

野生稻與栽培稻之

根圈土壤中甲烷氧化菌菌群組成的差異

農試所作物組 賴明信 李長沛 高岱君

一、前言

全球暖化的問題日益嚴重，溫室氣體是造成全球暖化的重要原因之一。甲烷為溫室氣體之一，其在大氣中存在的時間相較二氧化碳短暫許多；然而根據政府間氣候變化專門委員會(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)的第五次評估報告(2014年)，甲烷的全球暖化潛勢(Global Warming Potential, GWP)卻是二氧化碳的28倍，故近年來對於甲烷排放的議題越來越加重視。甲烷的排放，除了自然生成下之永凍層和濕地排放外，人類活動也是甲烷排放的主要來源，例如農業耕作、畜牧業牲畜廢氣的排放和能源的生產等。水稻是世界上主要的糧食作物之一，全球有一半以上的人口都仰賴稻米維生；而水稻必須在灌溉淹水的狀況下生長，才能獲得高產量與品質，導致土壤中有機質在無氧環境下容易轉換成甲烷，使水稻種植成為甲烷排放的元兇之一。

根據中華民國國家溫室氣體排放清冊報告(2018年)，台灣在2016年的溫室氣體排放量為293,125千公噸二氧化碳當量，其中，甲烷排放量為5,637千公噸二氧化碳當量，占總溫室氣體排放量的2%，僅次於二氧化碳，其中農業活動計占甲烷總排放量的23%，水稻種植的排放量又占將近二分之一。甲烷氧化菌是一群可利用甲烷為唯一碳源及能源，在水稻根圈中，可將甲烷氧化成二氧化碳的古細菌，可以有效降低水稻田排放甲烷的量，是解決溫室氣體造成熱效應的可行作為。有報告指出，根圈土壤微生物中，甲烷氧化菌的豐富度會受到土壤性質、氣候條件和田間管理方法等的影響(Vaksmas *et al.*, 2017; Malyan *et al.*, 2016)，不同水稻基因型的根圈土壤微生物之豐富程度也有差異(Shenton *et al.* 2016)。透過水稻生產模式與品種的改善，提高根圈土壤的甲烷氧化菌之豐富度與活性，降低水稻田的甲烷排放量，是兼顧環境生態與人類生活的友善生產方式。只是不同基因型間的土壤微生物豐富度差異性是否具有遺傳性？即

作者：賴明信研究員
連絡電話：04-23317103

水稻基因型與甲烷氧化菌族群間的關係還不清楚，都限縮此議題的發展。藉由探討水稻基因型與根圈土壤甲烷氧化菌族群的關係，解析並找尋有助於甲烷氧化菌生成的水稻種原，透過遺傳設計解析此特性的遺傳行為，並進一步經過育種過程將此特性導入栽培種，培育新品種進行推廣，期許選育出兼顧產量和品質，又能對減緩全球暖化有積極貢獻的水稻品種。

二、不同水稻基因型根圈土壤氧化菌組成之差異分析

Shenton 等人(2016)為了瞭解野生稻抗病蟲害及抗環境因子變遷能力的消失，以19種*Oryza*稻屬基因型(13種野生稻(wild rice)與6種栽培稻(cultivated rice))為材料，調查根圈(rhizosphere soil)、寬鬆附著(attached soil)和根圈外(bulk soil)的土壤微生物多樣性；發現，野生稻與栽培稻的寬鬆附著土壤之微生物族群豐富程度，兩者沒有明顯差異存在，但在根圈的土壤微生物族群豐富程度，野生稻明顯大於栽培稻；同時也發現，根圈的土壤微生物族群中之甲基單孢菌屬(*Methylomonas*)豐富程度，在*O. brachyantha*、*O. longiglumis*和*O. granulata*(屬於早分化(early diverged)的水稻物種)明顯比其他參試水稻基因型高，顯示早分化水稻物種之根圈的土壤微生物族群中，甲烷氧化菌明顯較高。基於上述報告結果，探究農試所收集建構的野生稻種原，有無具有此特性材料

存在？進一步探究此特性的遺傳行為，及建構中間親本，將此特性導入栽培品種，選育新品種。

(一)、樣品準備

本研究選用能夠與栽培稻雜交的野生稻5種，分別為852T034、OMAP5、W10、W37和W423，及栽培稻3種，分別為台農67號(TNG67)、台農71號(TNG71)和台農育942001號(942001)，總計共8個基因型。稻種先經過60°C 10分鐘的溫湯殺菌，野生稻先以小刀劃破種皮助其打破休眠，再將種子浸泡於水中兩天後離水，待其發芽後，點播於未經施肥之土壤。待其生長到二葉齡後，移植至長53 cm×寬42.5 cm的塑膠盆中，盆中盛裝來源一致的土壤，並經均勻攪拌。每盆每基因型種植一株，一盆共8株(如圖一)，計4重複。植株培養於溫室，於第10天及第19天施硫酸銨肥料，每次每盆8 g，至第29天進行取樣。

(二)、根圈土壤的取樣

根圈土壤的取樣流程如圖二所示。利用直徑20 mm，長65 mm的空心圓柱管，以植株為中心，取固定範圍的土



圖一、水稻移植後樣本設置。

壤。取出後的土壤用手將其從根部剝離，裝入取樣管中。取樣後，立即將取樣管放入液態氮中急速冷凍，再放入裝有碎冰的保麗龍盒帶回，保存於-80°C的冰箱中，待日後分析。

(三)、分析結果

送驗分析材料為四重複中每盆參試基因型生長勢較均一的兩重複。土壤樣本使用 DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN) 萃取其DNA，使用引子(Primer) 341F及 805R進行16S rDNA V3-V4 片段(region) 擴增，以Illumina MiSeq進行次世代定序(NGS, next-generation sequencing)。圖三為利用主座標分析法(PCoA, Principal Coordinate Analysis)分析各樣本間土壤微生物菌相的差異性結果。紅點代表野生稻，藍點代表栽培稻，不同稻種由不同的形狀表示，橫軸PC1為變異程度8.79%，縱軸PC2為變異程度7.99%。將參試基因型的根圈土壤微生物進行座標標示，以縱軸PC2的基準線進行分界，可以明顯地將野生稻基因型及栽培稻基因型區分成兩群，其中OMAP5、W37和

942001在重複間的分析結果差異甚大。顯示根圈土壤微生物的菌相與水稻基因型具有關聯性，野生稻與栽培稻有差異性存在；此結果與學者Shenton等人(2016)的研究相同，雖然兩者參試的基因型都不相同。根圈土壤微生物中的甲烷氧化菌群組成會影響水田甲烷排放量，直接影響溫室效應高低，為本次研究關注的對象。比較根圈土壤中甲烷氧化菌群組成的數據，結果如圖四，依據各參試樣本之不同甲烷氧化菌的條數(read counts)所繪製成多重變異分析(NMDS, non-metric multidimensional scaling)圖。紅點代表野生稻，藍點代表栽培稻，雖然野生稻的分布和栽培稻的分佈有重疊，但可明顯看出野生稻大多分布在NMDS2基準線的上方，而栽培稻則大多分布在下方，推論出野生稻和栽培稻之根圈土壤甲烷氧化菌的菌相是有差異存在。

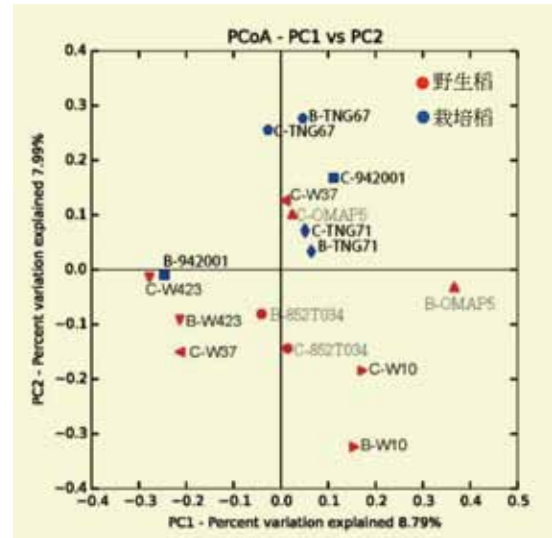
目前已知之甲烷氧化菌有23個菌屬，約60個菌種被分離出來。大部分學者藉由形態差異、內膜系統結構、碳同化路徑、固氮能力以及其他生理特性，



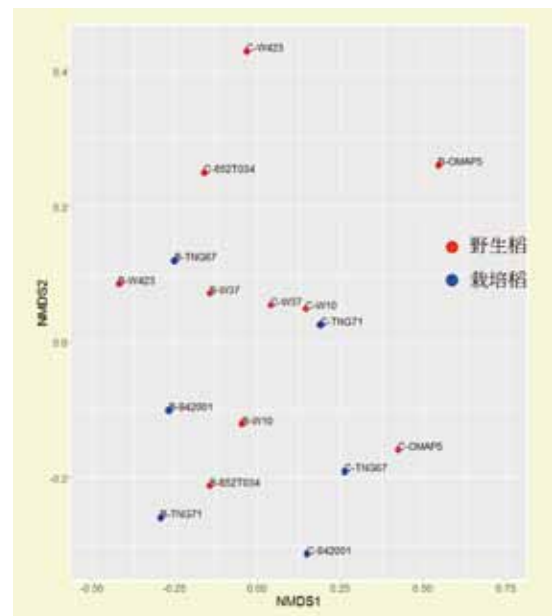
圖二、取樣流程。

將甲烷氧化菌分成type I和type II兩類。屬於type I類的甲烷氧化菌，其內膜構造為通過中央部分呈束囊層狀，基因中的G+C含量為45至65 mol%，主要含有16C脂肪酸，可利用RuMP途徑作為碳同化之初級路徑；屬於type II類的甲烷氧化菌，其內膜較靠近細胞膜排列成環狀，其基因中的G+C含量為60至67 mol%，主要含有18C脂肪酸，可利用Serine途徑作為碳同化之路徑。因為結構上的不同，使不同種類甲烷氧化菌，在不同環境中有不同的活性，因此有學者針對type I和type II類的甲烷氧化菌菌群差異進行研究，學者Vishwakarma等人(2010)研究收穫前後甲烷氧化菌的族群變化時，發現type I類的甲烷氧化菌，在變遷環境中較能迅速的根據環境反應變化；學者Mohanty等人(2006)研究氮肥對水稻田和森林中的甲烷氧化菌族群變化，發現氮肥施用會抑制type II類的甲烷氧化菌生長，尤其在施用高濃度氮肥後，type I類的甲烷氧化菌族群數量，明顯較type II類的甲烷氧化菌族群數量高。台灣的稻米生產管理模式，普遍會施用高氮肥及進行中斷灌溉水和曬田，水田土壤中的氮含量高，田區環境變化較劇烈，因此，type I類的甲烷氧化菌扮演的角色，較type II類重要。另外，台灣學者蕭友晉博士等人(2018)於研究水稻田土壤中嗜甲烷菌群的親緣關係時，也發現台灣水稻田土壤中具備高效能的嗜甲烷菌群，主要是type Ia型的*Methylosarcina*及*Methylobacter*。因此，我們將分析聚焦於type I類的甲烷氧化菌

群，首先，將參試樣本間的甲烷氧化菌群的資料進行標準化(Normalization)，再依標準化後的資料，分析各參試樣本的甲烷氧化菌菌群結構，結果如圖五，縱軸為甲烷氧化菌菌群百分比，橫軸為參



圖三、不同基因型根圈土壤微生物之主座標分析(PCoA)。

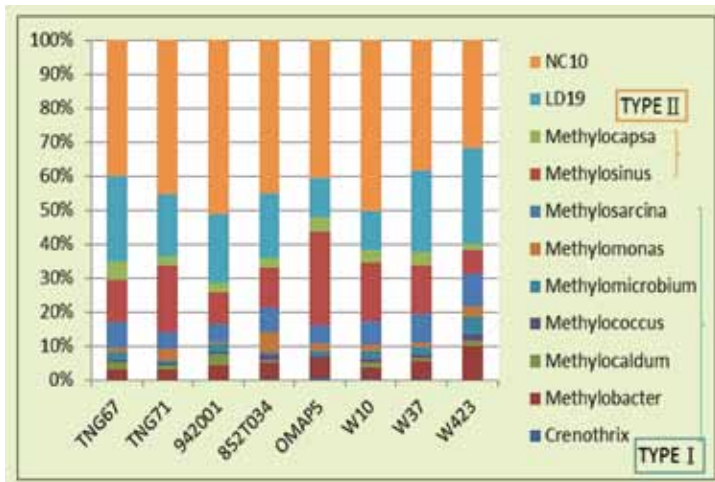


圖四、不同樣本間甲烷氧化菌之結構組成的相似性。

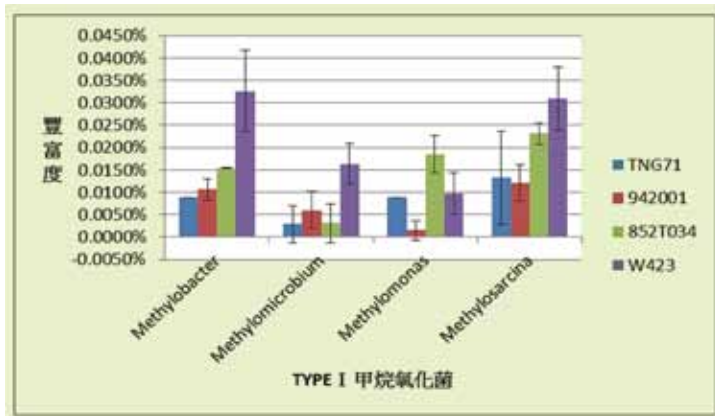
試樣本。由圖五可知，參試樣本的甲烷氧化菌之族群結構有明顯差異存在，聚焦於type I類的甲烷氧化菌群，發現參試野生稻(852T034、OMAP5、W10、W37和W423)的type I類佔總甲烷氧化菌的比例明顯比參試栽培稻(TNG67、TNG71和942001)還高；仔細探討各參試基因型，W423的type I類甲烷氧化菌群比例超過30%最高，是參試栽培稻的兩倍，852T034次之。進一步比較type I類菌群之單一甲烷氧化菌，結果如圖六。縱軸為甲烷氧化菌的豐富度百分比，橫軸為

單一甲烷氧化菌，藍色與紅色分別為栽培稻台農71號(TNG71)及台農育942001號(942001)，綠色與紫色分別為野生稻基因型852T034及W423。從圖比較栽培稻TNG71和942001及野生稻852T034和W423之根圈土壤中各type I甲烷氧化菌的菌相差異，分離之各甲烷氧化菌相在野生稻基因型明顯高於栽培稻，其中*Methylobacter*、*Methylomicrobium*及*Methylosarcina*之豐富度，以野生稻基因型W423最高，*Methyomonas*則是在野生稻852T034的根圈土壤中較豐富。根據學

者Shenton等人(2016)的研究顯示，野生稻基因型和栽培稻根圈土壤中，type I類甲烷氧化菌的菌相差異最為明顯，本試驗結果再度證明了野生稻和栽培稻根圈土壤的微生物族群有差異性，尤其type I類甲烷氧化菌的豐富度，在野生稻基因型之根圈土壤中明顯比栽培稻豐富。



圖五、不同品種甲烷氧化菌的比例。



圖六、參試基因型的TYPE I類甲烷氧化菌菌群的百分比。

三、結語

水稻在從野生稻演化或人為雜交改良的過程中，常會遺失一些重要性狀(例如:抗病蟲害、抗環境因子等能力)，降低了栽培稻的適應能力，致使栽培稻應對環境的遺傳脆弱性大幅提高。導入野生稻基因型

的特性，擴大栽培稻的遺傳變異幅度，是因應氣候變遷，稻米穩定生產的重要策略之一。根據前人研究報告及本試驗結果，根圈土壤微生物的組成會因作物基因型不同而有所差異；栽培稻根圈土壤中能氧化甲烷的甲烷氧化菌，其豐富度明顯較野生稻基因型低。根圈土壤微生物的菌相與作物根的分泌物(Exudates)有關係，根的分泌物與基因型有關，可能具有遺傳性。本試驗結果發現水稻根圈中甲烷氧化菌豐富度，野生稻基因型明顯高於栽培稻，透過育種過程，將此特性導入栽培稻，並進一步找到調控基因，培育出釋放甲烷量少的品種，讓稻米業者在兼顧產量、品質及友善環境的生產時，能夠實際參與降低地球暖化的工作。

四、參考文獻

- 行政院環境保護署 (2018), 「2018年中華民國國家溫室氣體排放清冊」
- 賴明信、李長沛、高岱君, 2019, 根圈土壤微生物與作物生長交感研究之探討, 技術服務 (119:11-150)。
- IPCC, 2014. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY USA.
- Malyan, S.K., Bhatia, A., Kumar, A., Gupta, D.K., Singh, R., Kumar, S.S., Tomer, R., Kumar, O., and Jain, N. (2016). Methane production, oxidation and mitigation: a mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Sci. Total Environ.* 572, 874–896.
- Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E., Floris, V., and Conrad, R. (2006). Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Appl Environ Microb*, 72: 1346–1354.
- Shenton, M., Iwamoto, C., Kurata, N., and Ikeo, K. (2016) Effect of wild and cultivated rice genotypes on rhizosphere bacterial community composition. *Rice*. 9:42.
- Shiau, Y.J., Cai, Y., Jia, Z., Chen, C.L., Chiu, C.Y. (2018) Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan. *Soil Biol. Biochem.*, 124: 59-69.
- Vaksmas, A., van Alen, T.A., Ettwig, K.F., Lupotto, E., Valè, G., Jetten, M.S., and Lùke, C. (2017) Stratification of diversity and activity of methanogenic and methanotrophic microorganisms in a nitrogen fertilized Italian paddy soil. *Front Microbiol.* 8:2127.
- Vishwakarma, P., Singh, M., and Dubey, S.K. (2010) Changes in methanotrophic community composition after rice crop harvest in tropical soils. *Biol Fertil Soils*, 46: 471.