

微生物緩解作物低溫逆境之表型體篩選

葉侑橋¹、林育萱^{2*}

¹ 財團法人農業科技研究院助理研究員。

² 財團法人農業科技研究院資深研究員兼植物科技研究所所長。

* yhlin@mail.atri.org.tw

摘 要

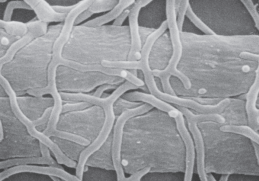
隨著全球氣候變遷，極端氣候事件益趨頻繁，對農業生產造成新的艱鉅挑戰。本研究旨在探討高效篩選潛力微生物應用於緩解熱帶果樹木瓜於低溫逆境下的傷害或受低溫傷害後可加速其回復生長之效能。於環控室中模擬田間微生物應用方式進行兩種測試篩選，以探索其緩解低溫逆境之潛力：一為施用微生物一段時間再低溫處理後評估木瓜苗株受傷害情形；二為植株低溫處理後施用微生物一段時間以評估木瓜苗株回復生長情形。共計有18株菌株參與測試，原先皆為針對不同目標篩選出的功能性微生物菌株，為了解其潛在多功能性故進行緩解低溫傷害能力之篩選，結果得知不同微生物於減緩植株低溫傷害和低溫逆境後促進其回復生長效果不一。透過本篩選流程其中有4株微生物菌株具有顯著減緩低溫傷害之能力；3株具有低溫傷害後回復生長促進之功效，再針對以上潛力菌株進一步分析發現，試驗菌株之活菌培養液對減緩傷害之效果顯著優於過濾後去菌體之培養液。本研究提供基於表型體資訊和多光譜影像分析的方法來評估微生物對作物低溫逆境的緩解效益，並展示了應用微生物緩解環境逆境對植物之可能。未來研究可進一步探索不同類群微生物的潛在功能及其機制，以發掘微生物的多元應用性及優化其在環境逆境中的應用策略。

關鍵字：寒害、光譜影像分析、苗期、極端氣候

前 言

面對全球暖化與極端氣候所帶來對農業生產之種種難以預測的挑戰，除了可透過育種選拔尋找具有抗耐逆境性新品種外，更可透過運用微生物跨作物別進行廣效性地緩解氣候逆境對作物生長之影響，並協助穩定農業計畫生產及品質提升。木瓜(*Carica papaya* L.)為熱帶多年生常綠果樹，在臺灣種植產地集中於臺南、屏東、高雄、雲林、嘉義及南投等地，可全年生產。但近年來冬季寒流

帶來的農損事件頻繁發生，造成果農重大損害。寒流為害不只木瓜受到損害，種植於鄰近的作物如蓮霧、蜜棗、鳳梨及胡瓜等也同樣受到寒流重大的影響。以木瓜植株為例，其生育適溫為21~33℃ (Knight, 1980)，日均溫需在16℃以上，其生育、結實、產量及品質才能達生產標準，如果於相較溫暖的生育狀態(25~35℃)，突然遭受連續短時間(48hr內)且非凍結溫度(4~15℃)之低溫逆境，或是夜溫達12~14℃於數小時內，常會造成寒害(chilling stress) (Nakasone & Paull, 1998;



Pradhan *et al.*, 2019; Zhu, *et al.*, 2007)，對於植體而言可見的傷害，包含葉片壞疽、水浸狀與落葉等不良影響，進而使生長勢衰弱或停滯生長，對於果實的傷害則是造成寒斑賣相不佳的問題，不但影響全年生產時程規劃且造成產值短少。農業用微生物已被證實可具有多種功能，除了可應用於作物病蟲害防治及促進養分利用效率等功能外，對於環境逆境對作物傷害的緩解作用也陸續被證實其效益(Barea 2015; Ngumbi & Kloepper 2016; Valliere, *et al.*, 2020; Ali, *et al.*, 2023; Singh, *et al.*, 2023)。為加速功能性微生物應用於農業生產，應用其可減緩作物受低溫逆境傷害程度或於低溫逆境傷害後加速回復生長勢，本研究應用所建立之兩種試驗流程，針對低溫逆境發生前或後，模擬田間施用方式連續根部澆灌微生物培養液，同步觀察累積作物表型體資訊、光譜影像資訊與傷害性指標進行綜合分析評估，以了解並探討微生物緩解作物低溫逆境之效益。

材料與方法

試驗植株

木瓜‘紅妃’品種於先前品種測試試驗中相較對低溫敏感，故選定為主要試驗材料，種子購自農友種苗公司，於28℃黑暗中浸種7天，待其胚根突破種皮或種皮開裂後播種於三吋黑軟盆中，介質使用沃鬆一號(大益農科，型號：SB4)，介質每升施用4克緩釋肥(台和園藝，型號：12-9-10-2TE)；播種完成即移置潮汐灌溉生長箱(台灣海博特，型號：FH1300)於日夜溫28/26℃，光週期12hr， $250 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下培育，待其兩片子葉完全展開，並於第二片真葉冒出時，進行植體生育表現調查。完成後移置走入式生長箱以日夜溫32/30℃，光週期12hr， $150 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下培育。

低冷處理

木瓜達1月苗株齡即進行低溫處理，處理前日將木瓜苗移出生長箱，並進行影像紀錄，同步開啓走入式冷藏庫預冷，待處理日將各處理組別均勻分布置於走入式冷藏庫中，以日夜溫7.5℃，光週期12hr， $20 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下進行低溫處理，低溫處理時間計算待全部植株置入後，溫溼度紀錄器(HOBO, 型號：MX2301)紀錄溫度低於7.5℃以下之時間點起算連續進行48hr低溫處理。

試驗微生物處理組及對照組

供試微生物共計18個菌株，來自於國內數個學研單位及農業試驗改良場所之研發成果，透過農業部臺中區農業改良場2021-2023年度「微生物提升作耐逆境能力之平臺測試」計畫之功能測試專案提供本研究試驗用微生物，依不同試驗批次、測試標的或功能驗證等試驗設計，部分菌株有重複應用於不同批次試驗中，所有供試菌株尚在研發階段故不在此揭露相關訊息，若有菌株資訊洽詢需求請洽臺中區農業改良場。試驗處理組別除了供試菌株外，每次試驗皆包含3組為未施用菌株之對照組：CK為常溫對照組、CKT為低溫對照組及CKW為低溫物理防護(透明塑膠袋包覆)對照組，以作為對照比對。

試驗流程

運用微生物緩解作物低溫逆境影響試驗拆分為兩個不同流程試驗模組(圖一)，微生物應用時機亦有所差異，其中(1)評估運用微生物減緩作物受低溫逆境之影響(藍色框線箭頭)：完成初始植體生育表現調查結束後，即依不同微生物製劑推薦施用濃度進行灌溉(每株單次50ml)，於低溫處理前每次間隔6天連續灌溉3次，並於1個月齡苗進行低溫處理48hr，低溫處理結束後立即進行各處理組全株葉片傷害性評估(包含葉片捲曲、水浸狀及落葉數量)與標定葉之葉綠素計讀

值調查，並剪取指定葉序之成熟完全展開葉片，擷取離葉多光譜影像(台灣海博特，型號：Phenobox)，透過全株葉片傷害性相關評估指標與離體葉片多光譜影像分析結果對處理間進行減緩低溫逆境之效益評估。此試驗流程，透過根部連續澆灌促使試驗微生物成為根圈強勢菌株，再由微生物與作物之交互作用或應用其代謝物質使作物對低溫耐性增加以減少傷害產生，後續評斷應用微生物對於減少低溫傷害的效益；(2)評估運用微生物增強或加速回復作物受低溫逆境後之生長勢表現(黃色實心箭頭)：植株於低溫處理結束後，為減少處理間差異依個別傷害性表現重新分組，並同上述流程(1)操作方法施用微生物，惟每次澆灌前調查生育表現與擷取全株多光譜影像，以評估微生物處理對於低溫逆境後回復生長促進之效果。透過建立根圈強勢供試微生物促進植物回復生長，縮短逆境後復育所需時間。經由以上兩種不同組合之

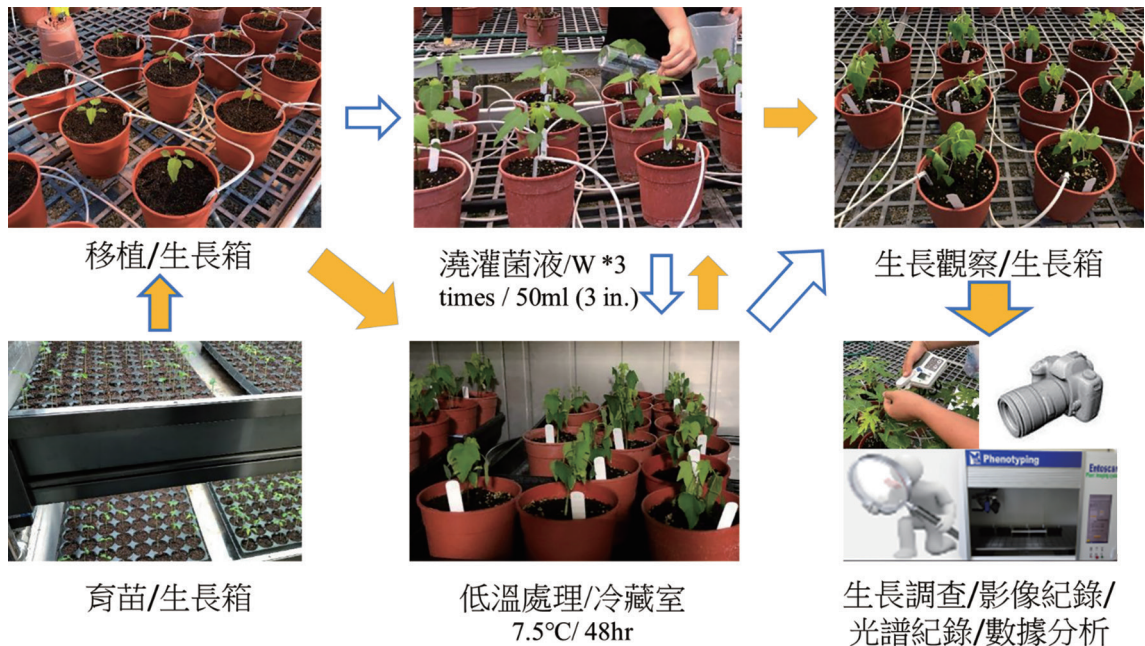
測試流程，可確立一套完整透過表型體資訊評斷微生物緩解作物低溫逆境之效益方法。

數據蒐集及分析

植體觀察分為生育表現及傷害性表現調查，生育表現調查內容包括株高、株寬幅、葉片數、莖寬、標定葉之葉綠素計讀值等；傷害性表現調查包含落葉數、壞疽葉片數、水浸狀葉片數、標定葉片葉綠素計讀值等；多光譜影像參數包含400-1,000nm內16個單光譜葉片反射率、至少15個植生指數之平均表現，於不同試驗目標中，透過生育表現或傷害性表現評估微生物緩解作物低溫逆境之效果，再透過多光譜影像分析對前述兩種不同表現作逐步回歸分析，透過植物表型體光譜影像評估微生物是否有效緩解作物低溫逆境。

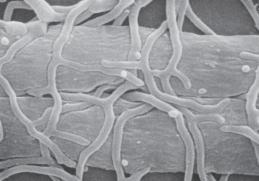
結果

供試微生物菌株依所建構之植物於低溫逆境下表型體篩選流程(圖一)進行測試，



圖一、微生物緩解植物低冷逆境之植物表型體篩選流程。

Fig. 1. Procedure for screening microorganisms to mitigate chilling stress in plants.



第一批次試驗共有10個微生物菌株(T1~T10)參與測試，由微生物菌株施用減緩木瓜苗低溫傷害以及傷害後回復生長促進之試驗結果可得知(表一)，微生物減緩植體傷害表現方面，其中T7、T9與T10處理組所呈現之植體傷害程度相較其他微生物處理組為低，分別為20.1%、24.8%與21.1%傷害率；光譜影像分析結果，則呈現T7與T9傷害性相較其他微生物組別低。另外在植株受低溫傷害後回復生長促進方面，株高相對生長表現呈現T9與T10處理組較佳，分別達42.6%與42.2% 相對

生長率；莖寬相對生長表現則以T8與T10處理組較佳，分別達58.5%與57.8% 相對生長率；植體投影面積相對生長表現方面，則以T9為較佳可達145% 相對生長率；以光譜影像分析結果，則以T9與T10有較佳回復生長表現。綜合上述植物表型體結果初步判定T9處理組不論在減緩低溫傷害與低溫後回復生長上皆表現較佳，另外T7、T8與T10也各有一定程度之減緩寒害效果，或可採用不同微生物菌株組合運用、施用濃度或劑型調整等方法強化其效果。

表一、於低溫逆境前後施用微生物(T1-T10)對傷害減緩與回復生長促進之差異性分析與光譜分析結果

Table 1. Analysis of differences in damage reduction and promotion of regrowth by applying microorganisms (T1-T10) before and after chilling stress, and spectral prediction results

TRI	Inoculation before chilling stress		Inoculation after chilling stress			
	Damage ratio (%)	Prediction ²	Relative Growth Rate (%)			Prediction ³
			Height	Stem width	Plant projected area	
CK	0.0e ¹	9.4de	49.2a	72.0a	161.3a	61.6a
CKT	31.1bc	35.6abc	20.6e	48.6c	82.0d	51.5cd
CKW	4.8de	6.2e	26.2de	48.2c	98.7bcd	50.0d
T1	36.7abc	41.7ab	31.8cd	55.5bc	99.4bcd	52.6cd
T2	29.0c	37.5abc	37.3bc	51.3bc	109.2bcd	54.6bc
T3	32.2bc	31.7abc	29.2d	54.2bc	108.1bcd	55.0bc
T4	52.0a	44.8a	26.7de	51.7bc	83.4cd	53.6bcd
T5	35.7abc	41.8ab	27.3de	52.1bc	97.7bcd	54.9bc
T6	48.1ab	45.3a	28.6d	49.9bc	83.3cd	49.9d
T7	20.1cd	23.6cd	32.9cd	53.6bc	110.9b	54.0bcd
T8	32.6bc	29.4abc	32.8cd	58.5b	92.3bcd	53.5bcd
T9	24.8cd	27.1bc	42.6ab	54.9bc	145.5a	59.9a
T10	21.1cd	29.2abc	42.2ab	57.8b	110.8bc	57.3ab

¹ Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at P<0.05 by LSD test.

² The prediction is the damage trait prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

³ The prediction is the relative growth rate prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

第二批試驗共有12個微生物菌株(T11~T22)參與測試，由微生物菌株施用減緩木瓜苗低溫傷害以及傷害後回復生長促進之試驗結果(表二)可得知，微生物減緩植體傷害表

現方面，以T21與T16有較佳表現，分別有4.4%與5.4% 植體傷害率；以光譜影像分析結果則T21與T18為較佳。在低溫傷害後回復生長促進方面，株高相對生長表現上，以T22

最佳可達67.9%，T20最差僅有43.2% 相對生長率；莖寬相對生長表現上，以T11最佳高達100.4%，T20最差僅有74.4% 相對生長率；植體投影面積相對生長表現上，則以T22為最佳高達218.3% 相對生長率；以光譜影像分析結

果，則以T16有最佳表現。此次試驗結果多數組別間差距較小不易明顯區分其差距，仍可初步判定T21處理組在微生物減緩低溫傷害方面有較佳的效果；在低溫後回復生長促進方面，則以T22處理組有較佳回復生長促進效果。

表二、於低溫逆境前後施用微生物(T11-T22)對傷害減緩與回復生長促進之差異性分析與光譜分析結果

Table 2. Analysis of differences in damage reduction and promotion of regrowth by applying microorganisms (T11-T22) before and after chilling stress, and spectral prediction results

TRI	Inoculation before chilling stress		Inoculation after chilling stress			
	Damage ratio (%)	Prediction ²	Relative Growth Rate (%)			Prediction ³
			Height	Stem width	Plant projected area	
CK	0.0d ¹	26.6d	54.4ab	110.0a	159.6ab	60.8bc
CKT	84.0a	69.3abc	47.6b	90.8abc	119.0b	59.9c
CKW	4.0d	24.0d	57.5ab	81.6bc	178.7ab	62.6abc
T11	76.0ab	72.2a	54.0ab	100.4ab	168.9ab	63.5ab
T12	80.0ab	61.1abc	53.0ab	95.6abc	154.9ab	63.4ab
T13	66.0abc	65.4abc	54.4ab	89.6abc	160.7ab	61.2bc
T14	72.0abc	70.1ab	53.8ab	89.1abc	142.5ab	59.7c
T15	60.0abc	66.9abc	52.6ab	92.0abc	119.2b	61.6abc
T16	54.0bc	61.9abc	55.8ab	81.0bc	176.3ab	64.7a
T17	70.0abc	61.5abc	58.2ab	96.4abc	173.0ab	62.8abc
T18	72.0abc	59.0bc	57.0ab	84.7bc	158.6ab	62.2abc
T19	74.0ab	67.6abc	56.4ab	94.7abc	122.7b	62.4abc
T20	68.0abc	70.4ab	43.2b	74.4c	135.2ab	64.0ab
T21	44.0c	57.5c	53.7ab	85.7bc	184.9ab	64.0ab
T22	76.0ab	66.4abc	67.9a	85.0bc	218.3a	62.6abc

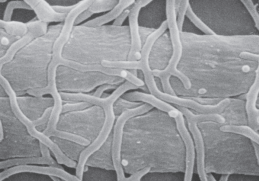
¹ Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at P<0.05 by LSD test.

² The prediction is the damage trait prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

³ The prediction is the relative growth rate prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

透過上述大量篩選試驗結果，鎖定其中潛力微生物5菌株，進一步探討具較佳功效之減緩傷害微生物菌株其主要功能效益貢獻者為菌株活體或為其代謝物，每個菌株材料分為微生物培養菌液(活體+代謝物) T23~T25及去活體過濾液(代謝物)T23DE~T25DE，後者為微生物培養液以0.22 μ m濾膜過濾去除菌體為試驗材料，以上兩種材料分別進行(1)減

緩低溫傷害流程試驗，此次試驗為進一步分析不同傷害指標，改採用捲曲葉片比例、水浸狀葉片比例與落葉比例等指標進行傷害程度之評估，並解析其相關光譜影像數據之結果。由結果(表三)可得知，在捲曲葉片比例上，以T25、T25過濾液(T25-DE)與T23有最佳減緩效果，分別達51.9%、47.4%與48.3%；在水浸狀葉片比例上，T25與T23也同樣有較好



減緩效果，分別達30.9%與28.3%；在落葉比例上，則以T23、T25、T23過濾液(T23-DE)、T26過濾液(T26-DE)有較佳減緩效果，分別為6.7%、6.9%、6.7%與0%；光譜影像分析結果則以T23有最佳減緩效果，而T25次之。另外測試植物受低溫傷害後回復生長表現，同樣進行3種微生物與其過濾液之低溫傷害後施用

微生物試驗結果(表四)可得知，在相對生長表現上，僅植體投影面積表現上有顯著差異，以T27-DE與T29-DE促進效果較佳，分別達166.8%與156.9%；在根部鮮重、地上部乾重與根部乾重累積上，以T28-DE表現較佳，分別達25.24g、1.81g與2.16g，光譜影像分析結果則以T28-DE最佳，而T27-DE次之。

表三、於低溫逆境前施用微生物(T27-29)及其過濾液對作物遭受低溫傷害減緩程度與光譜分析結果
Table 3. Analysis of damage reduction and spectral prediction from applying microorganisms (T23-26) and their filtrates before chilling stress

TRT	Inoculation before chilling stress			
	Curled leaves (%)	Waterlogged leaves (%)	Dropped leaves (%)	Prediction ²
CK	0.0c ¹	0.0e	0.0b	20.8d
CKT	80.1a	60.0a	8.5ab	49.5ab
CKW	0.0c	15.0de	0.0b	27.9cd
T23	48.3b	28.3cd	6.7b	24.1cd
T24	61.1ab	52.4a	10.0ab	41.6abc
T25	51.9b	30.9bcd	6.9b	32.2bcd
T26	65.4ab	46.1abc	8.3ab	37.7abcd
T23-DE	63.3ab	50.0ab	6.7b	53.5a
T24-DE	58.3ab	46.9abc	20.2a	49.9ab
T25-DE	47.4b	42.6abc	10.6ab	38.4abcd
T26-DE	63.3ab	51.5ab	0.0b	48.2ab

¹ Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at P<0.05 by LSD test.

² The prediction is the damage trait prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

表四、於低溫逆境後施用微生物(T23-26)及其濾液對作物遭受低溫傷害後再生長速度與光譜影像分析結果

Table 4. Analysis of regrowth rate and spectral prediction results by applying microorganisms (T27-29) and their filtrates after chilling stress

TRT	Inoculation after chilling stress							
	Relative Growth Rate (%)			Biomass Trait (g)				Prediction ²
	Height	Stem width	Plant projected area	Shoot FW	Root FW	Shoot DW	Root DW	
CK	47.5ab ¹	79.7ab	85.0c	13.65a	30.58a	2.38a	2.66a	93.20a
CKT	46.6ab	68.4c	105.1bc	10.76bc	19.80bcd	1.84bc	1.63d	59.94c
CKW	44.8ab	82.4a	113.6bc	12.26ab	24.62bc	2.11ab	2.12bc	74.33b
T27	48.2ab	70.2bc	112.3bc	10.51bc	18.80d	1.65c	1.67cd	47.28d
T28	48.3ab	71.3bc	116.9bc	10.54bc	19.90bcd	1.72c	1.63d	46.38d
T29	41.5b	70.0bc	129.2ab	10.05c	19.51cd	1.69c	1.69bcd	49.41d
T27-DE	52.1a	68.5c	166.8a	10.69bc	20.24bcd	1.71c	1.55d	60.96c
T28-DE	46.8ab	68.4c	141.5ab	10.88bc	25.24ab	1.81bc	2.16b	66.79bc
T29-DE	50.7a	71.6bc	156.9a	10.17c	18.57d	1.63c	1.54d	51.72d

¹ Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at P<0.05 by LSD test.

² The prediction is the relative growth rate prediction from multispectral imaging results and vegetation index.

討 論

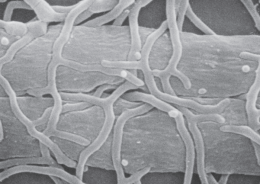
極端氣候所產生的低溫效應是一種綜合性的逆境表現，通常會使得作物生長停滯與遲緩(Pandey *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2015; Dikilitas *et al.*, 2021)。許多具有低溫馴化能力之作物可透過如相關低溫逆境之滲透勢物質含量變化來判斷低溫逆境是否產生(Theocharis *et al.*, 2012; Subramanian *et al.*, 2016)。番木瓜是常綠熱帶果樹，雖然有如山番木瓜具有抗耐低溫特性之品系，可於海拔三千公尺以上進行栽培，但多數商業品種不具有如山番木瓜抗耐低溫之特性，尤其紅妃木瓜這種典型不耐寒品種，冬天常見的寒流發生或是晚上短暫低溫常會影響其生長。然而此低溫傷害變化若以肉眼觀察不一定能明顯看出相關低溫傷害或施用微生物誘導植物內抗耐低溫物質的變化，因此透過傷害性表現，並配合光譜影像分析結果輔助判斷低溫傷害情形及使用微生物減緩植物傷害與傷害後回復促進生長效益有其必要性(Maurya *et al.*, 2019)。低溫傷害最直觀的評斷為葉片受傷程度，其中以水浸狀葉片與落葉是常見難以回復之傷害表現，倘若於低溫發生前施用微生物可減少其傷害性狀程度，該微生物應具有協助植體抵禦低溫逆境之能力。於微生物應用試驗中，透過外表型結果，快速大量判別參試植株之葉片是否遭受傷害，即可區分具有減緩傷害潛力之菌株，並同時配合光譜分析結果，提供另一客觀資訊累積相關資訊，可於後續檢視個菌株之相關潛力。從測試的微生物中，挑選出最具有潛力之微生物並納入重複試驗中的對照組，也可了解於不同批次試驗中的再現性，進一步可確定微生物之穩定性與效益。

目前仍不清楚微生物對於木瓜苗遭受低溫逆境之減緩傷害機制，初步透過微生物

過濾液之施用，確認目前有效提升抗耐低溫逆境之潛力微生物菌株，其仍以活菌作用為主，但部分過濾液澆灌仍有其功效，雖然尚未能鎖定特定功能代謝物質成分或進一步定量測試功效，但也表示其代謝體應用仍具有一定功效，如朝生物刺激素等產品發展仍需進一步深入探討其指標成分、機制或功效。在抗耐低溫逆境之微生物應用策略上，應可朝向施用組合優化之方向進行調整，可依據施用頻度測試與濃度頻度組合測試，尋找出最佳效率的施用方式，便於農民端導入應用。

本試驗測試之菌株種類面向廣，包含有貝萊斯芽孢桿菌、液化澱粉芽孢桿菌、鏈黴菌、木黴菌、地衣芽孢桿菌、暹羅芽孢桿菌及地衣芽孢桿菌等，再加上代謝物樣品累計達36個試驗樣品，已可篩選出表現較佳之減緩低溫傷害菌株與具有促進再生長效益菌株，但仍難以歸納不同類群之微生物是否具有對於低溫逆境之傷害減緩功效或再生長促進效果，此種功效可能仍屬於菌株本身特性。

應用此兩階段測試流程可快速辨識微生物製劑是否具有減緩低溫逆境的能力，評斷個別菌株於不同情境之功能性，以減緩傷害試驗而言，從開始進行木瓜苗培養到結束試驗，僅需35天左右，而低溫逆境後回復再生長促進試驗則需50天，單次測試以目前設備裝置可容納試驗微生物樣品量可達10-12個，且於環境控制狀態下操作，可避免植株受到外在不穩定氣候影響，使其呈現具一致性之表現，大幅提升植物表型體篩選效率及準確度。透過此試驗模組，可由大量參試微生物菌株中，快速挑選具有減緩低溫傷害潛力之微生物；再接續探討潛力微生物於減緩傷害程度與傷害後回復生長促進效益的各項指標，可了解適當的施用策略應如何調整，縮



短應用至田間測試所需要的時間，提高微生物的多元應用性。

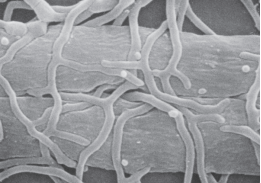
致 謝

我們衷心感謝農業部臺中區農業改良場提供2021-2023年「微生物提升作耐逆境能力之平臺測試」計畫經費支持及相關試驗材料支援。

參考文獻

1. Ali, S., Tyagi, A., Mir, R.A., Rather, I.A., Anwar, Y., Mahmoudi, H. 2023. Plant beneficial microbiome a boon for improving multiple stress tolerance in plants. *Frontiers Plant Sci.* 14:1266182.
2. Barea, J. M. 2015. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *J. Soil Sci. Plant nut.* 15(2): 261-282.
3. Barka, E.A., Nowak, J., Clément, C. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *App. Environ. Microbiol.* 72(11), 7246-7252.
4. Cozzolino, R., Pace, B., Cefola, M., Martignetti, A., Stocchero, M., Fratianni, F., Nazzaro, F., De Giulio, B. 2016. Assessment of volatile profile as potential marker of chilling injury of basil leaves during postharvest storage. *Food Chem.* 213, 361-368.
5. Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., Yurin, V. 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J. Experi. Bot.* 65(5), 1259-1270.
6. Dikilitas, M., Karakas, S., Simsek, E., Yadav, A.N. 2021. Microbes from cold deserts and their applications in mitigation of cold stress in plants. In *Microbiomes of extreme environments*, 1st edn, A.N. Yadav, A.A. Rastegari, and N. Yadav, eds. (Boca Raton, USA: CRC press) pp. 126-152.
7. Kakar, K.U., Ren, X. I., Nawaz, Z., Cui, Z.Q., Li, B., Xie, G.L., Hassan, M.A., Ali, E., Sun, G.C. 2016. A consortium of rhizobacterial strains and biochemical growth elicitors improve cold and drought stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biol.* 18: 471-483.
8. Knight, R. J. 1980. Origin and world importance of tropical and subtropical fruit crops. In: eds *Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties, and Uses*. S. Nagy, P.E. Shaw, AVI Publishing, Westport, pp. 1-120.
9. Kuk, Y. I., Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B. H., Jung, S., Guh, J. O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 43(6), 2109-2117.
10. Maurya, N. K., Goswami, A. K., Singh, S. K., Prakash, J., Goswami, S., Chinnusamy, V., Kumari, A. 2020. Studies on expression of *CBF1* and *CBF2* genes and anti-oxidant enzyme activities in papaya genotypes exposed to low temperature stress. *Sci. Hortic.* 261, 108914.
11. Mishra, P. K., Bisht, S. C., Ruwari, P.,

- Selvakumar, G., Joshi, G. K., Bisht, J. K., Bhatt, J. C., Gupta, H. S. 2011. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonads* from NW Himalayas. Arch. Microbial. 193, 497-513.
12. Nakasone, H. Y., Paull, R. E. 1998. Tropical Fruits. Cab International, UK CAB
13. Ngumbi, E., Kloepper, J. 2016. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. Appl. Soil Ecol. 105:109-125.
14. Pandey, P., Ge, Y., Stoerger, V., Schnable, J. C. 2017. High throughput in vivo analysis of plant leaf chemical properties using hyperspectral imaging. Front. Plant Sci. 8, 1348
15. Park, E., Kim, Y. S., Omari, M. K., Suh, H. K., Faqeerzada, M. A., Kim, M.S., Baek, I., Cho, B. K. 2021. High-throughput phenotyping approach for the evaluation of heat stress in korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) using a hyperspectral reflectance image. Sensors 21(16), 5634.
16. Pradhan, S., Goswami, A. K., Singh, S. K., Prakash, J., Goswami, S., Chinnusamy, V., Talukdar, A., Maurya, N. K. 2019. Low temperature stress induced physiological and biochemical alterations in papaya genotypes. S. Afr. J. Bot. 123, 133-141.
17. Sanaeifar, A., Yang, C., de la Guardia, M., Zhang, W., Li, X., He, Y. 2022. Proximal hyperspectral sensing of abiotic stresses in plants. Sci. Total Environ. 861, 160652.
18. Singh, A., Mazahar S., Chapadgaonkar, S.S., Giri, P., Shourie, A. 2023. Phyto-microbiome to mitigate abiotic stress in crop plants. Front. Microbiol. 14:1210890.
19. Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Mageswari, A., Selvakumar, G., Sa, T. 2016. Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. PLoS ONE 11(8), e0161592.
20. Suyal, D. C., Soni, R., Yadav, A. N., Goel, R. 2021. Cold adapted microorganisms: survival mechanisms and applications. In Microbiomes of extreme environments, 1st edn, A.N. Yadav, A.A. Rastegari, and N. Yadav, eds. (Boca Raton, USA: CRC press) pp. 177-191.
21. Tambussi, E. A., Bartoli, C. G., Guamet, J. J., Beltrano, J., Araus, J. L. 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. Plant Sci. 167(1), 19-26.
22. Theocharis, A., Bordiec, S., Fernandez, O., Paquis, S., Dhondt-Cordelier, S., Bailleul, F., Clément, C., Barka, E.A. 2012. *Burkholderia phytofirmans* PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures. Mole. Plant Microbe Interact. 25(2), 241-249.
23. Valliere, J. M., Wong, W. S., Nevill, P. G., Zhong, H., Dixon, K. W. 2020. Preparing for the worst: Utilizing stress-tolerant soil microbial communities to aid ecological restoration in the Anthropocene. Ecol. Solut. Evid. 1(2): e12027.
24. Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sachan, S.G., Saxena, A. K. 2017. Extreme cold environments: a suitable niche for selection of novel psychrotrophic microbes



- for biotechnological applications. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 2(2), 1-4.
25. Zhu, J., Dong, C. H., Zhu, J. K. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. opin. Plant Biol.* 10(3), 290-295.
26. Zhu, K., Sun, Z., Zhao, F., Yang, T., Tian, Z., Lai, J., Zhu, W., Long, B. 2021. Relating hyperspectral vegetation indices with soil salinity at different depths for the diagnosis of winter wheat salt stress. *Remote Sensing* 13(2), 250.

A Phenotypic Screening Process for Microbes with the Ability to Alleviate Crop Low-temperature Stress

You-Chiao Yeh¹, Yu-Hsuan Lin^{2*}

¹ Associate Researcher, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.

² Researcher and Director, Plant Technology Research Center, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.

* Corresponding author, e-mail: yhlin@mail.atri.org.tw

ABSTRACT

Global climate change has led to frequent extreme weather events, posing new challenges to agricultural production. This study has investigated the use of agricultural microbes to reduce chilling stress and enhance the regrowth after stress in tropical fruit trees such as papaya. Two approaches were tested: application of various functional microbes for a period of time before chilling stress to mitigate plant damage, and application for a period of time after stress to promote plant recovery. Through this screening process, four microbial strains were found to have the potential to significantly reduce plant chilling damage; three strains showed efficacy in plant recovery from chilling damage. The results further showed that the effectiveness of these approaches varied, with live microbes being more effective than their filtrates in reducing plant damage. This study demonstrates that agricultural microbes can assist alleviate environmental stress and recommends further research to optimize the applications of microbes under chilling stress.

Keywords: Chilling stress, Spectral imaging analysis, Seedling stage, Extreme weather

