* 菌株與臺南五號綠豆間的相容性與共生關係良好，雖過往研究相對較少，但結果表明其可作為田間接種菌的參考菌株。

參考文獻



- Akiyama, K., Tanigawa, F., Kashiwara, T., & Hayashi, H. 2010. Lupin pyranoisoflavones inhibiting hyphal development in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*, 71(16), 1865-1871.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301(5638), 1377-1380.
- Bandyopadhyay, A. K., Jain, V., & Nainawatee, H. S. 1996. Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 21, 189-192.
- Barnum, D. W. 1977. Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Analytica Chimica Acta*, 89(1), 157-166.
- Becana, M., Gogorcena, Y., Aparicio-Tejo, P., & Sánchez-Díaz, M. 1986. Nitrogen fixation and leghemoglobin content during vegetative growth of alfalfa. *Journal of Plant Physiology*, 123(2), 117-125.
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110.
- Beijerinck, M. 1888. Cultur des *Bacillus radicicola* aus den Knöllchen. *Botanische Zeitung*, 46, 740-750.
- Bergersen, F. J. 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. In. pp. 315-335. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, U.K.
- Bhandirge, S. K., Patel, V., Patidar, A., Pasi, A., & Sharma, V. 2016. An overview on phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(6), 50-55.

- 
- Bhattacharya, A., & Saha, P. 1997. Germination behaviour of two morphologically different types of seed of *Cassia tora* at different temperatures. *Weed Research*, 37(2), 87-92.
- Bijlsma, J., de Bruijn, W. J., Velikov, K. P., & Vincken, J. P. 2022. Unravelling discolouration caused by iron-flavonoid interactions: complexation, oxidation, and formation of networks. *Food chemistry*, 370, 131292.
- Blicharski, T., & Oniszczyk, A. 2017. Extraction methods for the isolation of isoflavonoids from plant material. *Open Chemistry*, 15(1), 34-45.
- Blount, J. W., Dixon, R. A., & Paiva, N. L. 1992. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41(5), 333-349.
- Bolaños-Vásquez, M. C., & Werner, D. 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(3), 339-346.
- Borda, V., Reinhart, K. O., Ortega, M. G., Burni, M., & Urcelay, C. 2022. Roots of invasive woody plants produce more diverse flavonoids than non-invasive taxa, a global analysis. *Biological Invasions*, 24(9), 2757-2768.
- Bouhaouel, I., Richard, G., Fauconnier, M. L., Ongena, M., Franzil, L., Gfeller, A., Slim Amara, H., & du Jardin, P. 2019. Identification of barley (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare*) root exudates allelochemicals, their autoallelopathic activity and against *Bromus diandrus* Roth. Germination. *Agronomy*, 9(7), 345.
- Brechenmacher, L., Lei, Z., Libault, M., Findley, S., Sugawara, M., Sadowsky, M. J., Sumner, L. W., & Stacey, G. 2010. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*, 153(4), 1808-1822.

- 
- Broughton, W. J., & Dilworth, M. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125(4), 1075-1080.
- Carlsen, S. C., Pedersen, H. A., Spliid, N. H., & Fomsgaard, I. S. 2012. Fate in soil of flavonoids released from white clover (*Trifolium repens* L.). *Applied and Environmental Soil Science*, 2012, 1-10.
- Chialva, M., Lanfranco, L., & Bonfante, P. 2022. The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 135-142.
- Chin, S., Behm, C. A., & Mathesius, U. 2018. Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. *Plants*, 7(4), 85.
- Chirug, L., Nagar, E. E., Okun, Z., & Shpigelman, A. 2021. Effect of flavonoid structure and pH on iron-mediated pectin interaction. *Food Hydrocolloids*, 116, 106654.
- Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S., & Koffas, M. A. 2017. Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2259.
- Christ, B., & Müller, K. 1960. Zur serienmäßigen bestimmung des gehaltes an flavonol-derivaten in drogen. *Archiv der Pharmazie*, 293(12), 1033-1042.
- Dai, G., Nicole, M., Andary, C., Martinez, C., Bresson, E., Boher, B., Daniel, J. F., & Geiger, J. P. 1996. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(5), 285-306.
- Dakora, F. D., Joseph, C. M., & Phillips, D. A. 1993. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 101(3), 819-824.
- Del Valle, I., Webster, T. M., Cheng, H. Y., Thies, J. E., Kessler, A., Miller, M. K., Ball, Z. T., MacKenzie, K. R., Masiello, C. A., & Silberg, J. J. 2020. Soil organic matter attenuates the efficacy of flavonoid-based plant-microbe communication. *Science*

Advances, 6(5), eaax8254.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 3342-3351.

Dong, W., & Song, Y. 2020. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. International Journal of Molecular Sciences, 21(16), 5926.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(14), 8139-8144.

Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Yawar Iqbal, E., Siddiqi, H., & Naz, A. 2011. Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure–activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(17), 9080-9093.

Farooq, N., Abbas, T., Tanveer, A., & Jabran, K. 2020. Allelopathy for weed management. In: J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (eds.), Co-evolution of secondary metabolites. pp. 505-519. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.

Feng, L., Yin, J., Nie, S., Wan, Y., & Xie, M. 2018. Structure and conformation characterization of galactomannan from seeds of *Cassia obtusifolia*. Food Hydrocolloids, 76, 67-77.

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology, 52(1), 61-76.

Frank, B. 1889. Über die pilzsymbiose der leguminosen. Berichte der Deutschen

Botanischen Gesellschaft, 7, 332-346.

Gniazdowska, A., & Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 395-407.

González-Pasayo, R., & Martínez-Romero, E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(5), 572-577.

Grundler, F., Betka, M., & Wyss, U. 1991. Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: total amounts of proteins and amino acids. *Phytopathology*, 81(1), 70-74.

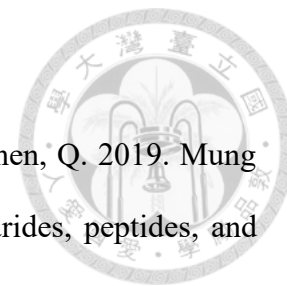
Guchu, S. M., Yenesew, A., Tsanuo, M. K., Gikonyo, N. K., Pickett, J. A., Hooper, A. M., & Hassanali, A. 2007. C-methylated and C-prenylated isoflavonoids from root extract of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry*, 68(5), 646-651.

Han, F., He, X., Chen, W., Gai, H., Bai, X., He, Y., Takeshima, K., Ohwada, T., Wei, M., & Xie, F. 2020. Involvement of a novel TetR-like regulator (BdtR) of *Bradyrhizobium diazoefficiens* in the efflux of isoflavonoid genistein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(12), 1411-1423.

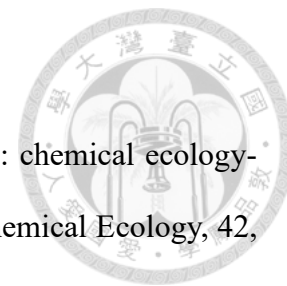
Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125-129.

Hayashi, M., Tansengco, M. L., Suganuma, N., Szczyglowski, K., Krusell, L., Ott, T., & Udvardi, M. 2005. Methods for studying nodule development and function. In: A. J. Márquez (ed), *Lotus japonicus* Handbook. pp. 53-82. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Hooper, A. M., Tsanuo, M. K., Chamberlain, K., Tittcomb, K., Scholes, J., Hassanali, A., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. 2010. Isoschaftoside, a C-glycosylflavonoid from *Desmodium uncinatum* root exudate, is an allelochemical against the development



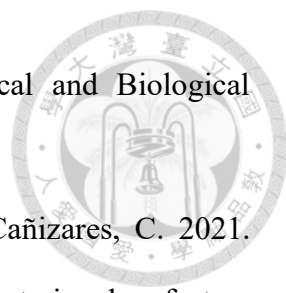
- of *Striga*. *Phytochemistry*, 71(8-9), 904-908.
- Hou, D., Yousaf, L., Xue, Y., Hu, J., Wu, J., Hu, X., Feng, N., & Shen, Q. 2019. Mung bean (*Vigna radiata* L.): bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits. *Nutrients*, 11(6), 1238.
- Huang, Y. L., Chow, C. J., & Tsai, Y. H. 2012. Composition, characteristics, and in-vitro physiological effects of the water-soluble polysaccharides from *Cassia* seed. *Food Chemistry*, 134(4), 1967-1972.
- Jain, S., & Patil, U. 2010. Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. — An Overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(4), 430-437.
- Ji, Z. J., Yan, H., Cui, Q. G., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. 2017. Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 114-119.
- Jordan, D. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.
- Jurinjak Tušek, A., Šamec, D., & Šalić, A. 2022. Modern techniques for flavonoid extraction — to optimize or not to optimize? *Applied Sciences*, 12(22), 11865.
- Kape, R., Parniske, M., Brandt, S., & Werner, D. 1992. Isoliquiritigenin, a strong nod gene-and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1705-1710.
- Kato-Noguchi, H. 2022. Allelopathy and allelochemicals of *Imperata cylindrica* as an invasive plant species. *Plants*, 11(19), 2551.
- Kazlauskaite, J. A., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. 2021. Novel extraction method using excipients to enhance yield of genistein and daidzein in *Trifolium pratensis*

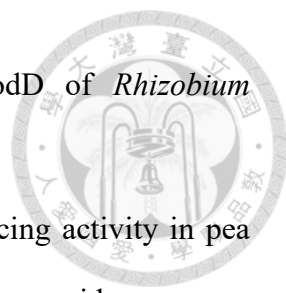


- L. *Pharmaceutics*, 13(6), 777.
- Khan, Z., Midega, C. A., Hooper, A., & Pickett, J. 2016. Push-pull: chemical ecology-based integrated pest management technology. *Journal of Chemical Ecology*, 42, 689-697.
- Khurm, M., Wang, X., Zhang, H., Hussain, S. N., Qaisar, M. N., Hayat, K., Saqib, F., Zhang, X., Zhan, G., & Guo, Z. 2021. The genus *Cassia* L.: ethnopharmacological and phytochemical overview. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2336-2385.
- Kong, C., Zhao, H., Xu, X., Wang, P., & Gu, Y. 2007. Activity and allelopathy of soil of flavone O-glycosides from rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6007-6012.
- Kytidou, K., Artola, M., Overkleeft, H. S., & Aerts, J. M. 2020. Plant glycosides and glycosidases: a treasure-trove for therapeutics. *Frontiers in Plant Science*, 11, 357.
- Lambrides, C. J., & Godwin, I. D. 2007. Mungbean. In: C. Kole (ed), *Pulses, sugar and tuber crops*. pp. 69-90. Springer Berlin, Heidelberg, Germany.
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, Y., & Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 159(12), 1329-1339.
- Lawson, C., Rolfe, B., & Djordjevic, M. 1996. Rhizobium inoculation induces condition-dependent changes in the flavonoid composition of root exudates from *Trifolium subterraneum*. *Functional Plant Biology*, 23(1), 93-101.
- Lee, H. I., Lee, J. H., Park, K. H., Sangurdekar, D., & Chang, W. S. 2012. Effect of soybean coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* nodulation ability, biofilm formation, and transcriptional profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2896-2903.
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Müller, A. J., Balsiger, S., Hennecke, H., & Fischer,



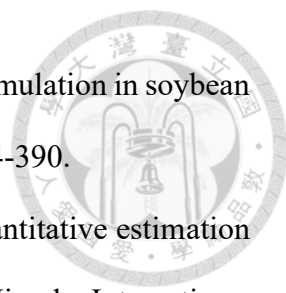
- H. M. 2010. Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. FEMS Microbiology Letters, 312(2), 184-191.
- Liu, C. W., & Murray, J. D. 2016. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. Plants, 5(3), 33.
- Liu, Y., Yin, X., Xiao, J., Tang, L., & Zheng, Y. 2019. Interactive influences of intercropping by nitrogen on flavonoid exudation and nodulation in faba bean. Scientific Reports, 9(1), 4818.
- Lupini, A., Araniti, F., Sunseri, F., & Abenavoli, M. R. 2014. Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regulation, 74, 23-31.
- Mackey, A. P., Miller, E. N., & Palmer, W. A. 1997. Sicklepod (*Senna obtusifolia*) in Queensland. In: Pest status review series-land protection. pp. 1-36. Department of Natural Resources and Mines, Queensland, Australia.
- Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., & Skorupska, A. 2010. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. Microbiological Research, 165(1), 50-60.
- Marazzi, B., Endress, P. K., De Queiroz, L. P., & Conti, E. 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. American Journal of Botany, 93(2), 288-303.
- Mehal, K. K., Kaur, A., Singh, H. P., & Batish, D. R. 2023. Investigating the phytotoxic potential of *Verbesina encelioides*: effect on growth and performance of co-occurring weed species. Protoplasma, 260(1), 77-87.
- Mekonnen, A., & Desta, W. 2021. Comparative study of the antioxidant and antibacterial activities of *Rumex abyssinicus* with commercially available *Zingiber officinale*

- 
- and *Curcuma longa* in Bahir Dar city, Ethiopia. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 8(1), 1-11.
- Mendoza-Suárez, M., Andersen, S. U., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. 2021. Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: key factors in the rhizobium-legume symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 12, 690567.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.
- Mishra, A. K., Mishra, A., Kehri, H., Sharma, B., & Pandey, A. K. 2009. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 1-7.
- Morandi, D., Le Signor, C., Gianinazzi-Pearson, V., & Duc, G. 2009. A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza*, 19, 435-441.
- Mun, B. G., Kim, H. H., Yuk, H. J., Hussain, A., Loake, G. J., & Yun, B. W. 2021. A potential role of coumestrol in soybean leaf senescence and its interaction with phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 12, 756308.
- Nakabayashi, K., Walker, M., Irwin, D., Cohn, J., Guida-English, S. M., Garcia, L., Pavlović, I., Novák, O., Tarkowská, D., & Strnad, M. 2022. The phytotoxin myrigalone A triggers a phased detoxification programme and inhibits *Lepidium sativum* seed germination via multiple mechanisms including interference with auxin homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4618.
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 11(6), 829-846.
- Novak, K., Kropáčová, M., Havlíček, V., & Škrdleta, V. 1995. Isoflavonoid phytoalexin

- 
- pisatin is not recognized by the flavonoid receptor NodD of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Folia Microbiologica, 40, 535-540.
- Novák, K., Lisá, L., & Škrdleta, V. 2004. Rhizobial nod gene-inducing activity in pea nodulation mutants: dissociation of nodulation and flavonoid response. Physiologia Plantarum, 120(4), 546-555.
- Okutani, F., Hamamoto, S., Aoki, Y., Nakayasu, M., Nihei, N., Nishimura, T., Yazaki, K., & Sugiyama, A. 2020. Rhizosphere modelling reveals spatiotemporal distribution of daidzein shaping soybean rhizosphere bacterial community. Plant, Cell & Environment, 43(4), 1036-1046.
- Ouedraogo, M., Hema, A., Bazié, B. S. R., Zida, S. W., Batieno, B. J. T., Kabré, E., Palé, E., & Nacro, M. 2021. Identification of major flavonoids using HPLC-MS/MS and determination of antioxidant potential of *Vigna radiata* seed extracts. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, 50, 57-67.
- Pei, Y., Siemann, E., Tian, B., & Ding, J. 2020. Root flavonoids are related to enhanced AMF colonization of an invasive tree. AoB Plants, 12(1), plaa002.
- Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E., Castellanos, J. Z., & Martínez-Romero, E. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiology Ecology, 26(4), 289-296.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 306(2), 530-536.
- Porter, J. R. 1983. Variation in the relationship between nitrogen fixation, leghemoglobin, nodule numbers and plant biomass in alfalfa (*Medicago sativa*) caused by treatment with arsenate, heavy metals and fluoride. Physiologia Plantarum, 57(4), 579-583.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant



- properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Rajewski, A. (2018). Plant tissue fixation.
- Retrieved from "<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.rw8d7hw>"
- Rambhau, S. S., & Ashok, P. S. 2020. Comparative pharmacognostic study of *Senna tora* Linn. and *Senna obtusifolia* Linn. *Journal of Research in Indian Medicine*, 16(1), 2.
- Ramongolalaina, C., Teraishi, M., & Okumoto, Y. 2018. QTLs underlying the genetic interrelationship between efficient compatibility of *Bradyrhizobium* strains with soybean and genistein secretion by soybean roots. *PLoS One*, 13(4), e0194671.
- Rauter, A. P., Ennis, M., Hellwich, K. H., Herold, B. J., Horton, D., Moss, G. P., & Schomburg, I. 2018. Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). *Pure and Applied Chemistry*, 90(9), 1429-1486.
- Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J. W., van Brussel, A. A., & Lugtenberg, B. J. 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology*, 16, 841-852.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522(2), 169-177.
- Sachs, J., Ehinger, M., & Simms, E. 2010. Origins of cheating and loss of symbiosis in wild *Bradyrhizobium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(5), 1075-1089.
- Salloum, M. S., Menduni, M. F., Benavides, M. P., Larrauri, M., Luna, C. M., & Silvente, S. 2018. Polyamines and flavonoids: key compounds in mycorrhizal colonization of improved and unimproved soybean genotypes. *Symbiosis*, 76, 265-275.
- Scavo, A., Abbate, C., & Mauromicale, G. 2019. Plant allelochemicals: agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. *Plant and Soil*, 442, 23-48.
- Schmidt, P. E., Broughton, W. J., & Werner, D. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium*

- 
- japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7(3), 384-390.
- Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. 2021. Quantitative estimation of leghemoglobin content in legume root nodules. In: *Plant-Microbe Interactions*. pp. 33-35. Springer Protocols Handbooks, Humana, New York, NY.
- Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., & Hasanuzzaman, M. 2022. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants*, 11(22), 3158.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. 2021. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: a critical evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 150, 111932.
- Singla, P., & Garg, N. 2017. Plant flavonoids: key players in signaling, establishment, and regulation of rhizobial and mycorrhizal endosymbioses. In: A. Varma, R. Prasad, & N. Tuteja (eds.), *Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art*. pp. 133-176. Springer, Cham, Switzerland.
- Šoln, K., & Dolenc Koce, J. 2021. Allelopathic root inhibition and its mechanisms. *Allelopathy Journal*, 52, 181-198.
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. 2014. Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*, 31(5), 431-443.
- Takeshima, K., Hidaka, T., Wei, M., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., & Saeki, K. 2013. Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes and Environments*, 28(4), 414-421.
- Tang, D., Dong, Y., Ren, H., Li, L., & He, C. 2014. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its

- 
- sprouts (*Vigna radiata*). Chemistry Central Journal, 8(1), 1-9.
- Taniguchi, M., LaRocca, C. A., Bernat, J. D., & Lindsey, J. S. 2023. Digital database of absorption spectra of diverse flavonoids enables structural comparisons and quantitative evaluations. Journal of Natural Products, 86(4), 1087-1119.
- Telrandhe, U. B., & Gunde, M. C. 2022. Phytochemistry, pharmacology and multifarious activity of *Cassia tora* L.: a comprehensive review. Annals of Phytomedicine, 11(2), 231-239.
- Treutter, D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biology, 7(6), 581-591.
- van Dooren, I., Foubert, K., Bijttebier, S., Breynaert, A., Theunis, M., Exarchou, V., Claeys, M., Hermans, N., Apers, S., & Pieters, L. 2018. In vitro gastrointestinal biotransformation and characterization of a *Desmodium adscendens* decoction: the first step in unravelling its behaviour in the human body. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 70(10), 1414-1422.
- van Velzen, R., Doyle, J. J., & Geurts, R. 2019. A resurrected scenario: single gain and massive loss of nitrogen-fixing nodulation. Trends in Plant Science, 24(1), 49-57.
- Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. 2017. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: Microbes for legume improvement. pp. 1-43. Springer, Cham, Switzerland.
- Wang, R., Chang, Y. L., Zheng, W. T., Zhang, D., Zhang, X. X., Sui, X. H., Wang, E. T., Hu, J. Q., Zhang, L. Y., & Chen, W. X. 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. Systematic and Applied Microbiology, 36(2), 101-105.
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., & Yang, B. 2017. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. Annals of the New York Academy of

Sciences, 1398(1), 120-129.

- Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. 2013. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185-8190.
- Wuyts, N., Swennen, R., & De Waele, D. 2006. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 8(1), 89-101.
- Yokoyama, T. 2008. Flavonoid-responsive *nodY-lacZ* expression in three phylogenetically different *Bradyrhizobium* groups. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(5), 401-410.
- Yuk, H. J., Lee, J. H., Curtis-Long, M. J., Lee, J. W., Kim, Y. S., Ryu, H. W., Park, C. G., Jeong, T. S., & Park, K. H. 2011. The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity. *Food Chemistry*, 126(3), 1057-1063.
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., & Zandi, K. 2017. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, 162, 2539-2551.
- Zhang, W., Sun, K., Shi, R. H., Yuan, J., Wang, X. J., & Dai, C. C. 2018. Auxin signalling of *Arachis hypogaea* activated by colonization of mutualistic fungus *Phomopsis liquidambari* enhances nodulation and N₂-fixation. *Plant, Cell & Environment*, 41(9), 2093-2108.
- Zhao, J. 2015. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, 20(9), 576-585.
- Zhao, Y., Zhang, R., Jiang, K. W., Qi, J., Hu, Y., Guo, J., Zhu, R., Zhang, T., Egan, A. N., Yi, T. S., Huang, C. H., & Ma, H. 2021. Nuclear phylotranscriptomics and phylogenomics support numerous polyploidization events and hypotheses for the

evolution of rhizobial nitrogen-fixing symbiosis in Fabaceae. *Molecular Plant*, 14(5), 748-773.

行政院衛生福利部臺灣中藥典第四版編修委員。2021。決明子。載於臺灣中藥典。

(第四版，頁 147)。臺北市，中華民國：衛生福利部。

翁廷賜、賴森雄。1992。粉綠綠豆新品種台南五號之育成。臺南區農業改良場研究彙報，28，1-12。

陳任芳。2009。根瘤線蟲之防治管理對策。花蓮區農業專訊 (68)，14-16。

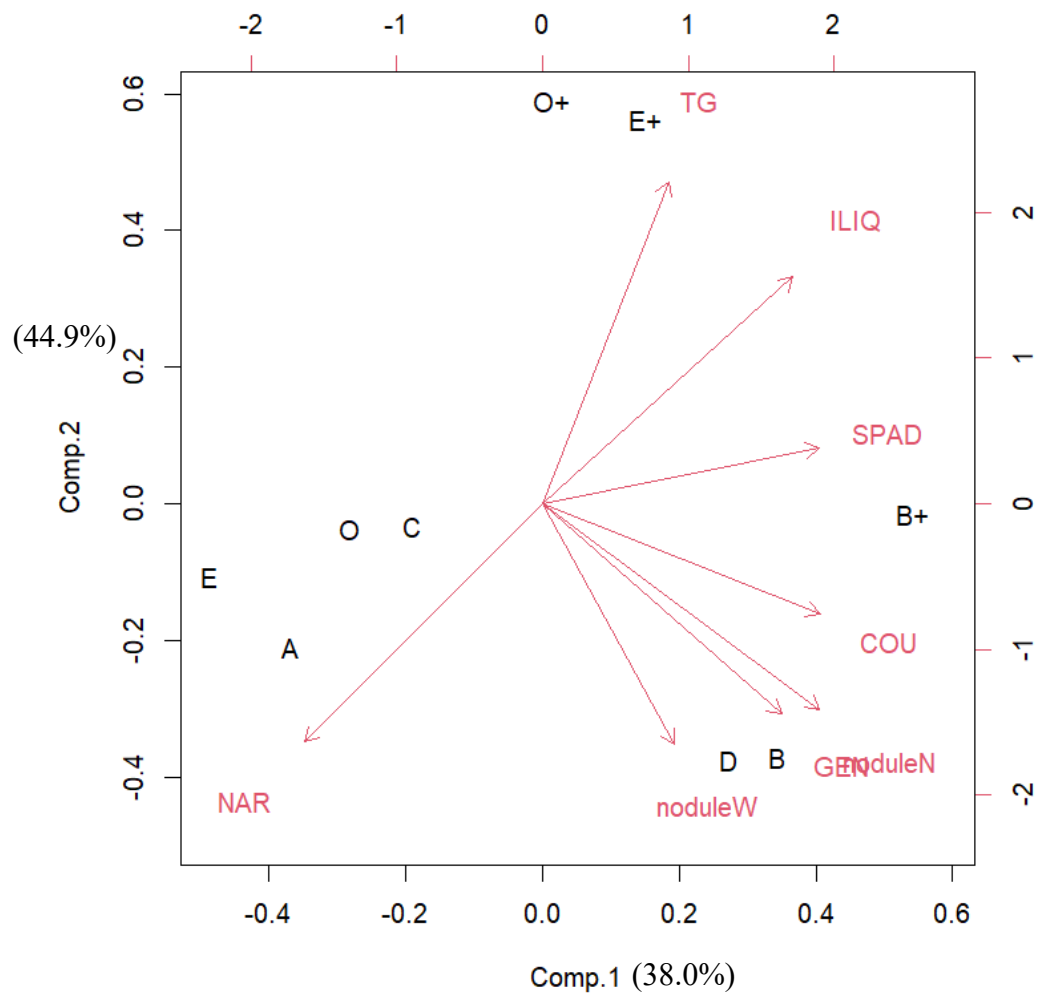
程須珍、王素華。1993。綠豆間種栽培技術。作物雜誌，9 (1)，26-27。

附錄



附錄 一、綠豆接種不同根瘤菌試驗：根際分泌物成分、根瘤數目、根瘤重量與根瘤菌種類的主成分分析

Appendix 1. Experiment of mung bean inoculation with different rhizobia: principal component analysis of root exudate composition, nodule numbers, nodule weight, and rhizobial strains



Loadings:

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8
SPAD	0.4169	0.0918	0.5477	0.2128	0.0834	0.3039	0.0037	0.6108
TG	0.1899	0.5283	0.0477	0.3056	0.1925	0.3771	-0.2907	-0.5704
COU	0.4184	-0.1812	-0.4571	0.0944	-0.6321	0.4100	0.0804	0.0005
GEN	0.3602	-0.3443	-0.3590	-0.1251	0.4678	-0.0513	-0.6058	0.1367
noduleN	0.4176	-0.3377	0.0392	0.0890	0.4125	-0.0421	0.6441	-0.3397
noduleW	0.1985	-0.3951	0.5697	-0.0499	-0.3784	-0.2459	-0.3449	-0.3935
ILIQ	0.3774	0.3720	-0.1753	0.3516	-0.1485	-0.7292	0.0148	0.1041
NAR	-0.3592	-0.3906	-0.0553	0.8383	0.0456	0.0272	-0.0895	0.0422

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8
O	-1.6101	-0.1937	-1.441	-0.58627	-0.0619	-0.0782	-0.0114	0.06235
A	-2.0886	-1.1006	0.206	0.46688	-0.1244	0.1651	-0.2625	0.04427
B	1.9603	-1.9401	0.329	0.19394	0.2171	-0.3883	-0.0192	0.02513
C	-1.0843	-0.1738	2.183	-0.40100	-0.1342	-0.0541	-0.0948	-0.05189
D	1.5537	-1.9653	0.476	-0.00836	-0.1643	0.2526	0.3217	0.02384
E	-2.7667	-0.5574	-1.017	0.20306	0.1970	-0.0359	0.1745	-0.08040
O+	0.0774	3.0811	0.753	0.02393	0.4653	0.1146	0.0557	0.03826
B+	3.0918	-0.0864	-1.120	-0.13675	0.0791	0.1797	-0.2297	-0.05473
E+	0.8666	2.9362	-0.369	0.24457	-0.4737	-0.1557	0.0658	-0.00683

Importance of components:

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8
Standard deviation	1.8961405	1.7428539	1.0651593	0.31278180	0.257628784	0.189097960	0.174019578	0.0479697100
Proportion of Variance	0.4494186	0.3796925	0.1418205	0.01222906	0.008296574	0.004469755	0.003785352	0.0002876366
Cumulative Proportion	0.4494186	0.8291111	0.9709316	0.98316068	0.991457257	0.995927012	0.999712363	1.0000000000

SPAD: Chlorophyll Meter's reading; TG: total phenolic contents; COU: coumestrol contents; GEN: genistein contents; ILIQ: isoliquiritigenin contents; NAR: naringenin contents; nodule: noduleN numbers; noduleW: nodule weight

附錄 二、綠豆根部的假性根瘤 (田間試驗)

Appendix 2. Root-knot galls of the mung bean (field experiment)



附錄 三、盆栽試驗照片

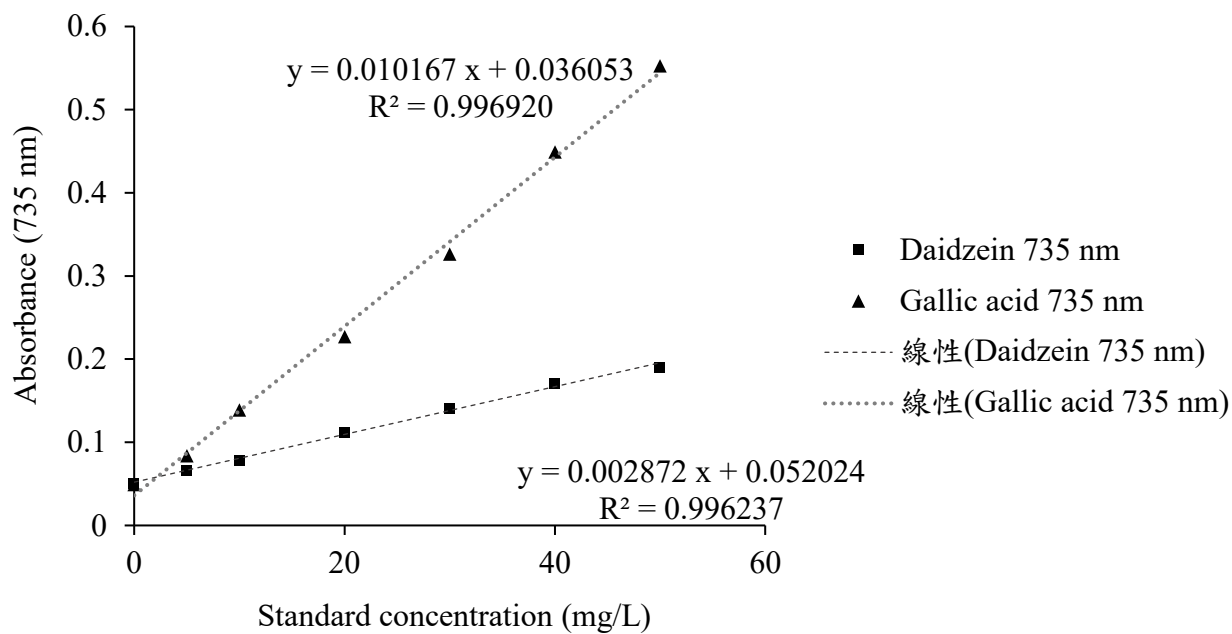
Appendix 3. Photos of pot experiments



上圖為 pillow system 試驗，下圖為三吋盆試驗。

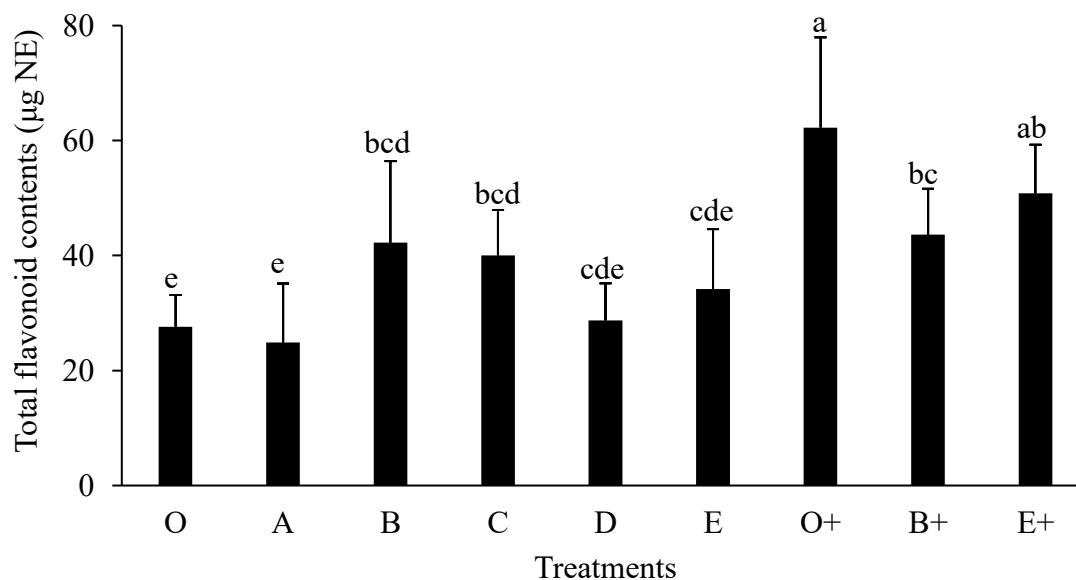
附錄 四、總酚含量標準線

Appendix 4. Standard curves for determination of total phenolic content



附錄 五、三吋盆綠豆接種試驗——盆內介質的總類黃酮含量

Appendix 5. Total flavonoid content in the media of the three-inch pot mung bean inoculation experiment



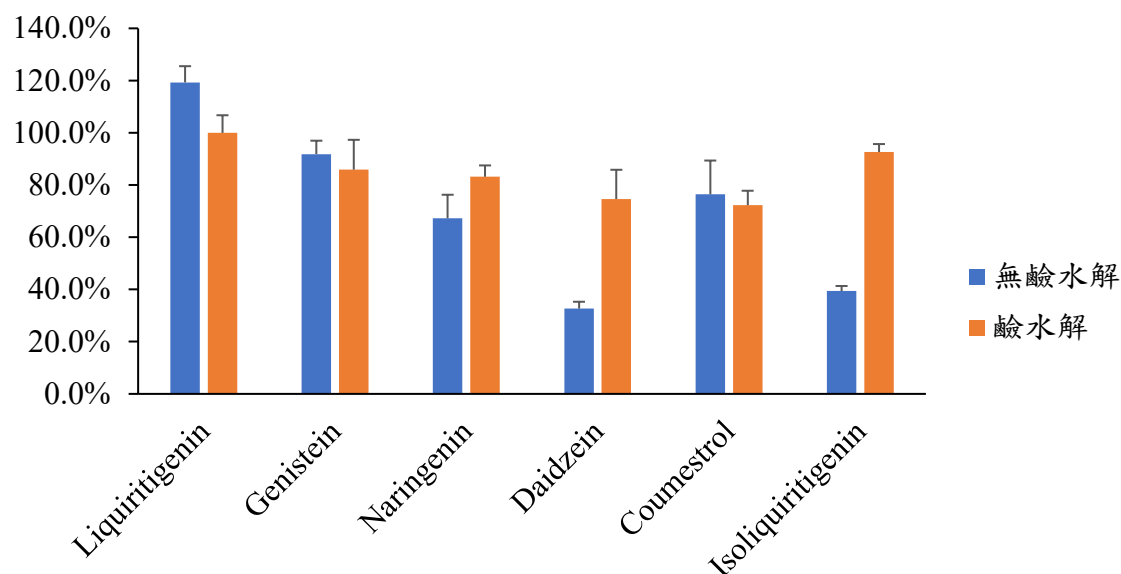
Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay Method 2	Total flavonoid content (µg NE)
O. Non-inoculated	27.61 ± 5.53
A. Inoculated with <i>B. diazoefficiens</i>	24.90 ± 10.24
B. Inoculated with <i>B. arachidis</i>	42.24 ± 14.19
C. Inoculated with <i>B. elkanii</i>	40.03 ± 7.90
D. Inoculated with <i>B. japonicum</i>	28.70 ± 6.47
E. Inoculated with <i>E. fredii</i>	34.18 ± 10.42
O+. Non-inoculated, high N	62.25 ± 15.70
B+. Inoculated with <i>B. arachidis</i> , high N	43.62 ± 8.00
E+. Inoculated with <i>E. fredii</i> , high N	50.82 ± 8.46

Values are the total amount of compounds per pot (µg) and expressed as means ± standard deviation (N = 10 for **B&E**. N =5 for **others**). Means in the same column followed by the same letter are not significantly different between treatments ($p < 0.05$, LSD test). NE: naringenin equivalents.

由於已經以 HPLC-DAD 定量受關注的黃酮類化合物，故將參考價值低的總類黃酮測定放在附錄呈現。

附錄 六、本研究萃取方法的黃酮類化合物回收率

Appendix 6. Recovery rate of flavonoids under the extraction method of this study

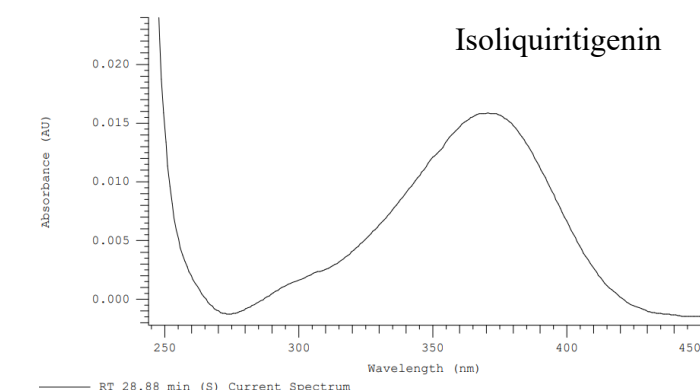
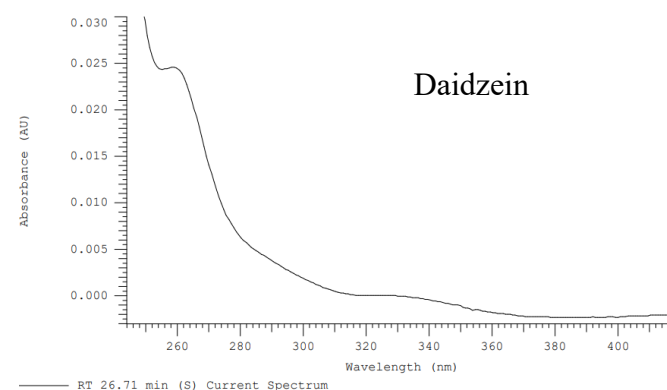
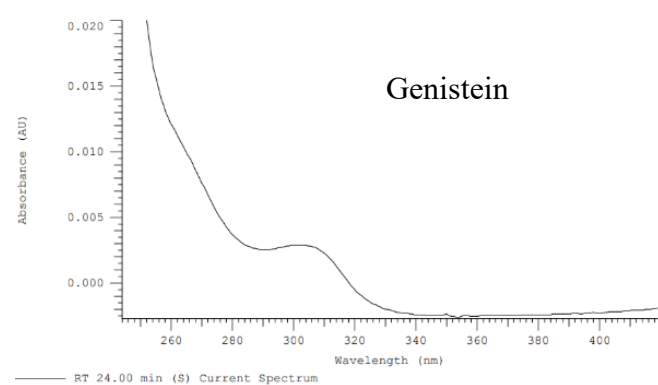
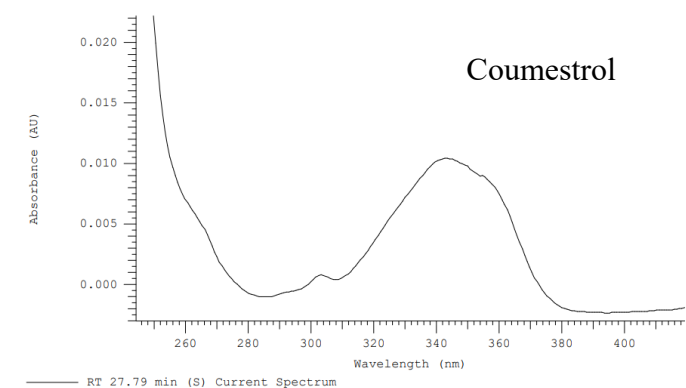
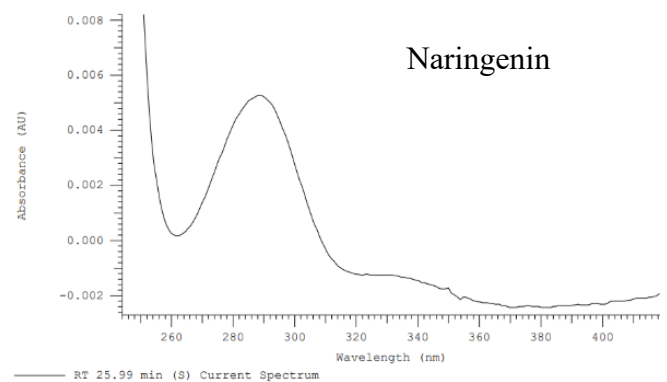
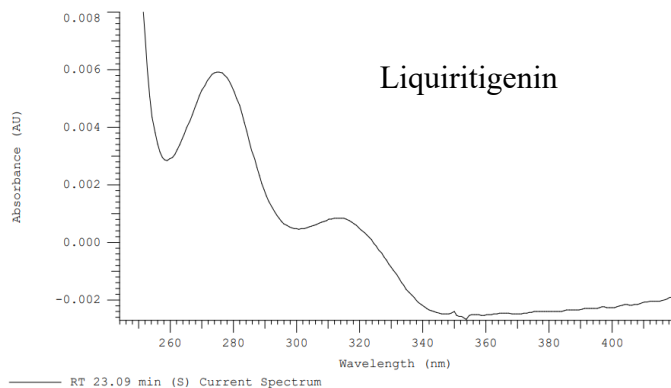
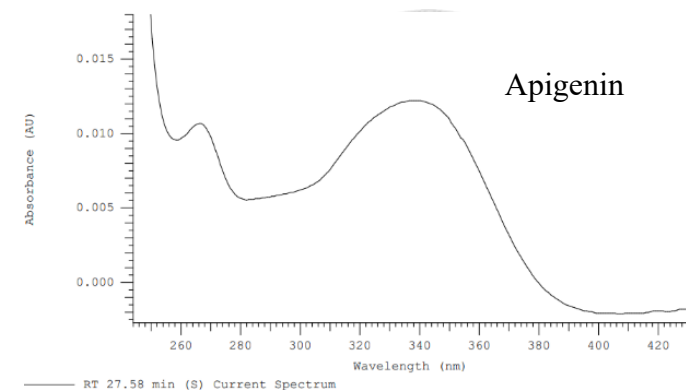
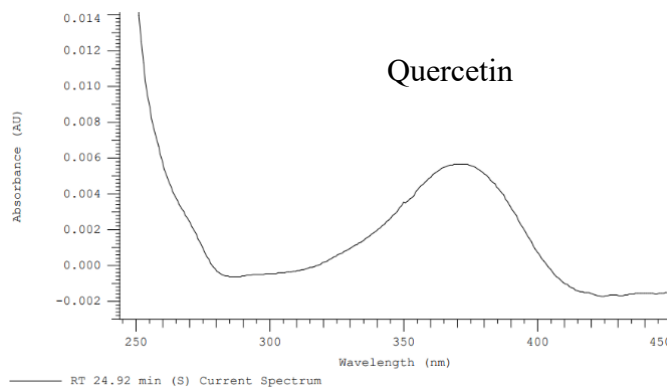
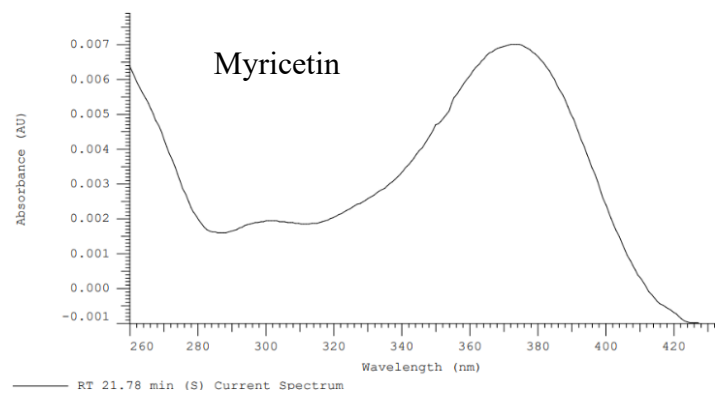


	% Recovery	
	Without alkaline hydrolysis process (UN)	With alkaline hydrolysis process (UAL)
Liquiritigenin	119.3 ± 6.2	99.9 ± 6.8
Genistein	91.8 ± 5.1	85.9 ± 11.4
Naringenin	67.2 ± 9.1	83.2 ± 4.3
Daidzein	32.7 ± 2.6	74.6 ± 11.2
Coumestrol	76.4 ± 12.9	72.3 ± 5.5
Isoliquiritigenin	39.4 ± 1.9	92.6 ± 3.1

Values are mean of three analysis (n = 3) and expressed as means ± standard deviation.

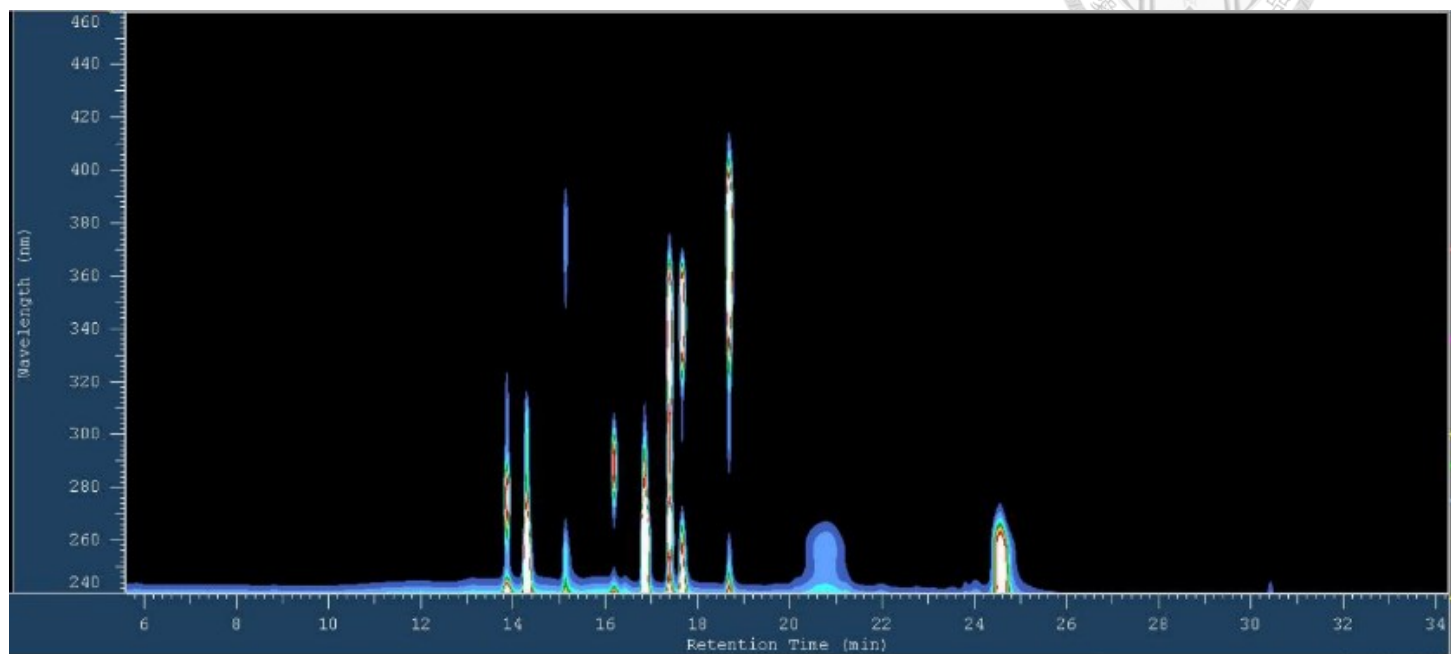
試驗步驟：取約 45 克蛭石與珍珠石混合物 (6:1, v/v) 放入三吋盆內，加入 125 mL 養液與 1 mL 的 1 ppm 黃酮類化合物標準品混合物。盆內介質吸飽水後，放進-80° C 冰箱內冷凍，並接著於冷凍乾燥機凍乾 2 天。乾燥後，將栽培介質以粉碎機粉碎。將粉末與萃取溶劑 70% 甲醇以(3:50)的比例萃取，其餘萃取及分析步驟請參考材料與方法章節 3.7。

Appendix 7. HPLC-DAD spectrums of flavonoid standards

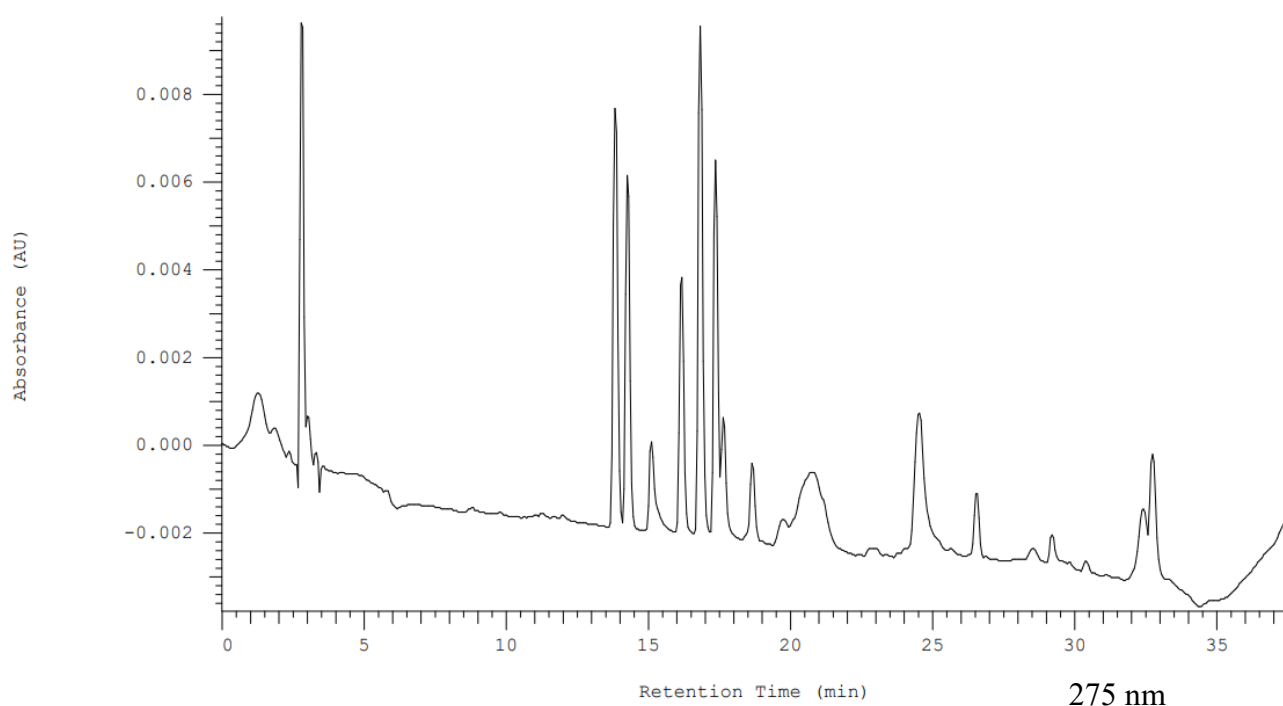


附錄 八、Program 1 下，黃酮類標準品之 HPLC-DAD 層析圖

Appendix 8. HPLC-DAD chromatogram of flavonoid standards under program 1

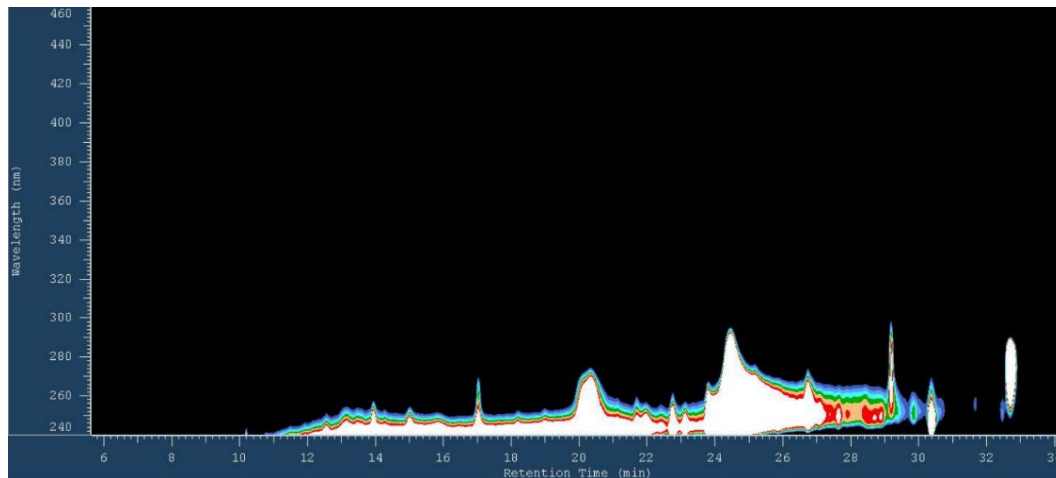
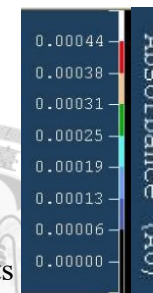


Liquiritigenin (13.84min~13.89min)	Daidzein (16.81min~16.85min)
Genistein (14.25min~14.30min)	Apigenin (17.35min~17.39min)
Quercetin (15.09min~15.15min)	Coumestrol (17.62min~17.66min)
Naringenin (16.15min~16.20min)	Isoliquiritigenin (18.64min~18.66min)

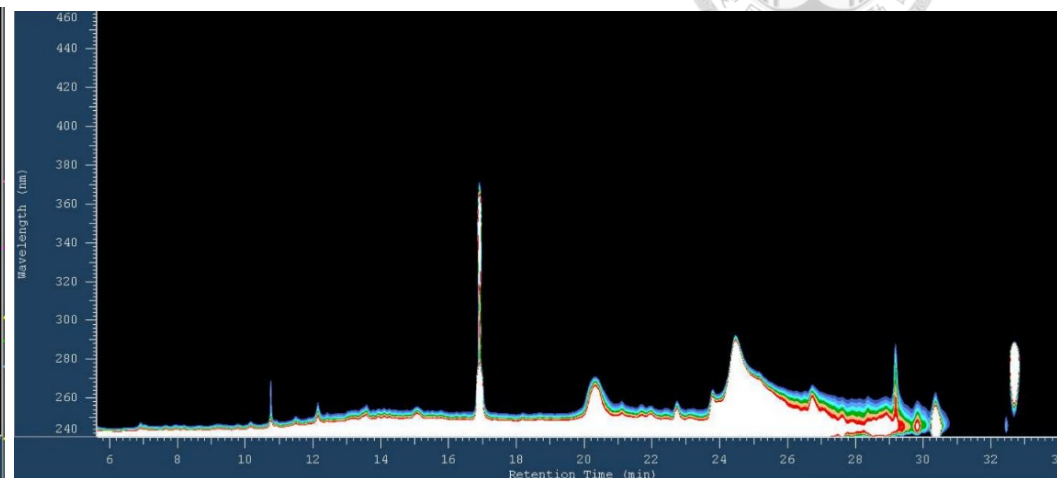


附錄 九、決明與綠豆的 pillow system 試驗，栽培介質萃取物的 HPLC-DAD 層析圖

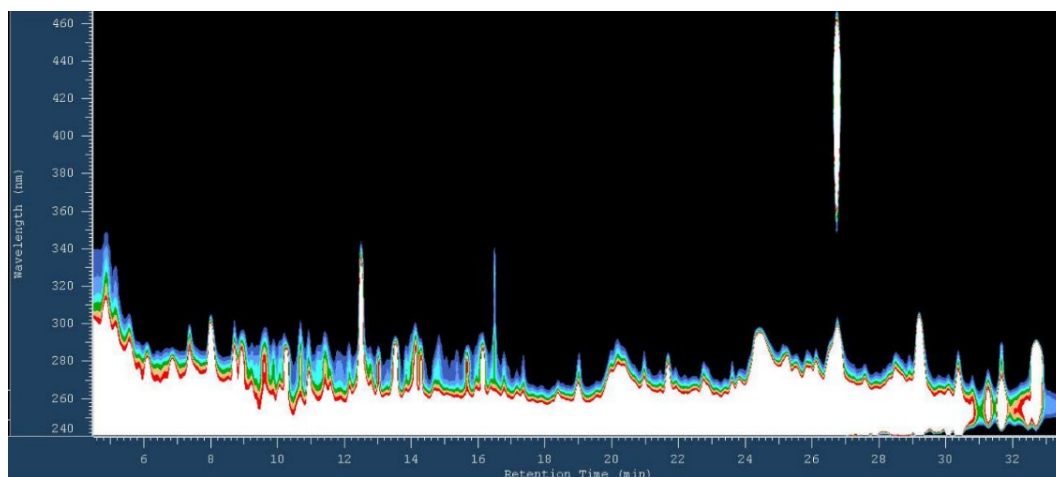
Appendix 9. HPLC-DAD chromatograms of growing medium extracts from the mung bean and *Senna tora* pillow system experiments



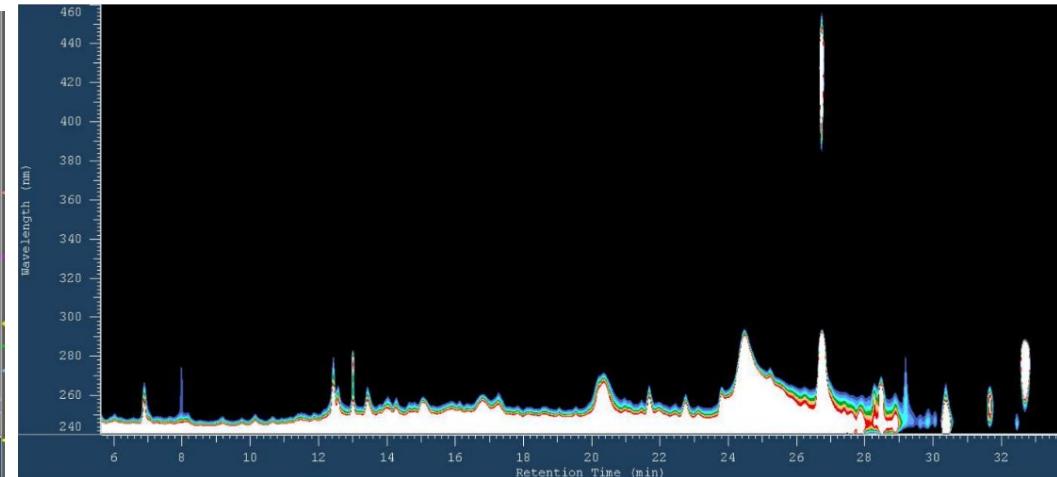
決明低氮無菌



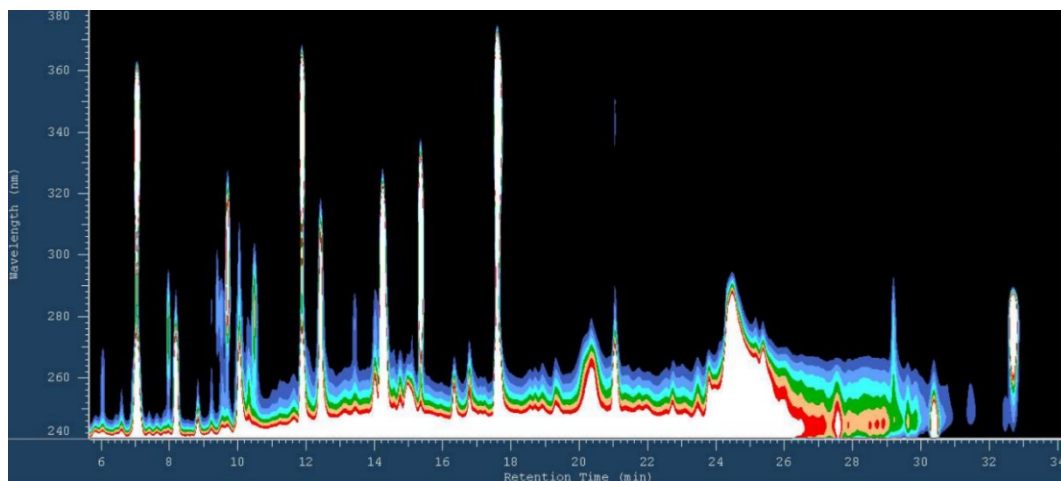
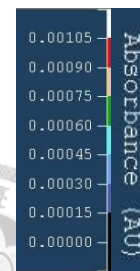
決明低氮加菌



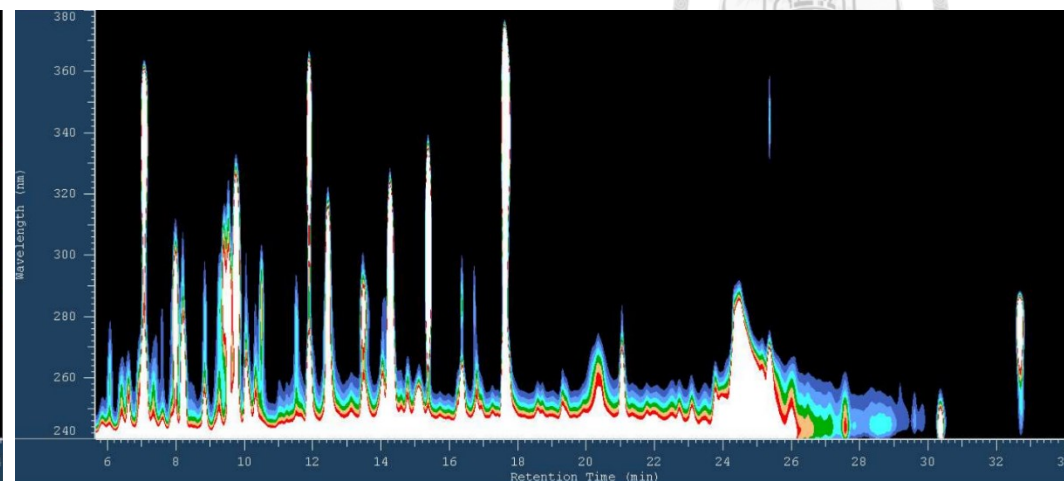
決明高氮無菌



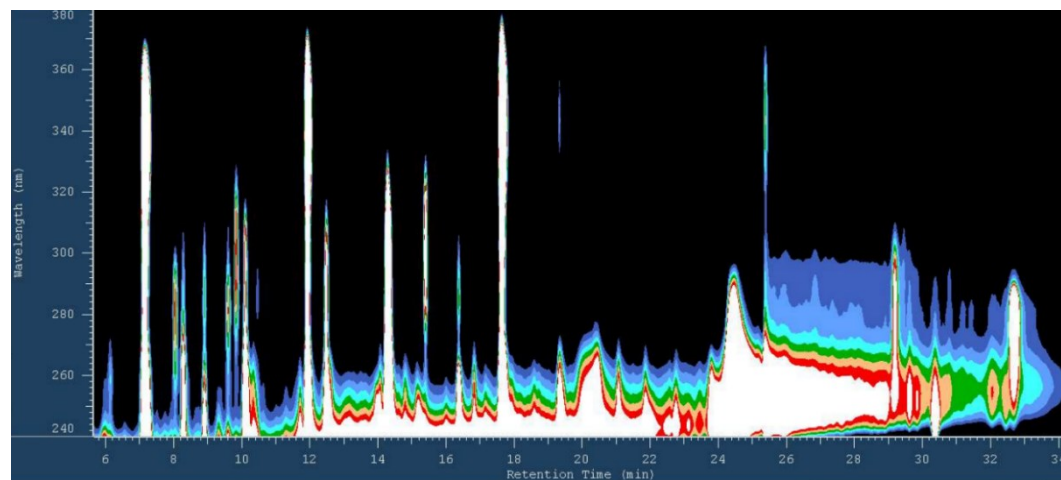
決明高氮加菌



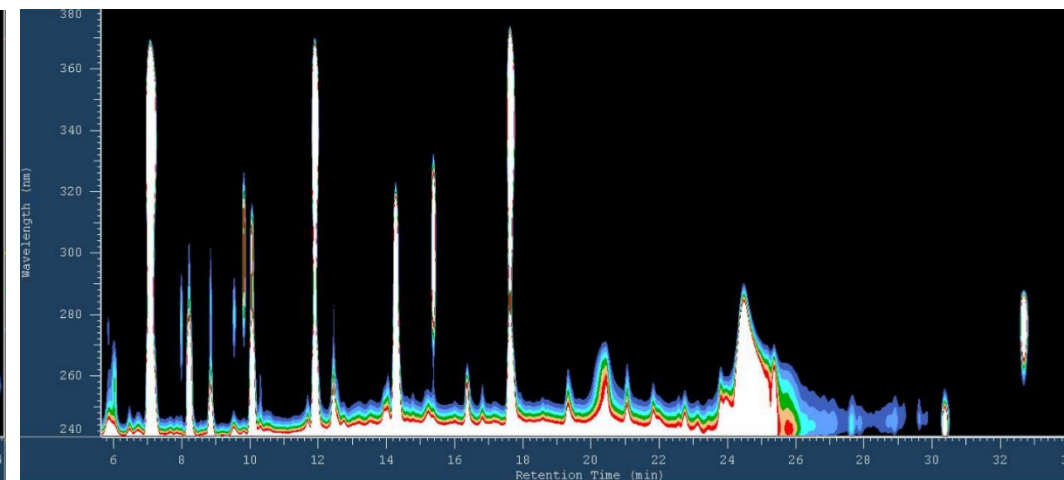
綠豆低氮無菌



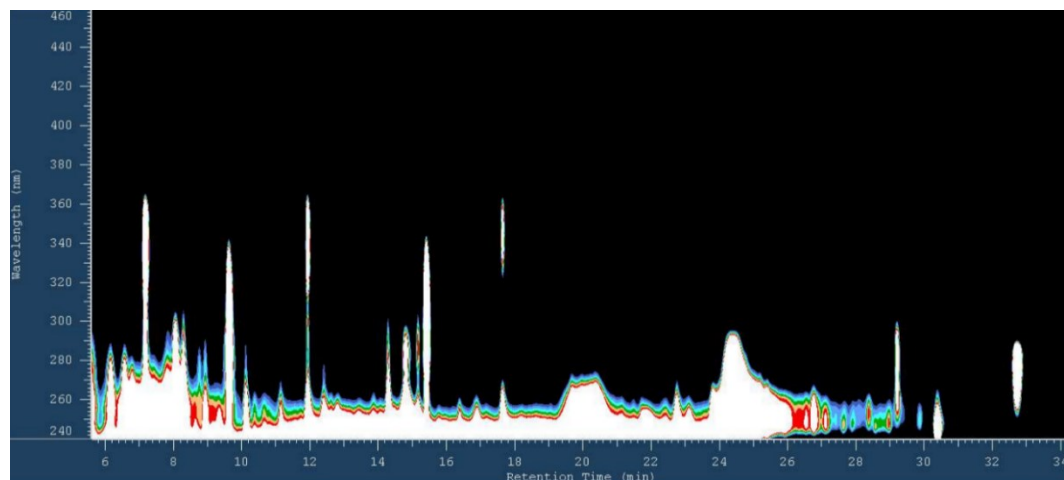
綠豆低氮加菌



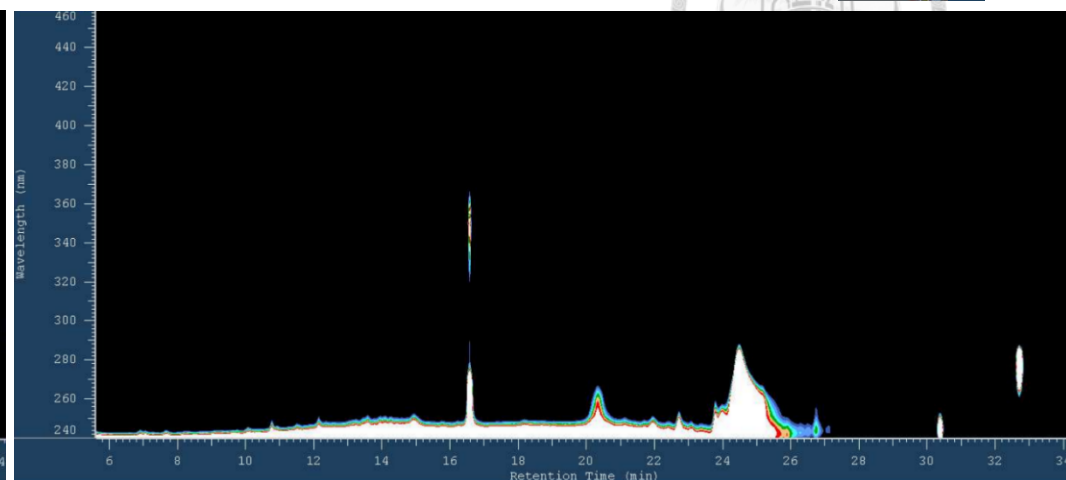
綠豆高氮無菌



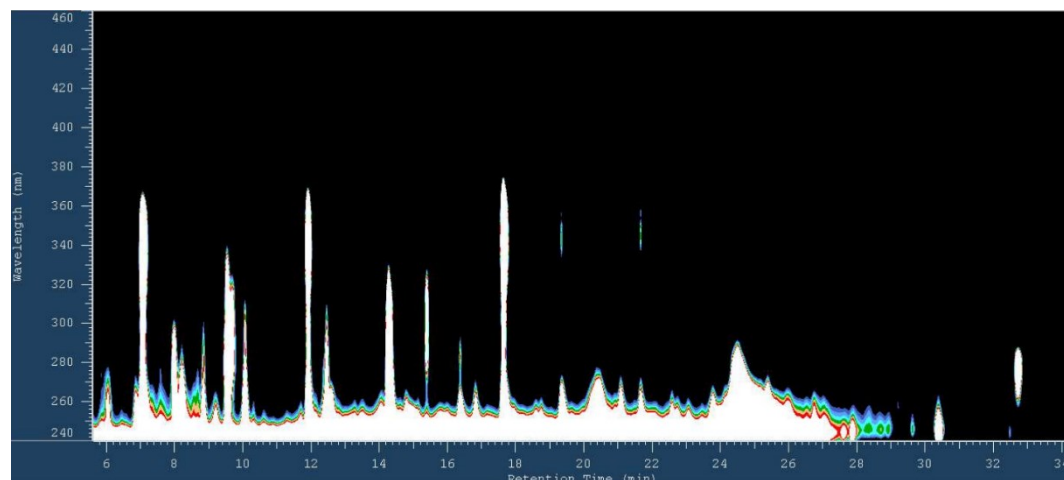
綠豆高氮加菌



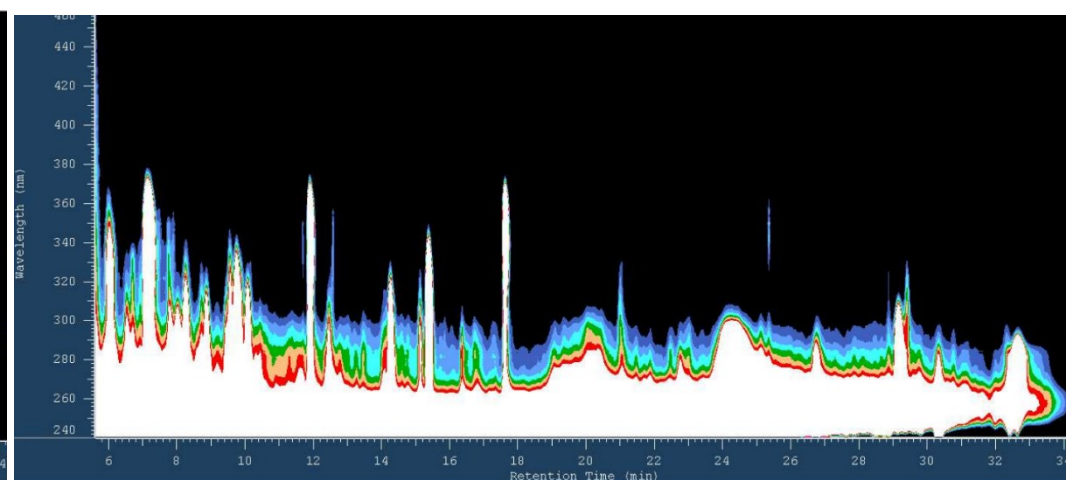
混種低氮無菌



混種低氮加菌

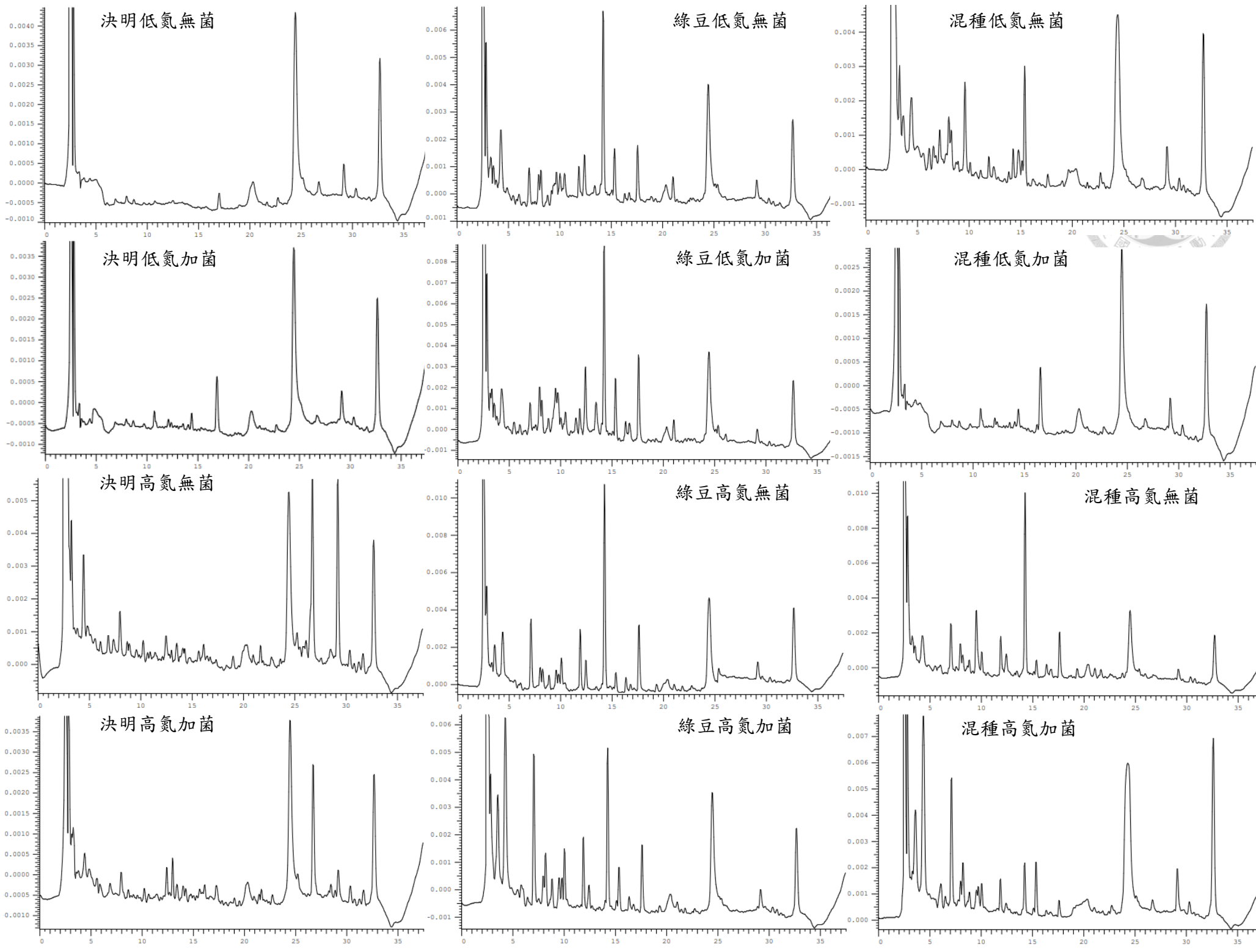


混種高氮無菌



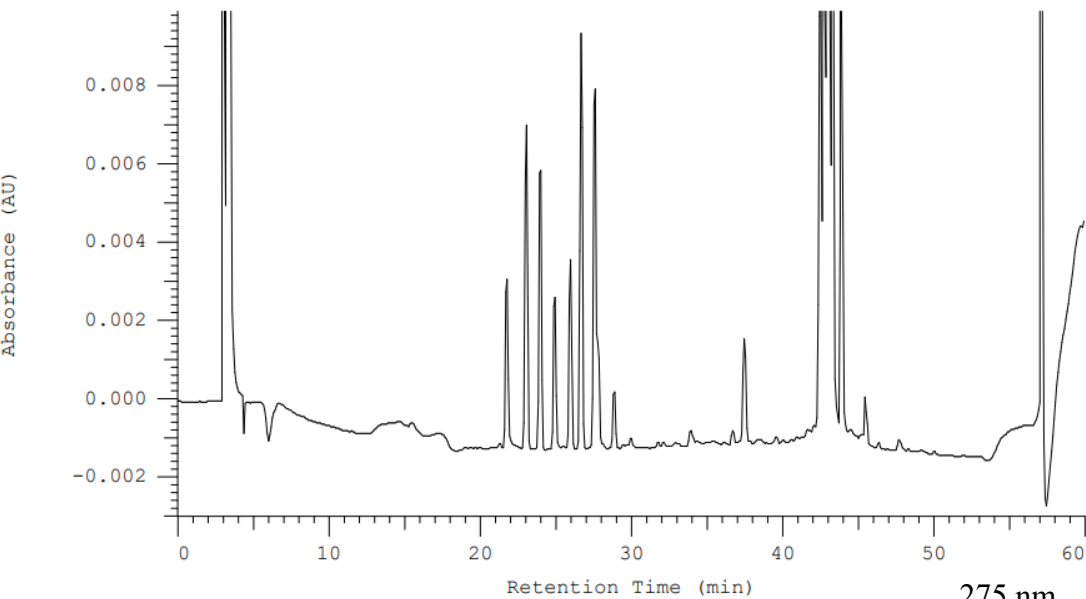
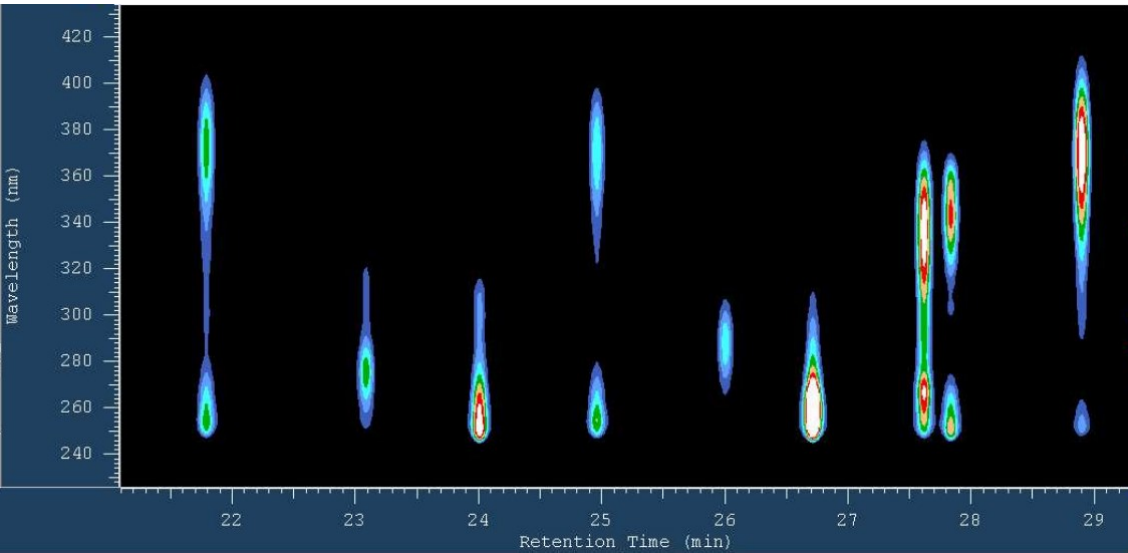
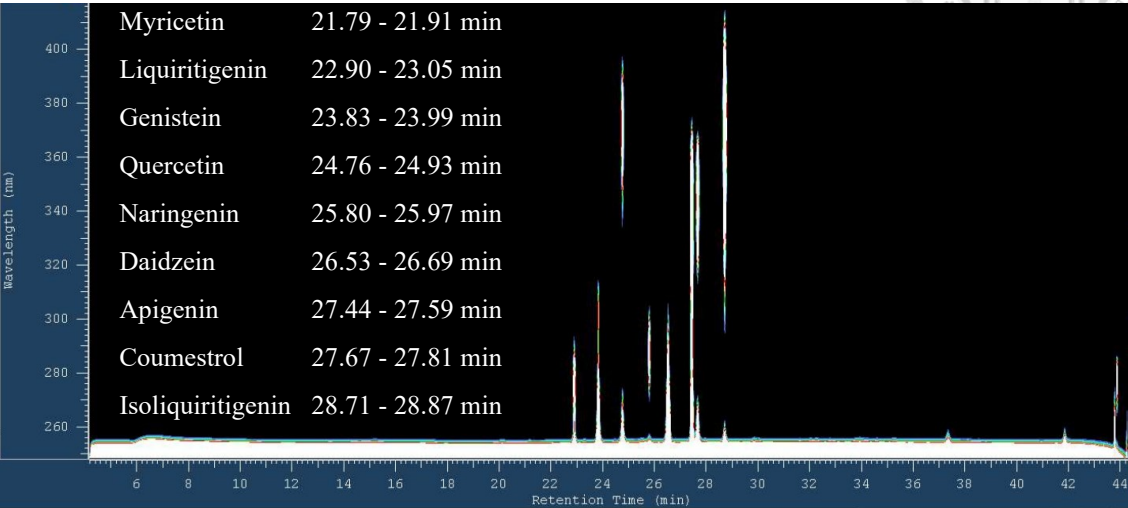
混種高氮加菌

附錄 十、決明與綠豆的 pillow system 實驗，栽培介質萃取物之 HPLC 層析圖 (275 nm)
Appendix 10. HPLC chromatograms (275 nm) of growing medium extracts from the mung bean and *S. tora* pillow system
X 軸為 retention time (min)，Y 軸為 absorbance (AU)。



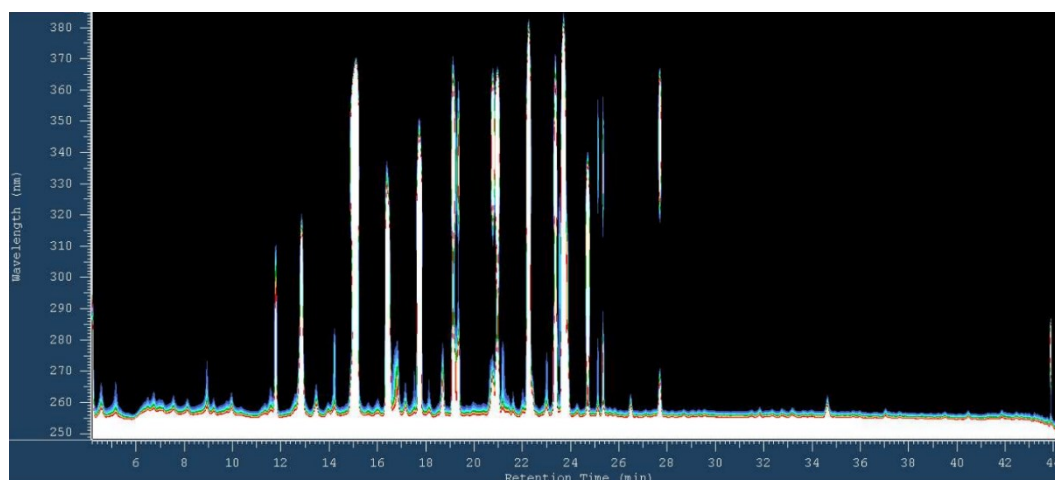
附錄 十一、Program 2 下，黃酮類標準品之 HPLC-DAD 層析圖

Appendix 11. HPLC-DAD chromatogram of flavonoid standards under program 2

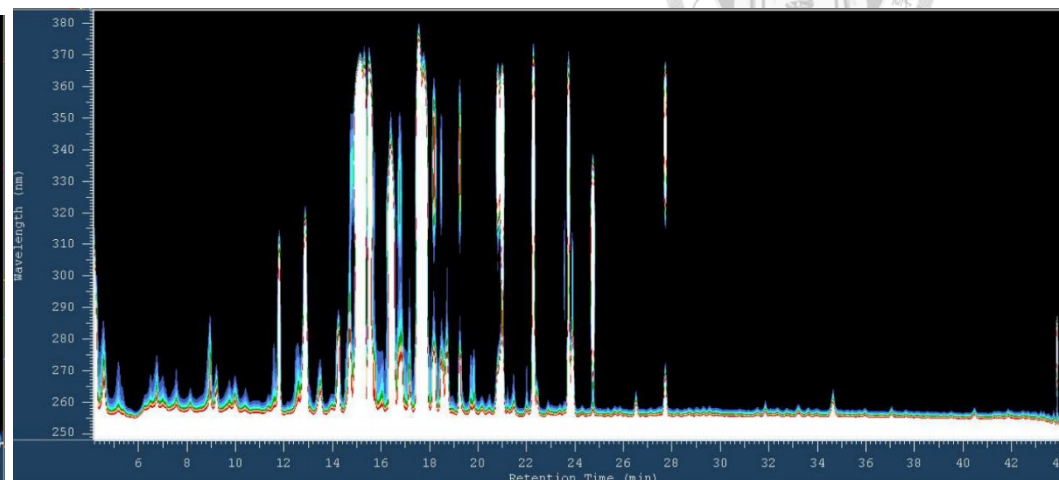


附錄 十二、三吋盆試驗中，盆內介質萃取物之 HPLC-DAD 層析圖

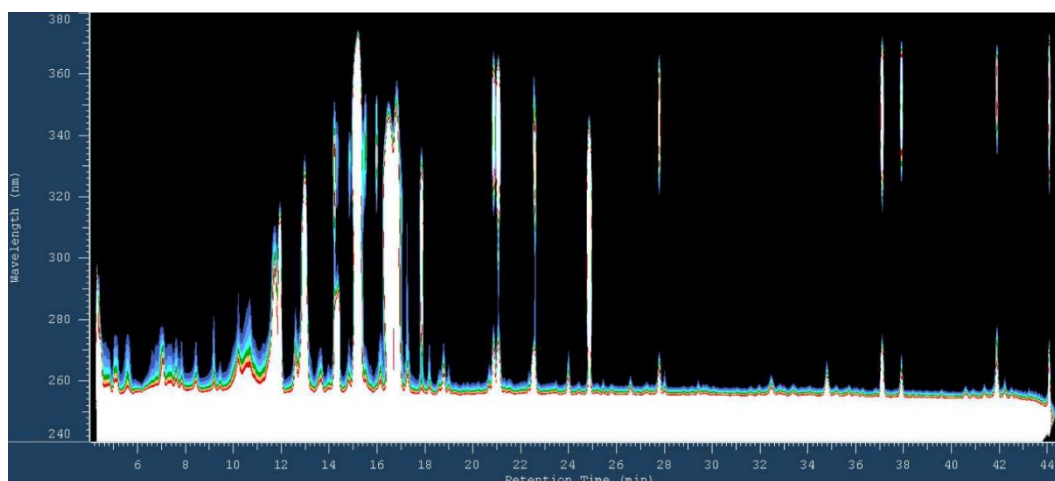
Appendix 12. HPLC-DAD chromatograms of growing medium extracts from the 3-inch pot experiment



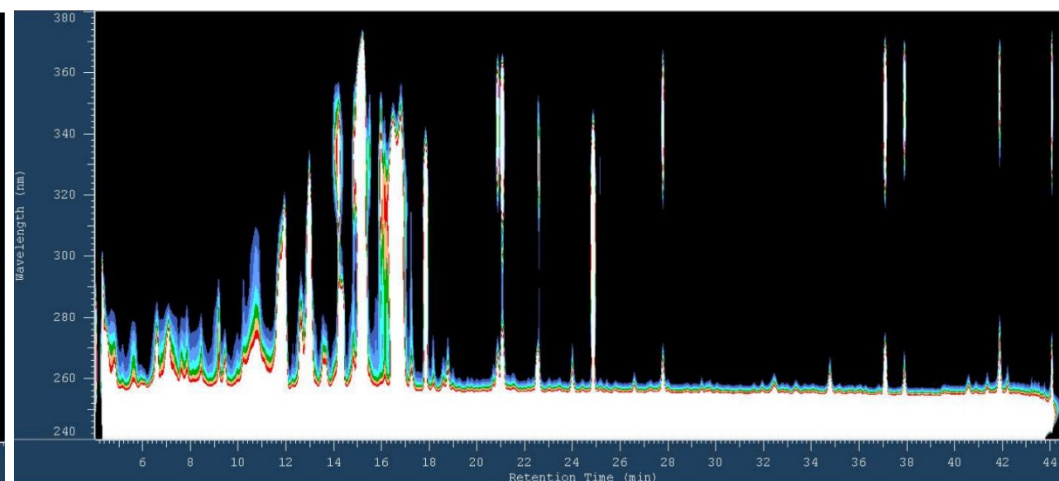
Non-inoculated, low N, without alkaline hydrolysis



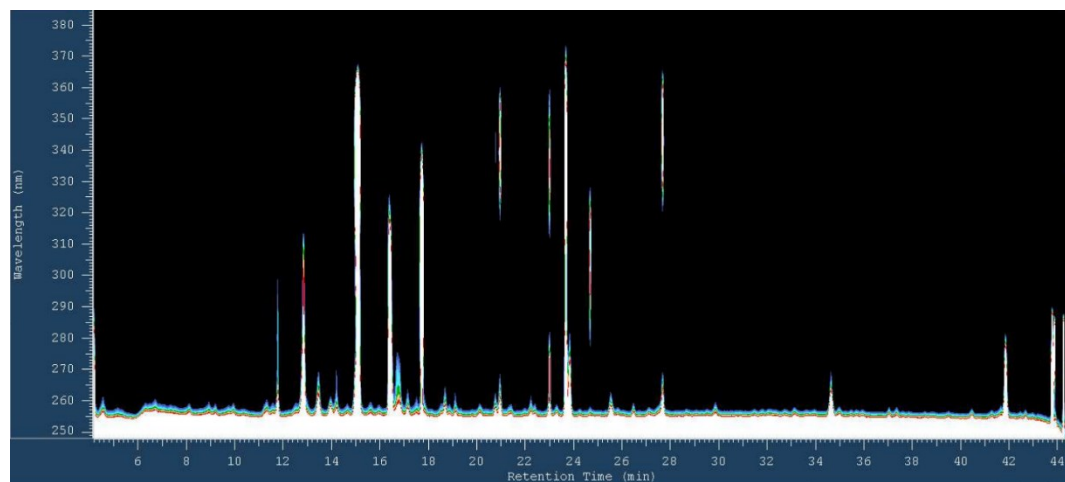
Non-inoculated, low N, with alkaline hydrolysis



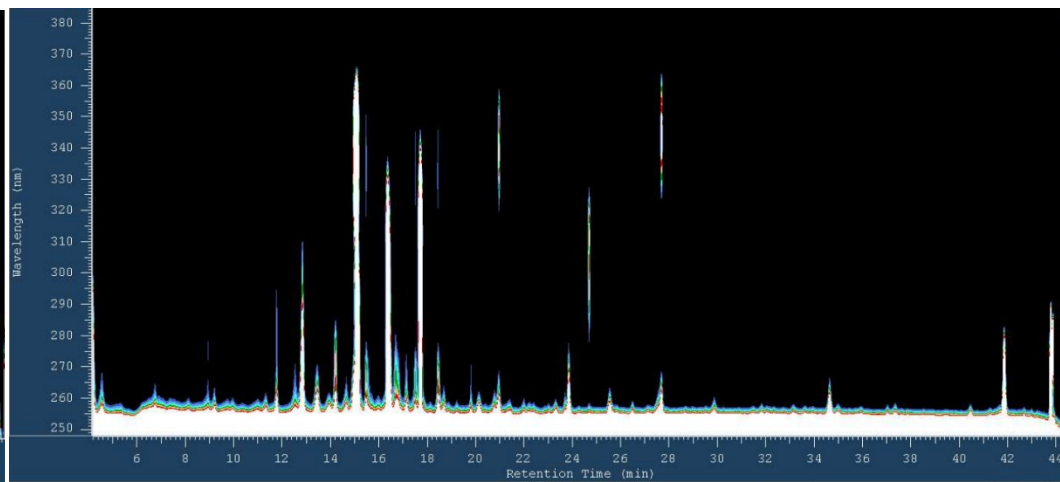
Non-inoculated, high N, without alkaline hydrolysis



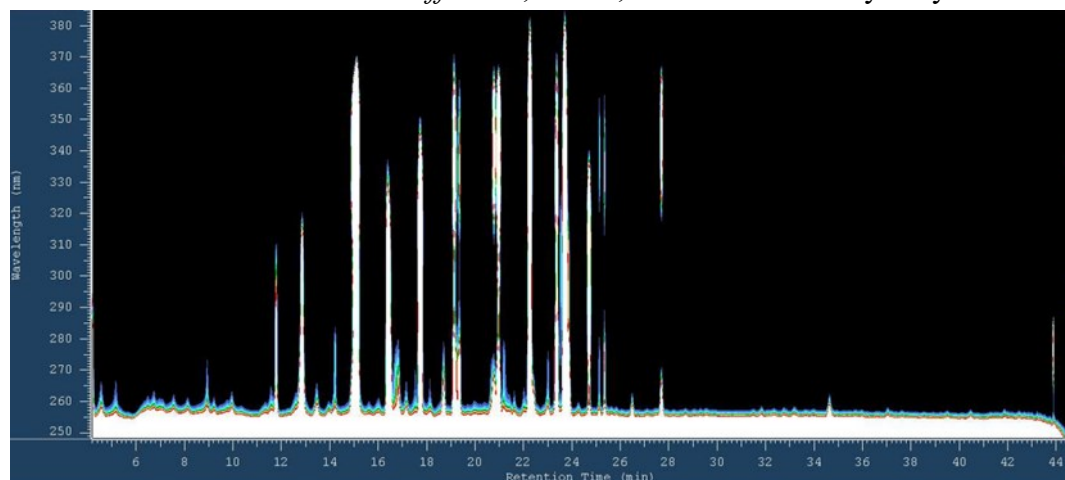
Non-inoculated, high N, with alkaline hydrolysis



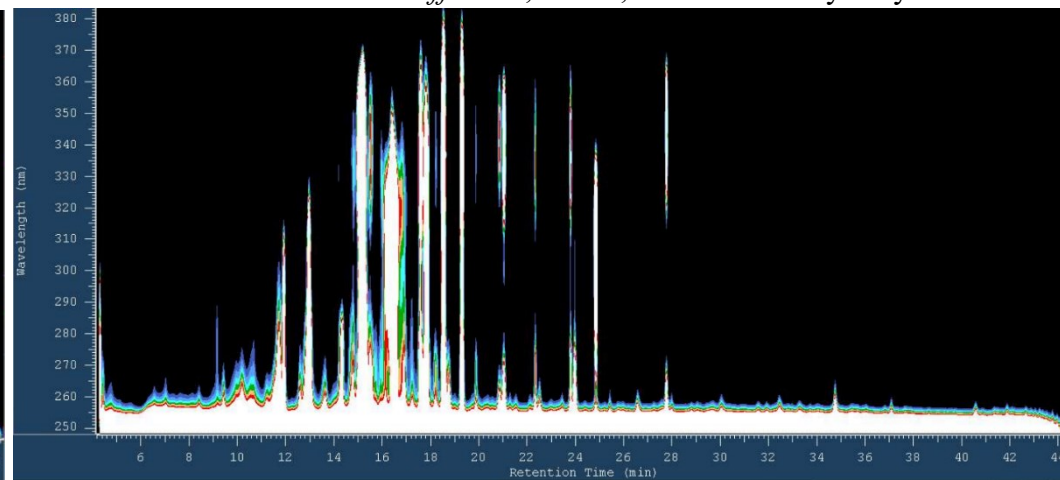
Inoculated with *B. diazoefficiens*, low N, without alkaline hydrolysis



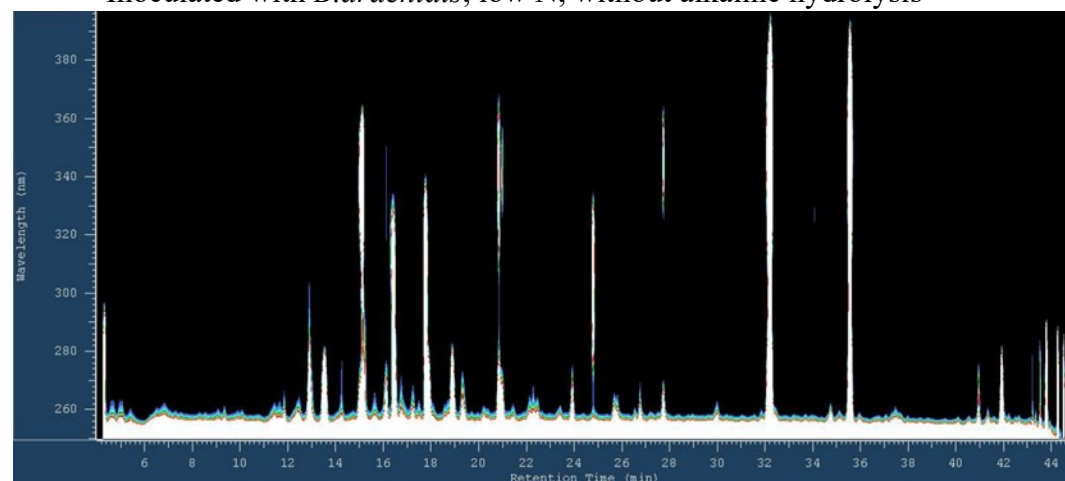
Inoculated with *B. diazoefficiens*, low N, with alkaline hydrolysis



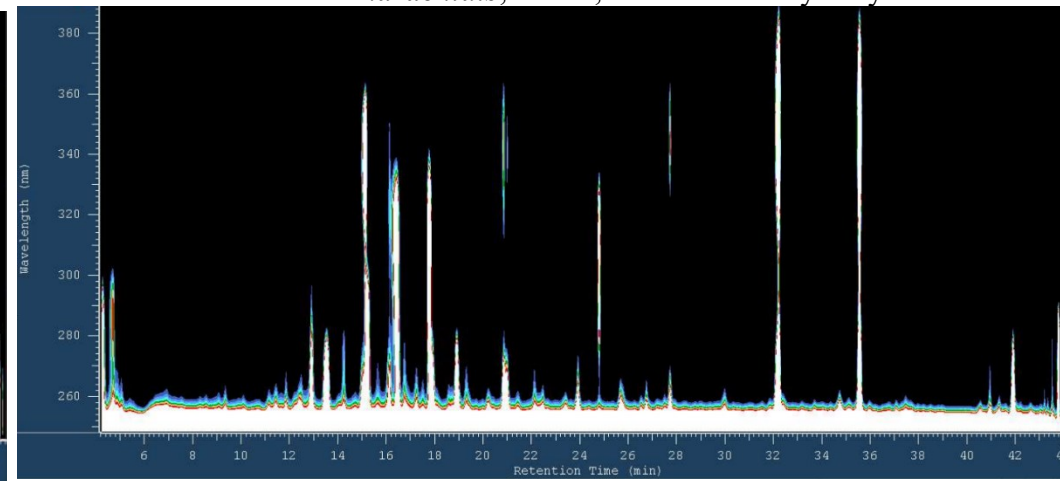
Inoculated with *B. arachidis*, low N, without alkaline hydrolysis



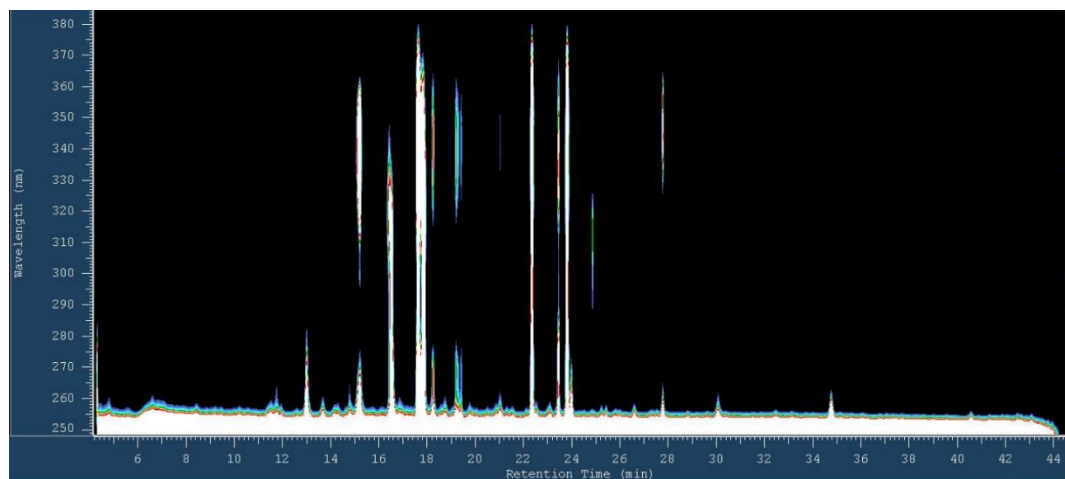
Inoculated with *B. arachidis*, low N, with alkaline hydrolysis



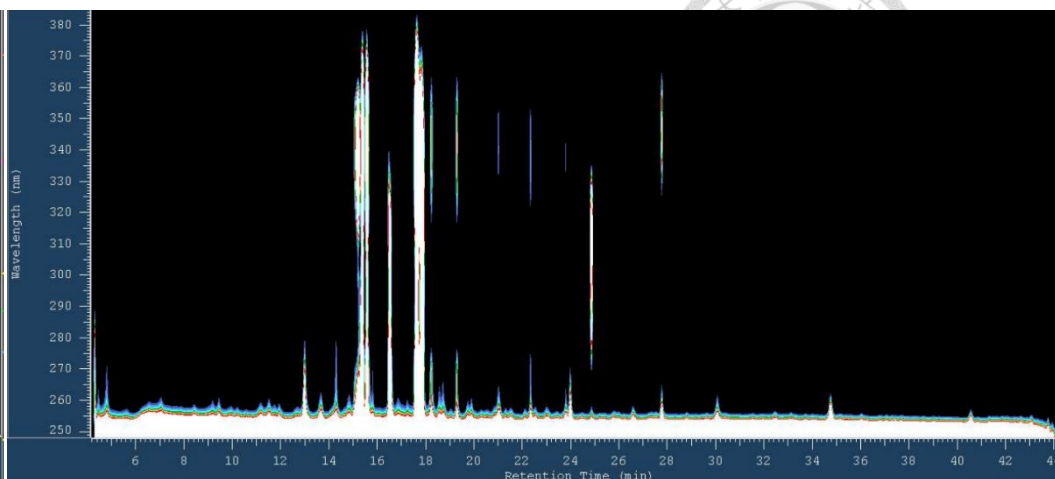
Inoculated with *B. elkanii*, low N, without alkaline hydrolysis



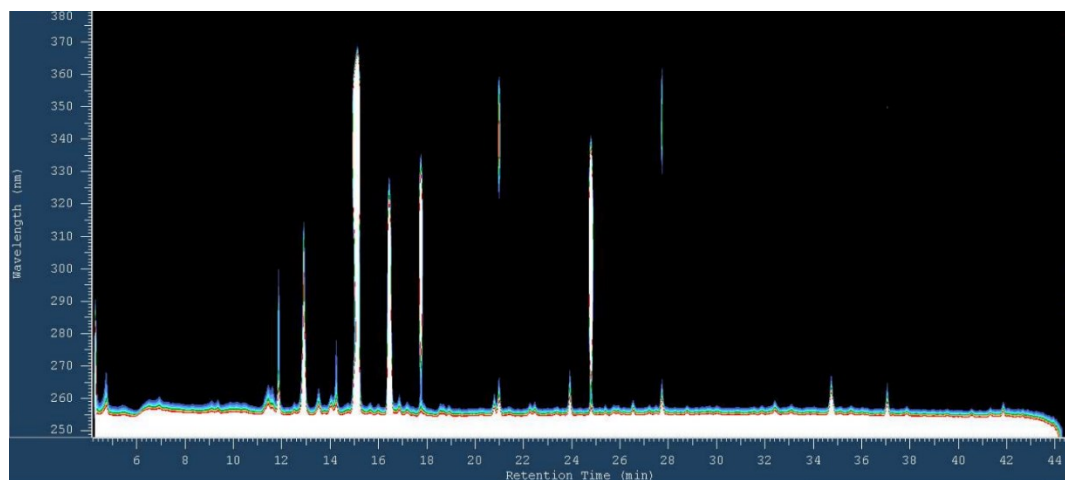
Inoculated with *B. elkanii*, low N, with alkaline hydrolysis



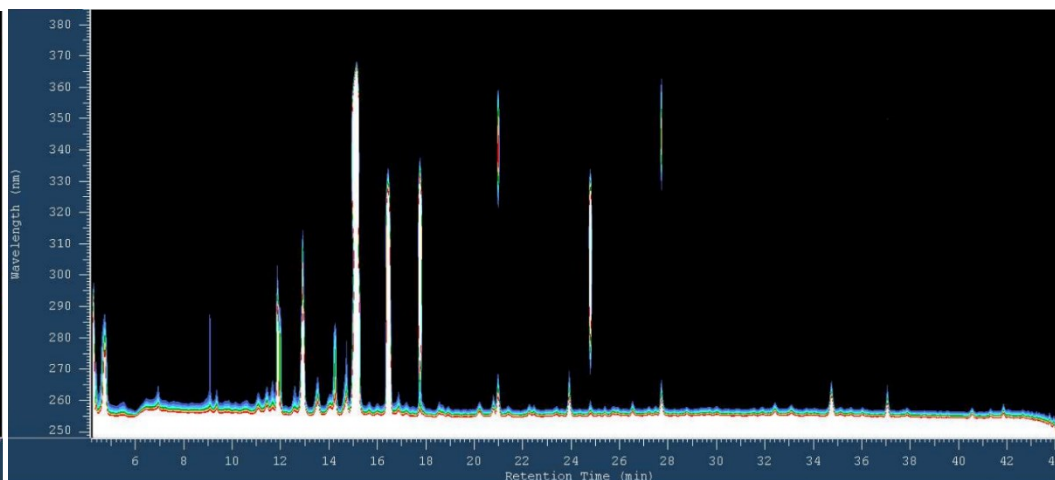
Inoculated with *B. japonicum*, low N, without alkaline hydrolysis



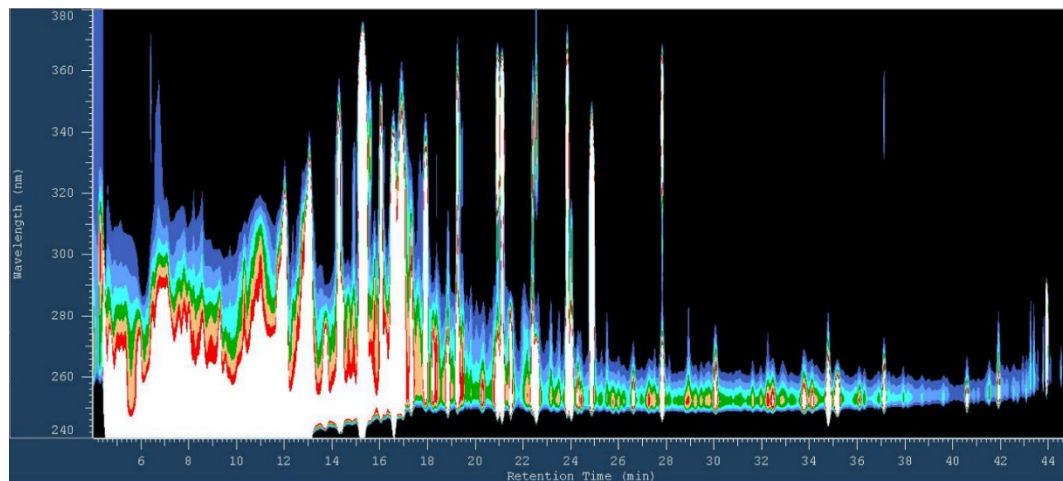
Inoculated with *B. japonicum*, low N, with alkaline hydrolysis



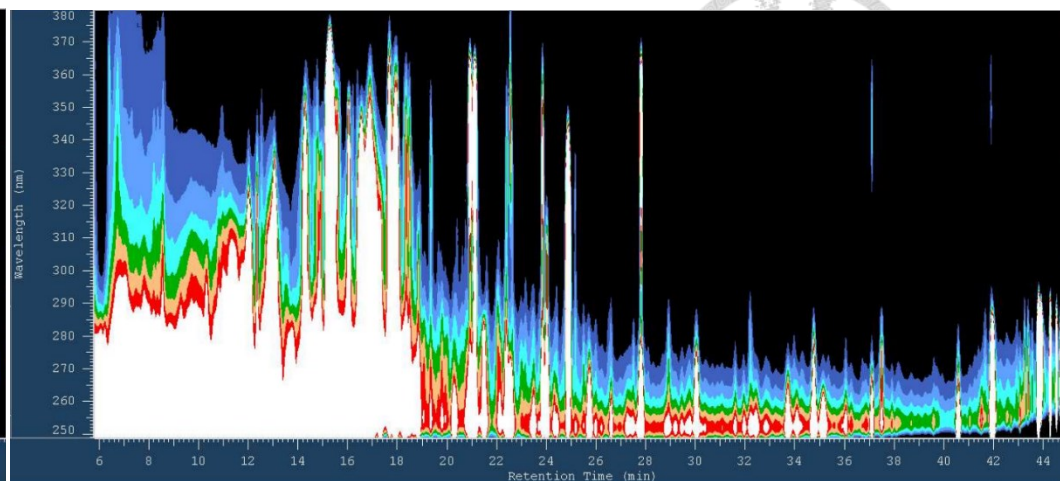
Inoculated with *E. fredii*, low N, without alkaline hydrolysis



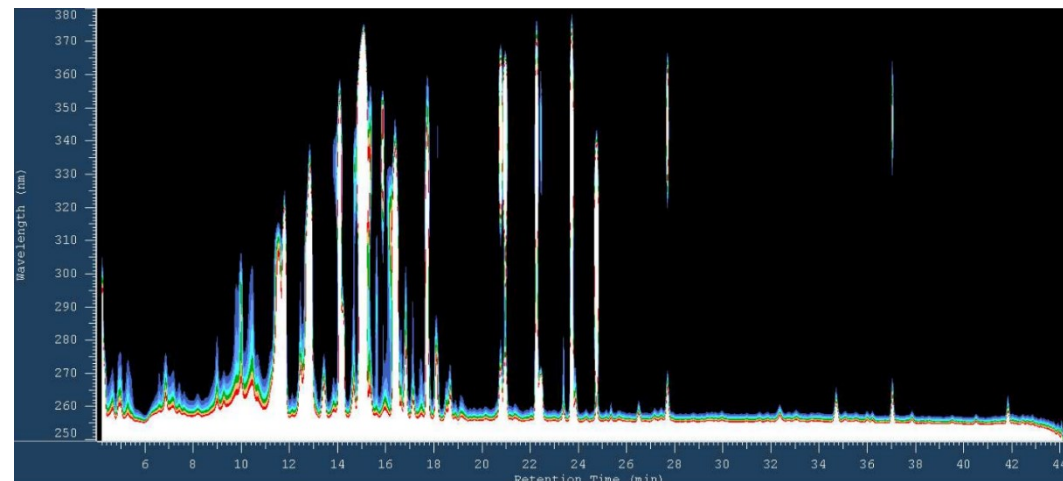
Inoculated with *E. fredii*, low N, with alkaline hydrolysis



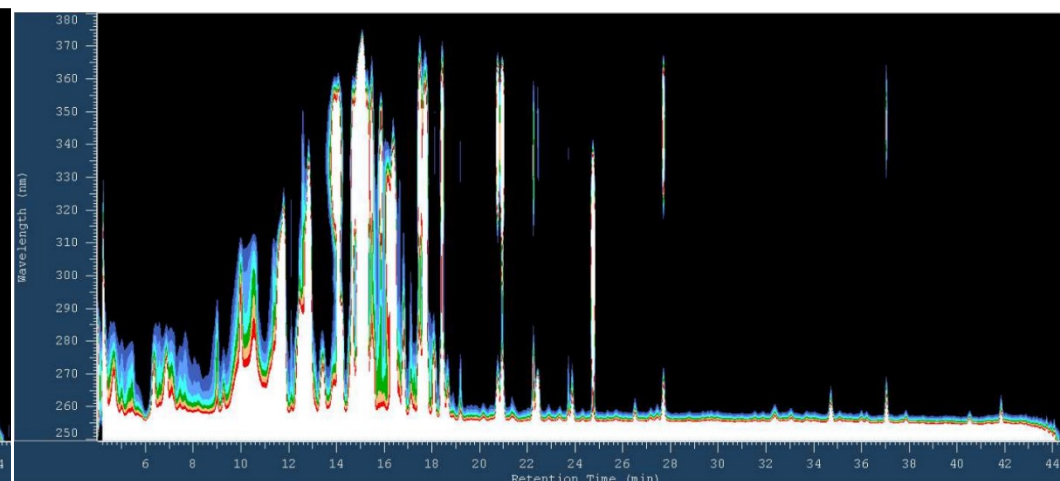
Inoculated with *B.arachidis*, high N, without alkaline hydrolysis



Inoculated with *B.arachidis*, high N, with alkaline hydrolysis



Inoculated with *E.fredii*, high N, without alkaline hydrolysis

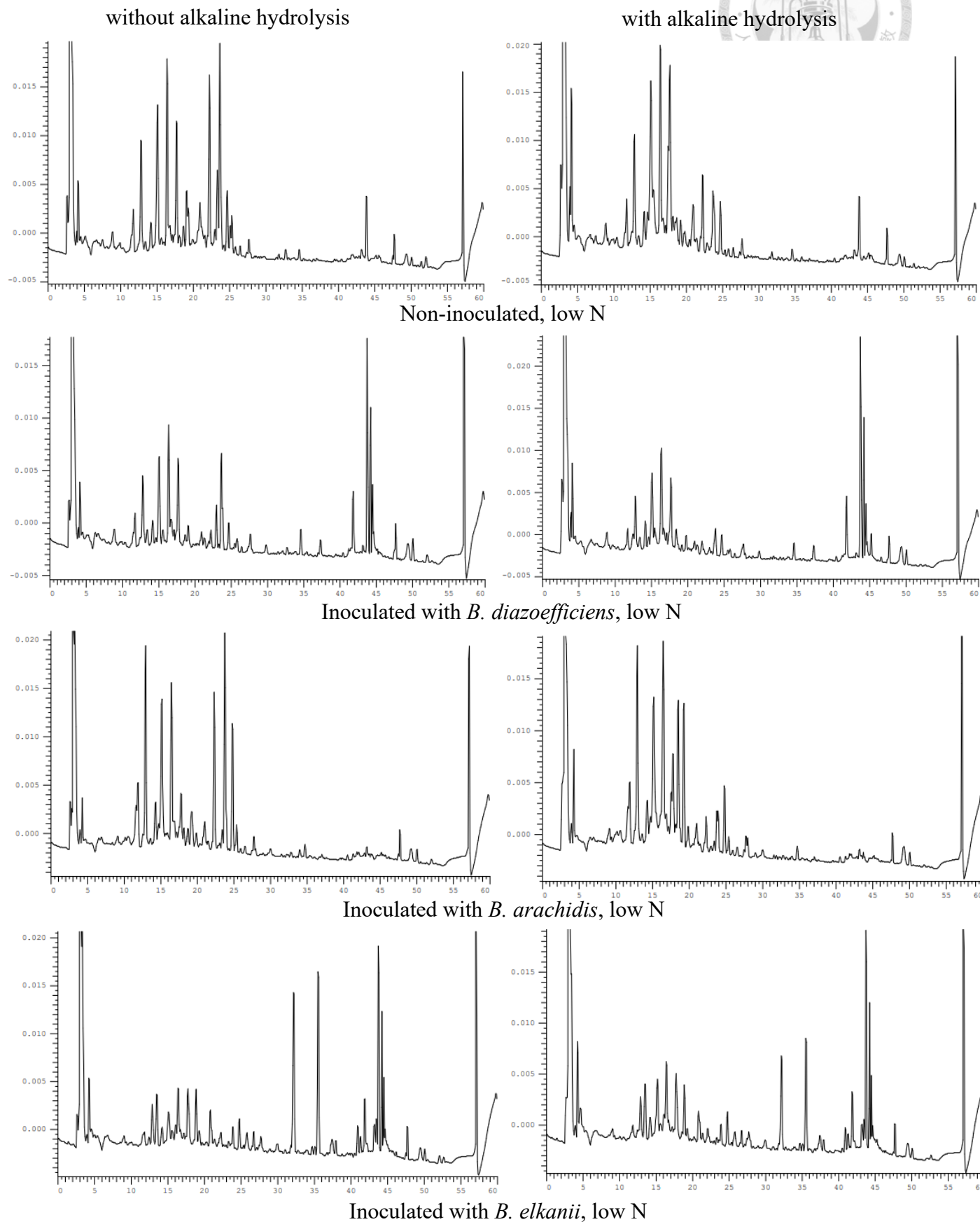


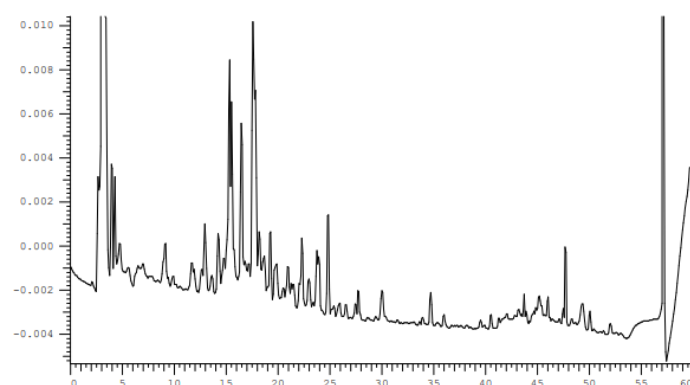
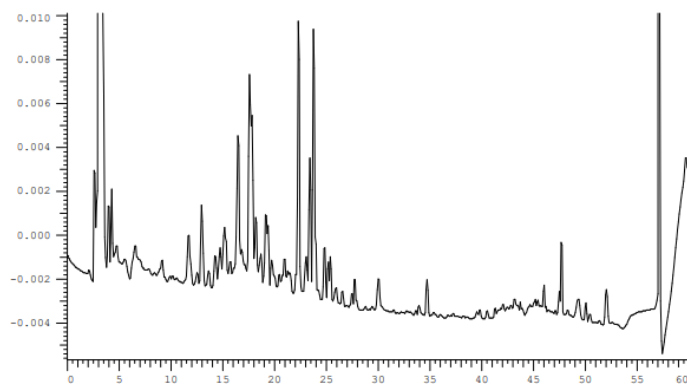
Inoculated with *E.fredii*, high N, with alkaline hydrolysis

附錄 十三、三吋盆實驗中，盆內栽培介質萃取物之 HPLC 層析圖 (275 nm)

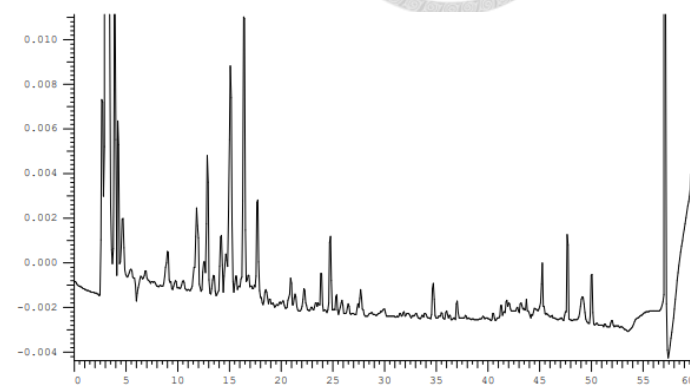
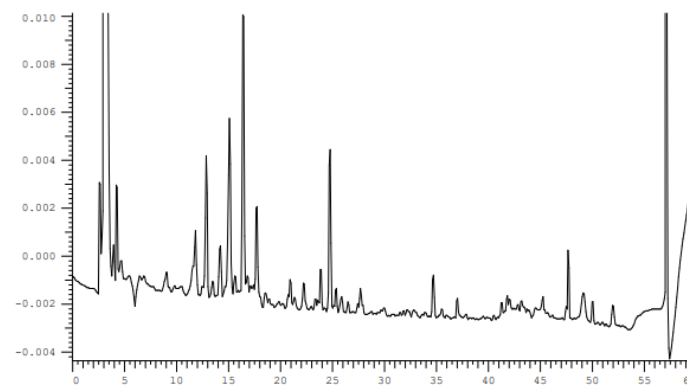
Appendix 13. HPLC chromatograms (275 nm) of growing medium extracts from the 3-inch pot experiment

X 軸為 retention time (min)，y 軸為 absorbance (AU)。

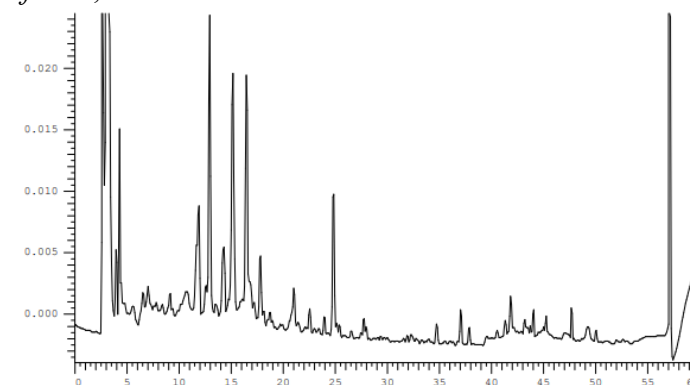
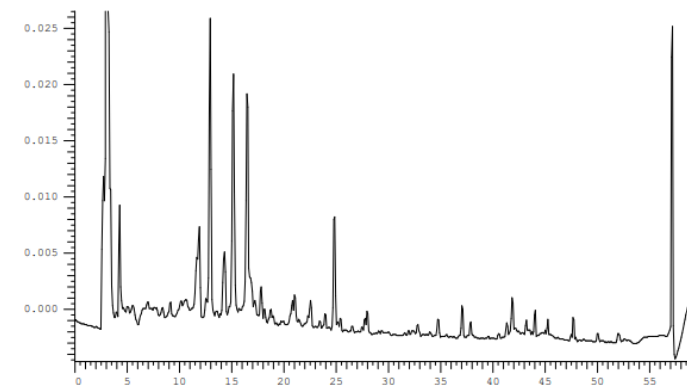




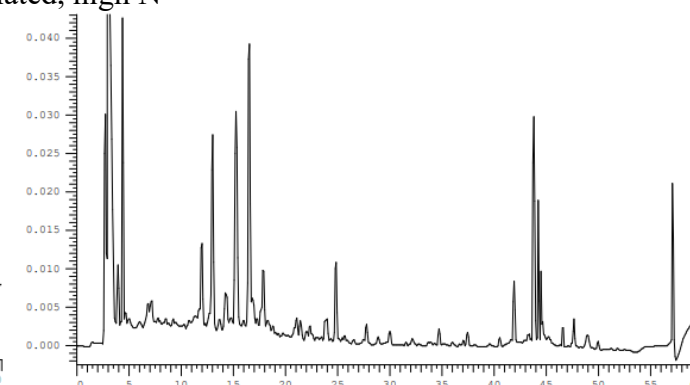
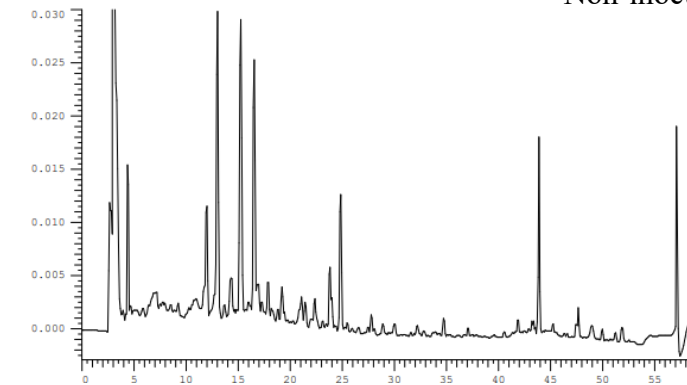
Inoculated with *B. japonicum*, low N



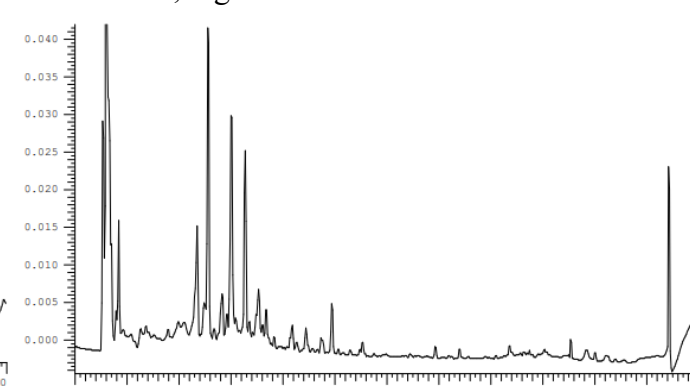
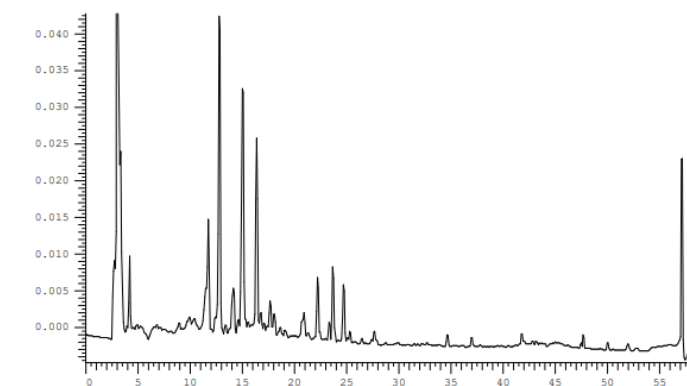
Inoculated with *E. fredii*, low N



Non-inoculated, high N



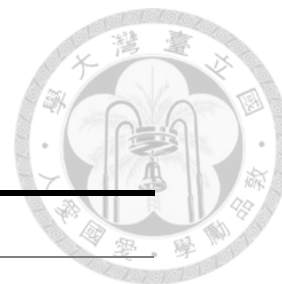
Inoculated with *B. arachidis*, high N



Inoculated with *E. fredii*, high N

附錄 十四、LC-MS 分析條件

Appendix 14. LC-MS analysis parameters



MS parameter	
Positive / Negative mode	Positive mode
LC parameter	
Mobile phase A	0.1% formic acid in H ₂ O
Mobile phase B	100% acetonitrile
Guard column	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm
Temperature	50°C

Gradient			
min	Flow Rate (mL min ⁻¹)	A (%)	B (%)
0	0.3	95	5
8	0.3	90	10
14	0.3	75	25
17	0.3	67	33
24	0.3	55	45
31	0.3	42	58
38	0.3	17	83
40	0.3	17	83
42	0.3	5	95
50	0.3	5	95
51	0.3	95	5
60	0.3	95	5
Total run time		60	

附錄 十五、LC-MS/MS 化合物鑑定

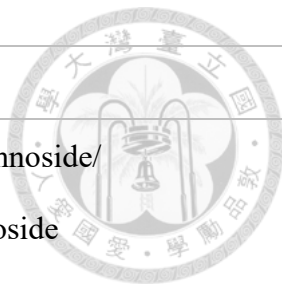
Appendix 15. LC-MS/MS compound identification



No.	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Fragment ions (m/z)	Possible aglycones	Suggested identity
Flavonoids					
1	6.55	579.17	255.06 > 417.12 > 297.06	Daidzein	Daidzein-4,7-diglucoside
2	11.20	417.12	255.06 > 199.07	Daidzein	Daidzin (Daidzein 7-O-glucoside)
3	12.75	417.12	255.06 > 297.07 > 199.07	Daidzein	Puerarin (Daidzein-8-C-glucoside)
4	15.95	255.06	199.07 > 227.06 > 237.05 > 181.06 > 153.07	Daidzein	Daidzein
5	9.10	593.15	269.04 > 431.09 > 311.05 > 241.05	Coumestrol	Not found in literature
R1	13.20	269.04	213.04 > 197.05 > 241.04	Coumestrol	Coumestrol-related fragment
6	14.00	431.09	269.04 > 241.04 > 197.05 > 213.04 > 311.05 > 225.05	Coumestrol	Coumestrin (Coumestrol 3-O-glucoside)



R2	16.65	269.04	197.06 > 213.05 > 241.04	Coumestrol	Coumestrol-related fragement
7	17.95	269.04	241.04 > 213.05 > 197.05 > 157.06 > 225.05	Coumestrol	Coumestrol
8	8.50	595.17	243.06 > 271.06 > 215.06	Genistein	Genistein diglucoside (Genistein 7,4'-di-O-glucoside)
9	13.25	433.11	215.06 > 243.06 > 271.05	Genistein	Genistin (Genistein 7-glucoside)
10	17.85	271.06	153.02 > 243.06 > 215.06 > 197.05 > 213.05 > 241.05 > 225.04	Genistein	Genistein
11	12.70 、 12.90	505.14	295.05 > 427.10 > 325.06 > 409.08 > 349.06 > 379.07 > 391.08 > 296.05 > 445.10	Apigenin	Related to apigenin C-glycosylated compound (van Dooren et al., 2018) *UN only
12-1	12.90	433.11	313.07 > 283.06 > 397.09 > 415.10 > 337.07 > 379.08	Apigenin	Vitexin / Isovitexin
12-2	13.00	433.11	283.06 > 313.07 > 337.07 >	Apigenin	Vitexin / Isovitexin



			379.08		
13	13.20	579.17	313.06 > 433.11 > 415.10 > 295.05 > 379.08 > 337.06 > 367.08 > 283.05 > 397.09 > 325.06	Apigenin	Isovitexin 2"-O-rhamnoside/ Vitexin 2"-O-rhamnoside *Abundant in UAL
14	14.50	433.17	313.07 > 283.05 > 337.07	Apigenin	Vitexin / Isovitexin *only found in UAL
15	15.30	433.12	313.07 > 397.09 > 283.06 > 415.09	Apigenin	Isovitexin / Vitexin *only found in UAL
R3	8.80	Fragments in MS ¹		Calycosin / Biochanin A	Biochanin A diglucoside
R4	12.30	Fragments in MS ¹		Calycosin / Biochanin A	Biochanin A-7-O-glucoside
16	16.45	285.07	270.05 > 253.04 > 225.05	Calycosin / Biochanin A	Biochanin A
17	6.80	611.18	287.05 > 449.10	Luteolin / Kaempferol	Luteolin diglucoside / Kaempferol diglucoside
18	12.60	639.17	449.10 > 431.09 > 329.06 > 383.07 > 413.08	Luteolin / Kaempferol	Orientin (Luteolin-8-C-glucoside) related compound



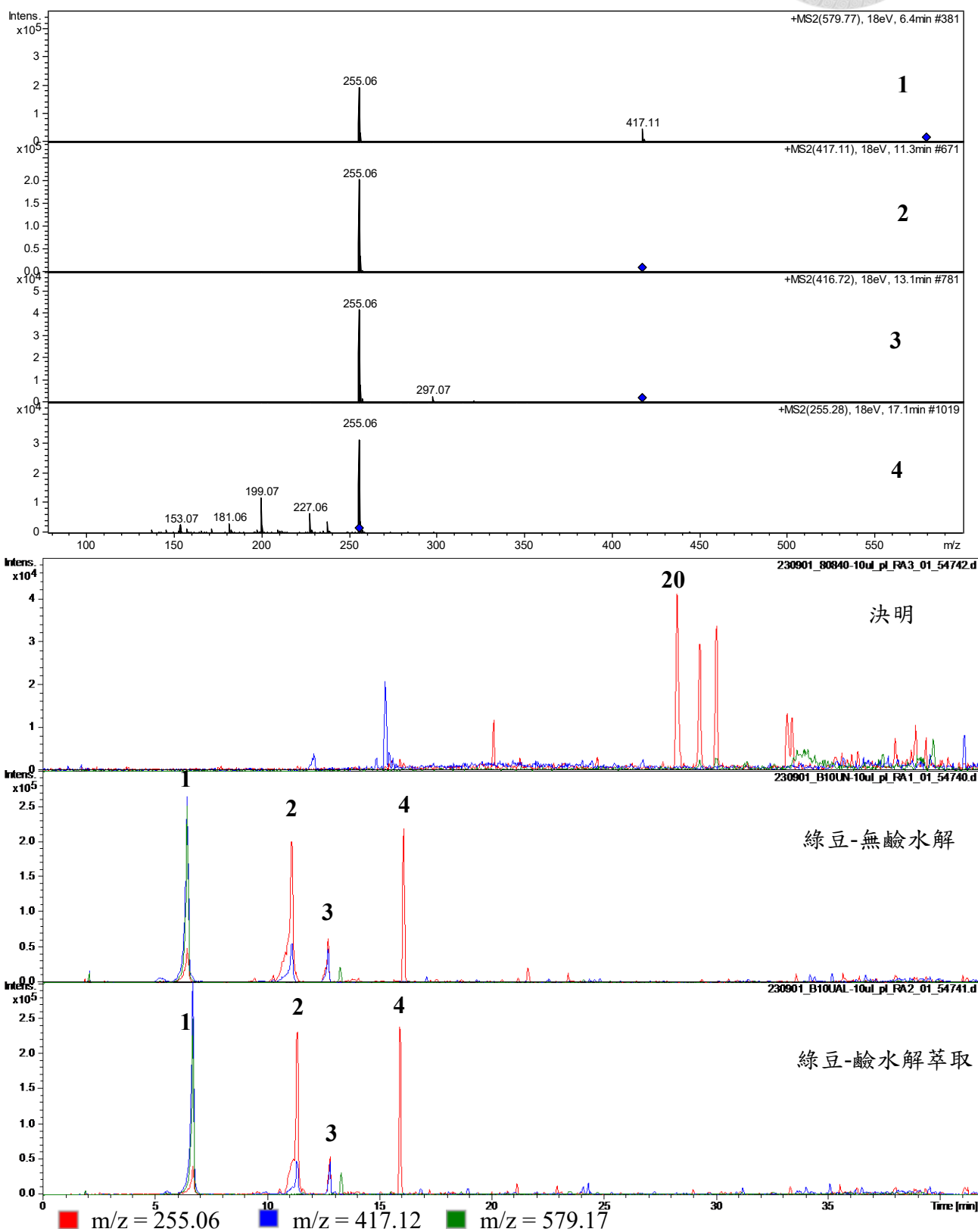
Anthraquinones					
19	24.45	271.06	229.04 > 197.05 > 201.05 > 225.05 > 158.10 > 253.05	Emodin	
20	28.40	255.06	227.06 > 209.06 > 181.06 > 237.05	Chrysophanol	
Saponin					
21	20.65	943.56	441.37 > 423.36 > 599.40 > 309.11 > 323.09	Soyasapogenol B	Soyasaponin I
Lipids					
22	22.05	302.30	284.29 > 258.26 > 191.11 > 240.26 > 186.09		2,2'-(Tetradecylimino)diethanol
23	24.60	518.32	184.07 > 207.09 > 242.27 > 189.09 > 295.10 > 258.10		LPC 18:3
24	25.15	518.32	184.07 > 258.11 > 500.32 > 335.25		LPC 18:3



25	25.75	494.32	184.07 > 494.32 > 476.31 > 258.10 > 311.25		LPC 16:1
26	26.50	520.37	184.07 > 285.21 > 258.11		LPC 18:2
27	27.00	520.34	184.07 > 258.10 > 502.33 > 337.27 > 270.31		LPC 18:2
28	27.60	496.36	184.07 > 407.27 > 391.26 > 258.10		LPC 16:0
29	28.30	496.34	184.07 > 478.33 > 313.27 > 258.10		LPC 16:0
30	28.60	522.35	184.07 > 258.11 > 504.55 > 339.28		LPC 18:1
31	29.25	522.36	184.07		LPC 18:1
32	30.80	536.37	184.07 > 518.34 > 258.11 > 216.08		LPC 19:1
33	31.30	536.37	184.07 > 518.36 > 258.10 > 353.30		LPC 19:1

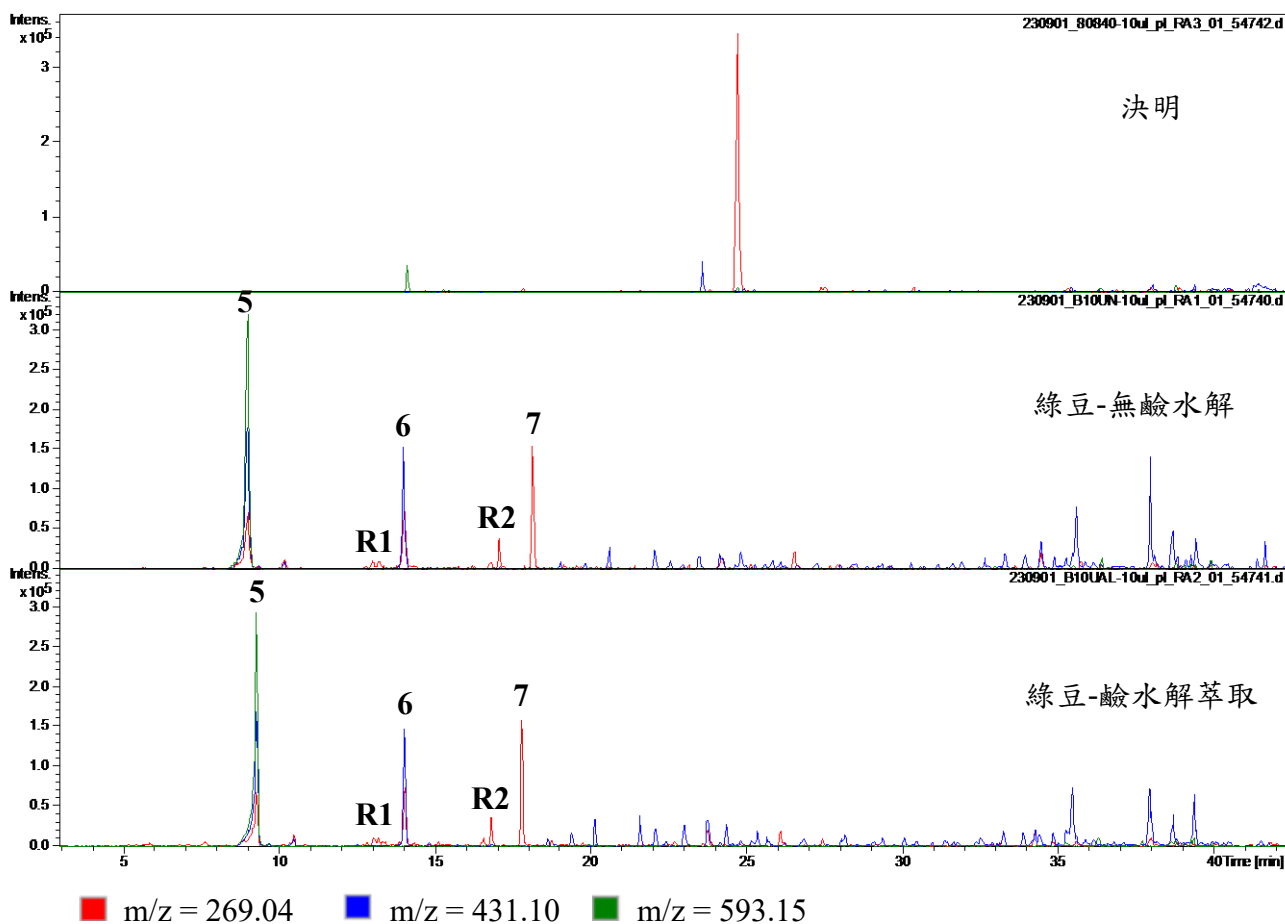
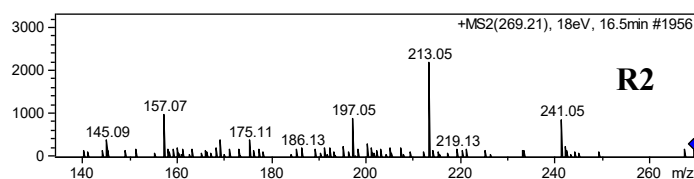
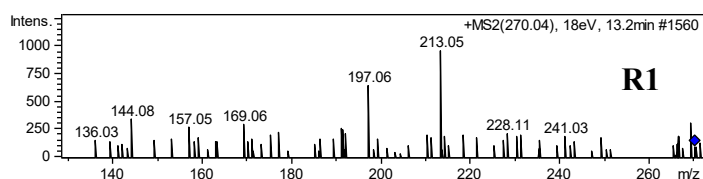
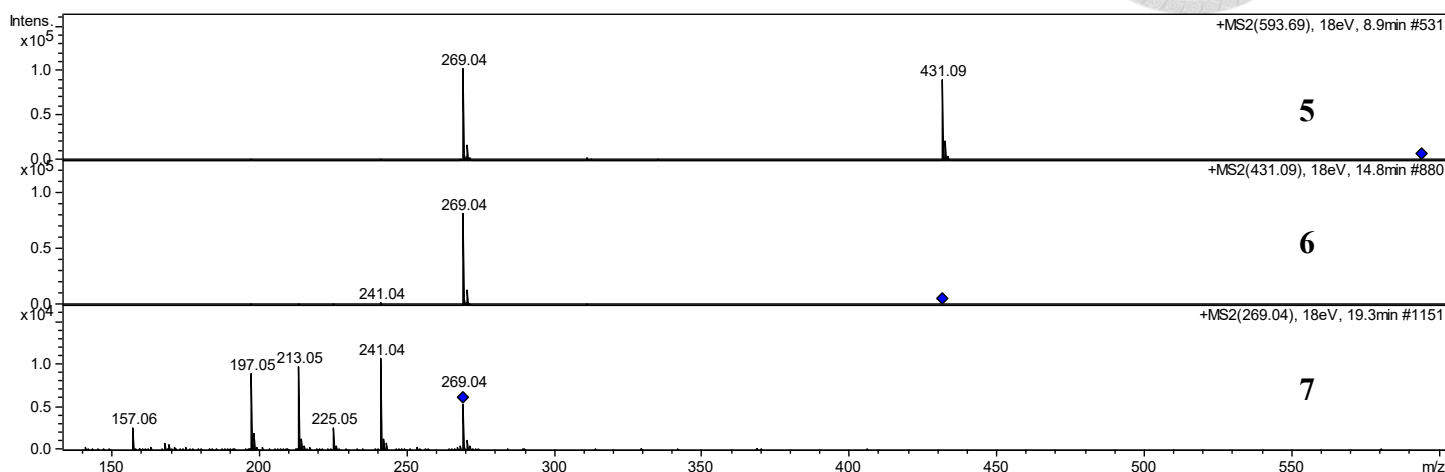
附錄 十六、Daidzein 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

Appendix 16. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of compounds related to daidzein



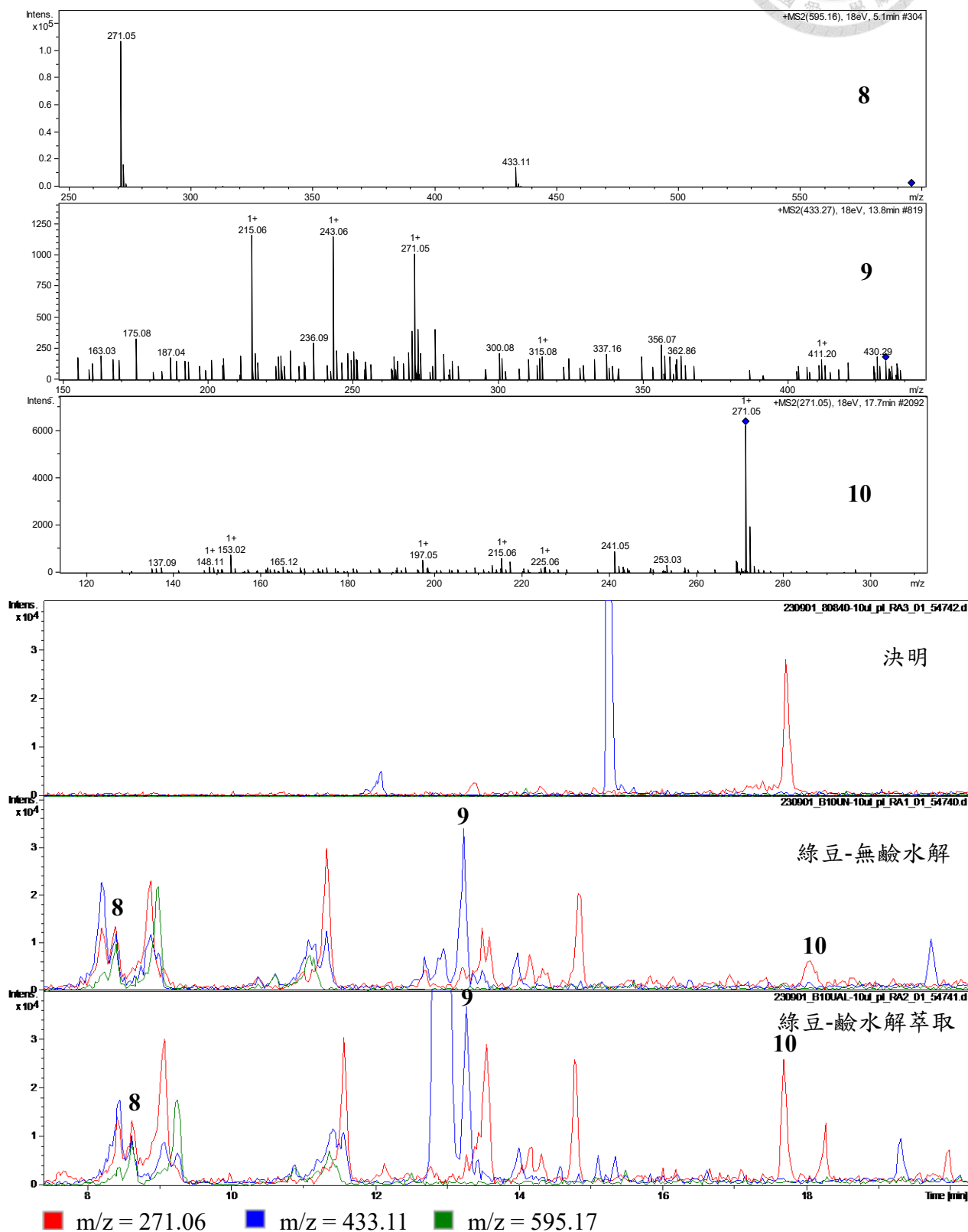
附錄 十七、Coumestrol 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

Appendix 17. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of compounds related to coumestrol



附錄 十八、Genistein 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

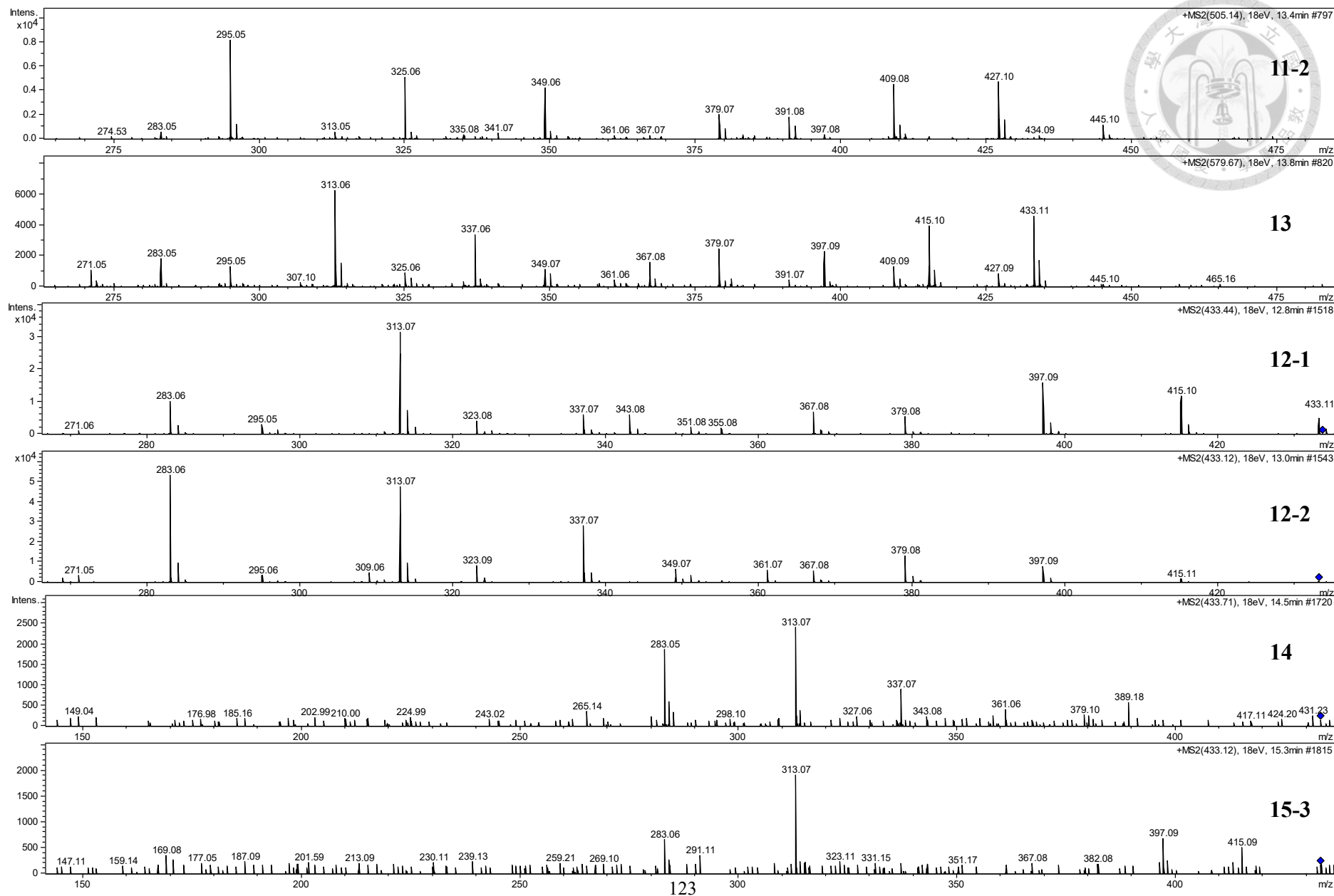
Appendix 18. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of compounds related to genistein



Note: Compound 9 & 13 share the same 433.11 m/z peak.

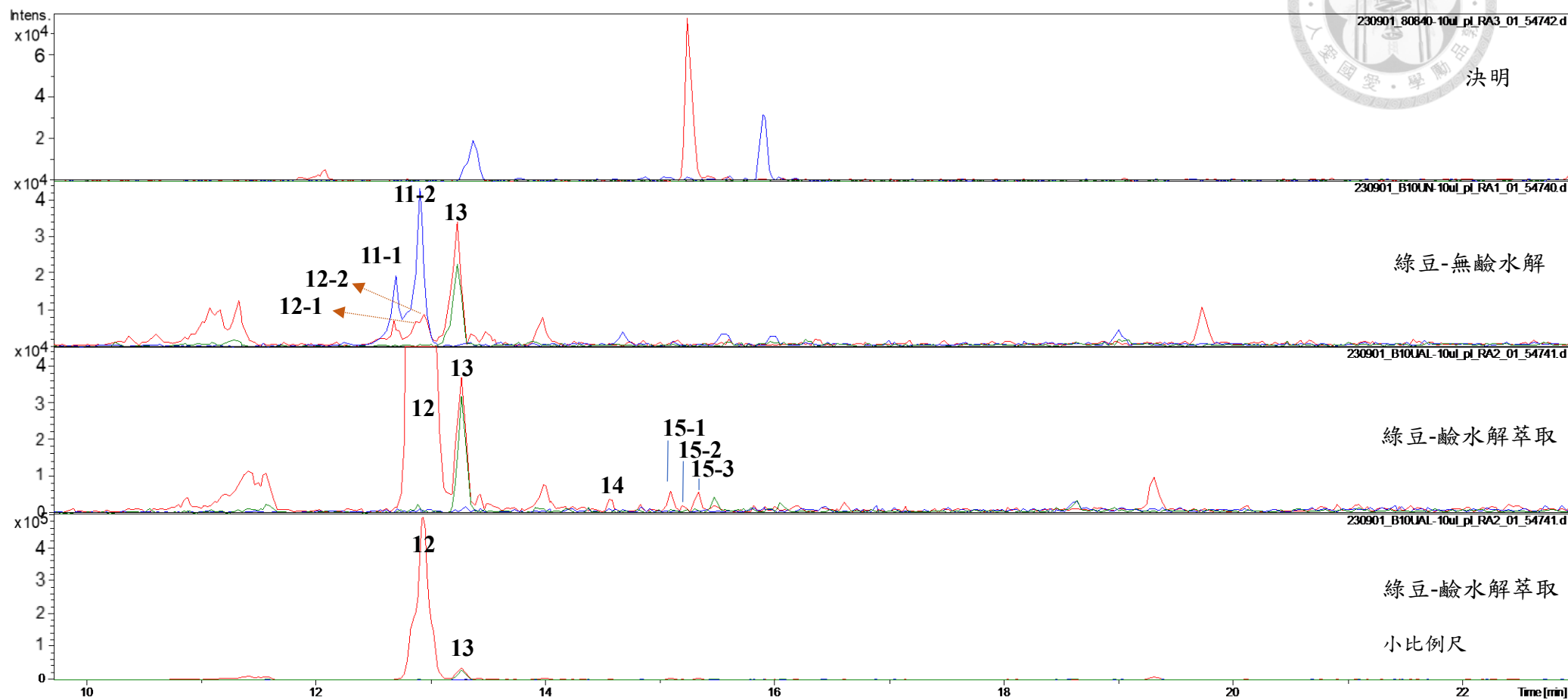
附錄 十九、Vitexin 和 isovitexin 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

Appendix 19. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of compounds related to vitexin and isovitexin





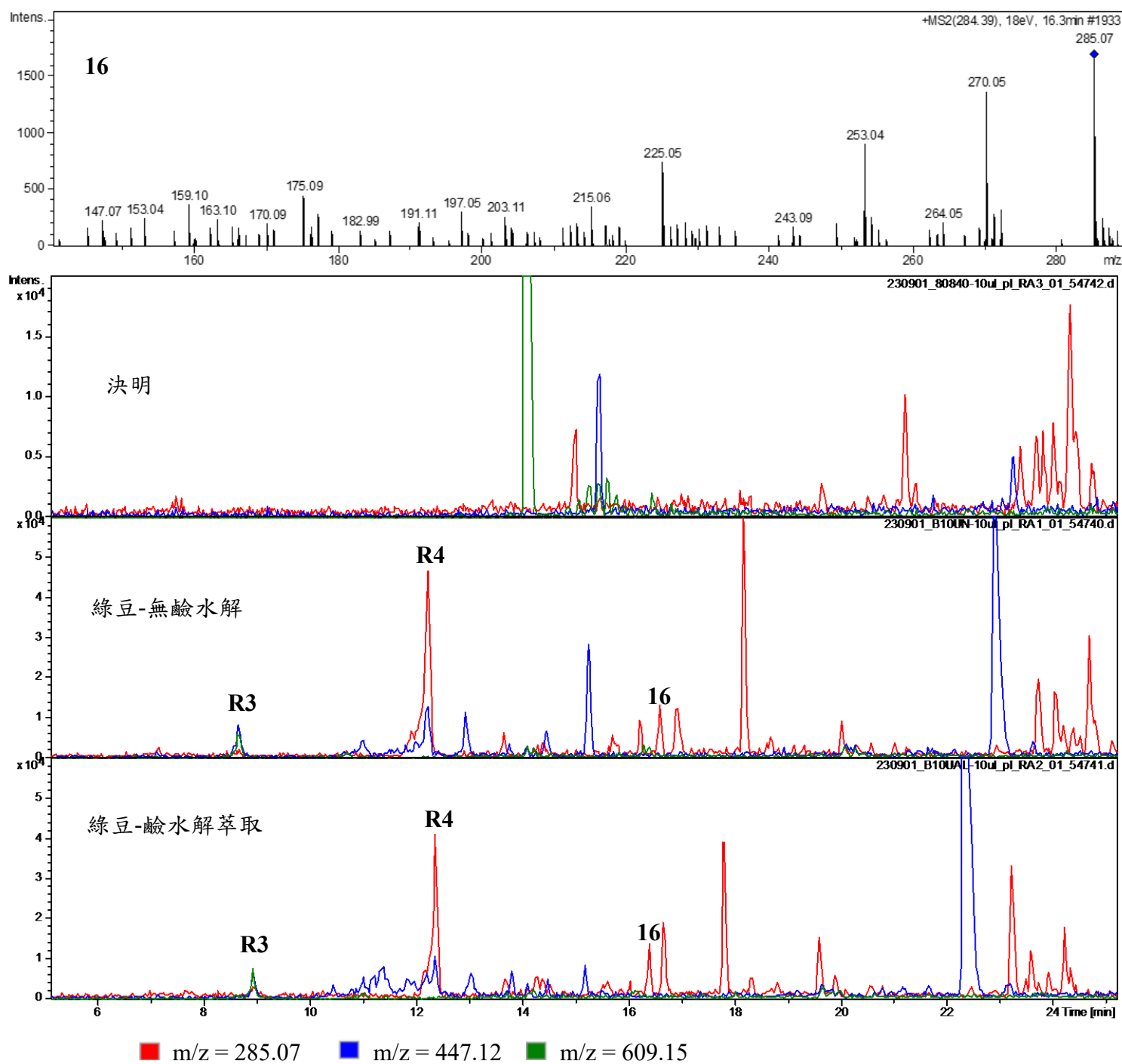
■ $m/z = 433.12$ ■ $m/z = 505.14$ ■ $m/z = 579.16$



Note: Compound 9 & 13 share the same 433.12 m/z peak.

附錄 二十、Calycosin 或 biochanin A 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

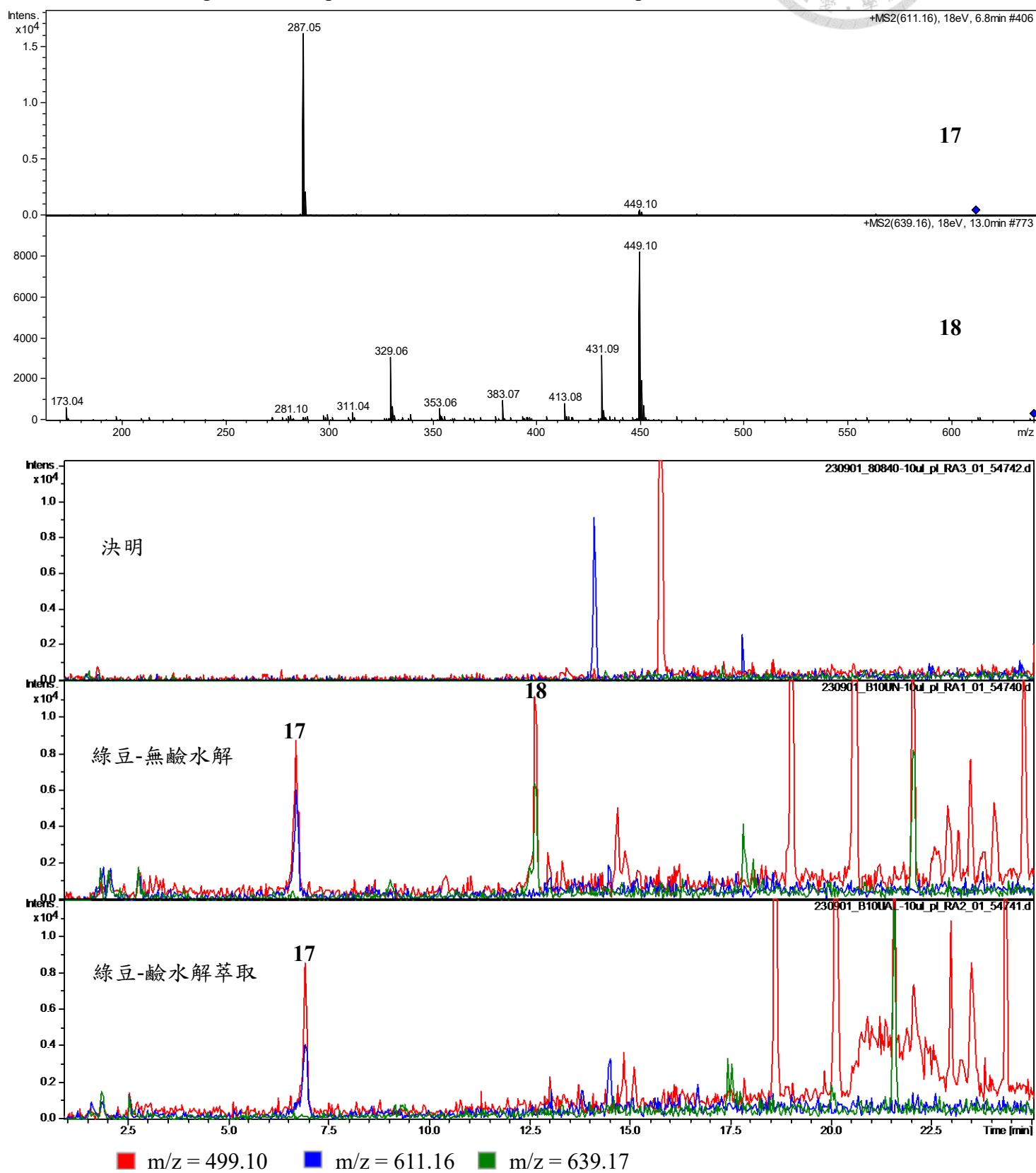
Appendix 20. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of compounds related to calycosin or biochanin A



附錄 二十一、Luteolin 或 kaempferol 相關化合物的串聯質譜和相應的萃取離子層析圖

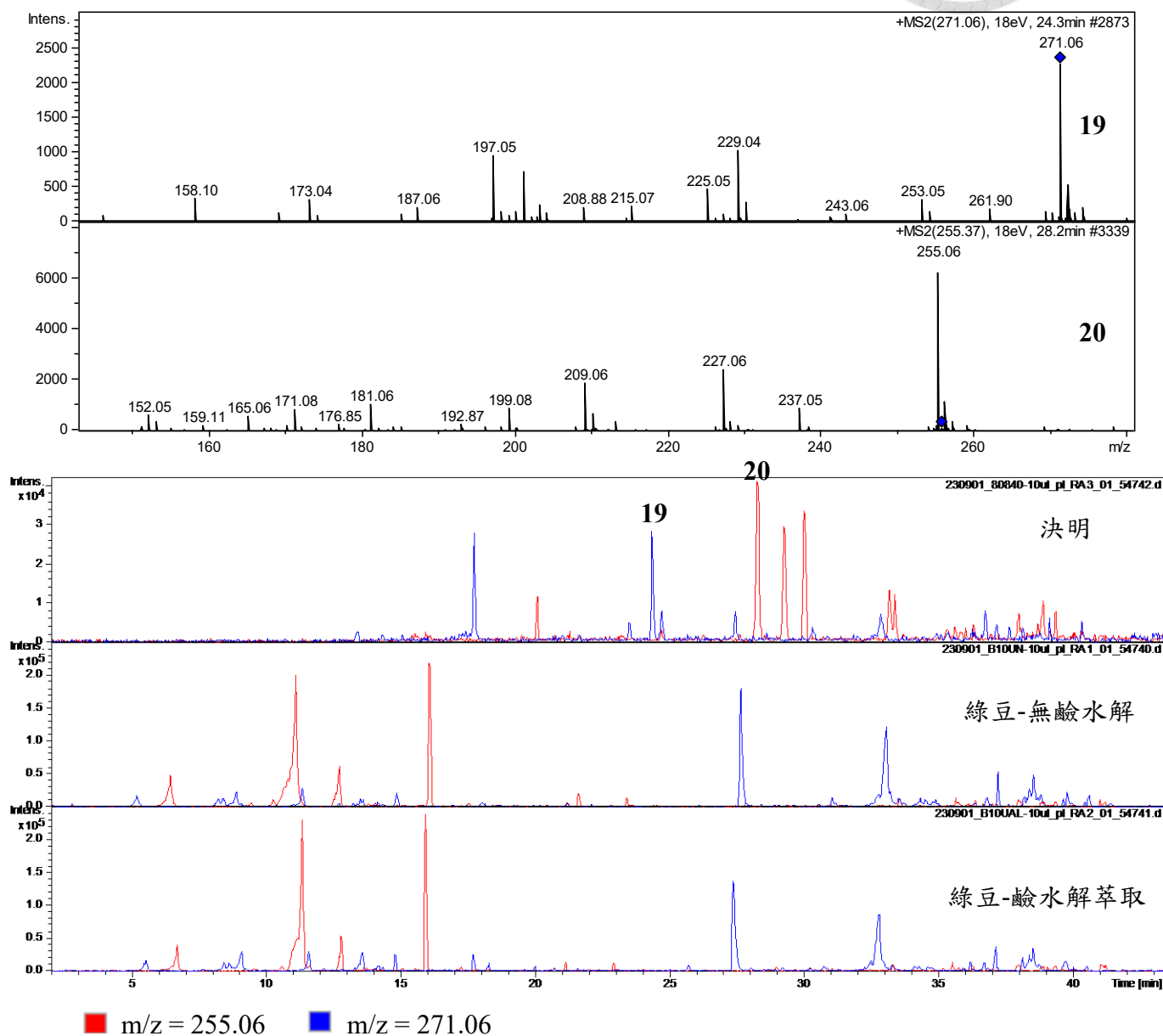
Appendix 21. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion

chromatograms of compounds related to luteolin or kaempferol



附錄 二十二、蒽醌化合物的串聯質譜及其相關的萃取離子層析圖

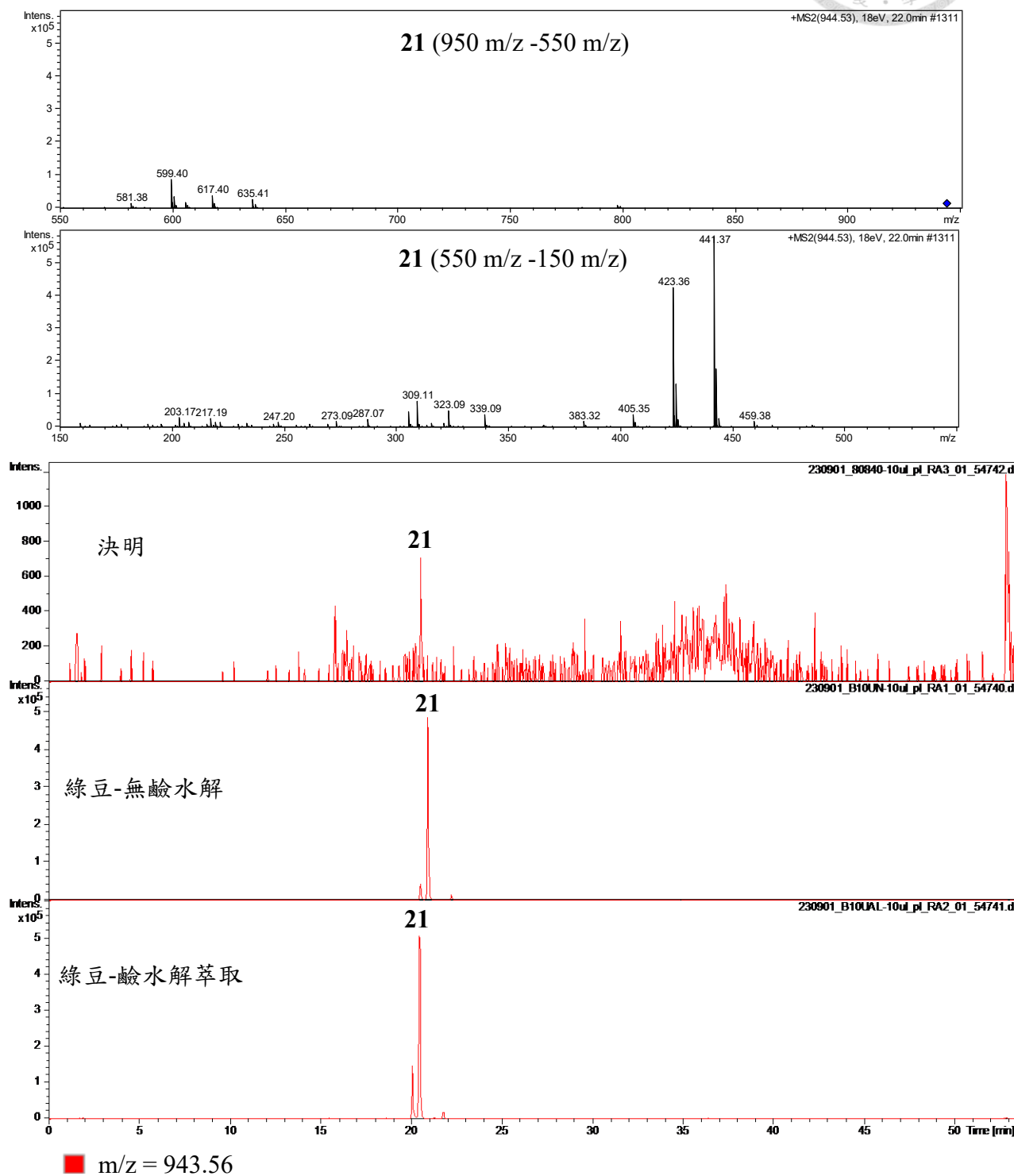
Appendix 22. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of anthraquinone compounds





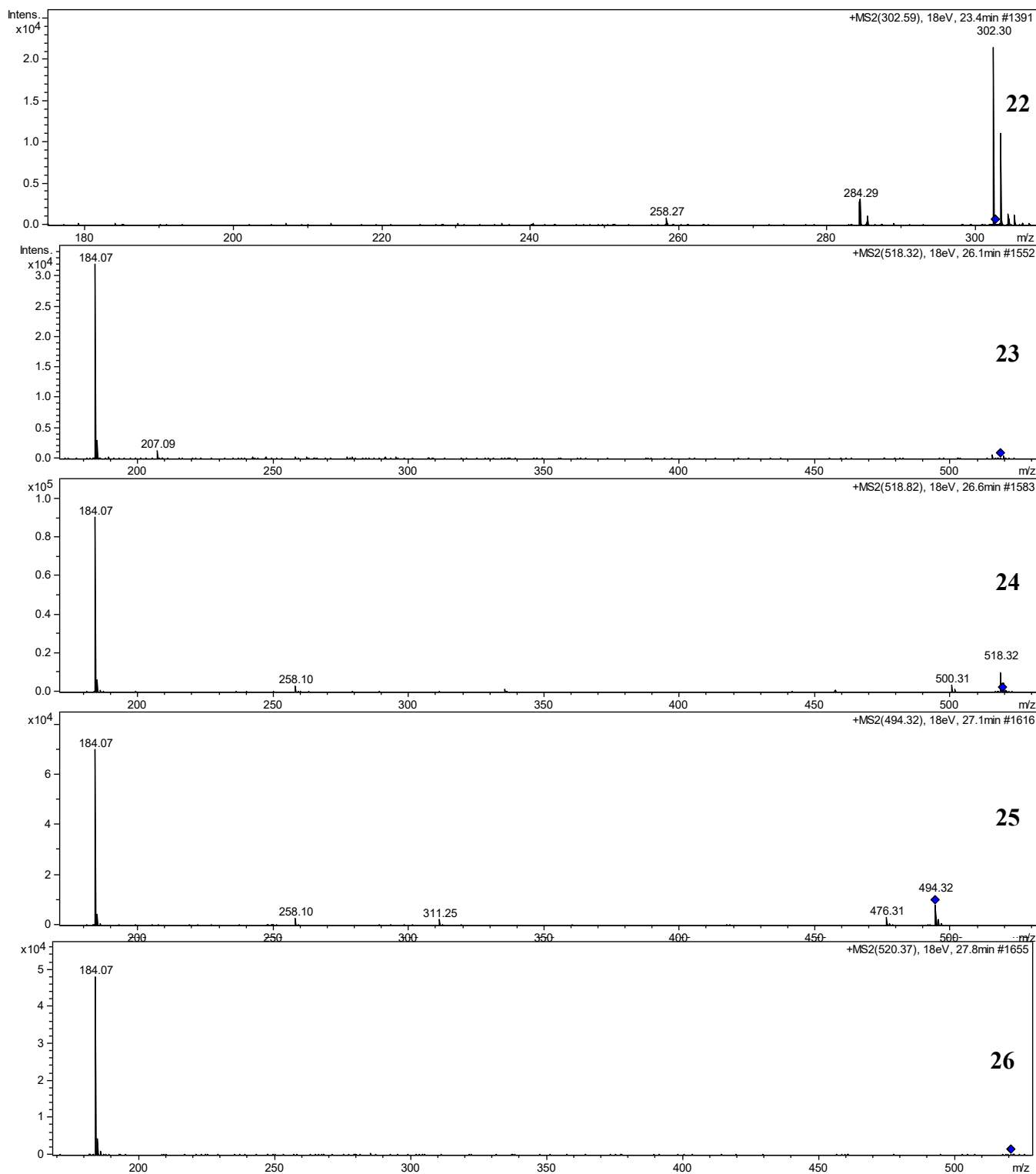
附錄 二十三、皂苷的串聯質譜及其相關的萃取離子層析圖

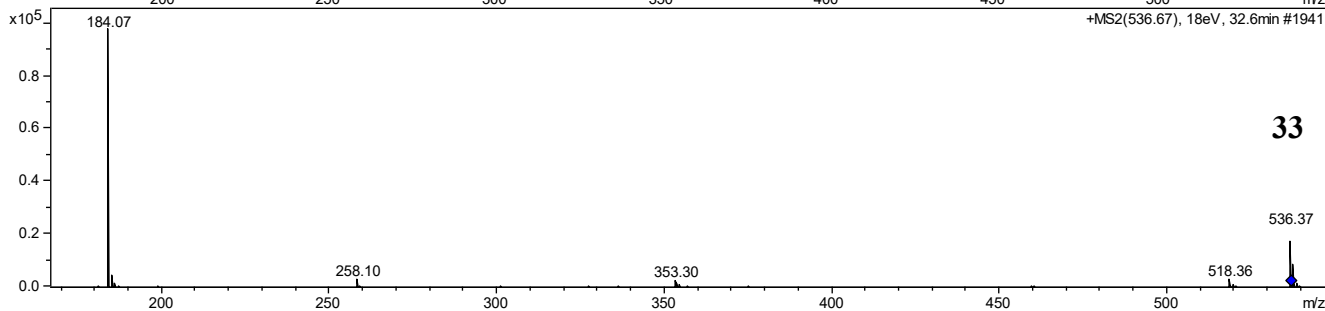
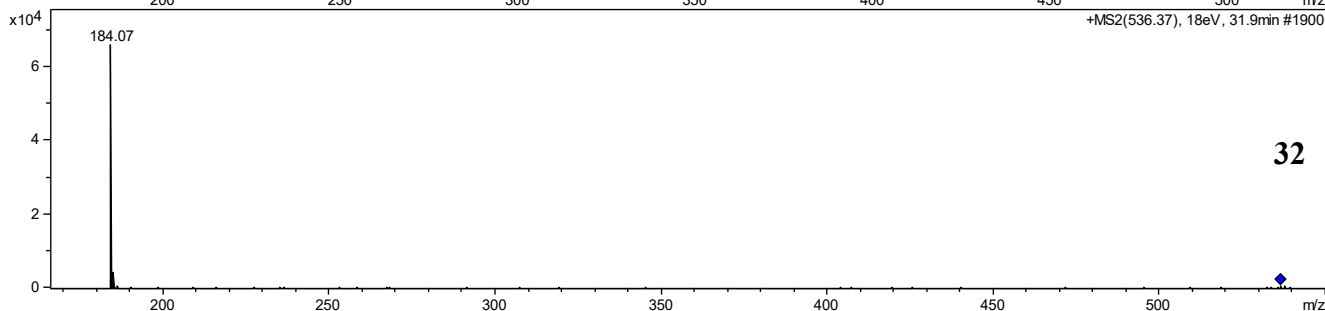
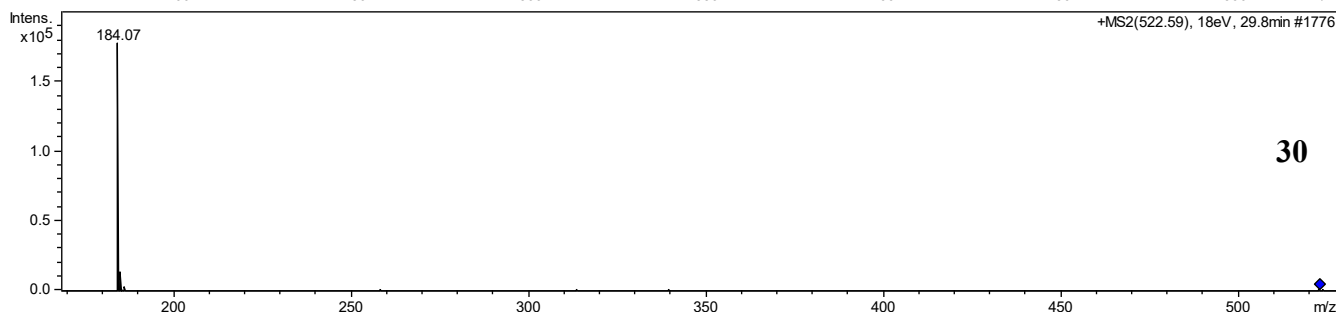
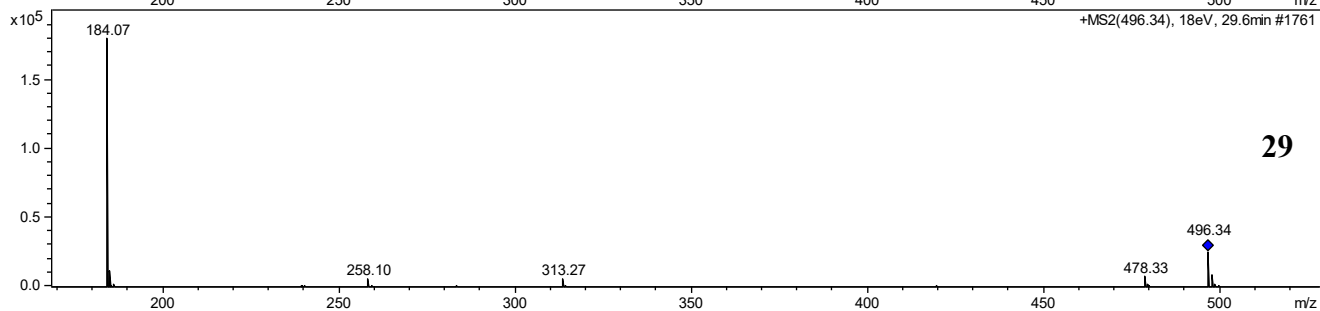
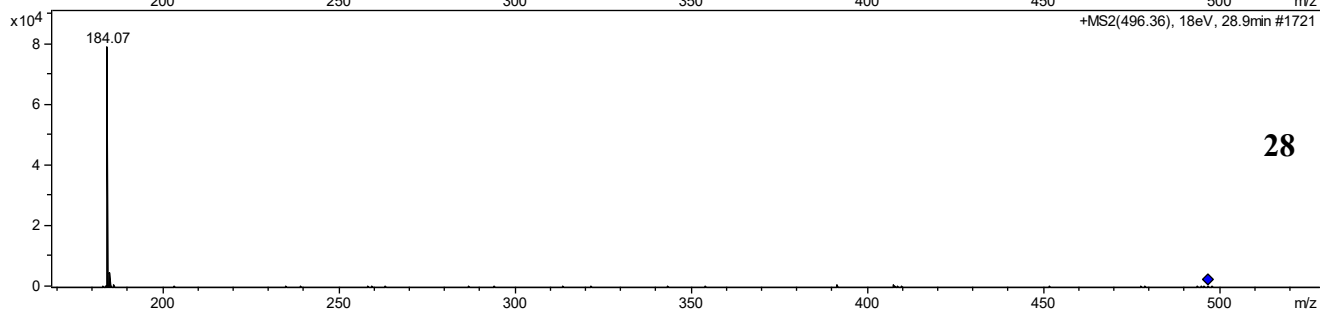
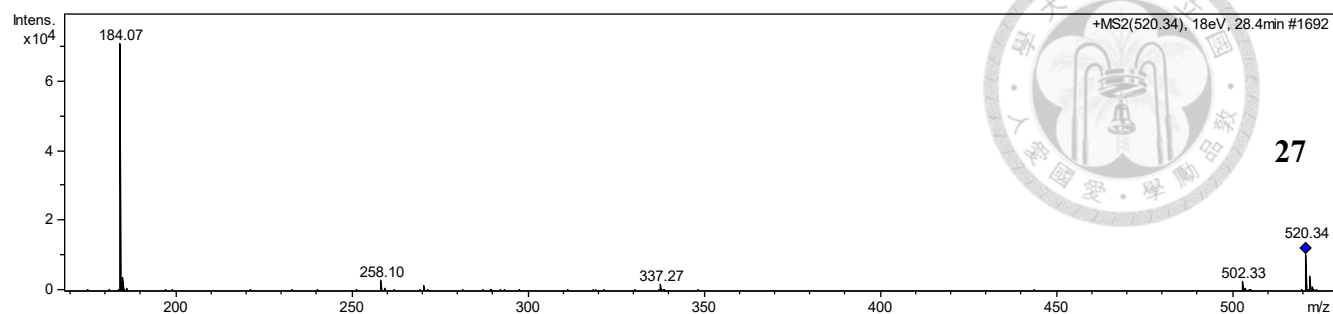
Appendix 23. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of the saponin compound

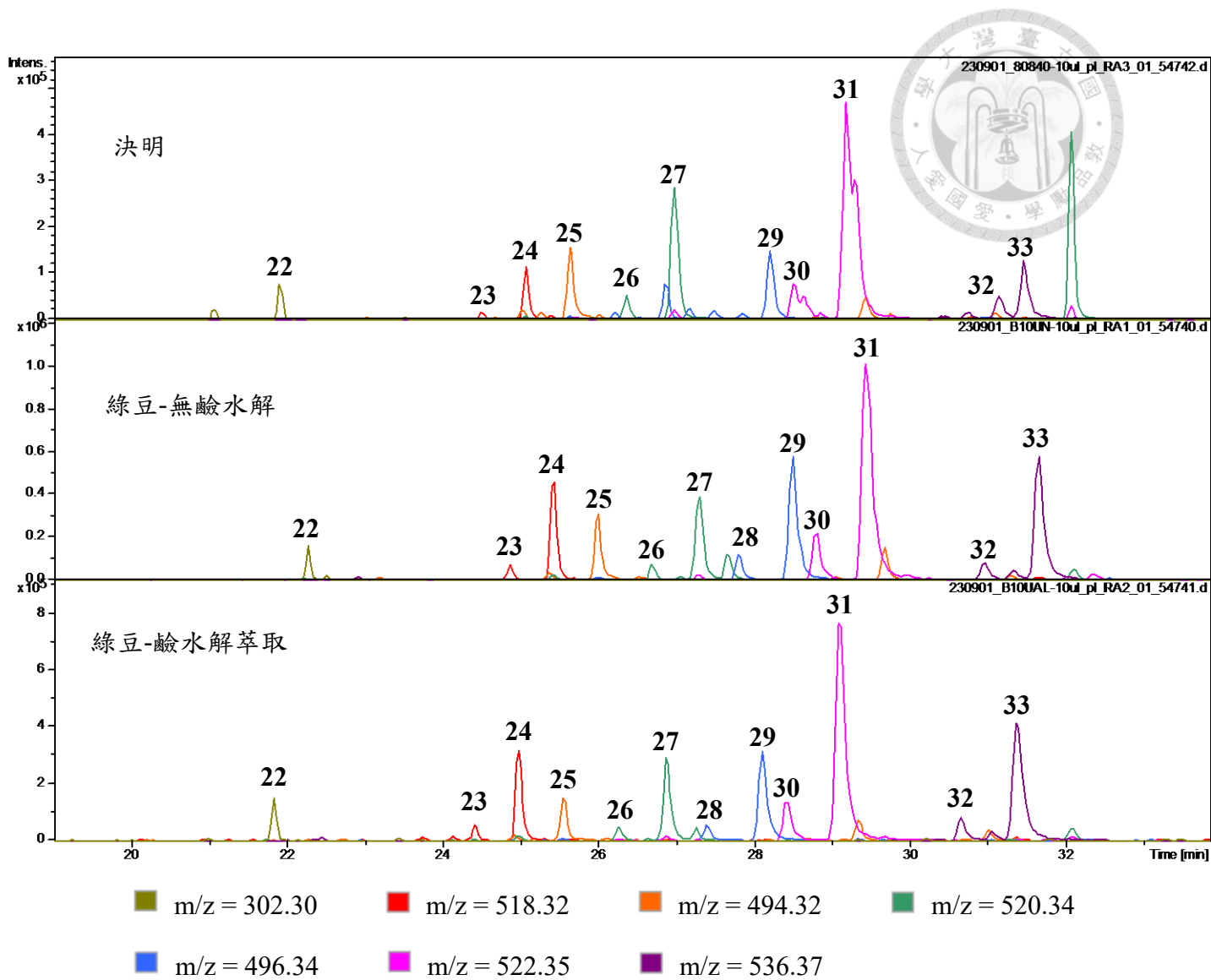


附錄 二十四、脂質化合物的串聯質譜及其相關的萃取離子層析圖

Appendix 24. Tandem mass spectrometry and corresponding extracted ion chromatograms of lipid compounds



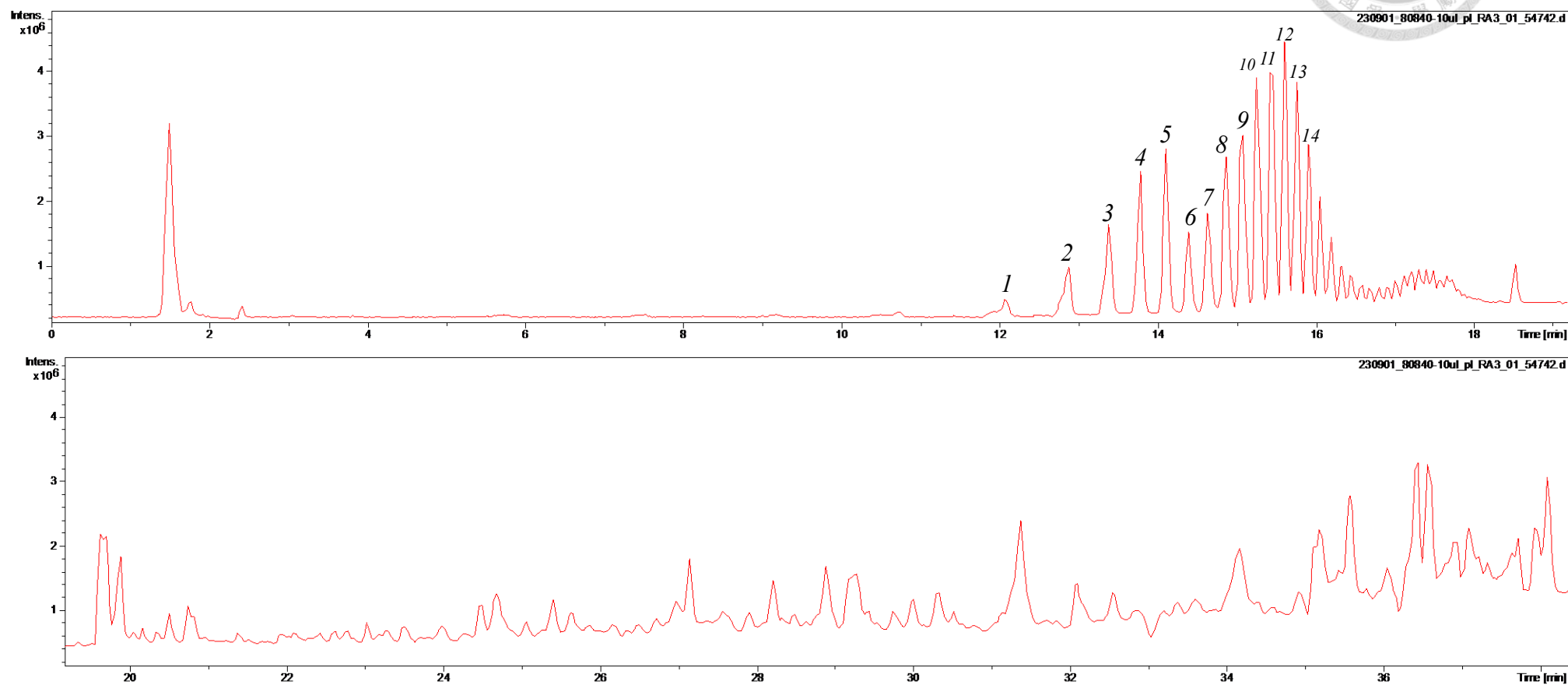






附錄 二十五、決明介質萃取物之 LC-MS 總離子層析圖

Appendix 25. Total ion chromatogram of *S. tora* media extract





上圖斜體標註的一次 MS 代表性化合物

標號	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	
<i>1</i>	415.25	432.28	437.23
<i>2</i>	459.28	476.31	481.26
<i>3</i>	503.31	520.34	525.29
<i>4</i>	547.34	564.37	569.32
<i>5</i>	591.37	608.40	613.35
<i>6</i>	635.39	652.42	657.37
<i>7</i>	679.42	696.45	701.40
<i>8</i>	723.45	740.48	745.43
<i>9</i>	767.47	784.50	789.45
<i>10</i>	811.50	828.53	833.48
<i>11</i>	855.53	877.52	877.51
<i>12</i>	899.54	916.58	921.52
<i>13</i>	943.57	960.61	965.55
<i>14</i>	超過偵測範圍		

(m/z)

由斜體字 *1~14* 的一次 MS 圖譜推測，種植決明的介質萃取物中 retention time 12~16 分鐘的化合物可能是 spidamine 類的化合物。

附錄 二十六、LC-MS 之總離子層析圖

Appendix 26. Total ion chromatograms of LC-MS analysis

