

中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

最佳(鄉土)教材獎

052101

比較生長在紅土或黑土之花生根瘤菌株種類及其固氮活性與其對非豆科植物生長之影響

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 吳昭慧 高二 李姿樺 高二 林俐瑩	指導老師： 呂億真
---	------------------

關鍵詞：根瘤菌、花生根瘤

摘要

近年來微生物肥料漸漸被廣泛使用，在高中課程學習到根瘤菌與豆科植物之間的共生固氮作用後，我們想進一步探討在紅土或黑土環境中共生的花生根瘤菌相關特性。研究結果顯示，不同花生品種及不同土壤環境皆會影響到根瘤內菌株的種類，且分離自紅土或黑土中的根瘤菌株對種子發芽皆有顯著促進效果，分離自黑土的花生根瘤內的根瘤菌對胚根的影響較顯著。此外，*Paraburkholderia* 以及 *Ensifer* 兩種根瘤菌屬的游離固氮活性較高，而 *Rhizobium*、*Ensifer*、*Paraburkholderia*、*Pantoea* 四種菌屬的游離固氮比活性皆高。希望這些結果能實際應用在日常生活中，對作物生產及微生物肥料的研發有所幫助。

壹、研究動機

在高三選修生物上冊課本中提到，豆科植物和根瘤菌之間的共生固氮作用具有專一性，且固氮作用對於豆科植物生長有極大的影響。但經過上網查詢花生生長的相關資料後，我們發現在不同酸鹼性土壤環境中會有不同生長情形。因此我們想了解，是否因為不同土壤環境會影響不同種類之根瘤菌共生，而不同種類根瘤菌之固氮活性也有所差異，進而影響植物之生長情形呢？由此發想，我們著手設計實驗，希望在實驗過程中，能得到關於種植在不同酸鹼環境下豆科植物與根瘤菌共生情形之相關結果，並能找出何種環境中能共生具有較高固氮活性之根瘤菌，以推廣到農業應用上。

貳、研究目的

- 一、探討生長在紅土或黑土環境下，不同品種花生植株內共生之根瘤菌種類及其菌落生長型態。
- 二、探討分離自紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌對於非豆科植物種子發芽與生長之影響。
- 三、探討在紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性。

參、研究設備及器材

一、研究材料

(一) 花生(*Arachis hypogaea*)種子

(品種：十一號花生、花仁花生、黑金剛花生、九號花生)

(二) 圓葉萵苣(*Lactuca sativa*)種子

(三) 黑土(採樣自濁水溪，經測定 pH=8.52、EC=122.2 μ s/cm、有機質(%)=0.955)

(四) 紅土(採樣自臺中都會公園旁，經測定 pH=5.252、EC=140.24 μ s/cm、有機質(%)=1.017)



(圖一) 圓葉萵苣種子



(圖二) 黑土



(圖三) 紅土

二、研究設備

- | | |
|---|----------------------------|
| 1.滅菌鍋 | 2.分光光度計(日立) |
| 3.試管震盪機 | 4.無菌操作台 |
| 5.精密電子秤 | 6.電子秤 |
| 7.大型風(烘)箱 | 8.常溫培養箱 |
| 9.氣相層析儀(Flame-ionization detector-gas chromatography:FID-GC)(HITACHI) | 10.植物培養箱 |
| 12.灰化爐 | 11.PCR 儀器(金萬林企業有限股份公司) |
| 14.高溫型可變式恆溫水槽 | 13.離心機(HETTICH/MIKRO 220R) |
| 16.酸鹼值測定計 | 15.UV 燈箱 |
| | 17.電導度計 |

三、培養基的配置

(一) YEM 培養液：

秤取 0.4g 酵母萃取物、10g 甘露糖醇、20g NaCl、50g K₂HPO₄、0.488g FeCl₃、20g MgSO₄·7H₂O 溶解於 200ml 水中，加入 10ml 剛果紅，再加水至 1L。

(二) YEMA 培養基：

於 YEM 培養液中加入 1.7% Agar，經高溫高壓滅菌後，分裝至直徑 9 公分之無菌培養皿，每皿 12.5ml。

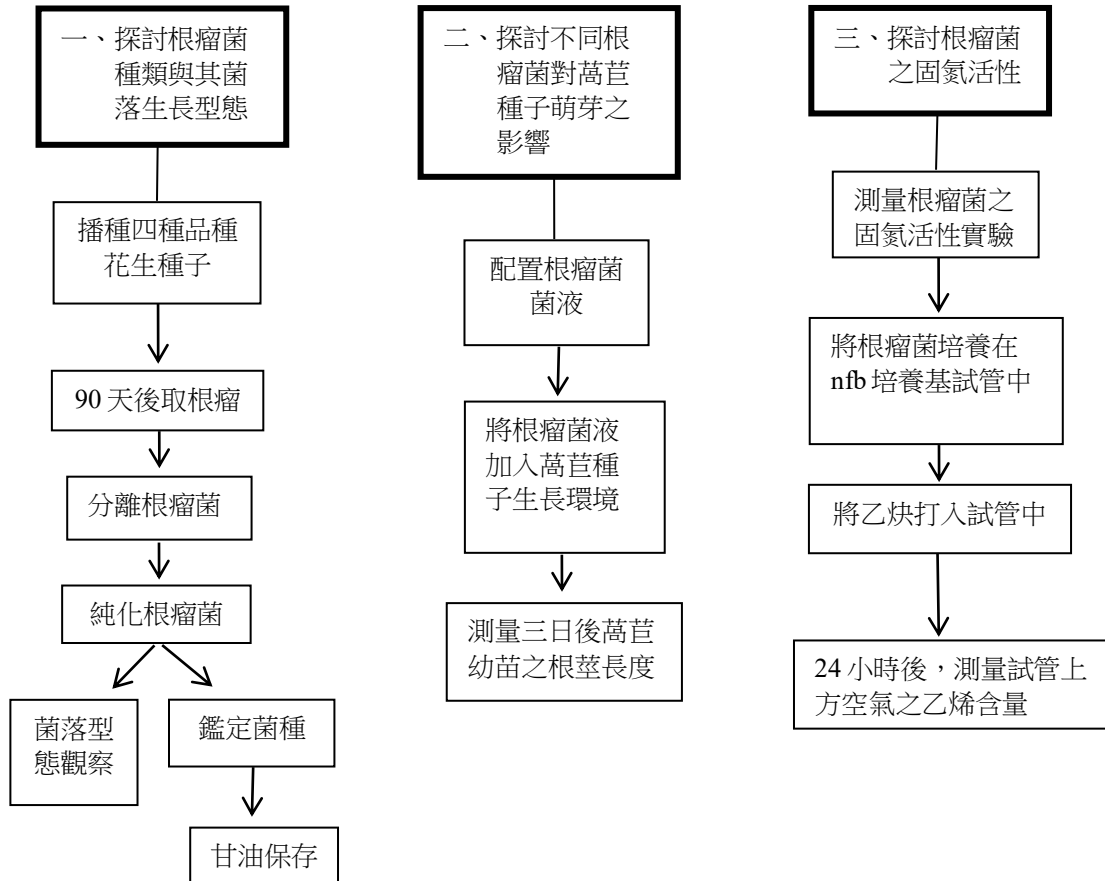
(三) Nfb 半固體培養基：

將 vitamin solution 以 0.22 μ m 之除菌膜(Millipore)過濾，裝入無菌血清瓶，貯存於 4°C 冰箱，並將 5g L-Malic acid、0.5g K₂HPO₄、0.2g MgSO₄·7H₂O、0.1g NaCl、0.02g CaCl₂、0.02g Na₂MoO₄·2H₂O、0.01g MnSO₄·H₂O、4.0ml 1.64%(w/v) Fe·EDTA、2.0ml 0.5% (w/v) Bromothymol Blue in Ethanol(BTB)、4.0g KOH、2.0ml Trace element solution (0.2g/L Na₂MoO₄·2H₂O、0.235g/L MgSO₄·H₂O、0.28g/L H₃BO₃、0.008g/L CuSO₄·5H₂O、0.024g/L ZnSO₄)、1.75g Bacto-agar 溶於 1L 之蒸餾水，以 KOH 調整 pH 至 6.8±0.1，以磁石攪拌，邊攪拌邊分裝於螺旋試管各 10 ml，旋上蓋子，以 121°C，15 分鐘滅菌，滅菌後趁熱震盪均勻。待冷卻至 100°C 以下，於無菌操作台下加入 10 μ l vitamin solution stock (0.01g/L Biotin、0.02g/L pyridoxin)至各分裝之試管即為 Nfb 半固體培養基，貯存於 4°C 冰箱中待用。

四、其他試劑

本實驗採用 Ultra Clean™ Microbial Genome Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc, USA)來進行染色體 DNA 純化，此試劑組內含 MicroBead Solution、Solution MD1、Solution MD2、Solution MD3、Solution MD4、Solution MD5。

肆、研究過程或方法



一、探討生長在紅土或黑土環境下，不同品種花生植株內共生之根瘤菌種類及其菌落生長型態

（一）紅土及黑土之酸鹼值和電導度的測定：

取 500g 之土壤樣品五份，以 105℃ 烘乾 24 小時。再將經烘乾之五份土壤樣品，各取 10g 分別放入燒杯中，加入 50ml 去離子水。稍微攪拌後，以 pH meter 和電導度計測量每份土壤樣品之 pH 值和 EC 值，求平均。

（二）花生種植：

105 年 4 月 30 日，我們共取四種不同花生品種（十一號花生、花仁花生，黑金剛花生，九號花生）之種子，分別種植於紅土及黑土的盆栽生長環境中（圖四）。



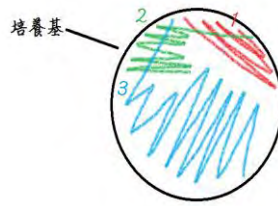
（圖四）

（三）根瘤菌之分離與純化

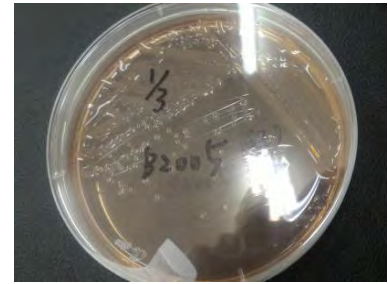
約 90 天後花生植株會進入開花期，此時是根瘤菌活性最佳、根瘤最明顯的時候 (Alvilio and Joao and Carlos, 1978)，我們在此時將花生植株從土壤中取出，清洗花生根部表層之土壤後，用剪刀將花生根上較為明顯的根瘤剪下，並取同一生長環境之同品種花生根瘤放入同根離心管中。再分別以漂白水、酒精、無菌水清洗表面。接著，配置 YEMA 培養基，將培養基分成 6 區，以高溫滅菌後的鑷子夾取一根瘤並擠破，塗盤於其中一區上，而同一培養皿中為土壤環境和花生品種皆相同之根瘤（圖五）。再將接種棒以酒精燈高溫消毒，刮取上述培養基上的菌，以三區劃菌法（圖六）分離到新的 YEMA 培養基中，使其生長。觀察生長三天後之菌落型態，並進行歸納（圖七）。最後將根瘤菌編號：英文字母代表土壤環境，B 代表黑土、R 代表紅土；後面一碼代表花生品種，其中 1 代表十一號花生、2 代表花仁花生、3 代表黑金剛花生、4 代表九號花生；最後三碼則是不同菌之編號。



(圖五)



(圖六)



(圖七)

(四) 根瘤菌之鑑種與保存：

本實驗以 Young *et al.* (2005)所述的方法進行菌屬鑑定，實驗流程如下：

1. 萃取根瘤菌染色體 DNA：

將適當 YEM 培養液 12.5 ml 倒入已長有菌株之 YEMA 培養基中混合成菌液後，抽取菌液 1.5ml 至微量離心管，以 4℃ 10000xg 離心 30 秒，倒掉上清液後再以相同轉速離心 30 秒，吸掉上清液，並將 300 μ l MicroBead Solution 加至微量離心管中，混合均勻後將溶液移至 MicroBeadtube 中，再加入 50 μ l Solution MD1。以 70℃ 水浴 10 分鐘後，放置於震盪盤中震盪 10 分鐘，並以 10000 xg 離心 60 秒。再將上清液吸取到新的 2ml 微量離心管中，加入 100 μ l Solution MD2，搖動 5 秒後靜置於 4℃ 之冰箱，等待 5 分鐘。接著，離心 60 秒後，將上清液抽取至新的 2ml 微量離心管中，加入 900 μ l Solution MD3 於上清液，並上下搖動 5 秒。再抽取 650 μ l 樣品加至 spin filter 中，離心 30 秒。並將濾液倒出後將剩餘之樣品抽取至 spin filter 中，離心 30 秒後，抽取 300 μ l 之 Solution MD4 加至 spin filter 中，離心 30 秒，將濾液倒出後再離心 10 秒。之後，將 spin filter 移到新的微量離心管中，抽取 50 μ l Solution MD5 加至 spin filter 中央，離心 30 秒之後，丟棄 spin filter，剩下之濾液即是萃取出之 DNA。最後，將 DNA 儲存於 -20℃ 冰箱中保存。

2. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)：

將 10x Taq buffer 2.5 μ l、dNTP 2 μ l、Forward primer 1F 1 μ l、Reverse primer 9R 1 μ l、Taq DNA polymerase 0.5 μ l 混合在一微量離心管中，並 spin down 5 秒。接著，將前述溶液 7 μ l 加入另一微量離心管中，加入 Template DNA 5 μ l

及 d.d.water 18 μ l，並離心約 30 秒。再將上述微量離心管置於 PCR 儀器中進行增幅反應，先進行 94℃ 兩分鐘，再以 94℃ 30 秒、58℃ 30 秒、72℃ 90 秒為一循環，進行 35 次循環，最後經過 72℃ 7 分鐘，降溫至 20℃ 後結束反應，暫存於 4℃ 之環境中。

3. 瓊脂糖膠體電泳(Agarose gel electrophoresis)：

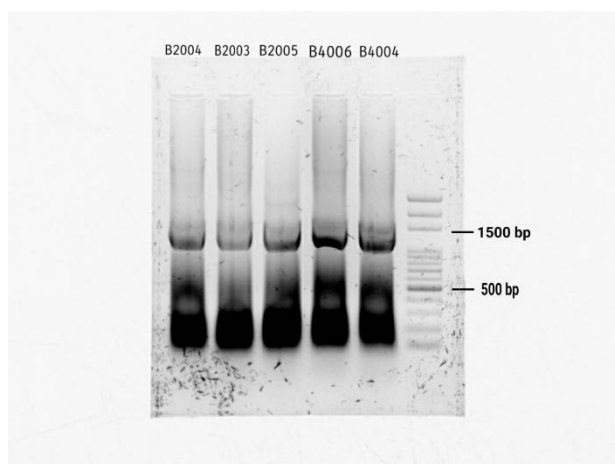
秤取 0.32g 瓊脂(agarose)置於 125ml 之錐形瓶中，加入 40ml 的 1x TAE buffer(40mM Tris-acetate 與 1mM EDTA)，配製成 0.8% 瓊脂膠，並將瓊脂凝膠片置於電泳槽中，加入 1x TAE buffer 後，取適量樣品，加入 2 μ l 的 10x loading dye(0.25% xylene cyanol FF、0.25% bromophenol blue 與 30% glycerol)於其中，混合均勻後注入瓊脂凝膠片之凹槽(well)中，以 100V 的電壓進行電泳，時間約為 35 分鐘。最後，將膠片置於溴化乙錠(ethidiumbromide, EtBr)染盆中進行染色，於水中退染 10 分鐘後，將其置於 UV 燈箱中觀察，並以照相設備擷取膠圖(圖八、圖九)。

4. 序列比對：

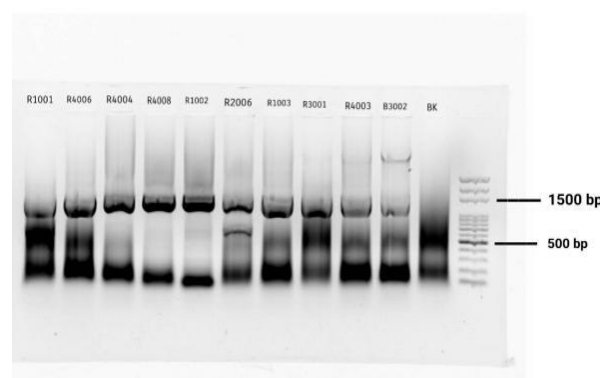
將 1500 bp 之 DNA 片段從膠片上切取下來，委請廠商進行 16S rRNA 基因序列比對。

5. 甘油保存：

將已純化成單一菌之培養皿加入 YEM 培養液 5 ml，再將培養基上的根瘤菌輕刮下與 YEM 培養液混合成菌液。接著，吸取 1ml 菌液放入裝有 5 ml 甘油並滅菌之甘油管（一菌作二重複），放到 -80℃ 保存。



(圖八)



(圖九)

二、探討分離自紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌對於非豆科植物種子發芽與生長之影響

由文獻中(Chabot *et al.*,1996)我們得知根瘤菌不只與豆科植物共生，對萵苣等農業作物也有促進生長之作用。因此我們進行種子發芽生物分析實驗(Leather and Einheling, 1988)，並進一步探討分離自紅土或黑土環境下，不同根瘤菌對萵苣種子發芽之影響，實驗流程如下：

(一) 根瘤菌活化：將已純化之根瘤菌取至新培養基中，使其生長。

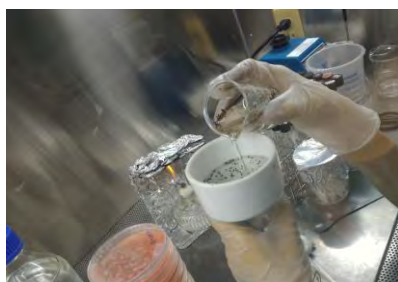
(二) 消毒種子：

秤量實驗所需之萵苣種子數，以 1.2%之漂白水（Corox, 含次氯酸鈉 > 6.25%）溶液消毒 10 分鐘，再以無菌水沖洗三次備用。（圖十）

(三) 配置根瘤菌菌液：

以滅菌過之乾棉花棒取培養 3 天的新鮮根瘤菌，浸入無菌水中，製備菌體懸浮液（圖十一），再取菌體懸浮液 $150\mu\text{l}$ 及無菌水 $1350\mu\text{l}$ 裝入小離心管中，並以等體積無菌水作為空白對照組 BK，以分光光度計測量 600 nm 波長下的 OD 值，以下列公式計算菌體密度。

$(\text{OD 值} \times 10) \times \alpha \text{ ml} = 0.1 \times 10 \text{ ml}$ （菌液濃度 $\times$ 菌液體積 = 欲得菌液濃度 $\times$ 欲得菌液體積）
取 α ml 菌體懸浮液放入試管中，最後以無菌水加至溶液共 10ml，即得實驗所使用之菌液（理論上 OD=0.1 之菌液）。



（圖十）



（圖十一）

(四) 將根瘤菌液加入萵苣種子生長環境：

置入濾紙於培養皿上，將菌液 2ml 滴在濾紙上，每種菌液滴 4 盤，並將萵苣種子每盤 12 顆排入培養皿中（圖十二）。接著，將萵苣種子培養皿放入箱子，並在箱子中放入一裝有水的三角錐形瓶，保持內部環境濕潤，再將箱子套上塑膠袋，最後以黑袋蓋

上，放入植物生長箱 25°C 使其生長 3 天。

(五) 萵苣幼苗之根莖長度測量：

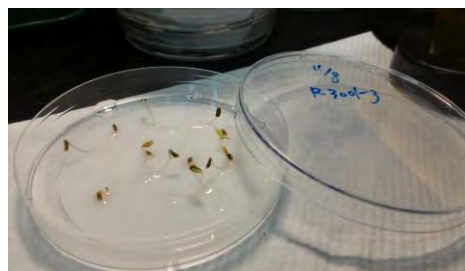
觀察萵苣種子發芽情形，並依下列公式計算絕對發芽率、相對發芽率。接著測量及記錄胚根與胚莖長度，最後分析其結果。（如圖十三）

絕對發芽率=發芽種子數/總種子數×100%

相對發芽率=實驗組發芽種子數/空白對照組發芽種子數×100%



(圖十二)



(圖十三)

三、探討在紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性：

由文獻得知，固氮酵素催化作用廣，除了能還原氮氣(N_2)轉化為氨(NH_3)外，還能還原乙炔(C_2H_2)成乙烯(C_2H_4)(Hardy *et al.*, 1973)，氰(CN^-)還原成氨(NH_3)及甲烷(CH_4)等(Postgate, 1982)。氣相層析技術可以將乙炔(C_2H_2)及乙烯(C_2H_4)這兩種氣體分開來，操作簡便，其敏感度為同位素 ^{15}N 法的 10^3 至 10^4 倍，此法以乙炔代替氮氣作為固氮酵素的受質，而乙烯產生速率可視為測量固氮酵素或固氮活性(Atlas and Bartha, 1993)，故乙炔還原能力經常被用來評估固氮酵素的活性，此法快速又無毒性，廣泛成為偵測固氮速率之方法(Weavve and Frederick, 1982；Atlas and Bartha, 1993；洪美華，2002)。因此本實驗利用乙炔還原法來測定根瘤菌之固氮活性，實驗流程如下：

(一) 活化根瘤菌：

將已純化之根瘤菌取至新 YEMA 培養基中，使其生長。

(二) 配置 Nfb 培養基。

(三) 接菌：

以接種棒將菌體垂直穿刺至 Nfb 半固體培養基中（圖十四），再將完成接菌之半固體 Nfb 培養基放入 30°C 培養箱中，等待 4 日使其生長。

(四) 乙炔注射：

等待 4 日後，將螺旋試管之螺旋蓋換成血清塞，並以針頭抽取螺旋試管中 3ml 之空氣，將之排出。接著，以針頭抽取 3ml 乙炔，將之注入螺旋試管，於 30℃ 保溫等待 1 日。



(圖十四)

(五) 測量並計算乙烯濃度

將試管內上部空間氣體抽出 0.5ml，注入氣相層析儀中，測量試管上部空間的乙烯量。氣相層析儀分離管柱中填充 60 至 100 篩目的 porapak，注射部的溫度為 100℃，管柱室的溫度為 60℃，氫氣與氮氣的流速為每分鐘 40ml，空氣流速為每分鐘 0.4ml (圖十五、十六)。再將結果記錄在氣相層析紙上 (如圖十七)，接著，測量氣相層析紙上的結果線條並代入下列公式 (賴威安，2010)：

$$\text{乙烯生成量}(\text{n mol hr}^{-1}) = \frac{5 \times \text{樣品 peak height} \times \text{樣品 attenuation}}{2.45 \times \text{標準品 peak height} \times \text{標準品 attenuation}} \times \frac{20\text{ml}}{0.5\text{ml}} \times \frac{1}{\text{時間(小時)}}$$

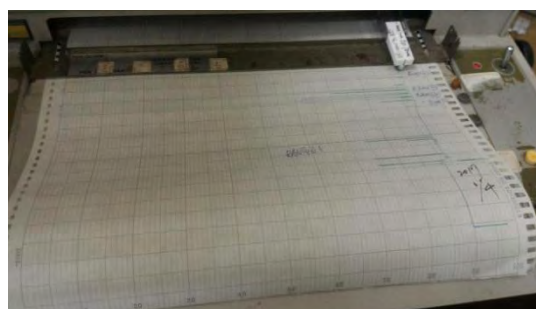
得乙烯生成莫耳數，並分析其結果。



(圖十五)



(圖十六)



(圖十七)

(六) 測量菌液內根瘤菌菌數：

取出濃度 100% 試管液體 0.01ml，放入微量離心管中，加入 0.99ml 水，其濃度為原液體 1%，依此步驟依次稀釋得濃度為原液體 0.01%、0.0001%、0.000001% 的溶液，以試管震盪機震盪裝有不同濃度溶液之微量離心管。接著，分別取出不同濃度之溶液

0.1ml 滴在培養基上並用加熱殺菌過之塗抹棒均勻塗抹於培養基，於培養基周圍黏上絕緣膠帶，以避免空氣的細菌、真菌汙染，使其生長 3 天後，觀察根瘤菌生長狀況，計算其菌數，並分析其結果。

(七) 游離固氮比活性之計算：

將乙烯生成量/log 菌數，得知其游離固氮比活性。

伍、研究結果

一、不同品種花生植株生長在紅土或黑土環境其共生之根瘤菌種類及其菌落生長型態

(一) 兩種花生取樣區土壤環境條件分析

由表一結果顯示，紅土是酸性土壤，黑土為鹼性土壤，且黑土及紅土的電導度與有機質含量差異不大。

表一 紅土及黑土的基本性質比較

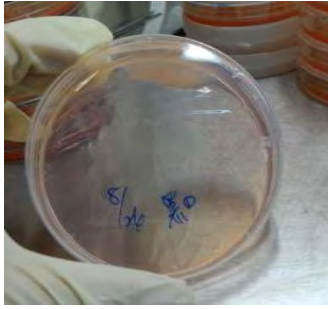
	紅土	黑土
採樣地點	臺中都會公園旁地區	彰化濁水溪流域
pH 值	5.25±0.25	8.52±0.08
有機質(%)	1.017±0.0846	0.955±0.0028
電導度(μ S/cm)	140.24±40.89	122.2±30.00

(二) 不同花生品種在紅土或黑土環境下分離的根瘤菌落型態比較

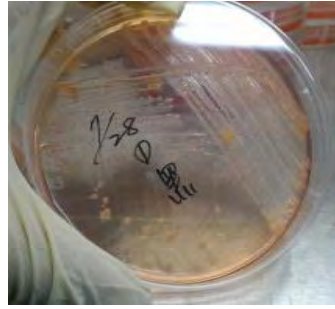
我們根據根瘤菌的菌落外觀型態可區分為透明長一層（代號 A；圖十八）、明顯痕跡（非一整層），痕跡上一小顆一小顆的（代號 B；圖十九）、乳白色（代號 C；圖二十）、明顯痕跡，較 B 透明（代號 D；圖二十一）、長一整層，較 A 不透明（代號 E；圖二十二）五類。而比較生長在兩種土壤中的不同品種花生所分離之固氮菌的菌落型態發現，生長在不同土壤之同品種花生其共生之固氮菌系有明顯的差異，如表二所示。

表二 在黑土或紅土中生長的菌株外觀比較

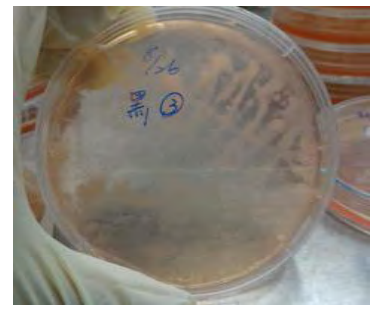
	十一號花生	花仁花生	黑金剛	九號花生
黑土	A.B	A.B	A.C.D	D.E
紅土	D.E	B	C	E



(圖十八)



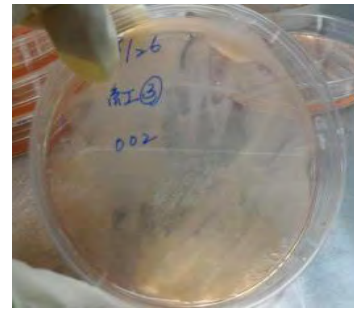
(圖十九)



(圖二十)



(圖二十一)



(圖二十二)

(三) 利用 16S rRNA 基因序列比對紅土或黑土環境下，不同品種花生之根瘤菌種

根據表二分析結果顯示，菌落型態相似的根瘤菌可能感染不同品種花生，而同一品種的花生根瘤中也有菌落型態不同的根瘤菌。而比對其 16S rRNA 序列鑑種發現，不同土壤環境存在之固氮菌種有明顯的差異。而同品種花生生長在不同土壤環境中，會與不同的固氮菌系共生（表三）。

表三 菌種鑑定結果

固氮菌來源		鑑定結果		
土壤環境	花生品種	strain	學名	相似度(similarity)
黑土	花仁花生	B2003	<i>Pantoea dispersa</i>	655/659(99.3%)
			<i>Pantoea wallisii</i>	653/658(99.2%)
		B2004	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	670/670(100%)
			<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	667/670(99.5%)
		B2005	<i>Rhizobium nepotum</i>	696/700(99.4%)
			<i>Rhizobium radiobacter</i>	696/700(99.4%)
黑土	黑金剛	B3002	<i>Ensifer kostiensis</i>	481/484(99.3%)
			<i>Ensifer saheli</i>	481/484(99.3%)
黑土	九號花生	B4006	<i>Pantoea dispersa</i>	678/678(100%)
			<i>Pantoea wallisii</i>	675/677(99.7%)
紅土	十一號花生	R1001	<i>Rhizobium multihospitium</i>	670/670(100%)
			<i>Rhizobium freirei</i>	670/670(100%)
		R1002	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	670/670(100%)
			<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	667/670(99.5%)
		R1003	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	670/670(100%)
			<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	667/670(99.5%)
紅土	黑金剛	R3001	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	716/720(99.4%)
			<i>Paraburkholderia fungorum</i>	714/720(99.1%)
紅土	九號花生	R4006	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	710/710(100%)
			<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	707/710(99.5%)
		R4008	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	491/491(100%)
			<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	488/491(99.3%)

文獻指出根瘤菌(root-nodulating bacteria)屬包括 *Rhizobium* 和 *Ensifer* 二屬名（周瑞興，2009），故上表結果中，本研究所分離之菌株屬名為 *Rhizobium* 的 B2005 和

R1001，以及屬名為 B3002 的 *Ensifer*，確為根瘤菌的菌屬。

在 Dall'Agnol 等人(2016)的研究中指出 *Paraburkholderia nodosa* 曾由根瘤中分離出來，可以行固氮作用，且具有結瘤基因，因此我們經鑑定為 *Paraburkholderia* 菌屬的 B2004、R1002、R1003、R3001、R4006、R4008 這六株菌可能是根瘤菌。

二、紅土環境下，與花生共生的根瘤菌對於非豆科植物萵苣種子發芽與生長之影響

(一) 自紅土分離的根瘤菌液，對萵苣種子發芽率的影響

根據表四和表五結果顯示，自紅土中分離之 R4008、R1003、R4006、R1001 皆促進種子發芽，而 R3001、R1002 則對種子發芽無影響。

此實驗分為兩次進行，且經計算後，紅土空白對照組發芽率為 $81.25 \pm 5.90\%$ ，實驗組發芽率與空白對照組比較後結果如表四、表五所示：

表四 紅土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗一）

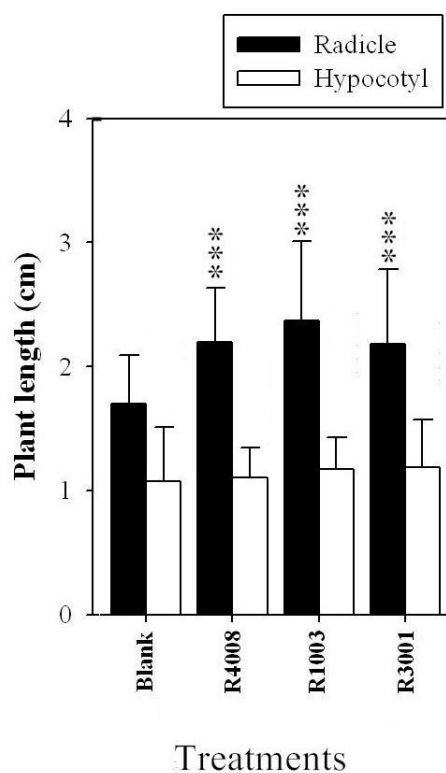
菌株	發芽的種子數（顆）	相對發芽率(%)
（全部共 48 顆種子）		
R4008	45	109.76
R1003	44	107.32
R3001	41	100

表五 紅土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗二）

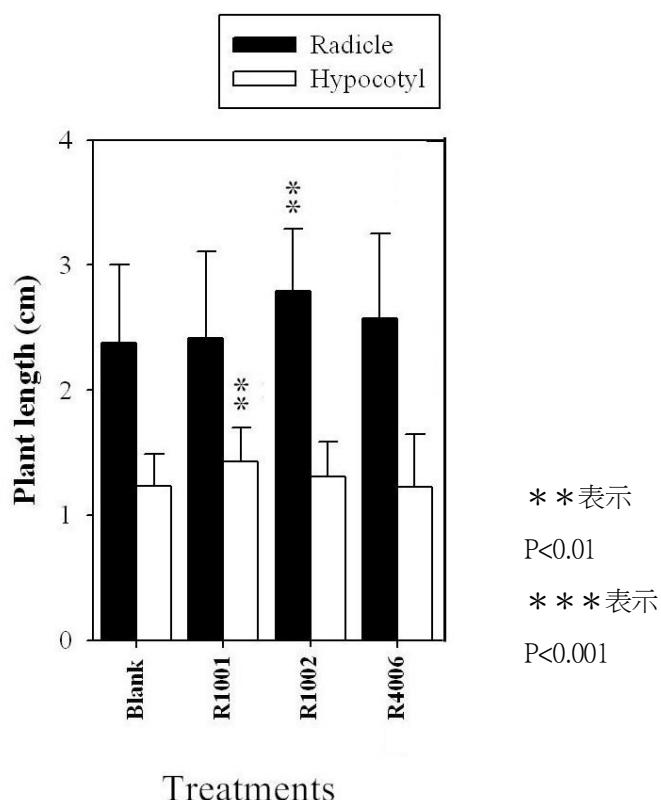
菌株	發芽的種子數（顆）	相對發芽率(%)
（全部共 48 顆種子）		
R1002	35	94.59
R4006	40	108.1
R1001	39	105.4

(二) 自紅土分離的根瘤菌液對萵苣幼苗之胚根及胚莖生長的影響

此實驗分為兩次進行，再以「最小顯著差異法(Least Significant Difference)」進行數據分析，結果如下圖（圖二十三、二十四）所示：



(圖二十三) 在紅土環境下共生之花
生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響
(實驗一)



(圖二十四) 在紅土環境下共生之花
生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響
(實驗二)

根據上圖得知：與控制組(Blank)相比，加入自紅土分離出的 R4008、R1003、R3001 根瘤菌液 P 值 <0.01 ，而 R1002 根瘤菌液 P 值 <0.001 ，此四種根瘤菌液皆具有促進萵苣幼苗胚根生長的作用。

三、黑土環境下，與花生共生的根瘤菌對於非豆科植物萵苣種子發芽與生長之影響

（一）自黑土分離的根瘤菌液，對萵苣種子發芽率的影響

根據表六和表七結果顯示，自黑土中分離之 B2005、B2003、B2004 皆促進種子發芽，而 B3002、B4006 則對種子發芽無影響。

此實驗分為兩次進行，且經計算後，黑土空白對照組發芽率為 $81.25 \pm 5.90\%$ ，實驗組發芽率與空白對照組比較後結果如表六、表七所示：

表六 黑土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗一）

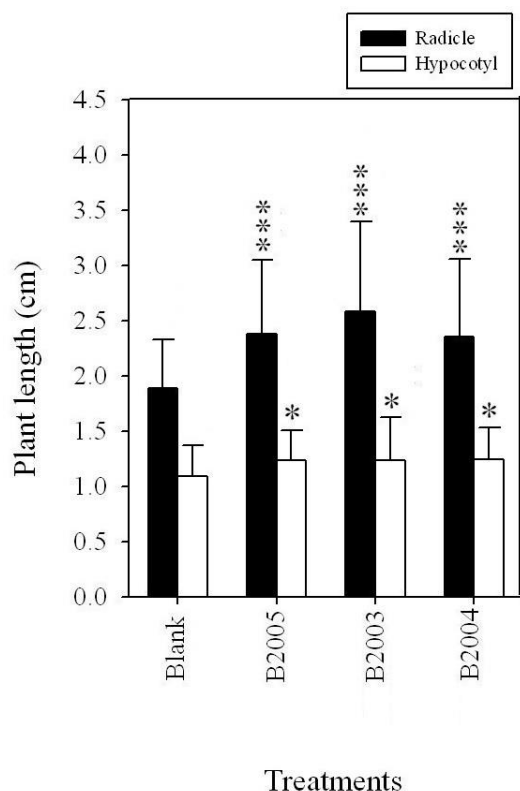
菌株	發芽的種子數（顆） （全部共 48 顆種子）	相對發芽率 （%）
B2005	42	102.44
B2003	42	102.44
B2004	44	107.32

表七 黑土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗二）

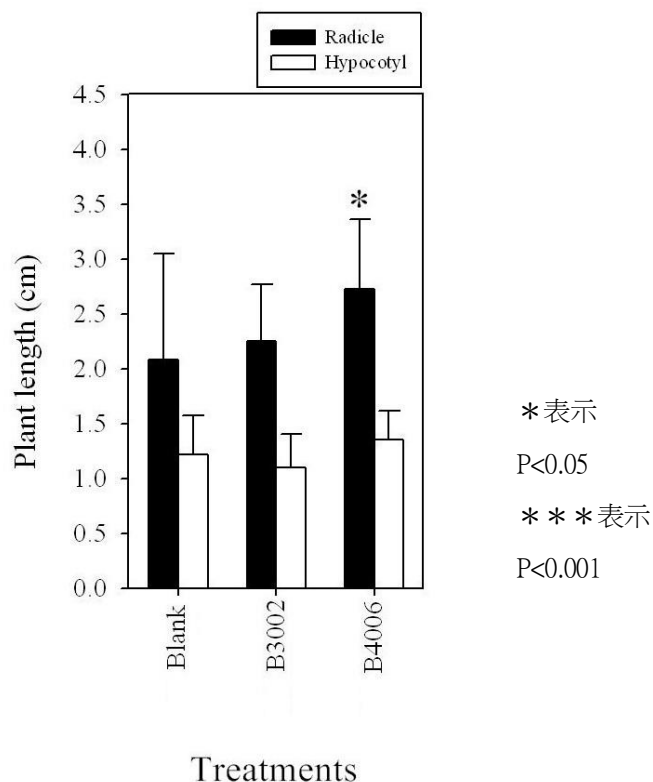
菌株	發芽的種子數（顆） （全部共 48 顆種子）	相對發芽率 （%）
B3002	36	97.29
B4006	35	94.59

(二) 自黑土分離的根瘤菌液對萵苣幼苗之胚根及胚莖生長的影響

此實驗分為兩次進行，再以「最小顯著差異法(Least Significant Difference)」進行數據分析，結果如下圖（圖二十五、二十六）所示：



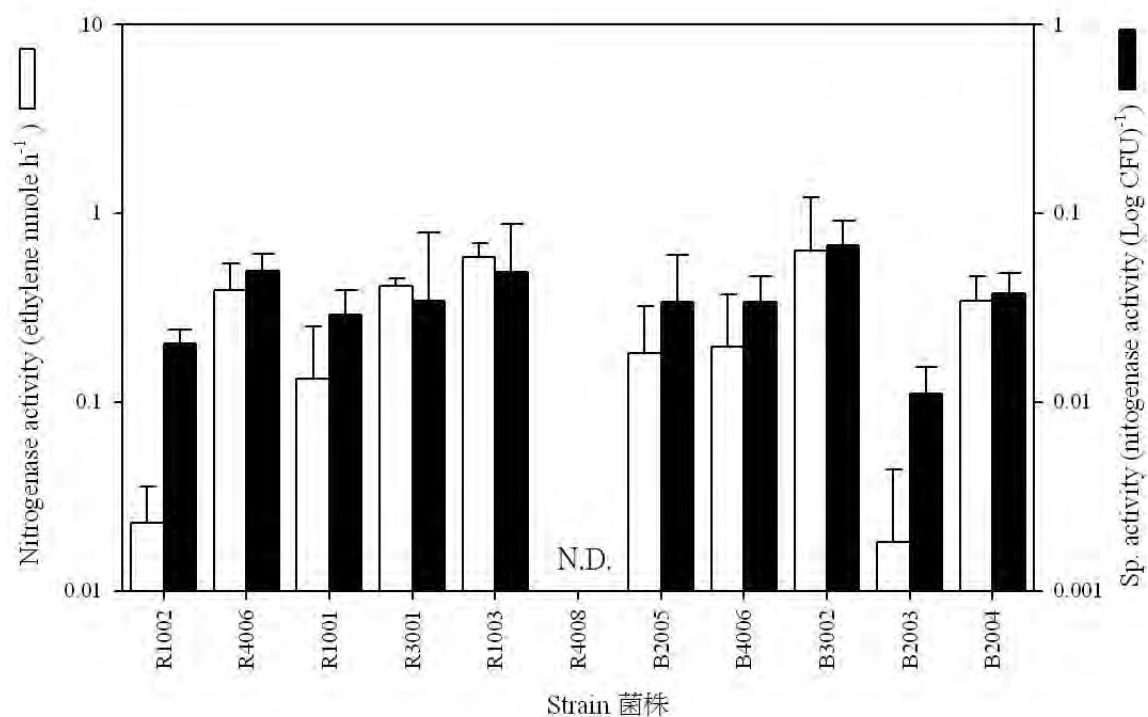
（圖二十五）在黑土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響（實驗一）



（圖二十六）在黑土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響（實驗二）

根據上圖得知：與控制組(Blank)相比，加入自黑土分離出的 B2005、B2003、B2004 根瘤菌液 P 值 <0.001 ，而 B4006 根瘤菌液 P 值 <0.05 ，此四種根瘤菌液皆具有促進萵苣幼苗胚根生長的作用。

四、紅土或黑土環境下，與花生共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性：



Nitrogenase activity(ethylene nmole)：固氮活性（乙炔活性）

Sp. activity(nitrogenase activity(Log CFU⁻¹))：比活性（公式：乙炔生成/log 菌數）

ND：表示偵測不到（標準偏差超過平均值）

（圖二十七）游離固氮實驗結果統計圖

根據上圖結果顯示，從紅土中分離出的 R4006、R3001、R1003，以及從黑土中分離出的 B3002、B2004 固氮活性皆較高（固氮活性皆達最大值 B3002 的 50%以上）；而自紅土中分離出的 R4006、R3001、R1003 與自黑土中分離出的 B2005、B4006、B3002、B2004 的比活性皆較高（比活性皆達最大值 B3002 的 50%以上）。

陸、討論

一、探討生長在紅土或黑土環境下，不同品種花生植株內共生之根瘤菌種類及其菌落生長型態。

- (一) 經由測量後我們得知黑土及紅土的電導度及有機質差異不大，且黑土為鹼性土壤，紅土為酸性的土壤，可推知電導度及有機質對根瘤菌無顯著影響，而 pH 值對根瘤菌的影響則較大。
- (二) 根據 16S rRNA 基因序列比對結果，本研究從四種不同品種的花生根瘤中共分離出包含 *Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium*、*Ensifer* 這四種屬的菌屬，其中 *Rhizobium*、*Ensifer* 這兩屬已被確定皆為根瘤菌屬。*Paraburkholderia* 在相關文獻中也被證實可行固氮作用，且具有結瘤基因。*Pantoea* 曾有學者分離自野生岩黃芪之根瘤，為根瘤內生菌之一，但尚未證實其單獨菌株結瘤的能力，未來我們會將其回種以確定是否有結瘤能力。(Dall'Agnol et al., 2016)。
- (三) 在同品種花生的根瘤中，可分離出不同種的根瘤菌，例如生長在紅土的十一號花生有 *Rhizobium multihospitium* 或 *Rhizobium freirei* 和 *Paraburkholderia caledonica*，生長在黑土中的花仁花生有 *Paraburkholderia caledonica* 和 *Rhizobium nepotum* 根瘤菌與之共生（如表六）。此外，不同品種的花生根瘤中，也可分離出有相同種的根瘤菌，例如生長在黑土中的花仁花生、紅土的十一號花生、紅土的九號花生、紅土的黑金剛花生皆有 *Paraburkholderia caledonica* 與之共生。

根據上述結果，我們認為高中課本所提及根瘤菌與豆科植物之間的共生關係具有專一性的敘述，不見得是指其特定根瘤菌株不能共生於不同品系的豆科植物，而只是表示特定根瘤與豆科植物之間「長期同盟」關係的忠實程度。

表八 在不同土壤的不同花生品種之菌株與四種菌屬關係

根瘤菌屬	花生品種/土壤環境					
	花仁/ 黑土	黑金剛/ 黑土	九號/ 黑土	十一號/ 紅土	黑金剛/ 紅土	九號/ 紅土
<i>Rhizobium</i>	+			+		
<i>Ensifer</i>		+				
<i>Paraburkholderia</i>	+			+	+	+
<i>Pantoea</i>	+		+			

根據表八整理的結果顯示，*Rhizobium* 根瘤菌屬在紅土的十一號花生及黑土中的花仁花生皆可分離出來，推測 *Rhizobium* 根瘤菌屬對於黑土或紅土的分部或適應性無異。在紅土的不同品種的花生根瘤中，皆可分離出 *Paraburkholderia caledonica* 根瘤菌，而黑土中只有花仁花生有此根瘤菌與之共生，推測 *Paraburkholderia caledonica* 較適應紅土的生長環境甚於黑土。至於 *Pantoea dispersa* 只出現在黑土的花仁花生及九號花生中，紅土中並沒有這種菌，推測 *Pantoea dispersa* 較適應黑土的生長環境甚於紅土。以上結果顯示土壤酸鹼值及電導度可能影響花生根瘤中共生的 *Paraburkholderia* 與 *Pantoea* 屬根瘤菌，但對 *Rhizobium* 則否。

二、 探討分離自紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌對於非豆科植物種子發芽與生長之影響：

比對鑑種結果和不同根瘤菌液對萵苣種子分析實驗後，可知分離自紅土或黑土的根瘤菌對植物根普遍有正向的影響，其中又以分離自紅土的 *Rhizobium*、*Paraburkholderia* 以及分離自黑土的 *Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium* 對種子發芽有促進效果。而分離自紅土的 *Paraburkholderia* 以及分離自黑土的 *Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium* 對胚根生長有促進效果，其中分離自黑土的根瘤菌株對胚根的生長影響較顯著。此結果顯示以上種類的花生根瘤菌株具有對非豆科植物之促生功能，這也提高了根瘤菌在農業應用上的價值。

三、 探討在紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性：

在游離固氮活性實驗結果顯示，*Paraburkholderia* 以及 *Ensifer* 兩種根瘤菌屬的固氮活性較高，而 *Rhizobium*、*Ensifer*、*Paraburkholderia*、*Pantoea* 四種菌屬的比活性皆高，其中以 *Ensifer* 此菌屬的固氮活性與比活性為最高。

雖然游離固氮沒有共生固氮的固氮能力強，但是在氮源較不充分的土壤中，細菌的游離固氮能力也可以供應本身生存所需的氮元素，所以增加細菌在土壤和作物根圈中是很重要的。

柒、結論

- 一、自紅土及黑土環境中生長的四種花生品種（十一號、花仁、黑金剛、九號）根瘤中分離到的菌株，經 16S rRNA 基因序列比對結果，分別為 *Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium*、*Ensifer* 四個菌屬，且一個花生根瘤內可分離出不只一種根瘤菌，一種根瘤菌也可與不只一種花生植株共生。此外，而不同花生品種及不同土壤環境皆會影響到根瘤內菌株的種類。
- 二、本研究發現，*Rhizobium*、*Paraburkholderia*、*Pantoea* 這三屬的菌株對種子發芽與莖胚根生長皆有顯著促進效果，其中分離自黑土的根瘤菌株對莖胚根的促進生長作用較紅土明顯。此實驗提供了花生根瘤菌株用於其他作物促生作用的可行性，也提高根瘤菌在農業應用範圍的價值。
- 三、本研究在比對游離固氮實驗及鑑種結果後，得知 *Paraburkholderia* 以及 *Ensifer* 兩種根瘤菌屬的固氮活性較高，而 *Rhizobium*、*Ensifer*、*Paraburkholderia*、*Pantoea* 四種菌屬的比活性皆高。

捌、參考資料及其他

趙大衛（2016）。普通高級中學選修生物上冊。臺南市：翰林出版。

洪美華（2002）。台灣本土豆科植物根瘤菌分離及特性研究(碩士論文)。台中：國立中興大學土壤環境科學系。

賴威安（2010）。 *Azospirillum rugosum* 新種與耐鹽根圈細菌的植物生長促進特性之篩選及對植物接種的效益(博士論文)。台中：國立中興大學土壤環境科學系。

周瑞興（2009）。含羞草屬植物之 β -根瘤菌 *Burkholderia* 與 *Cupriavidus* 間根瘤菌的競爭作用(博士論文)。台中：國立中興大學土壤環境科學系。

沈明來（2007）。 *生物檢定統計法*（第二版）。臺北：九州圖書文物有限公司。

Atlas, R. M. & Bartha, R.. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Application.*, 3rd ed. Addison-Wesley, Reading.

Chabot, R., Antoun, H. & Cescas, M. P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 184(2), 311-321.

Young, C.C., Kämpfer, P., Shen, F.-T., Lai, W.-A. & Arun, A.B. (2005).

Chryseobacterium formosense sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 423 – 426.

Dall'Agnol, R.F., Costa, M. R., Ribeiro, R. A., Delamuta, J. R. M., Chueire, L. M. O. & Hungria, M. (2016). Genome sequence of *Paraburkholderia nodosa* strain CNPSo 1341, a N₂-fixing symbiont of the promiscuous legume *Phaseolus vulgaris*. *Genome*

Franco, A. A., Pereira, J. C. & Neyra, C. A. (1978). Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, 63(3), 421-424.

Leather, G. R. & Einhellig, F.A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*, 14(10), 1821-1828.

Postgate, J. R. (1982). The Fundamentals of Nitrogen Fixation. London: Cambridge University Press.

Weaver, R.W., & L. R. Frederick. (1982). Rhizobium. In C. A. Black (Ed.) *Methods of Soil Analysis Part 2*. (pp. 1467-1472). Madison. Am. Soc. Agron. No.9

R. W. F. Hardy, R.W., Burns & Holsten, R.D. (1973). Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology Biochemistry*, 5, 47-81.

【評語】 052101

1. 本研究探討在紅土或黑土環境中共生的花生根瘤菌之相關特性。結果發現根瘤內菌株的種類會因不同花生品種及不同土壤環境而受影響。此外亦分析不同根瘤菌屬的游離固氮活性。本研究的結果對未來作物生產及微生物肥料的研發有參考價值，主題及成果具鄉土意義。
2. 實驗設計及進行方法及分析之科學性有待加強。
3. 對實驗背景之理論基礎尚待加強。
4. 實驗記錄尚稱完整。

摘要

近年來微生物肥料漸漸被廣泛使用，在高中課程學習到根瘤菌與豆科植物之間的共生固氮作用後，我們想進一步探討在紅土或黑土環境中共生的花生根瘤菌相關特性。研究結果顯示，不同花生品種及不同土壤環境皆會影響到根瘤內菌株的種類，且分離自紅土或黑土中的根瘤菌株對萵苣種子發芽皆有顯著促進效果，分離自黑土的花生根瘤內的根瘤菌對胚根生長的影響較顯著。此外，*Paraburkholderia*以及*Ensifer*兩種根瘤菌屬的游離固氮活性較高，而*Rhizobium*、*Ensifer*、*Paraburkholderia*、*Pantoea*四種菌屬的游離固氮比活性皆高。希望這些結果能實際應用在日常生活中，對作物生產及微生物肥料的研發有所幫助。

壹、研究動機

在高三選修生物上冊課本中提到，豆科植物和根瘤菌之間的共生固氮作用具有專一性，且固氮作用對於豆科植物生長有極大的影響。經查閱相關資料後，我們發現在不同酸鹼土壤環境中花生植株會有不同的生長情形。因此我們想了解，不同土壤環境是否因為共生不同種類之根瘤菌，而不同種類根瘤菌之固氮活性也有所差異，進而影響花生植株之生長情形？由此發想，我們著手設計實驗，希望得知關於種植在不同酸鹼環境下，不同品系的花生與根瘤菌間之共生關係之相關結果，進而找出在何種土壤環境下共生之根瘤菌具有較高固氮活性，以推廣到農業應用上。

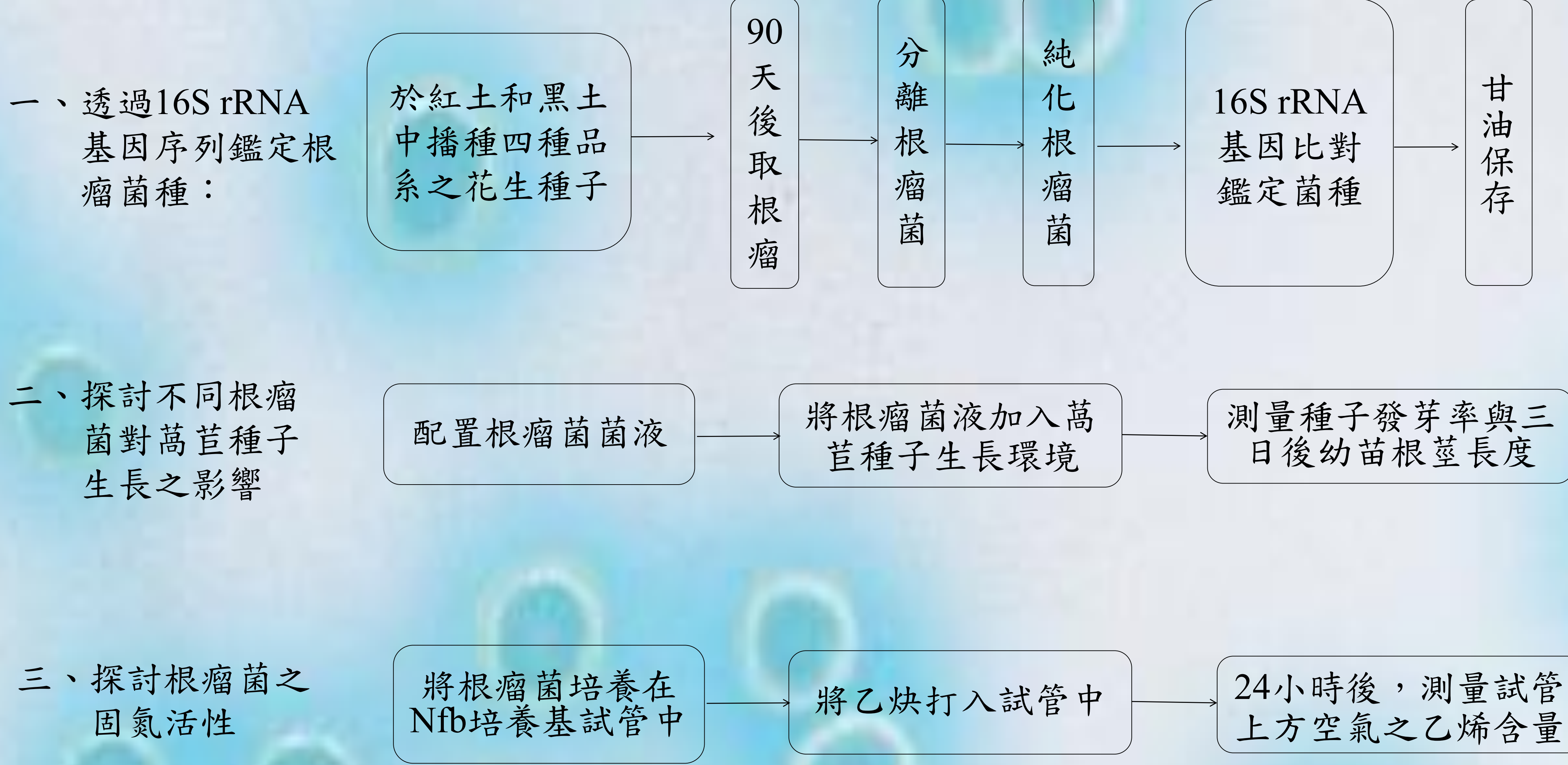
貳、研究目的

1. 探討生長在紅土或黑土環境下，不同品系花生植株內共生之根瘤菌種類。
2. 探討分離自紅土或黑土環境下，共生的不同根瘤菌種對於非豆科植物種子發芽與生長之影響。
3. 探討在紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性。

參、研究器材

- 花生(*Arachis hypogaea*)種子（品系：十一號花生、花仁花生、黑金剛花生、九號花生）
- 圓葉萵苣(*Lactuca sativa*)種子
- 紅土(採樣自臺中都會公園旁，經測定pH=5.252、EC=140.24μs/cm、有機質(%)=1.017)
- 黑土(採樣自濁水溪流域農田，經測定pH=8.52、EC=122.2μs/cm、有機質(%)=0.955)
- 精密電子秤、灰化爐、植物培養箱、離心機、PCR儀器、電導度計、YEMA培養基、Nfb半固體培養基、試管震盪機、氣相層析儀、酸鹼值測定計、分光光度計

肆、研究方法



伍、研究結果

- 一、探討生長在紅土或黑土環境下，不同品系花生植株內共生之根瘤菌種類：
- 透過16S rRNA基因序列比對結果（表一）可知，相同根瘤菌能感染不同品系花生植株，且同一品系的花生根瘤中也同時共生不同的根瘤菌種。文獻指出根瘤菌屬包括*Rhizobium* 和 *Ensifer* 二個屬（周瑞興，2009），故本研究中編號B2005、R1001和B3002為此兩屬的根瘤菌種。在Dall'Agnol等人（2016）的研究中指出 *Paraburkholderia nodosa*是由根瘤中所分離出來的菌種，可行固氮作用，且具有結瘤基因。本研究中編號B2004、R1002、R1003、R3001、R4006和R4008的菌均為*Paraburkholderia*屬。

(表一) 菌種鑑定結果

分離來源		鑑定結果		
土壤環境	花生品系	菌株	學名	相似度
黑土	花仁花生	B2003	<i>Pantoea dispersa</i> <i>Pantoea wallisii</i>	655/659(99.3%) 653/658(99.2%)
		B2004	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia dipogonis</i>	670/670(100%) 667/670(99.5%)
		B2005	<i>Rhizobium nepotum</i> <i>Rhizobium radiobacter</i>	696/700(99.4%) 696/700(99.4%)
黑土	黑金剛	B3002	<i>Ensifer kostiensis</i> <i>Ensifer saheli</i>	481/484(99.3%) 481/484(99.3%)
黑土	九號花生	B4006	<i>Pantoea dispersa</i> <i>Pantoea wallisii</i>	678/678(100%) 675/677(99.7%)
紅土	十一號花生	R1001	<i>Rhizobium multihospitium</i> <i>Rhizobium freirei</i>	670/670(100%) 670/670(100%)
		R1002	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia dipogonis</i>	670/670(100%) 667/670(99.5%)
		R1003	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia dipogonis</i>	670/670(100%) 667/670(99.5%)
紅土	黑金剛	R3001	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia fungorum</i>	716/720(99.4%) 714/720(99.1%)
紅土	九號花生	R4006	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia dipogonis</i>	710/710(100%) 707/710(99.5%)
		R4008	<i>Paraburkholderia caledonica</i> <i>Paraburkholderia dipogonis</i>	491/491(100%) 488/491(99.3%)

二、紅土環境下，與花生共生的根瘤菌對於非豆科植物萵苣種子發芽與生長之影響

(一) 自紅土分離的根瘤菌液，對萵苣種子發芽率的影響

根據表二和表三結果顯示，自紅土中分離之R4008、R1003、R4006、R1001皆促進種子發芽，而R3001、R1002則對種子發芽無影響。

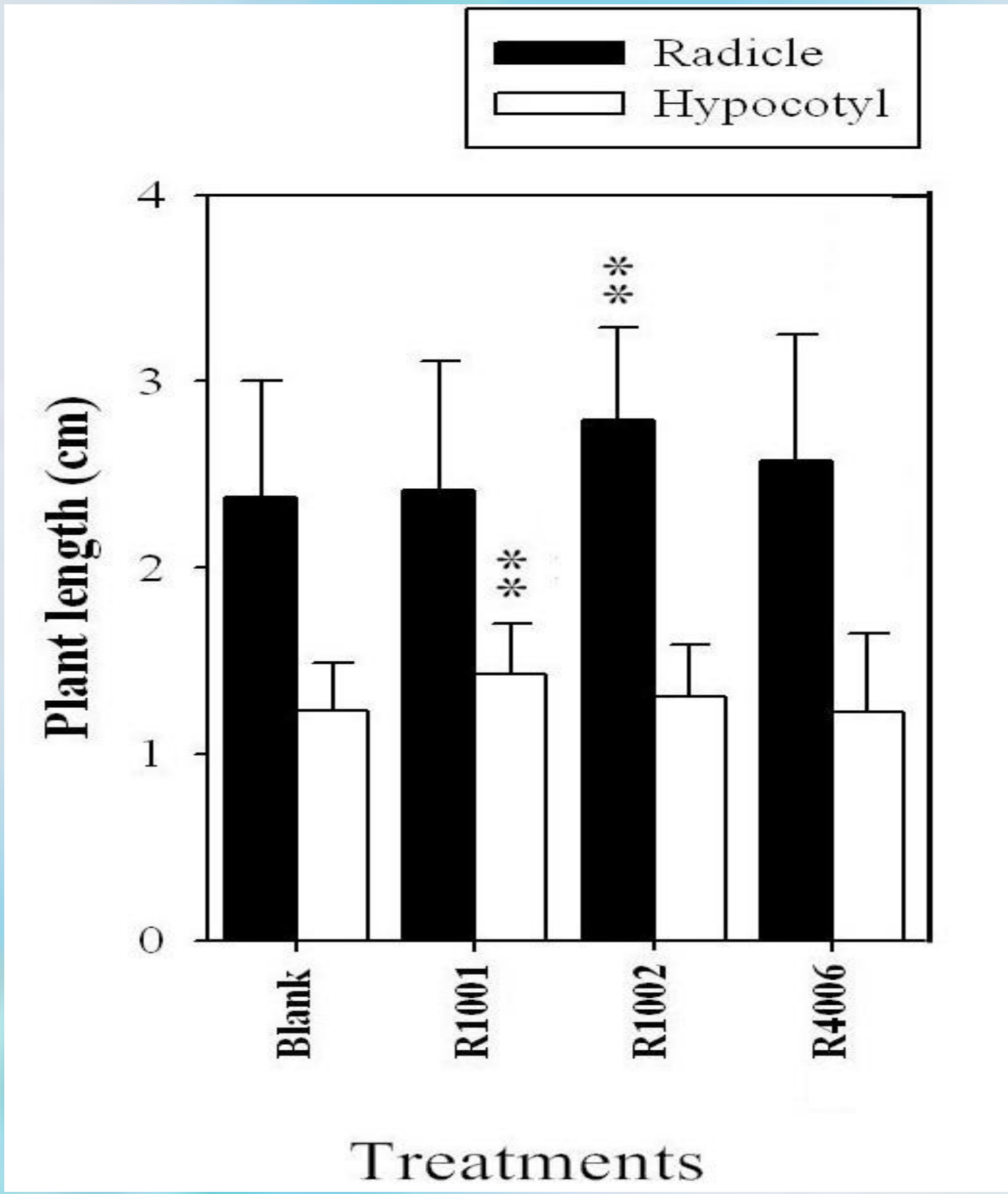
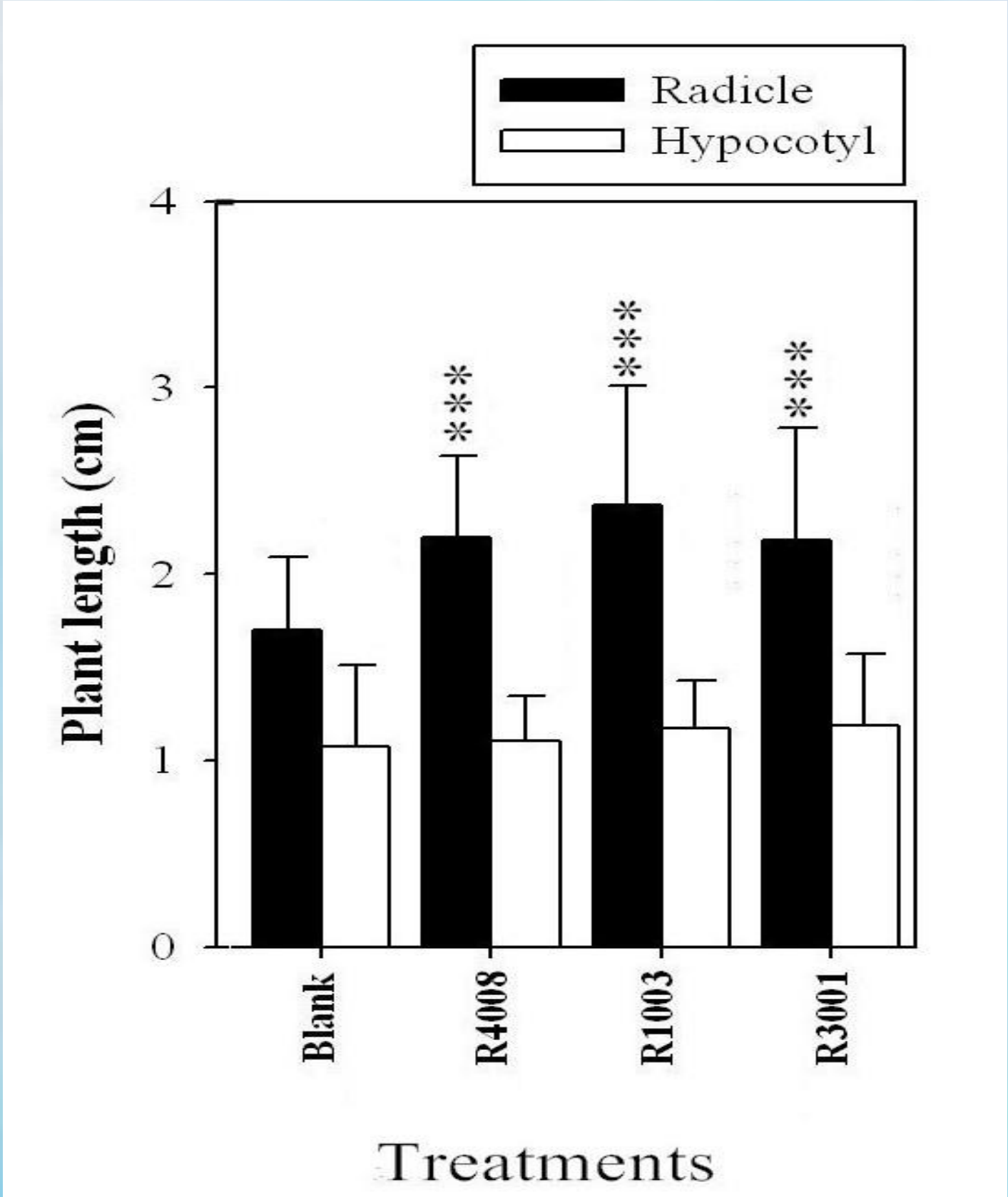
表二 紅土根瘤菌液中生長之萵苣種子發苴種芽率（實驗一）

菌株	發芽的種子數（顆） （全部共48顆種子）	相對發芽率(%)
R4008	45	109.76
R1003	44	107.32
R3001	41	100

表三 紅土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗二）

菌株	發芽的種子數（顆） （全部共48顆種子）	相對發芽率(%)
R1002	35	94.59
R4006	40	108.1
R1001	39	105.4

(二) 自紅土分離的根瘤菌液對萵苣幼苗之胚根及胚莖生長的影響



**表示P<0.01
***表示P<0.001

(圖一) 在紅土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響(實驗一)

(圖二) 在紅土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響(實驗二)

根據上圖得知：與控制組(Blank)相比，加入自紅土分離出的R4008、R1003、R3001根瘤菌液P值<0.01，而R1002根瘤菌液P值<0.001，此四種根瘤菌液皆具有促進萵苣幼苗胚根生長的作用。

三、黑土環境下，與花生共生的根瘤菌對於非豆科植物萵苣種子發芽與生長之影響

(一) 自黑土分離的根瘤菌液，對萵苣種子發芽率的影響

根據表四和表五結果顯示，自黑土中分離之B2005、B2003、B2004皆促進種子發芽，而B3002、B4006則對種子發芽無影響。

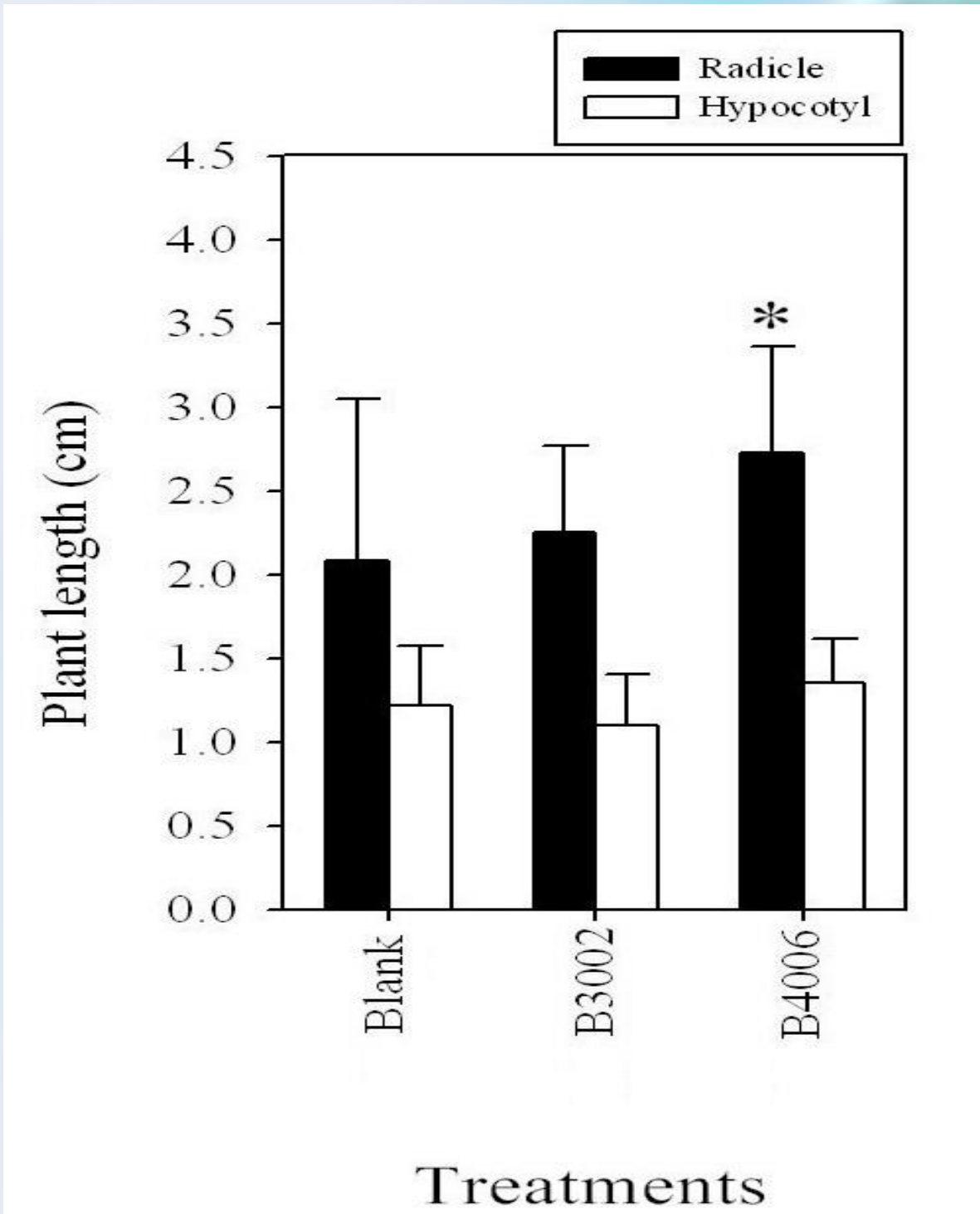
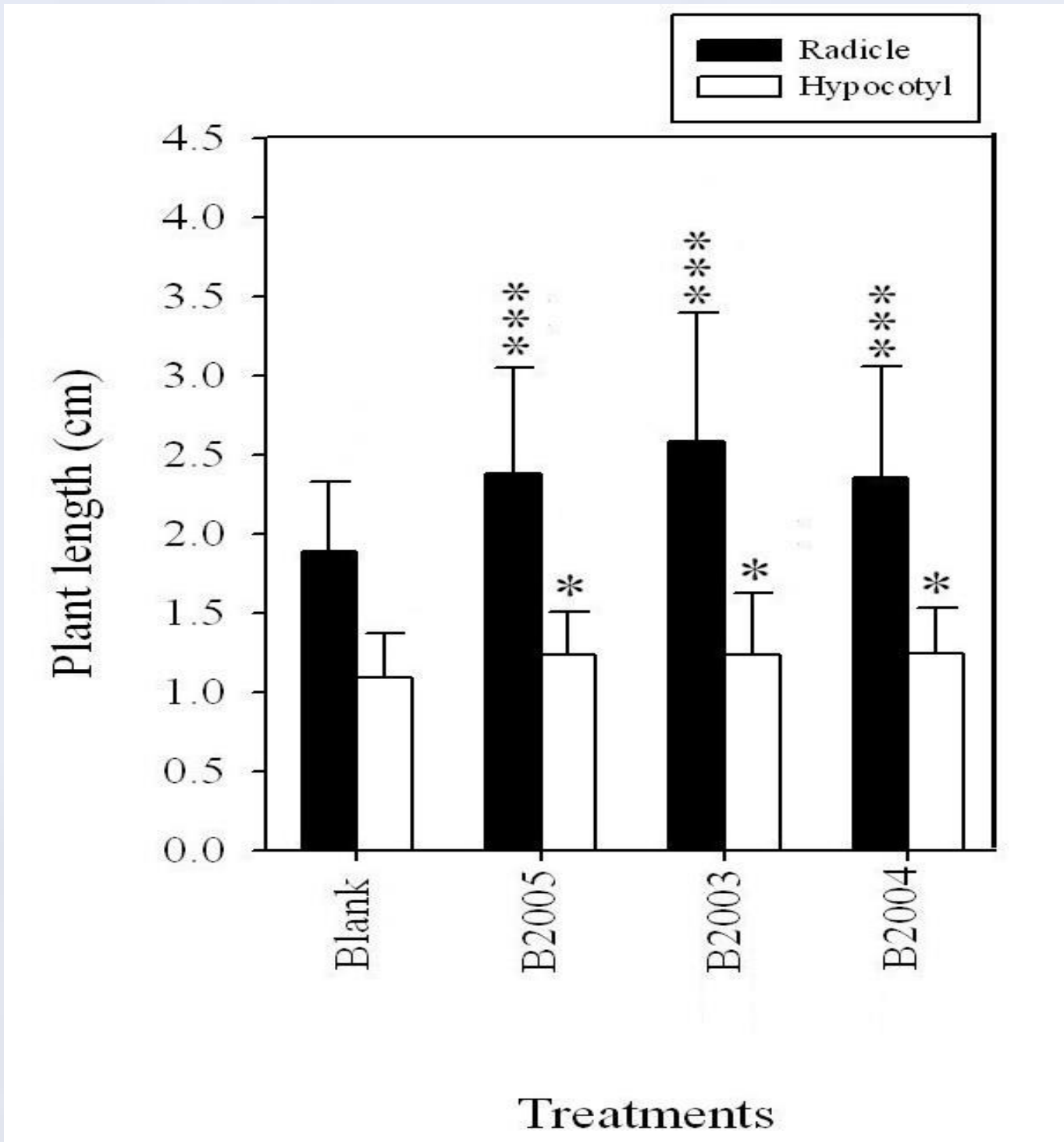
表四 黑土根瘤菌液中生長之萵苣種子發苴種芽率（實驗一）

菌株	發芽的種子數（顆） （全部共48顆種子）	相對發芽率(%)
B2005	42	102.44
B2003	42	102.44
B2004	44	107.32

表五 黑土根瘤菌液中生長之萵苣種子發芽率（實驗二）

菌株	發芽的種子數（顆） （全部共48顆種子）	相對發芽率(%)
B3002	36	97.29
B4006	35	94.59

(二) 自黑土分離的根瘤菌液對萵苣幼苗之胚根及胚莖生長的影響



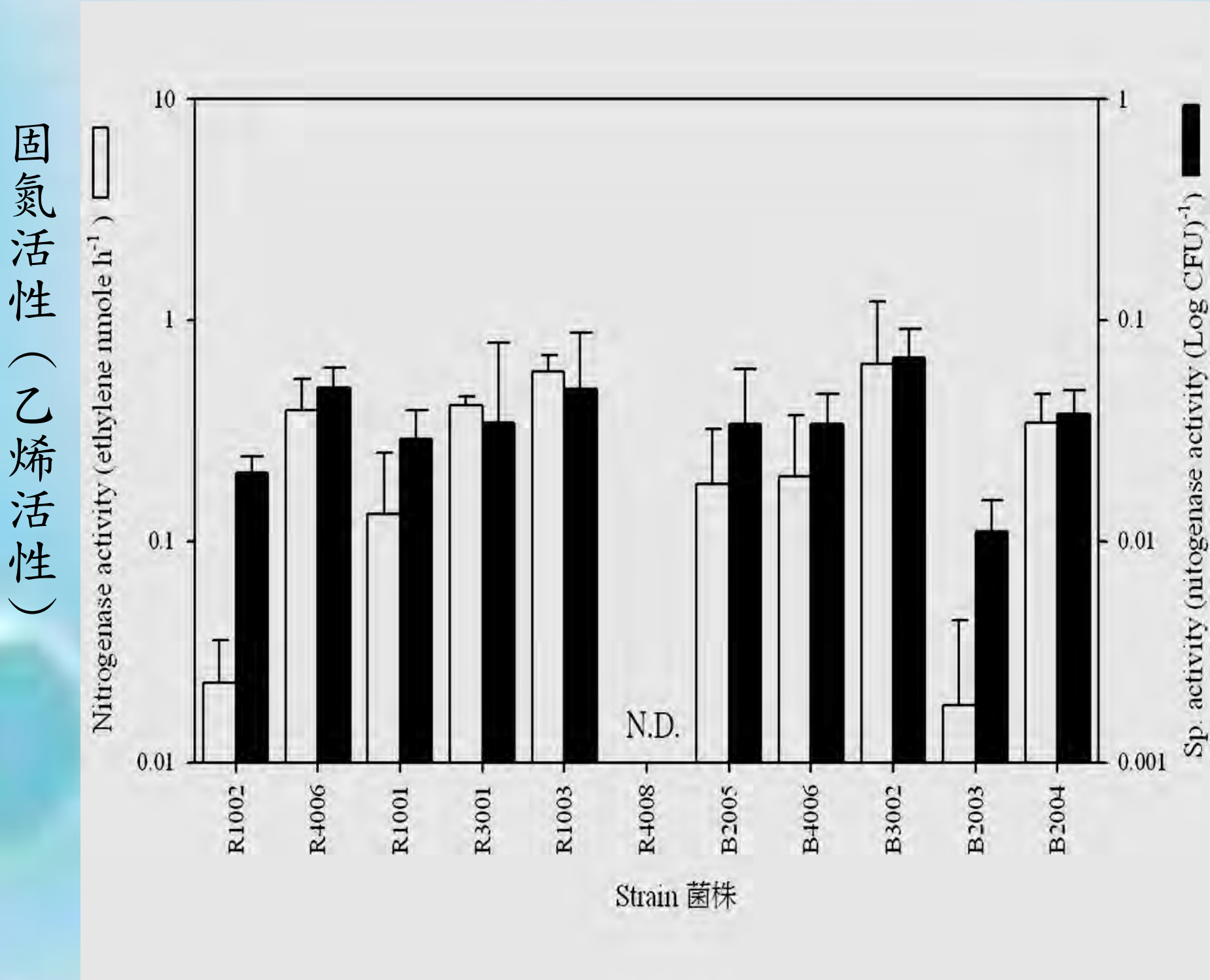
* 表示P<0.05
*** 表示P<0.001

(圖三) 在黑土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響 (實驗一)

(圖四) 在黑土環境下共生之花生根瘤菌對萵苣胚根及胚莖之影響 (實驗二)

根據上圖得知：與控制組(Blank)相比，加入自黑土分離出的B2005、B2003、B2004根瘤菌液P值<0.001，而B4006根瘤菌液P值<0.05，此四種根瘤菌液皆具有促進萵苣幼苗胚根生長的作用。

四、探討在紅土或黑土環境下，共生的不同種根瘤菌之游離固氮活性：



(圖五) 游離固氮活性測定結果

根據左圖結果顯示，從紅土中分離出的R4006、R3001和R1003，以及從黑土中分離出的B3002和B2004固氮活性皆較佳；而自紅土中分離出的R4006、R3001、R1003與自黑土中分離出的B2005、B4006、B3002、B2004的比活性皆較佳。

陸、討論

- 一、本研究從四個不同品系的花生根瘤中共分離出*Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium*、*Ensifer* 這四個屬的菌種。
- 二、在相同品系花生的根瘤中，可分離出不同種的根瘤菌，而不同品系的花生根瘤中，也可分離出有相同種的根瘤菌。根據上述結果，我們認為高中課本所提及「根瘤菌與豆科植物之間的共生關係具有根瘤菌專一性」的敘述，不見得是指特定根瘤菌不能共生於不同品系的豆科植物，而只是表示特定根瘤菌與豆科植物之間「長期同盟」關係的忠實程度。
- 三、比對根瘤菌種鑑定結果和根瘤菌液對萵苣種子實驗後，可知分離自紅土或黑土的根瘤菌液對萵苣種子胚根生長普遍有正向的影響。此結果顯示以上四屬的花生根瘤菌株具有對非豆科植物之促生功能，這也提高了根瘤菌在農業應用上的價值。
- 四、本實驗因時間問題僅能測定游離固氮活性，雖然游離固氮沒有共生固氮的固氮能力強，但是在氮源較不充分的土壤中，細菌的游離固氮能力也可以供應本身生存所需的氮元素，所以增加細菌在土壤和作物根圈中是很重要的。

柒、結論

- 一、自紅土及黑土環境中生長的四種花生品系（十一號、花仁、黑金剛、九號）根瘤中分離到的菌株，經16S rRNA基因序列比對結果，包含有*Pantoea*、*Paraburkholderia*、*Rhizobium*、*Ensifer*四個根瘤菌屬，且一個花生根瘤內可分離出不只一種根瘤菌，一種根瘤菌也可與不只一種花生品系植株共生。此外，不同花生品系及不同土壤環境皆會影響到根瘤內菌株的種類。
- 二、在本研究中屬於*Rhizobium*、*Paraburkholderia*、*Pantoea*這三屬的菌株對萵苣種子發芽率與胚根生長皆有顯著促進效果，其中分離自黑土的根瘤菌株對萵苣胚根的促進生長作用較紅土明顯。此實驗提供了花生根瘤菌株用於其他作物促生作用的可行性，也提高根瘤菌在農業應用範圍的價值。
- 三、本研究在比對游離固氮實驗及鑑種結果後，得知*Paraburkholderia*以及*Ensifer*兩個根瘤菌屬的固氮活性較高，而*Rhizobium*、*Ensifer*、*Paraburkholderia*、*Pantoea*四個菌屬的比活性皆高。

捌、參考資料及其他

洪美華（2002）。台灣本土豆科植物根瘤菌分離及特性研究(碩士論文)。台中：國立中興大學土壤環境科學系。

周瑞興（2009）。含羞草屬植物之β-根瘤菌*Burkholderia*與*Cupriavidus*間根瘤菌的競爭作用(博士論文)。台中：國立中興大學土壤環境科學系。

Chabot, R., Antoun, H. & Cescas, M. P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate- solubilizing *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 184(2), 311-321..

Leather,, G. R. & Einhellig, F.A.(1988). Bioassay of naturally occurring allelo- chemicals for phytotoxicity.*Journal of Chemical Ecology*, 14(10), 1821-1828.