

# 2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060001

參展科別 植物學

作品名稱 喝ㄋㄟㄋㄟ的植物長得好？！

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 國立臺南第一高級中學

指導教師 陳柏文、鄭楷騰

作者姓名 張瑄芳、毛楷維

關鍵詞 牛奶、胺基酸、生物逆境

## 作者簡介



君不見，黃河之水天上來，奔流到海不復回。

白駒過隙，時間如潺潺流水帶走了歲月。我是來自台南一中三年級的張瑄芳，三年高中生涯，從一開始生物課的奇想，經歷在實驗室擺長的研究時間，以及在電腦前與海報和報告書的奮鬥，終於到了最後關頭。何其有幸能擠過窄門，進入多少夢寐以求的國際科展殿堂。沿途的風風雨雨，奮鬥與努力，都要感謝指導老師們以及隊友的一路相伴，讓我有機會在研究領域發光發熱。



我是毛楷維，目前就讀國立台南一中三年級，有幸能在高中時期參與科學研究的過程，在過程中思考、實驗、分析、驗證，每個步驟充滿樂趣，在一年的實驗研究中從表觀到分生，打開我對植物免疫的好奇。

此次國際科展，特別感謝一路走來的陳博文老師和鄭凱騰老師的教導，與教授的指教，使我在過程中受益良多。

## 摘要

新聞報導指出，澆灌牛奶的植株果實更加香甜，成為農產品銷售新噱頭。實地試驗發現番茄植株澆灌牛奶後枯黃葉子數量減少，更進一步發現澆灌牛奶之阿拉伯芥植株抗菌能力明顯提升，而牛奶中的脯胺酸(proline)應是協助抗菌的物質。在抗菌機制方面，牛奶和脯胺酸都能使氣孔在病原體分泌 effector 之後再度打開的程度降低，並且使胼氈質(Callose)累積量上升，而分生方面也偵測到乙烯合成相關基因與模式免疫反應(PTI)相關基因(PR1, CYP81F2, FRK1, MKK1)表現量上升，顯示更多未知由脯胺酸促進免疫反應的可能。未來我們期待能夠找出更加廣泛深入由 proline 影響之免疫反應途徑，並對高經濟作物之抗病有所貢獻。

## Abstract

Reportedly, agricultural products, like fruits, would be more delicate by irrigating milk. We have found out that less than usual are the number of yellow-dead leaves on the tomato tree which was irrigated with milk. Irrigating milk also increase the resistance to the necrotrophic bacterium *Pectobacterium carotovorum*ssp *Carotovorum* (*Pcc*) in *Arabidopsis thaliana*. Irrigating proline, which is an ingredient of milk, can enhance the resistance to *Pcc* ; besides, the accumulation of proline rises in *Arabidopsis thaliana* after irrigating milk, which suggests that proline may play an important role in the defensive mechanism. Moreover, irrigating milks and proline enhance *Arabidopsis thaliana* resistance to *Pcc* by either depositing callose or inducing the expression of the PTI responsive *FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (FRK1)*, and therefore induce the other responsive genes *CYTOCHROME P450, FAMILY 81 (CYP81F2)*, *MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 1 (MKK1)* and *PATHOGENESIS RELATED 1 (PR1)*. However, irritating milk and proline can strengthen the gene expression of ACC synthesis, which indicated that there are more undiscovered mechanisms that we can search for.

# 壹、前言

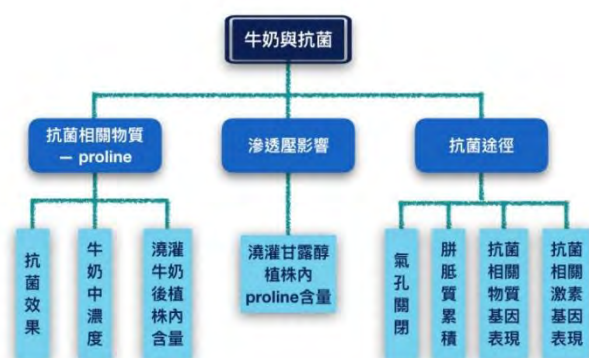
## 一、研究動機

新聞中，水果店裡充斥各種號稱「牛奶澆灌」的水果，牛奶芭樂、牛奶蜜棗……到底，使用牛奶澆灌作物可以帶來什麼樣的影響？是讓果實變得更大更甜，或是有其他功能如抗病呢？還是，這一切只是商人的炒作？懷著探究根本的熱忱，我們自己當起了農夫，開始在實驗室種起植物，意外地發現澆灌牛奶對植物是有幫助的！到底其中藏著什麼樣的秘密？於是我們設計了一連串的實驗，以更嚴謹的方法探究牛奶與植物的神秘關係。

在牛奶成功協助植物抗病後，我們又對牛奶是如何幫助植物抗病的感到好奇。牛奶中最含有許多的胺基酸，我們經過實驗發現Proline較其他胺基酸更能幫助植物對抗細菌，我們推測Proline可能為牛奶協助植物抗病的關鍵之一，因此我們著手確定牛奶中是否有Proline，並設計實驗了解是否真為牛奶中的Proline在幫助植物抗病。

## 二、研究目的



- (一) 探討牛奶對阿拉伯芥植株形態的影響
- (二) 探討牛奶對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響
- (三) 藉由植物初級防禦相關基因表現實驗確定牛奶是否藉由增強防禦反應抵抗細菌
- (四) 檢驗牛奶是否使植物累積更多callose以抗病
- (五) 探討外加胺基酸對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響
- (六) 探討牛奶是否含有與植物抗菌能力有關的物質
- (七) 探討滲透壓對植物抗菌能力的影響
- (八) 藉由植物初級防禦相關基因表現實驗確定胺基酸是否藉由增強防禦反應抵抗細菌
- (九) 檢驗胺基酸是否使植物累積更多callose以抗病
- (十) 探討阿拉伯芥植株面對生物逆境是否能以自行累積胺基酸抵抗











(圖一) 研究架構圖

## 貳、研究過程或方法

### 一、研究設備及器材

塑膠軟盆	塑膠托盤	鑷子	剪刀
			
鋁箔紙	保鮮膜	培養土	珍珠石
			
蛭石	離心管	錐形瓶	血清瓶
			
防爆管	無菌操作台	離心機	植物生長箱
			
玻璃滴管	微量吸管	電子天秤	攪拌子&加熱器
			
錐形管	比色管	分光光度計	冰箱
			
L 形管	半透膜	量筒	細菌培養箱
			

			
pH 測量計	震盪儀	培養皿	數位相機
			

## 二、配土

- (一) 珍珠石：蛭石：泥炭土：水=1：1：2：1
- (二) 混和均勻後即可使用

## 三、春化阿拉伯芥種子：

- (一) 將適量的阿拉伯芥種子放進1.5mL離心管，加入無菌水
- (二) 外層包覆鋁箔紙，置入4°C冰箱
- (三) 靜置2天即完成春化

## 四、土耕阿拉伯芥成株：

- (一) 將直徑2吋圓形花盆填滿土
- (二) 於土上點三顆種子
- (三) 置於一長方形之高盤中，於盤中加入適量水，並封上保鮮膜，使盤中維持濕度70%以上
- (四) 阿拉伯芥栽種於22°C、日照24小時恆溫生長室中
- (五) 植株一周大時掀開保鮮膜，之後每2天補一次水
- (六) 兩周大時可疏苗，使每盆只剩一株植物
- (七) 植株葉片長至圓盆邊際時即可視為成株

## 五、牛奶澆灌

- (一) 將未澆水2天之成株\*4分別處理
  1. control：加入20mL 水

2. 12.5%：加入10mL milk

3. 6.25%：加入5mL milk

4. 125%：加入2.5mL milk

(二) 於9天後觀察其地上部外部型態

## 六、觀察牛奶、胺基酸處理植物體之染菌外型差異

(一) 配製12.5%、6.25%、3.125%牛奶各100mL

(二) 配製8mM Proline 100mL

1. 秤0.921g Proline粉末

2. 加入100mL d.d.H<sub>2</sub>O

(三) 每組4株成株，分別處理 water、12.5%牛奶、6.25%牛奶、3.125%牛奶、8mM Proline，兩日後感染

(四) 配置LB Broth 含有0.01% Ampicillin 100μL

1. 取一1000mL血清瓶，秤12.5g LB powder加入，加d.d.H<sub>2</sub>O至500mL，滅菌

2. 滅菌後於室溫冷卻，加入500μL 0.01% Ampicillin

(五) 培養軟腐病菌(*Pectobacterium carotovorum*)

1. 將LB Broth 100mL倒入一無菌250mL錐形瓶

2. 用tip刮一個細菌群，置入錐形瓶中

3. 放置於28°C、800rpm之細菌培養箱，培養18~24hr

(六) 配製菌液

1. 取出前一日培養菌液100mL，分至兩個50mL離心管中完成配重

2. 完成配重後，將菌液以4500g離心力轉6分鐘

3. 秤含水硫酸鎂(246.47g/mol)24.647g加d.d.H<sub>2</sub>O到100mL，配成1 M 硫酸鎂水溶液，稀釋為10mM的硫酸鎂

4. 將離心完成後上清液倒掉，兩管各倒入10mL 10mM硫酸鎂，用震盪儀直至沒有沉澱，重複步驟

5. 重複步驟4 2~3次即可



## 七、測CFU(單位面積菌落數)

- (一) 將每盆處理過之植株，隨機於三片葉上做記號
- (二) 染菌後一日於做記號之葉片鑽取 $2.54\text{cm}^2$ 大小組織，放進1.5mL之離心管
- (三) 於無菌操作台中沖洗無菌水，並將組織磨碎
- (四) 以 $\text{MgSO}_4$  10mM將菌液做序列稀釋10倍、100倍、1000倍、3000倍等，並將稀釋後菌液塗抹於培養基上(一次3盤)
- (五) 培養一日後，取可清楚數菌落(30~300個)之培養皿，數菌落並推算原單位面積菌落濃度

## 八、氣孔開閉的測量

- (一) 配置浸泡液 18ml，將處理過的植物葉下表皮撕下浸泡其中，照光使氣孔開啟。
- (二) 過 1.5 小時觀察控制組氣孔開啟後感菌組加入 $5 \times 10^6$ cfu/ml 軟腐病菌
- (三) 再經 1.5 小時與 5 小時後以顯微鏡觀察葉下表皮並拍照
- (四) 將拍下的葉下表皮照片每組選取 20 個氣孔測量寬度與長度

## 九、抽取植物組織中的RNA

### (一) 採取植物組織

1. 取下新鮮植物組織，立即以液態氮處理
2. 以均質機將組織均勻粉碎

### (二) RNA萃取

1. 在碎組織中加入 $450\mu\text{L}$  RNA Lysis A/2-ME Solution，以vortex震盪混合後，在 $60^\circ\text{C}$ 中反應3分鐘後，以最高轉速(約 $12000\sim 14000\times g$ )離心5分鐘
2. 將樣品均質液加入裝有RNA Spin Filter的收集管，以最高轉速離心2分鐘，再取出濾液至新的離心管
3. 加入相對細胞裂解液0.5倍的純酒精，以微量吸管抽吸均勻
4. 將混合液倒入裝有RNA Spin Column的新的收集管，以最高轉速離心1分鐘，丟棄濾液
5. 將RNA Spin Column放回收集管，加入 $500\mu\text{L}$  RNA Wash Solution I，以最高轉速離心分鐘，丟棄濾液
6. 在每一樣品中加入 $2\mu\text{L}$  DNase I與 $80\mu\text{L}$  DNase I Incubation Buffer，以輕拍或輕微搖晃混合，於室溫中培養15分鐘
7. 加入 $500\mu\text{L}$  RNA Wash Solution I至RNA Spin Column，以最高速離心1分鐘，丟棄

濾液

8. 將RNA Spin Column放回收集管，加入600 $\mu$ L RNA Wash Solution II，以最高速離心1分鐘，丟棄濾液，在重複此步驟一次
9. 將RNA Spin Column放回收集管，以最高轉速離心3分鐘，將殘留酒精去除。再將RNA Spin Column放入新的離心管
10. 加入30~50 $\mu$ L Nuclease-free water到RNA Spin Column，靜置1分鐘後，以最高轉速離心1分鐘回收RNA

(三) 將RNA轉換為cDNA

1. 加入oligo-dT後於70°C反應5分鐘，再進入4°C反應5分鐘
2. 加入反轉錄酶、Mg<sup>2+</sup>、Buffer、核苷酸，於25°C反應5分鐘，進入42°C一小時，再進入70°C反應15分鐘

十、 Real-Time PCR操作過程

- (一) 加入Mix溶液（含有Mg<sup>+2</sup>、核苷酸、DNA聚合酶、SYBR Green），每管10 $\mu$ L
- (二) 加入primer，正、反股每管各4 $\mu$ L
- (三) 加入cDNA樣本，每管各2 $\mu$ L
- (四) 使用real time PCR machine得到Ct value

十一、 測定胼氈質沉積量(Callose deposition)

- (一) 將菌液定量5 $\times$ 10<sup>6</sup>注射入葉片
- (二) 鑽孔並利用95%酒精褪色
- (三) 用d.d.H<sub>2</sub>O沖洗葉片(至少三次)，以去除殘留之酒精
- (四) 利用Anilline Blue將組織染色，避光靜置一晚
- (五) 使用紫外光顯微鏡觀察，並拍攝照片
- (六) 於image J匯入照片，計算胼氈質堆積個數

十二、 檢測染菌控制組植物體內Proline 的含量

- (一) 配製茛三酮
  1. 加入6mL 醋酸
  2. 加入4mL 6M 磷酸
  3. 秤0.25g 水合茛三酮加入，並攪拌均勻

(二) 配製3%磺基水楊酸50mL(密度 1.84g/mL)

1. 取出 2.76g 的磺基水楊酸
2. 加水加至 50mL

(三) 檢測 Proline 含量

1. 將冷凍 (-80°C)已秤重樣本拿出，泡液態氮
2. 將加入鋼珠的樣本用震盪機震碎
3. 加入 3%磺基水楊酸各0.9mL
4. 在常溫下，用 5000g 離心力轉 20 分鐘
5. 每組抽取 2 管樣本液各0.4mL，加入 0.4mL 茚三酮，再加入 0.4mL 醋酸
6. 放入 100°C的水浴槽中一小時
7. 將樣本拿出後冷卻（置入碎冰中），將各濃度混為一管，每管加入 1.6mL 甲苯  
（不溶水但溶有機物）
8. 使用分光光度計(520nm)測甲苯層

十三、阿拉伯芥種子滅菌方法

- (一) 取一15mL離心管
- (二) 將1.8mL HClO置入15mL離心管
- (三) 抽20μL twintwenty(介面活性劑)置入15mL離心管
- (四) 加d.d.H<sub>2</sub>O至15mL
- (五) 抽1mL清洗液注入裝有適量種子之1.5mL 離心管
- (六) 用vortex(轉速3~4)轉8分鐘
- (七) 於無菌操作台將清洗液抽出
- (八) 用無菌水清洗5次(每次搖晃120下)
- (九) 注入無菌水
- (十) 春化

十四、配製1/2 MS medium(400 mL)

- (一) 準備一廣口量杯(2L)，加入d.d.H<sub>2</sub>O 約200mL
- (二) 秤量以下藥品加入：
  1. MS 0.88g
  2. MES 0.2g (buffer)

### 3. Sucrose 4g (1%)

(三) 利用攪拌石+磁力攪拌器混和均勻

(四) 使用酸鹼測定儀，歸零，利用KOH將pH校正至5.7

(五) 準備1L量筒，將混和溶液倒入，加d.d.H<sub>2</sub>O 至400mL

(六) 準備一500mL血清瓶，加入以上溶液，秤量4g (1%) Phytigel 加進溶液中，蓋上瓶蓋貼滅菌膠條，滅菌

## 十五、滅菌

利用滅菌釜，將之設定為121°C、20分鐘

## 十六、觀察不同牛奶濃度培養基對植物生長的影響

(一) 配置下列濃度的培養基各三盤：

1. control (20mL 1/2 MS medium)

2. 8.33% (1.66mL milk+18.34mL 1/2 MS medium)

3. 6.25% (1.25mL milk+18.75mL 1/2 MS medium)

4. 5% (1mL milk+19mL 1/2 MS medium)

(二) 待冷卻凝固後倒置冷藏

(三) 將春化過的無菌種子點在培養基上，一盤十顆，且排成一直線，間隔0.7cm

(四) 於開口處封parafilm，保持其無菌狀態，平放於22°C、日照24小時恆溫生長室，以利其根部向下生長

(五) 發芽後將plate直立（排面水平），使植物體垂直於排面生長，以便觀察

## 十七、觀察不同胺基酸對植物生長的影響

(一) 配Proline (115.13g/mol) 溶液22.5 mM

1. 秤0.1295g Proline粉末，加進50mL離心管

2. 加d.d.H<sub>2</sub>O至50mL

(二) 配threonine (g/mol) 溶液22.5 mM

1. 秤0.1340g threonine粉末，加進50mL離心管

2. 加d.d.H<sub>2</sub>O至50mL

(三) 製作2mM 胺基酸植物培養基

1. 加1.77mL 22.5mM 胺基酸溶液至50mL離心管中

2. 將滅菌完成之1/2MS medium加至20mL，稍微搖晃均勻

3. 倒至直徑9cm之圓形培養皿

#### 4. 待凝固後倒置冷藏

- (四) 將春化過的無菌種子點在培養基上，一盤十顆，且排成一直線，間隔0.7cm
- (五) 於開口處封parafilm，保持其無菌狀態
- (六) 平放於22°C、日照24小時恆溫生長室，以利其根部向下生長
- (七) 發芽後將plate直立（排面水平），使植物體垂直於排面生長，以便觀察

#### 十八、測量牛奶滲透壓

- (一) 將滲透膜泡在 d.d.H<sub>2</sub>O 中，靜置一小時
- (二) 將滲透膜夾在兩透明 L 型管之間，於兩 L 型管分別加入牛奶和 d.d.H<sub>2</sub>O 各 25ml
- (三) 置於 8 度 C 冰箱 5 天後觀察兩管間高度差，計算即可得結果

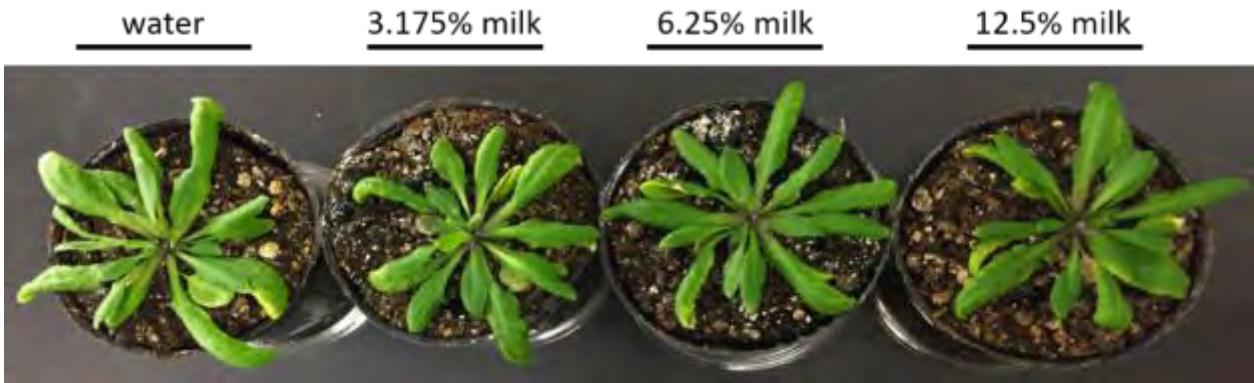
#### 十九、觀察牛奶、濃度和牛奶相同之甘露醇處理植物體之染菌外型差異

- (一) 測量牛奶滲透壓約300 mOsm/Kg，配置等滲透壓的甘露醇溶液
- (二) 每組4株，分別處理d.d.H<sub>2</sub>O、甘露醇、牛奶
- (三) 兩日後染菌

## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) 探討牛奶對阿拉伯芥植株形態的影響

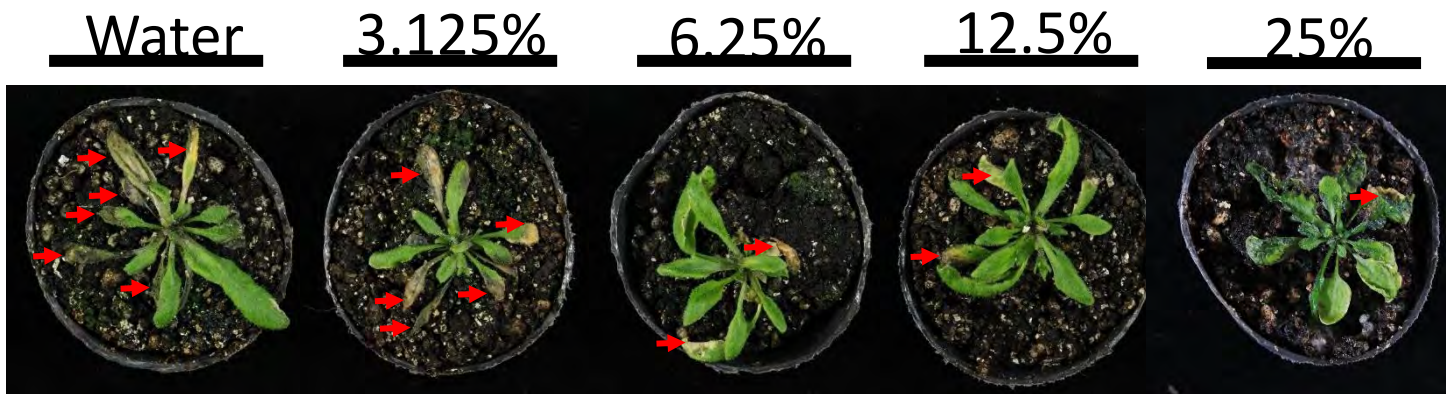


(圖二)不同濃度牛奶處理9天結果

由圖三可見，短期低濃度的牛奶處理，外表上和Control組相比無太多差異，但經過牛奶處理之植株葉片邊緣較黃。

#### (二) 探討牛奶對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響

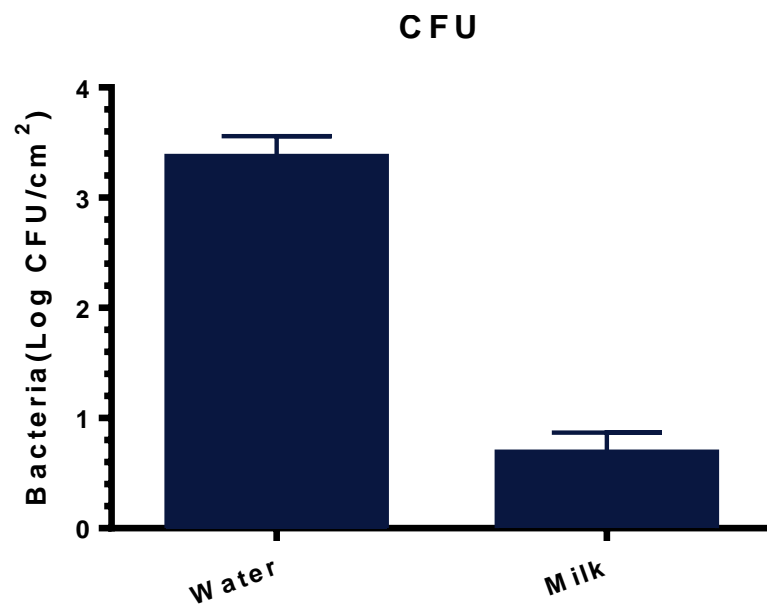
##### 1. 不同濃度牛奶對阿拉伯芥抗菌能力之影響



(圖三)不同濃度牛奶處理染菌後結果

由圖四可見，經越高濃度牛奶處理之阿拉伯芥成株出現病徵之葉片數量較Control組與低濃度牛奶處理的植株少，證實澆灌牛奶的植物對於生物逆境有較好的抗性。

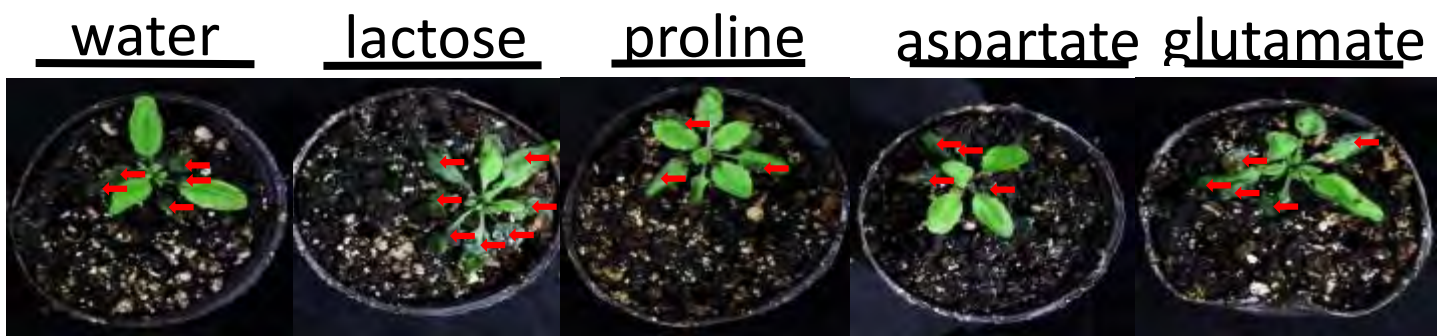
## 2. 預先處理牛奶植物體之染菌後 CFU 差異



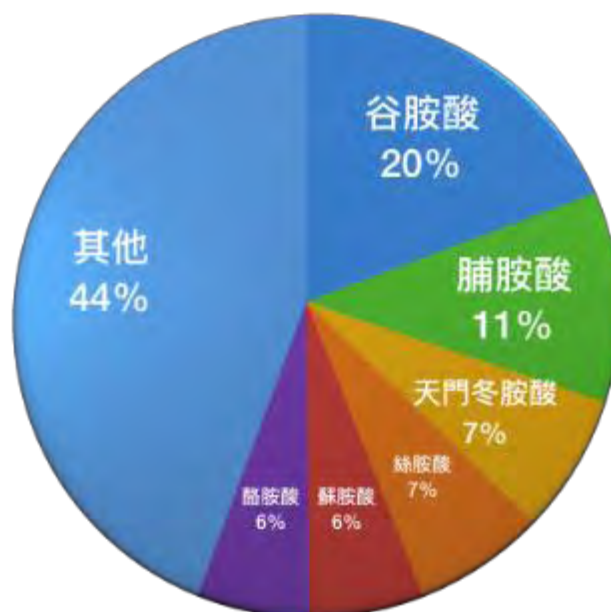
(圖四) 預先處理牛奶植物體之染菌後CFU差異

從圖五中可知，控制組植物的菌落形成單位 (CFU) 的對數值約為3.4，而澆灌牛奶的植物CFU之對數值則約為0.6，兩者相差近三個數量級。根據以上數據，可知澆灌牛奶能夠明顯減少植物體內的細菌數量，協助植物抵抗細菌。

(三) 探討外加胺基酸對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響



(圖五) 胺基酸處理染菌後結果



(圖六) 不同胺基酸在牛奶中的含量比例

牛奶中含有許多胺基酸，我們挑選牛奶中的乳糖和含量前三多的胺基酸Proline, Aspartate, Glutamate檢驗其對植物抗菌能力的影響。由圖九可見，經2mM Proline 處理之阿拉伯芥成株在感染後出現病徵之葉片數量及面積較控制組少，說明澆灌Proline像牛奶一樣可以提升植物對於生物逆境的抗性。



(四) 探討滲透壓逆境對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響

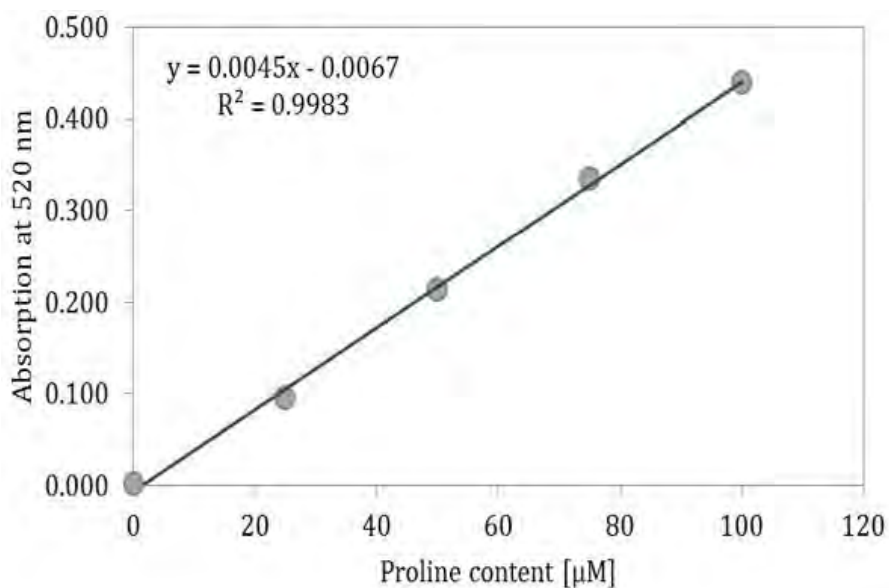
Water mock   Osmotic   Water bac   Osmotic bac



(圖七)滲透壓處理感菌結果

由圖十一可見，經與牛奶等滲透壓的甘露醇溶液處理後的阿拉伯芥成株出現明顯病徵的葉片數量與控制組差異不大，可證實滲透壓並無法增強植物抗菌能力。

(五) 探討牛奶是否含有與植物抗菌能力有關的物質

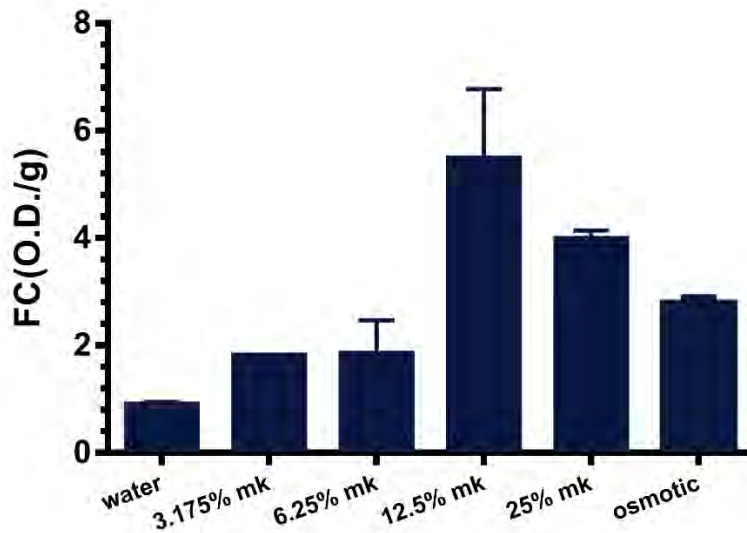


(圖八) Proline檢量線 (圖片來源: [www.bio-protocol.org/e1749](http://www.bio-protocol.org/e1749))

1 • 檢測牛奶中是否含有Proline

我們測量出牛奶中Proline O.D.值為0.5200。由檢量線計算可知， $0.5200 = 0.0045x - 0.0067$ ，牛奶中Proline 的濃度為 $119.72\mu\text{M}$ 。

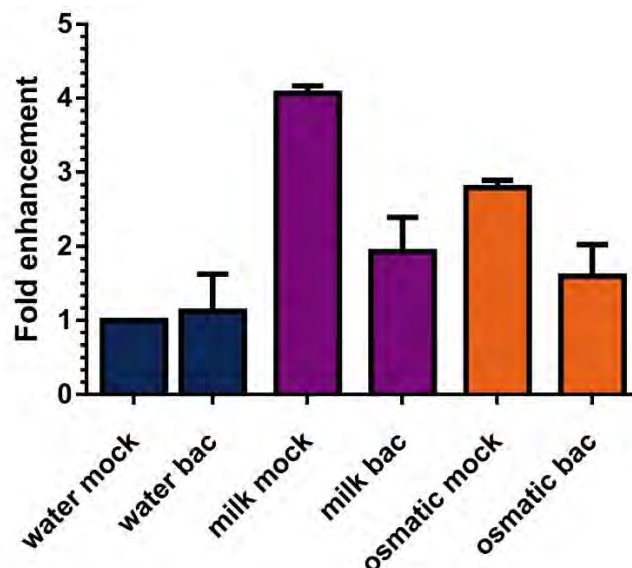
2 • 澆灌牛奶的植物體內是否有Proline累積



(圖九) 阿拉伯芥澆灌不同濃度牛奶的Proline累積量

由圖十可見，澆灌牛奶的阿拉伯芥相較控制組於Proline累積量有顯著的提升，而相異濃度間的效果有所差異，當牛奶濃度為3.175%與6.25%時，植物體內單位鮮重Proline約為控制組的兩倍；當牛奶濃度上升至12.5%時，植物體內Proline濃度達到最高，約為控制組的七倍；而牛奶濃度繼續提升至25%時，Proline濃度反而下降為控制組的五倍。並且由滲透壓組比較之下，由累積量的差異我們可以得知牛奶除了滲透壓外有其他物質使Proline累積。

### 3. 探討阿拉伯芥植株面對生物逆境是否能以自行累積胺基酸抵抗

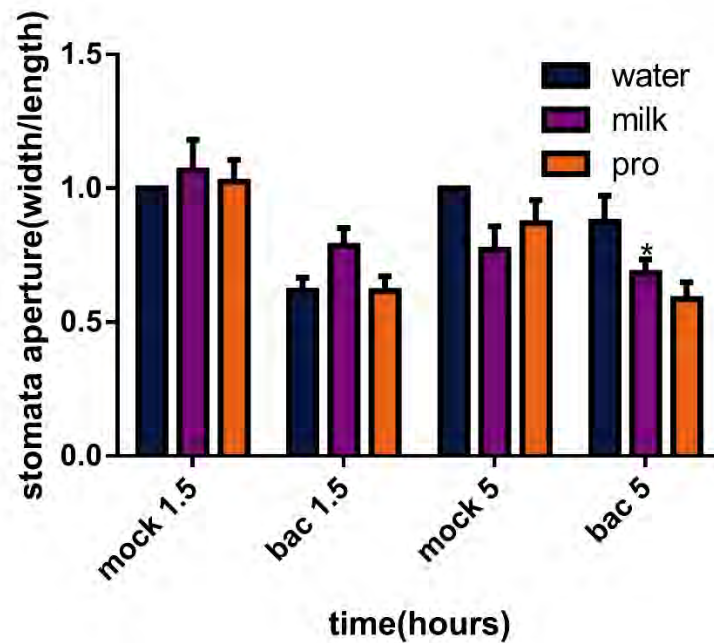


(圖十)未預先做任何處理植株染菌後地上部Proline含量差異

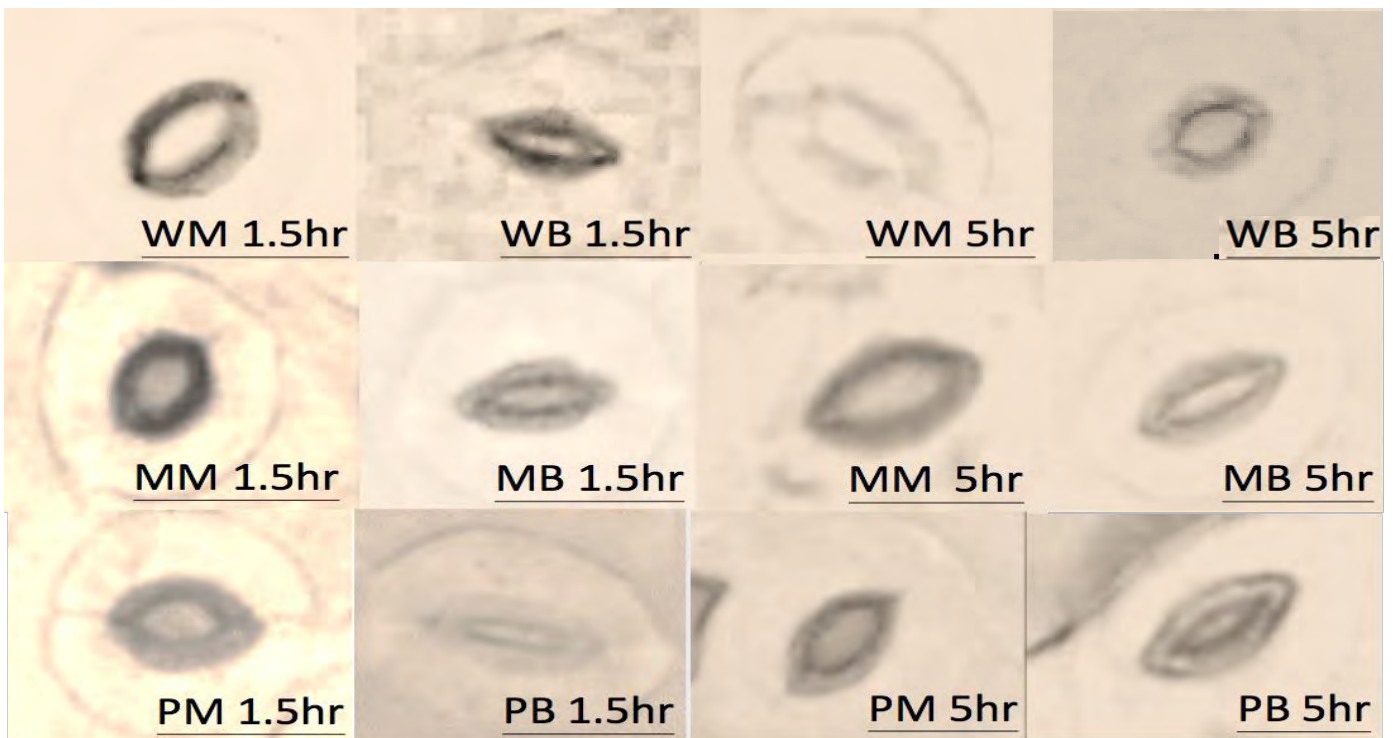
因為外加Proline可以幫助植物抵抗細菌，所以我們好奇，感菌後的植物是不是會自行合成Proline，使體內的Proline量增加，而結果發現，處理水的植物感染後Proline累積量是控制

組的一到二倍，並不顯著，但牛奶或滲透壓處理後的植物感染後Proline含量反而下降，我們認為可能是因為植物體內的Proline 代謝成水楊酸等物質以加強植物抗菌能力。

(六) 觀察處理後是否影響植物氣孔的開闔情形



(圖十一) 處理牛奶與Proline後氣孔在1.5個小時與5個小時的氣孔寬長比

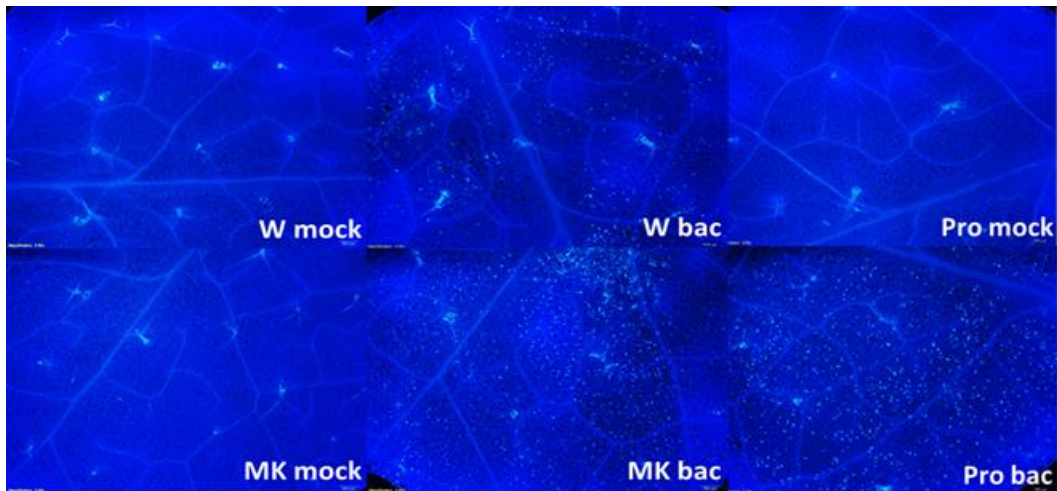


(圖十二) 處理牛奶與Proline後氣孔在1.5個小時與5個小時的氣孔

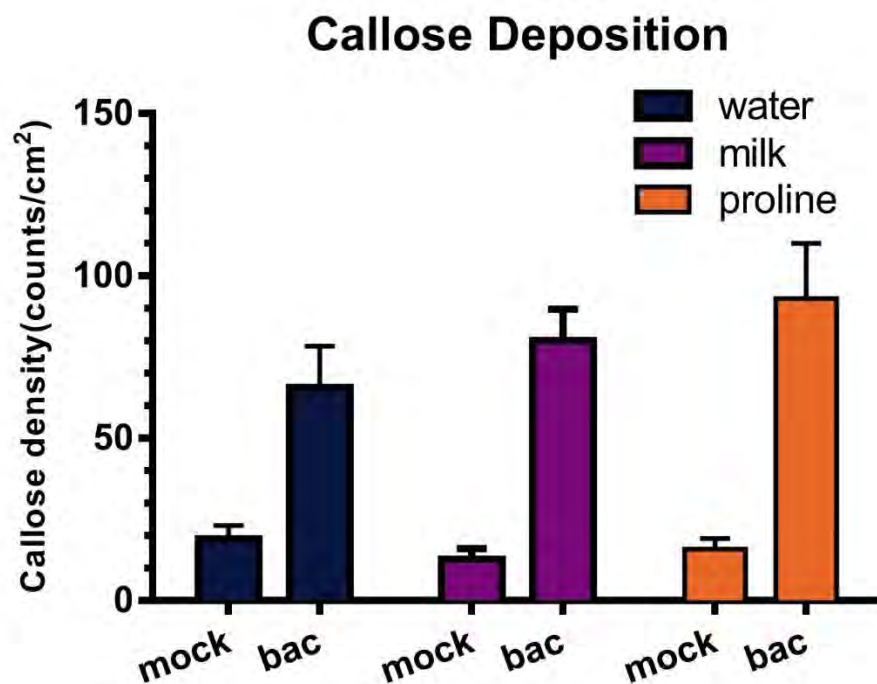
而澆灌物質是如何幫助植物抗菌呢?植物會先以大範圍、快速的方式，在植物體受到感染後，氣孔會關閉以防止病原體的侵入，但長時間下病原體產生分泌物(Effector)重新打開氣

孔，由圖時一可見，1.5 小時下染菌組的氣孔皆較控制組關閉，但經過 5 個小時，處理水的染菌組寬長比明顯增加，代表開啟，但牛奶處理與 Proline 處理組的氣孔寬長比變化不大，由此可知，外加物質可以使植物氣孔保持關閉的狀態

(七) 檢驗澆灌物質是否使植物累積更多 callose 以抗病



(圖十三) 使用螢光顯微鏡拍攝的影像

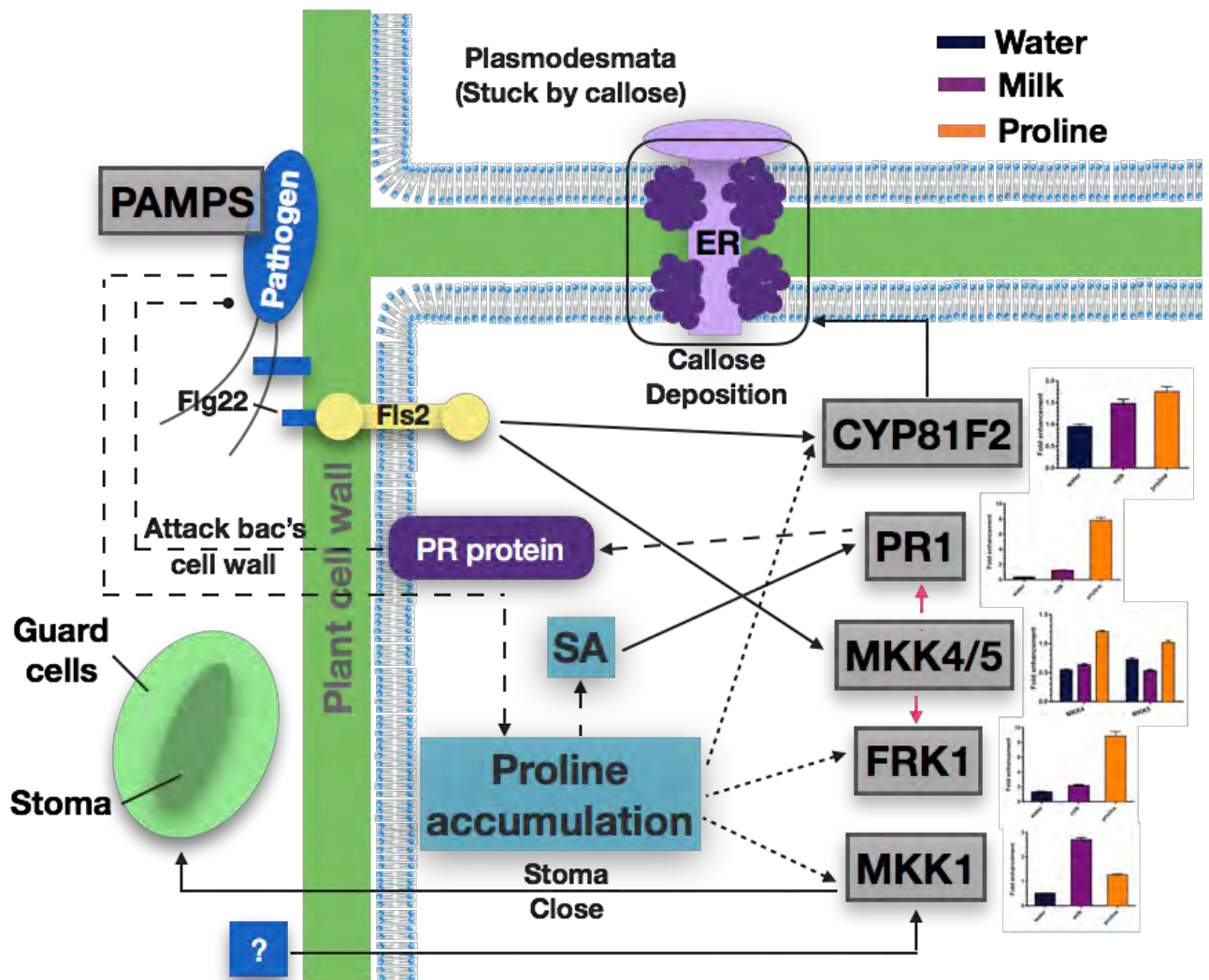


(圖十四) 預先處理之植物染菌後callose deposition差異

在見到 *CYP81F2* 基因的表現量提升後，我們希望能直接確定是否真的有更多的 callose 累積，因此我們進行測量 callose 的實驗，以染劑將 callose 染色並在顯微鏡下量測 callose 的數量。

由圖七、八可知，不論是控制組還是澆灌牛奶的實驗組，在感菌後callose沉積量均會明顯增加，但牛奶澆灌組在感菌後callose沉積量約為染菌前的五倍，而控制組只有原先的三到四倍，這說明澆灌牛奶可以使植物在面對刺激時於相同時間內產生更多的callose沈積，達到最佳的抗菌效果。

(八) 藉由植物初級防禦相關基因表現實驗確定澆灌物質是否藉由增強初級防禦反應抵抗細菌

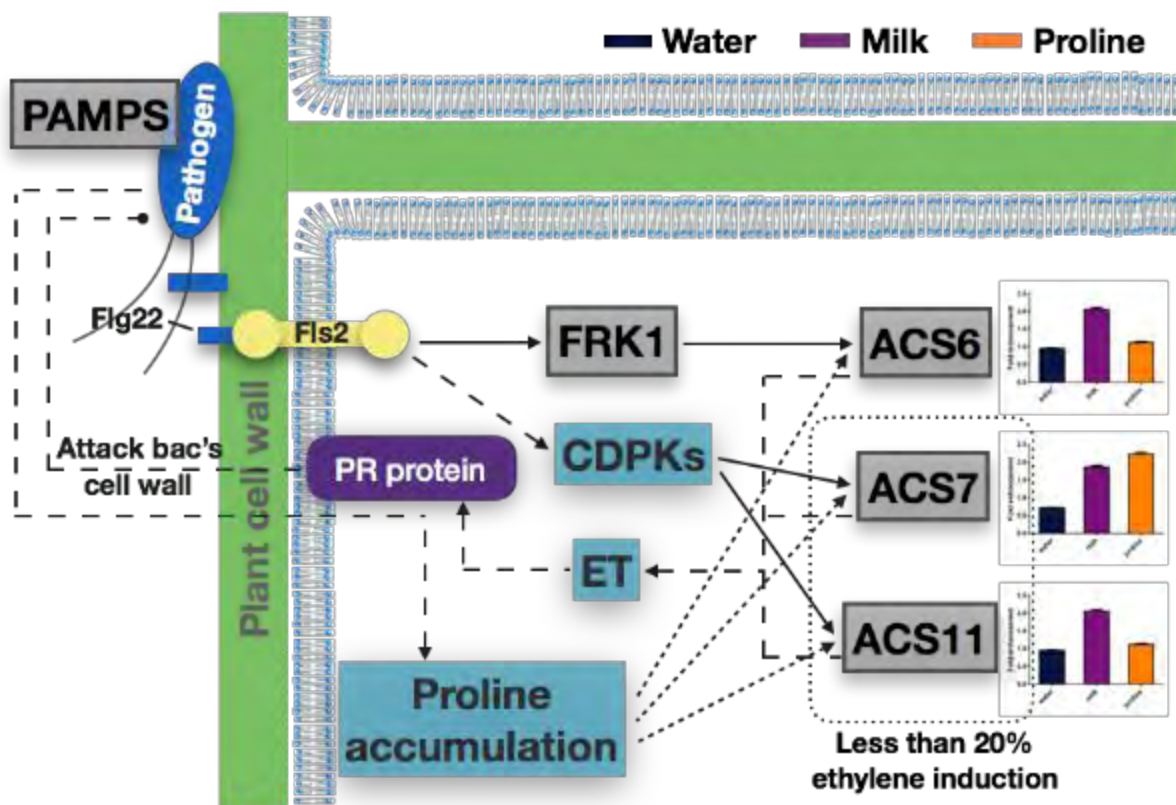


(圖十五) 預先處理之阿拉伯芥染菌後 PTI 基因表現差異及反應途徑

確定澆灌物質可以幫助阿拉伯芥抗菌後，我們猜測澆灌物質能夠增強阿拉伯芥的防禦反應；而植物的防禦有主動與被動兩種，植物可以藉由產生 PR 蛋白主動攻擊細菌，或是累積 callose 堵塞原生質絲，callose (胼胝質) 能夠在植物受到細菌等帶有抗原的外來物刺激時，迅速堆積，堵塞原生質絲孔道，而氣孔關閉，使細菌不再繼續擴散或進入細胞，達到抵抗細菌的效果，我們便尋找四個初級防禦相關基因，量測這些基因在感染後的表現量是否受到牛奶影響。

其中，*PR1* 基因與製造 PR 蛋白相關，*FRK1* 與感測細菌鞭毛上相關，*CYP81F2* 則與 callose 的合成累積相關，而 *MKK1* 與植物氣孔開閉相關。由上圖六可以得知，處理水的阿拉伯芥在感染後 *PR1* 基因表現量下降，而其他兩種基因表現量均增加，可以推測植物體內有防禦反應的進行。而澆灌牛奶的植物在感染後四種基因的表現量均增加，顯示體內的防禦反應進行得更為活躍，也說明牛奶可以有效提升阿拉伯芥的防禦反應。

(九) 由植物乙烯代謝途徑相關基因表現實驗確定是否藉由外加物質增強植物免疫反應



(圖十六) 預先處理之阿拉伯芥染菌後乙烯合成相關基因表現差異及反應途徑

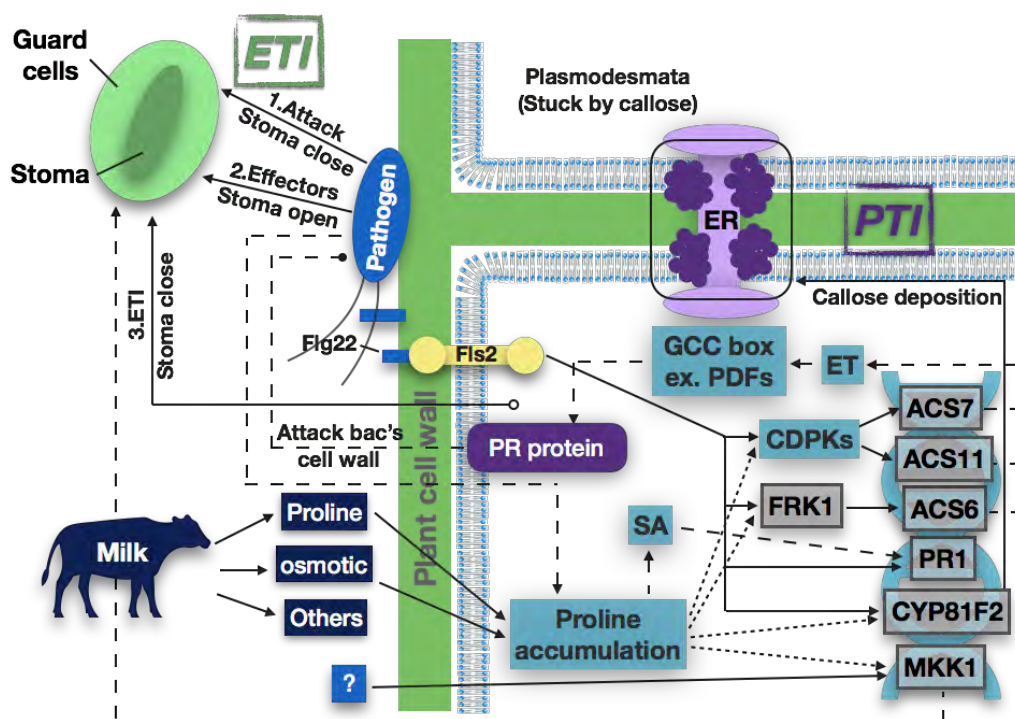
由PTI與Fls2所開啟的FRK1基因會開啟下游的ACS相關基因，由上表可知，經Proline與牛奶處理後的植物ACS6、ACS7和ACS11基因表現量比水處理組高，ACS基因可開啟一系列乙烯相關免疫反應，合成PR蛋白以抗菌。

由此我們可以得知，PTI免疫反應可以延伸至乙烯等訊息傳遞物質相關的反應，且處理後的植物ACS基因表現量更多，因此我們猜測Proline 的代謝或合成可能可以間接增強ACS的基因表現。

## 二、討論

- (一) 在結果六(二)中，在牛奶濃度小於等於 12.5%時，植物體內 Proline 濃度皆隨牛奶濃度上升而增加，但 25%牛奶濃度處理的植物中所含的 Proline 較 12.5%濃度處理的植物少，我們推測這是因為滲透壓的關係，植物對 Proline 的吸收或合成可能因為外界滲透壓的改變也有所改變。
- (二) 結果七中，MKK4 和 MKK5 的基因表現量並沒有上升，表示 MKK4/5 下游的具活性激酶量並未上升，但這兩者的下游基因 PR1 和 FRK1 有上升，因此我們推測有兩種可能，MKK4/5 激酶具活性的數量可能變多或是具有其他途徑的基酶活性或數量上升，使植物防禦相關基因的基因表現量上升。
- (三) 因牛奶為高濃度物質，所以必具有高滲透壓的特性，而我們經文獻中得知，植物在高滲透壓的環境下體內會自行合成 Proline，以造成植物體內外相近的滲透壓，但經由結果四滲透壓處理的植物抗菌能力並沒有增加許多，而滲透壓處理後植物體內 Proline 累積量比牛奶處理還少，因此我們認為植物體內滲透壓的濃度應超過一定的範圍才能有效幫助植物抵抗病菌，而由結果十可以得知，經滲透壓或牛奶處理後的植物感菌後體內 Proline 累積量皆下降，我們推測可能是 Proline 的累積代謝成其他物質進而抗菌，由文獻中指出，Proline 可以代謝成水楊酸等物質，來增強更多免疫反應，所以我們以後也可以再更深入的探討外加物質對水楊酸等訊息傳遞物質的影響。
- (四) 此外，我們也利用摻有不同物質(牛奶、胺基酸)的培養基種植阿拉伯芥，並觀察地上、地下部的生長情形。從圖十六、十七可以看出，生長在胺基酸牛奶培養基中的阿拉伯芥遍生長較控制組的不良：地上部明顯較小、葉片黃化、主根根長較短……推測是因為 Proline 及非 Proline 胺基酸對植物造成壓力，影響植物生長。此外，綜合前述牛奶及胺基酸提升抗菌力的結果，我們可以推測，這些壓力使植物可能進入 primed stage，因此在細菌感染時可以更快地啟動更多的初級防禦相關機制，這些也是未來可以再討論的現象。

## 肆、結論與應用



(圖十七) 機制圖

透過實驗，牛奶澆灌可以幫助植物抗菌，透過成分組成的分析與染菌實驗後我們知道牛奶的成分中可以較能幫助植物抗菌的物質為Proline，澆灌牛奶後植物體內也會有Proline累積量的上升，而這些物質是如何幫助植物抗菌呢?PTI為植物先天性快速抵抗病原體的免疫反應，植物會關閉氣孔阻止更多病原體的入侵、植物會在原生質絲孔道上堆積callose，以阻擋病原體擴散，還會自行合成PR蛋白攻擊病原體的細胞壁。而經過氣孔開閉的實驗，我們發現經牛奶或Proline處理後的植物能持續使氣孔關閉，而我們好奇處理後的植物是否會開啟更多相關免疫反應，於是我們測量處理後植物的PTI相關基因表現，我們發現合成PR蛋白相關的PR1基因、合成callose相關的CYP81F2基因、關閉器孔相關的MKK1基因與能傳遞到下游其他植物免疫反應相關的FRK1基因的基因表現量皆有上升，但測量基因表現之外，我們還需要觀察植物是否真的進行反應，於是我們測量了植物體內callose的累積量，發現經處理後的植物callose累積量比處理水的植物還高，因此我們能知道牛奶與Proline的澆灌能幫助植物抵抗病菌的侵擾。而因FRK1基因表現量的上升，我們好奇FRK1下游開啟的其他免疫反應是否上升，ACS等乙烯合成酶的基因表現量的確提升了，因此我們能得知外加物質可能間接地影響乙烯的相關合成反應。最後，我們探討牛奶和Proline是如何增強這一系列的防禦反應，植物體內在澆灌Proline與牛奶後Proline累積量上升，因此我們認為澆灌牛奶或Proline能直接地或間接地使植物體內Proline累積量上升，Proline累積量的上升能藉由代謝成其他產物幫助植物增加PTI相關基因表現，以達到抗菌的效果。



## 伍、參考資料及其他

一、primer 引子序列為:

ACTIN8(ATIG49240) F, 5' -GAGATGATGCTCCCAGAGCG-3'

R, 5' -TCCATGTCATCCCAGTTGCT-3'

FRK1 (AT2G19190) F, 5' -GCCAACGGAGACATTAGAG-3'

R, 5' -CCATAACGACCTGACTCATC-3'

CYP81F2 (AT5G57220) F, 5' -AAATGGAGAGAGCAACACAATG-3'

R, 5' -ATCGCCCATTCOAATGTTAC-3'

PR1(AT2G14610) F, 5' -AAAACCTAGCCTGGGGTAGCGG-3'

R, 5' -CCACCATTGTTACACCTCACTTTG-3'

ACS6(AT4G11280) F, 5' -GTTCCAACCCCTTATTATCC-3'

R, 5' -CCGTAATCTTGAACCCATTA-3'

ACS7(AT4G26200) F, 5' -CGCTGAGAATCAGGTCTCGT-3'

R, 5' -TGAGGACGATCCGGTCAGG-3'

ACS11(AT4G08040) F, 5' -TGGCGACTCTCATGGACAAG-3'

R, 5' -ACCCAAGACTTCTGGATGCTC-3'

MKK4(AT1G51660) F, 5' -TCGTCCTCTGTCCCTCGTCTT-3'

R, 5' -GGGGATACATGCACCATCAT-3'

MKK5 (AT3G21220) F, 5' -TCCATAAGTTTTGCATACCC-3'

R, 5' -GCAAATCCAGCTEAAAATCAC-3'

MKK1(AT4G26070) F, 5' -AAGATGTTTGAAGATTCGGA-3'

R, 5' -ATCCACCACTAGCAGAGAAA-3'

二、Fumiaki Katagiri, Kenichi Tsuda(2010): Understanding the Plant Immune System

三、Peter N. Dodds and John P. Rathjen(): Plant immunity: towards an integrated view of plant - pathogen interactions

四、Aarzo Qamar, Kirankumar S. Mysore and Muthappa Senthil-Kumar(2015). Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens

from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491715/pdf/fpls-06-00503.pdf>

五、Lá szló Szabados, Arnould Saviouré (2009). Proline: a multifunctional amino acid Trends in Plant Science, 15, 89-97. Retrieved December 23, 2009,

from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138509002982>

六、 Willem F. Broekaert, Stijn L. Delaure, Miguel F.C. De Bolle, and Bruno P.A. Cammue<sup>1</sup>(2006).The role of ethylene in host-pathogen interactions.

from <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>

## 【評語】 060001

研究主題由生活上的觀察切入，再進一步有學理上的推論，及不錯的實驗設計來說明牛奶之所以對植株的生長有所影響，應該是牛奶內部的一些成分造成。整體研究報告的內容，有深度。結果的推論具有一定的水準，值得肯定。