

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

040709

放線菌對玉米生長之影響及其機制的探討

學校名稱：國立臺中女子高級中學

| | |
|--|-------------------------|
| <p>作者：</p> <p>高二 李祐君</p> <p>高二 李瑋婷</p> <p>高二 徐曉蝶</p> <p>高二 譚亦珣</p> | <p>指導老師：</p> <p>謝金山</p> |
|--|-------------------------|

關鍵詞： 放射菌、玉米、IAA

摘要

市售玉米肥料中含有放線菌，因此我們推論放線菌能促進玉米生長，而我們對放線菌如何影響玉米的生長機制感到好奇，進而設計實驗探討其原因。

首先，我們自玉米田中採取較高大的玉米植株基部土壤，由土壤中分離出各種放線菌，再以不同的放線菌處理玉米種子並種植，接著觀察各植株之鮮重與株高間的差異，以複式顯微鏡觀察莖部組織的變化以及測定其 IAA 分泌量，並加以鑑定。

我們觀察到有些種類的放線菌能使玉米葉鞘的維管束組織及薄壁細胞增多，進而促進植株對水分及養分的運輸；而有些種類的放線菌亦會分泌促進植物生長的激素，如 IAA。

壹、研究動機

生物課教過放線菌是一種革蘭氏陽性菌，曾經因其形態而被認為是介於細菌和黴菌之間的物種。放線菌大部分是腐生菌，普遍分佈於土壤中，一般都是好氣性，少數則和某些植物共生。

一位組員寒假中參觀阿公的農田時，阿公告訴她在加了一種特殊的土壤後，玉米會長的特別好，還拔了一株沒有加該土壤的植株對照，果然明顯瘦小許多，而後這位組員仔細閱讀該土壤的包裝說明，發現裡面含有放線菌，因此讓我們想更進一步探討放線菌是如何影響玉米的生長機制。

貳、研究目的

- 一、探討放線菌對玉米植株之株高與鮮重是否產生影響
- 二、探討放線菌對玉米植株之莖部是否產生影響
- 三、探討放線菌影響玉米生長的機制

參、研究設備及器材

一、實驗生物：

1. 玉米種子〈農友牌玉美珍之一代交配非基因轉植之糯玉米種子〉
2. 放線菌

二、實驗器材：

三、實驗藥品及配方

- | | | |
|-------------------|---------------|-----------------|
| 1. 培養皿 | 18. 電子秤 | 35. PCR machine |
| 2. 打火機 | 19. 括勺 | 36. 鑄膠槽 |
| 3. 酒精燈 | 20. 秤量紙 | 37. 尺梳 |
| 4. 移植環 | 21. 鑷子 | 38. 電泳槽 |
| 5. 取樣瓶 | 22. 皮尺 | 39. UV 燈 |
| 6. 500mL 血清瓶 | 23. 乳膠手套 | |
| 7. 50mL、100mL 量筒 | 24. 鋁箔紙 | |
| 8. 50mL、100mL 錐形瓶 | 25. 標籤紙 | |
| 9. 96 孔微孔盤 | 26. 針筒 | |
| 10. 試管 | 27. 1.5mL 離心管 | |
| 11. 試管架 | 28. pH 計 | |
| 12. 針頭過濾器 | 29. 微波爐 | |
| 13. 玻璃珠 | 30. 離心機 | |
| 14. 塑膠培養器 | 31. 無菌操作台 | |
| 15. BVB 培養介質 | 32. 高壓滅菌鍋 | |
| 16. 塑膠滴管 | 33. 震盪培養箱 | |
| 17. 1mL、5mL 定量滴管 | 34. Magellan | |

〈一〉 HV 培養基：

1. HV 培養基：以 RO 水配製 1L HV 培養基

HV 培養基配方

| 藥品名稱 | 重量 (g/L) |
|---------------------------------------|----------|
| Humic acid | 1.00 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.50 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.05 |
| KCl | 1.71 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.01 |
| CaCO ₃ | 0.02 |

表(一)

2. 加入少量 HCl 或 NaOH 使 HV 培養基之 pH 值為 7.2
3. 加入 20g Agar
4. 高壓滅菌〈120°C、15lb〉已配好的 HV 培養基

5. 待培養基冷卻至 40~50°C，再加入 cycloheximide 50 mg
6. 在無菌操作台內，配製附加濃縮液〈配方如下表〉，自濃縮液中取 1.0 mL，以針筒及 0.22 μ m 的針頭過濾器加入 HV 培養基

附加濃縮液配方

| 藥品名稱 | g/L |
|--------------|--------|
| thiamine HCl | 0.0250 |
| Biotin | 0.0125 |

表(二)

- 〈二〉 ISP4 培養基：以 RO 水配製並高溫高壓滅菌

ISP4 配方 (37g/L)

| 藥品名稱 | g/L | 藥品名稱 | g/L |
|-----------------------|--------|--------------------|--------|
| Soluble Starch | 10.000 | Calcium Carbonate | 2.000 |
| Pipotassium Phosphote | 1.000 | Agar | 20.000 |
| Magnesium Sulfate USP | 1.000 | Ferrous Sulfate | 0.001 |
| Solium Chloride | 1.000 | Manganous Chloride | 0.001 |
| Ammonium Sulfate | 2.000 | Sulfate Zinc | 0.001 |

表(三)

- 〈三〉 ISP1 培養液：以 RO 水配製並高溫高壓滅菌

ISP1 培養液配方

| 藥品名稱 | g/L |
|---------------------|-----|
| Bacto tryptone | 5 |
| Bacto yeast extract | 3 |

表(四)

- 〈四〉 IAA 標準液

- 〈五〉 LB 培養液：以 RO 水配製並高溫高壓滅菌

LB 培養基配方

| 藥品名稱 | g/L |
|-----------------|-----|
| Tryptone | 10 |
| Yeast extract | 5 |
| Sodium Chloride | 10 |

表(五)

- 〈六〉 Van Urk-Salkowski reagent：以 RO 水配製並高溫高壓滅菌

Salkowaki reagent 配方

| 藥品名稱 | mL/L |
|---|-------|
| H ₂ SO ₄ (96%-98%) | 150.0 |
| FeCl ₃ • 6H ₂ O(5M) | 7.5 |

表(六)

- 〈七〉 Carboxymethylcellulose Sodium (甲基纖維素)

〈八〉 Lysis buffer (裂解液) (pH=8)

Lysis buffer 配方

| 藥品名稱 | 濃度 |
|------|-------|
| Tris | 50 mM |
| EDTA | 25 mM |
| SDS | 3% |

表(七)

〈九〉 Extraction buffer (pH=8)

Extraction buffer 配方

| 藥品名稱 | 濃度 |
|-----------------------|-------|
| Tris | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| CH ₃ COONa | 0.3 M |

表(八)

〈十〉 TAE buffer (pH=8)

TAE buffer 配方

| 藥品名稱 | 濃度 |
|---------------------|-----------|
| Tris | 242 g/L |
| Glacial acetic acid | 57.1 mL/L |
| EDTA | 0.05 M |

〈十一〉 Primer 表(九)

Primer F1: 5' AGA GTT TGA TCI TGG CTC AG 3'

Primer R5: 5' ACG GIT ACC TTG TTA CGA CTT 3'

〈十二〉 Ethidium bromide

〈十三〉 PCR content

| 藥品名稱 | 體積(μL) |
|------------------------|--------|
| Template DNA | 1.0 |
| 10x buffer | 2.5 |
| Taq polymerase | 0.5 |
| 2.5 mM dNTP | 2.0 |
| Primer F1 (10μM) | 0.5 |
| Primer R5 (10μM) | 0.5 |
| 50mM MgCl ₂ | 2.0 |
| dH ₂ O | 16.0 |

表(十)

肆、研究過程及方法

一、採取土樣

- 〈一〉將已成熟的玉米植株自土中拔出，採取根部周圍的土壤
- 〈二〉將採集土壤中較大的土塊捏成均勻顆粒並陰乾
- 〈三〉磨細的土樣置入夾鏈袋，放入冰箱保存（4~6°C）

| | | | |
|------|--------|--------|--------|
| 編號 | A | B | C |
| 採集地點 | 嘉義縣六角鄉 | 台中市昌明巷 | 台中縣清水鎮 |
| 顏色 | 灰 | 灰 | 紅 |
| 編號 | D | E | F |
| 採集地點 | 台中縣清水鎮 | 堆肥 | 台中市 |
| 顏色 | 紅 | 黑 | 灰 |

| | | | |
|--|--|---|--|
|  |  |  |  |
| 未經處理的土樣 | 陰乾後的土樣 | 土樣裝入研鉢研磨 | 研磨完後各秤取 10g |

圖（一）

二、從土壤中篩選出放線菌

〈二〉配製無菌水：

1. 取樣瓶內裝入 RO 水 90 mL 並高溫高壓滅菌

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| 配製 HV 培養基所需之實驗用品 | HV 培養基 | 無菌水 |

圖（二）

〈三〉十倍序列稀釋：

1. 第一次稀釋：每種土樣各取 10g 分別加入一瓶無菌水中配成稀釋液（10g 土樣 + 90g 無菌水），在稀釋液中各加入 1g Agar 減少沉澱量
2. 第二次稀釋：以定量滴管吸取步驟 1.之稀釋液各 10 mL 分別加入無菌水中（10 mL 稀釋液 + 90 mL 無菌水）
3. 第三次稀釋：重複步驟 2.稀釋所得之稀釋液
4. 第四次稀釋：重複步驟 2.稀釋步驟 3.所得之稀釋液

5. 以定量滴管從步驟 3.及 4.所得之稀釋液各取 0.1 mL 分別加入 HV 培養基中，再以已滅菌的塗抹棒將培養基上的稀釋液均勻塗開
6. 標注土樣代號、日期及濃度
7. 將步驟 5.已處理的培養基與 2 皿未塗抹的培養基（對照組）置於室溫下培養

三、分離出土樣中各種放線菌，並將其分別移入 ISP4 培養基做純品系培養

(一)純品系培養：

1. 3 天後，HV 培養基上長出各種細菌，從中辨別出放線菌

辨別依據：

| | 放線菌 | 其他細菌 |
|----|---|--|
| 外觀 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 小圓形菌落 2. 邊緣有毛狀或輻射狀菌絲 3. 表面粗糙 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 不規則形狀的菌落 2. 無菌絲 3. 表面光滑狀若水滴 |
| 氣味 | 土味 | 惡臭味 |

2. 用已滅菌的移植環將不同種放線菌的菌落分別移植至 ISP4 培養基上，並於培養基上稀釋同種放線菌之菌量。

稀釋方法如下：

- (1) 用已滅菌的移植環將步驟 1.辨別出的放線菌塗抹於 ISP4 培養基約 $\frac{1}{4}$ 的面積
- (2) 將移植環滅菌後，自第一次塗抹處畫出去，塗抹約 $\frac{1}{4}$ 的面積
- (3) 將移植環滅菌後，自第二次塗抹處畫出去，塗抹約 $\frac{1}{4}$ 的面積
- (4) 以石蠟膜將培養皿密封，置於室溫下培養

3. 共分離出 100 種放線菌

| 土樣代號 | 編號 | 總數 | 備註 |
|------|-------------|-----|--------------|
| A | A-001~A-021 | 19 | 003、015 無菌長出 |
| B | B-001~B-010 | 8 | 001、009 無菌長出 |
| C | C-001~C-014 | 13 | 006 無菌長出 |
| D | D-001~D-028 | 28 | |
| E | — | 0 | 無放線菌長出 |
| F | F-001~F-050 | 32 | 其餘 18 種皆有重複 |
| 全部 | | 100 | |



純品系培養的放線菌

圖（三）

四、以不同的放線菌處理玉米種子並種植玉米

〈一〉 方法一：用放線菌的孢子處理玉米種子

1. 將放線菌的孢子黏附在玉米種子上：
 - (1) 配製含介面活性劑的無菌水：以血清瓶裝 1L RO 水加入 Tween 80 並高溫高壓滅菌
 - (2) 各試管裝入 20 個小玻璃珠，蓋上試管蓋並高溫高壓滅菌
 - (3) 將 20 個已滅菌的小玻璃珠放入一皿純品系培養的培養皿中，蓋上培養皿蓋，左右搖晃培養皿使小玻璃珠的表面均勻附著孢子
 - (4) 將步驟(3)所取之試管的管口以酒精燈滅菌，再用已滅菌的鑷子將培養皿中的 20 個小玻璃珠夾回試管內
 - (5) 以定量滴管將 10 mL 無菌水，加入試管中配成孢子懸浮液
 - (6) 在孢子懸浮液中加入 0.1g Carboxymethylcellulose Sodium 使溶液黏稠，孢子較易附著於玉米種子上
 - (7) 在紙杯中放入 18 顆玉米種子，將孢子懸浮液倒入紙杯中，輕搖紙杯使孢子懸浮液能與玉米種子均勻混合
 - (8) 用標籤標註放線菌的編號和種植日期
2. 種植上述步驟處理過的玉米種子：
 - (1) 準備 3×6 的穴盤，將 BVB 培養介質填裝入穴盤至 2/3 滿
 - (2) 以鑷子將處理後的玉米種子分別夾入各穴盤中，以 BVB 培養介質填滿穴盤，最後將標籤插入土中
 - (3) 在溫室中種植玉米，每天固定於 7 時與 19 時自動澆水
3. 80 種菌以此方法分別處理玉米，篩選出七種效果最好的菌
4. 以此方法再次確認，且分別在 10 天與 17 天後各收 36 株玉米植株作數據

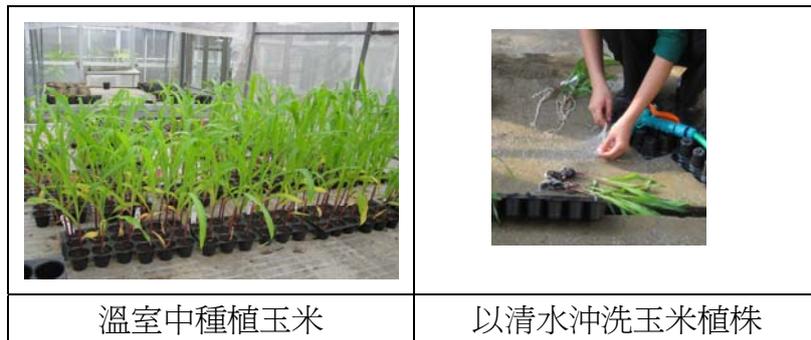
〈二〉 方法二：用放線菌菌體處理玉米種子

1. 液體培養放線菌
 - (1) 16 個錐形瓶各裝入 25mL 的 ISP1 培養液及 20 個小玻璃珠（使搖瓶培養時放線菌生長較均勻且增加溶氧量）並高溫高壓滅菌
 - (2) 用已滅菌的移植環 7 種放線菌分別接入培養液中。每種菌培養 2 瓶，另有 2 瓶對照組〈CK〉
 - (3) 將 16 個錐形瓶置於 28°C 的震盪培養箱中培養
2. 將放線菌體黏附於玉米種子上
 - (1) 培養 7 天後取出
 - (2) 於每個錐形瓶中加入 0.25g Carboxymethylcellulose Sodium 使液體粘稠，放線菌體較易黏附在玉米種子上
 - (3) 在錐形瓶中各放入 18 粒玉米種子，搖晃錐形瓶使瓶內液體與玉米種子混合均勻
 - (4) 用標籤註明日期和放線菌編號
3. 種植已處理的玉米種子
 - (1) 準備 3×6 的穴盤，將 BVB 培養介質填裝入穴盤至 2/3 滿
 - (2) 用鑷子將上述步驟處理過的玉米種子分別夾入各穴盤中
 - (3) 用定量滴管自各錐形瓶中吸取 2mL 放線菌液滴入 BVB 培養介質中

- (4) 用 BVB 培養介質將穴盤填滿，將標籤插入土中
 - (5) 在溫室中種植玉米，每天固定於 7 時與 19 時自動澆水
- 〈三〉 重複方法二，並以含特定濃度 IAA (0.1ppm、1ppm、5ppm、10ppm) 之 ISP1 培養基處理玉米種子做為比較

五、測量玉米植株的鮮重與株高

- 〈一〉 採收玉米植株：玉米成長到適當高度後進行第一次採收，7 天後進行第二次採收
 1. 將玉米植株從培養介質中拔出（不破壞根部），以清水沖洗乾淨並陰乾
- 〈二〉 用電子秤秤量玉米植株之鮮重
- 〈三〉 用皮尺測量玉米植株之株高：自基部量到植株之最高點
- 〈四〉 整理數據並製成圖表



圖（四）

六、測定放線菌是否會產生 IAA

〈一〉 液體培養放線菌

1. 32 個錐形瓶各裝入 25mL 的 LB 培養液並高溫高壓滅菌
2. 以鋁箔紙包覆錐形瓶，於暗室中的無菌操作台用定量滴管吸取 L-form tryptophan_(aq) 2mL 滴入針筒中，針筒前端裝上 0.22 μ m 的針頭過濾器過濾微生物
3. 用已滅菌的移植環將 7 種放線菌分別接入培養液中。每種菌培養 4 瓶，另有 4 瓶為對照組〈CK〉
4. 將 32 個錐形瓶置於 28°C 的震盪培養箱中培養
5. 於 3 天與 7 天後各取兩重複測定是否產生 IAA

〈二〉 測定放線菌 IAA 的分泌量

1. 用定量滴管自每個錐形瓶中吸取 1mL 培養液加入離心管中
2. 將離心管置入離心機中以 10000rpm 離心 10 分鐘
3. 離心後用定量滴管吸取 1mL 上清液滴入試管中
4. 在試管中加入 4mL Van Urk-Salkowski reagent 後置於暗室，30 分鐘後觀察是否有呈色反應
5. 用定量滴管自每個試管中取 0.25mL 的液體滴入微孔盤(96 孔)，以 Magellan 測定液體的吸光度

七、鑑定菌種

〈一〉 PCR 聚合酶連鎖反應

1. DNA 抽取

- (1) 在已滅菌的離心管中裝入 100 μ L 的 lysis buffer
- (2) 挑取放線菌孢子放入離心管，以手指輕彈離心管使其混合均勻後置入 65°C 的恆溫箱 1 小時，讓 DNA 完全溶解
- (3) 加入預熱的 extraction buffer 200 μ L 震盪
- (4) 加入等體積的 phenol / chroform / isocarbamyl alcohol(取下層)
- (5) 上下搖晃均勻至出現乳白色
- (6) 以 14000rpm 離心 10 分鐘
- (7) 取上清液至新的離心管中，並加入 60 μ L 異丙醇沉澱，置入冷凍櫃 10 分鐘
- (8) 以 14000rpm 離心五分鐘後倒去液體
- (9) 以 70% 預冷的 EtoH 清洗兩次，每次離心 2 min.
- (10) 烘乾 5 分鐘 (50°C)
- (11) 以 60°C 預熱的水溶 DNA
- (12) 每種菌取 1.0 μ LDNA 進行以下流程

2. PCR 流程

- (1) 將 PCR content 加入 PCR machine
- (2) 設定 PCR machine 如下

PCR protocol :

| | | |
|------------|------|-------|
| Section1 : | 96°C | 2min |
| Section2 : | 96°C | 45sec |
| (重複 35 次) | 53°C | 30sec |
| | 72°C | 2min |
| Section3 : | 72°C | 5min |
| Section4 : | 4°C | |

使用 F1、R5 引子所放大的 DNA 片段是細菌核糖體的 16SRNA 的 DNA

〈二〉 電泳

- (1) 製作 1.5% 電泳膠片：

將 0.45 g Agarose 加入 30mL 1X TAE buffer，加熱至完全溶解後冷卻至 60°C，再倒入鑄膠槽內，並插上尺梳待其凝固。
- (2) 將 0.6 μ L 6X dye 與 PCR product 3 μ L 混合均勻
- (3) 配製 running buffer (0.5X TAE buffer)：

VmL 的 50X TAE buffer + 99V mL 的 dH₂O = 100VmL 的 0.5X TAE buffer

等電泳膠片凝固後，將膠片置入電泳槽中
- (4) 加入 running buffer 淹沒電泳膠片
- (5) 用定量滴管將染色的 PCR product 滴入膠片的凹槽中
- (6) 通電 100V 30~35 分鐘
- (7) 用 Ethidium Bromide 將膠片染色
- (8) 將膠片放在 UV 燈下呈色



圖 (五)

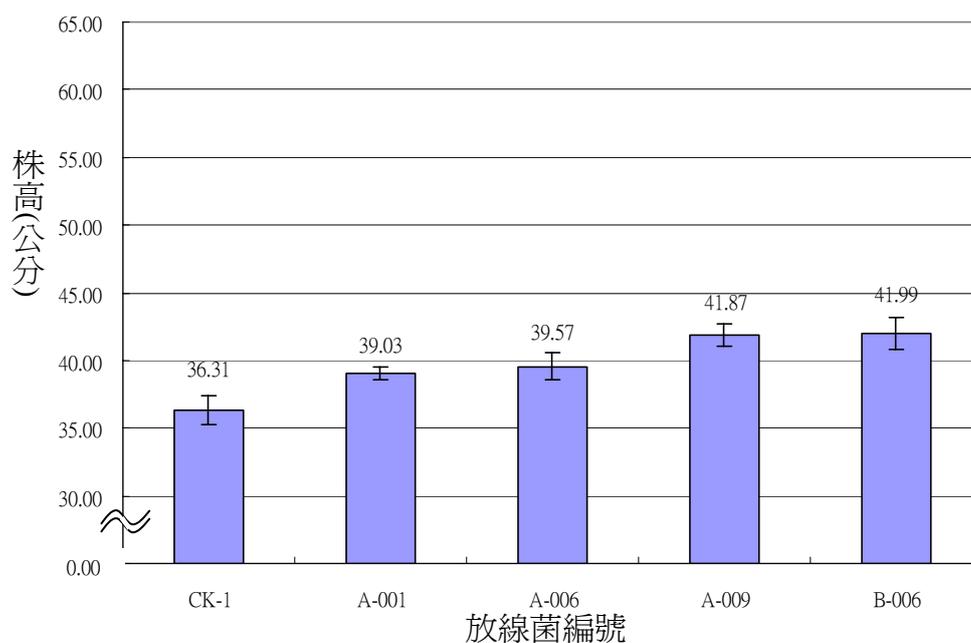
〈三〉 將此段 16SRNA 的 DNA 交給專業人員解序後上網比對菌種

伍、研究結果

一、方法一：用放線菌孢子處理玉米種子

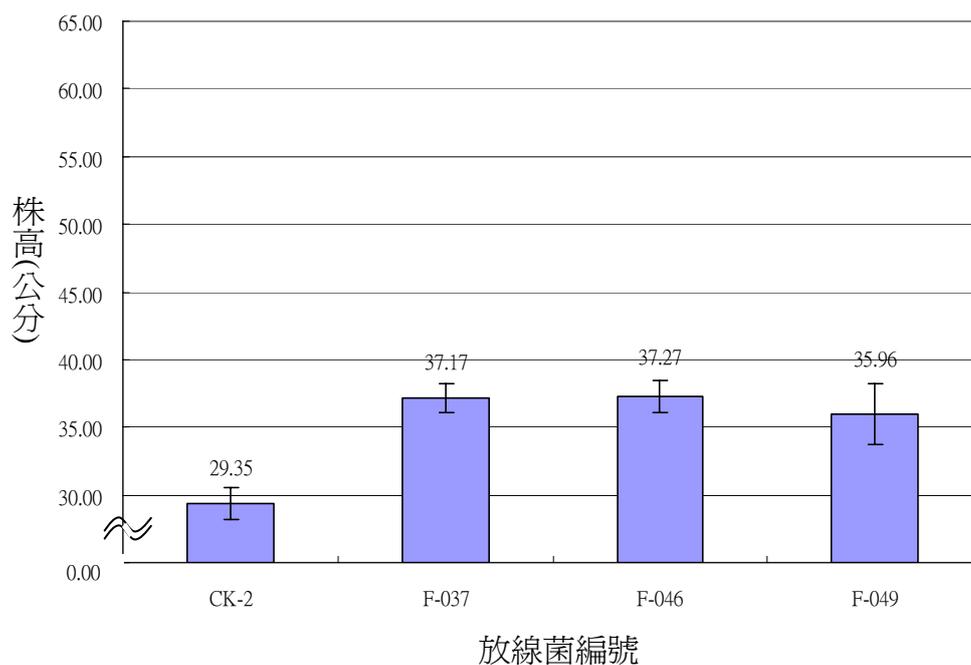
〈一〉 從 80 種放線菌中篩選出 7 種對玉米生長影響較明顯的放線菌
(2007 年 7 月 23 日~2007 年 8 月 1 日)

用不同種放線菌孢子處理過的玉米平均株高



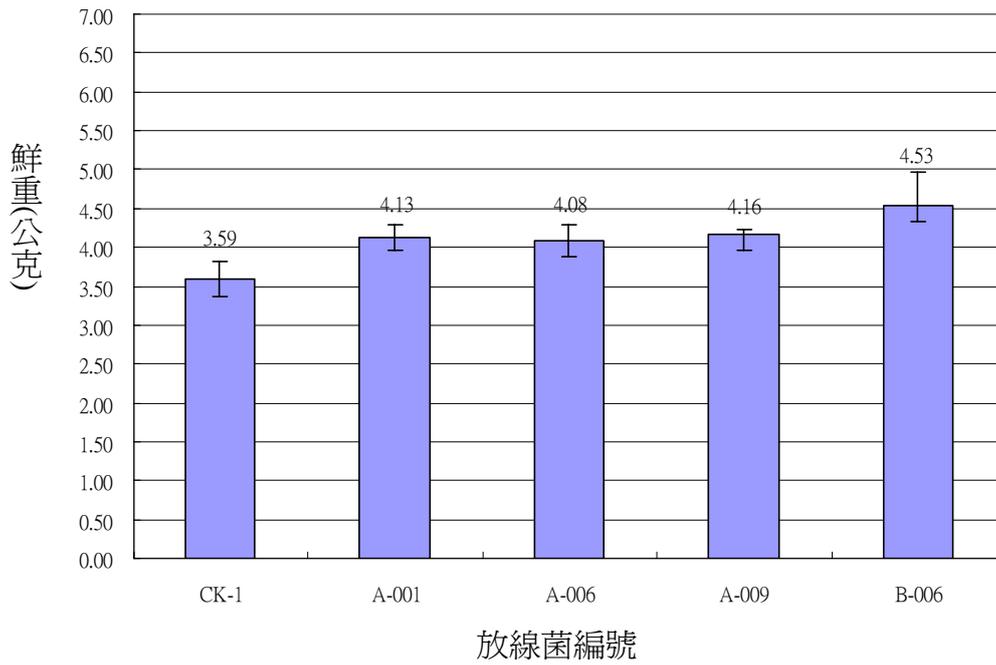
圖表 (一)

用不同種放線菌孢子處理過的玉米平均株高



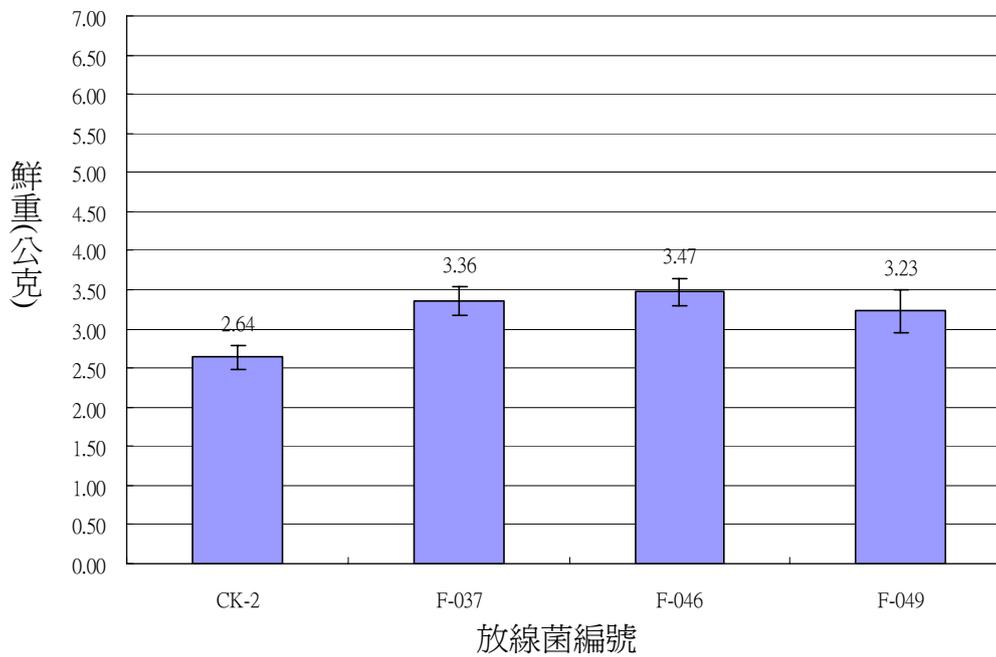
圖表 (二)

用不同種放線菌孢子處理過的玉米平均鮮重



圖表 (三)

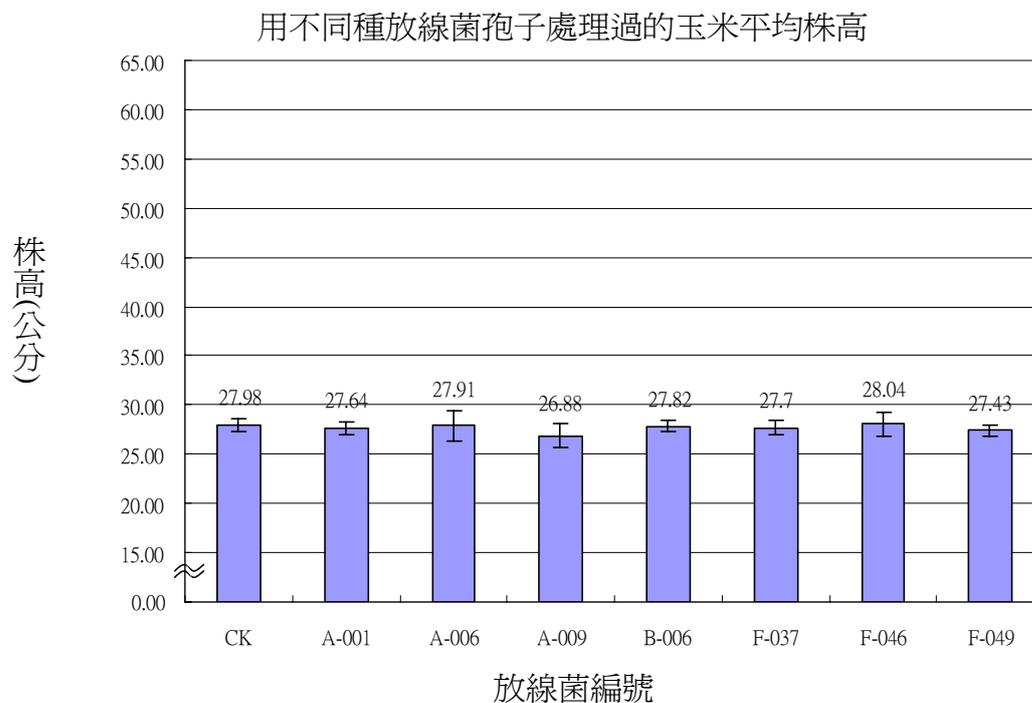
用不同種放線菌孢子處理過的玉米平均株高



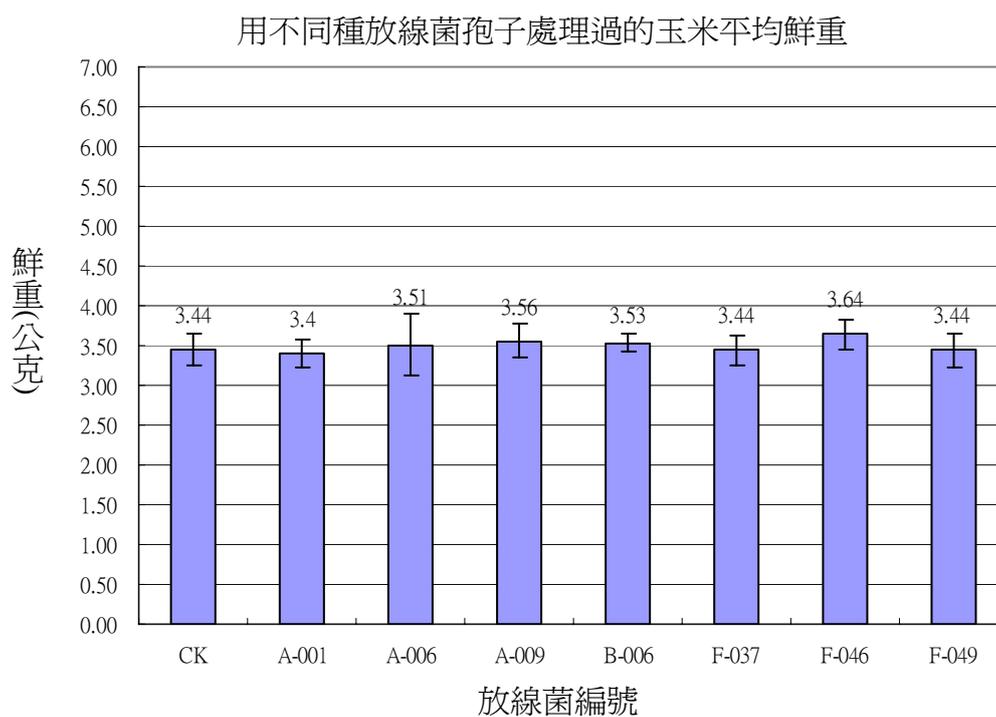
〈二〉 種植 10 天〈2007 年 10 月 18 日 ~ 2007 年 10 月 28 日〉

| 項目 \ 放線菌編號 | CK | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 | F-037 | F-046 | F-049 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 平均株高(公分) | 27.98 | 27.64 | 27.91 | 26.88 | 27.82 | 27.7 | 28.04 | 27.43 |
| 平均鮮重(公克) | 3.44 | 3.4 | 3.51 | 3.56 | 3.53 | 3.44 | 3.64 | 3.44 |

表 (十一)



圖表 (五)

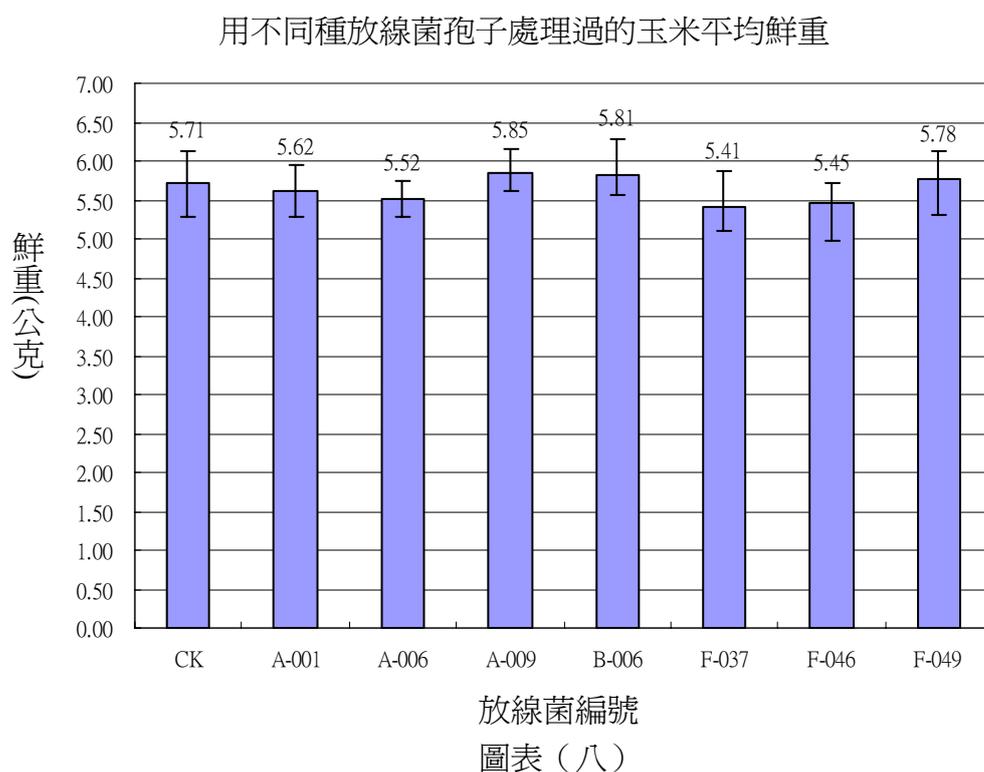
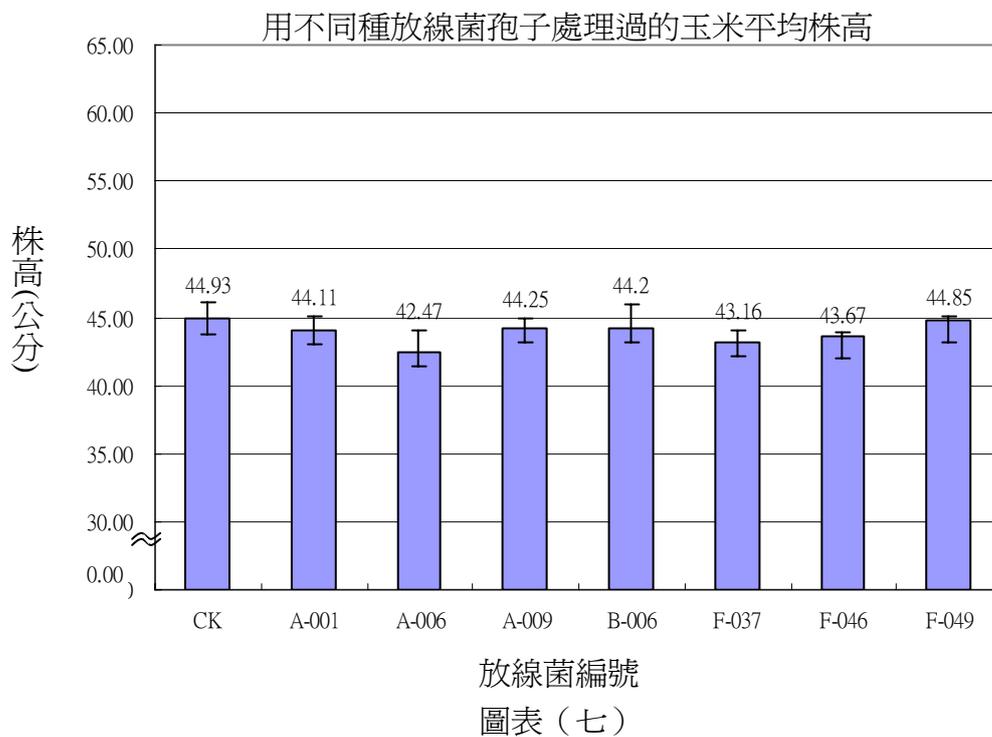


圖表 (六)

〈三〉 種植 17 天〈2007 年 10 月 18 日 ~ 2007 年 11 月 4 日〉

| 項目 \ 放線菌編號 | CK | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 | F-037 | F-046 | F-049 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 平均株高(公分) | 44.93 | 44.11 | 42.47 | 44.25 | 44.20 | 43.16 | 43.67 | 44.85 |
| 平均鮮重(公克) | 5.71 | 5.62 | 5.52 | 5.85 | 5.81 | 5.41 | 5.45 | 5.78 |

表 (十二)



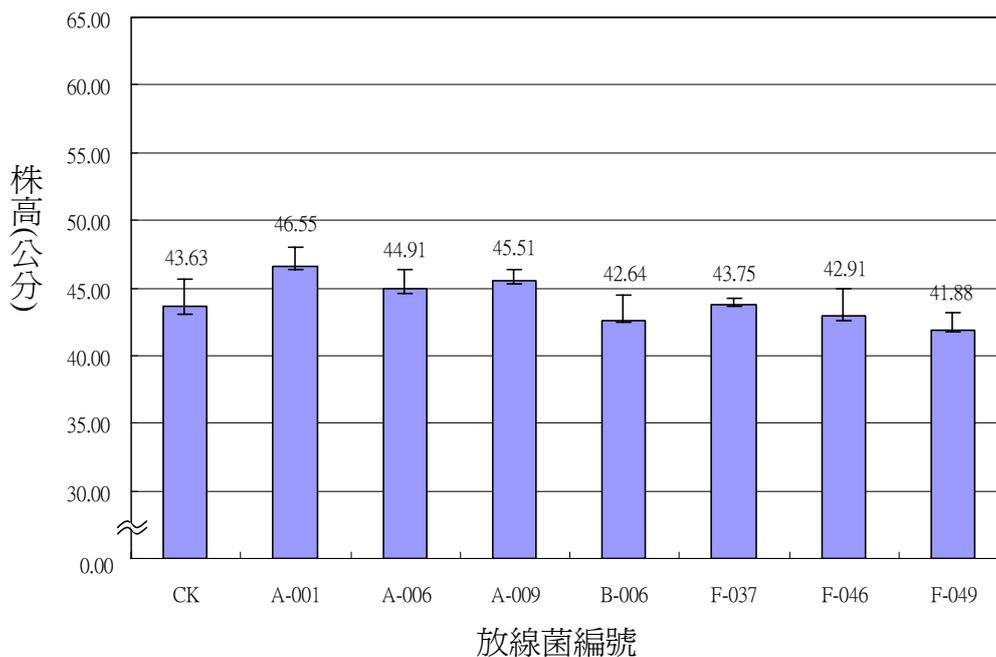
二、方法二：用放線菌菌體處理玉米種子

〈一〉 種植 21 天〈2007 年 12 月 28 日 ~ 2008 年 1 月 18 日〉

| 項目 \ 放線菌編號 | CK | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 | F-037 | F-046 | F-049 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 平均株高(公分) | 43.63 | 46.55 | 44.91 | 45.51 | 42.64 | 43.75 | 42.91 | 41.88 |
| 平均鮮重(鮮重) | 4.52 | 4.32 | 4.55 | 4.58 | 3.79 | 3.73 | 4.37 | 4.39 |

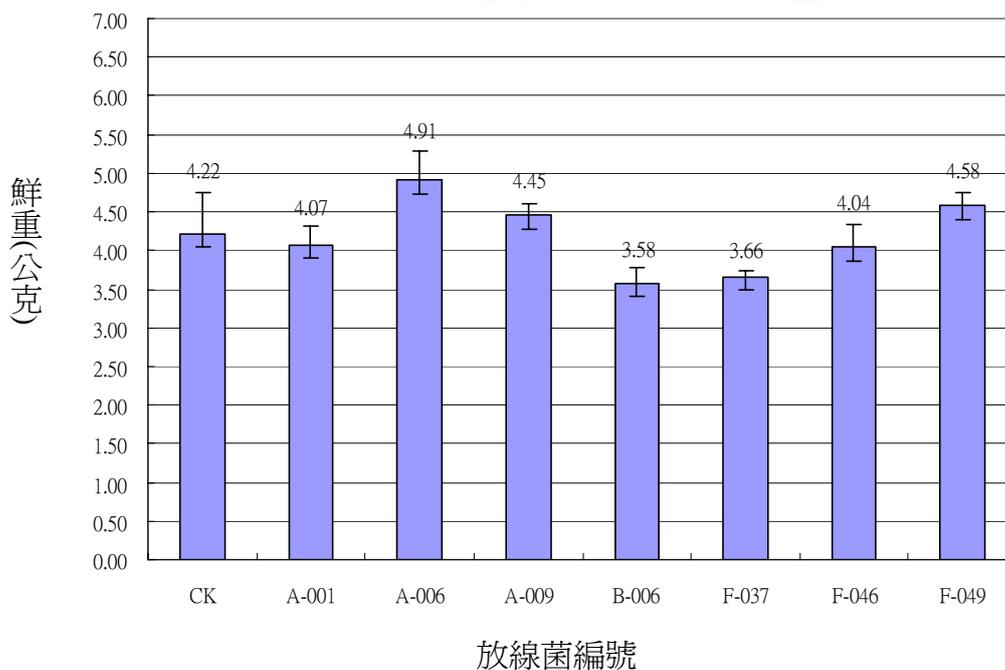
表 (十三)

用不同種的放線菌菌體處理過的玉米平均株高



圖表 (九)

用不同種放線菌菌體處理過的玉米平均鮮重

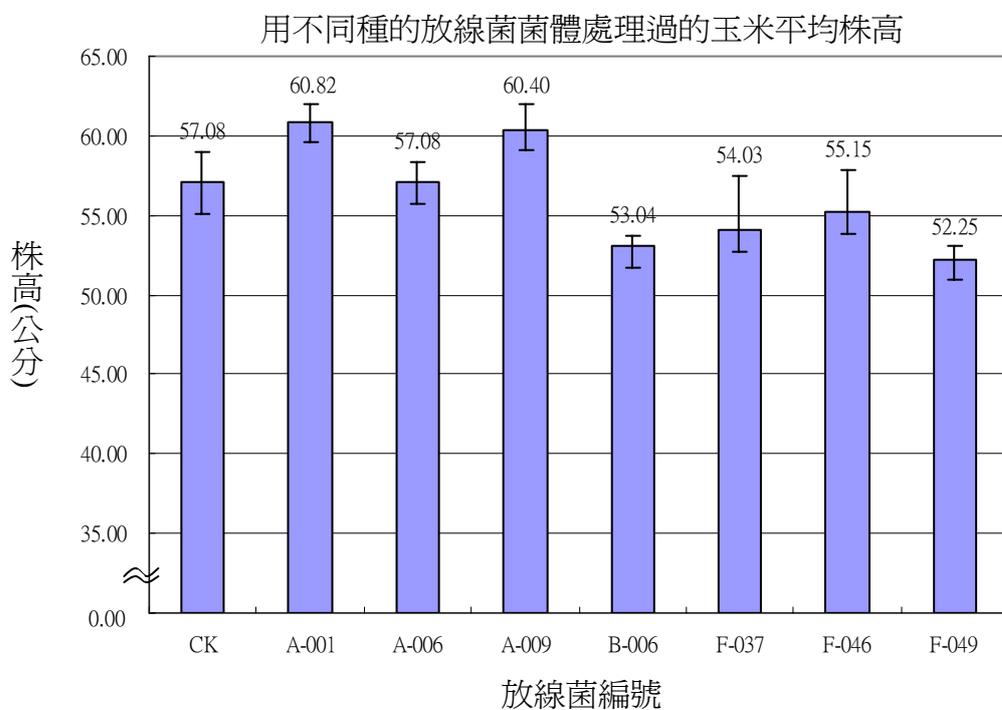


圖表 (十)

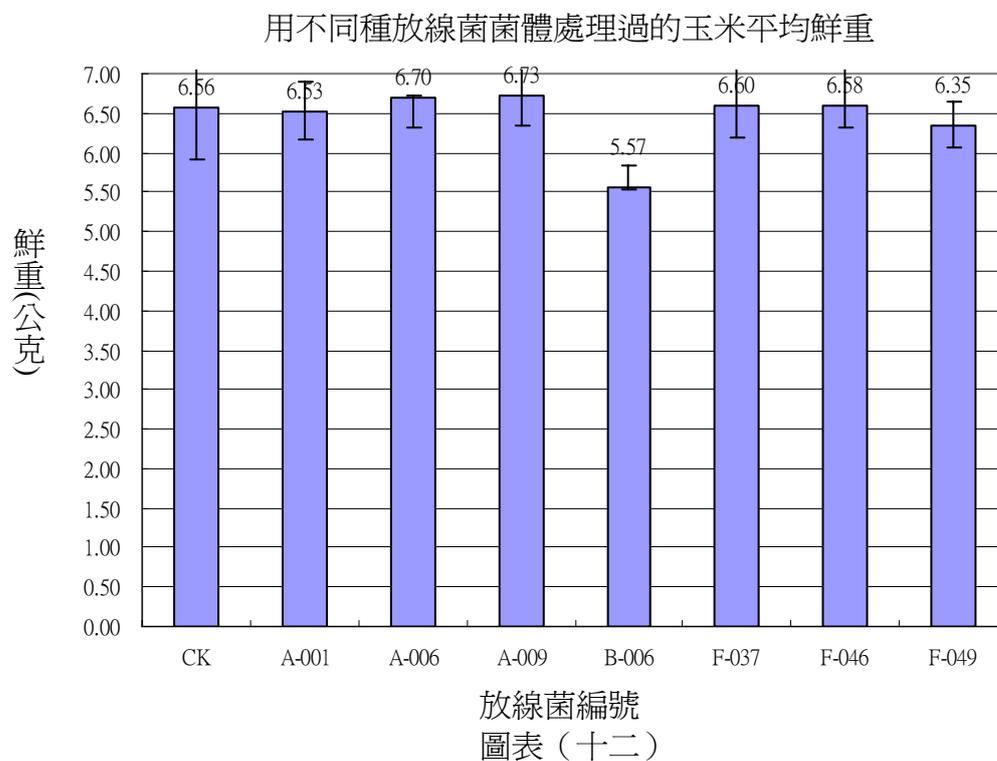
〈二〉 種植 28 天〈2007 年 12 月 28 日 ~ 2008 年 1 月 25 日〉

| 項目 \ 放線菌編號 | CK | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 | F-037 | F-046 | F-049 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 平均株高(公分) | 57.08 | 60.82 | 57.08 | 60.40 | 53.04 | 54.03 | 55.15 | 52.25 |
| 平均鮮重(鮮重) | 6.56 | 6.53 | 6.70 | 6.73 | 5.57 | 6.60 | 6.58 | 6.35 |

表 (十四)



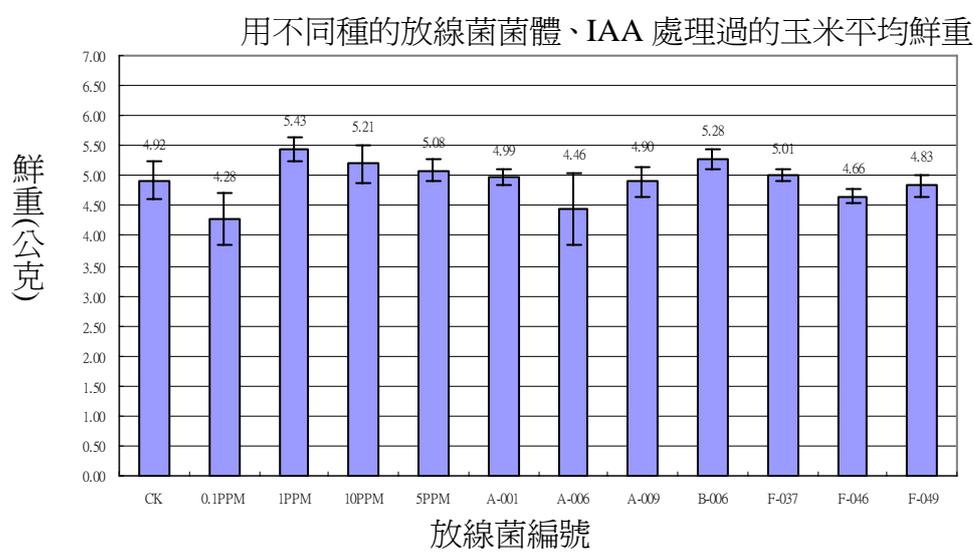
圖表 (十一)



圖表 (十二)

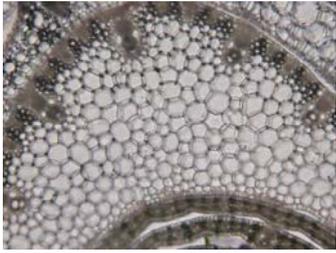
〈三〉 重複方法二，並以含特定濃度 IAA 之 ISP1 培養基處理玉米種子做為比較

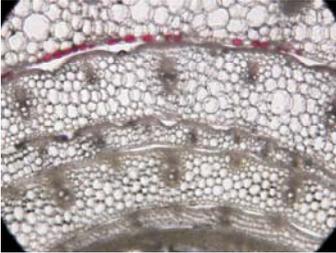
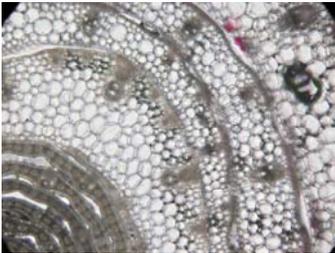
| 放線菌編號 | 用不同種的放線菌菌體、IAA 處理過的玉米 | | | | | 平均株高 | | | |
|----------|-----------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 項目 | CK | 0.1ppm | 1ppm | 5ppm | 10ppm | | A-001 | | |
| 平均株高(公分) | 40.31 | 36.51 | 41.49 | 40.41 | 39.96 | | 39.91 | | |
| 平均鮮重(公克) | 4.92 | 4.28 | 5.43 | 5.08 | 5.21 | | 4.99 | | |
| 放線菌編號 | | | | | | | F-049 | | |
| 平均株高(公分) | 40.31 | 36.51 | 41.49 | 40.41 | 39.96 | 40.86 | 40.05 | 39.39 | 38.87 |
| 平均鮮重(公克) | 4.46 | 4.90 | 5.28 | 5.01 | 4.66 | 4.83 | | | |

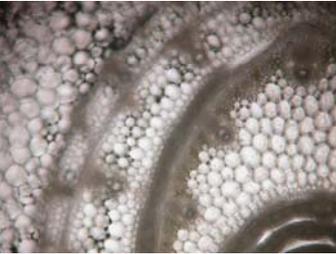


圖表 (十四)

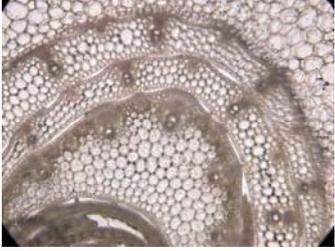
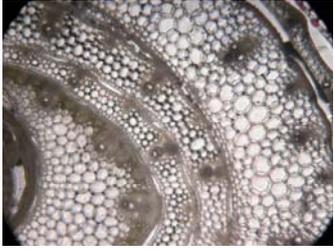
三、經不同種放線菌處理過的玉米莖部基部之切片

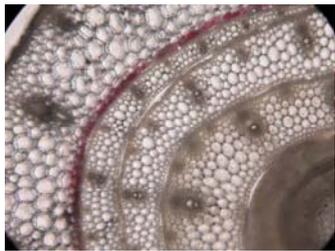
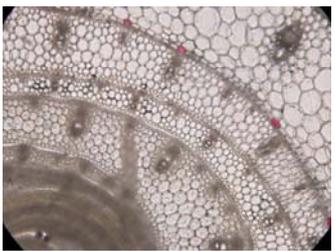
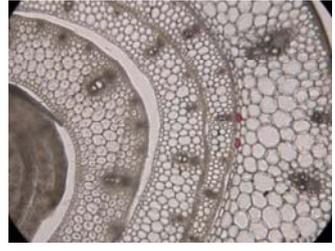
| | | | |
|----------------|---|--|---|
| CK 玉米莖部基部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 5 | 9 | 4 |

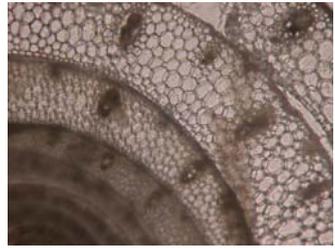
| | | | |
|-------------------|---|--|---|
| A-001 玉米莖部基部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 10 | 9 | 14 |

| | | | |
|-------------------|---|--|---|
| A-006 玉米莖部基部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 7 | 13 | 13 |

| | | | |
|-------------------|---|--|---|
| A-009 玉米莖部基部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 7 | 9 | 13 |

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| B-006 玉米莖部基 部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 12 | 8 | 11 |

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| F-037 玉米莖部基 部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 11 | 11 | 11 |

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| F-046 玉米莖部基 部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 9 | 8 | 12 |

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| F-049 玉米莖部基 部切片 |  |  |  |
| 維管束個數 | 10 | 9 | 12 |

圖（六）

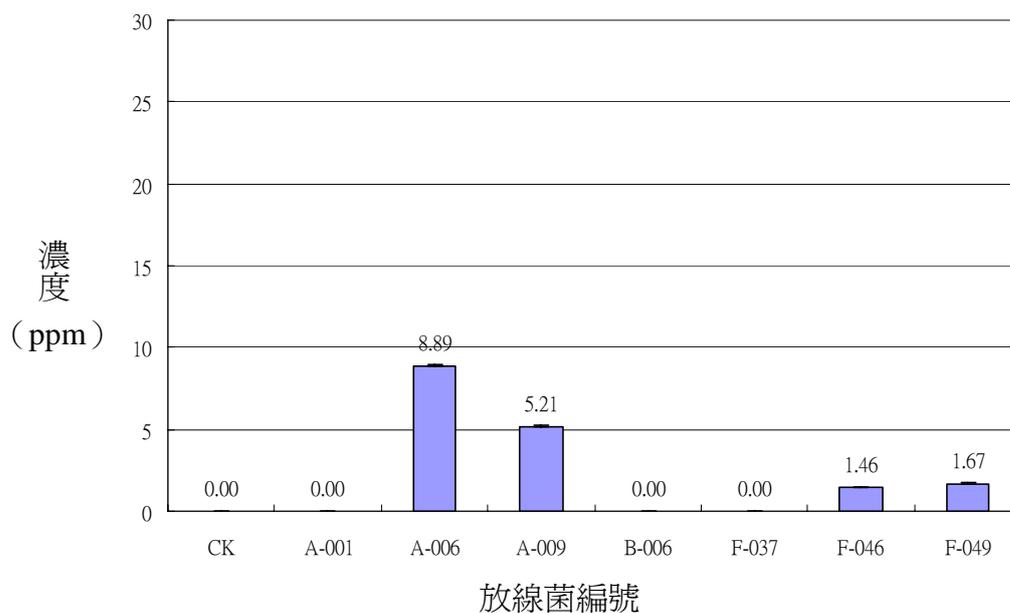
四、定溫培養放線菌並測量其分泌 IAA 的濃度

〈一〉 定溫 (28°C) 培養放線菌 3 天

| 放線菌編號 試樣編號 | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 |
|-------------------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | 0.082 | 0.161 | 0.12 | 0.077 |
| 2 | 0.087 | 0.149 | 0.124 | 0.077 |
| 3 | 0.081 | 0.144 | 0.123 | 0.078 |
| 4 | 0.085 | 0.144 | 0.125 | 0.08 |
| 吸光值平均 | 0.08375 | 0.1495 | 0.123 | 0.078 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 0 | 8.889 | 5.208 | 0 |
| 放線菌編號 試樣編號 | F-037 | F-046 | F-049 | CK |
| 1 | 0.086 | 0.096 | 0.106 | 0.085 |
| 2 | 0.083 | 0.099 | 0.095 | 0.096 |
| 3 | 0.085 | 0.096 | 0.096 | 0.093 |
| 4 | 0.083 | 0.093 | 0.093 | 0.086 |
| 吸光值平均 | 0.08425 | 0.096 | 0.0975 | 0.09 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 0 | 1.458 | 1.667 | 0 |

表 (十六)

IAA 濃度 (28°C 3 天)

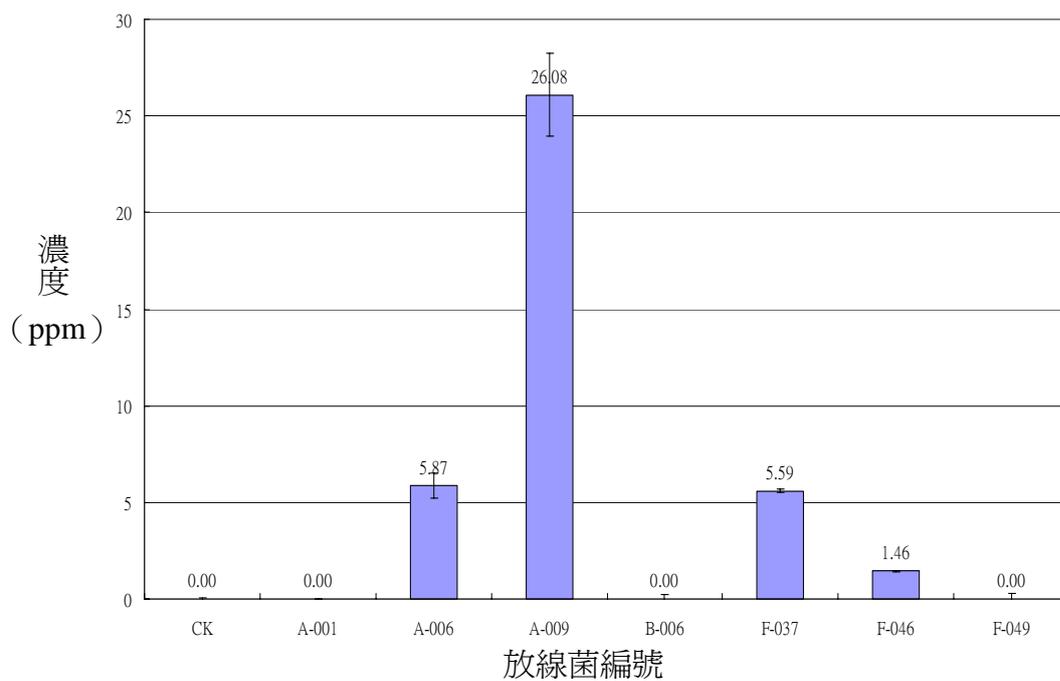


圖表 (十五)

〈二〉 定溫 (28°C) 培養放線菌 7 天

| 放線菌編號 試樣編號 | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|
| 1 | 0.049 | 0.035 | 0.068 | 0.102 |
| 2 | 0.05 | 0.1 | 0.052 | 0.077 |
| 3 | 0.046 | 0.17 | 0.496 | 0.056 |
| 4 | 0.045 | 0.206 | 0.477 | 0.047 |
| 吸光值平均 | 0.0475 | 0.12775 | 0.27325 | 0.0705 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 0 | 5.868 | 26.076 | 0 |
| 放線菌編號 試樣編號 | F-037 | F-046 | F-049 | CK |
| 1 | 0.115 | 0.096 | 0.053 | 0.072 |
| 2 | 0.137 | 0.099 | 0.053 | 0.083 |
| 3 | 0.123 | 0.096 | 0.118 | 0.071 |
| 4 | 0.128 | 0.093 | 0.114 | 0.074 |
| 吸光值平均 | 0.12575 | 0.096 | 0.0845 | 0.075 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 5.590 | 1.458 | 0 | 0 |

表 (十七)
IAA 濃度 (28°C 7 天)



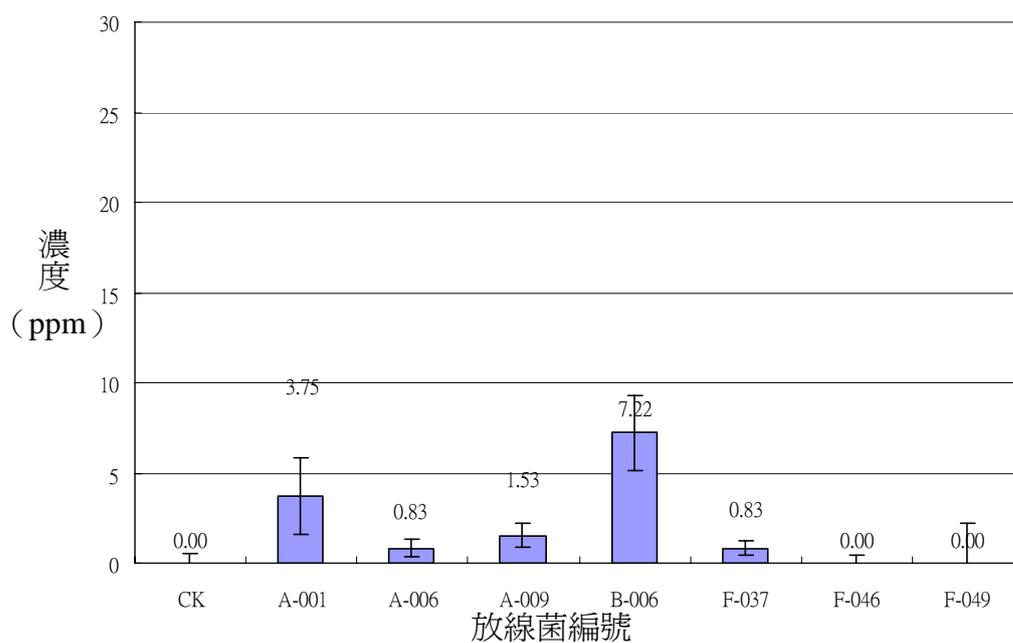
圖表 (十六)

〈三〉 定溫 (24°C) 培養放線菌 3 天

| 放線菌編號 試樣編號 | A-001 | A-006 | A-009 | B-006 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.125 | 0.120 | 0.117 | 0.148 |
| 2 | 0.125 | 0.114 | 0.122 | 0.145 |
| 3 | 0.162 | 0.112 | 0.115 | 0.170 |
| 4 | 0.133 | 0.112 | 0.127 | 0.181 |
| 吸光值平均 | 0.136 | 0.115 | 0.120 | 0.161 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 3.750 | 0.833 | 1.528 | 7.222 |

| 放線菌編號 試樣編號 | F-037 | F-046 | F-049 | CK |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.112 | 0.111 | 0.098 | 0.112 |
| 2 | 0.116 | 0.108 | 0.101 | 0.114 |
| 3 | 0.113 | 0.108 | 0.072 | 0.105 |
| 4 | 0.119 | 0.115 | 0.077 | 0.106 |
| 吸光值平均 | 0.115 | 0.110 | 0.087 | 0.109 |
| IAA 平均濃度 (ppm) | 0.833 | 0 | 0 | 0 |

表 (十八)
IAA 濃度 (24°C 3 天)



圖表 (十六)

五、放線菌的鑑定

| 菌編號 | 學名 |
|-------|---|
| A-006 | <i>Streptomyces fradiae</i> |
| A-009 | <i>Streptomyces</i> sp.(97%) <i>Streptomyces roseogriseus</i> (97%) |
| B-006 | <i>Streptomyces</i> sp.(98%) <i>Streptomyces aureus</i> (97%) |
| F-037 | <i>Streptomyces aureus</i> |
| F-046 | <i>Streptomyces</i> sp.(98%) <i>Streptomyces albogriseclus</i> (97%) |
| F-049 | <i>Streptomyces flaveus</i> |

表（十九）

陸、討論

一、實驗過程之討論

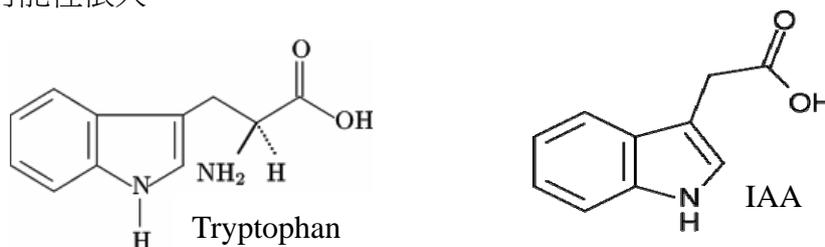
（一） 配製 HV 培養基後，另加入 thiamine HCl、biotin 與 cycloheimide。

1. 先將 thiamine HCl 及 biotin 配成濃縮液。因實驗所需的用量極少，直接秤取誤差較大，故先將藥品配成濃縮液，再取適當量加入培養基中能降低誤差。
2. HV 培養基高溫高壓滅菌後冷卻至 40°C~50°C 時加入 cycloheimide，因此種化學藥品能抑制真菌生長，但在高溫下會被破壞，故須等到培養基冷卻後方可加入。
3. thiamine HCl、biotin 可作為放線菌生長時所需的養分，將 thiamine HCl、biotin 加入培養基時須以 0.22 μ m 的針頭過濾器將微生物濾掉，因此時 HV 培養基中已含 cycloheimide，無法再利用高溫高壓滅菌，故需用此法過濾。

（二） 測定 IAA 的濃度

色胺酸為 IAA 生成的前驅物，有 L-form tryptophan（L-色胺酸）及 D-form tryptophan（D-色胺酸）兩種。D-form tryptophan 不溶於水，僅溶於有機溶劑如酒精，酒精對微生物有害，因此細菌無法使用。

植物能以色胺酸合成 IAA，因此我們認為在植物根附近應有此胺基酸，所以在測試 IAA 的實驗中加入 L-form tryptophan，若放線菌能由此前驅物生成 IAA，就可能可促進植物生長，且我們實驗的菌種是從玉米基部的土壤中分離出，能促進玉米生長的可能性很大。



圖（七）

1. 吸光值的測定：

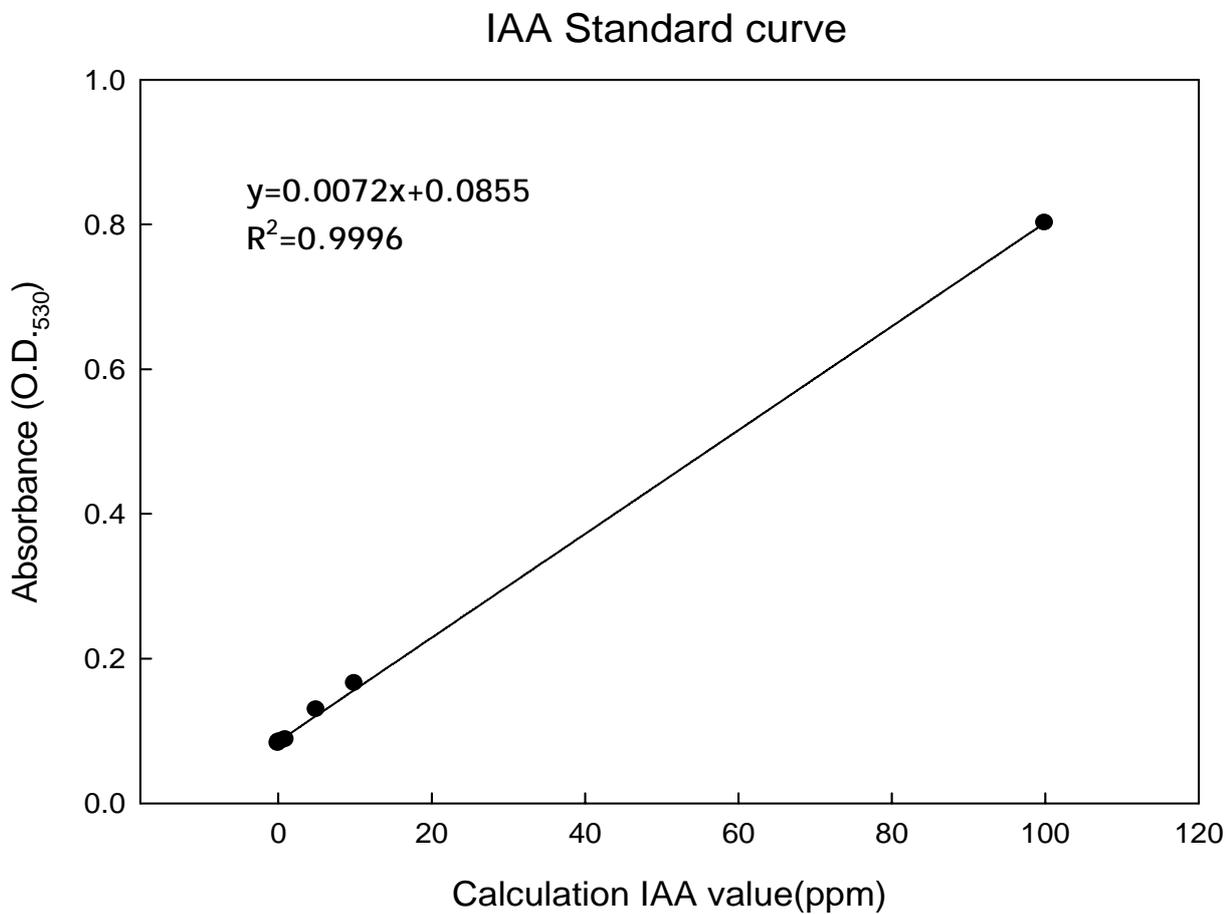
IAA 會與 Van Urk-Salkowski 反應呈現紅色，Magellan 用以測液體的透光度並轉換為吸光值(OD_{λ})，以 Magellan 測量波長 530nm 的光下該溶液之吸光值
公式如下：

$$OD_{\lambda} = -\log T = -\log(I/I_0)$$

$$\left(\begin{array}{l} T = \text{the per-unit transmittance} \\ I_0 = \text{the intensity of the incident light beam} \\ I = \text{the intensity of the transmitted light beam} \end{array} \right)$$

2. 推測 IAA 的濃度

我們已知濃度 10^{-1} ppm、1ppm、10ppm、100ppm 的 IAA 溶液吸光值，推測出一函數（如下圖），將 Magellan 測得之吸光值帶入此函數，推測出 IAA 的含量。



圖表（十七）

二、實驗結果之討論

(一) 放線菌對玉米生長的影響

1. 方法一：用放線菌的孢子處理玉米種子

| 種植 10 天〈2007 年 10 月 18 日 ~ 2007 年 10 月 28 日〉 | | |
|--|---------------|---------------|
| 放線菌編號 | 玉米株高實驗組與對照組之比 | 玉米鮮重實驗組與對照組之比 |
| CK | 1 | 1 |
| A-001 | 0.99 | 0.99 |
| A-006 | 1.00 | 1.02 |
| A-009 | 0.96 | 1.03 |
| B-006 | 0.99 | 1.03 |
| F-037 | 0.99 | 1.00 |
| F-046 | 1.00 | 1.06 |
| F-049 | 0.98 | 1.00 |

表 (二十)

| 種植 17 天〈2007 年 10 月 18 日 ~ 2007 年 11 月 4 日〉 | | |
|---|---------------|---------------|
| 放線菌編號 | 玉米株高實驗組與對照組之比 | 玉米鮮重實驗組與對照組之比 |
| CK | 1 | 1 |
| A-001 | 0.98 | 0.98 |
| A-006 | 0.95 | 0.97 |
| A-009 | 0.98 | 1.02 |
| B-006 | 0.98 | 1.02 |
| F-037 | 0.96 | 0.95 |
| F-046 | 0.97 | 0.95 |
| F-049 | 1.00 | 1.01 |

表 (二十一)

方法二：用放線菌菌體處理玉米種子

| 種植 21 天〈2007 年 12 月 28 日 ~ 2008 年 1 月 18 日〉 | | |
|---|---------------|---------------|
| 放線菌編號 | 玉米株高實驗組與對照組之比 | 玉米鮮重實驗組與對照組之比 |
| CK | 1 | 1 |
| A-001 | 1.07 | 0.96 |
| A-006 | 1.03 | 1.01 |
| A-009 | 1.04 | 1.01 |
| B-006 | 0.98 | 0.84 |
| F-037 | 1.00 | 0.83 |
| F-046 | 0.98 | 0.97 |
| F-049 | 0.96 | 0.97 |

表（二十二）

| 種植 28 天〈2007 年 12 月 28 日 ~ 2008 年 1 月 25 日〉 | | |
|---|---------------|---------------|
| 放線菌編號 | 玉米株高實驗組與對照組之比 | 玉米鮮重實驗組與對照組之比 |
| CK | 1 | 1 |
| A-001 | 1.07 | 1.00 |
| A-006 | 1.00 | 1.02 |
| A-009 | 1.06 | 1.03 |
| B-006 | 0.93 | 0.85 |
| F-037 | 0.95 | 1.01 |
| F-046 | 0.97 | 1.00 |
| F-049 | 0.92 | 0.97 |

表（二十三）

（二） 同種放線菌效果差異的探討

1. 七種放線菌在夏季對玉米有較明顯促進生長作用，討論可能原因如下：
 - (1) 放線菌分泌植物生長激素如 IAA 或玉米生長所需養分
 - (2) 抑制土壤中抑制玉米生長的菌種
 - (3) 促進發根、維管束組織的分化及生長
2. 但第二次重複方法一種植時，A-001、F-037、F-046 對玉米生長無促進作用，甚至比對照組矮小，討論可能原因如下：
 - (1) 菌量控制及測量上的誤差
 - (2) 放線菌生長天數的差異
 - (3) 初步篩選菌時於夏季，當時促進生長效果明顯而此次並無，推測溫度對這幾種菌有影響，如合成 IAA 之酵素的活性
 - (4) 放線菌與植物競爭土壤養分，造成抑制植物生長的現象

(三) 不同種植時間對實驗結果之影響

1. 比較相隔一週的玉米生長情形：

種植的玉米分兩次採收，第一次為玉米生長至適當高度時，第二次為與第一次相隔 7 天後，由此探討時間與放線菌對玉米生長影響的關係。

由實驗知方法一種植結果：後 7 天比前 7 天的影響效果平均減少 0.1%，可能原因如下：

(1) 培養介質中的其他菌種與放線菌競爭：

種植玉米後，所添加的放線菌與培養介質中其他菌種達新的生態平衡，原本菌量的優勢不再，故對促進玉米生長的效果漸減

(2) 放線菌對玉米的生長機制影響無持久性

(3) 穴盤的空間及所盛裝培養介質的養分有限，若要探討長期種植時放線菌對玉米生長的影響，應供以較大的空間及足夠的養分生長

(4) 但 3. 直接經放線菌菌體處理過的玉米，其影響效果生長 7 天後比 7 天前增加了 4%。而經放線菌孢子處理之玉米其影響效果 7 天候比 7 天前減少 0.1%。造成此種差異之可能原因如下：

(1) 直接添加菌體時，添加之菌量較添加孢子時多，放線菌可能維持較長時間的生長優勢

(2) 放線菌分泌之生長素濃度隨時間增長而增加

(3) 當培養介質中養分不足時，死亡的放線菌菌體可成為植物養分的另一來源

2. 不同季節，玉米生長天數的控制：

玉米生長受天氣影響，夏季時（溫室室溫約 30°C ~ 35°C）生長較快；冬季時（溫室室溫約 18°C ~ 22°C）生長較慢，待玉米生長至適當高度（約 30 cm~40 cm）時才進行第一次採收，以免影響實驗準確性，因此於不同季節對玉米生長天數會做適當調整

(四) IAA 的分泌量與放線菌培養天數的探討

探討 28°C 下培養三天及七天的菌產生 IAA 量不同的因素

1. A-009 分泌 IAA 的量隨時間增長而增多，表此種菌分泌 IAA 的量可能因放線菌的年齡增加而增加。
2. A-006 培養 7 天所分泌 IAA 的量反較培養 3 天的少，可能原因為人為失誤
3. F-046 分泌 IAA 的量未隨時間增加而增加，可能原因如下：
 - (1) 此種放線菌僅在剛開始培養、養分充足的 3 天內分泌 IAA
 - (2) IAA 量達一定濃度後會抑制此菌分泌 IAA
 - (3) 我們加入之色胺酸量固定，若此菌產生 IAA 的途徑需用到此胺基酸，則可能須在此胺基酸濃度達一定量時才產生 IAA
4. F-037 培養 3 天未測得有分泌 IAA，而在培養 7 天後測得，可知此種放線菌須在培養一段時間後方產生 IAA
5. F-049 培養 3 天測得有分泌 IAA，而在培養 7 天後無，其可能原因為：
 - (1) 實驗誤差
 - (2) 產生之 IAA 被放線菌分解

6. A-001、B-006 皆未分泌 IAA

(五) IAA 的分泌量與培養放線菌的溫度之關係

重複方法二，並以含特定濃度 IAA 之 ISP1 培養基處理玉米種子做為比較

| 種植 12 天 (2008 年 5 月 18 日 ~ 2008 年 5 月 30 日) | | |
|---|---------------|---------------|
| 放線菌編號 | 玉米株高實驗組與對照組之比 | 玉米鮮重實驗組與對照組之比 |
| CK | 1 | 1 |
| 0.1ppm IAA | 0.91 | 0.87 |
| 1ppm IAA | 1.02 | 1.10 |
| 5ppm IAA | 1.01 | 1.03 |
| 10ppm IAA | 0.99 | 1.06 |
| A-001 | 0.99 | 1.01 |
| A-006 | 0.90 | 0.91 |
| A-009 | 0.96 | 1.00 |
| B-006 | 1.01 | 1.07 |
| F-037 | 0.99 | 1.02 |
| F-046 | 0.98 | 0.94 |
| F-049 | 0.96 | 0.98 |

表 (二十五)

- 選擇於 24°C 及 28°C 培養放線菌產生 IAA 的量是因土壤中的溫度不像氣溫變化那麼大，夏天(32°C)土中溫度約 28°C，而冬天(20°C)土中溫度約 24°C
- 不同種放線菌在此二溫度下培養 3 天產生 IAA 量的比較
 - A-001、B-006 在 24°C 下產生 IAA 5ppm 以上，在 28°C 下不產生
 - A-006、A-009 在 24°C 下產生之 IAA 量在 1ppm 上下，在 28°C 下產生 5ppm 以上
 - F-037 在 24°C 下產生約 1ppm 之 IAA，在 28°C 下不產生；F-046、F-049 則相反

(六) 不同溫度下玉米生長情形與 IAA 分泌量之探討

由於測量 IAA 產生量的菌是直接由菌體開始培養，所以我們主要探討直接以菌體黏附玉米對其株高及鮮重之影響與 IAA 產量的關係。由表(二十五)知：用加入 1ppm IAA 的培養液處理過的玉米，其促進生長的效果最明顯，IAA 濃度太高或太低都會有相反效果

1. 以方法二種植玉米探討 IAA 分泌量對株高之影響

(1) 冬天：

促進：A-001、A-006、A-009，其中 A-006、A-009 於 24°C 產生約 1ppm 的 IAA；而 A-001 產生 IAA 的量在 1~5ppm 之間

抑制最明顯：B-006，於 24°C 產生 IAA 的濃度超過 7ppm 可能因此抑制玉米生長

(2) 夏天：

促進：B-006，但於 28°C 無 IAA 產生，推測 B-006 有其他影響玉米生長的因素

抑制最明顯：A-006、A-009 於 28°C 產生 IAA 的濃度皆高於 5ppm，可能抑制株高

2. 以方法二種植玉米探討 IAA 分泌量對鮮重之影響

從實驗知：夏天玉米鮮重受放線菌影響較冬天大但並非與 IAA 的分泌量有關，推測有其他影響其生長的因素

(七) 放線菌對玉米莖部基部維管束分布的影響

由玉米莖部基部之切片照片可看出，經放線菌處理的玉米，葉鞘層次較對照組多，表葉片數較多；薄壁細胞與維管束數量也較多，可提升植株運輸水分及養分的功效，使玉米生長較快

(八) 土壤中的微生物相

培養介質中微生物相十分複雜，放線菌和土壤中其他菌種有共生、競爭等關係，故不能以放線菌在培養基中分泌 IAA 的情形直接斷定此種放線菌對玉米生長的情形。

柒、結論

- 一、會分泌特定濃度 IAA 的放線菌對玉米的株高及鮮重均有促進作用，但有促進作用的放線菌不一定會分泌 IAA
- 二、經放線菌處理的玉米，葉鞘層次較對照組多，表葉片數較多；薄壁細胞與維管束數量也較多，可提升植株運輸水分及養分的功效，使玉米生長較快
- 三、在不同溫度下同種放線菌分泌的 IAA 量不同，因此在不同季節對玉米生長的影響情況不同

捌、未來展望

- (一) 以蝦蟹殼粉代替培養基培養放線菌以達廢物利用
- (二) 增加玉米種植的天數、生長空間及養分
- (三) 放線菌對土壤的微生物相的影響
- (四) 繪製不同濃度 IAA 在特定溫度下對玉米生長的影響曲線，藉此比較各種放線菌分泌的 IAA 濃度

玖、參考文獻

一、中文部分

〈一〉博士論文

石信德 鏈黴菌 PMS-702 防治作物病害的功效與其抑制主要代謝物防治黴色素之鑑定 (2003 年一月)

〈二〉科學期刊：科學發展 391 期：1-30 (2005 年七月)

二、英文部分

Plant Growth Regulation 40：97-106 2003 Kluwer Academic Publishers. (2003 年)

Colorimetric assay for indolic compounds Gordon and Weber, Colorimetric estimation of indoleacetic acid, Plant Phys. 26, 192-195 (1951 年)

【評語】 040709

放線菌在植物保護及植物生長調節是一個不錯的題材。作者等的研究目的明確亦有一定程度的重要性…但可能礙於時間不足，致實驗成果未能依既定目標完成，殊為可惜。玉米生長只觀察苗期，但其生長至採收達一、二個月之久，未來可嘗試延長觀察期，將有助於數據分析及結論。