

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 植物學科

佳作

052101

探討芒果炭疽病菌對光的感應及反應

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 郭怡翎	指導老師： 邱伯勤
---------------	--------------

關鍵詞：芒果炭疽病菌、光照反應、光敏素

摘要

愛文芒果是台灣重要經濟果樹，其對炭疽病卻甚為感病，是芒果產銷上一大問題。病原菌在生長及感染時受外在環境影響，因此本研究希望藉由分析芒果炭疽病菌野生型菌株與光敏素突變菌株之發展、耐乾燥能力及致病能力等試驗去探討芒果炭疽病菌對光之感應及反應。本研究發現黑暗培養可抑制炭疽病菌產孢，但同時可促進發病、生長及孢子發芽，黑暗培養所獲得孢子對乾燥逆境有較好耐受性；藍光會抑制所有菌株生長及產孢，光敏素的缺失影響四種光源下孢子發芽及遠紅光下產孢。分析光敏素基因的表現量，發現於黑暗下表現量最低而遠紅外可誘導基因表現。本研究為芒果炭疽病菌對光感應及反應之首次研究報告，期望本研究成果可提供於芒果採收後儲藏之病害管理。

壹、研究動機

芒果為台灣農業外銷市場的一大重要水果。芒果炭疽病菌時常感染其果實使其果實表面布滿黑斑，芒果炭疽病是全球芒果產區都面臨的嚴重問題。在高溫且高濕的環境中，採收後的芒果，炭疽病罹病率可達 90 - 100%。本研究想深入探討是否有方法可以減緩芒果炭疽病的病徵或抑制芒果炭疽病菌生長及產孢，並且找尋除了噴灑農藥之外的防治方法，使芒果在產銷上面可以更加順利。現今許多農民防治芒果炭疽病菌的方式為噴灑農藥及套袋，但本研究認為噴灑農藥會危害到環境及人體，因此本研究希望可以透過物理性或化學性的方法防治芒果炭疽病，以同時達到減緩芒果炭疽病的病徵及對環境的危害性最小。

本研究想深入了解光照與芒果炭疽病菌的生長之間的關聯，並開始查詢芒果炭疽病菌基因中與光接受有關的基因為何。最後發現芒果炭疽病菌中的組胺酸激酶有光敏素的基因序列，光敏素為光色素蛋白，芒果炭疽病菌光敏素色素蛋白的蛋白結構分析顯示具有多種蛋白功能，除了具接受光的光敏素 (phytochrome) 功能區，還具有與訊號傳遞有關的蛋白功能區。因此本研究決定以芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株 ($\Delta CgHK1$) 做為實驗研究對象。芒果炭疽病菌主要以分生孢子為感染源危害芒果，病原菌在生長與發育及感染時常受外在環境影響，因此本研究希望藉由分析芒果炭疽病菌野生型菌株與光敏素突變菌株之生長、產孢能力、孢子發芽與耐乾燥能力、及致病能力等試驗去探討芒果炭疽病菌對光之感應及反應，並進一步研究四種光源對芒果炭疽病菌對光之感應及反應以及滲透壓逆境環境之影響，除上述之病原菌特性分析外，也增加芒果炭疽病菌之對植物有毒代謝物分析。期待本研究可以透過給予不同光照的方式減緩芒果炭疽病菌的生長發現病原菌對光的感應及反應，並在未來提供其他研究參考，應用到農業發展上，使芒果的外銷更加順利。

貳、研究目的

本研究希望能透過光照的方式防治芒果炭疽病菌，為了能夠找出光照與芒果炭疽病菌之間的關係，本研究提出以下幾點實驗目的，希望能夠找出他們之間的關聯。

- 一、探討不同光照時間對芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株的生長、產孢、耐乾燥能力、孢子致病及發芽能力的影響。
- 二、探討不同波長的光對芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株的生長、產孢、孢子致病及發芽能力的影響。
- 三、了解芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株生長時產生的代謝物對葉片的影響。
- 四、探討芒果炭疽病菌野生株於不同色光照射處理之 *CgHKL* 基因表現。
- 五、了解不同波長的光及光敏素對芒果炭疽病菌於滲透壓逆境下的生長能力影響。

參、儀器與材料

一、研究儀器

無菌操作台、恆溫生長箱(25°C)、木架燈箱、不同波長的燈管(白光、藍光、紅光、遠紅光)、血球計數器、UV 燈箱、複式顯微鏡、離心機、電泳槽、熱循環機、微量吸管、微量離心管、離心管、無菌針頭、培養皿、滅菌釜、Rotor-Gene Q Series 儀器。

二、研究材料

芒果葉片(愛文、凱特、懷特)嫩葉、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 Potato Dextrose Agar (PDA)、Murashige and Skoog (MS) 培養基、modified Czapek's (CZ) broth 培養基、馬鈴薯葡萄糖培養基 Potato Dextrose broth (PDB)、乙酸乙酯 Ethyl acetate (EA)、二甲基亞砜 Dimethyl sulfoxide (DMSO)、TRIzol、氯仿 (Chloroform)、異丙醇 (Isopropanol)、75%乙醇、RNase-Free Water、Oligo d(T) primer、MMLA HP RT 10x Reaction Buffer、100mM DTT、RiboGuard RNase Inhibitor、10mM dNTP、MMLV High Performance Reverse Transcriptase、瓊脂 (Agarose)、Bee Taq polymerase、溴化乙錠、10x TAE buffer、Primer F、Primer R、Modified Czapek's (0.2 % NaNO₃、0.05 % MgSO₄·7H₂O、0.05 % KCl、0.001 % FeSO₄·7H₂O、0.1 % K₂HPO₄、10 mM Sucrose 和 1.5 % agar)、1 M Sorbitol。



無菌操作台



血球計數器



木架燈箱, 不同波長的燈管(白光、藍光、紅光、遠紅光)



滅菌釜



微量吸管



UV燈箱(照膠台)



複式顯微鏡



Rotor-Gene Q Series



離心機 (4 °C)

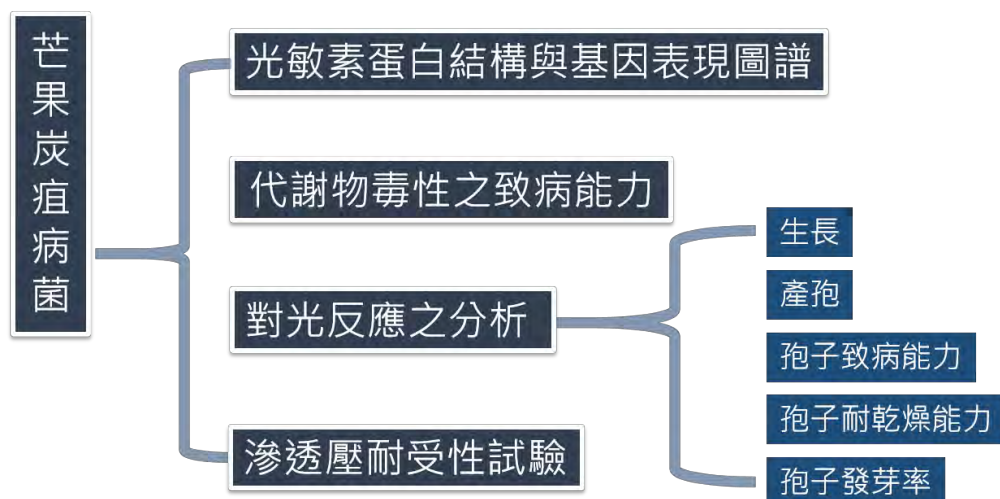


熱循環機



電泳槽

肆、研究流程



伍、實驗方法

一、菌株來源及保存

(一)來源

1. 本研究使用之芒果炭疽病菌株 CgTYC-2 及其光敏素基因突變株 Δ CgHK1 A5、 Δ CgHK1 B12、 Δ CgHK1 B13 是由中興大學李敏惠老師實驗室提供。

(二)短期保存菌株

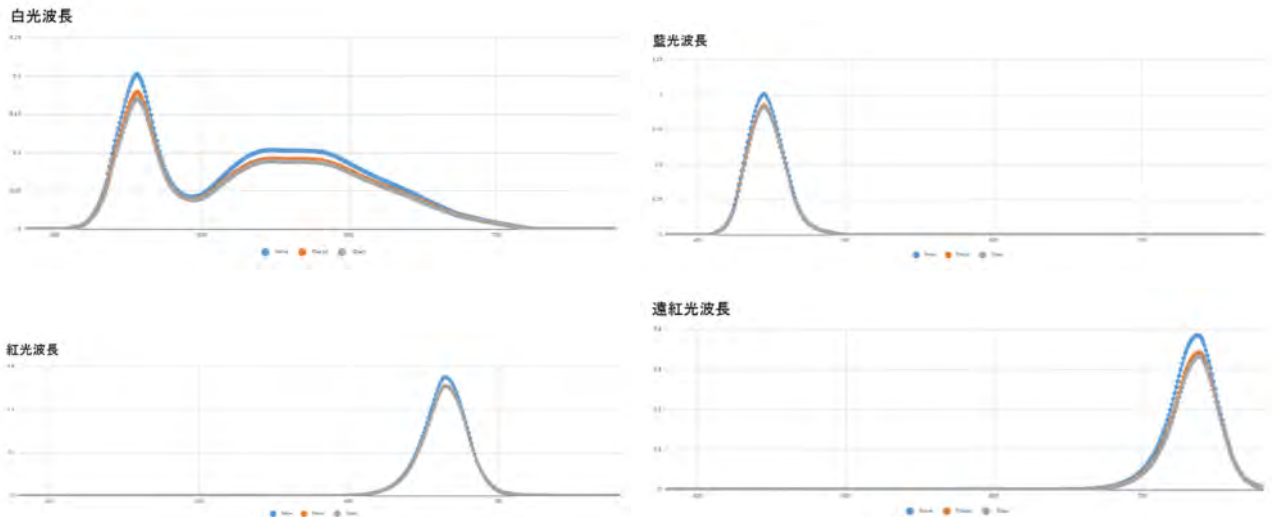
1. 從 -80 °C 的冰箱中取出菌株。
2. 將其移植至 PDA 培養基中於 25 °C 的生長箱培養 6-7 天。
3. 沿菌株外緣切塊放入 1.5 mL 的微量離心管中放入 4 °C 冰箱中保存備用。

二、光照條件於芒果炭疽病菌生長之影響

(一) 24 小時光照 (LL)、12/12 光暗輪替 (LD)、24 小時黑暗 (DD)。

1. 將各菌株之孢子懸浮液 (500 顆) 接種於 PDA 培養基與 MS 培養基上，置於培養基正中央。
2. 將培養皿放進酒精消毒後的塑膠盒中。
3. 以光度計測量生長箱的光強度。
4. 將已接種芒果炭疽病菌的培養基分別放進 25 °C 的生長箱中，給予 24 小時光照與 12 小時光暗輪替與 24 小時黑暗的條件。所用為一般燈管，光亮度為 2500 LUX。
5. 再量測其生長直徑、產孢數，探討孢子的致病能力、耐乾燥程度、發芽率。
6. 每個處理三重複，本實驗共重複兩次。

(二)不同波長的光 (白光、藍光 450 nm、紅光 660 nm、遠紅光 740 nm)



1. 本研究之各種光源處理，所使用之光源為 LED 燈之白光(PPFD=93 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ，5000 LUX)、藍光(PPFD=115 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ，5000LUX)、紅光(PPFD=107 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ，2500LUX) 及遠紅光(PPFD=3.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ，200LUX)，提供之波長範圍如上所示，測試時分為無遮蓋 (藍線)、透明塑膠培養皿遮蓋 (橘線)、透明玻璃培養皿遮蓋 (灰線)。
2. 芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株 $\Delta\text{CgHK1 A5}$ 、 $\Delta\text{CgHK1 B12}$ 和 $\Delta\text{CgHK1 B13}$ 接種於 PDA 培養基與 MS 培養基或山梨糖醇查氏培養基正中央。
3. 以保鮮膜分別將培養皿周圍封住，保持濕度。
4. 將接種後的培養基分別放入置有白光、藍光、紅光、遠紅光燈管的木架燈箱中，進行光照培養 5-7 天，燈箱置於 27 °C 溫控之小房間，各木箱並放置一溫溼度紀錄器記錄其溫度及濕度。
5. 溫度計錄顯示藍光光箱盒內溫度介於 27.5~28°C 之間，其他三的光箱內的溫度則介於 27~27.5°C 之間，濕度皆在 47% 左右。
6. 於收培養基的當天量測其生長直徑、產孢數，探討孢子的致病能力、代謝物毒性及滲透壓耐受性。

三、量測菌落生長直徑

- (一) 將接種芒果炭疽病菌之培養基從生長箱或燈箱取出後拍照記錄菌落型態，從培養皿背面描繪菌落的邊緣。
- (二) 選取兩條具代表性之菌落直徑測量其長度後取平均。
- (三) 每處理有三重複 (每菌株在每光源處裡有三皿)，此實驗共重複三次。

四、孢子計數

(一)方法一

1. 將培養於 MS 培養基 6-7 天的芒果炭疽病菌加入 1 mL 的無菌水。
2. 以無菌的解剖刀輕輕刮落培養基表面孢子，孢子與水混合成孢子懸浮液。
3. 以微量吸管吸取孢子懸浮液通過已滅菌的微孔紗布 *miracloth* 進行過濾，濾液收集至 1.5 mL 微量離心管。
4. 孢子濃度藉由血球計數器計數後計算。
5. 可做為計算整皿的孢子量，也是用來製備接種源的方法。

(二)方法二

1. 將芒果炭疽病菌野生株及突變株 $\Delta CgHK1 A5$ 、 $\Delta CgHK1 B12$ 、 $\Delta CgHK1 B13$ 培養於 MS 培養基 6-7 天。
2. 於緊鄰接種點之周圍平均分布下以 5 mm 打孔器打下三個菌絲塊。
3. 以鑷子夾取菌絲塊放入 2 mL 的微量離心管中再加入 1 mL 的去離子水。
4. 將微量離心管震盪 10 秒鐘使菌塊所含有的孢子均勻懸浮於水中。
5. 吸取孢子懸浮液至新的 1.5 mL 離心管。
6. 孢子濃度藉由血球計數器計數後計算。
7. 以此方法定量產孢子量是因為此種光源處理菌體在生長過程容易產生型態不同且不穩定的扇形菌落，也因緊鄰接種點之區域較早產孢，有較多孢子可計數。

五、致病能力測試

(一)接種芒果炭疽病菌野生株及突變株 $\Delta CgHK1 A5$ 、 $\Delta CgHK1 B12$ 、 $\Delta CgHK1 B13$ 於 MS 培養基培養 6-7 天，製備孢子懸浮液。

(二)以 75%酒精消毒塑膠盒。

(三)舖兩張擦手紙於塑膠盒底部，倒入 100 mL 的去離子水以保持盒中的濕度。

(四)將葉片底部對齊排好後以膠帶固定於瀝水墊上，瀝水墊放置於保鮮盒中，蓋上蓋子保濕備用。

(五)將 10^5 spores/mL 孢子懸浮液 5 μ L 對峙接種在芒果葉表上。若芒果葉片為嫩葉，則孢子懸浮液直接接種在葉片表面上；若為老葉，則以無菌針頭在葉片表面畫上井字號的傷口，再將孢子懸浮液接種在傷口上，且完全覆蓋傷口。

(六)本實驗共重複 3 次。

六、耐乾燥測試

- (一)接種芒果炭疽病菌野生株及突變株 $\Delta CgHK1 A5$ 、 $\Delta CgHK1 B12$ 、 $\Delta CgHK1 B13$ 於 MS 培養基，培養 6-7 天。
- (二)將 10^5 spores/mL 孢子懸浮液 5 μ L 接種在 3 個培養皿蓋上。
- (三)置於 28 °C 的培養箱中 24 小時，使水分蒸發，再於原處滴上 20 μ L 的 MQ 水、PDB 或 CZ broth。
- (四)將培養皿倒扣在滴上 MQ 水、PDB 或 CZ broth 的培養皿蓋上保持濕度，再放進塑膠盒中置於 28 °C 一天，將箱子蓋緊以防止水分散失。
- (五)將滴上 MQ 水、PDB、CZ broth 的培養皿蓋在接種處分別蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下觀察其發芽率。
- (六)每處理三重複，實驗進行兩次。

七、代謝物毒性測試

(一)PDB 液態培養

1. 將 200 mL 的 PDB 裝入錐形瓶中，在瓶口由下而上蓋上濾紙一張、秤藥紙兩張、鋁箔紙一張以橡皮筋綁緊後滅菌。
2. 在滅過菌的 PDB 中接種 8 個 5 mm 的菌絲塊，放進 25 °C 的生長箱中。
3. 於 0、5、12、19、24、33 天分別從 PDB 中取出 3.6 mL PDB 濾液於 2 管 2 mL 微量離心管中，並將這些微量離心管避光放進 -20 °C 的冰箱中保存。
4. 在第 33 天時將所有離心管取出退冰成液狀，將微量離心管的蓋子剪掉。
5. 剪下芒果葉時斜切葉柄使截面積較大，插入有濾液的微量離心管中，以石臘膜 parafilm 封住管口，避免水分蒸散過快。
6. 將插有葉子的微量離心管放入一個大塑膠盒中，以保鮮膜封住上蓋保濕，置於室溫中。
7. 每處理三葉片，本實驗進行一次。

(二)乙酸乙酯萃取

1. 將芒果炭疽病菌野生株、突變株 $\Delta CgHK1 A5$ 接種於 PDA 培養基後，置於白光、藍光、紅光、遠紅光下生長 14 天。
2. 將所有真菌生長的區域以打孔器取下菌絲塊。
3. 放入抽風槽將打孔完的菌絲塊吹乾。
4. 將每皿中的 15 片菌絲塊放入 2 mL 的微量離心管，並加入乙酸乙酯。
5. 避光保存冰於 4 °C 的冰箱中 12 天，使菌絲塊所含代謝物可以溶於乙酸乙酯。

6. 將乙酸乙酯萃取液移至另一新 2 mL 的微量離心管中，於抽氣櫃中以 55 °C 水浴使乙酸乙酯可以完全揮發。
7. 以 DMSO 潤洗乾燥後的微量離心管，使萃取出來的代謝物可以回溶於 DMSO。
8. 稀釋已回溶代謝物的 DMSO 為 50x、100x、200x，再以每滴 5 μ L 接種在芒果葉片表面上。
9. 每處理有三葉片重複，本實驗進行一次。

八、發芽率測試

(一) 於不同光照時間下生長所產生的孢子的發芽率

1. 培養芒果炭疽病菌野生株、 Δ CgHK1 B13 及 Δ CgHK1 A5 於 MS 培養基於 LL、LD 及 DD 光照條件下 6-7 天。
2. 使用 96 孔盤進行試驗，每孔中滴入 10 μ L 的 10⁵ 孢子懸浮液及 70 μ L 的 MQ 水。
3. 將 96 孔盤置入 25 °C，12 小時光暗輪替的生長箱中 24 小時。
4. 將 96 孔盤從生長箱取出，放在顯微鏡下觀察並計數孢子的發芽。
5. 每處理三重複，本實驗進行兩次。

(二) 於不同波長光下發芽率

1. 培養芒果炭疽病菌野生株及突變株 Δ CgHK1 B13 於 MS 培養基 12 小時光照下培養 6-7 天。
2. 將 10⁶ 孢子懸浮液取 50 μ L，並加入 100 μ L PDB、850 μ L 去離子水為第一組。
3. 將 10⁶ 孢子懸浮液取 50 μ L，並加入 950 μ L 去離子水為第二組。
4. 接種第一組及第二組於培養皿蓋上(每滴 5 μ L，每處理三重複)，將培養皿蓋放入 800 mL 的塑膠盒中。
5. 分別放入白光、藍光、紅光和遠紅光下 3 小時，再放在顯微鏡下觀察及計數孢子的發芽率。黑暗處理是將塑膠盒包裹黑色塑膠袋放在遠紅光燈箱中。
6. 本實驗進行一次。

九、總量核糖核酸之萃取

- (一) 在 24 小時黑暗下培養芒果炭疽病菌野生株於 MS 及 PDA 培養基上 6 天。
- (二) 將芒果炭疽病菌於生長箱中拿出分別放到白光、紅光、藍光、遠紅光、黑暗、白光 12 小時光暗輪替下生長 3 個小時。
- (三) 以解剖刀將培養皿中所有的真菌菌絲刮入預先備好的離心管中放在管架。
- (四) 在管架內倒入液態氮保持低溫，插入離心管以研磨棒研磨菌絲至白色粉末狀。

- (五) 於離心管加入 1mL TRIzol 後震盪均勻，再加入 200 μ L 氯仿 (Chloroform) 搖勻。
- (六) 開蓋使其排氣後再搖勻，放在室溫中 3 分鐘。
- (七) 在 4 $^{\circ}$ C 下將離心管以 12000 rpm 離心 15 分鐘。
- (八) 取離心管中的上清液至新離心管中，加入與上清液同體積的異丙醇 (isopropanol) 搖勻後放於室溫 10 分鐘。
- (九) 在 4 $^{\circ}$ C 下將離心管以 12000 rpm 離心 10 分鐘。
- (十) 移除離心管中的上澄液，在離心管加入 1 mL 75%乙醇，在 4 $^{\circ}$ C 下將加入乙醇的離心管以 10000 rpm 離心 10 分鐘。
- (十一) 移除離心後離心管中的乙醇，開蓋使其乾燥。
- (十二) 以 1mL 無菌水回溶，以超微量核酸定量光譜儀測量濃度，利用 1% 電泳膠確認。

十、合成 cDNA

- (一) 取 5 μ L 的 RNA 於微量離心管中，並加入 RNase-Free Water 4 μ L 及 10 μ M 的 oligo d(T) primer 1 μ L。
- (二) 置放入熱循環機，65 $^{\circ}$ C/ 2 分鐘後再插冰 1 分鐘。
- (三) 反應完成後，再分別加入 RNase-Free Water 4 μ L、MMLA HP RT 10x Reaction Buffer 2 μ L、100mM DTT 2 μ L、10mM dNTP 1 μ L、RiboGuard RNase Inhibitor 0.5 μ L、MMLV High Performance Reverse Transcriptase 0.5 μ L 混合均勻。
- (四) 將加入完成的微量離心管制入熱循環機進行反應，依序 37 $^{\circ}$ C/ 60 分鐘、85 $^{\circ}$ C/ 5 分鐘，反應完成再插冰 1 分鐘，完成後得 cDNA，儲藏於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

十一、半定量反轉錄聚合酶連鎖反應(semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, semi-qRT-PCR)

- (一) 取 2 μ L 反轉錄合成所得之 cDNA 於微量離心管中，並加入 RO H₂O 14.4 μ L、10x Buffer 2 μ L、10mM dNTP 0.4 μ L、Primer F 0.4 μ L、Primer R 0.4 μ L、taq 0.4 μ L。
- (二) 取 1 μ LgDNA 於微量離心管中，並加入 H₂O 15.4 μ L、RO 10x Buffer 2 μ L、10 mM dNTP 0.4 μ L、Primer F 0.4 μ L、Primer R 0.4 μ L、taq 0.4 μ L 為正對照組。
- (三) 取 RO H₂O 16.4 μ L、10x Buffer 2 μ L、10mM dNTP 0.4 μ L、Primer F 0.4 μ L、Primer R 0.4 μ L、taq 0.4 μ L 為負對照組。
- (四) 將以上所有微量離心管制入熱循環機中 $^{\circ}$ C進行反應，反應條件為 94 $^{\circ}$ C/ 2 分鐘，接者以 94 $^{\circ}$ C/ 30 秒、60 $^{\circ}$ C/ 30 秒、72 $^{\circ}$ C / 16 秒進行 30 個循環，再給予 72 $^{\circ}$ C/ 7 分鐘、25 $^{\circ}$ C/ 無限 (tubulin 基因) Internal control 為 beta-tubulin 基因。

- (五) 將以上所有微量離心管制入熱循環機中進行反應，反應條件為 94 °C/ 2 分鐘，接者以 94 °C/ 30 秒、55 °C/ 30 秒、72 °C/ 45 秒進行 30 個循環，再給予 72 °C/ 7 分鐘、25 °C/ 無限 (*CgHK1* 基因)。

十二、膠體電泳

- (一) 秤取 0.6 g 瓊脂置於 250 mL 之錐形瓶中，加入 30 mL 的 0.5x TAE buffer，配置成 2 % 瓊脂凝膠。
- (二) 將瓊脂凝膠膠片置於電泳槽中，加入 0.5x TAE buffer 至淹沒瓊脂凝膠膠片。
- (三) 取 4 μ L 跑完 qRT-PCR 的樣品加入 1 μ L 的 10x loading dye，混合均勻，將樣品及 DNA marker 注入瓊脂凝膠膠片的凹槽中。
- (四) 以 125 V 的電壓進行電泳，時間約 20 分鐘。
- (五) 將膠片置於溴化乙錠染盆中染色 6 分鐘，再於水中退染 6 分鐘。
- (六) 將其置於 UV 燈箱中觀察，並以照相設備擷取膠圖。
- (七) 對照 DNA marker 計算片段大小及以 Kodak molecular imaging software 取得濃度進行數據分析。

十三、即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)

- (一) 取 2 μ L 反轉錄合成所得之 cDNA 於微量離心管中，並加入 RO 水 6 μ L、5x Mix 3 μ L、Primer F 2 μ L、Primer R 2 μ L，混合均勻。
- (二) 將微量離心管放入 Rotor-Gene Q Series 熱循環機進行反應，並打開電腦。反應條件為 94 °C/ 15 分鐘，接者以 95 °C/ 15 秒、58 °C/ 20 秒、72 °C/ 20 秒進行 40 個循環。
- (三) 機器讀取的訊號再以 Rotor-Gene Q Series Software 進行分析。
- (四) 芒果炭疽病菌之 actin 基因為 Internal control

十四、蛋白結構的預測方法

- (一) 將 *CgHK1* 的胺基酸序列放入 InterPro 的網頁中使其對應出可預測的蛋白功能區。
- (二) 按照網頁上預測的結果畫出蛋白功能區結構的位置。

十五、滲透壓耐受性試驗

- (一) 芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株 $\Delta CgHK1$ A5 和 $\Delta CgHK1$ B13 接種於 PDA 培養基正中央。
- (二) Modified Czapek's (0.2 % NaNO_3 、0.05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 % KCl 、0.001 %

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 % K_2HPO_4 、10 mM Sucrose 和 1.5 % agar) 添加測試藥劑配製成 1 M Sorbitol 之滲透壓逆境培養基。

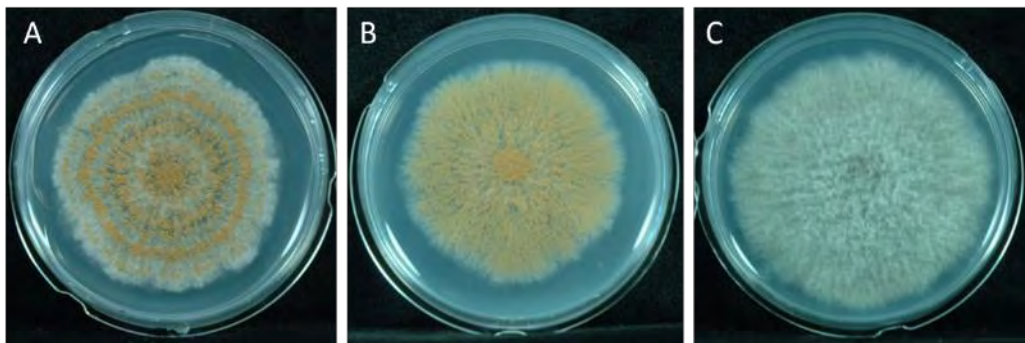
(三) 接種芒果炭疽病菌於 Modified Czapek's 和滲透壓逆境培養基，並放置於白光、藍光、紅光及遠紅光的環境下培養 7 天。

(四) 紀錄菌落生長直徑，觀察菌株生長受抑制情形，以了解菌株是否對培養條件具有耐受性差異。每處理三重複，本實驗進行一次。

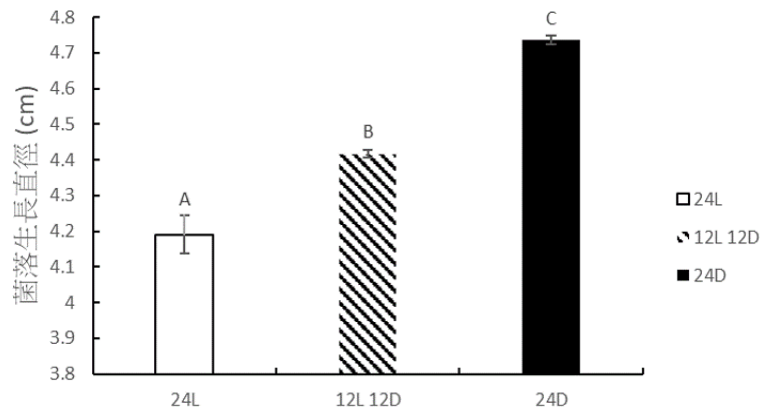
陸、實驗結果

一、不同光照條件對芒果炭疽病菌生長型態之影響

為了解光照時間的長短對芒果炭疽病菌生長的影響，本研究接種芒果炭疽病菌野生株於 MS 培養基上，以生長箱之白光作為光源分別給予 12 小時光暗輪替、白光 24 小時光照及 24 小時黑暗下生長 6 天。芒果炭疽病菌會隨著 12 小時光暗輪替由菌落中心產生一圈又一圈的橘色分生孢子堆 (圖一，A)，而光照 24 小時芒果炭疽病菌則整個菌落都產生孢子呈現均勻的橘色孢子堆 (圖一，B)，黑暗 24 小時則使芒果炭疽病菌整個菌落產生具濃密氣生菌絲，但表面不無產生肉眼可見之橘色孢子堆，菌落顏色呈現灰色 (圖一，C)。定量菌落生長直徑，經過統計分析後發現黑暗條件下培養的菌株生長直徑顯著大於 12 小時光暗輪替及 24 小時光照處理下生長的菌落 (圖二)。分析實驗結果，推測黑暗條件會抑制芒果炭疽病菌產生孢子，同時也能促進菌株生長。

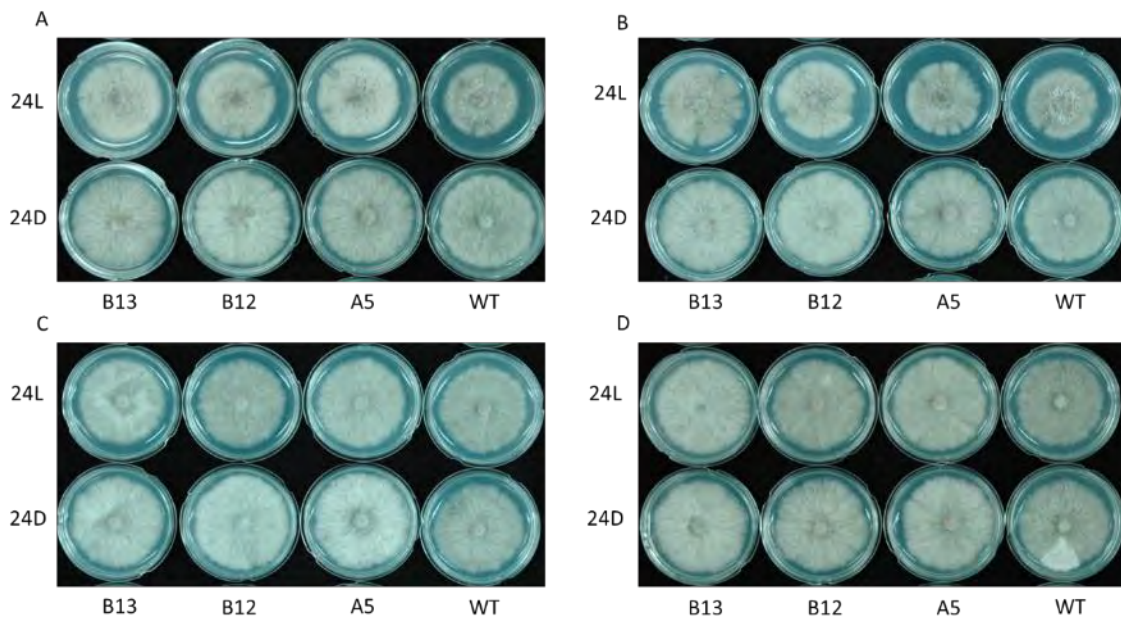


圖一、芒果炭疽病菌野生株接種於 MS 培養基給予 (A) 白光 12 小時光暗輪替、(B) 24 小時光照及 (C) 24 小時黑暗下生長 6 天的菌落生長型態。

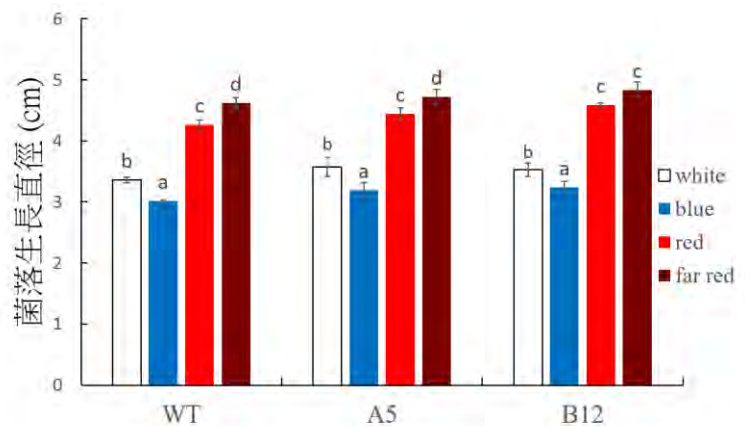


圖二、芒果炭疽病菌野生株於白光的 24 小時光照、12 小時光暗輪替及 24 小時黑暗下生長 6 天的菌落生長直徑。

由上述實驗中我們發現白光對芒果炭疽病菌產孢及生長的影響。因此本研究想進一步了解不同色光對芒果炭疽病菌生長的影響。本研究將芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1 A5$ 、 $\Delta CgHK1 B12$ 和 $\Delta CgHK1 B13$ 於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 5-7 天。為避免每個照光箱溫度差異的影響，每個照光箱內皆放置 3 皿以錫箔紙包覆之黑暗培養對照組。結果顯示芒果炭疽病菌株於白光下相較於黑暗生長之菌落小 (圖三，A)。計錄發現藍光光箱盒中芒果炭疽病菌株於藍光下相較於黑暗生長之菌落小，並且照射藍光的菌株容易出現型態變異且不穩定的扇形菌落 (圖三，B)。芒果炭疽病菌株於紅光及黑暗條件下生長的菌落型態和大小並無差異 (圖三，C)。於遠紅光及黑暗條件下培養的芒果炭疽病菌株所生長的菌落之間型態與大小並無差異 (圖三，D)。四個光箱盒的溫度雖然有些有差異，但分別在四光箱盒內的黑暗培養的菌生長直徑並沒有明顯的差異。定量菌落生長直徑，經由統計分析後發現紅光及遠紅光條件下生長的菌落大小相近，而白光及藍光下生長的菌落大小顯著小於遠紅光、紅光。於四種光源下，野生株及突變株之間的生長差異並無顯著性差異 (圖四)。分析實驗結果，發現於紅光、遠紅光下菌株生長的速度與黑暗的條件差不多，推論紅光及遠紅光能促進芒果炭疽病菌生長，而光敏素基因之缺失不影響在四種色光下的生長。



圖三、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12、 $\Delta CgHK1$ B13 於 (A) 白光、(B) 藍光、(C) 紅光及 (D) 遠紅光下生長 6 天的菌落生長型態。四種色光皆為 24 小時光照 (24L)，其對照組皆為黑暗 (24D)。

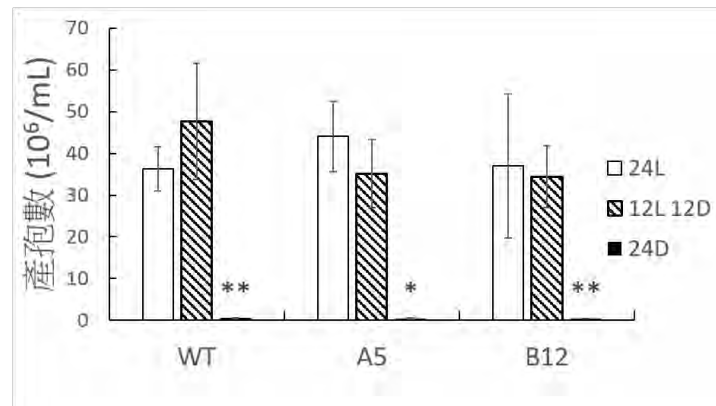


圖四、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12 於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 6 天的菌落生長直徑。

二、不同光照條件對芒果炭疽病菌產生孢子能力之影響

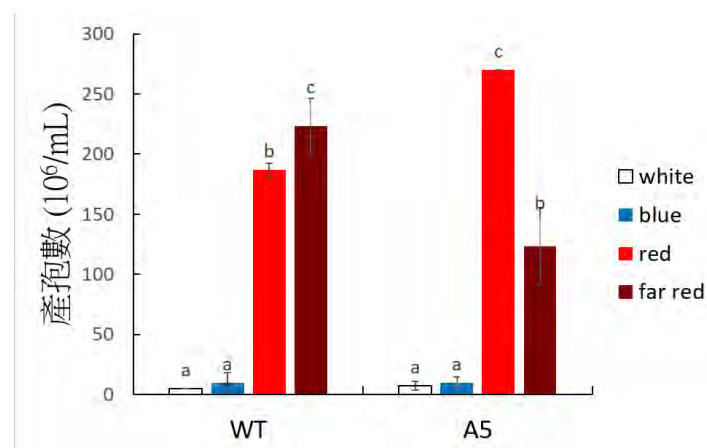
由上述實驗中我們發現光照時間對芒果炭疽病菌菌落生長大小的影響，本研究想進一步探討不同光照時間是否影響芒果炭疽病菌的產孢量。本研究接種芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12 於 MS 固體培養基，分別給予 24 小時光照、12 小時光暗輪替及

24 小時黑暗環境，生長 5-7 天後收集產生之孢子，再透過血球計數器定量孢子數。經由統計分析發現所有芒果炭疽病菌於 24 小時黑暗下產孢量很低，推測黑暗條件會抑制產孢 (圖五)。24 小時黑暗下生長的菌株產孢量顯著低於全光照及 12 小時光暗輪替，顯示芒果炭疽病菌株控制產孢的基因受光調控。

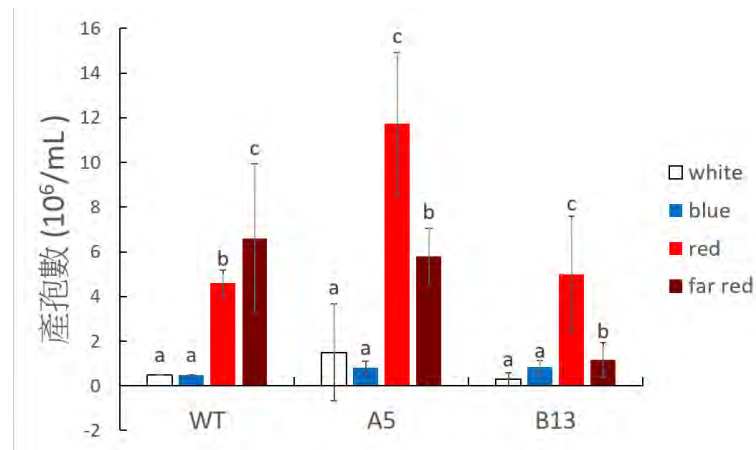


圖五、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12 於白光的 24 小時光照 (24L)、12 小時光暗輪替 (12L 12D) 及 24 小時黑暗 (24D) 下生長 6 天的產孢數。

由上述實驗中我們發現不同光照時間對芒果炭疽病菌產孢的影響。因此本研究想進一步更詳細的探討不同色光對芒果炭疽病菌產孢的影響。本研究接種芒果炭疽病菌野生株、 $\Delta CgHK1$ A5 及 $\Delta CgHK1$ B13 於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 5-7 天後收集菌落產生的孢子，再透過血球計數器定量孢子數。經由統計分析所有芒果炭疽病菌於遠紅光及紅光下的產孢數皆比白光及藍光多，而且兩株光敏素突變株的紅光產孢明顯的高於遠紅光，但野生株的遠紅光下產孢卻較紅光多(圖六、圖七)，結果顯示芒果炭疽病菌株中控制產孢的基因可能受紅光及遠紅光所調控，可推測突變株缺失之光敏素基因與受遠紅光及紅光所調控的產孢有關。



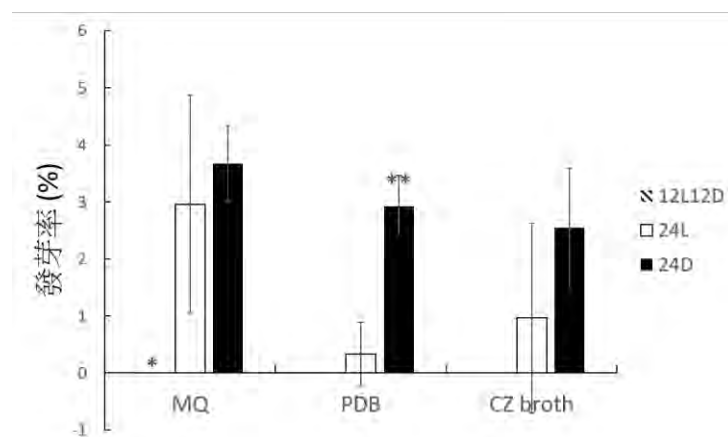
圖六、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 於白光、藍光、紅光及遠紅光下 6 天的產孢數。



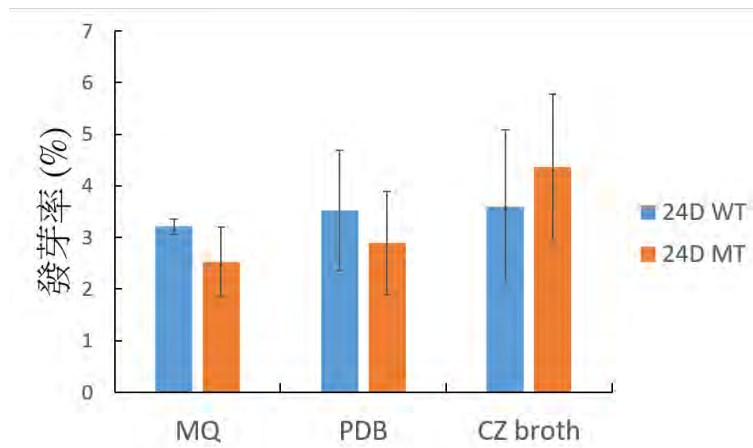
圖七、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13 於白光、藍光、紅光及遠紅光下 6 天的菌落產孢數。

三、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子耐乾燥能力之影響

本研究想了解不同光照時間下產生的孢子對逆境的耐受度是否不同，因此進行耐乾燥之測試。接種芒果炭疽病菌之野生株於 MS 固態培養基，分別給予 24 小時光照、12 小時光暗輪替及 24 小時黑暗環境，生長 5-7 天後將其產生之孢子製備成孢子懸浮液 ($10^5/\text{ml}$) 接種於培養皿蓋，待其乾燥後再分別滴上 MQ 水、PDB 及 CZ broth 再培養 24 小時後以複式顯微鏡觀察並計算孢子發芽率。芒果炭疽病菌之野生株置於 12 小時光暗輪替下產生的孢子，其耐乾燥能力差，發芽率為 0%，24 小時光照及 24 小時黑暗所產生的孢子雖有發芽，但發芽率仍然很低，僅有 0.5 - 4% (圖八)。本研究再接種芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 於 24 小時黑暗下產生的孢子，其耐乾燥能力依舊不佳，經由統計分析結果野生株與突變株孢子的耐乾燥能力並無顯著差異(圖九)。



圖八、芒果炭疽病菌野生株於白光的 24 小時光照、12 小時光暗輪替及 24 小時黑暗下生長 6 天的孢子耐乾燥程度。

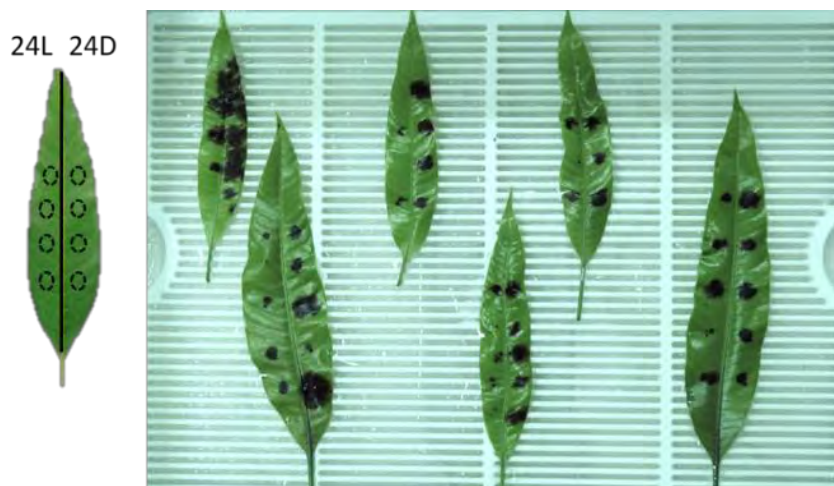


圖九、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1 A5$ 於 24 小時黑暗下生長 6 天的孢子耐乾燥程度。

四、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子對葉片致病能力影響

因芒果炭疽病菌以分生孢子為主要感染源，所以本研究也想了解孢子的致病能力。本研究接種芒果炭疽病菌之野生株於 MS 固態培養基上，再分別給予 24 小時光照及 24 小時黑暗環境，生長 5-7 天後，取得的孢子製備成懸浮液接種於葉片表面上，觀察其病斑大小。結果 24 小時黑暗下產生的孢子造成的病斑相較於 24 小時光照下產生的孢子更大 (圖十)，經由統計分析結果具有顯著性差異。

由上述實驗中我們發現光照程度對芒果炭疽病菌產生的孢子其對葉片致病能力的影響。因此本研究想進一步了解芒果炭疽病菌野生株與突變株於黑暗下產生的孢子對葉片的影響。芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1 A5$ 於 24 小時黑暗下生長 5-7 天後取得孢子製成懸浮液對峙接種於葉片表面上，觀察其病斑大小。芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1 A5$ 置於 24 小時黑暗下生長後取得的孢子接種於葉片表面後 6 天，野生株與突變株造成的病斑大小相近，經統計分析結果，野生株及突變株產生的孢子對葉片的致病能力無顯著性差異 (圖十一)。



圖十、芒果炭疽病菌野生株於白光 24 小時光照及 24 小時黑暗下產生的孢子接種於愛文芒果葉片第 3 天的發病情形。

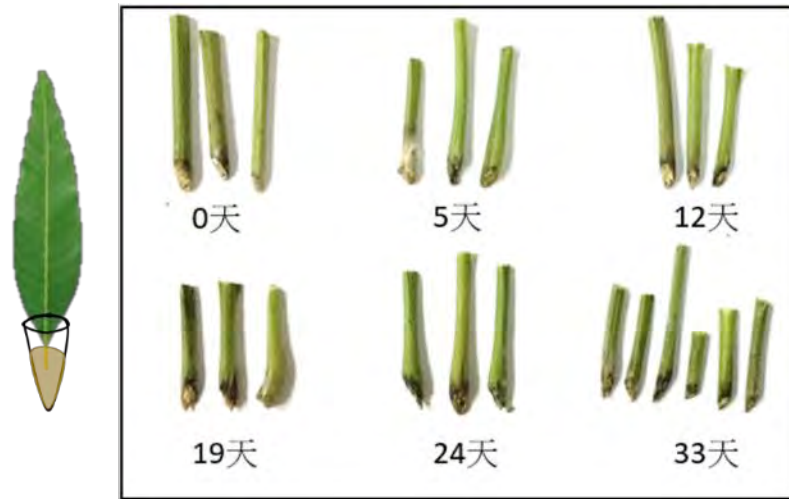


圖十一、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 於 24 小時黑暗下產生的孢子接種於愛文芒果葉片第 3 天的發病程度。

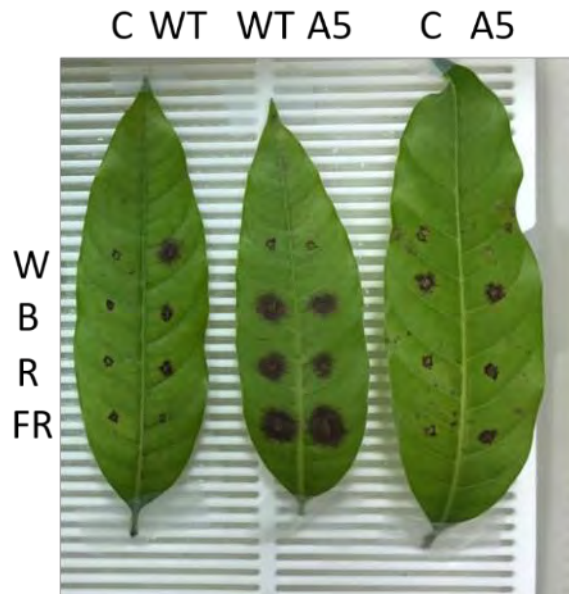
五、不同光照時間對芒果炭疽病菌生長代謝物對葉片致病能力影響

測試完芒果炭疽病菌本身的致病因子之後，本研究好奇芒果炭疽病菌在生長時產生的代謝物對於芒果葉片有沒有毒性，接種於芒果組織是否也會出現病徵，因此設計實驗獲得其代謝物並接種於植物組織，觀察病徵是否發生。本研究接種芒果炭疽病菌野生株 8 塊菌絲塊於 PDB 中，培養於 12 小時光暗輪替的生長箱，在第 0 天、5 天、12 天、19 天、24 天、33 天分別取出 3.6 mL 的培養液至 2 管 2 mL 微量離心管中，避光冰於 -20°C 冰箱中。在第 33 天時取出所有的離心管移去其蓋子，將葉柄傷口浸入培養液，以石臘膜封住管口保持濕度，放於一塑膠盒中以包鮮模蓋住上端保持濕度，放置室溫 3 天。將葉柄拿起觀察其變黑程度即為其代謝物的致病能力，每三根為三重複。芒果炭疽病菌於不同培養時間產生的代謝物中，第 24 和 33 天的代謝物使葉柄截切面黑化的程度些微比其他天數所產生的代謝物高 (圖十二)。

因以液態培養得到的代謝物效果不彰，猜測可能與濃度有關係，因此本研究再次設計實驗以乙酸乙酯萃取出代謝物，待乙酸乙酯蒸發完全後以 DMSO 回溶，期待較高濃度的代謝物接種於葉片可以看到較明顯的結果。芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 接種於 PDA 培養基後，置於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 14 天後，取下菌絲塊，再加入乙酸乙酯使菌絲塊中的代謝物溶於乙酸乙酯中，以 55°C 水浴使乙酸乙酯揮發，以 DMSO 回溶經稀釋 200 倍後，接種 5 μL 於葉表上，實驗組為稀釋 200 倍之 DMSO 回溶野生株或突變株產生的代謝物，控制組為稀釋 200 倍之 DMSO。芒果炭疽病菌產生的代謝物相較控制組於葉片上有產生明顯病徵，因此對葉片產生病害的原因不只是病原菌本身，代謝物也參與其中，而野生株及突變株產生的代謝物之間對葉片致病能力並無顯著差異 (圖十三)。



圖十二、芒果炭疽病菌野生株培養在 PDB 培養液於白光 12 小時光暗輪替下在第 0 天、5 天、12 天、19 天、24 天和 33 天產生代謝物的致病能力。



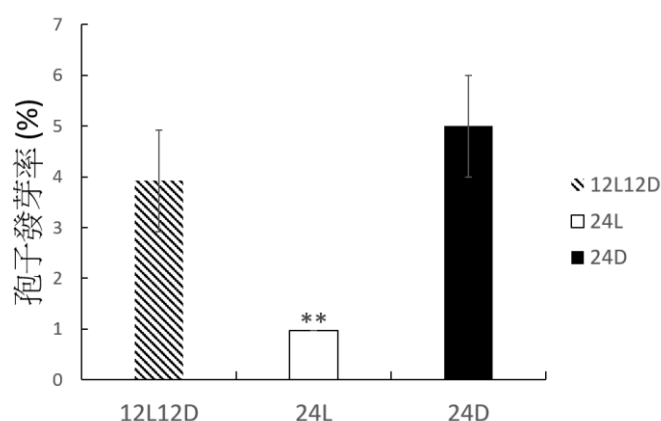
圖十三、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 接種於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 14 天代謝物的致病能力。C：控制組；WT：野生株；MT：突變株。

六、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子發芽率之影響

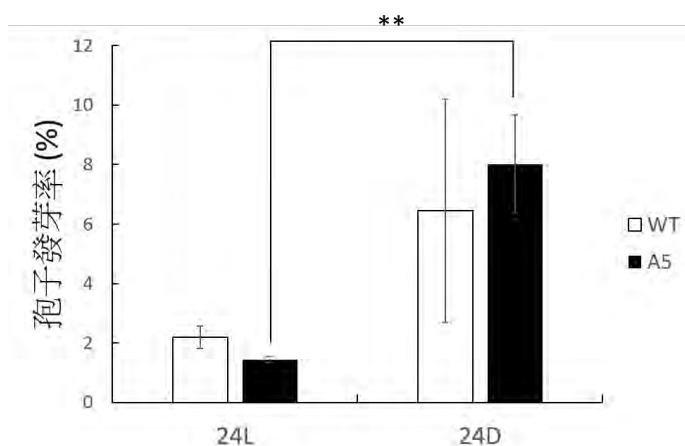
由上述實驗可以得知不同光照條件對芒果炭疽病菌孢子的致病能力之影響，本研究想進一步探討不同光照條件對孢子的發芽能力之影響。接種芒果炭疽病菌之野生株於 12 小時光暗輪替、24 小時光照及 24 黑暗環境 6 天，菌株產生的孢子製成孢子懸浮液後滴於 96 孔盤中，將 96 孔盤置於 12 小時光暗輪替的生長箱中，培養 24 小時使孢子發芽後以顯微鏡下觀察並定量孢子的發芽率。經由統計分析結果顯示，芒果炭疽病菌於 24 小時黑暗中產生孢子

的發芽率顯著高於 24 小時光照產生孢子的發芽率 (圖十四)。藉由發現長時間光照會顯著降低孢子的發芽率，因此本研究推測光照可能會影響孢子的發芽之活性。

由上述實驗中我們發現不同光照時間對芒果炭疽病菌產生的孢子其發芽率的影響。本研究進一步探討芒果炭疽病菌野生株及突變株於不同光照時間產生的孢子其發芽率有何不同。芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 接種於 MS 固態培養基上，給予 24 小時光照及 24 小時黑暗環境 6 天，產生之孢子製成孢子懸浮液後滴於 96 孔盤中，置 96 孔盤於 12 小時光暗輪替的生長箱中 24 小時，使孢子發芽後取出孔盤於顯微鏡下觀察並定量發芽率。經由統計分析結果，可以看到突變株 24 小時黑暗與 24 小時光照條件下孢子發芽率的差異較野生株明顯，推測光敏素基因的缺失可能會影響不同光照時間環境下產生的孢子其發芽率(圖十五)。

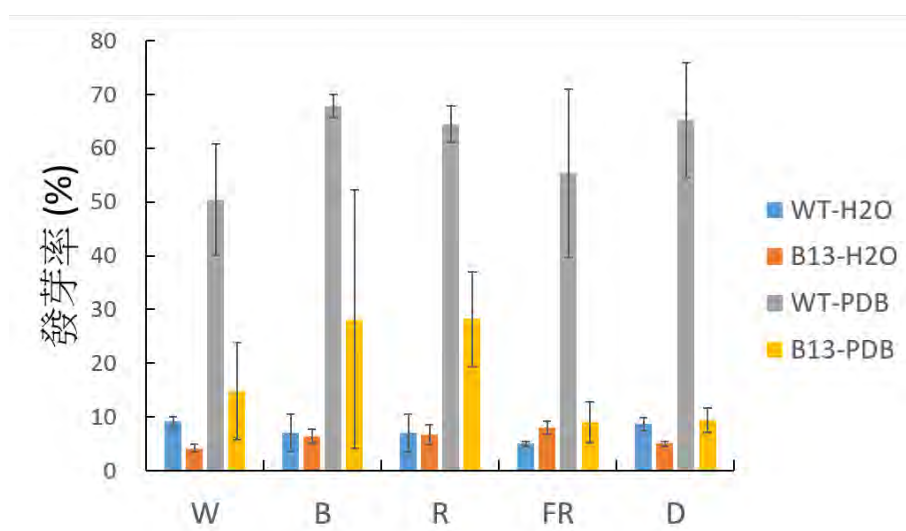


圖十四、芒果炭疽病菌野生株於白光的 12 小時光暗輪替、24 小時光照及 24 小時黑暗下培養所產生之孢子的發芽率。



圖十五、芒果炭疽病菌野生株和 $\Delta CgHK1$ A5 於白光 24 小時光照及 24 小時黑暗下培養所產生之孢子的發芽率。

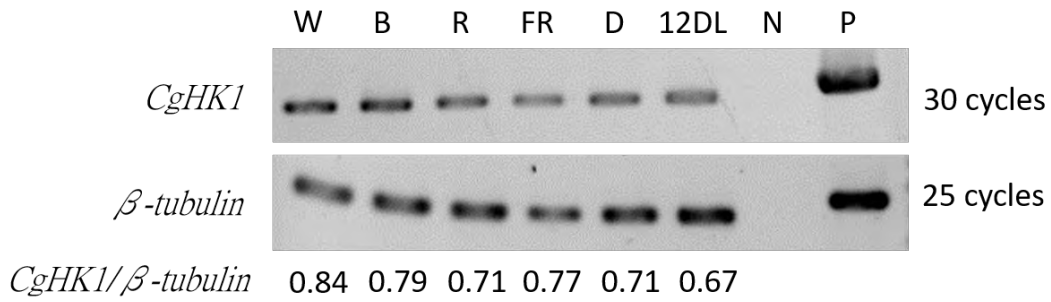
由上述實驗可初步了解不同光照時間對芒果炭疽病菌產生之孢子的發芽率影響，本研究為提高孢子發芽率特地給予營養，希望能進一步觀察到芒果炭疽病菌野生株與 $\Delta CgHK1$ B13 間發芽率的差別。接種芒果炭疽病菌野生株和 $\Delta CgHK1$ B13 於 MS 固態培養基，給予 12 小時光暗輪替環境生長 6 天，產生的孢子製成孢子懸浮液並加入營養豐富的 PDB 或水，接種於培養皿蓋後放在塑膠盒中，塑膠盒加水使其保濕，把盒子分別至於白光、藍光、紅光及遠紅光下 3 小時使其發芽後取出，以蓋玻片覆蓋接種處，將培養皿蓋置於顯微鏡下觀察其發芽率。經由統計分析結果，在四種光源下添加 PDB 皆能使孢子發芽率顯著高於水處理，並且所有光源下於 PDB 的添加中野生株的孢子發芽率顯著高於突變株，顯示 PDB 中的養分可以促進孢子的發芽 (圖十六)。



圖十六、芒果炭疽病菌野生株和 $\Delta CgHK1$ B13 於白光 12 小時光暗輪替下產生的孢子，給予 PDB 或水後置於白光、藍光、紅光和遠紅光下 3 小時之發芽率。

七、Semi qRT-PCR

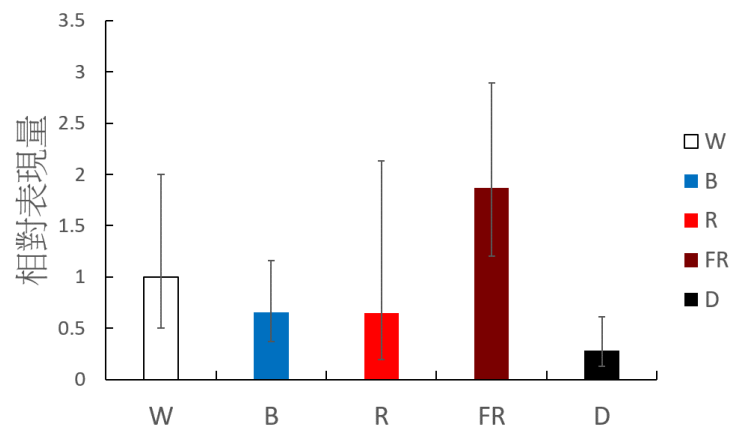
於以上各種實驗之後，發現光對芒果炭疽病菌突變株的產孢及孢子發芽率與野生型菌株有差異，因此本研究欲利用 Semi qRT-PCR 相對定量不同色光處理下 *CgHK1* 基因之表現量。將芒果炭疽病菌接種於 PDA 培養基後給予 24 小時黑暗環境生長 6 天，於第 6 天將芒果炭疽病菌移至白光、藍光、紅光及遠紅光下培養 3 小時，收集光照處理後之菌絲，抽取其 RNA 並合成 cDNA 再藉由 semi qRT-PCR 檢測其基因表現。結果顯示白光處理下 *CgHK1* 基因表現量最高而 12 小時光暗輪替處理下 *CgHK1* 基因表現量最低 (圖十七)。



圖十七、semi qRT-PCR 檢測 *C. gloeosporioides* TYC-2 於不同色光照射處理之 *CgHK1* 基因表現。芒果炭疽菌於 24 小時黑暗下生長 6 天後移至不同色光照射 3 小時，W：照射白光 3 小時；B：照射藍光三小時；R：照射紅光 3 小時；FR：照射遠紅光 3 小時；D：給予黑暗 3 小時；12DL：維持 12/12 光暗輪替 3 小時；N：Negative control 為 PCR Solution；P：Positive control 為 TYC-2 gDNA。

十、qRT-PCR

因 semi qRT-PCR 的 *CgHK1* 基因表現量與以上結果不符，因此又以 qRT-PCR 檢測其基因表現量。芒果炭疽病菌培養於 PDA 培養基給予 24 小時黑暗環境生長 6 天，於第 6 天將芒果炭疽病菌移至白光、藍光、紅光及遠紅光下培養 3 小時，收集光照處理後之菌絲，抽取其 RNA 並合成 cDNA 再藉由 qRT-PCR 檢測 *CgHK1* 基因表現量。結果顯示遠紅光的處理下 *CgHK1* 基因表現量最高相較其它色光處理，而黑暗處理的 *CgHK1* 基因表現量則最低。本研究發現遠紅光可顯著的誘導 *CgHK1* 基因的表現，而黑暗則可抑制 *CgHK1* 基因表現。

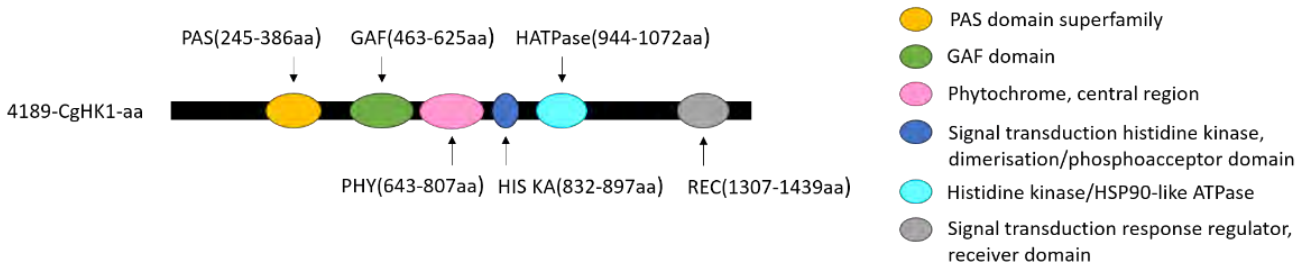


圖十八、qRT-PCR 檢測 *C. gloeosporioides* TYC-2 於不同色光照射處理之 *CgHK1* 基因表現。

芒果炭疽菌於 24 小時黑暗下生長 6 天後移至不同色光經照射 3 小時之處理，W 為白光；B 為藍光；R 為紅光；FR 為遠紅光；D 為黑暗。

十一、 *CgHK1* 蛋白質結構預測結果

CgHK1 基因轉譯出 6 個胺基酸之蛋白質產物，經 InterPro Protein sequence analysis & classification 線上軟體預測其蛋白質之胺基酸序列包含 PAS domain superfamily、Histidine kinase/HSP90-like ATPase、Signal transduction histidine kinase,dimerisation/phosphoacceptor domain、Signal transduction response regulator,receiver domain、GAF domain、Phytochrome, central region (圖十九)。

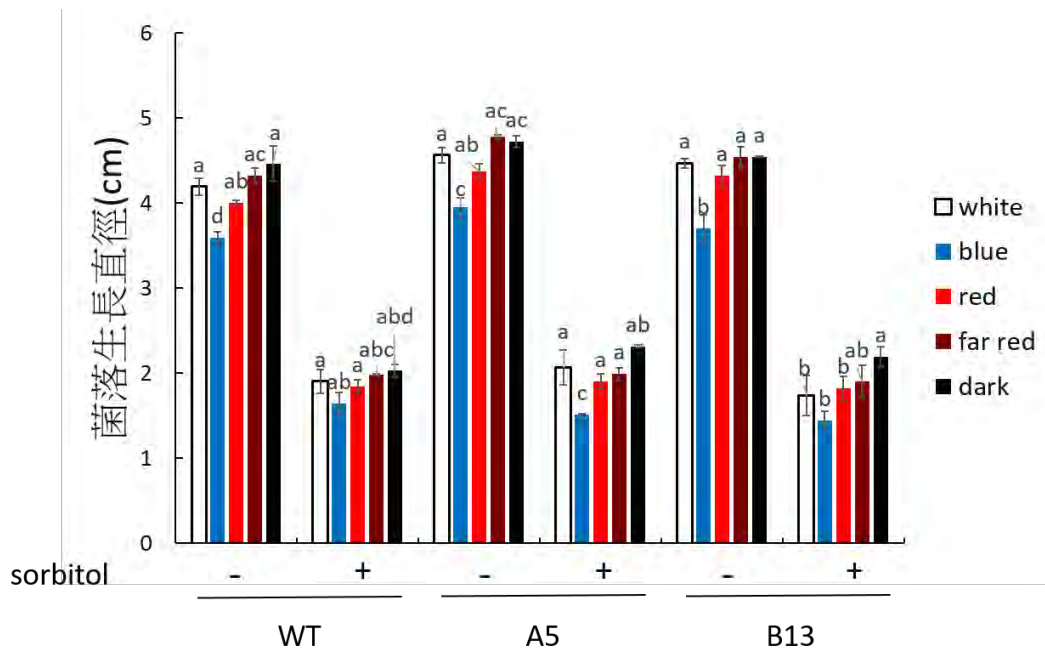


圖十九、*CgHK1* 蛋白質結構預測結果。

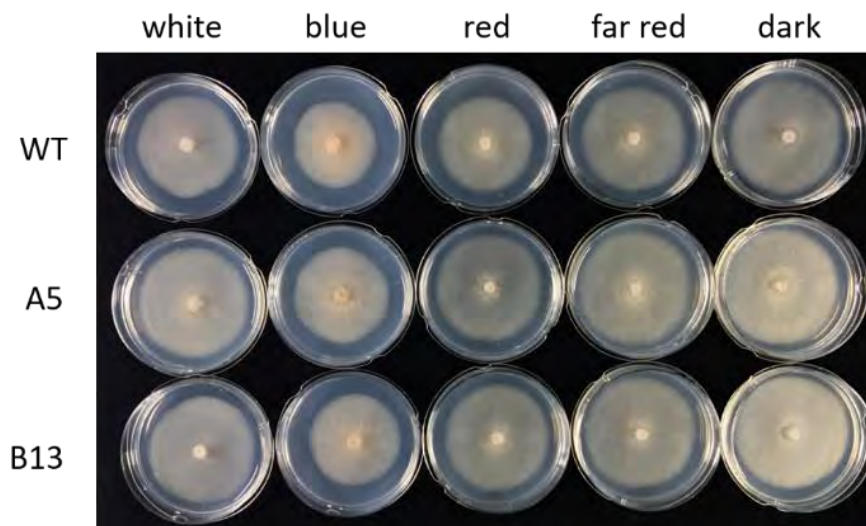
十二、滲透壓耐受性試驗

本研究想進一步了解芒果炭疽病菌對滲透壓耐受性的試驗，希望可以發現在滲透壓逆境下不同波長光對芒果炭疽病菌野生株、 $\Delta CgHK1$ A5 和 $\Delta CgHK1$ B13 之間的影響。接種芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株 $\Delta CgHK1$ A5 和 $\Delta CgHK1$ B13 於 PDA 培養基正中央。Modified Czapek's (0.2 % NaNO_3 、0.05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 % KCl 、0.001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 % K_2HPO_4 、10 mM Sucrose 和 1.5 % agar) 添加測試藥劑配製成 1 M Sorbitol 之滲透壓逆境培養基。接種芒果炭疽病菌於 Modified Czapek's 和滲透壓逆境培養基，並放置於白光、藍光、紅光及遠紅光的環境下培養 7 天。為避免每個照光箱溫度差異的影響，每個照光箱內皆放置 3 皿以錫箔紙包覆之黑暗培養對照組。最後紀錄菌落生長直徑，觀察菌株生長受抑制情形，以了解菌株是否對培養條件具有耐受性差異。經由統計分析結果顯示，滲透壓逆境下所有菌株的生長都受到抑制，藍光光箱盒中所有菌株於藍光下無滲透壓逆境的生長相較其他光照條件被明顯抑制(圖二十一、圖二十二)，並且呈微橘菌落 (圖二十一)。芒果炭疽病菌株於白光、紅光、遠紅光及黑暗條件下生長的菌落型態和大小並無差異，在滲透壓逆境下受抑制的情形也無明顯差異(圖二十一、圖二十二)。四個光箱盒的溫度雖然有些有差異，但分別在四光箱盒內的黑暗培養的菌生長直徑並沒有明顯的差異。於四種光源下，野生株及突變株之間的生長差異並無顯著性差異 (圖二十一、圖二十二)。分析實驗結果，發現於藍光下菌株生長的速

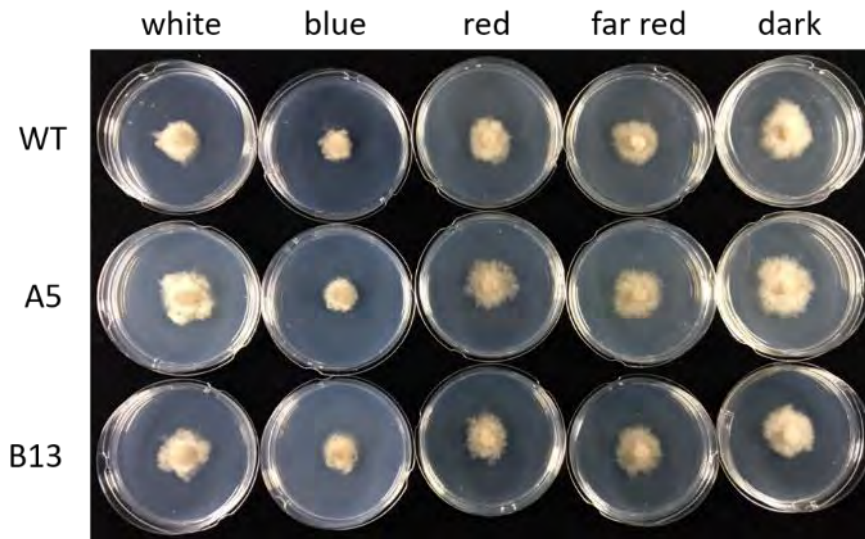
度較其他條件慢 (圖二十)，推論藍光能抑制芒果炭疽病菌生長，而光敏素基因之缺失不影響在四種色光下的生長。



圖二十、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13 於白光、藍光、紅光及遠紅光下在添加或不添加山梨糖醇的查氏培養基上 7 天的菌落生長直徑。



圖二十一、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13 不添加山梨糖醇的查氏培養基培養上於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 7 天的菌落生長型態。四種色光皆為 24 小時光照 (24L)，其對照組皆為黑暗 (24D)。



圖二十二、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13 在添加山梨糖醇的查氏培養基上於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長 7 天的菌落生長型態。四種色光皆為 24 小時光照 (24L)，其對照組皆為黑暗 (24D)。

柒、討論

一、各色光源有溫差

於不同波長光的實驗中，因木架燈箱置於實驗室內，所以較無法控制溫度一致。從記錄上來看，藍光的溫度皆高於其餘三種光源，雖然在嘗試調低冷氣溫度後，四個溫度及溫度差皆有下降，但藍光的溫度依舊偏高，但分別培養在四光箱盒內的黑暗條件下，菌絲生長並沒有明顯的差異，顯示四個燈箱的溫度差異並不影響生長，但是否對產孢有影響需要再確定。於日後的實驗中，將會針對溫度的部分設計實驗，其一為另開發實驗技術使四個燈管溫度一致，其一為以溫度為操縱變因，探討溫度對芒果炭疽病菌株的生長及產孢影響的層面及多寡。

二、代謝物萃取方式

於研究方法中有提到三種代謝物萃取的方式，但前兩種的結果皆不盡人意。第一種於撕下玻璃紙時發現玻璃紙已經被固定於培養基上了，原因為芒果炭疽病菌株的菌絲已經穿過玻璃紙深入培養基中，而此情況代表本來實驗想以玻璃紙隔絕菌絲往下長的目的失敗。因此本研究想以液態培養菌株的方式避開菌絲只抽取濾液得到其代謝物，但結果因濃度太低，濃縮後也無果，故結果並不明顯。改以第三種方式進行實驗，但因 DMSO 溶劑本身對葉片具毒性，50x、100x 稀釋的 DMSO 溶劑本身對葉片都會有影響，因此最後選擇 200x 的結果。

三、生長型態與大小

從芒果炭疽病菌菌落生長的型態和大小可看出一般白光/ 25 °C (2500LUX)時，菌株會產生橘色色素與孢子堆，並且於黑暗環境時不會產生。但於 LED 的白光/ 27 °C (5000LUX)時菌株並不會產生橘色色素與孢子堆，菌株呈現灰色。目前推測可能是因為溫度及光的強度導致孢子的產生有差異，另外藍光下芒果炭疽病菌產生的不穩定扇形菌落，在 29 °C 的 LED 白光環境時也不會產生，因此也推測可能是藍光容易導致的變異。從圖一至圖四可以得知黑暗、紅光、遠紅光可以促進菌株生長的大小，而白光及藍光下生長的菌株生長大小較小。因此可知光照會對芒果炭疽病菌的生長有影響，並且芒果炭疽病菌生長相關基因可能會受紅光及遠紅光調控，與光敏素的基因有關。

四、菌落產孢數

從芒果炭疽病菌的產孢數可知黑暗相對於光照會抑制菌株產孢，並且紅光及遠紅光會促進芒果炭疽病菌產孢。於圖一中我們可以看到光照下生長的芒果炭疽病菌菌落呈現橘色，黑暗下生長的芒果炭疽病菌菌落呈現灰色，結合圖二的圖表可以推知孢子數多時菌株成橘色，反之孢子數少時菌株成灰色，但也有觀察到菌落橘色，但孢子量很低，因此推論芒果炭疽病菌無法從菌株的顏色推估菌株的產孢量。從圖三及圖四可以看出紅光及遠紅光會促進芒果炭疽病菌產孢，因此推論芒果炭疽病菌產孢的基因可能受紅光及遠紅光調控。

五、致病能力測試

從圖十可以得知於黑暗環境生長產生的孢子對葉片的致病能力較於光照環境生長產生的孢子強，由圖十一可知芒果炭疽病菌野生株與突變株產生的孢子對葉片的致病能力並無明顯差異。在致病能力測試的實驗中，本研究發現若接種的孢子懸浮液太早蒸發完會影響實驗最終的結果。太早蒸發完的孢子懸浮液會使病斑減小，因此在實驗操作時須盡量快速完成接種，避免接種完的孢子懸浮液太早蒸發，也推測孢子的發芽率及產生附著器可能與環境水分多寡有關。

六、孢子的發芽率

由實驗中可以了解 24 小時光照環境產生的孢子其發芽率較 24 小時黑暗及 12 小時光暗輪替低，且突變株於 24 小時光照及 24 小時黑暗的差異比野生株更明顯。因此本研究認為 *CgHK1* 基因可能參與孢子發芽率的調控，且與光照呈現負相關。

七、PDB 的給予

由圖八、圖九及圖十六可以看到前兩者的孢子液在加入 PDB 之後並沒有顯著提升孢子的發芽率，但圖十六中加入 PDB 的孢子懸浮液明顯比未加入的發芽率更高。圖十六的實驗只加入 3 小時便取出觀察，而圖八及圖九的實驗，孢子經乾燥處理後 1 天後才加 PDB 1 天後觀察孢子的發芽率，因此推斷 PDB 可以在短時間內促進孢子發芽，而乾燥 1 天明顯抑制孢子發芽，加了 PDB 也沒辦法恢復。

八、CgHK1 基因表現量

從圖十七可以看到 *CgHK1/β-tubulin* 的數值差異不明顯，但於白光、藍光、紅光、遠紅光及黑暗條件中黑暗的基因表現量最低，與圖十八中的結果相符，可以推論黑暗會抑制其基因表現。由 qRT-PCR 也可以了解遠紅光的條件可以誘導 *CgHK1* 基因的表現，與芒果炭疽病菌生長、產孢的實驗結果相符。

捌、結論

- 一、黑暗會促進芒果炭疽病菌生長的大小，抑制菌株產孢的數量，促進孢子的致病能力。
- 二、白光在適當溫度下會促進及影響芒果炭疽病菌產孢。
- 三、藍光會促使芒果炭疽病菌菌株產生不穩定的扇形菌落。
- 四、紅光及遠紅光會調控芒果炭疽病菌生長的基因，促進芒果炭疽病菌的生長及產孢。
- 五、芒果炭疽病菌野生株及突變株孢子的致病能力無明顯差異。
- 六、於全黑暗及 12 小時光暗輪替下生長的芒果炭疽病菌孢子發芽能力比 24 小時光照好。
- 七、PDB 在短時間 (3 小時) 內能促進孢子發芽，乾燥處理後 1 天抑制孢子發芽。
- 八、於遠紅光下生長的芒果炭疽病菌 *CgHK1* 基因表現量為白光的 1.87 倍。
- 九、藍光明顯抑制芒果炭疽病菌生長，滲透壓逆境對芒果炭疽病菌生長抑制的程度更嚴重。

玖、未來展望

- 一、了解不同溫度對芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株的生長、產孢、孢子的耐乾燥能力、發芽率、致病能力的影響。

壹拾、 參考資料

- 一、 Karlsruhe Institute of Technology, Institute for Applied Biosciences, Department of Microbiology, D-76187 Karlsruhe, Germany
- 二、 Max Rubner Institut, Department for Safety and Quality of Fruit and Vegetables, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe, Germany b Institute of Sciences of Food Production, National Research Council (ISPA-CNR), Via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy
- 三、 1Department of Plant Pathology & Microbiology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA; email: gbeattie@iastate.edu 2Department of Biological Sciences, Southwestern Oklahoma State University, Weatherford, Oklahoma 73096, USA
- 四、 Copyright © 2018 CASE 報科學. All rights reserved.Theme: ColorMag by ThemeGrill. Powered by WordPress.
- 五、 臺灣農藥科學 (Taiwan Pesticide Science) 3: 65-78 (2017)DOI: 10.6671/TPS/2017.003.05
- 六、 安寶貞、呂理桑、莊再揚、高清文。1998。套袋與地面覆蓋對椪果炭疽病與蒂腐病之防治效果。植病會刊 7:19-26

附錄

本研究實驗用到的引子對

引子名稱	序列
Actin-qRT-PCR-F	ATCAACCCCAAGTCCAACAG
Actin-qRT-PCR-R	GGCGTTGAAGGTCTCGAAG
CgHK1-qRT-PCR-F	GGTCTTCAGCCTGTCGATTC
CgHK1-qRT-PCR-R	ATAGCGCACCAGAGCTTGAC
CgHK-Si-ck-F	CCAAAAGCGGAAACCAGAAG
CgHK-mRNA-Reverse	ATCTTAGTGCTCGTCAGGCCATCA

【評語】 052101

1. 本研究在探討芒果炭疽病菌對光的感應及反應，本作品利用光敏素突變株探討光線對芒果炭疽病菌生長、產孢能力、發芽能力的影響。主要藉由分析芒果炭疽病菌野生型菌株與光敏素突變菌株之特性如耐乾燥能力及致病力等，以進一步探討芒果炭疽病菌對光之感應及反應。結果發現黑暗培養可抑制炭疽病菌產孢，但同時可促進發病、生長及孢子發芽，光敏素的缺失則會影響四種光源下孢子發芽及遠紅光下產孢。進一步並發現光敏素基因於黑暗下表現量最低並會受遠紅外誘導。
2. 單一作者完成相當可觀的研究成果，還利用分子生物技術探討不同光線對光敏素基因表現的影響。
3. 可加強對實驗基本原理的了解。
4. 本研究的結果未來對於芒果採收後儲藏之病害管理可提供有用的資訊。

摘要

愛文芒果是台灣重要經濟果樹，其對炭疽病卻甚為感病，是芒果產銷上一大問題。病原菌在生長及感染時受外在環境影響，因此本研究希望藉由分析芒果炭疽病菌野生型菌株與光敏素突變菌株之生長與發育、耐乾燥能力及致病能力等試驗探討芒果炭疽病菌對光之感應及反應。本研究發現黑暗培養可抑制炭疽病菌產孢，但同時可促進發病、生長及孢子發芽，黑暗培養所獲得孢子對乾燥逆境有較好耐受性；藍光會抑制所有菌株生長及產孢，光敏素的缺失影響四種光源下孢子發芽及遠紅光下產孢。分析光敏素基因 (*CgHK1*) 的表現量，發現於黑暗下表現量最低而遠紅外可誘導基因表現。本研究為芒果炭疽病菌對光的感應及反應之首次研究報告，期望本研究成果可提供於芒果採收後儲藏之病害管理。

壹、研究動機

芒果為台灣農業外銷市場的一大重要水果。芒果炭疽病是全球芒果產區都面臨的嚴重問題，此種病菌時常感染芒果使其果表布滿黑斑。根據安寶貞等人研究指出，在高溫且高濕的環境中，採收後的芒果炭疽病罹病率可達 90 - 100%。本研究想深入探討是否有方法可以減緩芒果炭疽病的病徵或抑制芒果炭疽病菌生長及產孢，並且找尋除了噴灑農藥之外的防治方法，使芒果在產銷上面可以更加順利。現今許多農民防治芒果炭疽病菌的方式為噴灑農藥及套袋，但本研究認為噴灑農藥會危害到環境及人體，因此本研究希望可以透過物理性或化學性的方法防治芒果炭疽病，以同時達到減緩芒果炭疽病的病徵及對環境的危害性最小。

為了深入了解光照與芒果炭疽病菌的生長之間的關聯，本研究開始查詢芒果炭疽病菌基因中與光接受有關的基因為何。最後發現芒果炭疽病菌的組胺酸激酶有光敏素的基因序列。光敏素為光色素蛋白，芒果炭疽病菌光敏素色素蛋白的蛋白結構分析顯示具有多種蛋白功能，除了具接受光的光敏素 (phytochrome) 功能區，還具有與訊號傳遞有關的蛋白功能區。因此本研究決定以芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株 ($\Delta CgHK1$) 做為實驗研究對象。

貳、研究目的

本研究希望能透過光照的方式防治芒果炭疽病菌，為了能夠找出光照與芒果炭疽病菌之間的關係，本研究提出以下幾點實驗目的，希望能夠找出他們之間的關聯。

- 一、探討不同光照時間對芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株的生長、產孢、耐乾燥能力、孢子致病及發芽能力的影響
- 二、探討不同波長光對芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株的生長、產孢、孢子致病及發芽能力的影響
- 三、了解芒果炭疽病菌野生株及光敏素突變株生長時產生的代謝物對葉片的影響
- 四、探討芒果炭疽病菌野生株於不同色光照射處理之 *CgHK1* 基因表現
- 五、了解不同波長的光及光敏素對芒果炭疽病菌於滲透壓逆境下的生長能力影響。

參、實驗器材與流程設計

一、實驗器材

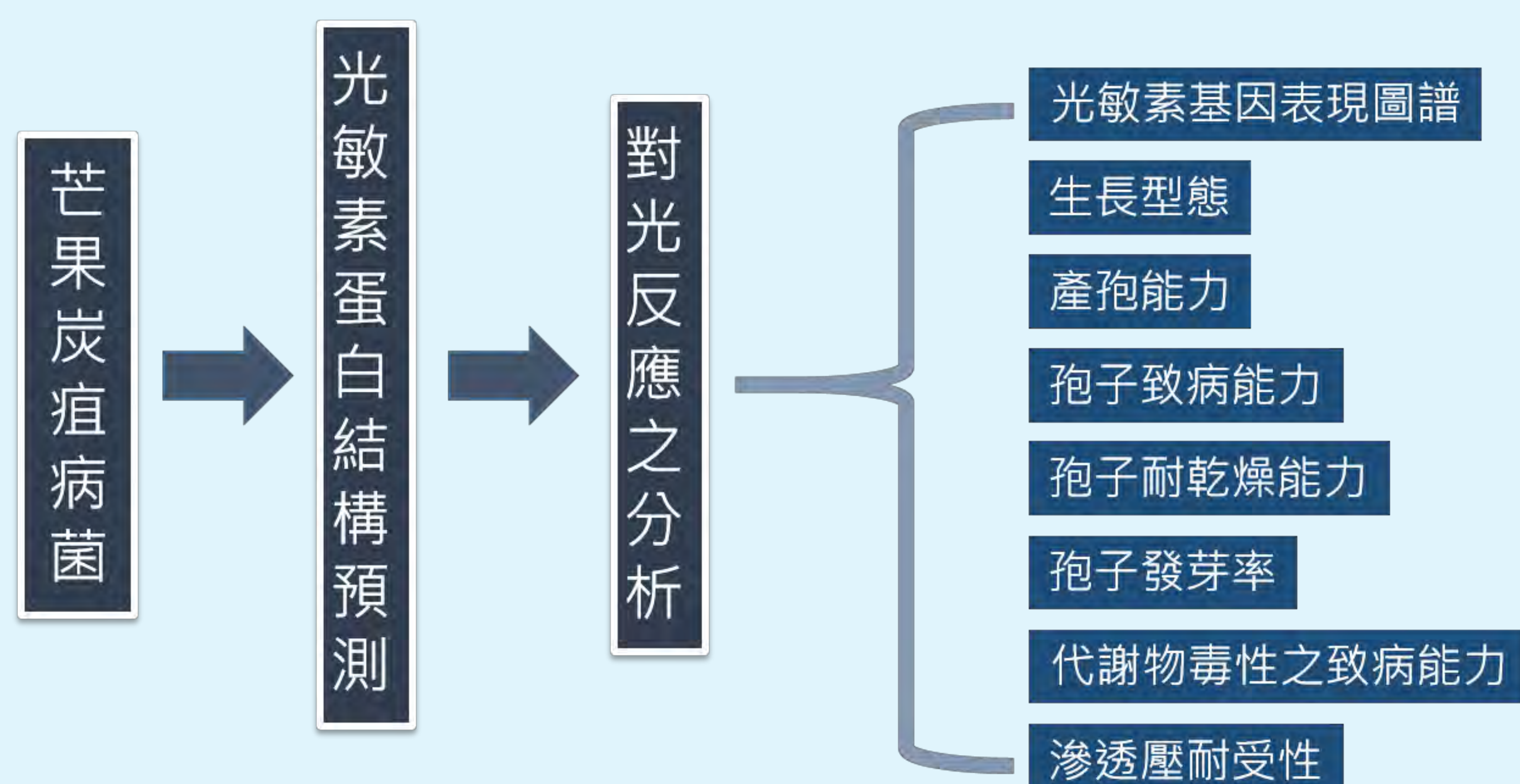
研究儀器

無菌操作台、恆溫生長箱(25°C)、木架燈箱、不同波長的燈管(白光、藍光、紅光、遠紅光)、血球計數器、UV燈箱、複式顯微鏡、離心機、電泳槽、熱循環機、微量吸管、微量離心管、離心管、無菌針頭、培養皿、滅菌釜。

研究材料

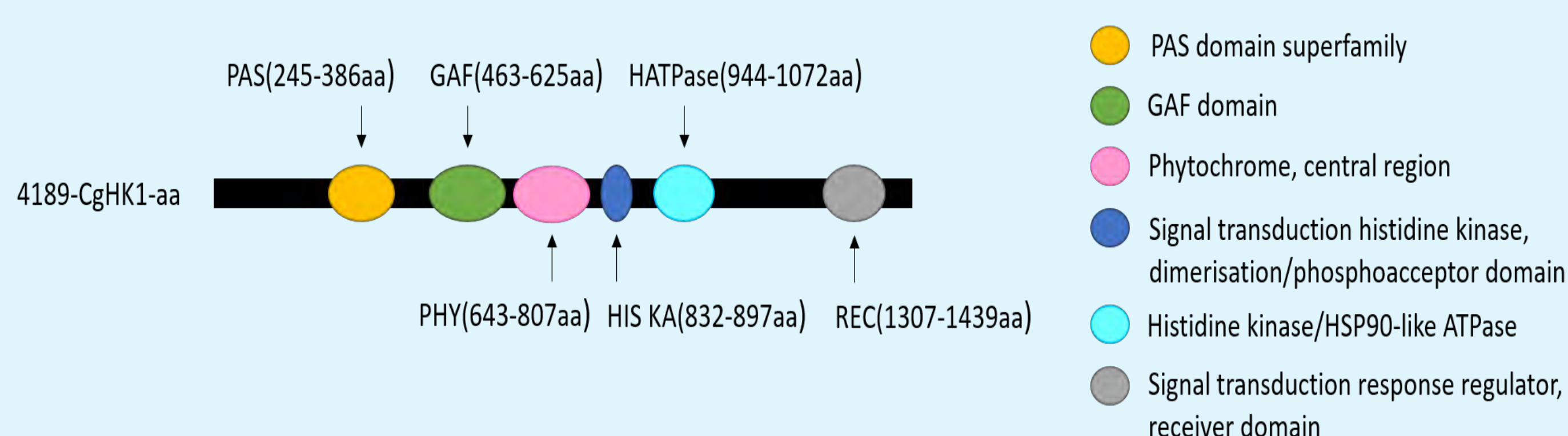
芒果葉片(愛文、凱特、懷特)嫩葉、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 Potato Dextrose Agar (PDA)、Murashige and Skoog (MS) 培養基、modified Czapek's (CZ) broth 培養基、馬鈴薯葡萄糖培養基 Potato Dextrose broth、乙酸乙酯 Ethyl acetate (EA)、二甲基亞砜 Dimethyl sulfoxide (DMSO)、TRIzol、氯仿、異丙醇、75%乙醇、semi-qRT-PCR(RNase-Free Water、Oligo d(T) primer、MMLA HP RT 10x Reaction Buffer、100mM DTT、RiboGuard RNase Inhibitor、10mM dNTP、MMLV High Performance Reverse Transcriptase)、qRT-PCR(Bee Taq polymerase、Primer F、Primer R)、凝膠電泳(溴化乙錠、10x TAE buffer、Agarose)。

二、實驗流程



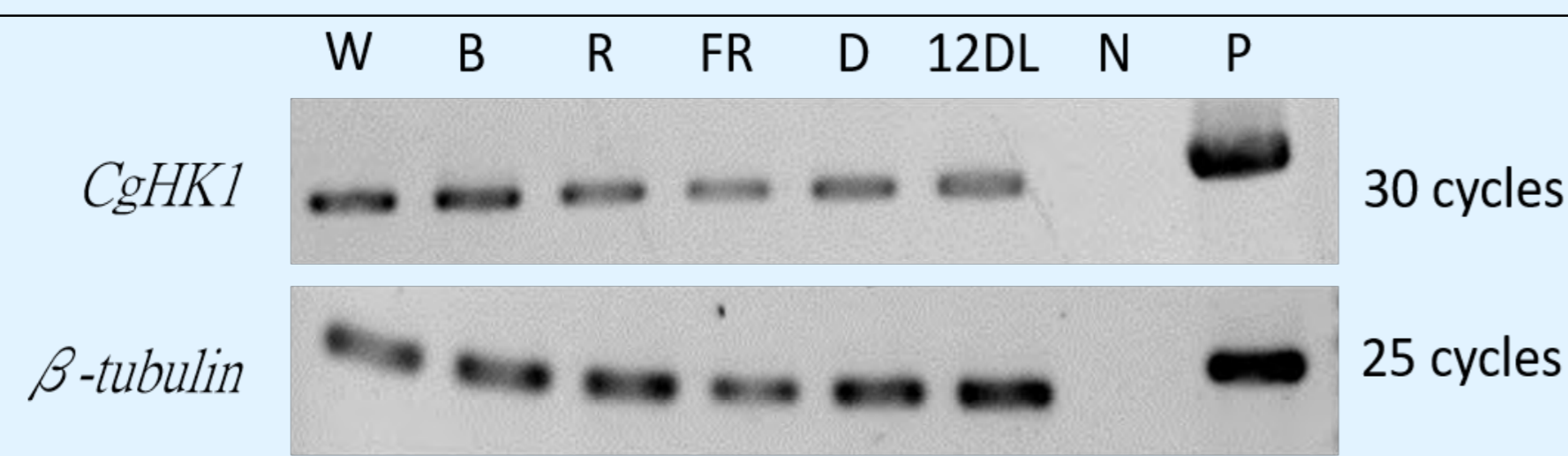
肆、研究結果

一、*CgHK1* 蛋白質結構預測結果



圖一、*CgHK1* 蛋白質結構預測結果。

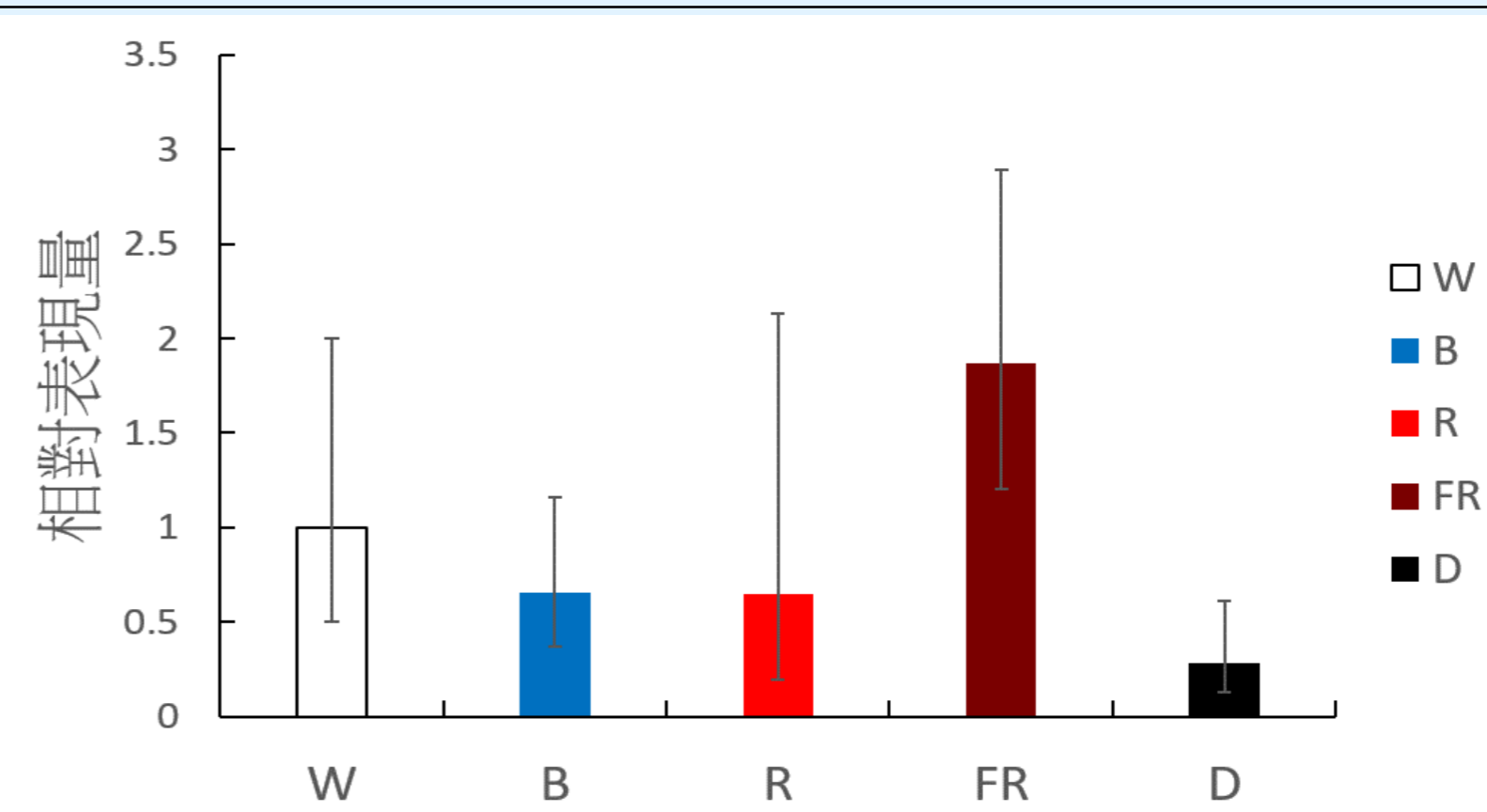
二、Semi qRT-PCR



CgHK1/β-tubulin 0.84 0.79 0.71 0.77 0.71 0.67

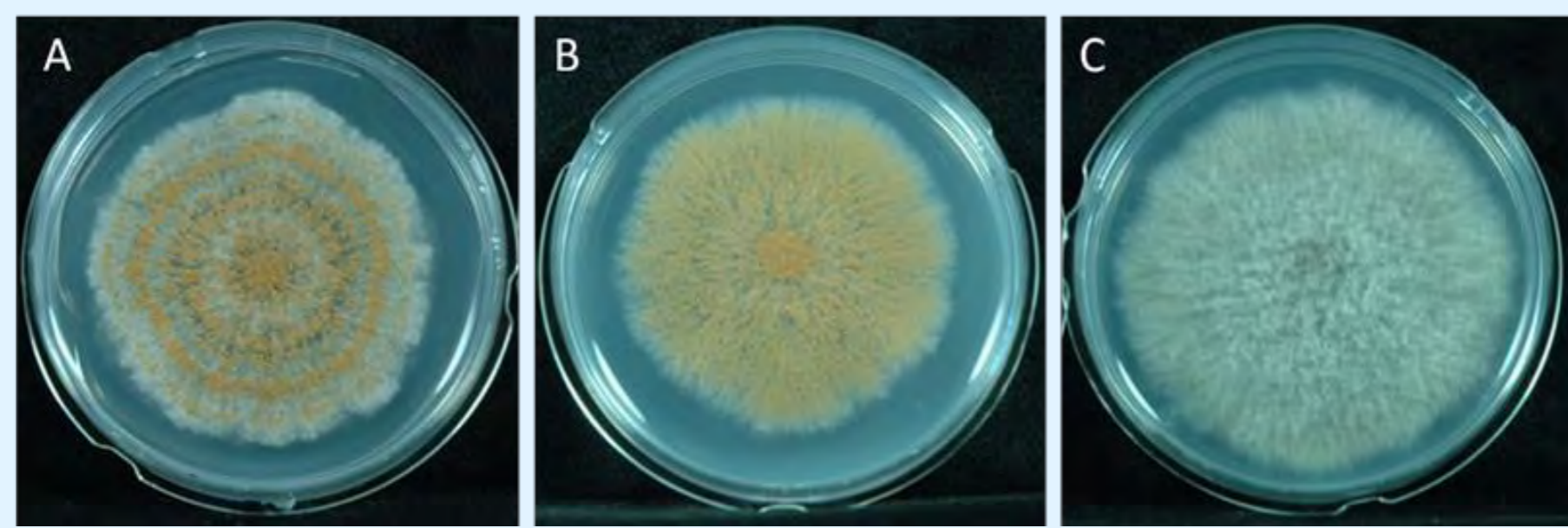
圖二、semi qRT-PCR 檢測 *C. gloeosporioides* TYC-2 於不同色光照射處理3小時之 *CgHK1* 基因表現。W：照射白光；B：照射藍光；R：照射紅光；FR：照射遠紅光；D：給予黑暗；12DL：維持12/12光暗輪替；N：Negative control:PCR Solution；P：Positive control:TYC-2 gDNA。

三、qRT-PCR

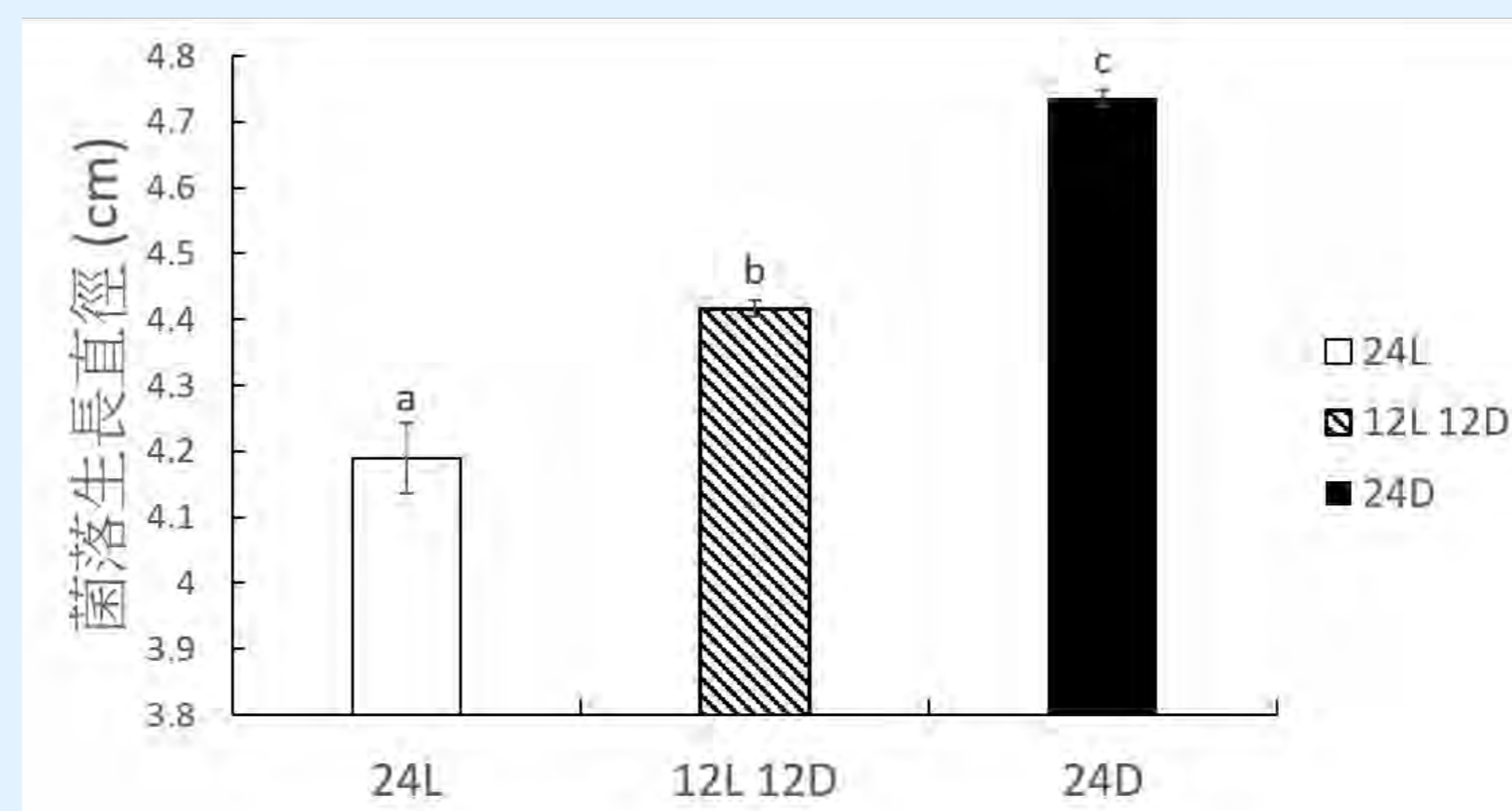


圖三、qRT-PCR 檢測 *C. gloeosporioides* TYC-2 於不同色光照射處理之 *CgHK1* 基因表現。W為白光；B為藍光；R為紅光；FR為遠紅光；D為黑暗。

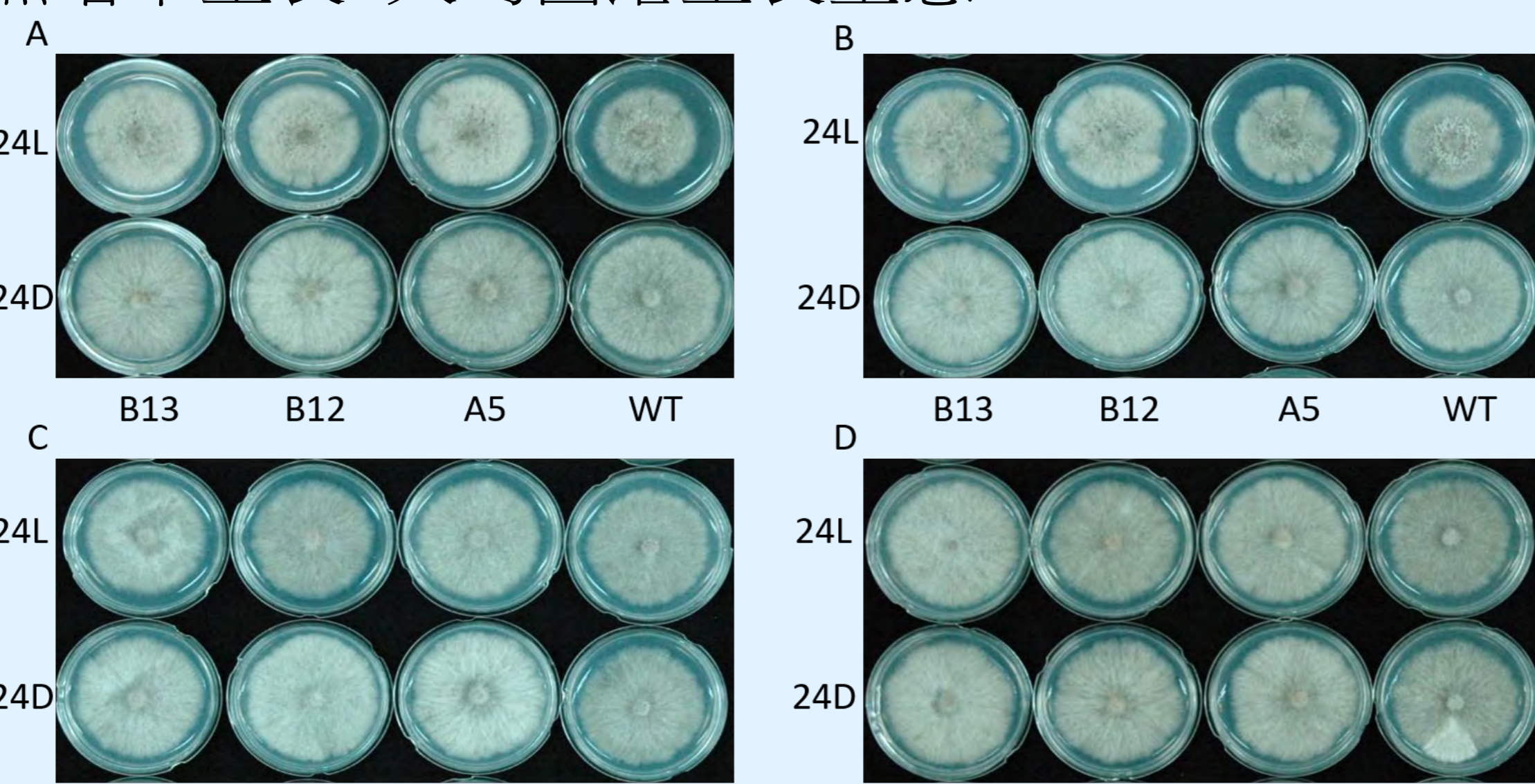
四、不同光照條件對芒果炭疽病菌生長型態之影響



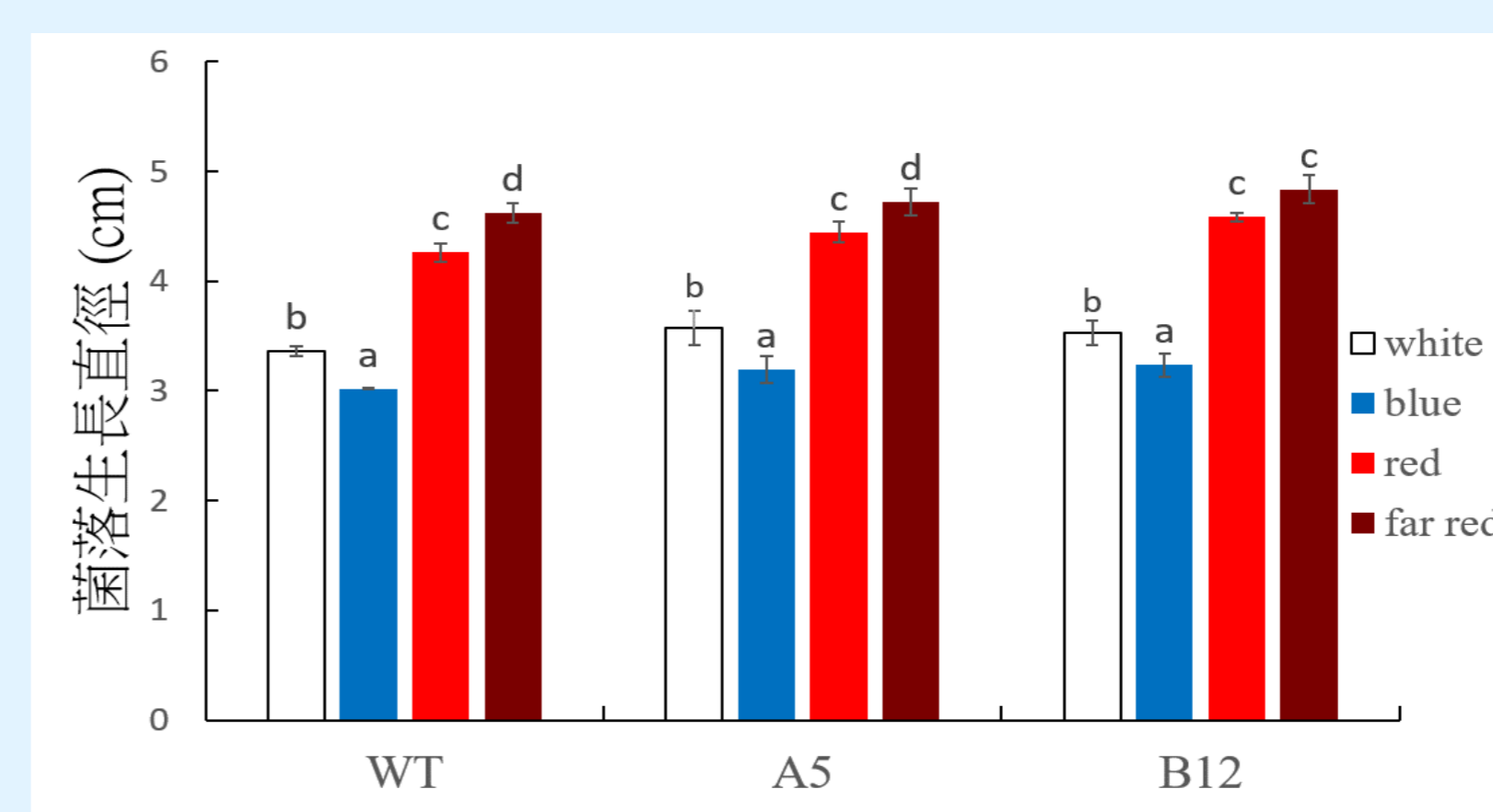
圖四、芒果炭疽病菌野生株接種於MS培養基給予 (A) 白光12小時光暗輪替、(B) 24小時光照及 (C) 24小時黑暗下生長6天的菌落生長型態。



圖五、芒果炭疽病菌野生株於白光的24小時光照、12小時光暗輪替及24小時黑暗下生長6天的菌落生長直徑。

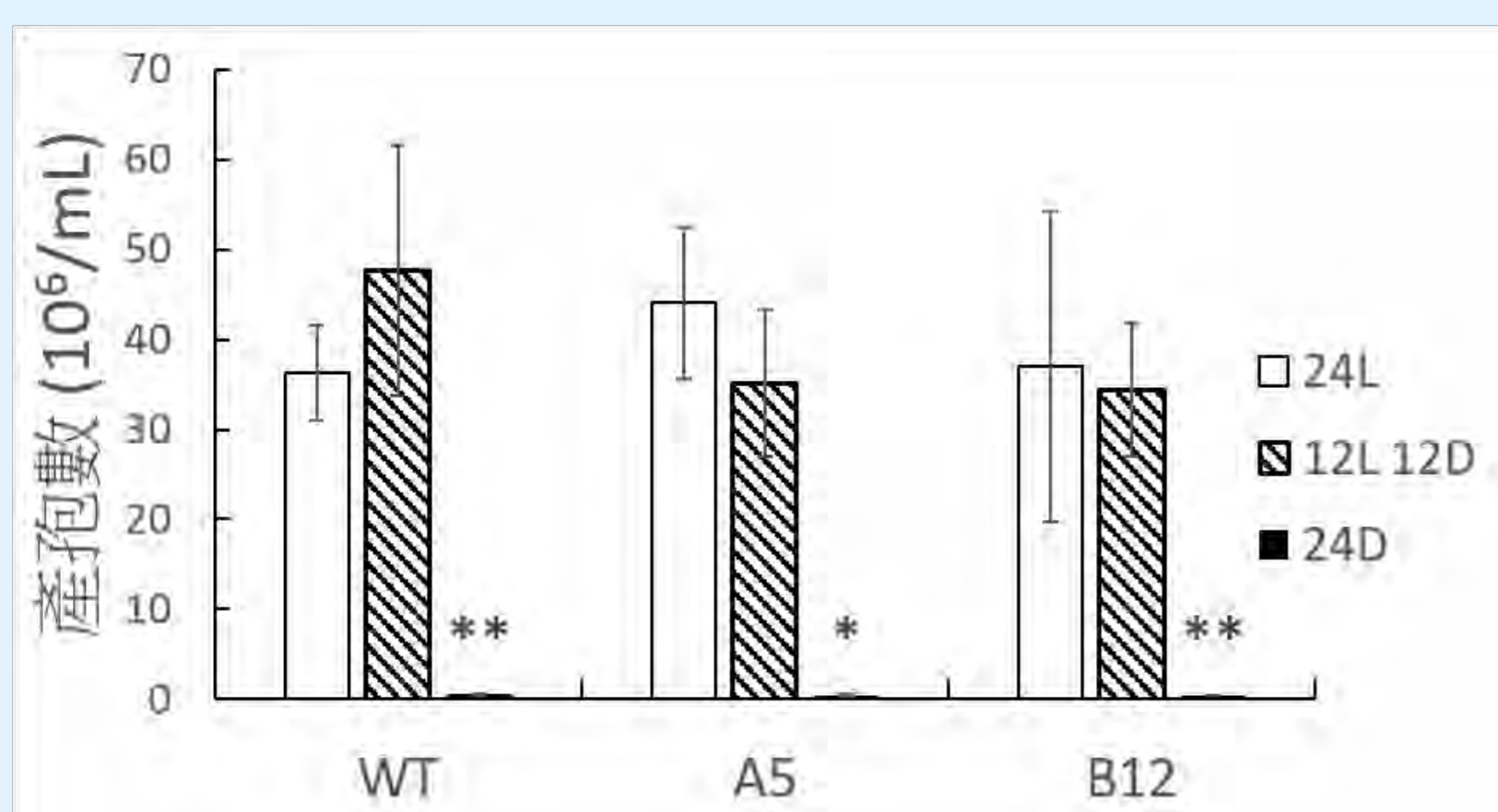


圖六、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12、 $\Delta CgHK1$ B13 於 (A) 白光、(B) 藍光、(C) 紅光及 (D) 遠紅光下生長6天的菌落生長型態。四種色光皆為24小時光照 (24L)，其對照組皆為黑暗 (24D)。

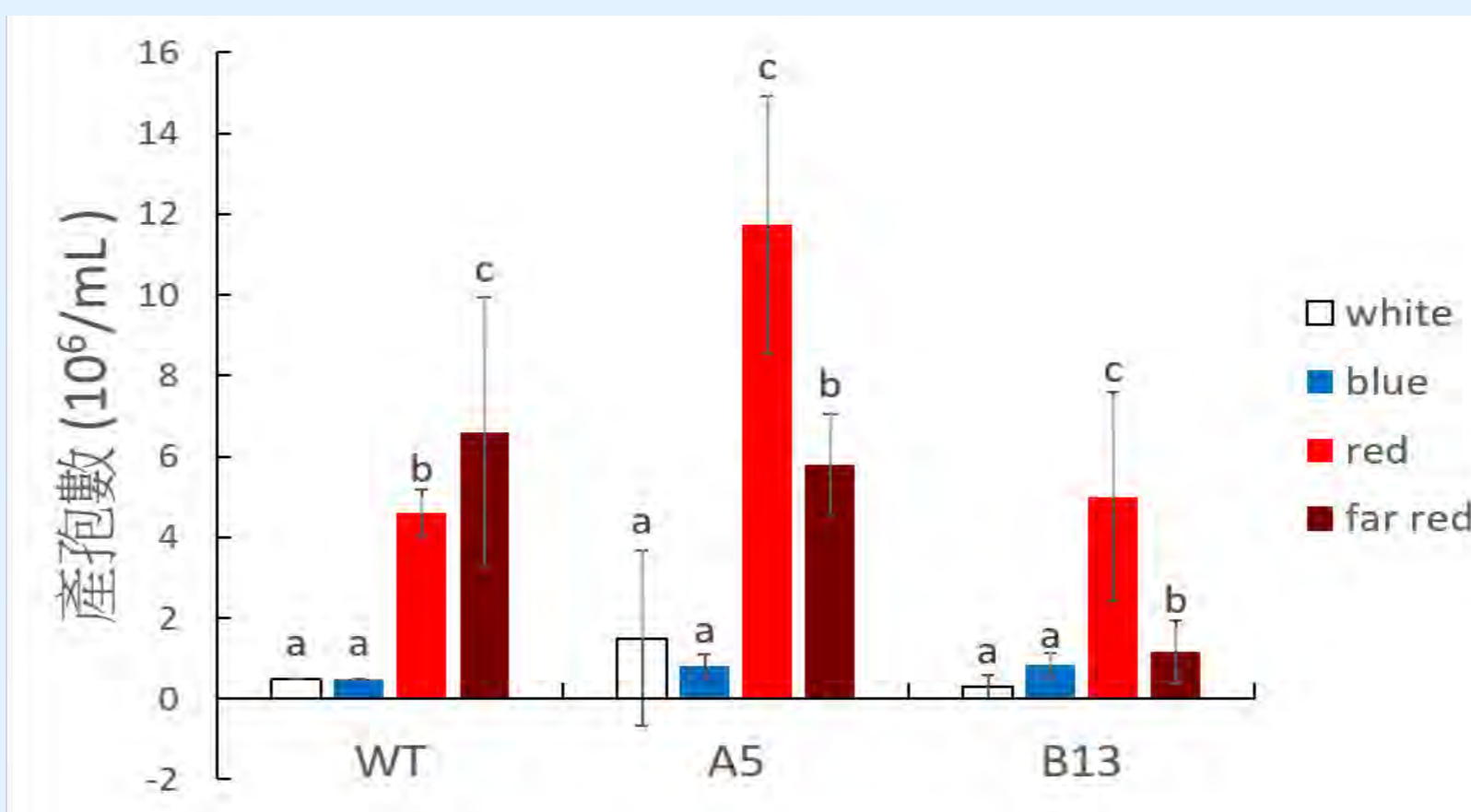


圖七、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12 於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長6天的菌落生長直徑。

五、不同光照條件對芒果炭疽病菌產生孢子能力之影響

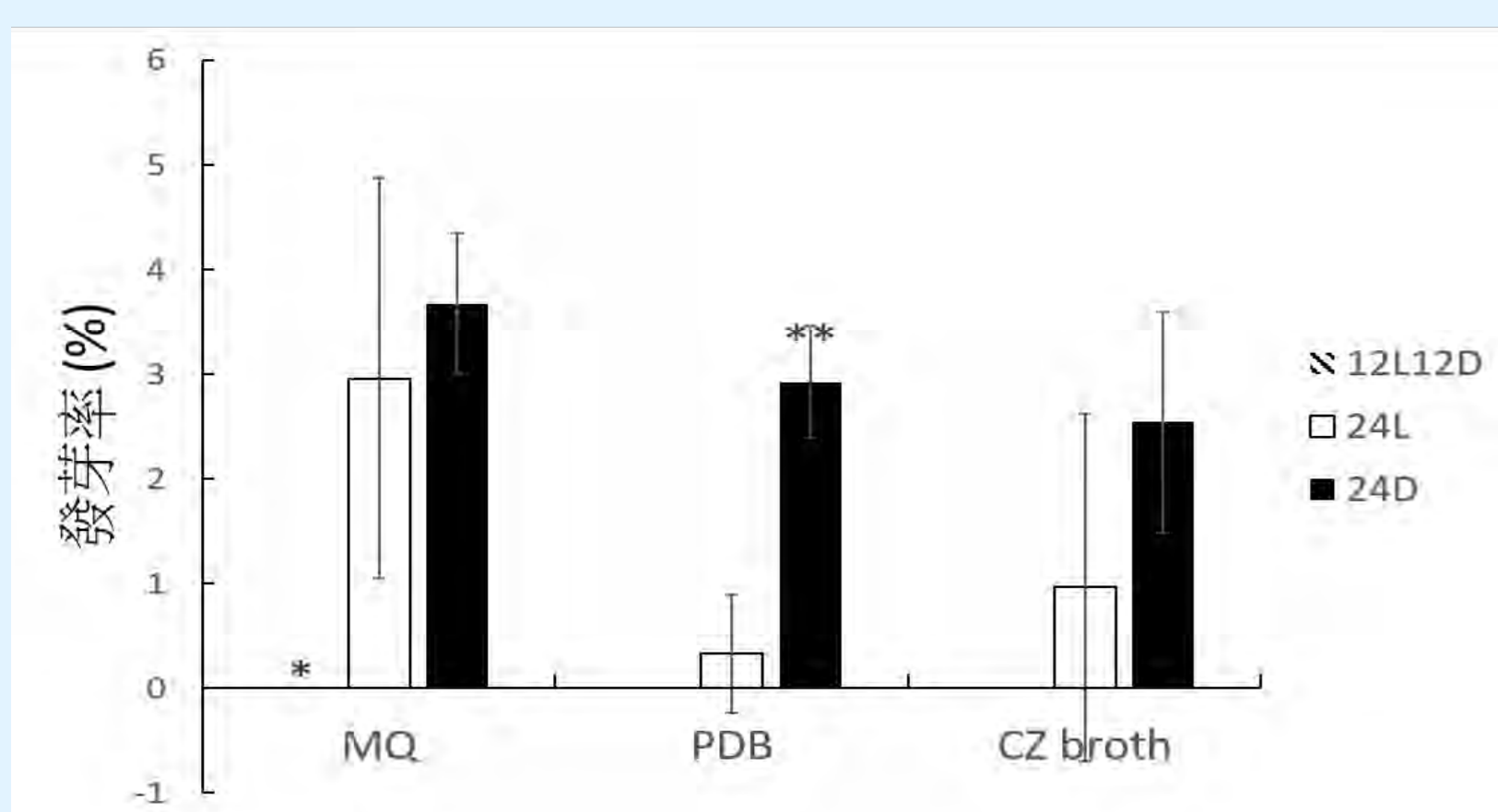


圖八、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B12 於白光的24小時光照 (24L)、12小時光暗輪替 (12L 12D) 及24小時黑暗 (24D) 下生長6天的產孢數。

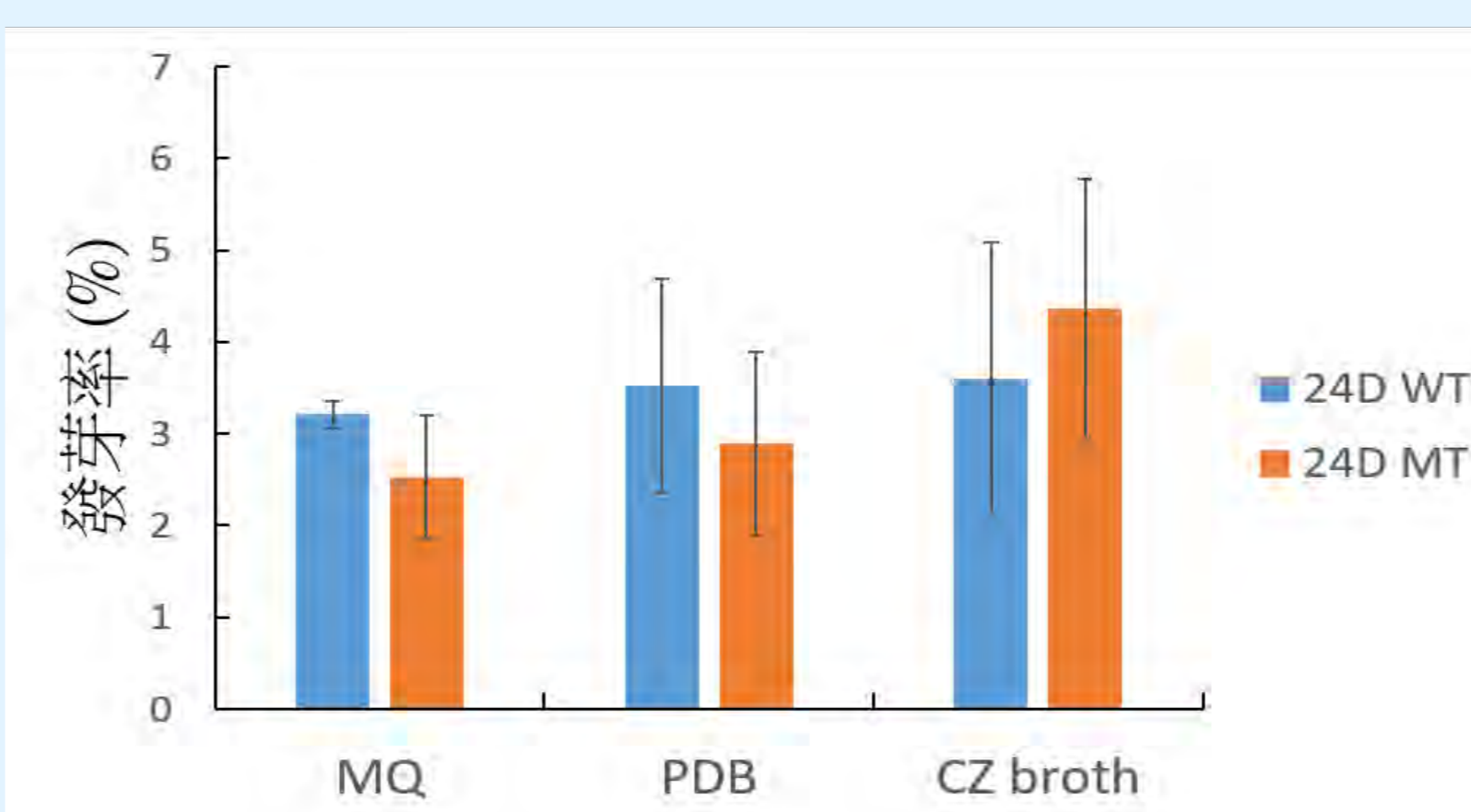


圖九、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13 於白光、藍光、紅光及遠紅光下6天的菌落產孢數。

六、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子耐乾燥能力之影響



圖十、芒果炭疽病菌野生株於白光的24小時光照、12小時光暗輪替及24小時黑暗下生長6天的孢子耐乾燥程度。

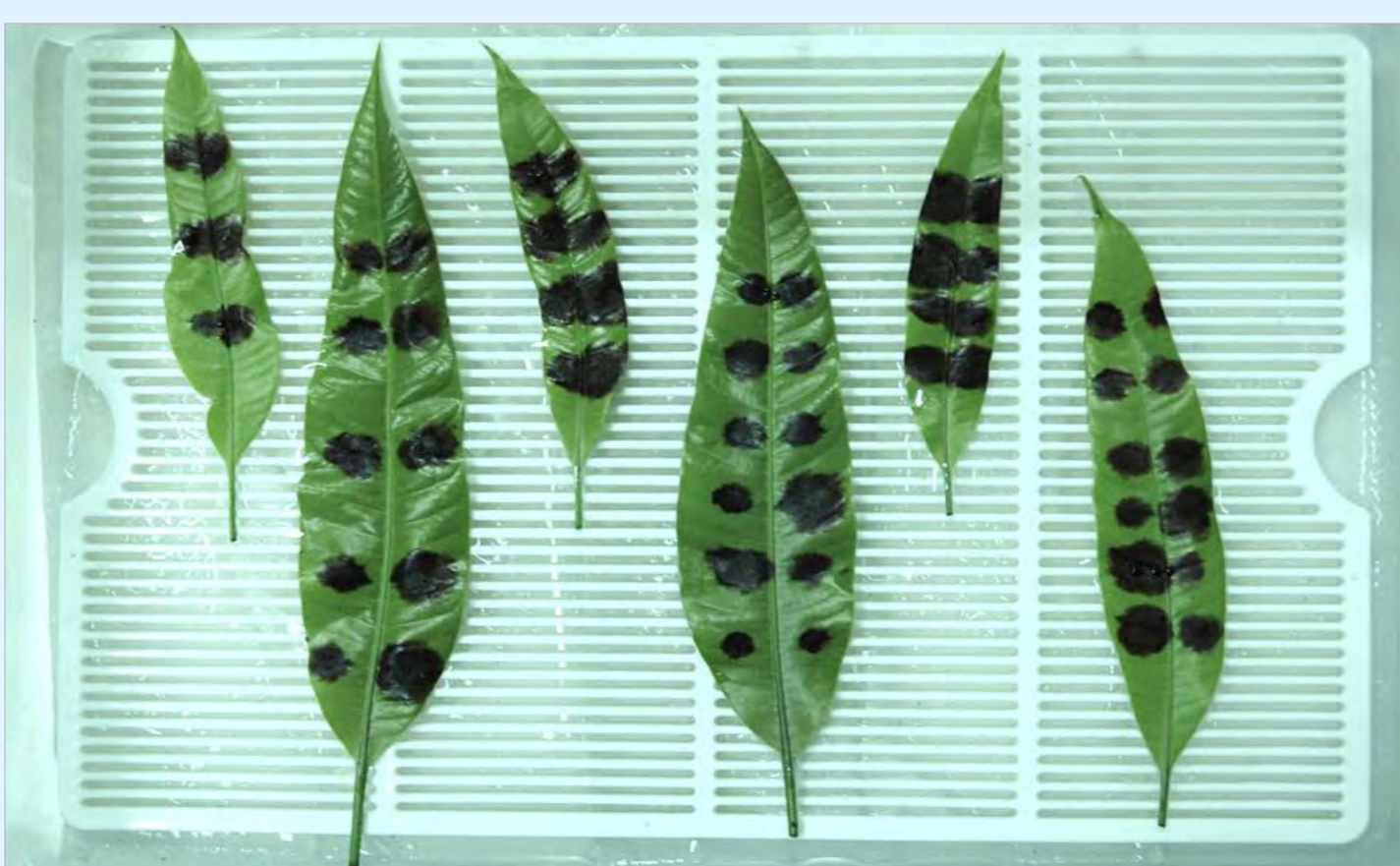


圖十一、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 於24小時黑暗生長6天的孢子耐乾燥程度。

七、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子對葉片致病能力影響

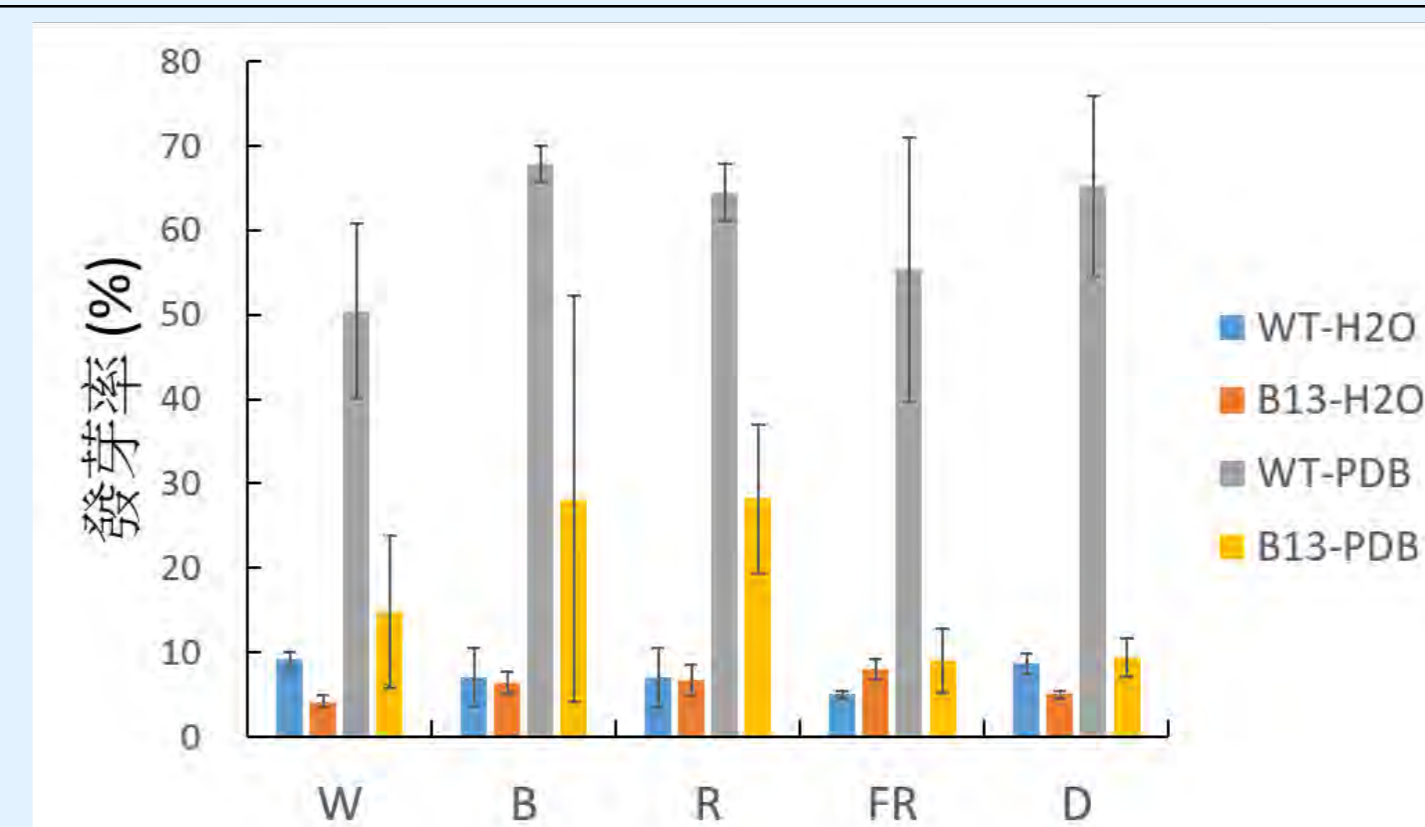
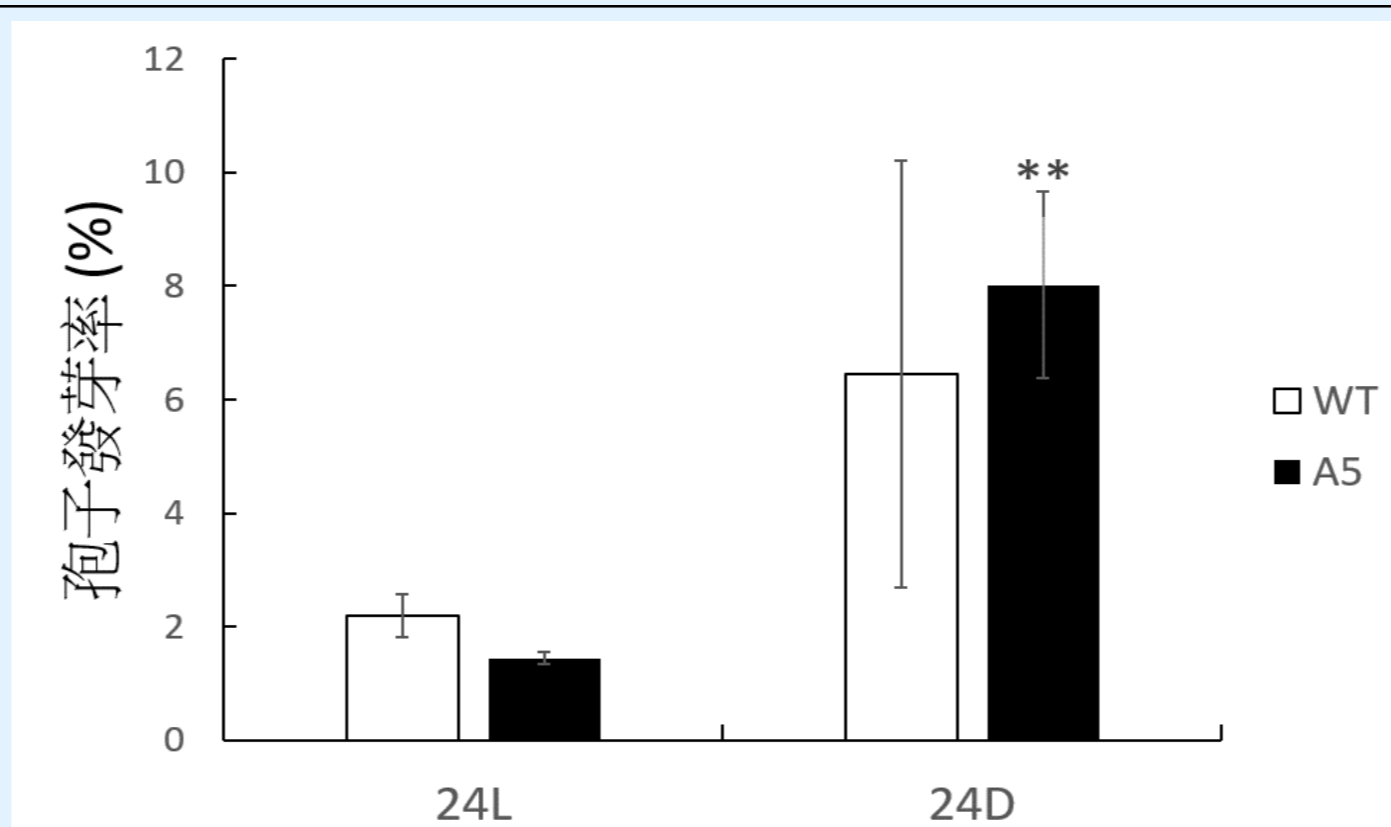
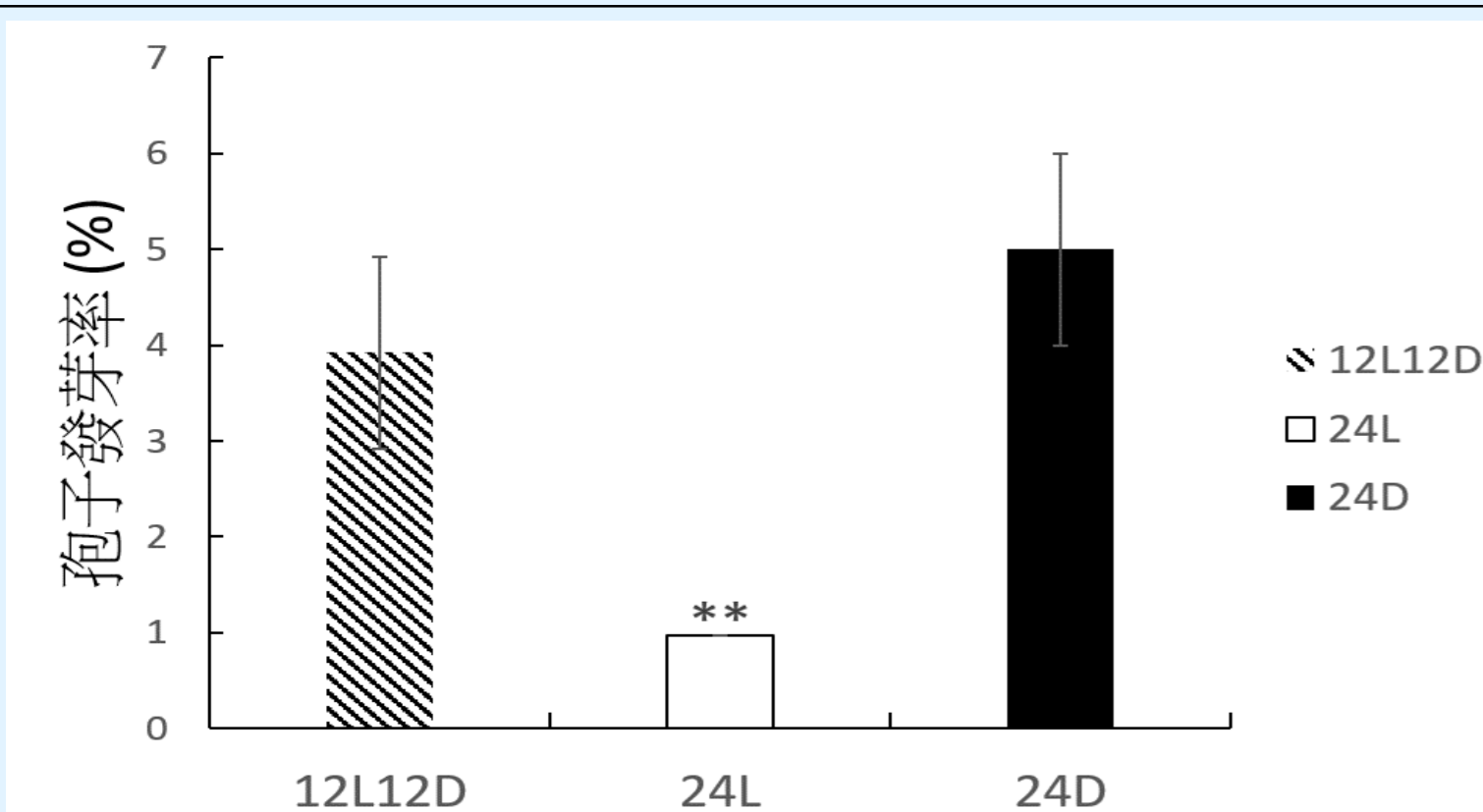


圖十二、芒果炭疽病菌野生株於白光24小時光照及24小時黑暗產生的孢子接種於愛文芒果葉片第3天的發病情形。



圖十三、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5 於24小時黑暗下產生的孢子接種於愛文芒果葉片第3天的發病程度。

八、不同光照條件對芒果炭疽病菌分生孢子發芽率之影響

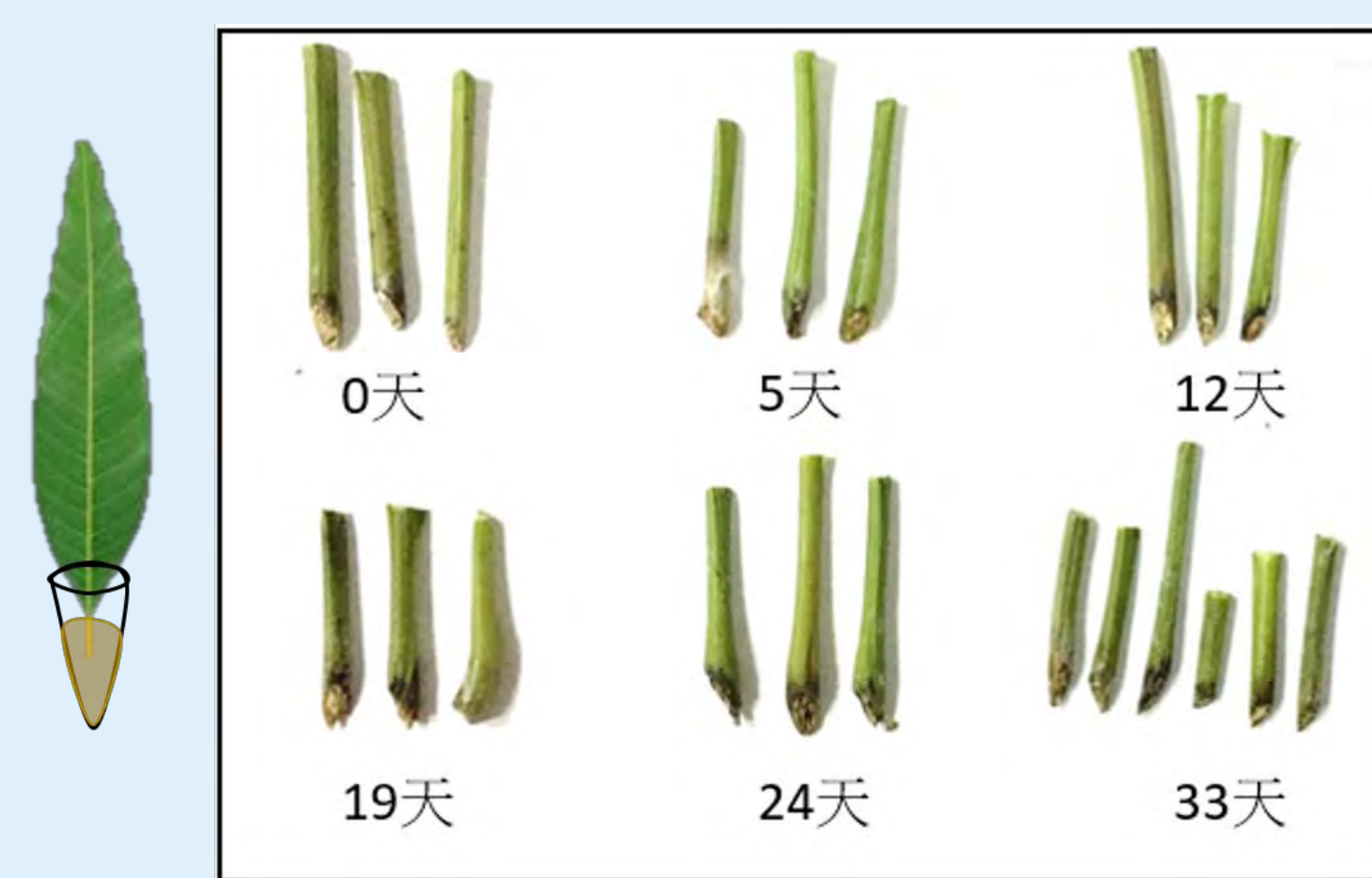


圖十四、芒果炭疽病菌野生株於白光的12小時光暗輪替、24小時光照及24小時黑暗下培養所產生之孢子的發芽率。

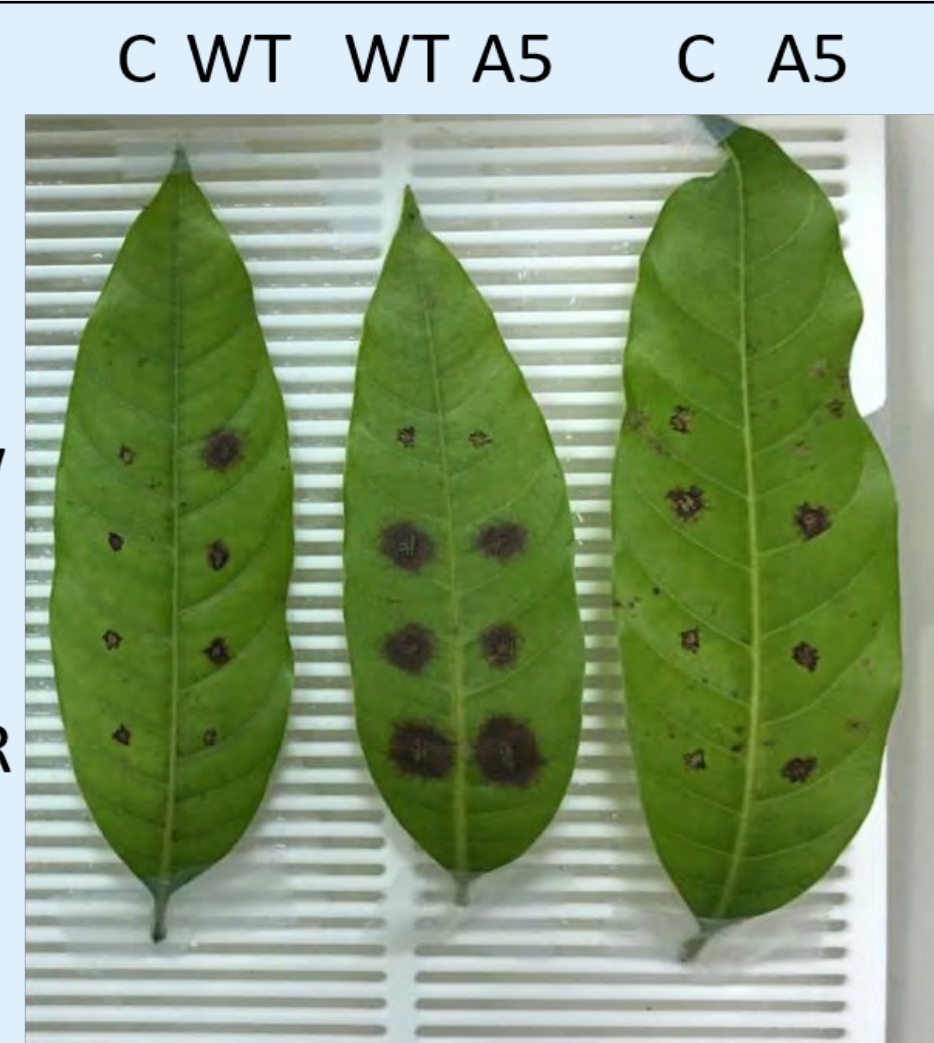
圖十五、芒果炭疽病菌野生株和 $\Delta CgHK1$ A5 於白光24小時光照及24小時黑暗培養所產生之孢子的發芽率。

圖十六、芒果炭疽病菌野生株和 $\Delta CgHK1$ B13 於白光12小時光暗輪替下產生的孢子，給PDB或水於不同波長光3小時之發芽率。

九、不同光照條件對芒果炭疽病菌生長代謝物對葉片致病能力影響

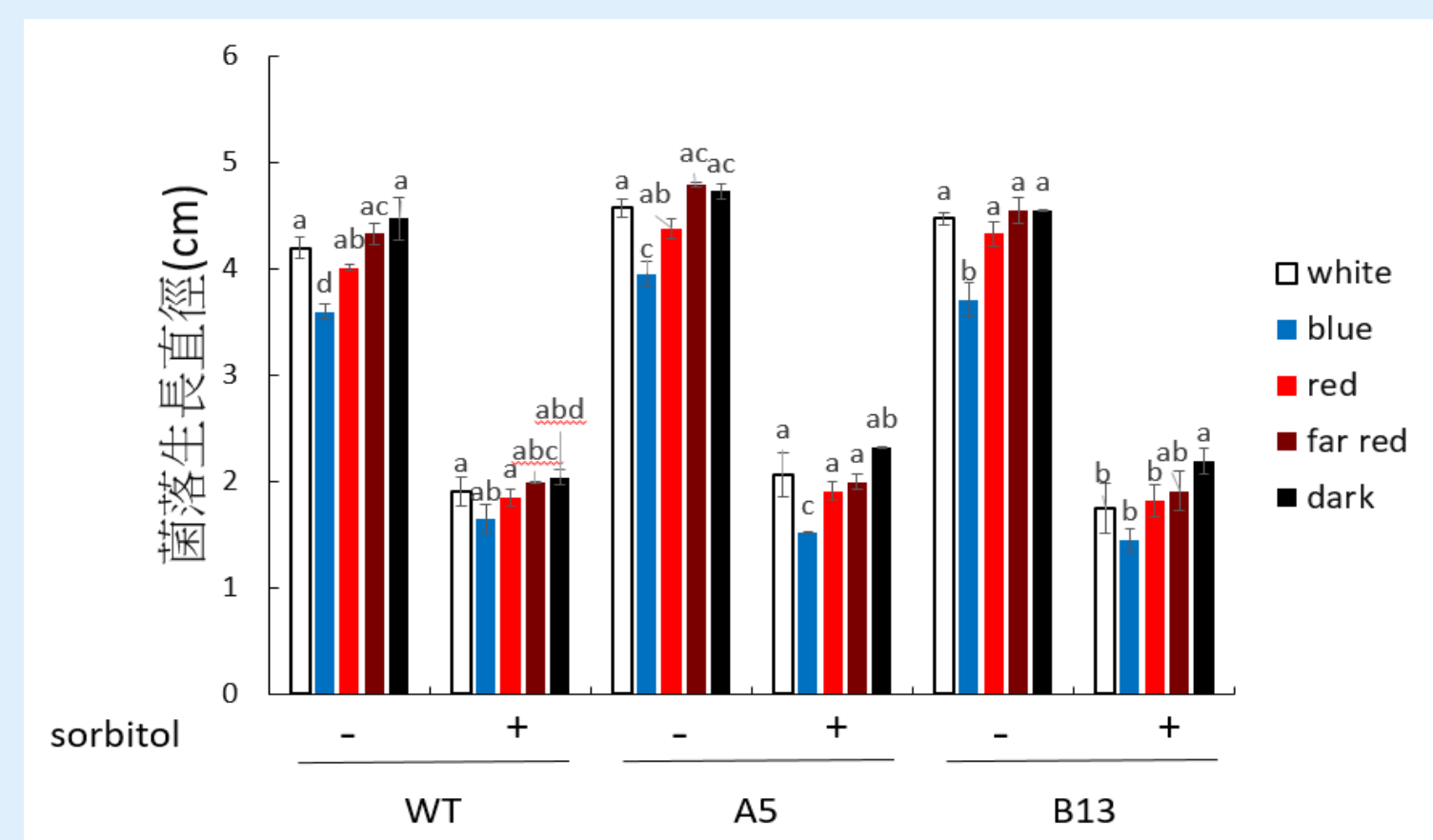


圖十七、芒果炭疽病菌野生株培養在PDB培養液於白光12小時光暗輪替下在第0天、5天、12天、19天、24天和33天產生代謝物的致病能力。

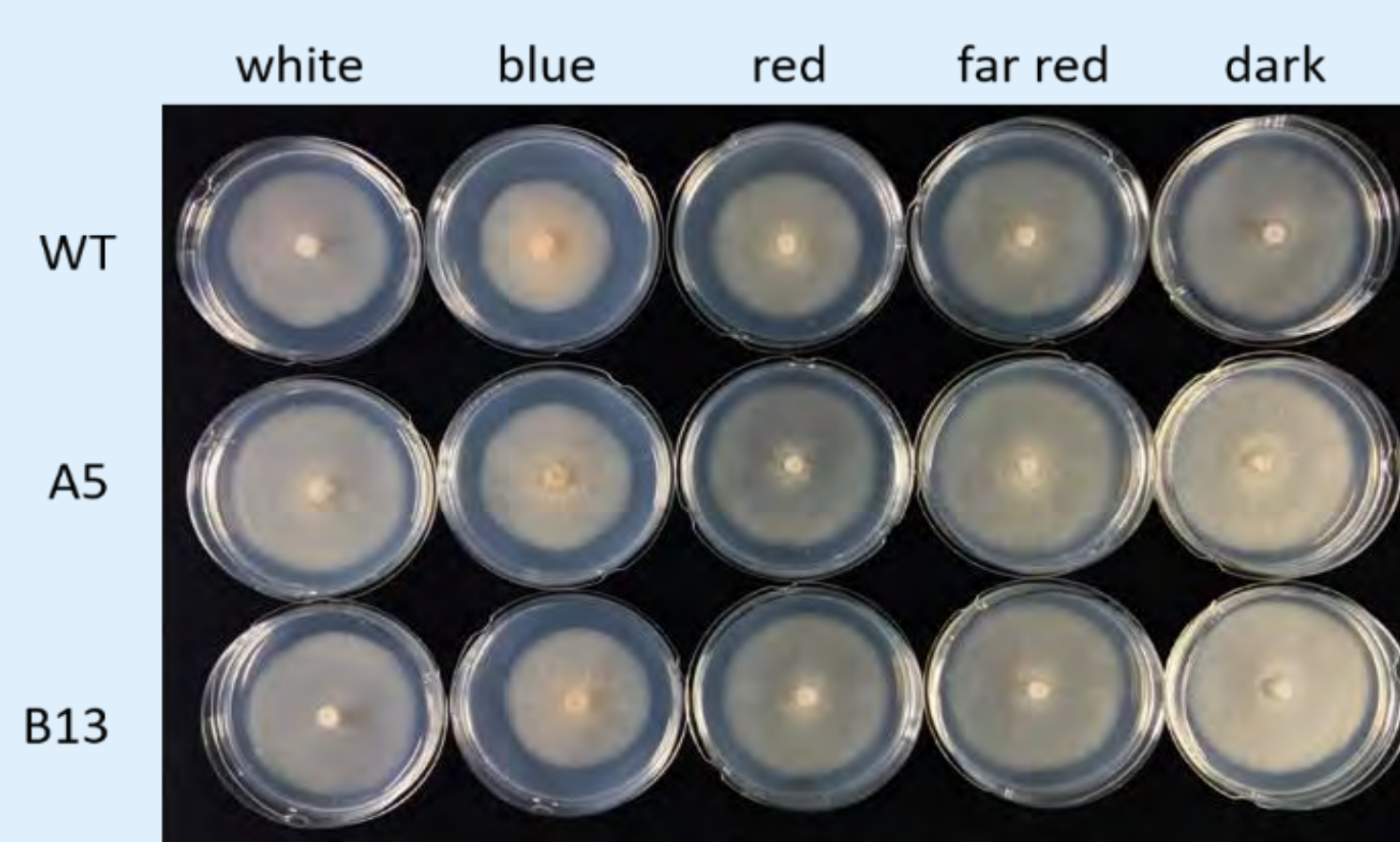


圖十八、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5接種於白光、藍光、紅光及遠紅光下生長14天代謝物的致病能力。C：控制組；WT：野生株；A5：突變株。

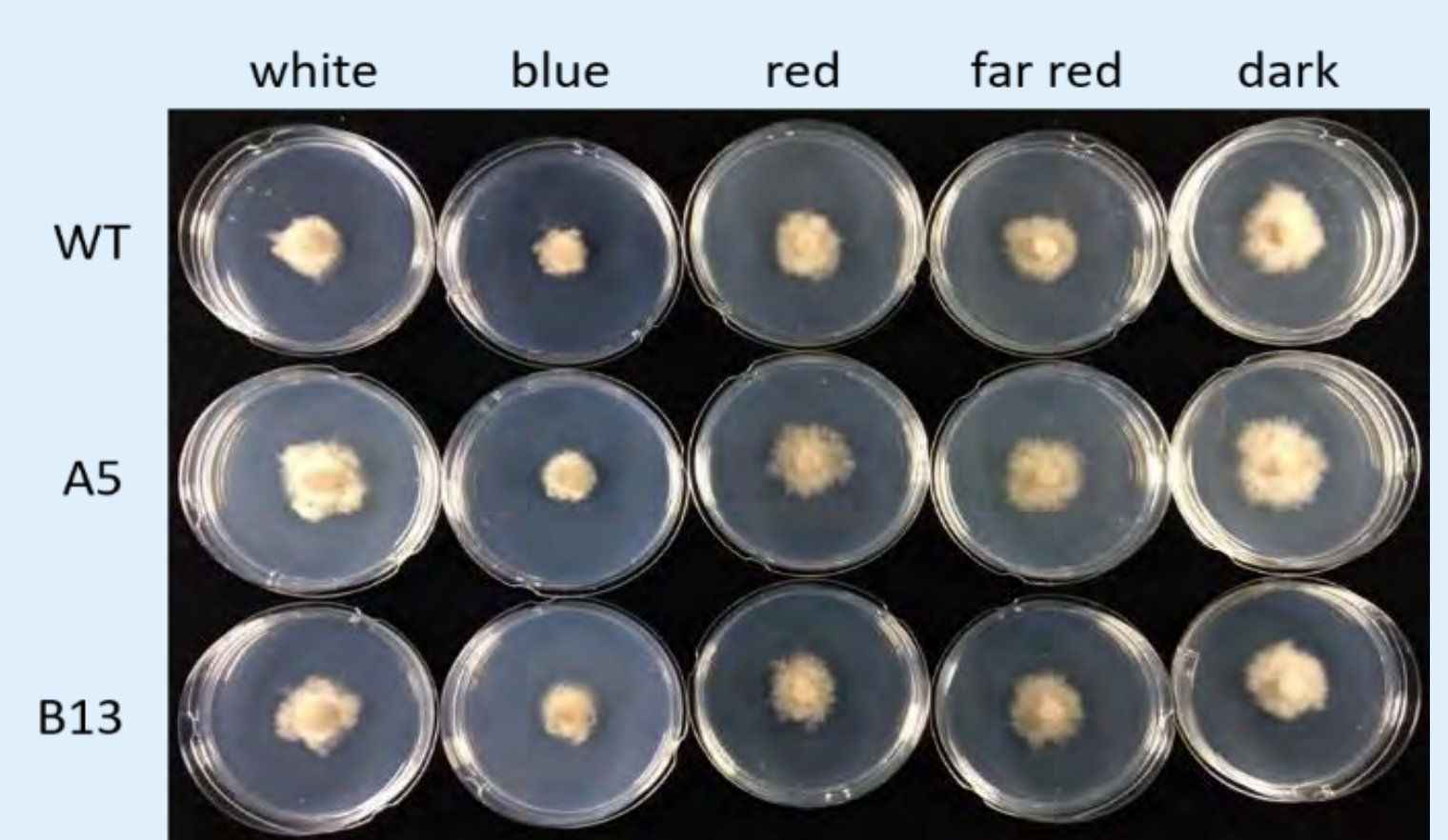
十、不同光波長對芒果炭疽病菌於滲透壓耐受性之試驗



圖十九、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13於白光、藍光、紅光及遠紅光下在添加或不添加山梨糖醇的查氏培養基7天的菌落生長直徑。



圖二十、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13在不添加山梨糖醇的查氏培養基上於不同波長光下生長7天菌落生長型態。



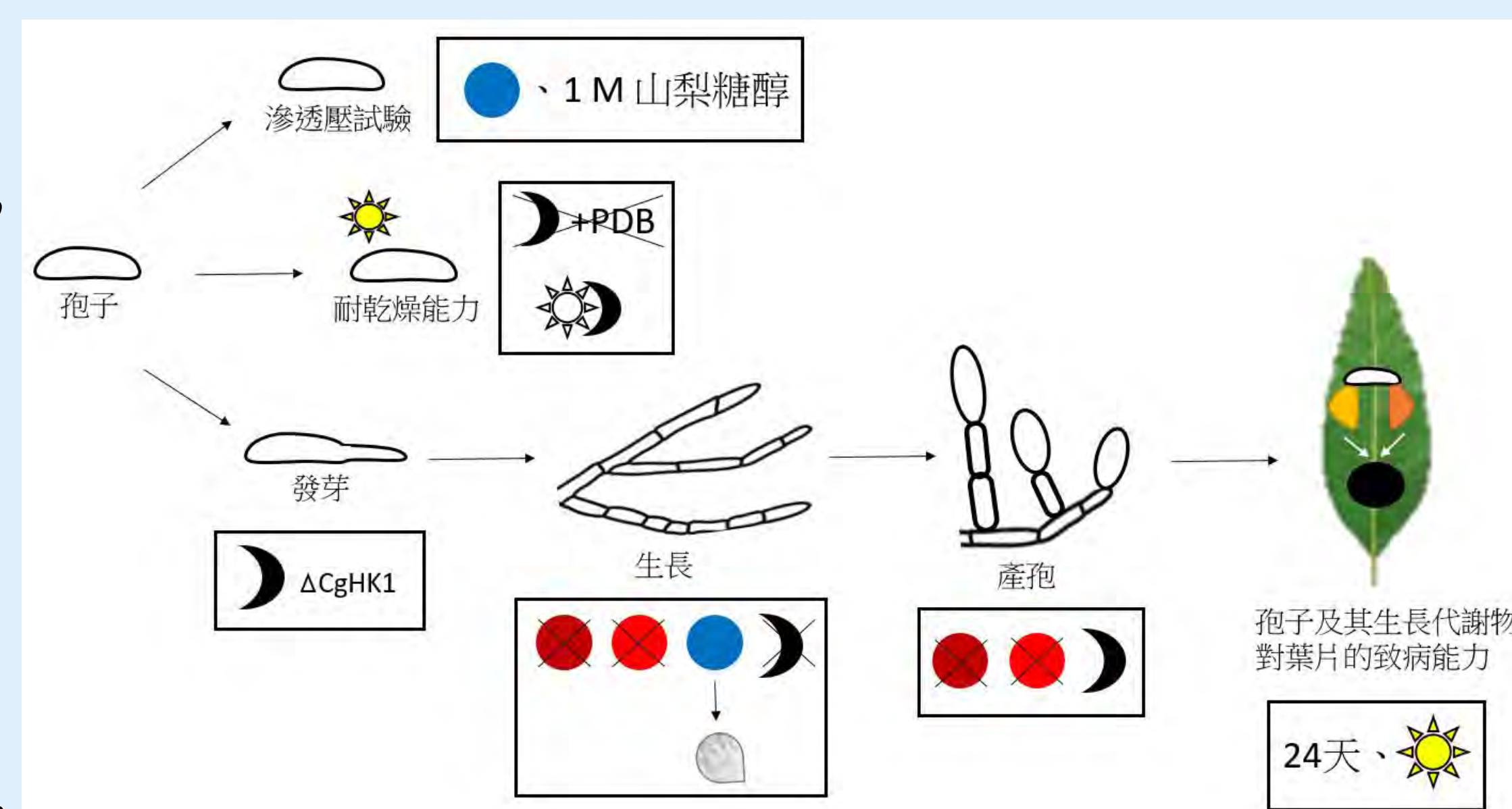
圖二十一、芒果炭疽病菌野生株及 $\Delta CgHK1$ A5、 $\Delta CgHK1$ B13在添加山梨糖醇的查氏培養基上於不同波長光下生長7天菌落生長型態。

伍、討論

- ▶ **各色光源有溫差:** 於不同波長光實驗中，因木架燈箱置於實驗室內，所以無法控制溫度一致。藍光的溫度皆明顯高於其餘三種光源，在嘗試改善後藍光溫度依舊偏高，而分別培養在四光箱盒內的黑暗條件下，菌絲生長並沒有明顯差異，顯示四個燈箱的溫差並不影響生長，但是否對產孢有影響需再確定。
- ▶ **代謝物萃取方式:** 第一種於撕下玻璃紙時發現玻璃紙已被固定於培養基上，因菌絲已穿過玻璃紙深入培養基中，此代表實驗想以玻璃紙隔絕菌絲往下長的目的失敗。因此本研究以液態培養菌株以避開菌絲只抽取濾液得到其代謝物，但因濃度太低，濃縮後無效果，結果不明顯。改以第三種方式進行實驗，但因DMSO溶劑對葉片具毒性，50x、100xDMSO溶劑本身對葉片都有影響，因此最後選擇200x的結果。
- ▶ **PDB的給予:** 由耐乾燥及發芽率實驗可看到耐乾燥的孢子液在加入PDB之後並無顯著提升孢子發芽率，但發芽率實驗加入PDB的孢子懸浮液明顯比未加入的發芽率更高。發芽率實驗只加3小時便觀察，而耐乾燥實驗，孢子經乾燥處理1天後才加PDB觀察發芽率，因此推斷PDB可以在短時間內促進孢子發芽。

陸、結論

- 一、於全黑暗及12小時光暗輪替下產生的芒果炭疽病菌孢子發芽能力比全光照好。
- 二、黑暗會促進芒果炭疽病菌的生長，抑制產孢的數量，黑暗培養產生的孢子有較強的致病能力；而光照會促進芒果炭疽病菌產孢。
- 三、不同光波長測試，顯示紅光及遠紅光會促進芒果炭疽病菌的生長及產孢。藍光明顯抑制芒果炭疽病菌生長且會促使芒果炭疽病菌產生不穩定扇形菌落。
- 四、芒果炭疽病菌的光敏素基因轉譯蛋白帶有多個蛋白功能區，其在遠紅光下的表現量明顯高於黑暗處理，顯示其可受遠紅光誘導表現。
- 五、芒果炭疽病菌光敏素基因突變株在不同光照波長處理下，菌落生長與野生株無明顯差異，在產孢上紅光及遠紅光皆可促進兩者的產孢，但突變株的產孢量在紅光下顯著高於遠紅光，與野生株相反，顯示芒果炭疽病菌光敏素基因參與芒果炭疽病菌產生孢子的過程。
- 六、光敏素基因的缺失對黑暗培養所產生的孢子其致病能力無影響。
- 七、PDB在短時間(3小時)內能促進孢子發芽，乾燥處理後1天抑制孢子發芽，但此種乾燥處理下全黑暗產生的孢子較全光照產生的孢子明顯有較佳的發芽。
- 八、高滲透壓逆境嚴重的抑制對芒果炭疽病菌生長，此種抑制在各光波長下表現一致，而且光敏素基因的缺失並沒有影響高滲透壓逆境下菌株的生長。



柒、參考資料

- 一、Karlsruhe Institute of Technology, Institute for Applied Biosciences, Department of Microbiology, D-76187 Karlsruhe, Germany
- 二、Max Rubner Institut, Department for Safety and Quality of Fruit and Vegetables, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe, Germany b Institute of Sciences of Food Production, National Research Council (ISPA-CNR), Via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy
- 三、1Department of Plant Pathology & Microbiology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA; 2Department of Biological Sciences, Southwestern Oklahoma State University, Weatherford, Oklahoma 73096, USA
- 四、Copyright © 2018 CASE報科學. All rights reserved.Theme: ColorMag by ThemeGrill. Powered by WordPress.
- 五、臺灣農藥科學 (Taiwan Pesticide Science) 3: 65-78 (2017)DOI: 10.6671/TPS/2017.003.05
- 六、安寶貞、呂理桑、莊再揚、高清文。1998。套袋與地面覆蓋對椶果炭疽病與蒂腐病之防治效果。植病會刊 7:19-26