

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學系

碩士論文

Master Program for Plant Pathology and Microbiology

National Taiwan University

Master Thesis

蛇紋岩土壤鎳及鉻對微生物族群及根瘤線蟲的影響

Effects of nickel and chromium on microbial
communities and root-knot nematode in serpentine soil

謝孟珊

Meng-Shan Hsieh

指導教授：楊爵因 博士

Advisor: Jiue-in Yang, Ph.D.

中華民國 109 年 7 月

July 2020





摘要

蛇紋岩土壤為一富含鎳、鉻的天然環境，低鈣鎂比為此土壤特性。目前台灣蛇紋岩土壤中微生物群相未知，本研究於2019年1月起調查蛇紋岩土壤中線蟲群相，採集我國宜花東共23個區域之蛇紋岩土壤與非蛇紋岩土壤，各分離出20與22科線蟲。比較相同樣本數下分離的線蟲總量，發現蛇紋岩土壤中的線蟲遠少於非蛇紋岩土壤，推論高濃度的鎳、鉻環境不利於線蟲生存。探究線蟲分群類別，Qudsianmenatidae 科僅在蛇紋岩土壤中被發現，Anguinidae、Dolichodoridae、Rhabdolaimidae 等科之線蟲則僅出現於非蛇紋岩土壤中。在非蛇紋岩土壤中出現頻率最高的 *Meloidogyne*, *Heterocephalobellus* 兩屬線蟲在蛇紋岩土壤中豐度明顯下降，推測該兩屬線蟲可能對於重金屬為較敏感，耐受性較低。因此，本研究首先探究高濃度鎳、鉻於根瘤線蟲體內所產生之生理影響。本研究挑選新興重要入侵病原象耳豆根瘤線蟲作為試驗材料，發現其在鎳、鉻環境中，繁殖、侵染、發育及代謝等生理能力皆受到影響，且高濃度下不利其生存；鎳濃度高於200 ppm時，象耳豆根瘤線蟲的死亡率會顯著上升，而高於50 ppm的鉻，則使象耳豆根瘤線蟲有100%死亡率。當環境中含有鎳時，象耳豆根瘤線蟲的卵孵化率、侵染能力及代謝速度皆下降，然而其卵及幼蟲發育速度皆加快。而環境中的鉻，則使象耳豆根瘤線蟲的卵孵化率、侵染植株及代謝等能力下降，並使幼蟲發育速度加快。於本研究調查中，發現蛇紋岩土壤中有一種對鎳、鉻具有高度耐受性之根瘤線蟲，推測該種類可能獲得環境中微生物之協助而產生較佳適應性。因此，本研究調查蛇紋岩土壤中的細菌群相，進行細菌功能性分析，結果發現，共有十七個屬 (*Dongia*, *Pirellula*, *Anaerolinea*, *Haliangium*, *Sphingomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus*, *Pedomicrobium*, *Pseudaminobacter*, *Steroidobacter*,

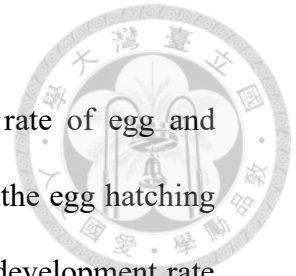


Reyrannella, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*) 於蛇紋岩土壤中具有較高的相對豐度。其中，*Sphinogomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus_Solibacter*, *Steroidobacter*, *Reyrannella* 等八個屬，過去曾被報導於高濃度金屬環境中具耐受性，且有金屬吸附及螯合等能力。本研究發現，*Bacillus nealsonii* 及 *Solitalea koreensis* 與 *Acidobacteria bacterium* 等三菌株與土壤中鎳、鉻濃度具有高度正相關性。本研究中所篩選出之與重金屬相關菌群，可做為後續研究高鉻、鎳環境中線蟲-細菌交互作用的潛力菌株。



Abstract

Serpentine soil is a rich nickel and chromium soil, and the low Mg/Ca ratio is its feature. Microbiome in serpentine soil is unknown. Since January 2019, the study investigated the soil microbiome in serpentine soil and compared them with non-serpentine soils in the same region. There were fewer nematodes in serpentine soil than non-serpentine soil, which suggested high concentration of environmental nickel and chromium are harmful to nematode. Among the 23 samples collected from the eastern Taiwan, a total of 20 families of nematodes were found in serpentine soils, while 22 families were found in non-serpentine soil. The family Qudsianmenatidae was only discovered in serpentine soil, while Anguinidae, Dolichodoridae, Rhabdolaimidae were only observed in non-serpentine soils. The top two abundant genera in non-serpentine soils, *Meloidogyne* spp. and *Herterocephalobellus* spp., only present significant low abundance in serpentine soil. Therefore, we assumed the two genera are sensitive and have lower tolerance level to heavy metals. We explored the physiological effects of *Meloidogyne* spp. in high concentration nickel and chromium environment. The emerging guava root-knot nematode, *Meloidogyne enterolobii*, was select as the experimental material in this study. This study revealed that the reproduction, development, invasion, and metabolism of the nematode were impacted by nickel and chromium, and that the high concentration of the two metals in the environment are toxic to nematodes and harm their survival. When the environmental nickel concentration is higher than 200 ppm, the mortality of *M. enterolobii* was significantly increased. Also, 100% *M. enterolobii* mortality would be reached when the environment contains higher than 50 ppm chromium. When the environment contains nickel, the egg hatching rate, invasion ability and



metabolism of *M. enterolobii* were decreased, but the development rate of egg and juvenile were both increased. On the other hand, chromium decreased the egg hatching rate, invasion ability and metabolism of *M. enterolobii*, and increased development rate of juvenile. One *Meloidogyne* species, code species S, was discovered in serpentine soil, and had higher tolerance to nickel and chromium than other *Meloidogyne* species. We hypothesized *Meloidogyne* species S adapted to the environment with the help of microbes in the same environment. Therefore, this study investigated the bacteria communities in serpentine soil, and analyzed their potential gene functions. As results, seventeen genera were found to have higher relative abundance in serpentine soil: *Dongia*, *Pirellula*, *Anaerolinea*, *Haliangium*, *Sphingomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus*, *Pedomicrobium*, *Pseudaminobacter*, *Steroidobacter*, *Reyrannella*, *Bacillus* and *Bradyrhizobium*. Among them, 8 genera (*Sphingomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus_Solibacter*, *Steroidobacter*, and *Reyrannella*) were previously reported to have higher tolerance to high metal concentrations, and were able to absorb metal and carry chelation. In our study, *Bacillus nealsonii*, *Solitalea koreensis* and *Acidobacteria bacterium* were found to have strong positive correlation to the concentration of nickel and chromium. The heavy-metal related bacteria revealed in this study can be use as candidate strains to study the interaction of nematode and bacteria in the high- nickel and chromium environments.



目錄

摘要.....	i
Abstract	iii
目錄.....	v
第一章· 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機.....	2
第二章· 蛇紋岩土壤微生物相調查.....	4
2.1 簡介.....	4
2.1.1 蛇紋岩土壤微生物生態.....	4
2.1.2 細菌多樣性分析指標.....	6
2.1.3 線蟲成熟指數分析環境汙染程度.....	7
2.1.4 水平基因轉移.....	8
2.1.5 研究目的.....	8
2.2 材料與方法.....	9
2.2.1 蛇紋岩土壤樣本採集及性質分析.....	9
2.2.1.1 土壤樣品採集與保存.....	9
2.2.1.2 手攜式 X 射線螢光光譜儀分析與土壤分類.....	9
2.2.1.3 酸鹼值 (pH) 測定.....	9
2.2.1.4 電導度 (EC) 測定.....	9
2.2.1.5 土壤質地分析.....	9
2.2.1.6 重金屬之 BCR 序列萃取.....	10



2.2.2	土壤細菌相分析.....	11
2.2.2.1	核酸萃取.....	11
2.2.2.2	細菌群相定序.....	11
2.2.2.3	序列分析.....	12
2.2.2.4	數據分析.....	12
2.2.3	線蟲相.....	13
2.2.3.1	線蟲分離及核酸萃取.....	13
2.2.3.2	線蟲形態鑑定.....	13
2.2.3.3	線蟲核醣體核酸之定序.....	13
2.2.3.3.1	線蟲目標片段增幅.....	13
2.2.3.3.2	建構目標片段質體.....	14
2.2.3.3.3	轉殖.....	15
2.2.3.3.4	質體純化.....	16
2.2.3.3.5	定序與解序.....	16
2.2.3.4	根瘤線蟲種類鑑定.....	17
2.2.3.4.1	雌成蟲陰部膜紋鑑定.....	17
2.2.3.4.2	Multiplex PCR.....	18
2.2.3.4.3	增幅 18S, ITS, LSU 目標區段.....	19
2.2.3.5	成熟度指數計算.....	19
2.3	結果.....	20



2.3.1	土壤性質測定	20
2.3.2	線蟲群相	21
2.3.2.1	分離及鑑定之線蟲結果	21
2.3.2.2	植被分佈與土壤種類影響環境中線蟲數量	21
2.3.2.3	土壤種類影響線蟲群相	22
2.3.2.4	植被分佈變化更能顯示線蟲成熟度指標差異	23
2.3.2.5	對鎳、鉻耐受性高的根瘤線蟲 S	23
2.3.2.5	對鎳、鉻耐受性高的根瘤線蟲 S	23
2.3.2.5.1	根瘤線蟲 S 第曼公式指標及陰部膜紋	23
2.3.2.5.2	根瘤線蟲 S 分子鑑定	23
2.3.2.5.3	根瘤線蟲 S 能存活於高濃度鎳、鉻溶液中	23
2.3.3	細菌群相	24
2.3.3.1	環境中菌群種類相對豐度比較	24
2.3.3.2	土壤中細菌豐度與環境因子相關性	25
2.4	討論	26
第三章	鎳、鉻對象耳豆根瘤線蟲生理影響	31
3.1	簡介	31
3.1.1	鎳對線蟲的影響	31
3.1.2	鉻對線蟲的影響	32
3.1.3	根瘤線蟲	33
3.1.4	研究目的	34
3.2	材料與方法	35
3.2.1	象耳豆根瘤線蟲培養	35



3.2.2	金屬溶液配製	36
3.2.3	存亡試驗	36
3.2.4	孵化率試驗	36
3.2.5	根部侵染試驗	37
3.2.6	胚胎發育試驗	38
3.2.7	齡期發育試驗	39
3.2.8	脂質染色試驗	40
3.2.9	接種試驗	41
3.2.10	數據分析	41
3.3	結果	42
3.3.1	線蟲對環境中鉻、鎳具有敏感性	42
3.3.2	鎳鉻抑制卵孵化率	42
3.3.3	鎳與鉻皆降低線蟲侵染植物的能力	43
3.3.4	鎳加快胚胎發育	43
3.3.5	鎳鉻加速幼蟲發育	44
3.3.6	鎳鉻降低代謝速度	44
3.3.7	在含有鎳鉻環境下仍可完成世代	45
3.4	討論	45
第四章	結論	50
	引用文獻	51
	圖表	65



表次索引

表一、線蟲分子鑑定引子對序列。.....	65
表二、土壤樣本性質。.....	66
表三、土壤中金屬可交換態濃度.....	68
表四、各樣品定序資訊.....	69
表五、各樣品線蟲種類及數量累積表.....	70
表六、根瘤線蟲 S 二齡幼蟲量測。.....	72
表七、18S, ITS, SSU 區段定序結果。.....	73

圖次索引

圖一、土壤樣本採集點示意圖。.....	74
圖二、幫浦及布氏漏斗裝置示意圖。.....	75
圖三、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤之線蟲數量累積圖。.....	76
圖四、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中線蟲種類熱圖分析。.....	77
圖五、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中數量前十的線蟲屬別。.....	78
圖六、不同土壤類別之線蟲成熟度指標。.....	79
圖七、不同植被環境中線蟲成熟度指標。.....	80
圖八、自蛇紋岩分離之根瘤線蟲 S 二齡幼蟲及陰部膜紋。.....	81
圖九、Multiplex 電泳結果。.....	82
圖十、根瘤線蟲對鎳鉻的耐受性比較。.....	83
圖十一、土壤中前十細菌比例。.....	84
圖十二、土壤細菌物種 Shannon、Simpson、ACE 及 Chao1 多樣性分析。.....	85
圖十三、CCA 分析細菌群相與環境因子酸鹼度及鎳鉻濃度之相關性。.....	86



圖十四、熱圖分析土壤中細菌豐度變化。	87
圖十五、與鎳鉻濃度高度正相關性的菌株。	88
圖十六、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中不同時間點之死亡率。	89
圖十七、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中不同時間點之死亡率。	90
圖十八、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中十天後的卵孵化率。	91
圖十九、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中十天後的卵孵化率。	92
圖二十、象耳豆根瘤線蟲於含鎳 pluronic gel 中成功侵染植株數目。	93
圖二十一、象耳豆根瘤線蟲於含鉻 pluronic gel 中成功侵染植株數目。	94
圖二十二、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中六十小時後一齡幼蟲及二齡幼蟲比例。 .	95
圖二十三、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中六十小時後一齡幼蟲及二齡幼蟲比例。 .	96
圖二十四、象耳豆根瘤線蟲在含鎳土壤中番茄幼苗根部裡十天後發育階段比例。	97
圖二十五、象耳豆根瘤線蟲在含鉻土壤中番茄幼苗根部裡十天後發育階段比例。	98
圖二十六、象耳豆根瘤線蟲於螢光顯微鏡下脂質含量。	99
圖二十七、象耳豆根瘤線蟲於螢光顯微鏡下脂質含量。	100
圖二十八、番茄株高、根系長度及根重受鎳、鉻及象耳豆根瘤線蟲侵染之變化。	101
圖二十九、象耳豆根瘤線蟲於鎳鉻土壤環境中結瘤數、根瘤指數、卵塊數、卵數 及土壤中二齡幼蟲隻數的變化。	102



第一章・緒論

1.1 研究背景

蛇紋石為富含鎂的超基性變質岩，其分布於板塊交界處，風化後的土壤稱為蛇紋岩土壤。蛇紋岩廣泛分布於全球，巴爾幹半島、土耳其、古巴、阿爾卑斯山、法國新喀里多尼亞、美國加利福尼亞、日本、中國、越南、菲律賓及台灣等地區皆有蛇紋岩岩礦 (Shewry & Peterson 1976; Nabais et al. 1996; Harrison 1997; Dell et al. 2002)。在台灣，蛇紋岩分布於宜蘭縣 (南澳) 及花蓮縣 (豐田、萬榮、瑞穗、玉里) 與台東縣 (池上、卑南) 等地 (Cheng 2009; Cheng et al. 2011; Chang et al. 2013)。蛇紋岩富含鎳、鉻、鈷及錳等礦物，其風化過程中會將石綿纖維釋放至環境中，因此有危害環境生態及人體健康的疑慮 (Hseu 2018)。一般土壤中的鎳濃度範圍多介於 5-500 ppm (mg/kg)、鉻平均含量小於 100 ppm (Kabata-Pendias 2001)，而蛇紋岩土壤中的鎳與鉻含量則皆可超過 10000 ppm (Oze et al. 2004; Hseu 2006)，但其對植物之生物有效性鎳僅約為總量之 3.5% 至 12.0%，鉻則更低為 0.1% (劉滄琴, 2007)，其可能與礦物之鍵結強度有關，鎳為二價之離子，而鉻常為三價離子，因此與三價鉻離子相關之礦物抵抗風化作用的能力會大於二價鎳有關之礦物。此外，蛇紋岩土壤也具有錳、鈷含量偏高的特性 (Oze et al. 2004; Wu et al. 2012; Rajapaksha et al. 2013)，且土壤中鈣/鎂比值小於 1 (Cooper 1978)，整體缺乏具生物有效性的氮、磷、鉀，導致種植肥力差 (Hseu 2018)。

當土壤中含有高濃度重金屬，造成作物生長不良或作物中有重金屬殘留，不僅其周圍生態遭受脅迫，更影響農產品食用安全。蛇紋岩土壤中有高濃度鎳與鉻，重金屬鎳影響生物生理功能，舉凡人類呼吸功能、損害大鼠心臟及肝臟等 (Ahamed



2011; Meindl et al. 2014)；而暴露於金屬鉻環境中則使人肺炎風險增高及土壤中細菌量減少 (Pandey et al. 2005; Saha et al., 2011)。而目前已知鎳會降低線蟲壽命長度、繁殖及活動能力 (Khan et al. 1996; Wang & Wang 2008)；鉻則使線蟲壽命縮短、繁殖及活動能力下降，甚至使發育速度變慢 (Boyle & Kakouli-Duarte 2008; Roh et al. 2009; Wu et al. 2012; Jiang et al. 2016)。除了鎳、鉻以外，其他重金屬 (銀、鎘、鈷、銅、錳、汞、鋅、鉛) 亦會造成線蟲壽命減短、活動能力，而鋅亦會使線蟲發育速度下降 (Vranken et al. 1988; Wang & Xing 2008)。綜合前人研究得知，當環境中重金屬含量增加，除了危害該棲地之生物，甚至造成其許多生理行為受到影響，而隨著人類生活便利，現今環境污染問題日益增加，因此重金屬污染對於生物的危害仍為須重視的問題。

1.2 研究動機

我國東部具有豐富的蛇紋岩與蛇紋岩土壤分布，對於土壤特性與相關植被等已有少數團隊在進行探索，但目前對於微生物群相的資訊仍相當有限。本研究室調查富含重金屬的鎳、鉻土壤微生物相時，發現包含根瘤線蟲等數種線蟲之存在。此觀察與前人研究所指含有鎳、鉻等重金屬的環境會使其死亡之現象不符 (Pasternak 1982; Vranken & Tiré C Heip 1989; Khan et al. 1996)。許多研究指出土壤微生物可能透過水平基因轉移 (Horizontal gene transfer) 方式，而演化生存於逆境之中 (Nelson et al. 1999; Keeling 2009; Zhaxybayeva et al. 2009; Shoeb et al. 2012)。基於前人研究曾指出線蟲也可能透過環境中微生物之水平基因轉移而獲得有利於其生存之基因 (Danchin et al. 2010; Mayer et al. 2011)，推論這些能夠於重金屬環境中之線蟲可能具有重金屬環境逆境之適應性，且其能力可能來自於環境中之微生物水平基因轉移。根瘤線蟲為 (Root-knot nematodes) 遍佈全球並首具經濟重要性之植物病原線蟲，可寄生超過兩千種植物，為土壤傳播，且於適當環境條件下繁殖力強、不容易



移除。過往研究報告中認為根瘤線蟲應無法生存於高濃度鎳的環境中，更提出添加鎳作為土壤改良劑以進行防治根瘤線蟲的想法 (Khan et al. 1996; Khan et al. 2006)。因此，本研究選用根瘤線蟲作為材料，探討該類重金屬環境對線蟲所產生之逆境，並首度嘗試從微生物與微生物交互作用的角度，透過微生物群相數據的分析，探究土壤微生物於此環境中可能與線蟲產生之交互作用。



第二章 · 蛇紋岩土壤微生物相調查

2.1 簡介

2.1.1 蛇紋岩土壤微生物生態

蛇紋岩土壤生態群相的探索還處於起始的階段。對於該土壤環境中真菌群相的研究，大約起始於十五年前。Pal 等人在印度安德曼地區蛇紋岩土壤，發現 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* 及 *Mucor* 等六個屬的真菌為該地的優勢族群。針對被成功分離出的 *Aspergillus*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizopus* 及 *Trichoderma* 等七個屬的真菌探討其功能性，發 *Aspergillus*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* 及 *Trichoderma* 皆對鈷有抗性，能生存於含鈷培養基中，其中 *Mortierella* SPS 403 為吸收最多鈷離子菌株 (Pal et al. 2006; Pal et al. 2007)。另外，當環境中具有菌根菌 (mycorrhiza) 時，蛇紋岩土壤中的微生物相具有較高的多樣性，且歧異度較低。學者推論，蛇紋岩土壤中的重金屬對菌根菌影響較小，使菌根菌可以適應並生存於該環境，不會影響其多樣性，甚至可以協助其他微生物適應該環境，使蛇紋岩土壤微生物相的多樣性上升。當環境中有菌根菌存在時，可協助植物生長於蛇紋岩土壤，使植物生長較好，受重金屬影響較小 (Schechter & Bruns 2008; Branco 2010; Doubkova et al. 2012; Doubkova et al. 2013)。

分子生物學的發展與次世代定序的技術成熟，致使蛇紋岩土壤的細菌群相得以被探索。位於地中海型氣候的義大利的含有高濃度鎳的蛇紋岩土壤中，細菌群相的相對豐度，在門 (Phylum) 的階層，由高至低依序排列為 Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria 等菌 (Mattarozzi et al. 2017)。Mattarozzi 等人 (2017)



基於在特定分類門的物種，蛋白質數量與總鑑定到的蛋白質數量之固定比率，遂以功能性蛋白質系統發育為分類依據，進而分析功能性微生物相對豐度。結果觀察觀察到 Proteobacteria 門為最具優勢。其中， α -Proteobacteria 中 Rhizobiales 目(Order) 為最大宗，而 β -Proteobacteria 內則是 Burkholderiales 最為豐富，及 γ -Proteobacteria 中 Enterobacteriales, Pseudomonadales 及 Xanthomonadales 等目的菌最多。此外，Actinobacteria, Corynebacteriales, Micrococcales 等目也被觀察到為此土壤中的優勢菌群；其中，相對豐度最高的屬為 *Methylobacterium mesophylicum* (Mattarozzi et al., 2017)。Igwe 等人 (2019) 將植物種於蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中，再分析根圈土壤菌相，發現雖然兩土壤中皆是 Proteobacteria 及 Actinobacteria 門為較優勢的族群，但非蛇紋岩土壤的菌種多樣性較高 (Igwe & Vannette 2019)。在該蛇紋岩土壤中，*Microvirga* 及 *Acidobacteria bacterium* RB41 有相對高的豐度。*Mircovirga* 屬與前述義大利學者研究找到的 *Methylobacterium* 皆歸在 *Methlobacteriaceae* 科，與蛇紋岩土壤中的根瘤菌 *Mesorhizobium* 在比較基因演化分析的結果屬於同一個適應族群，該菌群中分離出的菌株大多對鎳具有高度的耐受性 (Porter et al. 2017)。而在印度安德曼蛇紋岩土壤菌相調查，發現優勢菌群多為革蘭氏陰性細菌，包含 *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* 及 *Actineobacter*。而相對豐度較低的革蘭氏陽性菌中，則包含有 *Bacillus* 及 *Streptomyces*。研究指出，比起真菌，更多根際細菌能存活於含鎳的培養基中，並且發現 *Cupriavidus* KPS 201, *Pseudomonas* AND 601 及 *Bacillus* CTS 420 等菌株具有吸收水溶液中鎳的功能 (Pal et al. 2007)。

線蟲是地表上數量最多且分佈非常廣泛的動物 (Van Den Hoogen et al. 2019)，然而學者對於蛇紋岩土壤中的線蟲群相了解相當有限。Hungate 等人於 2000 年在美國賈斯珀里奇生物保護區 (Jasper Ridge Biological Preserve) 的草地調



查蛇紋岩土壤，發現雖然和砂質土壤一樣是食細菌性的種類占比較高，但蛇紋岩土壤中有較高數量的線蟲 (Hungate et al. 2000)。Monokrousos 等人調查希臘地區蛇紋岩土壤，發現無論其上的植被為何，線蟲的物種豐富度及成熟指數 (maturity index, MI 值) 皆高於無植被的蛇紋岩土壤。然而，植被影響根圈土壤中線蟲群相。食細菌的線蟲在所有組別中皆為最大族群，食真菌的線蟲，則在無植被處會顯著較少 (Monokrousos et al. 2014)。

對於蛇紋岩土壤微生物群相的研究，過往的報導局限於義大利、美國、印度、奧地利等地，且僅針對單一類別的微生物，未曾討論微生物之間的交互作用關係。我國東部具有豐富的蛇紋岩與蛇紋岩土壤分布，雖然對於土壤性質特性與相關植被等已有團隊在進行探索，但目前對於微生物群相的資訊仍相當有限，值得探究。

2.1.2 細菌多樣性分析指標

以探究 Alpha diversity 來了解一棲息地中物種歧異度差異，選用了常見的四種多樣性指標 Shannon、Simpson、Chao-1 和 ACE 進行分析。

環境受到人為擾動、汙染時，可能導致其中的生物多樣性降低，且有能適應其環境變化的優勢族群出現。生物多樣性指標可反應環境中生物多樣性 (diversity) 的變化。香農-維納指數 (Shannon-Wiener index) 常用於環境中生物多樣性分析的指標 (Spatharis et al. 2011; Strong 2016)。香農指數由 Shannon 於 1948 年 (Shannon 1948)，而當時 Wiener 被認為是該理論共同發展者，因此後人為了紀念 Wiener，將兩人名字並列，因此後續成了「香農-維納指數」。該指數透過計算物種總數及各物種比例得出，除了包含物種多樣性外，其中也考慮到物種均勻度，越豐富均勻的族群，指標數值越高，代表該環境具有較高的生物多樣性。



辛普森指數 (Simpson index) 於 1949 年被提出 (Simpson, 1949)，計算時同時考慮物種均勻度及豐富度，也是常被用於探討環境中生物多樣性的指標，其數值介於 0 至 1，數值越大表示多樣性越高。其餘兩個多樣性指標 Chao1 及 ACE 則分析其群相豐富度，其結果亦可以反映 OTU 數量多寡，指數越高代表豐富度越高。Chao1 最早於 1984 年被 Chao 提出 (Chao, 1984)，該指數會同時考慮僅出現一次的物種，若抽樣觀察到多數物種都屬於只出現一次的物種，則表示該群相可能存在更多物種待發現，亦可預期該族相有較高的豐富度。ACE 同樣由 Chao 提出 (Chao et al., 1993)，是生態學估計物種總數的常用指數之一，與 Chao1 相同，指數越大表示群落豐富度越高。

2.1.3 線蟲成熟指數分析環境汙染程度

線蟲分布廣、數量多，且對於環境有高敏感性，具有可以發展成環境汙染指標的潛力生物。Bongers 於 1990 提出「成熟指數 (maturity index, MI)」，做為統整腐生性線蟲的 c-p 指標及植食性線蟲 PPI 指標，再經過計算所得到的綜合指標 (Bongers 1990)。MI 值越高，表示此環境越不受干擾，而越低則受人為影響較重。於土壤中添加氮源，或農藥施灑，皆會使 MI 值降低 (Neher 1999; Ruess et al. 2001; Sarathchandra et al. 2001; Gupta et al 2019)。環境中有金屬銅的存在時，也有較低的 MI 值 (Khan et al. 1996)。然而，此指標未能反應所有環境汙染源。Negy 研究土壤中 13 種重金屬 (鋁、砷、鉍、鎘、鉻、汞、銅、鉬、鎳、鉛、硒、鋇) 與線蟲 MI 值之相關性，發現僅有鉻及硒的存在對 MI 值有負相關性 (Nagy 1999)。Fuller 等人 (1997) 也報導，並非全數添加三氯乙烯及甲苯的土壤，MI 值都會被影響 (Fuller et al. 1997)。



2.1.4 水平基因轉移

自然界中，生物透過基因體的變異與多樣性，得以適應和生存於不同的環境中。面對逆境時，擁有特殊的抗逆境基因則有利於該物種族群的生存。基因體的改變，可能來自於突變，亦可能為從他處獲得基因的結果。生物由外界獲得基因的方式，包含垂直基因傳遞 (vertical gene transfer) 與水平基因轉移 (horizontal gene transfer) 等方式；前者為祖先傳遞給子代，為同物種內傳遞；後者則為生物傳遞給周圍其他生物細胞，可能傳遞給非同物種生物 (Keeling & Palmer 2008)。目前有許多研究支持物種間可能透過水平基因轉移，可使生物適應於逆境中 (Nelson et al. 1999; Keeling 2009; Zhaxybayeva et al. 2009; Shoeb et al. 2012)；亦有研究指出線蟲透過水平基因轉移獲得基因，協助其生存、取食等能力 (Sommer & Streit 2011)。例如，植物寄生性線蟲的纖維素酵素酶基因 (cellulase) 被認為來自於環境中的細菌 (Kikuchi et al. 2004; Abad et al. 2008; Opperman et al. 2008; Haegeman et al. 2011)。Mayer 等人 (2011) 以轉錄體學分析種內及種間之纖維素酶基因差異，並透過實驗證實腐生性線蟲 *Pristionchus pacificus* 可透過殖入纖維素酶基因而產生有活性的纖維素酶 (Mayer et al. 2011)。而 Danchin 等人 (2010) 在透過系統發育分析功能性酵素，發現南方根瘤線蟲 *Meloidogyne incognita* 中的糖苷水解酶 GH28 與一系列的細菌直系同源物形成高度相似的族群 (Danchin et al. 2010)。

2.1.5 研究目的

前人研究曾指出線蟲可能透過環境中微生物之水平基因轉移而獲得有利於其生存之基因，因此，推論能夠於重金屬環境中之線蟲可能具有環境逆境之適應性，且其能力可能來自於環境中之微生物水平基因轉移。本章研究調查分析高濃度重



金屬土壤 (蛇紋岩土壤) 中之細菌群相，找尋可能做為協助線蟲生存於該環境中之潛力菌株，以利未來進一步研究線蟲與環境微生物之交互作用，了解線蟲對於抵抗逆境之相關演化機制，作為綜合防治植物線蟲之相關參考。

2.2 材料與方法

2.2.1 蛇紋岩土壤樣本採集及性質分析

2.2.1.1 土壤樣品採集與保存

2019 年 1 月至 12 月間，於台灣東部宜蘭三星、花蓮吉安鄉、壽豐鄉、萬榮鄉、台東池上鄉等共 23 個區域採集蛇紋岩土壤 (9 處) 及非蛇紋岩土壤 (14 處) 樣品進行研究，如圖一。採集針對細菌與植物線蟲較活躍的部位，深度約 3-15 公分的植物根圈土壤進行收集。每個區域皆隨機選取 13 個點進行收集，每個點取約 500 克土壤裝入夾鏈袋中。土壤由快遞運回實驗室後，將每夾鏈袋中土壤接分別混合均勻。自編號 1-3 的土樣中，等比例取部分填充滿 50 mL 離心管一管，後立刻保存於 -80 °C 中，作為後續萃取土壤 DNA 使用；同時，相同編號之土樣等比例混合後取約 500 克，在室溫下陰乾 1-2 週作為後續土壤性質測定使用。其餘土壤則保存於室溫，用於線蟲相分析。

2.2.1.2 手攜式 X 射線螢光光譜儀分析與土壤分類

將已陰乾的土壤樣品以 100 mesh 網篩過篩，再透過手攜式 X 射線螢光光譜儀 Portable X-ray Fluorescence (pXRF) (Olympus XRF DP2000, Olympus Corporation, Japan) 分析其土壤中所含各元素含量 (Hseu et al., 2016)。依照分析結果所得之樣本中鎳、鉻含量，將 23 個土壤樣品分成濃度分類為低 (濃度 < 200 mg/kg)、中 (200 mg/kg ≤ 濃度 < 1000 mg/kg)、高 (1000 mg/kg ≤ 濃度) 等三類群。



2.2.1.3 酸鹼值 (pH) 測定

使用 HORIBA F-71 pH meter (Horiba Ltd., Japan) 測定土壤樣本之酸鹼值。測定樣品前，皆以 pH 7 與 pH 10 標準緩衝溶液校正 pH 測定儀。秤量 20 g 土壤於 100 mL 燒杯中，加入 20 mL 去離子水並以玻璃棒攪拌均勻，靜置 30 分鐘。接著再攪拌一次，再靜置 30 分鐘後，測定該土壤懸浮液之酸鹼值 (McLean 1982)。每個樣品測定前需再均勻攪拌，待讀值穩定後記錄讀值。

2.2.1.4 電導度 (EC 值) 測定

使用 JENCO 3170 電導度測定儀 (Jenco Ltd., Taiwan) 測定土壤樣本之電導度。測定樣品前先以 1413 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 標準液校正電導度測定儀。秤量 100 g 土壤於 500 mL 塑膠燒杯中，緩慢加入去離子水且持續攪拌使其混和直到土壤樣本表面反光。靜置一小時後，充分攪拌土壤樣本，將樣本倒入鋪有濾紙的布氏漏斗裝置，如圖二，並利用幫浦抽氣過濾，收集其濾液，利用電導度計測定濾液 EC 值 (Rhoades 1982)。

2.2.1.5 土壤質地分析 (比重計法)

質地分析採用 Bouyoucos 所提出之比重計法 (Bouyoucos 1936)。秤取 50 g 土壤於 500 mL 燒杯中，加入 200 mL 去離子水充分攪拌均勻，並加入 10 mL 5% 偏磷酸鈉溶液，放置室溫反應至隔天。將土壤懸浮液倒入金屬攪拌杯中，並添加去離子水至杯子 1/2 處，將杯置於攪拌器下方攪拌六分鐘。攪拌後將全部懸濁液移入 1000 mL 量筒內，並加去離子水至 1000 mL，用攪拌槳上下攪動二十次，取出開始計時，二十秒後，輕放入比重計，不使上下震動。待四秒時，紀錄比重計讀值 (P_s ; g/L)，此讀值為黏土與粉土 (Silt) 之量。記錄完後，再次以攪拌棒上下攪動土壤懸濁液，靜置兩小時後，放入比重計讀取讀數 (P_c ; g/L)，此讀值為樣本中黏土量。測量土壤樣本需做空白校正，因偏磷酸鈉溶液會影響液體密度，故應測定每 1000 mL 去離子水中含 10 mL 偏磷酸鈉溶液之比重計讀數 (P_B)，然後加以扣除。



2.2.1.6 重金屬之 BCR 序列萃取

參考歐盟提出之 BCR 序列萃取法 (Sutherland and Tack, 2003)。針對酸可溶及可交換態 (Acid-exchangeable fraction, F1) 及可還原態 (Reduction fraction, F2) 測定。首先 F1 萃取方法為：稱取 2 g 土壤樣品，置於 100 mL 離心瓶中，並加入 40 mL 0.11 M HOAc，在室溫下以 150-175 rpm 震盪十六小時，再以 3000 rpm 離心二十分鐘，上清液以 Whatman No. 42 濾紙過濾，得到 F1 萃取液。接著將上一步驟之殘餘土樣加入 40 mL 0.5 M NH₂OH-HCl 溶液，並添加 25 mL 2M HNO₃ 溶液使其 pH=1.5，在室溫下以 150-175 rpm 震盪 16 小時，固液相分離及處理方式同前步驟，獲得 F2 萃取液。將獲得之萃取液以感應耦合式電漿 (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP/OES, HORIBA, ULTIMA2) 測定鎳、錳、鉻、鈷之濃度。

2.2.2 土壤細菌相分析

2.2.2.1 核酸萃取

本研究欲針對所採集之蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤之細菌群相進行分析。各區域土壤樣品取 250 mg，以 DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen Ltd., Germany) 試劑組萃取土壤總體核酸，根據廠商建議之步驟進行。首先將 250 mg 土壤放入 PowerBead Pro Tube 中，隨後加入 800 µl CD1 溶液，接著放置於 Vortex-Genie 2 震盪儀 (Scientific Industries Inc., USA) 上並以刻度 10 震盪強度震盪十分鐘 (若超過十二個樣本，則時間增加五分鐘)。震盪完確認樣本與溶液均勻混和後，將其以 15000 g 離心一分鐘，接著將 600 µl 上清液移至 microcentrifuge tube 中，再加入 200 µl CD2 溶液並以震盪儀震盪五秒，再將其以 15000 g 離心一分鐘。離心完後將其 600 µl 上清液移至乾淨的 microcentrifuge tube，須避免吸取底部之沉澱物，再加



入 600 μ l CD3 溶液並以震盪儀震盪五秒，並以迷你微量離心機離心五秒，確保管壁及管蓋無殘留液體，隨後吸取 650 μ l 裂解液至 MB Spin Column 中，再以 15000 g 離心一分鐘，接著去除液體再將剩餘的 650 μ l 裂解液移入 MB Spin Column 中，並以 15000 g 離心一分鐘。離心完畢後，將 MB Spin Column 移至乾淨的 2 mL Collection Tube 上，再加入 500 μ l EA 溶液並以 15000 g 離心一分鐘，接著將液體去除後，再加入 500 μ l C5 溶液，再次以 15000 g 離心一分鐘。接著將 MB Spin Column 移至乾淨的 Collection Tube，再以 16000 g 離心兩分鐘，確保 Column 上無殘留液體。最後將其移至 Elution tube 中，並加入 50 μ l 1/10 EB 溶液，確保全部溶液停留於濾膜上並靜置一分鐘，再以 15000 g 離心一分鐘，完成萃取土壤 DNA。萃取完之核酸分裝 20 μ l 保存於-20 °C，另外 30 μ l 保存於-80 °C。待後續進行定序。

2.2.2.2 細菌群相定序

利用專一性引子對 319F (5'- CCTACGGGNGGCWGCA- 3') 及 806R (5'- GACTACHVGGGGTATCTAATCC -3')，針對細菌 16S 核糖體 RNA 的 V3-V4 區段進行增幅。每個樣品需含有 12.5 ng DNA，並搭配利用 KAPA HiFi HotStart ReadyMix 試劑 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。其反應條件為：95 °C 反應 3 分鐘，隨後進行 95 °C 反應 30 秒，55 °C 反應 30 秒及 72 °C 反應 30 秒循環 25 次，最後於 72 °C 反應 5 分鐘。PCR 產物透過 1.5% Agarose 電泳膠進行電泳分離，並針對 500 bp 位置條帶純化其 DNA 以利建立後續細菌資料庫。細菌資料庫依據 Illumina 平台的 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation 步驟進行建構。PCR 產物透過 Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) 及 Qsep100™ 系統 (BioOptic Inc., Taiwan) 進行評估及測定，將須上機的每個樣本調整至等量後混和，接著使用 Illumina MiSeq platform 產生 300 bps 成對的序列資料庫 (Klindworth et al., 2013, Fadrosh et al., 2014)。



2.2.2.3 序列分析

首先將初始讀出的成對序列利用 FLASH (v1.2.7, FutureWave Software, USA) 進行組裝 (Magoc & Salzberg 2011)，並使用 QIIME 1.9.1 (<http://qiime.org/>) 軟體將低品質 ($Q < 20$) 的序列去除 (Caporaso et al. 2010)，留下的序列透過 UCHIME 獲得有效之目標物種 (Edgar et al. 2011; Haas et al. 2011)，隨後過濾數據完後即會產生初始 operational taxonomic unit (Edgar)，OTU 透過 USEARCH 軟體 (v.7, <https://www.drive5.com/usearch/>) 將其與過往物種 97%以上序列相符的 OTU 群集一起 (Edgar, 2013)。得到之序列使用 R 軟體 (v.2 15.3, <https://www.r-project.org/>) 搭配 FactoMineR package 及 ggplot2 package 減少多維度變異並進行 Principal Component analysis (Zemanova et al.) 分析菌相與環境因子之關聯性。

2.2.2.4 數據分析

為了瞭解各樣品間物種豐度資訊，繪製熱圖以便比較各樣品間物種豐度高低 (Jami et al. 2013)，分組樣本先透過標準化得到 z-score，將一個樣品在該分組上的豐度和所有樣品在該分組的平均豐度差除以所有樣品在該分組上的標準差，以呈現圖中物種豐度，為+2 至-2。以探究 Alpha diversity 來了解一棲息地中物種歧異度差異，選用了常見的四種多樣性指標進行分析。以 QIIME 分析 Shannon，Simpson，Chao1 及 ACE (Whittaker 1972)。族群豐富度透過 Chao1 及 ACE 指數評估，物種多樣性中的相對豐度及均勻度則透過 Shannon 及 Simpson 評估。透過隨機選擇每個樣品的測序數量來構建稀釋曲線，以代表觀察到物種的數量 (Schloss et al., 2009)。為了確認土壤性質與細菌群相之間的關係，使用 R 軟體 (v.2 15.3, <https://www.r-project.org/>) 中的 'vegan' 套件將土壤性質與定序結果之細菌種類進行 Canonical Correspondence Analysis (CCA)。



2.2.3 線蟲相

2.2.3.1 線蟲分離及核酸萃取

土壤樣本之線蟲以改良式柏門氏漏斗分離法分離 (Baermann & and Eine einfache, 1917)。取 100 g \pm 5% 土壤，放置於鋪有單張擦手紙的 20 mesh 網篩中，將漏斗水量至淹過網篩濾網，完成架設漏斗裝置，並靜置以待分離線蟲。收集 45 小時後軟管底部 10 ml 的水樣，於光學顯微鏡 (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japan) 視野下，以數位單眼相機 (Canon EOS 80D, Canon Inc., Japan) 進行水樣中每隻線蟲之型態拍攝，以利後續型態鑑定。將拍照完的線蟲放入 20 μ l 0.25 M NaOH 浸泡三至十六小時後，利用核酸增殖系統儀 (Bio rad S1000TM, Bio Rad Laboratories Inc., USA) 於 95 $^{\circ}$ C 下加熱三分鐘，再依序加入 10 μ l 0.5M Tris buffer (pH 8.0)、4 μ l 1.25M HCl 和 5 μ l 2% triton X-100，之後再加熱至 95 $^{\circ}$ C 三分鐘，完成線蟲 DNA 之粗萃取 (Floyd et al., 2002)。萃取得的 DNA 保存於 -20 $^{\circ}$ C，以供後續試驗。

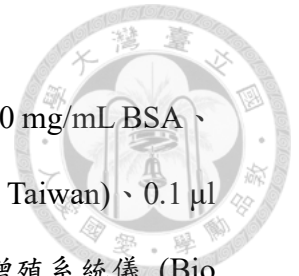
2.2.3.2 線蟲型態鑑定

由改良式柏門氏漏斗分離法分離的線蟲，於光學顯微鏡 (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japan) 下拍照後的照片，利用 Image J 1.8.0 (NIH, USA) 輔助，進行線蟲體長、體寬、頭唇部至食道球長度、尾巴長度等器官之比例量測，運用第曼公式 (de Manian formula) 與 Nemaplex 資料庫 (2020, USA) 及相關文獻之描述進行比對，完成線蟲種類之鑑定。

2.2.3.3 線蟲核糖體核酸定序

2.2.3.3.1 線蟲目標片段增幅

透過初步型態鑑定分為植食性線蟲與腐生性線蟲，並參考前人已發表研究使用之線蟲通用的 PCR 引子進行增幅特定區段。PCR 反應液體積為 10 μ l，其中包含：



2.7 μl PCR H_2O 、1 μl 0.5 Tris (pH 8.3)、1 μl 0.025 M MgCl_2 、0.5 μl 10 mg/mL BSA、0.5 μl 2.5 mM dNTP (Bioman, Taiwan)、2 μl 10 μM primers (Genomic, Taiwan)、0.1 μl Bio Taq DNA Polymerase (Bioman, Taiwan) 及 1 μl DNA。搭配核酸增殖系統儀 (Bio rad S1000TM, Bio Rad Laboratories Inc., USA)，依據不同引子對增幅目標線蟲核酸片段植食性線蟲選用引子對 TW81 (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC -3') 和 AB28 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT -3')，針對目標物種核糖體核酸 ITS 區段進行增幅，其反應條件為：94 °C 反應 4 分鐘，隨後進行 94 °C 反應 30 秒，55 °C 反應 30 秒及 72 °C 反應 90 秒循環 35 次，最後於 72 °C 反應 10 分鐘 (Zheng et al. 2000)。腐生性線蟲選用引子對 NF1 (5'-GGT GGT GCA TGG CCG TTC TTA GTT -3') 和 18Sr2b (5'-TAC AAA GGG CAG GGA CGT AAT -3')，針對目標物種核糖體核酸 SSU 區段進行增幅，其反應條件為：94 °C 反應 10 分鐘，隨後進行 94 °C 反應 1 分鐘，58 °C 反應 30 秒及 72 °C 反應 1 分鐘循環 35 次，最後於 72 °C 反應 10 分鐘 (Porazinska et al. 2009)。增幅後的目標片段產物儲存於-20 °C 冰箱。

2.2.3.3.2 建構目標片段質體

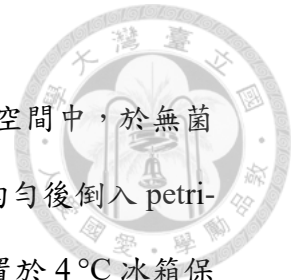
製作 1.5 % Agarose 電泳膠 (Bioman, Taiwan) 並浸於含有 0.5 X TBE buffer 之 Owl separation systems (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。取 10 μl PCR 產物與 2 μl 6X DNA Loading Dye (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 混和後，使用 pipette 吸取移入 1.5 % Agarose 電泳膠孔槽中，並於相近電泳膠孔槽中添加 1 μl 100 bp DNA ladder (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 作為增幅條帶長度大小對照。反應以電壓 105 伏特，電流 400 毫安培進行 40 分鐘。後膠體以稀釋 1000 倍之溴化乙錠 (Ethidium Bromide; EtBr, Bioshop Canada Inc., Canada) 染色 10 分鐘，再以 ddH₂O 退染 10 秒。最後將體置於紫外光成像設備 Gel DOCTM EZ Imager (Bio-Rad, USA) 中，搭配 Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, USA) 軟體擷取並分析影像，判讀增幅片段的



位置。參照 MinElute[®] Gel Extraction Kit (Qiagen Ltd., Germany) 使用說明書，以解剖刀片將符合目標片段大小的膠體，用刀片切下後放在 1.7 mL 的離心管內，加入膠體體積 3 倍的 QG buffer，接著在 50 °C 水浴槽中加熱 10 分鐘，待其膠體完全融於溶液，之後加入膠體體積 1 倍的 Isopropanol，均勻搖晃數次。將混和液加入 MinElute column，以 13000 rpm 離心 20 秒，將濾液倒掉，並加入 750 μ l PE buffer 靜置 3 分鐘，以 13000 rpm 離心 20 秒並倒掉濾液，之後再以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將 column 移至新的 1.7 mL 離心管。加入 10 μ l 1/10 EB 並靜置 1 分鐘，之後以 13000 rpm 離心 1 分鐘。最後收取含目標片段之 DNA 濾液，放置於 -20 °C 冰箱保存。後續將純化的目標 DNA 片段克隆至 p-GEM[®]-T Easy Vector System I 系統 (Promega Corp., Madison, WI, USA)。前述得到純化 1 μ l DNA 與 1.66 μ l 2X Rapid Ligation Buffer、0.33 μ l p-GEMT、0.33 μ l T4-ligase 在 200 μ l 離心管中混和均勻，並置於 4 °C 進行反應至隔天。

2.2.3.3.3 轉殖

將 14 mL 養菌管 (BD Biosciences Ltd., USA) 放入冰中預冷 20 分鐘，之後加入 8 μ l OmniMax[™] 2 T1 Cell (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 以及 1 μ l ligation 的產物，混和靜置 20 分鐘，接著放入 42 °C 水浴槽內加熱 45 秒，再迅速移到冰上靜置 2 分鐘。接著加入 250 μ l SOC medium+ MgCl₂ (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)，並將養菌管放入 42 °C 培養箱內以 225 rpm 震盪培養 90 分鐘。吸取 100 μ l 培養液並以玻棒平均塗抹於藍白篩培養基，倒放於 37 °C 培養箱中 16~18 小時。待藍白篩培養基上菌落生成後，於無菌操作台內以滅過菌的牙籤沾取適當大小的單一圓形白色菌落，接著在裝有 2 mL LB broth+ Ampicillin 的 14 mL 養菌管中均勻混和，並置於 37 °C 培養箱，以 250 rpm 震盪培養 12~16 小時。藍白篩培養基製作方式為：250 mL ddH₂O 加入 17.5 g LB Agar Lennox (BioShop[®] Canada Inc., Bulington, Ontario)



並以 121 °C，1.5 atm 滅菌 30 分鐘，待冷卻約至 50 °C 後，在避光空間中，於無菌操作台內加入 250 µl Ampicillin、500 µl IPTG 及 875 µl X-gal，搖晃均勻後倒入 petri-dish (Alpha plus, Taiwan)，待其冷卻吹乾後使用，剩餘培養基則放置於 4 °C 冰箱保存，保存期限為 4 週。

2.2.3.3.4 質體純化

使用 QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen Ltd., Germany) 進行，實驗步驟參照廠商提供之使用說明書並作些微調整進行。詳細試驗步驟如下：將養菌管內的混和液吸至 1.7 mL 離心管中以 13000 g 離心三分鐘後，移除上清液。加入 250 µl P1 buffer 後震盪，使離心後沉積的底部菌泥懸浮，再加入 250 µl P2 buffer 搖晃少於五分鐘，至混和液變清澈。接著，加入 350 µl N3 buffer 輕微搖晃十秒，放入離心機以 17000 g 離心十分鐘。後將上清液移入 Spin Column，以 17000 g 離心三十秒，倒掉廢液後再加入 750 µl PE Buffer 潤洗，並以 17000 g 離心十秒。將廢液倒掉後，再以 17000 g 離心一分鐘，確保 Spin Column 中無殘留液體。將 Column 放至新的 1.7 mL 離心管中，並加入 50 µl 1/10 EB 靜置一分鐘，使 DNA 溶出，最後以 13000 rpm 離心一分鐘，得到純化之質體，將其保存在 -20 °C 冰箱供後續試驗使用。

2.2.3.3.5 定序與解序

取 10 µl 純化質體送至於基龍米克斯生物科技 (Genomics BioSci & Tech, Taiwan) 進行定序。定序平台為 ABI 3730XL 系統，(Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。序列資料用 Geneious 軟體 (Geneious Prime 2016R 11, <https://www.genious.com>) 擷取序列，接著於兩端加上 PCR 所使用引子對修飾，修飾後序列與 NCBI 的 Genbank 資料庫進行序列之 BLAST，結果包含序列兩兩之間相似度評分 (Max score or Total score)、目標序列與資料庫序列吻合之比例 (Query coverage)，這些吻合的序列片段有多少的比例其核酸相同 (Percent identity)。綜合



參考以上結果，判定序列片段之來源物種。

2.2.3.4 根瘤線蟲種類鑑定

依前述方法挑選常見且廣泛的引子對進行線蟲定序後，獲得環境中線蟲群相資訊至屬 (genus) 的層級。隨後，為確認在蛇紋岩土壤中發現的根瘤線蟲種類 (species)，以利後續有效培養之具有重金屬耐受性根瘤線蟲的物種，故透過適用於根瘤線蟲之較專屬的鑑定方式，觀察並描述其陰門膜紋特徵，以及針對 18S、LSU、ITS 等核糖體區段進行更詳盡的分子鑑定。

2.2.3.4.1 雌成蟲陰部膜紋鑑定

陰部膜紋為根瘤線蟲雌成蟲形成後一特殊構造，為根瘤線蟲形態鑑定常使用的方法。在顯微鏡下觀察被根瘤線蟲感染的綠豆植株，選擇明顯膨大的根瘤，以鑷子取小放入 6 公分培養皿中，輕輕撥開植物組織可見膨大的根瘤雌成蟲，小心將雌成蟲取下並放在滴有 500 μ l 水的載玻片上。用鑷子輕擠壓雌成蟲，將其體內組織擠出，再用圓頭解剖刀小心切割，只留下陰部膜紋部分表皮，並將其移至乳酸內洗去多餘體內組織，之後再放到新的載玻片上並蓋上蓋玻片，爾後放到光學顯微鏡 (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japan) 下觀察拍照並依據前人文獻描述之陰部膜紋特徵，比對陰門唇厚度、寬度、長度、皺褶程度等指標，進而鑑定其線蟲種類 (Eisenback et al., 1980)。

2.2.3.4.2 Multiplex PCR

為了得知自蛇紋岩土壤採集之根瘤線蟲是否為常見的象耳豆根瘤線蟲，南方根瘤線蟲及爪哇根瘤線蟲等三種根瘤線蟲。依據 Hu 等人 (2011) 的研究報告，增幅 28S 核糖體 RNA D2、D3 區間，使用 PCR 引子對包含：MF (5'-GGG GAT GTT TGA GGC AGA TTT G-3')、MR (5'-AAC CGC TTC GGA CTT CCA CCA G-3')、Me-F (5'-AAC TTT TGT GAA AGT GCC GCT G-3')、Me-R (5'-TCA GTT CAG GCA GGA TCA ACC-3')、Mi-F (5'-GTG AGG ATT CAG CTC CCC AG-3')、Mi-R (5'-



ACG AGG AA C ATA CTT CTC CGT CC-3')、Fjav (5'-GGT GCG CGA TTG AAC TGA GC-3')、Rjav (5'-CAG GCC CTT CAG TGG AAC TAT AC-3') (Hu et al. 2011)。

PCR 反應液共 10 μ l，其中包括：PCR H₂O 2.7 μ l、0.5M Tris 1 μ l (pH8.3)、0.025M MgCl₂ 1 μ l、10 mg/ml BSA 0.5 μ l、2.5mM dNTP (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 0.5 μ l、10 μ M primers (Genomic BioSci & Tech Co., Ltd., Taiwan) 3.2 μ l、5u/ul Bio Taq DNA Polymerase (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 0.1 μ l 和 DNA 1 μ l。反應條件為：94 °C 反應 2 分鐘，隨後進行 94 °C 反應 30 秒、64 °C 反應 30 秒、68 °C 反應 1 分鐘的循環，共 35 次，最後於 72 °C 反應 5 分鐘。取 PCR 產物 10 μ l 與 6X DNA Loading Dye (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 2 μ l 混合。將 2% Agarose 電泳膠 (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 浸於含有 0.5X TBE buffer 之 Owl separation systems (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。加入 PCR 產物後，以電壓 105 伏特，電流 400mA 運行 40 分鐘，並利用 1 μ l 100 bp DNA Ladder (Bioman, Taiwan) 作為對照。電泳完後膠體以溴化乙錠 (Ethidium Bromide; EtBr, Bioshop Canada Inc., Canada) 染色 10 分鐘，再以 ddH₂O 退染 10 秒鐘。最後將膠體置於紫外光成像設備 Gel DOCTM EZ Imager 中擷取影像，並判讀增幅片段的位置與文獻做比對。

2.2.3.4.3 增幅 18S, ITS, LSU 目標區段

為了鑑定新分離出之根瘤線蟲 S，參考前人研究報告使用選用三個線蟲通用的目標區段並進行優化，將目標物種 rDNA 的 18S (Small Subunit)、ITS (Internal Transcribed Spacer) 和 LSU (Large Subunit) 等三部分片段進行增幅。PCR 反應液體積共 10 μ l，其內包含：PCR H₂O 2.7 μ l、0.5M Tris 1 μ l (pH8.3)、0.025M MgCl₂ 1 μ l、10 mg/ml BSA 0.5 μ l、2.5mM dNTP (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 0.5 μ l、10 μ M primers (Genomic BioSci & Tech Co., Ltd., Taiwan) 3.2 μ l、5 μ l Bio Taq DNA Polymerase (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 0.1 μ l 和 DNA 1 μ l。18S rDNA 使用的引子對為 SSU18A (5'- AAA GAT TAA GCC ATG CAT G -3') 和 SSU26R (5'- CAT



TCT TGG CAA ATG CTT TCG -3') (Blaxter & Robertson 1998), 其反應條件先以 94°C 反應 5 分鐘, 隨後進行 94°C 反應 30 秒, 54.1°C 反應 30 秒, 68°C 反應 1 分鐘循環 38 次, 最後於 68°C 反應 5 分鐘。ITS rDNA 使用的引子對為 TW81 (5'- GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC -3') 和 AB28 (5'- ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT -3') (Subbotin et al. 2001), 其反應條件先以 94°C 反應 4 分鐘, 隨後進行 94°C 反應 30 秒, 55°C 反應 30 秒, 72°C 反應 45 秒循環 35 次, 最後於 72°C 反應 10 分鐘。LSU rDNA 使用的引子對為 D2A (5'- ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') 和 D3B (5'- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') (De Ley et al. 2005), 其反應條件先以 95°C 反應 5 分鐘, 隨後進行 94°C 反應 30 秒, 55°C 反應 45 秒, 72°C 反應 2 分鐘循環 35 次, 最後於 72°C 反應 10 分鐘。PCR 產物保存於 -20°C。

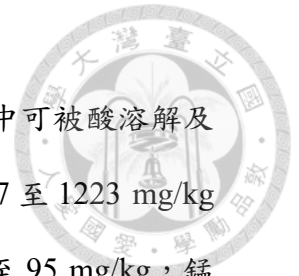
2.2.3.5 成熟度指標計算

確認線蟲種類後以科層級計算成熟度指標。成熟度指標計算方式為各科線蟲相對應之 C-p value 與其在樣本間出現頻率之乘積, 再除以樣本內總線蟲隻數的總和 (Bongers, 1990)。

2.3 結果

2.3.1 土壤性質測定

測定所採集得之 23 個區域的土壤 pH、EC 與 Ni、Cr 濃度 (表二)。其中, 蛇紋岩土壤 pH 值介於 6.51 至 7.25, EC 值介於 220.1 至 1209.0 $\mu\text{s}/\text{cm}$, 鎳濃度為 232 至 2630 mg/kg, 鉻濃度為 400 至 3967 mg/kg; 非蛇紋岩土壤 pH 值介於 5.06 至 8.00, EC 值介於 221.1 至 1232.0 $\mu\text{s}/\text{cm}$, 鎳濃度為 43 至 91 mg/kg, 鉻濃度為 82 至 217 mg/kg。蛇紋岩土壤鈣鎂比介於 0.23 至 1.79, 顯示農田耕作施肥影響蛇紋岩土壤之鈣鎂比低之特性。蛇紋岩土壤中鉀的含量則為 1517 至 7064 mg/kg, 遠低於非蛇紋岩土壤 (9534 至 18500 mg/kg)。



另外以酸萃取土壤中金屬含量結果顯示，蛇紋岩森林土樣本中可被酸溶解及交換態之鎳為 921 mg/kg，鉻為 43 至 434 mg/kg，錳及鈷分別為 27 至 1223 mg/kg 及 22 至 161 mg/kg，可還原態之鎳為 257 至 503 mg/kg，鉻為 66 至 95 mg/kg，錳及鈷則為 867 至 1171 mg/kg 及 108 至 156 mg/kg (表三)。

2.3.2 線蟲群相

2.3.2.1 分離及鑑定之線蟲結果

透過型態及分子鑑定之線蟲依照各採集土壤樣品整理如表五，蛇紋岩土壤中共分離出二十個科，而非蛇紋岩土壤中則為二十二個科，其中 Qudsianmenatidae 科僅在蛇紋岩土壤中被發現；Anguinidae、Dolichodoridae、Rhabdolaimidae 等科之線蟲則僅出現於非蛇紋岩土壤中。

2.3.2.2 植被分布與土壤種類影響環境中線蟲數量

以線蟲數量探討其是否受到植被或土壤種類影響。依據不同植被分類，香蕉田土、水稻田土以及森林土分別有六個區域，在相同樣本數下，自香蕉田分離出線蟲 456 隻，水稻田 418 隻，森林土 750 隻，經 ANOVA 統計分析結果得知，組間有顯著差異，而由線蟲數量可以得知香蕉田土與水稻田土相近，而森林土則相較其他兩種植被有較多的線蟲數量 (錯誤! 找不到參照來源)。而以土壤區分，蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤皆由九個區域土壤進行分析，兩種土壤在相同樣本數下，比較分離出的線蟲數目，每個組別土壤皆從合計 11700 克土壤分離線蟲。蛇紋岩土壤的線蟲總數為 542 隻，而非蛇紋岩土壤為 1082 隻，經過 t-test 兩兩比較後結果顯示，蛇紋岩土壤與非蛇紋岩土壤中線蟲數量有顯著差異，蛇紋岩土壤中線蟲數量減少了約 5 成 (圖二)，結果顯示在高濃度鎳、鉻下的蛇紋岩土壤線蟲數量較少，較不利於線蟲生存。



2.3.2.3 土壤種類影響線蟲群相

將所有分離的線蟲經過型態特徵並搭配引子增幅特定片段進行定序後，分離出共 22 科線蟲 (圖四 a)，其中 Cephalobidae, Aphelenchoididae, Dorylaimidae, Tripylidae, Meloidogynidae, Rhabdolaimidae, Belonolaimidae, Thornenematidae, Dolichodoridae, Anguinidae 等十個科在非蛇紋岩土壤中具有較高相對豐度，相對應的 Achromadoridae, Panagrolaimidae, Monhysteridae, Rhabditidae, Mononchidae, Actinolaimidae 等六個科則是在蛇紋岩土壤中有較高相對豐度。而統計結果發現 Qudsianmenatidae 科僅在蛇紋岩土壤中被發現，Anguinidae, Dolichodoridae, Rhabdolaimidae 等科之線蟲則僅出現於非蛇紋岩土壤中僅在普通土壤中出現。而以屬的層級分類，所有土壤樣本中共分離出 38 個屬的線蟲 (圖四 b)。在蛇紋岩土壤中最高頻率出現的前十個屬的線蟲依序為 *Tylenchus*, *Heterocephalobellus*, *Rotylenchulus*, *Panagrolaimus*, *Eumonhystera*, *Pseudacrobeles*, *Trischistoma*, *Hirschmanniella*, *Achromadora*；而在非蛇紋岩土壤最高頻率出現的十個屬為 *Meloidogyne*, *Heterocephalobellus*, *Aphelenchus*, *Helicotylenchus*, *Eucephalobellus*, *Monochromadora*, *Mesodorylaimus*, *Rhabdolaimus*, *Tylenchorhynchus*, *Hirschmanniella* (錯誤! 找不到參照來源。), 非蛇紋岩土壤中前十大屬線蟲僅有 *Heterocephalobellus* 及 *Hirschmanniella* 兩屬線蟲出現於蛇紋岩土壤，可能與蛇紋岩土壤性質特殊性有關，這些能生存於蛇紋岩土壤中之線蟲具有耐重金屬環境之潛力。於所有樣品分離之線蟲，其中分離出數量最多的兩個屬為 *Heterocephalobellus* 及 *Meloidogyne*，又以 *Meloidogyne* 在兩種不同土壤中豐度差距最大，蛇紋岩土壤中為 0.03，非蛇紋岩土壤中為 0.17，蛇紋岩土壤中根瘤線蟲的相對豐度遠低於非蛇紋岩土壤，本實驗結果與過往文獻闡述根瘤線蟲不適合生存於高濃度鎳、鉻相符。



2.3.2.4 植被變化更能顯示線蟲成熟度指標差異

在線蟲成熟度指標上，無論是僅計算腐生性線蟲 (MI、MI25)，或是植食性線蟲 (PPN)，更又是綜合顯示指標 (Σ MI25)，皆顯示在蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中，並無顯著差異，趨勢相同，表明線蟲成熟度指標在本研究對於鎳、鉻含量高的蛇紋岩土壤並沒有因環境金屬汙染而有差異 (圖六)；而在不同植被下的線蟲成熟度指標可以看出水稻田土相比其他兩者較不穩定 (圖七)，並且於統計上三者有差異，顯示環境之種植植被會影響線蟲群相組成。

2.3.2.5 對鎳、鉻耐受性高的根瘤線蟲 S

2.3.2.5.1 根瘤線蟲 S 第曼公式指標及陰部膜紋

本研究從蛇紋岩分離出並成功培養的根瘤線蟲 (*Meloidogyne* sp. S)，其二齡幼蟲體長為 360-460 μm ，而依據第曼公式所量測各指標 a 為 22.50-33.85，b 為 5.44-9.02，b' 為 9.56-22.11，c 為 16.25-43.00，c' 為 2.17-5.00，K 為 12-16 μm ，S2 為 11-16 μm (表六)。陰部膜紋成平滑膜紋橢圓形且側線明顯，中間唇略厚且寬 (圖八)。

2.3.2.5.2 根瘤線蟲 S 分子鑑定

以 Hu 等人發表的 Multiplex 方法，針對區段，鑑定是否為 *Meloidogyne* 屬線蟲，亦能得知是否為 *M. enterolobii*, *M. incognita* 或是 *M. javanica*，結果顯示該線蟲確定為 *Meloidogyne* spp.，並且在 660 bp 增幅出條段，其指出為 *M. javanica* (圖九)，亦針對 COII 區段、ITS 區段、SSU 區段的核糖核酸進行鑑定，結果顯示此三個區間的核糖核酸無法辨別出單一物種，其相似度過於接近 (表七)。後續則會在增加其餘區段定序，確認是否為 *M. javanica*。

2.3.2.5.3 根瘤線蟲 S 能存活於高濃度鎳、鉻溶液中

將田間常見之象耳豆根瘤線蟲與自蛇紋岩採集之根瘤線蟲 S 進行致死率實驗，



結果發現在 200 ppm 鎳及 20 ppm 鉻溶液中 *M. enterolobii* 死亡率高達 75% 及 88% 時，*Meloidognye* sp. S 僅有 18% 與 2% 的線蟲死亡，可以得知從蛇紋岩分離出來的 *Meloidognye* sp. S 對於金屬鎳與鉻皆具有高度耐受性 (圖十)。

2.3.3 細菌群相

分析細菌群相包含的土壤樣本為共 23 個區域，其中分成 9 個蛇紋岩土壤區域，及 14 個非蛇紋岩土壤區域。細菌群相分析依據蛇紋岩土壤中以鉻與鎳濃度區分為高 (濃度 > 1000 ppm)，中 (1000 ppm \geq 濃度 > 200 ppm)，而非蛇紋岩土壤的濃度組別分類為低 (200 ppm \geq 濃度)。各樣品定序結果如表四，有 77209 至 131802 個 Raw reads (Raw PE)，透過拼接得到的 Tags 序列為 69229 至 115923，而其有效序列比率皆高於 83%，OTU 數量介於 2713 至 5137 之間。

2.3.3.1 環境菌群種類相對豐度比較

將所有樣本中細菌序列定序後，以門分類發現，*Verrucomicrobia* 與 Actinobacteria 在 High 組別中相對豐度比 Low 與 Median 較高，而 *Chloroflexi* 則是在 High 組別中相對豐度最少 (圖十一 a)。而 High 組別中 *Verrucomicrobiae* 及 Thermoleophilia 兩綱的細菌又比其他兩個組別較多，但 *Anaerolineae*, *Deltaproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria* 等三個綱細菌的相對豐度卻在 High 組別中明顯較少 (圖十一 b)。而以目的層級分析發現 *Chthoniobacterales*, *Gaiellales* 及 *Rhizobiales* 在 High 組別中有較高的相對豐度，而 *Betaproteobacteriales* 的相對豐度在 High 組別中相較其餘兩組較少，此外，其該圖呈現前十高出現頻率之菌株相對豐度總和在 High 組別中較高，約為 50%，Low 及 Median 則僅 40% (圖十一 c)，推測在高濃度組別中可適應該生存環境之菌株較容易成為優勢族群，佔該環境中大部份比例。



最後，以科層級下分類，相對豐度比例高的前十個科細菌為 *Gaiellaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Pedosphaeraceae*, *Soilbacteraceae*, *Bacillaceae*, *Anaerolineaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *Pirellulaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Gemmataceae*，此十個科在組別 Low 與 Median 皆為 25%，累積比例較為相近；而在組別 High 中則為 35%，累積比例相較其他兩個組別高。其中 *Chthoniobacteraceae* 和 *Xanyhobacteraceae* 在組別 High 中相較 Low 及 Median 比例較高，而 *Pirellulaceae* 比例則在 High 組別下降 (圖十一 d)，在科的層級下亦觀察到環境中鎳鉻濃度可能影響菌相組成，能適應該環境者能擴大族群，成為優勢菌群。

2.3.3.2 土壤中細菌豐度與環境因子相關性

利用次世代定序分析細菌的 16S 核糖體基因之 V3-V4 區段，得到的片段經過比對資料庫後，首先透過 Shannon, Simpson, Chao 1 及 ACE 指標分析菌相的多樣性，結果發現在濃度高的組別中，皆呈現較低的多樣性 (圖十二)，顯示在含有高濃度鎳、鉻的蛇紋岩土壤可能較不適合微生物生存，又以能適應該環境者成為優勢菌群，因此該環境具有較低的多樣性。

接著分析其屬層級，全部環境中總共有二十六個屬 *Dongia*, *Pirellula*, *Anaerolinea*, *Haliangium*, *Sphinogomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Desulfobacca*, *Gemmata*, *Bryobacter*, *Thiobacillus*, *Nitrospira*, *Anaeromyxobacter*, *Gaiella*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus*, *Pedomicrobium*, *Pseudaminobacter*, *Steroidobacter*, *Reyrannella*, *Mycobacterium*, *Acidibacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*，而其中 *Nocardioides*, *Desulfobacca*, *Mycobacterium*, *Acidibacter* 四個屬在組別 Low 中比其他兩個組別細菌相對豐度較高，而 *Dongia*, *Pirellula*, *Anaerolinea*, *Haliangium*, *Sphinogomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces* 則是在 Median 組別中有較高的相對豐度。另外 *Gaiella*, *Pseudolabrys*, *Rhodopseudomonas*, *Candidatus*,



Pedomicrobium, *Pseudaminobacter*, *Steroidobacter*, *Reyrannella*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium* 等十屬細菌則是在 High 組別有相對高的豐度 (圖十四)。透過群相分析發現有十七個屬在 Median 或 High 濃度組別中有較高相對豐度，與金屬濃度具有正相關性；反之四個屬在 Low 與金屬濃度呈現負相關性。

以 CCA 分析土壤中細菌與環境因子之相關性，發現土壤中 *Bacillus nealsonii*, *Solitalea koreensis*, *Acidobacteria bacterium* Ac 11 E3 三菌株與鎳、鉻濃度有高度正相關性 (圖十三)，其中 *B. nealsonii*, *S. koreensis*, *A. bacterium*，在組別 High 土壤中相比於 Low 及 Median 有較高的豐富度 (圖十五)，該三株菌株可能為該環境之特殊菌株，能適應並生存於高濃度蛇紋岩土壤中。

2.4 討論

本研究為東亞第一篇探究蛇紋岩土壤微生物相之研究，且為首次同時對蛇紋岩土壤中線蟲及細菌群相進行調查，並探討其之間交互作用。本研究發現含有高濃度鎳、鉻的蛇紋岩土壤環境較不利線蟲生存，但線蟲成熟度指標無法反應蛇紋岩土壤環境中的線蟲相差異。此外，本研究揭示臺灣蛇紋岩土壤中存在八個屬、三個種與重金屬吸附、螯合等功能相關的細菌菌株，不僅相對豐度與金屬濃度具有正相關性，亦能將金屬轉換成較不具毒性之價態，具有應用於去除重金屬污染相關技術或商品之潛力。後續我們欲分離培養這些潛力菌株，與進行基因層次比較，探究根瘤線蟲 S 是否可能曾由該列菌株獲得特殊基因，而適應於蛇紋岩土壤環境。

在本研究調查結果，線蟲數量在蛇紋岩土壤中遠低於非蛇紋岩土壤，顯示高濃度鎳、鉻確實較不適合線蟲生存，而 Hungate 等人在 2000 年發表蛇紋岩土壤中數量多於崩積土土壤，但本研究之非蛇紋岩土壤並非全為崩積土土壤，因此無法相互比較。



比較豐度比率前十高的線蟲，僅有兩個屬的線蟲在兩種土壤中都有出現，為 *Heterocephalobellus*, *Hirschmanniella*。其餘有八個屬的線蟲 *Tylenchus*, *Heterocephalobellus*, *Rotylenchulus*, *Panagrolaimus*, *Eumonhystera*, *Pseudacrobeles*, *Trischistoma*, *Hirschmanniella*, *Achromadora* 為蛇紋岩土壤中特有的優勢族群，相對豐度較高。而線蟲豐度結果中顯示，在非蛇紋岩土壤中出現頻率最高的 *Meloidogyne*, *Heterocephalobellus* 兩屬線蟲在蛇紋岩土壤中豐度明顯下降，推測該兩屬線蟲可能對於蛇紋岩土壤環境為較敏感，不再為最優勢族群，蛇紋岩土壤特性為高濃度鎳、鉻、低鈣鎂比及低有效性氮磷鉀，而與在本研究土壤性質結果中，採集之樣品蛇紋岩土壤中鎳鉻總量較高且鉀較低，但鈣鎂比並非與原先特性相符，推測是因為因耕作行為使其改變，而由此綜合推測，*Meloidogyne*, *Heterocephalobellus* 兩屬線蟲在蛇紋岩土壤中，可能受到土壤中鎳鉻的濃度或是鉀含量的影響，使其較不利於生存於該環境。此外，本研究在蛇紋岩土壤中分離出一鎳鉻耐受性相當高的根瘤線蟲 S，該線蟲如何適應該生存環境並繁殖且建立族群是值得探討。後續，筆者將會先以探究其在鎳、鉻中所受到的生理影響，了解其與象耳豆根瘤線蟲的差異，以便進一步研究其適應機制。

在 Monokrousos 等人調查希臘地區蛇紋岩土壤線蟲群相結果顯示，種植之植被影響周圍土壤中線蟲群相 (Monokrousos et al. 2014)，與本研究結果情況相符。在不同植被環境下，線蟲豐富度及成熟度指標皆有差異，其中又以森林土壤樣品間的成熟度指標 MI 及 ΣMI_{25} 變化最小，推估香蕉及水稻田可能因耕作方式不同，而造成組別間成熟度指標差異較大。但在過往文獻中指出，當環境受人為耕作影響，添加氮源或施灑農藥，會使 MI 值較低 (Neher 1999; Ruess et al. 2001; Sarathchandra et al. 2001; Gupta et al. 2019)，相對較不受人為干擾的原生林相則 MI 值會越高，但本研究結果並無看到此趨勢，反而是香蕉及水稻的農田中有較高的



線蟲成熟度指標 (MI 及 Σ MI25)。而將線蟲成熟度指標用於污染的情形下，大多研究結果趨向當環境中含有特定污染物 (銅、鋅、鉛、硒及鉻) 會使 MI 值下降，但多數環境污染的調查中發現，MI 值並不被影響 (Korthals et al. 1996; Fuller et al. 1997; Nagy 1999; Park et al. 2011; Gutierrez et al. 2016)，亦有研究指出在高污染環境中，卻有較高的成熟度 (Heininger et al. 2007)。在本研究中，蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤的線蟲成熟度指標，並未因環境金屬濃度上升而有所差異。此觀察與前人研究報導含鉻環境之 MI 值會降低相牴觸。然而，過往研究皆無實驗測試單一金屬環境進行測試，亦未排除其他環境因子之影響，或許即為成熟度指標無法於含有多種重金屬之蛇紋岩土壤中產生顯著差異之原因。

透過多樣性指標分析環境中細菌群相多樣性，結果發現無論是 Shannon，Simpson，Chao1 及 ACE 指標結果皆顯示在高濃度中有較低的多樣性，顯示在高濃度組別中物種均勻度、豐富度及歧異度皆較低，推測可能因環境中高濃度重金屬影響，使能適應之菌群成為優勢菌群，並篩選無法生存之細菌，使多樣性下降。

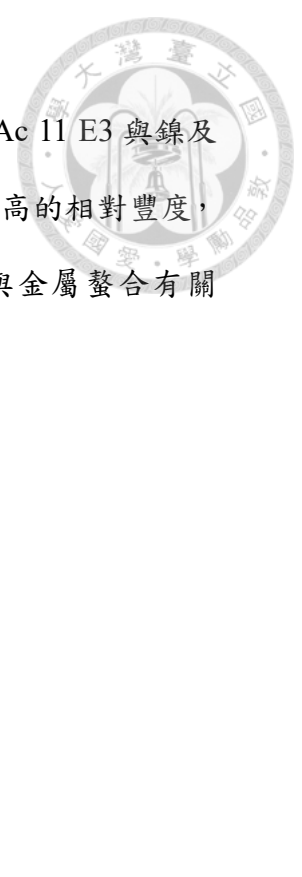
在細菌群相分析中，在 Low 和 Median 中相對豐度較高的 *Geobacter* sp. 過往文獻指出可分泌固氮酶協助固氮作用 (Bazylinski et al. 2000)，可能與 Low 和 Median 組別中多為耕作農田有關，因施肥方式及協助植物生長，因此觀察到其相對豐度較高。接著，為了找出能協助線蟲生存於蛇紋岩土壤環境的潛力菌株，比較其中高濃度組別中與金屬具有相關性的菌群。

結果發現，在中濃度 Median 組別相對豐度高的 *Sphingomonas* sp., *Geobacter* sp., *Streptomyces* sp. 皆被指出與重金屬有關，在前人研究中 *Sphingomonas* sp. 不僅能做為生物吸附劑，初步處理重金屬污染廢水，而環境中添加 *Sphingomonas* sp. 更能協助植物吸收更多重金屬 (Chen 2012; Chen et al. 2014a; Chen et al. 2014b)，而在



本實驗結果亦觀察到在 Median 組別中的相對豐度較 Low 高，*Sphingomonas* 確實在金屬濃度較高的環境中生存，推測本研究來自蛇紋岩土壤中的 *Sphingomonas* sp. 為可能開發做為去除環境重金屬的潛力菌株；許多研究指出 *Geobacter* sp. 具有還原金屬的功能，推測因 *Geobacter* sp. 相較於其他細菌更能適應於高濃度鎳、鉻，有助於 *Geobacter* sp. 成為環境中的優勢菌群；*Streptomyces* 被指出具有高度親和力的鎳轉運蛋白，且具有良好吸附工業廢水中鎳 (Hungate et al. 2000) 的功能 (Amoroso et al. 2000; Ozturk et al. 2004; Long et al. 2018)，此屬細菌亦能存活於受鉻污染之環境，且能將環境中較具毒性的 Cr (VI) 轉為相對毒性較低的 Cr (Hungate et al.) (Hungate et al. 2000; Morales et al. 2007)，推測在本研究中 Median 組別所採集蛇紋岩土壤中的 *Streptomyces* sp. 可能具有螯合鎳、鉻功能，使植物能在蛇紋岩土壤生長，極高可能開發成為去除鎳、鉻的候選菌株。

而在高濃度 High 組別中有較高豐度的 *Pseudolabrys* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Candidatus_Solibacter* sp., *Steroidobacter* sp., *Reyrannella* sp. 等五屬細菌亦有文獻指出其在含有金屬環境下有較高的相對豐度。前人調查含有鎘、鉛、鋅土壤時，*Pseudolabrys* sp. 出現頻率最高，另外在含有 300 mg/kg 濃度含鎳底泥的微生物相調查中發現該細菌也在前二十高頻率出現菌群當中 (Lu & Zhang 2014; Oyetibo et al. 2019)；*Rhodopseudomonas* sp. 被證實具有吸收鎳的能力，且當環境含有適當濃度的鎳會提高其該菌產氫效率及固氮活性 (Chen & Hongyu 1987; Takakuwa 1987; Liu et al. 2009)，推估該菌種可能做為在蛇紋岩土壤環境中協助植物生長；另外 *Candidatus_Solibacter* sp. 在 Golebiewski 等人的細菌群相調查發現，在鉻含量較高的組別也有相對高的豐度 (Golebiewski et al. 2014)；*Steroidobacter* sp. 及 *Reyrannella* sp. 則是在重金屬區域中有顯著優勢，與金屬濃度具有高度相關性 (Hong et al. 2015; Yin et al. 2015; Wu et al. 2019)。而將細菌群相與環境因子以 CCA 分析，找出三種



細菌 *Bacillus nealsonii*, *Solitalea koreensis*, *Acidobacteria bacterium* Ac 11 E3 與鎳及鉻的濃度有高度正相關性，此三個菌株皆在鎳鉻濃度高組別中有較高的相對豐度，其中 *B. nealsonii* 被報導其蛋白酶可以做為工業螯合劑，可能與金屬螯合有關 (David et al. 2018)，使金屬被轉換為較不具有毒性的狀態。



第三章 · 鎳、鉻對象耳豆根瘤線蟲生理影響

3.1 簡介

3.1.1 鎳對線蟲的影響

環境中的鎳會影響生物生存。研究指出，無論在海洋底泥或是土壤中含有高濃度金屬鎳時，線蟲的數量及物種多樣性皆顯著下降 (Semsar et al. 2011; Hedfi et al. 2012)。學者觀察到環境中含有 10^{-8} mol/L 鎳時，*Panagrellus redivivus* 四齡幼蟲發育至成蟲數量多於同時間長度之無鎳環境，顯示該濃度使 *P. redivivus* 四齡幼蟲發育速度加快。但學者亦發現，相同濃度下並不會影響二齡或三齡幼蟲發育速度；甚至在 10^{-3} mol/L 下，三齡幼蟲發育至四齡幼蟲的數量減少約 50%。而當環境有 105 mg/L 鎳，即能造成 50% *Panagrellus Silusiae* 的二齡幼蟲於 48 小時後死亡。若濃度為 635 mg/L，則能導致 50% 成蟲死亡 (Samoiloff et al. 1980; Pasternak 1982)。

於 *Caenorhabditis elegans* 上的研究顯示，當環境中僅含有 2.5 mg/L 即會影響成蟲體長，含鎳的處理組皆比對照組有較長的體長，子代亦同；暗示這個對於體長的影響，有累積的趨勢 (Wang & Wang 2008)。在含鎳環境下其壽命亦會縮短，在 75 mg/L 濃度的鎳下，壽命比對照組明顯減少八天 (Wang & Wang 2008)；亦有研究發現 *C. elegans* 在含有鎳的汙泥中，其壽命隨之下降 (Rudel et al. 2013)。環境中鎳會影響 *C. elegans* 的活動，使其每分鐘身體彎曲次數會明顯下降 (Wang & Wang 2008)。當環境中鎳高於 75 mg/L 濃度，有較高比例 *C. elegans* 對氯化鈉產生趨性 (Wang & Wang 2008)。研究也指出鎳環境導致生殖能力下降，於含有 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的培養基上觀察到，產卵率顯著下降； $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 環境中，*C. elegans* 的精子細胞活化速率下降 (Kong et al. 2017)。



而高濃度的鎳則可以造成植物寄生性線蟲繁殖率降低。當環境中含有高於 50 mg/kg 的鎳，會降低植食性線蟲 *Meloidogyne javanica* 在鷹嘴豆植株上的結瘤率及卵塊數，也一樣暗示爪哇根瘤線蟲較不適合生存於此環境 (Khan et al. 1996)。然而，對於 *M. incognita* 在番茄上的研究，則發現相同濃度的鎳會使其結瘤率及卵塊數皆顯著增加；鎳濃度需要增加至 200 mg/kg 以上，才會降低根瘤及卵塊數目，以及土壤中的根瘤線蟲族群量 (Khan et al. 2006)。

3.1.2 鉻對線蟲的影響

環境中的鉻濃度與線蟲數量與豐富度有高度負相關 (Boufahja et al. 2011; Hedfi et al. 2012)。鉻對於線蟲為毒性物質，影響生理機制，使其不利於生存。無論是土壤中的腐生性線蟲 *Panagrellus silusiae*、海洋裡的線蟲 *Monhystera disjuncta*，皆會受到環境中的鉻而降低其發育速度，甚至死亡。當 *P. Silusiae* 二齡幼蟲暴露於 106 mg/L 鉻 48 小時後，使其 50% 死亡，而 289 mg/L 鉻則使成蟲有 50% 死亡率。另外高於 50 mg/L 鉻即可使 *P. Silusiae* 幼蟲生長受到抑制，96 小時後體長比對照組明顯減少約 110%。若將幼蟲暴露於含 100 mg/L 鉻的環境中 24 小時，隨後經過 96 小時後，發現處理組成蟲比例明顯下降 63%，顯示該濃度下鉻使腐生性線蟲 *P. Silusiae* 發育減緩 (Pasternak 1982)；而 *M. disjuncta* 在 15 mg/L 濃度的鉻且溫度 22°C 下，死亡率高達 50% 以上，且於該條件下，九十六小時後，並未有任何二齡幼蟲發育至成蟲，相比對照組的成蟲比例降低約 80% (Vranken & Tiré C Heip 1989)。

以秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 為材料的生理影響研究指出，鉻縮短其體長與壽命，並降低活動、代謝及繁殖能力。當環境中含有鉻濃度 115 mg/L 時，線蟲暴露於該環境 24 小時後，死亡率高達五成；而在 20 mg/L 濃度下，其生長及繁殖能力皆會被抑制 50% 以上；當濃度高於 13 µg/L，線蟲的身體彎曲次數及



頭擺動能力皆下降 (Roh et al. 2009; Wu et al. 2012; Jiang et al. 2016)。此外，高於 400 ppm 濃度的鉻，可使蟲生線蟲 *Steinernema feltiae* 停留在昆蟲體內的發育所需時間增加 (Boyle & Kakouli-Duarte 2008)。

3.1.3 根瘤線蟲

根瘤線蟲 (Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.) 為遍佈全球並首具經濟重要性之植物病原線蟲，每年可造成全球經濟損失達一兆七千億美元 (Elling 2013)。其寄主範圍相當廣泛，寄主作物可多達兩千多種 (Lu et al. 2019)，包含茄科、十字花科蔬菜、禾本科、豆科、葫蘆科、果樹等，及重要的觀賞花卉，甚至可造成多達 226 種田間雜草的危害 (Batten & Powell 1971; Reddy 1985; Mcsorley 1992; Trudgill 1997; Mendes et al. 2007; Rich et al. 2009; Caporaso et al. 2010; Lu et al. 2019)。受到根瘤線蟲寄生的植株會因為根系不正常腫大，影響水分及養分的吸收，進而使植株生長發育不良，造成葉片黃化甚至植株矮化。受其嚴重侵染者可導致根系腐爛，使周圍病原菌入侵，形成複合感染，使作物品質及產量下降，甚至使寄主作物死亡 (Roland et al. 2009)。其地域分佈範圍十分廣泛，根據國際農業及生物科學中心 (Centre for Agriculture and Bioscience International; CABI) 的統計資料，根瘤線蟲屬在全球的分布北至挪威、芬蘭、俄羅斯，南至非洲、南美洲、紐西蘭等，能適應多種氣候環境，而台灣位處熱帶及亞熱帶交界處，更是根瘤線蟲屬密集分佈的區域範圍。

根據台灣植物病害名彙的紀錄，存在於台灣的根瘤線蟲屬種類包含南方根瘤線蟲 (*M. incognita*)、象耳豆根瘤線蟲 (*M. enterolobii*)、爪哇根瘤線蟲 (*M. javanica*)、花生根瘤線蟲 (*M. arenaria*)、水稻根瘤線蟲 (*M. graminicola*) 及北方根瘤線蟲 (*M. hapla*) 等 6 種 (曾顯雄 et al. 2019)。其中，象耳豆根瘤線蟲近年來對全球多種作物造成嚴重危害，考慮其風險及經濟損失，被歐洲暨地中海植物保護組織 (European



and Mediterranean Plant Protection Organization; EPPO) 列為 A2 等級之檢疫有害生物 (Freitas et al. 2017)。

根瘤線蟲屬為絕對寄生 (Obligate parasite)，需要倚靠寄主進行生長及繁殖。依照其寄生型態及取食習性，可歸類為固著型 (Sedentary) 的內寄生 (Endoparasitic) 線蟲。根瘤線蟲其發育時期分為卵，四個齡期的幼蟲及雌成蟲，雌成蟲產卵後，胚胎發育至一齡幼蟲仍會在卵內，等待環境適合生存的條件，或是受到根部釋放化學物質刺激 (Roland et al. 2009)，才蛻皮成為二齡幼蟲並游離卵膜。二齡幼蟲是唯一能夠侵染寄主的時期，在土壤中游動尋找適當的寄主入侵，侵染位置通常為植物根部的延長區 (elongation)，線蟲藉由口針戳刺，同時分泌纖維酵素 (cellulolytic)，幫助其順利侵入植株內部。進入植株的二齡幼蟲會在細胞間移動至植物根尖分生組織處，接著轉向移動至維管束 (Castagnone-Sereno et al. 2013; Jones et al. 2013)。抵達維管束後，二齡幼蟲以口針戳刺期周圍植物細胞，使植物受到刺激持續有絲分裂但卻無法細胞分裂，持續的增生形成多個「巨大細胞」 (Giant cell) (Gheysen & Mitchum 2019)，該細胞群成為線蟲取食點，以提供養分，使二齡幼蟲固著於此處，完成後續的生長發育。二齡幼蟲會在此處蛻皮並逐漸膨大，依序發育成三齡及四齡幼蟲，之後逐漸成長成雄成蟲及雌成蟲，雄成蟲恢復成線狀形態並游離根部，雌成蟲會持續膨大最終形成水滴狀般形態，接著雌成蟲會分泌凝膠狀物質形成卵塊，並將卵排放至卵塊內部。根瘤線蟲可能因為環境影響、寄主不同及不同物種之根瘤線蟲，完成一個世代的時間也有所差異；一般而言，所需的時間約 3 至 6 週 (Castagnone-Sereno et al. 2013)。

3.1.4 研究目的

本研究於富含高濃度鉻與鎳土壤中發現一個根瘤線蟲族群，顯示該根瘤線蟲



可能具有耐受或抵抗逆境之能力。此具有較佳逆境耐受性之族群的發現，亦為根瘤線蟲之綜合防治帶來隱憂。由於過往學者對於重金屬鎳、鉻於根瘤線蟲所造成的生理影響並無相關研究，故本章節研究鎳、鉻對於根瘤線蟲於其繁殖、侵染、發育及代謝功能之影響，以利後續根瘤線蟲抵抗環境逆境之相關探討。

3.2 材料與方法

3.2.1 象耳豆根瘤線蟲培養

本研究所使用之象耳豆根瘤線蟲 (*M. enterolobii*)，使用市售有機綠豆 (*Vigna radiata*) 作為寄主作物進行培養。將實驗室前人自田間採集且完成鑑定的象耳豆根瘤線蟲 (賴建任, 2019)，接種於種植五天大綠豆的盆栽，在植物周圍挖三個直徑與深度皆約一公分的洞，再將 1000 隻根瘤線蟲懸浮液倒入洞內，隨後用土將洞補平，完成接種。並將盆栽培養於 28°C 恆溫生長箱，生長箱設定為濕度 50%，光照 12 小時，35-40 天後自綠豆植株根部分離卵塊。隨後，需將卵塊消毒，首先將 30-50 個卵塊挑置於裝 1.1 mL 無菌 ddH₂O 的 1.7 mL 離心管中，之後加入 100 μL 市售 6% 漂白水，以最終濃度 0.5% 的消毒水消毒卵塊一分鐘，每隔 10 秒將離心管上下搖晃，使卵塊能均勻散佈在消毒水中，之後以 1500 x g 轉速離心一分鐘使卵塊沉於底部，接著在解剖顯微鏡 (Carl Zeiss AG, Germany) 下抽取約 1 mL 上清液，再加入 1 mL 無菌 ddH₂O 漂洗，再次以 1500 x g 轉速離心一分鐘使卵塊沉於底部，同樣的在解剖顯微鏡 (Carl Zeiss AG, Germany) 抽取 1 mL 上清液，重複上述漂洗步驟三次，最後將離心管中的卵移置 6 公分塑膠培養皿中，即可得到消毒完成並脫離卵膜的卵，以利後續進行孵化率及胚胎發育試驗。而將卵置於設定日夜均溫 28°C，濕度 50%，光照 12 小時的生長箱中 5-7 天，即可得到二齡幼蟲，進行後續試驗。



3.2.2 金屬溶液配製

所有試驗用金屬溶液皆為實驗當日所配製。本研究以重鉻酸鉀 (Potassium dichromate (VI), Katayama Chemical, Japan) 配製得含有 Cr^{6+} 的溶液，建置含鉻之環境，將 57 mg 重鉻酸鉀溶於 10 mL ddH₂O 中，以獲得含有 2000 ppm Cr^{6+} 的溶液，作為後續稀釋濃度的濃縮液。此外，鎳的試驗，則使用氯化鎳 (Nickel Chloride, Alfa Aesar, America) 所配製成含有 Ni^{2+} 之溶液進行，將 44 mg 氯化鎳溶於 10 mL ddH₂O，以便得到含有 2000 ppm Ni^{2+} 之溶液，作為後續稀釋濃度的濃縮液備用。

3.2.3 存亡試驗

為了瞭解線蟲對於目標金屬濃度之存活耐受性，本研究分別進行線蟲於七個不同濃度的鎳、鉻溶液 (0, 1, 10, 50, 100, 200, 1000 mg/L) 中的存亡試驗，其中以 0 mg/L 作為對照組。實驗以 12 孔盤 (BD Biosciences Ltd., USA) 為容器，先在每個孔洞中加入 1 mL ddH₂O，並在每個孔洞中以挑針放入 30 隻二齡幼蟲，隨後分別加入 0, 1, 10, 50, 100, 200, 1000 μl 含 2000 mg/L Ni^{2+} 或 Cr^{6+} 的金屬濃縮液，並再加入 ddH₂O 使每個孔盤的溶液最終體積為 2 mL，接著將孔盤以鋁箔紙包其外表避光，並置放於日夜均溫 28°C，濕度 50%，光照 12 小時的生長箱，之後每 24 小時觀察二齡幼蟲死亡數目，直到對照組中的二齡幼蟲全數僵直。此試驗每組皆進行三重覆。欲設定後續試驗最適濃度，將挑選線蟲分別能在該金屬濃度下存活至少 3-7 天，並該濃度下的線蟲死亡率與對照組相比在統計上有顯著差異。

3.2.4 孵化率試驗

為了瞭解環境中的鎳、鉻對根瘤線蟲卵孵化率的影響，本研究將根瘤線蟲放置



於兩個不同濃度的金屬溶液 (50, 100 mg/L 鎳溶液；1, 10 mg/L 鉻溶液) 中，並以無添加金屬的無菌 ddH₂O 為對照組，觀察在含有鎳及鉻環境下，根瘤線蟲卵孵化是否受到影響。實驗以 12 孔盤 (BD Biosciences Ltd., USA) 為容器，將挑針以鑷子將其凹成圓圈，使其在中央處能夠形成水膜，再以該器具將 50 個卵挑放於含有 1.9 mL 無菌 ddH₂O 中，隨後分別加入 1 及 10 μ l 含 2000 mg/L Cr⁶⁺ 的濃縮液或 50 及 100 μ l 含 2000 mg/L Ni²⁺ 的濃縮液，並再加入 ddH₂O 使每個孔盤的溶液最終體積為 2 mL，接著用鋁箔紙將孔盤包好避光，並置於設定日夜均溫 28°C，濕度 50%，光照 12 小時的生長箱中，10 天後計算各個孔洞中孵化的線蟲隻數及未孵化的卵，計算孵化率。此試驗隻每組皆進行五重覆。

3.2.5 根部侵染試驗

為了瞭解環境中的鎳、鉻對根瘤線蟲侵染植株能力的影響，本研究欲讓線蟲存活於含有番茄幼苗的兩個不同濃度金屬的 pluronic gel (50, 100 mg/L 鎳；1, 10 mg/L 鉻)，並以無添加金屬的 pluronic gel 為對照組，觀察根瘤線蟲在含有鎳鉻的環境下，侵染能力是否受到影響。首先用玻璃滴管將 200 隻根瘤線蟲二齡幼蟲吸入玻璃離心管中，並用轉速 1.0 x g 離心使線蟲沉於底部，隨後將上清液去除，並以玻璃滴管吸取底部線蟲液 (約 50 μ l) 於 6 孔盤 (BD Biosciences Ltd., USA) 的孔洞中，接著再吸取 50 μ l 無菌 ddH₂O 並放到相同孔洞中，此步驟避免線蟲殘留於玻璃滴管，每個孔洞皆放置 200 隻根瘤線蟲。隨後將孔盤置於冰上，並在孔盤中加入 2.8 mL 23% pluronic gel，分別添加 1 及 10 μ l 含 2000 mg/L Cr⁶⁺ 的濃縮液或 50 及 100 μ l 含 2000 mg/L Ni²⁺ 的濃縮液，並再添加 23% pluronic gel，使其最終體積為 3 mL，再以左右搖晃方式確保金屬溶液充分與 pluronic gel 混勻，而最終濃度為 1 及 10 ppm 的鉻和 50 及 100 mg/L 的鎳。隨後將 5 天大番茄幼苗 (農友 301，農友種苗股份有



限公司，台灣) 放置於孔洞中，並確保植物根部全部沒入於 pluronic gel 中，接著將孔盤移至室溫環境 (24-26°C) 的水平平板上，待 pluronic gel 完全凝固，再將孔盤置於設定日夜均溫 28°C，濕度 50%，光照 12 小時的生長箱中，72 小時後將番茄植株移出孔洞放置於 100 mL 燒杯，加入約 50 mL 自來水清洗根部，去除殘留之 pluronic gel，並準備進行根部染色步驟。在燒杯中加入 30 mL 1.5% 漂白水透化根部 4 分鐘，之後倒掉漂白水並以 50 mL 自來水潤洗根部三次，接著將根部浸泡於 50 mL 自來水 15 mL，去除殘留的漂白水溶液。將裝有 30 mL 醋酸品紅的 100 mL 玻璃燒杯放置於電磁加熱攪拌器 Corning PC-450d (Corning Inc., USA)，以刻度 10 加熱 6 分鐘後，再將加熱攪拌器刻度轉至 6，使醋酸品紅溶液保持一定溫度，並將番茄植株放入待其染色根部 1.5 分鐘。再以鑷子將番茄植株夾至乾淨 100 mL 燒杯，並以 50 mL 自來水沖洗三次，去除殘留醋酸品紅。接著加熱 30 mL 酸化甘油 (10 μ l 稀硫酸滴入 30 mL 甘油)，以刻度 10 加熱 3 分鐘，隨後調整至刻度 6，並將番茄植株夾入並退染 45 秒，該步驟要注意甘油突沸，溫度過高可能使植株根部斷裂。退染結束即完成染色步驟。接著將番茄植株夾出至乾淨的 100 mL 燒杯並添加約 10 mL 自來水，使其根部保持濕潤。隨後將植株置於玻片上，並將地上部剪除僅留根部，再蓋上另一片玻片，將番茄根部壓扁，並以透明膠帶將上下玻片固定，使其不輕易分離即可。接著以光學顯微鏡 (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japan) 觀察並統計根內二齡幼蟲隻數，隨後計算根瘤線蟲成功侵染植株比率。此試驗進行六重複。

3.2.6 胚胎發育試驗

為了瞭解環境中的鎳、鉻對根瘤線蟲胚胎階段發育的影響，本研究將根瘤線蟲放置於兩個不同濃度的金屬溶液 (50, 100 mg/L 鎳溶液；1, 10 mg/L 鉻溶液) 中，



並以無添加金屬的無菌 ddH₂O 為對照組，觀察在含有鎳及鉻環境下，根瘤線蟲胚胎發育速度是否受到改變。首先挑選 30 個尚未發育至一齡幼蟲的卵，將其用能在中央處形成水膜的圓圈狀挑針撈起，並移至含有 1.9 mL 無菌 ddH₂O 的 12 孔盤(BD Biosciences Ltd., USA) 孔洞中，隨後加入 1 及 100 μ l 含 2000 ppm Cr⁶⁺的濃縮液或 50 及 100 μ l 含 2000 ppm Ni²⁺的濃縮液，並再加入無菌 ddH₂O 使每個孔盤的溶液最終體積為 2 mL，接著用鋁箔紙將孔盤包好避光，並置於設定日夜均溫 28°C，濕度 50%，光照 12 小時的生長箱中，之後每 12 小時觀察卵內胚胎發育階段，計算成功發育至一齡幼蟲及二齡幼蟲數目，持續觀察 240 小時。此試驗每組皆進行五重覆。

3.2.7 齡期發育試驗

為了瞭解環境中的鎳、鉻對根瘤線蟲幼蟲發育的影響，本研究欲使根瘤線蟲二齡幼蟲成功侵染番茄植株，並使土壤環境含有兩個不同濃度的金屬 (50, 100 mg/kg 鎳；1, 10 mg/kg 鉻)，並以無添加金屬的土壤為對照組，觀察在含有鎳及鉻環境下，根瘤線蟲幼蟲發育速度是否受到改變。首先將五天大番茄幼苗移至裝有 50 g 無菌栽培介質 (珍珠石：培養土=1：2) 的三吋盆中，接著在植物周圍挖三個直徑與深度皆約一公分的洞，並倒入含有 200 隻根瘤線蟲的懸浮液，隨後用土將洞補平，完成接種。為了降低金屬影響線蟲侵染，在接種 12 小時後再分別加入 1.25 及 2.5 mL 2000 mg/L Ni²⁺金屬濃縮液和 25 及 250 μ l 2000 mg/L Cr⁶⁺金屬濃縮液，接著以順時針方向加入約 30 mL 自來水於每個盆栽中，使金屬溶液可以充分滲入土壤中，製造分別含有 50 及 100 mg/kg 的鎳或 1 及 10 mg/kg 的鉻土壤環境。隨後將盆栽培養於 28°C 恆溫生長箱，生長箱設定為濕度 50%，光照 12 小時。期間每兩天澆 50 mL 自來水於每個盆栽中。接種十天後將番茄植株移出土壤，並利用醋酸品紅方法將其根部染色 (同 2.2.5 根部侵染試驗染色方法)，染色完畢後將植株地上部以剪刀剪除，



並將根部放置於兩片玻片之中，將根部壓扁，並以透明膠帶固定使其不易滑動。將玻片放置於光學顯微鏡 (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japan) 下，觀察並計算二齡幼蟲發育至三齡、四齡幼蟲或雌成蟲隻數，統計幼蟲發育至不同齡期的比例。此試驗進行六重複。

3.2.8 脂質染色試驗

為了瞭解環境中的鎳、鉻對根瘤線蟲代謝之影響，本研究將根瘤線蟲放置於兩個不同濃度的金屬溶液 (50, 100 mg/L 鎳溶液；1, 10 mg/L 鉻溶液) 中，並以無添加金屬的無菌 ddH₂O 為對照組。先以挑針將 30 隻孵化未滿 24 小時的二齡幼蟲移至 12 孔盤中，每個孔洞皆含有 1.9 mL 無菌 ddH₂O，接著加入 1 及 100 μ l 含 2000 mg/L Cr⁶⁺ 的濃縮液或 50 及 100 μ l 含 2000 mg/L Ni²⁺ 的濃縮液，並再加入無菌 ddH₂O 使每個孔盤的溶液最終體積為 2 mL，接著用鋁箔紙將孔盤包好避光，放置於震盪儀，使其穩定供給氧氣，接著在第三及五天時將線蟲以玻璃滴管吸取線蟲移至眼洞玻皿中，改良 Pino 等人發表線蟲脂質染色方法 (Pino et al. 2013) 進行染色。將眼洞玻皿中多餘的液體移出，僅留約 10 μ l，並加入 200 μ l M9 溶液 (KH₂PO₄ 3 g, Na₂HPO₄ 6 g, NaCl 5 g, 1M MgSO₄ 1 ml, in 1 L dH₂O) 清洗線蟲三次，接著將 M9 溶液移除後，再加入 200 μ l M9 with 0.01% Triton X-100 溶液靜置 1 分鐘，接著移出液體並置換 200 μ l M9 with 40% isopropanal 溶液並停留 3 分鐘，需要持續搖晃使線蟲漂浮於溶液中，隨後使線蟲沉澱並將液體移除。再以玻璃滴管將線蟲移置於 12 孔盤內，移線蟲時液體需少於 50 μ l，每個孔洞內含有 1 mL 的 M9 溶液，並添加 6 μ l Nile red stock (0.5mg/ml in acetone)，隨後用鋁箔紙將 12 孔盤密封，使其置於黑暗三小時，並使其搖晃。兩小時後，將線蟲移出，並利用 M9 with 0.01% Triton X-100 溶液清洗三次並將線蟲放置於 M9 with 0.01% Triton X-100 溶液中置於黑暗 30



分鐘，接著使用光學顯微鏡 (Olympus Corporation, Japan) 搭配 FITC 濾鏡觀察並拍照，後續利用 Image J 軟體 (NIH, USA) 計算線蟲體內脂肪面積。

3.2.9 接種試驗

為了瞭解根瘤線蟲是否能在環境中含有鎳、鉻時，是否能夠完成一個世代，並且成功繁殖，本研究欲使根瘤線蟲二齡幼蟲成功侵染番茄植株，並使土壤環境含有兩個不同濃度的金屬 (50, 100 mg/kg 鎳；1, 10 mg/kg 鉻)，並以無添加金屬的土壤為對照組，另外有無接種線蟲的對照組，可用於觀察金屬對植物本身影響。首先將 5 天大番茄幼苗移至裝有 250 g 無菌栽培介質 (珍珠石：培養土= 1：2) 的五吋盆中，定植一週後分別加入 6.25 及 10.5 mL 2000 mg/L Ni^{2+} 金屬濃縮液和 125 μl 及 1.25 mL 2000 mg/L Cr^{6+} 金屬濃縮液，接著以順時針方向加入約 100 mL 自來水於每個盆栽中，使金屬溶液可以充分滲入土壤中，製造分別含有 50 及 100 mg/kg 鎳或 1 及 10 mg/kg 鉻土壤環境。加入金屬溶液三天後接種根瘤線蟲，在植物周圍挖三個直徑與深度皆約一公分的洞，並倒入含有 1500 隻根瘤線蟲的懸浮液，隨後用土將洞補平，完成接種。隨後將盆栽放置於日夜溫 30/26°C 溫室，光照為 14 小時，平均濕度為 40-60%。種植期間每兩天添加 200 mL 自來水於每個盆栽中。接種 40 天後，將番茄植株移出土壤，計算植物高度、根長及根重，以得知植物在該環境是否受到影響，另外亦計算根瘤數目、根瘤指數、卵塊數以及卵數目，了解根瘤線蟲在鎳、鉻環境中，是否能夠成功侵染及繼續繁殖子代。此試驗進行六重複。

3.2.10 數據分析

所有試驗量測所得到的數值以統計軟體 SAS University Edition (9.4TS1-M6，SAS Institute，USA) 先進行 ANOVA 差異性分析，設定 $p \text{ value} < 0.05$ 為有顯著差



異，確認試驗組間有顯著差異後，再以 Tukey 統計並進行差異比較並將其分組。

3.3 結果

3.3.1 線蟲對環境中鉻、鎳具有敏感性

將象耳豆根瘤線蟲置於在七個不同濃度 (0, 1, 10, 50, 100, 200, 1000 mg/L) 的鎳金屬溶液中的觀察，並與放置於水中的對照組相比較其存活率，結果呈現於圖十六。實驗一天後發現，200 mg/L 與 1000 mg/L 的處理組，分別有 10% 及 80% 的線蟲死亡。而透過 log-rank 分析結果顯示，1000 mg/L 處理組在五天後會全數死亡，200 mg/kg 則是十天，100 mg/kg 為十三天，而 1 及 10 mg/L 處理組線蟲可存活十五天。以七個不同濃度 (0, 1, 10, 50, 100, 200, 1000 mg/L) 的鉻金屬溶液處理，試驗結果呈現於圖十七。試驗一天後，即觀察到 100、200、1000 mg/L 鉻造成象耳豆根瘤線蟲全數死亡，而 10 ppm 則有 60% 的死亡率。以 log-rank 分析其在金屬溶液下之存活率，發現 50 及 100 mg/kg 在五天內及全數死亡，而 10 mg/kg 則可存活至十天。實驗結果顯示根瘤線蟲對於環境中金屬具有敏感性，隨環境中金屬濃度之增加，其能夠存活的時間也逐漸縮短。為方便後續生理實驗之觀察，挑選受試線蟲在處理後 3-7 天之間仍有 50% 生存率的最高金屬濃度進行；挑選濃度 50 及 100 mg/L 鎳溶液，與 1 及 10 mg/L 鉻溶液作為試驗濃度。

3.3.2 鎳鉻抑制卵孵化率

將象耳豆根瘤線蟲的卵置於兩個不同濃度 (50, 100 mg/L) 的鎳金屬溶液中 10 天，並比較放置於水中的對照組的孵化率，結果發現象耳豆根瘤線蟲的卵在 100 mg/L 鎳溶液中處理 10 天的線蟲卵孵化率顯著下降 15%，而 50 mg/L 的處理組則



與對照組無顯著差異 (圖十八)。而於兩個不同濃度 (1, 10 mg/L) 的鉻溶液的處理結果則顯示，線蟲的孵化率分別下降 40% 及 43% (圖十九)。實驗結果顯示當環境中金屬濃度到達一定量 (100 mg/L 鎳；1 mg/L 鉻) 會抑制根瘤線蟲卵的孵化率，使其後代數目減少。

3.3.3 鎳與鉻皆降低線蟲侵染植物的能力

將象耳豆根瘤線蟲二齡幼蟲放置於兩個不同濃度 (50, 100 mg/L) 鎳環境中，72 小時後計算成功侵染植株根部的線蟲數量，比對照組平均減少了 21 隻及 50 隻 (圖二十)，侵染率平均下降 18.1% 及 43.1%。而於兩個不同濃度 (1, 10 mg/L) 鉻環境中，3 天後侵染植株的線蟲隻數平均減少了 39 隻及 84 隻 (圖二十一)，侵染率下降 33.6% 及 72.4%。實驗結果顯示，根瘤線蟲在環境中含有鎳鉻時，會降低其侵染寄主能力，使其進入植株的線蟲數目減少。

3.3.4 鎳加快胚胎發育

將象耳豆根瘤線蟲的卵放置於鎳溶液中，60 小時後觀察到 50 mg/L 處理組中已有 63% 發育至一齡幼蟲及 1% 二齡幼蟲，僅剩 36% 尚在胚胎階段；100 mg/L 處理組中，有 61% 已發育至一齡幼蟲，39% 處於胚胎階段；而在對照組中，僅有 50% 發育至一齡幼蟲，仍有 50% 仍處於胚胎發育階段 (圖二十二)。於鉻環境中，60 小時後，1 ppm 處理組有 63% 一齡幼蟲及 1% 二齡幼蟲，僅剩 36% 仍在胚胎發育階段，而 10 ppm 處理組已有 65% 發育至一齡幼蟲，35% 仍處於胚胎發育階段；而在對照組中則有 64% 一齡幼蟲及 36% 仍處於胚胎發育階段的卵 (圖二十三)。實驗結果顯示，根瘤線蟲在胚胎階段時，會受到環境中金屬鎳的影響而加速發育，而鉻則是不會影響其發育速度。



3.3.5 鎳鉻加速幼蟲發育

將象耳豆根瘤二齡幼蟲接種置於含有鎳的土壤環境中，十天後，於種植於土壤內的植物根部染色發現，50 mg/kg 處理組中僅有 12% 仍為二齡幼蟲階段，52% 已發育至三齡幼蟲，28% 達到四齡，且有 8% 的雌成蟲。而在 100 mg/kg 鎳處理組中，則有 39% 三齡幼蟲，34% 四齡幼蟲，並有 18% 的雌成蟲，而僅剩 9% 二齡幼蟲。對照組在十天後仍有 75% 的二齡幼蟲，僅 20% 發育至三齡幼蟲，2% 成為四齡幼蟲，3% 為雌成蟲 (圖二十四)。此外，在含有鉻的土壤環境中，檢視寄主根部染色結果，發現尚有 59% 二齡幼蟲未發育至下個階段，1 mg/kg 處理組有 31% 發育至三齡幼蟲，9% 四齡幼蟲，且有 9% 的雌成蟲。10 mg/kg 的處理組則有 57% 三齡幼蟲，14% 四齡幼蟲，16% 的雌成蟲，僅剩 13% 二齡幼蟲。而在該試驗的對照組中，僅有 20% 發育至三齡幼蟲，2% 四齡幼蟲，3% 雌成蟲，且仍有 75% 的二齡幼蟲 (圖二十五)。實驗結果顯示，當環境中含有金屬鎳鉻時，皆會使根瘤線蟲幼蟲階段發育加速，且隨環境中濃度增加，其發育速度隨之加快。

3.3.6 鎳鉻降低代謝速度

將象耳豆根瘤線蟲二齡幼蟲浸泡於鎳溶液中，三天或五天後染色確認線蟲體內剩餘脂質，結果發現在 50 及 100 mg/L 鎳的組別中，可見有脂質堆積的現象，脂質平均面積高於對照組 (圖二十六)；實驗結果暗示，50 及 100 mg/L 的鎳環境會使二齡幼蟲代謝變慢。而浸泡在鉻溶液中的二齡幼蟲，於三天或五天後染色，結果亦發現 1 及 10 ppm 鉻處理組中的線蟲脂質平均面積高於對照組 (圖二十七)。由實驗結果可推知，於重金屬環境中的線蟲代謝速度較無重金屬的環境中的蟲更為緩慢。



3.3.7 在含有鎳鉻環境下仍可完成世代

將象耳豆根瘤線蟲二齡幼蟲放置於不同濃度鎳環境與鉻環境中，40 天後測量番茄高度、重量及根長，發現無論有無接種線蟲，在含有 50 及 100 mg/kg 的鎳土壤中，番茄植株高度、根長及根重皆與對照組相比沒有差異。1 及 10 mg/kg 的鉻土壤，亦不會影響番茄植株生長（圖二十八）。分析於鎳、鉻環境中根瘤線蟲生存狀況，故計算番茄根部之根瘤數目、根瘤指數、卵塊數與卵數目，觀察到在含有 50 及 100 mg/kg 鎳的土壤中，根瘤及卵塊數目並未減少，甚至在 100 mg/kg 鎳組別土壤中的二齡幼蟲相比於對照組更為增加。實驗結果顯示，環境中含有鎳能使根瘤線蟲發育變快，縮短世代所需的時間，且可以順利繁殖。在 1 及 10 mg/kg 鉻的土壤中，根瘤數目並未減少，亦有卵塊及卵產生，表示在該濃度鉻下，象耳豆根瘤線蟲仍能生存且繁殖。另外，在 1 mg/kg 鉻組別中，雖然與對照組相比有較高的卵量，但土壤中二齡幼蟲數目並無差異（圖二十九）。由實驗結果可推測，環境中的鉻可能造成線蟲發育變快，但其促進效益略差於鎳。

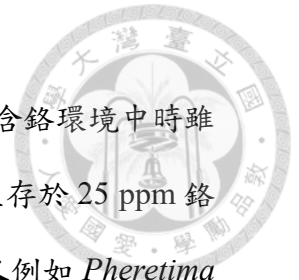
3.4 討論

本研究發現環境中高濃度的鎳對線蟲而言為毒性物質，會使象耳豆根瘤線蟲的壽命縮短並且降低卵的孵化率，影響其繁殖能力。過往，許多學者嘗試探究鎳調控繁殖能力之機制，發現鎳離子 (Ni^{2+}) 除了降低生物繁殖能力，亦會抑制哺乳類動物生長激素釋放進而降低其發育速度。研究指出，鎳離子會降低公牛精子活動能力並使其精子外膜細胞凋亡，且其濃度與公牛精子病變比例具有正相關性 (Zemanova et al. 2007; Lukac et al. 2011)。在人體卵巢細胞試驗中發現，鎳離子抑制卵激素生成機制可能與抑制膜上受體有關：暴露於鎳離子環境中，細胞表面的



cadherins 與 β -catenin 數量皆下降 (Revesz et al. 2004)，此兩種蛋白與生物胚胎形成、發育及癌症有高度相關性。此外，鎳離子也影響哺乳動物神經系統，於使牛垂體受影響，降低生長激素及催乳激素的釋放。而在大鼠實驗中，則發現鎳離子為催乳激素抑制劑 (Lorenson et al. 1983; Carlson 1984)。本研究的觀察結果，與前人所提出鎳使秀麗隱桿線蟲的壽命及繁殖能力下降的情況一致 (Wang & Wang 2008; Kong et al. 2017)。然而，本研究的發育試驗及接種試驗結果卻發現，無論是胚胎亦或是幼蟲，皆觀察到鎳離子會使象耳豆根瘤線蟲發育增快，且較快進入下一個世代；與過往在秀麗隱桿線蟲與 *Panagrellus redivivus* 兩種線蟲上被觀察到的情況並不相符 (Samoiloff et al. 1980; Wang & Wang 2008)。本研究結果暗示，並非所有線蟲在特定重金屬環境中就會產生相似的生長與發育變化。鎳離子影響象耳豆根瘤線蟲的發育的方式，可能遵循其他的生理反應模型。類似現象曾在昆蟲上被觀察到：當昆蟲棲息於逆境時，會透過快速發育進而適應環境。當果蠅經過寒冷處理 (暴露於 -4°C 兩天)，其產生之後代發育速度比穩定維持於室溫 25°C 的對照組還要快 (Rako & Hoffmann 2006)。其延伸出對逆境之抗性，可能與熱休克蛋白 Hsp70 有關。將果蠅卵放置於較低溫 (20°C) 孵化後其子代較為長壽，並加快其發育速度及抗熱性；學者於此處理組果蠅研究，發現 Hsp70 的表現量較高 (Sorensen & Loeschcke 2004)。後續若針對象耳豆根瘤線蟲於逆境時，進行熱休克蛋白表現量測定，則能進一步探究其是否與果蠅抵禦逆境的機制相似。

鉻對土壤中無脊椎生物的生存與繁殖能力影響不盡相同。前人研究中指出環境中含有高量的鉻能使 *Panagrellus Silusia*, *Monhystera disjuncta* 及 *Caenorhabditis elegans* 等多種線蟲死亡 (Pasternak 1982; Vranken & Tiré C Heip 1989; Wu et al. 2012)。本研究亦發現當環境中含有高於 50 ppm 的鉻，24 小時後象耳豆根瘤線蟲高達 80-100% 死亡率。同時，鉻會使象耳豆根瘤線蟲的卵孵化率下降，與 *C. elegans* 的情況



一致 (Roh et al. 2009)。然而，同樣為無脊椎動物的蚯蚓，生存於含鉻環境中時雖然壽命減短，繁殖能力卻會顯著上升。例如 *Octochaetus pattoni* 生存於 25 ppm 鉻環境中，死亡率上升結果與前述線蟲影響相同，但繁殖率卻上升。又例如 *Pheretima posthuman* 在 100 ppm 中壽命明顯縮短，但其再生能力及有性生殖頻率皆提升 (Soni & Abbasi 1981; Abbasi & Soni 1983)。此外，Boyle 等人曾報導鉻會使蟲生線蟲 *Steinernema feltiae* 留在昆蟲體內的時間增長，但子代數量並未增加，推測乃因發育變慢所致 (Boyle & Kakouli-Duarte 2008)。然而，本研究發現環境中含有鉻時會使象耳豆根瘤線蟲的發育速度加快，而且該影響不發生於胚胎過程，只發生於幼蟲時期。綜合上述，鉻對於線蟲幼蟲發育為一重要因子，但實際機制可能因線蟲種類有所差異，值得進一步探究。未來學者針對不同類群之生物，進行相關生理反應機制之探討，或許可更加了解演化過程中所導致的差異。

於代謝影響之探究本研究結果發現，浸泡三天或五天鉻溶液的組別皆會使象耳豆根瘤線蟲代謝減緩，有脂質堆積的現象，而前人研究中亦觀察到鉻會使秀麗隱桿線蟲代謝減緩 (Jiang et al. 2016)。在人類研究上卻發現，透過 250 μg 治療的嬰兒可以減緩葡萄糖耐受性不良之症狀，使嬰兒被餵食葡萄糖後，血糖濃度較不易大幅度浮動 (Hopkins et al. 1968)。葡萄糖與脂質在人體中皆受胰島素調控。於肝細胞中，胰島素會刺激葡萄糖利用並儲存為糖源及脂肪，同時抑制葡萄糖合成。胰島素亦會促進脂質合成，並抑制其降解 (Saltiel & Kahn 2001)。而 Gahoi 等人 (2016) 在研究線蟲分泌蛋白體時，發現有與人體胰島素相似的肽 (Insulin-like peptide)，其對動物發育及代謝扮演重要的角色，而這些蛋白於植物寄生性線蟲、動物寄生性線蟲、人類寄生性線蟲、蟲生線蟲及非寄生的線蟲皆有被鑑定到 (Gahoi & Gautam 2016)。綜合前人與本研究結果，推論環境中的鉻可能影響生物胰島素釋放，而使生物代謝



能力受到干擾，而可能是使葡萄糖利用上升，且抑制脂質降解，進而觀察到脂質堆積的現象。

針對不同線蟲比較其相對應影響其生理反應之金屬濃度，與 *C. elegans* 目前已知文獻相比。已知 75 μM 鎳或 115 mg/L 鉻會使 *C. elegans* 壽命縮短 (Roh et al. 2009; Wang & Wang 2008)，而在本研究則觀察到 200 mg/L 鎳及 100 mg/L 鉻一天後會使 *M. enterolobii* 死亡率與對照組相比有顯著差異，可以發現造成相同影響，在 *C. elegans* 需要較高濃度，推測與前人提出毒性與體型大小有關 (Anderson & Weber, 1975)，*C. elegans* 長度約為 1 mm，*M. enterolobii* 二齡幼蟲則約 400 μm 。而在繁殖能力方面，發現 20 mg/L 會使 *C. elegans* 子代數減少，而 2.5 μM 鎳則使其生殖速度下降 (Roh et al. 2009; Wang & Wang 2008)，但本研究則是針對其 *M. enterolobii* 卵孵化率進行探究，故比較基準不同，不易比較。侵染能力及發育速度影響則在 *C. elegans* 研究中並無前人探討。

與第二章蛇紋岩土壤性質相互比較，蛇紋岩土壤中的鎳離子為二價形式，鉻離子則為較不具毒性的三價形式，而經過有效性測定得知本研究蛇紋岩土壤中有效性鎳離子可高達 934 mg/kg，遠高於與本研究配製含 Ni(Hungate et al.) 金屬溶液之濃度，顯示本研究之生理影響於蛇紋岩環境中結果亦相符，高濃度鎳下不利根瘤線蟲生存；而有效性鉻離子則為 43 至 434 mg/kg，本研究生理試驗之結果濃度亦低於環境中有效性離子濃度，但本研究配製之溶液為較具毒性的 Cr (VI)，因此若需比較則需要更多試驗，進而換算不同價位鉻濃度對線蟲之影響。

本研究結果顯示，當農田環境中含有中量的鎳時，該逆境可能促使根瘤線蟲加快發育，於較短的時間內完成生活週期並順利繁衍後代。當環境中含有中量的鉻時，也會造成根瘤線蟲的幼蟲階段發育加快，使其進到成蟲階段時間縮短，較快完成一個世代並繁殖下一代。當田間具有鎳與鉻的污染，或是於具有兩者重金屬的環境如



蛇紋岩土壤，有可能會因此提高環境中根瘤線蟲族群。因此，過往所提出施用鎳以防治根瘤線蟲的作法，不僅無法達到成功防治的效果，長期而言，可能使根瘤線蟲對作物的危害加劇。此外，本研究觀察到線蟲代謝受到鎳影響而減緩但卻能加快期發育，可以推估根瘤線蟲於此環境中會進行不同的代謝途徑，使其只需較少的能量就可以發育至成蟲並繁衍後代，未來亦相當值得進一步探討。



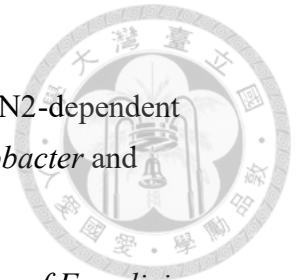
第四章 · 結論

本研究結果闡明根瘤線蟲於鎳、鉻環境中之繁殖、發育、侵染及代謝能力之影響，瞭解根瘤線蟲生存於該等逆境時，體內脂肪代謝速度減緩、存活率降低、卵的孵化率受到抑制、幼蟲的發育速度有所提升、侵染植株根部的比例則降低。象耳豆根瘤線蟲對於金屬的反應，綜合而言與其他線蟲並不完全相近，例如特定金屬鎳反而較類似於前人所報導的昆蟲的模型，值得未來植物寄生性線蟲生理研究者與生態演化者參考。對於根瘤線蟲生理機制的深入探討，可做為農業中的植物寄生性線蟲的綜合防治策略提出重要參考依據。基於本研究發現根瘤線蟲在鎳、鉻環境中會產生加速發育的現象，筆者認為運用此二種重金屬於防治根瘤線蟲之想法需要調整，於相關製劑中添加重金屬反而可能縮短線蟲完成世代所需時間，導致作物生長季內有更快的線蟲族群增量，造成更大的作物損失。除此之外，本研究針對蛇紋岩土壤中線蟲與細菌群相交互作用，為全球首例。筆者不僅提出東亞地區的蛇紋岩土壤微生物生態報告，也同時也是第一篇對於該環境場域進行微生物與微生物間交互作用的探討報告。本研究於蛇紋岩土壤中所找到對鎳、鉻具有高度耐受性之新紀錄種根瘤線蟲，推測可能有獲得來自環境中候選細菌的特殊基因，值得後續進行探究。

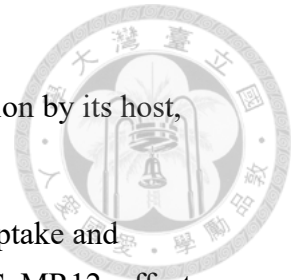


引用文獻

- 曾顯雄, 曾國欽, 張清安, 蔡東纂, 和嚴新富, 2019. 台灣植物病害名彙. **第五版**.
- 劉滄琴 郭, 朱戩良, 連深, 2007. 台灣東部蛇紋岩母質化育土壤地區重金屬特性之初探 *台灣農業研究* **56**, 65-78.
- 賴建任, 2019. *根瘤線蟲電漿激活水防治系統之開發與運用*: 國立臺灣大學.
- Abad P, Gouzy J and Aury JM, *et al.*, 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* **26**, 909-15.
- Abbasi SA and Soni R, 1983. Stress-Induced Enhancement of Reproduction in Earthworm *Octochaetus-Pattoni* Exposed to Chromium (VI) and Mercury (II) - Implications in Environmental-Management. *International Journal of Environmental Studies* **22**, 43-7.
- Ahamed M, 2011. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology In Vitro* **25**, 930-6.
- Allouche M, Nasri A, Harrath AH, Mansour L, Beyrem H and Boufahja F, 2020. Migratory behavior of free-living marine nematodes surrounded by sediments experimentally contaminated by mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of King Saud University Science* **32**, 1339-45.
- Amoroso MJ, Schubert D, Mitscherlich P, Schumann P and Kothe E, 2000. Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces spec.* *Journal of Basic Microbiology* **40**, 295-301.
- Babich H and Stotzky G, 1983. Toxicity of nickel to microbes: environmental aspects. *Advances in Applied Microbiology* **29**, 195-265.
- Bardgett RD, Speir TW, Ross DJ, Yeates GW and Kettels HA, 1994. Impact of pasture contamination by copper, chromium, and arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. *Biology and Fertility of Soils* **18**, 71-9.
- Batten CK and Powell NT, 1971. The *Rhizoctonia-Meloidogyne* Disease Complex in Flue-cured Tobacco. *Journal of Nematology* **3**, 164-9.



- Bazylnski DA, Dean AJ, Schuler D, Phillips EJ and Lovley DR, 2000. N₂-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. *Environmental Microbiology* **2**, 266-73.
- Blaxter ML and Robertson WM, 1998. *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*. England: CABI.
- Bongers T, 1990. The Maturity Index - an Ecological Measure of Environmental Disturbance Based on Nematode Species Composition. *Oecologia* **83**, 14-9.
- Boufahja F, Hedfi A, Amorri J, Aissa P, Beyrem H and Mahmoudi E, 2011. An Assessment of the Impact of Chromium-Amended Sediment on a Marine Nematode Assemblage Using Microcosm Bioassays. *Biological Trace Element Research* **142**, 242-55.
- Bouyoucos GJ, 1936. Directions for making mechanical analyses of soils by the hydrometer method. *Soil Science* **42**, 225-9.
- Boyle S, and Kakouli-Duarte T, 2008. The effects of chromium VI on the fitness and on the beta-tubulin genes during in vivo development of the nematode *Steinernema feltiae*. *Science of the Total Environment* **404**, 56-67.
- Branco S and Ree RH, 2010. Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. *PLoS One* **5**.
- Caporaso JG, Kuczynski J and Stombaugh J, *et al.*, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**, 335-6.
- Carlson HE, 1984. Inhibition of prolactin and growth hormone secretion by nickel. *Life Science* **35**, 1747-54.
- Castagnone-Sereno P, Danchin EG, Perfus-Barbeoch L and Abad P, 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review Phytopathology* **51**, 203-20.
- Chang YT, Hseu ZY, Lizuka Y and Yu CD, 2013. Morphology, Geochemistry, and Mineralogy of Serpentine soils under a tropical forest in southeastern taiwan. *Taiwan Journal of Forest Science* **28**, 185-201.
- Chen B, Shen J, Zhang X, Pan F, Yang X and Feng Y, 2014a. The endophytic bacterium,



Sphingomonas SaMR12, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *Sedum alfredii*. *PLoS One* **9**, e106826.

Chen B, Zhang Y, Rafiq MT, *et al.*, 2014b. Improvement of cadmium uptake and accumulation in *Sedum alfredii* by endophytic bacteria *Sphingomonas* SaMR12: effects on plant growth and root exudates. *Chemosphere* **117**, 367-73.

Chen W, 2012. The Study of Bioremediation on Heavy Metal of Cultured Seawater by *Sphingomonas* sp. XJ2 Immobilized *Sphingomonas* Strain. *Advanced Materials Research* **347-353**, 1436-41.

Chen ZC and Hongyu BS, 1987. Enhancement of hydrogenase and nitrogenase activities in *Rhodopseudomonas capsulata* by nickel. *FEMS Microbiology Letters* **12**, 359-363.

Cheng CH, Jien SH, Lizuka YT, H. , Chang YH and Hseu ZY, 2011. Pedogenic Chromium and Nickel Partitioning in Serpentine Soils along a Toposequence. *Pedology* **75**, 659-68.

Cheng CH, Jien SH, Tsai H, Chang YH, Chen YC and Hseu ZY, 2009. Geochemical Element Differentiation in Serpentine Soils From the Ophiolite Complexes, Eastern Taiwan. *Soil Science* **174(5)**, 283-91.

Cooper GR, 1978. Greenhouse experiments with maize grown in ultramafic soils. *Soil Science* **85**, 437-44.

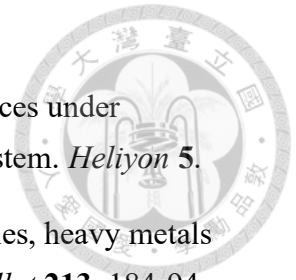
Danchin EGJ, Rosso MN, Vieira P, *et al.*, 2010. Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17651-6.

David A, Singh Chauhan P, Kumar A, *et al.*, 2018. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. *International Journal of Biological Macromolecules* **108**, 1176-84.

De Ley P, De Ley IT, Morris K, *et al.*, 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **360**, 1945-58.



- Dell B, Xu D, Rogers C and Huang L, 2002. *Eucalyptus Plantations: Research, Management and Development* Singapore: World Scientific.
- Doubkova P, Suda J, and Sudova R, 2012. The symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi contributes to plant tolerance to serpentine edaphic stress. *Soil Biology & Biochemistry* **44**, 56-64.
- Doubkova P, Vlasakova E and Sudova R, 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant and Soil* **370**, 149-61.
- Duruibe JO, Ogwuegbu MOC and Egwurugwu JN, 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of the Physical Sciences* **2**, 112-8.
- Edgar RC, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* **10**, 996-+.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C and Knight R, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194-200.
- Elling AA, 2013. Major emerging problems with minor meloidogyne species. *Phytopathology* **103**, 1092-102.
- Freitas VM, Silva JGP, Gomes CB, Castro JMC, Correa VR, and Carneiro RMDG, 2017. Host status of selected cultivated fruit crops to *Meloidogyne enterolobii*. *European Journal of Plant Pathology* **148**, 307-19.
- Fuller ME, Scow KM, Lau S and Ferris H, 1997. Trichloroethylene (TCE) and toluene effects on the structure and function of the soil community. *Soil Biology & Biochemistry* **29**, 75-89.
- Gahoi S and Gautam B, 2016. Identification and analysis of insulin like peptides in nematode secretomes provide targets for parasite control. *Bioinformation* **12**, 412-5.
- Gheysen G and Mitchum MG, 2019. Phytoparasitic Nematode Control of Plant Hormone Pathways. *Plant Physiol* **179**, 1212-26.
- Golebiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A and Wrobel B, 2014. 16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils. *Microbial Ecology* **67**, 635-47.



Gupta D, Bhandari S, and Bhusal DR, 2019. Variation of nematode indices under contrasting pest management practices in a tomato growing agro-ecosystem. *Heliyon* **5**.

Gutierrez C, Fernandez C, Escuer M, *et al.*, 2016. Effect of soil properties, heavy metals and emerging contaminants in the soil nematodes diversity. *Environ Pollut* **213**, 184-94.

Haas BJ, Gevers D, Earl AM, *et al.*, 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research* **21**, 494-504.

Haegeman A, Jones JT and Danchin EG, 2011. Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism? *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 879-87.

Harrison S, 1997. How natural habitat patchiness affects the distribution of diversity in Californian serpentine chaparral. *Ecology* **78**, 1898-906.

Hedfi A, Boufahja F, Aïssa P, Mahmoudi E and Beyrem H, 2012. Do trace metals (chromium, copper, and nickel) influence toxicity of diesel fuel for free-living marine nematodes? *Environmental Science and pollution Research* **20**, 3760-70.

Heininger P, Hoss S, Claus E, Pelzer J and Traunspurger W, 2007. Nematode communities in contaminated river sediments. *Environ Pollut* **146**, 64-76.

Hong C, Si YX, Xing Y and Li Y, 2015. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and pollution Research* **22**, 10788-99.

Hopkins LLJ, Ransome-Kuti O and Majaj AS, 1968. Improvement of impaired carbohydrate metabolism by chromium 3 in manourished infants. *Am J Clin Nutr* **21**, 203-11.

Hseu ZY, 2006. Concentration and Distribution of Chromium and Nickel Fractions Along A Serpentinic Toposequence. *Soil Science* **171**, 341-53.

Hseu ZY, 2018. *Biogeochemistry of Serpentine Soils*. USA: Nova.

Hseu Z-Y, Chen Z-S, Tsai C-C, Jien S-H, 2016. Portable X-Ray Fluorescence (pXRF) for Determining Cr and Ni Contents of Serpentine Soils in the Field. In., 37-50.

Hungate BA, Jaeger Iii CH, Gamara G, Chapin Iii FS, And Field CB, 2000. Soil microbiota in two annual grasslands: responses to elevated atmospheric CO₂. *Oecologia*



124, 589-98.

Hu MX, Zhuo K and Liao JL, 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* **101**, 1270-7.

Hungate BA, Jaeger Iii CH, Gamara G, Chapin Iii FS and Field CB, 2000. Soil microbiota in two annual grasslands: responses to elevated atmospheric CO₂. *Oecologia* **124**, 589-98.

Igwe AN and Vannette RL, 2019. Bacterial communities differ between plant species and soil type, and differentially influence seedling establishment on serpentine soils. *Plant and Soil* **441**, 423-37.

Jami E et al., Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J* **7** (6), 1069-79.

Jiang Y, Chen J, Wu Y, Wang Q and Li H, 2016. Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **11**, e0148014.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EG, et al., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **14**, 946-61.

Kabata-Pendias A, 2001. *Trace Elements in soils and plants*. UK: Applied Geochemistry Research Group Imperial College.

Keeling PJ, 2009. Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current Opinion Genetetic Development* **19**, 613-9.

Khan MR, Khan MW and Singh K, 1996. Effects of nickel and root-knot nematode on the growth and protein content of chickpea. *Nematology*. **24**, 87-90.

Khan MR, Khan SM, Mohiddin FA and Askary TH, 2006. Effects of high nickel soil on root-knot Nematode disease of tomato. *Nematopica* **36**, 79-87.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1.

Kikuchi T, Jones JT, Aikawa T, Kosaka H and Ogura N, 2004. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus*



xylophilus. *FEBS Letters* **572**, 201-5.

Kong L, Gao X, Zhu J, Zhang T, Xue Y and Tang M, 2017. Reproductive toxicity induced by nickel nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology* **32**, 1530-8.

Korthals GW, Alexiev AD, Lexmond TM, Kammenga JE and Bongers T, 1996. Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 979-85.

Liu BF, Ren NQ, Ding J, Xie GJ and Guo WQ, 2009. The effect of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *International Journal of Hydrogen Energy* **34**, 721-6.

Long JY, Gao XN, Su MH, Li HP, Chen DY and Zhou SY, 2018. Performance and mechanism of biosorption of nickel from aqueous solution by non-living *Streptomyces roseorubens* SY. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **548**, 125-33.

Lorenson MY, Robson DL and Jacobs LS, 1983. Divalent cation inhibition of hormone release from isolated adenohipophysial secretory granules. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 8618-22.

Losi M and Frankenberger W, 1994. Chromium-resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. *Water Air and Soil Pollution* **74**, 405-13.

Lu M and Zhang ZZ, 2014. Phytoremediation of soil co-contaminated with heavy metals and deca-BDE by co-planting of *Sedum alfredii* with tall fescue associated with *Bacillus cereus* JP12. *Plant and Soil* **382**, 89-102.

Lu XH, Solangi GS, Li DJ, Huang JL, Zhang Y and Liu ZM, 2019. First Report of Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* on *Gardenia jasminoides* in China. *Plant Disease* **103**, 1434-5.

Lukac N, Bardos L, Stawarz R, *et al.*, 2011. In vitro effect of nickel on bovine spermatozoa motility and annexin V-labeled membrane changes. *Journal of Applied Toxicology* **31**, 144-9.

Magoc T and Salzberg SL, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**, 2957-63.



Mattarozzi M, Manfredi M, Montanini B, *et al.*, 2017. A metaproteomic approach dissecting major bacterial functions in the rhizosphere of plants living in serpentine soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 2327-39.

Mayer WE, Schuster LN, Bartelmes G, Dieterich C and Sommer RJ, 2011. Horizontal gene transfer of microbial cellulases into nematode genomes is associated with functional assimilation and gene turnover. *Bmc Evolutionary Biology* **11**.

McLean EO (1982) Soil pH and lime requirement. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*, 2nd edn. pp 199–224. Madison: Agronomy Monograph No 9. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America.

Mcqueen JP and Treonis AM, 2019. Cacao agroforestry in Belize: Effects on soil nematode community structure. *Agroforestry Systems* **94**, 1123-1132

Mcsorley R, 1992. Nematological Problems in Tropical and Subtropical Fruit Tree Crops. *Nematropica* **22**, 103-16.

Meindl GA, Bain DJ and Ashman TL, 2014. Nickel accumulation in leaves, floral organs and rewards varies by serpentine soil affinity. *Aob Plants* **6**, plu036.

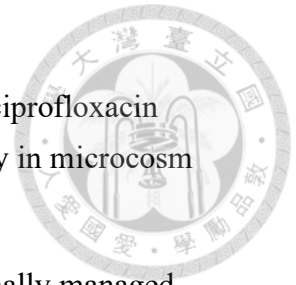
Mendes ML, Dickson DW, Schoellhorn R, Cetintas R and Brito JA, 2007. Host status of petunia cultivars to root-knot nematodes. *Nematology*. **35**, 91-4.

Monokrousos N, Charalampidis G, Boutsis G, Sousanidou V, Papatheodorou EM and Argyropoulou MD, 2014. Plant-induced differentiation of soil variables and nematode community structure in a Mediterranean serpentine ecosystem. *Soil Research* **52**, 593-603.

Morales DK, Ocampo W and Zambrano MM, 2007. Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2704-12.

Nabais C, Freitas H, Hagemeyer J and Breckle SW, 1996. Radial distribution of Ni in stemwood of *Quercus ilex* L. trees grown on serpentine and sandy loam (umbric leptosol) soils of NE-Portugal. *Plant and Soil* **183**, 181-5.

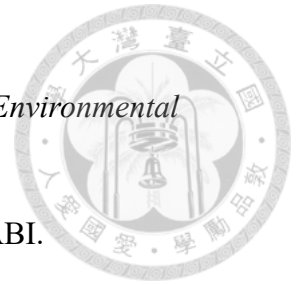
Nagy P, 1999. Effect of an artificial metal pollution on nematode assemblage of a calcareous loamy chernozem soil. *Plant and Soil* **212**, 35-43.



- Nasri A, Hannachi A, Allouche M, *et al.*, 2020. Chronic ecotoxicity of ciprofloxacin exposure on taxonomic diversity of a meiobenthic nematode community in microcosm experiments. *Journal of King Saud University Science* **32**, 1470-5.
- Neher DA, 1999. Nematode communities in organically and conventionally managed agricultural soils. *Journal of Nematology* **31**, 142-54.
- Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, *et al.*, 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-9.
- Novelli ELB, Rodrigues NL, Sforcin JM and Ribas BO, 1997. Toxic effects of nickel exposure on heart and liver of rats. *Toxic Substance Mechanisms* **16**, 251-8.
- Opperman CH, Bird DM, Williamson VM, *et al.*, 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14802-7.
- Oyetibo GO, Miyauchi K, Huang Y, *et al.*, 2019. Comparative geochemical evaluation of toxic metals pollution and bacterial communities of industrial effluent tributary and a receiving estuary in Nigeria. *Chemosphere* **227**, 638-46.
- Oze C, Fendorf, S. B, K. D, Cleman ARG, 2004. Chromium geochemistry in serpentinized ultramafic rocks and serpentine soils from the Franciscan complex of California. *American Journal of Science* **304**, 67-101.
- Ozturk A, Artan T and Ayar A, 2004. Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Colloids Surf B Biointerfaces* **34**, 105-11.
- Pal A, Ghosh S and Paul AK, 2006. Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. *Bioresour Technology* **97**, 1253-8.
- Pal A, Wauters G and Paul AK, 2007. Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant and Soil* **293**, 37-48.
- Pandey V, Dixit V and Shyam R, 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* **61**, 40-7.



- Park BY, Lee JK, Ro HM, and Kim YH, 2011. Effects of heavy metal contamination from an abandoned mine on nematode community structure as an indicator of soil ecosystem health. *Applied Soil Ecology* **51**, 17-24.
- Pasternak J, Mudry T and Haight M, 1982. Toxicity of Seven Heavy Metals On Panagrell Us Silusiae: the Efficacy of the Free-Living Nematode as an in Vivo Toxicological Bioassay. *Nematologica*, 3–11.
- Pino EC, Webster CM, Carr CE and Soukas AA, 2013. Biochemical and high throughput microscopic assessment of fat mass in *Caenorhabditis elegans*. *JOVE Visible Experiment*.
- Porter SS, Chang PL, Conow CA, Dunham JP and Friesen ML, 2017. Association mapping reveals novel serpentine adaptation gene clusters in a population of symbiotic *Mesorhizobium*. *ISME J* **11**, 248-62.
- Proctor J, 1999. Toxin, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 334-5.
- Proctor J and Baker AJM, 1994. The importance of nickel for plant growth in ultramafic(serpentine) soils. . *In Toxic metals in soil-plant system*, 417-32.
- Rajapaksha AU, Vithanage M, Ok YS and Oze C, 2013. Cr(VI) Formation related to Cr(Hungate et al.)-muscovite and birnessite interactions in ultramafic environments. *Environmental Science Technology* **47**, 9722-9.
- Rako L and Hoffmann AA, 2006. Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **52**, 94-104.
- Reddy DDR. Analysis of crop losses in tomato due to *Meloidogyne incognita*, 1985. *Indian Journal of Nematology* **15**, 55-59.
- Revesz C, Forgacs Z, Lazar P, *et al.*, 2004. Effect of nickel (Ni²⁺) on primary human ovarian granulosa cells in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods* **14**, 287-92.
- Rich JR, Brito JA, Kaur R and Ferrell JA, 2009. Weed Species as Hosts of *Meloidogyne*: A Review. *Nematropica* **39**, 157-85.
- Roh JY, Lee J and Choi J, 2009. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for



metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology Chemistry* **25**, 2946-56.

Roland P, Maurice M, S. AJL, 2009. *Root-Knot nematode*. England: CABI.

Rudel D, Douglas CD, Huffnagle IM, Besser JM and Ingersoll CG, 2013. Assaying Environmental Nickel Toxicity Using Model Nematodes. *PLoS One* **8**, e77079.

Ruess L, Schmidt IK, Michelsen A and Jonasson S, 2001. Manipulations of a microbial based soil food web at two arctic sites - evidence of species redundancy among the nematode fauna? *Applied Soil Ecology* **17**, 19-30.

Saha R, Nandi R and Saha B, 2011. Sources and toxicity of hexavalent chromium. *Journal of Coordination Chemistry* **64**, 1782-806.

Salamun P, Brazova T, Miklisova D and Hanzelova V, 2015. Influence of selected heavy metals (As, Cd, Cr, Cu) on nematode communities in experimental soil microcosm. *Helminthologia* **52**, 341-7.

Saltiel AR and Kahn CR, 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

Samoiloff MR, Schulz S, Jordan Y, Denich K and Arnott E, 1980. A Rapid Simple Long-Term Toxicity Assay for Aquatic Contaminants Using the Nematode *Panagrellus-Redivivus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**, 1167-74.

Sarathchandra SU, Ghani A, Yeates GW, Burch G and Cox NR, 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biology & Biochemistry* **33**, 953-64.

Schechter SP, Bruns TD, 2008. Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Molecular Ecology* **17**, 3198-210.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7537-41.

Semsar H, Fotovati A, Lakzian A, Khorassani R and Mogaddam EM, 2011. The effect of heavy metals (lead, nickel and cadmium) and cow manure on population changes of



indigenous soil nematodes. *Electronic journal of soil management and sustainable production* **1**, 119-135.

Shannon CE, 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* **27**, 379-423.

Shewry PR and Peterson PJ, 1976. Distribution of chromium and nickel in plants and soil from serpentine and other sites. *Journal of Ecology* **64**, 195-212.

Shoeb E, Badar U, Akhter J, Shams H, Sultana M and Ansari MA, 2012. Horizontal gene transfer of stress resistance genes through plasmid transport. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **28**, 1021-5.

Simpson EH, 1949. Measurement of Diversity. *Nature* **163**, 688-.

Sommer RJ and Streit A, 2011. Comparative genetics and genomics of nematodes: genome structure, development, and lifestyle. *Annual Review of Genetics* **45**, 1-20.

Soni R and Abbasi SA, 1981. Mortality and Reproduction in Earthworms *Pheretima Posthuma* Exposed to Chromium(VI). *International Journal of Environmental Studies* **17**, 147-9.

Sorensen JG and Loeschcke V, 2004. Effects of relative emergence time on heat stress resistance traits, longevity and hsp70 expression level in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology* **29**, 195-203.

Spatharis S, Roelke DL, Dimitrakopoulos PG and Kokkoris GD, 2011. Analyzing the (mis)behavior of Shannon index in eutrophication studies using field and simulated phytoplankton assemblages. *Ecological Indicators* **11**, 697-703.

Spellerberg IF and Fedor PJ, 2003. A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon-Wiener' Index. *Global Ecology and Biogeography* **12**, 177-9.

Strong WL, 2016. Biased richness and evenness relationships within Shannon-Wiener index values. *Ecological Indicators* **67**, 703-13.

Subbotin SA, Vierstraete A, De Ley P, *et al.*, 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 1-



16.

Takakuwa S, 1987. Nickel Uptake in *Rhodopseudomonas-Capsulata*. *Archives of Microbiology* **149**, 57-61.

Trudgill DL, 1997. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp); How can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology* **46**, 26-32.

Van Den Hoogen J, Geisen S, Routh D, *et al.*, 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* **572**, 194-+.

Vranken G, And Tiré C Heip C, 1989. Effect of Temperature and Food on Hexavalent Chromium Toxicity to the Marine Nematode *Monhystera disjuncta*. *Marine Environmental Research* **27**, 127-36.

Vranken G, Tire C and Heip C, 1988. The Toxicity of Paired Metal Mixtures to the Nematode *Monhystera-Disjuncta* (Bastian, 1865). *Marine Environmental Research* **26**, 161-79.

Wang D and Wang Y, 2008. Nickel sulfate induces numerous defects in *Caenorhabditis elegans* that can also be transferred to progeny. *Environmental Pollution* **151**, 585-92.

Wang DY and Xing XJ, 2008. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences* **20**, 1132-7.

Whittaker RH, *Evolution and measurement of species diversity*. 1972: pp. 213-251. USA: WILEY

Wu Q, Qu Y, Li X and Wang D, 2012. Chromium exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations in chronic toxicity assay system of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* **87**, 1281-7.

Wu Z, Gao G and Wang Y, 2019. Effects of soil properties, heavy metals, and PBDEs on microbial community of e-waste contaminated soil. *Ecotoxicology Environmental Safety* **180**, 705-14.

Yin HQ, Niu JJ, Ren YH *et al.*, 2015. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Scientific Reports* **5**.



Zemanova J, Lukac N, Massanyi P et al., 2007. Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* **54**, 281-6.

Zhaxybayeva O, Swithers KS, Lapierre P, et al., 2009. On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5865-70.



圖表

表一、線蟲分子鑑定引子對序列。

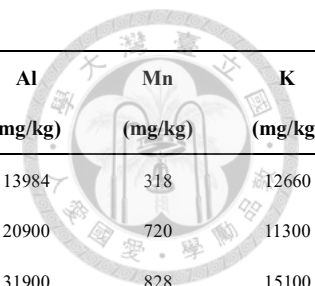
Table 1. The primer sequence of nematode identification.

Primer Name	Sequence (5'- 3')	Reference
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	(Zheng <i>et al.</i> , 2000)
AB28	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT	(Zheng <i>et al.</i> , 2000)
NF1	GGT GGT GCA TGG CCG TTC TTA GTT	(Porazinska <i>et al.</i> , 2009)
18Sr2b	TAC AAA GGG CAG GGA CGT AAT	(Porazinska <i>et al.</i> , 2009)
MF	GGG GAT GTT TGA GGC AGA TTT G	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
MR	AAC CGC TTC GGA CTT CCA CCA G	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Me-F	AAC TTT TGT GAA AGT GCC GCT G	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Me-R	TCA GTT CAG GCA GGA TCA ACC	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Mi-F	GTG AGG ATT CAG CTC CCC AG	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Mi-R	ACG AGG AAC ATA CTT CTC CGT CC	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Fjav	GGT GCG CGA TTG AAC TGA GC	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
Rjav	CAG GCC CTT CAG TGG AAC TAT AC	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
SSU18A	AAA GAT TAA GCC ATG CAT G	(Blaxter & Robertson, 1998)
SSU26R	CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG	(Blaxter & Robertson, 1998)
D2A	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	(De Ley <i>et al.</i> , 2005)
D3B	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA	(De Ley <i>et al.</i> , 2005)

表二、土壤樣本性質。

Table 2. Soil properties.

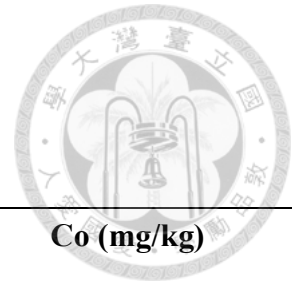
Sample name	Location (GPS coordination)	Crop	Texture	pH	EC ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	Cr (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Ca/Mg	Fe (mg/kg)	Al (mg/kg)	Mn (mg/kg)	K (mg/kg)
SR1	(23° 42'41.2"N, 121° 24'41.8"E)	Rice	Silty clay loam	6.81	792	864	675	16207	11400	1.42	43829	16593	752	6223
SR2	(23° 02'06.8"N, 121° 11'19.6"E)	Rice	Clay	6.90	1209	697	675	14838	8300	1.79	43535	14299	823	2131
SR3	(23° 02'12.8"N, 121° 11'22.0"E)	Rice	Clay	6.61	413.1	501	357	8781	8200	1.07	54230	17920	898	3722
SB1	(23° 42'37.5"N, 121° 24'43.0"E)	Banana	Loam	7.25	818.3	400	281	14140	12250	1.15	38570	10027	721	7064
SB2	(23° 01'52.2"N, 121° 11'34.1"E)	Banana	Sandy clay loam	6.51	560.3	1250	881	-	-	-	40600	-	739	-
SB3	(23° 02'02.4"N, 121° 11'35.4"E)	Banana	Clay	6.69	307.5	492	232	4950	7100	0.70	48041	22633	738	2762
SF1	(23° 02'17.4"N, 121° 11'57.6"E)	Forest	Clay	6.51	345.0	3097	2399	2990	13500	0.22	111000	10300	1580	2762
SF2	(23° 02'14.4"N, 121° 12'01.5"E)	Forest	Clay	7.01	229.1	3967	2095	6380	7800	0.82	107000	15700	2050	1786
SF3	(23° 02'10.1"N, 121° 12'07.6"E)	Forest	Sandy clay loam	6.61	413.1	2329	2630	2054	8900	0.23	79951	6797	1257	1517
GR1	(23° 05'31.9"N, 121° 13'07.3"E)	Rice	Clay loam	6.28	703.0	98	51	2402	-	-	35000	24800	235	16700
GR2	(23° 05'30.8"N, 121° 13'09.1"E)	Rice	Clay loam	6.62	1323.0	108	47	2634	-	-	32900	27700	234	17300
GR3	(23° 04'59.2"N, 121° 12'36.4"E)	Rice	Clay	6.99	627.7	97	46	2706	9453	0.29	35400	31000	314	18500
GR4	(24° 39'45.6"N, 121° 39'12.9"E)	Rice	Clay loam	7.08	350.0	139	44	9853	-	-	25300	18200	259	10000
GR5	(24° 39'45.7"N, 121° 39'11.8"E)	Rice	Silty clay	7.42	434.7	127	48	12700	-	-	28500	20800	259	9645
GR6	(24° 39'47.3"N, 121° 39'14.5"E)	Rice	Clay loam	6.59	536.9	150	57	14700	-	-	30700	20900	720	9534
GB1	(24° 42'37.2"N, 121° 24'42.2"E)	Banana	Clay loam	6.15	843.4	173	91	5220	7600	0.69	36344	17308	766	12675
GB2	(24° 53'19.8"N, 121° 32'27.1"E)	Banana	Silty loam	7.52	328.5	121	55	17100	-	-	32100	20800	773	13400
GB3	(24° 53'16.1"N, 121° 32'27.4"E)	Banana	Loam	8.00	221.1	217	53	12600	8646	1.46	33600	26800	830	14000
GB4	(24° 53'24.9"N, 121° 32'31.1"E)	Banana	Loam	7.88	302.1	82	47	29700	-	-	29800	19100	274	11100



Sample name	Location (GPS coordination)	Crop	Texture	pH	EC ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	Cr (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Ca/Mg	Fe (mg/kg)	Al (mg/kg)	Mn (mg/kg)	K (mg/kg)
GF1	(23 ° 02'14.5"N, 121 ° 11'53.3"E)	Forest	Silty clay	5.25	663.5	106	58	2335	-	-	31889	13984	318	12660
GF2	(23 ° 58'04.3"N, 121 ° 32'57.9"E)	Forest	Loam	7.78	363.1	110	57	22800	-	-	30700	20900	720	11300
GF3	(23 ° 57'58.5"N, 121 ° 32'51.9"E)	Forest	Clay loam	5.09	606.2	137	52	1833	-	-	34300	31900	828	15100
GF4	(23 ° 57'51.8"N, 121 ° 32'45.0"E)	Forest	Silty clay loam	5.06	417.3	131	43	1605	8159	0.20	29600	14800	585	10900

採集之 23 個樣本土壤質地、酸鹼度、電導度及鎳與鉻總含量。蛇紋岩土壤為 SR1~SF3。非蛇紋岩土壤為 GR1~GF4。

The soil texture, pH, EC, and concentration of nickel and chromium of 23 collected soil. SR1 to SF3 were serpentine soil, and GR1 to GF4 were general soil.



表三、土壤中金屬可交換態濃度

Table 3. The concentration of exchange metal in soil

	Sample Name	Ni (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Co (mg/kg)
F1	SF1	921	434	1223	161
	SF2	-	43	27	22
F2	SF1	503	66	1171	156
	SF2	257	95	867	108

F1 為酸可溶及可交換態 (Acid-exchangeable fraction)，F2 為可還原態 (Reduction fraction)。

SF1 及 SF2 皆為蛇紋岩森林土壤

F1 is acid-exchangeable fraction and F2 is reduction fraction. Both SF1 and SF2 are the serpentine forest soil.



表四、各樣品定序資訊

Table 4. Sequencing information of each sample.

Sample Name	Raw PE (#)	Raw Tags (#)	Clean Tags (#)	Effective Tags (#)	OTU	Q20	Q30
GB1	90,981	80,374	77,889	76,799	4623	99.42	97.21
GB2	116,285	101,729	98,575	97,911	4471	99.46	97.3
GB3	95,105	83,363	80,992	80,567	4001	99.44	97.22
GB4	94,863	83,147	80,784	80,255	4303	99.44	97.26
GF1	132,550	116,271	112,764	111,187	2860	99.44	97.29
GF2	99,112	87,371	84,844	84,233	4265	99.46	97.34
GF3	112,203	98,391	95,635	94,541	3433	99.46	97.35
GF4	109,735	96,167	93,420	92,673	2837	99.44	97.28
GR1	121,717	108,355	105,094	103,949	4851	99.44	97.3
GR2	113,415	101,154	98,197	97,131	5108	99.44	97.33
GR3	131,802	115,923	112,458	111,139	5226	99.42	97.25
GR4	122,188	108,564	105,357	104,304	5413	99.45	97.34
GR5	101,382	89,824	87,047	86,119	5118	99.44	97.32
GR6	107,553	95,076	92,264	91,904	5137	99.46	97.38
SB1	85,166	74,472	72,057	71,372	4454	99.4	97.12
SB2	115,446	100,479	97,476	96,119	3816	99.43	97.22
SB3	119,645	105,074	101,702	100,505	4572	99.41	97.17
SF1	96,256	84,196	81,514	80,738	2713	99.42	97.16
SF2	99,286	87,370	84,797	83,949	3209	99.42	97.24
SF3	83,918	73,336	71,045	70,326	2730	99.41	97.19
SR1	77,209	69,229	67,198	66,526	4713	99.4	97.2
SR2	108,254	95,288	92,385	91,461	4032	99.4	97.2
SR3	112,062	97,918	94,799	93,851	4832	99.4	97.2

Raw PE 表示原始下機的 PE reads，拼接得到 Raw Tags，Clean Tags 則是過濾低品質和短長度後的序列，而去除嵌合體後用於後續分析的 Effective Tags。Q20 和 Q30 是指 Effective Tags 中鹼基 Q 值大於 20 (定序錯誤率小於 1%) 和 30 (定序錯誤率小於 0.1%) 的鹼基所佔的百分比。

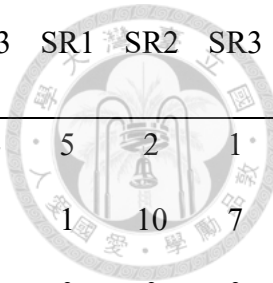
Raw PE means the original off-machine PE reading, and after splitting obtain Raw Tags. Clean Tags refers to the sequence after filtering with low quality and short length, and remove the substitute is Effective Tags. The percentage of the length of the string Q value greater than 20 (sequencing error rate less than 1%) and 30 (sequencing error rate less than 0.1%).

表五、各樣品線蟲種類及數量累積表

Table 5. The nematode family and number accumulation in each sample.



Family	c-p value	GB2	GB3	GB4	GF2	GF3	GF4	GR4	GR5	GR6	SB1	SB2	SB3	SF1	SF2	SF3	SR1	SR2	SR3
Achromadoridae	3	0	0	0	2	0	0	0	3	7	0	9	0	0	0	0	1	1	0
Actinolaimidae	5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	0
Aphelenchoididae	2	10	12	5	32	19	5	0	0	0	9	0	9	0	0	4	0	0	0
Anguinae	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Belonolaimidae	2	9	0	0	3	16	0	0	0	0	6	1	0	0	0	3	3	1	1
Cephalobidae	2	15	40	13	82	62	26	0	5	6	18	13	13	7	30	22	0	1	2
Dolichodoridae	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dorylamidae	4	4	4	2	1	14	0	0	23	22	7	0	0	0	1	3	2	7	0
Hoplolaimidae	3	0	9	0	0	13	37	0	0	0	5	2	5	12	34	0	0	0	0
Leptolaimidae	3	3	3	0	5	8	4	1	3	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0
Meloidogynidae	3	0	5	10	0	7	6	16	8	120	3	2	3	5	1	0	0	4	0
Monhysteridae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	4	1	0	0	0	23
Mononchidae	4	3	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	12	2	0	0	0	0



Family	c-p value	GB2	GB3	GB4	GF2	GF3	GF4	GR4	GR5	GR6	SB1	SB2	SB3	SF1	SF2	SF3	SR1	SR2	SR3
Panagrolaidae	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	24	5	2	1
Pratylenchidae	3	0	10	0	0	0	0	2	15	11	0	0	0	0	0	1	1	10	7
Qudisianematidae	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		0	0	0
Rhabditidae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	10	0
Rhabdolaimidae	3	2	9	2	29	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thornenematidae	5	0	0	0	0	0	1	0	14	1	0	0	0	0	0	3	0	0	13
Tripylidae	3	0	0	5	16	37	3	18	0	0	0	0	1	0	39	0	0	0	0
Trischistomatidae	3	0	0	1	1	10	10	0	0	0	4	0	10	0	7	0	0	0	0
Tylenchidae	2	0	0	0	2	10	34	0	0	0	29	2	5	4	0	1	0	1	0
Unknown	-	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	-	55	92	38	175	202	130	52	71	176	86	32	62	69	115	61	16	43	47

透過型態及分子鑑定確認每一隻線蟲物種，該表為科層級之分類，每科線蟲有相對應的 cp-value (Bongers, 1990)，其為計算成熟度之數值。

Confirm each nematode species through type and molecular identification. The table is a classification of family level. Each family nematode has a corresponding cp-value, which is the value for calculating maturity.



表六、根瘤線蟲 S 二齡幼蟲量測。

Table 6. Measurement of *Meloidogyne* sp. S J2s.

	第曼公式(de Manian formula)	Value
L	線蟲體長	360- 460 (μm)
a	線蟲體長/線蟲最大體寬	22.5- 33.85
b	線蟲體長/線蟲頭部至食道長	5.44- 9.02
b'	線蟲體長/線蟲頭部至背食道腺終端	9.56- 22.11
c	線蟲體長/尾長	16.25- 43.00
c'	線蟲尾長/肛門處體寬	2.17- 5.00
K	線蟲最大體寬	12- 16 (μm)
S2	口針長	11- 16 (μm)

依據第曼公式所計算之指標，量測值為 30 隻二齡幼蟲之平均。

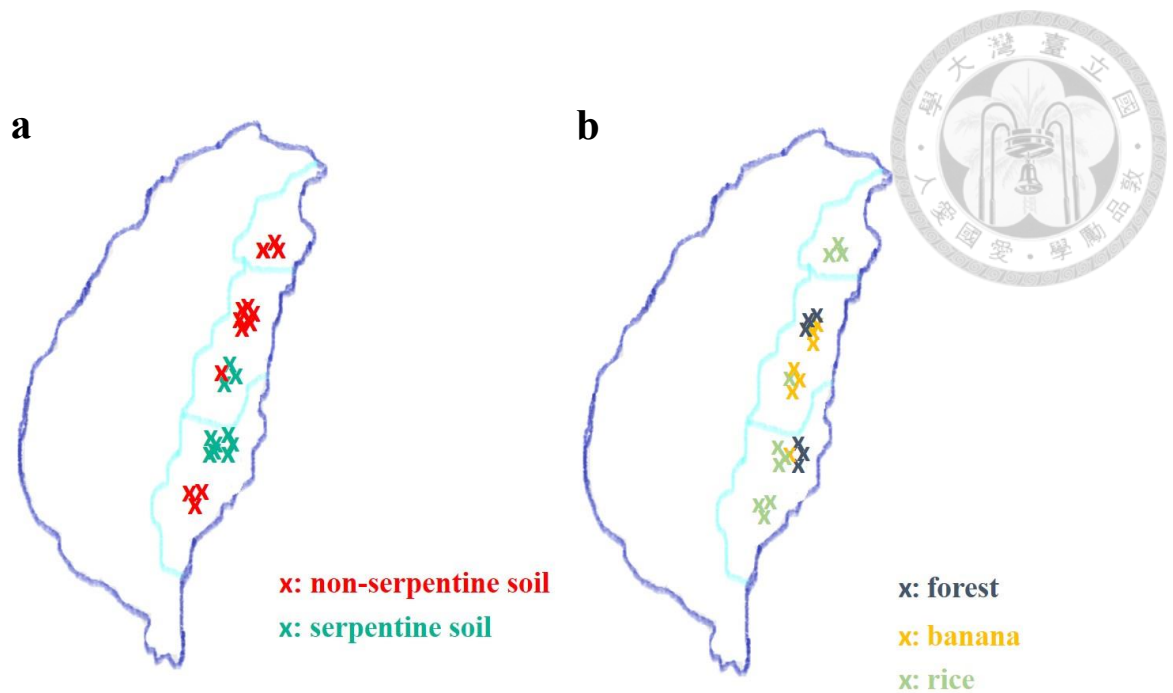
The index were calculated 30 J2s according to de Manian formula.



表七、18S, ITS, SSU 區段定序結果。

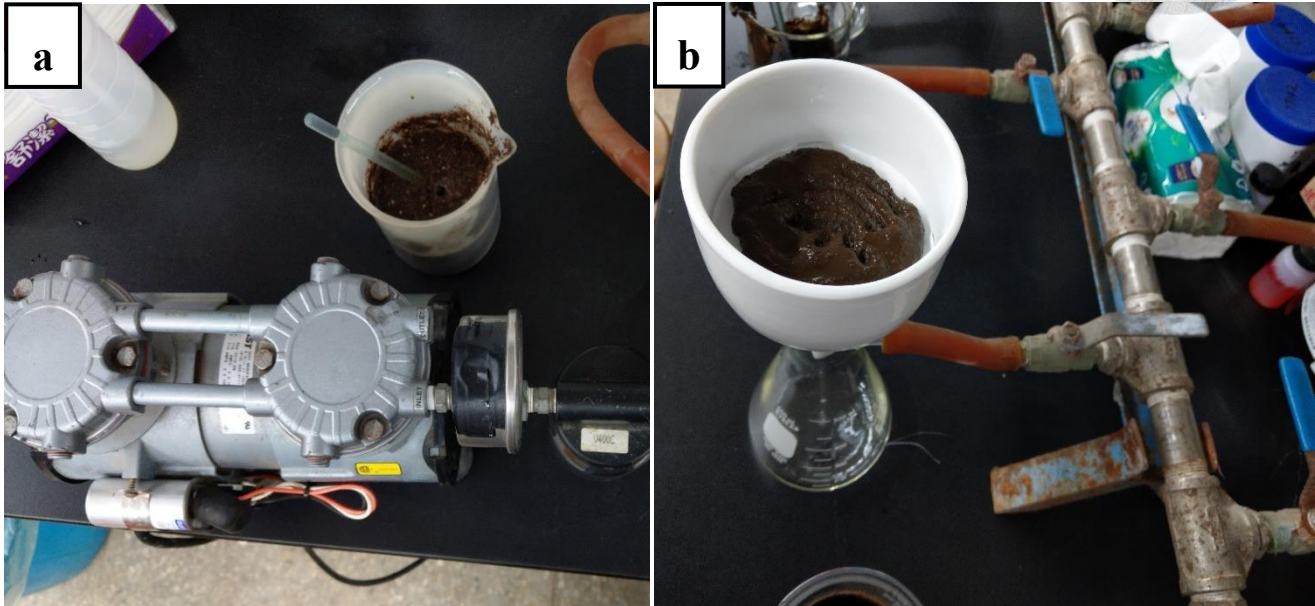
Table 7. The region of 18S, SSU and ITS sequencing.

18S	LSU	ITS
<i>M. incognita</i> 99.47%	<i>M. luci</i> 98.47%	<i>M. incognita</i> 99.82%
<i>M. polycephannulata</i> 99.47%	<i>M. javanica</i> 98.55%	<i>M. arenaria</i> 99.82%
<i>M. javanica</i> 99.47%	<i>M. ethiopica</i> 98.36%	<i>M. javanica</i> 99.82%
<i>M. konaensis</i> 99.34%	<i>M. incognita</i> 97.92%	<i>M. konaensis</i> 99.64%
<i>M. morocciensis</i> 99.34%	<i>M. haplanaria</i> 97.57%	<i>M. polycephannulata</i> 99.64%
<i>M. luci</i> 99.34%	<i>M. enterolobii</i> 97.76%	<i>M. hispanica</i> 99.28%
<i>M. arenaria</i> 99.21%	<i>M. arenaria</i> 97.09%	
<i>M. paranaensis</i> 99.21%		
<i>M. phaseoli</i> 99.08%		
<i>M. lopezi</i> 99.08%		
<i>M. paranaensis</i> 98.82%		
<i>M. arabicida</i> 98.81%		
<i>M. izalcoensis</i> 98.81%		



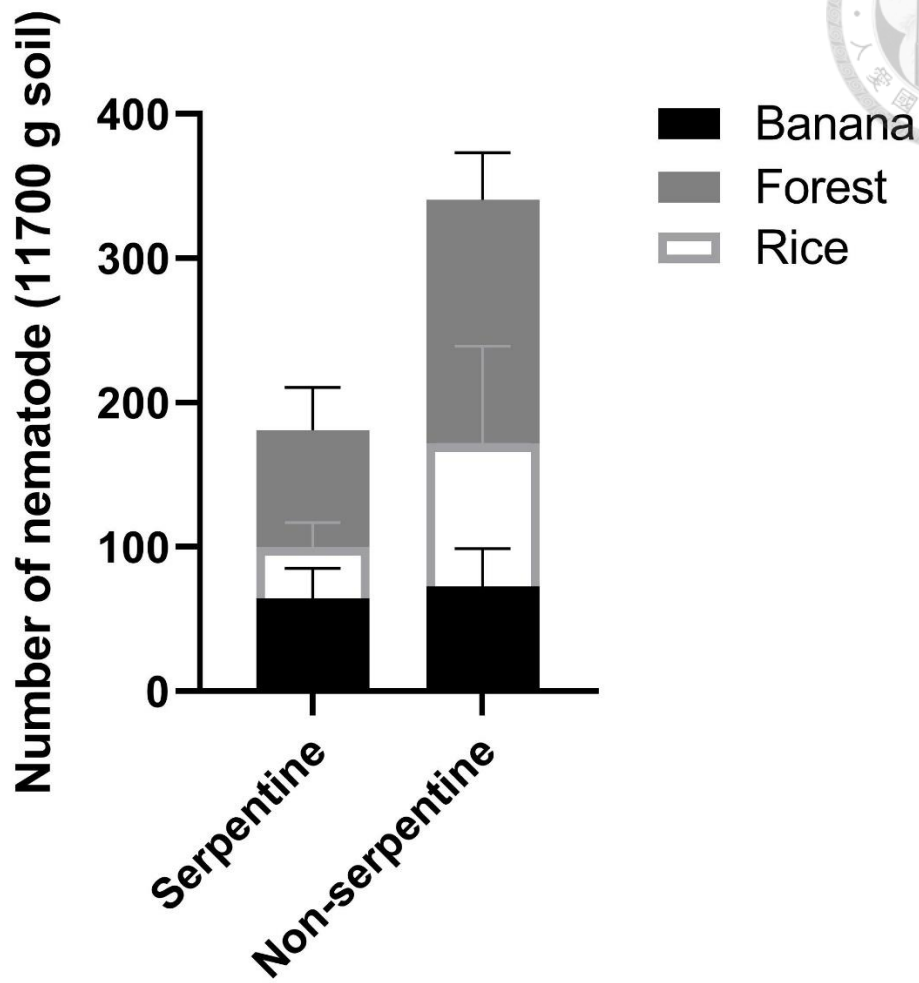
圖一、土壤樣本採集點示意圖。a 以土壤區分，包含蛇紋岩土壤 (serpentine soil) 及非蛇紋岩土壤 (non-serpentine soil)，b 以植被區分，包含森林，香蕉及水稻田土。

Figure 1. Collecting area. a is including serpentine soil and non-serpentine soil; b is including forest, banana and rice farms.



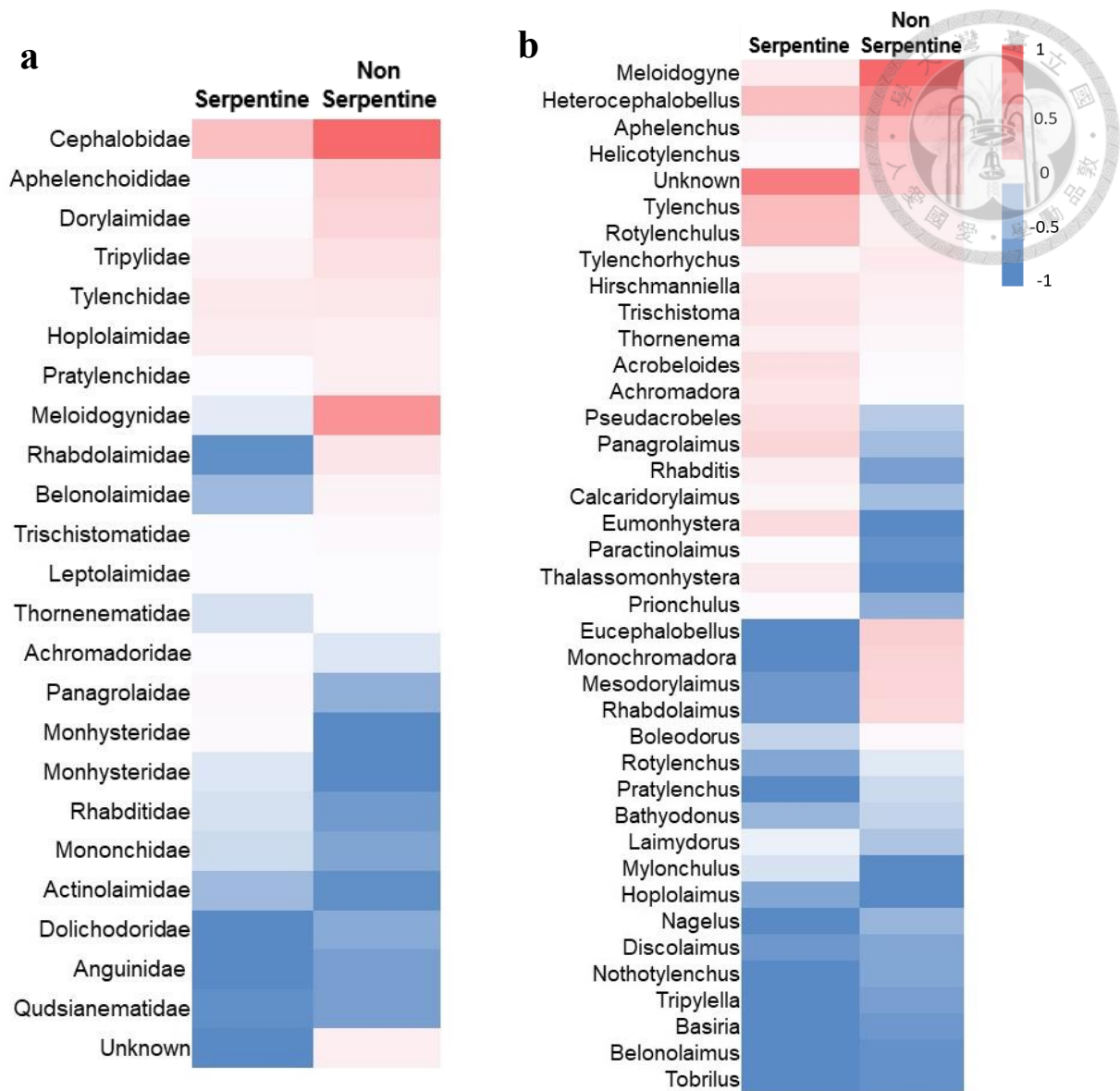
圖二、幫浦及布氏漏斗裝置示意圖。測定 EC 值試驗中用以收集濾液之裝置。a 為幫浦；b 為布氏漏斗。

Figure 2. The picture of pump and Bucher funnel. The equipment was used to collect filtrate in measuring EC experiment. a is pump; b is Bucher funnel



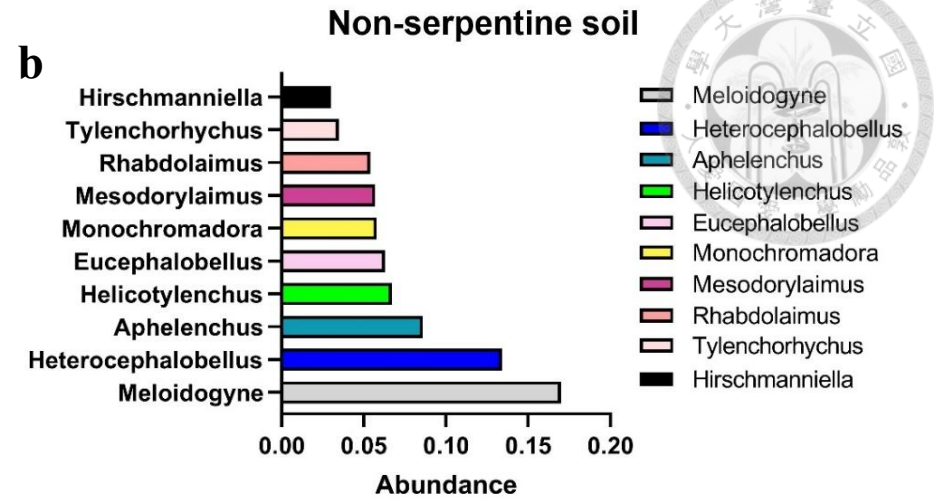
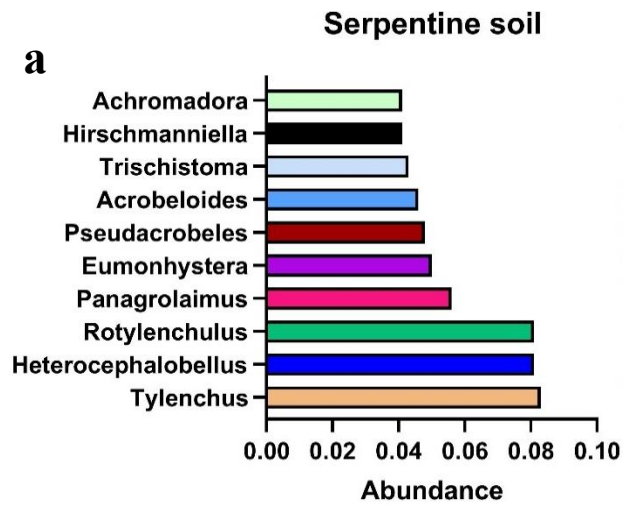
圖三、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤之線蟲數量累積圖。

Figure 3. The accumulation number of nematodes from serpentine soil and non-serpentine soil.



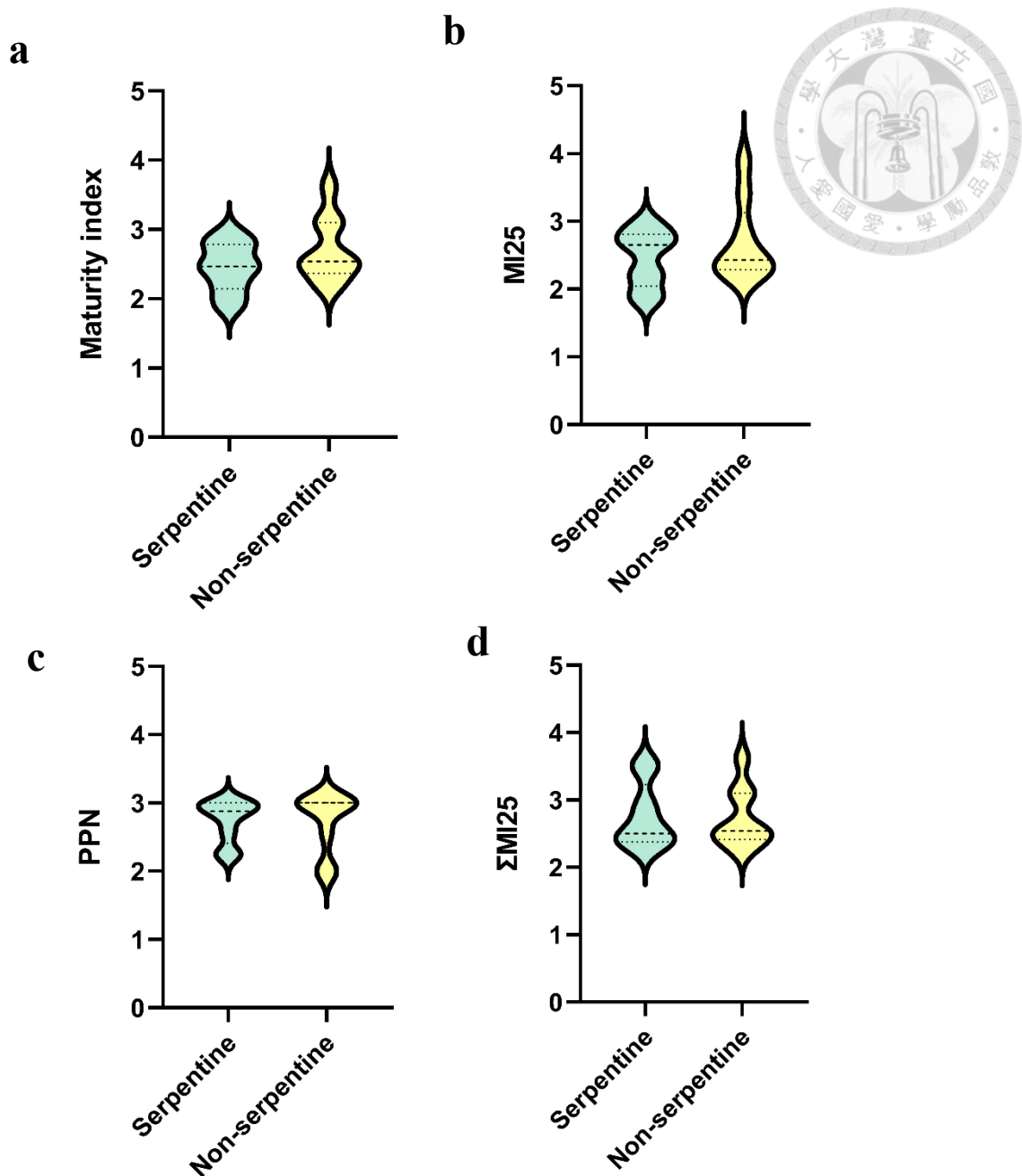
圖四、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中線蟲種類熱圖分析。不同物種間豐度相互比較，以不同顏色呈現相對豐度，紅色表示相對豐度最高，藍色則為相對豐度最低。a 圖為科的層級，b 圖為屬的層級。

Figure 4. Heat map of nematode genus or family was isolated from serpentine soil or non-serpentine soil. Grouping by soil type, then compare abundance to different species. Showing the relative abundance by different color, red is highest abundance, and blue is lowest abundance. a: the level of family, b: the level of genus.



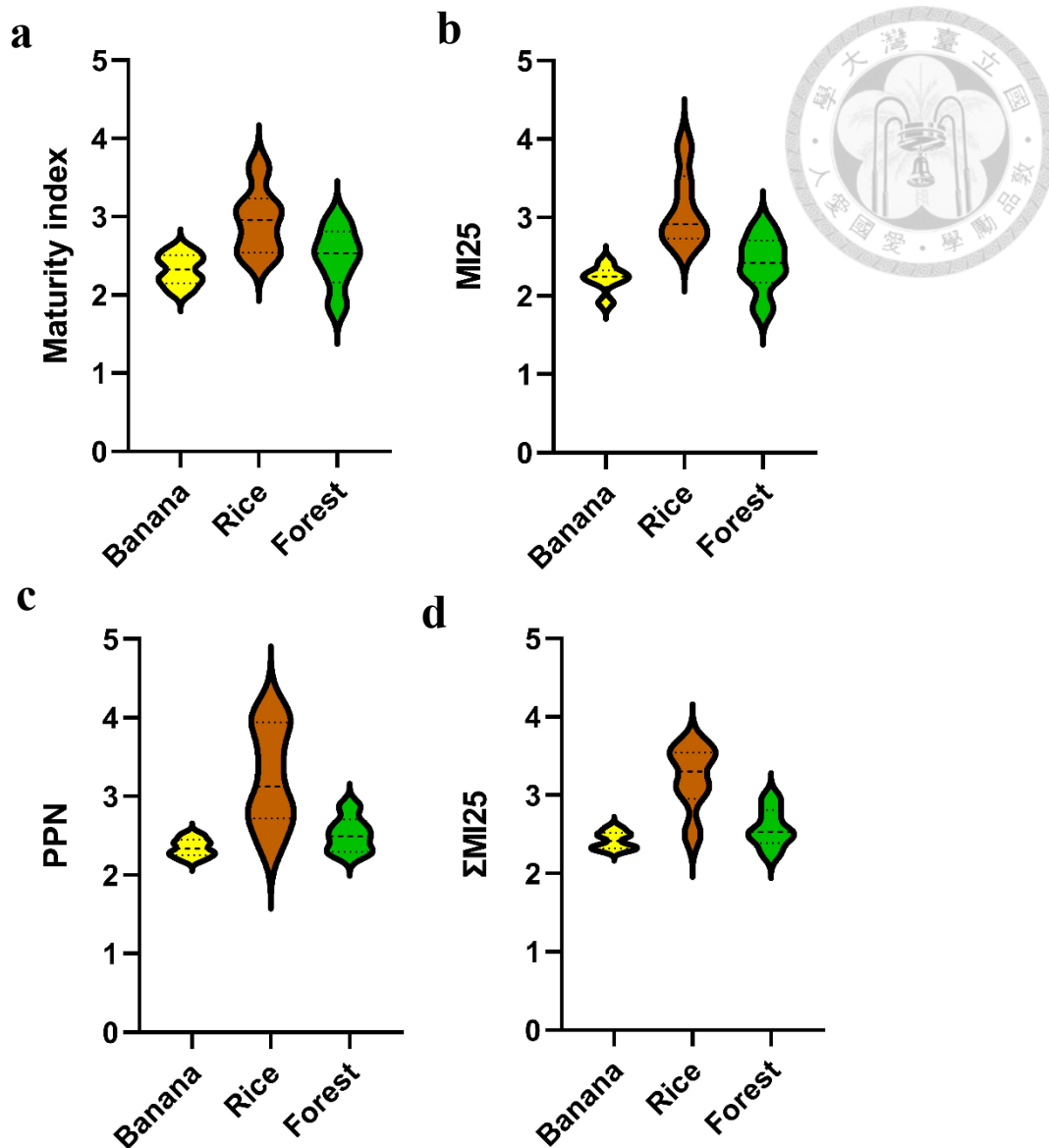
圖五、蛇紋岩土壤及非蛇紋岩土壤中數量前十的線蟲屬別。所有分離出的線蟲經過鑑定統計後，根據兩種不同土壤分組，依照相對豐度進行排序，圖為前十個出現頻率高的屬。a 圖為蛇紋岩土壤，b 圖為非蛇紋岩土壤。

Figure 5. Top ten genera were isolated from serpentine soil or non-serpentine soil. After all the isolated nematodes were identified and counted, grouping them according to two different soils and sorted relative abundance to obtain the top ten genera with high frequency. a: serpentine soil, b: non-serpentine soil



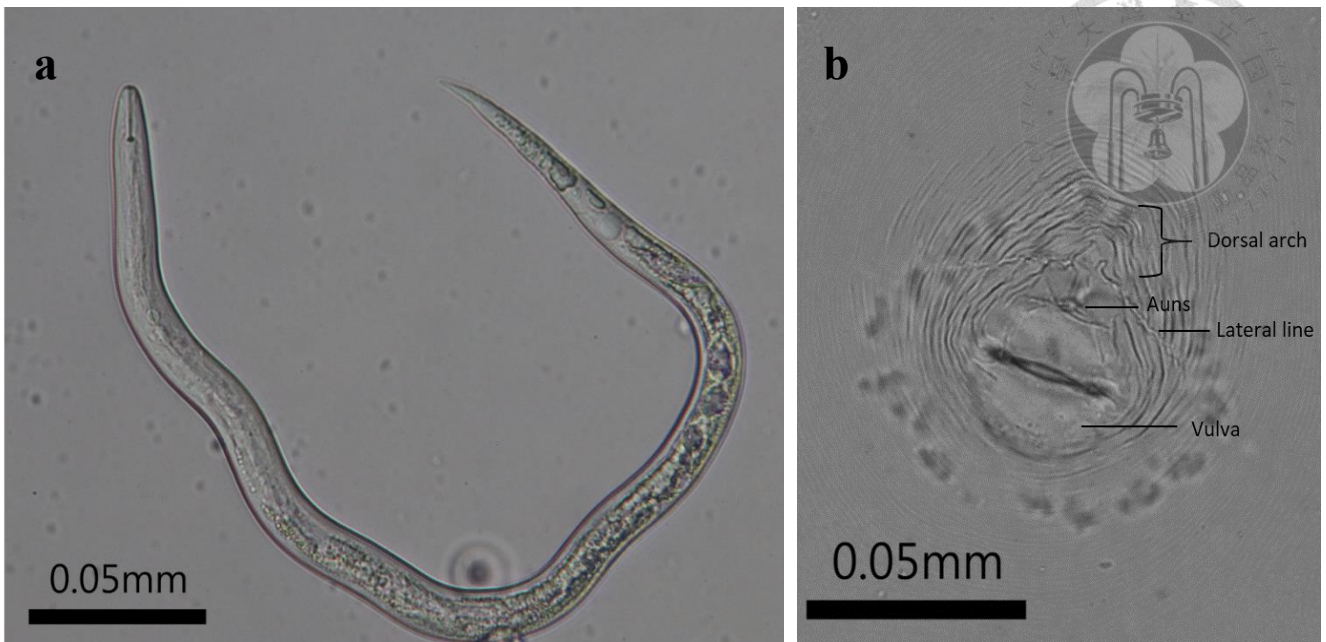
圖六、不同土壤類別之線蟲成熟度指標。a 為僅分析腐生性線蟲，b 為腐生性線蟲，不包含 cp-1，c 為僅分析植食性線蟲，d 為所有線蟲，但不包含 cp-1。每張圖結果皆經過 one-way ANOVA 計算顯示組間無差異。

Figure 6. The maturity index of nematode in different soil. a: only free-living nematode, b: only free-living nematode, excluding cp-1, c: only plant-parasitic nematode, d: both free-living and plant-parasitic nematode, but excluding cp-1.



圖七、不同植被環境中線蟲成熟度指標。a 為僅分析腐生性線蟲，b 為腐生性線蟲，不包含 cp-1，c 為僅分析植食性線蟲，d 為所有線蟲，但不包含 cp-1。每張圖結果皆經過 one-way ANOVA 計算顯示組間有差異。

Figure 7. The maturity index of nematode in different soil. a: only free-living nematode, b: only free-living nematode, excluding cp-1, c: only plant-parasitic nematode, d: both free-living and plant-parasitic nematode, but excluding cp-1. Each result has significantly difference by one-way ANOVA test.

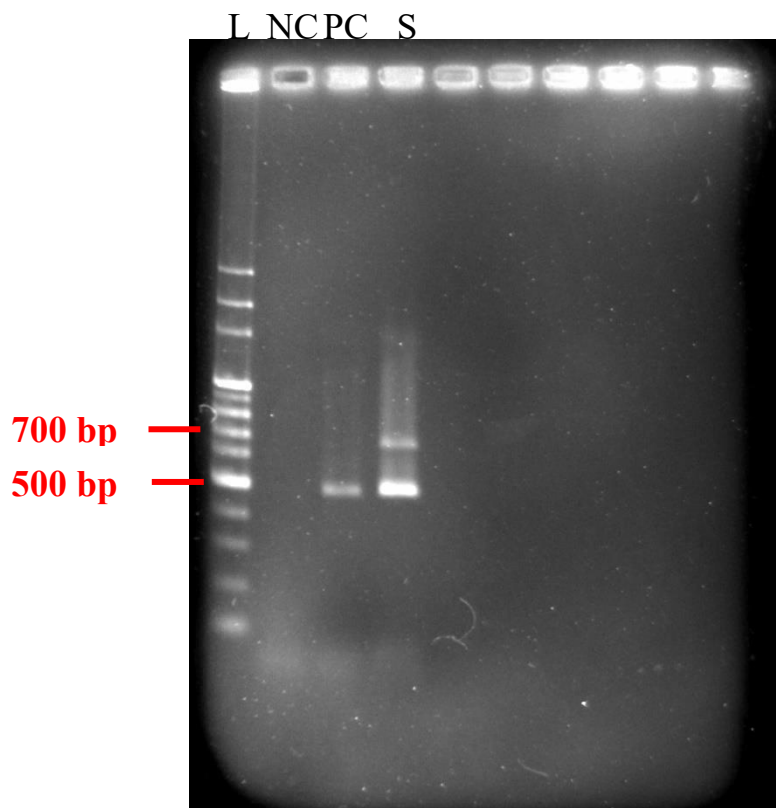


圖八、自蛇紋岩分離之根瘤線蟲 S 二齡幼蟲及陰部膜紋。a 為二齡幼蟲，b 為陰部膜紋。

陰部膜紋有高 dorsal arch 且其側線明顯。

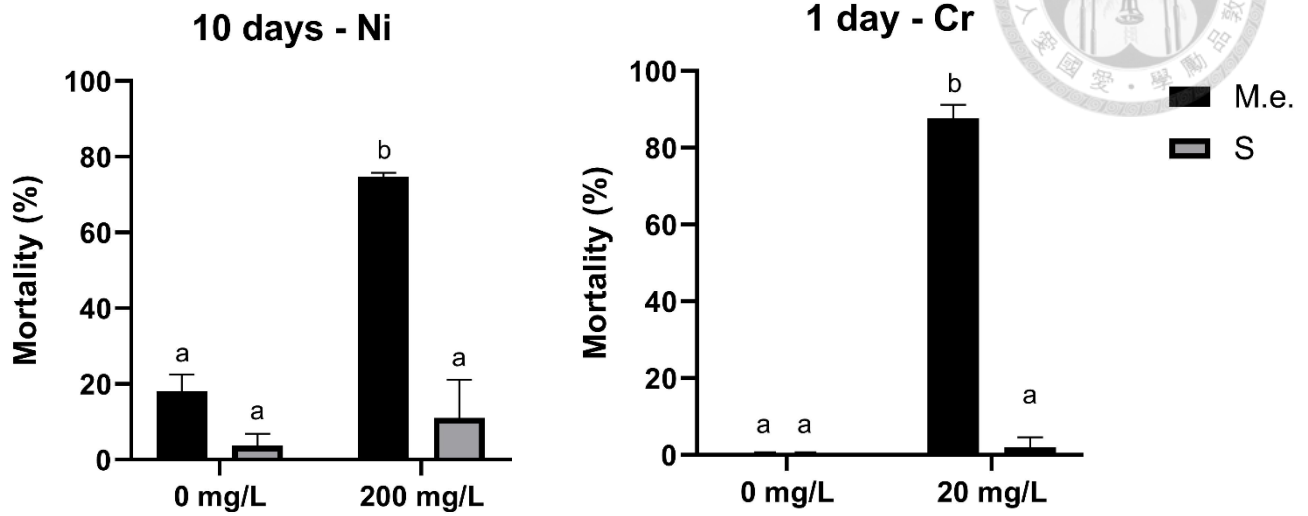
Figure 8. The J2 and perineal pattern of *Meloidogyne* sp. S which was isolated from serpentine soil.

a: J2, b: perineal pattern. The dorsal arch of perineal pattern is high and the lateral line is clear observed.



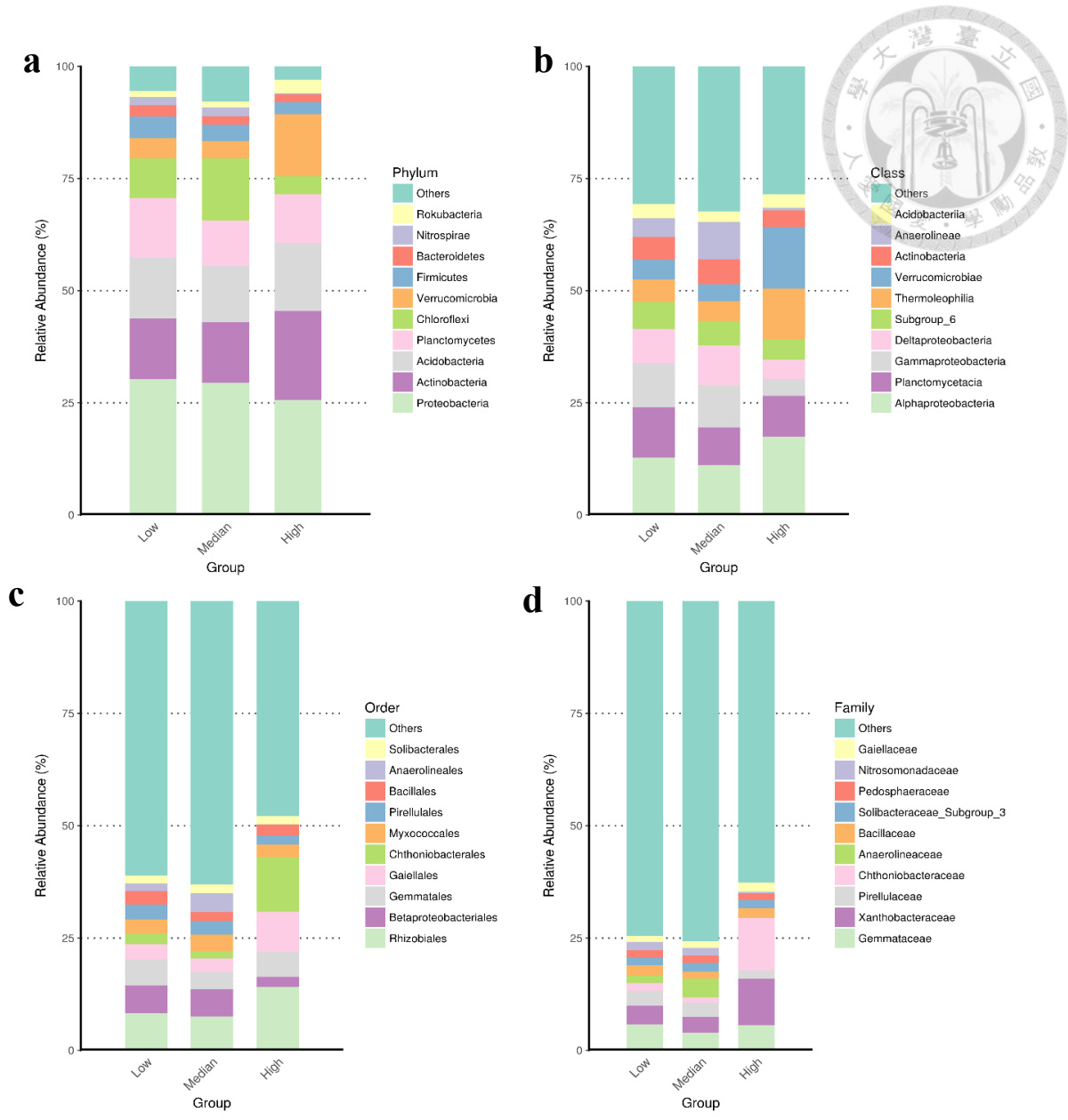
圖九、Multiplex 電泳結果。PCR 引子對 MF/MR、Me-F/Me-R、Mi-F/Mi-R、Fjav/Rjav 之 Multiplex PCR 測試。L: Ladder, C: Positive control, NC: Negative control, S1: *Meloidogyne* sp. S。根瘤線蟲屬的預期片段為：500 bp。*Meloidogyne javanica* 會再額外增幅出預期片段 660 bp。

Figure 9. The gel electrophoresis of multiplex result. Multiplex PCR test by the primer: MF/MR、Me-F/Me-R、Mi-F/Mi-R、Fjav/Rjav. L: Ladder, C: Positive control, NC: Negative control, S: *Meloidogyne* sp. S. The expected fragment of the *Meloidogyne* spp. are 500bp. The fragments 660 bp for *Meloidogyne javanica*.



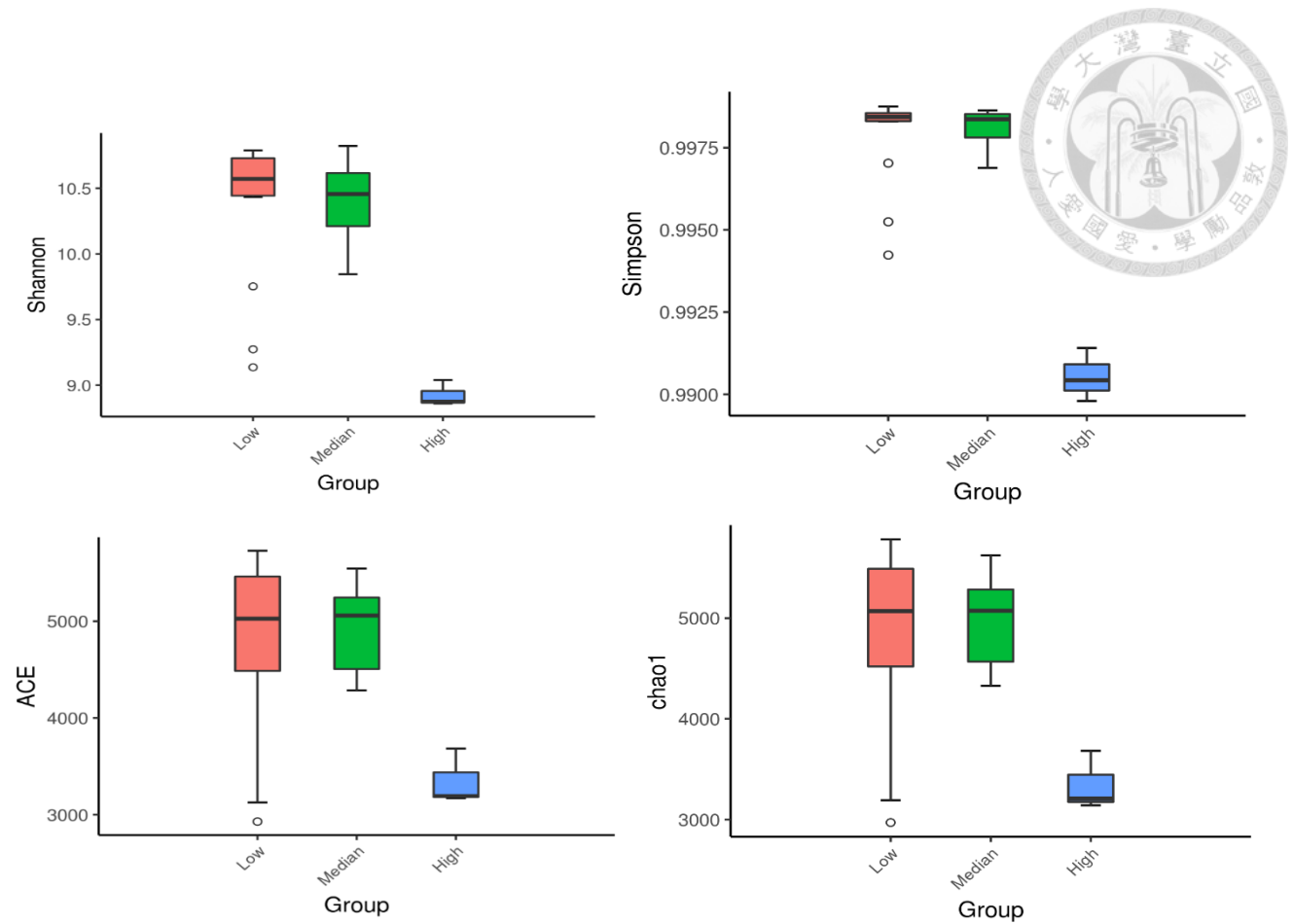
圖十、根瘤線蟲對鎳鉻的耐受性比較。對照組為 0 ppm，試驗組為 200 ppm 鎳溶液及 20 ppm 鉻溶液。每組別 30 隻二齡幼蟲，三重複。不同字母表示具顯著差異組別。(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

Figure 10. Comparing the tolerance of *Meloidogyne* sp. to nickel and chromium. Control was 0 ppm, and the other groups were 200 ppm nickel solution and 20 ppm chromium solution. There were 30 J2s in each group and three replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



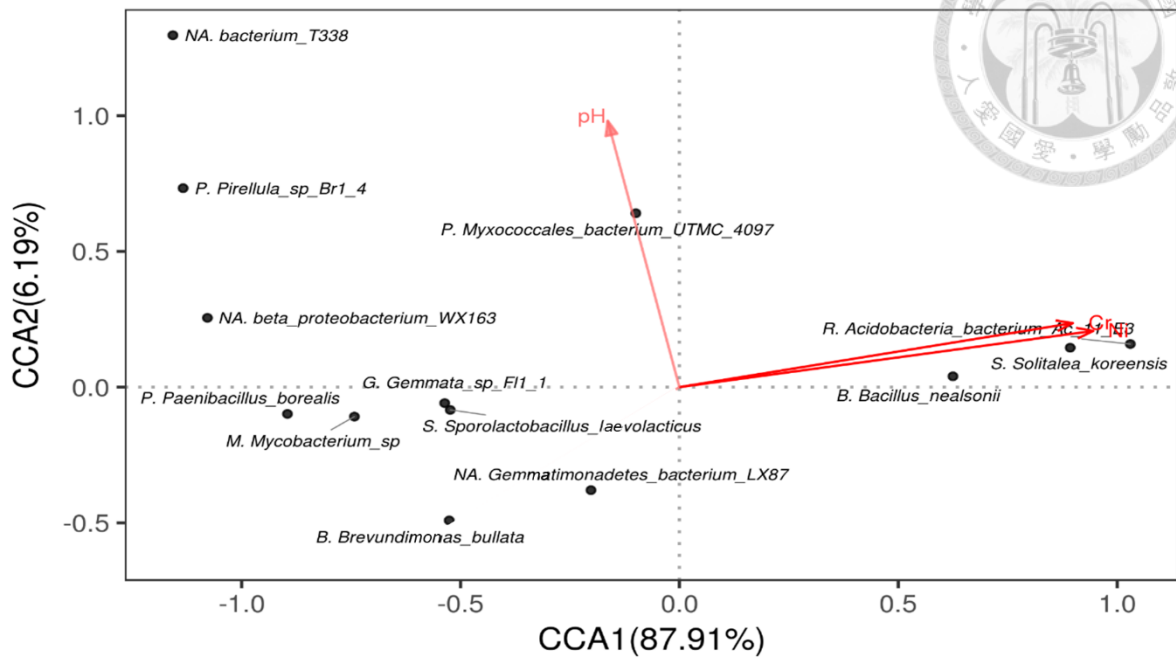
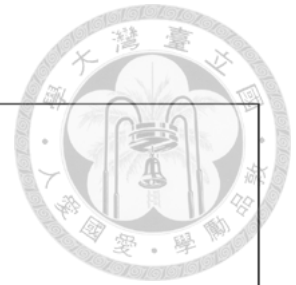
圖十一、土壤中細菌前十高出現頻率比例。統計所有測得的細菌 OTU 序列，根據三種不同金屬濃度分組。Low: 小於 200 mg/kg；Median: 200 mg/kg 及 1000 mg/kg 之間；High: 大於 1000 mg/kg。a 以門為層級，b 以綱為層級，c 以目為層級，d 科為層級。

Figure 11. Top ten families of bacteria from soil. Counting all the measured bacterial OTU sequences, group them according to three different metal concentrations. Low: ≤ 200 mg/kg; Median: 200 mg/kg $< X \leq 1000$ mg/kg; High: $X < 1000$ mg/kg. a is phylum, b is class, c is order and d is family.



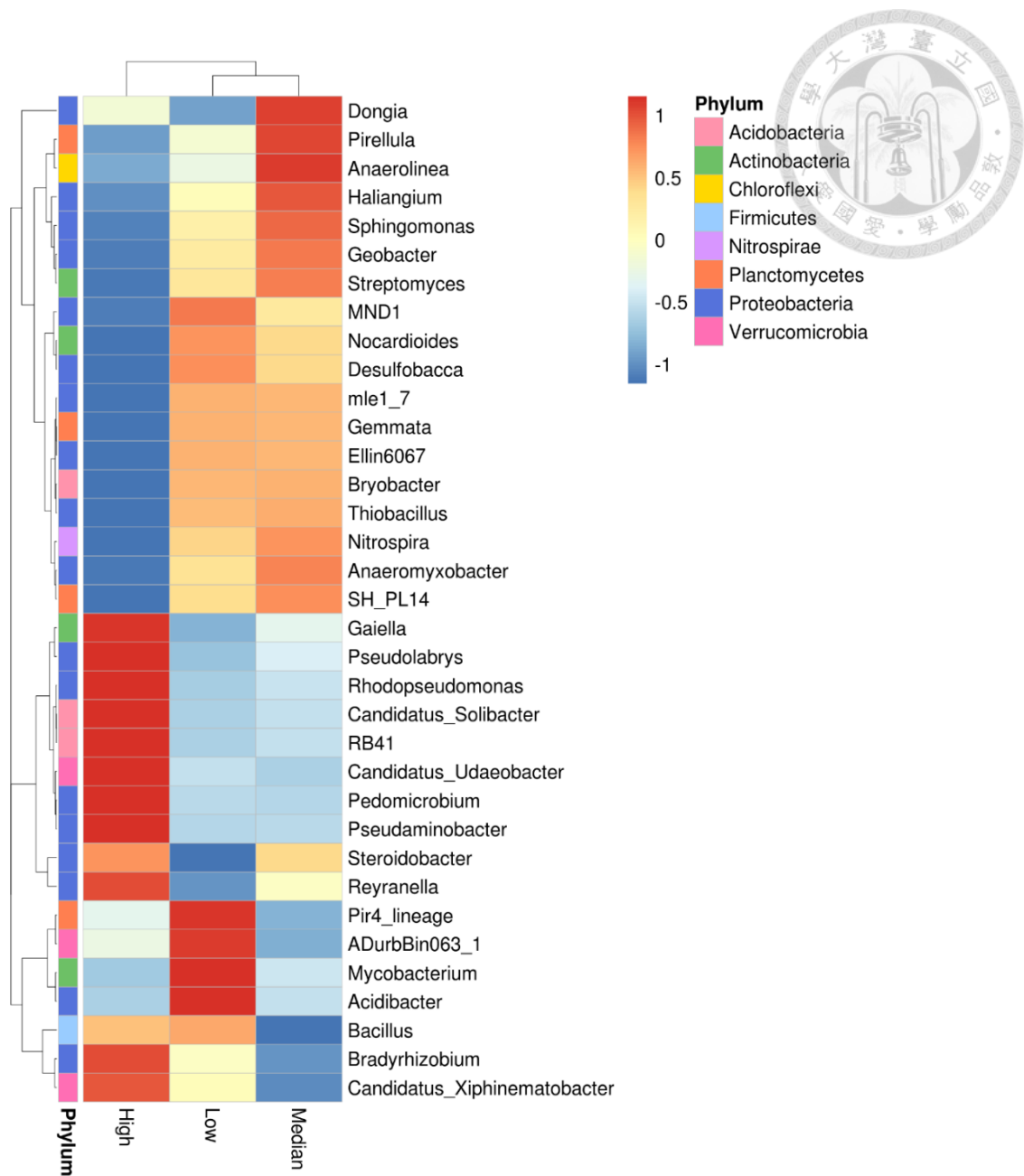
圖十二、土壤細菌物種 Shannon、Simpson、ACE 及 Chao1 多樣性分析。樣本經過標準化，使樣本內 OTU 數量一樣。再根據不同金屬濃度分組。Low: Low: 小於 200 mg/kg；Median: 200 mg/kg 及 1000 mg/kg 之間；High: 大於 1000 mg/kg。

Figure 12. The diversity index of soil bacteria: Shannon index, Simpson index, ACE index and Chao1 index. The OTU numbers are same by standerizing in each sample. Grouping by different concentration. Low: ≤ 200 mg/kg; Median: $200 \text{ mg/kg} < X \leq 1000$ mg/kg; High: $X < 1000$ mg/kg.



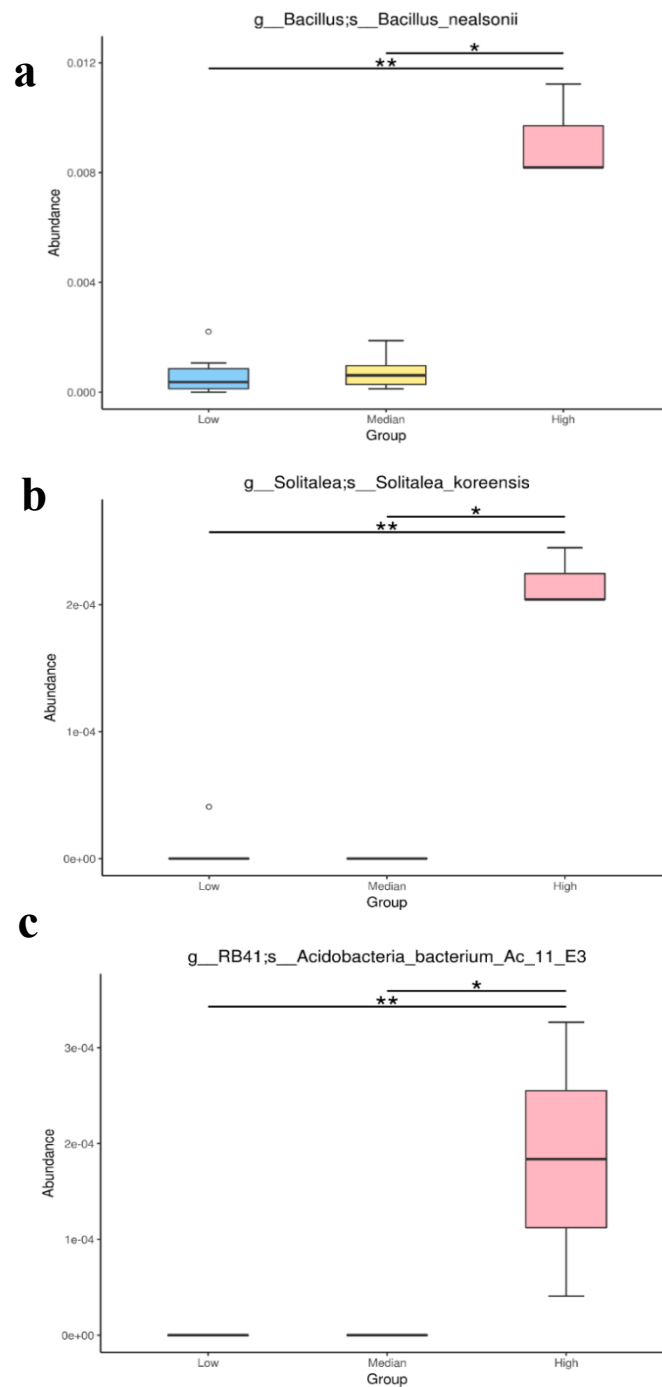
圖十三、CCA 分析細菌群相與環境因子酸鹼度及鎳鉻濃度之相關性。

Figure 13. The correlation by CCA analysis of bacteria and environmental factor pH value and concentration of nickel and chormium



圖十四、熱圖分析土壤中細菌豐度變化。不同組別中細菌的相對豐度變化，以不同顏色呈現相對豐度，紅色表示相對豐度最高，藍色則為相對豐度最低。Low: 小於 200 ppm；Median: 200 ppm 及 1000 ppm 之間；High: 大於 1000 ppm。

Figure 14. The changes of soil bacteria relative abundance in different groups by heat map. Showing the relative abundance by different color, red is highest abundance, and blue is lowest abundance. Low: ≤ 200 ppm; Median: $200 \text{ ppm} < X \leq 1000$ ppm; High: $X < 1000$ ppm.

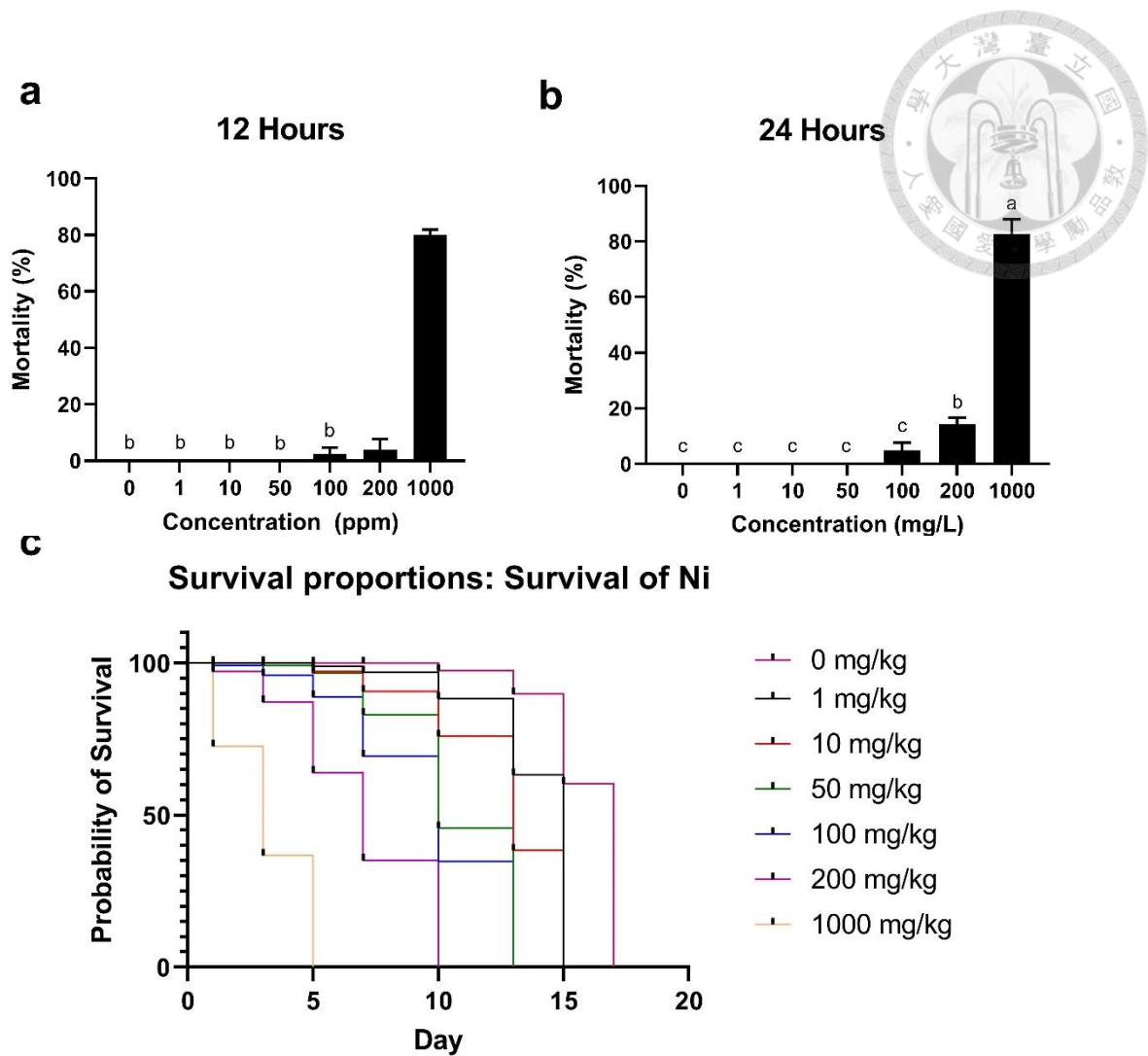


圖十五、與鎳鉻濃度高度正相關性的菌株。a 為 *Bacillus nealsonii*，b 為 *Solitalea koreensis*，c 為 *Acidobacteria bacterium Ac_11_E3*。組別濃度為 Low: 小於 200 ppm；Median: 200 ppm 及 1000 ppm 之間；High: 大於 1000 ppm。

Figure 15. The bacteria had high positive relation to the concentration of nickel and chromium.

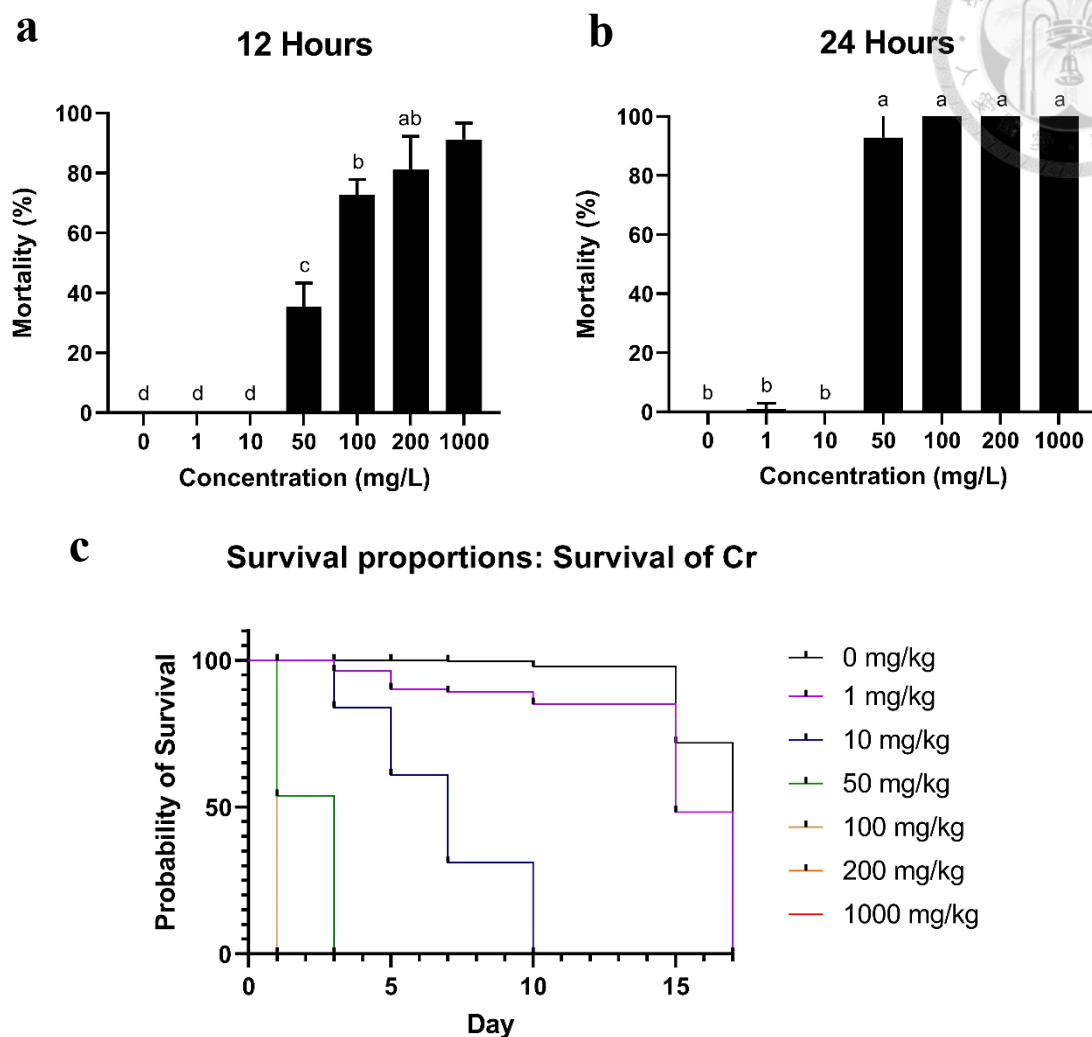
a: *Bacillus nealsonii*, b: *Solitalea koreensis*, c: *Acidobacteria bacterium Ac_11_E3*. The

concentration of group were Low: ≤ 200 ppm; Median: $200 \text{ ppm} < X \leq 1000$ ppm; High: $X < 1000$ ppm.



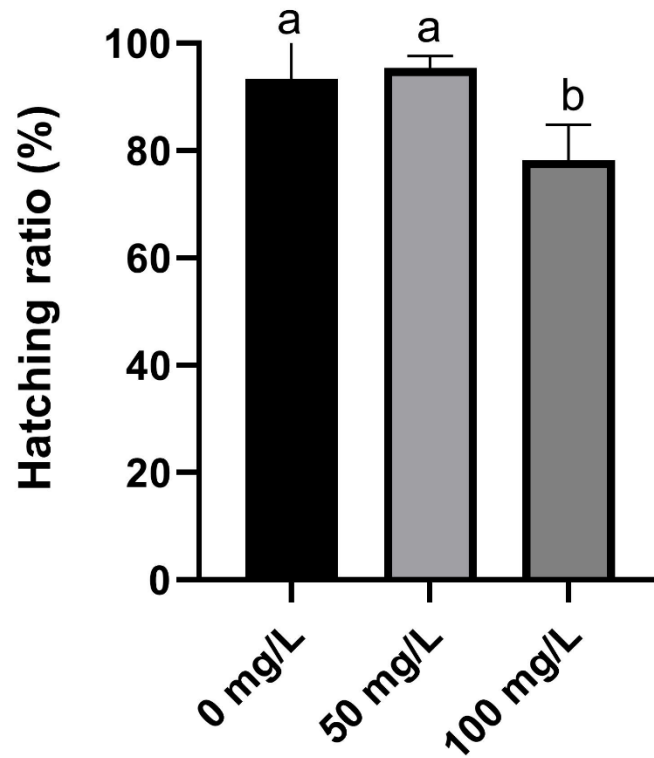
圖十六、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中不同時間點之死亡率。試驗組 1、10、50、100、200、1000 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 30 隻二齡幼蟲，三重複。a 與 b 圖內不同字母表示具顯著差異組別。(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。a 為 12 小時後，b 為 24 小時後，c 為 log-rank 圖，顯示各時間點下存活率。

Figure 16. The mortality of *Meloidogyne enterolobii* in nickel solutions at different time points. The experimental group were 1, 10, 50, 100, 200, 1000 ppm nickel solutions, and control group was 0 ppm. There were 30 J2s in each group and three replications. A significant difference at $p < 0.05$ was *, $p < 0.01$ was **, $p < 0.001$ was ***. a: after 12 hours, b: after 24 hours, c is log-rank figure, indicating the survival ratio at each time.



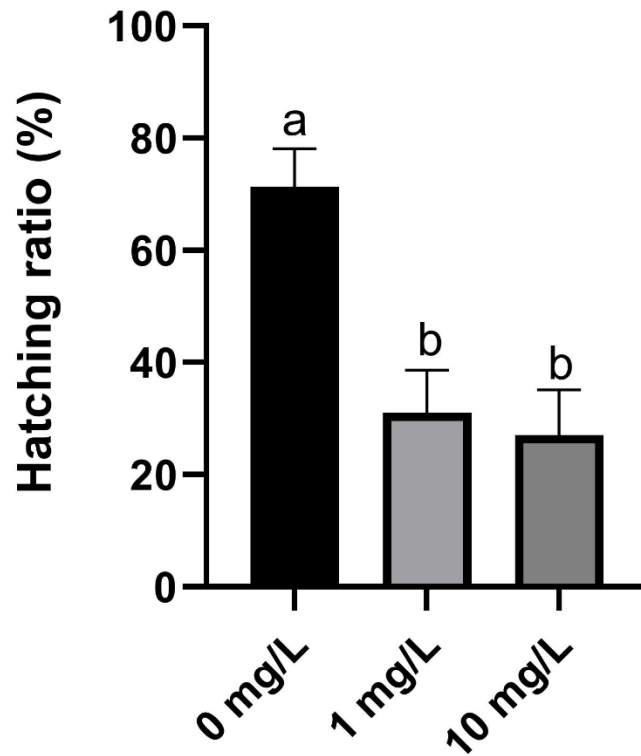
圖十七、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中不同時間點之死亡率。試驗組 1、10、50、100、200、1000 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 30 隻二齡幼蟲，三重複。a 與 b 圖內不同字母表示具顯著差異組別。(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。a 為 12 小時後，b 為 24 小時後，c 為 log-rank 圖，顯示各時間點下存活率。

Figure 17. The mortality of *Meloidogyne enterolobii* in chromium solutions at different time points. The experimental group were 1, 10, 50, 100, 200, 1000 ppm nickel solutions, and control group was 0 ppm. There were 30 J2s in each group and three replications. A significant difference at $p < 0.05$ was *, $p < 0.01$ was **, $p < 0.001$ was ***. a: after 12 hours, b: after 24 hours, c is log-rank figure, indicating the survival ratio at each time.



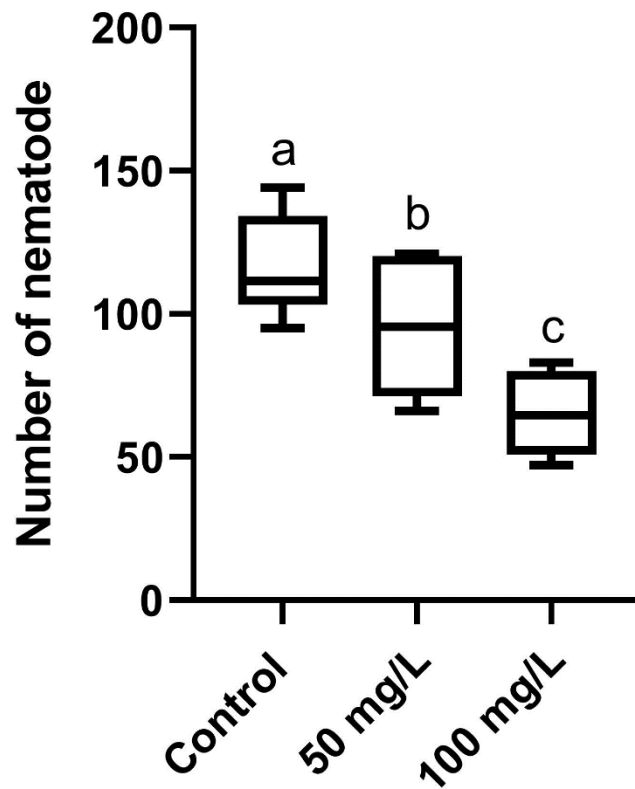
圖十八、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中十天後的卵孵化率。試驗組 50、100 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 50 個卵，五重複。不同字母表示具顯著差異組別。(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

Figure 18. The hatching rate of *M. enterolobii* in nickel solutions after ten days. The experimental group were 50, 100 ppm nickel solutions, and the control group was 0 ppm. There were 50 eggs in each group and five replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



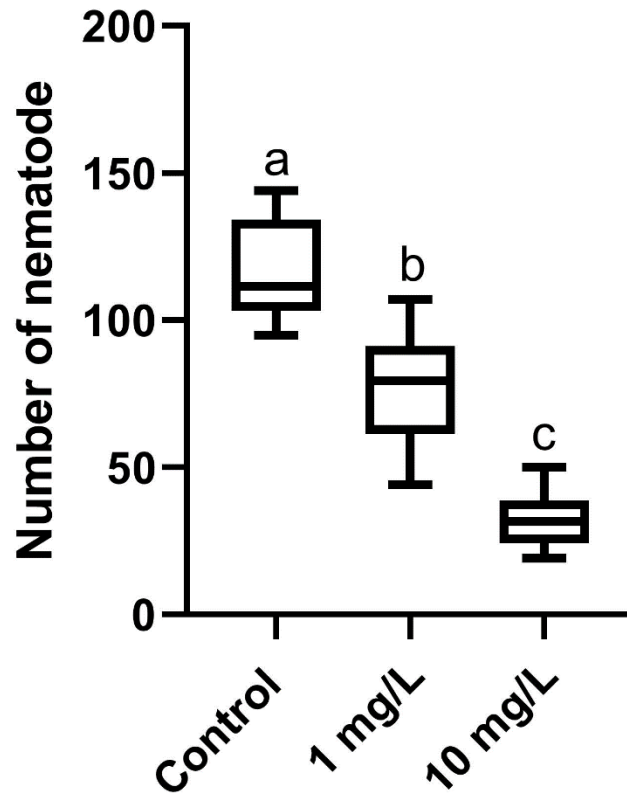
圖十九、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中十天後的卵孵化率。試驗組 1、10 ppm 鉻溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 50 個卵，五重複。不同字母表示具顯著差異組別。(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

Figure 19. The hatching rate of *M. enterolobii* in chromium solutions after ten days. The experimental group were 1, 10 ppm chromium solutions, and the control group was 0 ppm. There were 50 eggs in each group and five replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



圖二十、象耳豆根瘤線蟲於含鎳 pluronic gel 中成功侵染植株數目。試驗組 50、100 ppm 鎳 pluronic gel，對照組無添加金屬。每組放入 200 隻二齡幼蟲，六重複。不同字母表示具顯著差異(ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

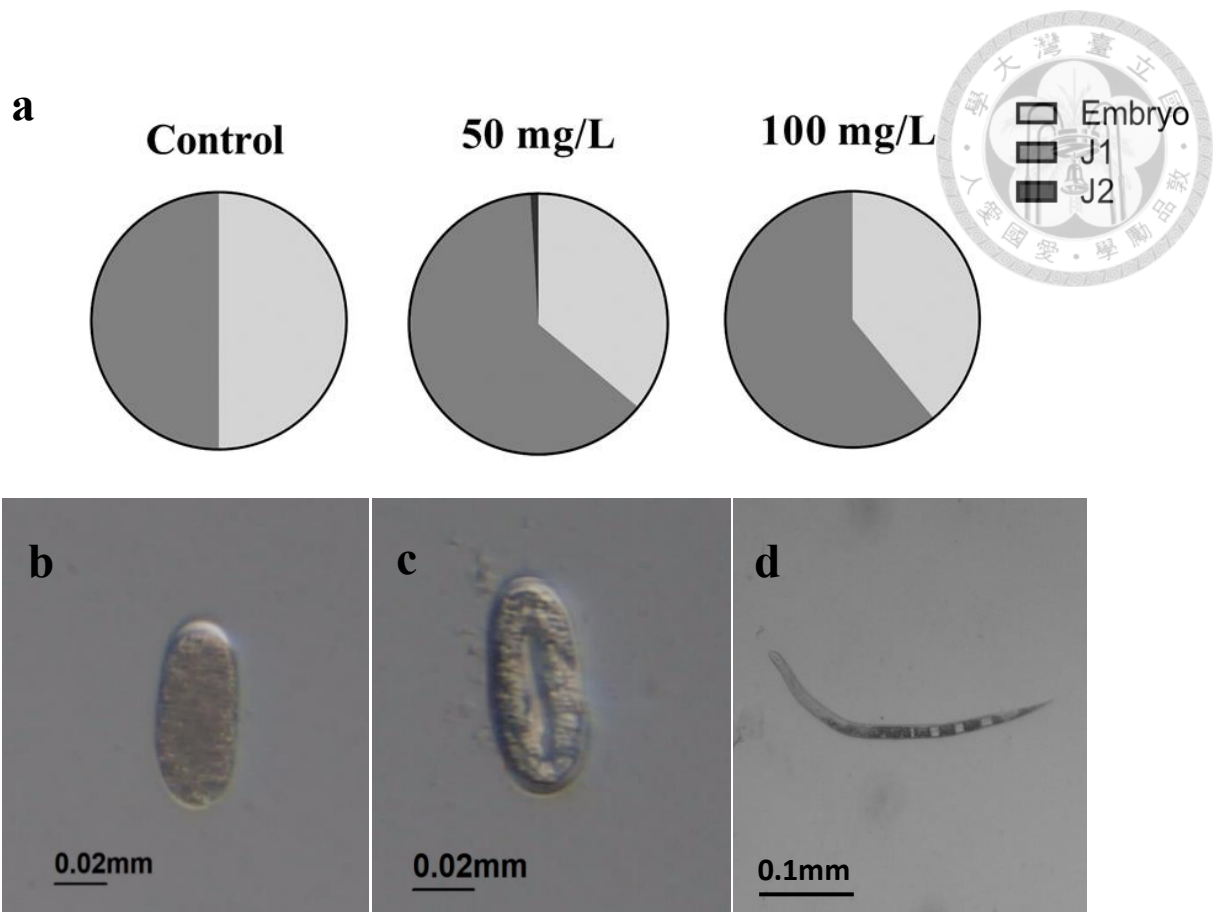
Figure 20. Number of successfully invaded *M. enterolobii* in nickel pluronic gel. The experimental group were 50, 100 ppm nickel solutions, and the control group was 0 ppm. Put 200 J2s in each group and six replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test). by the Tukey test).



圖二十一、象耳豆根瘤線蟲於含鉻 pluronic gel 中成功侵染植株數目。試驗組 1、10ppm 鉻 pluronic gel，對照組無添加金屬。每組放入 200 隻二齡幼蟲，六重複。不同字母表示具顯著差異 (ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

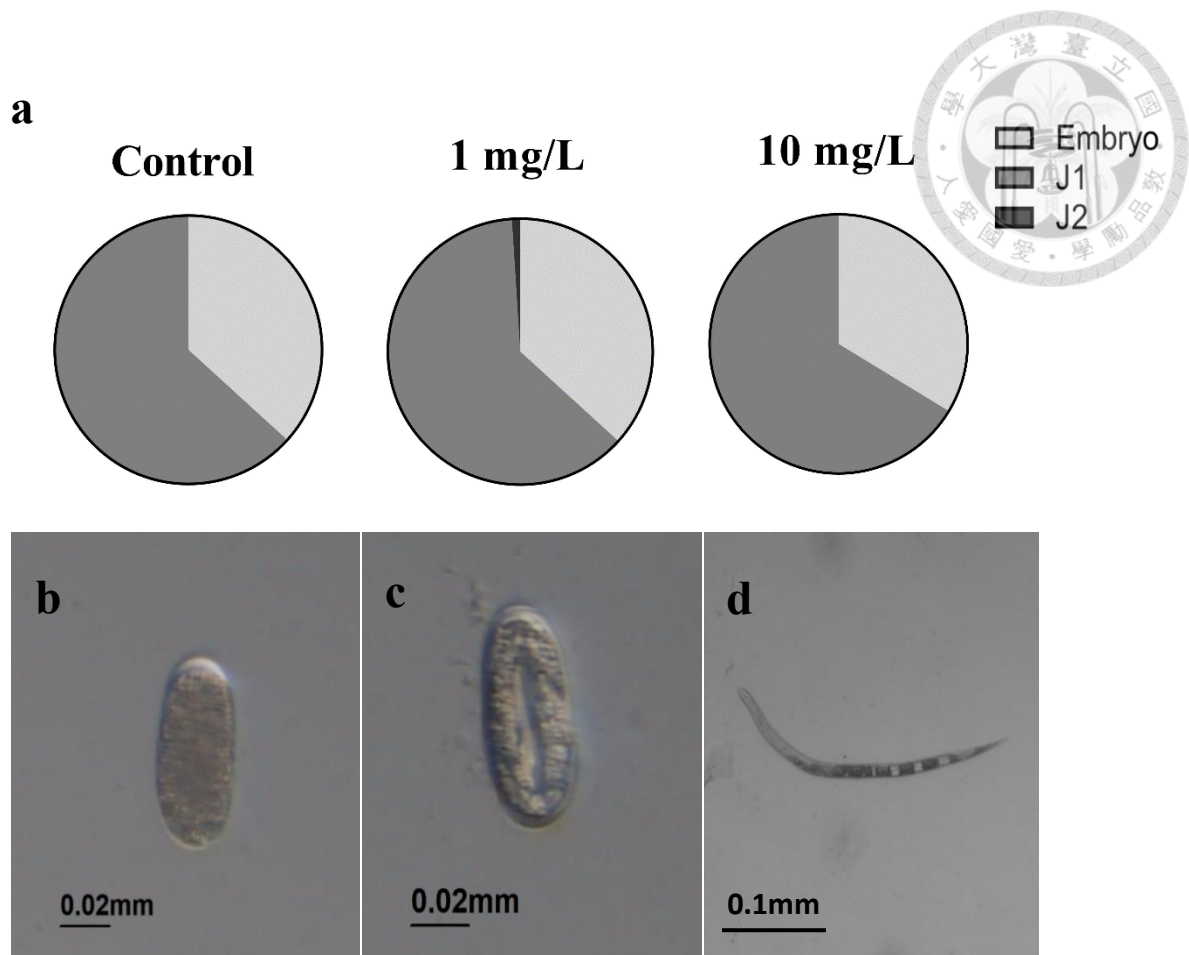
Figure 21. Number of successfully invaded *M. enterolobii* in chromium pluronic gel.

The experimental group were 1, 10 ppm chromium solutions, and the control group was 0 ppm. Put 200 J2s in each group and six replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



圖二十二、象耳豆根瘤線蟲於鎳溶液中六十小時後一齡幼蟲及二齡幼蟲比例。試驗組 50、100 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 30 個胚胎，五重複。a 為比例圓餅圖，b 為卵胚胎時期，c 為在卵膜中的一齡幼蟲，d 為游離卵膜的二齡幼蟲。對照組: 50% 胚胎, 50% 一齡幼蟲；50 ppm: 36% 胚胎, 63% 一齡幼蟲, 1% 二齡幼蟲；100 ppm: 39% 胚胎, 61% 一齡幼蟲。

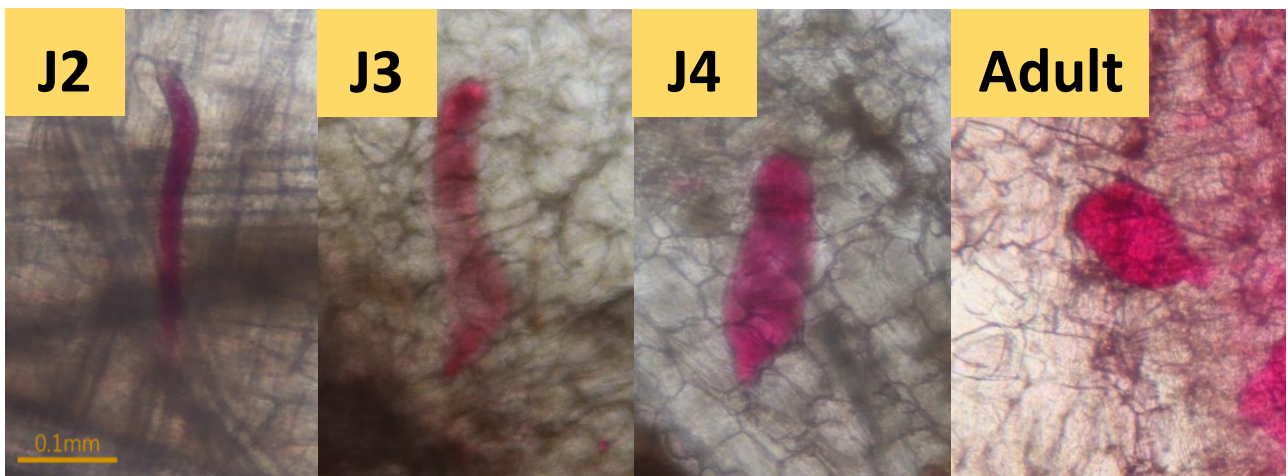
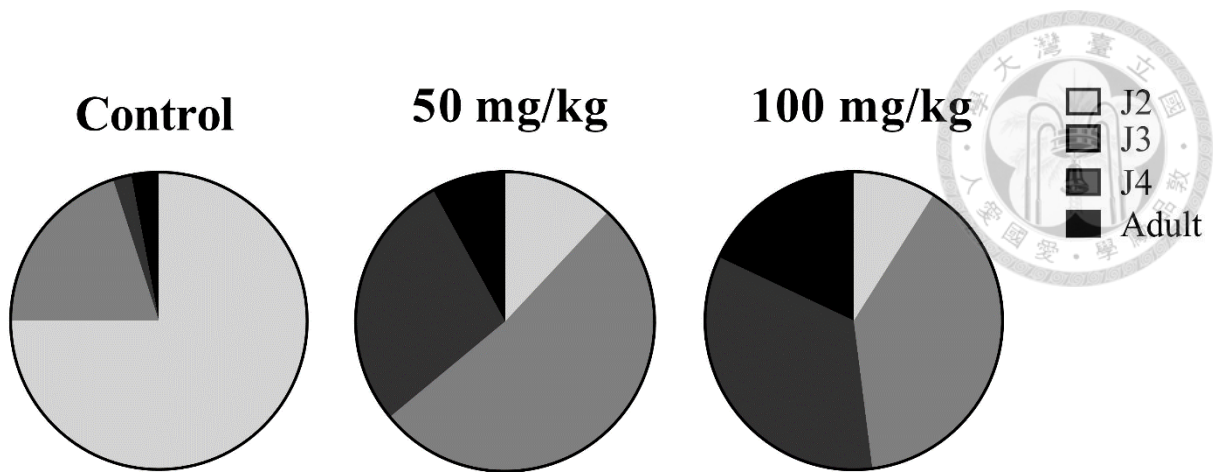
Figure 22. The ratio of *M. enterolobii* J1 and J2 in nickel solutions after 60 hours. The experimental group were 50, 100 ppm nickel solutions, and the control group was 0 ppm. There were 30 embryo in each group and five replications. a: the pie chart of ratio, b: embryo, c: J1 stage in egg, d: J2 stage. Control: 50% embryo, 50% J1; 50 ppm: 36% embryo, 63% J1, 1% J2; 100 ppm: 39% embryo, 61% J1.



圖二十三、象耳豆根瘤線蟲於鉻溶液中六十小時後一齡幼蟲及二齡幼蟲比例。試驗組 1、10 ppm 鉻溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 30 個胚胎，五重複。a 為比例圓餅圖，b 為卵胚胎時期，c 為在卵膜中的一齡幼蟲，d 為游離卵膜的二齡幼蟲。對照組：50%胚胎及 50%一齡幼蟲；50 ppm：36%胚胎，63%一齡幼蟲及 1%二齡幼蟲；100 ppm：39%胚胎及 61%一齡幼蟲。

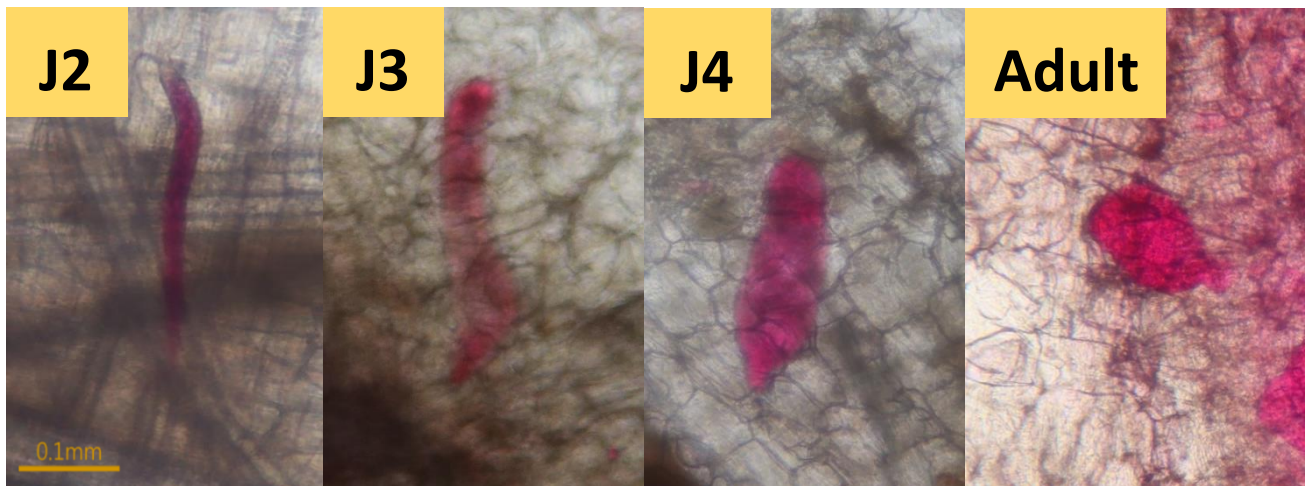
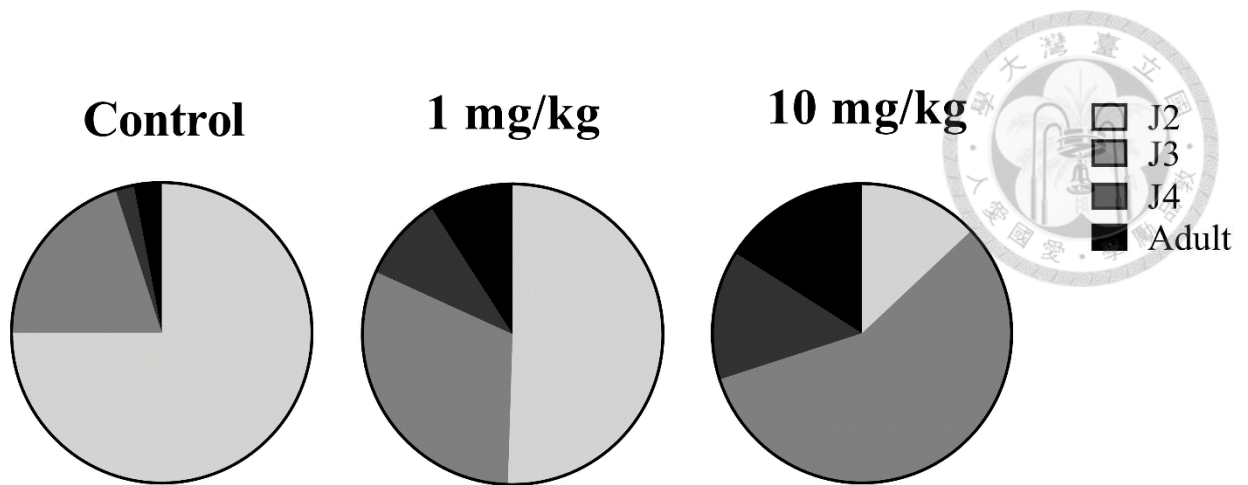
Figure 23. The ratio of *M. enterolobii* J1 and J2 in chromium solutions after 60 hours.

The experimental group were 1, 10 ppm chromium solutions, and the control group was 0 ppm. There were 30 embryo in each group and five replications. a: the pie chart of ratio, b: embryo, c: J1 stage in egg, d: J2 stage. Control: 50% embryo, 50% J1; 50 ppm: 36% embryo, 63% J1, 1% J2; 100 ppm: 39% embryo, 61% J1.



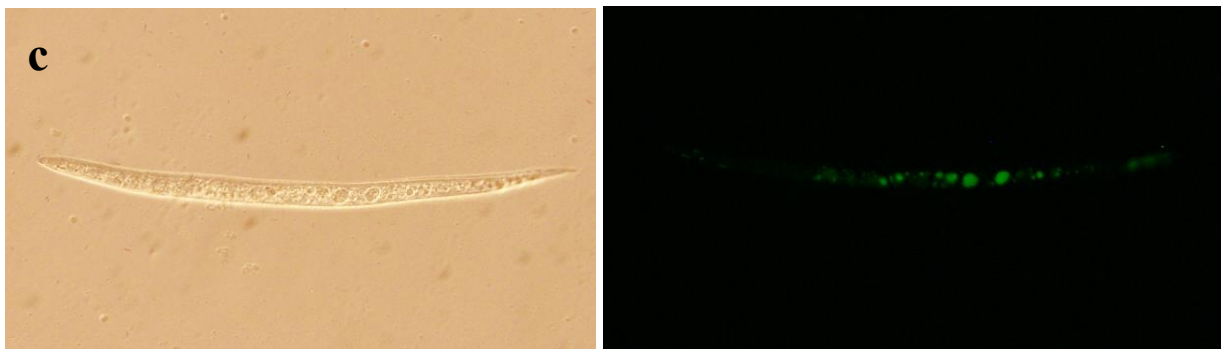
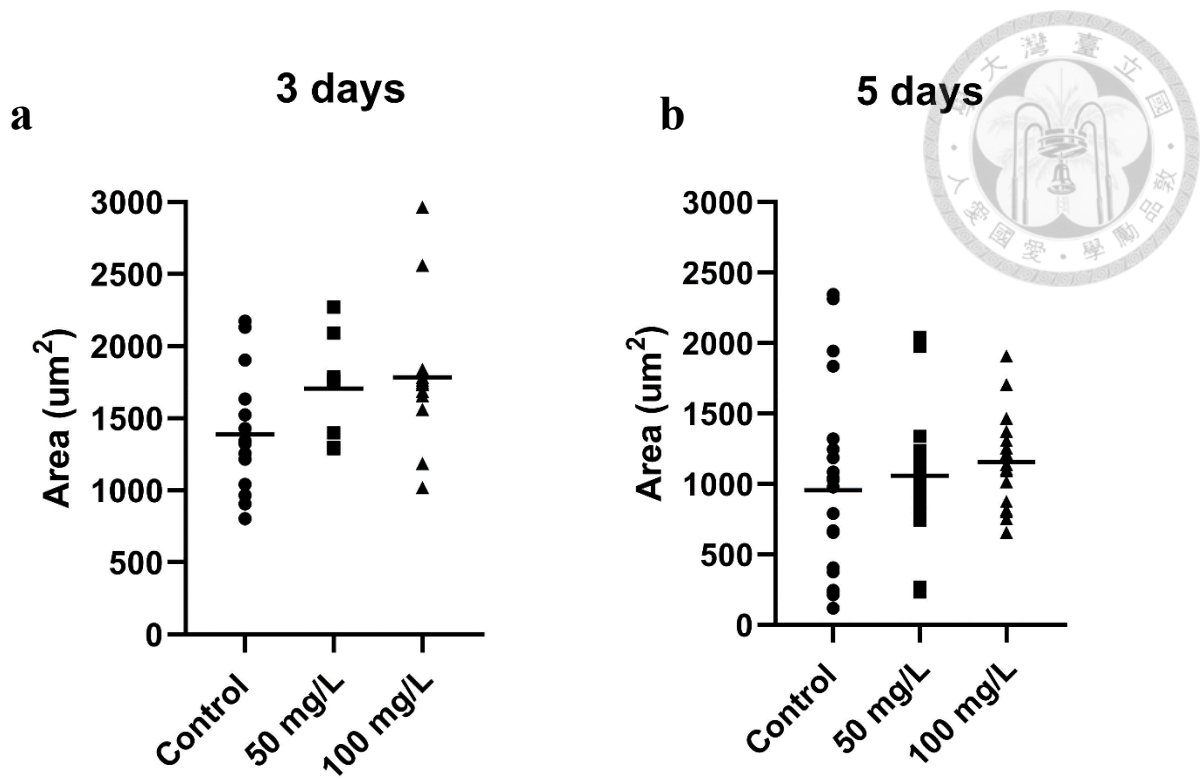
圖二十四、象耳豆根瘤線蟲在含鎳土壤中番茄幼苗根部裡十天後發育階段比例。試驗組 1、10 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組放 200 隻二齡幼蟲，六重複。對照組：75%二齡幼蟲，20%三齡幼蟲，2%四齡幼蟲及 3%雌成蟲；50 ppm：12%二齡幼蟲，52%三齡幼蟲，28%四齡幼蟲及 8%雌成蟲；100 ppm：9%二齡幼，39%三齡幼蟲，34%四齡幼蟲及 18%雌成蟲。

Figure 24. The juvenile development stage of *M. enterolobii* in tomato root in nickel soil after ten days. The experimental group were 50, 100 ppm nickel, and the control group was 0 ppm. There were 200 J2s in each group and six replications. Control: 75% J2, 20% J3, 2% J4 and 3% Adult; 50 ppm: 12% J2, 52% J3, 28% J4 and 8% Adult; 100 ppm: 9% J2, 39% J3, 34% J4 and 18% Adult.



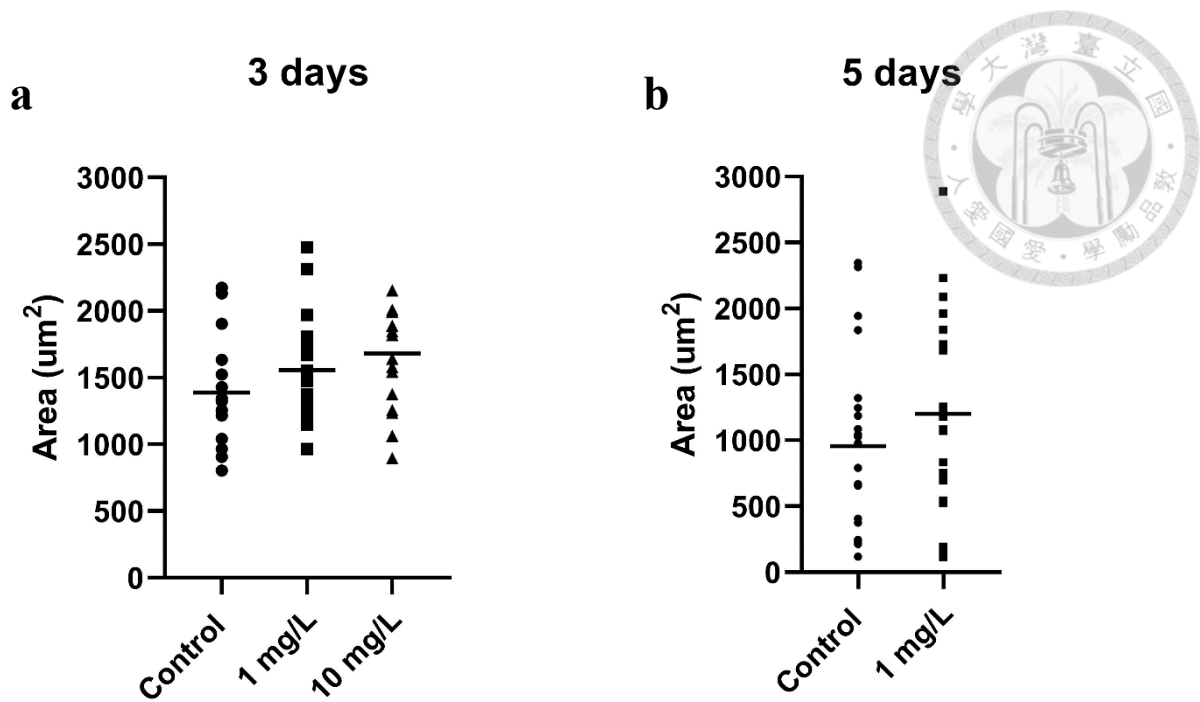
圖二十五、象耳豆根瘤線蟲在含鉻土壤中番茄幼苗根部裡十天後發育階段比例。試驗組 1、10 ppm 鉻溶液，對照組無添加金屬溶液。每組放 200 隻二齡幼蟲，六重複。對照組：75%二齡幼蟲，20%三齡幼蟲，2% 四齡幼蟲及 3%雌成蟲；1 ppm：50%二齡幼蟲，31%三齡幼蟲，9%四齡幼蟲及 9%雌成蟲；10 ppm：13%二齡幼蟲，57% 三齡幼蟲，14%四齡幼蟲及 16%雌成蟲

Figure 25. The juvenile development stage of *M. enterolobii* in tomato root in chromium soil after ten days. The experimental group were 1, 10 ppm chromium, and the control group was 0 ppm. There were 200 J2s in each group and six replications. Control: 75% J2, 20% J3, 2% J4 and 3% Adult; 1 ppm: 50% J2, 31% J3, 9% J4 and 9% Adult; 10 ppm: 13% J2, 57% J3, 14% J4 and 16% Adult



圖二十六、象耳豆根瘤線蟲於螢光顯微鏡下脂質含量。試驗組 50、100 ppm 鎳溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 25 隻二齡幼蟲。a 浸泡 3 天後脂質面積，b 浸泡 5 天後脂質面積，c 為螢光顯微鏡不同波長拍攝的線蟲樣貌。

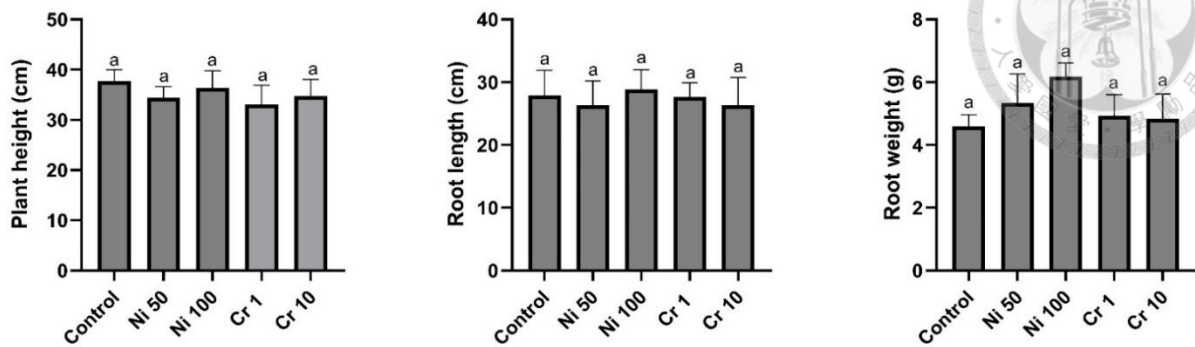
Figure 26. The lipid of *M. enterolobii* on fluorescence microscope. The experimental group were 50, 100 ppm nickel solutions, and the control group was 0 ppm. There were 25 J2s in each group. a: lipid accumulation of 3 days, b: lipid accumulation of 5 days, c: nematode on fluorescence microscope.



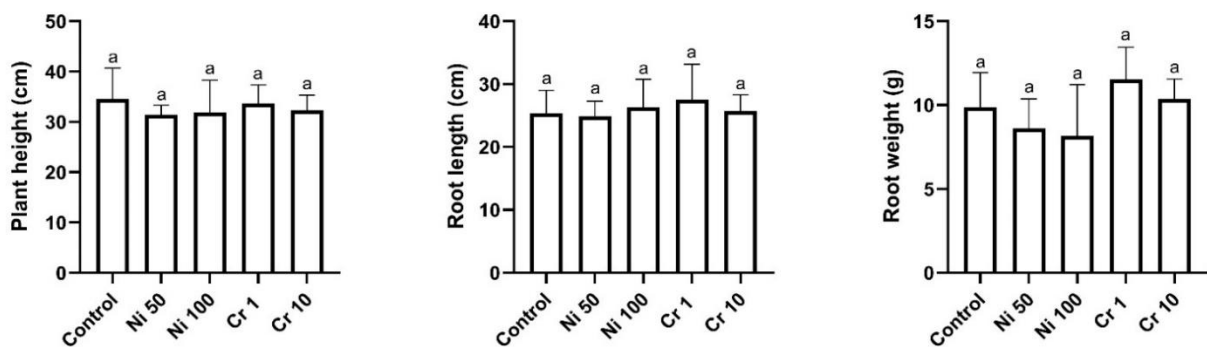
圖二十七、象耳豆根瘤線蟲於螢光顯微鏡下脂質含量。試驗組 1、10 ppm 鉻溶液，對照組無添加金屬溶液。每組 25 隻二齡幼蟲。a 浸泡 3 天後脂質面積，b 浸泡 5 天後脂質面積，c 為螢光顯微鏡不同波長拍攝的線蟲樣貌。

Figure 27. The lipid of *M. enterolobii* on fluorescence microscope. The experimental group were 1, 10 ppm chromium solutions, and the control group was 0 ppm. There were 25 J2s in each group. a: lipid accumulation of 3 days, b: lipid accumulation of 5 days, c: nematode on fluorescence microscope.

Non-inoculate nemaotde

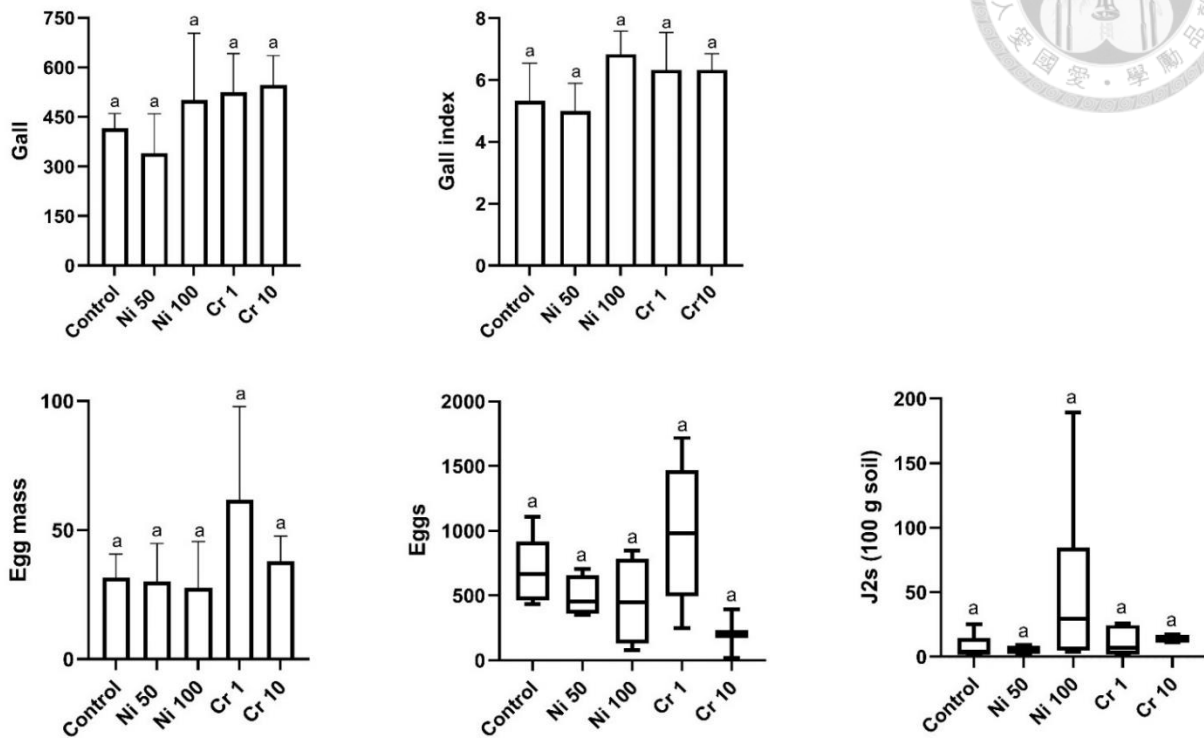


Inoculate nematode



圖二十八、番茄株高、根系長度及根重受鎳、鉻及象耳豆根瘤線蟲侵染之變化。試驗組為 50、100 ppm 鎳土壤環境及 1、10 ppm 鉻土壤環境，對照組則為無添加金屬土壤環境。另有無接種根瘤線蟲差異，接種組每組 1500 隻根瘤線蟲，無接種為對照組。每組六重複。不同字母表示具顯著差異組別 (ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

Figure 28. The change of tomato plant height, root length and weight were in metal environment and *M. enterolobii* inoculate. The experimental group were 50, 100 ppm nickel soil environment and 1, 10 ppm chromium soil environment, and the control group was 0 ppm. Another was inoculated *M. enterolobii*, there was 1500 J2s in the inoculating group, and control was no nematode. Six replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



圖二十九、象耳豆根瘤線蟲於鎳鉻土壤環境中結瘤數、根瘤指數、卵塊數、卵數及土壤中二齡幼蟲隻數的變化。試驗組為 50、100 ppm 鎳土壤環境及 1、10 ppm 鉻土壤環境，對照組無添加金屬土壤環境。每組 1500 隻根瘤線蟲幼蟲，六重複。不同字母表示具顯著差異組別 (ANOVA 分析 P 值小於 0.05 者，以 Tukey 分組)。

Figure 29. The change of gall, gall index, egg mass, eggs and J2s in soil of *M. enterolobii* in nickel and chromium soil environment. The experimental group were 50, 100 ppm nickel soil environment and 1, 10 ppm chromium soil environment, and the control group was 0 ppm. There were 1500 J2s in each group and six replications. Bars with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test).