

# 利用土壤微生物相分析技術 找尋作物根圈益菌 - 以洛神葵為例

文 / 圖 王誌偉



圖 1. 洛神葵根圈土壤之田間採集情形，將植株拔出後，以毛刷將附著於根表面之土壤刷下，之後將土壤集中於塑膠試管保存。

## 一、前言

根據 Curtis 等人於 2002 年報告估計，土壤可能含有超過 4 百萬種微生物，Gans 等人於 2005 年則預測 1 公克土壤有超過 1 百萬種不同的細菌。然而，這些微生物有超過 99% 都是無法人工培養的，惟隨著科技的發展，我們卻可以直接萃取土壤中微生物的 DNA，進一步分析微生物的種類與比例。多個研究指出，土壤微生物群對植物有許多益處，包括固氮作用、溶磷、產生植物生長賀爾蒙、防治病害與幫助植物忍受各種逆境等。本研究以臺東轄區特色作物洛神葵為例，藉由比較健康與罹染萎凋病之洛神葵根圈細菌種類，瞭解與洛神葵消長有關的細菌群相，期望對未來病害防治管理資材開發有所助益。

## 二、步驟與方法

### 樣本採集

為了增加樣本的數目以達到統計上的意義，本研究之土壤樣本採集自 3 個獨立的洛神葵田區，包括本場、知本與太麻里共 3 個地點，每塊田區分別採集 10 棵健康植株與 10 棵罹染萎凋病病株之根圈土壤（圖 1），共計 60 個土壤樣本以進行後續實驗。

### 土壤 DNA 萃取

田間採集之土壤樣本先放置於冰桶以冰塊保冷，帶回實驗室後放置於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。土壤樣品以 Qiagen 公司出產之強力土壤 DNA 抽取試藥組 (DNeasy power soil kit) 進行 DNA 萃取，萃取後之土壤 DNA 進行瓊脂膠體電泳分析（如圖 2），可看到一個明顯高分子量條帶。

### 細菌 16S rRNA 基因變異區段 DNA 增幅

每種細菌都有其獨特的 16S rRNA 基因序列，可以視為細菌的身分證，該基因共有 9 個變異區間，依序編號為 V1-V9，總長

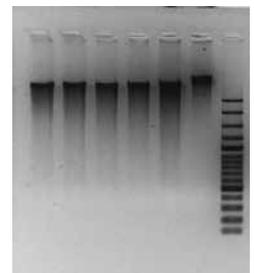


圖 2. 經萃取後之土壤 DNA 進行瓊脂膠體電泳分析結果，可以看到一個高分子量明顯的條帶。

度約 1,600 鹼基對 (base pair, bp)，因為常用的次世代定序儀器，例如本研究所使用的 Illumina MiSeq，只能讀取長度 500 bp 以下的序列，因此我們針對 V6-V8 三個變異區間來進行 PCR 增幅與分析，首先使用 U968F (5' -AACGCGAAGAACCTTAC-3') 與 U1391R (5' -ACGGGCGGTGWGTRC-3') 引子對進行 PCR 增幅反應，將土壤中細菌之身分識別碼 DNA 片段專一性增幅，隨後片段再經過純化與標定等步驟，即可進行次世代定序反應。

### 次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 與資料分析

上述製備好的 DNA 樣本必須通過嚴格品質確認，才可以進行精密的 NGS 反應，例如 DNA 片段必須是單一長度、A260/A280 紫外光吸光比值大於 1.8 與濃度必須超過 5 ng/ul 等條件 (圖 3)。簡單來說，利用此技術可以將樣本 DNA 一條一條的進行解序，因此可以得到上述土壤樣本中每個細菌之身分識別碼，其後再經定序反應，並將資料進行生物資訊分析，即可了解健康洛神葵根圈特有的細菌種類有哪些。

### 土壤有益微生物菌種分離與收集

為了未來能利用上述資訊重建一個健康土壤的微生物相，本場正在建立微

生物菌種庫，將採集自臺東地區的土壤樣本懸浮於無菌水中，取適量體積塗佈於培養基，待菌落形成後 (圖 4) 再進一步進行純化與保存，若經生物檢定等方法評估為有益之菌株，則會進行 16S rRNA 基因定序以初步鑑定該細菌菌種。表一為部分本場收集到之土壤有益細菌菌種與其可能之功能。

### 三、結語

Chang H.S. 等人於 2017 年研究比較作物高產與低產之土壤微生物相，發現高產之土壤有較多的 *Bradyrhizodium* 和 *Gammaproteobacteria* 這兩類細菌，推測高產可能與氮素源利用相關的微生物較多有關。國際上，在農業領域利用微生物相分析技術之相關研究越來越多，相信一定會累積成爆炸性的資訊，如何應用這些資訊，並且自土壤中篩選出有用的微生物，將是未來的一大挑戰。

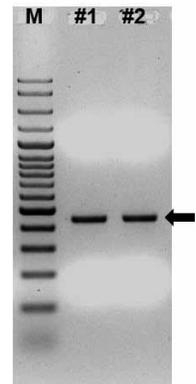


圖 3. 進行精密 NGS 反應之 DNA 樣品，如黑色箭號所示，為單一長度片段的條帶。



圖 4. 塗佈於培養基之土壤懸浮液形成大小小型態不一的菌落

表 1. 本場收集之土壤有益微生物菌種與其可能之功能

菌株代號	16S rRNA 序列比對結果	可能之功能
MI-69	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	分解土壤中蛋白質、木質素等養分
TD-42	<i>Bacillus megaterium</i>	幫助土壤有機質分解等
TD-49	<i>Streptomyces flavomacrosporus</i>	幾丁質分解等
TD-55	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	與樹豆共生進行固氮作用
SOI-138	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	對炭疽病等病原真菌生長拮抗
SOI-347	<i>Pseudomonas putida</i>	對疫病菌生長拮抗