

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060007

參展科別 植物學

作品名稱 以菸草探討電擊對植物免疫的影響

得獎獎項 二等獎

美國ISEF正選代表

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳怡旻、葉信宏

作者姓名 賴劭均、李馥如

關鍵詞 電擊、水楊酸、植物免疫

作者簡介



大家好，我們是李馥如和賴劭均，目前就讀北一女中科學班。專題研究是一個辛苦卻收穫滿滿的旅程，我們也在其中體會研究的態度和做實驗的樂趣。很高興在高三時有幸能站上國際科展的舞台，感謝辛苦指導的葉信宏教授、陳怡旻老師和張立學長，讓我們在高中時留下美好的回憶。

摘要

農作物常遭受病毒攻擊，造成重大經濟損失，但傳統的化學藥劑無法有效抑制病毒，且易殘留汙染環境。本研究旨在利用物理性的電擊模擬外界刺激，進而探討電擊對植物啟動水楊酸主導免疫反應的影響。實驗中以 10 伏特的電壓電擊菸草 10 分鐘，能使圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)的水楊酸標誌基因 *PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1(PRI)* 表現量提升，並使菸草鑲嵌病毒 (tobacco mosaic virus ; TMV) 的感染斑點數下降。顯示電擊處理可以誘導水楊酸所主導的免疫反應，並增強整體抗病毒性。另外，相較於未電擊過的菸草，電擊後的菸草系統葉在接種 TMV-GFP 後 *PRI* 基因表現量提升，表示電擊可能對菸草系統性水楊酸相關抗性表現產生預起效應(priming)，可以幫助植物對抗未來的病毒感染。

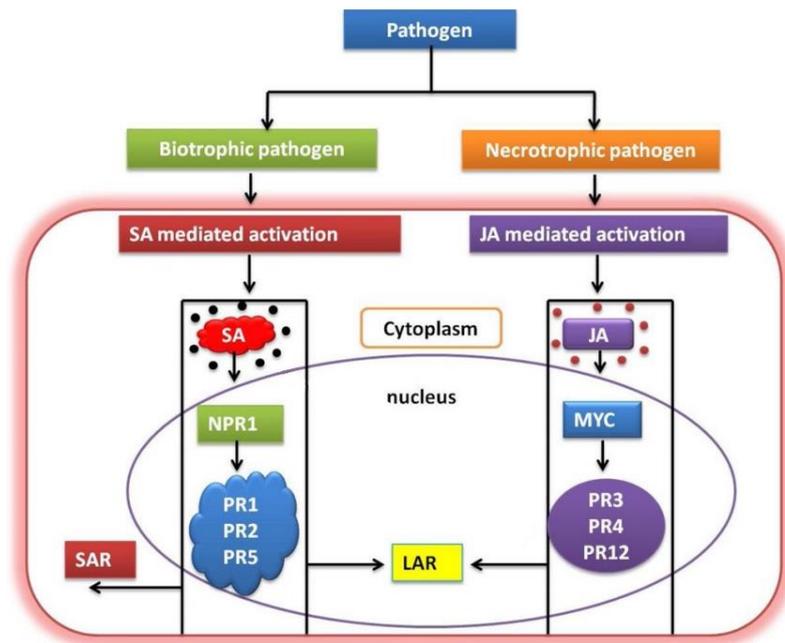
Crops are often suffered from viral infection, causing large economic loss. However, traditional chemicals cannot effectively control the viral infection and often remain in the environment. Here, we aim at using an electric shock, which is a physical method, to simulate external stimulation and analyze the effects of electric shock on the activation of salicylic acid (SA)-mediated immune response in plants. According to our results, giving a ten-volt electric shock on *Nicotiana benthamiana* for ten minutes can increase the expression of SA marker gene, *PRI*, and decrease TMV-induced lesions on leaves. It showed that electric shock can induce the SA-mediated immune response and improve virus resistance. In addition, after giving an electric shock and TMV inoculation, *PRI* expression in the systemic leaf increased as compared to control plants without electric shock. It indicated that electric shock may induce priming of systemic expression of SA-mediated immune gene, which can help plants defend against virus infection in the future.

壹、前言

一、研究動機

農作物常遭受各種病原菌攻擊，造成重大經濟損失。病原菌主要分為真菌、細菌、病毒及線蟲四大類(Peter and John, 2010)，傳統的農法大多以化學性方法進行病害防治，目前已能利用化學藥劑有效控制真菌、細菌及線蟲。然而，對於病毒這種內部寄生性的病原菌，至今仍缺乏實用的化學藥劑來控制感染。根據統計，全球平均每年受病毒感染造成的農作損失高達 300 億美元 (Sastry and Zitter, 2014)，因此如何有效防治植物病毒仍是一個重要且急迫的課題。

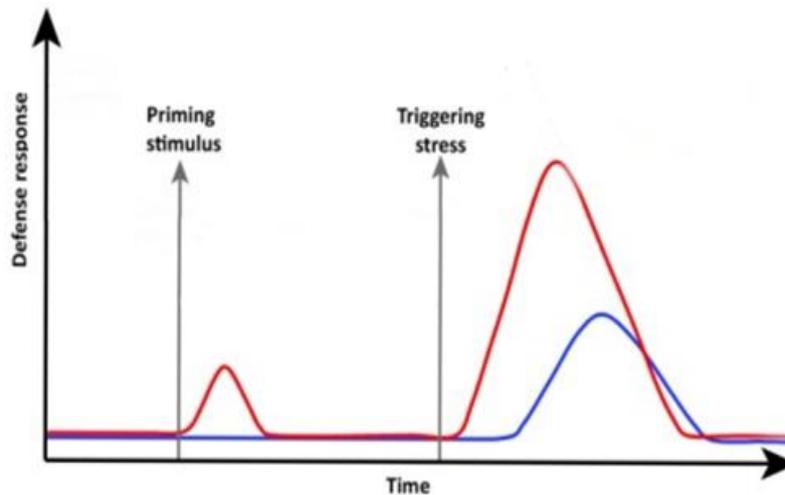
在化學藥劑無法有效控制病毒感染的情況下，引起植物自身的免疫反應來預防病毒入侵，是一種可能有效的防治策略。植物可以利用不同荷爾蒙來對抗不同病原菌，像是由茉莉酸(jasmonic acid；JA)主導的免疫反應，能對抗壞死性病原菌(necrotrophic pathogen)，而由水楊酸(salicylic acid；SA)主導的免疫反應，能對抗生物營養性的病原菌(biotrophic pathogen)，包括病毒(圖一)(Daniel et al., 2018)。水楊酸主導的免疫反應不只能引起區域獲得性抗性(local acquired resistance；LAR)，還能引起系統獲得性抗性(systemic acquired resistance；SAR)(圖一)。當生物營養性病原菌入侵植物後，會引起細胞中水楊酸的累積，進而活化水楊酸路徑中重要調節子 NPR1(NONEXPRESSOR OF *PR* GENES1)，來啟動下游的 *PR* 基因(*PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN GENES*)，其中也包括 *PR1*。這個免疫反應發生於受病原菌感染的葉片，稱為 LAR，接著水楊酸引起的免疫訊號會經由維管束傳遞至系統葉，引起全株的抗病基因表現並提升免疫力，稱為 SAR(圖一)(Sajad et al., 2018)。



圖一、植物受生物營養性病原菌(biotrophic pathogen)與壞死性病原菌

(necrotrophic pathogen) 感染後的免疫反應。當植物受到病原菌感染，會在局部產生荷爾蒙累積，如水楊酸(SA) 與茉莉酸(JA)，並啟動 NPR1 及 MYC 以活化抗性基因(PRs)，最終產生不同的免疫反應。包含區域獲得性抗性(local acquired resistance；LAR)及系統獲得性抗性(systemic acquired resistance；SAR)，讓整株植物產生抗性(Sajad et al., 2018)。

除了 SAR，我們也想引起類似預防針的效果，透過預先刺激，讓植物在未來遇到病毒時引發更強的免疫反應。預起效應(priming)是一種生理機制，使植物在面對逆境時能啟動更快或更強的免疫反應(圖二)。目前能夠促使植物進入這樣的警戒狀態的因子包含病原體、根部有益微生物、天然物質、合成化合物等(Martinez-Medina et al., 2016)。若刺激能對系統性水楊酸相關抗性表現產生 priming，便能預先使植物進入警戒狀態，在未來遭病毒感染時引起更強且更快的免疫反應。



圖二、植物的 priming 曲線(Martinez-Medina et al., 2016)。圖中縱軸為免疫反應程度，橫軸為經過時間。紅色線為植物接受兩次刺激的防禦反應程度曲線，可以看到植物接受第一次外界刺激時，會引起防禦反應，而在接受第二次的刺激時，會引起更大程度的防禦反應，此現象稱為 priming。藍色曲線是未經第一次外界刺激的訓練，只有接受第二次的刺激，同樣也會引起防禦反應，但與紅色線相比，反應速度較慢，且防禦反應程度較小。

本研究的目標是提升植物水楊酸主導的免疫反應以防治病毒。過去研究發現，電擊能促進植物的發芽、生長、次級代謝物的合成等，如增加植株高度與葉片重量(Al Taweel et al., 2018；Dannehl, 2018)，亦能用來防治植物蟲害，殺死幼蟲並降低卵的孵化率(Al-Hakeem et al., 2020)。另外，微弱的電擊不會殺死細胞，和生物營養性的病毒帶來的刺激相似，因此我們認為以電擊刺激植物，或許能誘發免疫反應來對抗病毒。除此之外，現今化學性的防治方法易殘留在作物及環境中，影響人體並衝擊環境，物理性的電擊處理不會在環境中遺留物質，對環境較為友善。

本研究以圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)探討電擊對植物免疫的影響。圓葉菸草的莖及葉柄比同為模式生物的阿拉伯芥粗壯，較能夠承受電擊的刺激，且與許多農作物同屬茄科，如馬鈴薯、番茄、辣椒等。藉由對菸草的實驗，希望能夠方便發展在農業上的應用。

我們以不同電壓電擊菸草後，以即時定量聚合酶連鎖反應(Quantitative real time polymerase chain reaction；qPCR)分析電擊後不同時間葉片中水楊酸標誌基因 *PR1* 的表現量，了解電擊能否引起水楊酸主導的免疫反應，並最佳化電擊條件。之後接種帶有綠色水母螢光蛋白(green fluorescent protein；GFP)的基因改造菸草鑲嵌病毒(tobacco mosaic virus；TMV)，在接種後不同天數觀察感染情形，來了解電擊能否增強菸草對病毒的抗性。接著我們以電擊做為第一次刺激，並在電擊後接種 TMV-GFP 作為第二次刺激，在接種後的不同時間點以 qPCR 分析 *PR1* 的表現量，比較電擊與未電擊的菸草面對第二次刺激時免疫反應的啟動時間與強度，探討電擊能否對系統性水楊酸相關抗性表現產生 priming。

二、研究目的

- (一) 探討電擊能否引起水楊酸主導的免疫反應。
- (二) 最佳化此電擊的電壓條件。
- (三) 探討電擊帶來免疫提升的持續時間。
- (四) 探討電擊能否有效降低病毒感染。
- (五) 探討電擊能否對系統性水楊酸相關抗性表現產生預起效應(priming)。

貳、研究過程或方法

一、設備及器材

(一) 植物培養

設備：恆溫植物生長室、日光燈、盆栽、圓葉菸草

(二) 電擊

設備：供電裝置、銅線、鱷魚夾、三用電表

(三) 採收樣本並萃取 mRNA

1. 設備：pipet、微量離心管、離心機、恆溫箱、Vortex-Genie、NanoDrop、錐形瓶、微波爐、齒梳、鑄膠盤、保鮮膜、電子秤、供電裝置、電泳膠片影像分析系統
2. 藥品：液態氮、TRIzol reagent、chloroform、ethanol、isopropanol、Agarose、Loading dye、EtBr、10X TURBO DNase Buffer、DNase、inactivation reagent、50X TAE buffer、Nuclease-Free Water、Distillation-Distillation H₂O (ddH₂O)、DNA ladder
3. 程式：以 ND-1000.V.3.8.1 測定 RNA 濃度

(四) 反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, ; RT-PCR)

1. 設備：pipet、微量離心管、八連排 PCR 反應管、離心機、Vortex-Genie、聚合酶連鎖反應儀
2. 藥品：5X Buffer (for Real Time)、Oligo dT Primer、Random 6 mers、RT enzyme Mix I、RNase Free dH₂O

(五) 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction ; qPCR)

1. 設備：Optical 96-Well Reaction Plate、Optical Adhesive Film、ABI 7500 Real Time PCR、Pipet
2. 藥品：Fast SYBR Green Master Mix、*Actin* primer、*PRI* primer、ddH₂O
3. 程式：以 7500 Software 設定 qPCR 階段

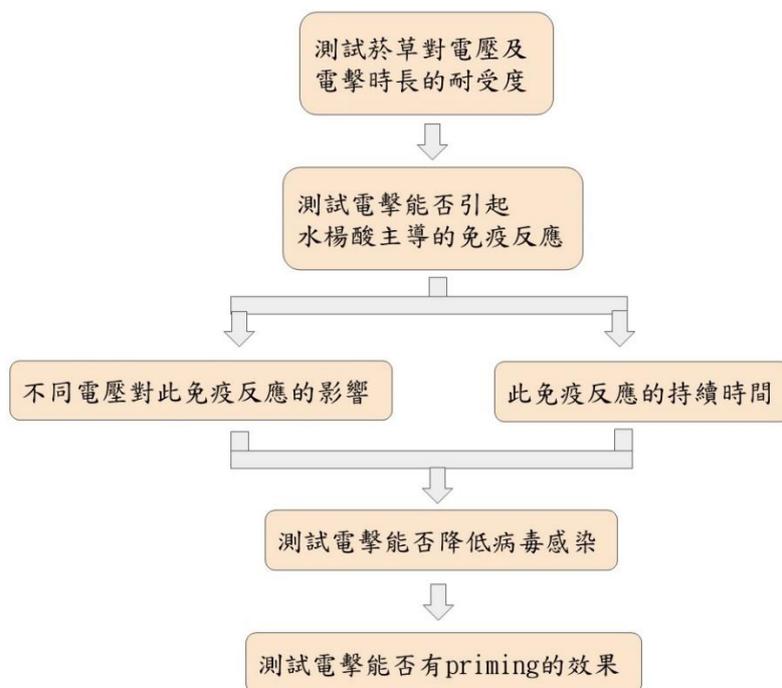
(六) 接種帶有綠色水母螢光蛋白的菸草鑲嵌病毒(TMV-GFP)

1. 設備：研鉢、研杵
2. 藥品：磷酸鉀(KP)、金鋼砂、已被 TMV-GFP 感染的葉片

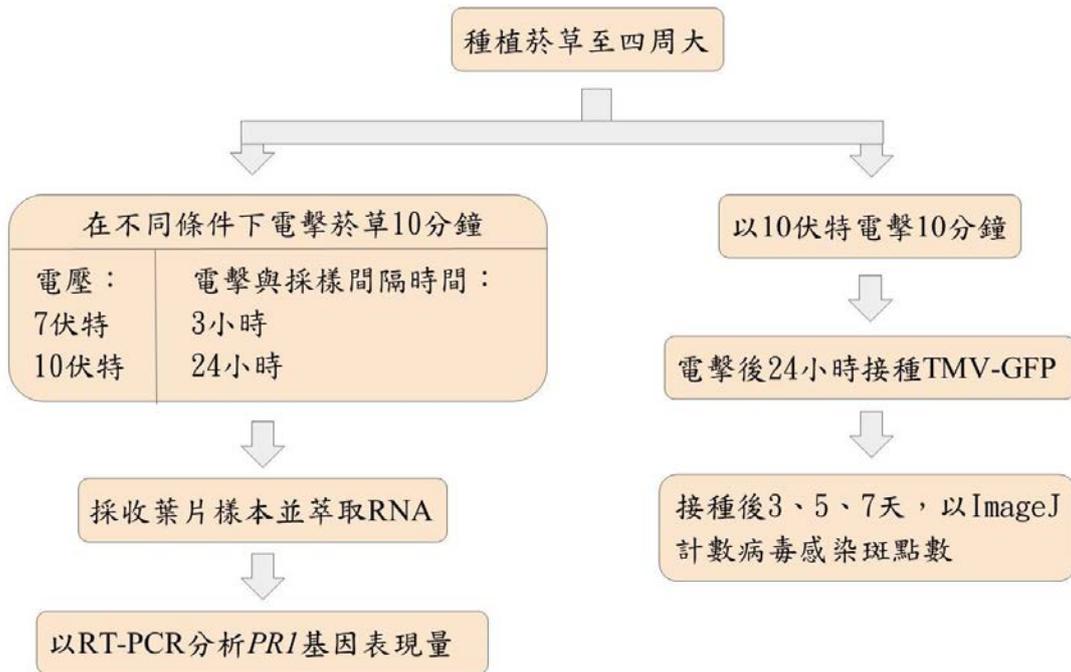
(七) 觀察 TMV-GFP 感染情形

1. 設備：紫外線燈、照相機
2. 程式：以 ImageJ 計數病毒感染斑點數

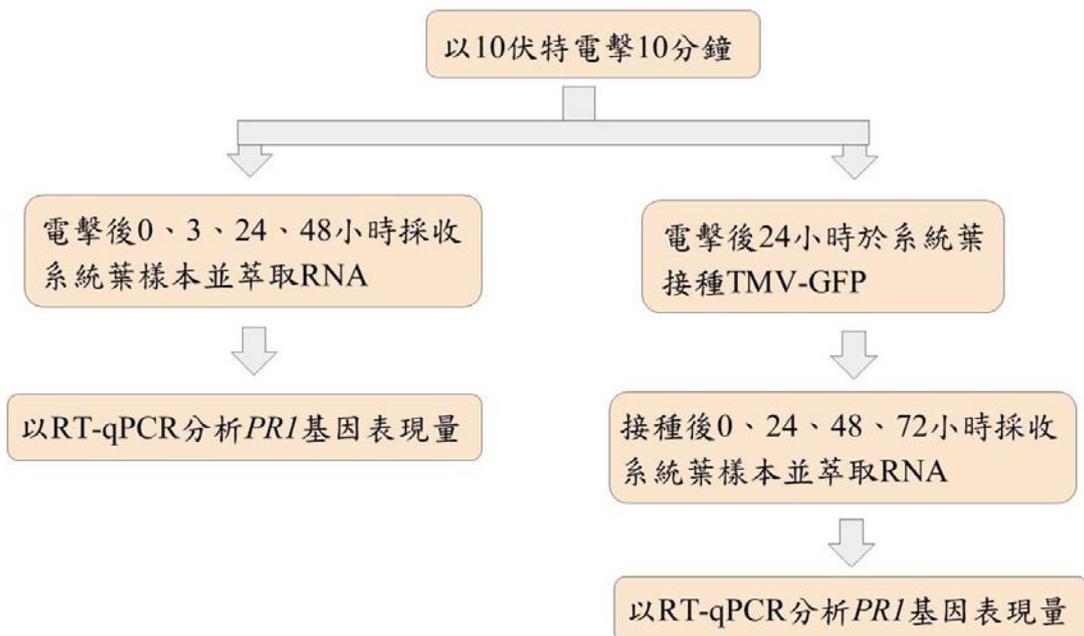
二、研究流程



圖三、研究架構圖



圖四、「探討電擊能否引起水楊酸主導的系統性免疫」實驗流程圖



圖五、「探討電擊能否對系統性水楊酸相關抗性表現產生 priming」實驗流程圖

二、研究方法

(一) 種植菸草

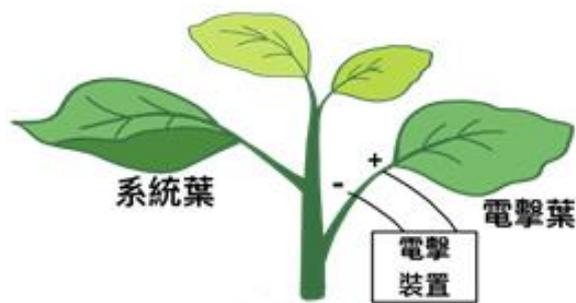
實驗對象圓葉菸草 (圖六)培養在恆溫 25°C 的植物生長室中。經過測試，我們選用生長至四周大的菸草，因為此階段才較能承受電擊的刺激。



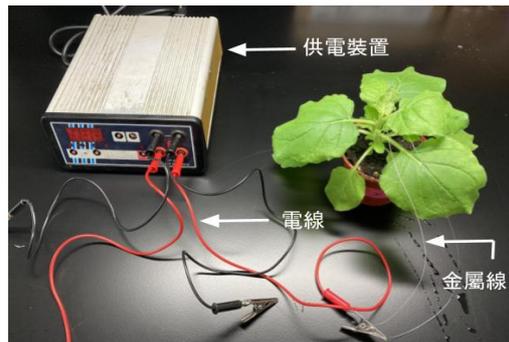
圖六、四周大的圓葉菸草

(二) 電擊菸草

將 0.3 mm 的銅線插入菸草電擊葉的葉柄中，正極在近葉片端，負極在近莖端，兩極間相距約 1 cm(圖七)。我們將電擊設備(圖八)搬運至植物生長室進行實驗，而不是搬運菸草到實驗室，避免途中環境條件的改變預先造成刺激，以確實控制變因。實驗電擊菸草第二片成熟葉，是為電擊葉，大約是從上往下數的第四片葉子；另選用電擊葉的上一片葉為系統葉(圖七)。系統葉較電擊葉晚長出來，可以代表未受電擊處理的上位葉，若在系統葉中能看到免疫基因表現量提升，就代表免疫訊號能向上傳遞，啟動全株的系統性免疫。



圖七、電擊示意圖



圖八、電擊設備

(三) 採收葉片樣本及 RNA 萃取

1. 抽 RNA

在電擊後的 3 或 24 小時，採收電擊葉及系統葉樣本各 0.1 g，分別裝入微量離心管，並凍入液態氮中。用研磨棒磨碎樣本後，加入 900 μ L TRIzol reagent，再以 rcf 12000 g 4°C 離心 5 分鐘。吸取上清液置入新的微量離心管，放置 5 分鐘後，加入 200 μ L chloroform，再放置 2 到 3 分鐘，以 rcf 12000 g 4°C 離心 15 分鐘。吸取上清液置入新的微量離心管，並加入 500 μ L isopropanol，在 4°C 下放置 10 分鐘後，以 rcf 12000 g 4°C 離心 10 分鐘。將上清液倒入廢液桶中，加入 1 mL 75%酒精，以 rcf 12000 g 4°C 離心 5 分鐘後，再次倒掉上清液。以迷你微量離心機 spin down 後，吸出剩餘上清液。將微量離心管放入加熱器，在 55°C 下加熱 2 分半後，加入 50 μ L Nuclease-Free Water，再放入加熱器中，在 55°C 下加熱 10 分鐘。微量離心管中液體即為樣本 RNA。

2. 確認 RNA 濃度

吸取 2 μ L 的 RNA 樣本放在 NanoDrop 上，測其 230 nm、260 nm 及 280 nm 的吸光值，記錄每管濃度。

為了確保 RNA 樣本的純度，以凝膠電泳進行測定。秤取 0.45g agarose 加入 30 mL TAE buffer 中。用微波爐加熱使其完全溶解後補

水至原重。再將混合液倒至鑄膠盤中，並插上齒梳。放置約 1 小時使膠體完全凝固，拔掉齒梳。將膠放入電泳槽中，並加入 TAE buffer 蓋過凝膠。在凝膠的第一格中加入 5-7 μL DNA ladder，並將 3 μL Nuclease-Free Water、1 μL Loading dye 與 1 μL RNA 樣本的混合液加入凝膠的其他格中，以 120 V 進行電泳 25 分鐘。將跑完的凝膠放入 EtBr 染劑中浸泡約 3 分鐘，再放入二次水中退染 3 分鐘。最後將凝膠放在電泳膠片影像分析系統中，照紫外線，並拍照記錄。

3. 去除樣本中殘留的 DNA

測完 RNA 樣本濃度後，在樣本管內加入十分之一倍樣本體積的 10X TURBO DNase Buffer 以及 1 μL DNA 降解酶，並在 37°C 下放置 1 小時。加入 4 μL inactivation reagent，以 rcf 12000 g 4°C 離心 5 分鐘。吸取上清液於新的微量離心管中。根據前面測出的 RNA 樣本濃度加 Nuclease-Free Water 稀釋，將樣本濃度保持在 1000 ng/ μL 上下。最後，將樣本放入 -80 °C 冰箱保存。

(四) 反轉錄反應(RT)

此步驟是要將 RNA 樣本經反轉錄作用合成 cDNA。取 RNA 樣本 1 μL 放入八連排中，並於每管內加入 4 μL 5X Buffer(for Real Time)、1 μL RT enzyme Mix I、1 μL Oligo dT Primer、3 μL Random 6 mers、10 μL RNase Free dH₂O。以 Vortex 震盪均勻，再用迷你微量離心機 spin down。放入聚合酶連鎖反應儀中加熱到 37°C 20 分鐘，再加熱到 85°C 5 秒鐘，冷卻到 4°C 後，從反應儀中取出 cDNA，放入 4°C 冰箱保存。

(五) 即時定量聚合酶連鎖反應 (qPCR)

我們以水楊酸免疫反應的標誌基因 *PR1* 作為 qPCR 的目標基因，並用 *Actin* 基因作為看家基因來校正。

取 96 孔盤，在每管中加入 5 μ L Fast STBR Green Master Mix、0.5 μ L Forward primer、0.5 μ L Reversed primer、3 μ L ddH₂O、1 μ L cDNA sample。以封膜封住 96 孔盤，將其放入即時聚合酶連鎖反應儀(ABI 7500 Real Time PCR)中，設定反應週期。

(六) 接種菸草鑲嵌病毒(TMV-GFP)

在研鉢中放入 0.3 g 已被 TMV-GFP 感染的菸草葉片，加入 6 mL KP 後，以杵磨碎葉片成汁液。在欲接種的葉片上灑上金鋼砂，並在葉片上順向塗抹磨碎的汁液，使葉片因刮磨造成傷口，以進行機械接種。放置五分鐘後，以清水沖洗接種的葉片，即接種完成。

(七) 觀察 TMV-GFP 感染情形

在接種後第三、五、七天觀察菸草葉片的 TMV-GFP 感染情形。實驗中採用的 TMV 帶有綠色水母螢光蛋白(green fluorescent protein；GFP)，在紫外光下會發出螢光，方便觀察病斑。將菸草放置在紫外燈下，拍照記錄菸草葉片的綠色螢光分布情形。我們利用 ImageJ 計數葉片上螢光斑點數量，並進行統計，一個螢光斑點代表一個病毒入侵繁殖，螢光斑點數愈少就表示成功入侵繁殖的病毒愈少。

參、研究結果與討論

一、測試菸草對電壓及電擊時長的耐受度

為了瞭解電擊是否會嚴重破壞維管束，我們先測試菸草對於電壓的耐受度。電源供應器能設定的最低電壓為 5 伏特，為了得到穩定電壓，我們從 7 伏特開始，以 3 伏特為單位逐步加強電擊強度，測得以 13 伏特的電壓電擊 10 分鐘會破壞維管束，造成電擊後電擊葉立刻變軟下垂(圖九)，可能會阻擾維管束中免疫訊號的傳遞，因此後續實驗以 7 伏特與 10 伏特比較不同電壓對菸草免疫反應的影響。



圖九、以 13 伏特電擊菸草 10 分鐘，箭頭處為葉柄破壞、葉片下垂的電擊葉。

我們先選擇電壓上限 10 伏特為固定電壓，延長電擊的時間以找出電擊時長的上限。分別電擊菸草 10 分鐘及 15 分鐘，在電擊後 3 小時，經 15 分鐘電擊的菸草葉片變軟下垂(圖十)，代表 15 分鐘的電擊會嚴重破壞維管束，因此後續實驗以 10 伏特電擊 10 分鐘為上限。



圖十、電擊後 3 小時的菸草，圈起處為電擊葉。左邊為以 10 伏特電擊 15 分鐘的菸草，右邊為以 10 伏特電擊 10 分鐘的菸草，可以看出經電擊 15 分鐘的菸草電擊葉葉柄變軟下垂。

二、不同電壓對菸草 *PR1* 基因表現量的影響

為了確認電擊能否引起水楊酸標誌基因 *PR1* 的表現量提升，以 7 伏特及 10 伏特電擊菸草 10 分鐘，並比較不同電壓對此表現量的影響。

表一、「不同電壓對菸草 *PR1* 基因表現量的影響」實驗設計

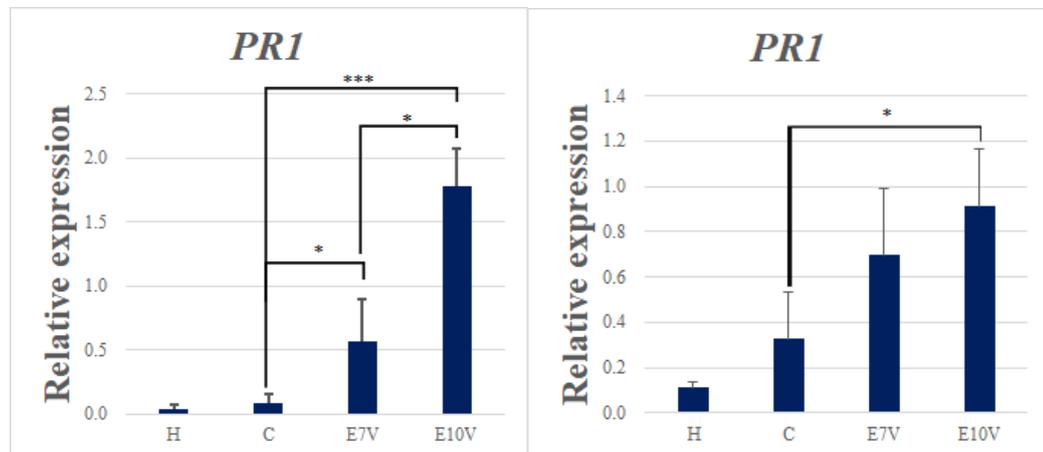
組別	處理方法
7 伏特實驗組(E7V)	以 7 伏特電擊 10 分鐘，電擊後 3 小時收樣。
10 伏特實驗組(E10V)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，電擊後 3 小時收樣。
對照組(C)	以銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，插線後 3 小時收樣。
健康組(H)	不處理，與其餘組別同時收樣。

RT-qPCR 結果顯示，以 7 伏特、10 伏特的電壓電擊後，電擊葉中 *PR1* 基因表現量提升，實驗組與對照組皆具顯著差異(圖十一 a)；在系統葉中的 *PR1* 基因表現量亦提升，10 伏特實驗組與對照組具有顯著差異(圖十一 b)。

經 10 伏特電擊的菸草，*PR1* 基因表現量皆較經 7 伏特電擊的菸草高，兩者在電擊葉中有顯著差異(圖十一 a)。另外，比較電擊葉與系統葉中的 *PR1* 基因表現量，可以發現電擊葉的基因表現量提升較系統葉明顯。這證明低電壓、短時間的電擊確實能啟動水楊酸主導的免疫反應。農業上若能運用電擊這個物理性的防治方法，引起植物自身免疫反應來對抗病毒，可以防治病毒並減少化學藥劑殘留造成的環境汙染。

(a)

(b)



圖十一、以 7 伏特(E7V)、10 伏特(E10V)電擊 10 分鐘，3 小時後菸草的 *PR1* 基因相對表現量的 RT-qPCR 結果。(a)電擊葉的 *PR1* 基因相對表現量，實驗組與對照組皆具顯著差異；(b)系統葉的 *PR1* 基因相對表現量，10 伏特實驗組與對照組具有顯著差異。(H 為健康組、C 為對照組、E 為實驗組。縱軸為與 *Actin* 基因的相對表現量。*：p-value<0.05，**：p-value<0.01，***：p-value<0.001。n=3。t-test)。

三、電擊後，菸草的 *PR1* 基因在不同時間的表現量

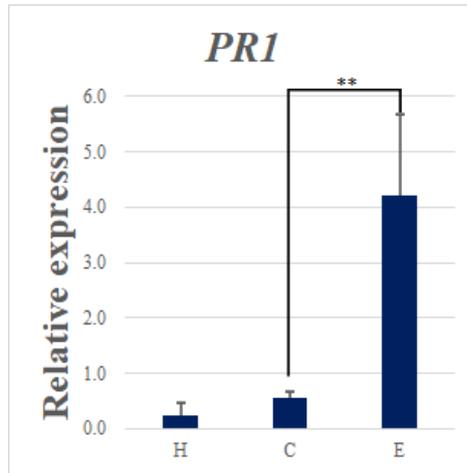
我們想進一步測定電擊後 *PR1* 基因表現量提升的持續時間，以了解一次電擊帶來的免疫提升能持續多久。選用前一實驗中，基因表現量提升較多的 10 伏特為固定電壓，並在電擊後的 3 及 24 小時採收葉片樣本。

表二、「電擊後，菸草的 *PR1* 基因在不同時間的表現量」實驗設計

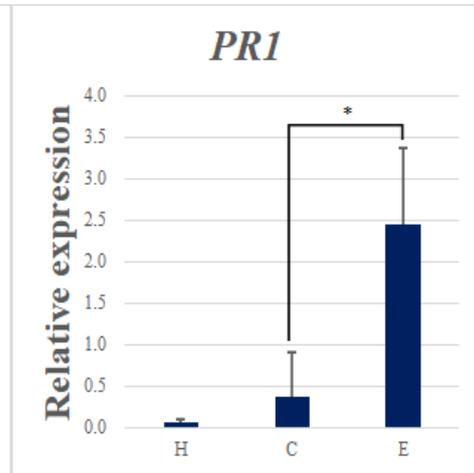
組別	處理方法
3 小時實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，電擊後 3 小時收樣。
3 小時對照組(C)	以銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，插線後 3 小時收樣。
24 小時實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，電擊後 24 小時收樣。
24 小時對照組(C)	用銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，插線後 24 小時收樣。
健康組(H)	不處理，與其餘組別同時收樣。

RT-qPCR 結果顯示，電擊後的 3 小時、24 小時，實驗組的 *PR1* 基因表現量均有提升，與對照組相比皆具顯著差異(圖十二)，且在 3 小時後的電擊葉中，差異特別顯著(圖十二 a)。這代表電擊引起的 *PR1* 基因表現量提升可以持續 24 小時。在電擊後的 3 小時，電擊葉與系統葉中的 *PR1* 基因表達皆有提升，推論免疫訊號已從電擊葉向外傳播，並透過水楊酸啟動 SAR，讓全株免疫力都提升。

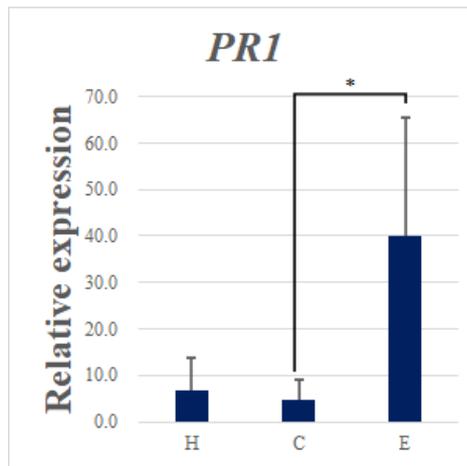
(a)



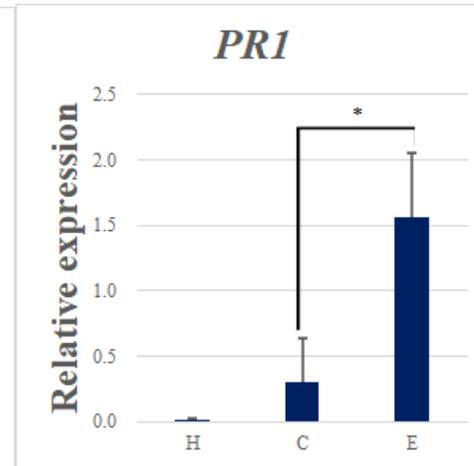
(b)



(c)



(d)



圖十二、以 10 伏特電擊 10 分鐘，3 小時及 24 小時後菸草 *PR1* 基因相對表現量的 RT-qPCR 結果，實驗組與對照組皆具顯著差異。(a)電擊後 3 小時的電擊葉 *PR1* 基因表現量；(b)電擊後 3 小時的系統葉 *PR1* 基因表現量；(c)電擊後 24 小時的電擊葉 *PR1* 基因表現量；(d)電擊後 24 小時的系統葉 *PR1* 基因表現量。(H 為健康組、C 為對照組、E 為實驗組。縱軸為與 *Actin* 基因的相對表現量。*：p-value<0.05，**：p-value<0.01。n=3。t-test)。

四、電擊對電擊葉對抗 TMV-GFP 感染的影響

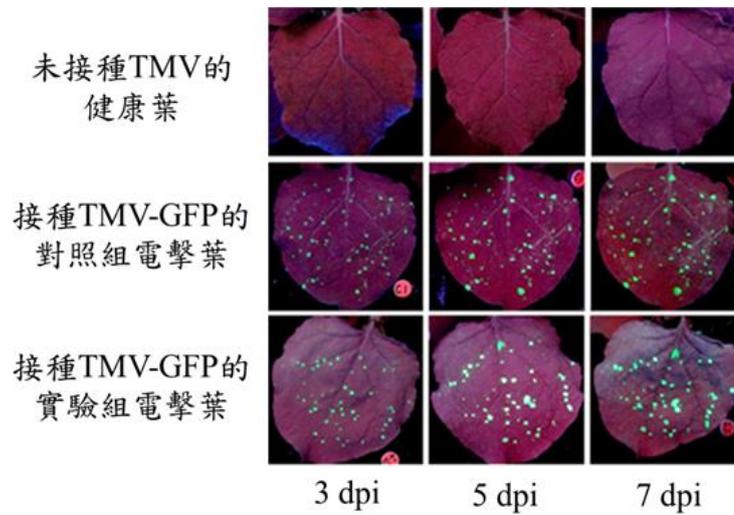
確認電擊能使水楊酸標誌基因 *PRI* 表現量提升後，我們想了解電擊能否實際帶來抗病效果。若電擊帶來的保護效果持續越久，在農業上的應用價值就越高，因此我們選用表現量仍有提升的電擊後 24 小時於電擊葉上接種 TMV-GFP，在接種後 3、5、7 天於紫外線燈下觀察感染情形，計數接種葉病毒感染斑點數。

表三、「電擊對電擊葉對抗 TMV-GFP 感染的影響」實驗設計

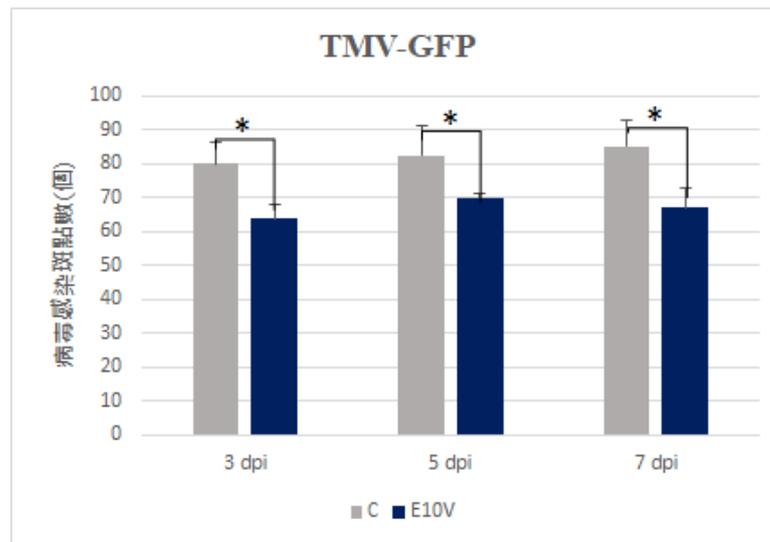
組別	處理方法
實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，電擊後 24 小時在電擊葉上接種 TMV-GFP。
對照組(C)	用銅線刺入葉柄 10 分鐘，插針後 24 小時在插針葉上接種 TMV-GFP。
健康組	不處理。

結果顯示實驗組的接種葉感染斑點數皆較對照組少，接種後 7 天內實驗組與對照組有顯著差異(圖十三)，代表電擊確實能降低實際的病毒感染。

(a)



(b)



圖十三、以 10 伏特電擊菸草 10 分鐘，24 小時後在電擊葉上接種 TMV-GFP，3、5、7 天後接種葉感染斑點數。dpi(day post-infection)指感染後天數。(a)紫外光下的 TMV-GFP 感染情形，綠色螢光部分即為感染的區域。圖中各組三天為同株菸草；(b)接種後第 3 天、5 天、7 天接種葉的 TMV-GFP 感染斑點數，7 天內實驗組與對照組皆具顯著差異。(C 為對照組，E 為實驗組。*：p-value<0.05，**：p-value<0.01。n=3。t-test)。

五、電擊對系統葉對抗 TMV-GFP 感染的影響

若能電擊一片葉子便帶來全株的保護效果，在農業上的應用會更廣。因此我們重複前一實驗的條件，改為在系統葉上接種 TMV-GFP，以觀察電擊對系統葉的病毒保護效果。

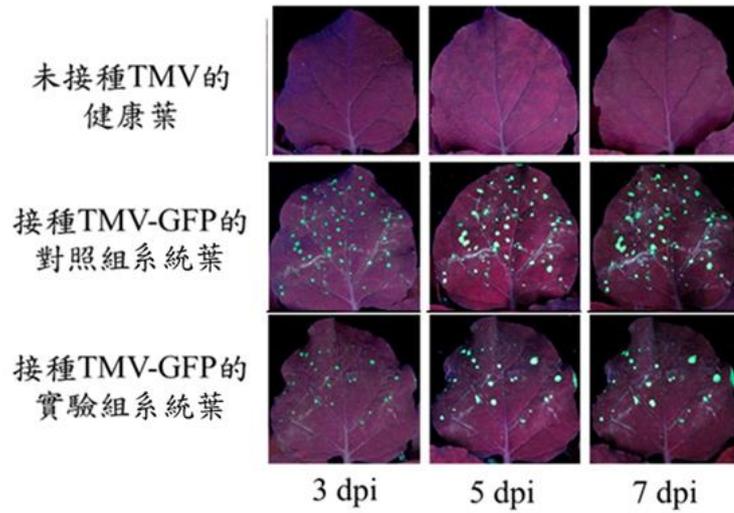
表四、「電擊對系統葉對抗 TMV-GFP 感染的影響」實驗設計

組別	處理方法
實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，24 小時後在系統葉上接種 TMV-GFP。
對照組(C)	以銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，24 小時後在系統葉上接種 TMV-GFP。
健康組	不處理。

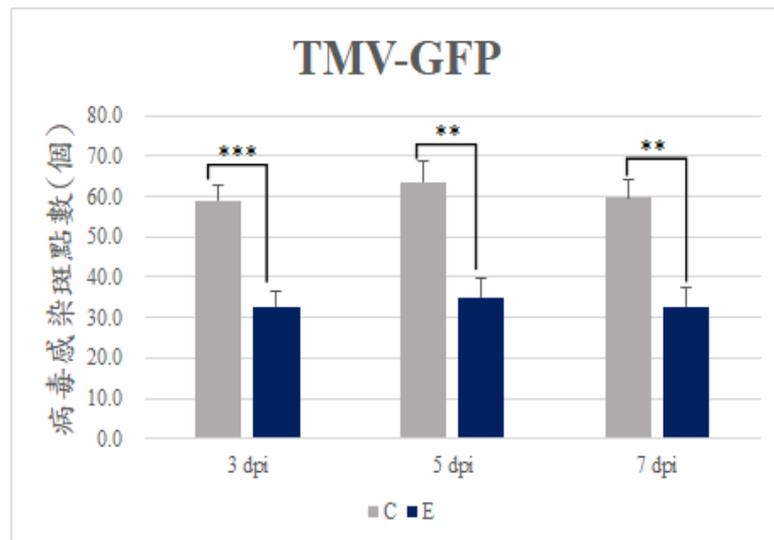
根據實驗結果，電擊後系統葉的 TMV-GFP 感染數明顯減少，在接種後七天內實驗組與對照組皆具統計差異(圖十四)，且差異較電擊葉顯著(圖十三、圖十四)，推測可能是因為系統葉沒有直接受到電擊傷害，因此能引起較強的免疫反應。

在自然界中，植物一般是透過葉片的偶然摩擦傳播病毒，感染到的病毒濃度比本實驗中低許多，且感染面積也比實驗中刻意接種的少。因此雖然實驗組與對照組的病毒感染差異隨時間減小，但我們推論在自然界中較低的感染濃度下，電擊應依舊能引起水楊酸主導的 SAR，帶來保護效果。

(a)



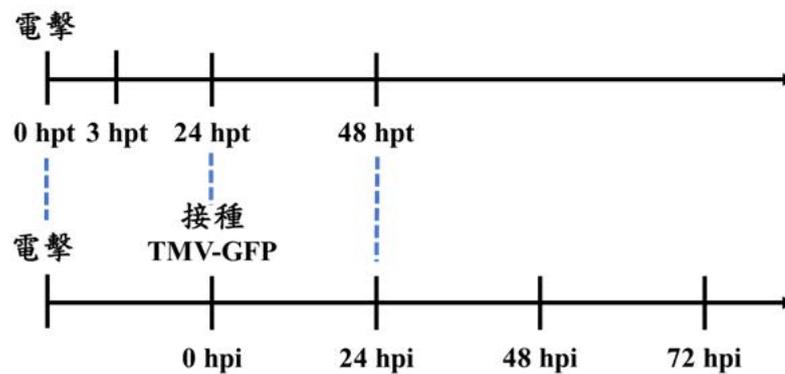
(b)



圖十四、以 10 伏特電擊菸草 10 分鐘，24 小時後在系統葉上接種 TMV-GFP，3、5、7 天後感染斑點數。dpi(day post-infection)指感染後天數。
(a)紫外光下的 TMV-GFP 感染情形，綠色螢光部分即為感染的區域。圖中各組三天為同株菸草；(b)接種後第 3 天、5 天、7 天接種葉的 TMV-GFP 感染斑點數，7 天內實驗組與對照組皆具顯著差異。(C 為對照組，E 為實驗組。*：p-value<0.05，**：p-value<0.01。n=3。t-test)。

六、 探討電擊能否對系統性水楊酸相關抗性表現產生預起效應(priming)

在先前的實驗中，電擊確實能引起菸草的 *PR1* 基因表現量提升，引起水楊酸主導的 SAR，並帶來實際的抗病毒效果。除此之外，我們想更進一步利用電擊產生如同預防針效果的 priming，可預先刺激植物，防治未來的病害。因此設計兩組實驗：以 10 伏特電擊菸草 10 分鐘後，將菸草分為未接種組與接種組。未接種組於電擊後 3、24、48 小時以 RT-qPCR 測定其 *PR1* 基因表現量；接種組則是在電擊後 24 小時接種 TMV-GFP，並於接種後 0、24、48、72 小時以 RT-qPCR 測定其 *PR1* 基因表現量(圖十五)，最終比較兩組，以探討電擊是否對系統性水楊酸相關抗性表現產生 priming，能使植物在未來遇到病毒時引發較快且較強的免疫反應。



圖十五、priming 實驗時間軸。hpt(hour post-treatment)表示電擊後小時數；
hpi(hour post-infection) 表示接種後小時數。上軸為未接種組，下軸為
接種組。

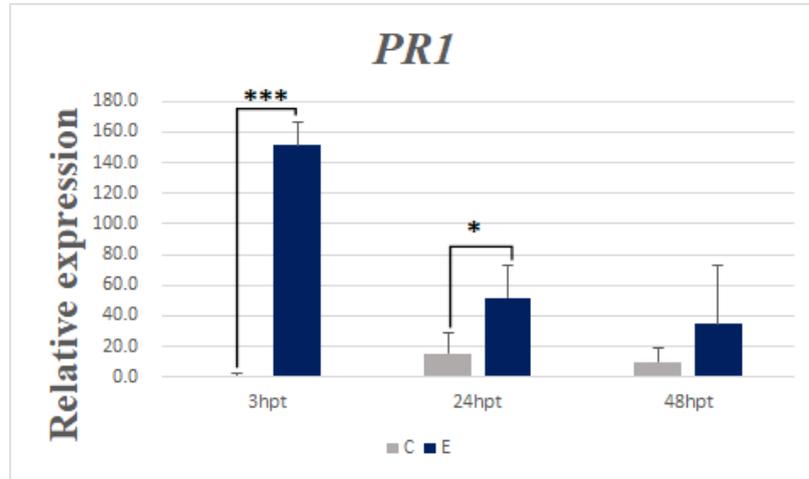
表五、「探討電擊能否對 SAR 帶來 priming 的效果」實驗設計

組別		處理方式
未接 種組	實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，在電擊後 3、24、48 小時採樣。
	對照組(C)	銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，在插針後 3、24、48 小時採樣。
接種 組	實驗組(E)	以 10 伏特電擊 10 分鐘，在電擊後 24 小時接種 TMV-GFP，並於接種後 0、24、48、72 小時採樣。
	對照組(C)	以銅線刺入菸草葉柄 10 分鐘，在插針後 24 小時接種 TMV-GFP，並於接種後 0、24、48、72 小時採樣。

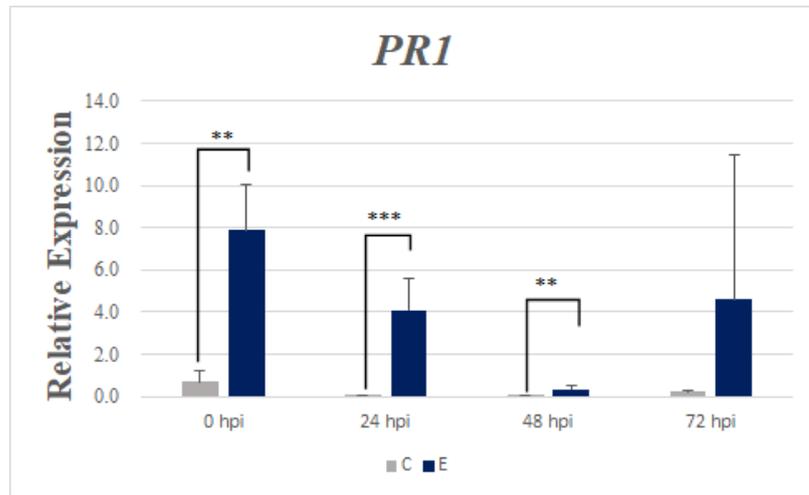
結果顯示，電擊後實驗組系統葉的 *PR1* 基因表現量均較對照組高。在未接種組中，實驗組系統葉的 *PR1* 基因表現量在 3 hpt 最高，隨著時間逐漸下降，在 24 hpt 內與對照組具顯著差異(圖十六 a)，代表電擊引起的 *PR1* 基因提升可持續 24 至 48 小時間。在接種組中，實驗組的 *PR1* 基因表現量在 0 hpi 時最高，隨著時間下降，至 72 hpi 時又提升，在 48 hpi 內與對照組具顯著差異；對照組的 *PR1* 基因表現量則在接種後逐漸提升(圖十六 b)。

接種實驗組的 *PR1* 基因表現量在 0 hpi 時最高，隨著時間下降，至 72 hpi 時又提升，這並不符合 priming 典型的雙高峰曲線(圖二)。參考未接種組 *PR1* 基因表現量的連續時間變化(圖十六 a)，可以發現在電擊後 24 小時內實驗組的表現量仍與對照組具顯著差異，因此推測接種組的結果可能受到尚未消退的電擊效果影響，使第二次刺激引起的表現量提升較不明顯。但接種實驗組在 72 hpi 時基因表現量又有提升，因此推測電擊仍有機會引起 priming。未來我們會再重複一次此實驗，並改為在電擊後 48 小時接種 TMV-GFP，在電擊引起的效果消退後，觀察接種 TMV-GFP 是否能引起更強的系統性水楊酸相關抗性表現，以了解電擊能否產生 priming。

(a)



(b)



圖十六、系統葉 *PR1* 基因表現量的連續時間變化。(a)以 10 伏特電擊菸草 10 分鐘，電擊後 48 小時內系統葉 *PR1* 基因表現量的 RT-qPCR 結果。表現量在 3 hpt 時最高，在 24 hpt 時仍與對照組具顯著差異。(b)以 10 伏特電擊菸草 10 分鐘，在電擊後 24 小時接種 TMV-GFP，接種後 72 小時內 *PR1* 基因表現量的 RT-qPCR 結果。其中 0 hpi 組在電擊後 24 小時採收，並未接種病毒。*PR1* 基因表現量在 0 hpi 最高，逐漸下降，至 72 hpi 時又提升，且在 48 hpt 內與對照組具顯著差異。(C 為對照組，E 為實驗組。*：p-value<0.05，**：p-value<0.01。n=3。t-test)。

肆、結論與應用

本研究運用電擊防治植物病毒。首先測試菸草對電壓及電擊時長的耐受度，找出以 10 伏特電擊 10 分鐘為上限。以 7 伏特及 10 伏特電擊菸草 10 分鐘後，在電擊葉與系統葉中能引起水楊酸抗性基因 *PR1* 的表現，代表電擊可以誘導水楊酸主導的免疫反應。在菸草的耐受度範圍中，電壓越高，*PR1* 的表現量就越高，且此表現量提升能持續 24 小時。接著，我們在電擊葉及系統葉上接種 TMV-GFP，發現電擊能實際使病毒感染斑點數下降，代表電擊的確可以增強整體抗病毒性。除此之外，電擊後的菸草在面對病毒刺激時能引起較顯著的 *PR1* 表現量提升，有機會對系統性水楊酸相關抗性表現產生 priming，能在電擊後防治未來的病毒感染。

若新長出的葉片也有免疫力的提升，且抗病效果能更持久，或許能在季節性流行病害前，預先以電擊啟動植物的免疫反應，就像是先「訓練」好植物，讓它利用自身的免疫機制防禦病毒。未來，我們會重複 priming 的實驗，改變接種病毒的時間，找出最適合的電擊時機。另外也想要在單株菸草上測試各種變因，例如給予短時間高電壓的電擊、改變電擊刺激位置、兩極間距離等，檢測植物的免疫強度與抗病毒狀況，以建立電擊產生植物免疫效果的模型。最後，想要嘗試更多不同的電擊方法，例如將銅片插入土壤中電擊，或是電擊水耕植物，增加電擊防治病毒的應用性。

伍、參考資料

- Al-Hakeem AM, S.Ghani MY, AlMallah NM (2020) Efficacy of plant-soil exposure to electric current against *Agrotis ipsilon*, *Bemisia tabaci* and *Meloidogyne* sp. *Eurasia J Biosci* 14: 4439-4444.
- Al Taweel SK, Cheyed SH, Al Amrani HA (2018). Effect of electric shock on germination and seedling growth in henbane species. *Acad. J. Med. Plants* 6(5): 071-078.
- Daniel F Klessig, Hyong Woo Choi, and D'Maris Amick Dempsey (2018). Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, volume 31, No. 9, 2018, pp. 871-888.
- Dannehl, D. (2018). Effects of electricity on plant responses. *Scientia Horticulturae*, 234, 382-392.
- Peter N. Dodds and John P. Rathjen (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature* volume 11, page 539–548 (August 2010)
- Sajad Ali, Bashir Ahmad Ganai, Azra N Kamili, Ajaz Ali Bhat, Zahoor Ahmad Mir, Javaid Akhter Bhat, Anshika Tyagi, Sheikh Tajamul Islam, Muntazir Mushtaq, Prashant Yadav, Sandhya Rawat, and Anita Grover (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol Res*, 2018.04.008.
- Sastry S. K., Zitter T. A. (2014). “Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics,” in *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics Vol. 2 Epidemiology and Management* (Dordrecht: Springer)

【評語】 060007

1. 研究主題具新穎性，實驗結果完整。
2. 以英文表達十分流暢，對問題之回覆相當確切。
3. 實驗記錄十分完整。
4. 對 PR1 蛋白表現之提升的機制可進一步探討。