

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 植物學科

最佳創意獎

052107

植物健康的無形殺手-以細菌氣味開發生物農藥

學校名稱：國立臺南女子高級中學

作者： 高二 黃怡亭 高二 沈俊廷 高一 沈洛伊	指導老師： 劉靜豪 郭人仲
---	-----------------------------

關鍵詞：細菌氣味、相剋作用、生物農藥

摘要

植物在野外生長會遭遇各種逆境壓力，本研究從野外土壤中純化出枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)，研究探討氣味對植物生長發育的影響。我們觀察到植物根長，鮮重會因氣味處理而減少，葉綠素 a,b 及胡蘿蔔素皆被氣味抑制，由 DAB 染劑染色法發現氧化壓力亦增高。

ABA 與乙烯是植物重要逆境賀爾蒙，所以分析植物逆境賀爾蒙合成相關基因，並利用 qPCR 技術看基因表現。結果發現植物逆境賀爾蒙 ABA、乙烯等相關基因表現量上升。而乙烯的累積可能影響植物葉綠素含量，或使植物產生氧化壓力，ABA 相關基因可能影響氣孔開閉。

我們挑選兩種 ABA 相關突變株處理枯草桿菌氣味；結果顯示 ABA 途徑突變株，其葉片對於枯草桿菌氣味的敏感度改變。我們想篩選一些細菌製成生物農藥，減少化學農藥的使用。

壹、研究動機

去年我們實際去生態現場(臺南安平觀夕平臺)採集不同地點下的土壤細菌，了解了植物根圈環境中擁有很豐富的微生物相，初步研究微生物氣味對植物的致病機制，以及植物如何做出反應。欲篩選具有農業應用價值之菌種，今年我們改用不同的細菌及植物做實驗。生物課堂中我們學到植物與周圍的病源發生了交互作用後，會產生一連串的分佈訊息傳遞，為了更廣泛且深入探討，最後決定以篩選到的枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)散發的氣味來做實驗，研究其是否影響阿拉伯芥的生長與發育。氣味是小分子的揮發性物質,容易揮發散去,利用細菌氣味來製成生物農藥，不讓植物直接接觸細菌，較不會汙染土壤，對於農業上的應用幫助也很大且可以取代化學農藥的使用，保護生態環境。於是我們繼續設計實驗深入的探究。

貳、研究目的

- 一、 實際到生態現場，採集土壤並純化出自然界中常見的細菌。
- 二、 利用細菌氣味處理植物，實際觀察並探討細菌氣味對植物生長發育的影響。
- 三、 希望未來可將我們所篩選到的細菌氣味製成生物農藥，減少化學農藥的使用，降低環境汙染。

參、研究設備及器材

枯草桿菌、阿拉伯芥 (野生株以及 nced3、abr1 兩種突變株)、1/4MS 培養基、LB 培養基、絹布(150 目，長 8cm，寬 5cm)、震盪器、恆溫水浴、震盪均質機、離心機、電子天平、鑷子、密封罐、濾紙(5.5cm、9cm)、培養皿(5.5cm、9cm)、有蓋試管、2.15 公升的密閉容器、微量滴管(20P、200P、1000P)、恆溫培養室(27 度、8.5k lux)、相機、電腦、蒸餾水、丙酮、液態氮、微量離心管、複式顯微鏡、StepOnePlus Real-TimePCRSystems、無菌操作臺

肆、研究過程與方法

一、研究過程與方法

(一)種植阿拉伯芥

1. 準備植物: 將阿拉伯芥種子放入 1.5ml 離心管中。
2. 消毒植物: 製備消毒水:製備 13.3%次氯酸鈉內含 0.1% Tween20 當消毒水。將製備好的消毒水取 1ml 打入裝有阿拉伯芥種子離心管中。
3. 再至無菌操作臺中利用無菌二次水清洗 5 次，每次 1ml 並搖晃 120 下。
4. 利用無菌玻璃滴管將 20 顆種子以線狀的方式平均點至絹布上。
5. 放入 4°C 冰箱 2 天。然後放置 27°C 光照 16 小時的恆溫生長箱培養 4 天準備進行實驗。

(二)純化細菌

1. 安平觀夕平臺防風林中的枯木附近採集土壤。
2. 菌種培養: 取 1 公克的樣本土壤放入 50 毫升無菌離心管中，接著加入無菌的二次水後利用震盪機震盪，以每分鐘 100 下的速度震盪 30 分鐘，震盪完畢後將其靜置於桌上 1 小時。待大分子雜質沉澱，1 小時後在無菌臺中將上清液分別稀釋成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍，並取 50 μ l 塗抹在裝有 LB 培養基的 9cm 圓盤上，接著利用石蠟封口膜密封後放置 28 度 C 無光生長箱。

3. 菌種純化與保菌：從菌盤中挑選單一菌落，接種至 50ml 無菌離心管中，利用石蠟封口膜密封後放置 28°C 無光生長箱，以每分鐘 150 轉培養 1 天。

(三)篩選我們有興趣細菌

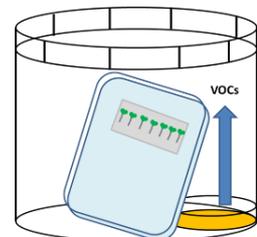
1. 將是培養隔夜之培養皿的 MS 側放入 5 顆在 1/4MS 上催芽 5 天大的植物，接著將培養皿蓋上，放置 27 度植物生長箱，5 天後進行拍照觀察
2. 5 天後觀察結果，從中找出能釋放出抑制植物生長的細菌，並加以保存以進行後續實驗。

(四)枯草桿菌氣味處理阿拉伯芥

1. 透過定序技術確認目標菌株為枯草桿菌，將枯草桿菌菌液從-80°C 冰箱中取出，並利用接種環沾取菌液後在裝有 25ml LB 培養基的 9cm 圓盤上進行四區劃線。密封後放置 28°C 無光生長箱隔夜，接著再從菌盤中挑選單一菌落，接種至無菌試管（內含有 3ml 液態 LB 培養基）。
2. 放置 28°C 無光生長箱，並以每分鐘 150 轉的速度搖盪 4 小時，4 小時後利用分光光度計測量菌液濃度調至 O.D600=1.0。接著吸取 20 μ l 的菌液塗抹在裝有 25ml LB 培養基的 9cm 圓盤上，利用石蠟封口膜密封後放置 28°C 無光生長箱 18 小時，菌盤即置備完成。
3. 氣味對植物之處理，密封罐噴灑 70%酒精進行消毒，接著將密封罐放入無菌操作臺中照射紫外光進行殺菌 1 小時，將培養在 1/4Ms 之 4 天大阿拉伯芥幼苗(已經過 2 天春化作用處理)方形盤立於罐中(如圖 1、2)所示，再把密封罐關上並利用石蠟封口膜後放置 27°C 光照 16 小時的恆溫生長箱培養。



圖 1、2: 細菌不與植物直接接觸



(五)葉片下表皮氣孔的觀察

1. 將阿拉伯芥以無菌的方式培養在 1/4MS 培養基中 4 天。
2. 將置備好的菌盤與植物一同放置 2 公升的密閉容器中，處理 3 天。
3. 利用顯微鏡觀察阿拉伯芥葉片的下表皮並且拍照。

(六)植物生化測定

1. 葉綠素含量測定

(1)取 0.05g 植物放置 2ml 的離心管，再丟入液態氮中急凍。加入 1 顆 8mm 的鋼珠至管中，利用震盪均質機，以最大震盪速度搖盪 1 分 30 秒，過程中每 30 秒需用液態氮將樣本與震盪均質機重新冷卻。

(2)組織研磨成碎片後加入 1.5 ml 之 80%冰丙酮中均勻混合，並放置震盪均質機以最大震盪速度搖盪 1 分 30 秒，接著在 4°C 下離心以最大轉速離心 15 分鐘。

(3)取出 1ml 上清液至比色管中，利用分光光度計測量波長 663.6、646.6、470.0 nm 之讀值。

2. 過氧化物之植物組織染色

利用 3,3'-diaminobenzidine (DAB)偵測植物組織內過氧化氫(H₂O₂)的含量。

配置 DAB 染劑(0.1g DAB 粉末溶於 50ml 10mM MES,pH7.0)。吸取 10 ml DAB 染劑於 5cm 圓形培養皿中，並用塑膠夾將欲染色的植物輕輕夾入裝有染劑之培養皿中。再利用 1 張拭鏡紙平鋪於植物組織上，接著利用真空幫浦中抽真空 10 分鐘。抽氣完畢後將其至於暗處避光靜置 8 小時，接著將染色完畢之組織浸泡至 99%酒精中，並加熱至葉綠素完全退色，即完成實驗。累積大量 H₂O₂ 之組織染色後呈現黃褐色。

(七)酵素活性分析

1. 蛋白質萃取

取 0.05g 植物組織加入 200μl 0.1M 磷酸鉀緩衝溶液(pH=7.0)利用均質機震盪萃取，再以 4 度 13200rpm 離心 10 分鐘，將上清液分裝置新的 1.5ml 離心管取

2. 蛋白質濃度測量

(1)利用 Bio-rad DCTM 套組測量蛋白質濃度

- (2)將 100µl Reagent A 與 2µl 蛋白質萃取液混合
- (3)加入 800µl Reagent B 後震盪均勻待其反應 15 分鐘
- (4)利用分光光度計測量 750nm 光下的吸光值
- (5)利用公式計算蛋白質濃度
- (6)蛋白質濃度(µg/µl) = 6.0636 * 750nm 光值 - 0.0308

3. CAT 活性測量

- (1)將 995 µl 的反應液(10mM H₂O₂ in 50mM 磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)與 5 µl 蛋白質萃取液混合
- (2)利用分光光度計測量 240nm 光下的吸光值，並記錄每分鐘的吸光值變化量
- (3)取前 1 分鐘的吸光值變化量，用以下公式計算酵素活性
- (4)活性 units mg-1protein= $\Delta A_{470}/26.6(\text{消光係數}) * 100(\text{稀釋倍數})/1(\text{分鐘數})/\text{蛋白質濃度}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) * 5(\text{加入的蛋白質萃取液體積 } \mu\text{l})$

4. 過氧化酶(Guaiacol Peroxidase, G-POD)活性測量

實驗原理: G-POD 是種能清除雙氧水的抗氧化酵素，G-POD 在清除雙氧水的過程，能將愈創木酚(Guaiacol)轉變成四聚體的結構，而四聚體結構的愈創木酚呈現深棕色，能吸收 470nm 波長的光，因此可藉由偵測 470nm 的吸光值來計算。

- (1) 取一根新的 1.5ml 離心管，並加入 0.5ml 100mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH7.0)，在加入 0.25ml 的蒸餾水與 0.1ml 2.5%愈創木酚。
- (2) 接著加入 2µl 的蛋白質萃樣本，利用震盪器混和均勻。
- (3) 最後加入 0.1ml 10mM 雙氧水，即開始反應。
- (4) 快速將液體倒入比色管中，測量 470nm 在第一分鐘吸光值變化。
- (5) 將讀值除以蛋白質濃度後，把結果繪製成圖。

(八)植物之基因表現測定

1. RNA 萃取:我們利用 Plant Total RNA Miniprep Purification Kit(GeneMark TR02 Kit)來萃取 RNA，我們遵循該套組所建議之實驗步驟進行 RNA 萃取，步驟如下。
 - (1)快速取<100 mg 新鮮組織、冷凍或保存於 RNAafterTM 試劑之組織，以液態氮處

理後迅速均勻研磨。

(2)立即將樣品均質液(<100 mg)放入離心管中，加入 450 μ l 的 Plant RNA Lysis B Solution /2-ME，vortex 震盪混合，於 60°C 反應 5~10 分鐘。反應過程中可來回翻轉離心管數次幫助混合。

(3)將 RNA Spin Filter(黃色墊圈)組裝至乾淨的 2 ml collection tube 中。將細胞裂解液加入，以最高轉速離心 2 分鐘。

(4)取出濾液(細胞裂解液)至新的 1.5 ml 離心管。

(5)加入相對於細胞裂解液 1.5 倍的 RNA Binding Solution/Ethanol mixture，以 vortex 震盪或微量吸管抽吸混合均勻。

(6)將 RNA spin column 組裝至新的 2 ml collection tube 中，將以上細胞裂解液 (lysate/binding/ethanol mixture)以及沉澱物，移至 RNA spin column 中，每次<700 μ l，以最高轉速離心 1 分鐘，丟棄濾液。

(7)將 RNA Spin Column 放回原來的 collection tube 中，加入 500 μ l RNA Wash Solution I，以最高轉速離心 1 分鐘，丟棄濾液。

(8)每一 RNA 樣品(以 spin column 為單位)，請事先將 80 μ l DNase I Incubation Buffer 與 2 μ l DNase I 混合，將此 82 μ l DNase I Solution 以吸管尖吸取至 RNA spin column 中心，室溫培養 15 分鐘。

(9)加入 500 μ l RNA Wash Solution I 至離心管柱，以最高轉速離心 1 分鐘，丟棄過濾液。

(10)將 RNA Spin Column 放回原來的 collection tube 中，加入 600 μ l RNA Wash Solution II，以最高轉速離心 1 分鐘，丟棄濾液。再重複此步驟一次。

(11)將 RNA Spin Column 放回原來的 collection tube 中，以最高轉速離心 3 分鐘，將殘留的酒精去除。將 RNA Spin Column 放至新的 1.5 ml 離心管。

(12)加入 30~50 μ l Nuclease-free water 到 RNA spin column 濾膜的中心，靜置 1 分鐘後，以最高轉速離心 1 分鐘回收 RNA。將回收之 RNA 樣品保存於-80°C。

2. Primers 的設計：gDNA \rightarrow cDNA \rightarrow 胺基酸

(1)參考前人的研究，找出常見的植物防禦基因。

(2)為了更確定是我們要的基因，我們從 cDNA 密碼子中找出相對的胺基酸序列。

(3)抽 RNA 時，可能會參雜一些 gDNA 而造成實驗誤差，進行 PCR 時為了避免同時放大出 gDNA，我們利用電腦當作輔助幫我們設計 primers，並實際從 cDNA 與 gDNA 之序列差異設計 primers。

3. cDNA 合成

(1)分別取如下的試劑：2 μ l RNA (0.5 μ g)；1 μ l oligo dT；7.8 μ l 無菌水，加至 0.2 ml 離心管。

(2)利用 PCR 機器進行實驗，設定條件為 70 °C 反應 5 min。

(3)立即將離心管置於冰上，使其冷卻，至少冷卻 5 min 以上。

(4)準備如下的試劑：4 μ l ImProm-II 5X reaction buffer；3.2 μ l 10mM MgCl₂；1 μ l dNTP。

(5)混合物加入 1 μ l Improm-II reverse transcript。

(6)將步驟 4 中準備好的試劑，加至含步驟(1)的離心管中。

(7)利用 PCR 機器進行實驗，設定條件為 25°C 反應 5 min，42°C 反應 1hr，70°C 反應 15 min。

(8)將製備好的 cDNA 存放-20 °C 冰箱中。

4. qPCR 法測定基因表現量

(1)將製備完成的 cDNA 利用無菌蒸餾水稀釋 8 倍。

(2)接著取 2 μ l 稀釋過的 cDNA 當做 PCR 放大的模板，與 10 μ l PCR GoTaqR Q-PCR Master Mix, 4 μ l forward primer(1 μ M), 4 μ l reverse primer(1 μ M)均勻混和，並加入 fasr optical reaction tubes(Han Gene)管子中。

(3)將管子放入 StepOnePlus Real-TimePCRSystems 儀器，即可開始進行 Q-PCR 分析。我們選用 94°C 處理 10 分鐘作為變性條件。再以變性溫度 94°C 處理 15 秒，引子黏合溫度 50°C 處理 15 秒進行 40 個循環。最後將實驗結果進行計算，得知基因表現量。

二、研究流程

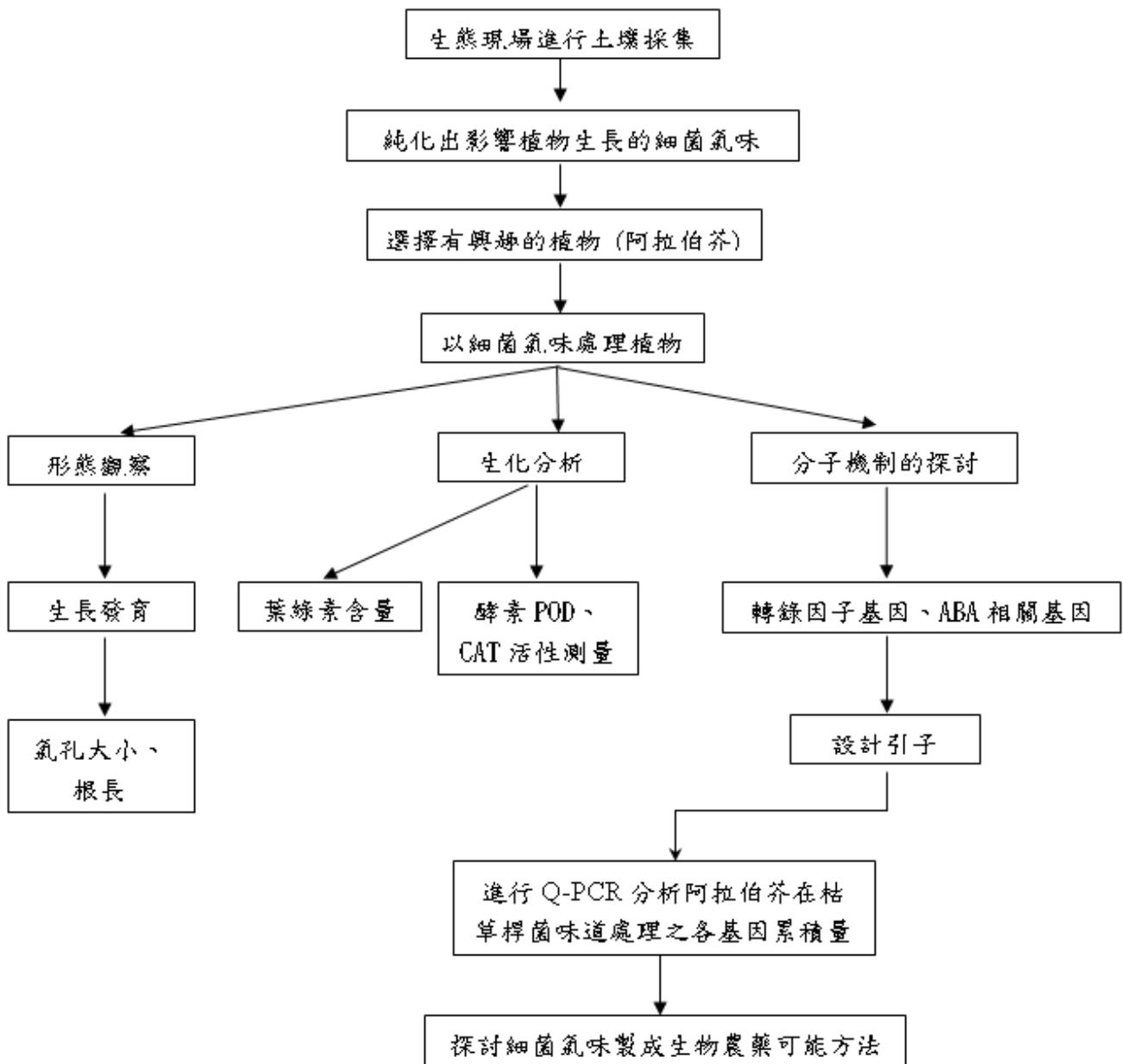


圖 3、流程圖

伍、研究結果

一、不同土壤微生物對植物生長發育有不同影響



第一取樣點：離海岸約 500m 之防風林
第二取樣點：離海岸約 100m 之防風林

圖 4、土壤菌種培養

1. 不同地點下土壤的細菌種類不同，對植物的生長影響也不同,有些細菌可幫助植物生長,例如:此次實驗中可見枯木下細菌使植物長得比較好，相反的有些細菌會抑制植物生長,例如枯木外細菌使植物長得比較不好。

二、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥生長與發育的影響

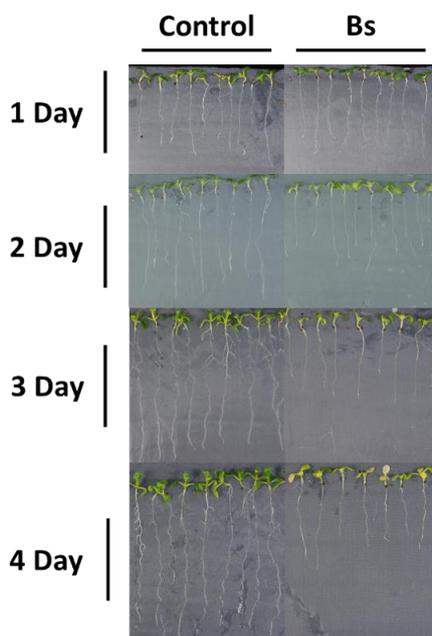


圖 5、經枯草桿菌氣味處理 1-4 天之阿拉伯芥

(一)根長

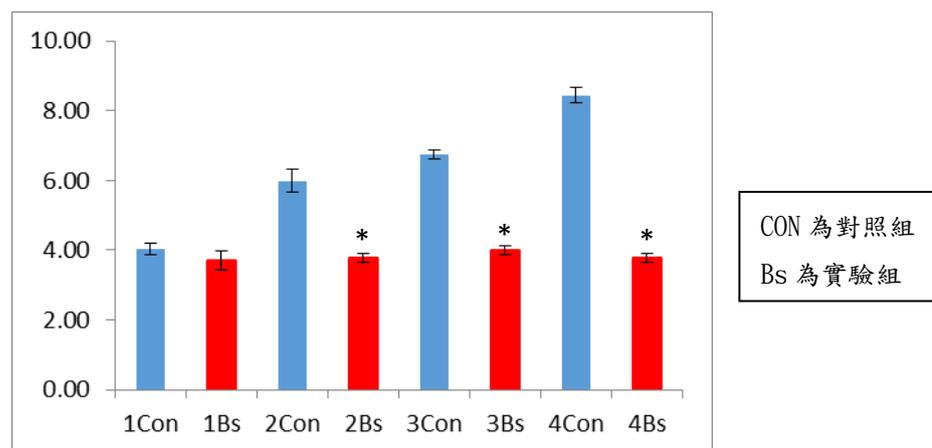


圖 6、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥根部生長的影響

表 1、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥根部生長的影響

	對照組 第一天	實驗組 第一天	對照組 第二天	實驗組 第二天	對照組 第三天	實驗組 第三天	對照組 第四天	實驗組 第四天
第一組	3.87	3.43	5.66	3.49	6.62	3.55	8.23	3.57
第二組	4.21	3.98	6.32	3.77	6.89	3.82	8.65	3.80
平均	4.04	3.71	5.99	3.78	6.76	3.99	8.44	3.78
誤差	0.17	0.275	0.33	0.14	0.135	0.135	0.21	0.115
Test		0.408974		0.022303		0.003845		0.002526

註 1:每組取 10 顆平均。 註 2:單位為 cm。

1. 4 天大的阿拉伯芥進行枯草桿菌氣味處理 1 天到 4 天，結果如(圖 5；圖 6；表 1)所示。藉由量測阿拉伯芥根長可以發現在枯草桿菌氣味處理下，根部生長受抑制。
2. 隨處理時間越長，根長與對照組差異越明顯，實驗組根長分別為對照組的 91.8 %、63.1%、59.0 %及 44.8 %，結果如(圖 6；表 1)所示，由此確認枯草桿菌氣味能有效抑制阿拉伯芥根部生長，在枯草桿菌氣味處理下阿拉伯芥根長幾乎不再變長。

(二)鮮重

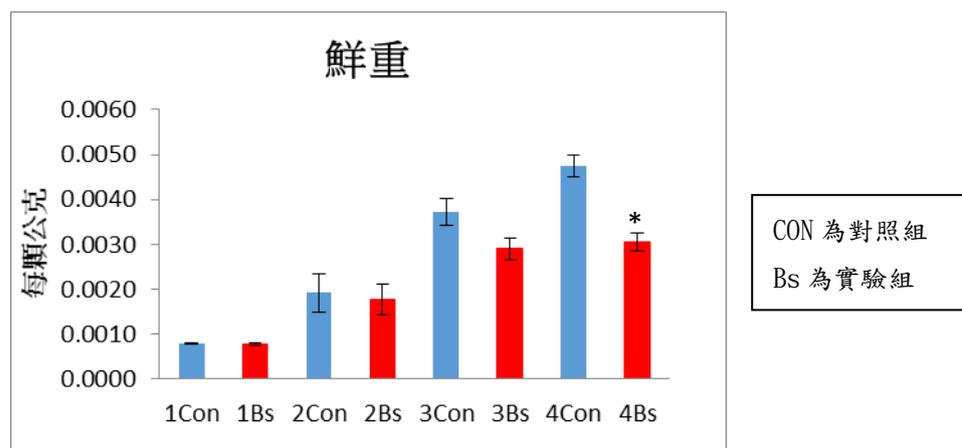


圖 7、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片鮮重的影響

表 2: 枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片鮮重的影響

對照組		實驗組	對照組	實驗組	對照組	實驗組	對照組	實驗組
第一天		第一天	第二天	第二天	第三天	第三天	第四天	第四天
0.0008	第一組	0.0008	0.0023	0.0021	0.0040	0.0027	0.0050	0.0029
0.0008	第二組	0.0008	0.0015	0.0014	0.0034	0.0032	0.0045	0.0033
0.0008	平均	0.0008	0.0019	0.0018	0.0037	0.0029	0.0048	0.0031
2.41E-05	誤差	3.41E-05	0.00042	0.000344	0.0003	0.00025	0.00025	0.0002
	test	0.832988		0.816173		0.167457		0.033685

註 1:每組取 10 顆平均。 註 2:單位為每顆公克。

1. 短時間的枯草桿菌氣味處理沒有明顯影響阿拉伯芥植株的鮮重，從測量全株鮮重的結果可以看出，在處理枯草桿菌氣味 1 到 2 天的過程，其全株鮮重分別為對照組的 100.0 % 與 94.7% ，結果如(圖 7；表 2)所示。
2. 當枯草桿菌氣味處理阿拉伯芥植株，天數到達第 3 和第 4 天後，處理組的全株鮮重為對照組的 78.4 % 與 64.6%，也就是當處理超過 3 天後，鮮重開始明顯下降。

三、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉綠素合成之影響

(一)葉綠素 a

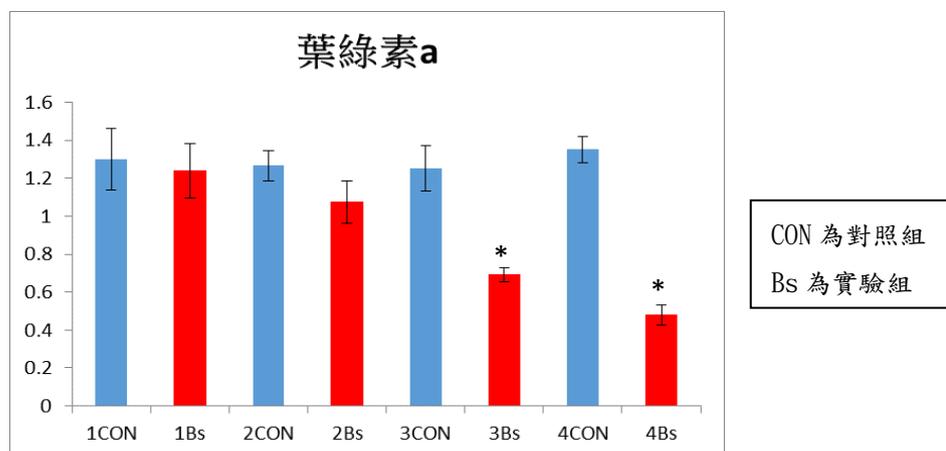


圖 8、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素 a 含量的影響

表 3、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素 a 含量的影響

	對照組 第一天	實驗組 第一天	對照組 第二天	實驗組 第二天	對照組 第三天	實驗組 第三天	對照組 第四天	實驗組 第四天
第一組	1.1400	1.0953	1.1867	0.9604	1.1351	0.7287	1.2828	0.5333
第二組	1.4613	1.3832	1.3474	1.1858	1.3698	0.6545	1.4219	0.4267
平均	1.3006	1.2393	1.2671	1.0731	1.2525	0.6916	1.3524	0.4800

註:單位為每顆毫克

(二)葉綠素 b

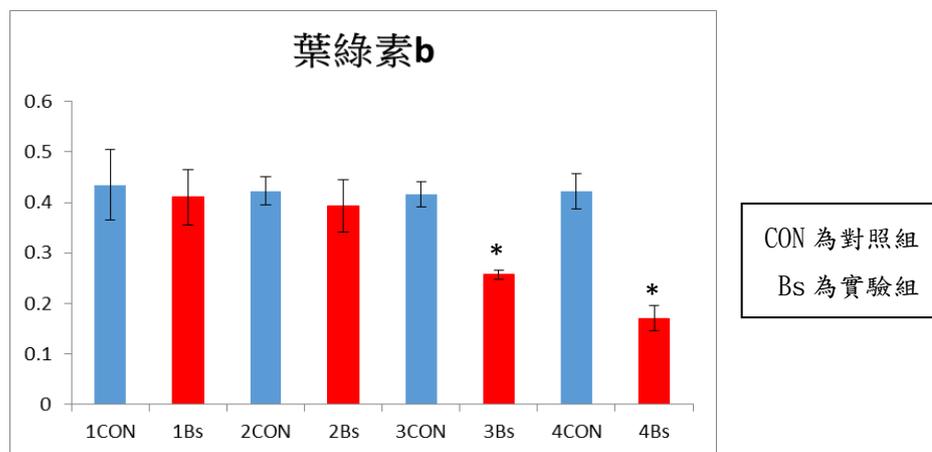


圖 9、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素 b 含量的影響

表 4、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素 b 含量的影響

	對照組 第一天	實驗組 第一天	對照組 第二天	實驗組 第二天	對照組 第三天	實驗組 第三天	對照組 第四天	實驗組 第四天
第一組	0.3652	0.3557	0.3960	0.3424	0.3914	0.2653	0.3865	0.1953
第二組	0.5046	0.4654	0.4500	0.4444	0.4410	0.2488	0.4576	0.1459
平均	0.4349	0.4105	0.4230	0.3934	0.4162	0.2571	0.4221	0.1706

註:單位為每顆毫克

(三)葉綠素總量

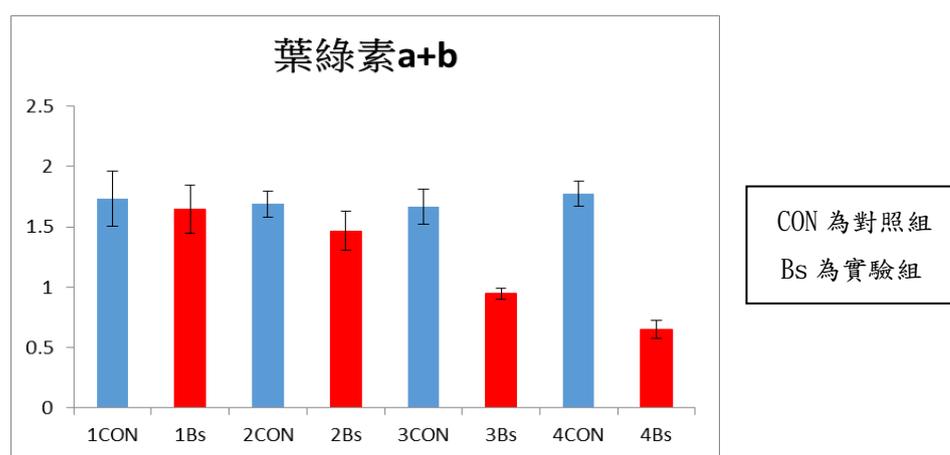


圖 10、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素總量的影響

表 5、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片葉綠素總量的影響

	對照組 第一天	實驗組 第一天	對照組 第二天	實驗組 第二天	對照組 第三天	實驗組 第三天	對照組 第四天	實驗組 第四天
第一組	1.5052	1.4510	1.5827	1.3028	1.5265	0.9940	1.6692	0.7286
第二組	1.9658	1.8487	1.7974	1.6303	1.8108	0.9033	1.8796	0.5725
平均	1.7355	1.6498	1.6901	1.4666	1.6686	0.9486	1.7744	0.6506

註:單位為每顆毫克

(四)類胡蘿蔔素

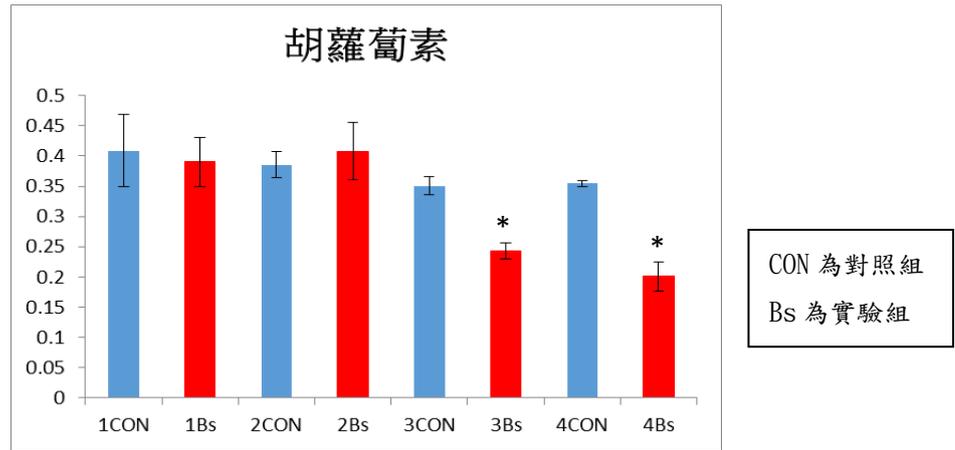


圖 11、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片類胡蘿蔔素含量的影響

表 6、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥葉片類胡蘿蔔素含量的影響

	對照組 第一天	實驗組 第一天	對照組 第二天	實驗組 第二天	對照組 第三天	實驗組 第三天	對照組 第四天	實驗組 第四天
第一組	0.3491	0.3497	0.3639	0.3604	0.3364	0.2557	0.3597	0.2247
第二組	0.4688	0.4311	0.4074	0.4547	0.3652	0.2293	0.3493	0.1774
平均	0.4089	0.3904	0.3857	0.4075	0.3508	0.2425	0.3545	0.2010

註:單位為每顆毫克

1. 從外觀形態上可看出阿拉伯芥葉片隨著處理時間增長，黃化程度則更加明顯。
2. 量測葉綠素的結果可以看出葉綠素 a、葉綠素 b、類胡蘿蔔素與總葉綠素含量皆隨著處理時增長而有越低之趨勢，結果如(圖 8、9、10、11；表 3、4、5、6)所示，由其在第 3 天後都有顯著下降趨勢。
3. 葉綠素 a 隨著處理的天數，其含量分別為對照組的 95.3 %、84.7 %、55.2 %與 35.5 %，結果如(圖 8；表 3)。
4. 葉綠素 b 同樣隨著處理處理的天數，其含量分別為對照組的 94.4%、93.0%、61.8 %與 40.4 %，結果如(圖 9；表 4)。
5. 葉綠素的總量也隨著處理處理的天數而遞減，含量分別為對照組的 95.1%、86.8 %、56.9 % 與 36.7 %，結果如(圖 10；表 5)。
6. 類胡蘿蔔素與前三者有著相似的趨勢，其隨著處理處理的天數，含量分別為對照組的 95.5 %、105.7 %、61.8 % 與 40.4 %，結果如(圖 11；表 6)。

四、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥氣孔閉合的顯微鏡照片

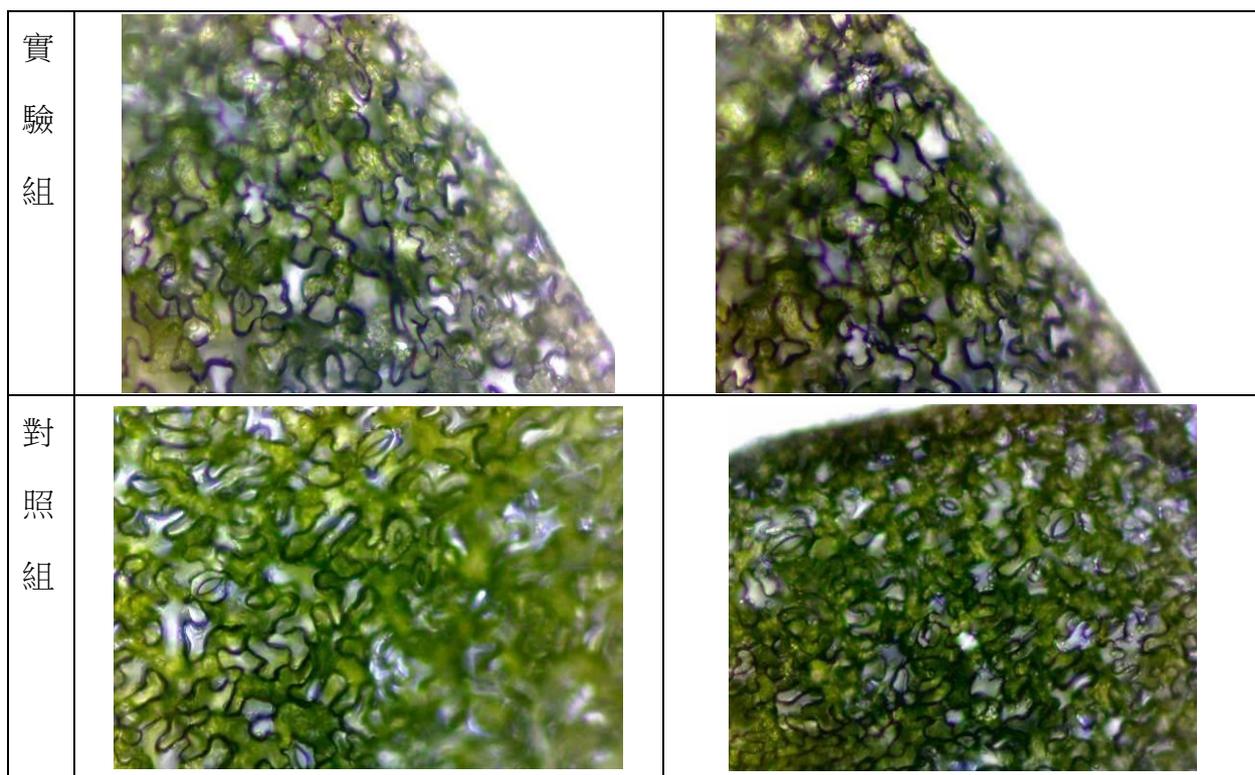


圖 12、枯草桿菌氣味影響阿拉伯芥氣孔閉合 (放大倍率:100*)

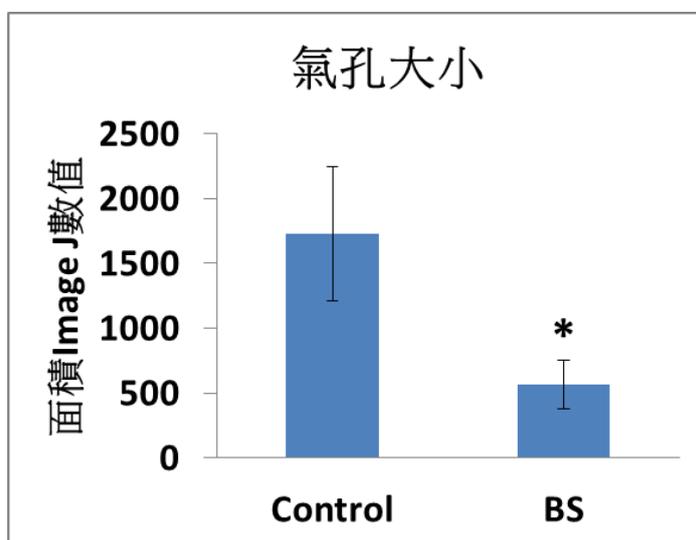


圖 13、枯草桿菌氣味促使阿拉伯芥氣孔閉合

表 7:利用 Image J 計算阿拉伯芥氣孔面積

氣孔開合面積比		
	Image J 數值	與對照組比
對照組	1725.2	100.0 %
實驗組	563.8	32.68 %

1. 阿拉伯芥在處理枯草桿菌氣味 2 天後，可以觀察到阿拉伯芥氣孔的開合面積明顯下降。
2. 利用 Image J 軟體計算後，處理組的氣孔面積約為對照組的 32.68 %。

五、枯草桿菌氣味對阿拉伯芥的影響與生理反應

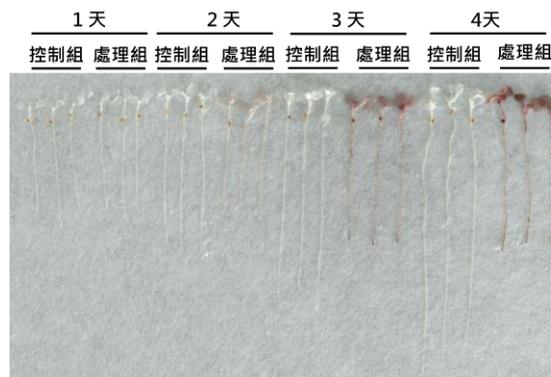


圖 14、枯草桿菌氣味誘導阿拉伯芥累積過氧化物

(一)步驟與結果

1. 4 天大的阿拉伯芥進行枯草桿菌氣味處理 1 到 4 天，並利用 3,3'-diaminobenzidine (DAB)進行組織染色，觀察在枯草桿菌氣味處理後阿拉伯芥內部過氧化氫(H_2O_2)的含量。
2. 從組織染色的結果可以清楚看出阿拉伯芥亦在枯草桿菌氣味處理下會累積過氧化氫，從第 2 天開始看出差異，第 3 天開始處理組過氧化氫含量明顯高於對照組，結果如(圖 14)所示。

六、酵素的活性

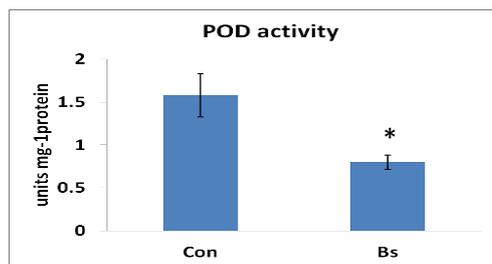


圖 15、POD 活性測定

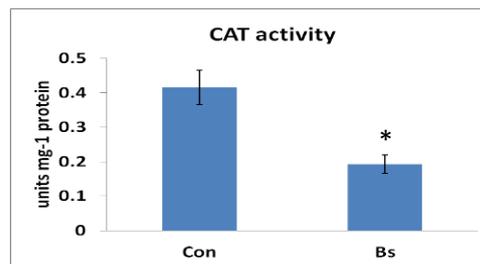


圖 16、CAT 活性測定

1. 由圖 15、16 可知 POD 和 CAT 酵素在經枯草桿菌氣味處理後，活性都降低。

七、阿拉伯芥在枯草桿菌氣味下之分子機制

我們將 4 天大的野生種阿拉伯芥以枯草桿菌氣味處理 3 天，並抽出其 RNA，並用 qPCR 觀測一些有興趣之基因的基因表現量。

(一)實驗步驟與結果

1. 透過 NCBI 網頁查詢基因序列，接著自己設計引子包括 Forward primer 與 Reverse primer 如表 8。
2. 利用 qPCR 分析基因的表現結果，如表 9; 圖 17。

表 8、設計出的引子的資訊

Loucs	Function	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	product	
AT1G01480	ACS2	Forward primer	ACATCGCTAATTTCCAAGACTACCA	25	60.34	40	4	0	219bp
		Reverse primer	CTCTATCAAATGCGGCATAGTACG	24	59.68	45.83	7	3	
AT5G64750	ABR1	Forward primer	CTAAAGTGAGAGAAGCTTCGAG	22	56.32	45.45	8	2	323bp
		Reverse primer	GGTTGAAGCAGGTCTAACGAG	21	58.66	52.38	3	0	
AT2G44840	ERF13	Forward primer	TTGTACCGGAGTTGGATTTTCAC	22	58.6	45.45	4	1	146bp
		Reverse primer	TCATACAGCAAACTCGTTGGAC	23	59.5	43.48	4	1	

AT2G47190	MYB2	Forward primer	CGTTCCTCTGGGCTAAAGC	19	58.23	57.89	4	4	320bp
		Reverse primer	GATTGGGCGTTGATTCGTTCC	21	60.2	52.38	3	0	
AT1G56600	GoLS2	Forward primer	GAGTTCGTGGAGTACAACAAG	21	56.6	47.62	4	4	294bp
		Reverse primer	GACCGTCTCCAAGAGGTTATG	21	57.83	52.38	5	0	
AT3G14440	NCED3	Forward primer	CGGTTTCTGGGAGATGGCTT	20	60.04	55	3	1	202bp
		Reverse primer	GGCTTAACAACAATGGCGGG	20	60.11	55	4	0	

表 9、阿拉伯芥在枯草桿菌氣味處理 3 天後，基因的表現量

		average	SD	p-value
*	GoLS2	13.065	1.420	0.014
*	NCED3	4.565	0.675	0.034
*	ABR1	16.592	3.281	0.042
*	MYB2	1.946	0.171	0.031
*	ACS2	6.722	0.742	0.016
*	ERF13	4.040	0.460	0.022

註:對照組為 1.000

* P<0.05

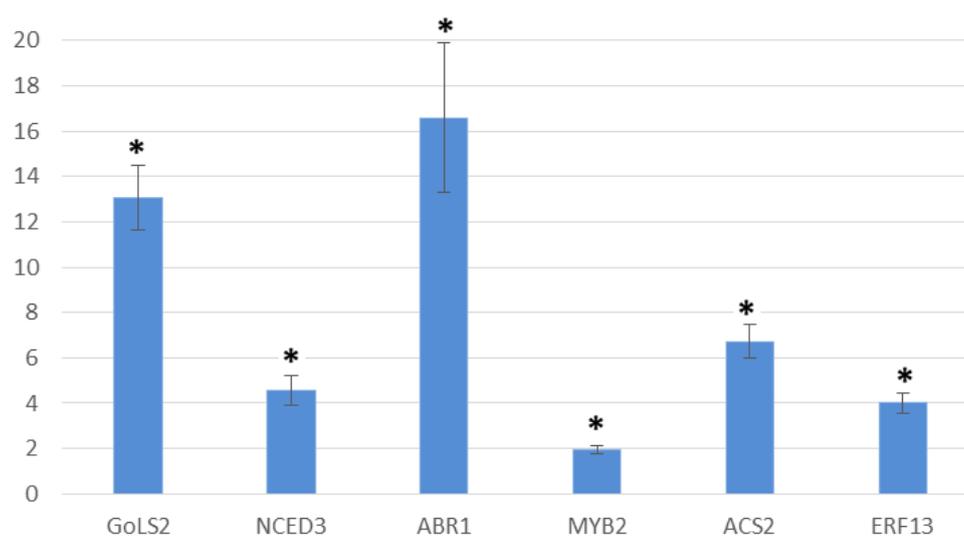
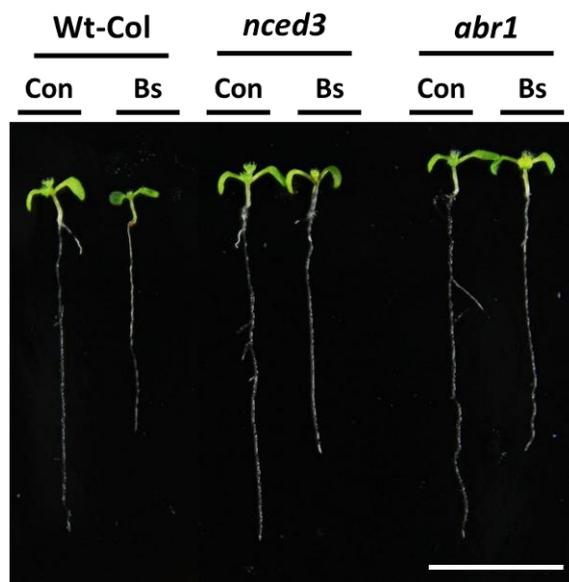
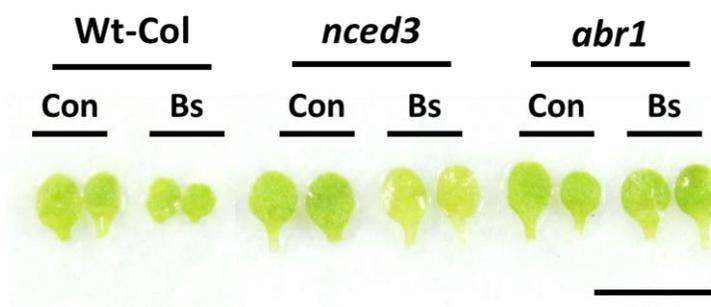


圖 17、阿拉伯芥在枯草桿菌氣味處理 3 天後，基因的表現量

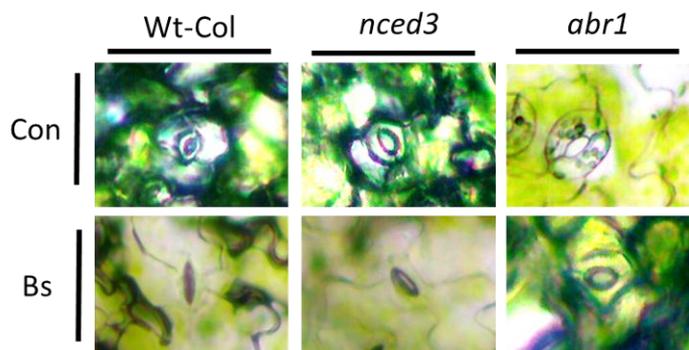
八、利用突變株探討 ABR1 與 NCED3 在枯草桿菌下的功能與角色



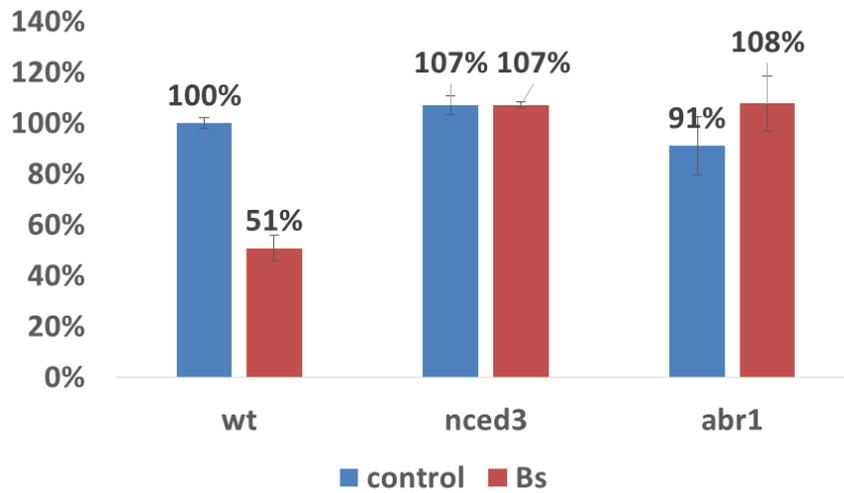
▲圖 18、不同突變株在枯草桿菌氣味處理 3 天後的植物形態照片，比例尺代表 1 公分



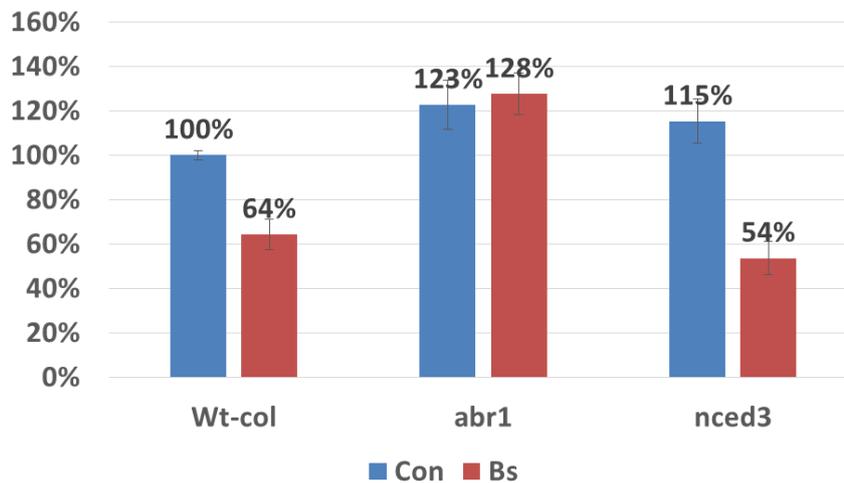
▲圖 19、不同突變株在枯草桿菌氣味處理 3 天後的子葉照片，比例尺代表 0.5 公分



▲圖 20、不同突變株在枯草桿菌氣味處理 3 天後的氣孔照片



▲圖 21、阿拉伯芥突變株，細菌氣味處理 3 天的子葉面積



▲圖 22、阿拉伯芥突變株，細菌氣味處理 3 天的氣孔面積

(一)實驗結果

1. 與阿拉伯芥野生種比較 abr1、nced3 突變株葉片對於 *B. subtilis* 揮發性物質的敏感度改變，根部則無此現象。
2. 在 *B. subtilis* 氣味處理下，abr1 突變株葉片生長未受抑制，氣孔面積和對照組大約相同。
3. 在 *B. subtilis* 氣味處理下，nced3 突變株葉片生長未受抑制，氣孔關閉則和對照組一樣，有關閉的趨勢。

陸、討論

- 一、不同地點下土壤的細菌數量及細菌種類不同，可篩選出具有農業應用價值的菌種，例如我們從土壤樣本中純化出來的枯草桿菌，無須直接接觸阿拉伯芥，利用氣味即可抑制阿拉伯芥生長，適當的利用細菌氣味對植物生長發育的相剋作用影響，可製成生物農藥。
- 二、綜合以上結果得知當枯草桿菌氣味處理阿拉伯芥一定時間長可看到抑制現象，實驗數據得知到達第 3 天後，阿拉伯芥鮮重增加開始明顯減緩，且根部生長明顯被抑制，我們推測這些現象可與下現象有關:
 - (一)枯草桿菌的氣味處理阿拉伯芥後，會促使其氣孔關閉因而降低光合作用速率。
 - (二)實驗結果得知阿拉伯芥受到枯草桿菌氣味處理會導致其葉片黃化，光合作用相關色素-葉綠素 a、b 含量下降，進而也影響光合作用效率、抑制阿拉伯芥生長。
- 三、植物賀爾蒙的誘導: ABA、乙烯和合成相關基因表現量上升，過度的提高這些植物賀爾蒙含量會讓植物造成傷害，也因此推論葉片黃化是因為大量累積乙烯造成的。
- 四、*abr1* 突變株實驗結果顯示，阿拉伯芥在枯草桿菌氣味下，*ABR1* 應參與阿拉伯芥在枯草桿菌氣味下由 ABA 啟動的相關生理反應，包含抑制葉片生長，氣孔關閉。
- 五、*ncde3* 突變株實驗結果顯示，阿拉伯芥在枯草桿菌氣味下，*NCDE3* 應參與阿拉伯芥在枯草桿菌氣味下由 ABA 啟動的相關生理反應，包含抑制葉片生長，但對於氣孔關閉影響不大。
- 六、一些抗氧化酵素(catalase、peroxidase)活性降低，造成過氧化物(ROS)的累積，造成植物體內氧化壓力，影響細胞生理反應。

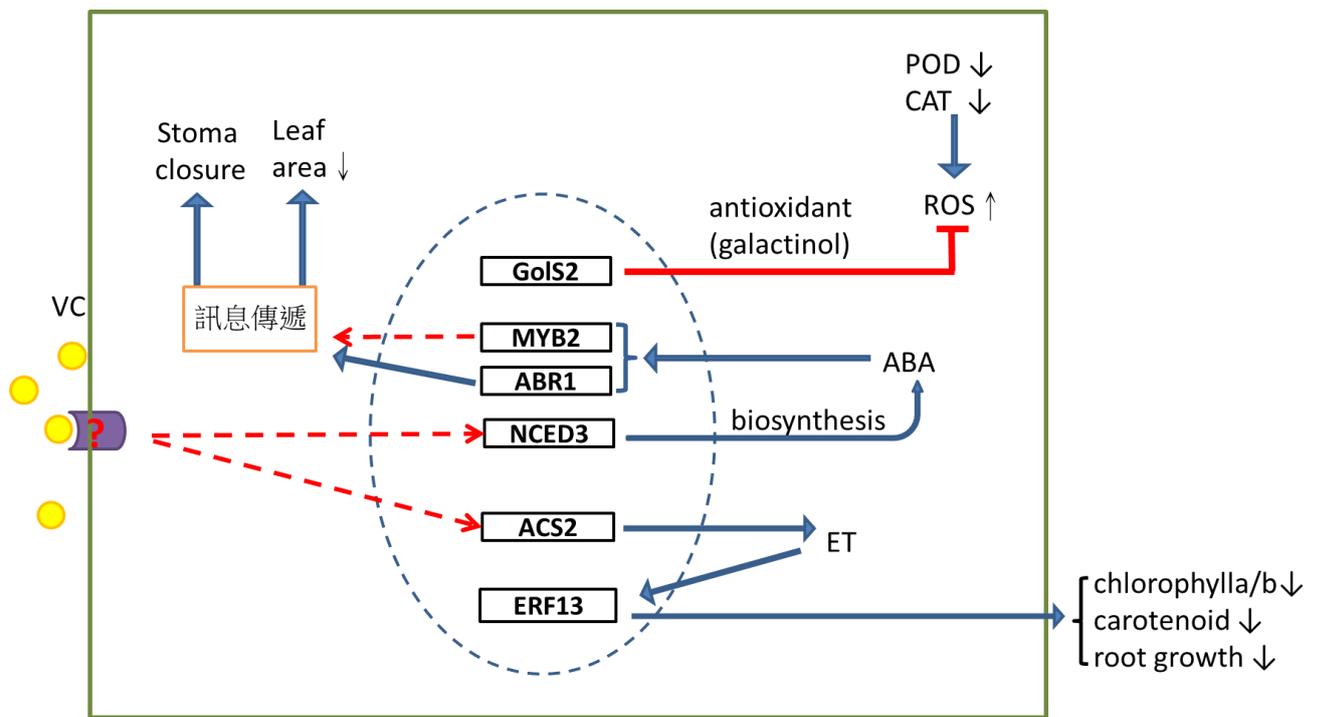


圖 23、分子機制圖

柒、結論與應用

阿拉伯芥在受到 *B. subtilis* 氣味處理後會對植物產生一系列的生理影響，包括抑制根長生長，葉綠素含量降低，過氧化物質的累積，透過 q-PCR 技術檢測基因表現量，探討枯草桿菌氣味對阿拉伯芥影響的分子機制，從中發現當阿拉伯芥暴露在枯草桿菌氣味中，其會誘導乙烯和 ABA 生合成基因表現上升。產生適當的乙烯、ABA 和 ROS，過量時會使植物造成負面影響。土壤中潛藏了許多具有應用價值的微生物，有的微生物能抑制植物生長。可貴的是微生物對於植物的影響未必需要透過直接接觸，像是我們從土壤中篩選出的枯草桿菌的氣味即可對阿拉伯芥的生長造成顯著影響，細菌氣味散掉以後較不會對土壤造成傷害。

我們想將篩選到的細菌製成生物製劑，並且使其不與土壤直接接觸，而藉由其散發的氣味來抑制雜草生長，這樣除了可使土壤中不要殘留細菌帶來的不好物質，也可減少化學農藥的使用，降低環境污染。



圖 24、25: 以細菌氣味作為天然農藥示意圖、結果圖

捌、參考資料及其他

- 一、Ayako Nishizawa. etc. 2008. Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiology*, Vol. 147, pp. 1251 - 1263.
- 二、Birkenbihl RP1, Diezel C, Somssich IE. 2012. *Plant Physiol.* 159(1):266-85. doi: 10.1104/pp.111.192641.
- 三、Choi DS, Hwang BK, 2011, Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling. *Plant Cell*;23(2):823-42.
- 四、Gerit Bethke. etc. 2012. Activation of the *Arabidopsis thaliana* Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide, flg22. *MPMI* Vol. 25, No. 4, 2012, pp. 471 - 480.
- 五、Izabela M. Juszczuk and Anna M. Rychter. 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica* Vol. 50 No. 4. 1257 - 1271.
- 六、LiuWu, DaiLiangying, 2007, ERF Transcription Factors Related to Plant Stress-Tolerance. *Chinese Agricultural Science Bulletin*; Vol.23 No.4.
- 七、NA Khan. ed. 2006. Ethylene action in plants. *Ann Bot.* 63-64. 99(3): 561.
- 八、Willem F. Broekaert, Stijn L. Delauré, Miguel F.C. De Bolle, and Bruno P.A. Cammue. The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology* Volume 44, 2006.

【評語】 052107

1. 本研究以枯草桿菌與阿拉伯芥為材料探討枯草桿菌揮發性物質對植物生長的影響。
2. 以細菌的氣味探討細菌與植物的交互作用為研究主題頗具創意。
3. 本成果是否能發展為生物性農藥仍待確認。