

## 2016 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 4 試場 植物生理學及解剖學

**注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。**

本次實作乃利用一系列不同濃度(0, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ )的甲基化茉莉酸(MeJA)處理阿拉伯芥(野生型 Col、突變體 a 與突變體 b)幼苗 10 天，調查葉綠素和花青素含量的變化，以瞭解茉莉酸對於阿拉伯芥幼苗生長的影響。另觀察此 3 種幼苗在對照組與不同濃度之 MeJA 實驗處理後，比較其植株之形態與解剖構造的變異。

**材料及實驗設備：**

A 實驗植物材料：		數量	
1. 阿拉伯芥 (野生型 Col、突變體 a 與突變體 b)在不同濃度(0, 25, 50, 100 $\mu\text{M}$ )的 MeJA 與白光(光強度 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )中生長 10 天的幼苗。		各 25 株/ 每人	
B 實驗器材：		數量	
小研磨棒	12 支	方格紙(墊在培養皿下測量初生根長度)	2 張
白鑷子(細尖頭)	1 支	單面刀	1 支
鐵夾	1 支	帖板	1 塊
鑷子(細尖頭)	1 支	測微尺 (目鏡、接物鏡)	1 個
1.5 ml 微量離心管(ependorf tube)	50 個	計時器	2 個
微量吸管	2 支	計算機	1 台
載玻片	10 片	保麗龍盒	2 盒
大蓋玻片(24*40)	10 片	液態氮	1 瓶
吸水紙 (或濾紙)	2 張	釘書機	1 台
油性簽字筆	1 支	C 藥品溶液：	
解剖顯微鏡及一般顯微鏡	各 1 台	dimethylformamide (DMF)	1.5 ml
分光光度計 (公用)	4 台	絕對酒精	3 ml
分光比色液槽(Cuvette)(0.6ml)	24 個	萃取液(Methanol 含 1% HCl)	3 ml
微量天平	1 台	氯仿(Chloroform)	5 ml
黑色書面紙 (墊在培養皿下以利葉部與根部觀察)	1 張	蒸餾水	10 ml

1. 請確認考生編號是否正確；若有誤，請舉手請助教處理。
2. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。公用儀器運用請依照指示使用。
3. 本試卷 (含封面、試題卷) 共 7 頁，於交卷時全部繳回。
4. 作答時間 80 分鐘，請於本卷上作答。試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。

## 第一部分 利用甲基化茉莉酸(MeJA)調查阿拉伯芥幼苗的生長:(50%)

### 實驗方法：

#### A. 葉綠素含量的測定：（提示：等待時間可以去做另一實驗）

1. 將各 5 株生長在不同濃度(0, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ )的 MeJA 與白光中的幼苗(野生型 Col、突變體 a 與突變體 b) 共 12 種處理之材料，用白鑷子夾起分別放入 1.5 ml 的小離心管中，並且測量其鮮重，記錄於下表。
2. 用鐵夾夾起 1.5 ml 的小離心管放入液態氮中浸泡幾秒中（請注意不要超過蓋子），待幼苗組織完全冷凍、液態氮揮發後，以小研磨棒將幼苗組織研磨成粉末，然後加入 100  $\mu\text{l}$  dimethylformamide (DMF)後，放置振盪器充分混合 10 分鐘。提示：請一次做完 12 管小離心管，然後平放於保麗龍盒(如桌上圖)，拿至振盪器充分混合 10 分鐘。
3. 充分混合後，進行離心，以 13000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$  離心 5 分鐘。
4. 吸取上清液 50  $\mu\text{l}$  到新的 1.5 ml 小離心管中，再加入 450  $\mu\text{l}$  絕對酒精。
5. 混合均勻後，吸取 400  $\mu\text{l}$  液體到分光比色液槽(Cuvette)中，請舉牌，助教將協助測量其吸光值  $\text{OD}_{663}$  與  $\text{OD}_{645}$  nm。請將測驗結果釘在考卷上
6. 帶入公式計算總葉綠素含量：

$$[\text{OD}_{663} + \text{OD}_{645}] / \text{幼苗鮮重} \quad [\text{單位} : \mu\text{g}/\text{F.W. g}]$$

#### 鮮重紀錄表

	0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
野生型 Col				
突變體 a				
突變體 b				

#### 總葉綠素含量

	0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
野生型 Col				
突變體 a				
突變體 b				

## B. 花青素含量的測定：

1. 將各 15 株生長在不同濃度(0, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ )的 MeJA 與白光中的幼苗(野生型 Col、突變體 a 與突變體 b) 共 12 種處理之材料，分別放入 1.5 ml 的小離心中，並且測量其鮮重，記錄之。
2. 用鐵夾夾起 1.5 ml 的小離心管放入液態氮中浸泡幾秒中（請注意不要超過蓋子），待幼苗組織完全冷凍、液態氮揮發後，以小研磨棒將幼苗組織研磨成粉末，然後加入 200  $\mu\text{l}$  萃取液，放置振盪器充分混合 10 分鐘。**提示：請一次做完 12 管小離心管，然後平放於保麗龍盒(如桌上圖)，拿至振盪器充分混合 10 分鐘。**
3. 加入氯仿(Chloroform)及無菌水各 200  $\mu\text{l}$ ，並且充分混合。
4. 進行離心，以 13000 rpm 4  $^{\circ}\text{C}$  離心 5 分鐘。
7. 吸取上清液 400  $\mu\text{l}$  到分光比色液槽(Cuvette)中，**請舉牌，助教將協助測量其吸光值  $\text{OD}_{663}$  與  $\text{OD}_{645}$  nm。**請將測驗結果釘在考卷上
6. 帶入公式計算花青素含量：  
[  $\text{OD}_{530} - 0.25\text{OD}_{657}$  ]/幼苗鮮重 [單位： $\mu\text{g}/\text{F.W. g}$ ]

鮮重紀錄表

	0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
野生型 Col				
突變體 a				
突變體 b				

花青素含量

	0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
野生型 Col				
突變體 a				
突變體 b				

**結果與討論：**

1. 根據實驗結果，請將甲基化茉莉酸濃度(X 軸)對野生型 Col、突變體 a 與突變體 b 葉綠素含量(Y 軸)與花青素含量(Y 軸)的關係畫成條狀圖，並請描述它們之間的關係。(16 分)
2. 如果此兩種突變體一個是茉莉酸荷爾蒙的接受體，另一個是茉莉酸合成酶，請推測突變體 a 與突變體 b 各屬於何者？並解釋原因。(10 分)
3. 根據實驗結果，解釋為什麼甲基化茉莉酸會造成野生型、突變體 a 與突變體 b 在葉綠素含量與花青素含量的差別。(10 分)
4. 如果將同樣的材料，包括野生型、突變體 a 與突變體 b 生長在相同的不同濃度的 MeJA，但較弱的白光( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )下 10 天，試推論 MeJA 對這三種阿拉伯芥幼苗的葉綠素與花青素含量的影響是否相同？並解釋原因。(4 分)
5. 本實驗所觀察的結果中，甲基化茉莉酸對根部(包括主根與側根)生長的影響，可能與下列何種荷爾蒙最有相關？(3 分) 並請解釋原因。(7 分)  
(A) 吉貝素 (B) 離層酸 (C) 乙烯 (D) 生長素 (E) 細胞分裂素

原因：\_\_\_\_\_。



- iii) 分別於下列表格中填入野生型、突變體 a、與突變體 b 幼苗的初生根的平均長度與側根的平均數目。18% (6%+3%+9%)

	初生根平均長度 (mm)	側根平均數目
野生型		
突變體 a		
突變體 b		

毛茸及氣孔有/無 (填入對應符號)

子葉	上表皮毛茸 : 有(O) 或無 (X)	上表皮氣孔 : 有(O) 或無 (X)
野生型		
突變體 a		
突變體 b		

毛茸及氣孔數目、細胞大小

初生葉	上表皮之毛茸數目/ 每片子葉 (0, ~10, >20)	上表皮氣孔數目 /40 倍接物鏡視野 (0, ~10, >20)	葉肉細胞內葉綠體平均 大小 (μm)
野生型			
突變體 a			
突變體 b			

- 3) 各實驗組 [培養皿標示為不同濃度 MeJA (25, 50, 100 μM)] 之野生型、突變體 a、與突變體 b 幼苗之相關特性的變化。22% (3%+15%+4%)
- i) 培養皿中哪些濃度處理後之幼苗可明顯觀察到花青素？主要位於幼苗的哪個部位？

- ii) 經過不同濃度之 MeJA 處理後，分別簡述三種幼苗之子葉與初生葉形態與顏色的變化；另分別指出初生葉之上表皮毛茸數目、葉肉細胞葉綠體數目、初生根長度與側根數目變化 [填入對應符號：明顯變多(甲)；無明顯變化(乙)；明顯變少(丙)]。

		25 $\mu$ M MeJA 處理	50 $\mu$ M MeJA 處理	100 $\mu$ M MeJA 處理
野生型	子葉變化			
	初生葉變化			
	毛茸數目			
	葉綠體數目			
	根長與數目			
突變體 a	子葉變化			
	初生葉變化			
	毛茸數目			
	葉綠體數目			
	根長與數目			
突變體 b	子葉變化			
	初生葉變化			
	毛茸數目			
	葉綠體數目			
	根長與數目			

- 4) 統整資料後，請描述甲基化茉莉酸(MeJA)對阿拉伯芥幼苗形態發生的影響。