

競賽編號：

105 學年度高級中學 全國生物科學科能力競賽

實驗 4~6 操作試題

得 分



本試卷滿分 150 分

競賽編號：

競賽說明：

請依所指定器材及藥品動手操作，並將答案填寫於答案卷的規定位置。實驗時請自己根據實驗需要來安排時間及實驗順序。本試卷配
分 150 分。

材料及實驗設備：

本試卷共分三個實驗題，所提供的材料及儀器設備列於各實驗題中，置於標示「實驗 4~6」之塑膠籃中，請檢查個人器材，如有不符，請舉手聲明，各項器材必須節省使用，競賽開始後不再補發。

本試場之共用材料：

材料名稱	數量
拭鏡紙、擦手紙	數包
蒸餾水	1 桶
標籤紙	2 包
加熱攪拌器	1 台

實驗 4

【植物病原體分析與檢測實驗】（50 分）

一、實驗目的：

以植物形態學、細胞生理學與分子生物學方法，分析與鑑定植物病原體種類(如：細菌、真菌與病毒)與宿主植物受到病原體感染後之反應。

二、實驗原理：

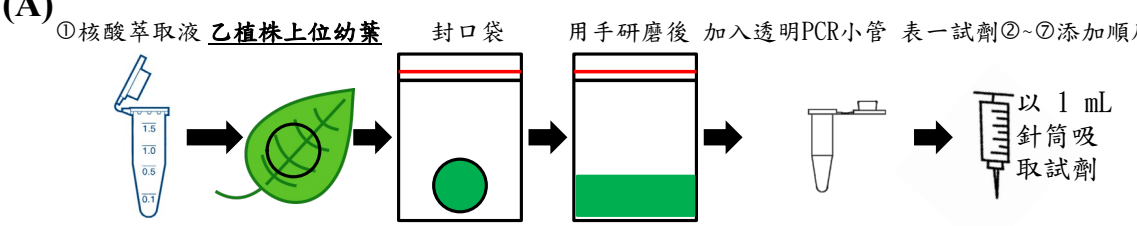
在自然環境，植物與不同種類微生物進行交互作用，例如：益生菌與病原體，植物常見的病原體有細菌、真菌與病毒，隨著分子生物學的進步，可以利用核酸聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)，實驗方法如下圖(圖一)，來偵測病原體特有的基因片段，如：外鞘蛋白基因或細胞分裂素生合成基因(圖二)。此外，在分析與鑑定植物病原體上可依三種病原體在形態大小作為鑑定病原體的方法。此外病原體在感染植物後，也會改變宿主植物的細胞生理與形態，藉此病原體能夠增殖。本實驗操作題，將探討與分析植物病菌的種類與宿主植物細胞之變化。

三、實驗試劑與材料：

表一：本實驗所需實驗試劑與材料

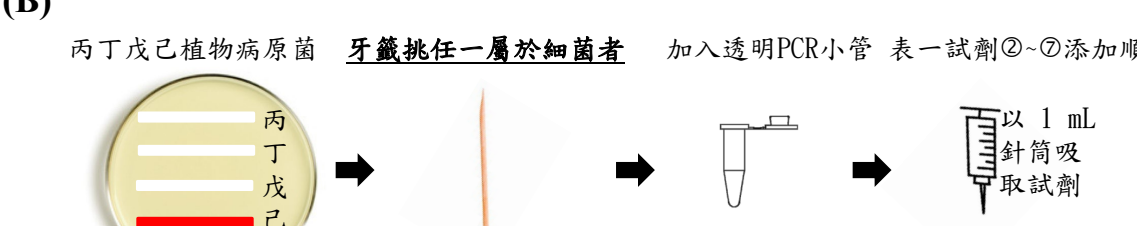
實驗試劑與材料	數量	實驗試劑與材料	數量
①核酸萃取液	1 管	甲乙植株	各 1 株
②DNase (DNA 分解酶)	1 管	丙丁戊己植物病原體	1 盤
③RNase (RNA 分解酶)	1 管	光學顯微鏡	1 台
④PCR 試劑 (聚合酶連鎖反應試劑，含聚合酶、dNTP 及緩衝液) 添加試劑請自行操作，反應由試務人員統一進行	1 管	載玻片 蓋玻片	各 4 組
⑤RT 試劑 (反轉錄反應試劑，含反轉錄酶、dNTP、緩衝液及隨機引子) 添加試劑請自行操作，反應由試務人員統一進行	1 管	滴管 (若需吸量不同試劑 請先用水清洗)	1 支
⑥90°C加熱以降解酵素	-	塑膠杯 (裝廢液)	1 個
⑦基因引子對 a,b,c,d	各 1 管	1 mL 針筒(定量用)	1 支
小刀	1 個	杯水	1 個
牙籤	4 支	PCR 試管	2 個

(A) ①核酸萃取液 乙植株上位幼葉 封口袋 用手研磨後 加入透明PCR小管 表一試劑②~⑦添加順序?



1. 以1 mL針筒取約500 µL核酸萃取液加入封口袋中。
2. 封口袋中放入乙植株捲曲葉約 1cm直徑，約為1.5 mL 微量離心管蓋大小。
3. 用手研磨後，以1 mL針筒取約30 µL萃取液。
4. 30 µL萃取液樣本先加入透明PCR小管。
5. 1 mL針筒以水抽吸清洗後，再思考試劑②~⑦添加順序?
6. 以 1 mL針筒吸取試劑之添加量皆為30 µL。

(B) 丙丁戊己植物病原菌 牙籤挑任一屬於細菌者 加入透明PCR小管 表一試劑②~⑦添加順序?



1. 以牙籤挑丙丁戊己其中任一屬於細菌者。
2. 先加入透明PCR小管，並與之後加入試劑混合均勻。
3. 1 mL針筒以水抽吸清洗後，再思考試劑②~⑦添加順序?
4. 以 1 mL針筒吸取試劑之添加量皆為30 µL。

圖一：核酸聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)，實驗方法。(A)配合題目第9題，利用 PCR 檢定植物葉片組織病毒。(B) 配合題目第 14 題，利用 PCR 檢定丙丁戊己植物病原菌。

外鞘蛋白基因片段

5' CCACTGTCC TCGTCACAAA CAAAAAGAGT TCATGGGTGA
ATCGGCCCTT GTTCAGAAAG CCAAGATGT ACAGGATGTA
TAAAAGCCCA GATGTTCTC GTGGTTGTGA A 3'

細胞分裂素基因片段

5' TGCATCTAAT TTTCGGTCCA ACTTGACACAG GAAAGACGAC
GACCGCGATA GCTCTTGCCC AGCAGACAGG GCTTCCAGTC
CTTTCGCTTG ATCGGGTCCA ATGCTGTCCTCAACTATCAA 3'

a	c
5' TGCATCTAAT TTTCGGTCCA 3'	5' GTTTGTGACGAGGACAGTGG3'
5' TTGATAGTTGAGGACAGCAT 3'	5' ATGTTCTC GTGGTTGTGA A 3'
b	d
5' TGGACCGAAA ATTAGATGCA 3'	5'CCACTGTCCTCGTCACAAAC3'
5' ATGCTGTCCTCAACTATCAA 3'	5'TTCACAACCACGAGGAACAT3'

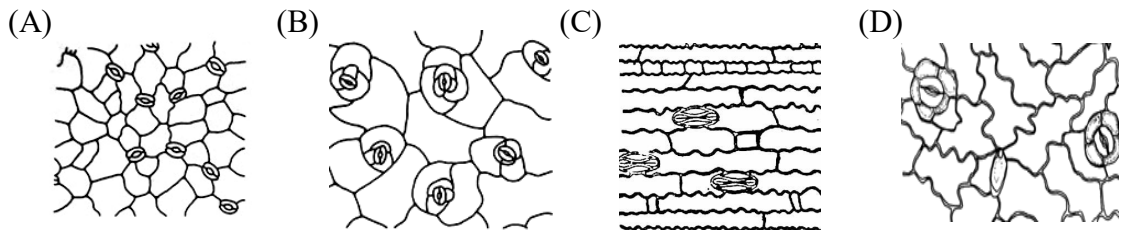
圖二：病原菌特有的基因片段，如：外鞘蛋白基因或細胞分裂素生合成基因。
表一之引子組合⑦abcd 序列，配合題目第 5 題與第 12 題。

四、實驗問題(本實驗操作題，為多重選擇題，答案全對才給分)(第 9

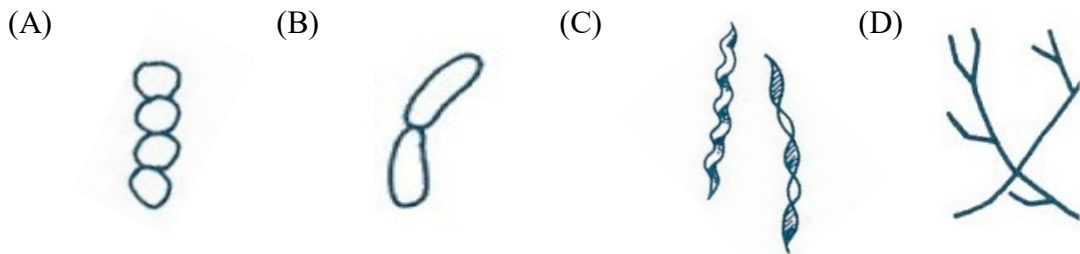
與 14 題 7 分，其餘每題 3 分，共 50 分)：

【1~9 題為利用 PCR 檢定植物葉片組織病毒，方法如上圖一與圖二所示】

1. 請以光學顯微鏡觀察甲植株葉片下表皮之表皮與保衛細胞分佈，何者正確？



2. 請以光學顯微鏡觀察甲植株葉柄之表皮細胞，下列何者正確？



3. 請以光學顯微鏡觀察甲植株葉片之絨毛，下列敘述何者正確？(A)絨毛是單細胞為葉片之表皮細胞之延伸。(B)絨毛為多細胞所組成。(C)絨毛形態為三分叉狀。(D)絨毛頂端之細胞可為圓球狀。
4. 甲植株為控制組、乙植株為病毒感染組(Geminiviruses 雙生病毒)，請觀察與比較甲植株正常葉片與乙植株捲曲葉片(或上位幼葉)之上表皮與下表皮組織。相較於甲植株，乙植株捲曲葉之上下表皮組織中，下列何者細胞形態有顯著變異？(A) 絨毛細胞。(B)腺毛細胞。(C)保衛細胞。(D)表皮細胞。
5. 利用核酸聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)，植物病毒基因 DNA 與其 mRNA 表現可做為檢測植株是否受到病毒感染，圖二中哪一組引子對可用來檢測乙植株是否受到病毒所感染？(A) a。(B)b。(C)c。(D)d。
6. 若欲檢測植物 RNA 病毒 (Potato virus X 馬鈴薯病毒 X)，假若某個植物樣本經核酸萃取液①萃取後，請先思考表一中試劑添加順序與步驟何者正確？(A) ③②⑥⑦④。(B) ②⑥⑤⑦④。(C) ③⑥⑦④⑤。(D) ②③⑦④⑥。
7. 若欲檢測植物 DNA 病毒 (Geminiviruses 雙生病毒)，假若某個植物樣本經核酸萃取液①萃取後，請先思考表一中試劑添加順序與步驟何者正確？(A) ③②⑥⑦④。(B) ②⑥⑤⑦④。(C) ③⑥⑦④。(D) ②⑤⑥④。
8. 請操作實驗步驟①②③④⑤⑦ (若操作時可不包含⑥)如圖一，並檢測植物樣本乙植株幼葉葉片，是否含有植物 DNA 病毒(Geminiviruses 雙生病毒)，表一中試劑添加順序何者正確？(A) ②⑦⑤。(B) ②⑦④。(C) ③⑦④。(D) ③⑦⑤。

9. 承第 8 題，請將此樣本 PCR 樣本管標註競賽編號---題號 9---上題答案選項後(例如：競賽編號為 1，題號 9，上題答案選項 X 則標註 1-9-X)，放於桌邊由試務人員回收進行 RT 或 PCR 反應，偵測是否有 DNA 病毒 (Geminiviruses 雙生病毒)反應？

【10~14 題為利用顯微鏡與 PCR 檢定丙丁戊己植物病原體，方法如上圖一與二】

10. 請以光學顯微鏡觀察丙丁戊己四種病原體中，細胞形態最小？(A)丙。(B)丁。(C)戊。(D)己。
11. 承第 10 題，請以光學顯微鏡觀察丙丁戊己四種病原體中，下列何者為細菌？(A)丙。(B)丁。(C)戊。(D)己。
12. 承第 11 題，請選取其中一個細菌的樣本中，若想以核酸聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)，檢測是否屬於農桿菌，上圖二中引子組合何者正確？(A) a。(B) b。(C) c。(D) d。
13. 承第 12 題，以牙籤挑取丙丁戊己其中為農桿菌菌體樣本，加入適當引子對 abcd 後，進行 PCR 反應(圖一)，表一中試劑添加順序何者正確？(A) ②⑦⑤。(B) ②⑦④。(C) ③⑦④。(D) ③⑦⑤。
14. 承第 13 題，請將此 PCR 樣本管標註競賽編號-題號 14-上題答案選項後(例如：競賽編號為 1，題號 14，上題答案選項 X 則標註 1-14-X)，放於桌邊由試務人員回收進行 RT 或 PCR 反應，偵測是否有農桿菌反應？

實驗 5

【生物性微油粒製備】（共 50 分）

實驗器材與藥品

※ 共用器材（放置於講台前的桌上）：

1. 95℃ 熱水（使用加熱攪拌器加熱保溫）。

※ 題目袋內的器材與藥品

項次	名稱	數量	項次	名稱	數量
1	裝有食品級酵母粉的 15 mL 塑膠離心管	3 個	4	顯微鏡蓋玻片與載玻片	3 組
2	裝有食用油的 15 mL 塑膠離心管	1 個	5	裝有蒸餾水的 50 mL 塑膠離心管	1 個
3	玻璃滴管	2 支	6	廢液杯	1 個

※個人桌面上的器材

1. 光學顯微鏡 1 台（放大倍率：400 倍）
2. 試管架 1 個

說明：

油脂是生命體不可或缺的化學分子之一。動物、植物、以及微生物都會合成與代謝油脂。油脂主要用於儲存能量、建構細胞膜、以及作為細胞訊息傳遞分子等。由於油脂不溶於水，因此在水溶液中，油脂會聚集形成油脂層，進而與水分離。為了有效地利用油脂，生物體發展出許多減少油脂聚集的方法，其中之一就是讓油脂形成微油粒(microdroplet)。但由於微油粒依然具有疏水性，生物體要如何讓微油粒穩定地存在水中呢？

實驗步驟：

1. 取出題目袋內裝有 0.05 g、0.2 g、0.8 g 酵母粉的塑膠離心管。
2. 分別加入 14 mL 的蒸餾水，溶解酵母粉。
3. 將塑膠離心管放入熱水中，加熱 5 分鐘，抑制酵母菌活性，同時讓菌體自然沉降到離心管底部。（請小心操作，避免燙傷）。
4. 小心地取回塑膠離心管，不要搖晃離心管。
5. 移除塑膠離心管內 10 mL 的蒸餾水，留下底部 4 mL 含有酵母菌的蒸餾水。（請小心操作，不要吸到沉降在離心管底部的菌體）。
6. 分別加入 4 mL 的食用油，用力搖晃塑膠離心管約 1 分鐘，讓油與水充分混合。

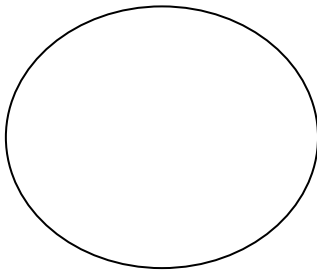
競賽編號：

7. 將塑膠離心管放回試管架，靜置 5 分鐘，觀察溶液是否有變化。
8. 分別自含有酵母粉的塑膠離心管中吸取少量液體（取樣位置：介於塑膠離心管刻度 7 與 8 之間），以 400 倍顯微鏡觀察液體中的酵母菌與微油粒分佈情形。

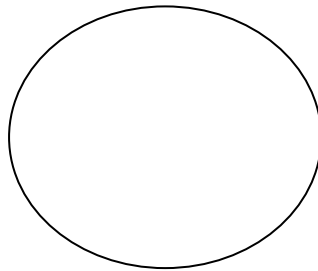
問題：(於答案卷上填寫答案)

1. 請將每個玻片全部看完，把顯微鏡視野下最常出現的酵母菌與微油粒的分佈情形，繪於下方的圓圈內。(9 分)

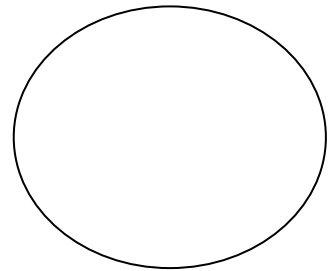
0.05 g 酵母菌



0.2 g 酵母菌



0.8 g 酵母菌



2. 請依據顯微鏡觀察的結果，推論溶液中的酵母菌濃度與微油粒大小的關係為何？(11 分)
3. 請依據實驗結果與油脂的特性，推論酵母菌如何避免微油粒聚集成大顆的油滴。(15 分)
4. 請設計一個實驗證明你的論點（酵母菌如何避免微油粒聚集）。實驗內容請詳述：(1) 實驗原理。(2) 實驗步驟。(3) 預期結果。(15 分)

實驗 6

【鬥蟋蟀行為觀察與研究】（共 50 分）

鬥蟋蟀是利用蟋蟀的領域行為，生殖行為？抑或是攻擊行為？

一、請參考影片內容(現場播放)，自行提問並設計實驗，利用提供的蟋蟀及工具完成實驗，動物行為常常在研究主題及範圍上定義(definition)模糊，但是根據你所知道的對下列相關行為進行定義(5 分)，以便下列實驗設計與操作結果與討論。

- a. 領域行為：
- b. 生殖行為：
- c. 攻擊行為：

二、下面一段文字幫助你對蟋蟀行為中所謂「鬥蟋蟀」活動與一般常民知識的了解，但是字裡行間，充滿未經科學證實的「常識」，這些可能需要進一步去實驗或試驗去證實。請以科學方法及步驟寫出你的研究設計，再進行操作，設計的內容應包括各要項：(10 分)

- 1. 提出問題或假說
- 2. 材料與方法 包括觀察內容項目：
 - a. 參數或變數及其計量單位
 - b. 記錄表格
 - c. 使用器材
- 3. 預期結果
- 4. 可能遭遇的困難
((請考慮操作所需時間及人力設備))

請考慮科學操作應注意的(PARCC)：

P: precision: 量測數據的準確度。

A: accuracy 問題討論精確度。

R: repeatable, replicate 重複性，再現性。

C: comparatives 以相同基準的比較性。

C: complete 研究完整性（如果可能達到）。

鬥蟋蟀相關資訊

鬥蟋蟀是風行在中國大陸千年以上的一種季節性活動，原本是後宮妃子打發時間的遊樂，後來因為緊張、刺激，又饒富趣味的過程吸引了皇帝的注意，於是在宮中盛行一時，最後又輾轉流傳到民間，據推斷可能隨著沿海各省的風行，也傳到了台灣，在當時也蔚為風尚。

古人曾評論蟋蟀，表彰其五德：「鳴不失時，信也；遇敵則鬥，勇也；寒則歸宇，識時務也；傷重致死，忠也；敗則不鳴，知恥辱也」。更何況「聽其鳴，可以忘倦；觀其鬥可以怡情」，所以只要加以適當的規劃，鬥蟋蟀便可成為有助於陶冶性格和怡情助興的有益活動，後世子孫更可以傳承這項傳統的中華文化和民俗活動。

鬥蟋蟀首先必須先有兩隻雄蟋蟀，鹽水鎮已故鎮長曾德輝先生說，在台灣會鬥的蟋蟀被分為兩種，即烏龍仔與赤羗仔（或紅娘仔）。一般都認為烏龍仔比較會鬥，其實昆蟲分類上皆屬同一種，稱黃斑黑蟋蟀，*Gryllus bimaculatus* (De Geer)。

影響因子 1.

觀察蟋蟀是否善鬥，根據民間人士傳授的相蟲方法如下：觀察蟋蟀翅上的黃斑顏色是否鮮豔；顏色過淺表示不成熟，過暗表示已老邁，都不是理想的目標；外形則以頭大、腹部結實（但不能太大），腹短者較佳，接著要六足完整；後足張開呈八字型、蹲得低站得穩者屬於上等；最後，切記不要弄傷了蟋蟀的觸角，否則將損失其鬥力。

影響因子 2.

是否善鬥與牠的生長環境也有很大的關係。最善鬥的蟋蟀通常生長在比較特殊的環境，例如，生長在蛇洞的「蛇蟀」、蛙洞的「四腳仔蟀」、蜈蚣洞「蜈蚣蟀」，及生長在岩石縫及石洞中的「石蟀」；但這些都是可遇不可求的。由蟋蟀的聲音可以初步辨識帥的好壞；聲音越沉、越慢者較佳。此外因蟋蟀會爭奪居所，因此在洞中的蟋蟀必是強者。

鬥蟋蟀比賽的過程包括戰場、規則、技巧均有獨到之處，簡述供參考：

鬥蟋蟀步驟及規則：

比賽開始前，雙方先將蟋蟀放在手掌中，使其沿著手掌前進，稱為溜蟀（又稱掄蟀）（**影響因子 3**）直到蟋蟀前進的速度逐漸緩慢，再放入擂台中，在此準備兩種鬥蟋蟀擂台。

雙方放入後，以細草或貓鬚等「軟絲」挑弄蟋蟀（**影響因子 4**），遭遇後一場激烈戰鬥於是展開。

善鬥的蟋蟀也會因為將身體蹲低、站得穩（**影響因子 5**），所以非但不易被搏

競賽編號：

倒，再繼續以其堅硬的牙展開第二波攻勢，使對手無還手的餘地，直到對手落荒而逃，再以勝者的姿態高舉前翅互相摩擦發響亮的聲音，此時鳴叫者被判定為勝方，而這些規則都在賽前明訂，且比賽時設裁判長隨時排難解紛。

鬥蟋蟀另一關鍵性技巧，敘述如下供試驗設計之參考：

比賽中舉足輕重的一項技巧，也就是貓鬚的使用、挑弄技巧的好壞，直接影響蟋蟀的輸贏，挑弄以枝條或細草等軟絲皆可。一般挑弄尾毛促其前進，挑弄觸角長其鬥志，技巧好者能夠順勢挑弄，引導蟋蟀的攻勢，增加牠的鬥力，反之則可能驚嚇到牠而使之厭戰，居於下風，如此必輸無疑。鬥蟋蟀比賽常分為個別賽及團體賽，兩者的樂趣相當，但團體賽似乎更引人入勝。因為這種比賽不只是蟋蟀的鬥力，更是參賽雙方的鬥智，舉凡技巧的運用、出場的順序，個中好手通常都能夠依靠經驗的累積而技壓群雄。

材料

1. 鬥王儲(竹筒)鬥櫥
2. 蟋蟀 (經養蟲罐隔離三天之材料)
3. 雄成蟲 3-5 隻
4. 塑膠盤 (40 x 30 x 10 cm) 1 個

三、鬥蟋蟀行為影響因子探討之操作

觀察兩隻蟋蟀互動過程並加以紀錄在表格中(10 分)，表一、表二僅供參考。

表一、蟋蟀行為觀察紀錄表

時間 (分秒)	觀察昆蟲的動作	觀察項目 (例如:身體部位及個體互動)	其他說明

競賽編號：

表二、蟋蟀行為觀察紀錄表

編號	自行定義 行為步驟	觀察行為分項紀錄				相關身 體部位\ 構造	其他說 明
		1	2	3	4		

四、依據觀察到的兩隻蟋蟀互動的行為過程，依照行為順序，歸納為幾個步驟，並畫出流程圖。

1. 由行為觀察紀錄依照所需目的，整理分析列表呈現。(10 分)
2. 依照行為順序，歸納為幾個步驟，並畫出流程圖。(15 分)

鬥蟋蟀行為模式流程範例(翻頁)：

此流程圖為民間鬥蟋蟀比賽，人為操控下的鬥蟋蟀行為模式，供參考。

標示部份為自訂觀測標準

