

Bacillus mycoides CHT2402 對萵苣幼苗 生長之影響

陳和緯¹ 林盈宏¹ 黃振文¹ 張碧芳^{1,2}

¹ 台中市 國立中興大學 植物病理學系

² 聯絡作者，電子郵件：pfchang@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2286-0442

接受日期：中華民國 99 年 8 月 9 日

摘要

陳和緯、林盈宏、黃振文、張碧芳. 2010. *Bacillus mycoides* CHT2402 對萵苣幼苗生長之影響. 植病會刊 19: 157-165.

植物根圈促生細菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 可分泌植物生長的調控因子，如植物荷爾蒙，來活化根部的代謝作用，或是藉由分泌抗生物質、嵌鐵物質、競爭生態位與養份及誘導植株抗性等作用來避免或降低植物遭受病原菌侵害之機率，進而維持或促進植物生長。本研究中發現蕈狀芽孢桿菌 *Bacillus mycoides* (BM) CHT2402 具有產生吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 與氨 (NH₃) 之特性，若施用 BM CHT2402 菌株於不同作物上觀察其促進作物生長的能力，我們發現栽植番茄、西瓜及萵苣植株於 BM CHT2402 的細菌懸浮液混拌介質中三週後，可增加植株鮮重，且其中以萵苣明豐三號品種效果最佳。但若嘗試以澆灌法施用 BM CHT2402 細菌懸浮液於番茄、西瓜及萵苣植株時，此促生細菌則無促進植物生長之效果。此外若將萵苣三品種種子播種於 BM CHT2402 混拌介質中，萵苣植株的生長明顯提高，但促進效果卻因不同品種而有所差異。

關鍵詞：植物根圈促生細菌、蕈狀芽孢桿菌、萵苣

緒 言

將根圈細菌外加到農業生態系統中，使植株生長發育良好，具有此特性的細菌稱為植物根圈促生細菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)⁽⁵⁾，其中包含 *Aeromonas* spp.、*Azoarcus* spp.、*Azospirillum* spp.、*Azotobacter* spp.、*Arthobacter* spp.、*Bacillus* spp.、*Clostridium* spp.、*Enterobacter* spp.、*Gluconacetobacter* spp.、*Klebsiella* spp.、*Pseudomonas* spp. 及 *Serratia* spp. 等菌⁽²¹⁾。PGPR 促進植物生長的機制可被粗略分為兩大類，一是直接的促進效用，此類 PGPR 可分泌植物生長的調控因子來活化根部的代謝作用，如植物荷爾蒙吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、吉貝素 (gibberellins, GA) 及植物生長素 (cytokinin) 等^(2, 3)，或是協助根部吸收營養。另一類則為間接的促進效用，此類 PGPR 可藉由分泌抗生物質 (antibiotic)、嵌鐵物質 (siderophores)、或利用競爭生態位與養份及誘導植株抗性 (induced

resistance) 等作用來避免或降低植物遭受病原菌侵害的機率^(10, 23)。

目前 PGPR 已廣泛被應用來促進植物之生長發育或防治特定病害，如在玉米 (*Zea mays* L. cv. Elita) 幼苗上施用 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 之稀釋培養濾液 (culture filtrates)，經分析，該濾液內含有類似吲哚乙酸 (IAA-like) 之化合物，因此經證實可促進玉米幼苗的生長⁽¹³⁾；若在辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 上施用可生成 GA 的 *B. cereus* MJ-1 或 *B. macroides* CJ-29 之細菌懸浮液，則可發現該懸浮液能增加其根部之鮮重⁽¹⁶⁾；而 *Serratia marcescens* 90-166 或 *B. pumilus* SE34 之細菌懸浮液經證實可誘導阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) 植株對胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 之抗性⁽²²⁾；此外，黃氏⁽¹²⁾ 指出單獨施用 *Bacillus* spp. (CHB103、CHB139 或 CHB184 菌株)，或將上述菌株與 CH100-S 植物健素漿劑共同施用在高苣上

皆可促進植株生長並降低由高苜蓿凋病菌 (*Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *lactucaae* Matuo et Motohashi) 引起的高苜蓿凋病之罹病度。

Bacillus mycooides 最早於 1886 由 Flüggé 氏所描述分類，而在 1946 年時被分類為 *B. cereus* var. *mycooides*⁽⁹⁾，到了 1986 年又被重新分類為 *B. mycooides*⁽⁷⁾。丁氏⁽⁸⁾也指出，*B. mycooides* CHT2402 (BM CHT2402) 可促進番茄植株生長，且利用此菌於 5% (w/v) 玉米粉或 5% (w/v) 黃豆粉培養後的培養液混拌入土壤介質中，則可發現若以此介質種植番茄，可降低由番茄萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans) 引起的番茄萎凋病之發生機率。

因此，根據上述 PGPR 的特性與效果，本研究擬利用經證實可促進番茄植株生長的 BM CHT2402 施用於番茄、西瓜及高苜蓿等不同的作物上，觀察此 PGPR 是否具有促進上述植株生長的效果。

材料與方法

供試菌株來源與培養

將蕈狀芽孢桿菌 *Bacillus mycooides* 編號 CHT2402 菌株 (以下簡稱 BM CHT2402) 從胰蛋白大豆瓊脂培養基 (Tryptic Soy Agar, TSA, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) 平板中取單一菌落，以劃線平板方式更新培養於 TSA 培養基上，置於室溫 (約 25°C) 中生長，另將單一菌落以 20% 無菌甘油 (glycerol) 保存於 -20°C 中，每隔四週至五週取更新培養單一菌落於 TSA 培養基上備用。

供試植株

本研究使用的供試植物有五種，分別為番茄農友 301 品種 (*Solanum lycopersicum* L. cv. Farmers 301, KNOWN-YOU SEED Co., Ltd., Kaohsiung, Taiwan)、西瓜藍寶品種 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai cv. Grand Baby, KNOWN-YOU SEED Co., Ltd., Kaohsiung, Taiwan)、高苜蓿明豐三號品種 (*Lactuca sativa* L. cv. Ming-feng NO. 3, Ming-feng Co., Ltd., Taichung, Taiwan)、高苜蓿圓葉品種 (*L. sativa* L. cv. Round-leaf, Ming-feng Co., Ltd., Taichung, Taiwan) 及高苜蓿 Black seeded simpson 品種 (*L. sativa* L. cv. Black seeded simpson, 由長榮大學生物科技系陳裕星博士提供)。將所有供試種子置於流動活水催芽兩天後，把種子種植於含有栽培介質 BVB No. 4 (Bas Van Buuren Co., Ltd., Maasland, Holland) 的 45 孔圓形育苗穴盤中 (每孔穴約

為 4.5 cm×4.5 cm×4.5 cm)，每孔穴播一顆種子，置於 25°C 定溫生長箱中生長，每天給予 13 小時光照 (四根旭光牌日光燈管 F34SP65, Taiwan Fluorescent Lamp Co., Ltd., Hsinchu, Taiwan)，每天定時澆水以保持植株生長穩定。

BM CHT2402 的 PGPR 特性分析

吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 分析：

修改自 Gordon 與 Weber 兩氏之方法⁽¹¹⁾，刮取 BM CHT2402 菌落至 LB 培養液 (Luria broth, LB, Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain) 中，放置於 37°C 下無光照培養約 8 至 12 小時後，將此菌液利用分光光譜儀 (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) 偵測波長 620 nm 的吸光值，取讀值 0.4 至 0.8 之間的培養液，再以 LB 稀釋上述培養液並定量讀值在 0.3±0.01。接著將此定量後之菌液取 10 µl 加入 6 ml 含 500 ppm 色氨酸 (L-tryptophan) 的 LB 培養液中，置於 37°C 下無光照培養兩天後，取出 2 ml 菌液移至 2 ml 離心管 (Microtube, Axygen Scientific, Inc., Union city, CA, USA) 中，再以 10,000×g 高速離心 10 分鐘 (Sorvall Legend MACH 1.6 R, Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA, USA) 後，取 0.4 ml 上清液到 1.6 ml Salkowaki 反應液 (10 ml Dist. H₂O, 6 ml 98% H₂SO₄, 0.3 ml 0.5 M FeCl₃·6 H₂O) 中，混勻後置於無光照環境下反應 30 分鐘，後利用分光光譜儀 (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) 偵測波長 530 nm 的吸光值，將此讀值對照 IAA (indole-3-acetic acid, Sigma-Aldrich Inc., Stenheim, Germany) 繪製成的標準曲線即可求得該菌產 IAA 的濃度 (parts per million, ppm)。本處理重複三次，每次重複至少三個樣品。

產氨 (NH₃) 能力分析：

修改自 Islam 氏等人之方法⁽¹⁴⁾，將 BM CHT2402 培養於 10 ml 的 4% 蛋白胍 (peptone) 中，置於 37°C 培養兩天，接著加入 0.5 ml 的納氏試劑 (Nessler's reagent, Sigma-Aldrich Inc., Stenheim, Germany)，觀察是否出現褐色到黃色的顏色變化，以判斷該菌是否有產氨的能力，本處理三重複，每次重複至少三個樣品。

產氰化物 (HCN) 能力分析：

修改自 Lorck 氏之方法⁽¹⁹⁾，在製備 TSA 培養基時加入甘胺酸 (4.4 g/L glycine, Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, USA)，並將 BM CHT2402 培養於其上，另取一濾紙，將其浸泡在內含 0.5% 苦味酸 (picric acid, Panreac, Barcelona, Spain) 與 2% 碳酸鈉 (Na₂CO₃, Bio

Basic Inc., Toronto, Canada) 的溶液中，接著把濾紙置於培養基的上蓋，以石蠟膜封住，置於室溫培養四天後，觀察濾紙是否出現橘色到紅色的顏色變化，以判斷該菌是否有產氰化物的能力。本處理三重複，每次重複至少三個樣品。

幾丁質分解酵素 (chitinase) 活性分析：

綜合自 Johnston 與 Booth 兩氏⁽¹⁵⁾ 以及 Lingappa 與 Lockwood 兩氏⁽¹⁸⁾ 的方法製備的查派克改良培養基 [modified Czapek-Dox Agar, CDA, 2 g/L NaNO₃, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L FeSO₄ · 7 H₂O, 0.5 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, 30 g/L sucrose, 0.1% (w/v) colloidal chitin, 15 g/L agar]，將 BM CHT2402 培養於室溫兩天，觀察是否出現透化圈以判斷該菌是否具幾丁質分解酵素之能力。本處理三重複，每次重複至少三個樣品。

溶磷 (Phosphate solubilization) 能力分析：

參照 Pikovskaya 氏的方法⁽²⁰⁾，配製 Pikovskaya's medium (0.5 g/L yeast extract, 10 g/L dextrose, 5 g/L CaPO₄, 0.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.2 g/L KCl, 0.1 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, 0.1 mg/L MnSO₄, 0.1 mg/L FeSO₄ · 7 H₂O, 15 g/L agar)，將 BM CHT2402 培養於室溫兩天，觀察是否出現透化圈以判斷該菌是否具溶磷能力。本處理三重複，每次重複至少三個樣品。

BM CHT2402 對植株生長之影響

混拌栽培介質施用：

將培養於 TSA 培養基二至五天的 BM CHT2402 利用無菌棉棒刮取一皿的菌落至無菌水 (約 400 ml) 中，配製成細菌懸浮液，將懸浮液與栽培介質 BVB No. 4 (約 1.4 Kg) 混拌均勻後備用，對照組以無菌水混拌。取 0.1 g 混拌介質進行 10 倍系列稀釋，將稀釋液取 0.1 ml 塗佈於 TSA 培養基上，以確認每克混拌介質中 BM CHT2402 的菌量達到 10⁸ cfu。將番茄、西瓜及萵苣 Black seeded simpson 品種與明豐三號品種之種子以流動活水催芽兩天後，直接播種於含混拌介質的 45 孔圓形育苗穴盤中 (每孔穴約為 4.5 cm×4.5 cm×4.5 cm)，播種三週後將植株根部洗淨，以吸水紙吸乾後，測量植株鮮重。本處理重複三次，每次重複至少 12 株。

澆灌施用：

將培養於 TSA 培養基二至五天的 BM CHT2402 利用無菌棉棒刮取菌落於無菌水中，配製成細菌懸浮液，此懸浮液利用分光光譜儀 (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) 偵測波長 620 nm 的讀值，調整菌液濃度至讀值

為 0.3±0.01 (此時菌量濃度約為 10⁸ cfu/ml)。將此定量之細菌懸浮液直接澆灌於播種番茄、西瓜及萵苣 Black seeded simpson 品種與明豐三號品種三天後的 45 孔圓形育苗穴盤 (每孔穴約為 4.5 cm×4.5 cm×4.5 cm) 中，對照組以無菌水澆灌，每孔穴澆灌 10 ml，共澆灌一次，播種三週後將植株根部洗淨，以吸水紙吸乾後，測量植株鮮重。本處理重複三次，每次重複至少 11 株。

不同萵苣品種之生長分析：

將栽培介質分為一般介質與經由高壓滅菌釜滅菌處理 (121°C, 1.2 Kg/cm², 20 min) 之介質，並分別以上述 BM CHT2402 混拌栽培介質法製備，將 Black seeded simpson、明豐三號及圓葉萵苣品種之兩天大催芽苗，直接播種於含上述各栽培介質的 45 孔圓形育苗穴盤 (每孔穴約為 4.5 cm×4.5 cm×4.5 cm) 中，播種三週後將植株根部洗淨，以吸水紙吸乾後，測量植株之株高、葉片數、植株鮮重。本處理重複三次，每次重複至少 16 株。

結 果

BM CHT2402 菌株的 PGPR 特性分析

為了解供試之 BM CHT2402 菌株具有哪些 PGPR 特性，本研究分析其產生 IAA、NH₃、氰化物、幾丁質分解酵素與溶磷的能力，結果顯示 BM CHT2402 具有產生 IAA 與 NH₃ 的能力，不具產生氰化物、幾丁質分解酵素及溶磷的能力 (表一)。另 BM CHT2402 於每毫升的培養液中能產生 3.76±1.77 ppm 的 IAA (表一)。

表一、*Bacillus mycoides* CHT2402 菌株之 PGPR 特性分析

Table 1. *In vitro* test of the PGPR characteristics of *Bacillus mycoides* CHT2402 strain

Property	Activity ¹
IAA production	+ ²
NH ₃ production	+
HCN production	-
Chitinase production	-
Phosphate solubilization	-

¹ +: activity present, -: activity absent

² IAA concentration 3.76 ± 1.77 ppm/ml

BM CHT2402 菌株對植株生長之影響

混拌栽培介質施用：

為測試以混拌方式施用 BM CHT2402 於栽培介質中是否可促進不同作物的生長，將已催芽種子種植於以 BM CHT2402 混拌的栽培介質中三週後，番茄、西瓜及萵苣等供試植株鮮重皆有增加的趨勢，經統計結果發現：此混拌介質對萵苣明豐三號品種與番茄農友 301 品種，其增加鮮重的效果最為顯著，相對於對照組可分別提升約 42% 與 17% 的植株鮮重。至於萵苣 Black seeded simpson 品種與西瓜藍寶品種則可分別觀察到提升約 20% 與 7% 的植株鮮重 (圖一)。

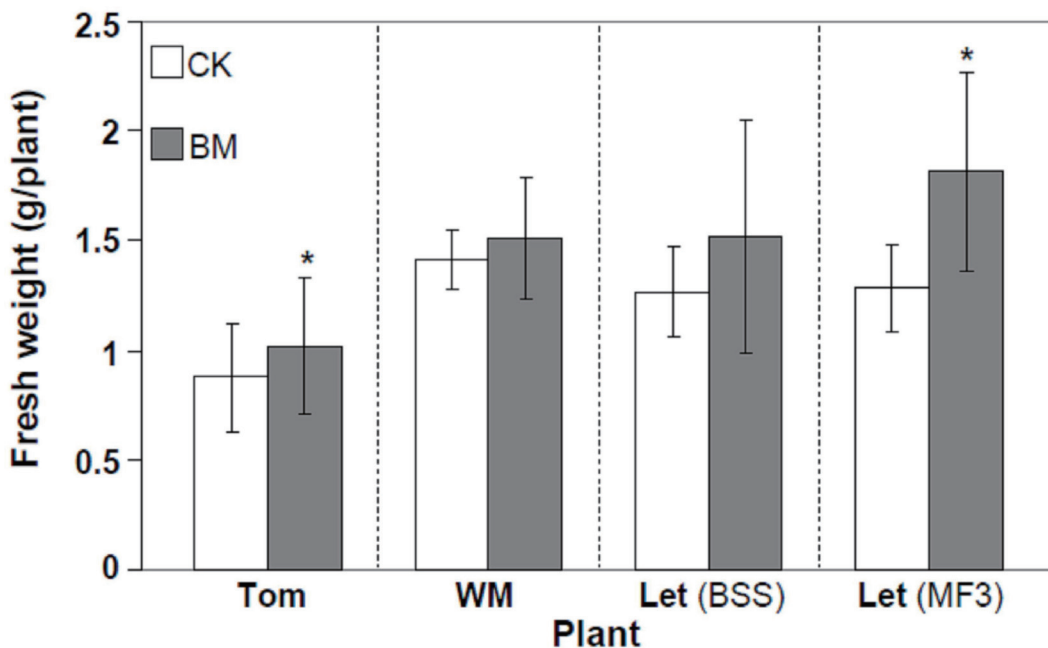
澆灌施用：

為測試 BM CHT2402 是否能以澆灌方式施用於栽培介質中並促進不同作物的生長，因此本研究將 BM CHT2402 以澆灌方式施用於播種三天後之植株，並於播種三週後測量植株鮮重，結果顯示：以澆灌方式施用 BM CHT2402 並未能促進供試作物生長的趨勢，甚

至對於番茄農友 301 品種與萵苣 Black seeded simpson 品種反而有降低其植株鮮重的結果，其中以萵苣 Black seeded simpson 品種相較於對照組降低鮮重約 7% 為最多，但此結果經統計分析後，此差異並不顯著 (圖二)。

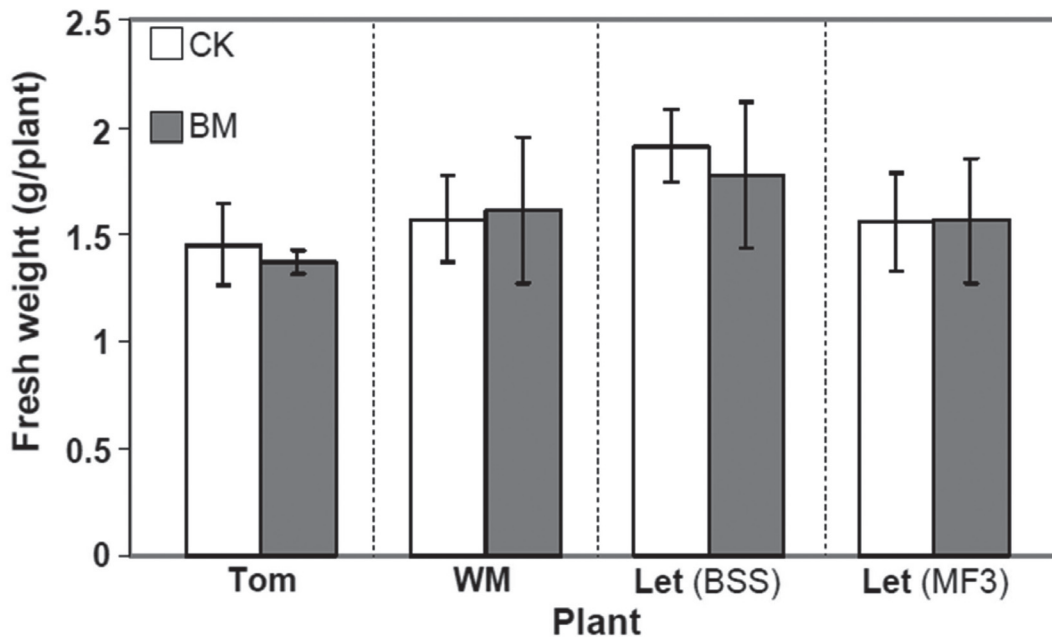
不同萵苣品種之生長分析：

為測試 BM CHT2402 以混拌方式施用於栽培介質中是否仍可促進不同萵苣品種的生長，並觀察栽培介質經由高壓滅菌後是否影響植株生長與 BM CHT2402 促進植株生長的能力。因此本研究將不同萵苣品種之已催芽種子種植於以 BM CHT2402 混拌的栽培介質或混拌的滅菌栽培介質三週後，Black seeded simpson 品種在 BM CHT2402 混拌栽培介質處理中，其株高與植株鮮重有顯著提升 (圖三 A、C)，相對於對照組可分別增加約 6% 與 18%，但葉片數的差異並不顯著 (圖三 B)；BM CHT2402 混拌滅菌栽培介質處理中，其株高顯著降低 (圖三 A)，相對於對照組減少了約 5%，而葉片數與植株鮮重相對於對照組的差異並不顯著 (圖三 B、C)，僅管在植株鮮重部份，BM CHT2402 混拌滅菌



圖一、以 *Bacillus mycoides* CHT2402 懸浮液混拌之栽培介質對不同作物鮮重 (Fresh weight) 的影響。將催芽後之番茄 (Tom)、西瓜 (WM) 及 Black seeded simpson (BSS) 與明豐三號 (MF3) 兩種品種的萵苣 (Let) 種子分別播種於 *B. mycoides* CHT2402 之混拌處理的介質中，於生長箱種植 21 天後測量各植株的鮮重。植株鮮重以學生 t 檢定 (Student's t-test) 進行統計分析，當其 P-value < 0.05 時，則顯示試驗組具顯著統計差異並於圖內以 * 表示。CK：水處理；BM：*B. mycoides* CHT2402 處理。

Fig. 1. Effects of media mixed with *Bacillus mycoides* CHT2402 suspensions on the fresh weight of different plants grown in growth chamber. Germinated seeds of tomato (Tom), watermelon (WM), and two cultivars (Black seeded simpson cultivar, BSS; and Ming-feng NO. 3 cultivar, MF3) of lettuce (Let) were sowed in media mixed with *B. mycoides* CHT2402. The fresh weight of each plant was measured 21 days after grown in growth chamber. The values were analyzed by Student's t-test and P-value < 0.05 (labeled as *) indicates significant difference. CK: water control; BM: *B. mycoides* CHT2402 treatment.



圖二、以 *Bacillus mycooides* CHT2402 懸浮液澆灌處理後對不同作物鮮重 (Fresh weight) 的影響。將催芽後之番茄 (Tom)、西瓜 (WM) 及 Black seeded simpson (BSS) 與明豐三號 (MF3) 兩種品種的萵苣 (Let) 種子分別種植於生長箱，於播種後三天以 *B. mycooides* CHT2402 懸浮液澆灌處理一次，並於播種後 21 天測量各植株的鮮重。植株鮮重以學生 t 檢定 (Student's t-test) 進行統計分析，當其 P-value < 0.05 時，則顯示試驗組具顯著統計差異，但所有試驗組與對照組於統計上無顯著差異。CK：水處理；BM：*B. mycooides* CHT2402 處理。

Fig. 2. Effects of media irrigated with *Bacillus mycooides* CHT2402 suspensions on the fresh weight of different plants grown in growth chamber. Germinated seeds of tomato (Tom), watermelon (WM), and two cultivars (Black seeded simpson cultivar, BSS; and Ming-feng NO. 3 cultivar, MF3) of lettuce (Let) were sowed in media and grew in growth chamber for 3 days, and then irrigated with *B. mycooides* CHT2402 once. At 21 days after sowing, the fresh weight of each plant was measured. The values were analyzed by Student's t-test and P-value < 0.05 (labeled as *) indicates significant difference, but no data set indicates significant difference. CK: water control; BM: *B. mycooides* CHT2402 treatment.

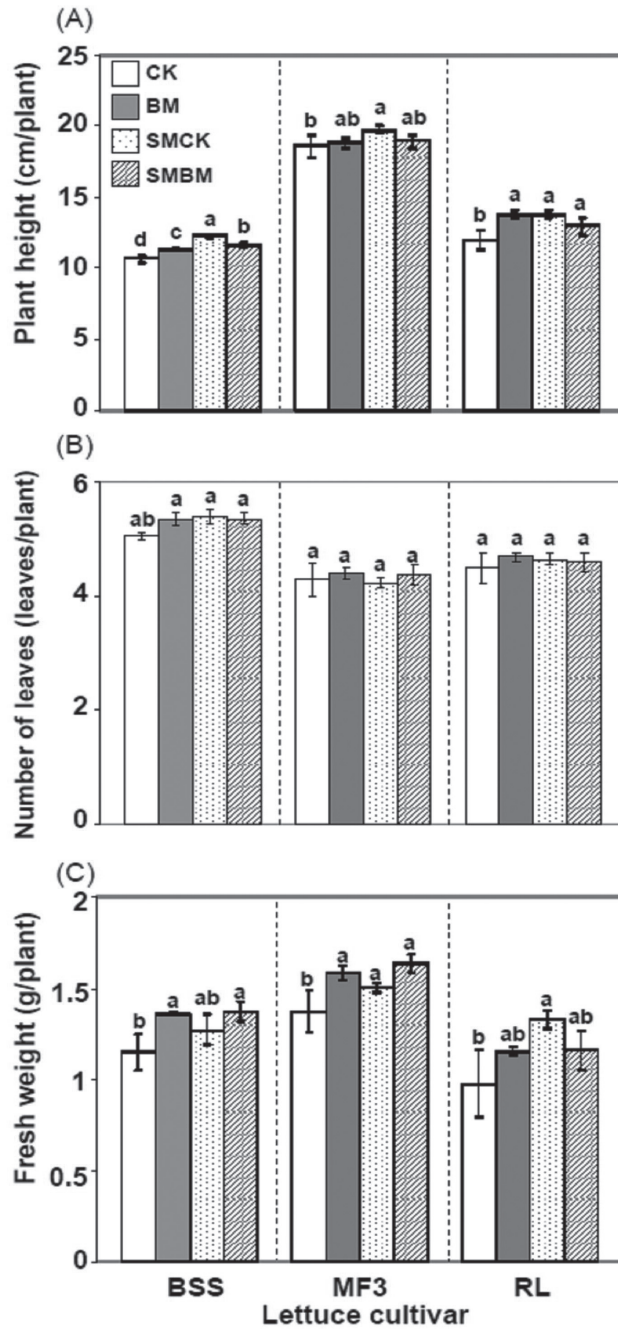
栽培介質組與 BM CHT2402 混拌栽培介質組的株重相似，且相較於栽培介質對照組皆有顯著差異，但相較於滅菌栽培介質對照組的差異不顯著 (圖三 C)。

明豐三號品種在 BM CHT2402 混拌栽培介質處理中，其株高與葉片數差異並不顯著 (圖三 A、B)，而植株鮮重有顯著提升 (圖三 C)，相對於對照組可增加約 16%；BM CHT2402 混拌滅菌栽培介質處理中，其株高、葉片數與植株鮮重相對於對照組的差異皆不顯著，雖然此處理中的植株鮮重為各組中最高 (圖三)。

圓葉品種在 BM CHT2402 混拌栽培介質處理中，其株高有顯著提升 (圖三 A)，相對於對照組可增加約 15%，而葉片數與植株鮮重的差異並不顯著 (圖三 B、C)；BM CHT2402 混拌滅菌栽培介質處理中，其株高、葉片數與植株鮮重相對於對照組的差異皆不顯著 (圖三)。

討論

已知不同的 PGPR 可有效促進不同植物的生長發育，而 PGPR 促進植物生長發育的原因經推測乃是 PGPR 能產生植物荷爾蒙或降低病原菌危害的機率^(2, 3, 5, 10, 23)。*Bacillus* spp. 為 PGPR 中被廣泛利用的菌種之一。其中 *B. mycooides* CHT2402 在番茄上經證實可促進植株生長，且將 *B. mycooides* CHT2402 與 5% (w/v) 玉米粉或 5% (w/v) 黃豆粉培養後的菌液混拌到土壤後種植番茄，可降低番茄萎凋病的發生⁽⁸⁾。本研究主要探討 BM CHT2402 是否具備 PGPR 的特性，且是否有能促進其他作物生長之能力。將 BM CHT2402 混拌栽培介質後種植不同植物，可發現其具有促進各種作物生長的趨勢，特別在萵苣明豐三號品種上最為顯著，植株鮮重可明顯提升約 42%。依此法施用後，BM CHT2402 可提昇植株鮮重的現象與丁氏⁽⁸⁾於番茄上所觀察到的結果



圖三、以 *Bacillus mycooides* CHT2402 懸浮液混拌栽培介質或混拌滅菌介質處理種植三週後對不同高苣品種之株高 (Plant height)、葉片數 (Number of leaves) 與鮮重 (Fresh weight) 的影響。將高苣 Black seeded simpson (BSS) 品種、明豐三號品種 (MF3) 與圓葉品種 (RL) 之種子分別播種於 *B. mycooides* CHT2402 懸浮液之混拌處理的介質或混拌滅菌介質中，於生長箱種植三週後測量各植株的株高、葉片數與植株鮮重。株高、葉片數與植株鮮重以鄧肯式測試 (Duncan's multiple range test) 來進行統計分析。CK：水處理；BM：*B. mycooides* CHT2402 處理。SMCK：滅菌介質以水處理；SMBM：滅菌介質以 *B. mycooides* CHT2402 處理。

Fig. 3. Effects of media or sterilized media mixed with *Bacillus mycooides* CHT2402 suspensions on the plant height, number of leaves, and fresh weight of different cultivars of lettuce grown in growth chamber for three weeks. Germinated seeds of three cultivars (including Black seeded simpson, BSS; Ming-feng NO. 3, MF3; and Round-leaf, RL) of lettuce were sowed in media or sterilized media mixed with *B. mycooides* CHT2402. The plant height, number of leaves, and fresh weight of each plant were measured three weeks after grown in growth chamber, and the values were analyzed by Duncan's multiple range test. Data sets with different letter are significantly different according to Duncan's multiple range test. CK: water control; BM: *B. mycooides* CHT2402 treatment; SMCK: water control of sterilized media; SMBM: *B. mycooides* CHT2402 treatment of sterilized media.

相似。Ahmad 氏等人⁽¹⁾以產生 IAA、NH₃、HCN、嵌鐵物質、溶磷能力及拮抗真菌等特性作為篩選土壤中具有促進植物生長特性之根圈細菌的依據。而在 *Azotobacter* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Mesorhizobium* spp.、及 *Bacillus* spp. 共 72 株供試菌株中，有 55 株的菌株具有產生 IAA 的能力且所有的菌株都有產生 NH₃ 的能力。Joseph 氏等人⁽¹⁷⁾以產生 IAA、NH₃、嵌鐵物質、及過氧化氫酶 (Catalase) 等特性作為篩選土壤中具有促進植物生長特性之根圈細菌的依據。而在 *Azotobacter* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Rhizobium* spp.、及 *Bacillus* spp. 共 150 株供試菌株中，有 145 株的菌株具有產生 IAA 的能力且其中 115 株菌株都有產生 NH₃ 的能力。Castro 氏等人⁽⁴⁾將捲葉羽衣甘藍 (*Brassica oleracea* L. cv. Arsis, curly kale) 分別種植於含有 0、4 及 8 μl/L 氣態 NH₃ 的生長箱中，培養液中不含有硝化鹽 (nitrate) 的處理中可發現種植於 4 及 8 μl/L 氣態 NH₃ 的植株，其莖部的鮮重相較於對照組有顯著的增加；而根部的鮮重在 4 μl/L 氣態 NH₃ 的植株相較對照組沒有差異，但在 8 μl/L 氣態 NH₃ 的植株其根重有顯著減少的情形。而本研究所使用的 BM CHT2402 具有產生 IAA 與 NH₃ 的能力，此類普遍的 PGPR 特性推測應與 BM CHT2402 促進萵苣生長相關。

若以混拌栽培介質法施用 PGPR 在實際田間應用上有其實行的困難度，故本研究嘗試使用較簡便的澆灌法施用 BM CHT2402，以利日後推行應用，結果顯示混拌栽培介質法與澆灌法相比，以澆灌法施用 BM CHT2402 並無法促進植物生長。Chakraborty 氏等人⁽⁶⁾以澆灌法施用 *B. megaterium* TRS-4 於茶上，每 15 天澆灌一次 10⁶ cfu/ml 的細菌懸浮液，則可增進茶的株高、分枝數及其葉片數。而適合以澆灌施用 BM CHT2402 來防治病害的作物及其施用周期與用量等方法，仍需進一步實驗測試。

以混拌方式施用 BM CHT2402 後可促進萵苣植株株重的增加，而此方法若施用於三種不同萵苣品種，其結果顯示以混拌栽培介質方式可顯著的提升 Black seeded simpson 品種的株高與植株鮮重，並能提高明豐三號品種的植株鮮重與圓葉品種的株高。顯示 BM CHT2402 可有效的促進不同品種的萵苣植株之生長，且促進程度會因不同品種而異。此外，以滅菌介質對照組種植萵苣相較於栽培介質對照組，滅菌過的介質可顯著提升各萵苣的株高 (三種萵苣品種) 與植株鮮重 (明豐三號與圓葉品種)，而此現象在 BM CHT2402 混拌處理的栽培介質組與其滅菌介質組之間相較，只在 Black seeded simpson 品種的株高出現滅菌介質組促進生長的差異。滅菌後的栽培介質可促進萵苣植株的生長勢，此一現象推測為介質中的微生物相會與該植物體競爭介質

中的養分或對植物體有不良影響，而在介質滅菌後因無此因子存在，故使植株生長勢增加；或是因為滅菌後的介質中，原本的微生物死亡後導致介質中的養分增加所導致。而 BM CHT2402 混拌處理後促進萵苣生長勢的現象卻不因介質滅菌後可促進植株生長勢所影響，可見 BM CHT2402 促進萵苣生長的效果應和 BM CHT2402 與介質內微生物的交互作用息息相關。

謝 辭

本研究經費承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫【99農科-9.3.1-檢-B2(6)】、教育部發展國際一流大學及頂尖研究中心計畫與國立中興大學共同補助，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
2. Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
3. Bottini, R., Cassán, F., and Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 497-503.
4. Castro, A., Stulen, I., Posthumus, F. S., and De Kok, L. J. 2006. Changes in growth and nutrient uptake in *Brassica oleracea* exposed to atmospheric ammonia. *Ann. Bot.* 97: 121-131.
5. Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., and Jurkevitch, Y. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 1-11.
6. Chakraborty, U., Chakraborty, B., and Basnet, M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *J. Basic Microbiol.* 46: 186-195.
7. Claus, D., and Berkeley, R. C. W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. Pages 1105-1139 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
8. Ding, P. F. 2006. Identification for biocontrol agents of tomato Fusarium wilt and evaluation for their potential biocontrol ability. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 64 pp. (In Chinese with English Abstract).

9. Gibson, T., and Gordon, K. E. 1974. Genus *Bacillus* Cohn 1872, Pages 529-550 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
10. Glick, B. R., and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.
11. Gordon, S. A., and Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 26: 192-195.
12. Huang, J. L. 2005. Identification for physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* and control experiments of lettuce Fusarium wilt. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 57 pp. (In Chinese with English Abstract).
13. Idris, E. E. S., Bochow, H., Ross, H., and Borriss, R. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *J. Plant Dis. Prot.* 111: 583-597.
14. Islam, M. R., Madhaiyan, M., Deka Boruah, H. P., Yim, W., Lee, G., Saravanan, V. S., Fu, Q., Hu, H., and Sa, T. 2009. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1213-1222.
15. Johnston, A., and Booth, C. 1983. Mycological Media and Methods. Pages 393-399 in: *Plant Pathologist's Pocketbook*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, UK. 448 pp.
16. Joo, G. J., Kim, Y. M., Kim, J. T., Rhee, I. K., Kim J. H., and Lee, I. J. 2005. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *J. Microbiol.* 43: 510-515.
17. Joseph, B., Patra, R. R., and Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* 2: 141-152.
18. Lingappa, Y., and Lookwood, J. L. 1962. Chitin medium for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* 52: 317-323.
19. Lorck, H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant* 1: 142-146.
20. Pikovskaya, R. E. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologia* 17: 362-370.
21. Podile, A. R., and Kishore, A. K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. Pages 195-230 in: *Plant-Associated Bacteria*. 712 pp. Gnanamanickam S. S. ed. Springer, Netherlands.
22. Ryu, C. M., Murphy, J. F., Mysore, K. S., and Kloepper, J. W. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant J.* 39: 381-392.
23. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.

ABSTRACT

Chen, H. W.¹, Lin, Y. H.¹, Huang, J. W.¹, and Chang, P. F. L.^{1,2} 2010. Effect of *Bacillus mycooides* on seedlings growth of lettuce. Plant Pathol. Bull. 19: 157-165. (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402, R. O. C.; ² Corresponding Author, E-mail: pfchang@nchu.edu.tw, Fax: +886-4-2286-0442)

Plant growth-promoting rhizobacteria could enhance plant growth by providing plant growth regulators such as phytohormones to activate the metabolic activities of plant roots, so as to protect plants from attack by phytopathogens or reduce the disease severity by secreting antibiotics or siderophores, competing for the ecological niches or nutrition, and inducing plant defense responses. In this study, *Bacillus mycooides* (BM) CHT2402 was used to test its ability on growth promotion of different crops. The abilities of BM CHT2402 to produce indole-3-acetic acid (IAA) and ammonia (NH₃) were observed. Media mixed with cell suspensions of BM CHT2402 increased the fresh weight of tomato, watermelon, and lettuce plants, especially on Ming-feng NO. 3 cultivar of lettuce. Media irrigated with cell suspensions of BM CHT2402, however, had no significant growth-promoting effects on these plants. Media mixed with cell suspensions of BM CHT2402 applied on three different lettuce cultivars could promote lettuce growth, but different growth-promoting effects were observed depending on the cultivars tested.

Key words: plant growth-promoting rhizobacteria, *Bacillus mycooides*, lettuce