

溶磷菌與高磷需求作物之相容性研究

張鈞喆¹、賴威安²、楊秋忠³、沈佛亭^{4,*}

摘要

本研究針對菌株是否可在根表面拓殖特性進行探討，篩選具移動性、生成 IAA 與 ACC 脫氨酶的溶磷菌株，於甘藍菜、番茄、菠菜種子進行生物分析及三角瓶栽試驗，瞭解菌株對種子發芽與幼苗生長的影響，並以螢光原位雜合與純系分離株分子指紋分析確認接種菌株在植株根系的分布評估相容性，另於溫室中以盆栽試驗探討接種菌株對三種作物生長的影響並評估菌株在微棲地環境中的適應性。測試溶磷菌配合 3 種作物的種子生物分析與三角瓶栽試驗，結果顯示其中 2 株菌可提高瓶栽甘藍菜地上部乾重、4 株菌可提高瓶栽番茄地上部乾重、3 株菌可提高瓶栽菠菜地上部乾重，利用純系分離株 BOX-PCR 分子指紋分析與 16S rRNA 基因螢光探針 EUB338 之雜合技術均顯示菌株於根系生長 30 天後仍可存活於根表面。經相容性測試篩選出之菌株進行盆栽試驗，顯示可提高盆栽甘藍菜生質量具適應性之菌種為 *Bacillus marisflavi* 與 *Pseudoarthrobacter niigatensis*；可提高盆栽番茄生質量具適應性之菌種為 *Brevundimonas albigilva* 與 *Gordonia hongkongensis*；可提高盆栽菠菜生質量具適應性之菌種為 *Bacillus xiamenensis* 與 *Paraburkholderia sacchari*。

關鍵詞：微生物肥料、溶磷菌、甘藍、番茄、菠菜、基因螢光探針。

前言

微生物肥料於 2010 年納入肥料管理法規範後，迄今市面商品二十餘支，為可配合化學肥料與有機質肥料使用的新興農業資材。然而因微生物肥料內含活性菌

* 通訊作者：ftshen@dragon.nchu.edu.tw

¹ 國立中興大學土壤環境科學系研究助理。台灣 台中市。

² 國立中興大學土壤環境科學系博士後研究員。台灣 台中市。

³ 中央研究院院士、國立中興大學土壤環境科學系教授。台灣 台中市。

⁴ 國立中興大學土壤環境科學系副教授。台灣 台中市。

種，需依賴其固氮、溶磷、溶鉀活性的表現方能發揮效果，不同於添加化學肥料或有機質肥料成分提供作物生長所需養分，菌株能否適應作物根圈或植體微棲地環境並穩定存在，將直接影響微生物肥料施用的效果，其中菌株與作物的相容性更是微生物接種能否成功的關鍵，但少有研究探討。土壤有益微生物的特性研究依賴在實驗室培養條件下進行的分析，雖然透過培養可評估其促進作物生長的潛力，但往往因現地環境與實驗室條件不同，導致在實驗室測試功能優良的微生物進入盆栽或田間後表現不如預期，其中了解微生物接種後在作物根表面的拓殖與內生特性是重要關鍵。

材料與方法

一、供試溶磷菌株篩選

自實驗室溶磷菌種庫中的分離株，經測定溶磷 (Nautiyal et al., 2000)，挑選活性較佳的菌株，進一步鑑定(Willems and Collins, 1993)，並且測定菌株的移動性、IAA 與 ACC 脫氨酶生成能力，挑選表現較佳的菌株進行後續試驗。

- (一) 將供試菌株接種於含不同濃度洋菜的肉汁平板培養基，觀察菌落擴散樣式得知菌株是否具有移動性(Rashid and Kornberg, 2000)。
- (二) 將供試菌株接種於含色胺酸的肉汁培養基，待培養後利用比色法測定培養液中的 IAA 含量(Gordon and Weber, 1951; Patten and Glick, 2002)，篩選可生成 IAA 的溶磷菌。
- (三) 另以 ACC 作為培養基中的氮源，接種菌株培養後利用比色法測定培養液中的 α -酮丁酸含量得知菌株的 ACC 脫氨酶活性(Penrose and Glick, 2003)。

二、螢光原位雜合與純系分離株分子指紋分析技術建立

為追蹤接種菌株是否存在於根圈或植體表面，將建立螢光原位雜合與純系分離株分子指紋分析技術。

- (一) 針對目標菌株設計探針並以螢光標定後，考慮探針的偵測專一性與靈敏度進行雜合反應條件最佳化。

- (二) 建立各菌株的分子指紋，以 BOX-PCR 針對細菌短重複片段進行增殖反應，再利用電泳分析得知不同菌株的基因型圖譜(Koeuth et al., 1995)。

三、種子生物分析與三角瓶栽試驗

於生長箱中分別以種子生物分析與三角瓶栽試驗評估菌株與作物的相容性。

- (一) 先將已表面消毒的種子置於含菌液的濾紙上，待種子發芽 3-7 d 後測定發芽率、胚根與胚莖長 (Lai et al., 2008)，篩選可促進種子發芽的菌株進行後續試驗。
- (二) 瓶栽試驗中，將接菌後的種子置於盛裝蛭石並添加植物養液 (Hoagland and Arnon, 1950) 的三角瓶中，於植物生長箱中培養，光照時間每日 13 小時，待幼苗生長後分別於第 10、20 與 30 d 進行生育性狀調查，另進行根部樣品的螢光原位雜合 (Assumus et al., 1995) 與純系分離株分子指紋分析，解析菌株在根圈或作物表面的拓殖特性。

四、溫室盆栽試驗

為了解菌株接種至複雜環境中對作物生長的影響與其在微棲地的適應性，於溫室中進行盆栽試驗，設計不同處理進行比較。本試驗供試土壤來源為彰化福興鄉玉米田土壤，土壤性質如表 1 所示。

- (一) 處理包括不施肥的對照組、全量化肥組、半量化肥組、半量化肥 + 磷酸三鈣 + 溶磷菌組，並以五重複進行。將接菌後的種子置於含土壤的盆栽中，待幼苗生長後每兩週進行植株生育性狀調查，並於採收時進行生質量分析。
- (二) 進行根圈、根表面菌體懸浮液的製備 (Matthyse and McMahan, 1998)，以螢光原位雜合與純系分離株分子指紋分析，解析菌株在根圈與根系表面的拓殖特性評估其在微棲地環境中的適應性。

表 1. 試驗土壤性質

pH	EC μS/cm	O.M %	N	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Zn
-----mg kg ⁻¹ -----											
7.4	497	3.41	1604.80	5636.77	8.24	400.29	96.64	548.70	246.57	8.31	3.28

結果與討論

一、供試溶磷菌株篩選

本研究測試菌株之移動能力 IAA 產生以及 ACC deaminase 活性功能以作為研究菌株根拓殖作用能力的參考與根據，表 2 為各菌株之移動能力、IAA 產生以及 ACC deaminase 活性的測試結果。

表 2. 菌株功能性比較

Strain	Motility			Production of	
	Swimming	Swarming	Twitching	IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ACC deaminase ($\text{nmol -ketobutyrate ml}^{-1}$)
<i>Arthrobacter</i> sp. OTO3C	-	-	-	58.78	1.80
<i>Arthrobacter</i> sp. OTO3D	-	-	-	28.40	9.27
<i>Arthrobacter</i> sp. OTO3E	-	-	-	35.55	6.25
<i>Arthrobacter</i> sp. OTO3G	-	-	-	49.75	0.00
<i>Aureimonas</i> sp. S-NaCl-1	-	-	-	15.89	0.00
<i>Aureimonas</i> sp. S-NaCl-3	-	-	-	14.44	0.00
<i>Aureimonas</i> sp. S-NB-5	-	-	-	0.00	4.41
<i>Aureimonas</i> sp. S-NB-8	-	-	-	13.00	0.00
<i>Bacillus</i> sp. K-NaCl-7	+	-	-	5.67	0.00
<i>Bacillus</i> sp. OTPB4	+	+	-	0.00	21.16
<i>Bacillus</i> sp. R-NB-5	-	-	-	36.33	19.92
<i>Brevundimonas</i> sp. S-NB-2	-	-	-	0.00	0.00
<i>Burkholderia</i> sp. OTSL7	-	-	-	0.00	0.00
<i>Cellulomonas</i> sp. K-NaCl-5	+	-	-	0.00	28.87
<i>Cupriavidus</i> sp. OTPB9	-	-	-	0.00	178.45
<i>Ensifer</i> sp. OTPB10	-	+	+	0.00	203.49
<i>Gordonia</i> sp. W-NaCl-3	-	-	-	0.00	0.00
<i>Kluyvera</i> sp. CTC-C5	+	+	-	70.78	123.04
<i>Microbacterium</i> sp. NAI1	-	-	-	0.00	11.58
<i>Pantoea</i> sp. CTC-P2	+	+	-	64.67	0.00
<i>Pantoea</i> sp. MYEO12	+	+	-	64.22	70.55
<i>Pseudomonas</i> sp. CTC-C2	+	-	-	25.11	7.48
<i>Pseudomonas</i> sp. CTC-C3	+	+	-	51.89	0.00
<i>Pseudomonas</i> sp. CTC-P1	+	+	-	32.22	39.74
<i>Pseudomonas</i> sp. MYEO14	+	-	-	12.00	66.18
<i>Pseudomonas</i> sp. MYET2	+	-	-	12.00	63.94
<i>Pseudomonas</i> sp. OTA1-2I	-	-	-	14.00	0.00
<i>Ralstonia</i> sp. OTSL6	+	-	-	0.00	119.57
<i>Rhizobium</i> sp. OTA1-2A	-	-	-	54.52	0.00
<i>Rhizobium</i> sp. R-NB-1(a)	-	-	+	84.78	8.94
<i>Sinomonas</i> sp. R-NB-11	-	-	-	169.56	0.00
<i>Sinomonas</i> sp. R-NB-15	-	-	-	172.00	0.00
<i>Sphingopyxis</i> sp. W-NaCl-5	-	-	-	0.89	20.71

+: 具移動性 - : 無移動性

二、種子生物分析

本研究依種子發芽生物分析結果與甘藍、番茄及菠菜相容性較好的溶磷菌株及功能性比較結果如表 3，結果顯示溶磷菌株對於作物可能具有物種選擇性，並非皆具有促進各種作物種子發芽生長之功效，有部分的專一性，其中移動能力、生產 IAA 及 ACC 之能力可能也並非唯一促進生長之因素。

三、三角瓶栽試驗

(一) 甘藍菜瓶栽試驗

將經種子發芽生物分析測試其對於甘藍菜生長促進具有潛力之 10 株溶磷菌菌株 OT03C、S-NB-8、S-NaCl-3、MYEO12、OTA1-2I、NAI-3、W-NaCl-5、K-NaCl-7、OT03D、OT03G 以瓶栽試驗測試其接種於甘藍菜種子對於植物生長的影響，經過 30 d 的生長地上部乾重經統計結果如圖 1 所示。結果顯示接種 OT03C 和 K-NaCl-7 對於甘藍菜的地上部乾重有明顯促進的效果，與未接種的處理相比較，分別提高了 65.4% 和 62.1%。其餘菌株對於甘藍菜地上部的乾重則沒有顯著促進的效果，但亦無明顯抑制生長的作用。

表 3. 種子發芽生物分析結果與三種作物相容性較佳之溶磷菌株及其功能性比較

Strain	Motility	Production of		Seed bioassay		
		IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ACC deaminase ($\text{nmol} - \text{ketobutyrate ml}^{-1}$)	Cabbage	Tomato	Spinach
<i>Arthrobacter</i> sp. OT03C	-	58.78	1.80	○	○	
<i>Arthrobacter</i> sp. OT03E	-	35.55	6.25		○	
<i>Arthrobacter</i> sp. OT03G	-	49.75	0.00	○	○	○
<i>Aureimonas</i> sp. S-NaCl-3	-	14.44	0.00	○		○
<i>Aureimonas</i> sp. S-NB-8	-	13.00	0.00	○		
<i>Bacillus</i> sp. K-NaCl-7	+	5.67	0.00	○		
<i>Bacillus</i> sp. OTPB4	+	0.00	21.16		○	○
<i>Brevundimonas</i> sp. S-NB-2	-	0.00	0.00	○	○	
<i>Cellulomonas</i> sp. K-NaCl-5	+	0.00	28.87			○
<i>Gordonia</i> sp. W-NaCl-3	-	0.00	0.00		○	○
<i>Pantoea</i> sp. MYEO-12	+	64.22	70.55	○		
<i>Pseudomonas</i> sp. OTA1-2I	-	14.00	0.00	○		○
<i>Rhizobium</i> sp. OTA1-2A	-	54.52	0.00			○
<i>Sinomonas</i> sp. R-NB-11	-	169.56	0.00	○	○	
<i>Sphingopyxis</i> sp. W-NaCl-5	-	0.89	20.71	○	○	○

Motility: + 表示具有Swimming, Swarming or Twitching能力; - 表示無移動能力; Seed bioassay: ○ 表具促進生長功效

將塗抹於 NA 培養基的根圈細菌懸浮液生長的菌落以 BOX-PCR 的反應產物，以電泳分析確認其是否與原接種菌株為同一菌株，結果如圖 2 所示，顯示所測試之根圈細菌與接種的菌株為同一菌，其中菌株的螢光原位雜合分析如圖 3 所示。

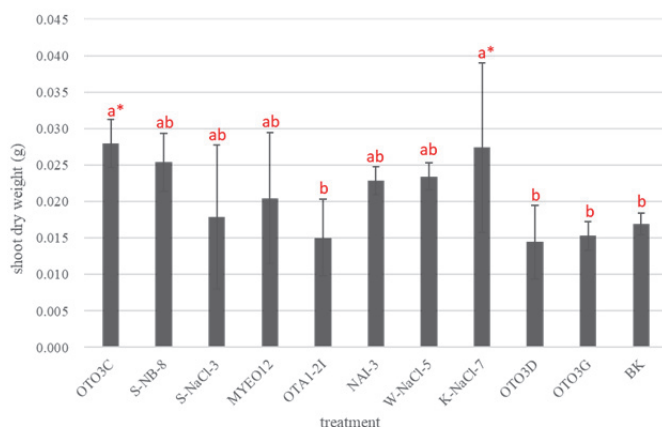


圖 1. 瓶栽試驗接種溶磷菌對於甘藍菜 30 d 生長地上部乾重

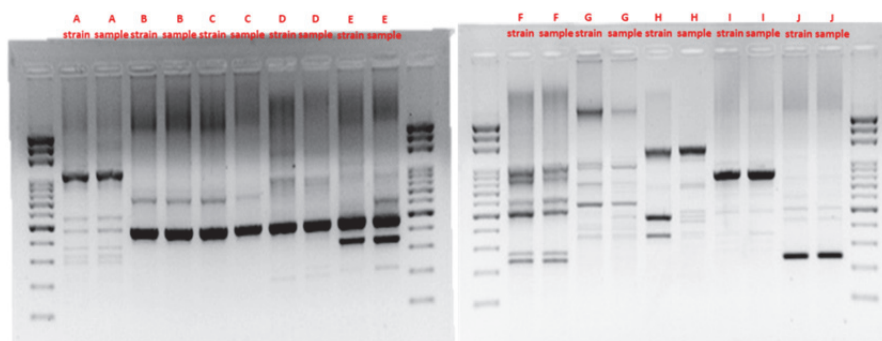


圖 2. 甘藍菜瓶栽培培養 30 d 根中回歸菌株的 BOX-PCR 指紋圖譜

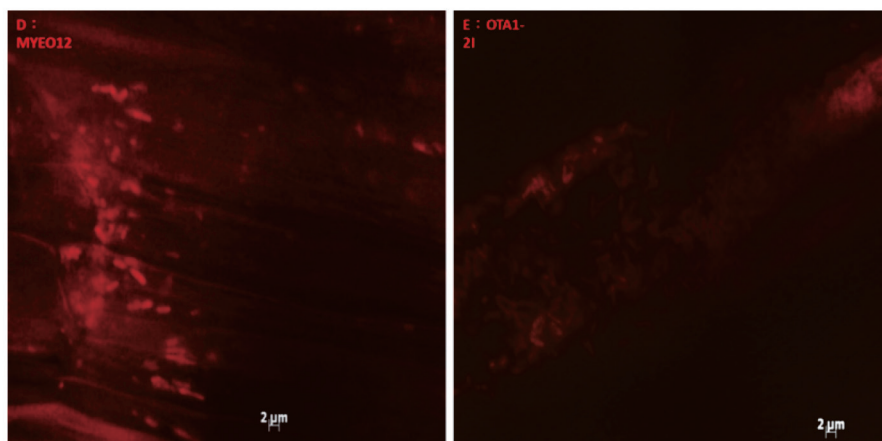


圖 3. 甘藍菜瓶栽培培養 30 d 根中回歸菌株的螢光原位雜合分析

(二) 番茄瓶栽試驗

將經種子發芽生物分析測試其對於番茄生長促進具有潛力之 10 株溶磷菌菌株 S-NB-2、R-NB-5、R-NB-11、OT03C、OT03E、OT03G、W-NaCl-3、W-NaCl-5、OTPB4、OTPB9 以瓶栽試驗測試其接種於番茄種子對於植物生長的影響，經過 30 d 的生長經統計結果如圖 4 所示。結果顯示接種 S-NB-2、W-NaCl-3、R-NB-5 及 OT03C 對於番茄地上部乾重有明顯促進的效果，與未接種的處理相比較，分別提高了 28.4 %、13.5 %、18.4 % 及 31.2 %。其餘菌株對於番茄地上部的乾重則沒有顯著促進的效果甚至產生抑制生長的作用。

將塗抹於 NA 培養基的根圈細菌懸浮液生長的菌落以 BOX-PCR 的反應產物，以電泳分析確認其是否與原接種菌株為同一菌株，結果如圖 5 所示，表示所測試之根圈細菌與接種的菌株為同一個菌株，其中菌株的螢光原位雜合分析如圖 6 所示。

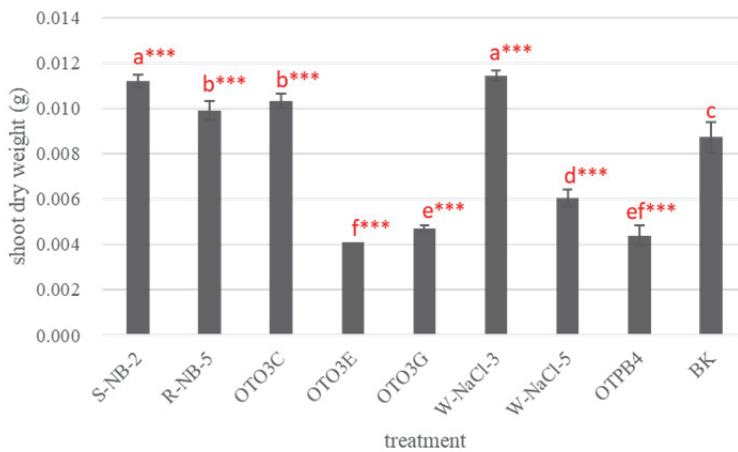


圖 4. 瓶栽試驗接種溶磷菌對於番茄 30 d 生長地上部乾重

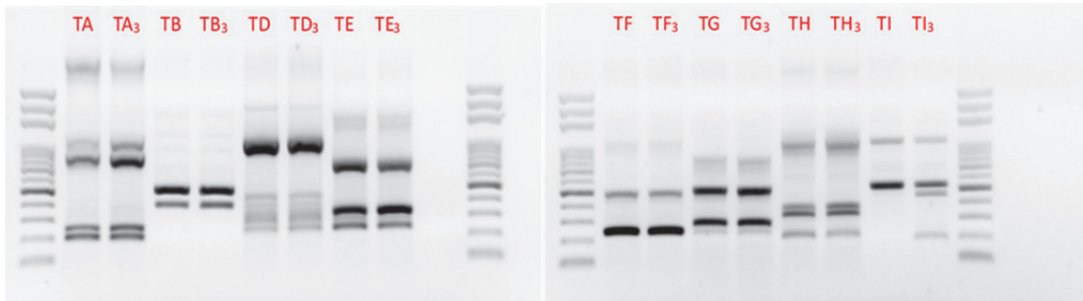


圖 5. 番茄瓶栽培 30 d 根中回歸菌株的 BOX-PCR 指紋圖譜

(三) 菠菜瓶栽試驗

將經種子發芽生物分析測試其對於番茄生長促進具有潛力之 10 株溶磷菌菌株 N13、OTPB4、OTA1-2A、OTA1-2I、S-NaCl-3、K-NaCl-5、W-NaCl-3、W-NaCl-5、OT03D、OT03G 以瓶栽試驗測試其接種於番茄種子對於植物生長的影響，經過 30 d 的生長經統計結果如圖 7 所示。結果顯示接種 N13、OTPB4 及 S-NaCl-3 對於番茄地上部乾重有明顯促進的效果，與未接種的處理相比較，分別提高了 94.8%、34.2%和 30.0%。其餘菌株對於番茄地上部的乾重則沒有顯著促進的效果。

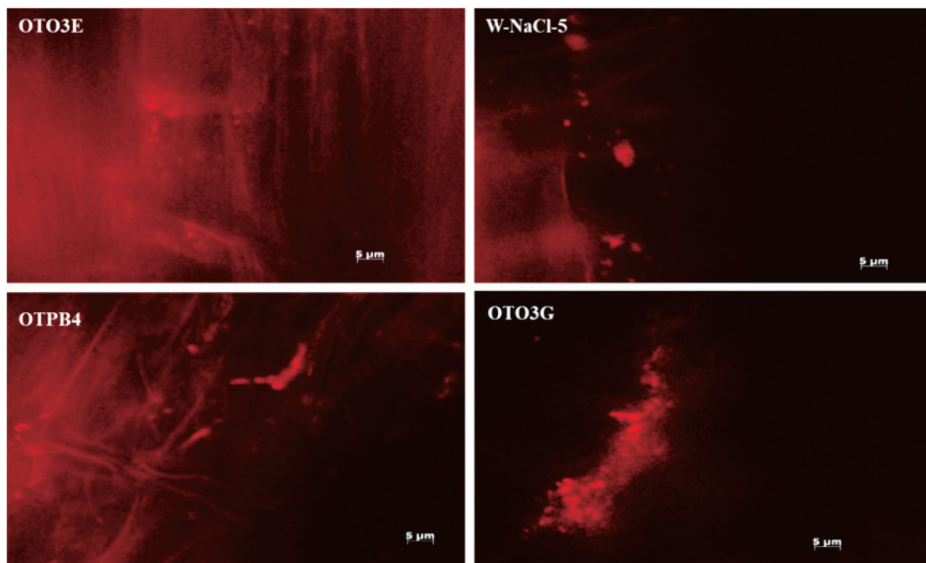


圖 6. 番茄瓶栽培培養 30 d 根中回篩菌株的螢光原位雜合分析

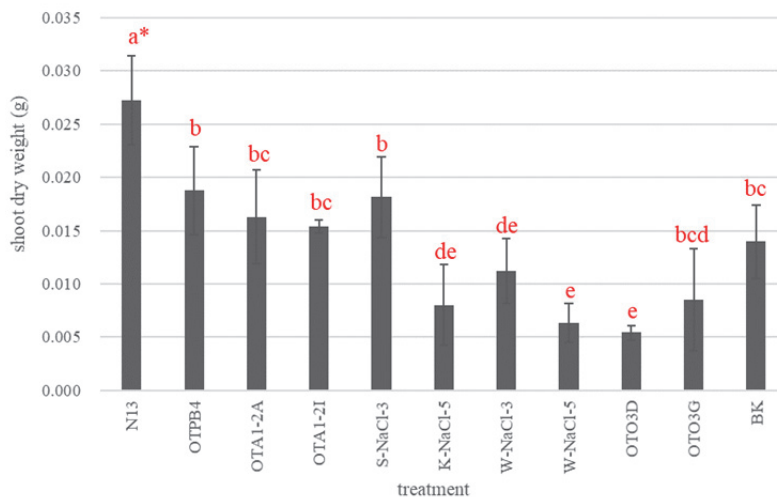


圖 7. 瓶栽試驗接種溶磷菌對於菠菜 30 d 生長地上部乾重

四、溫室盆栽試驗

(一) 甘藍菜溫室試驗

(1) 甘藍菜溫室試驗統計結果分析

甘藍菜盆栽試驗於溫室生長 60 d 及各處理生長比較情形如圖 8 所示，菌 A 為 OT03C *Pseudoarthrobacter niigatensis*、菌 B 為 K-NaCl-7 *Bacillus marisflavi*，可看出甘藍菜外表型態添加菌液的處理有約略優於較半量化肥處理。圖 9 為甘藍菜地上部平均鮮重統計分析，統計結果顯示全量化肥 (1CF) 為所有處理中地上部平均鮮重最高的處理，而添加菌液的處理於統計結果上皆明顯優於半量化肥處理，並具有顯著差異，結果顯示添加 OT03C *Pseudoarthrobacter niigatensis*、K-NaCl-7 *Bacillus marisflavi* 皆具有促進甘藍生長的效果，雖然無法達到全量化肥處理。



圖 8. 甘藍於溫室 60 d 生長狀況

(2) 甘藍菜溶磷菌適應性試驗結果

專一性之螢光探針觀察各菌株於甘藍根表面拓殖化的情形如圖 10 所示，甘藍接種 OT03C *Pseudoarthrobacter niigatensis*，於圖 10-a 根圈微及圖 10-b 根表於專一性螢光探針偵測下，OT03C 皆有被螢光顯微鏡偵測出，表示甘藍接種 OT03C 確

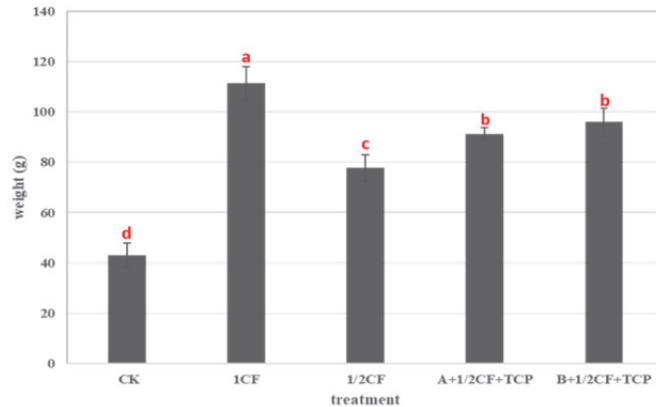


圖 9. 甘藍生長 60 d 地上部平均鮮重

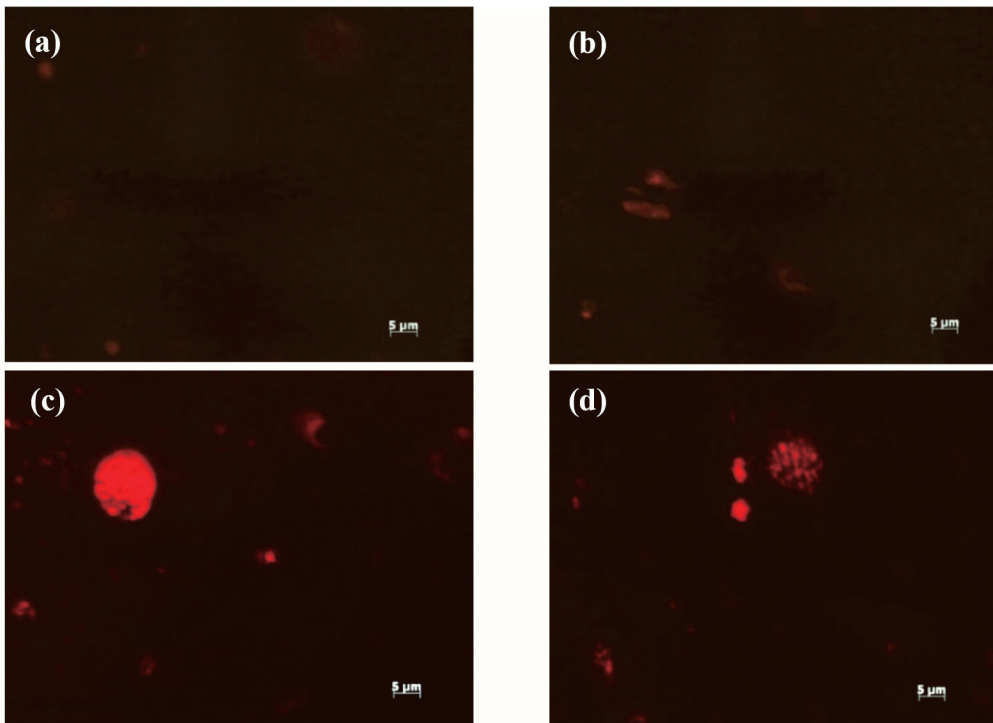


圖 10. 菌株 OT03C、菌株 K-NaCl-7 根圈及根表螢光原位雜合結果
(a)OT03C 根圈 (b) OT03C 根表 (c) K-NaCl-7 根圈 (d) K-NaCl-7 根表

實存在於甘藍根圈及根表微生物相，但其螢光反應相較於其他處理弱，推論有可能為微生物族群較少之因素。K-NaCl-7 *Bacillus marisflavi* 於專一性螢光探針偵測下，圖 10-c 根圈及圖 10-d 根表，K-NaCl-7 皆有被螢光顯微鏡偵測出，表示接種 K-NaCl-7 確實存在於甘藍根圈及根表微生物相，且 K-NaCl-7 會有群聚現象，雖然為不同盆栽但其相較於 OT03C 菌株更容易被探針偵測到，可能其微生物族群於甘藍根圈及根表適應性較佳族群數量較多，因此更容易被偵測出，而此現象也略表現於甘藍鮮重上，雖未達到顯著差異。

(二) 番茄溫室試驗

(1) 番茄溫室試驗統計結果分析

番茄盆栽試驗生長 60 d 生長狀況如圖 11 所示，由於番茄非一次性採收之作物，故調查其開花及結果數量，第一期平均結果數量如圖 12-a 所示，其中菌 A 為 S-NB-2 *Brevundimonas albigilva* 及菌 B 為 W-NaCl-3 *Gordonia hongkongensis*，添加菌液的處理皆略多於半量化肥處理，其中添加 W-NaCl-3 *Gordonia hongkongensi* 相較於半量化肥處理有達到顯著差異的水準，且與全量化肥為同一顯著差異等級。番茄盆栽試驗 60 d 總產量如圖 12-b 所示，番茄於第 60 d 總產量添加菌液之處理皆



圖 11. 番茄於溫室生長 60 d 狀況

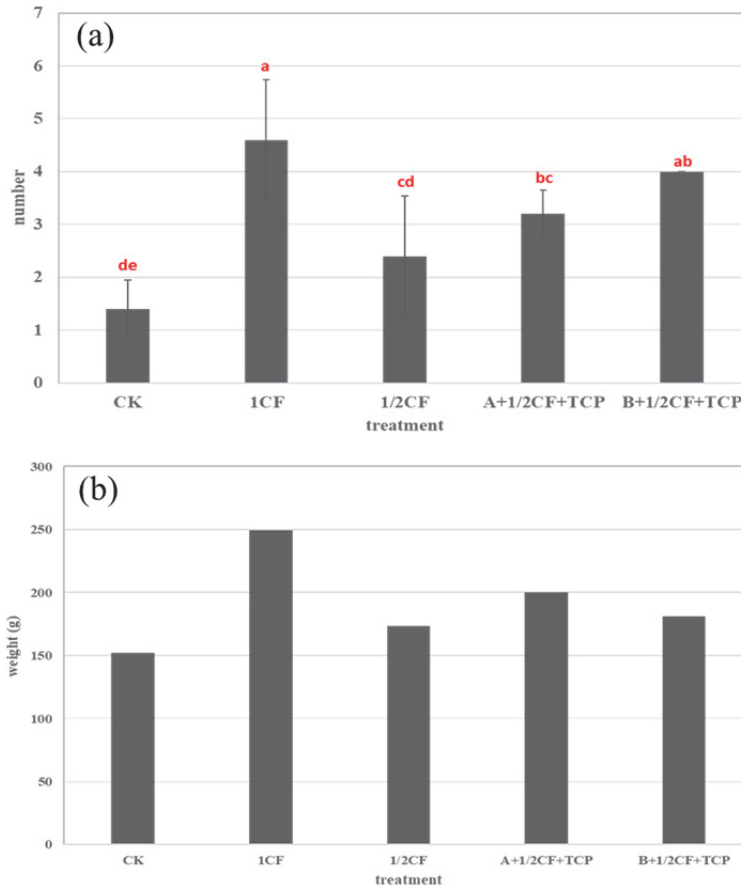


圖 12. (a) 番茄生長 45 d 平均結果數量 (b) 番茄生長 60 d 結果重量統計

略高於半量化肥處理，但未達到全量化肥處理之水平。由於番茄採果期較長，控制組已停滯生長，半量化肥處理於第三、第四花序有開始落花不結果之情形，而添加菌液處理番茄植株上尚有第三、第四花序果實尚未成熟，故待番茄完全成熟採收後，其差異性可能會更加明顯。

(2) 甘藍菜溶磷菌適應性試驗結果

專一性之螢光探針觀察各菌株於番茄根表面拓殖化的情形如圖 13 所示，番茄接種 S-NB-2 *Brevundimonas albigilva*，圖 13-a 根圈及圖 13-b 根表於專一性螢光探針偵測下，S-NB-2 皆有被螢光顯微鏡偵測出，表示番茄接種 S-NB-2 確實存在於番茄根圈及根表微生物相。接種 W-NaCl-3 *Gordonia hongkongensis*，圖 13-c 根圈及 13-d 根表於專一性螢光探針偵測下，僅有在根圈微生物族群中有被偵測出，而在根表微生物族群中則未被偵測到，顯示 W-NaCl-3 偏好於根圈土壤環境中。

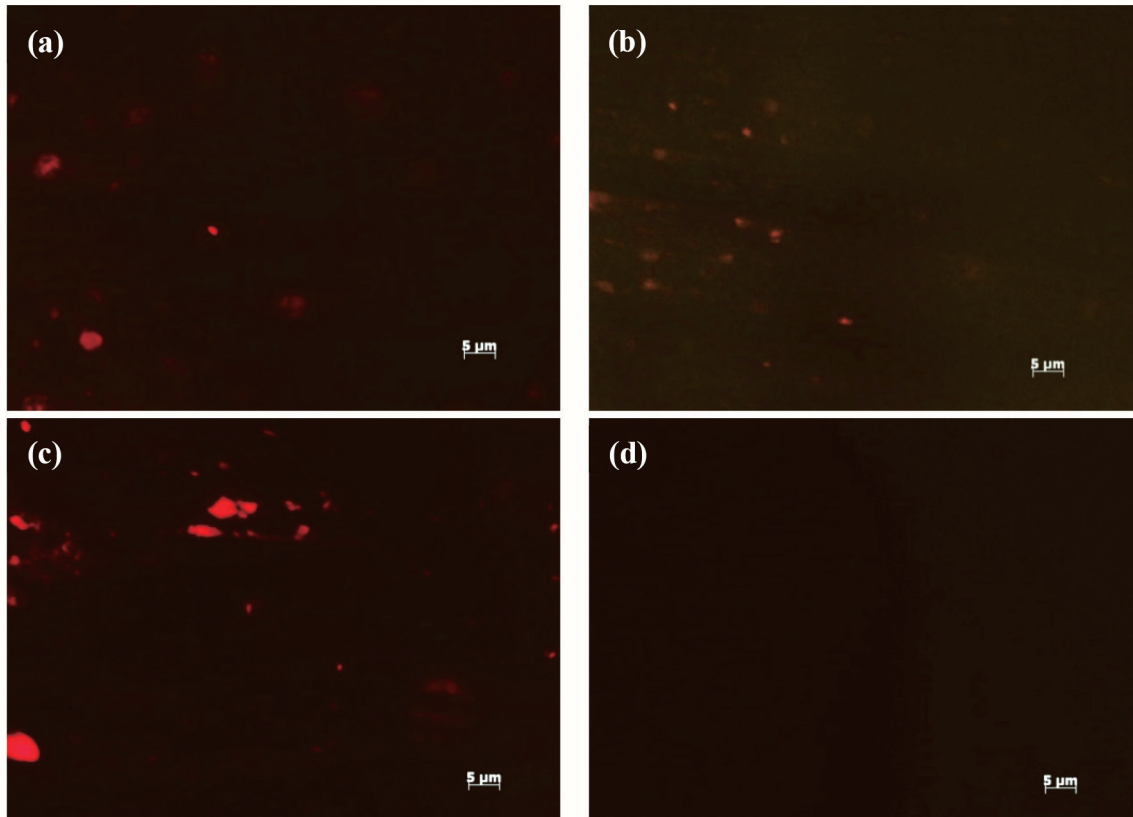


圖 13. 菌株 S-NB-2、菌株 W-NaCl-3 根圈及根表螢光原位雜合結果
(a) S-NB-2 根圈 (b) S-NB-2 根表 (c) W-NaCl-3 根圈 (d) W-NaCl-3 根表

(三) 菠菜溫室試驗

(1) 菠菜溫室試驗統計結果分析

菠菜盆栽試驗生長 30 d 生長狀況如圖 14 所示，其中菌 A 為 N13 *Paraburkholderia sacchari*，菌 B 為 OTPB4 *Bacillus xiamenensis*，由植株外表型態添加菌株處理皆優於半量化肥處理，且達到與全量化肥處理同一水平。菠菜種植 30 d 平均鮮重分析如圖 15 所示，添加菌液處理平均鮮重皆高於半量化肥處理，其中添加菌 A 處理與半量化肥處理有達到顯著差異，甚至於約略高於全量化肥處理。

(2) 菠菜溶磷菌適應性試驗結果

專一性之螢光探針觀察各菌株於菠菜根表面拓殖化的情形如圖 16 所示，菠菜接種 N13 *Paraburkholderia sacchari*，圖 16-a 根圈及圖 16-b 根表，於專一性螢光探針偵測下，N13 僅在菠菜根圈微生物有被螢光顯微鏡偵測出，根表微生物則未

被觀測出，表示 N13 可能偏好於根圈土壤環境中。OTPB4 *Bacillus xiamenensis* 於專一性螢光探針偵測下，圖 16-c 根圈及圖 16-d 根表，OTPB4 皆有被螢光顯微鏡偵測出，表示接種 OTPB4 確實存在於菠菜根圈及根表微生物相，但在根圈中偵測較微弱，可能其微生物族群較少不易被偵測。



圖 14. 菠菜於溫室生長 30 d 狀況

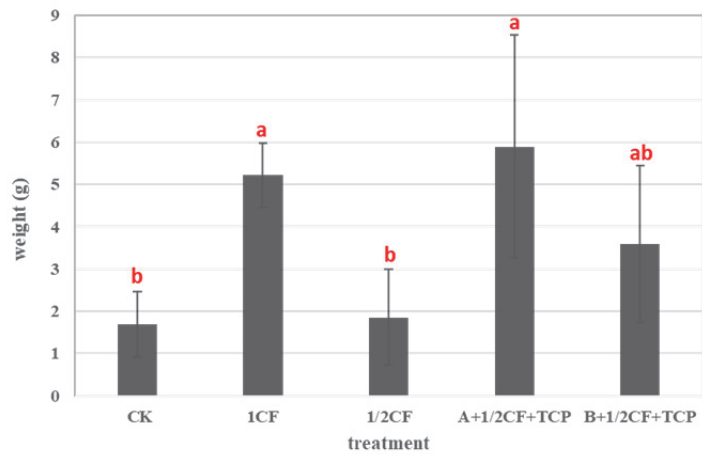


圖 15. 菠菜種植 30 d 平均鮮重

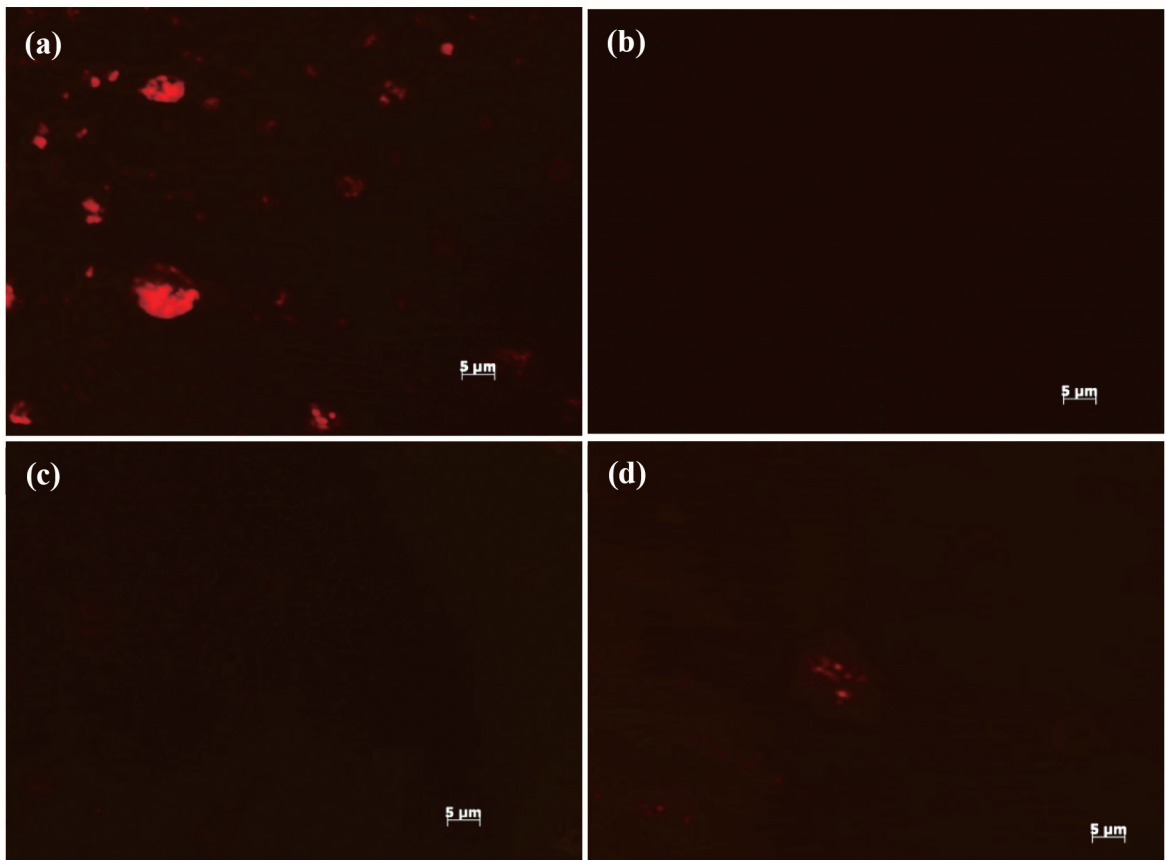


圖 16. 菌株 N13、菌株 OTPb4 根圈及根表螢光原位雜合結果

(a) N13 根圈 (b) N13 根表 (c) OTPB4 根圈 (d) OTPB4 根表

結論

經相容性測試篩選出之菌株進行盆栽試驗，顯示可提高盆栽甘藍菜生質量具適應性之菌種為 *Bacillus marisflavi* 與 *Pseudoarthrobacter niigatensis*；可提高盆栽番茄生質量具適應性之菌種為 *Brevundimonas albigilva* 與 *Gordonia hongkongensis*；可提高盆栽菠菜生質量具適應性之菌種為 *Bacillus xiamenensis* 與 *Paraburkholderia sacchari*。

本試驗針對溶磷菌肥功效研究，主要進行三階段的接種試驗進行篩選對作物具有促進或未抑制生長之溶磷菌作為最後之溶磷菌肥功效測試。第一階段種子發芽試驗，篩選之 50 株溶磷菌株接種於甘藍、番茄、菠菜，並非所有菌株皆對種子發芽具有促進之功效，與其溶磷能力、IAA 產生或 ACC 脫胺酵素活性也並非絕對的關係，甚至許多溶磷菌株更是有抑制幼苗生長的情形。第二階段 30 d 生長箱作物瓶栽相容性試驗，顯示篩選之 10 株促進生長或未抑制之溶磷菌株於純相環境中，也並非每株溶磷菌均有達到促進生長之功效，於生長過程中也可能產生抑制之現象。第三階段作物盆栽適應性試驗，於本試驗中相容性試驗篩選較佳之溶磷菌於盆栽試驗皆略有促進生長之功效，雖然大部分施菌處理皆未達到顯著差異，而且發現不同菌株於土壤環境中作用於根圈或根表也不同，而其族群大小可能也會影響產量。於一系列之溶磷菌肥功效試驗顯示：經過作物瓶栽相容性試驗能夠大幅篩選出不適用之溶磷菌株，對溶磷菌株產品的檢測有很大的幫助。

引用文獻

1. 行政院農委會農糧署。2013。肥料種類品目及規格。農糧字第 1021052625 號 附件二、肥料檢驗項目之檢驗方法。
2. 羅秋雄。2005。作物施肥手冊。中華肥料協會。
3. Abdul-Baki, A. A. and J. D. Anderson. 1973. Relationship between decarboxilation of glutamic acid and vigour in soybean seed. *Crop Sci.*13: 222-226.
4. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaeffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database

- search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
5. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S RNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
 6. Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J. R. Lawrence, A. Hartman. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
 7. Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. R. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene for *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 4801- 4805.
 8. Cavalca, L., A. Corsini, E. Canzi, and R. Zanchi. 2015. Rhizobacterial communities associated with spontaneous plant species in long-term arsenic contaminated soils. *World J. Microbio. Biotechnol.* 31: 735-746.
 9. Chun, J., J. H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, and Y. W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2259-2261.
 10. Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene encoding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-7853.
 11. Heiner, C. R., K. L. Hunkapiller, S. M. Chen, J. I. Glass, and E. Y. Chen. 1998. Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res.* 8: 557-561.
 12. Kelling, K., L. Bundy, S. Combs, and J. Peters. 1999. Optimum soil test levels for Wisconsin. *Univ. Wis. Coop. Extn. Ser. Bull. No. A3030.*
 13. Koeuth, T., J. Versalovic, and J. R. Lupski. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5: 408-418.
 14. Krüger, U., F. Bak, J. Aamand, O. Nybroe, N. Badawi, and B. F. Smets. 2018. Novel method reveals a narrow phylogenetic distribution of bacterial dispersers in environmental communities exposed to low hydration conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: 1-16.
 15. Lai, W. A., P. D. Rekha, A. B. Arun, and C. C. Young. 2008. Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L.

- Biol. Fertil. Soils 45: 155-164.
16. Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationery-phase sigma factor RpoS. Can. J. Microbiol. 48: 635-642.
 17. Penrose, D. M. and B. R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118: 10-15.
 18. Rashid, M. H. and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4885-4890.
 19. Watts, D. and J. R. MacBeath. 2001. Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Methods Mol. Biol. 167: 153-170.
 20. Willems, A. and M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 305-313.
 21. Young, C. C., P. Kämpfer, F. T. Shen, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2005. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 423-426.

Compatibility of Phosphate Solubilizing Bacteria Toward Crops with High Phosphorus Demand

Chun-Tse Chang¹, Wei-An Lai², Chiu-Chung Yang³, and Fo-Ting Shen^{4,*}

Summary

The present study was undertaken to study the colonizing behavior of phosphate solubilizing bacteria toward crops with high phosphorus demand. Motility, IAA and ACC deaminase producing abilities of phosphate solubilizing bacteria were screened first to obtain superior candidates. Bacterial inoculations were performed in seed bioassay and flask experiment. Considered for plant growth and bacterial colonization, the compatibilities of phosphate solubilizing bacteria toward cabbage, spinach and tomato were evaluated. The niche fitness of bacteria in soils will also be demonstrated in pot experiment. Out of the tested 35 strains were subjected to seed bioassay, and 8, 8, 3 strains were beneficial to seed germination of cabbage, tomato and spinach, respectively. Among them, 2 strains increased dry weight of above part of cabbage, 4 strains increased dry weight of above part of tomato, and 3 strains increased dry weight of above part of spinach. After 30 days of cultivation, inoculated strains still survived on root surface, as demonstrated using BOX-PCR fingerprinting of re-isolated strains and fluorescence *in situ* hybridization technique with EUB338 probe. Pot experiments

* Corresponding author, e-mail: ftshen@dragon.nchu.edu.tw

¹ Researcher Assistant, Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

² Postdoctoral Researcher, Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Professor, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC. Academician of the Academia Sinica.

⁴ Associate Professor, Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

showed that *Bacillus marisflavi* and *Pseudoarthrobacter niigatensis* can promote growth of cabbage, *Brevundimonas albigilva* and *Gordonia hongkongensis* can promote growth of tomato while *Bacillus xiamenensis* and *Paraburkholderia sacchari* can promote growth of spinach.

Keywords: Microbial fertilizer, phosphate solubilizing bacteria, cabbage, tomato, spinach, gene fluorescent probe.