

影響根圈細菌產生吲哚乙酸之因子

陳睦鈞¹ 林宗俊¹ 黃振文^{1,2}

¹ 臺中市 國立中興大學植物病理學系

² 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-1676

接受日期：中華民國 99 年 11 月 17 日

摘要

陳睦鈞、林宗俊、黃振文. 2010. 影響根圈細菌產生吲哚乙酸之因子. 植病會刊 19: 201-212。

本研究主要探討 *Paenibacillus polymyxa* Gh1、*Geobacillus thermoglucosidasius* Gh4、*Bacillus megaterium* Bg12 及 *Microbacterium resistense* Bg31 等根圈細菌菌株產生吲哚乙酸 (IAA) 之影響因子。光照處理對 4 菌株產生 IAA 之濃度皆比無光照之處理低，其中尤以培養 96 小時最為明顯。4 菌株在培養 48 小時後，它們的 IAA 產量均快速的提升。隨著培養溫度之上升，各菌株產生 IAA 的濃度亦呈現上升之趨勢，其中 Bg31、Gh1、Gh4 和 Bg12 菌株產生 IAA 的最適溫度分別為 28℃、32℃、32℃ 與 36℃。在酸鹼值測試研究中，於 pH 7.5 時，各菌株的 IAA 產量均表現最佳。氮素源中，色胺酸 (L-tryptophan) 為各菌株產生 IAA 之決定性因子，隨著色胺酸濃度的提高，IAA 產量亦隨之增加。碳素源對於各菌株產生 IAA 量的多寡會隨著不同碳素源及菌株的種類而有顯著的變異。測試不同的培養基質對菌量增殖及產生 IAA 之影響，發現大豆酪蛋白液態培養基 (Tryptic soy broth, TSB) 優於其他培養基的處理。將番茄、甜瓜及蘿蔔種子分別浸泡於上述各菌株之細菌懸浮液，並種植於栽培基質中，結果發現 Gh1、Gh4 及 Bg31 等三菌株均可顯著促進甜瓜及番茄幼苗之生長。此外，將 4 菌株之 TSB 培養液混拌於介質，進而種植不同作物，結果顯示菌株 Bg31 促進蘿蔔生長之效果最佳。將蘿蔔幼苗培養在 MS (Murashige and Skoog medium) 植物組織培養液中，分別加入 Bg31 菌株之 TSB 培養液與 IAA 標準品，評估其對幼苗根系發展之影響，結果發現兩處理皆可促進側根之發育且使側根較為粗壯。

關鍵詞：根圈細菌、吲哚乙酸、大豆酪蛋白液態培養基、蘿蔔、花生粕

緒言

植物根圈微生物可以獲取植物根系分泌的有機碳、氮等養分，故其族群數、群落組成及活性均顯著高於非根圈之土壤微生物。一般言之，根圈微生物具有間接或直接促進植物生長之能力者，稱曰 PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria)。有些 PGPR 可以分泌抗生素以抑制病原微生物之生長⁽¹⁴⁾；有些則可分泌鐵離子 (siderophores)，有助於微生物取得生長所需的鐵離子，間接奪走病原微生物獲取鐵離子的機會，致使其生長受到抑制，是故植物得以保持健康⁽¹⁰⁾；此外，亦有部分根圈微生物可分泌吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA)，直接促進植物生育⁽⁷⁾。然而根據本研究室初步結果，根圈微生物產生 IAA 的量，卻會受到菌系種類、培養環境及寄主植物根系的影響。因此，本文

主要目的在於測試不同的培養條件與碳、氮素源對四株植物根圈細菌產生吲哚乙酸的影響。

材料與方法

供試菌株來源

由臺中縣霧峰鄉農田之香蕉根圈土壤，分離到具有產生 IAA 能力之四種細菌菌株，經過 Biolog 快速偵測系統、脂肪酸鑑定系統及 16S rRNA 之序列比對，分別鑑定為 *Paenibacillus polymyxa* Gh1、*Geobacillus thermoglucosidasius* Gh4、*Bacillus megaterium* Bg12 及 *Microbacterium resistense* Bg31⁽³⁾。本研究以此 4 菌株作為供試菌種。

不同色胺酸濃度對菌株產生吲哚乙酸之影響

將左旋型態之色胺酸 (L-form Tryptophan, Ferak, Germen) 溶解於水中，經由無菌微孔過濾膜 (孔徑 $0.22\ \mu\text{m}$, Millipore 公司) 過濾後，調整色胺酸濃度 (0、100、200、300、400、500、600、700、800、900 及 1000 mg/L) 後，分別添加於高溫高壓 (121°C ，15 lb，20 min) 滅菌之 LB 液態培養基⁽¹⁾ (Luria-Bertani broth, LB; Zymeset 公司) 中，使酸鹼值維持在 pH 6.8，然後分注 5 ml 至滅菌過且包裹鋁箔之玻璃試管 (13 公分) 內，隨後分別接種各菌株 10^7 cfu/ml 之菌量 ($\text{O.D.}_{630}=0.38$)，移置於旋轉式培養器 (Roller-Torque Mixer, Assistant 公司) 進行震盪培養 (75 rpm， 30°C ，黑暗)，培養 96 小時後，離心 (10,000 rpm) 10 分鐘，分離菌體與培養液；再將培養液與 Salkowski 試劑⁽⁶⁾ (250 ml H_2O ，150 ml H_2SO_4 及 7.5 ml 5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 以 1:4 之比例均勻混合，在全暗的環境下，反應 30 分鐘，同時將不同濃度之吲哚乙酸標準品 (Indole-3-acetic acid, IAA, Sigma 公司) 添加於不接種菌體的液態培養基中，並以 Salkowski 試劑對 IAA 之專一呈色反應，在分光光度計波長 530nm 的條件下，製作吸收值與 IAA 濃度相關性的標準曲線，藉以推估各菌株在不同處理產生 IAA 的濃度。

光照、培養時間、溫度及酸鹼值對細菌菌株產生吲哚乙酸的影響

將 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株之細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml)，加入含有色胺酸 (500mg/L) 之 LB 液態培養基中，依照上述「不同色胺酸濃度對菌株產生吲哚乙酸之影響」的培養條件，分別測試光照、培養時間、溫度及酸鹼值對各菌株產生 IAA 的影響。各處理條件分述如下：(1) 光照處理：區分為光照及無光照兩組處理，各培養 48 小時及 96 小時；(2) 培養時間：分別培養 1 至 7 天；(3) 培養溫度：將接種過各菌株之液態培養基，分別移置於 16、20、24、28、32、36 及 40°C 之定溫培養箱中培養 4 天；(4) 酸鹼值：將液態培養基之酸鹼值，分別調整為 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5 及 9，培養 4 天。依上述之條件培養細菌菌株後，測定各處理產生 IAA 之濃度。

氮素源對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

將 Czapek's 液態培養基⁽¹⁾ (3% Sucrose，0.3% NaNO_3 ，0.1% K_2HPO_4 ，0.05% MgSO_4 ，0.05% KCl ，0.001% FeSO_4) 組成配方中的氮素源的硝酸鈉 (NaNO_3) 以各種氨基酸取代之，將 50 毫升高溫高壓滅菌過之基礎液態培養基，分別加入無菌微孔過濾膜過濾之

0.3% (w/v) 天冬胺酸 (aspartic acid)、天冬醯胺 (asparagine)、精胺酸 (arginine)、丙胺酸 (alanine)、胱胺酸 (cystine)、甘胺酸 (glycine)、穀胺酸 (glutamic acid)、穀胺醯胺 (glutamine)、組胺酸 (histidine)、異亮胺酸 (isoleucine)、白胺酸 (leucine)、賴胺酸 (lysine)、甲硫胺酸 (methionine)、戊胺酸 (norvaline)、正白胺酸 (norleucine)、鳥胺酸 (ornithine)、苯丙胺酸 (phenylalanine)、脯胺酸 (proline)、絲胺酸 (serine)、色胺酸 (tryptophan)、蘇胺酸 (threonine) 及缬胺酸 (valine) 等 22 種氨基酸，並以不加氮素源做為對照組。取 0.5 ml 培養於 NA (nutrient agar) 培養基⁽¹⁾ 24 小時之 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株之細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml)，分別接種於各液態培養基中，然後移置 32°C 定溫箱震盪培養，2 天後檢測 IAA 的濃度及各菌的增殖量，其中每處理三重複，並以 Czapek's 液態培養基及大豆酪蛋白液態培養基⁽¹⁾ (tryptic soy broth, TSB) 添加色胺酸 (500 mg/L) 為對照組。

碳素源對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

以 0.3% (w/v) 色胺酸作為氮素源，修正 Czapek's 液態培養基並去除碳素源的配方成分，每 50 ml 經高溫高壓滅菌之基礎液態培養基分別加入無菌微孔過濾膜過濾之 3% (w/v) 葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose)、麥芽糖 (maltose)、半乳糖 (galactose)、乳糖 (lactose)、蔗糖 (sucrose)、木糖 (xylose)、甘露糖 (mannose)、阿拉伯糖 (arabinose) 及核糖 (ribose) 等 10 種醣類做為碳素源，並以不加碳素源者作為對照組。隨後取 0.5 ml 培養於 NA 培養基 24 小時之 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株之細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml) 加入上述液態培養基中，每一種處理三重複，並以 Czapek's 液態培養基及 TSB 液態培養基添加色胺酸 (500 mg/L) 為對照組。

不同培養基質對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

將培養於 NA 培養基上 24 小時之 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株，製備成細菌懸浮液，並將各種不同營養基質 (PDB, Potato Dextrose Broth; KB, King's B Broth; NB, Nutrient Broth; LB, Luria-Bertani Broth; TSB, Tryptic Soy Broth)⁽¹⁾ 加入色胺酸 (500 mg/L) 後，酸鹼值調整為 7.5，並接種細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml)，置於無光照，溫度 32°C 培養 48 小時後，測試四株菌株在不同液態培養基中產生 IAA 之濃度。

細菌懸浮液與培養液對作物生長之影響

培養在 NA 平板上之 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株以無菌水洗下後，製成細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml)，將

番茄 (農友301, 農友種苗公司)、蘿蔔 (大梅花, 農友種苗公司) 及甜瓜 (銀輝, 農友種苗公司) 之種子浸泡於細菌懸浮液 15 分鐘後, 每 5 顆種子種植於 3 吋半之塑膠盆內 (試驗所使用之泥炭土, 經過高溫高壓滅菌每天消毒一次, 連續消毒 3 次), 播種後移置玻璃溫室中, 光照為自然光, 每天按時澆水。此外, 以未處理細菌懸浮液者作為對照組, 每一處理有五重複。播種 2 星期後除去植物根部附著之泥炭土, 秤量並記錄植株之鮮重。此外, 本研究亦探討各菌株之培養液對作物生長之影響, 方法如下: 將培養在 NA 平板上之 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株以無菌水洗下, 製成細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml) 後接種至 TSB 培養基中 (pH=7.5, 500 mg/L 之 tryptophan), 培養於無光照、32°C 定溫箱兩天後, 並以 TSB 液態培養基作為對照組, 將經過高溫高壓滅菌之泥炭土與培養液以 10:1 (v/v) 之比例進行混拌, 再將蘿蔔 (大梅花) 及甜瓜 (銀輝) 之種子, 每 5 顆種子種植於 3 吋半之塑膠盆內, 播種後移置溫室中, 每隔一星期澆灌各菌株之培養液乙次且每天定時澆水, 各處理有五重複, 並以不處理者為對照組, 三星期後觀察各植物之生長情形。

培養液內 IAA 濃度對植物根系生長之影響

將蘿蔔種子 (大梅花) 以流水浸種 36 小時後, 把蘿蔔苗放置含有 3% 水瓊脂 (Water agar, WA) 塊上, 然後將蘿蔔苗及瓊脂塊移植至含有 1x MS (Murashige & Skoog, Sigma 公司) 植物組織培養液之試管中。此一試驗分為四種處理, 處理一: Bg31 菌株依照上述「細菌懸浮液與培養液對作物生長之影響」之培養條件培養後, 培養液以 10,000 rpm 之轉速離心再經無菌之微孔過濾膜過濾, 然後將濾液分別稀釋 10、100 及 1,000 倍加入於 MS 培養液中; 處理二: 將 1、10 及 100 mg/L 之 IAA 標準品溶於 TSB 液態培養基中; 處理三: 將 TSB 液態培養基稀釋 10、100 及 1,000 倍為對照組; 處理四: MS 植物組織培養液作為另一對照組, 每一處理有三重複, 於室溫下每天給予 16 小時光照及 8 小時黑暗, 一個星期後觀察蘿蔔根系發展之變化。

大豆酪蛋白培養基 (TSB) 之組成分對 Bg31 菌株菌量增殖及產生吡啶乙酸之影響

將 TSB 液態培養基中去除胰化蛋白胨 (Tryptone, Difco 公司), 配製成 TSB-Tryptone 液態培養基; TSB 液態培養基中去除大豆蛋白胨 (Soytone, Difco 公司), 配製成 TSB-Soytone 液態培養基; TSB 液態培養基中去除氯化鈉 (Sodium chloride; NaCl, 三德藥品), 配製成 TSB-NaCl 液態培養基; 未調整之 TSB 液態培養基為對

照組。各處理液態培養基配製 50 ml 並經高溫高壓滅菌後, 將 Bg31 菌株之細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml), 取 0.5 ml 接種於各液態培養基中, 置於 32°C 定溫培養箱, 以無光照及 75 rpm 之轉速震盪培養 2 天後, 比較 Bg31 菌株在不同液態培養基中產生 IAA 之濃度。同時取各處理之培養液 1 ml, 以無菌水進行 10 倍系列稀釋後, 取 100 μ l 塗佈於 NA 培養基上, 於室溫培養 48 小時後記錄各處理之菌量。

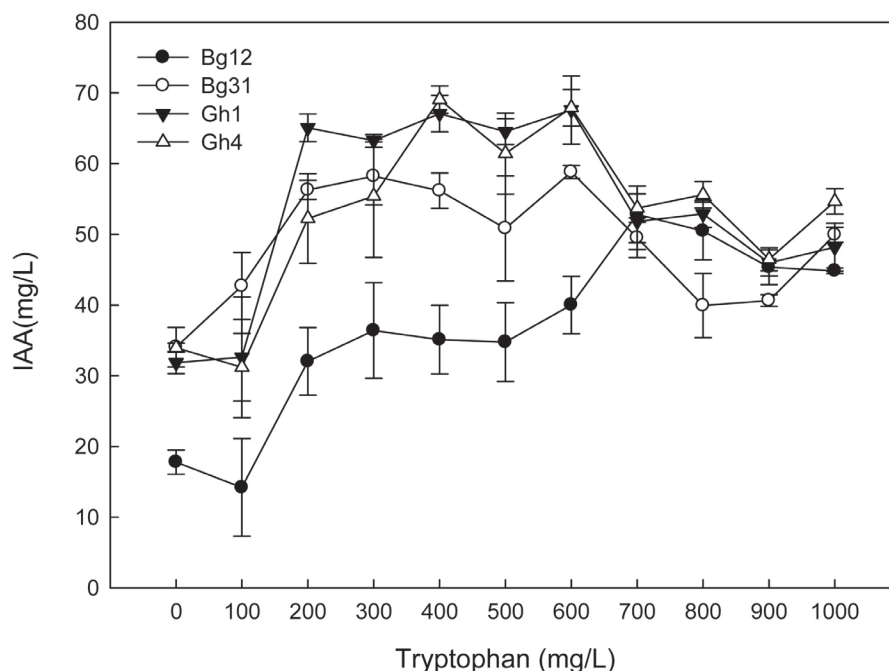
不同有機添加物對 Bg31 菌株菌量增殖及產生吡啶乙酸之影響

取 2% (w/v) 海草粉 (Sea weed supreme, 福壽公司)、苦茶粕 (Tea seed pomace, 福壽公司)、魚粉 (Fish meal, 得力公司)、酪蛋白 (Casein, Sigma 公司)、蓖麻粕 (Castor bean pomace, 福壽公司)、芝麻粕 (Sesame pomace, 福壽公司)、花生粕 (Peanut seed pomace, 福壽公司) 及苜蓿粉 (Alfalfa hay meal, 福壽公司) 取代 TSB 液態培養基中 1.5% (w/w) 之大豆蛋白胨 (Soytone) 及 0.5% (w/w) 之胰化蛋白胨 (Tryptone), 製成含有不同有機添加物之液態培養基; 並以僅含有 0.5% 氯化鈉 (Sodium chloride, NaCl, 三德藥品) 之液態培養基及 TSB 液態培養基作為對照組。經高溫高壓滅菌後, 待其冷卻後, 分別接種 0.5 ml 之 Bg31 菌株之細菌懸浮液 (10^7 cfu/ml) 於各處理 (50 ml) 中, 於 32°C 定溫培養箱, 以無光照及 75 rpm 之轉速震盪培養 2 天及 7 天後, 測定各處理中 IAA 之產量與菌量增殖之情形, 每處理各有三重複。此外亦以相同之方式測試澱粉類對 Bg31 產生 IAA 與菌量增殖之影響, 其中使用太白粉 (potato starch: PS, 馬鈴薯粉, 日正食品工業)、糯米粉 (sweet rice flour: SRF, 日正食品工業)、在來米粉 (rice flour: RF, 日正食品工業)、玉米粉 (corn starch: CS, 日正食品工業)、低筋麵粉 (all purpose flour: ARF, 日正食品工業), 各 2% (w/v) 替代 TSB 液態培養基中 1.5% (w/v) 之大豆蛋白胨及 0.5% (w/v) 之胰化蛋白胨; 並以含有氯化鈉之液態培養基及 TSB 液態培養基兩處理作為對照組。

結 果

不同色胺酸濃度對細菌菌株產生吡啶乙酸之影響

於不同濃度之色胺酸影響 IAA 產量之試驗中, 發現 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等菌株於含有 100 mg/L 與 200 mg/L 色胺酸之兩種液態培養基間所產生 IAA 濃度之差異最為顯著; 惟添加色胺酸濃度在 200~



圖一、不同色胺酸濃度對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響。

Fig. 1. Effect of various concentrations of L-form tryptophan on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermoblucoisidarius* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistense* Bg31.

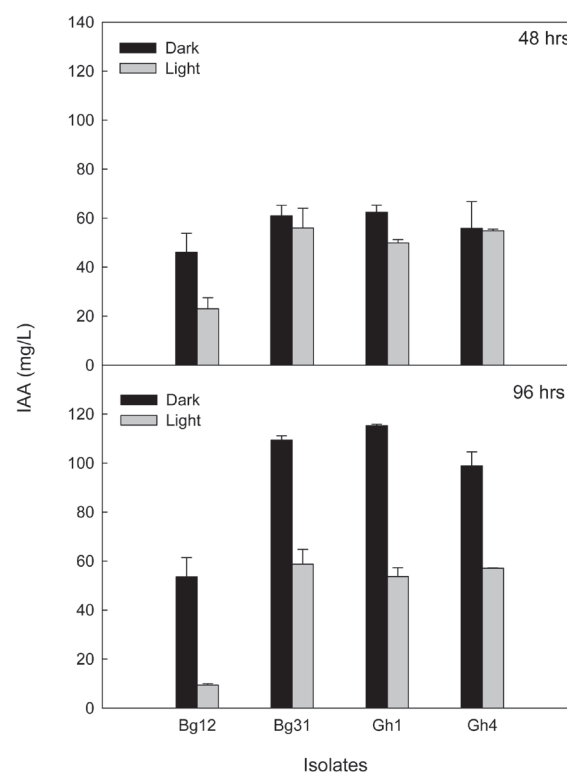
600 mg/L 之間，所產生之 IAA 濃度並無顯著之差別；Gh1 及 Bg31 菌株在添加 200 mg/L 色胺酸與 Gh4 菌株在添加 400 mg/L 色胺酸之液態培養基中，產生 IAA 之濃度即達到高峰，但添加 700 mg/L 時，IAA 產量濃度則呈現下降的趨勢；Bg12 菌株產生 IAA 之高峰則出現在添加 700 mg/L 色胺酸之液態培養基中，當色胺酸濃度達 800 mg/L 時，其 IAA 產量則逐漸下降（圖一）。

光照、培養時間、溫度及酸鹼值對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

測試光照與否對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等 4 菌株產生 IAA 濃度之影響，結果發現光照處理 48 小時後之培養液，各菌株產生 IAA 之濃度皆比無光照之處理低 3% 至 20% 左右，此差異情形於培養 96 小時後尤為顯著（圖二）。

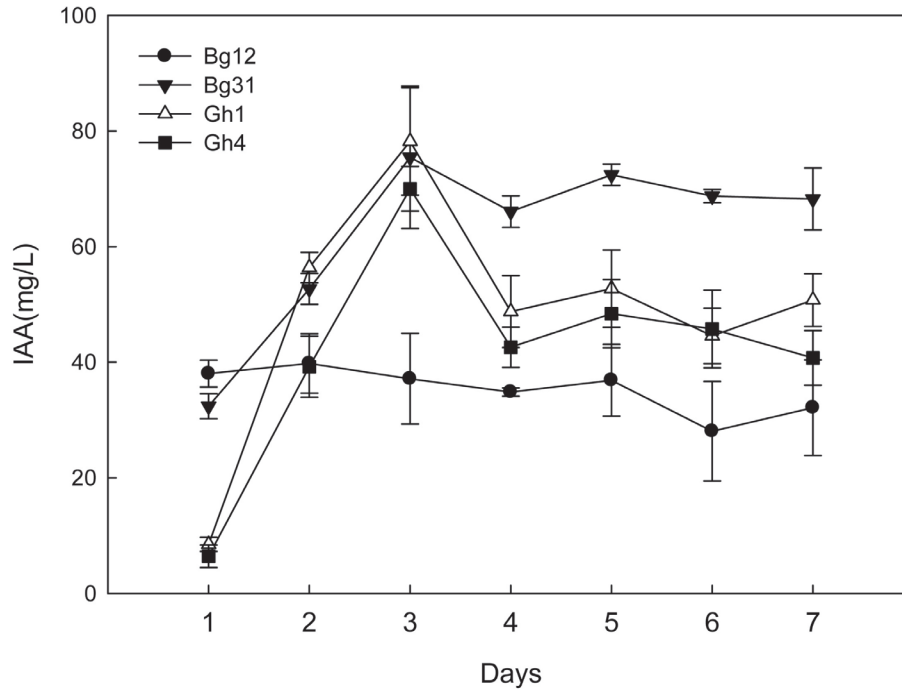
觀察不同培養時間對 4 菌株在產生 IAA 濃度之影響，結果發現培養 2 天後各菌株產生之 IAA 的量均快速增加；至於 Bg12 菌株在培養 3 天後，及 Gh1 與 Gh4 菌株在培養 4 天後，所產生之 IAA 有下降之趨勢；Bg31 菌株產生 IAA 隨培養時間之增加而增加，培養 4 天後 IAA 濃度增加之情形趨於平緩（圖三）。

將 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等菌株培養於 16 至 28°C 時，隨著溫度上升 IAA 之產量亦隨之增加；直至 32°C 時 Gh1 及 Gh4 菌株之 IAA 產量即達到高峰，惟若



圖二、光照對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響。

Fig. 2. Effect of light on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermoblucoisidarius* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistense* Bg31.



圖三、培養時間對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響。

Fig. 3. Effect of incubation time on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31.

培養溫度繼續升高，其 IAA 濃度則隨之下降。在 36°C 時 Bg12 菌株產生 IAA 之濃度方達到高峰，高於 36°C 時 IAA 產量則開始下降。在 28°C 時 Bg31 菌株 IAA 產量即達高峰，32°C 後產生之濃度即開始下滑 (圖四)。

在酸鹼值測試中，於 pH 5 時，除 Bg12 菌株可產生 IAA 外，其餘菌株皆不能產生；於 pH 7.5 時，4 菌株產生 IAA 之量均呈現最佳，其中 Gh1 菌株產生 IAA 之單位濃度量最高，其次則依序為 Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株；至於在 pH 9 時，Gh4 菌株已不產生 IAA (圖五)。

氮素源對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

將 Czapek's 液態培養基組成配方中氮素源之硝酸鈉以各種氨基酸取代，結果發現 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等 4 菌株培養於含有色胺酸 (L-form Tryptophan) 之液態培養基，可分別產生 10.2、6.17、11.44 及 8.12 (mg/L) 含量之 IAA (表一)，惟在添加其餘之氨基酸則皆偵測不到 IAA 之產生 (表一)。

碳素源對細菌菌株產生吲哚乙酸之影響

以不同碳素源做測試，發現 Gh1 菌株在添加甘露糖與色胺酸之條件下可產生最高產量之 IAA，其次則為蔗糖，而添加麥芽糖及乳糖之 IAA 產量最低。Gh4 菌株在沒有添加碳素源之對照組比添加碳素源之處理產

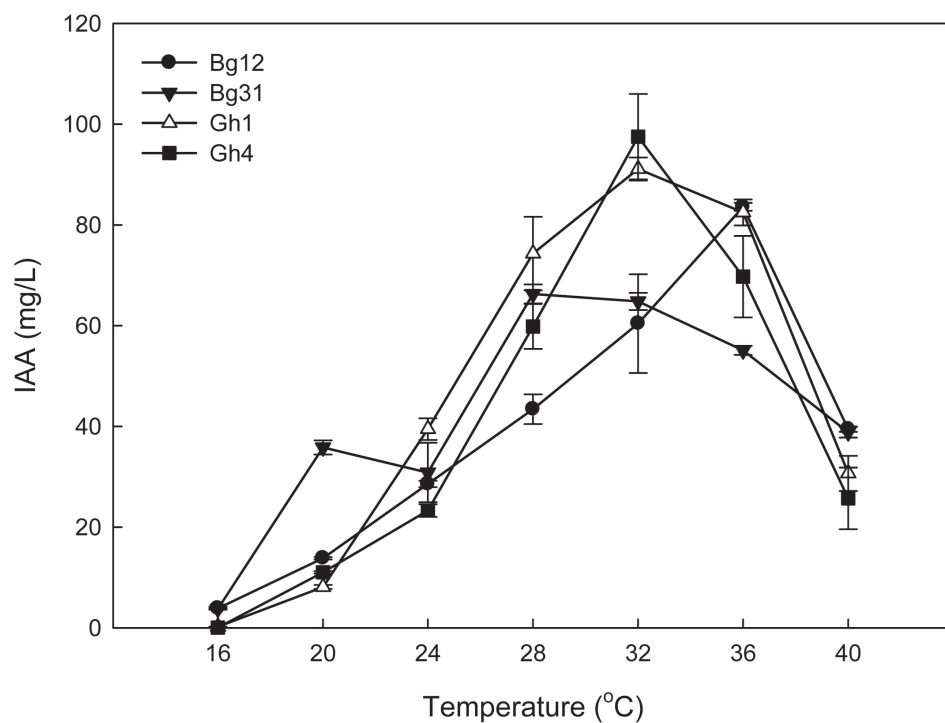
生更多之 IAA，碳素源之處理皆無 IAA 之產生或產生極低量之 IAA。Bg12 菌株在果糖、半乳糖、乳糖、蔗糖及木糖產生較多之 IAA。Bg31 菌株於添加蔗糖之處理中，可產生最高量之 IAA，其次則為阿拉伯糖和半乳糖 (表二)。

不同培養基質對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 產生吲哚乙酸之影響

利用 PDB、KB、NB、LB 及 TSB 等液態培養基作為培養 4 菌株之營養來源，培養兩天後利用 Salkowski 反應液偵測其 IAA 之濃度，結果顯示 4 菌株培養在 PDB 液態培養基中產生 IAA 濃度皆不佳；培養於 KB 液態培養基中，僅 Bg31 菌株產生之 IAA 濃度較高 (圖六)；各菌株培養於 LB 與 TSB 液態培養基有相類似之結果，皆可產生高濃度之 IAA，唯培養在 TSB 液態培養基之 IAA 產量優於 LB，故 TSB 為此 5 種液態培養基中最適合各菌株產生 IAA 之培養基質。

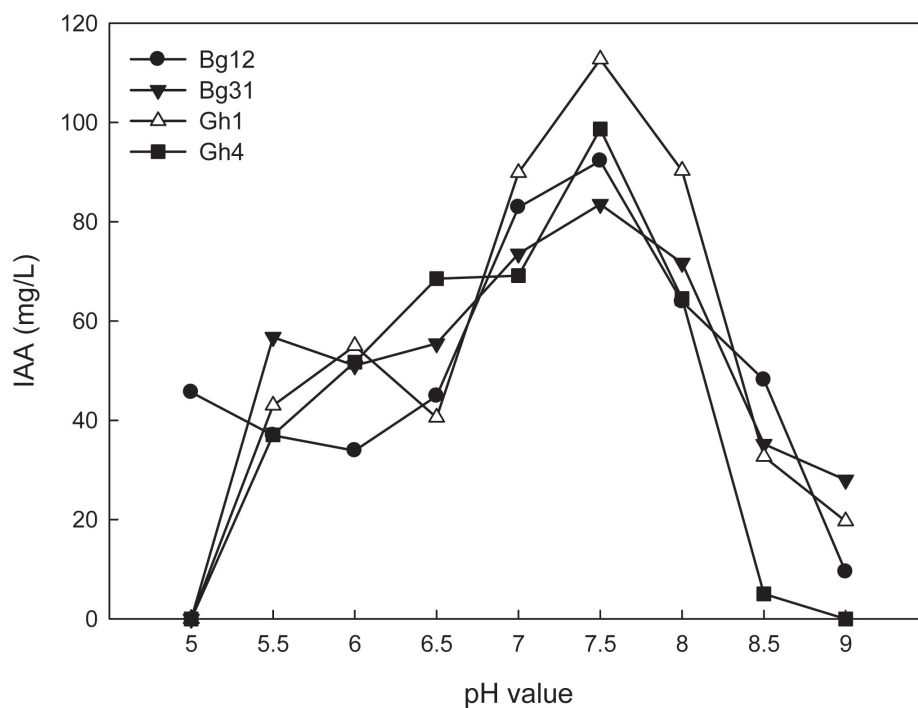
細菌菌株之細菌懸浮液與培養液對作物生長之影響

利用 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等 4 菌株之細菌懸浮液浸泡番茄、蘿蔔及甜瓜之種子，栽植於介質中 2 個星期後，發現 4 菌株並無明顯促進蘿蔔幼苗生長之



圖四、溫度對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響。

Fig. 4. Effect of temperatures on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31.



圖五、酸鹼值對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響。

Fig. 5. Effect of pH values on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31.

效果，其中 Bg12 菌株反而促使蘿蔔幼苗之鮮重輕於對照組；4 菌株皆可增加甜瓜之鮮重，其中 Bg31 菌株提升甜瓜植株鮮重之效果最佳；Gh4 與 Bg12 菌株有明顯提高番茄幼苗鮮重之效果，其中尤以 Bg31 菌株促進番茄生長的效果最佳 (表三)。此外，利用含色胺酸之 TSB 液態培養基震盪培養各菌株後，混拌介質後種植蘿蔔 3 個星期，發現以 Bg31 菌株可顯著促進蘿蔔幼苗之生育，Gh1 及 Gh4 菌株亦可促進種子之發芽，並使植株葉片較為肥大；唯 Bg12 菌株對於植株生育之影響較不明顯 (圖七)。

菌株培養液內 IAA 濃度對植物根系生長之影響

將 Bg31 菌株之 TSB 培養液及 IAA 標準品，加入 MS 植物營養液中，觀察其對蘿蔔幼苗根系發展之影響。結果發現原 TSB 培養液在濃度稀釋 10 及 100 倍時，均使蘿蔔之主根生長受到抑制。然而培養 Bg31 菌株之 TSB 處理蘿蔔幼苗後，可觀察到其側根之生長與 IAA 標準品之處理呈現類似之情形，即濃度較高之處理，其側根均呈現多且密集的現象 (無數據呈現)。

表一、氮素源對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸的影響

Table 1. Effect of nitrogen sources on production of IAA of bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31 in the culture broth for 2 days at 32°C

Nitrogen source ¹	IAA yield (mg/L)			
	Gh1	Gh4	Bg12	Bg31
Alanine	0	0	0	0
Arginine	0	0	0	0
Asparagine	0	0	0	0
Aspartic acid	0	0	0	0
Cysteine	0	0	0	0
Glutamic acid	0	0	0	0
Glycine	0	0	0	0
Histidine	0	0	0	0
Isoleucine	0	0	0	0
Leucine	0	0	0	0
Lysine	0	0	0	0
Methionine	0	0	0	0
Norleucine	0	0	0	0
Norvaline	0	0	0	0
Ornithine	0	0	0	0
Phenylalanine	0	0	0	0
Proline	0	0	0	0
Serine	0	0	0	0
Threonine	0	0	0	0
Tryptophan	10.2	6.17	11.44	8.12
Valine	0	0	0	0
NaNO ₃	0	0	0	0
None (CK1)	0	0	0	0
Cz+Try ² (CK2)	22.78	18.45	89.13	41.34
TSB+Try ² (CK3)	63.59	74.15	19.74	47.79

¹ 0.3 % (w/v) of each nitrogen source was added into basal medium (consisted of 3% sucrose, 0.1% dipotassium phosphate, 0.05% magnesium sulfate, 0.05% potassium chloride, and 0.001% ferrous sulfate).

² L-form tryptophan (final concentration of 500 mg/L) is added to Czapek's broth (Cz) or tryptic soy broth (TSB) to generate control medium 2 (CK2) or control medium 3 (CK3).

表二、碳素源對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸之影響

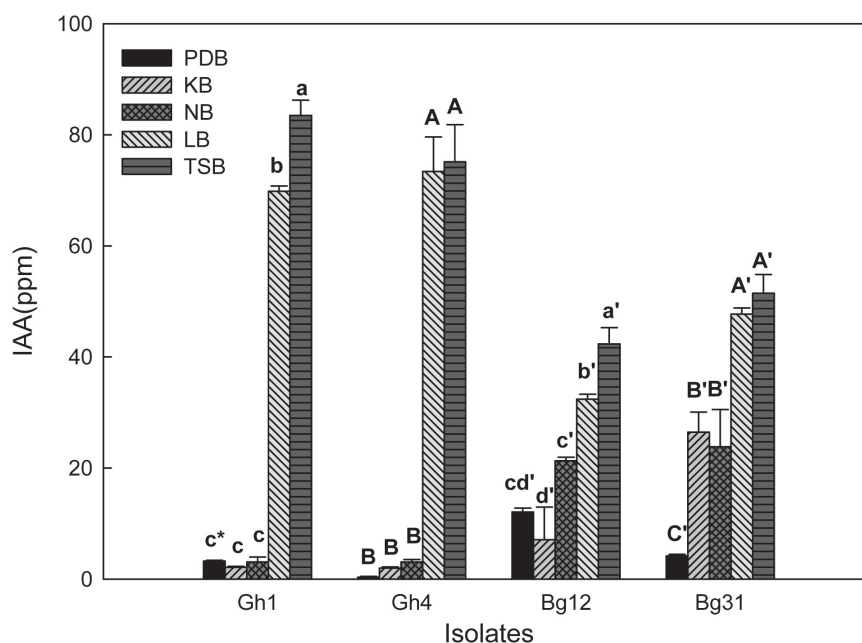
Table 1. Effect of carbon sources on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31 in the culture broth for 2 days at 32°C

Carbon source ¹	IAA yield (mg/L)			
	Gh1	Gh4	Bg12	Bg31
Arabinose	9.18d ³	0.71cd	0.15f	1.94cd
Fructose	8.32de	0.00d	12.01d	0.00def
Galactose	7.27e	0.00d	14.84c	1.71cde
Glucose	4.59fg	0.00d	7.05e	0.00f
Lactose	3.95fgh	0.42cd	15.72c	0.00f
Maltose	3.16gh	0.00d	1.87f	0.00f
Mannose	40.12a	0.00d	0.00f	0.72def
Ribose	4.77f	0.00d	0.00f	0.06ef
Sucrose	20.55c	1.21cd	12.22d	2.54c
Xylose	2.67hi	0.64cd	18.33b	0.00f
None (CK1)	0.00j	19.77a	0.00f	14.31b
Cz+Try ² (CK2)	1.54i	2.09c	42.68a	3.25ef
TSB+Try ² (CK3)	35.22b	12.37b	8.01e	32.32a

¹ 3 % (w/v) of each carbon source was added into basal medium (consisted of 0.3% tryptophan, 0.1% dipotassium phosphate, 0.05% magnesium sulfate, 0.05% potassium chloride, and 0.001% ferrous sulfate).

² L-form tryptophan (final concentration of 500 mg/L) is added to Czapek's broth (Cz) or tryptic soy broth (TSB) to generate control medium 2 (CK2) or control medium 3 (CK3).

³ Means (n=3) in the same column followed by the same letter are not different significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.



圖六、不同培養基質對 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株產生吲哚乙酸濃度之影響。

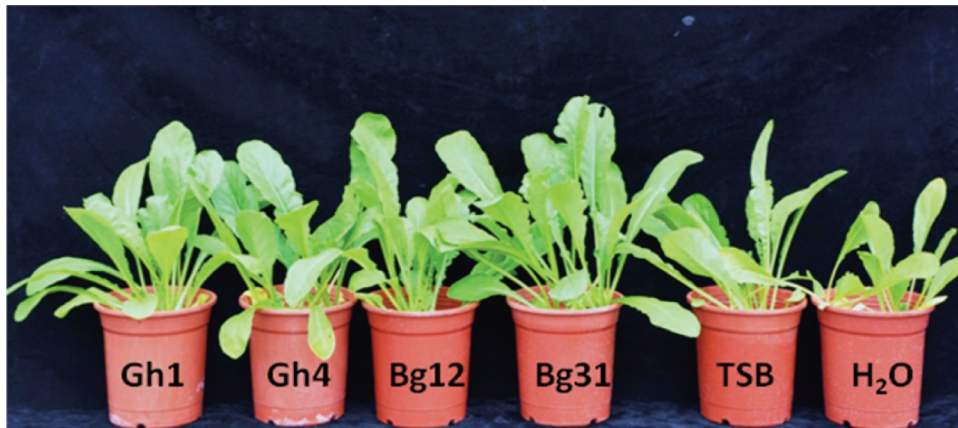
Fig. 6. Effect of nutrient regimes on production of IAA by bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermophilus* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistens* Bg31 for 2 days at 32°C. The mean of production of IAA by each bacterial strain grown in different culture broths is shown by different bar patterns. The bars with the same letters are not significantly different ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

表三、細菌菌株對作物生長之影響

Table 2. Effect of bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermoblucoisidarius* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistense* Bg31 on plant growth for 7 days in the greenhouse

Crop	Fresh weight (g/plant)				
	Gh1	Gh4	Bg12	Bg31	H ₂ O (CK)
Radish	1.2a ¹	1.35a	1.1a	1.37a	1.4a
Melon	0.76b	0.77b	0.7c	0.86a	0.64d
Tomato	0.17c	0.23b	0.25ab	0.28a	0.15c

¹ Means (n=5) in each crop followed by the same letter are not different significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.



圖七、四株細菌 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 菌株之培養液對蘿蔔植株生長之影響。

Fig. 7. Effect of TSB (tryptic soy broth)-culture filtrates of bacterial strains *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermoblucoisidarius* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistense* Bg31 on the growth of radish plants for 21 days in the greenhouse.

大豆酪蛋白培養基之組成分對 Bg31 菌株菌量增殖及產生吡啶乙酸之影響

將 TSB 液態培養基分別去除不同組成分後，培養 Bg31 菌株，結果發現去除胰化蛋白胨之培養液使 Bg31 菌株無法產生吡啶乙酸，而 Bg31 在去除大豆蛋白胨的培養液產生吡啶乙酸濃度，較對照組減少 3 ppm，其菌量濃度亦減少一半。Bg31 菌株在去除氯化鈉之培養液中，其產生吡啶乙酸之濃度及菌量之增殖，均較對照組高 (表四)，證明胰化蛋白胨是 TSB 培養液促進 Bg31 產生 IAA 之關鍵成分。

不同有機添加物對 Bg31 菌株菌量增殖及產生吡啶乙酸之影響

以 8 種有機添加物替代 TSB 中之胰化蛋白胨及大豆蛋白胨配製成培養基，比較 Bg31 菌株在這些培養液中菌量之增殖及產生 IAA 之情形，結果發現培養第 2 天時，僅花生粕之處理可使 Bg31 菌株產生 IAA，其餘添加物培養基質中均無 IAA 之產生。於菌量增殖方

面，亦是以花生粕促進 Bg31 菌株增殖之效果最佳，且與 TSB 培養液培養 Bg31 菌株之菌量相近 (表五)；培養第 7 天進行檢測時，仍僅花生粕之處理可使 Bg31 菌株產生 IAA (表五)。於添加澱粉類之結果，發現 Bg31 菌株於低筋麵粉、玉米粉、太白粉、在來米粉及糯米粉等 5 種澱粉類有機添加物之處理中，皆無 IAA 之產生。此外，利用低筋麵粉配製之液態培養對於 Bg31 菌株菌量增殖之效果最佳 (數據未呈現)。

討 論

本研究發現 Gh1、Gh4、Bg12 及 Bg31 等菌株在含有色胺酸之液態培養基中，均可以產生 IAA；同時發現色胺酸濃度、營養源及酸鹼值均可影響它們產生 IAA 之量。在溫室中，以這些具有產生 IAA 能力之菌株處理作物之種子或噴佈於作物之幼苗，發現各菌株均具有促進植株生育之效果，顯示它們擁有研製成生物性肥料之潛力。

表四、大豆酪蛋白培養液 (TSB) 去除不同組成份對 Bg31 菌株之菌量增殖及產生吲哚乙酸之影響

Table 3. Effect of different materials in tryptic soy broth on production of IAA by bacterial strain *Microbacterium resistense* Bg31 for 2 days at 32°C

Treatment ¹	IAA yield (mg/L)	Log cfu/ml
TSB-Tryptone	0.00d ²	10.93b
TSB-Soytone	19.08c	10.84b
TSB-NaCl	25.71a	11.40a
TSB (CK)	22.64b	11.00b

¹ TSB-Tryptone: tryptone was eliminated from tryptic soy broth; TSB-Soytone: soytone was eliminated from tryptic soy broth; TSB-NaCl; sodium chloride was eliminated from tryptic soy broth; TSB (CK): control.² Means (n=4) in the same column followed by the same letter are not different significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

表五、不同有機添加物對Bg31菌株菌量增殖及產生吲哚乙酸之影響

Table 4. Effect of various organic amendments on bacterial proliferation and production of IAA by bacterial strain *Microbacterium resistense* Bg31 in the basal broth for 2 and 7 days at 32°C

Treatment ¹	IAA (mg/L)		Log cfu/ml	
	2 nd day	7 th day	2 nd day	7 th day
Alfalfa hay meal	0	0	9.26c ²	9.32c
Casein	0	0	6.54d	6.38d
Castor bean pomace	0	0	9.94a	10.32a
Fish meal	0	0	9.57b	9.82b
Peanut seed pomace	1.17	7.97	10.20a	10.40a
Sea weed supreme	0	0	6.11bc	6.29bc
Sesame pomace	0	0	9.35bc	9.58bc
Tea seed pomace	0	0	3.30g	3.17f
None (CK1)	0	0	4.52f	4.42e
TSB (CK2)	10.14	17.54	10.10a	10.31a

¹ 2 % (w/v) of each organic amendment was added into basal medium (0.5% sodium chloride).² Means (n=3) in the same column followed by the same letter are not different significantly ($p=0.05$) according to Duncan's multiple range test.

菌類合成 IAA 之路徑，主要可分為需要色胺酸 (Tryptophan-dependent) 與不需色胺酸 (Tryptophan-independent) 兩種⁽⁷⁾。西元 1935 年，Thimann 氏⁽¹³⁾ 首先觀察到色胺酸 (tryptophan) 可使 *Rhizopus suinus* 合成 IAA 外，亦發現有些菌類可利用色胺酸調控 IAA 的產生。Bric 等人⁽²⁾ 曾以添加色胺酸之培養基快速篩選出具有產生 IAA 能力之菌株，顯示色胺酸在許多菌株產生 IAA 之過程中扮演著重要的角色。本研究模擬前人所述之試驗方法，發現色胺酸之濃度確實對 4 株菌株 IAA 的產量有決定性之影響。由於 Luria-Bertani broth (LB) 培養基為天然素材，營養較為複雜，於不添加色胺酸之環境下，4 菌株仍可產生 IAA，然而在後續以 Czapek's 培養液探討氮素源之試驗中，在無色胺酸

環境當中，所有測試之菌株均無 IAA 產生。顯示本試驗所測試的菌株其 IAA 合成的路徑應係為需要色胺酸 (Tryptophan-dependent) 的路徑。

作物種類⁽⁴⁾、培養時間長短⁽⁸⁾ 及土壤性質⁽¹¹⁾ 等因子均可影響菌種族群之建立，故在不同培養條件之測試中，各菌株皆有較適合之培養天數與溫度條件。本研究發現照光與否及酸鹼值可影響菌株產生 IAA 的濃度。IAA 在自然環境中，尤其在酸性之溶液及光照之情況下，會產生氧化作用，因而造成 IAA 不穩定⁽⁵⁾，故在較極端酸鹼值易造成 IAA 濃度之快速降解；比較無光照及有光照之條件下，發現培養時間越長會造成兩處理產生 IAA 的差異越大。尤其培養時間增長，培養液之酸鹼值會趨向酸化，促使 IAA 濃度加速下降。

在本研究結果發現不同碳氮素源會影響菌株之生長及代謝作用，其中以大豆酪蛋白液態培養基 (TSB) 最適於各菌株產生 IAA。若去除 TSB 培養液中不同成分，進而分析何種關鍵成分有助於菌株產生 IAA，結果發現 TSB 培養液中的 Tryptone 因富含有色胺酸，故有助於 4 菌株產生 IAA⁽¹²⁾。此外，TSB 培養液中之氯化鈉亦可影響 4 菌株之 IAA 產量與菌體之增殖。研究 4 菌株之細菌懸浮液與培養液對於作物生長發育的影響，結果發現浸泡各菌株之細菌懸浮液，對蘿蔔的生長情形並無差異；惟若施用各菌株的培養液後，則發現 Bg31 菌株可明顯使蘿蔔植株較為健壯且葉片較為肥厚，其他菌株則效果不彰。挑選各種蛋白質且富含有色胺酸之添加物與 TSB 液態培養基進行比較試驗，結果發現 Bg31 菌株培養在花生粕液態培養基中可顯著產生 IAA，且較 TSB 培養液更有利於菌量的增殖。比較澱粉類有機添加物對菌株的功效試驗，發現各澱粉類有機添加物皆無法使 4 菌株產生 IAA；此外，低筋麵粉對於菌量增殖之效果最佳，惟其效果僅為花生粕之 1/10，因此無需在前述配方中額外加入澱粉類的添加物。

在農業方面，通常利用 IAA 處理扦插植株或加入組織培養基中改善種苗的發育，由於 IAA 在水中和一般環境下較不穩定，因此在應用技術方面有其困難度。目前市面上常見之「發根粉或開根素」即採用較 IAA 穩定之類似物 NAA (1-naphthaleneacetic acid) 作為主要的成分⁽⁹⁾，以確保產品效果的安定性。本研究利用不同有機質製成的液態培養基培養 Bg31 菌株後，發現培養液中可以偵測到 IAA 的存在，同時亦有促進蘿蔔植株生長的功效。顯示 Bg31 菌株是一種具有被研製成生物肥料潛力的微生物。

謝 辭

本論文承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計劃 (97 農科 -14.2.1- 檢 -B4) 經費補助，使研究得以順利完成，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Atlas, R. M. 1993. Handbook of microbiological media. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1079 pp.
2. Bric, J. M., Bostock, R. M., and Silverstone, S. E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria Immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbiol. 57: 535-538.
3. Chen, M. C. 2009. Evaluation for development of a biofertilizer using rhizobacteria. Master thesis of National Chung Hsing University. 64pp. (in Chinese with English abstract)
4. Da Mota, F. F., Nóbrega, A., Marriel, I. E., Paiva, E., and Seldin, L. 2002. Genetic diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations isolated from the rhizosphere of four cultivars of maize (*Zea mays*) planted in Cerrado soil. Appl. Soil Ecol. 20: 119-132.
5. Dunlap, J. R. and Robacker, K. M. 1988. Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. Plant physiol. 88: 379-382.
6. Ehmann, A. 1977. The Van Urk-Salkowski Reagent - a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatograph detection and identification indole derivatives. J. Chromatogr. 132: 267-276.
7. Eisorra, E. I., Domingo, J. I., Manuel, T., and Rainer, B. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Mol. Plant. Microbe. In. 20: 619-626.
8. Halverson, L. J., Clayton, M. K., and Handelsman, J. 1993. Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybeans. Soil Biol. Biochem. 25: 485-493.
9. Kose, C. and Guleryuz, M. 2006. Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*). New Zeal. J. Crop Hort. 34: 145-150.
10. Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L. C., Höfte, M., and Bakker P. A. H. M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6: 177-185.
11. Seldin, L., Soares, R. A., da Crus, D. W., Nobrega, A., van Elsas, J. D., and Paiva, E. 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3860-3868.
12. Tetsu, H. 1981. Properties of amino acid composition of the tryptic fragments of the heavy chain of myosin subfragment. J. Biochem. 90: 785-788.
13. Thimann, K. V. 1935. On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. J. Biol. Chem. 109: 279-291.
14. Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., and Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 309-348.

ABSTRACT

Chen, M. C.¹, Lin T. C.¹, and Huang J. W.^{1,2} 2010. Factors affecting IAA production by rhizobacteria. Plant Pathol. Bull. 19: 201-212. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ² Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-2285-1676)

The factors affecting indole acetic acid (IAA) production by four rhizobacterial isolates, i.e. *Paenibacillus polymyxa* Gh1, *Geobacillus thermoblucosidasius* Gh4, *Bacillus megaterium* Bg12 and *Microbacterium resistense* Bg31, were studied. The amount of IAA produced by the bacteria grown under illumination conditions was reduced significantly at 96 hpi (hours post incubation) in comparison with dark treatment. Under dark conditions, the yield of IAA was rapidly increased at for 48 hpi. The optimal temperature for IAA production was 28°C for strain Bg31, 32°C for strains Gh1 and Gh4, and 36°C for strain Bg12, and the 4 tested strains produced the highest amount of IAA at pH of 7.5. The L-form tryptophan was the key nitrogen source for the tested strains to produce IAA, and the quantity of IAA was increased by increasing the concentration of tryptophan in the culture medium. The effect of carbon sources on IAA production varied among different bacterial strains. Among the selected commercial media, tryptic soy broth (TSB) showed to contain the optimal combination of ingredients for the 4 bacterial strains to produce IAA and to increase their biomass. Seeds of tomato, melon and radish soaked in bacterial cell suspension and sown in peat moss were evaluated for their growth. The results indicated that Bg31, Gh1 and Gh4 could promote the growth of melon and tomato seedlings. When bacterial biomass was mixed with peat moss prior seed sowing, only TSB-cultivated Bg31 promoted the growth of radish seedlings. *In vitro* experiments showed that TSB-cultivated Bg31 promoted the development of lateral roots of radish seedlings, which was similar to the effect of IAA on root development.

Keywords: rhizosphere bacteria, indole-3-acetic acid, tryptic soy broth, radish, peanut seed pomace