

中華民國第 57 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

052105

喝ㄋㄟㄋㄟ的植物長得好？！

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者：	指導老師：
高二 張瑄芳	陳柏文
高二 毛楷維	鄭楷騰

關鍵詞：牛奶、胺基酸、生物逆境

摘要

生活中常聽說牛奶可以幫助蔬果生長，我們好奇用牛奶澆灌植物是否真會帶來什麼改變，我們便選用阿拉伯芥進行我們的實驗。首先我們直接以牛奶澆灌植物，卻發現對植物的外觀沒有什麼影響。於是我們又進行了染菌實驗，藉此研究牛奶對植物抗菌是否有幫助。我們發現牛奶能夠提升阿拉伯芥對細菌的抵抗力，又在實驗後確定此現象與初級防禦反應相關。我們推測是牛奶中的胺基酸引起的，於是我們再以Proline等胺基酸澆灌植物，其中Proline亦能協助植物抗病；接下來我們再探討Proline協助植物抗病的機制，發現Proline和牛奶一樣可以增強初級防禦反應及利用callose堆積協助植物抗病。因此我們推測，牛奶中含有的Proline能夠幫助植物對抗細菌。

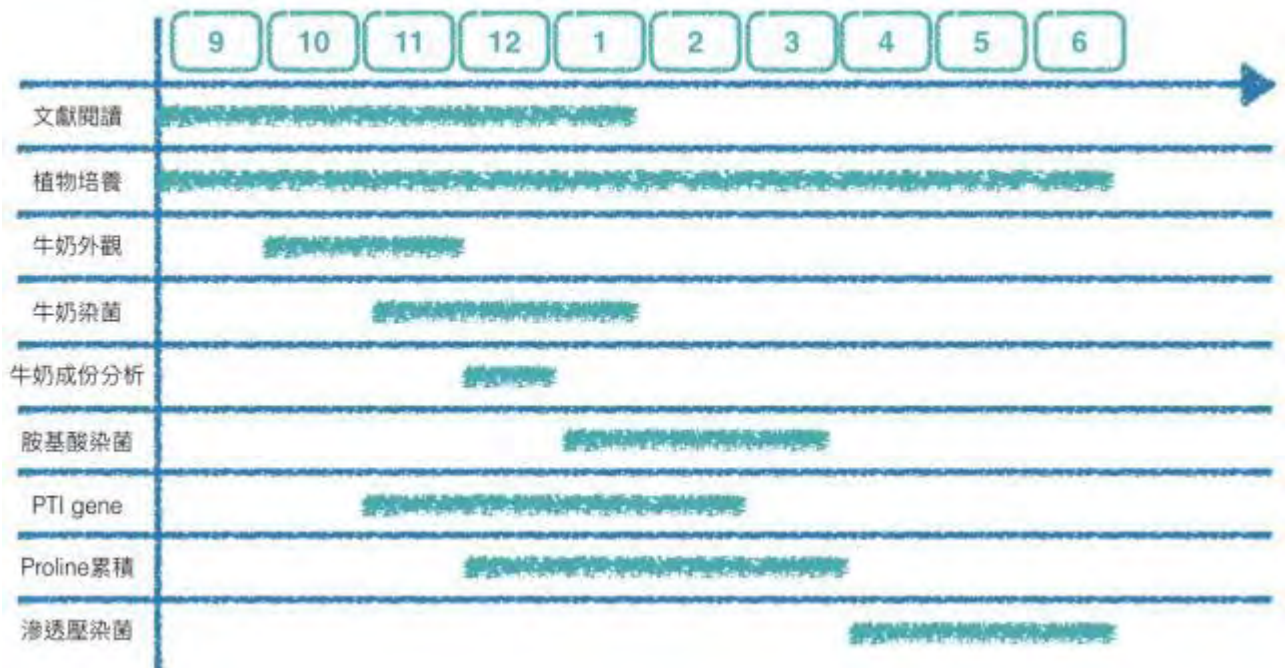
壹、研究動機

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。

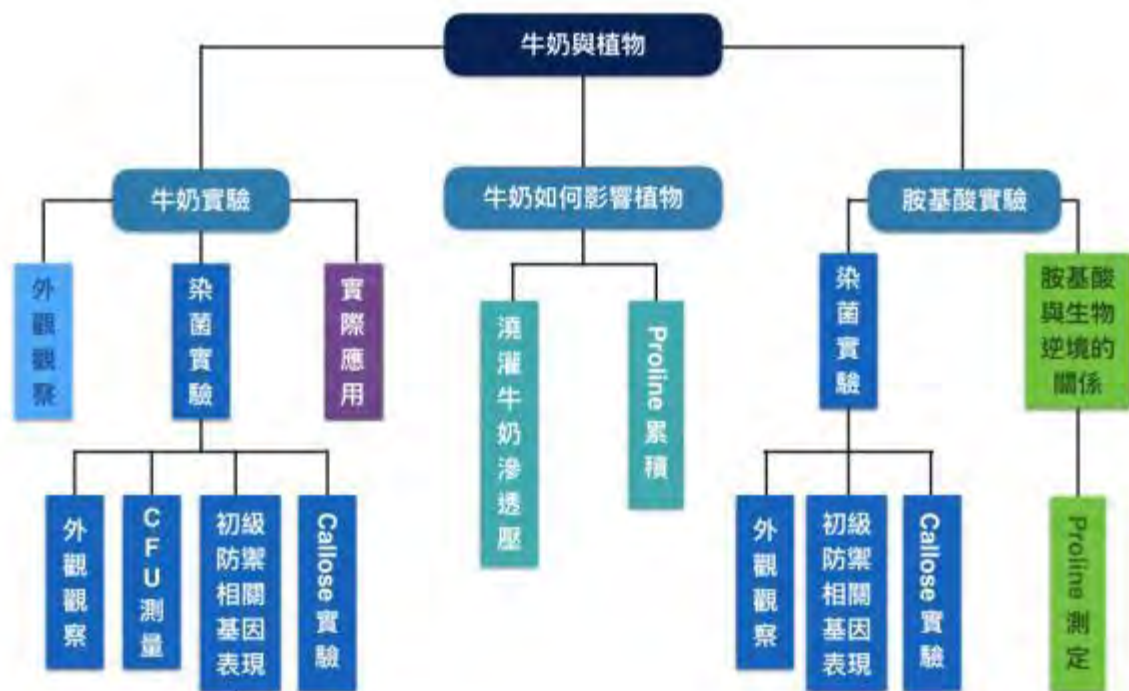
在牛奶成功協助植物抗病後，我們又對牛奶是如何幫助植物抗病的感到好奇。牛奶中最含有許多的胺基酸，我們經過實驗發現Proline較其他胺基酸更能幫助植物對抗細菌，我們推測Proline可能為牛奶協助植物抗病的關鍵之一，因此我們著手確定牛奶中是否有Proline，並設計實驗了解是否真為牛奶中的Proline在幫助植物抗病。

貳、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初級防禦反應抵抗細菌
- 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初級防禦反應抵抗細菌
- 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











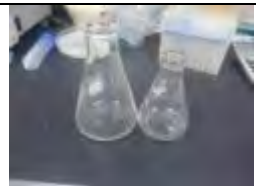

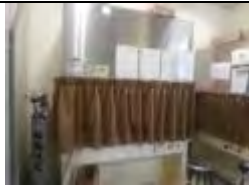









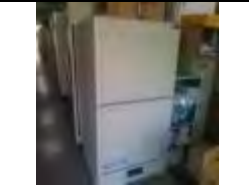













(圖一) 實驗流程圖



(圖二) 研究架構圖

參、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	攪拌籽&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
			

肆、研究過程或方法

一、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

二、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

三、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

四、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. 3.125%：加入2.5mL milk

(二) 於9天後觀察其地上部外部型態

五、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.H₂O

(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.H₂O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.H₂O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2
5. 重複步驟4 2~3次即可

六、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 2.54cm^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 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

七、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°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
6. 分鐘，丟棄濾液
7. 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
8. 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
9. 將RNA Spin Column放回收集管，加入 $600\mu\text{L}$ 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
10. 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

11. 加入30~50 μ 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、Mg²⁺、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

八、 Real-Time PCR操作過程

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

九、 測定胼胝質沉積量(Callose deposition)

- (一) 將菌液定量5 $\times 10^6$ 注射入葉片
- (二) 鑽孔並利用95%酒精褪色
- (三) 用d.d.H₂O沖洗葉片(至少三次)，以去除殘留之酒精
- (四) 利用Aniline 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，計算胼胝質堆積個數

十、 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

十一、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.H₂O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

十二、配製1/2 MS medium(400 mL)

- (一) 準備一廣口量杯(2L)，加入d.d.H₂O 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.H₂O 至400mL
- (六) 準備一500mL血清瓶，加入以上溶液，秤量4g (1%) Phytagel 加進溶液中，蓋上瓶

蓋貼滅菌膠條，滅菌

十三、滅菌

利用滅菌釜，將之設定為121°C、20分鐘

十四、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

十五、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.H₂O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.H₂O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

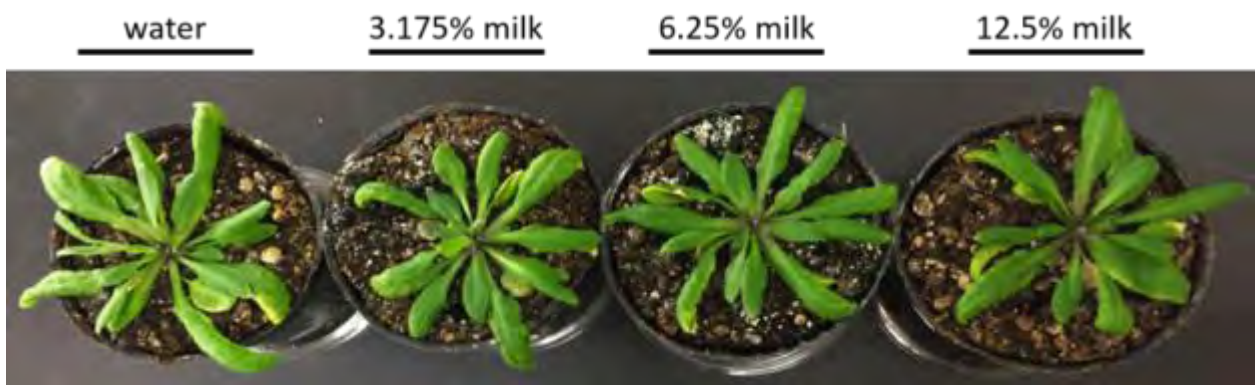
十六、測量牛奶滲透壓

- (一) 將滲透膜泡在 d.d.H₂O 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.H₂O 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

十七、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.H₂O、甘露醇、牛奶
- (三) 兩日後染菌

伍、研究結果



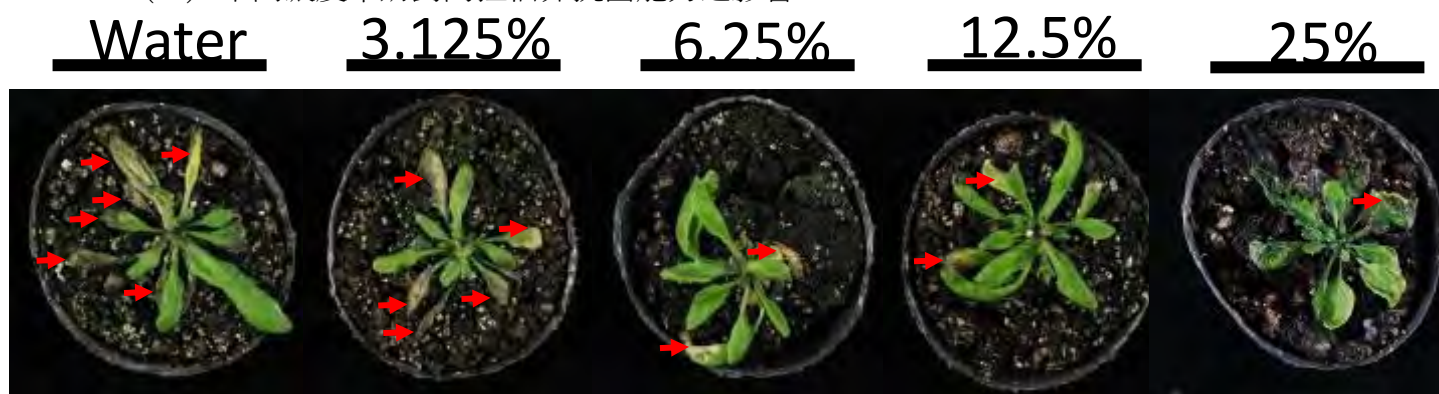
一、探討牛奶對阿拉伯芥植株形態的影響

(圖三)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

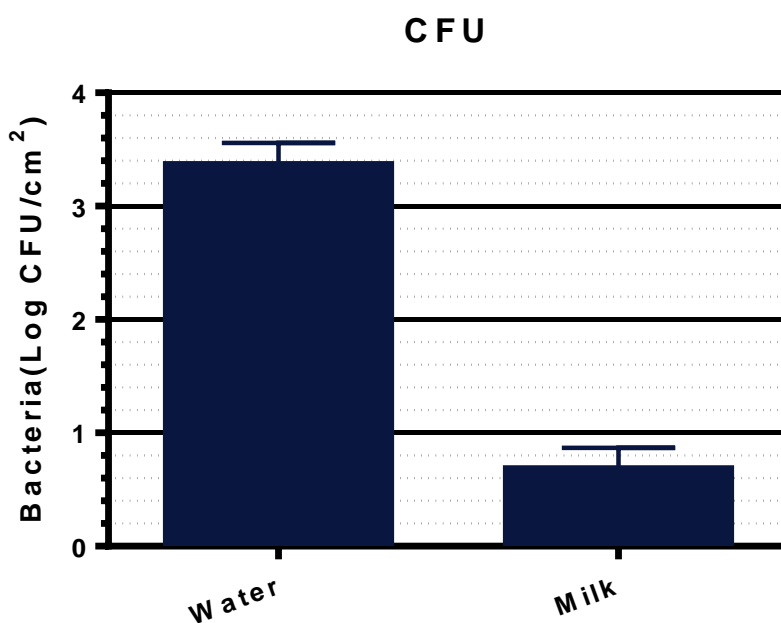
(一) 不同濃度牛奶對阿拉伯芥抗菌能力之影響



(圖四) 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控制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。

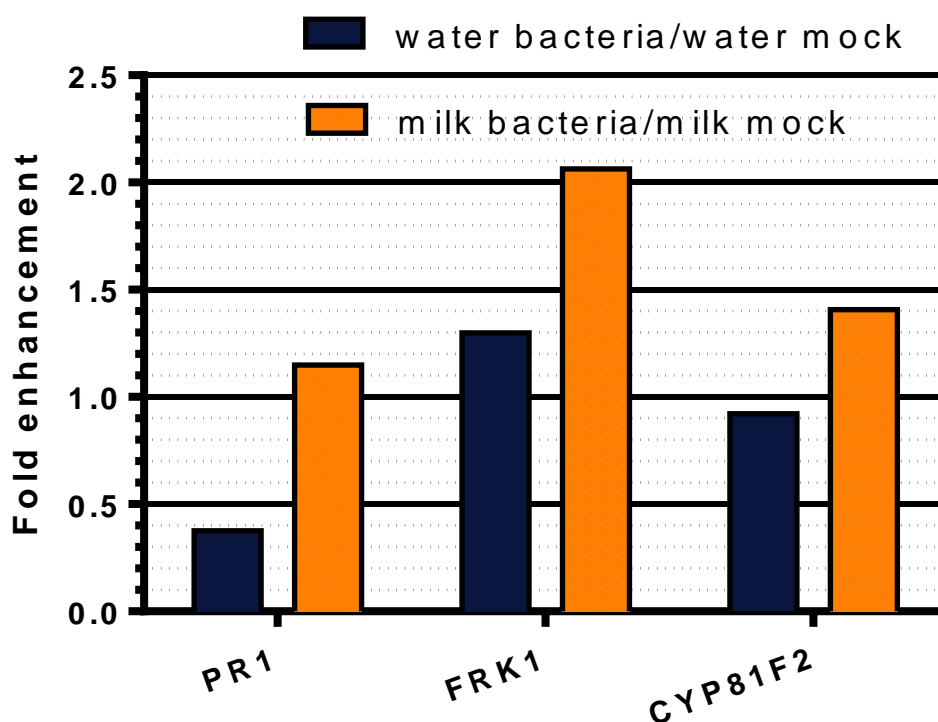
(二) 預先處理牛奶植物體之染菌後 CFU 差異



(圖五) 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。

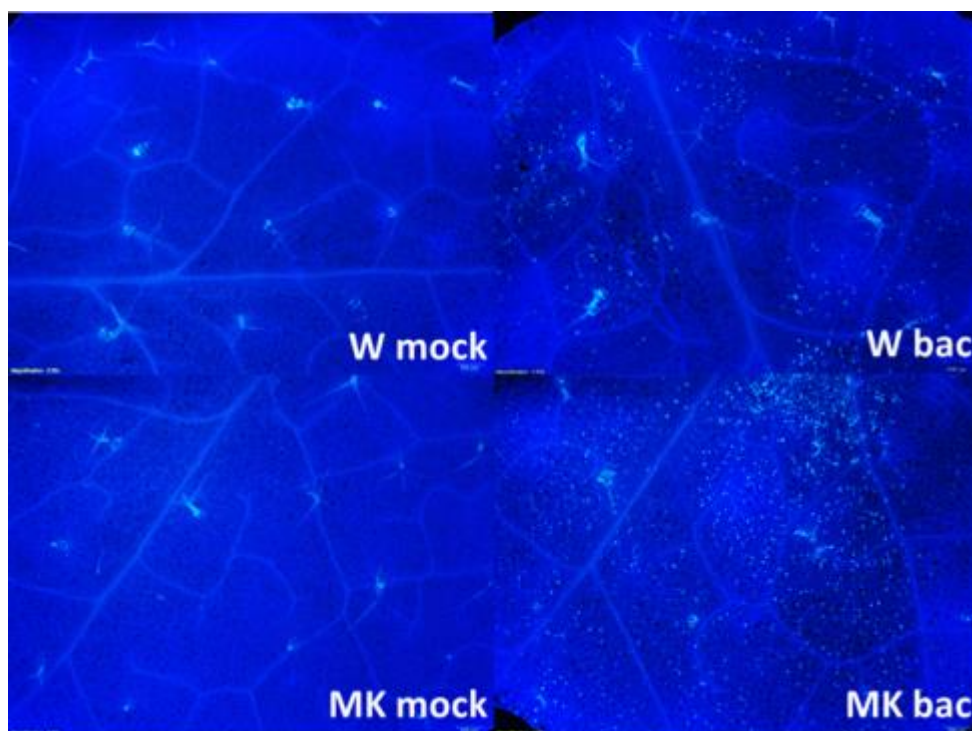
三、藉由植物初級防禦相關基因表現實驗確定牛奶是否藉由增強初級防禦反應抵抗細菌



(圖六) 澆灌牛奶之阿拉伯芥染菌後基因表現差異

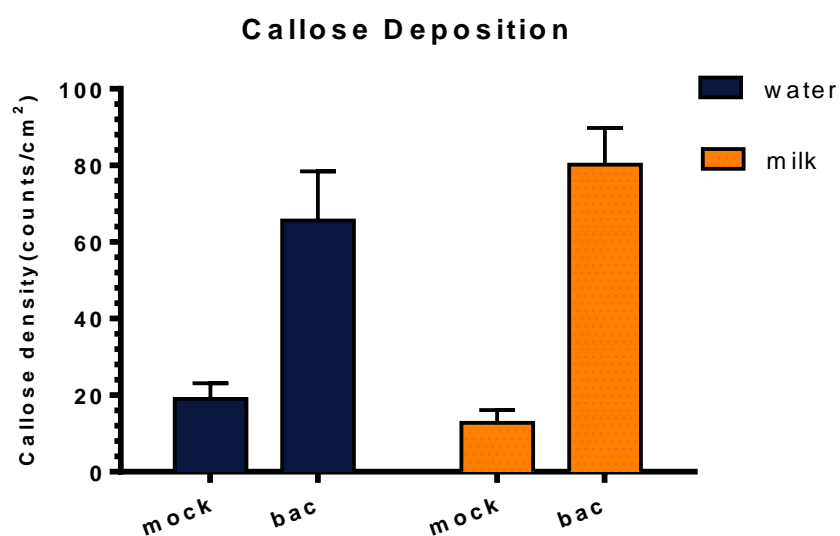
確定牛奶可以幫助阿拉伯芥抗菌後，我們猜測牛奶能夠增強阿拉伯芥的防禦反應；而植物的防禦有主動與被動兩種，植物可以藉由產生 PR 蛋白主動攻擊細菌，或是累積 callose 堵塞原生質絲，callose (胼氈質) 能夠在植物受到細菌等帶有抗原的外來物刺激時，迅速堆積，堵塞原生質絲孔道，使細菌不再繼續擴散、達到抵抗細菌的效果。這兩種反應都是初級防禦反應 (PTI) 的一部分，我們便尋找三個初級防禦相關基因，量測這些基因在感染後的表現量是否受到牛奶影響。

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。由上圖六可以得知，未澆灌牛奶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三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。



四、 檢驗牛奶是否使植物累積更多 callose 以抗病

(圖七) 使用螢光顯微鏡拍攝的影像



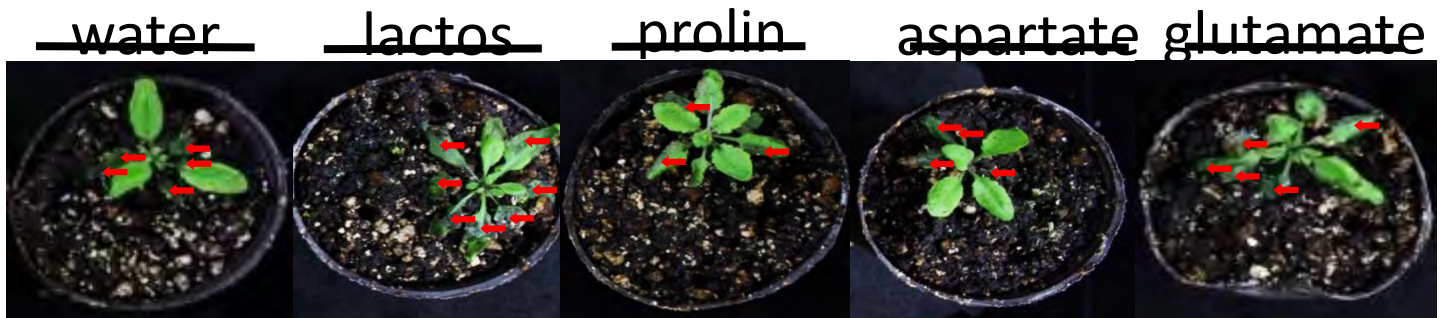
(圖八) 預先處理牛奶之植物染菌後callose deposition差異

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。

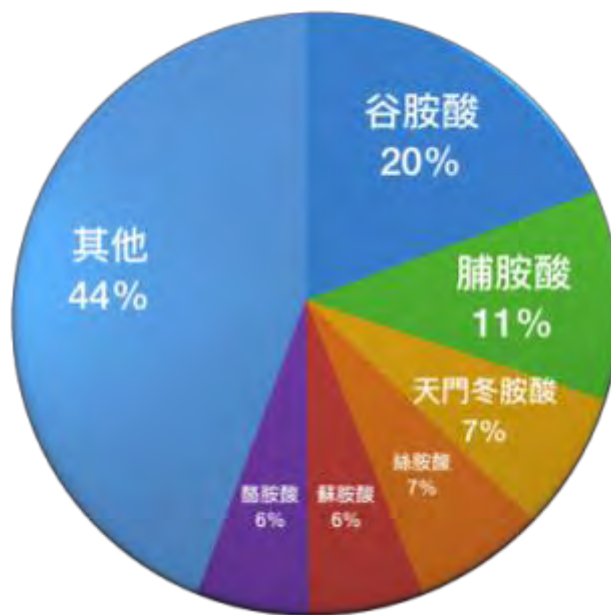
由圖七、八可知，不論是控制組還是澆灌牛奶的實驗組，在感菌後callose沉積量均會明顯增加，但牛奶澆灌組在感菌後callose沉積量約為染菌前的五倍，而控制組只有原先的三到

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。

五、探討外加胺基酸對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響



(圖九) 胺基酸處理染菌後結果

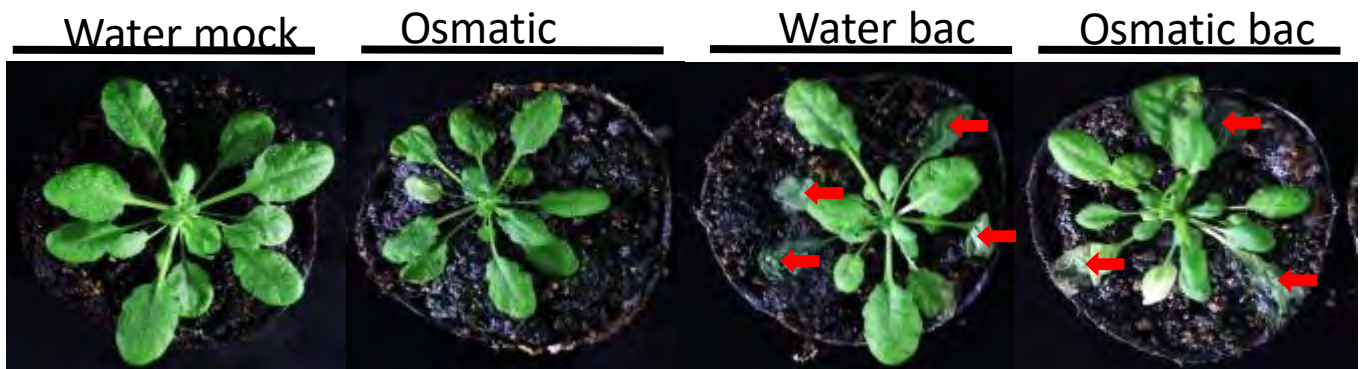


(圖十) 不同胺基酸在牛奶中的含量比例

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。

六、探討滲透壓逆境對阿拉伯芥植株抗菌能力的影響

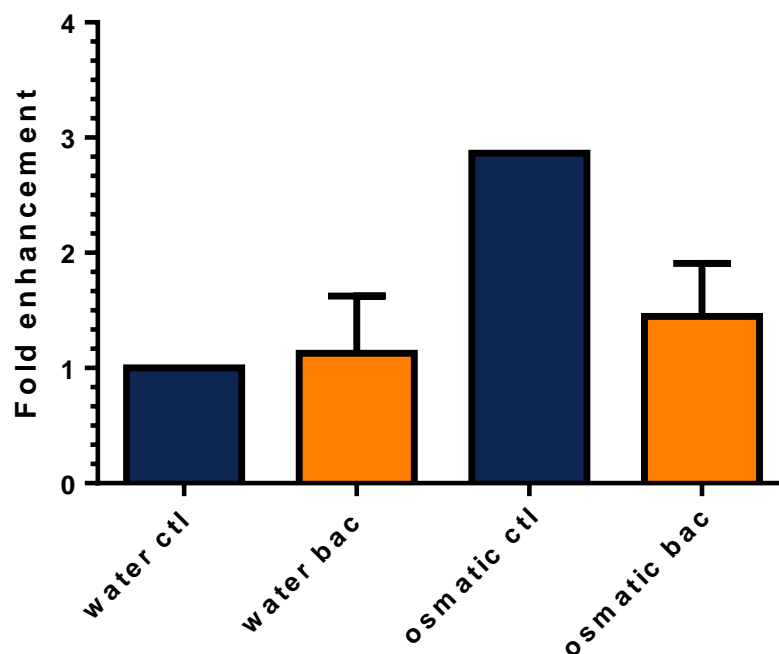
甲、滲透壓對阿拉伯芥抗菌能力影響



(圖十一)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。

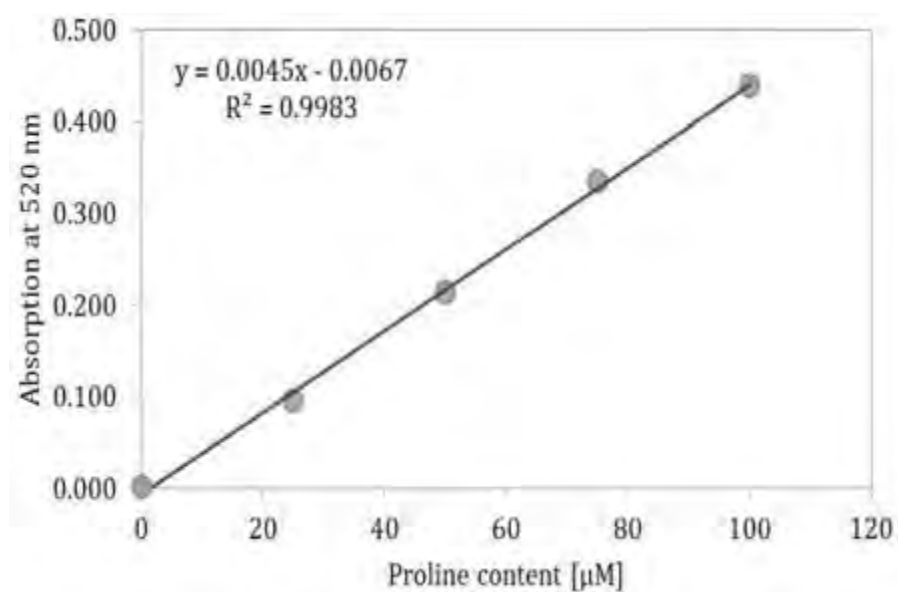
滲透壓處理後植物體內proline累積量



(圖十二)處理滲透壓感菌後植物地上部內proline含量

由圖十二可以得知，經過滲透壓處理後的植株體內proline含量皆上升，而控制組和滲透壓組的proline含量差異不大。

七、 探討牛奶是否含有與植物抗菌能力有關的物質

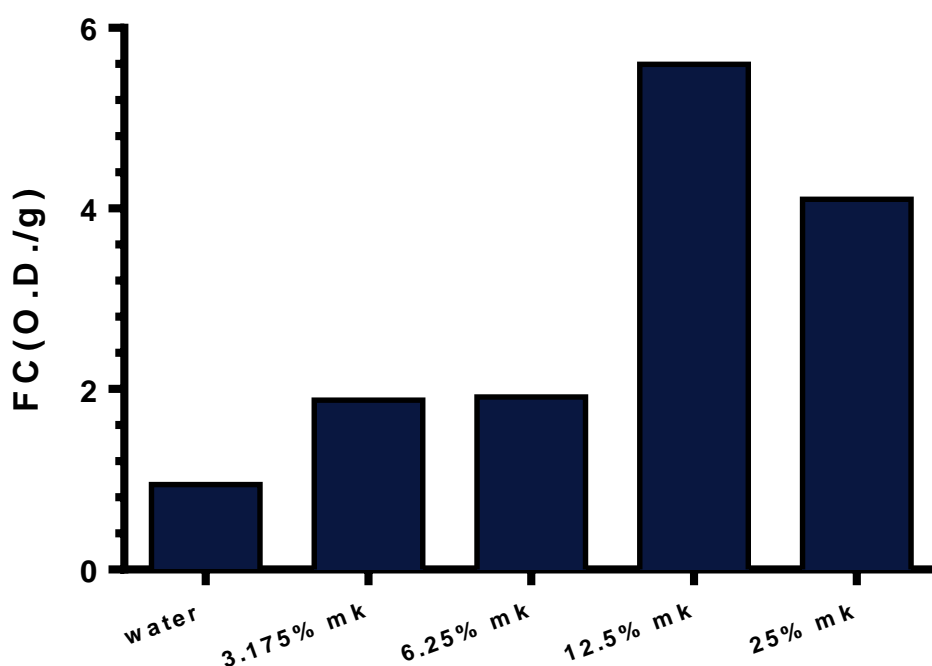


(一) 檢測牛奶中是否含有Proline

(圖十三) Proline檢量線 (圖片來源：www.bio-protocol.org/e1749)

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119.72μM。

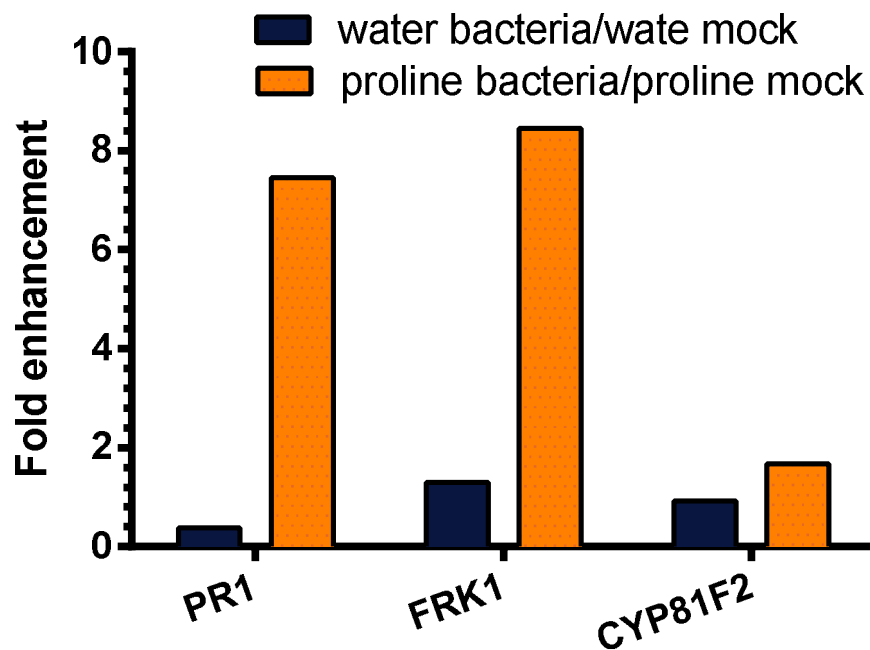
(二) 澆灌牛奶的植物體內是否有Proline累積



(圖十四) 阿拉伯芥澆灌不同濃度牛奶的Proline累積量

由圖十四可見，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。

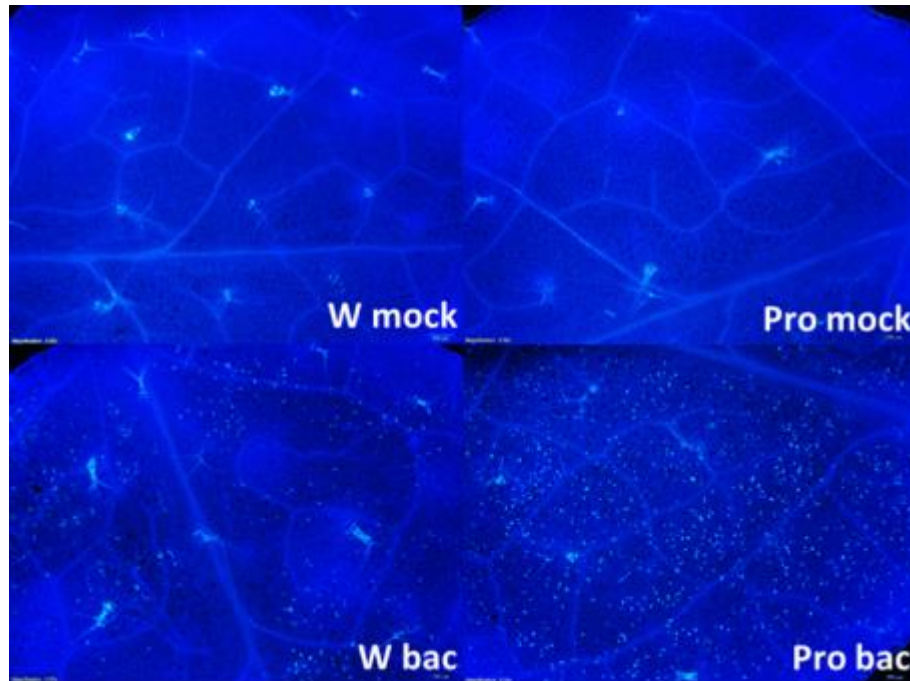
八、藉由植物初級防禦相關基因表現實驗確定胺基酸是否藉由增強初級防禦反應抵抗細菌



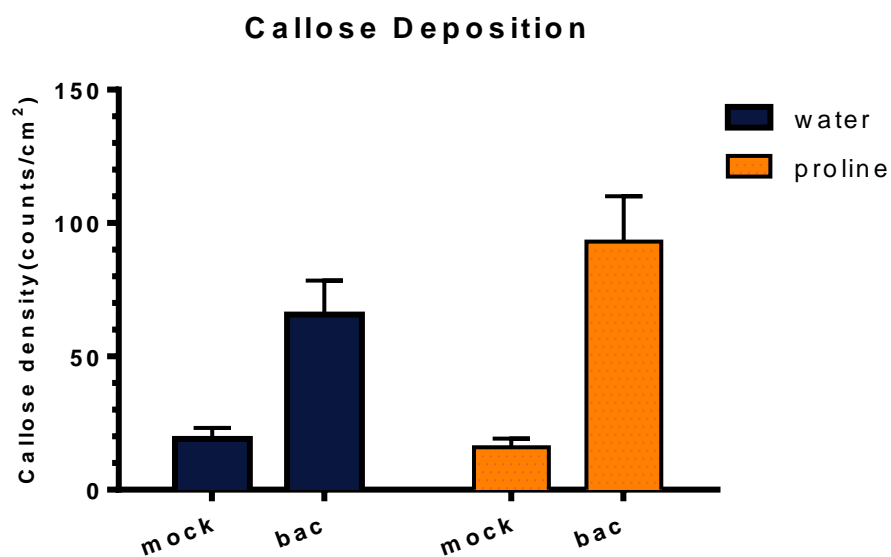
(圖十五)澆灌Proline之阿拉伯芥染菌後之基因表現差異

見到Proline也能夠協助阿拉伯芥抗菌後，我們想了解Proline是否也像牛奶一樣可以增強植物主動和被動的防禦，我們再次對PR1、FRK1、CYP81F2這三種基因進行表現量的測定。由圖十二可知，未澆灌Proline的植物在感染後PR1及CYP81F2的表現量皆下降，但PR1上升；而澆灌了Proline的阿拉伯芥三種基因的表現量皆有明顯上升。

九、 檢驗胺基酸是否使植物累積更多callose以抗病



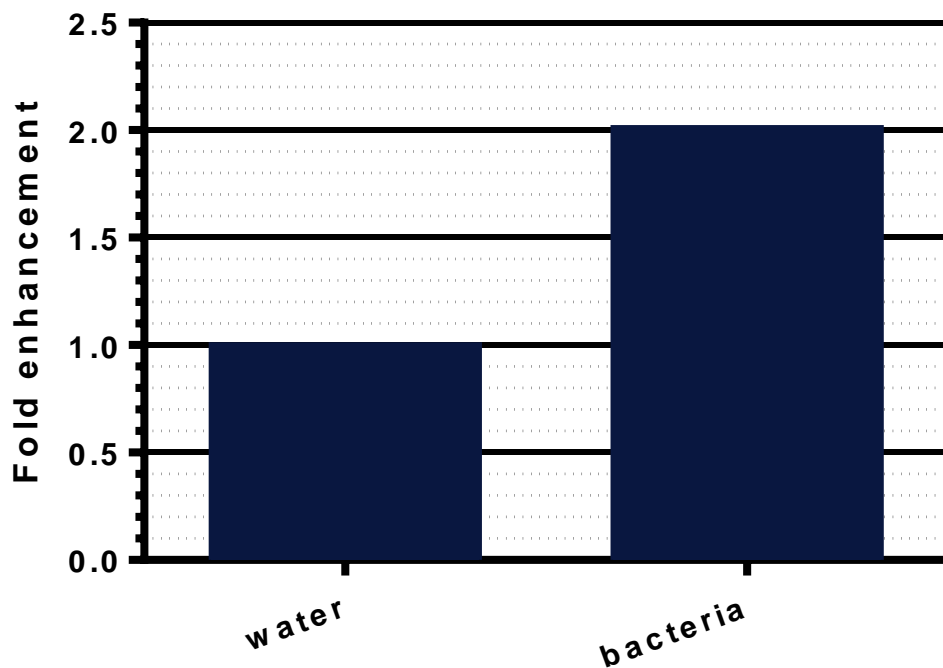
(圖十六) 使用螢光顯微鏡拍攝的影像



(圖十七) 胺基酸處理染菌後callose deposition差異

為了確定Proline澆灌的植物是否真的有累積callose，我們測量了Proline澆灌後植物在感染後的callose沈積情形。由圖十三、十四可知，在感染後，控制組與Proline組的callose沉積量皆較原先升高，但控制組的callose量為感染前的三倍，而Proline組為感染前的六倍，很明顯較控制組多出許多，證明澆灌Proline的植物能夠在感染後產生更多callose沈積抵抗細菌的侵擾。

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

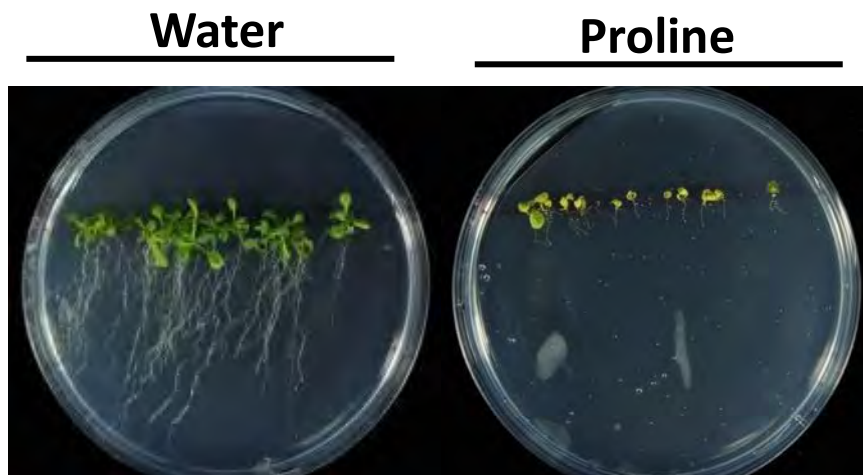


(圖十八)未預先做任何處理植株染菌後地上部Proline含量差異

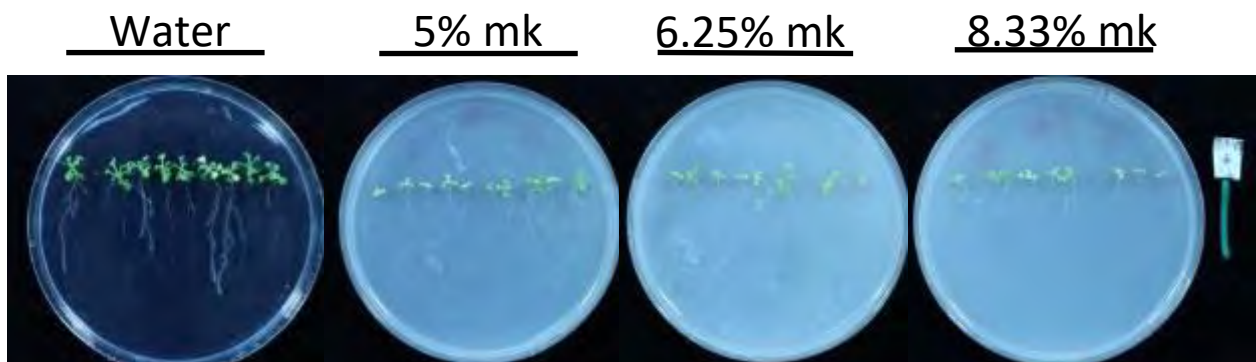
我們在先前的實驗都以外加胺基酸的方式協助植物抗病，若是沒有外加胺基酸植物會自行合成Proline嗎？於是我們直接以細菌感染未經處理的植物，並測量其Proline含量。由圖十可見，未經處理植物染菌後內部單位鮮重所含之Proline上升為原先的兩倍。

陸、討論

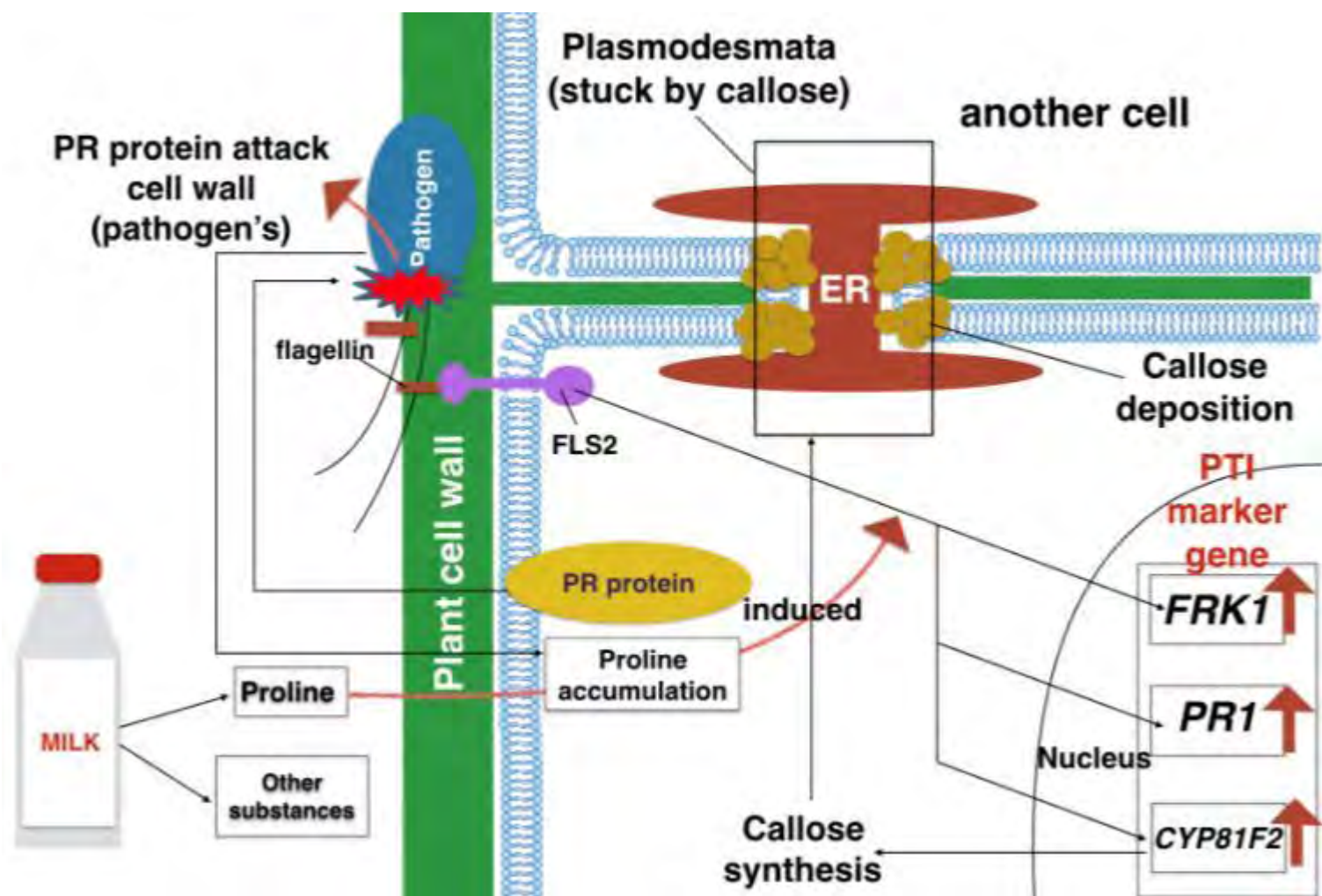
- 一、在結果六（二）中，在牛奶濃度小於等於 12.5%時，植物體內 Proline 濃度皆隨牛奶濃度上升而增加，但 25%牛奶濃度處理的植物中所含的 Proline 較 12.5%濃度處理的植物少，我們推測這是因為滲透壓的關係，植物對 Proline 的吸收或合成可能因為外界滲透壓的改變也有所改變。
- 二、結果七中，未經任何處理直接染菌的植物地上部的 Proline 含量較未染菌者多，可以推測 Proline 可能涉及植物體內抵抗細菌的機制，也因此植物在受到細菌感染後會自行合成 Proline 以對抗細菌，也證明了 Proline 與植物對生物逆境的抵抗有相當關聯性存在。
- 三、此外，我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，進而達到抗菌的效果。



（圖十九）胺基酸處理14天結果



（圖二十）不同濃度牛奶處理14天結果



柒、結論

(圖二十一) 機制圖

透過實驗，我們發現澆灌牛奶的植物在感染後出現病徵的葉子較少且體內含菌量較低，證明牛奶可以協助植物對抗細菌侵擾。在基因表現實驗後我們由 *PR1*、*FRK1*、*CYP81F2* 三基因明顯提升的表現量可以推知，牛奶可以增強阿拉伯芥的防禦反應，但我們仍進行了 callose 沈積實驗以確定 callose 是否真的隨著 *CYP81F2* 表現量的增加而累積更多。

對於這樣的抗菌效果，我們懷疑這是牛奶中的胺基酸所造成的，因此我們選擇了 Proline, Threonine 兩種胺基酸澆灌植物，再進行感染實驗，我們發現 Proline 能夠明顯提升植物抗病能力。因此我們著手確定牛奶中是否含有 Proline，以及澆灌牛奶的植物體內 Proline 含量是否會提升；我們發現牛奶中的確含有 Proline，而植物體內 Proline 含量也會因為澆灌牛奶而提升。

那 Proline 是否也像牛奶一樣，可以提昇 *PR1*、*FRK1*、*CYP81F2* 三中基因的表現量呢？我們測量了澆灌 Proline 之植物染菌後的基因表現量，發現三種基因表現量皆有明顯提升，代表

Proline也可以像牛奶一樣地幫助阿拉伯芥產生更強的防禦反應。另外，我們要再次地確定澆灌Proline的植物在感菌後的callose沉積量是否真的提升，因此我們再次進行了callose沉積實驗，也確定澆灌Proline的植物在感染後有較多callose累積。因此我們得到結論：由於牛奶中含有Proline，故澆灌牛奶可以使植物再受感染時產生更強的防禦反應，累積更多callose，進而提升植物抗菌能力。

先前的實驗都是我們外加Proline於植物，若是我們不外加Proline，植物在面對細菌侵擾時是否仍能自行合成、累積Proline以對抗細菌？經過實驗，我們發現沒有外加任何物質的植物在感染後也會累積自身Proline含量。由此我們得知Proline與生物逆境確實存在相當關聯。

捌、參考資料及其他

- 一、 Prashant Singh, Shweta Yekondi, Po-Wen Chen, Chia-Hong Tsai, Chun-Wei Yu, Keqiang Wu, & Laurent Zimmerli. (2014). Environmental History Modulates Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1-Dependent Manner. *The Plant Cell* 26(6), 2676-2688. doi: 10.1105/tpc.114.123356
- 二、 László Szabados, & Arnould Saviouré. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2), 89-97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- 三、 Georgina Fabro, Izabella Kovacs, Valeria Pavet, Laszlo Szabados, & Maria E. Alvarez. (2004). Proline Accumulation and AtP5CS2 Gene Activation Are Induced by Plant-Pathogen Incompatible Interactions in Arabidopsis. *MPMI* 17(4), 343-350. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.4.343

未來展望

- 一、 因為牛奶濃度越大，根抑制效果越明顯，所以需要討論滲透壓對阿拉伯芥的影響。
- 二、 我們相信植物抗菌方面研究可以應用到農業，例如在農藥或肥料中加入Proline，提升植物的抗菌能力。

【評語】 052105

1. 本研究主要目的在探討澆灌牛奶對植物生長及抗病性的影響。實驗以阿拉伯芥進為材料，發現直接以牛奶澆灌植物，對植物的生長外觀沒有影響，但是能夠提升阿拉伯芥對細菌的抵抗力，研究具創意。
2. 觀察植物病徵的結果可加強，以提高判讀的準確度。
3. 團隊成員充分瞭解研究主題之相關知識背景，表達能力佳，值得肯定。
4. 實驗記錄尚可。

作品海報

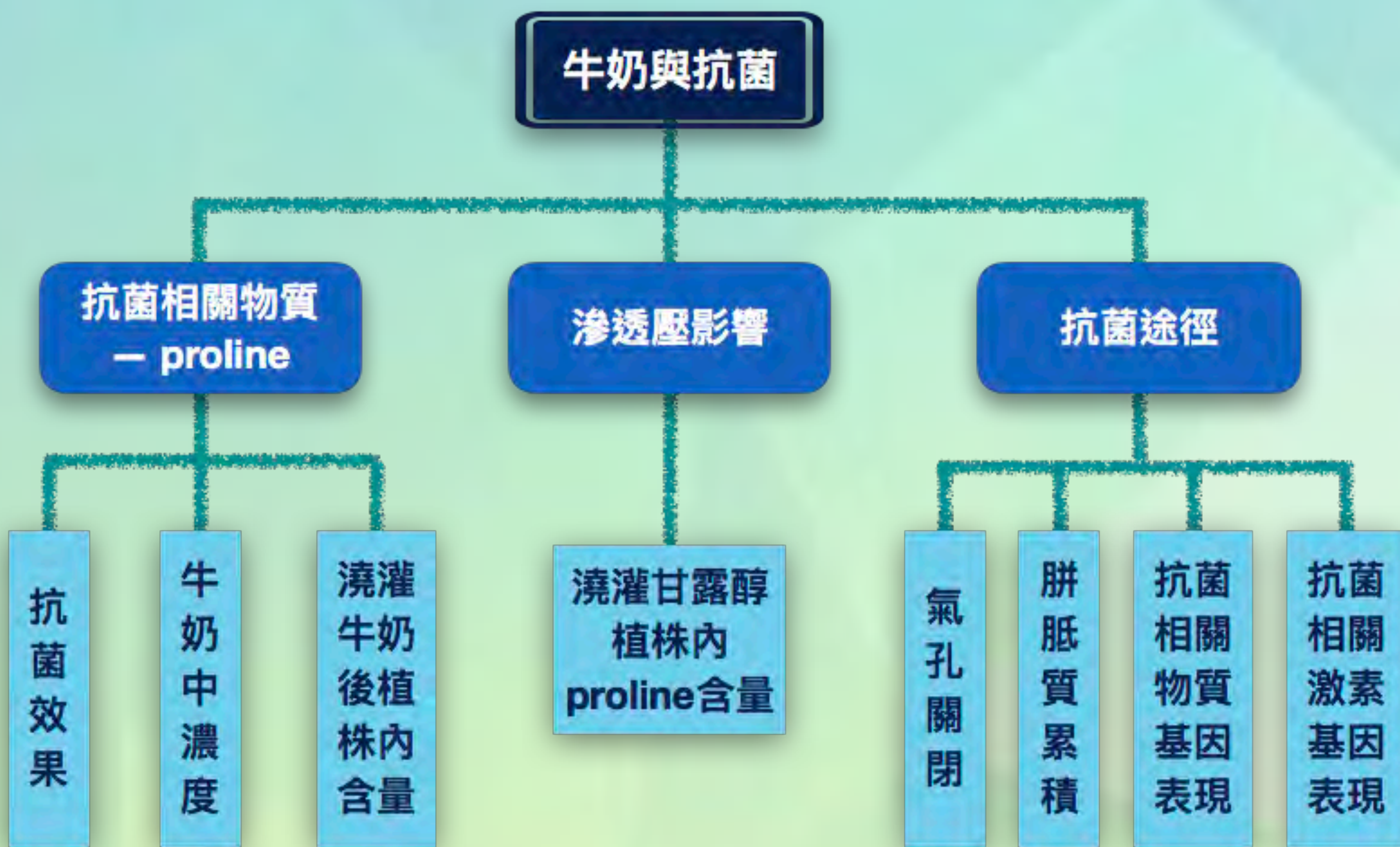
壹、摘要

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，並促進初級免疫反應(PTI)相關基因(PR1, CYP81F2, FRK1, MKK1)以及實際誘發之免疫反應(Callose)表現量上升。然而我們發現脯胺酸和牛奶亦可促進另外一條由乙烯調控的免疫途徑，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。

貳、研究動機

市面上充斥各種號稱「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影響？是讓果實變得更大更甜，或是有其他功能例如抗病呢？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的番茄植株上枯黃的葉片竟然變少了！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

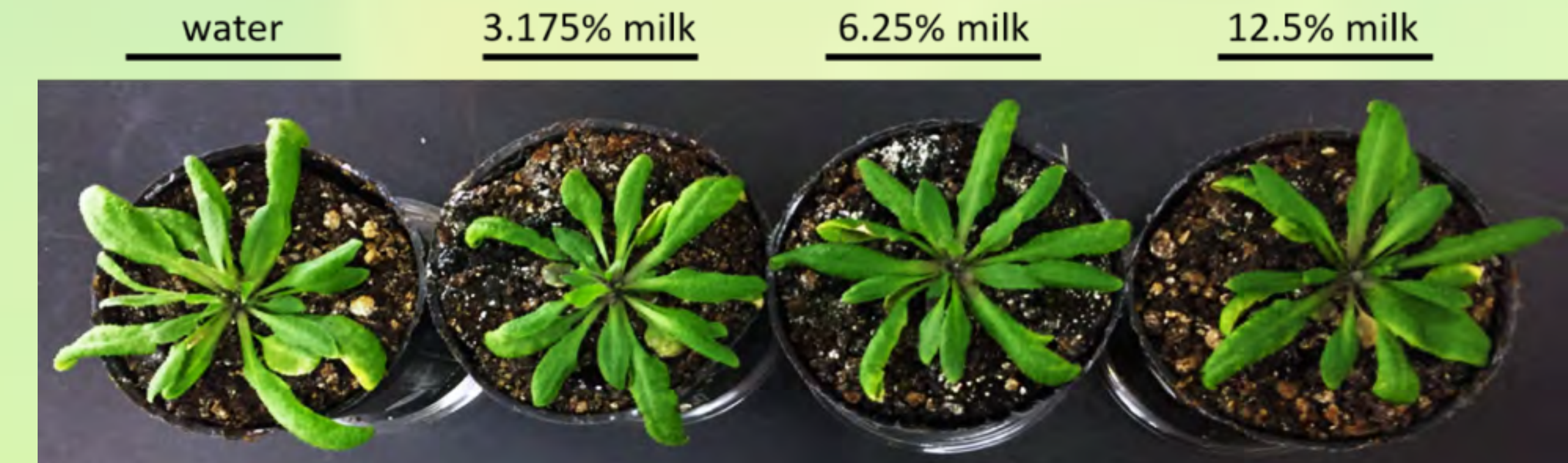
叁、研究目的與研究架構



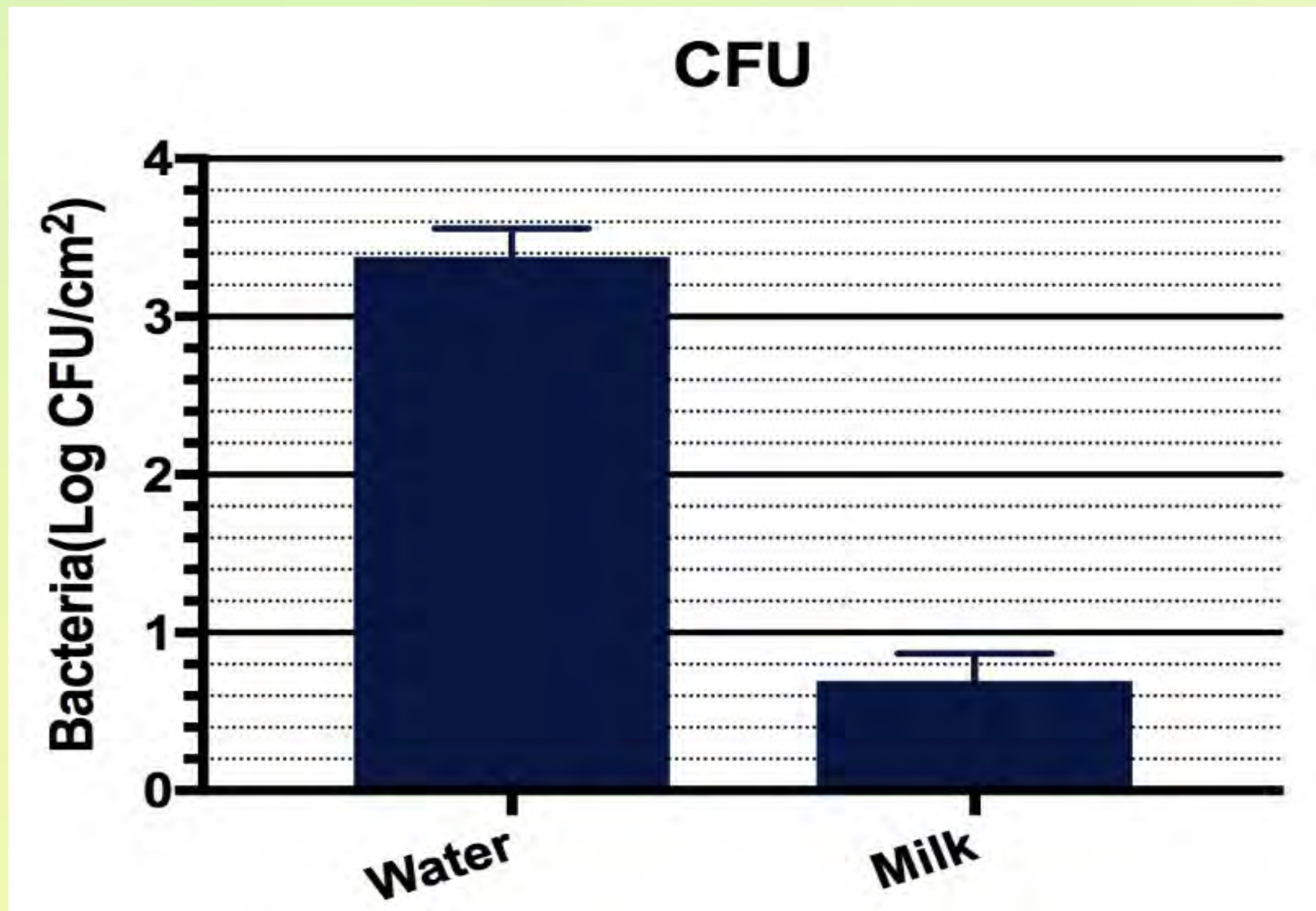
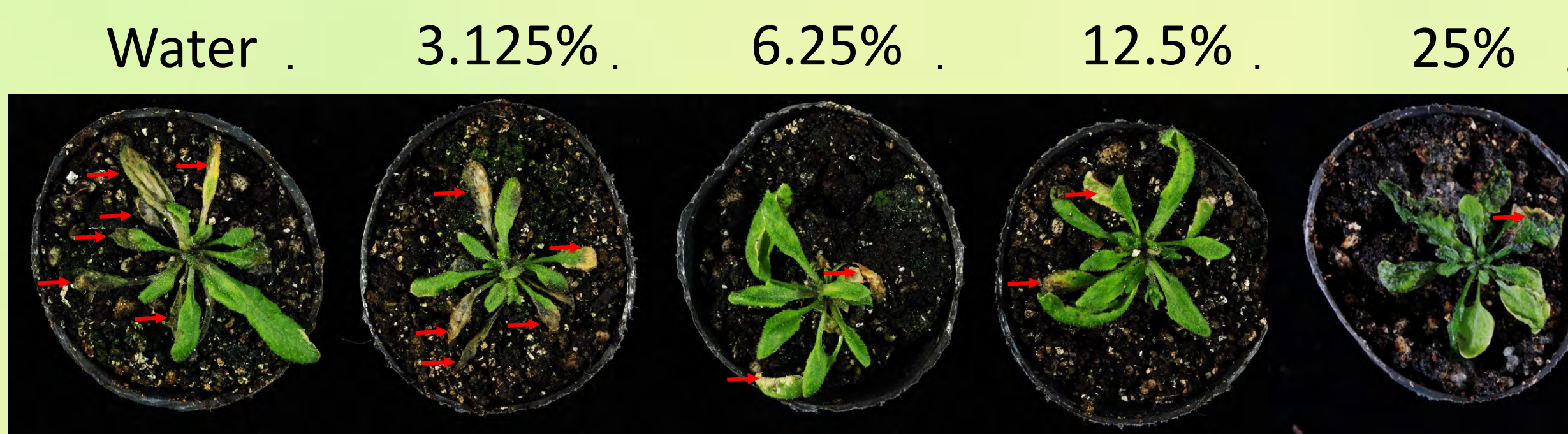
肆、研究結果

一、澆灌牛奶對阿拉伯芥植株外觀形態及抗菌能力的影響

(一)、不同濃度牛奶澆灌後外觀型態 (三)、澆灌牛奶後染菌單位面積菌落數(CFU)差異

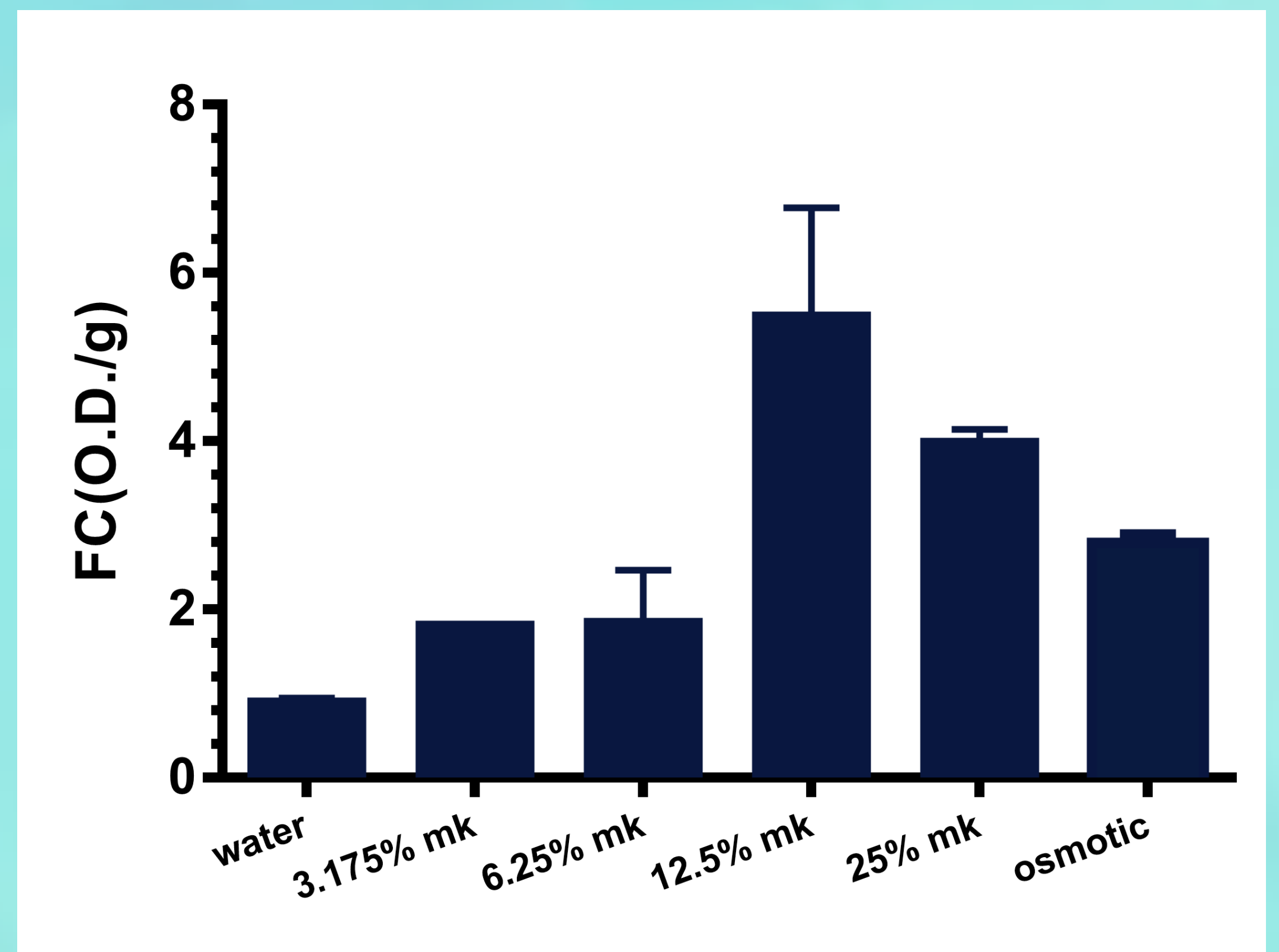
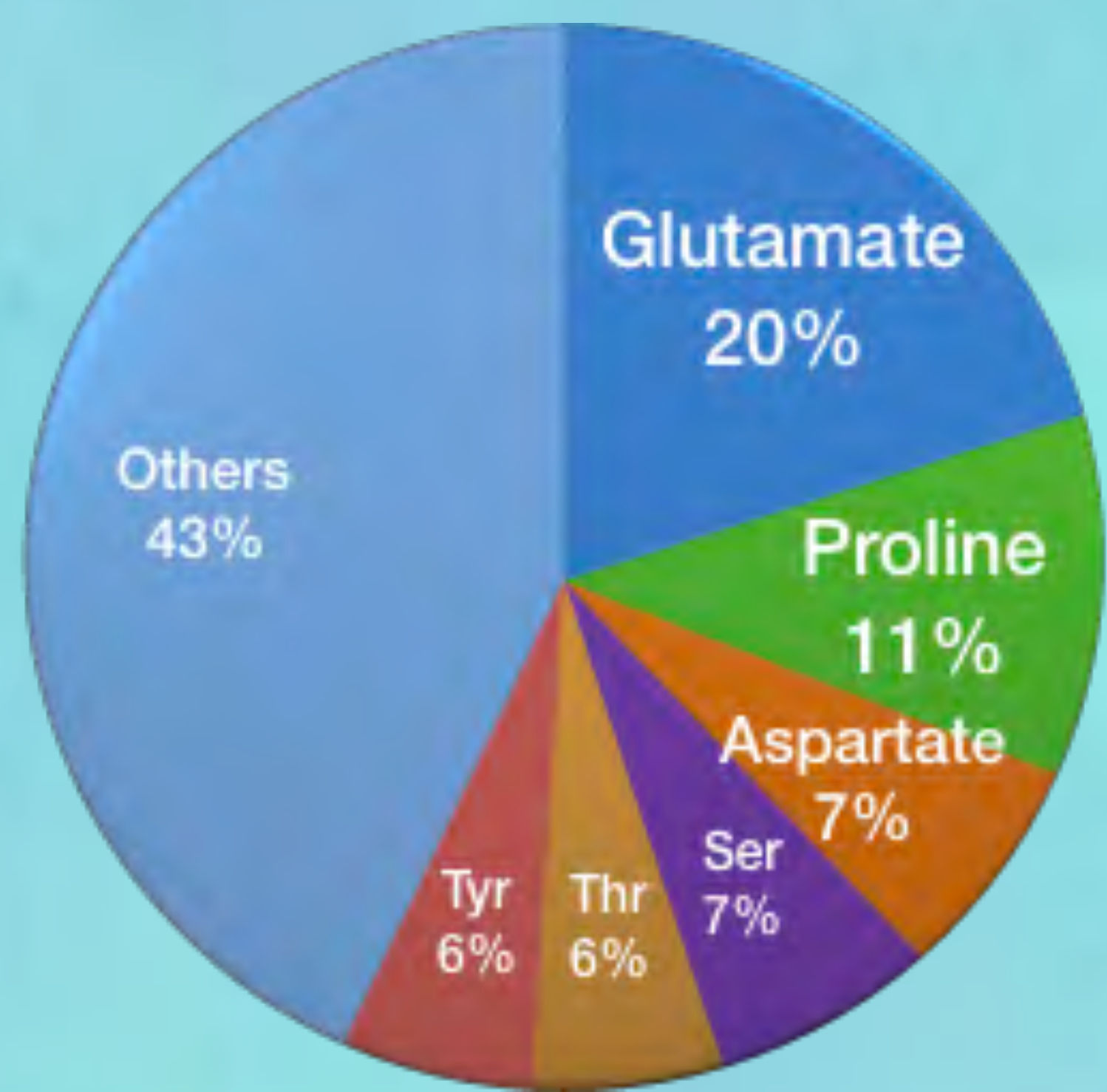


(二)、不同濃度牛奶澆灌後染菌結果



二、探討牛奶內相異物質對植物抗病能力的影響及特定物質累積量

(一)、牛奶內物質對植物抗病能力的影響 (二)、各種處理後植物體內Proline累積量

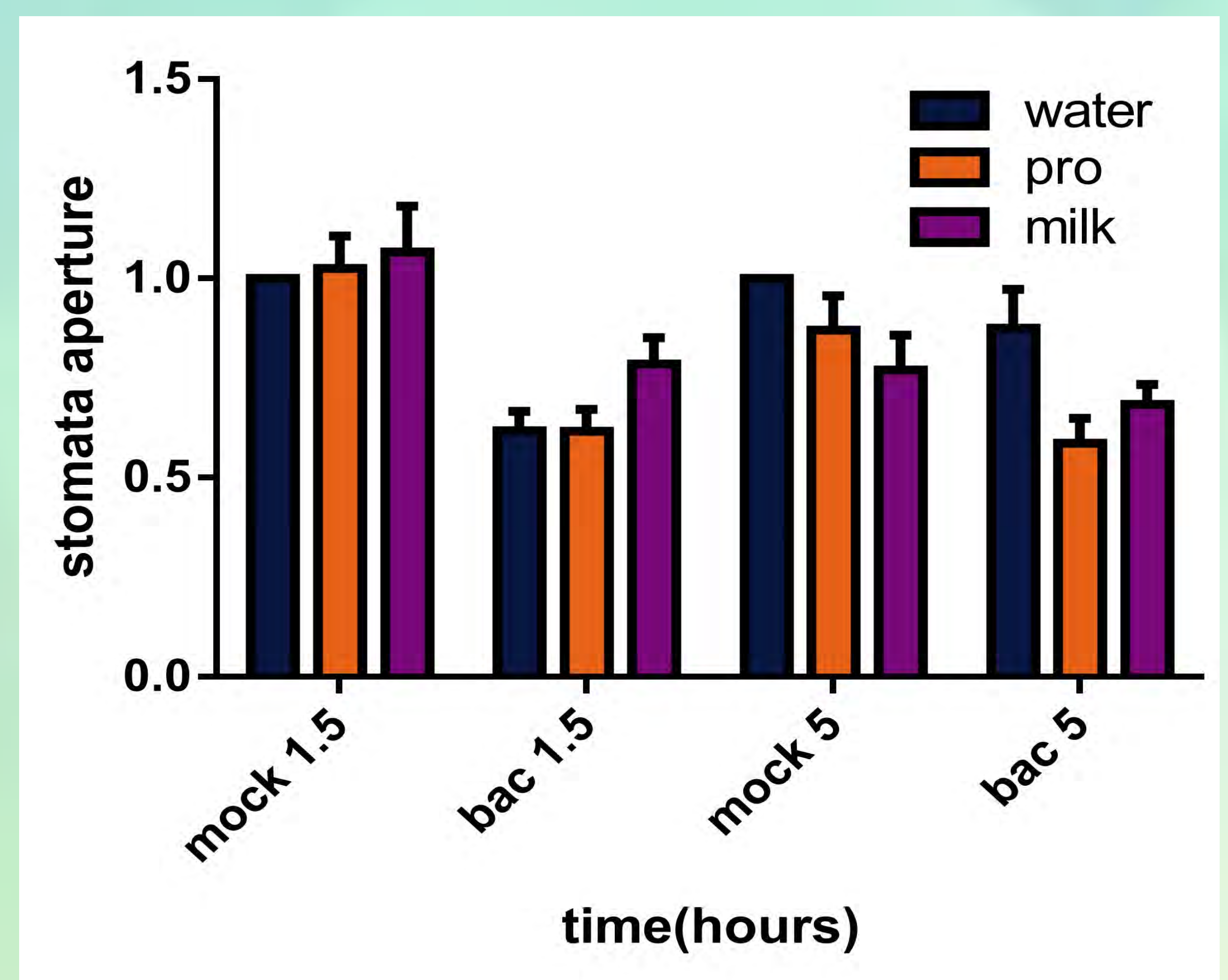


water lactose proline aspartate glutamate osmotic

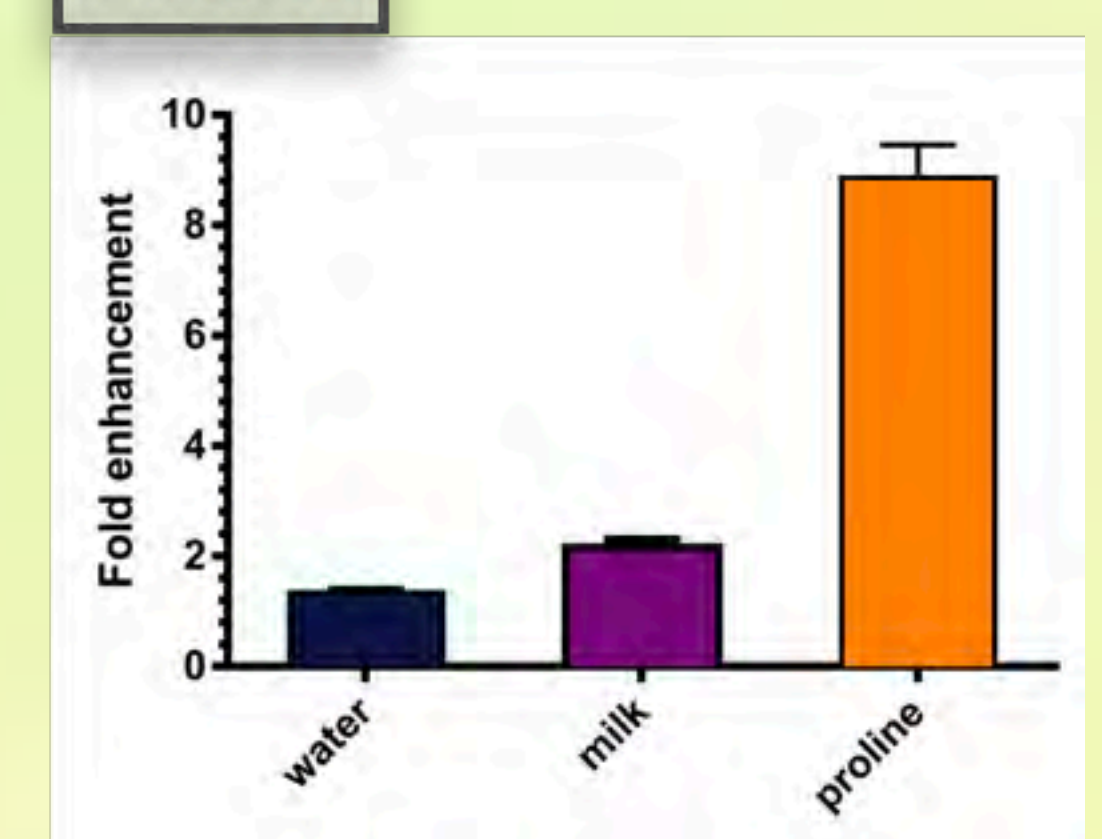
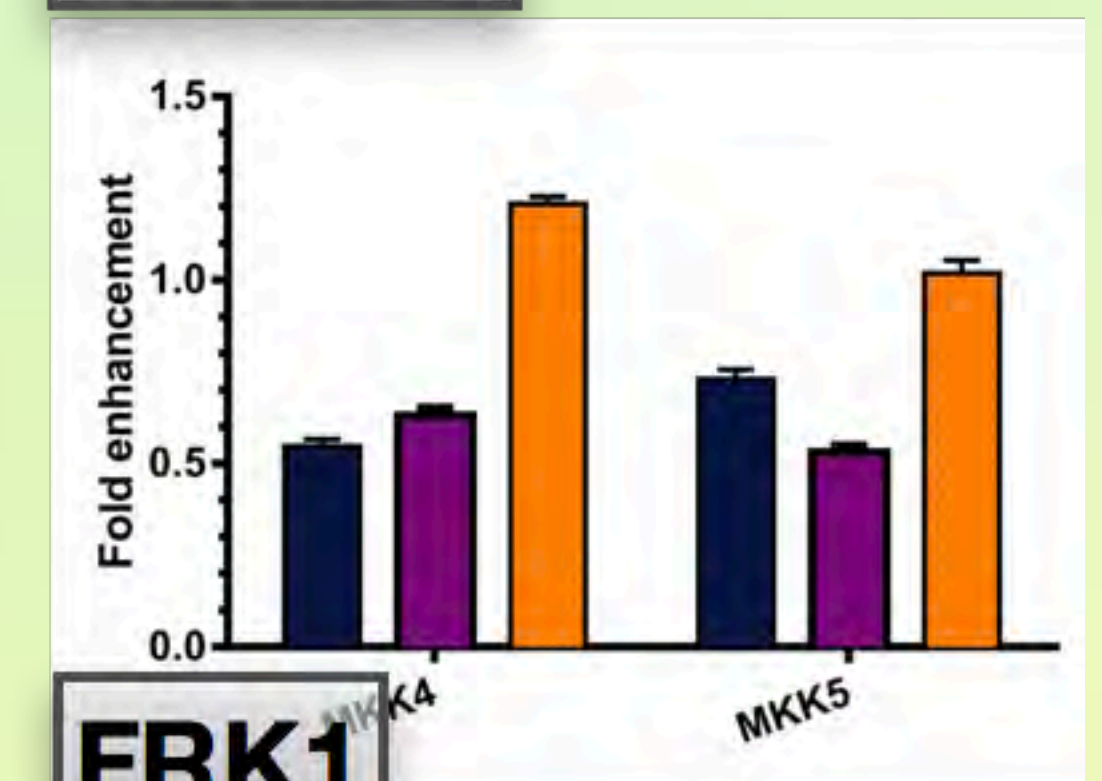
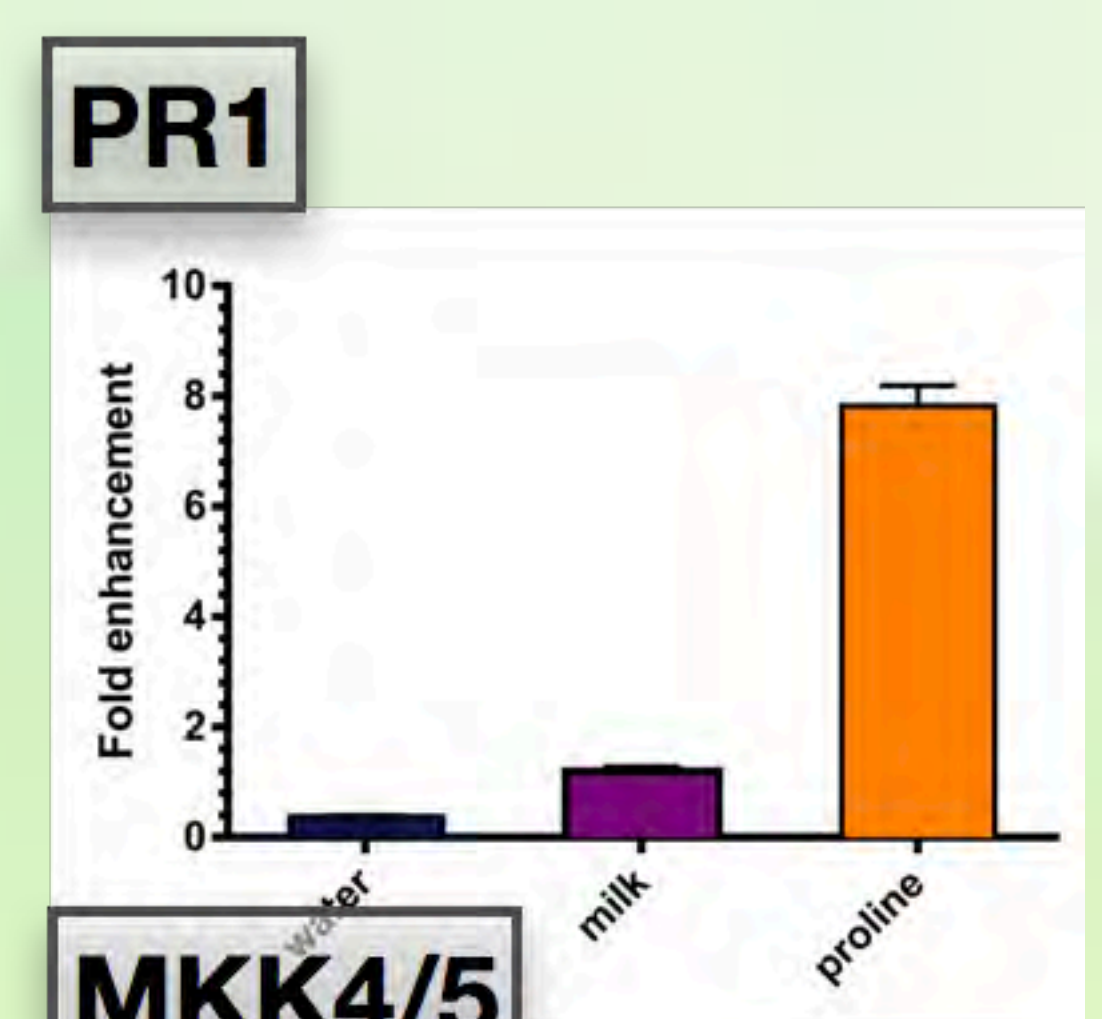
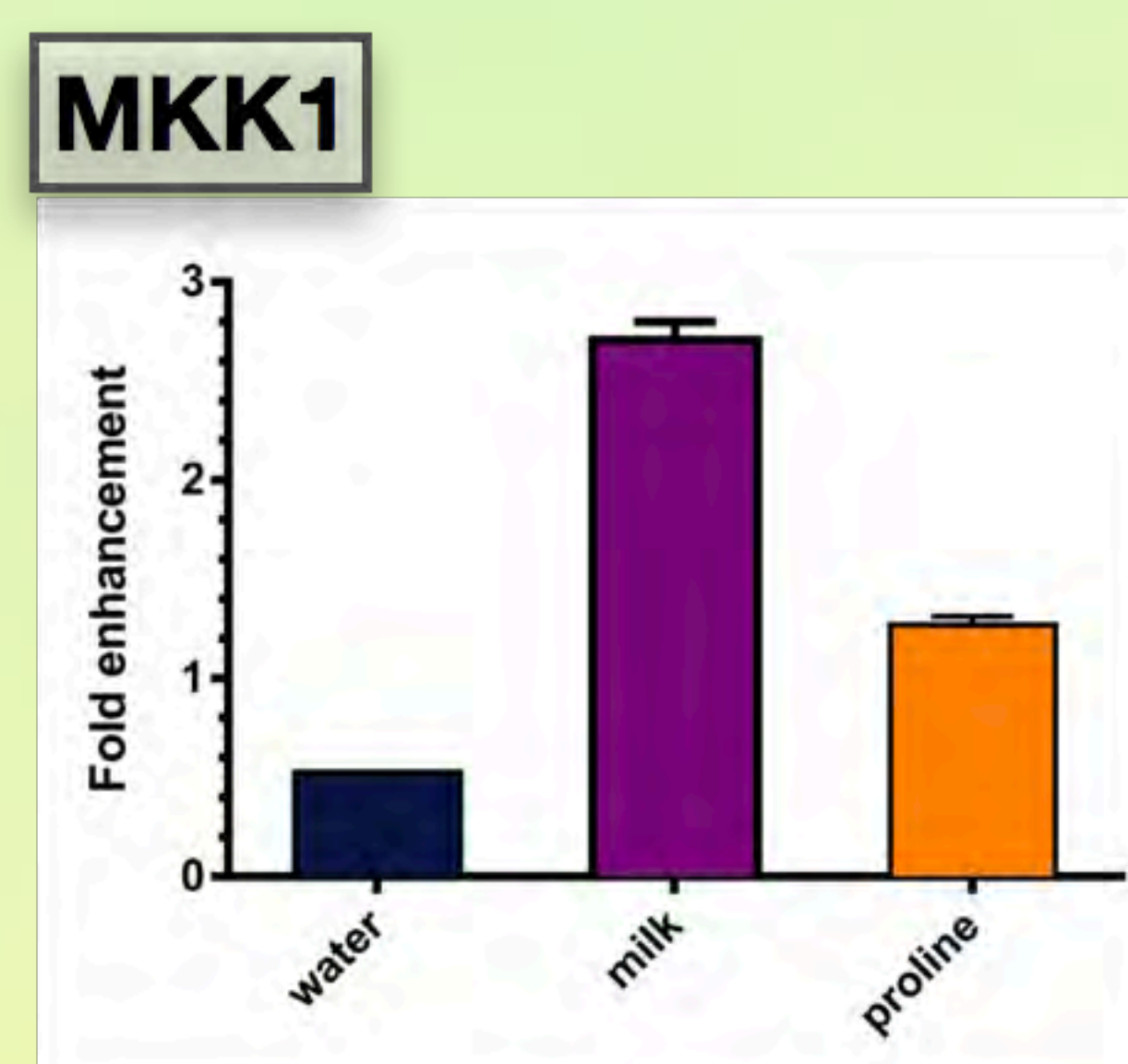
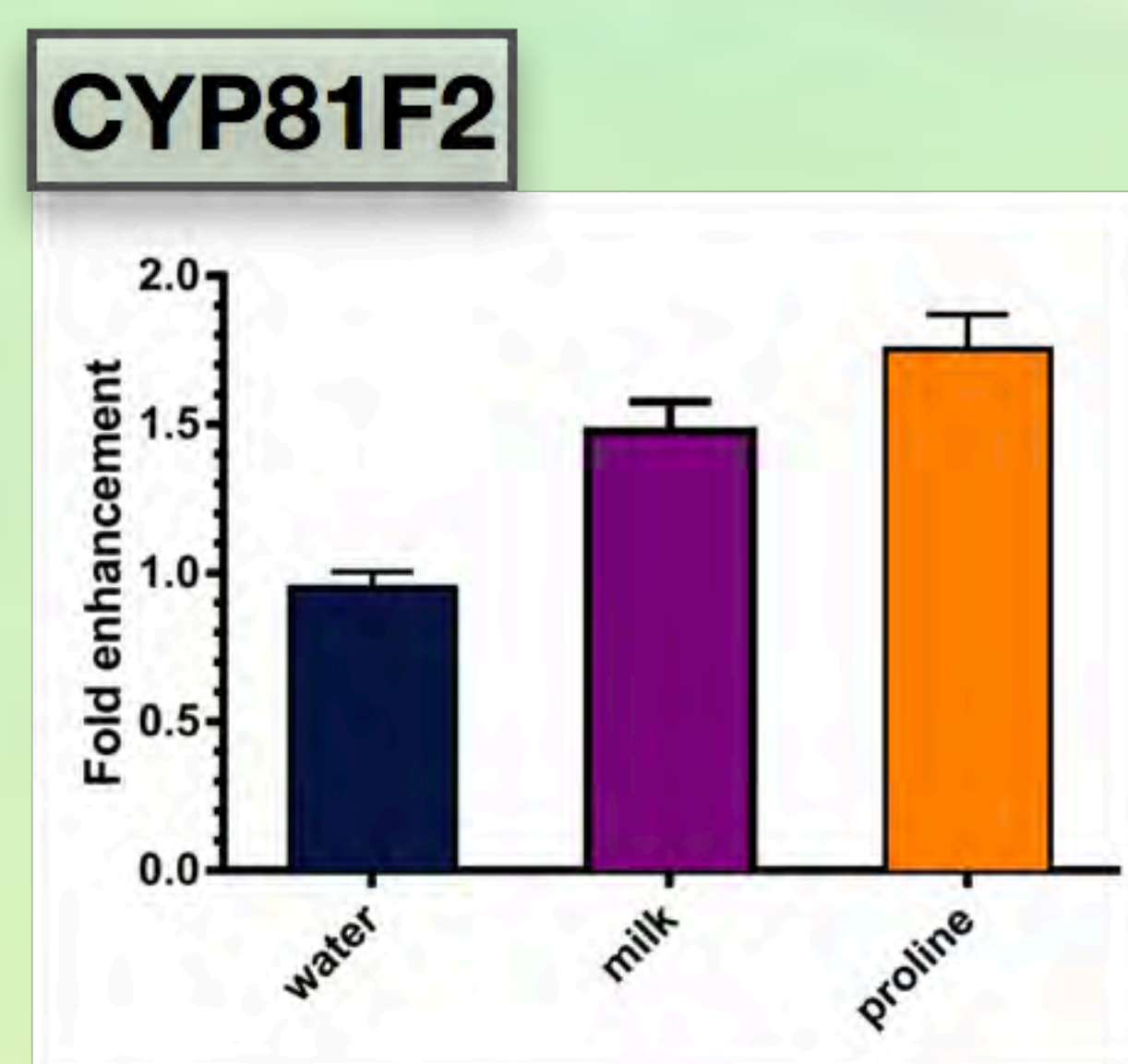
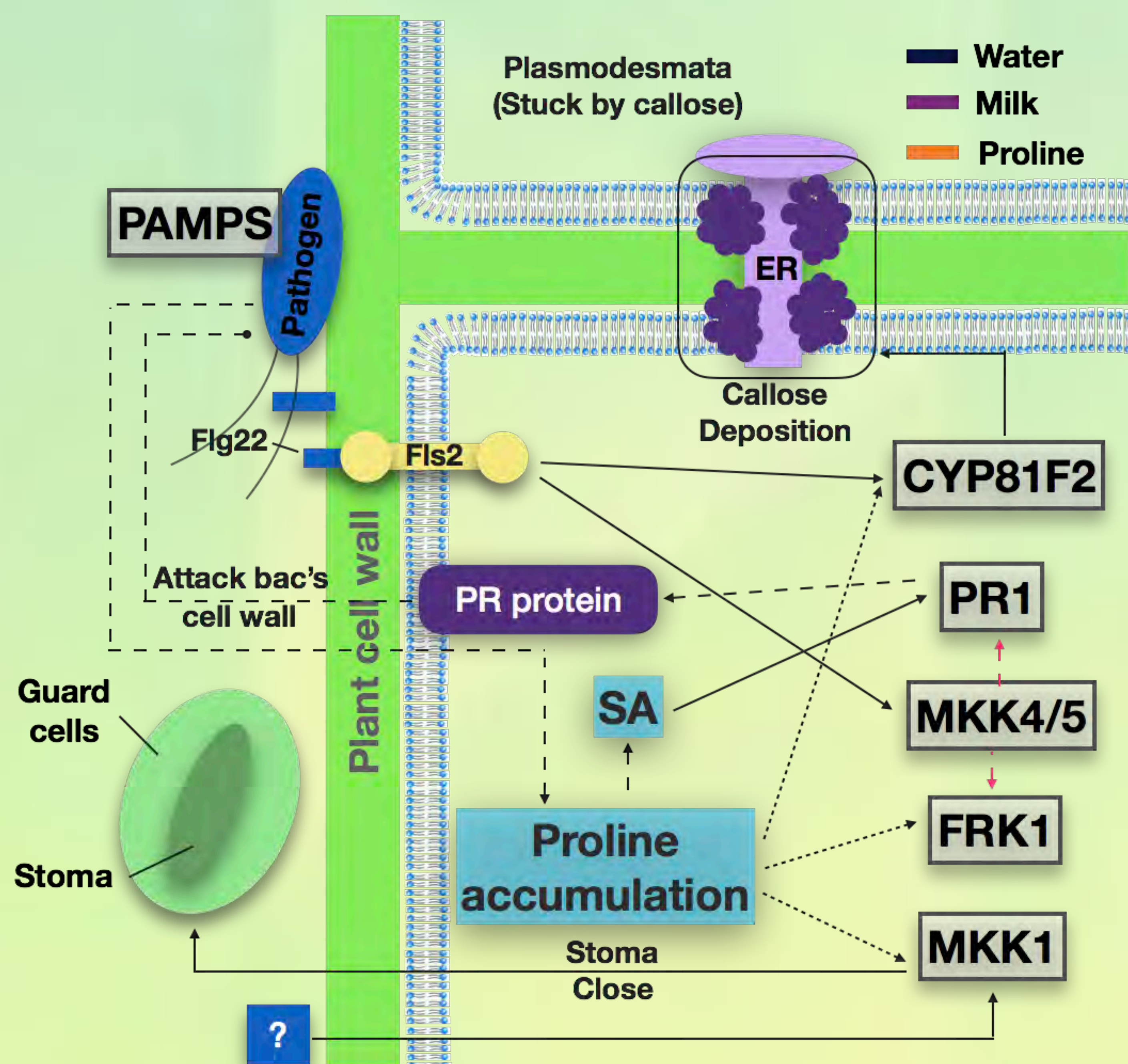


三、各種處理後初級防禦相關基因及防禦相關物質表現

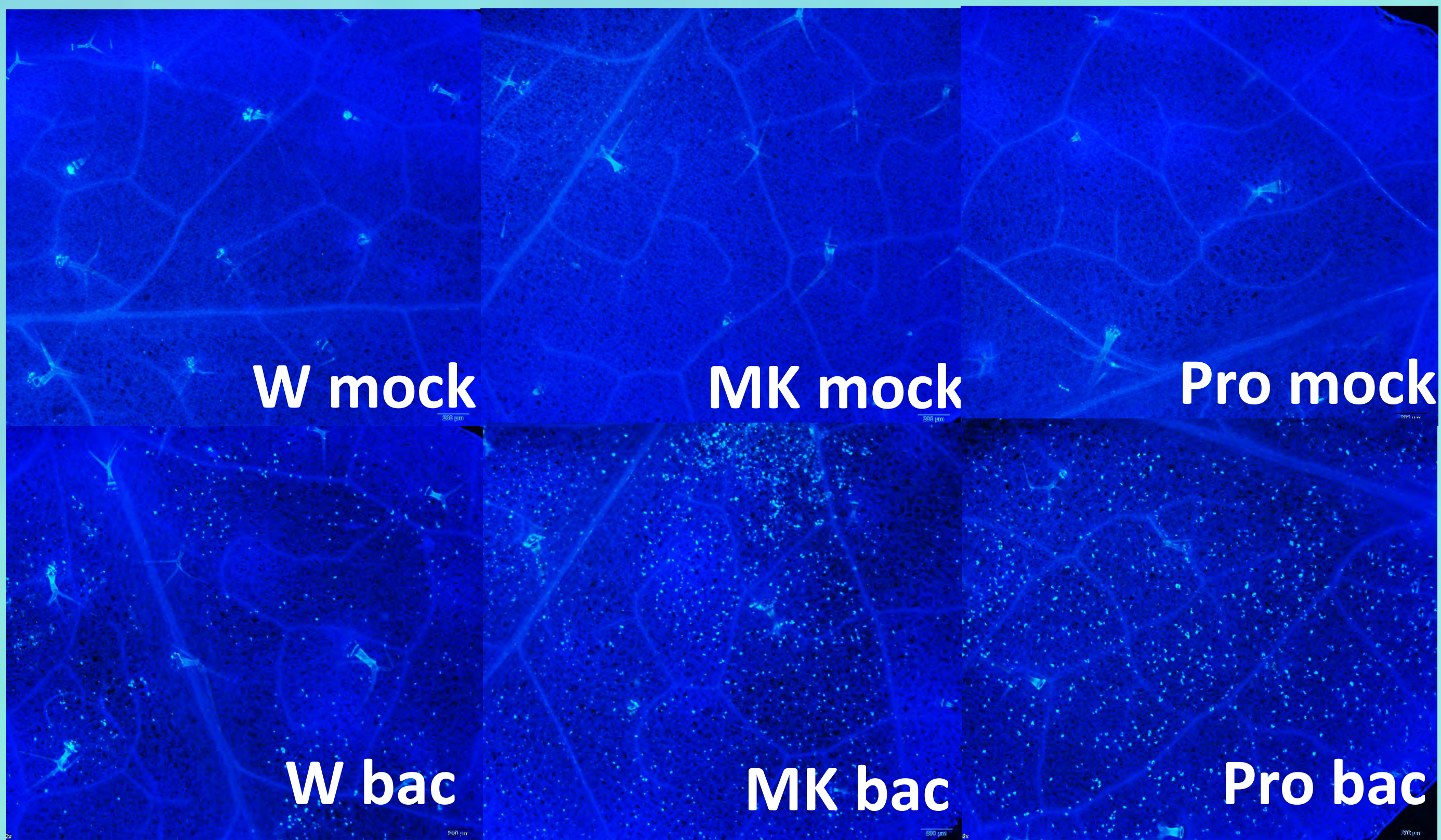
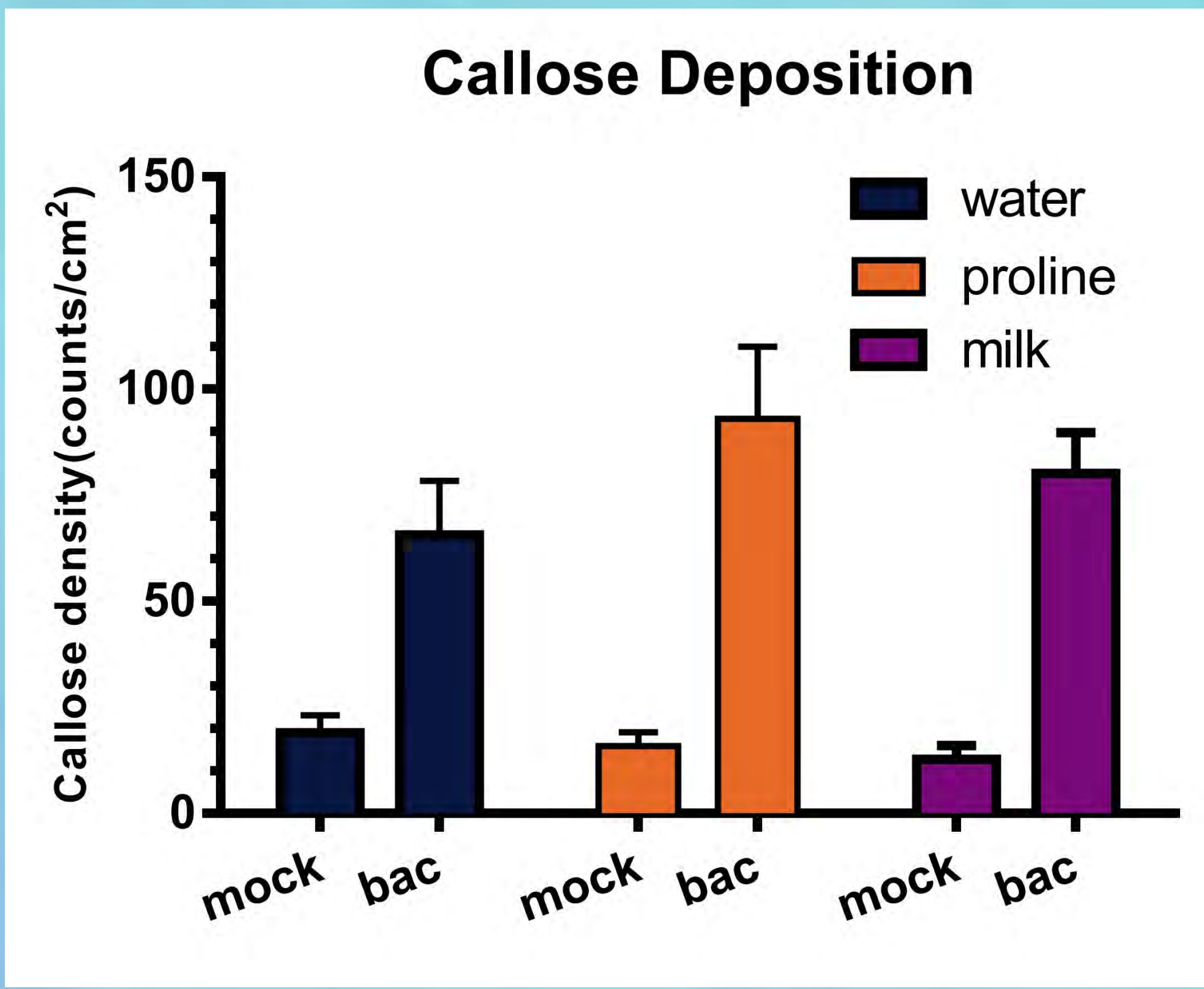
(一)、氣孔開闔大小



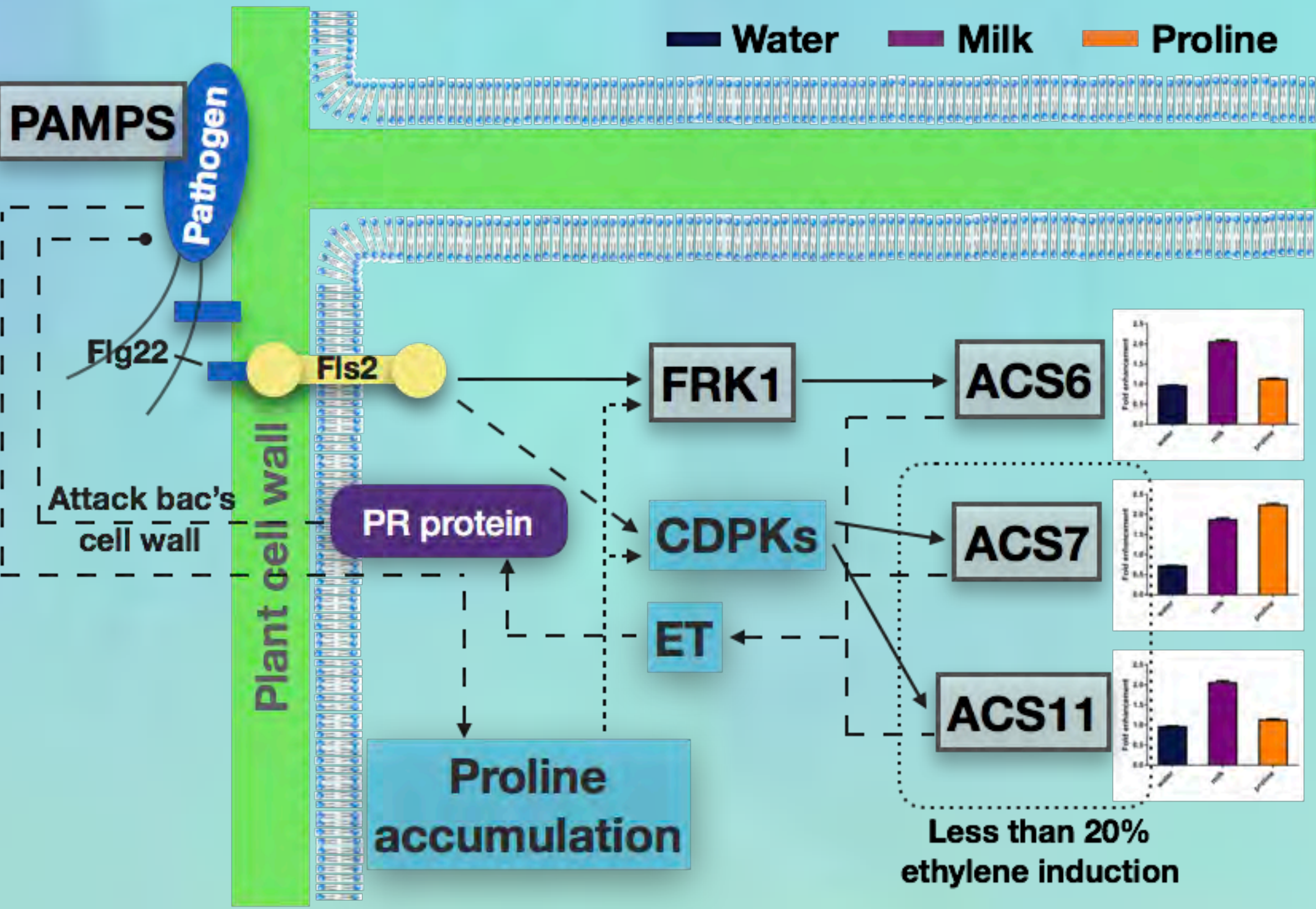
(二)、抗菌相關物質基因表現



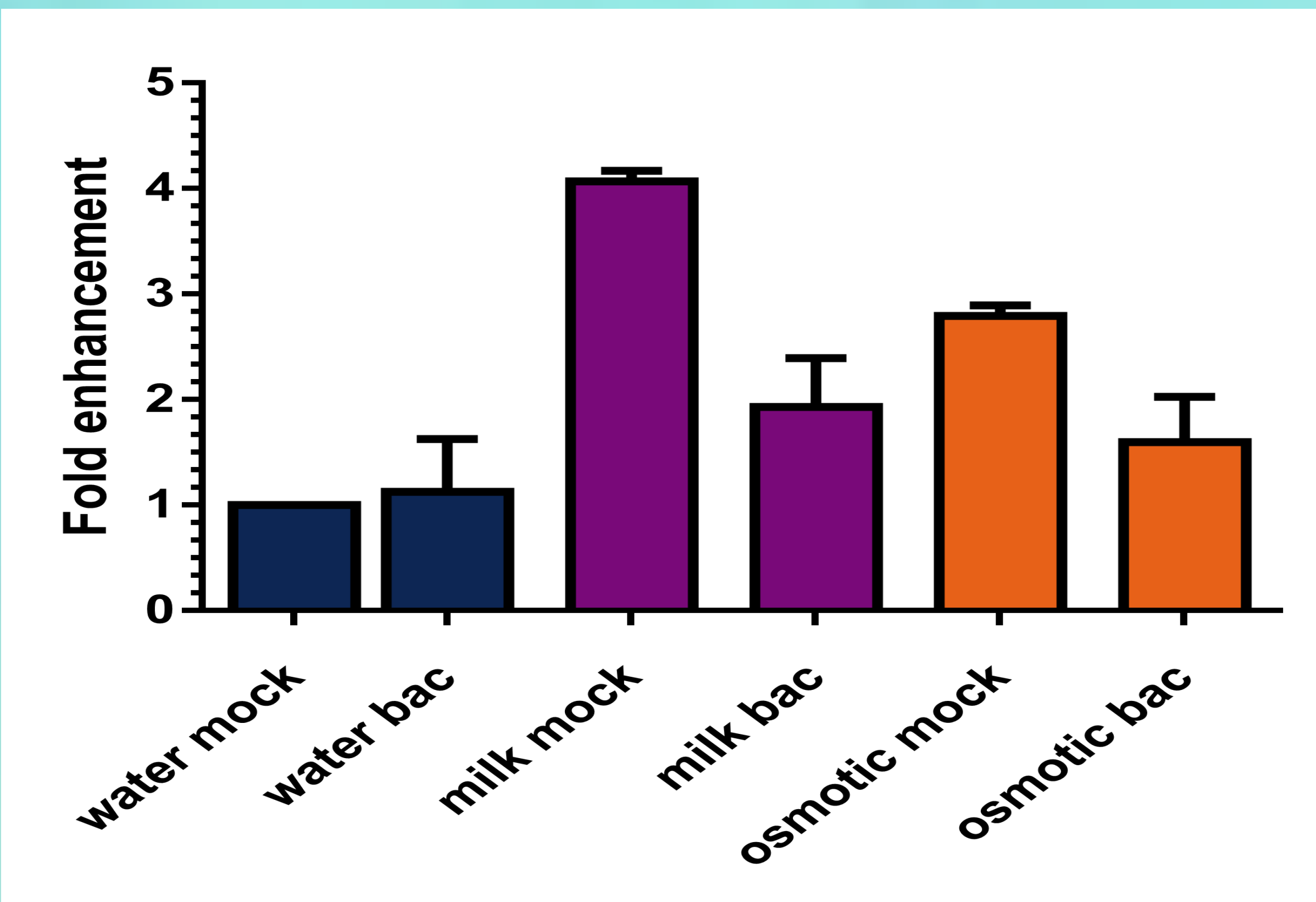
(三)、防禦物質胼胝質(callose)表現量



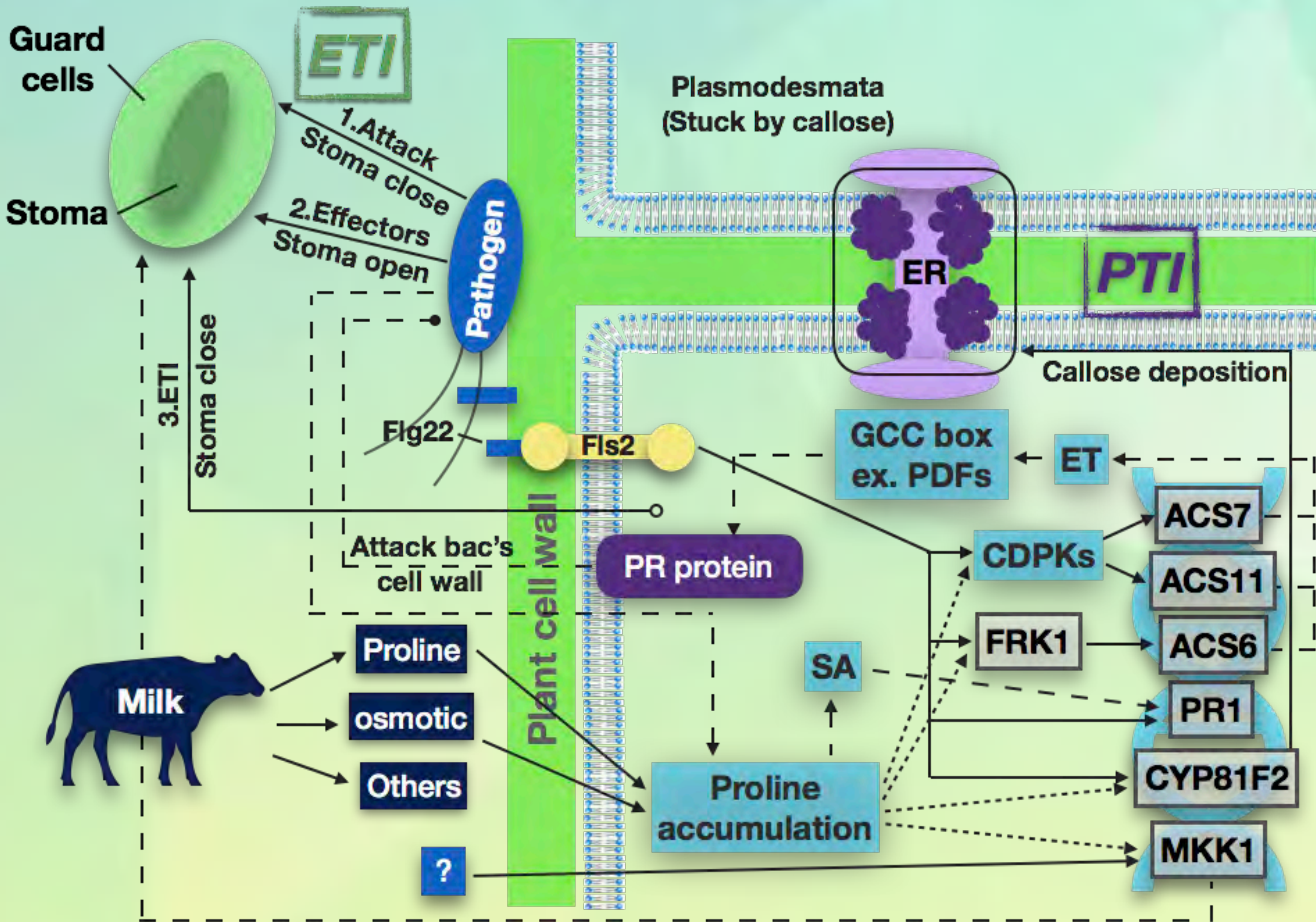
四、抗菌相關激素基因表現



五、染菌後脯胺酸累積



伍、結論



陸、參考資料與其他

1. Chen Po-Wen, Prashant Singh, Laurent, & Laurent Zimmerli. (2013). Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Molecular Plant Pathology* 14(1), 58-70. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00827.x
2. László Szabados, & Arnould Saviouré. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2), 89-97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009