

# 臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：“氮”憑本事-土壤中單棲固氮細菌族群比例及親緣關係探討

得獎獎項：佳作

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 林昀潔  
臺北市立第一女子高級中學 郭庭君

## 作者簡介



作者：林昀潔(圖左)

在無心插柳的情況下，我無意間闖入了實驗室的生活，從此開始跟這個題目奮鬥的日子。這個專題最吸引人的地方是，看起來沒有什麼偉大的標題但是越深入鑽研、探究，卻發現越來越多的謎團，宛如迷霧一般引人深究。

當我們每往下做一步碰到新的問題時，我們必須在舊有的知識上去推敲假設，然後實驗。用有限的已知來面對那深不可測的未知。

這樣的過程雖然辛苦，但也是一個難得的經驗，相信對未來想從事基礎科學研究的我有很深遠的影響。

最後要感謝我的夥伴、教授、老師、台大動物所 847 實驗室的全體學長姊、父母親、還有很多幫助我們的人。

作者：郭庭君(圖右)

目前就讀北一女中三年級。

從小對於生命科學的領域很有興趣，選擇專題課的分組時毫不猶豫的就選了生物組。然而會做到這一步，卻是因緣際會的。一開始的主題其實不是這個（笑），可是越做下去問題便一個一個的跑出來，為了解決這些問題，我們必須不斷的重新假設、實驗，甚至推翻之前的結論，最後現在這份作品的形貌才得以完全顯現。整個過程雖然混雜了歡笑與苦悶、笑語和淚水，整體來說卻是一個享受，也讓我距離一個真正的研究者的世界更近了一步。

感謝我的夥伴、教授、老師以及 R847 的所有學長姊，及一路支持我們的人。

## 目錄

摘要	
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
壹、前言	
一、研究動機	5~6
二、研究目的	6
貳、研究過程及方法	
一、研究設計	7
二、實驗器材	8
三、研究過程	9~17
參、研究結果與討論	18~34
肆、結論與未來展望	35
一、結論	
二、未來展望	
伍、參考文獻及附錄	
一、參考文獻	36
二、附錄	37~54

## 摘要

*Azotobacteraceae* 為一單棲固氮菌科，包含 *Azotobacter* 與 *Azomonas* 兩菌屬，在農業上可用來改善缺氮的貧瘠土壤。在分離土壤中的 *Azotobacteraceae* 時，發現非單棲固氮菌與單棲固氮菌間可能具有共生的情形。

我們利用優勢培養(缺氮)的方法篩選土壤中的 *Azotobacteraceae*，將優勢培養後所生成的菌落稀釋  $10^4$ ~ $10^6$  倍後，能有效分離 *Azotobacter* 與 *Azomonas*，然而低於此稀釋倍率則會形成混合菌落，其中可同時發現單棲固氮菌與非單棲固氮菌存在，推測某些非固氮菌在優勢培養過程中可能可從單棲固氮菌獲得氮源，與之共生。

此外亦從菌種形態的差異並配合顯微螢光雜合技術 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、分子遺傳標記 (16S-rDNA) 等方式，分析土壤中的 *Azotobacteraceae*，探討單棲固氮菌及其他非單棲固氮菌在培養基上的生長情形、比例及親緣關係。

## Abstract

The family *Azotobacteraceae* is a group of free-living nitrogen-fixing bacteria that is found in soil. Two genera are within this family: *Azotobacter* and *Azomonas*. Agriculturally, it is often used to improve fertility for nitrogen deficient barren lands. We analyze the *Azotobacteraceae* according to molecular biology and traditional taxonomy.

We used an enrichment procedure to culture the bacteria, and diluted it repeatedly. We found it most suitable to dilute it  $10^4\sim 10^6$  times to best separate *Azotobacter* from *Azomonas*. If the concentration were to be higher than this, mixed flora containing many different bacteria species would be found. Moreover, we noticed that non nitrogen-fixing bacteria, symbiotic nitrogen-fixing bacteria, and free-living nitrogen-fixing bacteria would form a single colony on a nitrogen-deprived medium. This implies that a symbiotic relationship may exist between nitrogen-fixing bacteria and non nitrogen-fixing bacteria.

We also discuss the growing situation, the group proportion, and the relationships between free-living nitrogen fixing bacteria and other bacteria by morphology, fluorescence in situ hybridization (FISH), and molecular biology.

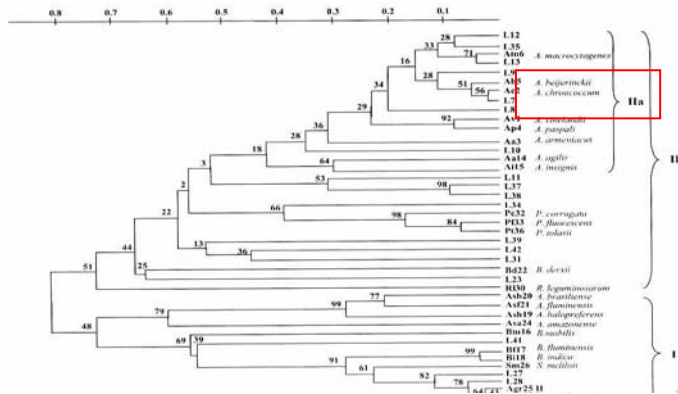
## 壹、前言

### 一、研究動機

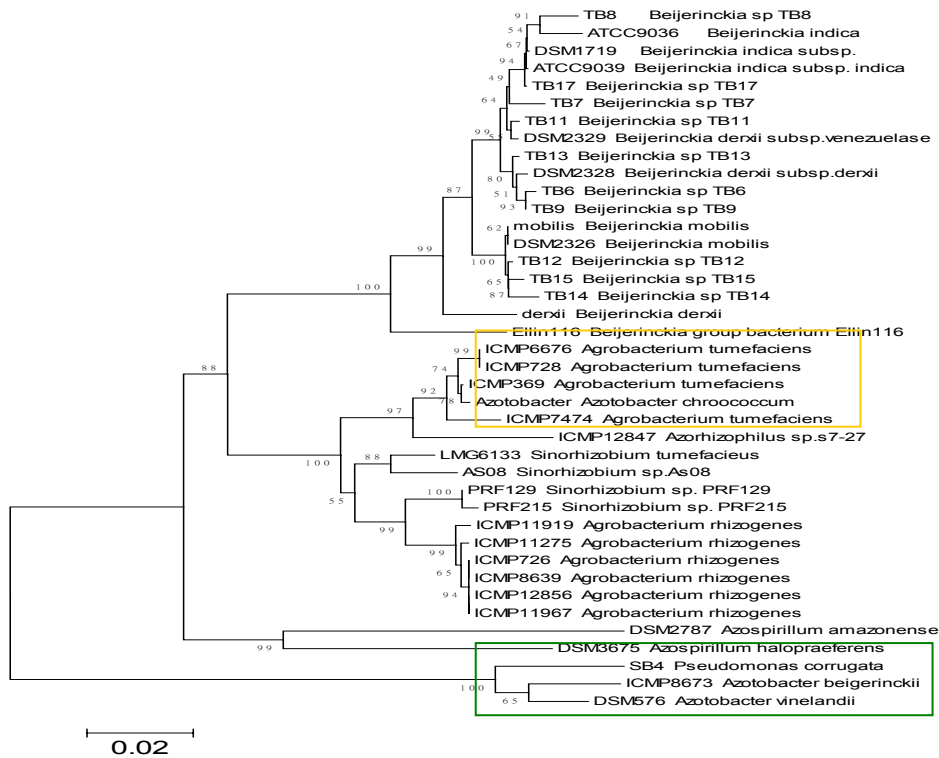
大多數植物需依賴氮元素以合成生長所需的蛋白質、核酸及腺苷三磷酸(ATP)，故缺氮經常會限制植物的生長。大氣中氮氣約佔總體積的五分之四，然而氣態氮並不能被大部分的植物所直接利用。固氮菌是一群可將空氣中的氮轉換為氨的土壤微生物( $N_2+6e^-+nATP+6H^+ \rightarrow 2NH_3 +nADP+nPi$ )，而氨溶於水或轉換為硝酸可供植物利用，固氮菌的種類及數目常隨著土壤成分及植物種類而有所差異。

*Azotobacteraceae* 是單棲性(free-living)土壤固氮菌科，包含 *Azotobacter* 與 *Azomonas*，可在土壤中自行單棲固氮而不須與植物共生。在過去的研究中發現，當土壤中 *Azotobacter* 的數量增加時，植物也長得較好，顯示 *Azotobacter* 對於土壤成分的調節或土壤結構的改善可能扮演著極為重要的角色。因此，研究 *Azotobacter* 菌種間親緣關係及菌種特性，除了提供分類上的依據外，也可作為未來生物性改良土壤貧瘠時的應用。

在我們初步的文獻回顧與資料分析中發現，依據 NCBI 資料庫中所登錄之 *Azotobacter* 各菌種 16S rRNA 基因序列所繪製的親緣關係圖與過去文獻中的分類結果不符：在文獻(7)中，*Azotobacter chroococcum* 與其他 *Azotobacter* 成員明顯歸為一類(圖一)，顯示 *Azotobacter chroococcum* 與其他 *Azotobacter* 關係較為密切；然而，在我們所建構的親緣關係樹中卻發現 *Azotobacter chroococcum* 與共生性的根瘤菌 *Agrobacterium* 關係卻較近(圖二)。因此，在接續實驗中，我們以具篩選性的培養基(缺氮)自不同植物根部土壤中分離，並培養各類 *Azotobacter* 固氮菌，利用 DNA 分子遺傳標記 16S rRNA 基因，分析培養基中所分離之各式固氮菌的細菌種類及親緣關係。此外，我們在分離的過程中，發現所培養的菌落中含有數種不同的固氮菌種類，故同時結合其它的實驗技術與分析方法(如：顯微螢光原位雜交)，探討各固氮菌種類在培養基上的生長情形。



(圖一)文獻(7)中以 16s rRNA 基因序列所建構之親緣關係圖，由圖可見 *Azotobacter chroococcum* (紅色方塊)與其他 *Azotobacter* 菌群關係較為密切。



(圖二) NCBI 登錄之 16s rRNA 基因序列與實驗所得序列所建構之 *Azotobacter* 親緣關係圖，其中 *Azotobacter chroococcum* (黃色方塊)與其它 *Azotobacter* (綠色方塊)菌群的親緣關係較遠，而與 *Agrobacterium* 關係較為相近。

## 二、研究目的

1. 利用培養基分離培養 *Azotobacter*，並探討培養基上菌落的生長情形以及組成差異。
2. 探討各種單棲固氮菌之間的親緣關係。

## 貳、研究方法及過程

### 一、實驗設計

分離培養  <i>Azotobacter</i>	目的：實際分離培養出 <i>Azotobacter</i>  設計：1. 使用缺氮的培養基培養單棲固氮細菌。 2. 觀察菌落形態作為初步分類依據。 3. 使用分子遺傳標記探討混雜菌落中的細菌種類。 4. 觀察不同細菌種類在培養基上生長的差異。 5. 探討單棲固氮菌在培養基上的生長情形及與其他菌種間的關係。
以分子遺傳方法作  親緣關係探討	目的：探討 <i>Azotobacter</i> 與其他土壤細菌的親緣關係  設計：1. 使用資料庫 NCBI 上的 16s rRNA 基因序列，分別針對 <i>Azotobacteraceae</i> 及 <i>Agrobacterium</i> 與 AY353708 設計引子。 2. 將初步分類後的菌落，分別使用兩組引子進行 PCR，以釐清 <i>Azotobacter chroococcum</i> 與其它固氮菌間的親源關係。 3. 將培養出的菌落進行定序，並至資料庫中進行菌種比對。

## 二、實驗器材

### (一)實驗器材及藥品：

PCR 反應器、離心機、震盪器、電泳槽、定溫烘箱、相位差顯微鏡、電腦，其他藥品及實驗室必備實驗用品。

### (二)分析軟體：

Sequencher : 整理並校對 DNA 序列

MEGA 3.0 : alignment

Clustal W : alignment

Mr.Bayes : 建構親緣關係圖

ARB Software: 測試 FISH 探針之適合度

### 三、研究過程

#### (一) *Azotobacter* 的分離、培養及探討

##### 1. 分離培養

###### (1) 採土：

我們挑選了數種植物根部附近的土壤作為取樣的地點，分別為野牡丹(野牡丹科)、蘿蔔(十字花科)、豆科植物、鬼針草(菊科)、大豆(豆科植物)。

###### (2) 加入培養液：

培養液詳細配方見附錄 1，此培養液不含氮源，故只有單棲固氮菌能在此培養液中存活，其中蔗糖為碳源、Mo 為固氮作用中不可缺少的元素，而  $Fe^{+2}$  則有活化固氮酶的作用。

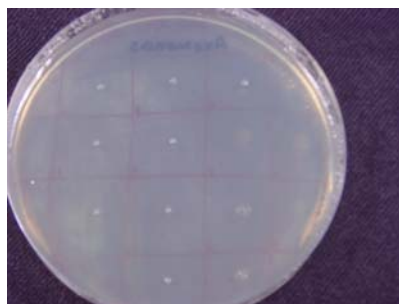
將培養液加入所採取的土壤中，並置於室溫下 3-5 天，其液體表面會形成一層生物薄膜(biofilm)。

因培養結果皆相似，故之後皆以由大豆根部附近採集的土壤進行實驗。

(3) 將此薄膜稀釋(加入 1000  $\mu$ L 的水中)，並置於由此培養液所製得的培養基中培養。

(4) 將菌落點出並連續稀釋  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  倍，於缺氮培養基上培養，而後再將菌落點出，以確實菌落來自單一菌種。

## 2. 觀察菌落型態並做初步分類



(圖五) *Azotobacter* 菌落

(圖六) *Azomonas* 菌落

由上圖可見，培養所得的菌落主要可分為兩種。依據文獻(6)判斷，*Azotobacter* 菌落呈黃色、直徑較大(約 0.6~0.8cm)，而 *Azomonas* 菌落則呈透明狀、直徑較小(約 0.4cm)。

## 3. 使用分子遺傳方法觀察混雜菌落中的細菌種類

在進行本研究的第二部分時(親緣關係分析)，我們發現有些菌落的 16S rRNA 基因可同時被 *Azotobacteraceae* 及 *Agrobacterium* 的專一性引子擴增，故推論可能有混雜菌落的產生，因此，希望藉由以下實驗來加以釐清：

### (1)方法：

A. 使用細菌的廣泛性引子(universal primer): 516F (5' TGC CAG CAG CCG CGG TA 3' ; *E. coli* positions 516-532)與 985R (5' GTA AGG TTC TTC GCG TT 3' ; *E. coli* positions 985-1001)，針對培養基培養出的菌落進行定序分析。

B. 將所得的序列與資料庫做比對，找出最接近之菌種與菌落型態(以傳統分類方式作為對照)。

(2)結果：

我們發現兩種情形：

a. 培養基培養出的菌落中 *Azomonas* 數量遠多於 *Azotobacter*。

b. 稀釋濃度在  $10^{-4}$  倍以上的二次培養液較易培養出混雜的菌

落，其外觀形態近似 *Azotobacter* 或 *Azomonas*，但仍含有

多種細菌，可能包括單棲固氮菌、共生固氮菌及非固氮菌。

推測共生固氮菌及非固氮菌可能與單棲固氮菌共生，並利用

其製造出的氮源在缺氮的培養基上生長。

#### 4. 觀察培養基上生長的族群比例

在發現上述兩點後，我們希望能夠：

(1)明確的數據描述結果 a 中兩菌群間的成長差異

(2)了解在缺氮培養基上培養出的混雜菌落是否均含有單棲固氮菌

(3)混雜菌落在所有菌落中所佔的比例，藉以作為結果 b 中推論共生固氮菌及非固氮菌可能與單棲固氮菌共生，並利用其製造出的氮源在缺氮的培養基上生長的假設。

因此我們選用顯微螢光原位雜交(Fluorescence in situ Hybridization; FISH) (附錄 2)的方法來探究上述問題。顯微螢光原位雜交(FISH)，是一種利用螢光標定之探針(labeled probe)，針對特定菌種進行雜合的技術。利用不同的光波段可激發特定之螢光標定物質，並在螢光顯微鏡下可看見細菌的形態。以下分述我們針對此兩目的的實驗設計及過程：

<p><i>Azotobacter</i> 與 <i>Azomonas</i> 在缺氮培養基上的比例</p>	<p>設計：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 選用二次稀釋濃度為 <math>10^{-4}</math> 倍的菌落進行探討。</li> <li>2. 因 <i>Azotobacter</i> 與 <i>Azomonas</i> 序列十分相近，無法設計出可精確分離此二者的專一性引子，因此，我們利用相位差顯微鏡先對 <i>Azotobacter</i> 及 <i>Azomonas</i> 細菌形態進行觀察。結果顯示兩者在顯微鏡下的形態相差甚大，<i>Azotobacter</i> 成短桿狀 (<math>5 \times 2 \mu\text{m}^2</math>)，且較 <i>Azomonas</i> (<math>2 \times 0.5 \mu\text{m}^2</math>) 粗大約 10 倍，可直接由形態上明顯區分，因此我們決定以自行設計、可同時標定 <i>Azotobacter</i> 和 <i>Azomonas</i> 的引子作為探針，並直接就形態差異判定此菌種。</li> <li>3. 在螢光顯微鏡底下比對使用 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, 用於染核酸) 和 Cy3(5,5'-disulfo-1,1'-(<math>\gamma</math>-carbopentynyl)-3,3,3'-tetramethylin-dolocarbocyanin-<i>N</i>-hydroxysuccinimidester) 標定之廣泛性探針 (eub338; 5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3' ) 與專一性探針(Az-B(F): positions 83-103 [5' CAC gCT AAC AgA TgA gCC TAg 3' ]) 行雜合反應後的結果。廣泛性探針可雜合所有細菌種類，而專一性探針只可與 <i>Azotobacter</i> 或 <i>Azomonas</i> 雜合，依形態可區分菌種，並進行計數。</li> <li>4. 重複計數數個視野，再進行平均及比例計算的工作。</li> </ol>
--	--

<p>混雜菌落中單 棲固氮菌與其他 細菌的比例</p>	<p>設計：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 選用二次稀釋濃度為 <math>10^{-4}</math> 倍的菌落進行探討。</li> <li>2. 選用自行設計 Cy3 螢光標定之廣泛性與專一性引子作為探針，分別比較同一視野下其與 DAPI 細胞染色法所得的情形，並計算 DAPI 染色法可得而兩探針無法雜合之非 <i>Azotobacter</i> 或 <i>Azomonas</i> 菌種，與兩者皆可染到之 <i>Azotobacter</i> 或 <i>Azomonas</i> 菌種的比例。</li> <li>3. 重複計數數個視野，再進行平均及比例計算的工作。</li> </ol>
-------------------------------------	--

[結果]

在實驗進行的初期，我們發現由廣泛性引子為探針所做的正控制組 (positive control) 的標定效果很好，然而，以專一性引子 (primer AzB(F)) 為探針的實驗組則效果不佳。因此，我們在不同的雜合 (Hybridization) 溫度、探針濃度及甲醯胺 (formamide) 濃度下，測試專一性引子的雜合效果：

(1) Hybridization 溫度

分別測試三種溫度：55°C、60°C、65°C。

(2) 探針濃度

在測試上述三種溫度時，分別測試添加 1  $\mu$ L 及 3  $\mu$ L 兩種不同體積的探針。

(3) formamide 濃度

在測試上述三種溫度時，分別測試 25% 及 30% 兩種不同濃度的 formamide。

(二)以分子遺傳標記探討 *Azotobacter* 與其他土壤細菌之親緣關係：

在查詢資料時發現，NCBI 上編號為 AY353708 的序列，原作者訂名為 *Azotobacter chroocum*，但經過和資料庫上其他序列進行比對之後，我們發現其與 *Agrobacterium* 屬的細菌較為相近。但因為資料庫上關於此菌種的 16s rRNA 基因序列僅此一條，為了避免因此序列與 *Azotobacter* 較不相似，而造成依靠其他種 *Aotobacter* 序列設計引子來進行的菌種分離及族群比例實驗結果判定的誤差，我們著手對這些細菌的親緣關係進行探討：

1. 使用 NCBI 資料庫上的 16s rDNA 序列，分別針對 *Azotobacteraceae*、*Agrobacterium* 以及 AY353708 設計引子。

(1)我們選用 MEGA 3 軟體進行序列排比(alignment)，再利用 Bio Edit 進行檢視。

(2)分別針對 *Azotobacteraceae*、*Agrobacterium* 及 AY353708 設計引子。

a. 下載資料庫上相似的數個屬的菌種序列

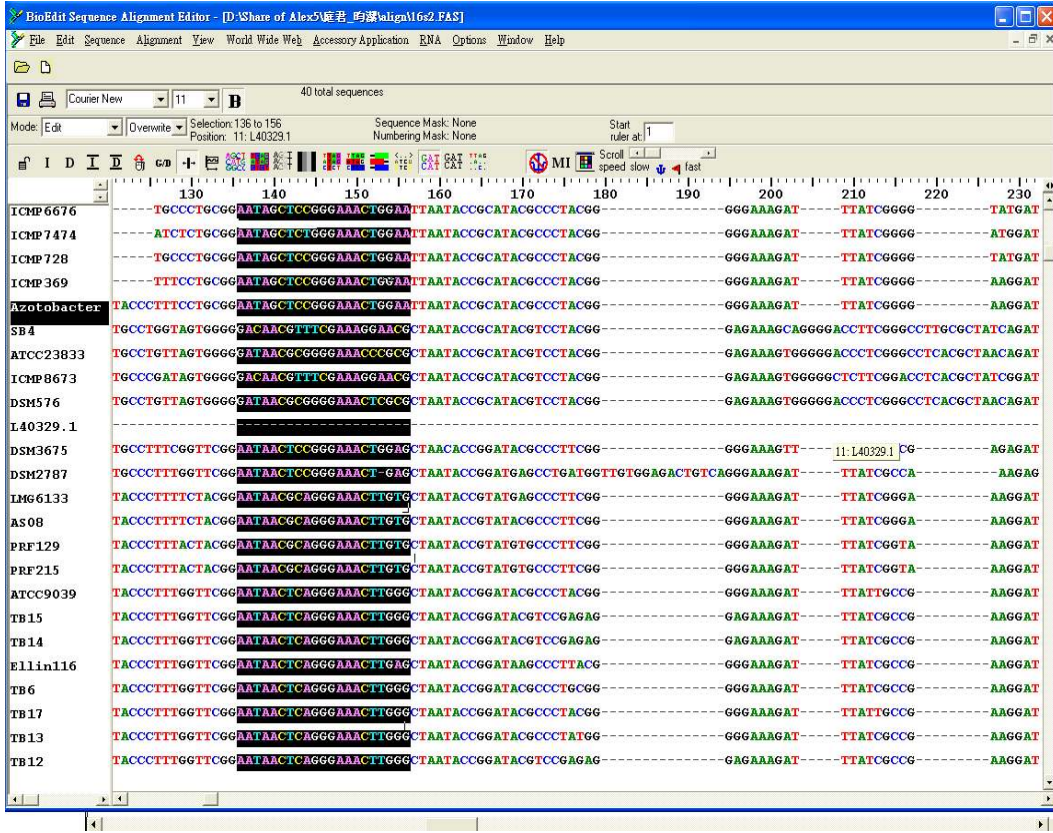
b. 比較並找出目標菌種與其他菌種不同之片段，設計為引子

c. 以針對 *Agrobacterium* 及 AY353708 設計的引子命名為

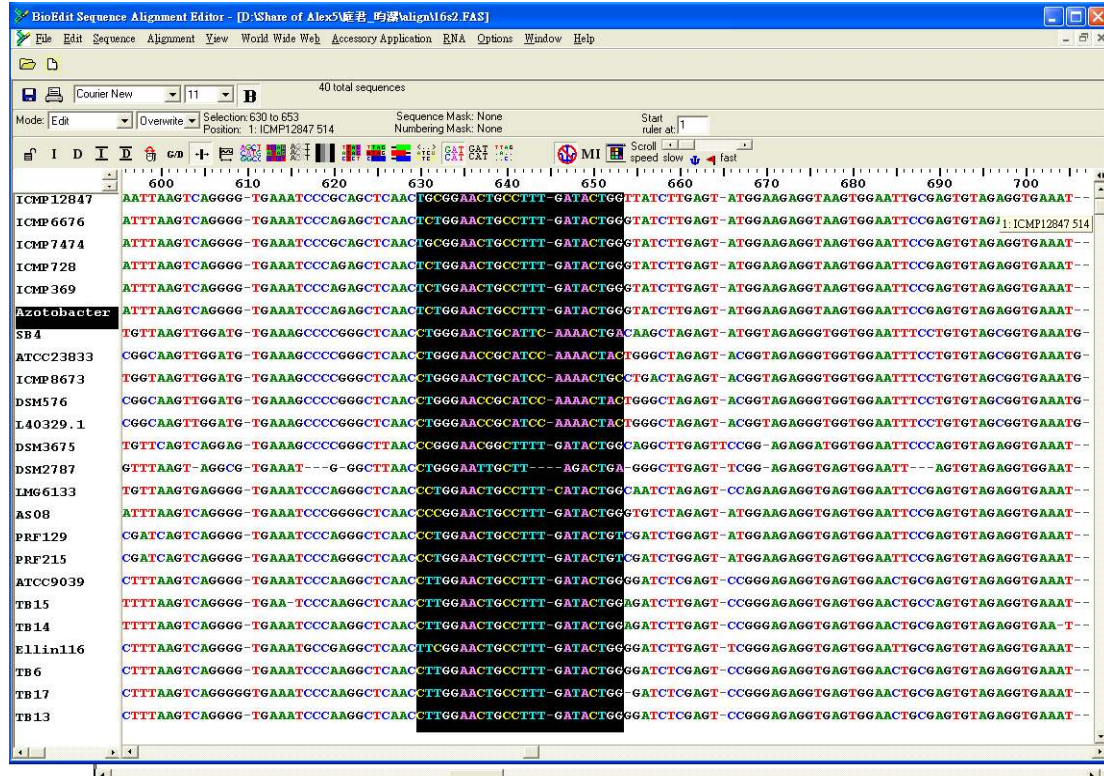
「primer AzA」，針對 *Azotobacteraceae* 設計的引子命名為

「primer AzB」。

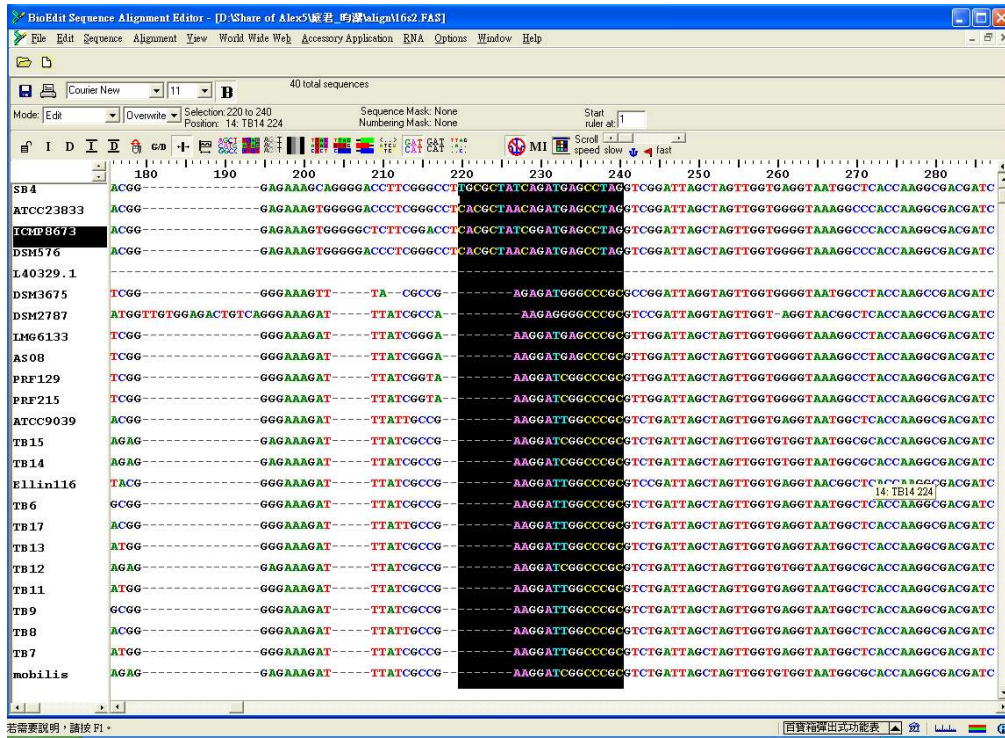
以下圖示為利用 BioEdit 軟體進行檢視，並設計引子的序列片段。



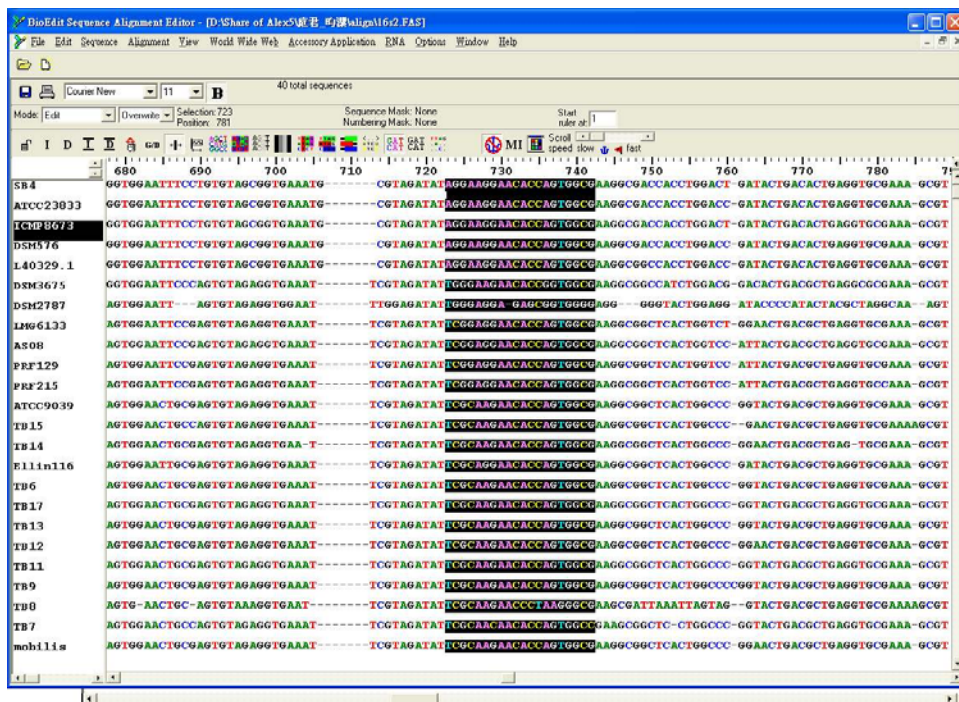
(圖七) Primer Az-A (F):positions 12-32 [5' AAT AgC TCC ggg AAA CTg gAA 3' ]



(圖八) PrimerAZ-A (R):positions 493-514 [5' AgT ATC NAA Agg CAg TTC CAg A 3']



(圖九) AZ-B(F): positions 83-103 [5' CAC gCT AAC AgA TgA gCC TAg 3']



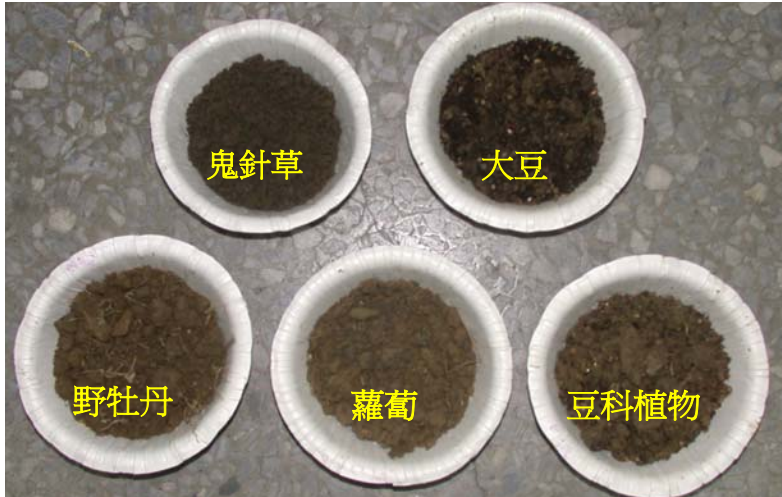
(圖十) AZ-B (R):positions 586-605 [5' CgC CAC Tgg TgT TCC TTC CT 3']

2. 將先前使用優勢培養法培養並初步分類後的菌落，分別使用兩組引子進行 PCR 反應，確定 *Azotobacter chroocum* 的 16s rRNA 基因序列與其它固氮菌間的親緣關係。
3. 將培養出的菌落進行定序，並至資料庫中比對，找出與其相近的菌種。
4. 使用 Clustal W 將自行做出的 16s rRNA 基因序列與資料庫上所得的序列進行序列排比(alignment)。序列排比時，需考慮到 16S rRNA 的二級結構，莖部(stem region)與圈環部(loop region)給予不同的值做加權分析。再使用 MrBaye 進行親緣關係圖的分析，並比較其與傳統分類方式的差異。

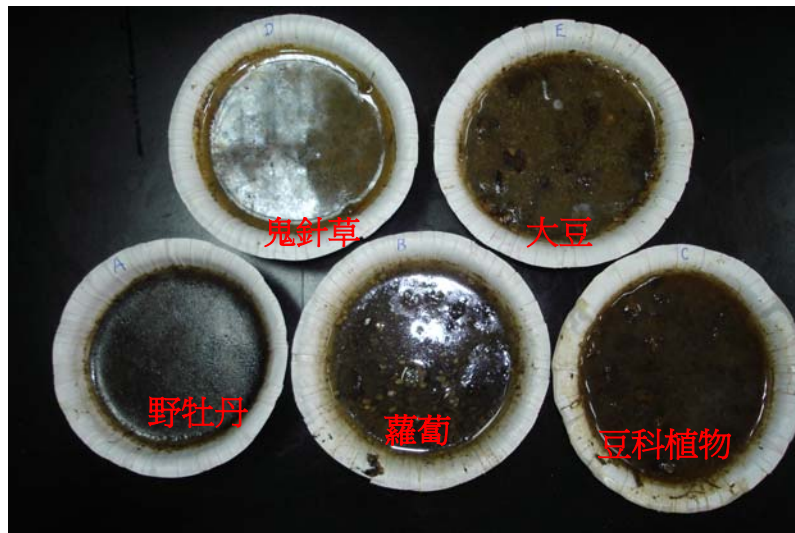
## 參、研究結果與討論

### 一、*Azotobacter* 的分離、培養及探討

(一) 採回的土壤利用優勢培養法培養。

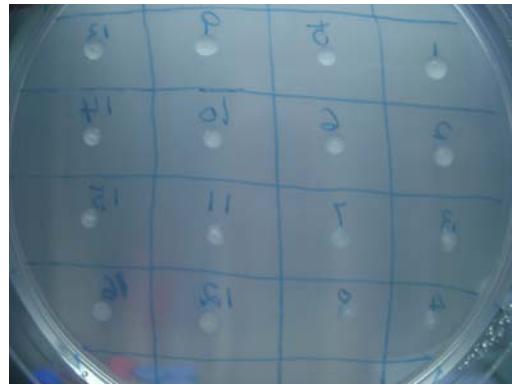
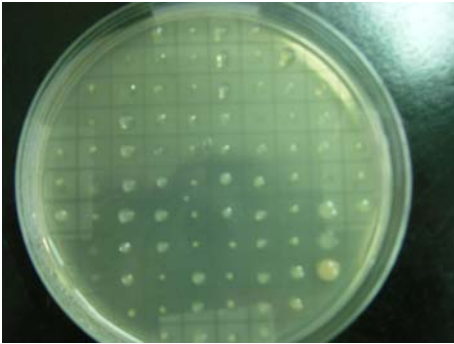


(圖十一) 五種不同植物根部的土壤所做分離培養

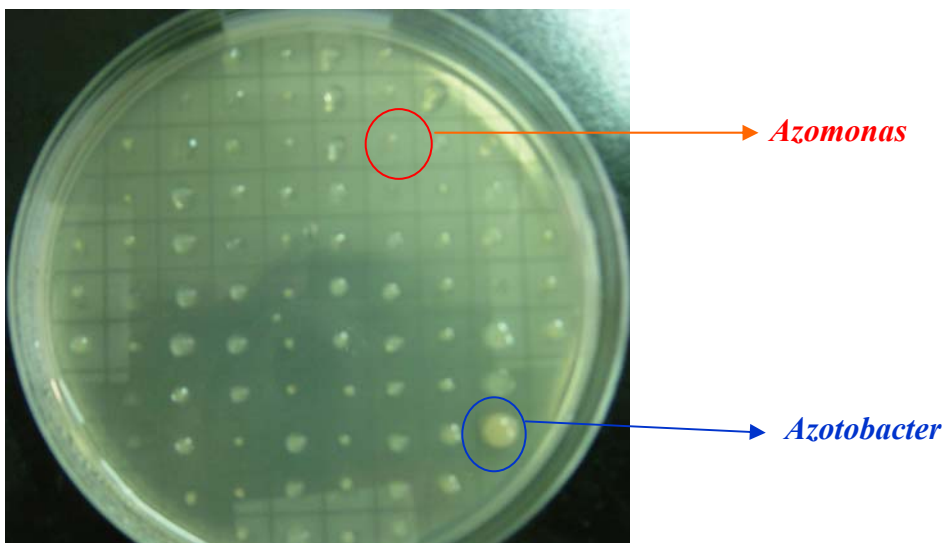


(圖十二) 培養約一星期後土壤培養基上長出的薄膜(Biofilm)。

(二)將薄膜取出後置於缺氮培養基上培養。



(圖十三) 純種菌落(pure colony) (圖十四) 混雜的菌落(hybrid colony)



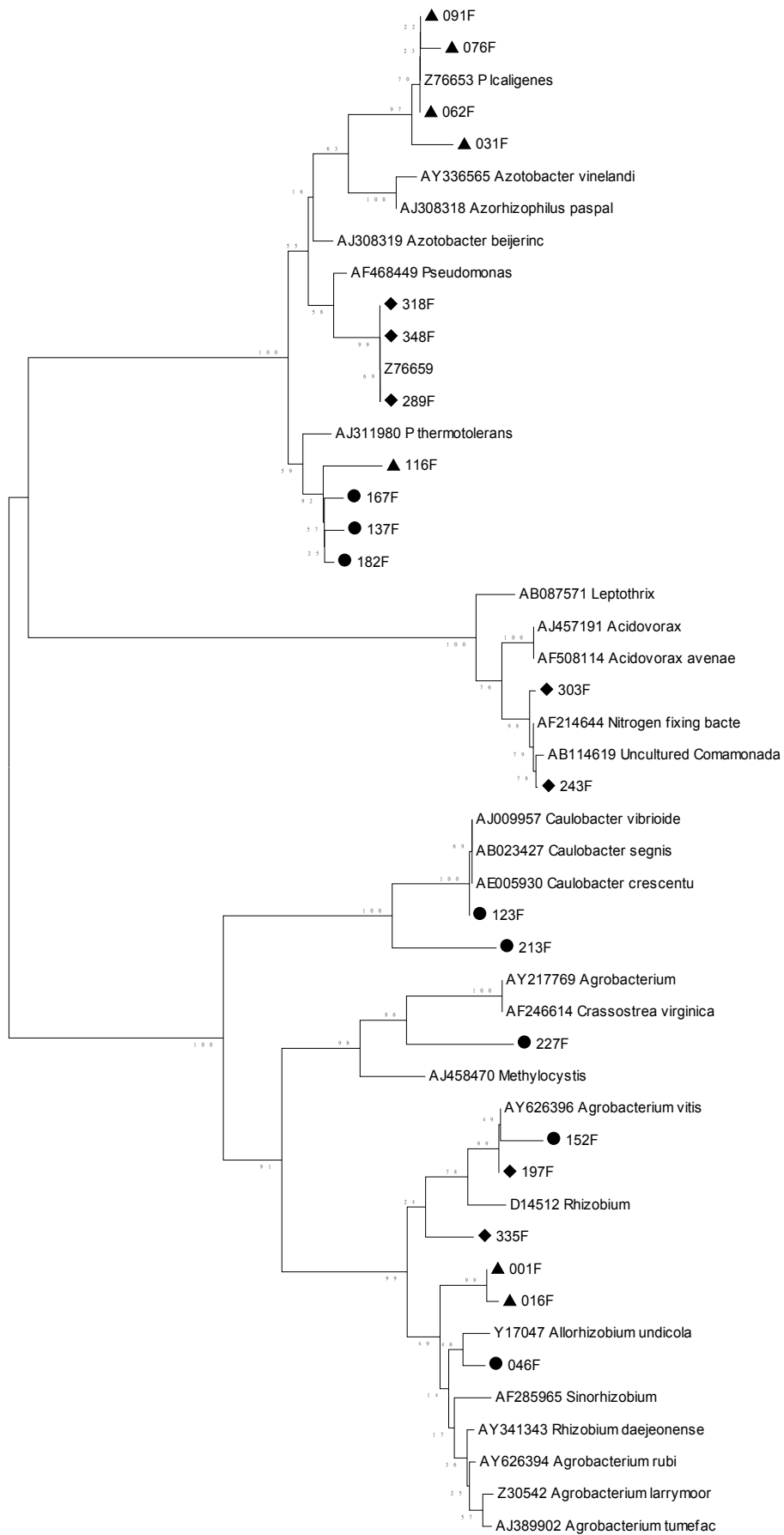
(圖十五) 純種菌落之外觀形態觀察

[結果]

由培養基上菌落的形態及數目差異，可以發現培養基中所培養出的 *Azomonas* 菌落明顯多於 *Azotobacter* 菌落。

(三)使用分子遺傳方法觀察混雜菌落中的細菌種類

1. 使用細菌的廣泛性引子(universal primer) (516F& 985R)，進行定序。
2. 將所得的序列與資料庫做比對，找出相近之菌種，與菌落形態之相關資料(即傳統分類方式作為對照)。



0.02

(圖十六) 利用 MEGA 所建構之親緣關係樹，圖中不同標記代表不同菌落(●◆▲分別代表三個不同菌落)，而不同標記後的數字則代表不同序列。顯示一個菌落具有許多菌種序列。其他序列則為與 RDP 基因資料庫進行比對後，再由 NCBI 下載的 16S rRNA 基因序列。

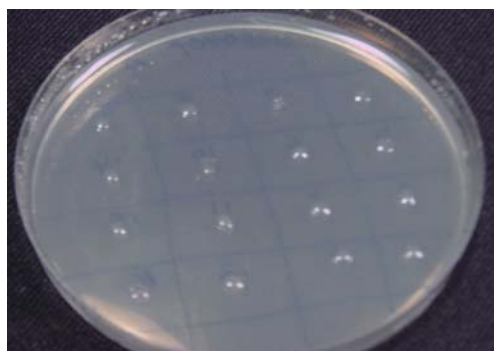
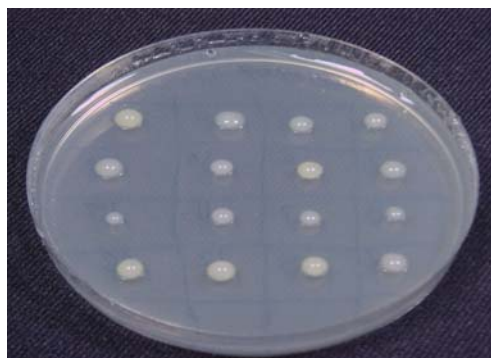
#### [結果]

由此圖可見，稀釋倍率在  $10^4$  以上的二次培養液較易培養出混雜的菌落，其外觀形態近似 *Azotobacter* 或 *Azomonas*，但仍可能包含多種細菌，包括單棲固氮菌、共生固氮菌及非固氮菌，推測共生固氮菌及非固氮菌可能可和單棲固氮菌共生，利用其製造出的氮源在缺氮的培養基上生長。

(四)觀察培養基上菌種生長的族群比例

1. *Azotobacter* 與 *Azomonas* 之比例：

菌落外觀



(圖十七)形似 *Azotobacter* 的混雜菌落

(圖十八)形似 *Azomonas* 的混雜菌落

(1)先以 primer Az-B 測試菌落中是否含有 *Azotobacter* 及 *Azomonas*。

PCR condition:

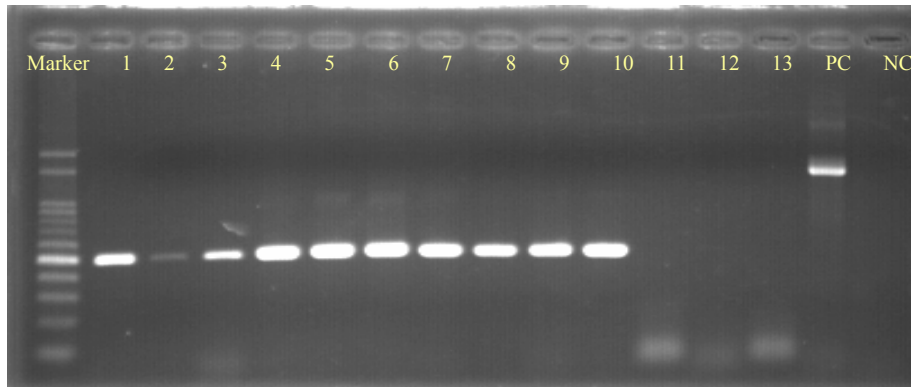
$$\left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30\text{sec} \\ 94^{\circ}\text{C} \quad 5\text{min} \rightarrow 52^{\circ}\text{C} \quad 45\text{sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 60\text{sec} \end{array} \right\} (30 \text{ cycles}) \rightarrow 72^{\circ}\text{C} 10\text{min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C}$$

代碼	DNA	Primer(F)	Primer(R)
1~3	ColonyA2, A10, A12	Primer AzB	Primer AzB
4~6	ColonyB1, B5, B10	Primer AzB	Primer AzB
7~9	ColonyC2, C9, C15	Primer AzB	Primer AzB
10	<i>Azotobacter</i> 9	Primer AzB	Primer AzB
11	<i>Azotobacter</i> 9	Primer AzA	Primer AzA
12	Soil DNA	Primer AzB	Primer AzB
13	Soil DNA	Primer AzA	Primer AzA
PC	Soil DNA	Universal primer	Universal primer
NC	ddH <sub>2</sub> O	Universal primer	Universal primer

(PC: positive control ; NC: negative control)

Universal primer (516f & 985r): 可夾出任何細菌片段並作為對照組的引子。

[結果]

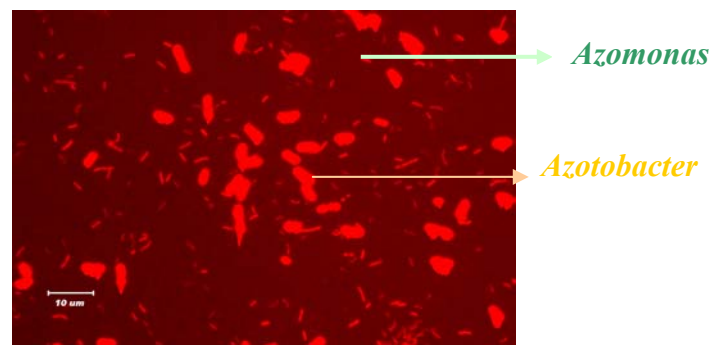
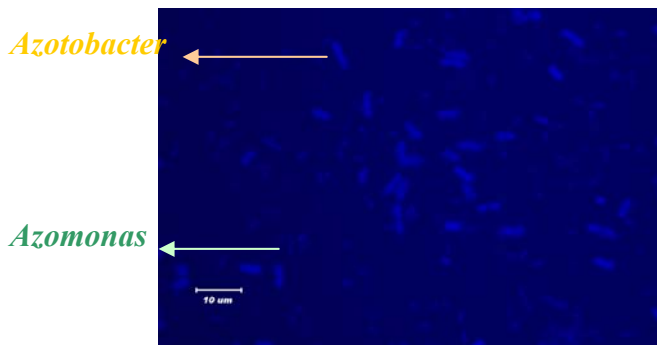


(圖十九) PCR 反應結果；樣本 1-9 皆含有 *Azotobacteraceae*，樣本 10、11 可用 primer AzB 擴增，不能用 primer AzA 擴增，應為 *Azotobacter*。樣本 12、13 為直接由土壤所萃取之細菌的 DNA，但無法用 primer AzA 或 AzB 擴增，可能是樣本中不含 *Azotobacteraceae* 和 *Agrobacterium*，或是萃取物中 *Azotobacteraceae* 和 *Agrobacterium* DNA 濃度不夠高所致。

(2)以顯微螢光原位雜交(FISH)計算 *Azotobacter* 與 *Azomonas* 之族群比例。

[結果]

[Hybridization] 溫度：55°C，引子濃度：1  $\mu$ L，[formamide]=25%



(圖二十) DAPI 染色法所得結果

(圖二十一) 廣泛性探針標定所得結果

[Hybridisation]: 溫度：55°C，引子濃度:1  $\mu$ L，[formamide]=25%

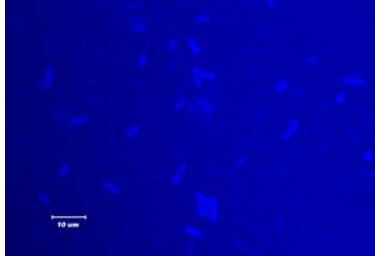


(圖二十二) DAPI 染色法所得結果

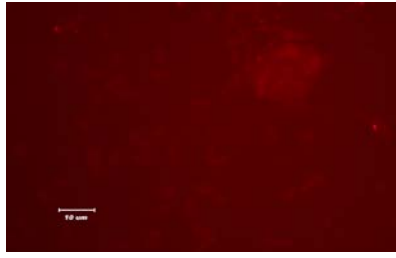
(圖二十三) 專一性探針標定所得結果

→圖二十三顯示專一性探針(probe AzB(F))無法行雜合反應，故進行測試探針測試實驗(以下皆為專一性探針 AzB(F))。

[Hybridization]: 溫度：55°C，引子濃度:1  $\mu$ L，[formamide]=30%

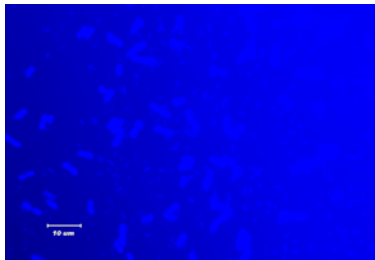


(圖二十四) DAPI



(圖二十五) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 55°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=25%



(圖二十六) DAPI

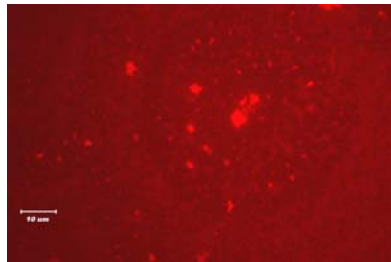


(圖二十七) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 55°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=30%



(圖二十八) DAPI

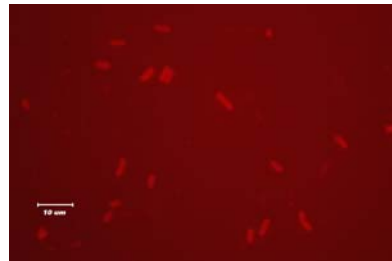


(圖二十九) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 60°C, 引子濃度: 1 μL, [formamide]=25%

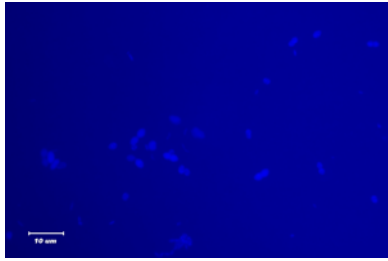


(圖三十) DAPI

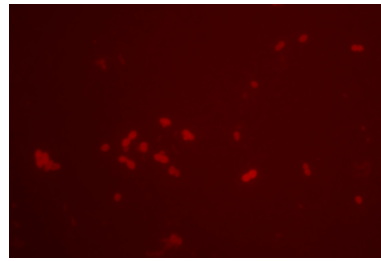


(圖三十一) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 60°C, 引子濃度: 1 μL, [formamide]=30%

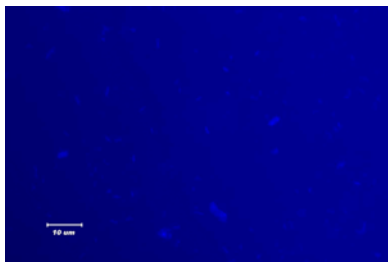


(圖三十二) DAPI



(圖三十三) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 60°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=25%

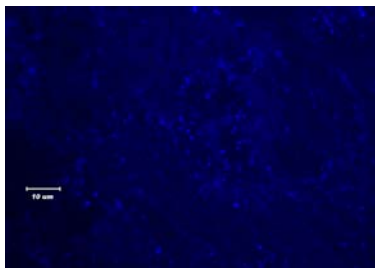


(圖三十四) DAPI

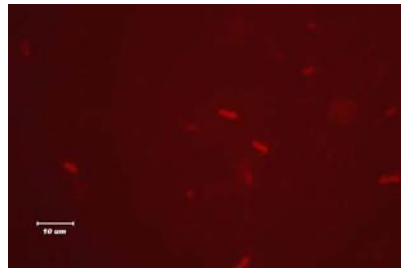


(圖三十五) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 60°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=30%

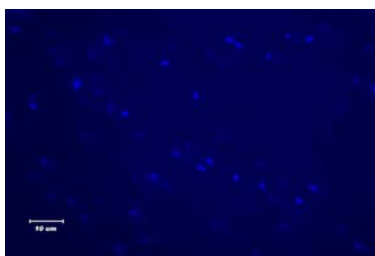


(圖三十六) DAPI



(圖三十七) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 65°C, 引子濃度: 1 μL, [formamide]=25%

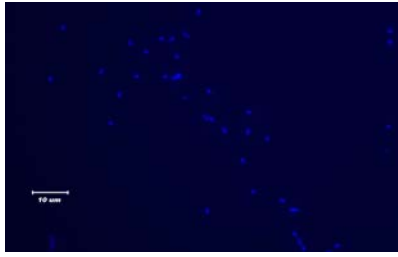


(圖三十八) DAPI

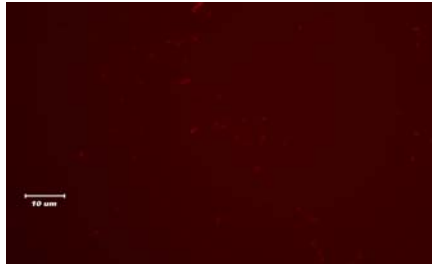


(圖三十九) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 65°C, 引子濃度: 1 μL, [formamide]=30%

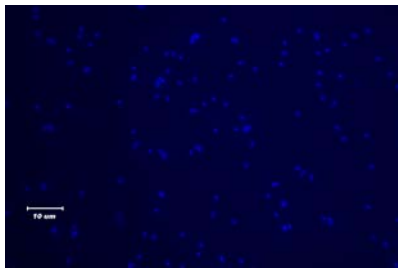


(圖四十) DAPI

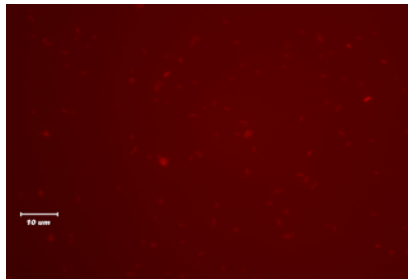


(圖四十一) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 65°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=25%

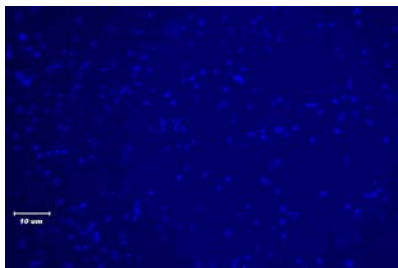


(圖四十二) DAPI



(圖四十三) Cy3

[Hybridization]: 溫度: 65°C, 引子濃度: 3 μL, [formamide]=30%



(圖四十四) DAPI



(圖四十五) Cy3

#### [結果]

在測試了雜合溫度、探針濃度及甲醯胺(formamide)濃度等實驗條件後，仍以廣泛性引子(Eub338)作為探針的正控制組(positive control)染色效果較好，而利用專一性引子(primer AzB(F))的實驗組部分，解析效果仍未見明顯改善。經由文獻(9)推測，16s rRNA 的二級結構可能在與專一性探針進行 FISH 反應時，影響探針與 rRNA 序列的雜合能力。此外，利用 ARB 軟體 (<http://www.arb-home.de/>)

進行探針合適度檢測，發現探針 AzB(F)的合適程度僅位於等級五，故重新設計一探針：5'-TTGGGAGGAAGGGCTGTA-3'，此探針經 ARB 軟體評比後列為等級一，因此用以日後測試。

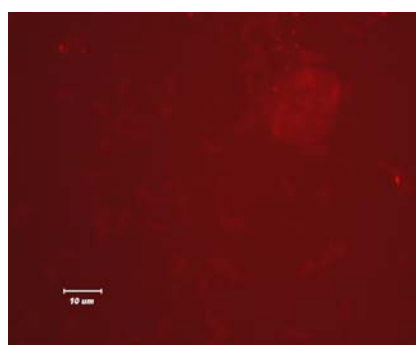
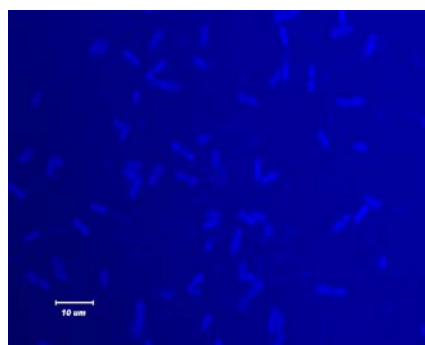
雖然，DAPI 染色法會因溫度的提高而產生背景雜訊，然而，我們計數主要以 Cy3 螢光的視野為主，故對實驗結果影響不大。

(表 1) 隨機挑選不同視野及不同樣本計數兩菌種間族群比例

	<i>Azotobacter</i> (個數)	<i>Azomonas</i> (個數)	<i>Azotobacter</i> / <i>Azomonas</i>
1.	26	99	0.26
2.	70	128	0.55
3.	15	31	0.48
4.	41	144	0.28
5.	29	121	0.24
6.	28	77	0.36
7.	9	14	0.64
8.	18	38	0.47
9.	26	59	0.44
平均值			0.41

## 2. 其它混雜菌落中單棲固氮菌與其他細菌的比例

[Hybridization] 溫度：46 °C

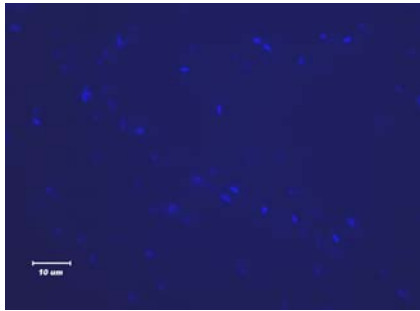


(圖三十九) DAPI

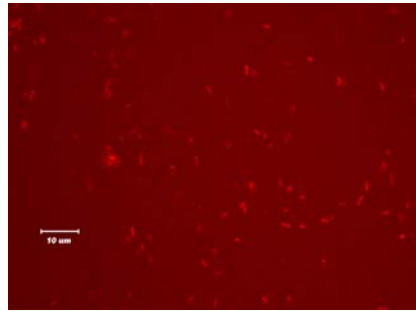
(圖四十) Cy3

[結果]：probe AzB(F)無法雜合 [結果]：probe AzB(F)無法雜合

[Hybridization] 溫度: 65 °C



(圖四十二) DAPI



(圖四十一) Cy3

[結果]: probe AzB(F)可雜合, 但 DAPI 因溫度太高而有雜訊, 故無法做比較

[結論]: 依照目前的實驗結果顯示, 所選用的專一性探針無法在 FISH 實驗中有效雜合至目標序列, 因此無法計算單棲固氮菌和其他細菌的比例。未來將嘗試利用新設計的專一性引子進行 FISH 反應, 並配合 Q-PCR (定量 PCR) 等方法進行實驗。

(二)以分子遺傳標記探討 *Azotobacter* 與其他土壤細菌之親緣關係

1. 使用資料庫(NCBI)上的 16s rRNA 序列，分別針對

*Azotobacteraceae* 及 *Agrobacterium* 以及 AY353708 設計引子。

AZ-A(F): 12-32 [5' AAT AgC TCC ggg AAA CTg gAA 3' ]

AZ-B(F): 83-103 [5' CAC gCT AAC AgA TgA gCC TAg 3' ]

AZ-A(R): 493-514 [5' AgT ATC NAA Agg CAg TTC CAg A 3']

AZ-B(R): 586-605 [5' CgC CAC Tgg TgT TCC TTC CT 3' ]

2. 將先前使用優勢培養法培養並依照菌落形態大小與顏色差異做初步的分類的菌落，每一種再挑2~3個菌落分別以兩組引子做PCR反應，確定 *Azotobacter chroocum* 的 16s rRNA 應較與何者相似。

(1) 稀釋倍率  $10^4$  的菌落

PCR condition:

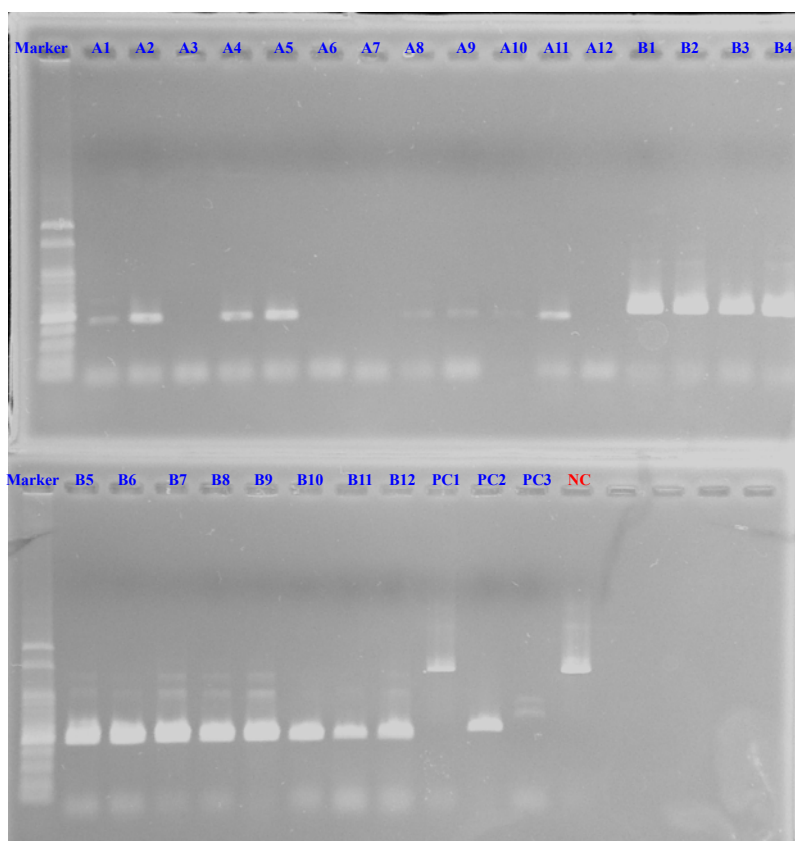
94°C 5min →  $\left. \begin{array}{l} 94^\circ\text{C} \ 30\text{sec} \\ 52^\circ\text{C} \ 45\text{sec} \\ 72^\circ\text{C} \ 60\text{sec} \end{array} \right\} (30 \text{ cycles}) \rightarrow 72^\circ\text{C} \ 10\text{min} \rightarrow 4^\circ\text{C}$

代碼	DNA	Primer(F)	Primer(R)
A1-A12	Clone1~12	AzA	AzA
B1-B12	Clone1~12	AzB	AzB
PC1	Soil DNA	Universal primer	Universal primer
PC2	Clone1	Universal primer	Universal primer
PC3	Clone1	Universal primer	Universal primer
NC	ddH2O	Universal primer	Universal primer

PC: positive control

NC: negative control

Universal primer (27f & 1492r): 可夾出任何細菌片段並作為對照組的引子。



(圖四十三) NC 為負控制組，應無任何產物出現，此處的 NC 呈現正反應，為實驗污染所造成。

我們發現在此稀釋濃度下的菌落可同時利用引子 AzA (F)與 AzB (R)擴增其 16S rDNA 片段，經由定序分析後，發現其為混雜的菌落，即擁有單棲固氮菌、共生固氮菌甚至非固氮菌類，然則外觀型態卻看似 *Azotobacter*。

## (2) 純種菌落

PCR condition:

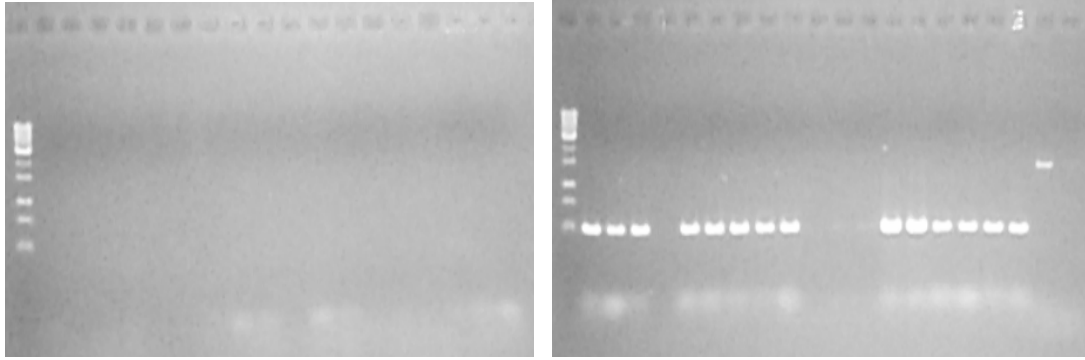
94°C 5min →  $\left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30\text{sec} \\ 52^{\circ}\text{C} \quad 45\text{sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 60\text{sec} \end{array} \right\} (30 \text{ cycles}) \rightarrow 72^{\circ}\text{C} \quad 10\text{min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C}$

代碼	DNA	Primer(F)	Primer(R)
A1-A18	Colony	Primer AzA	Primer AzA
B1-B18	Colony	Primer AzB	Primer AzB
PC	Soil DNA	Universal primer	Universal primer
NC	ddH <sub>2</sub> O	Universal primer	Universal primer

PC: positive control

NC: negative control

Universal primer (27f + 1492r): 可夾出任何細菌片段並作為對照組的引子。



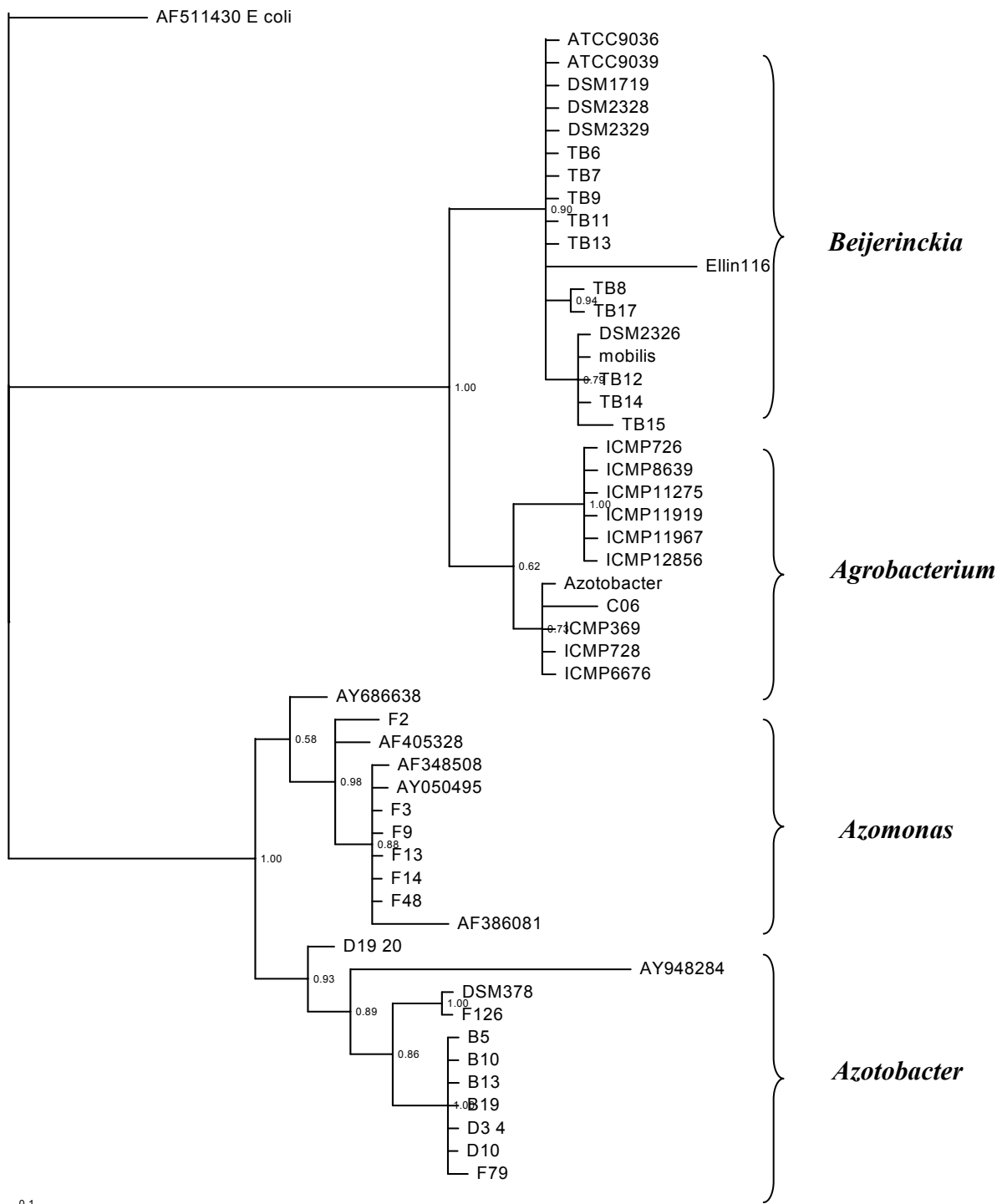
(圖四十四) 以 primer AzA (F+R) 夾取 (圖四十五) 以 primer AzB (F+R) 夾取

[結果]

PCR 反應結果所示，在此缺氮培養基上所培養之純種菌落均只能用 primer AzB (F+R) 放大其 16s rDNA，且均無法用 AzA (F+R) 放大其片段。此外，我們得知 *Agrobacterium* 須共生，無法單獨生長在此缺氮培養基上，而參照 NCBI 上的 *Azotobacter* 菌種 (AY353708；與 *Agrobacterium* 屬序列較相近的菌種) 所設計的 primer AzA (F+R)，亦無法放大可於此缺氮培養基上生長之菌種的 16s rDNA，故推測 NCBI 上的 *Azotobacter* 菌種 (AY353708) 應不屬於 *Azotobacter*，應歸類為 *Agrobacterium* 的序列。此外，綜合第一部份的混雜菌落的研究結果，我們發現一些混雜菌落雖外觀型態偏向 *Azotobacter*，但其中亦含有其它共生固氮菌或非固氮菌，故推測 AY353708 序列可能為作者當初定序時未清楚分離菌種的原因所致。

3. 將 PCR 反應放大之菌落做定序分析，並至資料庫中比對其相近的菌種。

4. 利用 Clustal W 將所得的序列與資料庫上的序列進行序列排比 (Alignment) (需考慮 16S rRNA 基因序列之二級結構，並以 *E. coli* 序列作為比照)，並利用 Mr. Baye 建構菌種之親緣關係圖，設定 100 萬個世代 (generation)，溫度為 0.002，並討論以傳統分類方式之菌種與 16s rRNA 序列分析結果的異同。



(圖四十六) 代表性之菌種親緣關係樹。

[結果]

- (1)由此親緣關係圖可見我們所得的序列(圖中編號為F2, F3, F9, F13, F14, F48, F126, F79, B5, B10, B13, B19, D3, D4, D10, D19, D20),均分別屬於 *Azotobacter* 或 *Azomonas*。兩者屬於同一科(*Azotobacteraceae*),我們所得的結果均印證之。但其實早期 *Azomonas* 與 *Azotobacter* 均被歸類於 *Pseudomonaceae* 此科中,但後人提出這兩種菌應單獨分類在另一科 (*Azotobacteraceae*)的說法。其中 *Azomonas* 的菌落形態與 *Pseudomonas* 的相近(均為透明狀菌落),故常被誤認為是分布廣泛的 *Pseudomonas*。但 *Pseudomonas* 雖分布廣泛,卻不具固氮能力,故無法生長於我們的缺氮培養基上,因此,雖然序列對照比對(blast)的結果均顯示相近菌種應為 *Pseudomonas*,但我們仍認為應為 *Azomonas* (然而基因資料庫中並無任何 *Azomonas* 的序列),且由我們所得的實驗結果更支持 *Azotobacter* 及 *Azomonas* 應單獨分類為另一科 (*Azotobacteraceae*),而不應與 *Pseudomonas* 歸屬於同一科 (*Pseudomonaceae*)。
- (2)可用引子 AzA (F+R)所放大之菌落,經定序分析後的結果顯示,圖四十五中的 C06 與 *Agrobacterium* 及 NCBI 上之 *Azotobacter* 序列(AY353708)親緣關係較為相近,故推測 NCBI 上 AY353708 序列應被歸類於 *Agrobacterium*。

## 肆、結論與未來展望

### 一、結論：

#### (一) *Azotobacter* 的分離及培養部分：

1. 主要可培養出 *Azotobacter* 和 *Azomonas* 兩屬之菌種，且 *Azomonas* 可培養的族群比例明顯大於 *Azotobacter*，約為 2.4 倍(參照表 1)。
2. 非固氮細菌或共生固氮菌確實會與單棲固氮細菌 *Azotobacter* 共生，生長於缺氮的培養基上，且其菌落型態近似於 *Azotobacter*。
3. 在使用 FISH 探討其族群比例時，發現專一性探針的雜合效果不佳，可能與目標菌種之 16s rRNA 二級結構有關。

#### (二) 親緣關係探討部分：

1. NCBI 上原命名為 *Azotobacter chroocum* (AY353708) 的基因序列應被歸類於 *Agrobacterium*。
2. *Azomonas* 可在缺氮的培養基上生長，可知此菌具固氮能力，支持 *Azotobacter* 及 *Azomonas* 應單獨分類為另一科 (*Azotobacteraceae*) 而不與非固氮菌類 *Pseudomonas* 同一科 (*Pseudomonaceae*) 的說法。

### 二、未來展望

1. 未來將考慮 16s rRNA 的二級結構來設計探針，並完成混雜菌落中單棲固氮菌與其他細菌比例的探討。
2. 發展我們的 *Azotobacter* 引子成為此屬菌種的標準專一性引子。
3. 探討非固氮菌類與固氮菌類的共生關係與氮源的利用方式。

## 伍、參考文獻及附錄

### 一、參考文獻

- (一) 苔莉 編著。(1992)。微生物學實驗。藝軒圖書出版社。  
p. 76-79。
- (二) ARB software (<http://www.arb-home.de>)
- (三) *Azotobacter vinelandii* genome project  
(<http://www.azotobacter.org/>)
- (四) Environmental Project Nitrogen Fixing Bacteria  
([http://www.wou.edu/las/natsci\\_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/nitrogen.html](http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/nitrogen.html))
- (五) NCBI on line database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- (六) Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)
- (七) The Prokaryotes (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB>)
- (八) Aquilanti, L., Mannazzu, I., Papa, R., Cavalca, L. and Clementi, F. (2004). Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **57**: 197-206.
- (九) Aquilanti, L., Favilli, F. and Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1475-1483.
- (十) Behrens, S., Ruhland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Bernhard, S-M. I., Fuchs, M. and Amann, R. (2002). *In situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domain *Bateria*, *Archaea*, and *Eucarya* to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1748-1758.



步驟：

1. 將取來的土壤放入紙碗內，深度約為 1~2 inches。
2. 將 solutionA 與 B 以 1:1 的方式加入碗內，並蓋過土壤高度約 1cm。
3. 用鋁箔紙將碗封好(以避免藻類生長)。
4. 在室溫下培養 4 至 7 天(此時會觀察到表面浮起一層薄膜, 此即為 Azotobacter 所生長而成, 千萬不可把膜弄破)。
5. 將薄膜挑起, 放到培養基上(配方為  $250\text{ ml A} + 250\text{ ml B} + 7.5\text{ g agar}$ )。
6. 在室溫下培養 1 至 3 天。

## (二) 顯微螢光原位雜交(FISH)實驗流程與方法

### Fixation of cells for FISH (for gram negatives)

1. Use toothpick to pick up one colony into 100 ul 4% pfa fixation.  
(sample size can be adjusted to suit , good if cells are in the range of 20-30 cells/ view)
2. Pellet cells as before and decant for 5 min. Wash cells (use pipet to resuspend) in PBS and pellet again for 5 min.
3. Resuspend cells into 50 ul PBS to concentration of  $10^8$ - $10^9$  cells/ml and add 50 ul ice cold ethanol and mix. Spin down and centrifuge briefly.
4. Fixed cells can be stored at 4°C for several months (possibly years). Cells are ready to be spotted onto slides for FISH.

### Clean slides

1. Clean slides by soaking in ethanolic KOH (or NaOH) for 1 hour (95% ethanol, 10% KOH (or NaOH), this is difficult to get into solution, may have to add more water or even soak in warm detergent for 1 h to a cleaning solution).
2. Rinse slides well in water and dry.

### Application of cells to slides

1. Spread 3-5 ul fixed cells to the gelatin coated slides, allow smear to air dry for 15 min.
2. Dehydrate smears by immersing slides into a series of

solutions of 50%, then 80% and then 90% ethanol, for 3 min in each.

3. Slides can be stored at room temp indefinitely.

### Hybridisation on slides

1. prepare 2 ml of hybridization buffer according to required stringency (% formamide).
2. For each smear prepared on the slides add 8 ul of hybridization buffer.
3. Add 1 ul of labeled probe (10-50 ng/ul will be fine).
4. Transfer slide to the hybridization chamber and incubate at the hybridization temperature (46°C) for 2 h.

### Wash step

1. Remove slide from chamber, and rinse hybridization buffer from slide with small amount of wash buffer at 48°C, (discard hybridization buffer containing formamide appropriately).
2. Immerse slide in wash buffer of appropriate stringency at 48°C for 15 min.
3. Rinse by immersing slide in distilled water, shake off excess water and dry slide immediately.
4. slide can be stored at 4°C until use.

### Counter Stain, DAPI

1. following *in situ* hybridization add about 0.1-5 ul DAPI solution (0.33 ug/ml in water) to smear,

incubate at room temperature for 5-10 min, wash off and dry slide.

### View slide

1. Mount the slide with AF1 and coverslip. Squeeze out excess AF1 and blot slide clean, take care of AF1 (toxic fumes).
2. Add non-fluorescent emersion oil (or not) and view with epifluorescent microscope.

### Preparation of Hybridisation Buffer (stringency of 25% formamide)

To a 2ml tube add:

- 40 ul 1M TRIS/HCl pH8.0
- 2 ul 10% SDS
- 360 ul 5M NaCl
- 500 ul formamide
- 1098 ul MQ water

### Preparation of Washing Buffer (stringency of 25% formamide)

To prepare in a 50 ml Falcon tube:

- To about 40 ml of MQ water add
- 50 ul 10 % SDS
- 1 ml 1M TRIS/HCl pH8.0
- 1490 ul 5M NaCl
- make up to 50 ml with MQ water

### (三) PCR 試驗過程

1. 分別使用 AzA(F+R)和 AzB(F+R)兩組 primer 進行 16S rDNA 片段

之夾取，作為初步 AB 組菌之分類：

PCR condition:

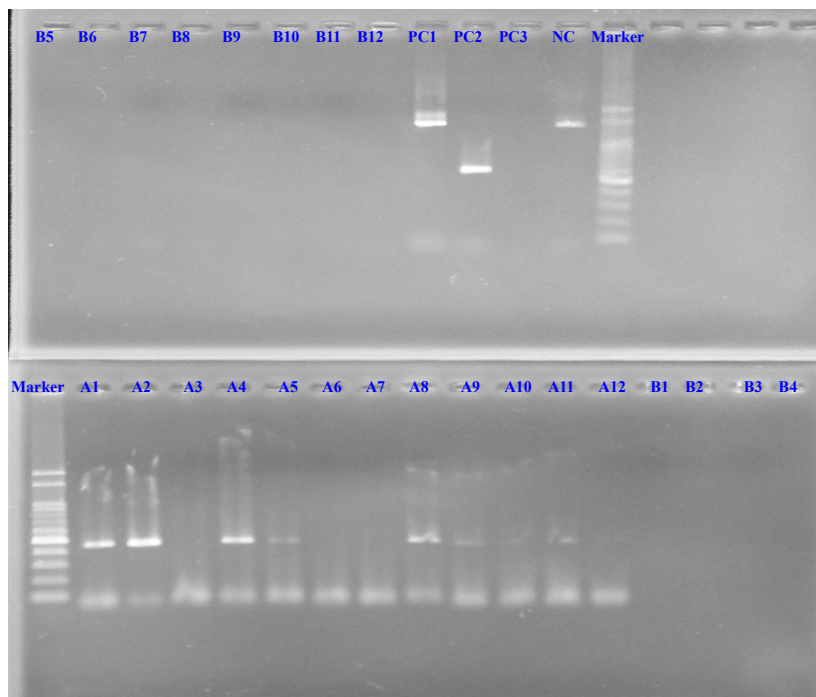
94°C 5min →  $\left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30\text{sec} \\ 52^{\circ}\text{C} \quad 45\text{sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 60\text{sec} \end{array} \right\} (30 \text{ cycles}) \rightarrow 72^{\circ}\text{C} 10\text{min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C}$

代碼	DNA	Primer(F)	Primer(R)
A1-A12	Clone1~12	AzA	AzA
B1-B12	Clone1~12	AzB	AzB
PC1	Soil DNA	Universal primer	Universal primer
PC2	Clone1	Universal primer	AzA
PC3	Clone1	Universal primer	AzB
NC	ddH <sub>2</sub> O	Universal primer	Universal primer

PC: positive control , NC: negative control

Universal primer: Universal primer (27f + 1492r) : 可夾出任何細菌片段並作為對照組的引子。

反應結果：



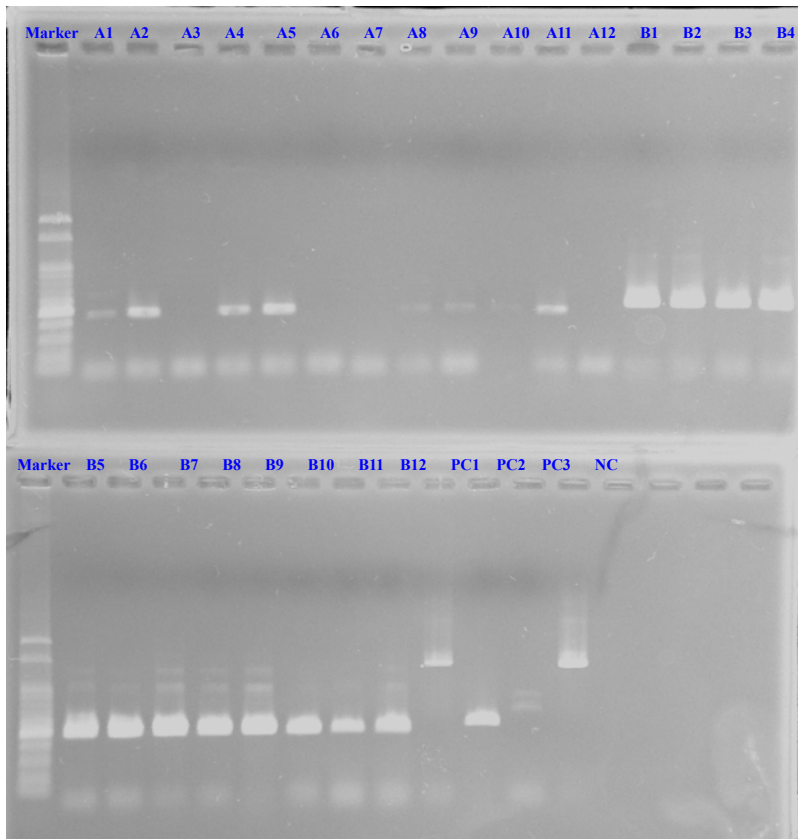
(圖一)

2. 更換新的 primerB 與滅菌之二次水後重新測試 AzA 及 AzB 引子  
之實驗。

PCR condition:

94°C 30sec }  
94°C 5min → 52°C 45sec } (30 cycles) → 72°C 10min → 4°C  
72°C 60sec }

反應結果：



(圖二)

### 3. 以 gradient PCR 處理

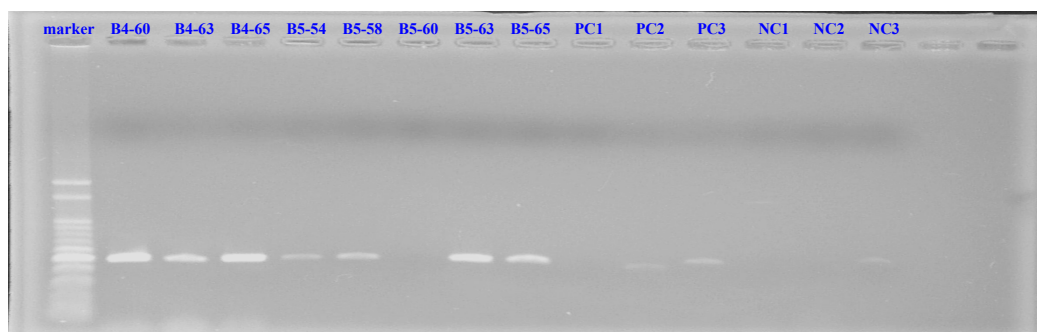
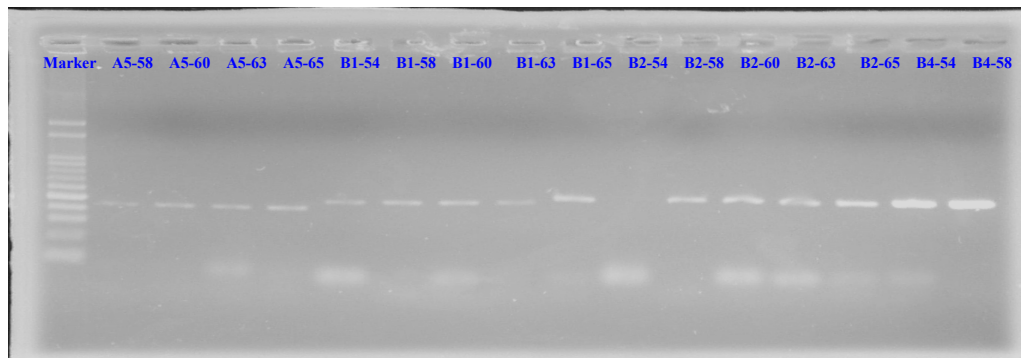
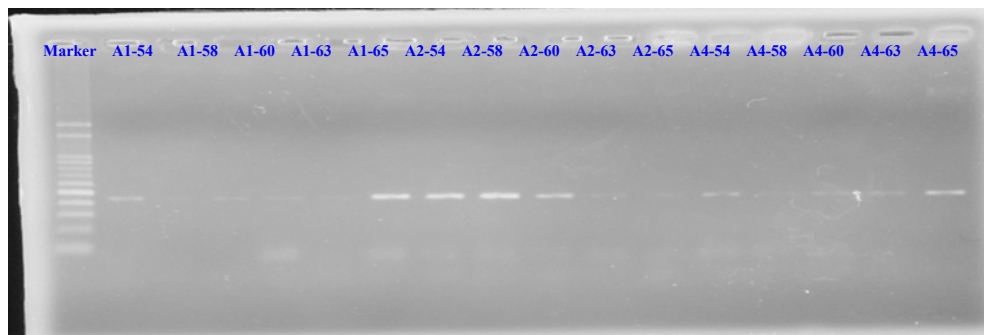
PCR condition:

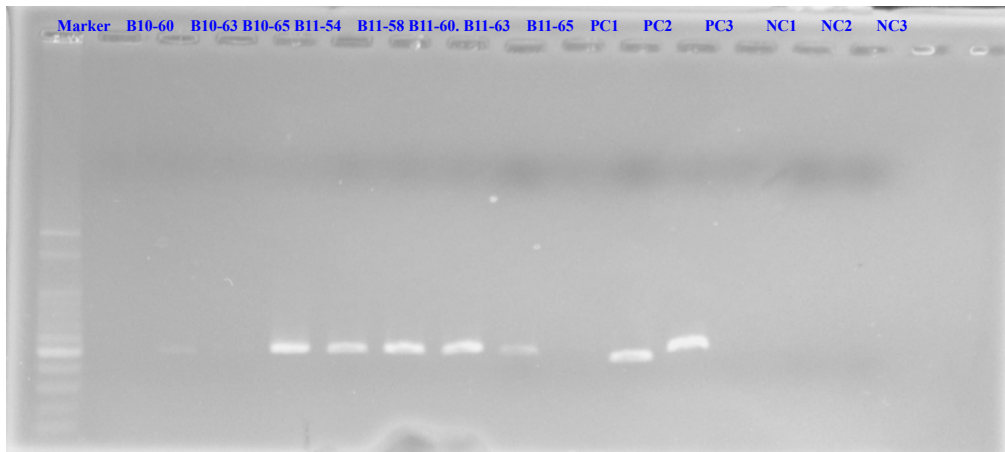
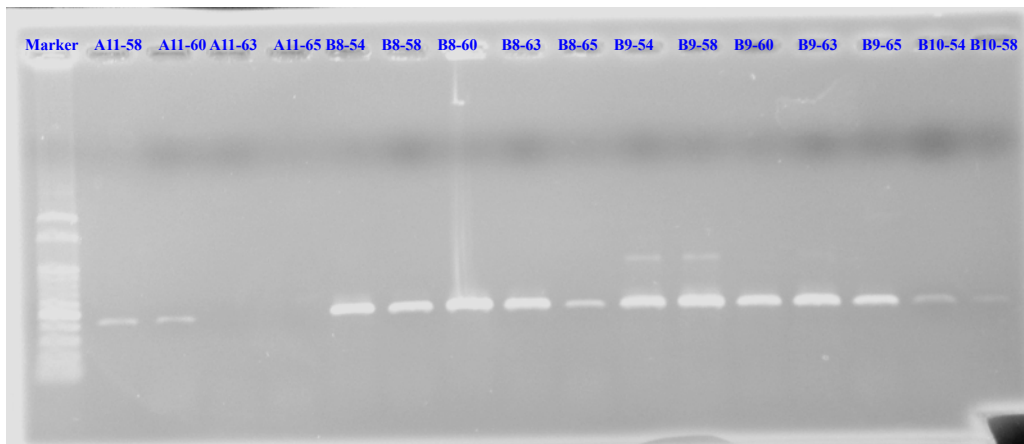
94°C	5min	→	52, 54, 58, 60, 63, 65°C	45sec	} (25 cycles) → 72°C 10min → 4°C ∞
94°C			72°C	60sec	
52°C					

52°C: PC1 PC2 PC3 NC1 NC2 NC3

字母 A 為以 primerA 夾取之片段，B 為 primerB 夾取之片段，第一個數字是 clone 的編號，第二個數字代表 54, 58, 60, 63, 65 的一個溫度，以 clone No. 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 等八個菌株做溫度梯度 PCR (gradient PCR) 反應。

反應結果：





(圖三)

[結果] 每一 clone 依溫度由高至低排下，出現亮帶（有產物）

為”+”，反之為”-”。

Clone No.	編號及溫度	Primer A 之結果	Primer B 之結果	討論
1	1-54	+	+	Clone 1 PCR 溫度超過 58 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	1-58	-	+	
	1-60	-	+	
	1-63	-	+	
	1-65	-	+	
2	2-54	+	-	Clone2 本實驗無法有效分辨出 primer A, B 的差異
	2-58	+	+	
	2-60	+	+	
	2-63	+	+	
	2-65	-	+	
4	4-54	+	+	Clone4 的 PCR 溫度超過 60 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	4-58	+	+	
	4-60	-	+	
	4-63	-	+	
	4-65	-	+	
5	5-54	+	+	Clone5 本實驗無法有效分辨出 primer A, B 的差異
	5-58	+	+	
	5-60	+	-	
	5-63	+	+	
	5-65	+	+	
8	8-54	+	+	Clone8 的 PCR 溫度超過 60 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	8-58	+	+	
	8-60	-	+	
	8-63	-	+	
	8-65	-	+	
9	9-54	+	+	Clone9 的 PCR 溫度超過 60 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	9-58	+	+	
	9-60	-	+	
	9-63	-	+	
	9-65	-	+	

10	10-54	+	+	Clone10 的 PCR 溫度超過 63 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	10-58	+	+	
	10-60	+	-	
	10-63	-	-	
	10-65	-	-	
11	11-54	+	+	Clone11 的 PCR 溫度超過 63 度即可提高 primer A 的專一性而分辨出差異
	11-58	+	+	
	11-60	+	+	
	11-63	-	+	
	11-65	-	+	

(四) 以廣泛性引子(Universal primer)放大混雜菌落之定序結果

>348F

ATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT  
GGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTGA  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCCAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>303F

ATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGA  
TGTAAGACAGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTTTGTGACTGCATCG  
CTGGAGTGCGGCAGAGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGC  
GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACT  
GGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA  
TGATGTGGTTTAATTCGATGC

>243F

ATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGA  
TGTAAGACAGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTTTGTGACTGCATCG  
CTGGAGTGCGGCAGAGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGC  
GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACT  
GGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATG  
ATGTGGTTTATTTCGATGC

>318F

ATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT  
GGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTGA  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCCAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCACTA

GCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>062F

ATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTC  
AGCAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTACTGAG  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>016F

ATACGAAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGGCAT  
TTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTC  
TTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTA  
GCCGTCCGGCAGTTGACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCGCTGGGG  
AGTACGGTCCGAAGATTAAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
CATGTGGTTTAATTCGAAGC

>123F

ATACGAAGGGGGCAGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACTG  
TTTAGTCAGAGGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAATTCCTTTGATACTGGCAGTC  
TTGAGTACGGAAGAGGTATGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCG  
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGTCCGTTACTGACGCTGAGGCTCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA  
GTTGTCCGCATGCATGCATGTCGGTACGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCGCTGGGG  
AGTACGGTCCGAAGATTAAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
CATGTGGTTTAATTCGAAGC

>137F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTT  
GCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGA  
CTAGGGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGTGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGCTCCTTGAGAGCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>001F

ATACGAAGGGGGCAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGGCATT  
TAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCT  
TGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAG  
CCGTCCGGCAGTTGACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCGCTGGGGA  
GTACGGTCCGAAGATTAAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC  
ATGTGGTTTAATTCGAAGC

>116F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGCCGGTTTG  
CTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCGGCTGAC  
TAGAGTACGGTAGAGGTGTGGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAA  
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCG  
TGTTGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC  
CGTTGGGCTCCTTGAGAGCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC  
ATGTGGTTTAATTCGAAGC

>197F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATA  
TTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCCGAGCTCAACTGCGGAACTGCCTTTGATACTGGGTAT  
CTTGAGTATGGAAGAGGTTAGTGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTC  
GCAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTAACTGGTCCATAACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTT  
AGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>213F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCC  
GTTTAGTCAGACGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCGTTTGATACTGGCGGG  
CTTGAGGACCGGAGAGGATAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTC  
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGTCCGTTACTGACGCTGAGGCTCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT  
AGTTGTTCGGCATGCATGCATGTTCGGTACGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>091F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTC  
AGCAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACACTGAG  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
AGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>152F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATA  
TTTAAGTCAGGGGGTAAATCCCCGAGCTCAACTGCGGAACTGCCTTTGATACTGGGTA  
TCTTGAGTATGGAAGAGGTTAGTGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT  
CGCAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTAACTGGTCCATAACTGACGCTGAGGTGCGTA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGT  
TAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGG  
GGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
AGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>289F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT  
GGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTGA  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCATAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
AGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>167F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTT  
GCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGA  
CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGCTCCTTGAGAGCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCTGAAGC

>227F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAGAGCGCACGTAGGCGGATT  
GATAAGTCAGGGGGTAAATCCCCGAGGCTCAACCTCGGAACTGCCTTTGATACTGTTAG  
TCTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT  
CGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCCCGATACTGACGCTGAGGTGCGAA

AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAAGC  
CAGCCGTTGGGTAGCTTGCTATTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCCTGG  
GGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>031F

ATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAAGTGGTTC  
AGTAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACACTACTGAG  
CTAGAGTACGGTAGAGGTTAGTGGAAATTCCTGTGTACGGTGAATGCGTAGATATAGG  
AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTA  
GCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACAGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>076F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTC  
AGCAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACACTACTGAG  
CTAGAGTACGGTAGAGGTTAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTAG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGC

>046F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGCA  
TTTAAGTCAGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTC  
TTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTA  
GCCGTCGGGCAGTTGACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCGCTGGGG  
AGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
CATGTGGTTTAATTCGAAGC

>182F

ATACGAAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTT  
GCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACACTGGCTGA  
CTAGAGTACGGTAGAGGTTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACT  
AGCCGTTGGGCTCCTTGAGAGCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAGAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTATTCGAAGC

>335F

ATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATA  
TTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTCGGAACTGCCTTTGATACTGGGTAT  
CTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTC  
GCAGGAACACCAGTGACGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTT  
AGCCGTCGGGCAGTGTACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCGCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCGAAGC

### (五) 純種菌落行第一次定序之分析結果

DNA 定序結果：

>B1-65：

TAACAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC

GATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCT  
GTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT  
GCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG  
CGCGGTAGGCGGTTTGCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA ACTGC  
CTCCAAA ACTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA

>B2-65:

AGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATC  
CGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG  
CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAAATTGTA AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGTA  
GGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAYATACTGGGCGTAAAGCG  
CGCGTAGGCGGTTATGCTAAGTTGGCAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA ACTGC  
CTCCAAA ACTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATAGGAAGG

>B4-58:

ACTGGTGTTCCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCT  
CTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTCC CAGGTTGAGCCCCGGGGCTTTC  
ACCTCCA ACTTAGCAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCT  
TGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCG  
TAACGTCAAAA CTGCAGGATATTAGCCTACAGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTA  
CAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTC  
CAATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGA  
CTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAA  
CTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGTTAG

>B5-63:

ACTGGTGTTCCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCT  
CTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTCC CAGGTTGAGCCCCGGGGCTTTC  
ACCTCCA ACTTAGCAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCT  
TGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCG  
TAACGTCAAAA CTGCAGGATATTAGCCTACAGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTA  
CAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTC  
CAATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGA  
CTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAA  
CTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGTTAG

>A9-54:

ATAGCTCCGGGAA ACTGGAATTAATACCGTATGTGCCCTACGGGGAAAGATTTATCGG  
CAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC  
GATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT  
GCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTA AAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGA  
CGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGG  
GGGCTAGCGTTGTTTCGGAA TACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGCATTTAAGTCA  
GGGGGTGAAATCCAGAGCTCAACTCTGGA ACTGCCT

>B8-60, B8-63:

GTGGTGAGGTCAAGGCTCACAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAG  
TCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  
GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG  
TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTA  
CCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCA

AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTGCTAAGTTGGAGGT  
GAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAG  
AGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG

>B9-65:

GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTC  
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA  
GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA  
GGGCTGTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAAC  
TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG  
TAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTGCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGA  
ACTGCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGT

>B11-63., B11-65:

AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACG  
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT  
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG  
GAAGGGCTAGTAAGCTTAATACTCCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC  
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA  
CCTGGGAACTGCCTCCATAACTGGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCC  
CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA

#### (六) 純種菌落行第二次定序分析之結果

>F2:

CTCCTCACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCA  
CCTAAGGCGACGATCCGTA AAAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGACACTCG  
AGACACGGTCCATGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTT  
AAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATA  
AGCACCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGG  
GCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAAACCTGACTGACTAAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAA  
TTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F3:

TCCCCACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC  
CAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGACTGAGACACG  
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT  
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG  
GAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCT  
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG  
GGAACCTGCATTCAAAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F9:

CACGCTAACAGATGAGCCTAGAGGTCCGATAAGCTGAGTTGGTGAGAATGGCTACCAAG  
GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTC  
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA  
GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA  
GGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAAC  
TCTGTGCCACAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT  
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA  
CTGCATTCAAAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGC

GGTGAAATGCGTAATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F13:

CTCCCACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAGCTATGGTGAGGTAATGGCTCACCAA  
GGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGT  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC  
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA  
AGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAA  
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  
GTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG  
AACTGCATTCAAACTGACTGACTAAGTATGGTAAGGGTGGTGAATTTCTGTGTACG  
GTGAAATGCGTAATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F14:

AGAAGCACACCTAGCATCGGATAAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGAC  
GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA  
TTAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG  
CGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC  
ATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTG  
AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGGCGA

>F19:

CTCCTCACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACA  
AGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG  
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC  
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG  
AATGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCT  
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG  
GGAAGTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGG

>F48:

CACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAAGCTAGTTGGTGATGTTTTAATGGCTACCA  
AGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACCG  
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA  
TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGA  
GGAAGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC  
TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT  
GGGAAGTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTG  
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGG

>F79:

CACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATAAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACAAAGGC  
GACGATCCGGAATGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC  
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG  
CTGTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA  
AGCGCGCTAGGCGGTTTGTAAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGT  
GCCTCAAACTGGCTGACTAGAGTACGGTAAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA

>F83:

TTCTCACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCTA  
CCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGAC  
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAAGCC  
TGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG  
GGAGGAAGGGCTGTAAGCGAATACCTTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC  
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC  
TGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGGTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC  
CTGGGAACTGCATCCAAAACCTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCT  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F86:

CTCTTACGCTAACAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAAAGGCTCAC  
CAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACAC  
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAAGCCTGA  
TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGA  
GGAAGGGCTGTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCAGGC  
TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTGCTAAGTTGGAGGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT  
GGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGT  
GTAGCGGTGAAATGCGTAATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG

>F87:

TCCTCCCCGCTAAAGAGCCTAGGTCCGATAAGCTAGTGGTGGAGGTAAAGGCCCACCAA  
GGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGT  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAAGCCTGATCC  
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA  
AGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCAGGCTAA  
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC  
GTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG  
AACTGCATTCCAAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTA  
CGGTTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA

>F126:

ACTATTGGTGGGGTCAAGGTCAAGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCA  
GTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
GGACAATGGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCCGATT  
GTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGTAAAGCGAATACCTTGCAGTTTTGACGTT  
ACCGACAGAATAAGCACCAGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGC  
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGGTAAGTTGGATG  
TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGCCTGACTAGAGTACGGTA  
GAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG  
TGGCG

## 評語

1. 能設計實驗培養菌株，並依據 16srRNA 之序列及基因庫資料比對將菌株分類。
2. 表達清晰，邏輯完整。
3. 建議能改善 PCR 反應條件以減分定序之誤差，並能繼續深入探討固氮菌之生理功能。