

摘要

番茄的土壤傳播性病害常造成作物萎凋死亡，尤其又以番茄萎凋病較難防治且無快速有效的防治方法。因此我們想研究番茄萎凋病菌與其基因，我們將已去掉 $pmc1$ 基因的番茄鐮孢菌與野生型接種於番茄植株上，觀察其表現型及計算疾病嚴重程度，發現 $\Delta pmc1$ 的番茄鐮孢菌相較於野生型的致病程度較低，當接種wild type的番茄全死光時，接種 $\Delta pmc1$ 的番茄植株還有幾盆是仍未枯萎，甚至有葉片才剛開始泛黃。除了接種於番茄植株上，我們同時配好不同濃度的鈣離子，觀察 $\Delta pmc1$ 在不同鈣離子濃度的生長情形。由實驗結果發現， $\Delta pmc1$ 在0.2M時生長情形與wild type相差最多，推論 $\Delta pmc1$ 和野生型在鈣離子濃度為0.2M時生長速度相差最多， $\Delta pmc1$ 的生長應與鈣離子有相關。

研究動機

番茄是日常生活中易取得且營養的蔬菜水果，當我們在看新聞時，發現番茄在九、十月份因高溫乾旱而導致生育異常及生長勢差，也因此影響番茄收成，災損嚴重。除了高溫影響番茄產量之外，近期在高雄也出現俗稱「瘋穢」的病蟲害，造成近半的產量銳減。我們在這些新聞中發現，病蟲害影響的產量大於氣候影響，因而想進一步了解能夠影響番茄的相關病蟲害，進一步查詢到「番茄萎凋病菌」。

查完資料後，我們想了解番茄鐮孢病菌的致病原因是否與其中一段基因有關，因此找到相關實驗室，希望能在尖孢鐮孢菌中的一段基因 $pmc1$ 與其致病程度找到關聯性。同時，我們在一篇論文中發現，鈣調磷酸酶在 Fol 的分生孢子、衣原體孢子形成和致病力中具有重要功能，所以我們猜測 $pmc1$ 基因的表現與鈣離子環境有關係。

研究目的

- 一、探討 $\Delta pmc1$ 的番茄萎凋病菌在 Ca^{2+} 環境中的生長情形
- 二、觀察 wildtype 及 $\Delta pmc1$ 的番茄萎凋病菌萎凋程度的差別

研究設備與器材

一、實驗生物材料

- (一) 番茄萎凋病原真菌
(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*)
 1. 野生型(wild type)
 2. 突變型($\Delta pmc1$)
- (二) 番茄
 1. 農友 301

二、培養器材

- (一) 培養皿
- (二) 培養基
- (三) 錐形瓶
- (四) 滅菌針筒過濾器
- (五) 細菌培養箱
- (六) 震盪培養箱
- (七) 植物生長箱
- (八) 高溫滅菌釜

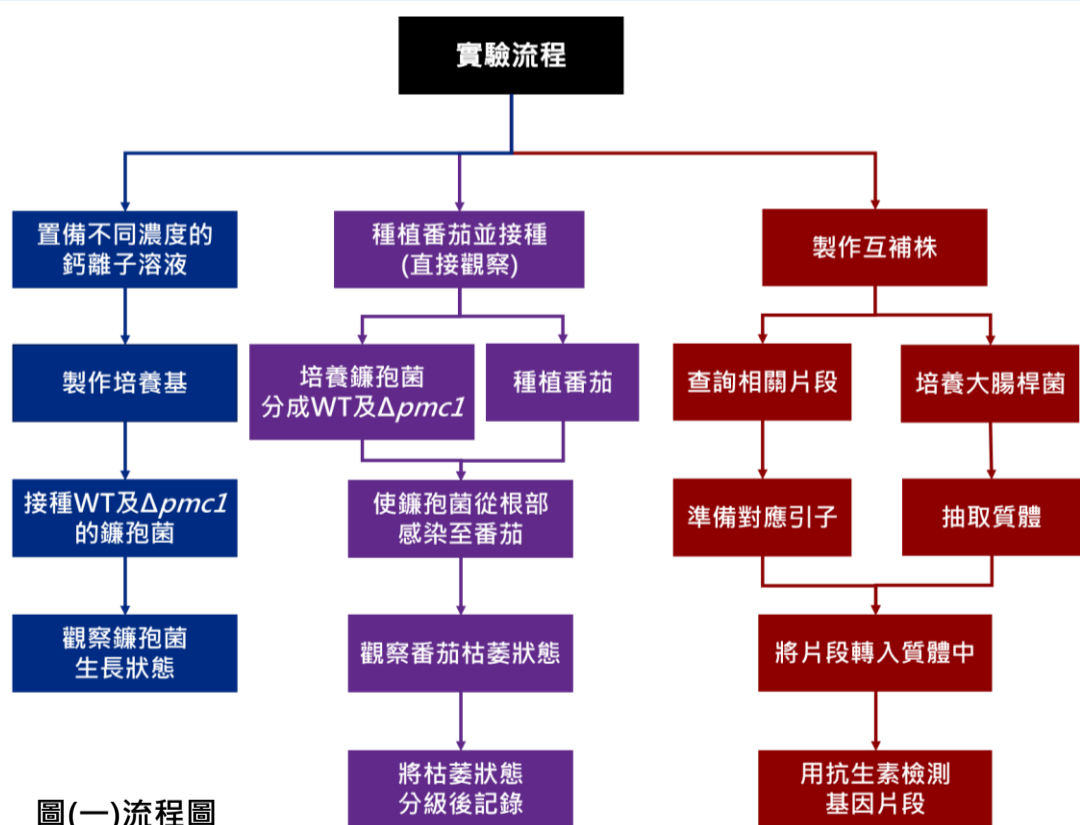
三、膠體電泳

- (一) 凝膠
- (二) 電泳
 1. 微量吸管
 2. 電泳槽
 3. 緩衝液
 4. 染劑(DNA ladder)
- (三) 照膠系統

四、PCR

- (一) DNA template
- (二) Forward primer
- (三) Reverse primer
- (四) DNA polymerase
- (五) dNTP
- (六) PCR 儀器

研究過程與方法



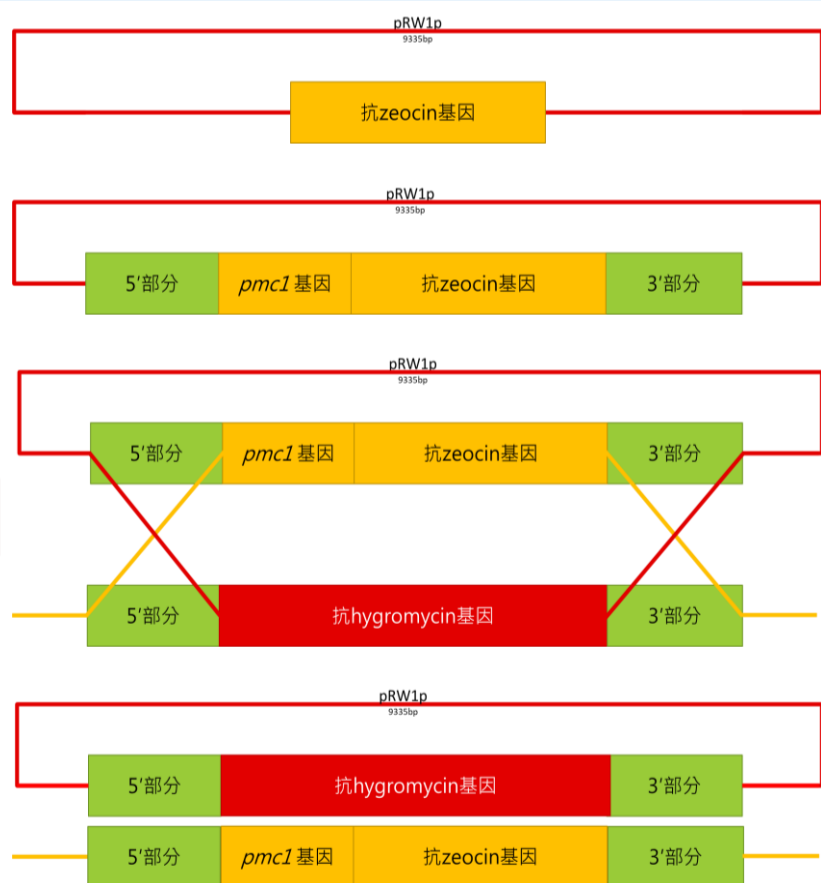
圖(一)流程圖

一、鈣離子測定

- (一) 量取不同濃度(0M、0.2M、0.4M)的鈣離子
- (二) 將配好的鈣離子溶液以針筒過濾器過濾
- (三) 將過濾完的鈣離子溶液加培養液倒入培養皿中
- (四) 觀察在不同鈣離子濃度的情況下，鐮孢菌的生長情況

二、將wildtype及 $\Delta pmc1$ 接種至番茄植株上觀察

- (一) 培養番茄幼苗
- (二) 放置一到兩週待其發芽
- (三) 將幼苗移至花盆
- (四) 製作鐮孢菌液
- (五) 放入37°C培養箱懸浮培養4天
- (六) 番茄植株接種鐮孢菌
- (七) 靜觀其生長狀況



圖(二)互補株原理示意圖

三、製作互補株

(一) 準備DNA片段

查詢需要編輯的 DNA 片段，並準備對應引子，本次實驗使用的引子對分別為：JC2124 / JC2395 和 JC2130 / JC2131

(二) 純化 DNA

(三) 抽質體

(四) 基因片段載體合併

(五) 將已完成質體植入大腸桿菌內

(六) 將大腸桿菌裡的 DNA 純化以後再次進行電泳以確定質體大小是否符合

(七) 同源重組互換

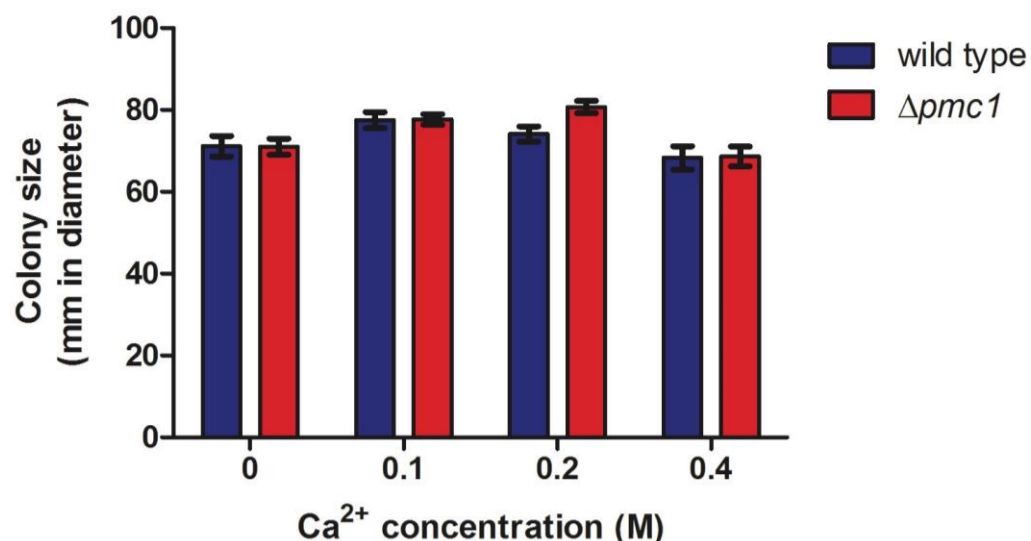
研究結果

一、在不同濃度的鈣離子環境中鐮孢菌的生長情形

鐮孢菌種類 Ca ²⁺ 濃度	WT	$\Delta pmc1$
0M		
0.2M		
0.4M		

表(一)菌落比較圖

- (一) 可以觀察到在0.4M下生長的鐮孢菌相較於未含有鈣離子以及0.2M濃度鈣離子的培養基中生長得更緩慢
- (二) 量出各盤菌落生長大小，運用資料分析軟體(PRISM生物統計軟體)繪出下圖(二)
- (三) 由圖(二)可明顯發現當濃度為0.2M時，wildtype以及 $\Delta pmc1$ 的生長情形相差最多。



表(二)菌落大小長條圖

二、番茄植株接種結果

- (一) 植物枯萎程度分級：接種鐮孢菌的番茄會有葉片枯黃的症狀

我們將疾病指數等級分為下列五個等級

0 = 無症狀

1 = 一到三片黃葉但未枯萎

2 = 至少四片黃葉但只有一到兩片枯萎

3 = 至少四片黃葉和三片枯葉

4 = 所有維管束都變成棕色，植物枯萎或死亡

- (三) 實驗結果

1. 第一次實驗結果

種類 棵數	WT	$\Delta pmc1$	ddH ₂ O
第一棵	4	4	0
第二棵	4	4	0
第三棵	4	4	0
第四棵	4	4	0
第五棵	4	4	0
第六棵	4	4	0
第七棵	4	3	0
第八棵	4	2	0
第九棵	4	2	0
第十棵	4	2	0
第十一棵	4	1	0
疾病嚴重程度	77%		

表(三)

- (二) 植物疾病嚴重程度指數

$$\frac{\sum(\text{number of plantlet symptomatic plants} \times \text{disease grade})}{\text{total number of disease scale} \times \text{maximum disease grade}} \times 100\%$$

植物疾病嚴重程度指數：計算方式為「每種疾病程度乘以株數的總和」除以「總株數乘以最嚴重的疾病等級」

2. 第二次實驗結果

種類 棵數	WT	$\Delta pmc1$	ddH ₂ O
第一棵	4	3	0
第二棵	4	4	0
第三棵	4	2	0
第四棵	4	4	0
第五棵	4	4	0
第六棵	4	2	0
第七棵	4	1	0
第八棵	4	4	0
第九棵	4	4	0
第十棵	4	4	0
疾病嚴重程度	80%		

表(四)

註：第二次結果植株的編號順序對應到下頁表(五)接種前後對比圖

- (四) 植物接種前後比較圖

時間	種類	WT	$\Delta pmc1$	ddH ₂ O
接種前				
接種兩週後				

表(五)

- (五) 第一次實驗以及第二次實驗結果：

我們發現 $\Delta pmc1$ 的疾病嚴重程度小於接種wild type，因為接種 $\Delta pmc1$ 的植株並非完全無枯萎，只是相較wild type的枯萎較少，所以我們由此推測 $pmc1$ 應與wild type致病力有部分關聯。

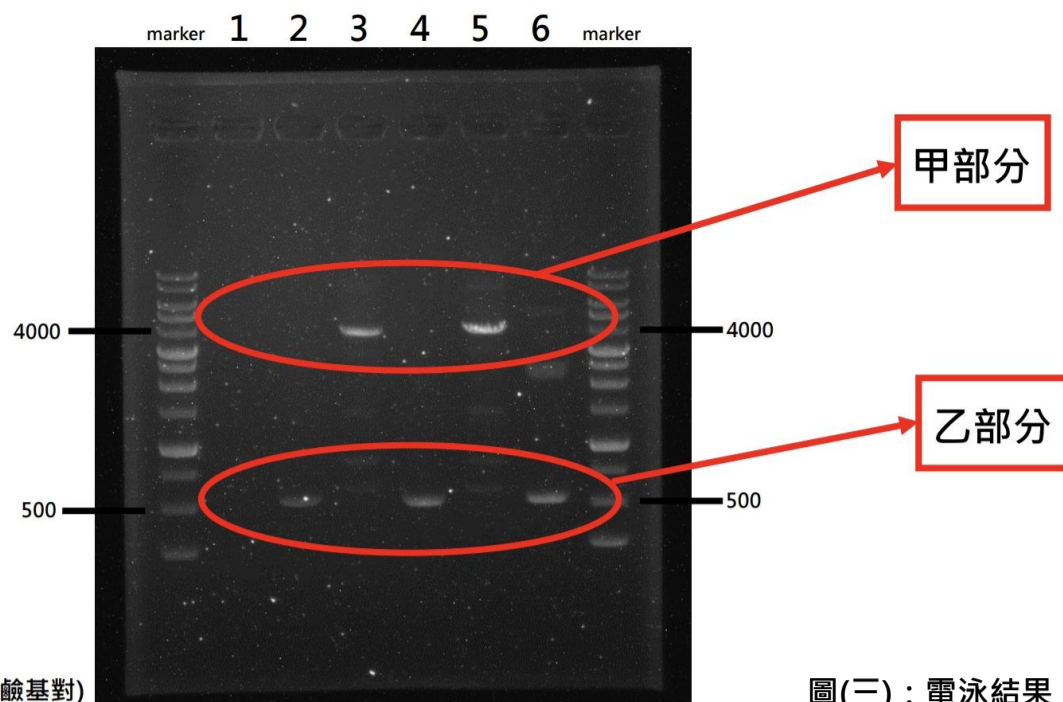
三、準備DNA片段的電泳結果

(一) 電泳結果

如右圖

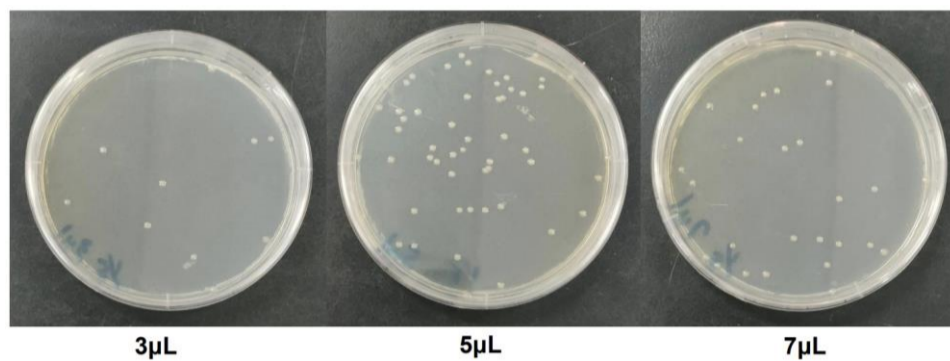
1. 甲部分為約4000鹼基對長度的DNA片段，對應的引子序號為JC2124 / JC2395
2. 乙部分為500-600鹼基對長度的DNA片段，對應的引子序號為JC2130 / JC2131，第一個樣本沒有複製到片段，而第二個樣本數量不足
3. 後續實驗採用第3-6組樣本

(單位：鹼基對)



圖(三)：電泳結果

四、將已完成質體植入大腸桿菌內的電泳結果



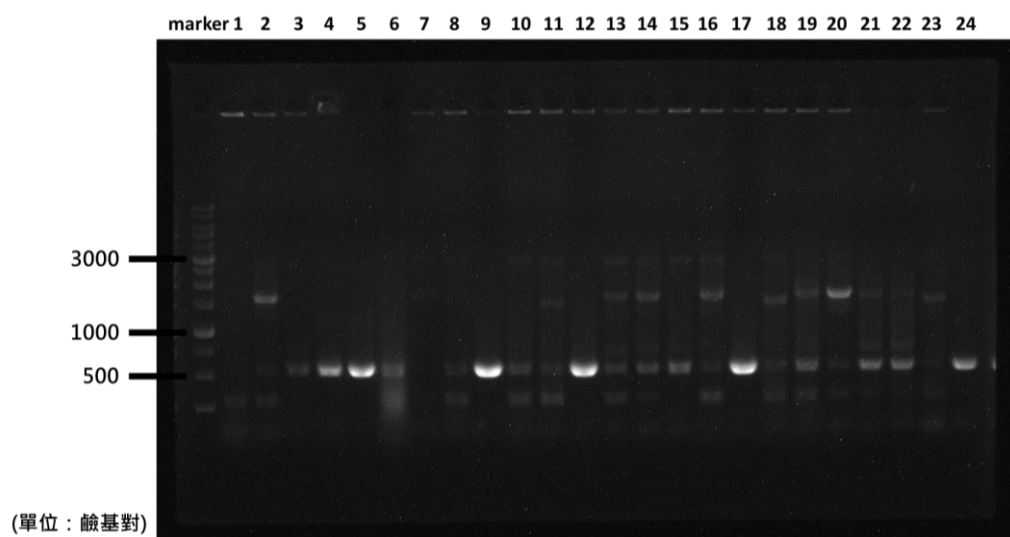
圖(四)培養結果

(一) 培養結果

1. 如左圖(四)：我們將已植入質體的大腸桿菌用含有抗生素的LB固態培養基進行篩選，以確保質體內的基因可正常表現
2. 圖中標出的容量為使用重組DNA多寡，可以發現使用5μL的重組DNA能生成最多菌落

(二) 電泳結果

1. 如左圖(五)使用菌落的基因電泳結果，在生存下來的質體內樣本越亮代表目標基因含量越高，較暗的部分則基因含量不多
2. 挑選編號4、5、9、12、17、21、22繼續進行後續的實驗



(單位：鹼基對)

圖(五)電泳結果

結論

- 一、由 $\Delta pmc1$ 在不同 Ca^{2+} 濃度環境中的生長情形結果可知 wild type 和 $\Delta pmc1$ 在濃度為0.2M的鈣離子濃度中生長情形差異最大。
- 二、由觀察wild type及 $\Delta pmc1$ 接種至番茄植株上的疾病程度，發現接種 $\Delta pmc1$ 的疾病嚴重程度小於wild type，我們推測 $pmc1$ 應與 wild type 致病力有部分關聯，在實驗中 $pmc1$ 全枯萎的時間會較 wild type 長，但仍舊會導致植株死亡。

未來展望

- 一、 $\Delta pmc1$ 與 wild type 在鈣離子環境中生長情形差異不明顯，可以試著換成其他離子（例如：鈉離子）看看是否會有更顯著的差異，也能使我們更加了解此基因
- 二、番茄鐮孢菌 $\Delta pmc1$ 的確會使番茄疾病嚴重程度在同時間內相較於 wild type 下降，未來若要使結果更加準確，可改為「每天」記錄，能更加了解萎凋差異
- 三、本研究目前已進行到製作互補株，將含有互補基因的質體放入大腸桿菌內且培養成功，未來進一步可將互補的鐮孢菌接種至番茄植株上，則可觀察缺失的 $pmc1$ 接回後的鐮孢菌對於番茄植株的萎凋狀況是否與 wild type 相同，並確定番茄萎凋與 $pmc1$ 的關係。若在未來能夠成功完整製作互補株且將其接種在番茄上並觀察，我們便能藉此實驗更加了解 $pmc1$ 的功能。

參考資料

- 一、Calcineurin Regulates Conidiation, Chlamyospore Formation and Virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* - PMC (nih.gov)
- 二、蕃茄的營養成分::台灣癌症基金會 (canceraway.org.tw)
- 三、樂活營養師 - 蕃茄 (foodcare.com.tw)
- 四、蕃茄萎凋病之防治 | 有機農業全球資訊網 (organic.org.tw)
- 五、蕃茄是蔬菜還水果？原來蕃茄營養功效這麼多 - Hello 醫師 (helloyishi.com.tw)