

中華民國第 60 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

052105

不同物種間植株感病的表現與變化

學校名稱：國立政治大學附屬高級中學

作者： 高二 王睿謙 高二 李昀軒 高二 林明倫	指導老師： 劉正暉
---	------------------

關鍵詞：轉基因植物、病毒擴散、病毒含量

摘要

為了瞭解植物被胡瓜嵌紋病毒(CMV)及蕪菁嵌紋病毒(TuMV-GR)感染後，不同物種間植株的表現與變化。本研究分別觀察圓葉菸草及阿拉伯芥的病徵、TuMV-GR 病毒之擴散情形並以 ELISA 技術檢驗植株內病毒含量。結果顯示受感染的圓葉菸草及阿拉伯芥呈現黃化、矮化、捲曲等病徵，另外，藉由含有綠色螢光蛋白(GFP)之 TuMV-GR 病毒所感染的圓葉菸草及阿拉伯芥中得知病毒皆由葉脈往葉緣擴散。我們也以 ELISA 驗證了轉入病毒特定基因片段的轉基因阿拉伯芥植株(TuP1、TuHC、R12-2、FA-1 轉基因植物) 並不會產生抗病機制，數值上反而呈現感病性提升的跡象，故推論轉植片段使植物感病性提升。

壹、研究動機

一、 研究動機

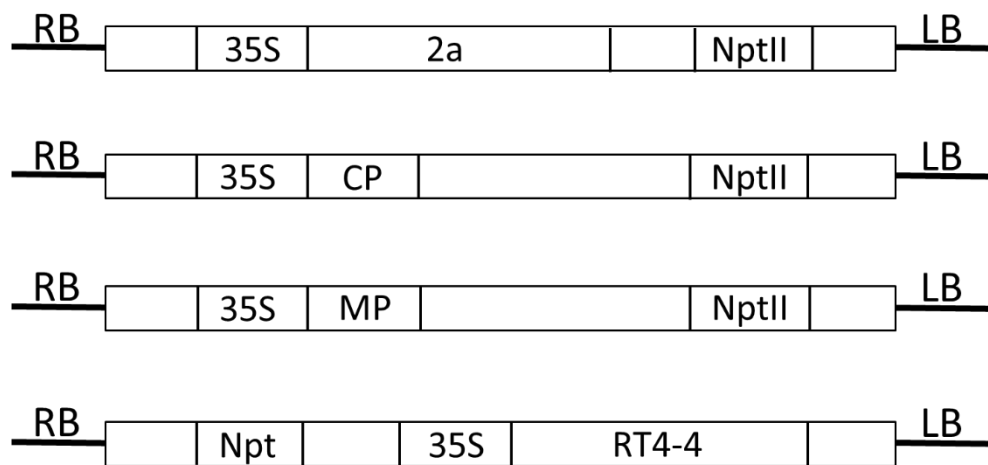
動物病毒對人類總是帶來許多危機，像是我們出生那年的 SARS、在世界各地造成眾多死亡數的流行性感冒病毒等，而人類也都會試著找出解決危機的辦法。這些種種讓我們想要試圖了解，如果是植物受到了病毒感染會如何。而在我們蒐集資料時，發現蕪菁嵌紋病毒內的 HC-Pro 蛋白可以抑制植物體內抵抗病毒的基因靜默機制 (gene silencing)，使病毒能夠順利存活在植物體內。而在前人的文獻中 [1]，轉入蕪菁嵌紋病毒的鞘蛋白基因能使植物出現抗病性。因此我們想探討，如果將 P1 及 HC-Pro 蛋白轉入植物中，植物是否能演化出一套對抗病毒的機制，使植物能夠啟動抗病機制免予受到感染，在此研究中我們著重在觀察受感染之轉基因植物的病毒含量分析。

二、 研究背景

(一) 胡瓜嵌紋病毒(CMV)

1. 病毒資訊

- (1) 胡瓜嵌紋病毒為單鏈型核糖核酸 (single stranded RNA)病毒。
- (2) 基因體為三條正股的 RNAs 及一條次基因體組成。
- (3) CMV 之病毒顆粒分子量為 24-26 kDa。
- (4) 病毒型態為球狀多面體，直徑約為 28~30nm。
- (5) 病毒架構示意圖:



[1][2]

2. 病徵

植株矮化，葉部呈現淡黃色嵌紋，葉形變異包含葉緣成波浪狀或向內捲，葉脈壞疽，葉脈有電光狀或輪點狀壞疽斑。〔3〕

3. 寄主範圍與傳播方式

- (1) CMV 之寄主範圍極為寬廣。可危害多數經濟作物，涵蓋單子葉及雙子葉植物。例如包含瓜類，如胡瓜、絲瓜、西瓜、洋香瓜、甜瓜；茄科作物包含蕃茄、甜椒、辣椒、菸草；果樹類作物包含百香果、香蕉以及種類繁多之觀賞花卉植物如唐菖蒲、金花石蒜、百合等。另外，CMV 也可感染多數之野生植物。而此研究主要以圓葉菸草及阿拉伯芥作為寄主。〔4〕〔5〕〔6〕

- (2) CMV 可藉感病之植物的汁液傳染，亦可由蚜蟲方式傳播，可傳播 CMV 之蚜蟲種類超過 60 種以上。另外，CMV 也可藉由種子攜帶傳播，至少有 19 種植物的種子能攜帶病毒傳播。

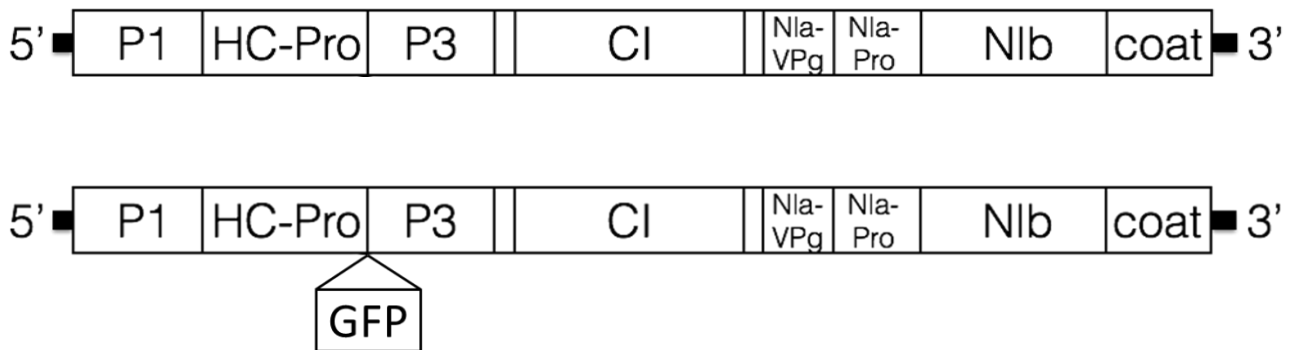
(二) 蕪菁嵌紋病毒(TuMV-GR)

1. 病毒資訊:

- (1) 蕪菁嵌紋病毒是 Potyvirus 屬的其中之一。P1 及 HC-PRO 蛋白質是病毒所表現的第 1 及第 2 蛋白質，也是本研究的重點。P1 蛋白雖然功能未知，但與 HC-PRO 共同存在植物體內時，會影響植物抗病機制及植物生長發育調控，使植物產生矮小、葉片捲曲狀。
- (2) 病毒架構示意圖: [7]

上圖為原始病毒架構

下圖為含有綠色螢光蛋白基因(GFP)的病毒架構



2. 病徵

葉片呈黃化圓狀斑點、深淺綠色交錯之嵌紋。成株葉片除嵌紋之外，並有皺縮及深色壞疽小點，質地變硬變脆，全株矮化。[6]

3. 寄主範圍與傳播方式

在十字花科植物中引起疾病。該病毒在自然界通常以 40-50 種蚜蟲傳播，也可藉由感病植物汁液傳播。本研究以汁液傳染方式傳播。

4. P1 及 HC-Pro 蛋白

- (1) P1 蛋白目前尚未了解其功能，但已知與 HC-Pro 蛋白共同表現時，能使 HC-Pro 的抑制基因沉默機制的作用增強。
- (2) HC-Pro 蛋白能抑制植物體內的基因沉默機制，進而達到使病毒成功感染植株的效果。
- (3) P1 與 HC-Pro 蛋白共同表現時，P1 與 HC-Pro 會是兩個獨立的蛋白，使兩者成為各自獨立的蛋白結構，而本研究中 FA-1 則是在兩者基因的鹼基對做出突變，使兩者無法獨立。〔8〕〔9〕〔10〕

5. 本研究選用人工改造的 TuMV-GR 病毒(如示意圖)，利用含有綠色螢光蛋白基因 (GFP)的蕪菁嵌紋病毒 TuMV-GR 進行接種實驗，以方便觀察病毒的擴散情形。

(三) 圓葉菸草

圓葉菸草是植物病毒學中使用廣泛的實驗宿主，由於它能成功的被多樣化且大量的植物病毒感染外，也易受多種植物病原體（例如細菌，卵菌，真菌等）感染，在操作上也十分容易。常應用在植物免疫系統和抗病訊號的研究上。因此，圓葉菸草長作為本實驗宿主的材料。〔11〕

(四) 阿拉伯芥

1. 阿拉伯芥是植物生物學和遺傳學領域廣泛應用的模式生物。相較於一個複雜的多細胞真核生物，阿拉伯芥的基因組相對較小，因此它是第一個基因組被完整定序的植物，其基因組大約為 12,500 萬鹼基對和 5 對染色體，研究至今已發現大約 35,000 個基因。
2. 阿拉伯芥是現在被廣泛用於研究植物科學，能了解許多開花植物的分子性狀，包括遺傳學，進化，種群遺傳學，和植物發育研究。阿拉伯芥植株小方便在有

限的空間內培養，與生活週期短，從萌芽到種子成熟，大約為六個星期，而單個植株能產生幾千個種子，且其自花傳粉的機制也有助於遺傳實驗。而所有這些優點都使阿拉伯芥成為研究上有用的模式生物，固本研究也採用阿拉伯芥進行實驗。〔12〕

(五) 酵素免疫分析法 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. 酵素免疫分析法是利用抗原抗體之間專一性鍵結之特性，對檢體進行檢測；由於結合於固體承載物(一般為塑膠孔盤)上的抗原或抗體仍可具有活性，因此設計其鍵結機制後，配合酵素呈色反應，即可顯示特定抗原或抗體是否存在，並可利用呈色的深淺進行定量分析。酵素免疫分析法的重要應用之一為病毒檢測，根據待測樣品與鍵結機制的不同，可設計出各種不同類型的檢測方式，主要以三明治法 (sandwich)、間接法 (indirect)、以及競爭法 (competitive) 三種為主。而在本次的研究中，我們採用的是間接法。

2. 間接法:

間接法常用於檢測抗體，一般之操作步驟為：

- (1) 將已知之抗原固著於塑膠孔盤上，完成後洗去多餘之抗原。
- (2) 加入待測檢體，檢體中若含有待測之一次抗體，則會與塑膠孔盤上的抗原進行專一性鍵結。
- (3) 洗去多餘待測檢體，加入帶有酵素之二次抗體，與待測之一次抗體鍵結。
- (4) 洗去多餘未鍵結二次抗體，加入酵素受質使酵素呈色，藉由 ELISA reader 測定塑膠盤中的吸光值，以評估有色終產物的含量即可測量待測抗體的含量。

(六) 螢光顯微鏡

螢光顯微鏡是一種觀測螢光或磷光物質的光學顯微鏡，使用螢光產生圖像。樣品被照射特定波長的光，使螢光物質能將其吸收並被激發，產生更長波長的光。近年來

在生物學研究中，螢光標記被廣泛地使用來標定生物分子，使螢光顯微鏡變得更加重要。它是以水銀燈或氙氣燈為光源，搭配具激發濾片，發散濾片組的光學儀器。〔13〕

貳、研究目的

- 一、觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在菸草及阿拉伯芥之感染表徵
- 二、以螢光顯微鏡觀察 TuMV-GR 病毒擴散情形
- 三、藉由間接式 ELISA 技術檢測植物體內病毒相對含量

參、研究設備及器材

一、實驗材料

(一) 植物

1. 圓葉菸草 *Nicotiana benthamiana*
2. 阿拉伯芥 *Arabidopsis thaliana*
3. 轉基因型阿拉伯芥 (圖由實驗室提供)

TuP1轉基因植物：

轉殖TuMV病毒P1基因。



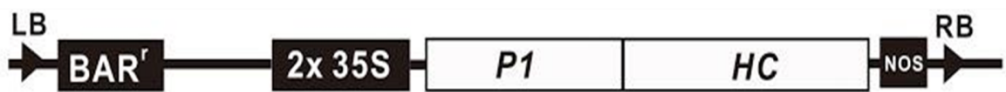
TuHC轉基因植物：

轉殖TuMV病毒HC-Pro基因。



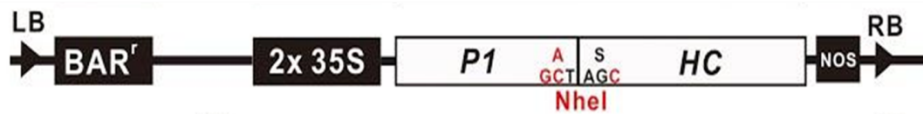
R12-2轉基因植物：

同時轉殖TuMV病毒的P1及HC-Pro基因。



FA-1轉基因植物：

轉殖TuMV病毒的P1及HC-Pro基因，但兩者間的鹼基對以人工作出突變，使之成為一個蛋白不會被切割。



(BAR' : Brasta 抗生素。 35S : 啟動子。 NOS : 停止子。)

(LB : Left Border 左邊界。 RB : Right Border 右邊界)

(二) 病毒

1. 胡瓜嵌紋病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)
2. 帶有 GFP 基因之無菁嵌紋病毒 *Turnip mosaic virus* (TuMV-GR)

二、 溶液

(一) 種子滅菌配方

1. 3%漂白水	體積比(V/V/V)
2X original bleach 6%	100
MQ	100

(二) 播種用培養基

2. 無抗生素培養基(1L)配方

品名	數量
MS salts	4.3 g
MES	0.5 g
Myo-inositol	0.1 g
Sucrose	10 g
Bacto-agar	10 g

3. 含抗生素培養基配方

品名	數量
MS salts	4.3 g
MES	0.5 g
Myo-inositol	0.1 g
Sucrose	10 g
Bacto-agar	10 g
BASTA(BA)	10000 μ l

4. 10X PBS buffer

品名	數量
NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
NaHPO ₄ ·2H ₂ O	14.4g
KCl	2g

NaN₃

2g

(三) ELISA 溶液配方

1. 1X PBST(1L)

品名	體積
10X PBS buffer	100 ml
Tween 20	0.5 ml
MQ	899.5 ml

2. Coating buffer(1L)

品名	重量
Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
NaN ₃	0.2g

3. Conjugate buffer

品名	數量
10X PBS	100ml
PVP-40	20g
Ovalbumin	2g

4. 4%牛奶

品名	數量
Coating buffer	100 ml
Milk	4 g

5. 第一次抗體 Antibody(Primary)

品名	數量
Conjugate buffer	10 ml
Anti-CMV rabbit serum	2 μ l
TuMV coat protein IgG	2 μ l

6. 第二次抗體 Secondary antibody

品名	數量
Conjugate buffer	10 ml
Alkaline phosphatase conjugate	2 μ l
Anti rabbit IgG	2 μ l

7. Substrate buffer(1L)

品名	數量
Diethanolamine	97 ml
H ₂ O	800 ml
NaN ₃	0.2 g

三、 設備

(一) 微量吸管

(二) 微量吸管尖

(三) 穴盆

(四) 介質

1. 培養土

2. 蛭石

3. 珍珠石

- (五) 研钵、杵
- (六) 金鋼砂
- (七) Nikon D3100 照相機
- (八) TissueLyser 組織研磨器
- (九) 顯微鏡
- (十) ELISA 微量盤
- (十一) ELISA 偵測儀

四、 軟體

- (一) Excel
- (二) ELISA 偵測儀之軟體:SkantRE 6.0.2
- (三) 顯微鏡顯像軟體:leica application suite V3

肆、研究過程或方法

● 阿拉伯芥 *Arabidopsis*



● 菸草 *Nicotiana*



實驗(一): 觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在菸草及阿拉伯芥之感染表徵

一、 菸草感染

1. 介質:將培養土、蛭石、珍珠石以 3:1:1 的比例均勻混合。
2. 將菸草種子均勻撒入混合好的介質中，並放入控制攝氏 24 度、16 小時日照，8 小時黑暗之溫室，等待七日使其發芽。
3. 將發芽七日菸草幼苗移盆至更大的盆栽。
4. 移盆後 14 天將分別帶有 CMV 及 TuMV-GR 的染病菸草葉片組織 0.4g 加上 1X PBS 4ml 磨碎。
5. 利用乾淨研杵將其磨碎後加入碳化矽粉末，並將溶液塗抹至健康菸草，塗抹過程中碳化矽粉末可製造傷口。
6. 感染後 1 週之菸草即可作為接種源感染阿拉伯芥。

二、 阿拉伯芥感染

(一) 阿拉伯芥種子進行消毒及播種，步驟如下:

1. 將種子放入 1.5c.c.離心管。
2. 加入 70% 酒精約 500 μ l 並均勻搖晃。
3. 將 70% 酒精取出，並用滅菌水再清洗。

4. 取出滅菌水後，再無菌操作台內加入 3% 漂白水，均勻搖晃後浸泡 10 分鐘。
5. 將 3% 漂白水取出，利用滅過菌且未開封之滅菌水清洗兩次。
6. 利用微量吸管將種子與水一並吸取，點於培養基上。
7. 等待 7 天進行移盆。

(二) 將感染後 1 週之菸草葉片組織 0.4g 加上 1X PBS 10ml 磨碎。

(三) 利用研杵將磨碎，並加入碳化矽粉末以利後續塗抹時製造傷口

(四) 利用棉花棒將溶液塗抹至 14 大的健康阿拉伯芥葉片。

(五) 塗抹後 5 分鐘利用蒸餾水將葉片上的汁液沖洗淨。

三、 拍照記錄病徵

(一) 菸草

選用感染後 7 天的菸草，以照相機及固定腳架垂直拍攝。

(二) 阿拉伯芥

1. 感染 CMV 後 5 天，以照相機及固定腳架垂直拍攝。

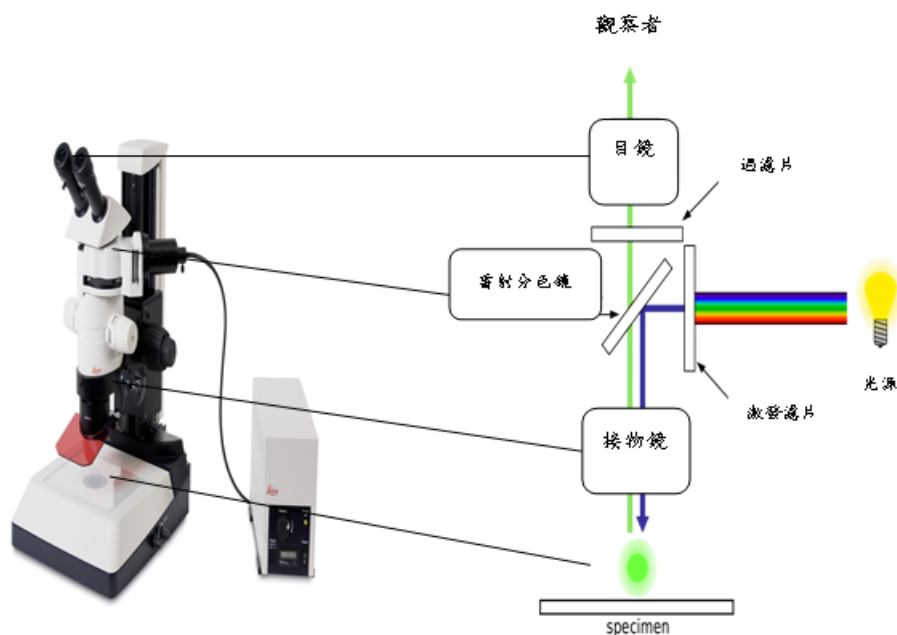
2. 感染 TuMV-GR 後 10 天，以照相機及固定腳架垂直拍攝。

實驗(二): 以螢光顯微鏡觀察 TuMV-GR 病毒擴散情形。

四、 螢光顯微鏡觀察

(一) 將 TuMV-GR 感染於菸草及阿拉伯芥後，分別拍攝 7 天及 10 天，利用螢光顯微鏡激發植株中綠色螢光蛋白，藉此得知是否感染成功

(二) 下圖為螢光顯微鏡之示意圖。利用螢光顯微鏡即可準確觀察及追蹤病毒擴散情形。



[13] [14]

實驗(三): 藉由間接式 ELISA 技術檢測植物體內病毒相對含量。

五、 ELISA 技術檢測病毒含量

- (一) 將感染後 7 天大之阿拉伯芥及菸草葉片組織 20 毫克加上 Coating buffer 400ml 放入 1.5ml 離心管並放入兩顆鋼珠，以研磨機進行打碎。
- (二) 將打碎後汁液體注入槽內，並置於 37 度保溫箱內一小時。
- (三) 將 ELISA 盤從 37 度取出，利用 1X PBST 清洗三次。
- (四) 加入 3%牛奶每一槽 100 μ l，並放入 37 度保溫箱一小時。
- (五) 將 ELISA 盤從 37 度取出，利用 1X PBST 清洗三次。
- (六) 加入 Antibody(Primary)每一槽 100 μ l 並置於 37 度保溫箱內一小時。
- (七) 將 ELISA 盤從 37 度取出，利用 1X PBST 清洗三次。
- (八) 加入 rabbit anti IgG 每一槽 100 μ l 並置於 37 度保溫箱內一小時。
- (九) 將 ELISA 盤從 37 度取出，利用 1X PBST 清洗三次。

(十) 加入 Substrate buffer 每一槽 100 μ l。

(十一) 等待反應約 45 分鐘開始放入 ELISA 儀器，設定吸光值波長為 405 奈米，並進行測量。

(十二) 測量後將數據整理後製成圖表並分析。

伍、研究結果

實驗(一): 觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在菸草及阿拉伯芥之感染表徵。

● 健康及感病之菸草

健康的菸草



CMV 感染後 5 天



TuMV-GR 感染 10 天



結果說明：

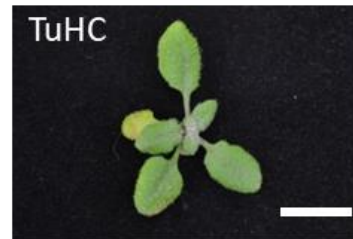
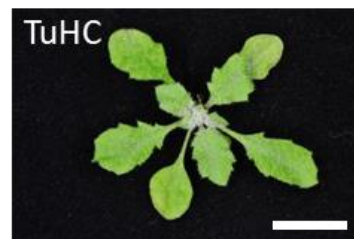
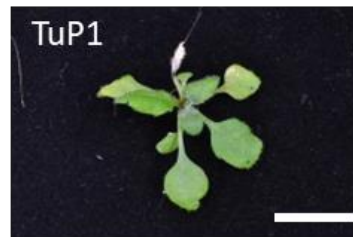
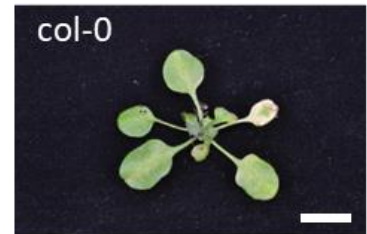
1. 此實驗為 3 重複，每重複至少 3 株植株。
2. 以健康之圓葉菸草為對照組(左圖)。
3. 菸草在 CMV 感染 5 天後及 TuMV-GR 感染 10 天後皆呈現明顯的葉片皺縮及捲曲(中間圖及右圖)。
4. 為了確認 CMV 及 TuMV-GR 病毒含量差異，故在實驗三進行了病毒含量分析。

● 健康及感病之阿拉伯芥

健康7天

CMV
感染5天

TuMV-GR
感染10天

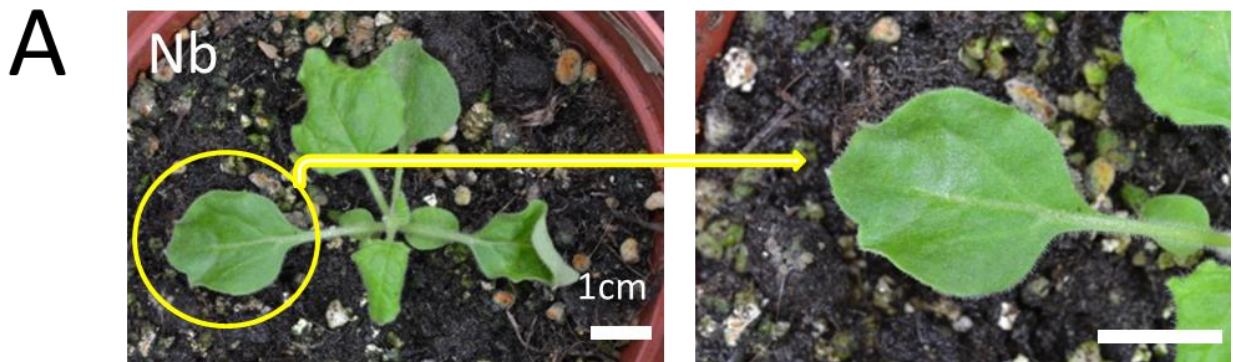


圖片說明

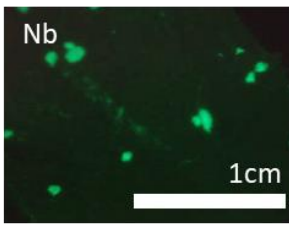
1. 觀察健康的阿拉伯芥葉形
 - (1) (col-0)為野生種，因此我們將其視為對照組(左上角)。
 - (2) TuP1 及 FA-1 與 col-0 相比，在葉形上沒有較顯著差異。
 - (3) TuHC 的葉片與 col-0 相比，葉片較小，形狀呈現輕微鋸齒狀。
 - (4) R12-2 葉片比 TuHC 小，且葉緣之鋸齒狀更強烈、更明顯。
2. 阿拉伯芥分別在感染後 5 天及 10 天，皆明顯呈現黃化及捲曲皺縮。
3. 從上述結果中得知野生種和轉入病毒特定蛋白片段感染後植株均出現黃色嵌紋病變及矮化的現象，並在後續實驗三以間接式 ELISA 進行觀測。

實驗(二): 以螢光顯微鏡觀察 TuMV-GR 病毒擴散情形。

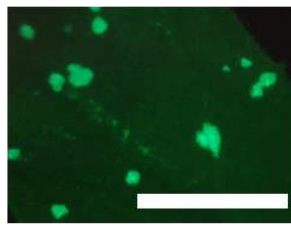
- TuMV-GR 感染菸草後 10 天:



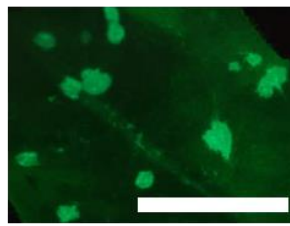
感染後第3天



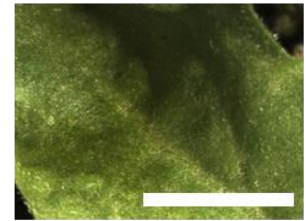
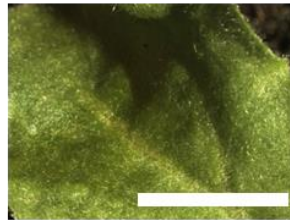
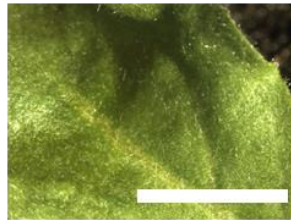
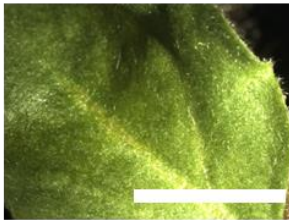
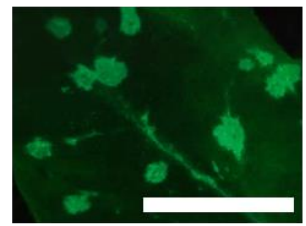
感染後第4天



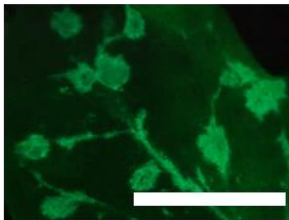
感染後第5天



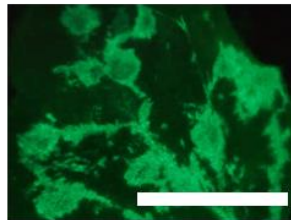
感染後第6天



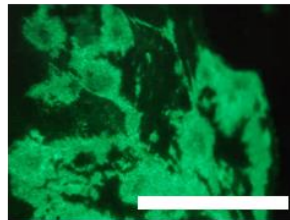
感染後第7天



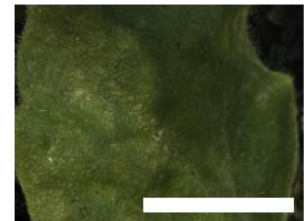
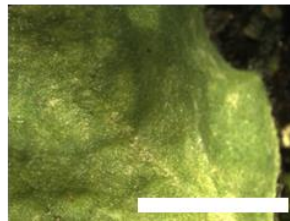
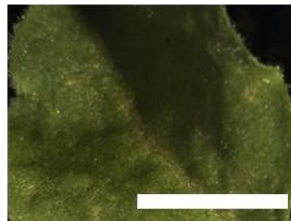
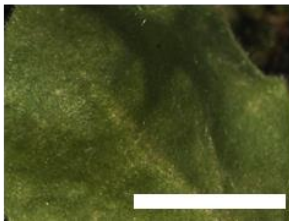
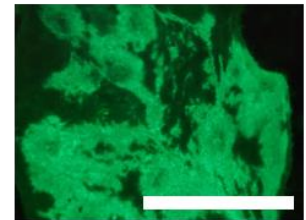
感染後第8天



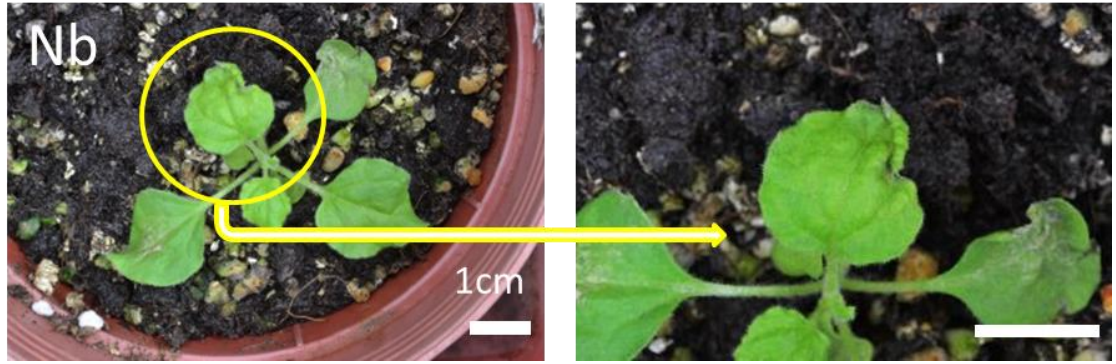
感染後第9天



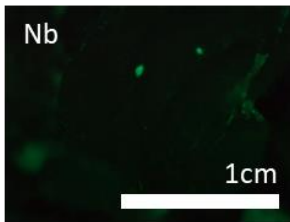
感染後第10天



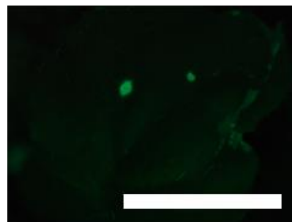
B



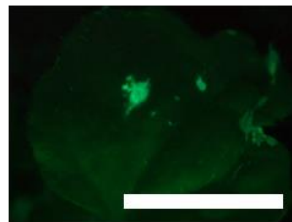
感染後第3天



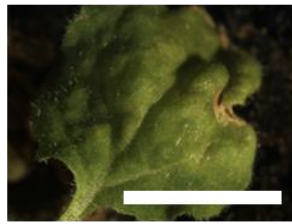
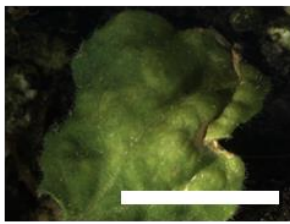
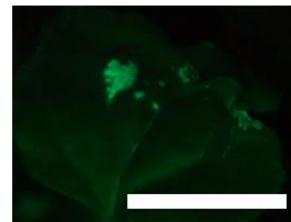
感染後第4天



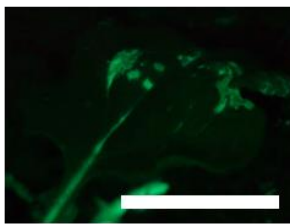
感染後第5天



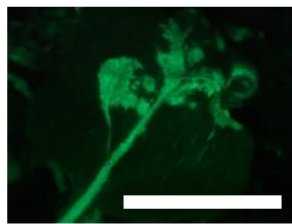
感染後第6天



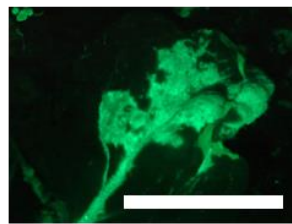
感染後第7天



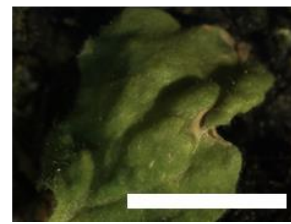
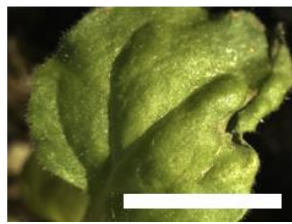
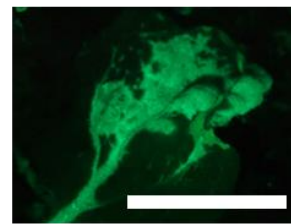
感染後第8天



感染後第9天



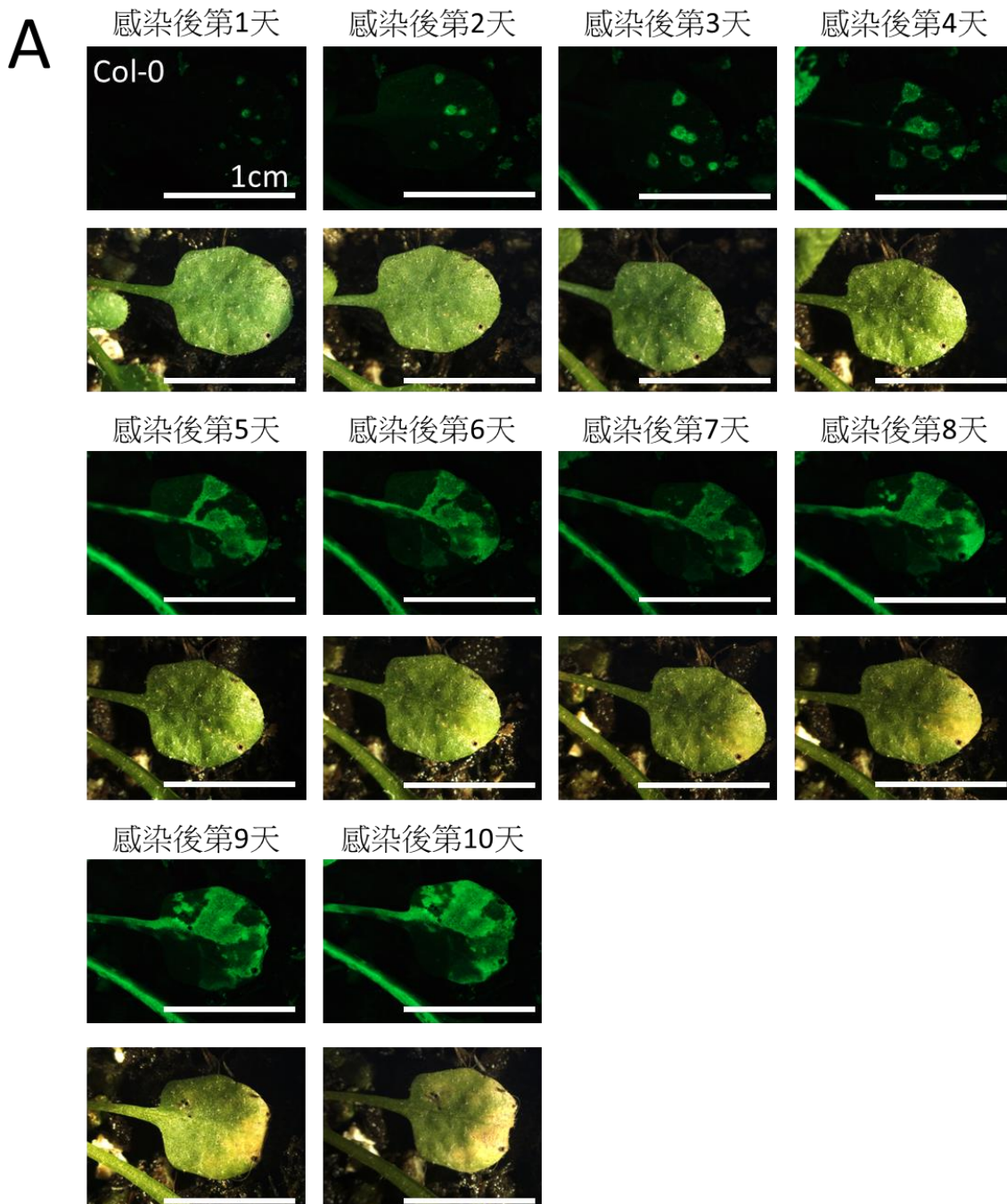
感染後第10天

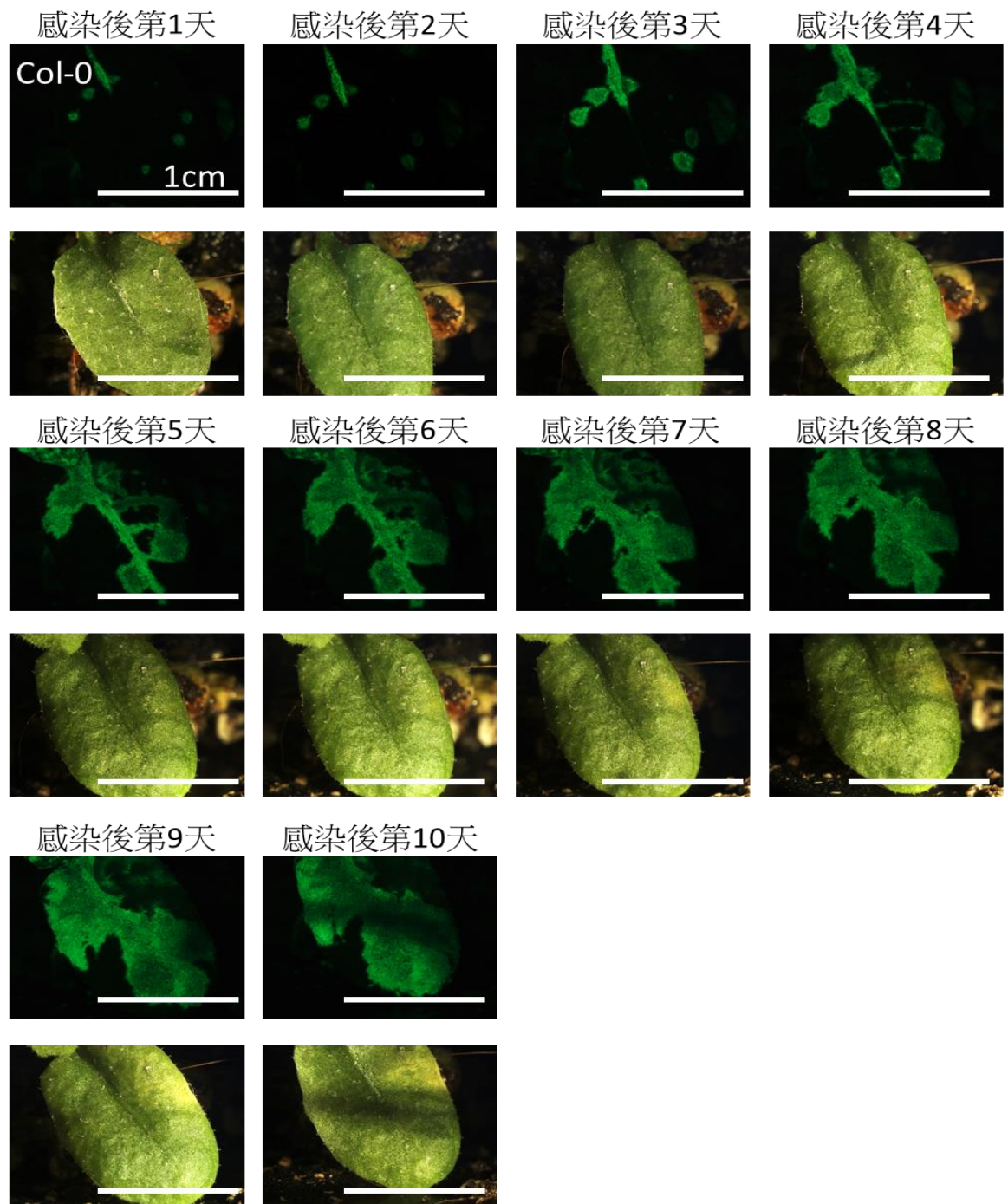


結果說明

1. 我們重複了兩次實驗(分別為圖 A 植株和圖 B 植株)，以求實驗準確性及可靠性。
2. 進行拍攝時，我們自兩株感病菸草各挑 1 片葉子(上述圖中圈起處)
3. 2 次實驗皆在第 3 天時，病毒含量極微少。
4. 到了第 5、6 天可以發現病毒明顯且大幅從感染點向外延伸。
5. 至 7 天時，感染點向外延伸的病毒延伸至葉脈且由葉脈擴散至整片葉子。
6. 10 天時，幾乎整片葉片皆呈現亮螢光綠。

● TuMV-GR 感染阿拉伯芥後 10 天:



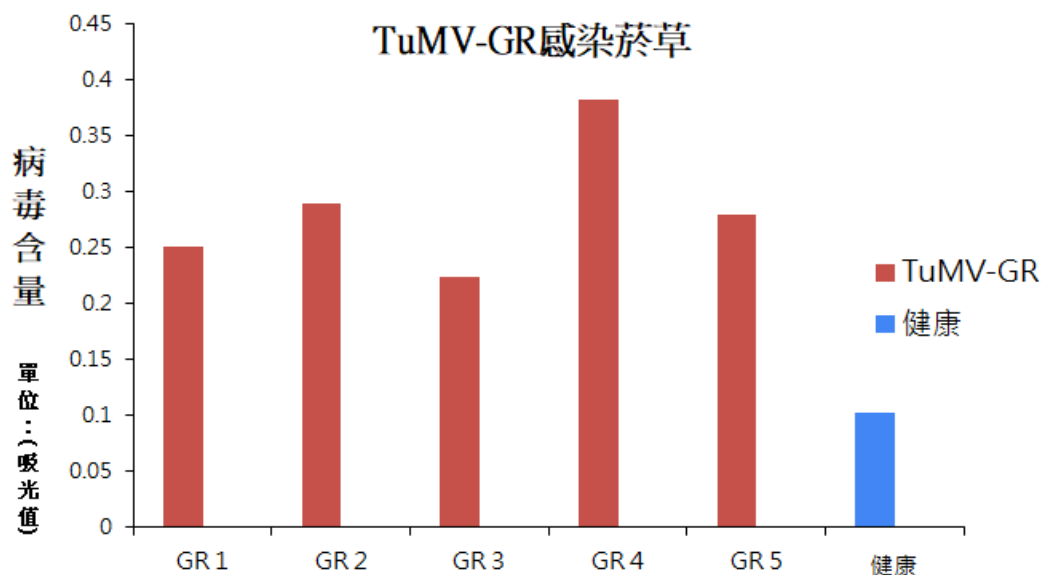
B

結果說明

1. 我們重複了兩次實驗(A、B 兩組)兩株感病阿拉伯芥各挑 1 片葉子，以求實驗準確性及可靠性。
2. 兩次實驗皆在第 1、2 天時，病毒含量極微少。
3. 在感染後 4 天內，病毒多從感染點向外擴散。

- 圖 A 我們可以發現到了感染後第 5、6 天，病毒明顯且大幅從葉脈開始向外蔓延。而圖 B 我們則可以發現，在第一天病毒即碰到葉脈，病毒從葉脈向外快速擴散。
- 到了感染後第 10 天，幾乎整片葉片皆呈現亮螢光綠。

實驗(三): 藉由間接式 ELISA 技術檢測植物體內病毒相對含量。



結果說明

- 此實驗感染 5 株菸草分別為 GR1 至 GR5，健康樣本 1 株當作對照組。
- 由長條圖可以看到，感染的菸草中病毒含量約為未感染的 2 至 3 倍。
- TuMV-GR 感染菸草後，有感染之菸草在數據呈現上很明顯的比健康之菸草還來的高許多，表示成功感染。

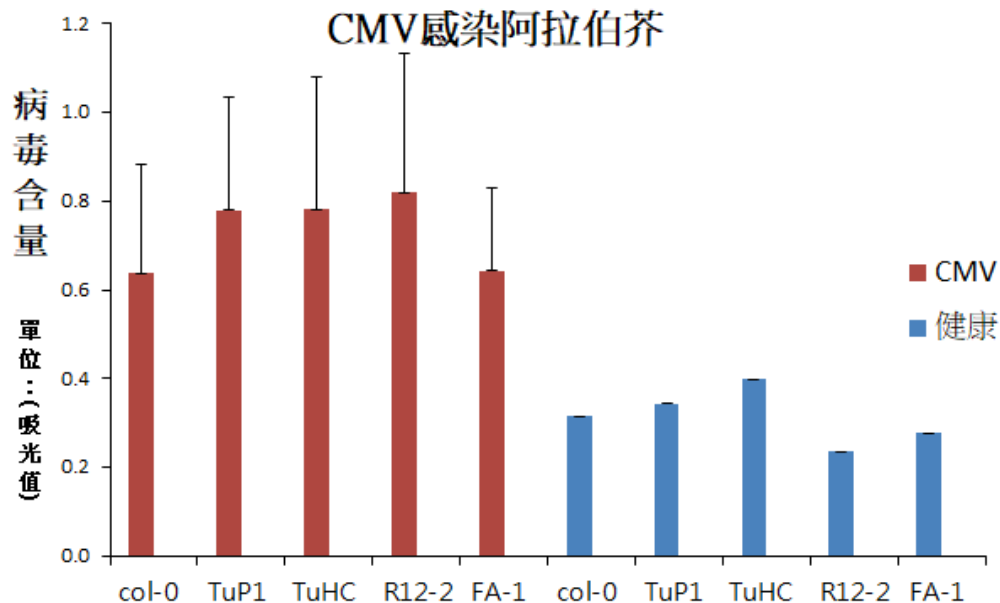
CMV感染菸草



結果說明

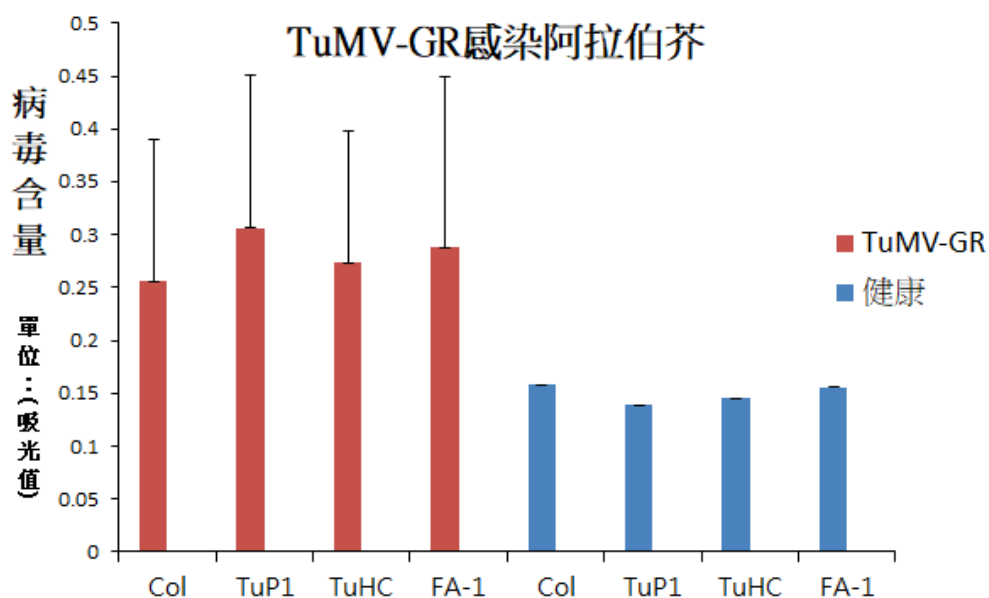
1. 此實驗以 CMV 感染 6 株菸草，健康樣本 1 株當作對照組。
2. 由長條圖可以看到，感染的菸草中病毒含量約為未感染的 6 倍
3. CMV 感染菸草後，有感染之菸草在數據呈現上很明顯的比健康之菸草還來的高許多，表示成功感染。

CMV感染阿拉伯芥



結果說明

1. 上述結果我們每一種轉基因植物皆感染了 8 至 9 棵，並取平均值，以求實驗可靠性。
2. 感染植株與健康植株相比，病毒含量多了將近 2 至 3 倍。
3. CMV 感染阿拉伯芥後，有感染之菸草在數據呈現上很明顯的比健康之菸草還來的高許多，表示成功感染。



結果說明

1. 上述結果我們每一種轉基因植物皆感染了 8 至 9 棵，並取平均值，以求實驗可靠性。
2. 感染的植株與健康的植株相比，病毒含量多了將近 1.5 至 2 倍。
3. CMV 及 TuMV-GR 感染阿拉伯芥後，有感染之菸草在數據呈現上很明顯的比健康菸草還來的高許多，表示成功感染。

陸、討論

實驗一：觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在菸草及阿拉伯芥之感染表徵

(一) 接種胡瓜嵌紋病毒及蕪菁嵌紋病毒對植物之影響

1. 使用圓葉菸草這種植物進行此實驗的原因
 - (1) 由於菸草為分子生物學、細胞學及基因遺傳學中的模式生物，且生命週期短因此選擇此植物。
2. 圓葉菸草
 - (1) 圓葉菸草受胡瓜嵌紋病毒感染後，葉片出現葉片黃化，葉緣向內捲曲呈現波浪狀，相較於健康植株整體有矮化的現象。受感染天數較長的圓葉菸草葉沿葉脈有壞疽斑出現。
 - (2) 蕪菁嵌紋病毒感染圓葉菸草後，葉片呈深淺綠色交錯之嵌紋，葉片皺縮且出現壞疽小點，全株質地變硬變脆，並有矮化的現象。
 - (3) 且蕪菁嵌紋病毒感染的植株較胡瓜嵌紋病毒感染的植株來的容易死亡。
3. 阿拉伯芥
 - (1) 接種胡瓜嵌紋病毒的阿拉伯芥出現植株矮化及葉片黃化的症狀，葉片則略呈波浪狀捲曲。
 - (2) 阿拉伯芥接種蕪菁嵌紋病毒，葉片有深淺綠色交錯的嵌紋，葉片捲曲且皺縮，嚴重者葉片甚至出現區塊性黃化，植株整體也較健康阿拉伯芥來的矮小。
 - (3) 且蕪菁嵌紋病毒感染的植株較胡瓜嵌紋病毒感染的植株來的容易死亡。

(二) 植物照顧不妥對於接種病毒之影響

1. 圓葉菸草

- (1) 在移盆後必須給予適當水分、溫度、濕度，且在移盆的過程中需要注意菸草幼苗之葉片不能貼在土表，否則會長得特別差。
- (2) 在感染時，也必須注意不要因用力過度，將葉片弄出如肉眼可見之傷口，否則感染後極易死亡。

2. 阿拉伯芥

- (1) 在種植阿拉伯芥時，必須注意種子的清潔，否則種在培養基有很大機會產生黴菌。且培養基內之水分也不能太多，不然剛長出來的葉片就會因水的吸附力而平貼於培養基上，導致植株生長不健康。
- (2) 盡量從培養基挑選較大較健康且相對翠綠的阿拉伯芥來進行移盆，我們發現墨綠色的阿拉伯芥移盆後無法存活。移盆時切記不要將葉片碰到土壤，否則植株容易死亡。
- (3) 在感染時，由於植株相對菸草來的小，在塗抹葉片時，不要將整株阿拉伯芥連根拉起，否則植株會長得不好、存活率低。

(三) 根據病毒發病速度調整阿拉伯芥感染天數

1. 胡瓜嵌紋病毒(CMV)

起初我們設定為感染七天(一周)後進行拍照觀察及 ELISA 檢測，但 ELISA 檢測結果顯示，受 CMV 病毒感染的樣本病毒含量過高，無法分辨受到感染的野生型植物及轉基因植物之間的病毒含量差異。於是我們重新設定接種天數，將受 CMV 病毒感染的樣本更改為感染五天後進行觀察，以利觀察出更明顯的個體差異。

2. 蕪菁嵌紋病毒(TuMV-GR)

與受 CMV 病毒感染的植株相同，起初也設定為感染七天(一周)後進行拍照觀察及 ELISA 檢測，但 ELISA 檢測結果顯示，受 TuMV-GR 病毒感染的樣本病毒含量過低，與對照組的健康植株數值相當，無法看出差異。於是我們也重新設定接種天數，設定受 TuMV-GR 病毒感染的植株更改為感染十

天後進行觀察，以利觀察出更明顯的個體差異。

實驗二：以螢光顯微鏡觀察 TuMV-GR 病毒擴散情形

由顯微鏡下所捕捉到的螢光照片來看，我們推測病毒藉由傷口進入植株後，會以放射狀的方式向外擴散，過程中碰到葉脈或維管束，也會順其方向擴散至植株的其他部位，透過植物本身的運輸機制，進而感染整棵植株。

實驗三：藉由間接式 ELISA 技術檢測植物體內病毒相對含量

(一) 圓葉菸草

由於圓葉菸草是易感植物，為病毒的良好宿主，因此感染效率良好，故不論是接種胡瓜嵌紋病毒或是蕪菁嵌紋病毒，健康植株與感染植株之間的數值呈現顯著差異。

(二) 阿拉伯芥

接種胡瓜嵌紋病毒與接種蕪菁嵌紋病毒的阿拉伯芥在 ELISA 數值上與健康植株皆有一定的差距，表示我們的接種是成功的。但就同為受感染植株間的數值做比較，野生種與轉基因植物間並沒有呈現顯著的差異，另外在轉基因植物彼此間也無明顯差異，故轉入病毒的特定片段基因在植物體內，並無法使植物抗病毒，反之使植物更易感病。

(三) 吸光值

由於 ELISA 技術檢測使用光檢測樣本，而溶液本身會吸收部分的光，因此即使是健康植株樣本，也會有吸光值存在。

而胡瓜嵌紋病毒(CMV)與蕪菁嵌紋病毒(TuMV-GR)之數值差異，由於兩株是不同的病毒株，感染植物的效率本身就是不相同的，因此不能相互進行比較。

柒、結論

除了害蟲與微生物會造成植物染病之外，病毒也是造成植物染病的主要原因，而如何增加植物抵抗病毒的能力，並減少農損也是近年來重要的研究目標之一。在演化的漫長過程中，植物發展出許多防禦病毒的機制，例如本研究所提到的基因靜默機制，而相對的病毒也演化出特有的方式來破壞植物的防禦機制。目前已經有許多研究針對植物與病毒間的種種機制進行探討與解析。

病毒會藉由傷口進入植物體內，由接種處延伸並經由維管束轉移至植物體的其他部位，進而感染整顆植株。遭受胡瓜嵌紋病毒感染的植株葉片黃化、葉形變異、葉緣捲曲及個體矮化。感染蕪菁嵌紋病毒的植株葉片出現皺縮，甚至呈現區塊性黃化及矮化等現象。

圓葉菸草由於是易感植物，在接種胡瓜嵌紋病毒與蕪菁嵌紋病毒後，無論是觀察植株本身的病徵，或是以酵素免疫分析法測得之數據，結果都顯示感染成效十分顯著。而在阿拉伯芥的部分雖然同樣有良好的感染成效，但在轉基因阿拉伯芥並沒有出現我們預期的抗病效果，故推測將這兩段病毒的基因轉殖入植物體中，無法使植物獲得抵抗病毒及不受病毒抑制的能力。未來，我們將嘗試不同的做法，使植物的基因沉默機制不會被病毒干擾，進而達到抗病效果。

捌、參考資料及其他

- [1] Han-Xin Lin, Luis Rubio, Ashleigh B. Smythe, and Bryce W. Falk (2004). Molecular Population Genetics of Cucumber Mosaic Virus in California: Evidence for Founder Effects and Reassortment. *Journal of Virology*, Vol. 78, No. 12, June 2004, p. 6666 – 6675, from <https://reurl.cc/xZG9b5>
- [2] 作物病蟲害與肥培管理技術資料光碟－菸草(無日期)。取自 <https://reurl.cc/62aZ45>

- [3] 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局(2001 年 3 月)植物保護圖鑑系列 6，第 71-74 頁。
取自 <https://is.gd/qBz27n>
- [4] 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局(2007 年 6 月)。瓜類病害與傳播蟲媒之診斷鑑定
與防治。取自 <https://is.gd/GLE5AE>
- [5] 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局(2003 年 12 月)植物保護圖鑑系列 13，第 81-84 頁。
取自 https://www.baphiq.gov.tw/Publish/plant_protect_pic_13/T_pdf/03-13.pdf
- [6] 行政院農業委員會台中區農業改良場(無日期)。臺中區農業專訊第 19 期夏季蔬菜常見
之病害。取自 <https://is.gd/4DCfEP>
- [7] Betty Y.-W. Chung, W. Allen Miller, John F. Atkins, and Andrew E. Firth (2008). An
overlapping essential gene in the Potyviridae. PNAS, vol. 105, no. 15 5897 – 5902,
from <https://www.pnas.org/content/pnas/105/15/5897.full.pdf>
- [8] Célia Plisson, Martin Drucker, Stéphane Blanc, Sylvie German-Retana, Olivier Le Gall, Daniel
Thomas, Patrick Bron (2003). Structural Characterization of HC-Pro, a Plant Virus
Multifunctional Protein. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 26, Issue of June 27,
pp. 23753 – 23761
- [9] Hernan Garcia-Ruiz (2019). Host factors against plant viruses. Molecular Plant Pathology, DOI:
10.1111/mpp.12851
- [10] 秋敏慈(2012)。P1 蛋白之穩定性影響 HC-Pro 抑制 miRNA 之調控機制。臺北：國立台灣
大學生物資源暨農學院植物病理與微生物系。
- [11] Goodin MM1, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. (2008). Nicotiana benthamiana: its history and
future as a model for plant-pathogen interactions. Mol Plant Microbe Interact. Aug;21(8):1015-26,
from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616398>
- [12] 阿拉伯芥(2020 年 2 月 23 日)。維基百科。取自 <https://is.gd/eLWGAM>
- [13] 螢光顯微鏡(2019 年 11 月 7 日)。維基百科。取自 <https://is.gd/1uhDZ2>
- [14] 螢光成像的模組化立體顯微鏡 Leica MZ10 (2018 年 4 月 26 日)。德國：萊卡公司取自
<https://is.gd/Y2Bww7>

【評語】 052105

1. 本研究對不同物種間植株感染植物病毒後之差異並無深入分析，所得之結論及推測仍須進一步的實驗驗證。
2. 本研究在探討 CMV 及 TuMV 感染阿拉伯芥及圓葉菸草的發病過程，較缺新意。
3. 所用病毒株系，血清來源及轉基因菸草之來源必須說明清楚。
4. 為何 P1、HC-Pro 或 P1+HC-Pro 的轉基因菸草皆無抗性需加以說明。如蛋白為基因靜默的抑制子，則會增加感病性，如係轉基因產生基因靜默作用，則可抗病，因此其轉基因株系之特性要說明清楚。

摘要

為了瞭解植物被胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 及蕪菁嵌紋病毒 (TuMV-GR) 感染後，不同物種間植株的表現與變化。本研究分別觀察圓葉菸草及阿拉伯芥的病徵、TuMV-GR 病毒之擴散情形並以 ELISA 技術檢驗植株內病毒含量。結果顯示受感染的圓葉菸草及阿拉伯芥呈現黃化、矮化、捲曲等病徵，另外，藉由含有綠色螢光蛋白 (GFP) 之 TuMV-GR 病毒所感染的圓葉菸草及阿拉伯芥中得知病毒皆由葉脈往葉緣擴散。我們也以ELISA驗證了轉入病毒特定基因片段的轉基因阿拉伯芥植株 (P1、HC、P1HC、FA) 並不會產生抗病機制，數值上反而呈現感病性提升的跡象，故推論轉植片段使植物感病性提升。

研究動機

蕪菁嵌紋病毒內的 HC-Pro 蛋白可以抑制植物體內抵抗病毒的基因靜默機制 (gene silencing)，使病毒能夠順利存活在植物體內。因此我們想探討，如果將病毒的基因片段轉入植物中，植物是否能演化出一套對抗病毒的機制，使植物能夠啟動抗病機制免予受到感染，在此研究中我們著重在觀察受感染之轉基因植物的病毒含量分析。

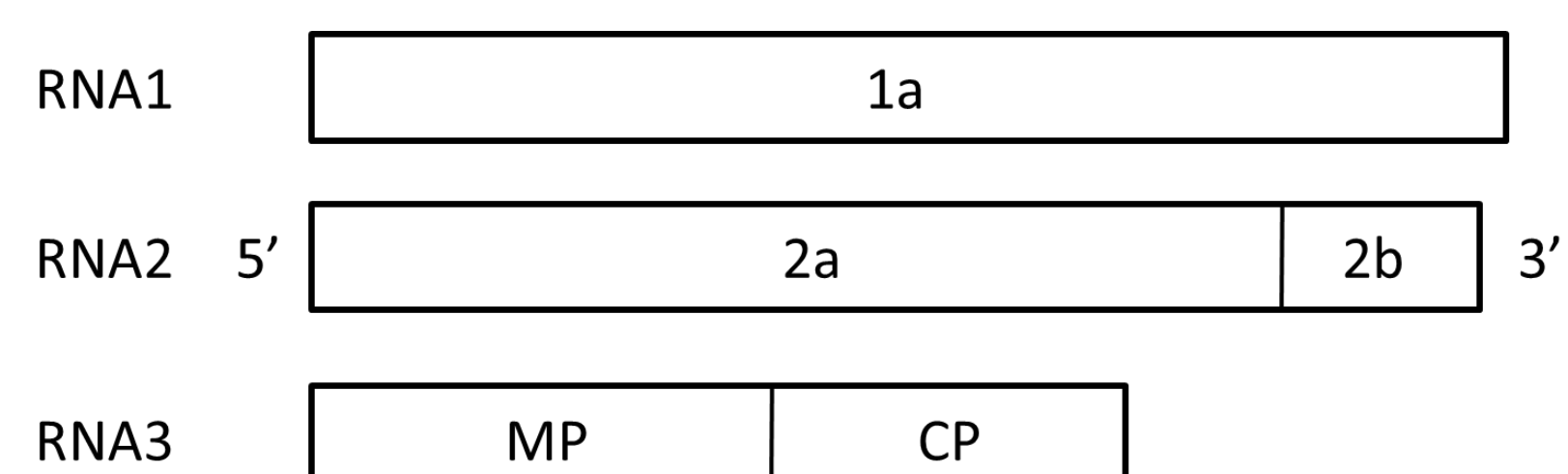
研究目的

1. 觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在植物之感染表徵
2. 觀察病毒擴散情形
3. 比較不同植株間病毒含量
4. 比較不同濃度感染源之影響
5. 暫時性表現病毒的基因於葉片，觀察葉片發病情形

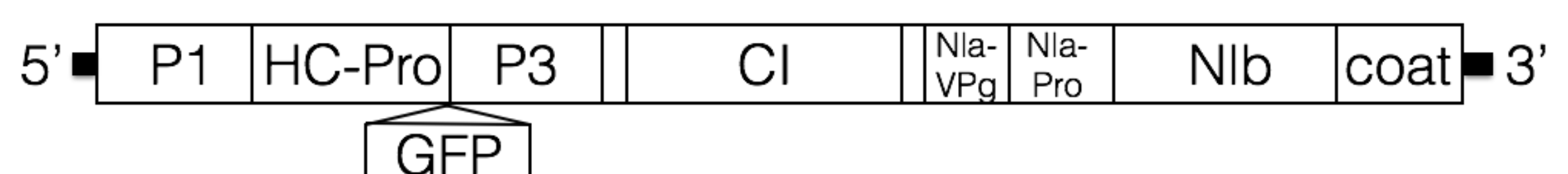
研究材料

病毒材料：

1. 胡瓜嵌紋病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)



2. 蕪菁嵌紋病毒 *Turnip mosaic virus* (TuMV-GR)



植物材料：

1. 菸草
2. 阿拉伯芥：
(1) Col-0 野生型 (Wild-type)

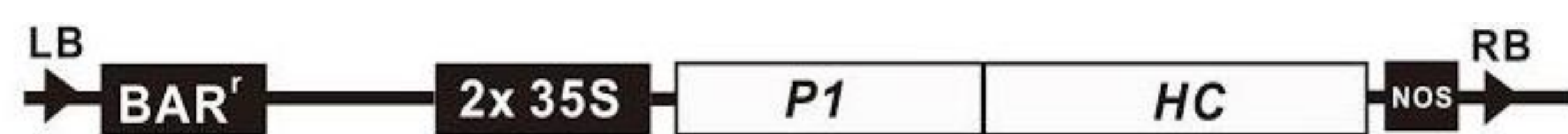
- (2) P1



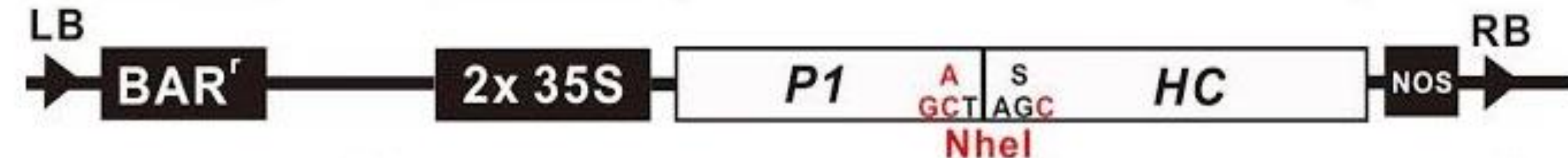
- (3) HC



- (4) P1HC



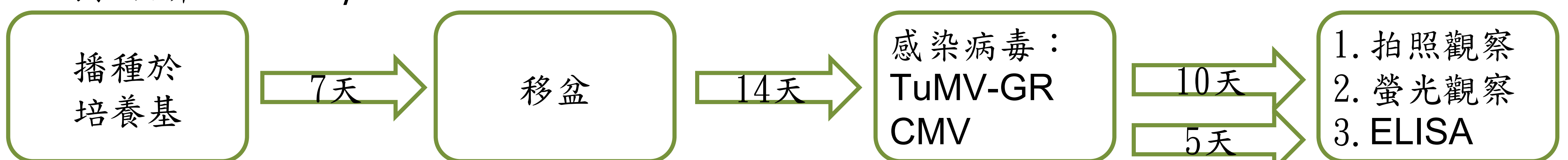
- (5) FA



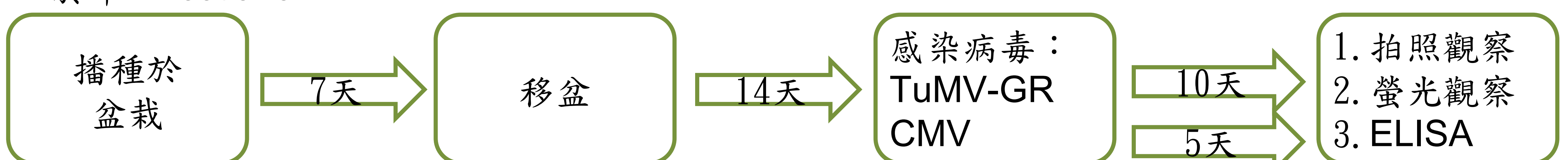
轉基因植物

研究過程或方法

- 阿拉伯芥 *Arabidopsis*



- 菸草 *Nicotiana*



實驗結果

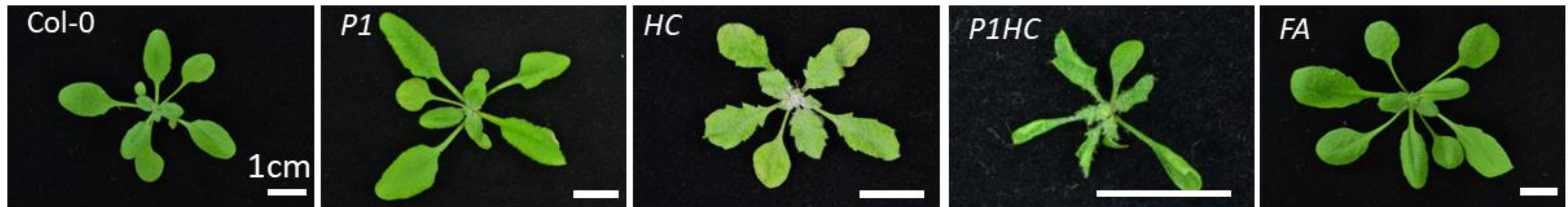
實驗(一)：拍照觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在菸草及阿拉伯芥之感染表徵。

• 菸草：



• 阿拉伯芥：

健康7天



CMV 感染5天

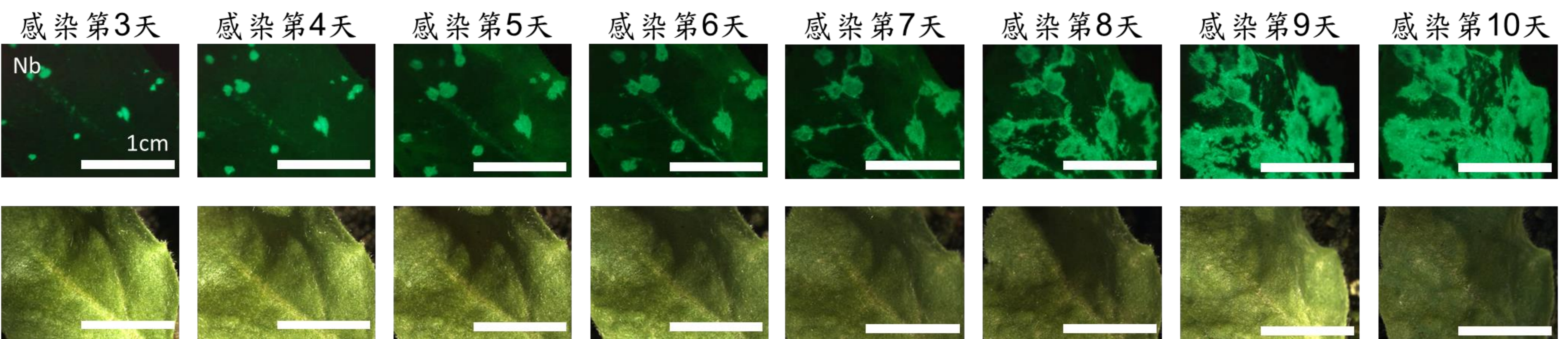


TuMV-GR 感染10天

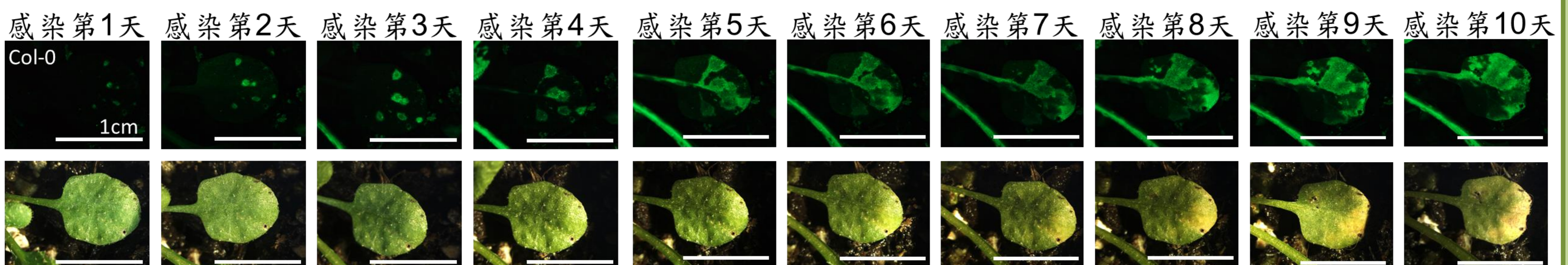


實驗(二)：以螢光顯微鏡觀察 TuMV-GR 病毒擴散情形。

• 菸草：

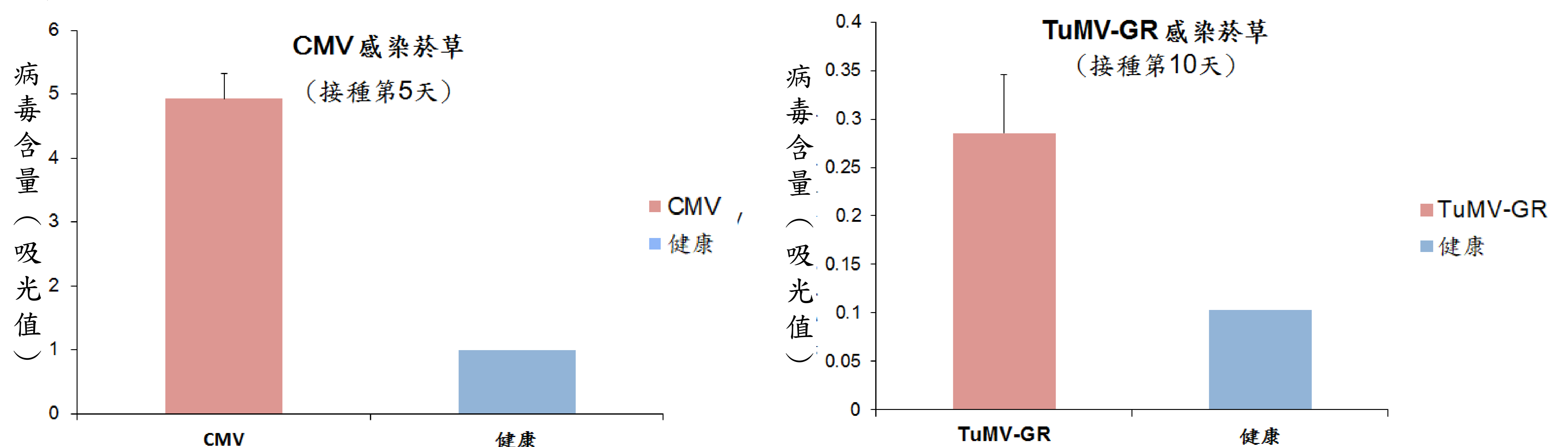


• 阿拉伯芥：

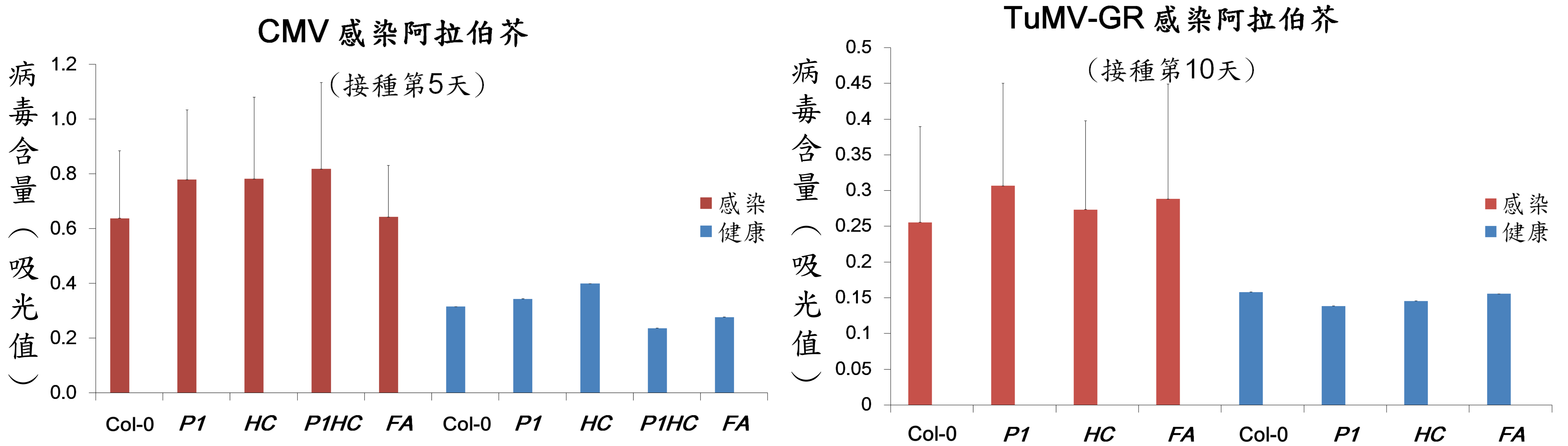


實驗(三)：藉由間接式 ELISA 技術檢測植物是否有受到病毒感染。

• 菸草：

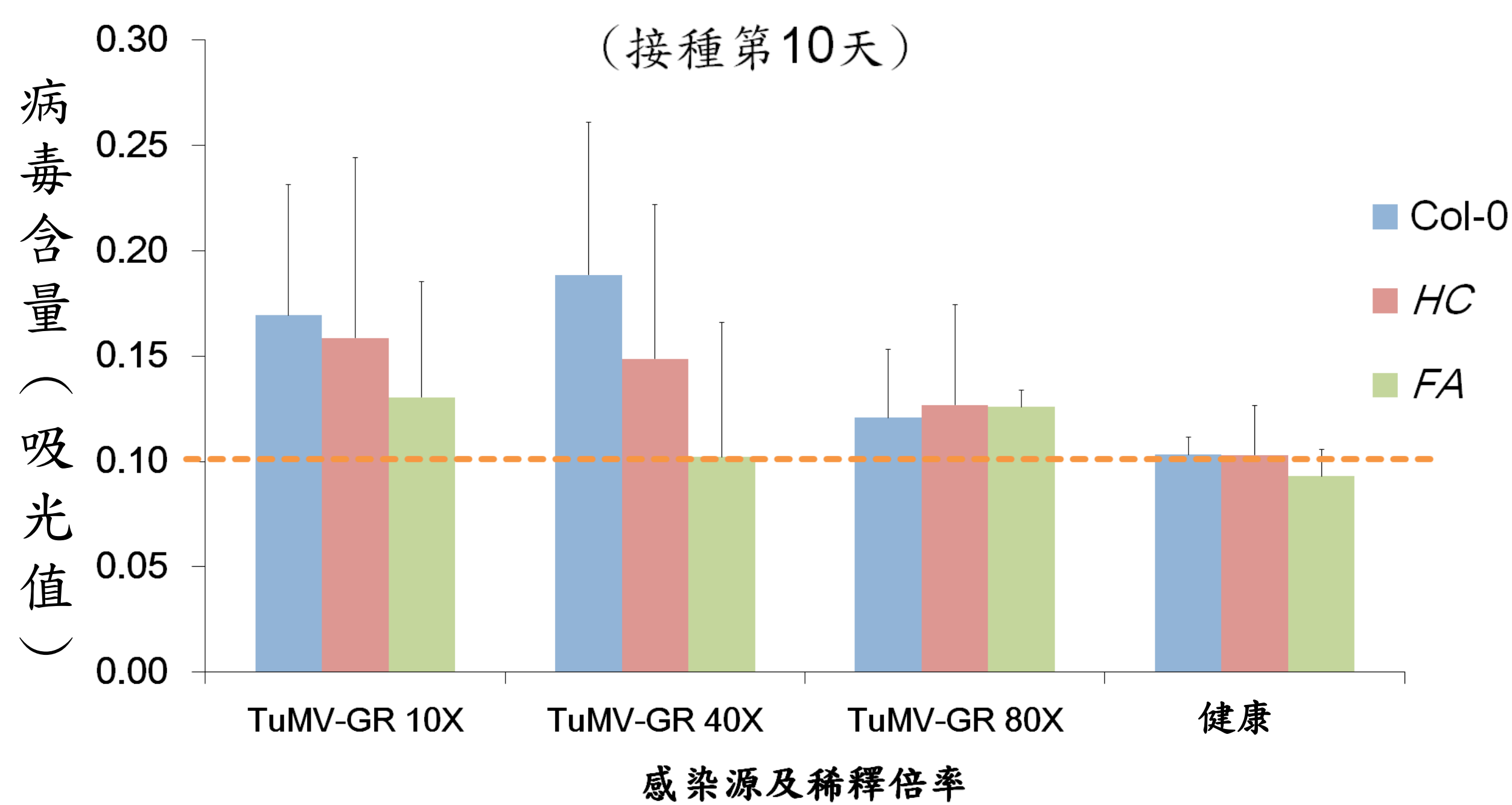


• 阿拉伯芥：

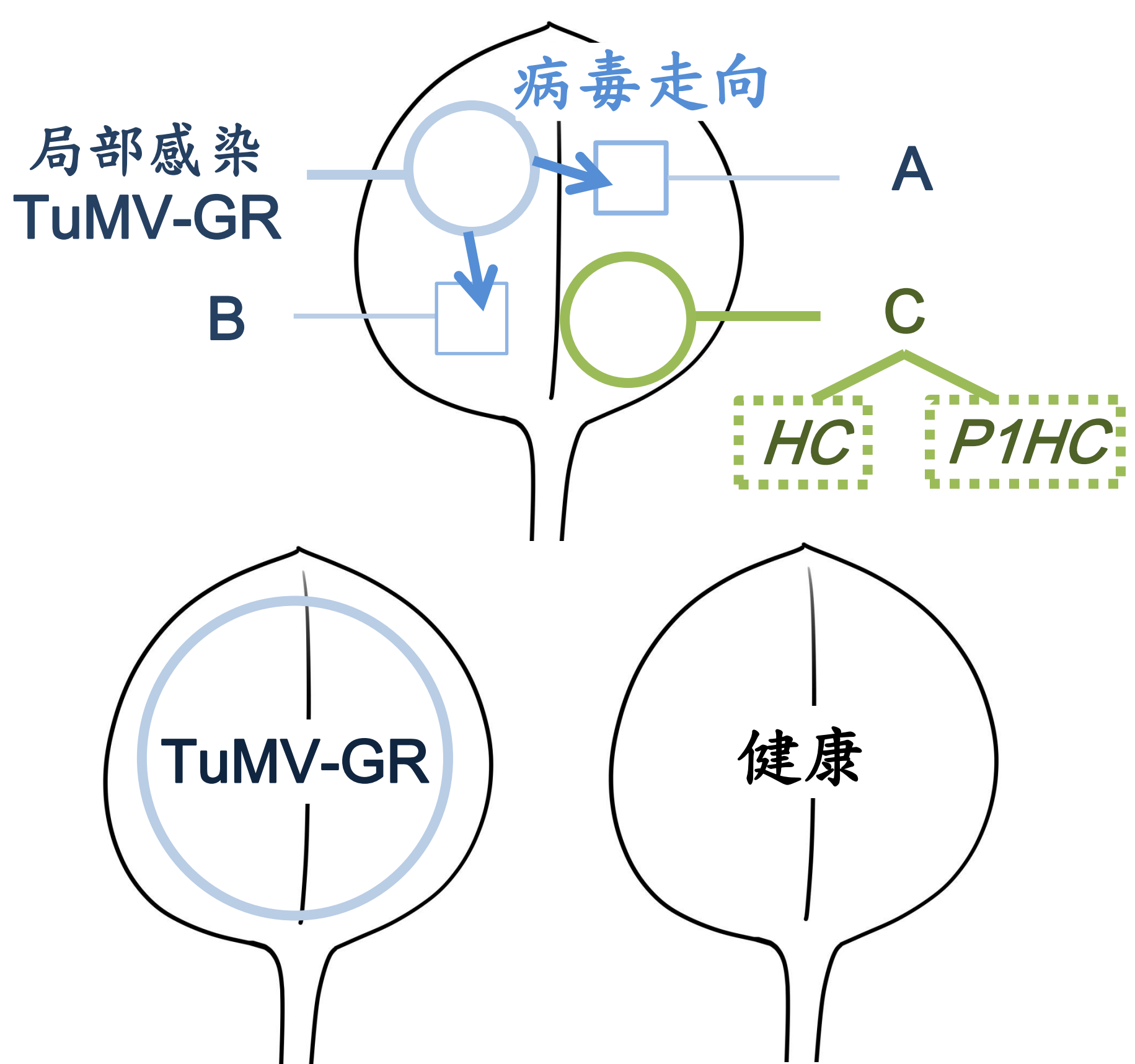


實驗(四)：改變接種源稀釋倍率，觀察接種成效

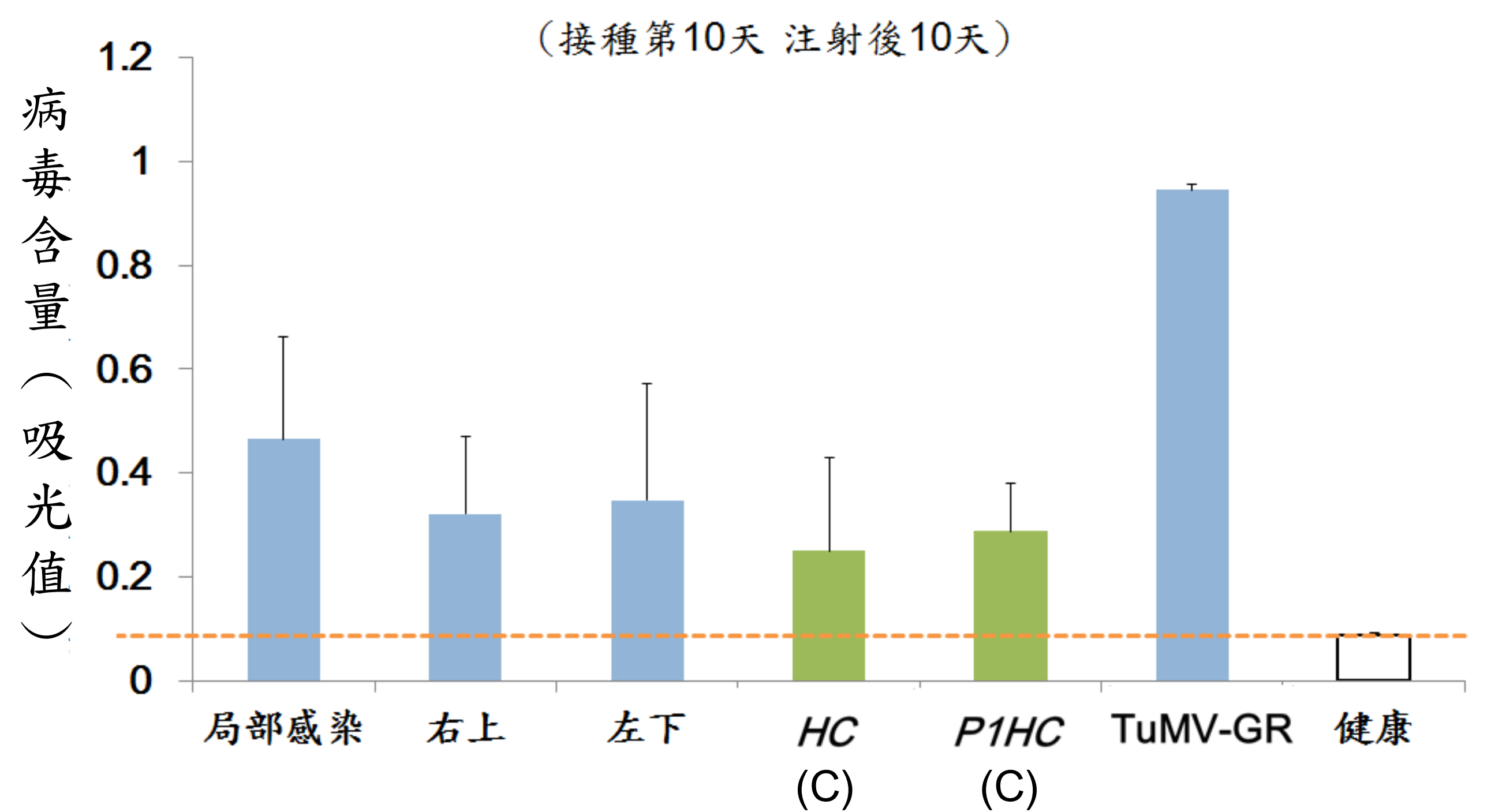
不同稀釋倍率的感染源



實驗(五)：以農桿菌將病毒基因轉入植物體中，以了解植物與病毒間的互動



利用農桿菌檢測植株抗病性



討論

實驗一：觀察 CMV 及 TuMV-GR 病毒在植物之感染表徵

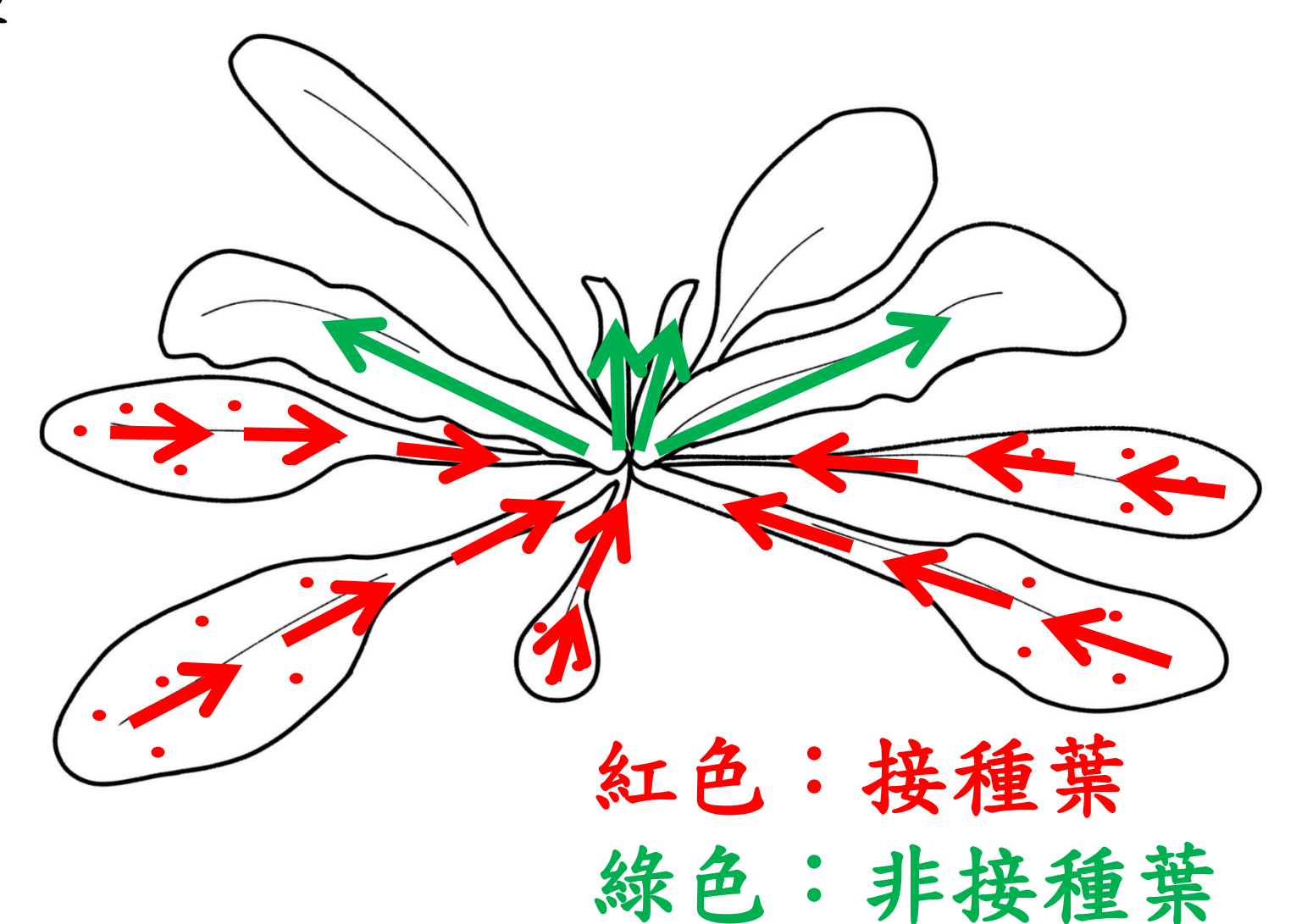
- (一) 接種胡瓜嵌紋病毒及蕪菁嵌紋病毒對植物之影響
- (二) 植物照顧不妥對於接種病毒之影響
- (三) 根據病毒發病速度調整阿拉伯芥感染天數

實驗二：觀察病毒擴散情形

實驗三：比較不同植株間病毒含量

實驗四：比較不同濃度感染源之影響

實驗五：暫時性表現病毒的基因於葉片，觀察葉片發病情形



結論

1. 病毒會由傷口進入植物體內，自接種處延伸並透過維管束轉移，感染整顆植株。
2. 病徵：遭受胡瓜嵌紋病毒感染的植株葉片黃化、葉形變異、葉緣捲曲以及個體矮化。感染蕪菁嵌紋病毒的植株葉片出現皺縮，甚至呈現區塊性黃化及矮化等現象。
3. 植物接種成果：圓葉菸草由於是易感植物，無論是病徵或病毒含量，都有良好的成效。轉基因阿拉伯芥沒有出現預期的抗病效果，故推測將這兩段病毒基因轉殖入植物體無法使植物獲得抵抗病毒的能力。