

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

苗栗地區耕作模式與生育時期對水稻根部內共生菌相  
之影響

Effect of field managements and growth stages on the rice  
root endophyte in Miaoli region

林冠穎

Guan-Ying Lin

指導教授：林維怡 博士

Advisor: Wei-Yi Lin, Ph.D.

中華民國 109 年 8 月

August 2020

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

苗栗地區耕作模式與生育時期  
對水稻根部內共生菌相之影響  
Effect of field managements and growth stages  
on the rice root endophyte in Miaoli region

本論文係林冠穎君 (R06621113) 在國立臺灣大學農藝學系研究所完成之碩士學位論文，於民國 109 年 7 月 7 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

林維怡 博士 林維怡 (簽名)  
(指導教授)

邱春火 博士 邱春火

張皓巽 博士 張皓巽

## 致謝



本篇論文能告完成，首先感謝我的指導教授 林維怡老師，在我就讀碩士班這3年的悉心教導。謝謝老師包容我因為在任公職，無法待在研究室協助各項事務，除此之外，老師還體貼我的特殊情況建議我合適的研究方向，讓我的研究資料能順利產出，在論文撰寫及文獻解讀上老師也給予我極大的協助，若沒有老師的指導實在難以完成這本論文，對於老師的感謝已非文字能夠形容。另外還要感謝口試委員邱春火博士及張皓巽博士，論文口試時在統計及微生物分析上的專業建議及指導，使本篇論文更臻完善。感謝苗栗改良場的張課長素貞及林助理研究員家玉提供本篇論文試驗水稻材料及土壤分析數據，您們的協助是論文能完成的重要關鍵。感謝圖爾思生物科技股份有限公司李偉豪先生及謝函學先生熱心提供生物資訊分析上的專業諮詢。

接著也要感謝3年來實驗室互相陪伴的同學及前輩，謝謝庭禎教導我實驗上的許多事情，還自願幫忙我做了很多論文實驗之外的事情；謝謝總是在考種館發憤苦讀的文發學長，每次晚上去做實驗看到笑臉迎人的您讓我少了許多寂寞；謝謝郁菱及鄧晨巧遇我時陪我話家常；感謝歐祈幫我詳盡地紀錄口試問答及錄音。此外也感謝修課期間互相幫助的許多系上、系外同學們，協助我解決學習上的諸多困惑，在你們身上總是學到許多。

特別感謝女友這段時間一直以來的理解與包容，不但為了相互陪伴北上報考台大的研究所，還在學校事務上給予我許多協助，甚至幫我校對文章及進行口試練習。感謝朋友們每次相聚時聽我抒發心情，每次談笑風生之後總能恢復身心活力。謝謝家人一路走來的支持，容忍我多次缺席重要的聚會，並幫助我處理許多生活上的繁雜事務，替我省下許多時間而能專心於兼顧工作及學業。

最後感謝農糧署中區分署、台中辦事處及林業試驗所長官同仁對我進修碩士班的支持與工作上的擔待，使我能完成本篇碩士論文。

## 摘要



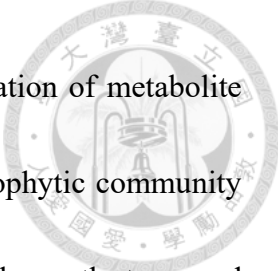
植物內共生微生物與作物生長發育密切相關，也會影響作物產量及品質，許多有益內共生微生物已被證實具有促進作物生長、增進作物逆境耐受性的能力。有鑑於慣行農業操作法在維繫農田土壤健康及生態多樣性的限制，以維持生產、生活及生態平衡為出發點的永續農法應運而生，然而不同農業操作是否會透過改變作物根圈及根內共生微生物的多樣性及組成，進而影響作物健康，目前瞭解有限；另一方面，有益微生物共生的時間點及族群結構關係著其對作物的效益，但內共生微生物群落組成是否會隨著作物發育時期的推進而產生變化，相關研究並不多。為瞭解耕作模式及生育時期對內共生菌組成的影響，本研究藉由 16S 核糖體 RNA 基因定序技術，在 2018 至 2019 年間 3 個期作，以苗栗縣苑裡鎮慣行及有機等 2 種管理水稻田為樣區，調查水稻根部內共生細菌群落組成，並於 2019 年兩個期作調查秧苗期和分蘖期根部內共生細菌群落之變化。結果顯示不同管理方式對水稻根內共生細菌  $\alpha$ -多樣性並無顯著影響，但對菌相的組成在三個期作都具有顯著差異，而生育期的不同對水稻根部內共生細菌組成及  $\beta$ -多樣性的影響更為顯著，推測水稻隨發育階段演進，會透過改變根部代謝而營造出相對應的菌相組成。另外經由指標物種分析，鑑定出對生育期及管理方式敏感的 OTUs，未來可再擴大檢視這些 OTUs 在水稻田的角色。本次試驗水稻雖來自相近區位，仍可見田間樣品受到區域環境因子的影響，建議未來可擴大樣區並進行長期的研究，以確認管理方式對於作物根內共生微生物組成及功能的影響。

關鍵字：水稻根內共生菌、16S 核糖體 RNA 基因定序、耕作方式、生育階段

## Abstract



Plant endophytic microorganisms have great impacts on crop growth, development and yield. Many beneficial endophytic microbes have been identified which can enhance the crop growth and stress tolerance. Because the conventional agricultural practices are not good for soil health and agricultural biodiversity, sustainable agricultural practices which aim to balance the crop production, people's living and ecosystem attract more and more attention. However, little is known about the impacts of agricultural practices on crop health via modifying the diversity and composition of endophytic and rhizosphere microbial communities. On the other hand, the timing that the beneficial microbe association forms and their composition influence the benefits that crops receive. However, it is still unclear that whether endophyte composition and structure change temporally during plant growth and development. In order to address these questions, we examined rice root microbiome by using the 16S ribosomal RNA gene sequencing from 2018 to 2019. The samples from organic and conventional-cultivated rice fields in Yuanli Town, Miaoli County were harvested for investigating the composition of the rice root bacterial endophyte under different practices at two different growth stages. The results showed that different managements only affected the composition of bacterial endophyte but not  $\alpha$ -diversity. However, the bacterial composition and  $\beta$ -diversity were significantly



different between two growth stages. It is possible that the modification of metabolite accumulation during the growing season leads to the change of endophytic community structure. In addition, by performing indicator species analysis, several growth stage- and field management-sensitive OTUs were identified. Further studies are required to examine their role in rice fields. Although our experimental sites were very close, the variation between samples were still observed, suggesting the presence of local environmental effects. Thus, we suggest that more experimental sites and long-term research are needed in the future to dissect the impacts of cropping practices on root endophyte composition and function in crops.

Key words: rice root endophyte; 16s ribosomal rRNA gene sequencing; cropping practices; growth stage

# 目錄

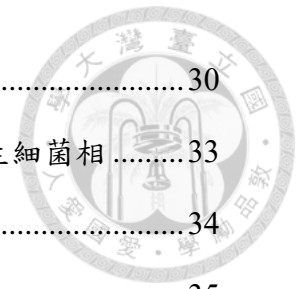


致謝 .....	I
摘要 .....	II
Abstract.....	III
目錄 .....	V
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	IX
附錄目錄 .....	X
第 1 章 前言 .....	1
1.1 永續農業 .....	1
1.1 耕作模式與土壤性質 .....	1
1.2 植物內共生微生物 .....	2
1.2.1 植物內共生微生物對植物生長的效益 .....	2
1.2.2 植物內共生微生物與耕作模式 .....	3
1.2.3 植物生育期對根圈菌相之影響 .....	4
1.3 植物根圈土壤及內共生微生物研究方法 .....	4
1.3.1 傳統微生物分離培養法 .....	5
1.3.2 土壤酶活性測定 .....	5
1.3.3 次世代定序技術 .....	5
1.3.4 利用次世代定序分析微生物群落多樣性 .....	6
1.4 研究目的 .....	7
第 2 章 材料及方法 .....	9
2.1 樣品採集 .....	9
2.2 田間施作方法 .....	9
2.3 樣本採樣與處理 .....	9

2.4	內共生細菌 DNA 萃取 .....	10
2.5	16s rRNA 基因次世代定序 .....	11
2.5.1	16S rRNA 基因聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) .....	11
2.5.2	樣本基因體建庫及定序 .....	11
2.5.3	定序資料處理 .....	11
2.6	生物資訊分析 .....	12
2.6.1	OTU 聚類和物種注釋 .....	12
2.6.2	樣品複雜度分析 ( $\alpha$ -多樣性; $\alpha$ -diversity) .....	12
2.6.3	樣本分組比較分析 ( $\beta$ -多樣性; $\beta$ -diversity) .....	13
2.6.4	環境因子分析 .....	13
2.6.5	基因功能預測 .....	13
2.6.6	敏感物種 (OTUs) 分析 .....	13
2.6.7	熱圖 (heatmap) 製作 .....	13
2.7	數據統計分析 .....	14
第 3 章	結果 .....	15
3.1	試驗取樣點環境概況 .....	15
3.2	水稻根部內共生細菌群落組成與生育地土壤性質關係 .....	16
3.3	水稻根部內共生細菌門組成在不同期作及管理方式下的差異 .....	16
3.4	水稻根部內共生細菌群落組成在不同期作 $\alpha$ -多樣性的差異 .....	17
3.5	水稻根部內共生細菌群落組成在不同期作 $\beta$ -多樣性的差異 .....	19
3.6	分析對管理方式及生育時期敏感的水稻內共生細菌指標 OTUs .....	25
3.7	不同期作水稻根部內共生細菌群落的功能預測分析 .....	26
第 4 章	討論 .....	28
4.1	田間管理方式對水稻內共生細菌群落結構及功能的影響 .....	28



4.2 生育期對水稻內共生細菌群落結構及功能的影響 .....	30
4.3 生育期及田間管理方式的交互作用共同影響水稻內共生細菌相 .....	33
4.4 田間管理方式對土壤特性及微生物相的影響 .....	34
4.5 品種及氣候環境條件對根內共生菌相的影響 .....	35
第 5 章 參考文獻 .....	37
附錄 .....	82



## 圖目錄



圖 1、本試驗水稻取樣田位置。.....	47
圖 2、2018-2019 年中央氣象局苑裡測站月平均溫度及降雨資料。.....	48
圖 3、土壤環境因子與不同管理方式的水稻內共生菌群組成的關聯性。.....	49
圖 4、2019 年第 1 期作水稻根部內共生細菌組成結構。.....	50
圖 5、第 2 期作水稻根部內共生細菌組成結構。.....	51
圖 6、2018 年第 2 期作分蘖期水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。....	52
圖 7、2019 年兩個期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。.....	53
圖 8、2019 年第 1 期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。.....	54
圖 9、2019 年第 2 期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。.....	55
圖 10、2019 年第 1 期作樣品中相對豐度受生育期影響之 OTUs。.....	56
圖 11、2019 年第 2 期作樣品中相對豐度受生育期或田間管理影響之 OTUs。....	57
圖 12、在不同管理方式下相對豐度具顯著差異的細菌。.....	58
圖 13、2019 年第 1 期作相對豐度受生育期影響而具顯著差異的細菌。.....	59
圖 14、2019 年第 2 期作相對豐度受生育期影響而具顯著差異的細菌。.....	60
圖 15、對田間管理方式和生育期敏感的水稻根內共生菌群落。.....	61
圖 16、水稻內共生細菌功能相似性主成分分析結果。.....	62
圖 17、2019 年第 1 期作受生育期不同而影響相對豐度之菌群的預測功能。.....	63
圖 18、2019 年第 1 期作對田間管理方式敏感之菌群的預測功能。.....	64
圖 19、2019 年第 2 期作受生育期不同而影響相對豐度之菌群的預測功能。.....	65
圖 20、2019 年第 2 期作對田間管理方式敏感之菌群的預測功能。.....	66

## 表目錄



表 1、本試驗採集水稻樣品概況。.....	67
表 2、16S rRNA 基因聚合酶連鎖反應條件。.....	68
表 3、試驗取樣田的土壤性質。.....	69
表 4、以相似性分析及置換多元變方分析評估 2019 年第 1 和第 2 期作水稻根內共生菌群組成的組間差異。.....	70
表 5、以 Mantel 檢定評估土壤特性對 2019 年 2 期作水稻根內共生菌結構。.....	72
表 6、本試驗各組樣品內生菌的 $\alpha$ -多樣性。.....	73
表 7、Chao1 指數變方分析結果。.....	75
表 8、以置換多元變方分析檢視田間管理方式及生育期對樣品細菌群落組成之影響。.....	76
表 9、相對豐度受不同管理方式影響的細菌分類群。.....	77
表 10、相對豐度受生育時期影響的細菌分類群。.....	80

## 附錄目錄

附表 1、以置換多元變方分析 2019 年第 1 期作內共生細菌群落組成之結果。 ...	82
附表 2、以置換多元變方分析 2019 年第 2 期作樣品細菌群落組成之結果。 .....	83
附表 3、2019 年第 2 期作樣品 Chao1 指數變方分析結果。 .....	84



## 第1章 前言




### 1.1 永續農業

拜綠色革命之賜，現代農民透過栽培優良品種、施用農藥、化學肥料以及機械化耕作等方式，將產能極大化，顯著提升農產品產量及品質，但此種慣行生產方式，卻同時伴隨土壤酸化、地力降低、有毒物質累積、病蟲抗藥性增加及化學肥料生產而帶來之環境汙染等問題，危害生態環境，且影響人體健康。有鑑於慣行管理衍生出的諸多壞處，加上近年來環境及氣候變遷加劇，許多以生態平衡原則為出發點、追求穩定環境及維持人類對農產品需求的永續農業操作方法便應運而生，這些操作方法透過維護田區生物相的多樣化和活性，在提高土壤肥力的同時仍保持作物產量。土壤為支持作物生長最重要的環境因子之一，而土壤生物相包括生長於根圈土壤及共生於作物根內部的細菌、真菌及動物等，可促進有機物的分解以及氮和磷等重要土壤養分的轉化和固定，對調節生態系統的循環及穩定性相當重要。

廣為人知的有機管理，亦是永續農業操作法的一類，具有清楚的定義及規範。行政院農業委員會在 2018 年 5 月 30 日公告之《有機農業促進法》第三條提及有機農業的定義為「基於生態平衡及養分循環原理，不施用化學肥料及化學農藥，不使用基因改造生物及其產品，進行農作、森林、水產、畜牧等農產品生產之農業。」除了確立有機農業的內涵外，亦訂定有機認證辦法及生產者應遵行的「有機農糧作物台灣良好農業規範」等，並輔導相關機構，近年更大力推廣有機及友善農業工作，足見我國政府對農業的永續發展日益重視。

### 1.1 耕作模式與土壤性質

依據 Jenny (1994) 所述，土壤受到氣候、生物、母質、地形和時間等 5 大自然因子共同作用而形成，並構成各地天然土壤性質。除了自然因子外，人為因子為影響土壤性質最主要因素，如耕犁及灌溉等，現代農業經營強調土地有



效利用，進一步加強人為因子對土壤的影響。慣行管理使用農業機械及化學藥劑進行作物管理，造成土壤壓實、團粒結構消失、土壤鹽鹼化、土壤酸化、重金屬殘留，且破壞原有生物相、降低土中生物多樣性等，危害土壤健康及永續經營。有機管理等永續經營方式強調盡可能減少耕犁、不使用化學合成藥劑以及有機質的添加和農業資材的再利用等，謀求土壤物理化學結構的改善及土壤生物多樣性的增加。透過長期的田間試驗，研究者發現有機耕作的土壤比慣行耕作的土壤具有較高的有機質含量、較厚的表土深度、較高的團粒穩定度及較高的多醣含量，且斷裂模數（modulus of rupture）較低，土壤侵蝕也較少（Reganold *et al.*, 1987；Blanco-Canqui and Lal, 2009）。長遠而言，有機耕作制度比慣行耕作制度在減少土壤侵蝕和保持土壤生產力方面更為有效。


## 1.2 植物內共生微生物

內共生細菌可以簡單地定義為發生在植物內部的細菌，或者根據 Hallmann 等人（1997）的定義：可以從表面消毒的植物組織中分離出來，並且不會明顯損害宿主植物的細菌。總體而言，植物內共生細菌群落組成相較於根圈土壤細菌更具物種特異性及穩定性，且應用上可能更具優勢，因為這些生活在植物組織內的細菌與植物細胞接觸的機會較高，若具有有利於植物生長之潛力，更容易直接發揮效益；根圈為與根部表面極為接近的土壤，因此根圈細菌具有進入植物根部並在組織中定植的潛力，被認為是植物內共生細菌群落的主要來源之一（Hallmann *et al.*, 1997；Germida *et al.*, 1998；Marquez-Santacruz *et al.*, 2010）。

### 1.2.1 植物內共生微生物對植物生長的效益

植物內共生細菌普遍存在於植物的內部組織中，多數是對植物沒有明顯影響的中性細菌（commensals），少數內共生菌則對植物生長發育有正面效益，稱作「植物生長促進細菌（plant growth promoting bacteria, PGPB）」

（Hallmann *et al.*, 1997）。根據目前研究已知植物可以「選擇」它們的共生



菌，而建構有益的菌群群落 (Marasco *et al.*, 2012)，但經歷數十年研究，植物內共生菌促進植物生長的機制仍未能被完整理解，因此受限 PGPB 的應用範圍，目前瞭解 PGPB 促進植物生長和健康的功能包括：(1) 增進營養吸收效率：PGPB 透過固氮作用、分泌有機酸以增加磷酸鹽的溶解度或合成螯合物 (chelation) 增加根部對鐵的吸收等機制，增進寄主植物對營養物質的吸收效率 (Gamalero and Glick, 2011)；(2) 生成植物荷爾蒙調節植物生理反應：PGPB 透過合成促進生長的植物荷爾蒙，如：生長素、細胞分裂素和吉貝素，或抑制老化相關的荷爾蒙，調節植物體內的生理反應，進而促進生長，例如：*Achromobacter xylosoxidans* 等 PGPB 可以合成氨基環丙烷羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 脫胺酶 (deaminase) 來減少植物體內乙烯的合成；(3) 抑制病原菌：PGPB 透過競爭拓殖區域養分、合成抗生物質以及誘導對病原體的系統抗性等，抑制根部病原菌生長；例如：向日葵接種內共生有益細菌可增強水分逆境下幼苗的生長，促進根部水楊酸合成並抑制病原真菌的生長 (Forchetti *et al.*, 2010)；(4) 增進非生物逆境耐性：PGPB 透過多種機制增進寄主植物對逆境的耐受性，例如：在土壤銅過多的逆境下，紫花苜蓿 (*Medicago lupulina*) 接種內共生根瘤菌後，不僅增加了植物的生長和氮含量，還誘導植物的抗氧化防禦反應 (Kong *et al.*, 2015)。總而言之，PGPB 透過影響植物基因表現、養分吸收能力、荷爾蒙代謝及與病原菌拮抗作用來增進植物生長及抗逆境能力，為有益微生物的潛力來源。

### 1.2.2 植物內共生微生物與耕作模式

植物根圈及內共生微生物的組成和多樣性會受到不同耕作管理模式影響而有所不同 (Bünemann *et al.*, 2006)。比較慣行與有機耕作等不同管理模式及不同耕犁強度對土壤及小麥根部內共生微生物群落的影響，發現土壤細菌群落主要受到耕犁強度影響，而根內共生細菌主要組成則明顯受



耕作模式影響 (Hartman *et al.*, 2018)，這意味著透過耕作管理可以塑造作物根內共生菌相；若比較管理模式對不同植物物種根內共生菌群落組成的影響，發現內共生菌群落受植物種類所控制，且管理模式對菌群結構的影響取決於宿主植物 (Wemheuer *et al.*, 2017)，顯示管理模式對內共生菌相的影響依植物而異，需獨立討論。Xia 等人 (2015) 從有機耕作和慣行耕作作物中分離內共生細菌群落，結果顯示有機耕作的作物組織中細菌物種豐富度和多樣性皆較高，顯示有機管理可能會增加內共生菌的豐富度和多樣性，進一步將內共生菌重新接種至番茄中，發現有 61% 的菌種可促進番茄植物的生長，而有 50–64% 則增加生物量的累積。綜合前人研究，相較於土壤微生物，植物內共生菌群落多樣性及組成受到不同耕作模式影響更為明顯，透過瞭解特定管理方式與內共生菌群落動態間的關係，將其實踐於作物生產上，在永續農業經營中具潛在應用價值。

### 1.2.3 植物生育期對根圈菌相之影響

除了耕作模式，不同生育期可能會對根圈微生物的組成造成影響。研究者發現，根圈微生物組成與玉米生育時期的變化高度相關，顯示植物根對根圈微生物的選擇性可能是造成微生物群落與生長階段同步變化的重要機制 (Yang *et al.*, 2017)，後續研究更進一步證明，植物發育過程會改變根系分泌物化學組成，由於根圈微生物對代謝基質偏好不一，因此造成根圈微生物組成的同步演替 (Zhalnina *et al.*, 2018)。相似於根圈土壤微生物，植物內共生微生物群落組成同樣受到植物生育時期影響，且可能與植物隨生長階段推進而發生的根部生物量變化相關 (Marques *et al.*, 2015)。

## 1.3 植物根圈土壤及內共生微生物研究方法

為瞭解微環境中的微生物組成及其特性，已發展出數種方法進行研究，以





下將逐一介紹常見之研究方法：


### 1.3.1 傳統微生物分離培養法

由於難以模擬自然環境中的微生物生長繁殖的真實條件，而多數微生物無法藉由人為培養而純化，推測目前成功培養的微生物至多佔 1 % 的自然界微生物，加上微生物形態較為簡單，雖然可根據外觀及生理生化特徵對微生物進行鑑定分類，但常限於較高的分類階層 (Amann *et al.*, 1995)。在缺乏更有效的研究工具前，要進行根圈土壤及內共生微生物群落多樣性及結構分析，傳統上仍需將微生物分離培養，然後透過一般的生物化學性狀，或特定的表現型來鑑定，因此相關研究結果局限於人為可分離之微生物。但隨著人們開始對土壤中微生物的原位 (*in situ*) 群落結構進行研究，發現常規的分離培養方法很難全面地估計微生物群落多樣性，因此僅靠傳統的微生物學方法是不夠的，需要其他技術彌補。

### 1.3.2 土壤酶活性測定

用生物化學技術能快速檢測土壤酶活性，使土壤酶學相關研究一度盛行，其中脲酶、磷酸酶和脫氫酶在土壤中的含量和變化規律研究較多，但土壤酶測定用於根圈土壤微生物研究的缺點是無法直接反映微生物實際生理狀態。生物群落層級生理圖譜 (community-level physiological profiles, CLPP) 是由 Garland 和 Mills (1991) 提出的另一種分析方法，該方法依據對 95 種不同單一碳源分解能力的差異，一次區分不同微生物群落，其中以美國 Biolog 公司 (Biolog, Inc.) 生產的微孔盤應用於根圈土壤微生物群落研究較多。但土壤酶測定至今沒有標準的參數和測定準則，無法為土壤微生物生態功能提供準確的答案，若要完整說明土壤微生物特徵，仍需配合其他方法。

### 1.3.3 次世代定序技術



由於從環境樣品中分離和培養微生物存在一定困難，分子生物學方法已被用來描述和鑑定微生物群落。分子生物技術的應用克服了傳統方法的限制，使研究者可以從基因層次上估計物種豐富度、均勻度、群落組成結構及動態變化等，從而更客觀地瞭解環境中微生物天然的生態狀況，其中次世代定序（next generation sequencing, NGS）技術近年來廣泛被運用於環境微生物群落結構鑑定，能有效且全面地呈現微生物群落組成結構。以下簡單介紹次世代定序技術及在微生物學的應用。

相較於桑格定序法（Sanger sequencing），DNA 次世代定序借助化學方法的改良與自動化工程技術的突破，大幅減少試劑用量，且可同步進行多樣本定序反應，有效縮短並減少定序反應所需時間與成本。不同於 Sanger 定序技術，次世代定序先解讀各小片段的基因序列，再運用資訊科技協助進行片段拼接，達成整個基因組定序的目的。次世代基因定序技術主要有 Illumina 的 Solexa、ABI（Applied Biosystems）的 SOLiD 與 Roche 的 454 等技術平台，其中本試驗使用的是 Illumina 定序平台，定序流程簡單說明如下，將 DNA 打斷成 150-300 bp 的片段，二端再各接上一段 adapter 序列，透過橋式聚合酶鏈鎖反應進行增幅，過程使用標記特定可移除螢光分子的 dNTP 與反應試劑，重覆進行螢光標記移除與偵測，在定序晶片上同時對數百萬條 DNA 進行反應，以達到快速且大量的定序結果。

#### 1.3.4 利用次世代定序分析微生物群落多樣性


相較於微生物分離培養法的諸多限制，次世代定序技術有助於全面性評估微生物多樣性。16S rRNA 基因擴增子定序（16S ribosomal RNA gene amplicon sequencing）即為將次世代定序技術應用於 16S rRNA 標識基因分析的技術，16S rRNA 基因長度約為 1500 bp，其轉錄之 rRNA 可組成核醣體小次單元體（small subunit, SSU），在細菌中 16S rRNA 基因序列同時保有物種鑑定必備的兩種特性：保守性及特異性，藉由引子黏合保守性高的

序列區域進行擴增，產物則包含序列變異較高且具物種專一性的區域，便可藉由將變異區序列與已知物種 DNA 資料庫相互比對，來確認細菌所屬之類群。

Philippot 等人 (2013) 利用 454 次世代定序平台，對 27 種基因型玉米和糖用甜菜的根圈土壤細菌群落組成進行分析，發現物種及品種的差異會影響特定的根圈細菌組成和結構，惟整體菌群組成受到環境因子影響仍較大。在田間管理部分，Navarro-Noya 等人 (2013) 發現慣行耕犁土壤中放線菌門 (Actinobacteria)、 $\beta$ -變形菌門 ( $\beta$ -Proteobacteria) 和厚壁菌門 (Firmicutes) 等分類群的相對豐度較非耕犁土壤高，同時擬桿菌門 (Bacteroidetes)、 $\delta$ -變形菌門 ( $\delta$ -Proteobacteria)、疣微菌門 (Verrucomicrobia) 等分類群相對豐度則較低；Chávez-Romero 等人 (2016) 比較不同殘株留置處理的玉米輪作田區根圈土壤微生物群落，發現在細菌分類階層一屬的方面，作物殘株留置會誘導與有機物分解相關微生物類群的增加；Wemheuer 等人 (2017) 對 3 種農地草種施以不同耕犁強度處理，結果顯示種間差異造成內共生菌群組成不同，且田間管理方式影響植物生長促進和氮代謝相關細菌的豐度。

#### 1.4 研究目的

植物內共生微生物對作物生長發育密切相關，進一步也影響作物產量及品質，許多有益內共生微生物已被證實具有促進作物生長、增進作物逆境耐受性的能力；因應氣候及環境變遷對農業生產造成的影響，政府極力推動永續農業以維持農業生產、生活及生態之平衡，並鼓勵農民轉向友善環境或有機農業管理模式，目前已有許多田間動植物之多樣性及指標物種建立的相關研究，微生物多樣性對植物養分吸收及逆境抗性息息相關，然永續耕作模式對微生物的影響目前研究相較有限，過去國內外研究多針對土壤或根圈微生物進行調查，且研究結果顯示微生物群落組成容易受到土壤特性或作物種類影響而有所變



異，難以釐清耕作模式對微生物多樣性的影響，而作物內共生菌群落除了作物本身特性的差異，目前仍不清楚內共生菌相是否可穩定且適時地反映外在耕作模式，並從中鑑定指標菌種，另一方面，在不同生育時期作物內共生菌群落組成變化尚未有相關研究，有益微生物形成內共生的時間點及各生育期內的微生物群落組成關係著這些微生物所能產出之效益，因此瞭解這些資訊將有利於未來施用微生物肥料或農藥時間點的參考。為增進耕作模式及生育時期對內共生菌組成的相關知識，本研究以苗栗縣苑裡鎮慣行及有機水稻田為樣區，調查水稻根部內共生細菌群落組成，以及不同生育時期根部內共生細菌群落多樣性之變化，試圖解決以下問題：

- (1) 透過調查所得資料進行水稻根部內共生細菌群落多樣性、均勻性、群落組成歧異度、細菌功能預測等相關分析，以瞭解慣行和有機管理對水稻根部內共生細菌群落組成之影響。另從生態功能角度探討水稻根部內共生細菌在不同耕作環境下扮演的角色，並建立耕作模式對應的指標內共生物種。
- (2) 分析相同耕作模式下，水稻根部內共生細菌群落隨著生育時期推演的變化，闡明水稻生育期與根部內共生微生物多樣性及群落組成之間的關係，為往後選擇合適時期進行各項管理措施提供參考，發揮有益微生物的作用，抑制病原菌的發展，提高水稻抗逆境、抗病能力，及提高品質及產量，為實現農業永續發展提供科學依據。



## 第2章 材料及方法

### 2.1 樣品採集

試驗水稻 (*Oryza sativa* L.) 植株種植於苗栗縣苑裡鎮，分別取自慣行耕作及有機耕作田區，2018 年第 2 期作慣行管理田區由黃東明農友管理，有機管理田區由江進富農友管理；2019 年第 1 期作的慣行管理田區由邱建朗和謝松文農友管理，有機管理田區由謝松文和劉貴華農友管理；2019 年第 2 期作慣行管理田區由邱建朗和謝松文農友管理，有機管理田區由徐阿米農友管理 (表 1)。每期作秧苗期、分蘖期分別於慣行耕作田區及有機耕作田區進行水稻植株採樣 (2018 年第 2 期作僅於分蘖期採樣)，將 (1) 不同管理方式：有機管理、慣行管理，及 (2) 不同生育期：秧苗期、分蘖期，作為本試驗探討主要變因。

### 2.2 田間施作方法

本試驗 2018 年第 2 期作有機和慣行田種植水稻品種為臺粳 9 號，2019 年 2 個期作慣行田區種植水稻品種皆為台南 11 號 (表 1)，病蟲害及肥培管理遵照試驗改良場所建議方式，種植期間施用複合肥料、過磷酸鈣、硫酸銨等作基肥及追肥，2019 年第 1 期作 2 個有機田區種植水稻品種分別為台粳 8 號、桃園 3 號，2019 年第 2 期作水稻種植品種皆為越光 (表 1)，有機田區農友皆遵照「有機農糧作物台灣良好農業規範」進行管理，並視需求施用有機農業適用之粕類或粒狀有機質肥料。

### 2.3 樣本採樣與處理

有機及慣行田區隨機選取 5 個位置點進行水稻樣本採集，以減少田區內栽種位置造成之差異。秧苗期水稻樣本從植株基部往外 5 公分的距離向下挖 5 公分，分蘖期水稻樣本從植株基部往外 10 公分的距離向下挖 10 公分，將植株連根挖起取樣。採集之水稻樣品以低溫運送至實驗室後，先剝除植株根基部大部分的田土，再以清水淋洗殘餘土壤，直至根部呈潔淨狀；之後將根部浸泡於 1

%市售漂白水 (Clorox®) 進行表面消毒 1 分鐘，再用無菌水清洗 4-5 次以去除殘留的漂白水，隨即將樣品以液態氮冷凍，保存於-80 °C 冰箱以待 DNA 萃取。



#### 2.4 內共生細菌 DNA 萃取

使用 QIAGEN DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen, 德國) 萃取水稻根部 DNA，參照廠商使用說明，操作方法簡述如下：

- (1) 將水稻的根以液態氮研磨至細粉。
- (2) 取 0.25 g 的粉末，置於 PowerBead Tube，震盪混和。
- (3) 加入 60  $\mu$ L C1 溶液，震盪 30 秒後上下反轉 30 次，重複 3 次以打破細菌細胞壁。
- (4) 以 10,000  $\times$  g 離心 30 秒以分離土壤。
- (5) 取出上清液至 Collection Tube，加入 250  $\mu$ L C2 溶液，震盪混和。
- (6) 置於冰上 5 min 以沉澱非 DNA 之有機與無機雜質。
- (7) 以 10,000  $\times$  g 離心 1 min 後取上清液至新 Collection Tube，加入 200  $\mu$ L C3 溶液，震盪混和。
- (8) 置於冰上 5 min，以加強去除有機酸、蛋白質及細胞殘骸等雜質。
- (9) 以 10,000  $\times$  g 離心 1 min 後取上清液至新 Collection Tube，加入 1,200  $\mu$ L C4 溶液震盪混和。
- (10) 將混合液加至 MB Spin Column 並以 10,000  $\times$  g 離心 1 min，此時 DNA 會因 C4 溶液的高鹽濃度而與矽膠膜結合。
- (11) 加入 500  $\mu$ L C5 溶液以 10,000  $\times$  g 離心 30 s，以清洗多餘鹽類、腐植酸及其他雜質。
- (12) 再以 10,000  $\times$  g 離心 1 min，以去除殘餘酒精。
- (13) 將 MB Spin Column 置於微量離心管 (eppendorf)，加入 100  $\mu$ L C6 溶液 (elution buffer) 將 DNA 回溶後以 10,000  $\times$  g 離心 30 s。
- (14) 將 DNA 樣品保存於-80 °C 冰箱。



## 2.5 16s rRNA 基因次世代定序

本試驗水稻根 DNA 樣品次世代定序與生物資訊初步分析委託圖爾思生物科技股份有限公司 (Biotools co., Ltd) 進行。

### 2.5.1 16S rRNA 基因聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)


針對細菌 16S rRNA 上 V3-V4 高度變異區域 (high variable regions, HVRs) 進行 PCR 專一性擴增放大及定序，以鑑定微生物之種類與群落。使用之引子對為 319F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 及 806R (5'-GACTACHVGGGTAT CTAATCC-3')，以 PCR 套組 KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, 瑞士) 進行反應，反應條件如表 2 所示。所得之產物以 1.5% agarose 進行電泳，選擇具有 500 bp 附近明亮條帶的樣品，並使用 AMPure XP beads (Beckman Coulter, 美國) 進行純化，以用於後續建庫及定序。

### 2.5.2 樣本基因體建庫及定序

根據 Illumina 16S Metagenomic 建庫作業程序 (Metagenomic Sequencing Library Preparation procedure (Illumina, 美國)) 進行基因體建庫，步驟簡述如下：使用 16S rRNA 基因 PCR 擴增子和含有雙索引 (dual indices) 及轉接子 (adapters) 的 Nextera XT Index Kit (Illumina) 進行第二階段擴增 (secondary PCR)，接著使用 Qubit 4.0 螢光定量儀 (Thermo Scientific, 美國) 和 Qsep100TM 系統評估接有索引序列的 PCR 產物 (indexed PCR product) 品質，品質確認後混合等量的 indexed PCR product 作為定序庫。建庫完成後在 Illumina MiSeq 平台上進行定序，生成成對的 300 bp 片段 (paired 300-bp reads) 供後續分析之用。

### 2.5.3 定序資料處理

將序列資料去除條碼 (barcode) 和 PCR 引子 (primer) 序列後，使用 FLASH (v1.2.11) 對每個樣品的讀序 (reads) 進行拼接 (最小重複 (overlap))



長度 10 bp；重複區域最大錯配率為 0.1)，拼接後的序列稱為 raw tags。接著使用 Qiime (v1.9.1) 對 raw tags 進行品質過濾處理，過濾條件如下：(1) tags 截取：將 raw tags 連續 3 個鹼基 q-score ( $q$ ) < 19 的 tags 從第一個低品質鹼基位點截斷；(2) tags 長度過濾：tags 經截取後進一步過濾掉連續高品質鹼基長度小於 tags 長度 75% 的 tags；過濾後獲得 clean tags。進一步對 clean tags 使用 UCHIME 演算法與資料庫 (GOLD database) 檢測嵌合體序列 (chimeric reads) 並去除之，得到用於後續分析的 effective tags。

## 2.6 生物資訊分析

### 2.6.1 OTU 聚類和物種注釋

使用 USEARCH 軟體 (v7.0.1090) 中的 UPARSE 演算法對所有樣品全部的 effective tags 進行 OTU (operational taxonomic unit) 聚類，以 97% 的一致性 (identity) 將序列聚類成為 OTUs，同時去除 singleton，並依照演算法將 OTUs 中出現頻率最高的序列作為 OTUs 的代表序列。同時使用 RDP Classifier (v2.2) 以 Silva 資料庫 (v132) 中的 core set 對 OTUs 代表序列進行物種注釋分析，依據得到之分類資訊分別在各個分類階層：kingdom (界)、phylum (門)、class (綱)、order (目)、family (科)、genus (屬)、species (種) 統計各樣本的微生物菌群落組成，在均一化前剔除粒線體 (mitochondria) 和葉綠體 (chloroplast) 相關之 OTUs，避免植物細胞中粒線體和質體 DNA 的影響。最後對各樣品序列資料以 tags 總數最小的為基準，進行均一化處理。資料處理過後，方進行後續的  $\alpha$ -多樣性分析和  $\beta$ -多樣性分析。

### 2.6.2 樣品複雜度分析 ( $\alpha$ -多樣性； $\alpha$ -diversity)

使用 Qiime (v1.9.1) 計算 observed-species、Shannon、Simpson、ACE (abundance-based coverage estimator)、Chao1 及 PD\_whole\_tree (Phylogenetic diversity) 指數。





### 2.6.3 樣本分組比較分析 ( $\beta$ -多樣性; $\beta$ -diversity)

使用 R (v3.3.1) 計算 Bray-Curtis distance。繪製分析圖: PCA (principal component analysis) 使用 factoextra 和 ggplot2 套件。

### 2.6.4 環境因子分析

為了檢驗環境因子 (pH、有機質含量、土壤鈣等) 與整個微生物群落的相關性, 使用 R 的 vegan 套件進行 Mantel test 分析: 將環境變數進行歐式距離 (euclidean distance) 計算作成距離矩陣, 接著採用 Spearman correlation 檢驗環境變數距離矩陣與微生物群落 Bray-Curtis 距離矩陣之間的相關性 (permutations 置換次數設為 9,999 次)。使用 R 的 phyloseq 及 microbiome 套件進行環境因子與微生物群落的典型相關分析 (canonical correlation analysis, CCA)。

### 2.6.5 基因功能預測


使用 PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states; v1.1.1) 搭配 Greengenes 資料庫, 基於細菌基因體的 16S rRNA 序列推測其與共同祖先的基因功能關係。使用 Tax4Fun 搭配 Silva 資料庫, 基於 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes And Genomes) 原核基因體註釋資訊的序列, 直接進行基因功能預測。

### 2.6.6 敏感物種 (OTUs) 分析

使用 R 的 indispesies 套件中 multipatt 函數確認微生物群落中個別物種 (OTUs) 與特定管理方式、生育時期的相關性, 接著使用 edgeR 套件的 glmLRT 進行概似比檢定 (likelihood ratio test, LRT) 以鑑定對管理方式或生育期敏感的 OTUs。

### 2.6.7 熱圖 (heatmap) 製作

不同生育期及管理方式相對豐度具差異的 OTU 以 R 的 pheatmap 套件繪製熱圖, 以歐氏距離 (euclidean distance) 為計算基準並採最遠聚合法



(complete-linkage) 進行階層式分群 (hierarchical clustering)。不同生育期及管理方式相對豐度具差異的預測基因功能以 R 的 ComplexHeatmap 套件繪製熱圖，以歐氏距離為計算基準並採最遠聚合法進行階層式分群，並以 KEGG level 1 功能分類拆分 (split) 各基因功能。

## 2.7 數據統計分析

使用 R stats (v4.0.2) 套件進行統計分析，顯著水準 (level of significance,  $\alpha$ ) 訂為 0.05。ANOVA (analysis of variance) 分析使用 R 基本套件 anova 函數，ANOSIM (analysis of similarities) 和 PERMANOVA (permutational multivariate analysis of variance, Adonis) 分析分別使用 R vegan 套件的 anosim 和 adonis 函數。採用 Kruskal-Wallis 檢定及 Dunn 事後比較檢定 (post-hoc test) 進行  $\alpha$ -多樣性指數組間差異檢驗。利用 R 執行組間 t-test 檢驗組間物種差異顯著性。

## 第3章 結果



### 3.1 試驗取樣點環境概況

本次試驗取樣之水稻栽種於苗栗縣苑裡鎮，管理方式及栽培品種如材料及方法所述，田區位置如圖 1 所示，各取樣田區之間距離均小於 1 公里，於水稻秧苗期及分蘗期取樣，每塊田區取五叢，第 1 期作和第 2 期作取樣時間分別為當年度 2 月及 4 月、8 月及 9 月，對照中央氣象局苑裡測站的溫度及雨量資料發現，第 1 期作 2 個取樣時間點的環境溫度均較第 2 期作低，降雨量的部分，在第 1 期作是分蘗期高於秧苗期，第 2 期作則反之（圖 2），可能分別受到梅雨季及颱風季的影響。另委託苗栗區農業改良場進行取樣田區的土壤檢測，檢測項目包括土壤 pH 值、電導度 (electrical conductivity, EC)、有機質含量、有效性磷、可交換性鉀、可交換性鈣、可交換性鎂、飽和鉀含量、飽和鈣含量、飽和鎂含量等土壤化學性質，檢測結果顯示所有有機管理之取樣田區的 pH 測值均高於慣行管理田區，在 2019 年第 1、2 期作有機管理的取樣田區，有機質含量較慣行管理田區高，在 2018 年第 2 期作及 2019 年第 1 期作有機管理取樣田區，可交換性鈣含量亦較慣行管理田區高（表 3）。接著進行 2019 年第 1 和第 2 期作水稻根內共生菌組成的相似性分析 (ANOSIM) 以確認後續分析結果之差異是否主要源自組間差異，結果顯示，R 值均為正數，僅少數樣品的組間比較結果未達顯著水準 ( $P > 0.05$ ) (表 4)，表示多數情況下各樣品組間差異大於組內差異，即確認來自同一取樣田水稻叢根內共生菌組成的相似性大於其他取樣田的樣品組別。另外，組間置換多元變方分析 (PERMANOVA) 結果則顯示，除 2019 年第 1 期作秧苗期慣行謝-慣行邱 (C1Xie-C1Chiu)、慣行邱-有機劉 (C1Chiu-O1Liu) 和 2019 年第 2 期作分蘗期有機徐 1-有機徐 2 (O2Shiu1\_s-O2Shiu2\_s) 等 3 組比較外，不同取樣田水稻根內共生菌組成具有差異 (表 4)。




### 3.2 水稻根部內共生細菌群落組成與生育地土壤性質關係

為瞭解土壤環境對水稻根內共生菌組成的影響，將細菌群落 OTUs 資料轉換為 Bray-Curtis distance 矩陣、土壤環境參數轉換為 Euclidean distance 矩陣後，計算 Spearman's  $\rho$  值以檢定土壤環境效應（即 Mantel Test）。結果顯示 2019 年第 1 期作的土壤 pH 值、有機質含量、飽和鈣濃度和可交換性鈣等參數與水稻根內共生菌組成變異具有顯著的正相關（Spearman's  $\rho > 0$ ,  $P < 0.05$ ），其中有機質含量、飽和鈣濃度具有較大相關性，且 2019 年第 2 期作分藥期分析資料也得到相似的結果（表 5）。此外也將細菌 OTUs 距離矩陣資料與土壤環境參數進行典型相關分析（canonical correlation analysis, CCA）以鑑定主要影響細菌群落組成的環境因子，2019 年兩期作樣品的 CCA 分析結果皆顯示水稻根內共生菌組成與土壤 pH 值、有機質含量、EC 值等環境因子有關，慣行管理樣區水稻內共生菌豐度與 pH 值、有機質含量呈現負相關，然而土壤 EC 值在第 1 和第 2 期作樣品的分析結果分別呈負和正相關；反之，有機管理樣區的水稻內共生菌豐度則在二個期作分析結果中皆顯示與 pH 值、有機質含量呈現正相關（圖 3A、B）。綜合分析所得結果說明，水稻根內共生細菌組成與生育地的土壤在一定程度上相關有機質含量、pH 值及土壤鹽類，而這些土壤特性可能受到耕作模式的影響，進而調整菌群組成。

### 3.3 水稻根部內共生細菌門組成在不同期作及管理方式下的差異


將本次試驗水稻根樣品 16S 擴增子定序結果，進行 OTU 聚類和物種注釋後，得到水稻根部內共生細菌門組成的結構。結果顯示，2019 年第 1 期作樣品雖然來自不同採樣地點，田區管理方式亦不同，於同一生育期（秧苗期 / 分藥期）具有相似的細菌門組成結構，在秧苗期變形菌門（Proteobacteria）、厚壁菌門（Firmicutes）、擬桿菌門（Bacteroidetes）約分別占 20%、30%、25%，分藥期的樣品中，變形菌門約佔 80%（圖 4）。第 2 期作部分，2018 年僅在一塊慣行及一塊有機管理田區採集分藥期樣品，2019 年則在二塊慣行及二塊有機管



理田區採集秧苗及分蘖期樣品，2018 年的樣品分析結果顯示，慣行管理田區水稻根部內共生菌落組成以變形菌門、放線菌門、厚壁菌門為主，佔比分別約為 35%、30%、21%，有機管理田區水稻根部內共生菌落則以變形菌門為優勢，佔比 77%，其次為擬桿菌門 (9%)，顯示不同管理方式下可能影響水稻根部內共生菌門組成 (圖 5A)，但 2019 年第 2 期作樣品與 2018 年第 2 期作、同年第 1 期作的菌群組成相異，結果顯示採樣地點、管理方式及生育期的差異對該期作樣品內共生細菌的門組成結構並無明顯影響，主要以變形菌門為最多，其次為厚壁菌門及擬桿菌門，三門細菌的佔比約 80% (圖 5B)。綜合以上結果，本試驗於 2018 年第 2 期作樣品觀察到有機和慣行耕作的水稻根部內共生細菌組成在「門」的分類階層上有差異，於 2019 年第 1 期作樣品觀察到不同生育期造成內共生細菌門組成有差異，但 2019 年第 2 期作的樣品卻不受採樣地、管理及生育期等因子影響。

#### 3.4 水稻根部內共生細菌群落組成在不同期作 $\alpha$ -多樣性的差異

生態學上以  $\alpha$ -多樣性分析說明樣本內的物種歧異程度，在微生物體學上也可透過  $\alpha$ -多樣性分析來反映樣品內微生物群落結構的歧異度。利用本試驗分析所得之水稻根部內共生細菌群落(OTUs)資料，計算 Chao1、Shannon、Simpson、Observed OTUs、ACE 和 Phylogenetic diversity (PD\_whole\_tree) 等  $\alpha$ -多樣性指數，並比較不同管理方式及不同期作下細菌群落的豐富度及均勻度，以 ANOVA 分析及 Kruskal-Wallis 檢定以瞭解各組組間差異之顯著性。Chao1 指數可用以估計細菌群落物種總數 (Chao, 1984)，分析結果顯示，2019 年第 1 期作秧苗期的各組樣本之間無顯著差異，但在分蘖期僅 O1Liu 的 Chao1 指數顯著高於 O1Xie 和 C1Xie；同年第 2 期作秧苗期的 C2Xie 樣品指數顯著低於 O2Shiu，分蘖期樣品中則以 O2Shiu2 樣品為最低，而兩生育期之間，C2Xie 樣品在分蘖期 Chao1 指數顯著高於秧苗期 (表 6)，顯示 Chao1 指數未明顯受管理模式的影響。Shannon 指數是綜合評估細菌群落的豐富度和均勻度，可反映

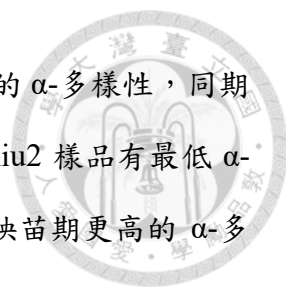


群落的多樣性 (Shannon, 1948)，結果顯示 2018 年第 2 期作分藥期樣品中，慣行栽培組的 Shannon 指數較高，2019 年第 1 期作所有樣品間卻無顯著差異，2019 年第 2 期作 C2Xie 秧苗期樣品的多樣性較低，但在分藥期各組間則無顯著差異，也不受生育期之影響 (表 6)。Simpson 指數用以估計群落中連續兩次抽樣可得到同一物種的概率，計算過程亦同時考慮群落的豐富度和均勻度 (Simpson, 1949)，分析結果與前述之 Shannon 指數分析結果相似 (表 6)。

Observed OTUs 即樣品中實際 OTUs 總數，用以估計細菌群落物種數，結果顯示 2019 年第 1 期作秧苗期樣品間 Observed OTUs 無顯著差異，分藥期樣品則以 O1Liu 樣品最高，O1Xie、C1Xie 較低，另外 O1Xie 的 Observed OTUs 在秧苗期高於分藥期；同年第 2 期作秧苗期樣品中 O2Shiu1 的 Observed OTUs 顯著高於 C2Xie，分藥期則以 O2Shiu2 最低，且 C2Xie 在分藥期相較秧苗期有更高的 Observed OTUs (表 6)。ACE 指數概念近似 Chao1 指數，將 OTUs 分成數量豐富和稀少的兩群，以相對比例來估算細菌群落物種總數 (Chao and Lee, 1992; Chao and Yang, 1993)，2019 年第 1 期作秧苗期樣品間 ACE 指數無差異，分藥期則以 O1Liu 的 ACE 指數最高而 O1Xie 最低，2019 年第 2 期作秧苗期 O2Shiu 的 ACE 指數最高而 C2Xie 最低，分藥期則以 O2Shiu2 較其他樣品低，另外 C2Xie 的 ACE 指數在分藥期高於秧苗期 (表 6)。

Phylogenetic diversity 為基於演化樹距離關係估算樣品細菌群落多樣性的指數 (Faith, 1992)，2019 年兩個期作秧苗期樣品間 Phylogenetic diversity 無差異，第 1 期作分藥期樣品以 O1Xie 的 Phylogenetic diversity 顯著低於其他樣品，第 2 期作分藥期則以 O2Shiu2 顯著低於其他樣品，此外 C2Xie 在分藥期有較秧苗期更高的 Phylogenetic diversity (表 6)。

綜合各  $\alpha$ -多樣性指數比較結果，2018 年第 2 期作分藥期的慣行栽培樣品有較高的 Shannon 指數；2019 年第 1 期作秧苗期各樣品間  $\alpha$ -多樣性無顯著差異，同期作分藥期下，除 Shannon 及 Simpson 指數外，其他指數顯示 O1Xie 樣品有較低的  $\alpha$ -多樣性；2019 年第 2 期作秧苗期下，




除 Phylogenetic diversity 外，各指數顯示 C2Xie 樣品有最低的  $\alpha$ -多樣性，同期作分蘗期除 Shannon 及 Simpson 指數外，各指數顯示 O2Shiu2 樣品有最低  $\alpha$ -多樣性，此外這些指數也顯示 C2Xie 樣品在分蘗期具有較秧苗期更高的  $\alpha$ -多樣性。

為瞭解 2019 年第 1 和第 2 期作各組樣品物種多樣性，於不同栽培管理、不同生育期是否有差異，及此 2 因子間是否具有交感作用，利用 Chao1 指數進行變方分析。分析結果顯示，2019 年第 1 期作不同管理方式、不同生育期樣品間 Chao1 指數均無顯著差異，且管理方式、生育期 2 因子間無交感作用 ( $p > 0.05$ )，2019 年第 2 期作不同管理方式下  $\alpha$ -多樣性指數在各組樣品之間亦無顯著差異，但不同生育期間樣品具顯著差異 ( $p = 0.00459$ )，且管理方式和生育期之間具顯著的交感作用 ( $p = 0.01443$ ) (表 7)。為釐清交感作用的來源，進一步在同一管理方式下分析不同生育時期、以及在同一生育期下分析不同管理方式的 Chao1 指數，結果發現在秧苗期及分蘗期下不同管理方式的 Chao1 指數雖有差異，但未達顯著水準 ( $p = 0.0703$ 、 $0.0983$ )；在有機栽培下 Chao1 指數不受生育期的影響，而慣行栽培下 Chao1 指數則受生育期之不同而呈現顯著差異 ( $p = 0.000183$ ) (附表 3)。由前述結果可得知 2019 年第 2 期作不同生育期間樣品 Chao1 指數差異主要源自於慣行管理樣品。此外為進一步確認不同管理方式間水稻根內生細菌  $\alpha$ -多樣性是否不同，將 2019 年全年資料合併以比較有機管理及慣行管理樣品，雖然 Shannon 指數的比較結果呈現差異趨勢 ( $p = 0.0666$ )，且以有機管理方式樣品具較高多樣性指數，但差異仍未達顯著，而其他  $\alpha$ -多樣性指數比較結果皆呈現無顯著差異 (結果未呈現)。

### 3.5 水稻根部內共生細菌群落組成在不同期作 $\beta$ -多樣性的差異

$\beta$ -多樣性為樣本組間的物種歧異程度，利用本試驗分析所得水稻根部內共生細菌群落資料，計算 Bray-Curtis distance 等  $\beta$ -多樣性指標，以瞭解不同處理之樣品間細菌群落組成的相似程度。基於 Bray-Curtis distance 分析，進行置換



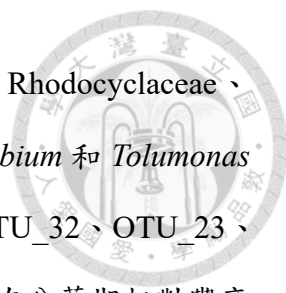
多元變方分析，發現 2018 年第 2 期作及 2019 年 2 個期作的樣品間內共生菌  $\beta$ -多樣性皆受到管理方式影響而具顯著差異 (表 8)，而另外評估 2019 年第 1 和第 2 期作樣品受生育期的影響，結果顯示，二個期作樣品間內共生菌  $\beta$ -多樣性亦受生育期而具顯著差異，且在這 2 個期作管理方式及生育期間均存在著交互作用，其中 2019 年第 2 期作樣品的交互效應更為明顯 (表 8)。進一步分析同一生育期下不同管理方式之樣品的組間差異，發現 2019 年第 1 期作秧苗期樣品間細菌群落組成在不同管理方式下並無差異 ( $p=0.09$ )，而分藥期樣品間則具有顯著差異 ( $p<0.001$ ) (附表 1)；2019 年第 2 期資料則顯示秧苗期及分藥期兩生育期下，不同管理方式間細菌群落組成皆有差異，惟分藥期較秧苗期更為明顯 (附表 2)；由上述的分析結果可知，管理方式對內共生菌  $\beta$ -多樣性的影響在分藥期較為顯著。

接下來將  $\beta$ -多樣性指標資料做線性關係降維、萃取，以進行主成分分析 (principal component analysis, PCA)，將不同組別的內共生細菌群落組成差異圖像化。首先分析 2018 年第 2 期作的樣品，結果顯示第 1 和第 2 主成分(PC1、PC2) 即可解釋 29.7 及 17.8% 的變異量，且兩組樣品間分群明顯，其中有機管理組各樣品點較集中，慣行管理組樣品點較分散 (圖 6)；2019 年第 1 期作各組樣品可由第 1 和第 2 主成分共同解釋 53.2 % 變異量，不同生育期間樣品點依第 1 主成分變異方向得到明顯的分群，即秧苗期、分藥期水稻根內共生細菌群落組成明顯分異，而不同管理方式的樣品分群較不明顯 (圖 7A)，進一步將秧苗期、分藥期樣品分別進行主成分分析後，發現秧苗期不同組樣品點分群不明顯 (圖 8A)，但分藥期的樣品可依管理方式而分群，其中有機管理方式樣品呈現相互交疊 (圖 8B)，顯示在分藥期不同管理方式造成之根內共生細菌群落組成差異下較秧苗期明顯；2019 年第 2 期作樣品資料可由第 1 和第 2 主成分共可解釋 60.1 % 的變異量，相似於第 1 期作，不同生育期樣品依第 1 主成分變異方向得到分群，其中秧苗期 4 群樣品依第 2 主成分變異方向分群，分藥期樣品分



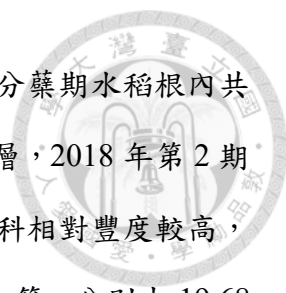
群則不明顯 (圖 7B)，將秧苗期、分蘖期樣品分別進行主成分分析後，發現秧苗期下有機、慣行等不同管理方式樣品依第 1 主成分方向分群，且有機管理樣品相互聚集 (圖 9A)，而分蘖期下不同管理方式樣品分群不明顯 (圖 9B)。

為了進一步瞭解上述水稻根內共生細菌群落組成中，在不同生育期及管理方式造成組間差異的主要菌群，將 2019 年第 1 和第 2 期作 OTU 相對豐度 (relative abundance) 依照不同處理進行比較分析後，鑑定出具顯著差異的 OTUs，並根據相對豐度繪製成熱圖 (Heatmap)。在管理方式方面，2019 年第 1 期作分析結果並無具顯著差異的 OTU (結果未呈現)，但在同年第 2 期作分析結果顯示共有 10 個 OTUs 在不同管理方式間相對豐度顯著差異 (圖 11)，其中 OTU\_89、OTU\_96 和 OTU\_213 在有機管理方式下相對豐度較高，物種分類分別屬 *Bacillus*、*Mobilitalea*、*Gallionellaceae* 等科或屬，且 *Gallionellaceae* 在有機管理下相對豐度達 1.3%；在慣行管理方式下 OTU\_5、OTU\_4、OTU\_7、OTU\_57、OTU\_3、OTU\_16 和 OTU\_13 等相對豐度較高，鑑定結果分別為 *Pleomorphomonas*、*Bradyrhizobium*、*Pseudolabrys*、*Tolumonas*、*Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia*、*Uliginosibacterium*、*Paenibacillus* 等屬，且 *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 在慣行管理下相對豐度達 18.83 %。在生育期方面，2019 年第一期作有 8 個 OTUs 具顯著差異 (圖 10)，其中 OTU\_26、OTU\_410 和 OTU\_25 在秧苗期相對豐度較高，物種分類分別屬 *Arcobacter*、*Kosakonia* 和 *Clostridium beijerinckii*，*C. beijerinckii* 在秧苗期樣品相對豐度達 3.01 %，而 OTU\_6、OTU\_12、OTU\_18、OTU\_37 和 OTU\_60 在分蘖期相對豐度較高，物種分類分別屬 *Acidovorax delafieldii*、*Pleomorphomonas*、*Azospirillum*、*Aeromonas*、*Azospira*，且 *A. delafieldii* 在分蘖期樣品相對豐度達 4.49 %；同年第 2 期作相對豐度具有差異的 OTU 共有 17 個 (圖 11)，其中 OTU\_520、OTU\_53、OTU\_39、OTU\_213、OTU\_65、OTU\_16、OTU\_98、OTU\_78 和 OTU\_57 在秧苗期相對豐度較高，物種分類結果分別為



*Curvibacter*、*Hydrogenophaga*、*Ideonella*、*Gallionellaceae*、*Rhodocyclaceae*、*Uliginosibacterium*、*Clostridium\_sensu\_stricto\_8*、*Ancalomicrobium* 和 *Tolomonas* 等科或屬，其中 *Hydrogenophaga* 相對豐度達 4.38 %，而 OTU\_32、OTU\_23、OTU\_6、OTU\_5、OTU\_4、OTU\_7、OTU\_20 和 OTU\_3 等在分藥期相對豐度較高，物種分類結果分別為 *Mycobacterium*、*Rhizomicrobium*、*Methylocystis*、*Pleomorphomonas*、*Bradyrhizobium*、*Pseudolabrys*、*Sphingomonas* 和 *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia*，其中 *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 相對豐度達 23.41 %。

另一方面，以物種分類階層 (taxonomic rank) 作為比較基礎，分析不同管理方式及生育期下水稻內共生細菌相對豐度變化情形。首先針對受到管理方式不同而在秧苗期及分藥期樣品中相對豐度較高的內共生細菌分類群進行說明，2018 年第 2 期作在有機管理方式下，分藥期的水稻根內共生細菌相對豐度較高的為變形菌門，而慣行管理方式下相對豐度較高的為酸桿菌門 (Acidobacteria)、放線菌門 (Actinobacteria) 和綠彎菌門 (Chloroflexi) (表 9)；2019 年第 1 期作有機管理方式下，水稻秧苗期根內共生細菌相對豐度較高的為梭桿菌門 (Fusobacteria)，分藥期則為擬桿菌門 (表 9)，而慣行管理方式下，秧苗期水稻根內共生細菌相對豐度較高的為梭桿菌門，在分藥期中則為 Patescibacteria (表 9)；2019 年第 2 期作有機管理方式下，秧苗期水稻根內共生細菌相對豐度較高的為綠彎菌門和螺旋菌門 (Spirochaetes)，分藥期則為 Negativicutes，在慣行管理方式下，秧苗期水稻根內共生細菌相對豐度較高的為厚壁菌門和 Epsilonbacteraeota，在分藥期較高的則是酸桿菌門、Patescibacteria、硝化螺旋菌 (Nitrospirae) 和 Omnitrophicaeota。綜合上述分析結果，有機管理田區的水稻根內共生細菌相對豐度較高者，在門或綱的分類階層於不同期作並無一致性，而慣行管理田區樣品則可見 Patescibacteria 和 Bacilli 於分藥期相對豐度較高。



以科、屬等較低分類階層比較 2018 及 2019 年第 2 期作分蘗期水稻根內共生細菌在不同管理方式間具有差異的分類族群。在「科」階層，2018 年第 2 期作分蘗期水稻在有機管理方式下以 Enterobacteriaceae 等 5 科相對豐度較高，其中 Enterobacteriaceae、Rhodocyclaceae 和 Chitinophagaceae 等，分別占 19.68 %、17 %和 5.22 %，慣行管理方式下則以 Streptomycetaceae 等 14 科相對豐度較高，其中 Streptomycetaceae 和 Bacillaceae 為最高，分別占 18 %和 2.5 % (圖 12 A)；2019 年第 2 期作分蘗期水稻在有機管理方式下以 Rhizobiaceae 等 5 科相對豐度較高，其中 Rhizobiaceae 即占 5.3 %，慣行管理下以 Rhodanobacteraceae 等 5 科相對豐度較高，但僅 Rhodanobacteraceae 占比超過 1 % (圖 12 B)。在「屬」階層下，2018 年第 2 期作分蘗期水稻在有機管理方式下以 *Uliginosibacterium* 等 3 屬相對豐度較高，其中 *Uliginosibacterium*、*Erwinia* 等，分別占 15.07 %和 6.1 %，慣行管理方式下則以 *Bacillus* 等 14 屬相對豐度較高，其中 *Bacillus* 即占 2.35 % (圖 12 C)；2019 年第 2 期作分蘗期水稻在有機管理方式下以 *Azospirillum* 等 5 屬相對豐度較高，其中 *Azospirillum* 占 1.72 %，慣行管理方式下以 *Hydrogenispora* 等 5 屬相對豐度較高，但其中占比最高的 *Hydrogenispora* 亦僅占 0.8 % (圖 12 D)。


連續三個期作的調查結果顯示，Enterobacteriaceae 和 Bacillaceae 等 2 科、*Bacillus* 等 1 屬內共生細菌相對豐度均因不同管理方式下而有所差異，其中 Enterobacteriaceae 細菌在有機栽培下相對豐度較高，Bacillaceae 和 *Bacillus* 等細菌相對豐度則在 2 個年度的第 2 期作水稻樣品中出現相反趨勢，2018 年以慣行管理下相對豐度較高，2019 年在有機管理下相對豐度較高。

接著以 2019 年 2 個期作水稻樣品進行分析，以鑑定受生育期影響而相對豐度顯著較高的根內共生細菌分類群。結果顯示 2019 年第 1 期作在秧苗期較高的為擬桿菌門、Epsilonbacteraeota 和厚壁菌門，分蘗期較高的為 Patescibacteria、Planctomycetes 和變形菌門 (表 10)。2019 年第 2 期作秧苗期



相對豐度較高為厚壁菌門、Epsilonbacteraeota 和螺旋菌門，在分蘗期相對豐度較更高的為酸桿菌門、Verrucomicrobia、Patescibacteria 和 Planctomycetes (表 10)。

以科、屬等分類階層比較不同生育期間相對豐度具顯著差異的分類群，在「科」階層下，2019 年第 1 期作秧苗期的樣品以 Veillonellaceae 等 2 科的細菌相對豐度較高，分蘗期下則以 Burkholderiaceae 等 6 科相對豐度較高，其中 Burkholderiaceae、Aeromonadaceae、Enterobacteriaceae 和 Rhodocyclaceae 分別占 32.34%、8.29%、6.1%和 4.12% (圖 13 A)；2019 年第 2 期作秧苗期下以 Rhodocyclaceae 等 14 科相對豐度較高，其中 Rhodocyclaceae、Clostridiaceae\_1、Paenibacillaceae、Spirochaetaceae 和 Aeromonadaceae 分別占 14.07%、5.76%、3.90%、2.9%和 2.9%，分蘗期下則以 Xanthobacteraceae 等 12 科相對豐度較高，其中 Xanthobacteraceae 和 Sphingomonadaceae 分別占 11.2%和 3.37% (圖 14 A)。在「屬」階層下，2019 年第 1 期作秧苗期樣品中以 *Paludibacter* 相對豐度較高(4.81%)，而分蘗期樣品中以 *Acidovorax*、*Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 和 *Pleomorphomonas* 等相對豐度較高，分別占 4.49%、11.75%和 2.67% (圖 13 B)；2019 年第 2 期作秧苗期下以 *Azospirillum* 等 17 屬相對豐度較高，其中 *Paenibacillus*、*Hydrogenophaga*、*Tolumonas*、*Curvibacter* 和 *Sulfurospirillum* 分別占 3.9%、2.87%、2.78%、2.56%和 2.24%，分蘗期下以 *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 等 10 屬相對豐度較高，其中 *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia*、*Bradyrhizobium*、*Pleomorphomonas* 和 *Methylocystis* 分別占 16.7%、8.34%、3.18%和 2.84% (圖 14 B)。二個期作內共生細菌相對豐度的結果顯示，Aeromonadaceae、Paludibacteraceae、Rhodocyclaceae 和 Veillonellaceae 等 4 科，*Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 和 *Pleomorphomonas* 等 2 屬，在不同生育期間產生差異，Paludibacteraceae 和 Veillonellaceae 皆在秧苗期相對豐



度較高, *Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 和 *Pleomorphomonas* 皆在分蘖期相對豐度較高, *Aeromonadaceae* 和 *Rhodocyclaceae* 相對豐度則在二個期作間出現相反趨勢, 第 1 期作於分蘖期相對豐富較高, 第 2 期作則在秧苗期相對豐度較高。

### 3.6 分析對管理方式及生育時期敏感的水稻內共生細菌指標 OTUs

為了鑑定偏好特定管理方式或生育時期的水稻根內共生細菌, 採用指標物種分析來確定內共生細菌群落中個別細菌 (OTUs) 與特定管理方式、生育時期的相關性 (Hartman *et al.*, 2018), 並將顯著相關 OTUs 進一步進行統計分析, 確認其豐度在不同管理方式或生育時期之間有所不同, 並以二分網絡圖 (bipartite networks) 呈現分析結果。經由指標物種分析, 2018 年第 2 期作分蘖期樣品中共有 43 個 OTUs 與管理方式顯著相關, 其中 34 個與慣行管理相關、9 個與有機管理相關, 2019 年第 1 期作共鑑定 45 個與特定管理方式顯著相關的 OTUs, 其中 20 個與慣行管理相關, 25 個與有機管理相關, 同年第 2 期作則有 91 個 OTUs, 其中 41 個與慣行管理相關, 50 個與有機管理相關; 而與生育時期顯著相關 OTUs 在 2019 年第 1 期作有 502 個, 其中 288 個與秧苗期相關, 214 個與分蘖期相關; 第 2 期作則有 140 個 OTUs, 其中 68 個與秧苗期相關, 72 個與分蘖期相關。為進一步驗證上述與管理方式或生育期相關的指標 OTU, 進行概似比檢定 (likelihood ratio test, LRT) 以鑑定對管理方式或生育期敏感的 OTUs。檢定結果顯示, 2018 年第 2 期作樣品中有 7 個 OTUs 對特定管理方式敏感, 相對豐度占內共生菌群落 14.04%, 2019 年第 1 期作樣品中並無對特定管理方式敏感者, 但有 29 個 OTUs 對生育時期敏感, 相對豐度占內共生菌群落 35.8%; 2019 年第 2 期作樣品有 3 個 OTUs 對特定管理方式敏感, 相對豐度占內共生菌群落 4.27%, 另有 11 個 OTUs 對特定生育時期敏感, 相對豐度占內共生菌群落 6.81% (圖 15)。總體而言對分蘖期敏感細菌以變形菌門為主, 少數指標 OTU 在不同生育期作或處理下被鑑定出來, 如 *Ralstonia*

*pickettii* 同時為 2019 年第 1 期作樣品中的分蘗期、同年第 2 期作有機管理的敏感物種 (圖 15)。




### 3.7 不同期作水稻根部內共生細菌群落的功能預測分析

為推測構成內共生細菌群落可能的功能，將 16S rRNA 基因定序所鑑定出的細菌，利用 PICRUSt 進行親緣關係分析找尋近緣物種，根據近緣物種的基因資訊，進而推測該未知菌種可能具有之基因功能 (Snel *et al.*, 1999 ; Konstantinidis and Tiedje, 2005 ; Zaneveld *et al.*, 2010 ; Segata and Huttenhower, 2011 ; Langille *et al.*, 2013)，再搭配 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 基因功能資料庫 (Kanehisa *et al.*, 2006 ; Kanehisa *et al.*, 2014)，得以預測細菌基因體所具有之功能分類群。

接著根據所得到的水稻內共生菌基因功能預測資料進行主成分分析，發現第 1 主成分 (PC1) 將 2019 年第 1 期的樣品依生育期明顯分群，即同一生育期水稻根內共生菌群落可能具有相似的基因功能群，而不同管理方式的樣品則未有明顯分群；另也觀察到分蘗期下慣行管理組的資料點較為聚集，有機管理組別資料較為離散，可能暗示分蘗期慣行管理的水稻根內共生菌群具有相近的功能，而有機管理的水稻根內共生菌群功能變異較大 (圖 16 A)。2019 年第 2 期作水稻內共生菌基因功能主成分分析結果顯示，第 1 主成分並未能將不同生育期的樣品明確分群，但若配合第 2 主成分則仍可見秧苗期、分蘗期樣品的分群狀況，但與第 1 期作結果相比較不明顯，而不同管理方式的樣品亦未有明顯分群 (圖 16 B)。

將不同生育期水稻根內共生菌以 KEGG 資料庫預測基因功能後，選擇功能相同之菌群進行相對豐度的差異檢定。分析結果發現 2019 年第 1 期作有 55 個功能類群對應之菌群的相對豐度在不同生育期具有顯著差異，如：在秧苗期 DNA repair and recombination proteins、purine metabolism 和 peptidases 等功能顯著較多，而 ABC transporters、secretion system 和 two-component system 等相



關功能類群則在分藥期較多，這些相對豐度具顯著差異的菌群功能以參與代謝 (metabolism) 相關功能居多 (圖 17)；同一期作有 26 個基因功能類群受到管理方式影響而使菌群相對豐度具有顯著差異，如 transcription factors、lipopolysaccharide biosynthesis proteins 和 sulfur relay system 相關功能類群在有機栽培下較多，bacterial motility proteins、flagellar assembly 和 cytoskeleton proteins 相關功能菌群在慣行栽培下較多，但這些具有差異的功能類群所對應之菌群的相對豐度大多小於 1% (圖 18)。2019 年第 2 期作分析結果則顯示，不同生育期之間共有 41 個功能類群所對應之菌群豐度具有差異，如 two-component system、secretion system 和 nitrogen metabolism 等在秧苗期較多，transporters、glycolysis / gluconeogenesis 和 amino sugar and nucleotide sugar metabolism 等功能在分藥期較多，與第 1 期結果相似，相對豐度具有差異的菌群功能多與代謝相關 (圖 19)；同一期作受到管理方式影響而使相對豐度具顯著差異的菌群推測有 44 個功能類群，如：cell motility and secretion 等功能在有機栽培下較多，oxidative phosphorylation 和 porphyrin and chlorophyll metabolism 等功能在慣行栽培下較多，但這些菌群相對豐度也都偏小 (圖 20)。綜合 2019 年二個期作的結果，bacterial motility proteins 等 32 個功能對應之菌群相對豐度皆在不同生育期間產生差異，其中 bacterial chemotaxis 等 12 個功能類群相對豐度皆在秧苗期較高，tryptophan metabolism 等 2 個功能類群及 KEGG 未分群者則在分藥期較多，其餘 17 個功能菌群相對豐度在二期作出現相反趨勢；在二個期作皆因不同管理而使相對豐度具有差異的菌群功能有 cell motility and secretion 等 8 個功能類群，其中 nucleotide metabolism、transcription related proteins 和 glycosphingolipid biosynthesis 等功能在有機管理下相對豐度較高，nitrotoluene degradation 功能菌群在慣行管理下相對豐度較高，其餘功能類群的菌群相對豐度則在二個期作出現相反趨勢。


## 第4章 討論




### 4.1 田間管理方式對水稻內共生細菌群落結構及功能的影響

田間的各種管理方式如：耕犁、灌溉、施肥等都會影響土壤特性，但是否會影響作物根圈及根內微生物多樣性，目前仍無定論；Xia 等人 (2015) 從四種作物的地上、地下和種子分離內共生細菌，發現有機管理能增加植物內共生細菌的豐度和多樣性，但仍有許多未知菌種無法分離，受限該研究所探究的範圍，而透過 16S rRNA 基因定序技術可全面檢視田間管理對微生物相的影響；Hartman 等人 (2018) 同時比較冬小麥的田間管理和耕犁強度對土壤及根內細菌組成的影響，由於耕犁強度與土壤結構高度相關，因此土壤細菌組成對耕犁強度較為敏感，相對的，有機管理雖然對根內共生細菌的豐度沒有顯著影響，但田間管理方式對群落組成具有長遠的效應，部分研究則指出長期有機管理下，農田土壤及植物內共生細菌組成在「門」的分類階層上與慣行管理者有差異，且這些細菌在土壤生化過程中具有重要作用 (Chaudhry *et al.*, 2012; Novara *et al.*, 2020; Wemheuer *et al.*, 2020)。本試驗結果與先前研究不盡相同，除 2018 年第 2 期作分藥期樣品及 2019 年第 2 期作部分(O2Shiu) 組別外，總體而言有機及慣行管理下的水稻根內共生細菌  $\alpha$ -多樣性並無顯著差異(表 6 和表 7)，顯示水稻在不同管理方式下都能從土壤中聚集細菌並維持根內共生菌組成的能力，或因管理造成的分類群消長而得到補償，使  $\alpha$ -多樣性得以維持，事實上早期研究也顯示，不同管理方式對植物根圈及內共生微生物多樣性的影響，遠小於對微生物群落結構的影響 (Morgan Ernest and Brown, 2001; Hartmann and Widmer, 2006; Wu *et al.*, 2007)；相對於  $\alpha$ -多樣性，本試驗在 2018 及 2019 年的第 2 期作結果中發現管理方式對內共生細菌群落結構有顯著影響，使  $\beta$ -多樣性產生差異，如同前述的研究，管理方式為影響小麥根內共生細菌相組成的主要驅動力，並使有機及慣行管理植株具有不同的  $\beta$ -多樣性。此外，本次試驗結果顯示管理效應對水稻根內共生細菌門組成的影響有限。





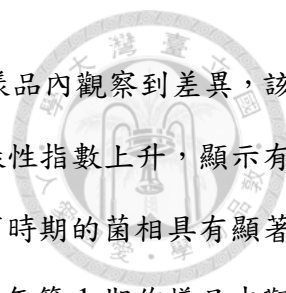
有機農業經營的主要目標之一是優化土壤微生物群落的健康和多樣性，目前已發現添加有機改良劑和腐植質等有機資材，對土壤微生物群落的組成有明顯影響，並推測會影響微生物參與的生化反應，進而增加土壤養分釋放以及降低土壤病原比例 (Monokrousos *et al.*, 2006 ; Esperschütz *et al.*, 2007 ; Fließbach *et al.*, 2007 ; Araújo *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2012)。而許多植物內共生菌被認為是從根圈土壤微生物群落的亞群中進入宿主植物 (Compant *et al.*, 2010)，或是同時來自種子及土壤 (Johnston-Monje *et al.*, 2016)。因此田間管理方式的差異可能會藉由改變土壤及根圈的微生物相，而進一步影響植物根內共生微生物部分組成結構。本次試驗經由比較不同管理間的內共生細菌 OTUs 的相對豐度，發現有差異的水稻根內共生細菌 OTUs 不多，分類上分別屬於 *Bacillus*、*Burkholderia\_Caballeronia\_Paraburkholderia* 和 *Bradyrhizobium* spp. (圖 11)，若是以分類階層進行相對豐度的比較，則發現如 *Rhizobiaceae*、*Bacillus* 和 *Azospirillum* spp. 等出現顯著差異(圖 12)。其中 *Azospirillum*、*Bacillus*、*Burkholderia*、*Paenibacillus* 和 *Pseudomonas* spp. 等在前人研究中顯示出與宿主植物代謝與生物抗性的密切相關而受到關注，也有相關微生物製劑商品已在市面銷售，而 *Bradyrhizobium* spp. 等屬於 *Rhizobiaceae* 的細菌則常與植物形成根瘤，直接或間接地刺激植物生長 (Wang and Martinez-Romero, 2000 ; Compant *et al.*, 2005 ; Nakkeeran *et al.* 2005 ; Bhattacharyya and Jha, 2012)。 *Azospirillum*、*Bacillus*、*Burkholderia*、*Erwinia*、*Pseudomonas* 等細菌則被認為是重要的溶磷細菌，可促進植物吸收磷的效率 (Sturz and Nowak, 2000 ; Sudhakar *et al.*, 2000 ; Mehnaz and Lazarovits, 2006)。試驗結果顯示有機管理能促進水稻根內 *Azospirillum*、*Bacillus*、*Pseudomonas* spp. 等 PGPB 相對豐度上升，慣行管理則在部分樣品中顯示能使 *Burkholderia*、*Paenibacillus* spp. 族群增加，但除 *Burkholderia* spp. 外，受影響細菌類群的相對豐度都不高，且 3 個期作的分析結果並未顯示一致的趨勢，如 2018 和 2019 第 2 期作分藥期不同管理方式樣品在 *Bacillaceae* 及 *Bacillus* spp. 相對豐度上呈現相反趨勢 (圖 12)。



傳統上利用 Biolog 菌種分析系統分析細菌功能，但只能用以檢測快速生長、好氧且可培養的異營生物 (Winding and Hendriksen, 1997; Nannipieri *et al.*, 2003)，使用 PICRUSt 代替 Biolog 分析來預測功能的準確性較高，通常對於土壤微生物群落和腸道微生物可以達到 85-90% 的正確率 (Langille *et al.*, 2013)，除此之外，透過 PICRUSt 可針對標記基因調查無法培養的微生物群落功能 (Forsberg *et al.*, 2014)。Ishaq 等人 (2017) 將來自有機和慣行管理田區的土壤接種於無菌介質並種植野燕麥 (*Avena fatua* L.) 等 2 種不同田間雜草，利用前述 PICRUSt 方法檢測發現土壤細菌的預測之功能雖僅有些微差異，但接種有機土壤後，土壤中與分解苯甲酸 (benzoate)、檸檬烯 (limonene) 及蒎烯 (pinene) 有關的細菌類群較多，因此推測有機管理田區對化學擾動有較佳恢復力。本試驗透過相同方法分析水稻根內共生細菌群落的預測基因功能，並進行主成分分析 (PCA)，但不同管理間的預測基因功能並未明確分群 (圖 16)。進一步比較菌群相對豐度具顯著差異的功能，發現僅有 4 個功能分群在 2019 年兩個期作間出現相同變化趨勢，然而這些功能與植物生長較無直接關聯，且菌群豐度多低於 1%，推測本次試驗不同管理對內共生菌群功能影響並不明顯。

#### 4.2 生育期對水稻內共生細菌群落結構及功能的影響

透過傳統培養及分離菌株的方式配合形態或分子鑑定，發現根圈及內共生細菌整體的豐度、各分離株的占比及  $\beta$ -多樣性會隨著植物的生育階段而有所改變，例如：玉米根圈細菌及真菌  $\alpha$ -多樣性隨著苗期、營養及生殖生長期、成熟期呈現先上升後下降的趨勢，小麥根圈和根內共細菌相受到生育期的影響遠大於栽培管理模式，尤其根內共生菌相對生育期變化更為敏感 (Baudoin *et al.*, 2002; Roesti *et al.*, 2006; Cavaglieri *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2015; Marag and Suman, 2018)，Walters 等人 (2018) 連續 20 週調查玉米根圈菌相，以 16s rRNA 基因定序分析，結果顯示早期菌相與土壤菌相較相似，隨植物生長菌相差異愈大，除了植物生長時期，田區位置和基因型也會影響根圈菌相；本試驗比較 2019 年水稻秧苗期和分蘗期根內共生菌



的多樣性及組成， $\alpha$ -多樣性的方面僅於 2019 年第 2 期作的樣品內觀察到差異，該期作的水稻植株隨著秧苗期進入分蘗期，根內共生細菌  $\alpha$ -多樣性指數上升，顯示有更豐富多樣的內共生細菌（表 6），在  $\beta$ -多樣性方面，二個生育時期的菌相具有顯著差異，且較管理方式造成之差異更為明顯（表 8），並在 2019 年第 1 期作樣品中觀察到不同生育期水稻根內共生菌組成在分類階層「門」的明顯差異，主要為變形菌的消長（圖 4），變形菌在富含有機碳環境會受到刺激而快速生長，屬於多養分營微生物（copiotrophs），推測其在分蘗期的增加應是受到田間施肥量增加的影響（Aneja *et al.*, 2006；Bernard *et al.*, 2007；Cleveland *et al.*, 2007；Fierer *et al.*, 2007）。根系分泌物的產生和擴散會受到植物生理狀態的影響，其組成被推測會隨著植物年齡而變化，而這些滲出物（exudates）可能參與內共生微生物的篩選，因此在不同植物生長階段吸引適合的微生物共生（Hamlen *et al.*, 1972；Buir and Caesar, 1984；Miller *et al.*, 1989），Zhalnina 等人（2018）以 PCA 分析不同生育時期裂稈燕麥根系分泌之代謝物組成，結果可見各時期有顯著差異，而許多菌群對這些代謝物的喜好不同，所以根系分泌之代謝物組成是影響根圈菌相組成和結構的重要因子，因此合理推測根圈菌相隨生育期變化，也使根內共生菌相有所調整。

本試驗結果顯示受到不同生育期影響的內共生細菌類群明顯較多，分析 OTUs 相對豐度發現 *Clostridium beijerinckii*、*Acidovorax delafieldii*、*Hydrogenophaga* spp. 和 *Burkholderia*、*Caballeronia*、*Paraburkholderia* spp. 等在秧苗期及分蘗期之間具有明顯差異（圖 10、圖 11），而以分類群的相對豐度為主進行比較則發現 Paludibacteraceae、Veillonellaceae、*Bradyrhizobium*、*Burkholderia*、*Caballeronia*、*Paraburkholderia* spp. 和 *Pleomorphomonas* spp. 等在兩個生育期間具有顯著差異，且在 2019 年兩個期作發現相近趨勢（圖 13、圖 14），顯示水稻根部配合生長階段的轉變來調控內共生細菌的群落組成，其中 *Burkholderia* spp. 和 *Bradyrhizobium* spp. 隨著生長階段推進而顯著增加，*Burkholderia* spp. 細菌曾被證明具有固氮及溶磷能力（Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001；Sudhakar *et al.*, 2000），*Bradyrhizobium* spp. 則經由研究被發現能透過合成螯鐵

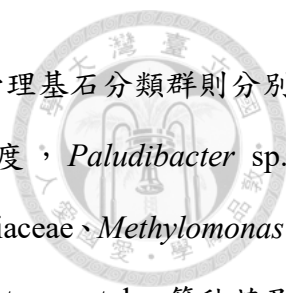
蛋白 (siderophore)、促進溶磷及固氮等生理過程促進周圍或寄主植物生長 (Antoun *et al.*, 1998 ; Carson *et al.*, 2000 ; Vessey, 2003) , 因此這些改變可能影響水稻營養吸收效率。

Chaparro 等人 (2013) 以阿拉伯芥為材料, 透過化學分析及 RNA 定序等方法, 發現隨著發育階段改變, 根分泌物組成隨之改變, 且分泌物組成與根圈細菌中參與糖類、胺基酸、二次代謝物代謝等功能基因變化有顯著相關。利用主成分分析檢驗本研究中不同生育期間內共生細菌的預測基因功能發現, 相似於細菌群落  $\beta$ -多樣性分析結果, 2019 年全年度兩生育期間功能得到明確分群 (圖 16), 進一步比較功能差異後, 發現不同生育期間有 15 個功能群出現相同變化趨勢, 其中秧苗期豐度較高的 DNA replication proteins、DNA repair and recombination proteins 等數個功能群對應於植物體生長初期遺傳物質的合成, 另外 nitrogen metabolism、other ion-coupled transporters 和 bacterial chemotaxis 功能豐度提高可能與水稻在秧苗期對土壤營養吸收有關。而分蘗期水稻根內共生菌中 Tryptophan metabolism 功能群豐度較高, Tryptophan 為植物生長激素吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 的前驅物, 可能是透過 PGPB 利用其為原料而生成 IAA, 造成生長促進效果 (Ul Hassan and Bano, 2015), 而同樣在分蘗期較豐富的 glycine、serine and threonine metabolism 功能群, 則推測與分蘗期植物體快速生長所需營養有關。另外, 預測基因功能分析的結果也有部分對應到菌落組成差異, 如: 分蘗期相對豐度較高的 *Bradyrhizobium* spp. 與 Tryptophan 轉換為 IAA 代謝途徑相關 (Sekine *et al.*, 1988), 在預測功能群中亦發現 Tryptophan metabolism 功能的豐度增加。結果顯示不同生育期間預測基因功能的差異, 然而本試驗採用的基因功能預測分析方法所獲得的資訊是微生物組具有相關功能或特性的潛力, 沒有關於基因表達層次的資訊, 若能同時進行轉錄體定序 (transcriptome sequencing), 所得結果能夠更直接反映環境微生物所表達的基因功能 (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016)。

#### 4.3 生育期及田間管理方式的交互作用共同影響水稻內共生細菌相

過去的研究多是收穫單一時間點的樣本來比較各種處理對微生物相的影響，本研究結合時間和田間管理的效應，除了前述田間管理差異以及作物生育期的推演對水稻內共生細菌群落結構的影響，也觀察到田間管理及生育期之間的交互作用，針對  $\alpha$ -多樣性進行變方分析，結果顯示 2019 年第 2 期作的水稻根內共生細菌群落在分蘗期有較高  $\alpha$ -多樣性，且生育期造成的差異在慣行管理的水稻樣品較為顯著，說明管理效應與生育期效應存在交互作用（表 7、附表 3）。以 PERMANOVA 分析菌落組成也可觀察到 2019 年二個期作的樣品皆存在田間管理與生育期的交感，且田間管理造成的差異主要存在分蘗期的樣品（表 8、附表 1、附表 2）。2019 年第 1 期作分蘗期，有機管理的樣品相較慣行管理樣品，擬桿菌相對豐度較高（表 9），這些類群的細菌被認為採取適用於營養來源較不穩定環境下的 r 生殖策略 (r strategists)，可能與有機管理大量使用的粕類肥料等初始有機質的降解有關 (Chávez-Romero *et al.*, 2016; Pascault *et al.*, 2013)。綜觀本次試驗結果，生育期效應對水稻根內共生群落組成所造成的影響遠大於管理效應，推測本試驗水稻兩生育期所具有的特異內共生細菌群落組成，應是透過根部分泌相對應的化學訊號物質，與環境微生物相互作用下所構成。

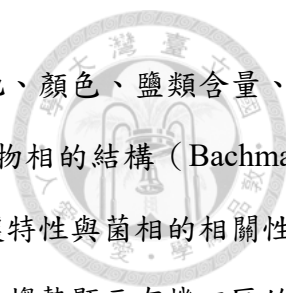
而由微生物群管理的角度來看，瞭解特定微生物類群對管理方式及生育時期是否敏感，以及它們是否具有特定的網絡關係十分重要，經常與許多其他微生物同時出現的微生物可能透過群落動態和微生物組功能發揮重要的生態作用，因而被稱為基石 (keystone) 分類群 (Agler *et al.*, 2016; Banerjee *et al.*, 2016; van der Heijden and Hartmann, 2016)。經由指標物種分析加上差異性檢定後，在 2019 年 2 個期作分別找到 29 及 11 個 OTUs 對特定生育期敏感，且分別占該期作內共生細菌總豐度的 35.8 % 及 6.81 %，並在 2018 年及 2019 年第 2 期作得到 7 及 3 個對特定管理方式敏感的 OTUs，分別占該期作 14.04 % 及 4.27 % (圖 15)。與 Hartman 等人 (2018) 所得結果相似，大部分基石分類群豐度並非造成該處理效應的主要分類群，然而 2019 年第



2 期作的 *Methylomonas* sp.、Enterobacteriaceae 等兩個有機管理基石分類群則分別在秧苗期及分蘗期的有機管理樣品中具有較高相對豐度，*Paludibacter* sp.、*Burkholderia*、*Caballeronia*、*Paraburkholderia* sp.、Burkholderiaceae、*Methylomonas* sp.、Enterobacteriaceae、Rhodocyclaceae 和 *WCHB1\_32* sp.、Planctomycetales 等秧苗及分蘗期基石分類群則分別在該生育期有較高的相對豐度（表 9）；*Methylomonas* spp. 參與環境中的甲烷氧化，並在近期有關基因組分析的研究中被發現具有合成固氮相關蛋白的活性（Rahalkar and Pandit, 2018），而 *Burkholderia* spp. 細菌如前所述，與共生植物健康有密切關係。由所得結果推論在不同管理及生育期下，可能引起基石分類群在水稻根內增殖，並經由促進其他與其生態特性相關微生物與水稻共生，共同發揮重要生態功能，最終構築出部分水稻根內共生菌群落。

#### 4.4 田間管理方式對土壤特性及微生物相的影響


本次進行試驗的田區分為有機及慣行等二種管理方式，整體來說，各田區總氮素投入量接近，惟有機農友不使用化學肥料，所施基肥和追肥分別為粕類及有機質顆粒肥料，而土壤檢測結果則顯示有機管理田區土壤 pH 值、有機質、土壤鈣含量等化學性質測值較高（表 3）；Clark 等人（1998）指出有機管理田區具有較高的土壤有機質、磷、鉀、鈣和鎂的濃度及穩定的 EC 值，然而亦有研究卻指出有機管理方式導致土壤磷及鉀含量的降低（Gosling and Shepherd, 2005）；本試驗有機田區的農友使用大量有機資材，但並未見到施用這些資材對土壤有效性磷、鉀、鎂和 EC 值有明顯影響；將粕類等含氮有機廢棄物添加到土壤中會促進微生物礦質化等產酸作用（Bevacqua and Mellano, 1994；Sikora and Yakovchenko, 1996），但有機廢棄物所含有機質又透過錯合（complexing）土壤鋁離子和增加鹽基飽和度，而提高酸性土壤的 pH 值（Shiralipour *et al.*, 1992、Van den Berghe and Hue, 1999）。相對於植物根內環境，土壤特性和肥力是外在環境，但前人研究指出植物根內共生真菌組成會隨土壤 pH 梯度而改變，土壤中的鈣、鎂、鈉等離子濃度也會影響根內共生菌多樣性及組成



(Postma *et al.*, 2007; Yaish *et al.*, 2016), 此外具有不同質地、顏色、鹽類含量、酸鹼度等特性的不同類型土壤亦被證明可影響植物根圈微生物相的結構 (Bachmann and Kinzel, 1992; Hinsinger *et al.*, 2009); 根據本試驗中土壤特性與菌相的相關性分析發現, 雖然 CCA1 和 CCA2 的變異解釋量偏低, 但整體的趨勢顯示有機田區的水稻根內共生菌組成與土壤鹽類 (EC 值)、有機質和 pH 值呈正相關 (圖 3), 顯示外在環境的特性和變化確實對植物根內共生細菌的組成和結構有所貢獻, 由於根內共生菌主要源自於土壤, 而土壤特性影響土壤或根圈微生物的組成, 因此推測土壤環境對於塑造根內共生菌有一定的貢獻。

#### 4.5 品種及氣候環境條件對根內共生菌相的影響

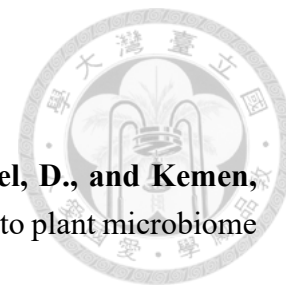
本次試驗樣品均來自苗栗苑裡的慣行和有機水稻田, 統計分析結果顯示生育期及田間管理僅能解釋約一半的群落結構差異 (表 8), 品種及未列入考慮的微氣候因子等也可能對內共生細菌組成產生影響。先前有研究比較粳稻、秈稻和非洲型水稻的根圈微生物相, 發現粳稻和非洲型水稻的根圈微生物相明顯分群, 而秈稻較接近非洲型稻, 顯示基因型的差異會影響根圈微生物相 (Edwards *et al.*, 2015); Walters 等人 (2018) 的研究亦證明玉米根圈細菌菌相受到基因型的影響, 然影響程度遠小於植物的生育期變化, 此外也發現部分細菌類群受到氣候因子顯著影響, 如該試驗中 Nocardiodaceae、Caulobacteraceae 和 Sphingobacteriaceae 等科細菌豐度與溫度呈正相關, Sphingobacteriaceae 和 Cytophagaceae 科細菌則與降雨量相關, 推測可能氣候狀況短時間內改變植株的光合作用等生理反應, 也改變微生物所能獲取之碳源或根部分泌物的組成或分泌量, 進而影響這些根圈微生物的豐度。本試驗田區所栽培之水稻品種不甚相同, 但皆屬於粳稻, 遺傳背景的差異性遠小於粳稻、秈稻和非洲型稻之間的差異, 且 2019 年慣行管理的二塊田區在第 1 和第 2 期作都種植相同品種 (表 1), 但仍能觀察到第 1 期和第 2 期作菌相的差異, 推測品種差異在本試驗的影響較小, 而第 1 期和第 2 期作的最大差異在於氣候變化, 2019 年第 1 期作二次採



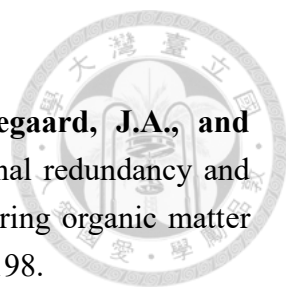
樣時間環境溫度都較第 2 期作低，且兩個期作秧苗期、生育期取樣時間雨量差異呈現相反變化（圖 2），皆可能影響水稻當時的光合生理、營養吸收效率以及土壤內的生化反應活性，進而對聚集根圈微生物的選擇以及內共生菌的相對豐度產生影響，未來可透過樣品數增加及對微氣候的監控來瞭解氣候因子的影響力。

本次試驗對於各樣品細菌群落資料進行分析後，發現菌相差異主要隨生育期而改變，且部分對應於預測基因功能的改變，而田間管理模式則對水稻根部內共生的細菌組成僅有些微影響，其中許多受影響之菌群具有促進植物生長相關之功能；除此之外，透過指標物種分析找到了對於特定管理方式及生育期敏感的候選指標分類群。為確認生育期及田間管理模式對於作物內共生菌相的影響，建議未來可擴大樣區進行長期的研究，以釐清根內菌相結構的影響因子，並探索菌相與作物生長和產量間的關係。



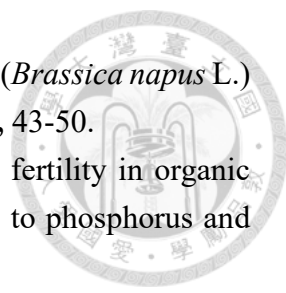


- Agler, M.T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., and Kemen, E.M.** (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biol.* **14**, e1002352.
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., and Narasimhan, G.** (2016). Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis: supplementary issue: bioinformatics methods and applications for big metagenomics data. *Evol. Bioinform.* **12**, EBO. S36436.
- Amann, R.I.** (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In Akkermans, A. D., Van Elsas, J. D., and De Bruijn, F. J., eds, *Molecular microbial ecology manual*. Springer, New York, NY, pp. 331-345.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**, 143-169.
- Aneja, M.K., Sharma, S., Fleischmann, F., Stich, S., Heller, W., Bahnweg, G., Munch, J.C., and Schloter, M.** (2006). Microbial colonization of beech and spruce litter—influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microb. Ecol.* **52**, 127-135.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., and Lalonde, R.** (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). In G. Hardarson and W. Broughton, eds, *Molecular microbial ecology of the soil*. Springer, New York, NY, pp. 57-67.
- Araújo, A.S., Leite, L.F., Santos, V.B., and Carneiro, R.F.** (2009). Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability* **1**, 268-276.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., and Kalra, A.** (2012). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiol. Biochem.* **58**, 227-235.
- Bünemann, E.K., Schwenke, G.D., and Van Zwieten, L.** (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Soil Res* **44**, 379-406.
- Bachmann, G., and Kinzel, H.** (1992). Physiological and ecological aspects of the interactions between plant roots and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 543-

- 
- Banerjee, S., Kirkby, C.A., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J.A., and Richardson, A.E.** (2016). Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Bio. Biochem.* **97**, 188-198.
- Baudoin, E., Benizri, E., and Guckert, A.** (2002). Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl. Soil Ecol.* **19**, 135-145.
- Benitez, M.S., Osborne, S.L., and Lehman, R.M.** (2017). Previous crop and rotation history effects on maize seedling health and associated rhizosphere microbiome. *Sci. Rep.* **7**, 15709.
- Bernard, L., Mougel, C., Maron, P.A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F.e.Z., Berge, O., Marol, C., and Balesdent, J.** (2007). Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C-labelled wheat residue as estimated by DNA-and RNA-SIP techniques. *Environ. Microbiol.* **9**, 752-764.
- Bevacqua, R.F., and Mellano, V.J.** (1994). Cumulative effects of sludge compost on crop yields and soil properties. *Commun Soil Sci Plant Anal* **25**, 395-406.
- Bhattacharyya, P.N., and Jha, D.K.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1327-1350.
- Blanco-Canqui, H., and Lal, R.** (2009). Crop residue removal impacts on soil productivity and environmental quality. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **28**, 139-163.
- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M.S., Nelson, J., Hodkinson, B.P., Tuskan, G., Schadt, C.W., and Vilgalys, R.** (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol. Ecol.* **23**, 3356-3370.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F.O., Amann, R., Eickhorst, T., and Schulze-Lefert, P.** (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**, 91-95.
- Carson, K.C., Meyer, J.-M., and Dilworth, M.** (2000). Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 11-21.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., and Etcheverry, M.** (2009). Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol. Res.* **164**, 391-399.
- Chao, A.** (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand Stat Theory Appl.* **11**, 265-270.
- Chao, A., and Lee, S.-M.** (1992). Estimating the number of classes via sample

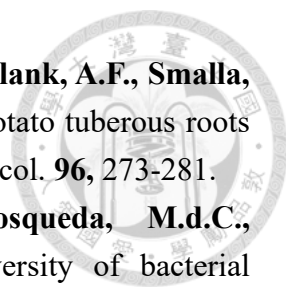
- coverage. *J Am Stat Assoc* **87**, 210-217.
- Chao, A., and Yang, M.C.** (1993). Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* **80**, 193-201.
- Chaparro, J.M., Badri, D.V., and Vivanco, J.M.** (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* **8**, 790-803.
- Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., and Vivanco, J.M.** (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One* **8**, e55731.
- Chaudhry, V., Rehman, A., Mishra, A., Chauhan, P.S., and Nautiyal, C.S.** (2012). Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microb. Ecol.* **64**, 450-460.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrri, C., Nacamulli, C., and Tabacchioni, S.** (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Agric., Ecosyst. Environ.* **8**, 11-18.
- Chávez-Romero, Y., Navarro-Noya, Y.E., Reynoso-Martínez, S.C., Sarria-Guzmán, Y., Govaerts, B., Verhulst, N., Dendooven, L., and Luna-Guido, M.** (2016). 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil Tillage Res.* **159**, 1-8.
- Clark, M.S., Horwath, W.R., Shennan, C., and Scow, K.M.** (1998). Changes in soil chemical properties resulting from organic and low-input farming practices. *Agron J* **90**, 662-671.
- Cleveland, C.C., Nemergut, D.R., Schmidt, S.K., and Townsend, A.R.** (2007). Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry* **82**, 229-240.
- Compant, S., Clément, C., and Sessitsch, A.** (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 669-678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Barka, E.A.** (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951-4959.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R.** (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194-2200.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellin, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., and Sundaresan, V.** (2015). Structure, variation, and

- assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E911-920.
- Egamberdieva, D., Wirth, S.J., Shurigin, V.V., Hashem, A., and Abd Allah, E.F.** (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *fusarium solani* under salt stress. *Front. Microbiol.* **8**, 1887.
- Emmett, B.D., Buckley, D.H., and Drinkwater, L.E.** (2020). Plant growth rate and nitrogen uptake shape rhizosphere bacterial community composition and activity in an agricultural field. *New Phytol* **225**, 960-973.
- Esperschütz, J., Gattinger, A., Mäder, P., Schloter, M., and Fließbach, A.** (2007). Response of soil microbial biomass and community structures to conventional and organic farming systems under identical crop rotations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**, 26-37.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R.o., and Caballero-Mellado, J.** (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2790-2798.
- Fierer, N., Bradford, M.A., and Jackson, R.B.** (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**, 1354-1364.
- Fließbach, A., Oberholzer, H.-R., Gunst, L., and Mäder, P.** (2007). Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* **118**, 273-284.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Izaguirre, M.J., Alemano, S., Alvarez, D., and Abdala, G.** (2010). Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Curr. Microbiol.* **61**, 485-493.
- Forsberg, K.J., Patel, S., Gibson, M.K., Lauber, C.L., Knight, R., Fierer, N., and Dantas, G.** (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* **509**, 612-616.
- Fukami, J., Cerezini, P., and Hungria, M.** (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express* **8**, 73.
- Gamalero, E., and Glick, B.R.** (2011). Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In D.K. Maheshwari, ed, *Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management*. Springer, New York, NY, pp. 17-46.
- Garland, J.L., and Mills, A.L.** (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351-2359.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., and Seib, A.M.** (1998). Diversity

- 
- of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**, 43-50.
- Gosling, P., and Shepherd, M.** (2005). Long-term changes in soil fertility in organic arable farming systems in England, with particular reference to phosphorus and potassium. *Agric. Ecosyst. Environ.* **105**, 425-432.
- Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G.A., and Vilgalys, R.** (2011). Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5934-5944.
- Gurusinghe, S., Brooks, T.L., Barrow, R.A., Zhu, X., Thotagamuwa, A., Dennis, P.G., Gupta, V.V., Vanniasinkam, T., and Weston, L.A.** (2019). Technologies for the selection, culture and metabolic profiling of unique rhizosphere microorganisms for natural product discovery. *Molecules* **24**, 1955.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., and Kloepper, J.** (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**, 895-914.
- Haney, C.H., Samuel, B.S., Bush, J., and Ausubel, F.M.** (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat. Plants* **1**, 15051.
- Hartman, K., van der Heijden, M.G.A., Wittwer, R.A., Banerjee, S., Walser, J.C., and Schlaeppli, K.** (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome* **6**, 14.
- Hartmann, M., and Widmer, F.** (2006). Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7804-7812.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., and Young, I.M.** (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* **321**, 117-152.
- Hryniewicz, K., and Baum, C.** (2012). The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. *In* Malik, Abdul, Grohmann, Elisabeth, Eds, *Environmental protection strategies for sustainable development*. Springer, New York, NY, pp. 35-64.
- Ishaq, S.L., Johnson, S.P., Miller, Z.J., Lehnhoff, E.A., Olivo, S., Yeoman, C.J., and Menalled, F.D.** (2017). Impact of cropping systems, soil inoculum, and plant species identity on soil bacterial community structure. *Microb. Ecol.* **73**, 417-434.
- Jenny, H.** (1941) *Factors of Soil Formation: A System of Quantitative Pedology*. Dover Publications, New York, NY.
- Jin, C.W., He, Y.F., Tang, C.X., Wu, P., and Zheng, S.J.** (2006). Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant*

Cell Environ **29**, 888-897.

- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M.** (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* **42**, D199-D205.
- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Islam, M.R., and Sa, T.J.S.** (2012). ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis* **56**, 77-86.
- Kennedy, A., and Smith, K.** (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* **170**, 75-86.
- Kong, Z., Mohamad, O.A., Deng, Z., Liu, X., Glick, B.R., and Wei, G.** (2015). Rhizobial symbiosis effect on the growth, metal uptake, and antioxidant responses of *Medicago lupulina* under copper stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 12479-12489.
- Konstantinidis, K.T., and Tiedje, J.M.** (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2567-2572.
- Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepille, D.E., Thurber, R.L.V., and Knight, R.** (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814.
- Li, R., Khafipour, E., Krause, D.O., Entz, M.H., de Kievit, T.R., and Fernando, W.D.** (2012). Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. *PLoS One* **7**, e51897.
- Lipiec, J., and Gliński, J.** (2011). Rhizosphere. In J. Gliński, J. Horabik, and J. Lipiec, eds, *Encyclopedia of agrophysics*. Springer, Netherlands, pp. 705-709.
- Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrekton, A., Kunin, V., Del Rio, T.G., Edgar, R.C., Eickhorst, T., Ley, R.E., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., and Dangl, J.L.** (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**, 86-90.
- Lynch, J., and Whipps, J.** (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**, 1-10.
- Marag, P.S., and Suman, A.** (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiol. Res.* **214**, 101-113.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El-Behairy, U.A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., and Daffonchio, D.** (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One* **7**, e48479.

- 
- Marques, J.M., da Silva, T.F., Vollú, R.E., de Lacerda, J.R.M., Blank, A.F., Smalla, K., and Seldin, L.** (2015). Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Appl. Soil Ecol.* **96**, 273-281.
- Marquez-Santacruz, H., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Velazquez-Sepulveda, I., and Santoyo, G.** (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet. Mol. Res.* **9**, 2372-2380.
- Marschner, H., Römheld, V., and Cakmak, I.** (1987). Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.* **10**, 1175-1184.
- Marschner, P., Crowley, D., and Yang, C.H.** (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* **261**, 199-208.
- Mehnaz, S., and Lazarovits, G.** (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb. Ecol.* **51**, 326-335.
- Monokrousos, N., Papatheodorou, E., Diamantopoulos, J., and Stamou, G.** (2006). Soil quality variables in organically and conventionally cultivated field sites. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1282-1289.
- Morgan Ernest, S., and Brown, J.H.** (2001). Homeostasis and compensation: the role of species and resources in ecosystem stability. *Ecology* **82**, 2118-2132.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G.** (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655-670.
- Navarro-Noya, Y.E., Gómez-Acata, S., Montoya-Ciriaco, N., Rojas-Valdez, A., Suárez-Arriaga, M.C., Valenzuela-Encinas, C., Jiménez-Bueno, N., Verhulst, N., Govaerts, B., and Dendooven, L.** (2013). Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* **65**, 86-95.
- Novara, A., Catania, V., Tolone, M., Gristina, L., Laudicina, V.A., and Quatrini, P.** (2020). Cover crop impact on soil organic carbon, nitrogen dynamics and microbial diversity in a Mediterranean semiarid vineyard. *Sustainability* **12**, 3256.
- Pascual, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., Mathieu, O., Lévêque, J., Mougél, C., and Henault, C.** (2013). Stimulation of different functional groups of bacteria by various plant residues as a driver of soil priming effect. *Ecosystems* **16**, 810-822.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Buckler, E.S., and Ley, R.E.** (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 6548-6553.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., and Van Der Putten, W.H.** (2013).

- Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 789-799.
- Rahalkar, M.C., and Pandit, P.** (2018). Genome-based insights into a putative novel *Methylomonas* species (strain Kb3), isolated from an Indian rice field. *Gene Rep.* **13**, 9-13.
- Reddy, M., Ila, R.I., and Faylon, P.S.** (2014). Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture. Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK
- Reganold, J.P., Elliott, L.F., and Unger, Y.L.** (1987). Long-term effects of organic and conventional farming on soil erosion. *Nature* **330**, 370-372.
- Rodriguez, P.A., Rothballer, M., Chowdhury, S.P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., and Falter-Braun, P.** (2019). Systems biology of plant-microbiome interactions. *Mol Plant* **12**, 804-821.
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., and Aragno, M.** (2006). Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1111-1120.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda Mdel, C., and Glick, B.R.** (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* **183**, 92-99.
- Segata, N., and Huttenhower, C.** (2011). Toward an efficient method of identifying core genes for evolutionary and functional microbial phylogenies. *PLoS One* **6**, e24704.
- Sekine, M., Ichikawa, T., Kuga, N., Kobayashi, M., Sakurai, A., and Syōno, K.** (1988). Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp. *Plant Cell Physiol.* **29**, 867-874.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., and Rahalkar, M.** (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 28-36.
- Shannon, C.E.** (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* **27**, 379-423.
- Shiralipour, A., McConnell, D.B., and Smith, W.H.** (1992). Physical and chemical properties of soils as affected by municipal solid waste compost application. *Biomass Bioenergy* **3**, 261-266.
- Sikora, L., and Yakovchenko, V.** (1996). Soil organic matter mineralization after compost amendment. *Soil Sci Soc Am J* **60**, 1401-1404.
- Simpson, E.H.** (1949). Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688-688.
- Snel, B., Bork, P., and Huynen, M.A.** (1999). Genome phylogeny based on gene content.



- Nat. Genet. **21**, 108-110.
- Sturz, A., and Nowak, J.** (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl. Soil Ecol.* **15**, 183-190.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G., Gangwar, S., and Ghosh, J.** (2000). Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). *J. Agric. Sci.* **134**, 227-234.
- Trapp, M.A., Kai, M., Mithofer, A., and Rodrigues-Filho, E.** (2015). Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry* **110**, 72-82.
- Ul Hassan, T., and Bano, A.** (2015). The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **15**, 190-201.
- Van den Berghe, C., and Hue, N.** (1999). Liming potential of composts applied to an acid oxisol in Burundi. *Compost Sci. Util.* **7**, 40-46.
- van der Heijden, M.G., and Hartmann, M.** (2016). Networking in the plant microbiome. *PLoS Biol.* **14**, e1002378.
- Vessey, J.K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**, 571-586.
- Walters, W.A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J.G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., and Shi, Q.** (2018). Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* **115**, 7368-7373.
- Wang, E., and Martinez-Romero, E.** (2000). *Sesbania herbacea*–*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microb. Ecol.* **40**, 25-32.
- Wemheuer, F., Kaiser, K., Karlovsky, P., Daniel, R., Vidal, S., and Wemheuer, B.** (2017). Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Sci. Rep.* **7**, 40914.
- Wemheuer, F., Berkelmann, D., Wemheuer, B., Daniel, R., Vidal, S., and Bisseleua Daghela, H.B.** (2020). Agroforestry management systems drive the composition, diversity, and function of fungal and bacterial endophyte communities in *Theobroma Cacao* leaves. *Microorganisms* **8**, 405.
- Winding, A., and Hendriksen, N.B.** (1997). Biolog substrate utilisation assay for metabolic fingerprints of soil bacteria: incubation effects. *In* Insam, Heribert, Rangger, Andrea, Eds, *Microbial communities*. Springer, New York, NY, pp. 195-205.
- Wu, T., Chellemi, D.O., Martin, K.J., Graham, J.H., and Rosskopf, E.N.** (2007).

- Discriminating the effects of agricultural land management practices on soil fungal communities. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 1139-1155.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., and Williams, M.A.** (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front. Plant Sci.* **6**, 490.
- Yaish, M.W., Al-Lawati, A., Jana, G.A., Patankar, H.V., and Glick, B.R.** (2016). Impact of soil salinity on the structure of the bacterial endophytic community identified from the roots of caliph medic (*Medicago truncatula*). *PLoS One* **11**, e0159007.
- Yang, J., Kloepper, J.W., and Ryu, C.-M.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**, 1-4.
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., and Ye, B.** (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS One* **12**, e0178425.
- Zaneveld, J.R., Lozupone, C., Gordon, J.I., and Knight, R.** (2010). Ribosomal RNA diversity predicts genome diversity in gut bacteria and their relatives. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3869-3879.
- Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U.N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loque, D., Bowen, B.P., Firestone, M.K., Northen, T.R., and Brodie, E.L.** (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat. Microbiol.* **3**, 470-480.

(A)



(B)



圖 1、本試驗水稻取樣田位置。

以苗栗縣苑裡鎮區域地圖標示 2018 年第 2 期作(A)和 2019 年第 1 和第 2 期作取樣田區位置。圖(B)以藍及紅色圓圈分別標示 2019 年第 1 和第 2 期作取樣之有機栽培田區位置，該年二期作取樣之慣行栽培田區為同一塊田，以黃色圓圈標示。

Figure 1. The local map of Yuanli Town, Miaoli County, Taiwan. (A) The location of experimental fields for sampling at the 2<sup>nd</sup> cropping season in 2018 are marked by blue icons. (B) The organic fields for sampling at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> cropping seasons in 2019 are marked by blue and red circles, respectively. The same conventional fields chosen for sampling at two cropping seasons are marked by yellow circles.

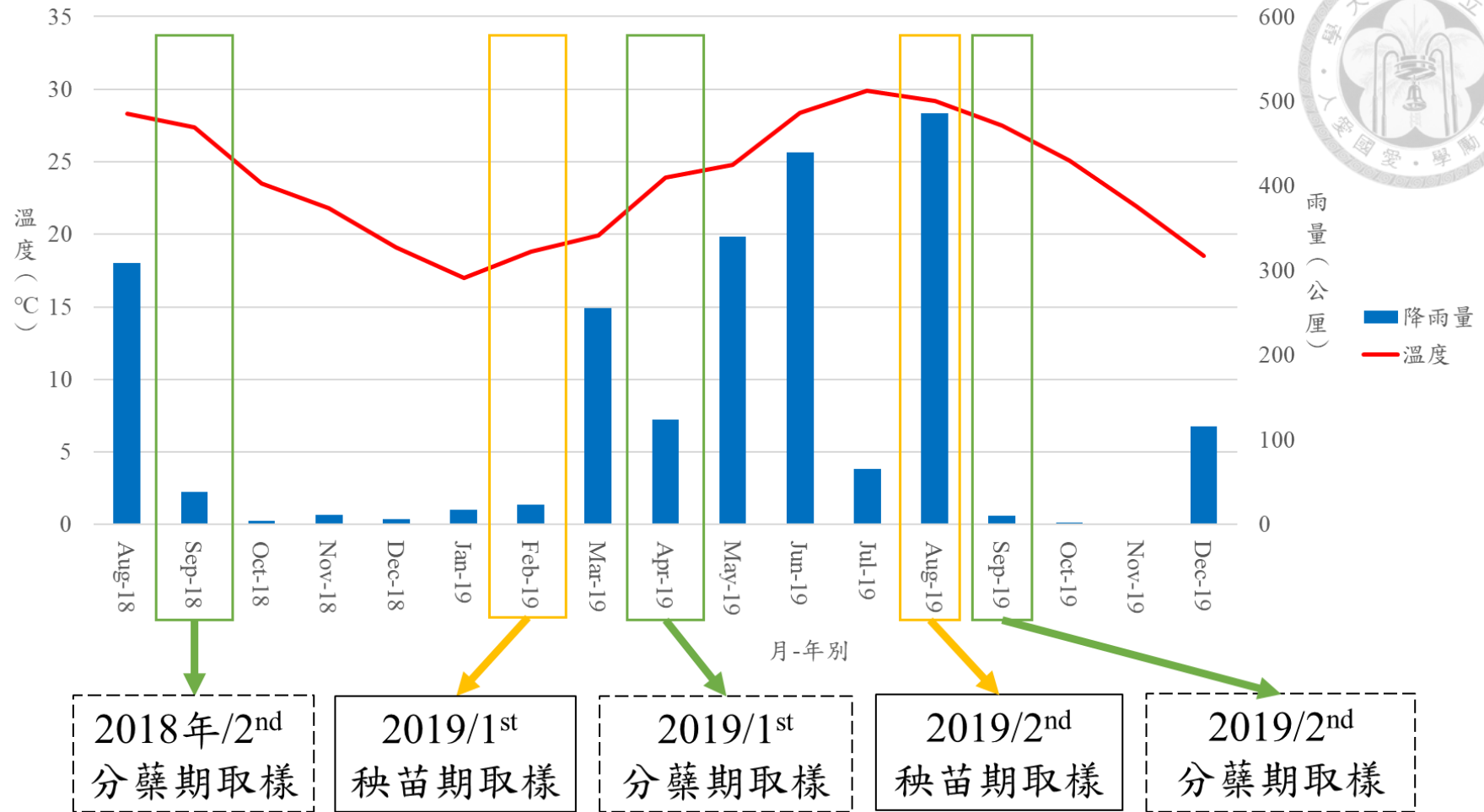


圖 2、2018-2019 年中央氣象局苑裡測站月平均溫度及降雨資料。

Figure 2. Monthly temperature and rainfall reports from 2018 to 2019 at Yuanli weather station (the Central Weather Bureau).

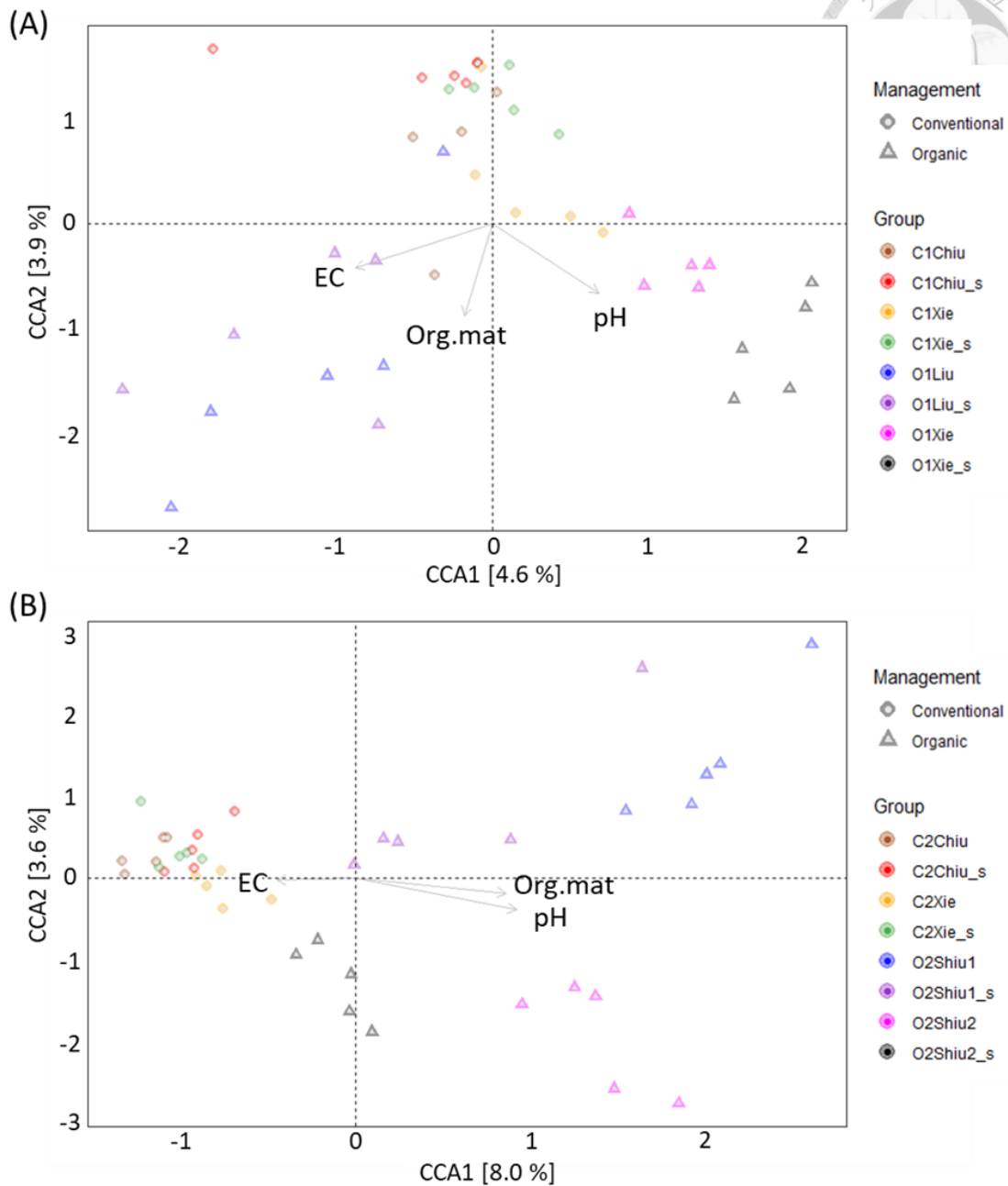


圖 3、土壤環境因子與不同管理方式的水稻內共生菌群組成的關聯性。以典型相關分析 (CCA) 說明 2019 年第 1 期作 (A) 和第 2 期作 (B) 樣品之 OTU 組成與土壤環境因子的關聯性。三角形和菱形分別為有機和慣行管理田區的樣品。EC 為土壤電導度值，pH 為土壤酸鹼值，Org.mat 為土壤有機質含量。

Fig 3. The correlation between the endophyte community data derived from rice roots and soil variables.

The ordination diagram of bacterial community data from the samples harvesting at the 1<sup>st</sup> (A) and 2<sup>nd</sup> (B) cropping season, 2019, respectively, with soil variables. Triangles and diamonds were the samples from organic and conventional fields, respectively. EC, soil electrical conductance; pH, soil pH; Org.mat, organic matter content.

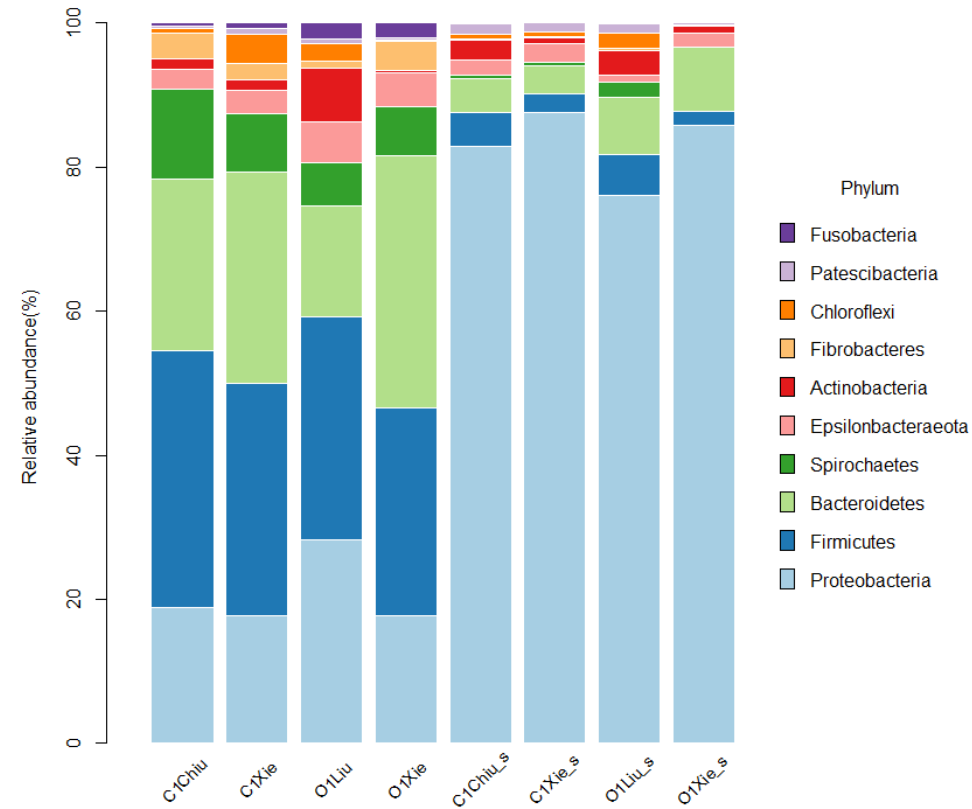


圖 4、2019 年第 1 期作水稻根部內共生細菌組成結構。

以相對豐度排名前十的菌門說明 2019 年第 1 期作水稻樣品根部內共生細菌組成結構。

Figure 4. The composition of rice root endophytes sampled at the 1<sup>st</sup> cropping season in 2019. Only top 10 abundant phyla were shown here.

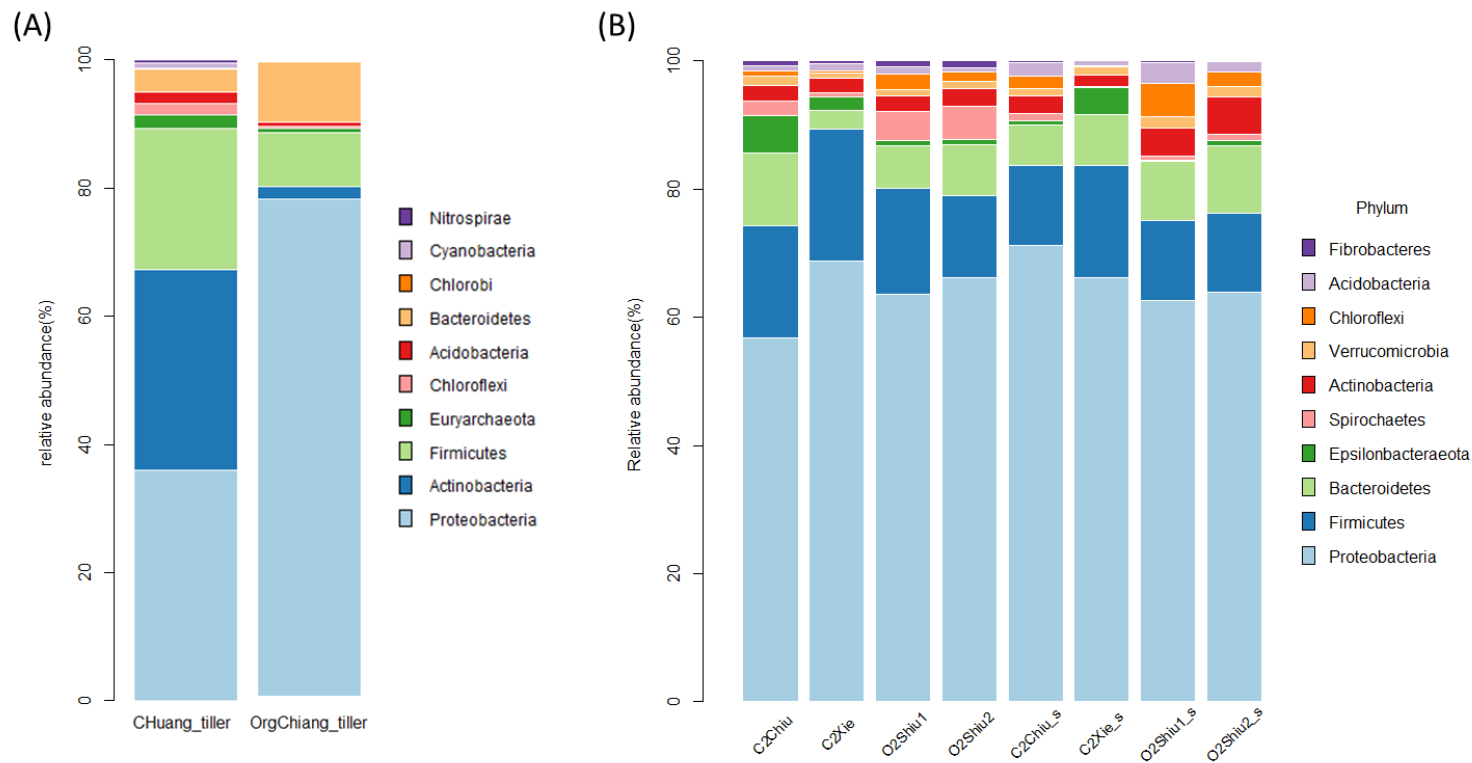


圖 5、第 2 期作水稻根部內共生細菌組成結構。

以相對豐度排名前十的菌門說明 2018 (A) 及 2019 年 (B) 第 2 期作水稻樣品根部內共生細菌組成結構。

Figure 5. The composition of rice root endophytes sampled at the 2<sup>nd</sup> cropping season in 2018 (A) and 2019 (B), respectively. Only top 10 abundant phyla were shown here.

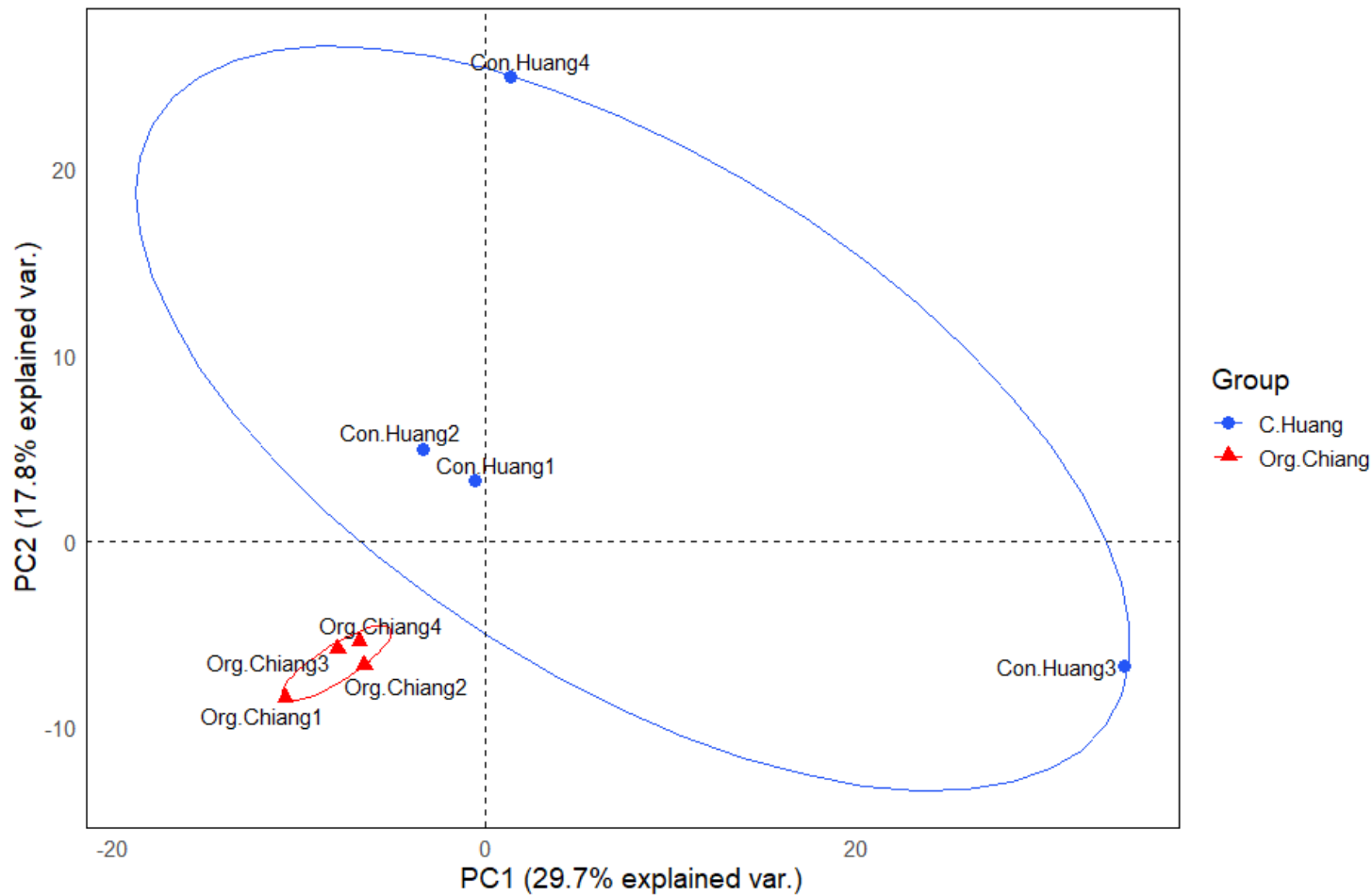


圖 6、2018 年第 2 期作分蘖期水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。  
橢圓形為 95 % 信賴區間。

Figure 6. Principal component analysis (PCA) plot based on the relative abundance of sequencing data of rice root endophyte sampled at the tillering stage in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2018. The ellipses are 95 % confidence interval.



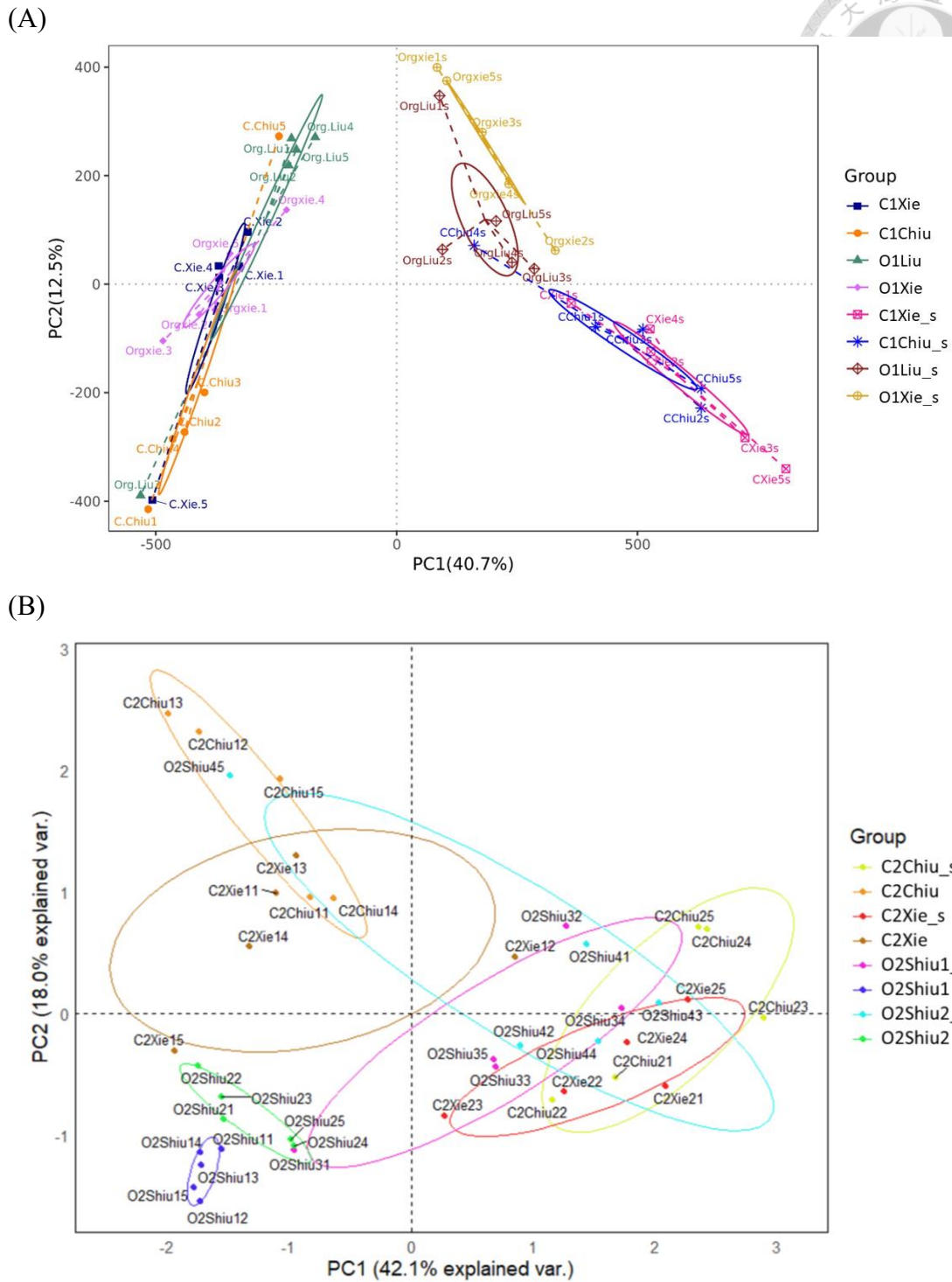


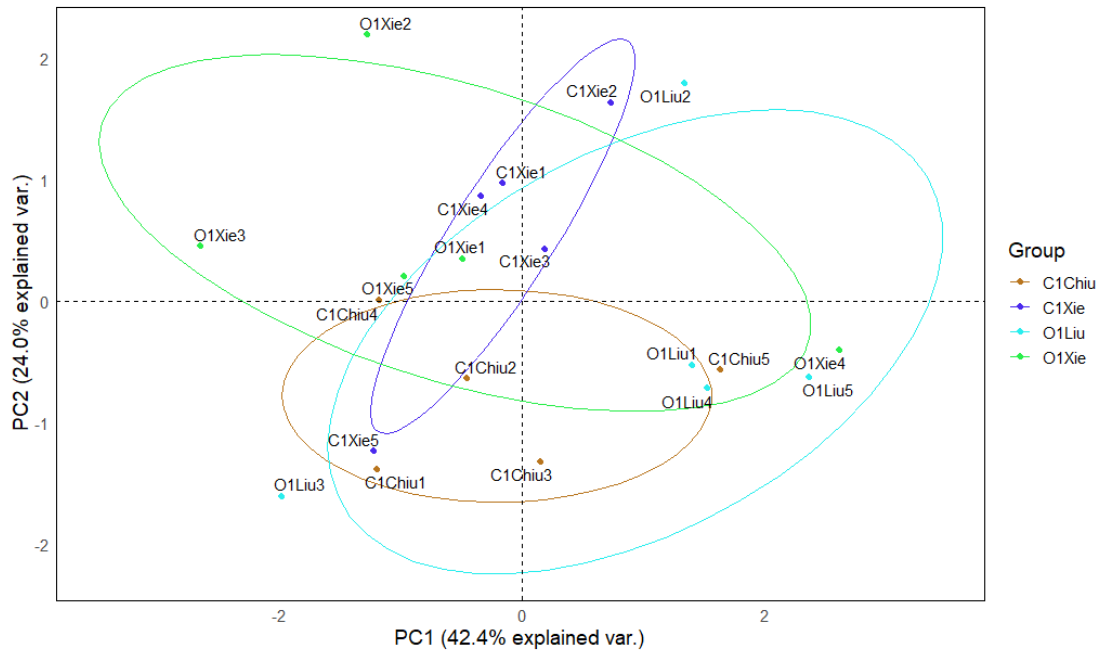
圖 7、2019 年兩個期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。

(A) 一期作及 (B) 二期作根內共生菌組成的主成分分析結果。橢圓形為 95% 信賴區間。

Figure 7. PCA plot based on the relative abundance of sequencing data of rice root endophyte sampled at the 1<sup>st</sup> (A) and 2<sup>nd</sup> (B) cropping season in 2019. The ellipses are 95% confidence interval.



(A)



(B)

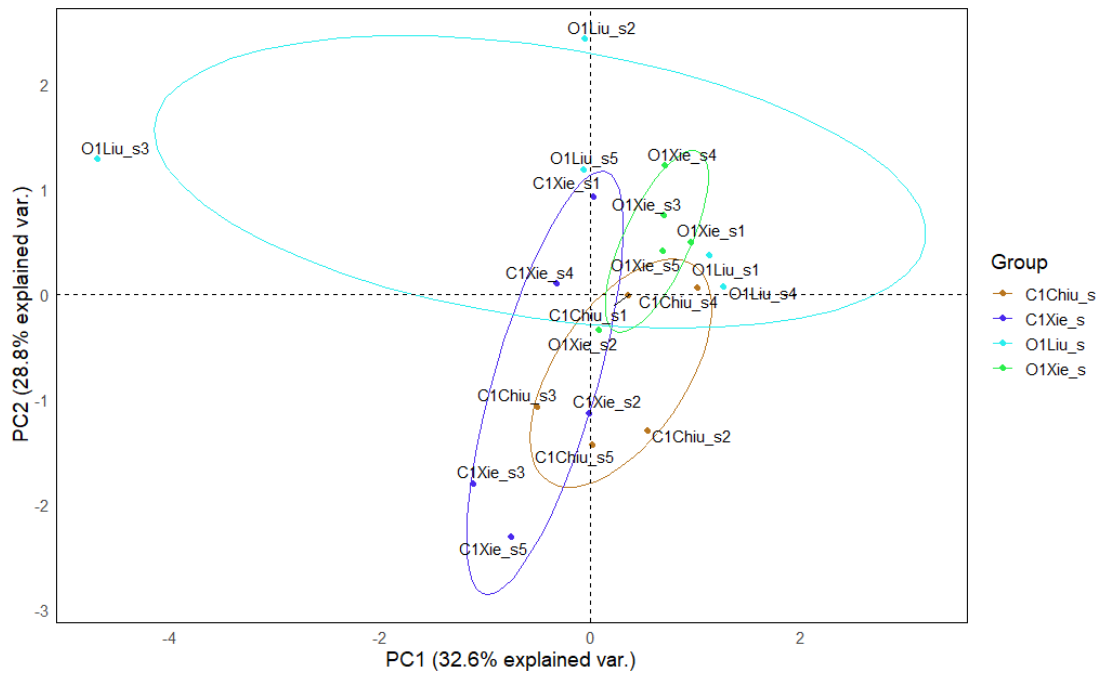


圖 8、2019 年第 1 期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。

(A) 秧苗期及 (B) 分蘖期根內共生菌組成的主成分分析結果。橢圓形為 95% 信賴區間。

Figure 8. PCA plot based on the relative abundance of sequencing data of rice root endophyte sampled at the seedling (A) and tillering (B) stages in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019, respectively. The ellipses are 95 % confidence interval.

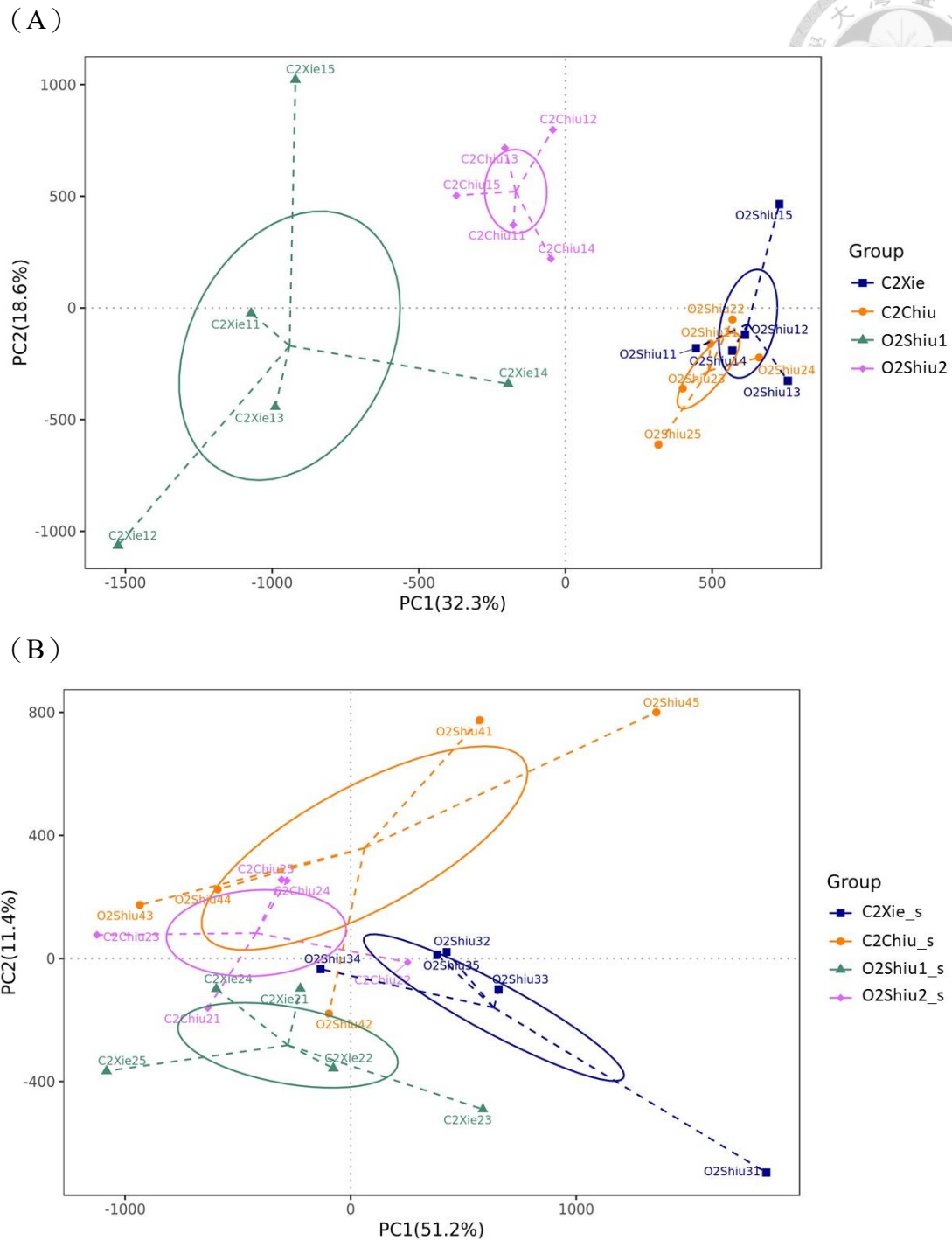


圖 9、2019 年第 2 期作水稻根部內共生細菌組成的主成分分析結果。

(A) 秧苗期及 (B) 分蘗期根內共生菌組成的主成分分析結果。橢圓形為 95 % 信賴區間。

Figure 8. PCA plot based on the relative abundance of sequencing data of rice root endophyte sampled at the seedling (A) and tillering (B) stages in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019, respectively. The ellipses are 95 % confidence interval.

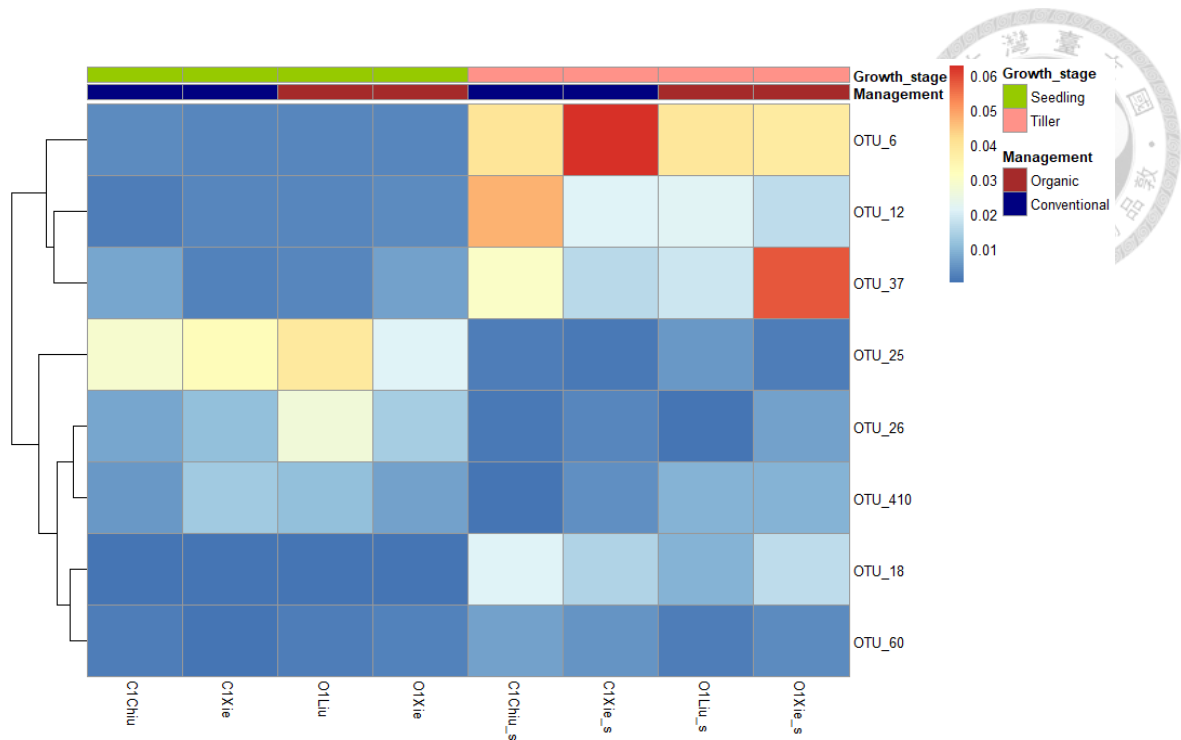


圖 10、2019 年第 1 期作樣品中相對豐度受生育期影響之 OTUs。

以熱圖說明 2019 年第 1 期作樣品中在任一生育期相對豐度具顯著差異之 OTUs，色階代表樣品中各 OTU 所佔之相對豐度。

Fig 10. Heatmap of Heatmap of relative abundance which were significantly affected by growth stage in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019. The color scale indicates the range of relative abundance for a given OTU.

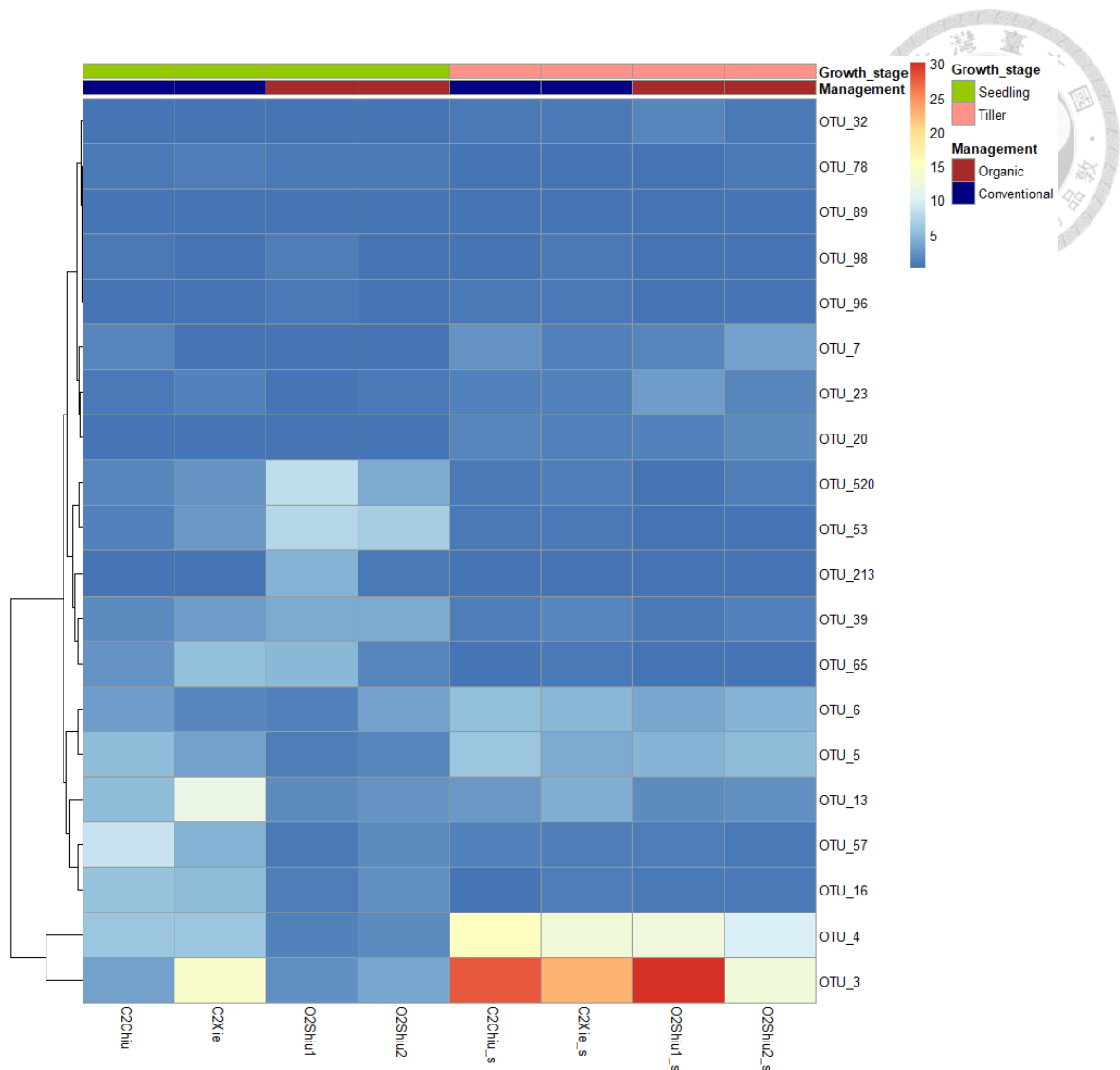


圖 11、2019 年第 2 期作樣品中相對豐度受生育期或田間管理影響之 OTUs。以熱圖說明 2019 年第 2 期作樣品在任一生育期或田間管理方式下相對豐度具顯著差異之 OTUs，色階代表樣品中各 OTU 所佔之相對豐度。

Fig 11. Heatmap of relative abundance of OTUs which were significantly affected either by growth stage or field management in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019. The color scale indicates the range of relative abundance for a given OTU.

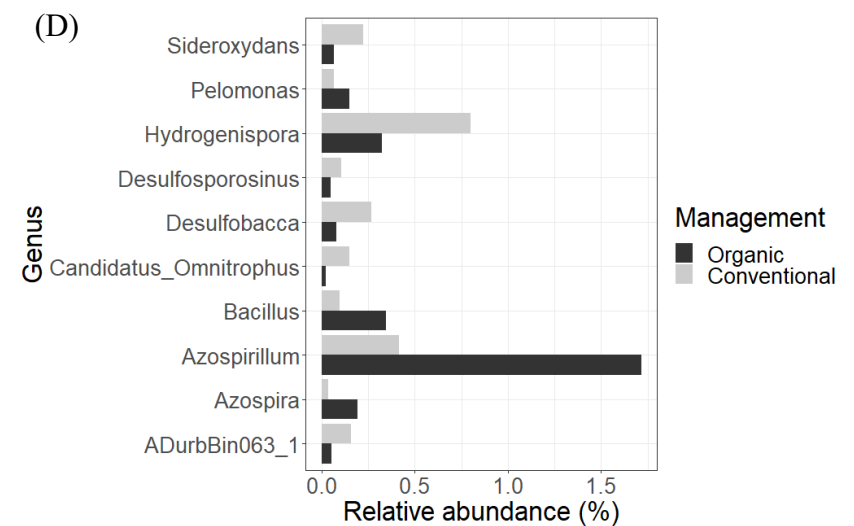
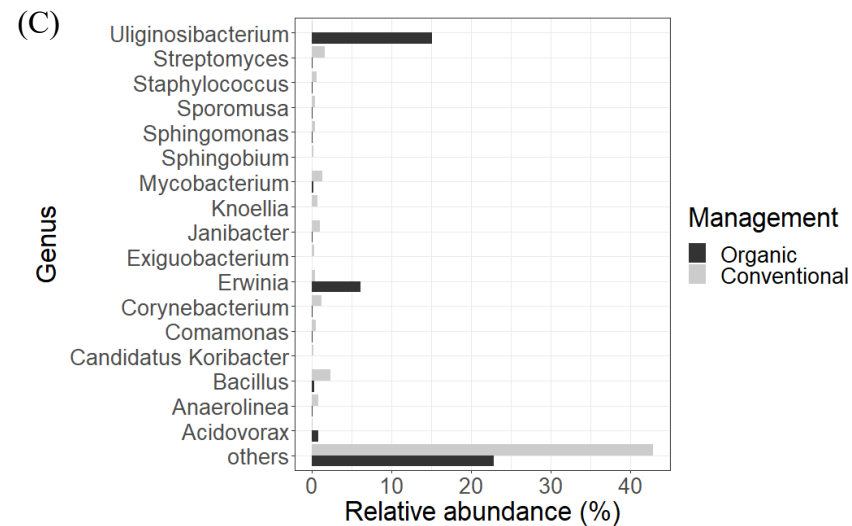
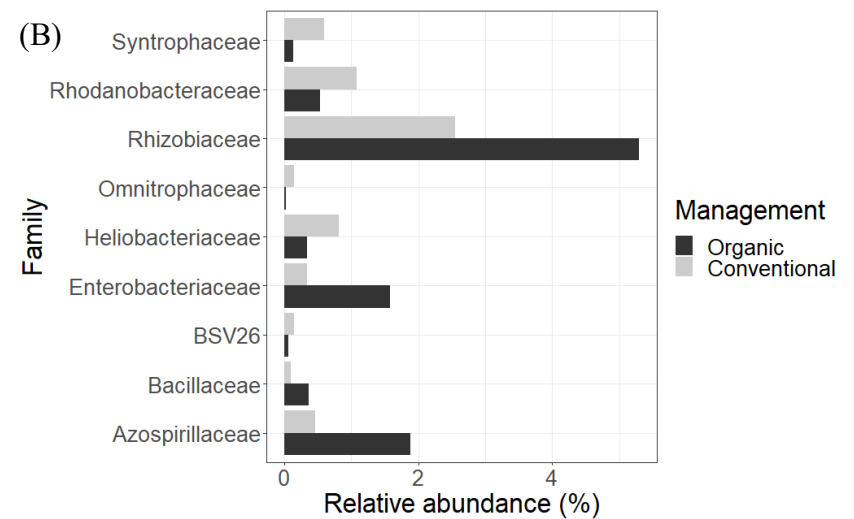
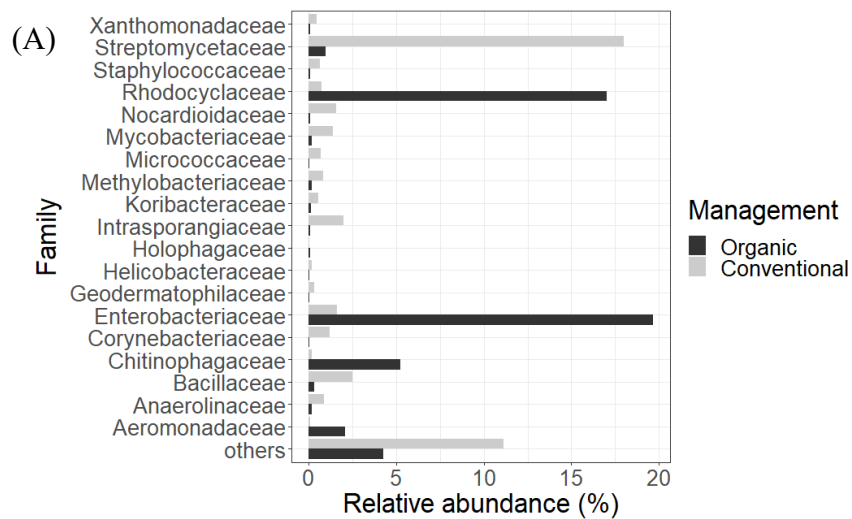
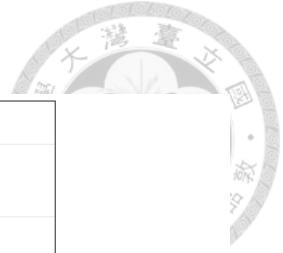


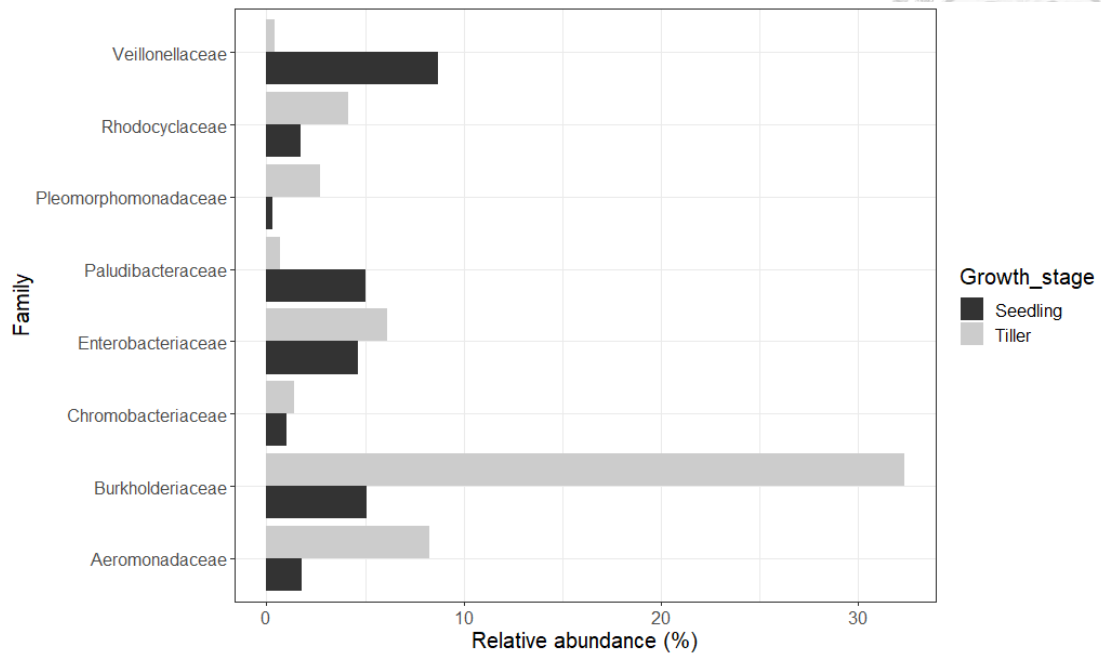
圖 12、在不同管理方式下相對豐度具顯著差異的細菌。

2018 (A、C) 及 2019 (B、D) 年第 2 期作分藥期樣品在不同管理方式下相對豐度具顯著差異的細菌科 (A、B) 及屬 (C、D)。

Fig 12. Families (A & B) and genus (C & D) which were significantly enriched either under either organic or conventional management at the tillering stage in the 2<sup>nd</sup> cropping season in 2018 (A & C) and 2019 (B & D), respectively.



(A)



(B)

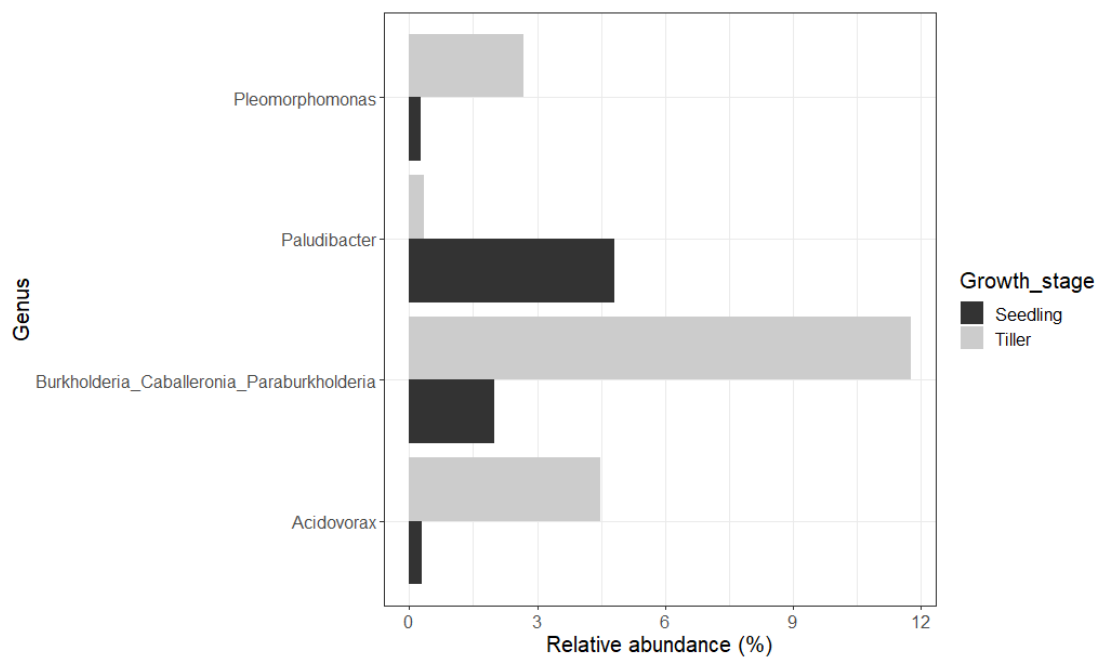
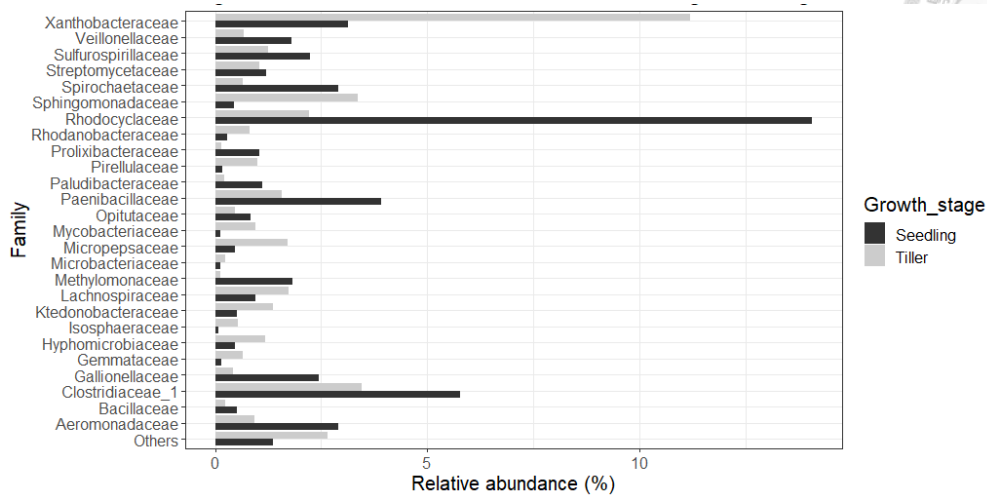


圖 13、2019 年第 1 期作相對豐度受生育期影響而具顯著差異的細菌。  
2019 年第 1 期作樣品中因生育期不同而相對豐度具顯著差異的細菌科 (A) 及屬 (B)。

Fig 13. Families (A) and genus (B) which were significantly enriched at either seedling or tillering stage in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019.



(A)



(B)

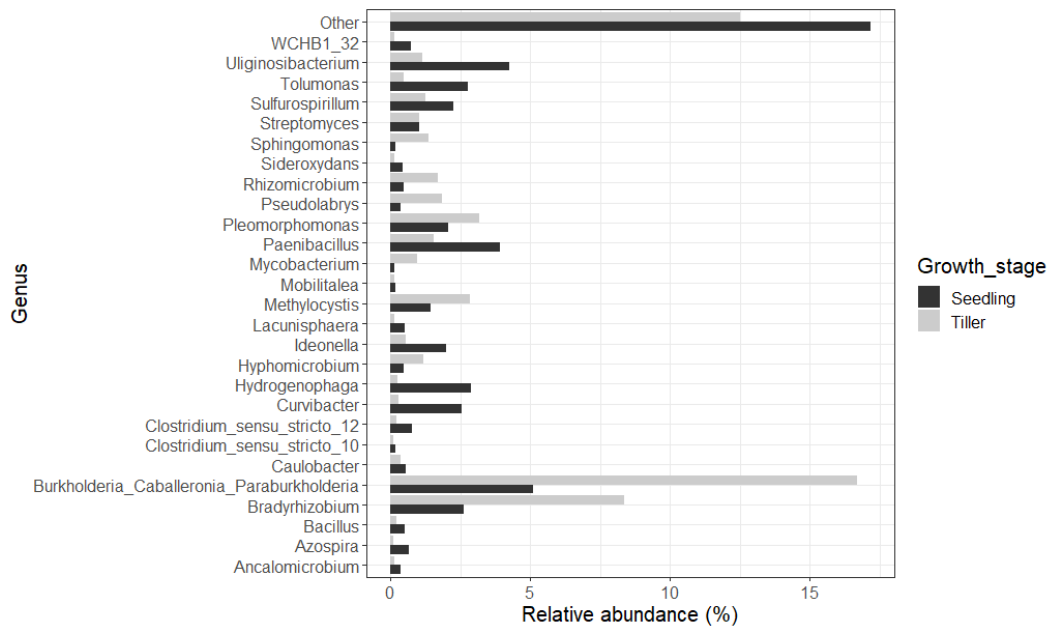


圖 14、2019 年第 2 期作相對豐度受生育期影響而具顯著差異的細菌。  
 2019 年第 2 期作樣品因生育期不同而相對豐度具顯著差異的細菌科(A)及屬(B)。  
 Fig 14. Families (A) and genus (B) which were significantly enriched at either seedling or tillering stages in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019.



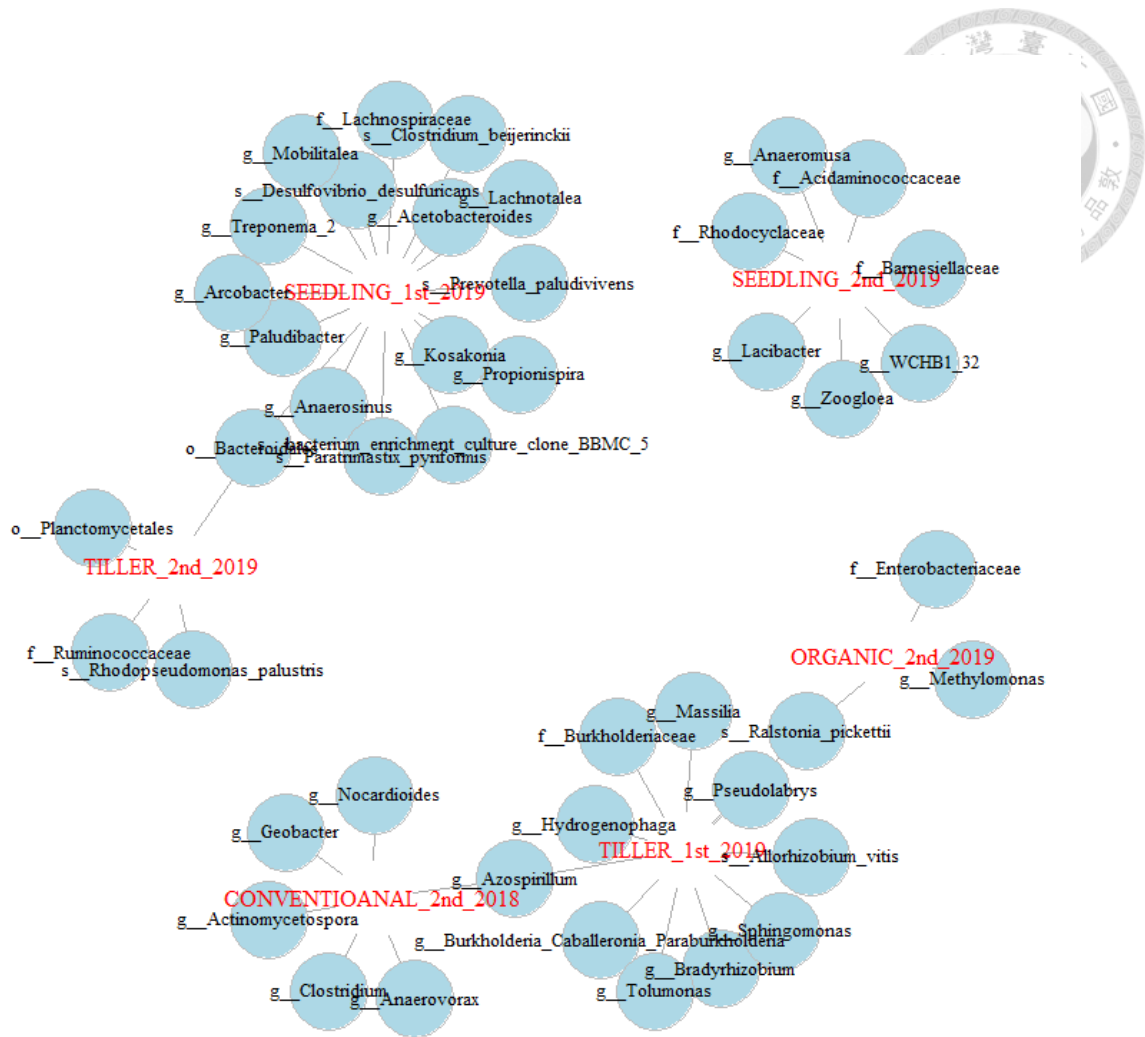


圖 15、對田間管理方式和生育期敏感的水稻根內共生菌群落。

以二分網絡圖表示 2018-2019 年間水稻根內共生菌群落對田間管理方式和生育期相關 OTUs，圓圈代表單個細菌 OTU（以鑑定分類顯示）與一個或多個田間管理方式或生長期呈正相關（ $p < 0.05$ ）。

Fig 15. Bipartite networks display field management- and growth stage-sensitive OTUs in rice root endophytic communities in 2018- 2019 determined by indicator species analysis. Circles represent individual bacteria OTUs showed as the taxonomic level are positively and significantly associated with one or more of the field managements or growth stages ( $p < 0.05$ ).

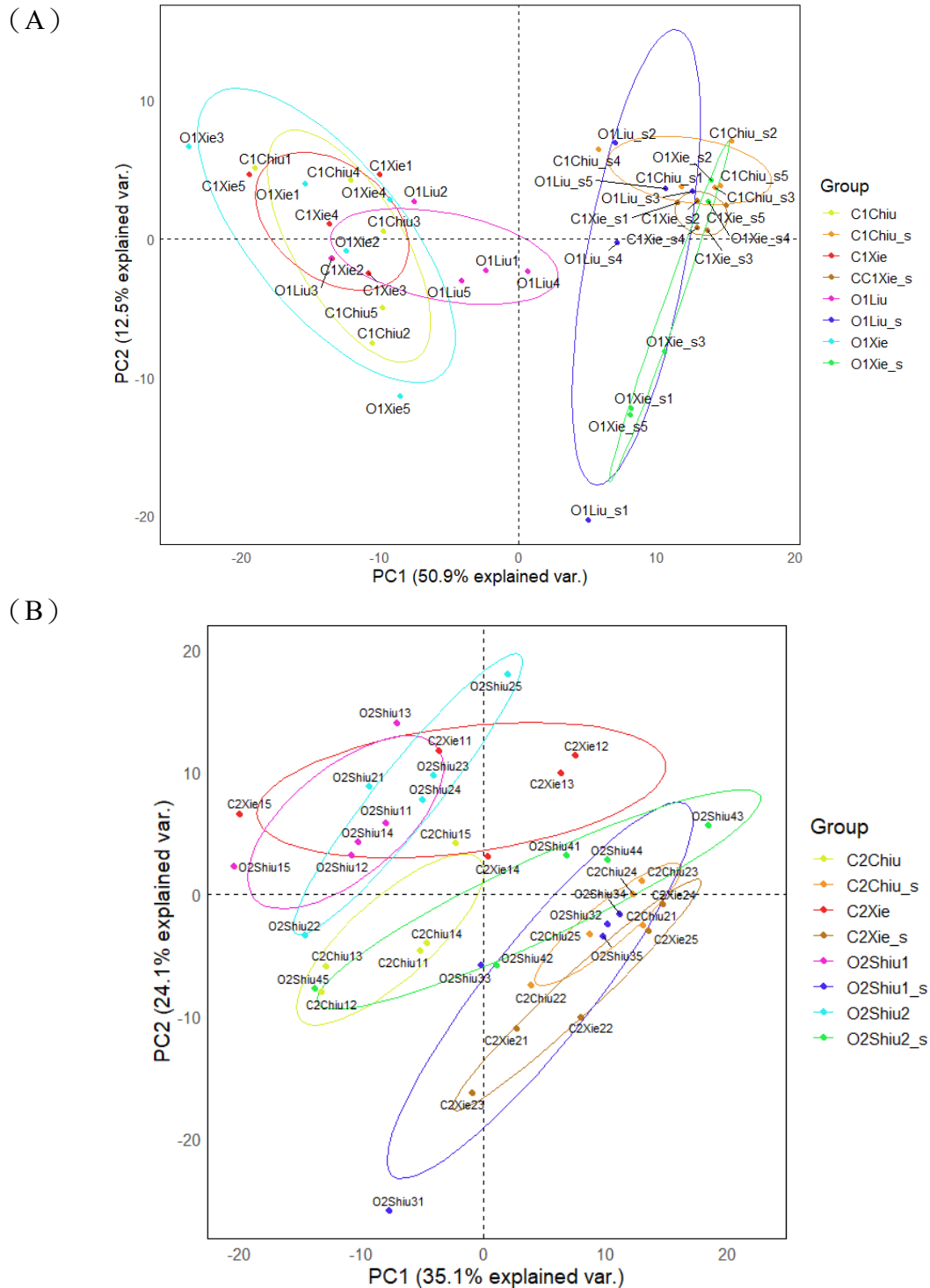


圖 16、水稻內共生細菌功能相似性主成分分析結果。  
依據內共生菌群的功能預測結果進行水稻內共生細菌功能相似性主成分分析結果。  
分析資料源自 2019 年第 1 期作 (A) 和第 2 期作 (B) 的樣品。

Fig 16. PCA of rice root endophyte community functional content similarities based on the relative abundance of the functional prediction consequence. Data were derived from the samples harvesting in the 1<sup>st</sup> (A) and 2<sup>nd</sup> (B) cropping season, 2019, respectively. The ellipses were 95% confidence interval.

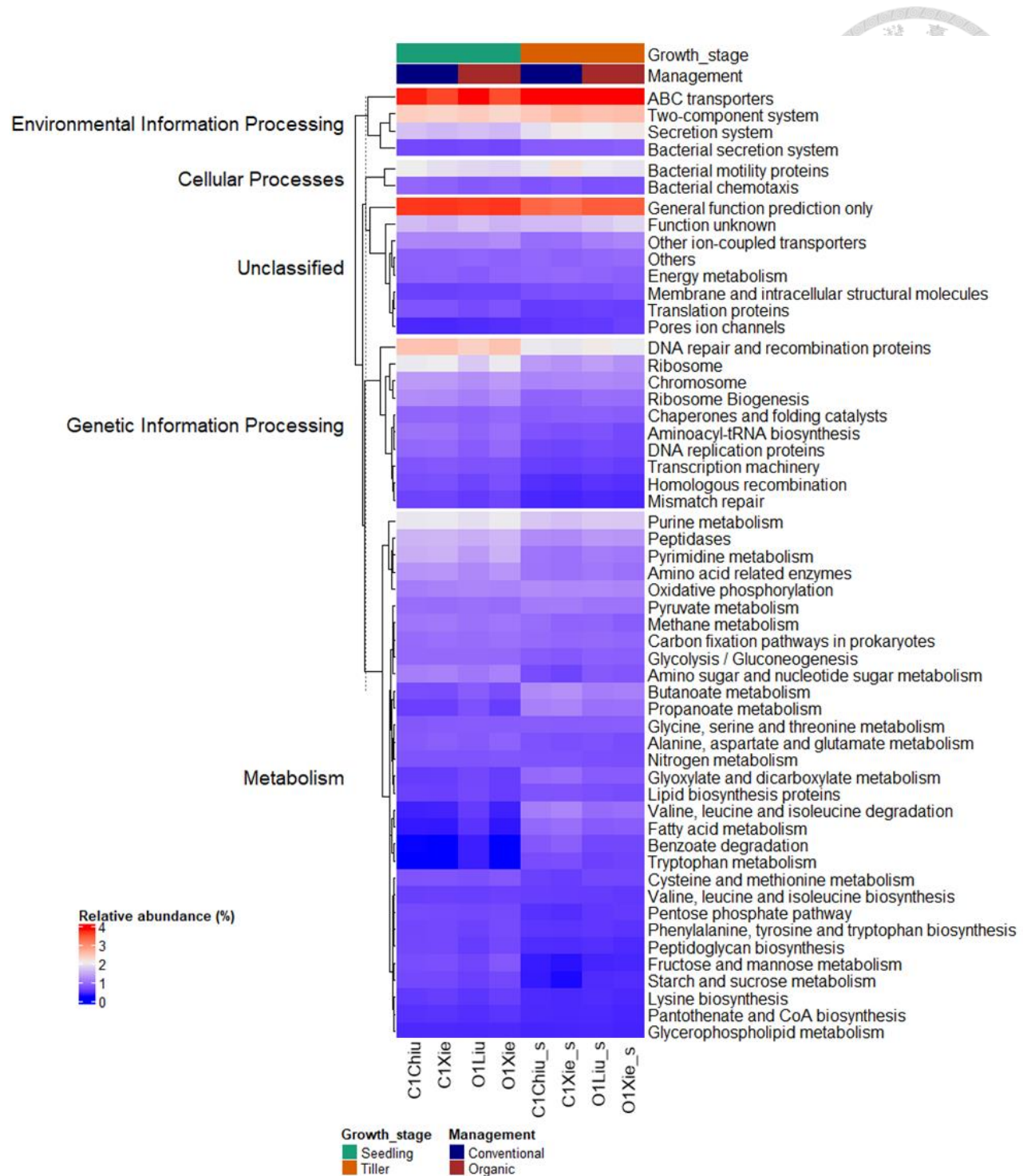


圖 17、2019 年第 1 期作受生育期不同而影響相對豐度之菌群的預測功能。以 KEGG 功能分群，將 2019 年第 1 期作秧苗和分蘗期水稻內共生細菌相對豐度具顯著差異者進行分類。僅平均相對豐度 > 0.5% 功能群以熱圖呈現。

Fig 17. The predicted function of growth stage-sensitive endophyte communities in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019.

Heatmap of rice root endophytes in KEGG pathways significant enriched at the seedling or tillering stages in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019. Only the functions with average relative abundance > 0.5% were shown here.

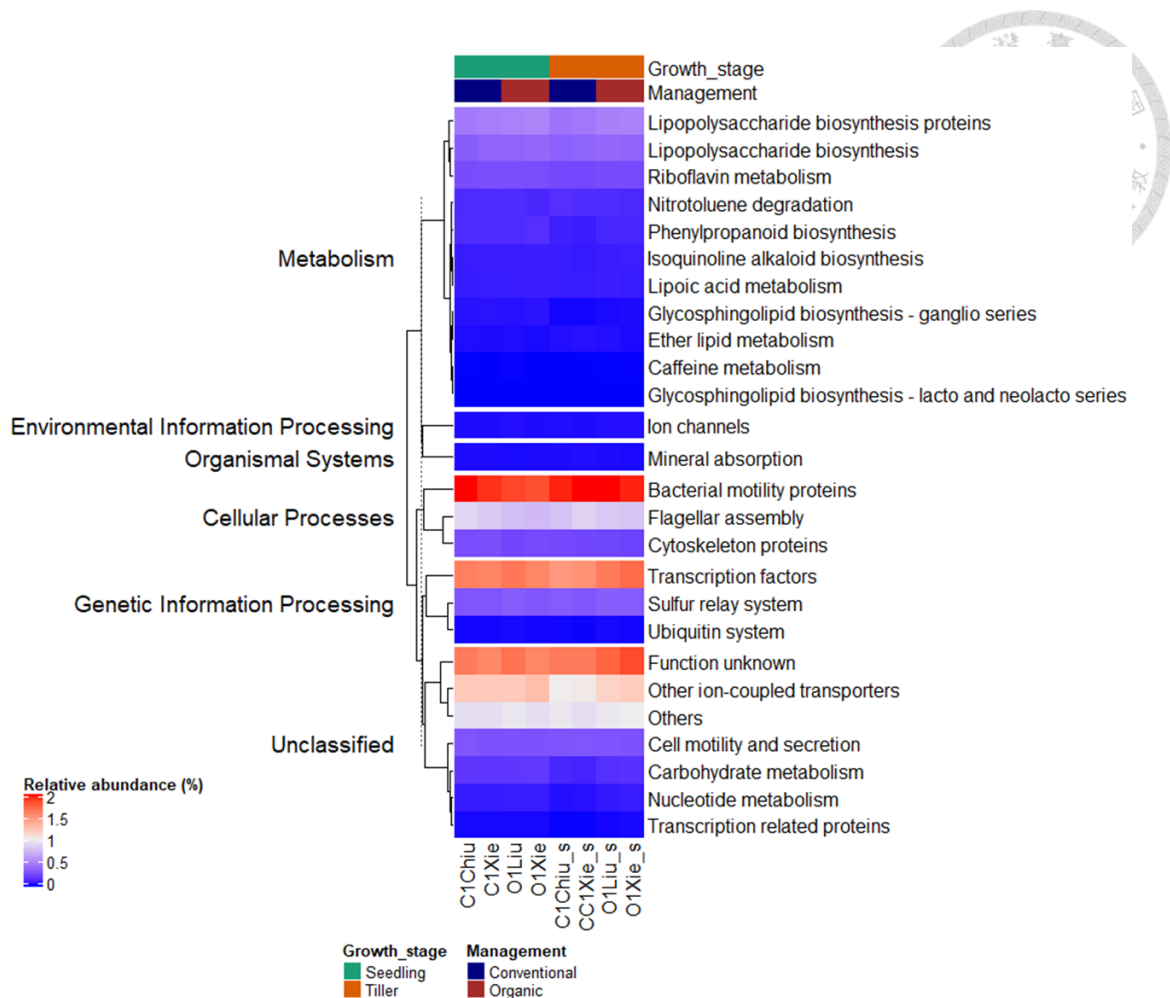


圖 18、2019 年第 1 期作對田間管理方式敏感之菌群的預測功能。

以 KEGG 功能分群，將 2019 年第 1 期作生長於慣行或有機耕作田區之水稻內共生細菌相對豐度具顯著差異者進行分類。相對豐度以熱圖呈現。

Fig 18. The predicted function of management-sensitive endophyte communities in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019.

Heatmap of rice root endophytes in KEGG pathways significant enriched in conventional or organic field in the 1<sup>st</sup> cropping season, 2019.

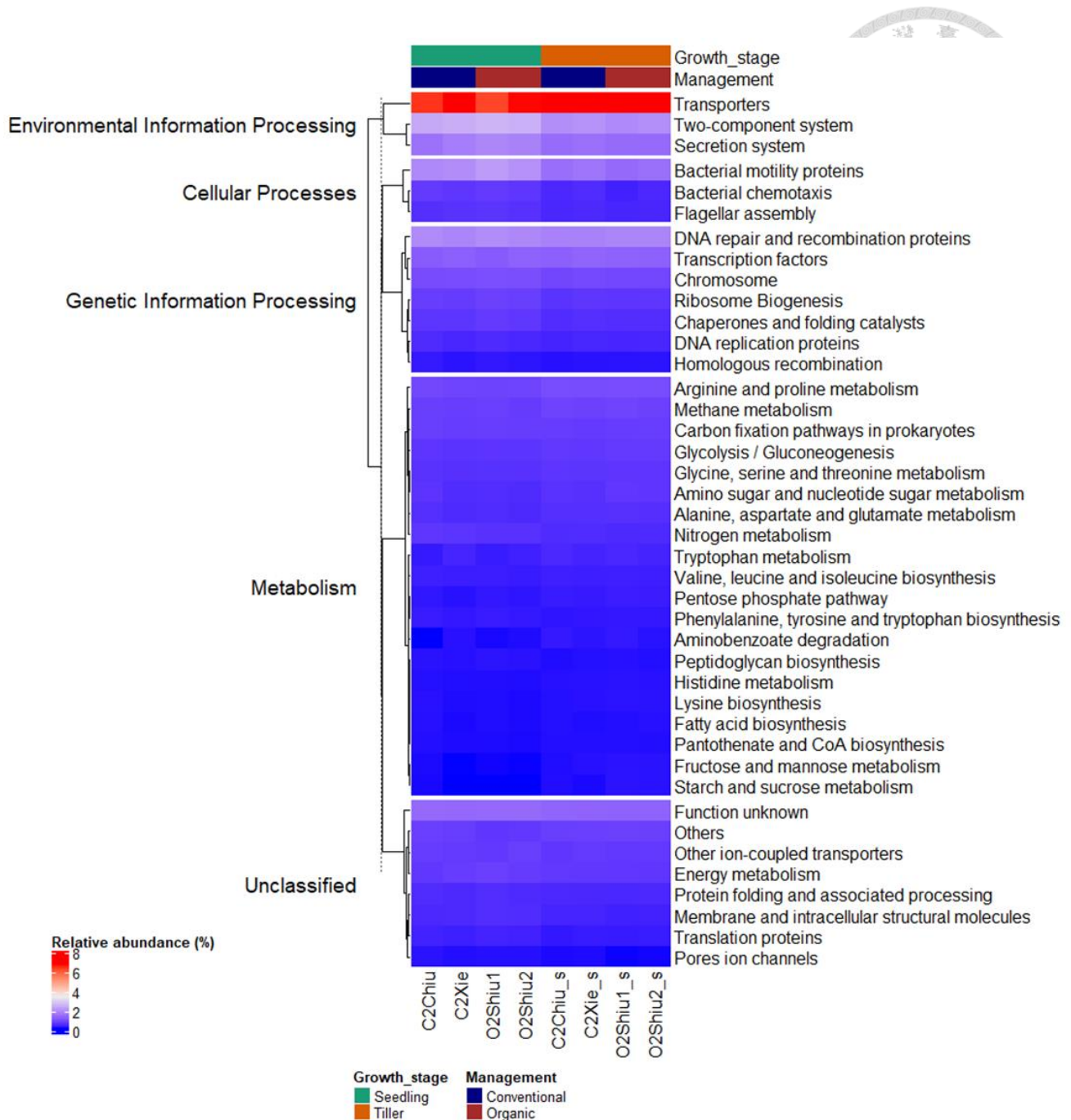


圖 19、2019 年第 2 期作受生育期不同而影響相對豐度之菌群的預測功能。以 KEGG 功能分群，將 2019 年第 2 期作秧苗和分蘗期水稻內共生細菌的相對豐度具顯著差異者進行分類，僅平均相對豐度 > 0.5% 功能群以熱圖呈現。

Fig 19. The predicted function of growth stage-sensitive endophyte community in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019.

Heatmap of rice root endophytes in KEGG pathways significant enriched at the seedling or tillering stages in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019. Only the functions with average relative abundance > 0.5% were shown here.

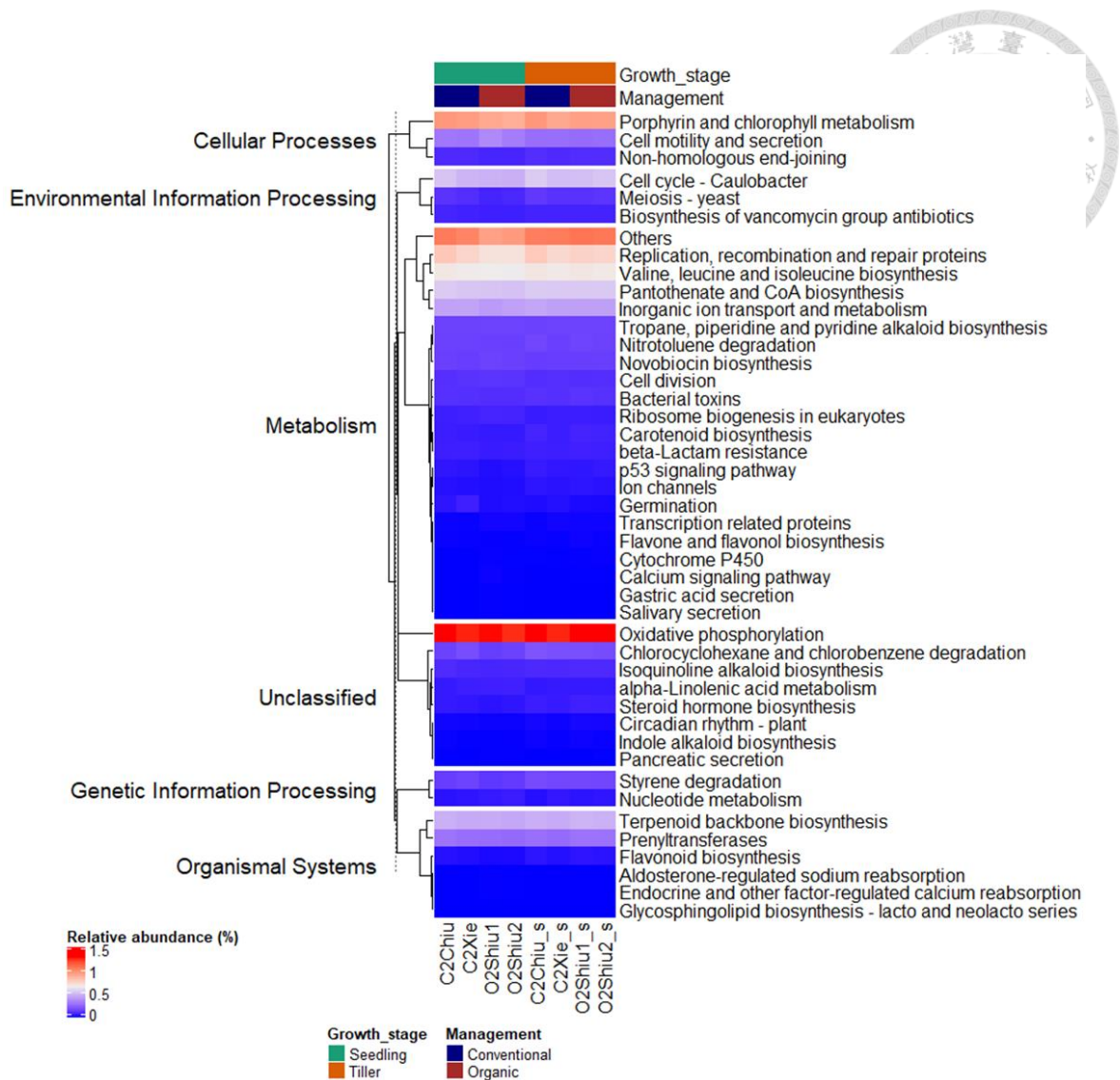


圖 20、2019 年第 2 期作對田間管理方式敏感之菌群的預測功能。

以 KEGG 功能分群，將 2019 年第 2 期作生長於慣行或有機耕作田區之水稻內共生細菌相對豐度具顯著差異者進行分類，相對豐度以熱圖呈現。

Fig 20. The predicted function of management-sensitive endophyte communities in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019.

Heatmap of rice root endophytes in KEGG pathways significant enriched in conventional or organic field in the 2<sup>nd</sup> cropping season, 2019.



表 1、本試驗採集水稻樣品概況。

Table 1. Rice samples collected in this study.

採樣期	生育期	耕作方法	樣品組別	樣品數	水稻品種	採樣地點座標
2018 年第 2 期作	分蘗期	慣行管理	C.Huang	4	台稈 9 號	24.420189, 120.716317
		有機管理	Org.Chiang	4	台稈 9 號	24.412318, 120.715840
2019 年第 1 期作	秧苗期	慣行管理	C1Xie	5	台南 11 號	24.369643, 120.709031
			C1Chiu	5	台南 11 號	24.364497, 120.707921
		有機管理	O1Liu	5	桃園 3 號	24.363708, 120.708252
			O1Xie	5	台稈 8 號	24.368548, 120.705008
	分蘗期	慣行管理	C1Xie_s	5	台南 11 號	24.369643, 120.709031
			C1Chiu_s	5	台南 11 號	24.364497, 120.707921
		有機管理	O1Liu_s	5	桃園 3 號	24.363708, 120.708252
			O1Xie_s	5	台稈 8 號	24.368548, 120.705008
2019 年第 2 期作	秧苗期	慣行管理	C2Xie	5	台南 11 號	24.369628, 120.708997
			C2Chiu	5	台南 11 號	24.364497, 120.707921
		有機管理	O2Shiu1	5	越光	24.367912, 120.710227
			O2Shiu2	5	越光	24.368315, 120.710501
	分蘗期	慣行管理	C2Xie_s	5	台南 11 號	24.369628, 120.708997
			C2Chiu_s	5	台南 11 號	24.364497, 120.707921
		有機管理	O2Shiu1_s	5	越光	24.367912, 120.710227
			O2Shiu2_s	5	越光	24.368315, 120.710501

表 2、16S rRNA 基因聚合酶連鎖反應條件。

Table 2. PCR conditions for amplifying V3-V4 region of 16S rRNA gene.



Steps	Temperature (°C)	Time (min)
Initialization	95	3
Denaturation	95	0.5
Annealing	55	0.5
Extension	72	0.5
Final elongation	72	5
Final hold	4	

← 25 cycles



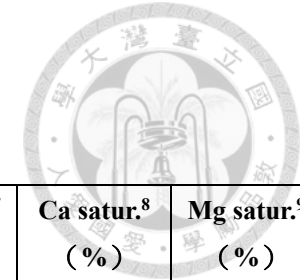


表 3、試驗取樣田的土壤性質。

Table 3. Soil properties of experimental sites.

取樣時期	取樣田	pH	EC <sup>1</sup>	Org. mat. <sup>2</sup> (%)	Available P <sup>3</sup> (ppm)	Exch. K <sup>4</sup> (ppm)	Exch. Ca <sup>5</sup> (ppm)	Exch. Mg <sup>6</sup> (ppm)	K satur. <sup>7</sup> (%)	Ca satur. <sup>8</sup> (%)	Mg satur. <sup>9</sup> (%)
2018 年 第 2 期作	黃東明-慣行 (C.Huang)	5.11	0.172	2.42	6.00	44	692	163	1.4	16	43
	江進富-有機 (Org.Chiang)	5.74	0.081	2.33	5.70	53	1049	266	1.5	24	58
2019 年 第 1 期作	謝松文-慣行 (C1Xie)	4.89	0.294	2.32	5.10	106	551	145	4.1	42	18
	邱建朗-慣行 (C1Chiu)	4.93	0.358	2.58	5.65	117	798	191	3.8	50	20
	劉貴華-有機 (O1Liu)	5.01	0.460	3.00	5.20	104	926	193	3.6	62	21
	謝松文-有機 (O1Xie)	5.27	0.285	2.83	8.05	131	836	204	4.7	58	23
2019 年 第 2 期作	謝松文-慣行 (C2Xie)	4.58	0.150	2.48	3.2	173	522	125	4	23	9
	邱建朗-慣行 (C2Chiu)	4.60	0.308	2.77	1.50	134	788	170	3.1	35	13
	徐阿米-有機 1 (O2Shiu1)	4.97	0.169	3.07	3.7	144	736	151	3.8	38	13
	徐阿米-有機 2 (O2Shiu2)	5.07	0.200	3.07	6.80	198	945	190	4.7	44	14

<sup>1</sup> EC：土壤電導度；<sup>2</sup> Org. mat.：有機質含量；<sup>3</sup> Available P：有效性磷；<sup>4</sup> Exch. K：可交換性鉀；<sup>5</sup> Exch. Ca：可交換性鈣；<sup>6</sup> Exch. Mg：可交換性鎂；<sup>7</sup> K satur.：鉀飽和度；<sup>8</sup> Ca satur.：鈣飽和度；<sup>9</sup> Mg satur.：鎂飽和度

表 4、以相似性分析及置換多元變方分析評估 2019 年第 1 和第 2 期作水稻根內共生菌群組成的組間差異。

Table 4. Evaluation of group effects on rice root endophyte community structure at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> cropping season in 2019 by analysis of similarities (ANOSIM) and PERMANOVA.

Group	ANOSIM		PERMANOVA	
	R-value	P-value	R <sup>2</sup>	P-value
C1Chiu- C1Chiu_s	1	0.008	0.56267	0.0092
C1Xie- O1Xie_s	1	0.009	0.62851	0.0072
C1Xie- C1Chiu	0.178	0.161	0.1539	0.1975
C1Xie- C1Xie_s	1	0.005	0.70196	0.0085
C1Xie- O1Liu_s	1	0.009	0.51494	0.0084
C1Chiu- O1Liu	0.24	0.131	0.23022	0.1245
O1Xie- C1Xie_s	1	0.013	0.72349	0.0065
O1Xie- O1Xie_s	1	0.011	0.63914	0.007
O1Liu- C1Chiu_s	1	0.005	0.49932	0.0068
C1Chiu- O1Xie_s	1	0.019	0.59449	0.0063
C1Xie- O1Liu	0.31	0.054	0.21722	0.0379
O1Xie- O1Liu_s	1	0.013	0.53658	0.008
C1Chiu_s- O1Xie_s	0.64	0.007	0.30406	0.0066
C1Chiu- O1Xie	0.534	0.01	0.25963	0.0391
O1Liu- O1Xie_s	1	0.008	0.5149	0.0064
C1Xie- O1Xie	0.168	0.061	0.1727	0.0416
O1Liu- O1Xie	0.556	0.036	0.30342	0.0145
O1Liu_s- O1Xie_s	0.612	0.008	0.29014	0.0062
O1Liu- O1Liu_s	1	0.012	0.41704	0.009
O1Liu- C1Xie_s	1	0.01	0.5918	0.0072
C1Xie- C1Chiu_s	1	0.004	0.59669	0.0075
C1Xie_s- O1Liu_s	0.532	0.01	0.30228	0.0083
C1Chiu- C1Xie_s	1	0.009	0.66643	0.0066
C1Xie_s- C1Chiu_s	0.428	0.005	0.21813	0.0078
C1Chiu- O1Liu_s	1	0.007	0.48257	0.0066
C1Xie_s- O1Xie_s	0.82	0.009	0.38486	0.008
O1Xie- C1Chiu_s	1	0.006	0.61388	0.0079
C1Chiu_s- O1Liu_s	0.332	0.029	0.19906	0.0236
O2Shiu1- C2Chiu	1	0.007	0.53188	0.0088
C2Xie- C2Chiu	0.608	0.012	0.34249	0.0085

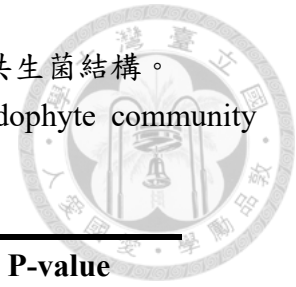
(續)表 4、以相似性分析及置換多元變方分析評估 2019 年第 1 和第 2 期作水稻根內共生菌群組成的組間差異。

(Continued) Table 4. Evaluation of group effects on rice root endophyte community structure at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> cropping season in 2019 by analysis of similarities (ANOSIM) and PERMANOVA.

Group	ANOSIM		PERMANOVA	
	R-value	P-value	R <sup>2</sup>	P-value
O2Shiu2- C2Chiu	0.922	0.007	0.44133	0.0092
O2Shiu2- C2Xie	0.814	0.005	0.34609	0.0077
O2Shiu1- O2Shiu2	0.412	0.006	0.23062	0.0076
O2Shiu1- C2Xie	0.964	0.007	0.4228	0.0086
O2Shiu2_s- C2Chiu_s	0.296	0.015	0.21432	0.0377
O2Shiu1_s- O2Shiu2_s	0.24	0.046	0.15533	0.1668
O2Shiu1_s- C2Xie_s	0.484	0.006	0.21196	0.0175
C2Xie_s- C2Chiu_s	0.312	0.018	0.1987	0.023
O2Shiu2_s- C2Xie_s	0.352	0.009	0.24389	0.0075
O2Shiu1_s- C2Chiu_s	0.472	0.007	0.21793	0.0102

表 5、以 Mantel 檢定評估土壤特性對 2019 年 2 期作水稻根內共生菌結構。

Table 5. Evaluation of effects of soil properties on rice root endophyte community structure at the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> cropping season in 2019 by Mantel test.



<b>Soil properties</b>	<b>Correlation (rho)</b>	<b>P-value</b>
<b>1<sup>st</sup> cropping season, 2019</b>		
Soil pH	0.1898	0.0012
Organic matter content	0.3662	1.00E-04
Calcium saturation ratio	0.3743	1.00E-04
Content of exchangeable calcium	0.3393	1.00E-04
<b>2<sup>nd</sup> cropping season, 2019</b>		
Soil pH	0.2537	0.0016
Organic matter content	0.3096	5.00E-04
Calcium saturation ratio	0.3329	0.0036
Availability of phosphorus	0.011	0.4012
Content of cadmium	0.1617	0.0191
Content of copper	0.2151	0.0285



表 6、本試驗各組樣品內生菌的  $\alpha$ -多樣性。

Table 6. Alpha diversity of rice root endophyte community.

Crop season	2 <sup>nd</sup> cropping season, 2018		1 <sup>st</sup> cropping season, 2019				2 <sup>nd</sup> cropping season, 2019			
Management	Organic	Conventional	Organic		Conventional		Organic		Conventional	
	Chiang	Huang	O1Liu	O1Xie	C1Chiu	C1Xie	O2Shiu1	O2Shiu2	C2Chiu	C2Xie
Growth stage	-		Seedling stage				Seedling stage			
Chao1	-	-	593.66±102.58	488.28±86	542.29±41.67	563.74±51.28	971.44±94.69 a <sup>s</sup>	735.97±162.44 ab	845.86±176.29 ab	523.93±85.67 bB
Shannon	-	-	6.63±0.44	6.35±0.35	6.32±0.24	6.52±0.27	7.18±0.7 a	6.88±0.8 ab	6.69±0.48 ab	5.42±0.57 b
Simpson	-	-	0.97±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01	0.98±0.01 a	0.98±0.01 a	0.98±0.01 ab	0.94±0.02 b
Observed_otus	-	-	395.4±59.57	329.8±49.07 A <sup>SS</sup>	363.2±18.5	380.4±25.54	703.8±103.28 a	559.2±133.41 ab	609±137.65 ab	371.8±79.83 bB
ACE	-	-	588.68±96.92	491.38±82.87	547.32±25.21	566.25±37.82	979.09±87.03 a	731.61±134.45 ab	875.62±181.56 ab	537.96±102.67 bB
PD_whole_tree	-	-	9.17±1.24	7.87±1.06	8.38±0.49	8.98±0.72	11.66±0.63	10.19±1.8	11.26±1.88	8.11±1.29 B
Growth stage	Tillering stage		Tillering stage				Tillering stage			
Chao1	-	-	736.54±177.63 a	332.93±25.93 b	436.58±64.38 b	487.84±113.01 ab	1118.84±242.61 a	650.64±83.38 b	1079.64±194.87 a	1057.59±95.78 aA
Shannon	5.71±0.4 b	7.19±0.63 a	6.75±0.78	5.79±0.09	5.97±0.68	5.62±0.49	6.91±0.57	5.7±0.42	6.32±0.83	6.68±0.74



(續)表 6、本試驗各組樣品內生菌的  $\alpha$ -多樣性。

(Continued) Table 6. Alpha diversity of rice root endophyte community.

Crop season	2 <sup>nd</sup> cropping season, 2018		1 <sup>st</sup> cropping season, 2019				2 <sup>nd</sup> cropping season, 2019			
	Organic	Conventional	Organic		Conventional		Organic		Conventional	
Management	Chiang	Huang	O1Liu	O1Xie	C1Chiu	C1Xie	O2Shiu	O2Shiu2	C2Chiu	C2Xie
Growth stage	Tillering stage		Tillering stage				Tillering stage			
Simpson	-	-	0.97±0.02	0.97±0.00	0.95±0.02	0.94±0.02	0.97±0.01	0.94±0.02	0.94±0.03	0.94±0.03
Observed_otus	-	-	484.2±114.4 a	213.2±9.63 cB	324.2±47.64 bc	297±58.49 c	779.4±126.48 a	442.8±46.21 b	736.4±207.56 ab	784.2±130.24 aA
ACE	-	-	772.77±197.82 a	328.71±33.93 b	465.68±70.11 ab	505.12±116.08 ab	1154.07±259.86 a	674.12±89.6 b	1105.64±211.39 a	1087.78±99.66 aA
PD_whole_tree	-	-	10.32±1.83 a	5.82±1.14 b	8.76±0.58 ab	9.23±1.01 a	13.07±1.46 a	9.17±0.72 b	13.02±2.35 ab	13.59±1.69 aA

<sup>\$</sup>, <sup>\$\$</sup> 經 Kruskal-Wallis 檢定後，指數平均值呈現顯著差異 ( $p < 0.05$ ) 的組別以不同英文字母標示。無字母標示表示未檢測到差異。小寫字母表示在同一生育期下各組樣品之間的比較之差異顯著性，大寫字母則是同一組在不同生育期之間的比較。

<sup>\$</sup>, <sup>\$\$</sup> Means followed by different letter are significantly different at  $p < 0.05$  after Kruskal-Wallis test. Absence of letter means no significance was detected across comparisons. Comparisons between groups sampled at the growth stage are shown by lower case letters. Comparisons between samples at different stages are shown in capital letters.



表 7、Chao1 指數變方分析結果。

Table 7. ANOVA analysis of Chao1 indices

Factor	1 <sup>st</sup> cropping season in 2019						2 <sup>nd</sup> cropping season in 2019					
	Df	Sum of Sqs <sup>\$</sup>	Mean Sq <sup>\$\$</sup>	F	Pr (>F)	Sig <sup>\$\$\$</sup>	Df	Sum of Sqs	Mean Sq	F	Pr (>F)	Sig
Management	1	9146	9146	0.452	0.506		1	567	567	0.012	0.91316	
Growth.stage	1	23541	23541	1.163	0.288		1	430035	430035	9.14	0.00459	**
Management Growth.stage	1	17879	17879	0.884	0.353		1	310970	310970	6.609	0.01443	*
Residual	36	728437	20234				36	1693881	47052			
Total	39	779003	70800				39	2435453	788624			

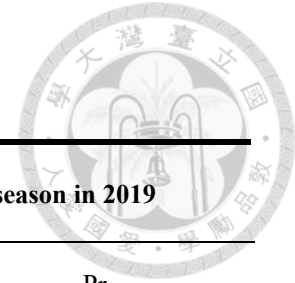
<sup>\$</sup> Sum of Sqs: Sum of squares

<sup>\$\$</sup> Mean Sq: Mean of squares

<sup>\$\$\$</sup> Sig: significance. \*\*, p < 0.01, \*, p < 0.05

表 8、以置換多元變方分析檢視田間管理方式及生育期對樣品細菌群落組成之影響。

Table 8. PERMANOVA table of bacteria community structure and field management or growth stages.



Factors	2 <sup>nd</sup> cropping season in 2018						1 <sup>st</sup> cropping season in 2019						2 <sup>nd</sup> cropping season in 2019					
	Df	Sum of Sqs <sup>\$</sup>	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig <sup>\$</sup>	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig
Management	1	0.85032	0.40375	4.0628	0.028	*	1	0.4158	0.03636	2.5838	0.036	*	1	0.8762	0.11092	7.6634	<0.001	***
Growth.stage	-	-						4.8445	0.42357	30.101	<0.001	***	1	2.4076	0.3048	21.0584	<0.001	***
Management × Growth.stage	-	-						0.3831	0.03349	2.3802	0.05	*	1	0.4994	0.06323	4.3684	0.002	**
Residual	6	1.25576	0.59625				36	5.7939	0.50658				36	4.1159	0.52106			
Total	7	2.10608	1				39	11.4373	1				39	7.8992	1			

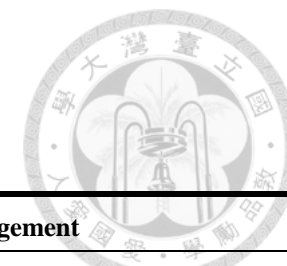
\$ Sum of Sqs: Sum of squares

\$\$ Sig: significance: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1



表 9、相對豐度受不同管理方式影響的細菌分類群。

Table 9. Taxa groups of bacteria which abundance was affected by field managements.



The bacterial groups which were relatively abundant under the organic management, compared to conventional management					
2 <sup>nd</sup> cropping season, 2018		1 <sup>st</sup> cropping season, 2019		2 <sup>nd</sup> cropping season, 2019	
Tillering stage		Seedling stage	Tillering stage	Seedling stage	Tillering stage
Phylum	Proteobacteria		Bacteroidetes	Spirochaetes, Chloroflexi, Others	
Class	[Saprospirae], Gammaproteobacteria, Holophagae	Fusobacteriia	Bacteroidia	Spirochaetia, Others	Negativicutes
Order	[Saprospirales], Aeromonadales, Enterobacteriales, Holophagales, Rhodocyclales	Fusobacteriales	Chitinophagales	Azospirillales, Gemmatales, Methylococcales, Rhodospirillales, Spirochaetales, Others	Azospirillales, Enterobacteriales, Selenomonadales
Family	Aeromonadaceae, Chitinophagaceae, Enterobacteriaceae, Holophagaceae, Rhodocyclaceae	Leptotrichiaceae	Pseudomonadaceae	Archangiaceae, Azospirillaceae, Bacillaceae, Cellulomonadaceae, Chromobacteriaceae, Gallionellaceae, Gemmataceae, Methylomonaceae, Methylophilaceae, Spirochaetaceae	Azospirillaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Rhizobiaceae
Genera	<i>Acidovorax</i> , <i>Anaerolinea</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Uliginosibacterium</i>	<i>Hypnocyclicus</i>	<i>Novosphingobium</i> , <i>Pseudomonas</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> , <i>Azospira</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium_sensu_stricto_10</i> , <i>Curvibacter</i> , <i>Gemmata</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Mobilitalea</i> , <i>Sideroxydans</i> , <i>Spirochaeta_2</i> , <i>Treponema_2</i>	<i>Azospira</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pelomonas</i>



(續)表 9、相對豐度受不同管理方式影響的細菌分類群。

(Continued) Table 9. Taxa groups of bacteria which abundance was affected by field managements.

<b>The bacterial groups which were relatively abundant under the organic management, compared to conventional management</b>					
<b>2<sup>nd</sup> cropping season, 2018</b>		<b>1<sup>st</sup> cropping season, 2019</b>		<b>2<sup>nd</sup> cropping season, 2019</b>	
<b>Tillering stage</b>		<b>Seedling stage</b>	<b>Tillering stage</b>	<b>Seedling stage</b>	<b>Tillering stage</b>
Species				<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	<i>Paraburkholderia kururiensis</i> subsp. <i>kururiensis</i>
<b>The bacterial groups which were relatively abundant under the conventional management, compared to organic management</b>					
Phylum	Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi	Fusobacteria	Patescibacteria	Firmicutes, Epsilonbacteraeota	Acidobacteria, Patescibacteria, Nitrospirae, Omnitrphicaeota
Class	Acidobacteriia, Actinobacteria, Anaerolineae, Bacilli	Deltaproteobacteria	Bacilli, Parcubacteria	Bacilli, Campylobacteria	Acidobacteriia, Chlamydiae, Ignavibacteria, KD4_96, Omnitrphica, Parcubacteria
Order	Acidobacteriales, Actinomycetales, Anaerolineales, Bacillales, Xanthomonadales	Desulfovibrionales	Bacillales, Betaproteobacteriales	Aeromonadales, Bacillales, Campylobacteriales, Rhizobiales	Acidobacteriales, Chlamydiales, Holophagales, Kryptoniales, Micrococcales, Omnitrphales, Syntrophobacteriales, Xanthomonadales
Family	Others, Anaerolinaceae, Bacillaceae, Corynebacteriaceae, Geodermatophilaceae, Helicobacteraceae, Intrasporangiaceae, Koribacteraceae, Methylobacteriaceae, Micrococcaceae, Mycobacteriaceae, Nocardioideaceae, Staphylococcaceae, Streptomycetaceae, Xanthomonadaceae	Desulfovibrionaceae	Beijerinckiaceae, Burkholderiaceae, Hyphomicrobiaceae	Aeromonadaceae, Hyphomicrobiaceae, Microbacteriaceae, Paenibacillaceae, Pleomorphomonadaceae, Rhodocyclaceae, Sulfurospirillaceae, Xanthobacteraceae	BSV26, Heliobacteriaceae, Omnitrphaceae, Rhodanobacteraceae, Syntrophaceae



(續)表 9、相對豐度受不同管理方式影響的細菌分類群。

(Continued) Table 9. Taxa groups of bacteria which abundance was affected by field managements (continued).

The bacterial groups which were relatively abundant under the conventional management, compared to organic management					
2 <sup>nd</sup> cropping season, 2018		1 <sup>st</sup> cropping season, 2019		2 <sup>nd</sup> cropping season, 2019	
Tillering stage		Seedling stage	Tillering stage	Seedling stage	Tillering stage
Genera					
<i>Bacillus, Comamonas, Exiguobacterium, Janibacter, Knoellia,</i> <i>Sphingobium, Sphingomonas, Sporomusa, Staphylococcus,</i> <i>Streptomyces</i>			<i>Bradyrhizobium,</i> <i>Burkholderia_Caballeronia_Paraburkholderia, Dechloromonas,</i> <i>Hyphomicrobium, Ralstonia,</i> <i>Sulfurospirillum</i>	<i>Bradyrhizobium,</i> <i>Clostridium_sensu_stricto_1,</i> <i>Hyphomicrobium, Paenibacillus,</i> <i>Pleomorphomonas, Propionivibrio,</i> <i>Pseudolabrys, Sphingomonas,</i> <i>Sulfurospirillum, Tolumonas,</i> <i>Uliginosibacterium, WCHB1_32</i>	<i>ADurbBin063_1,</i> <i>Candidatus_Omnitrophus, Desulfobacca,</i> <i>Desulfosporosinus, Hydrogenispora,</i> <i>Sideroxydans</i>
Species					
		<i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>		<i>Clostridium_beijerinckii,</i> <i>Clostridium_sp_TW13,</i> <i>Hyphomicrobium_sp_AT4</i>	

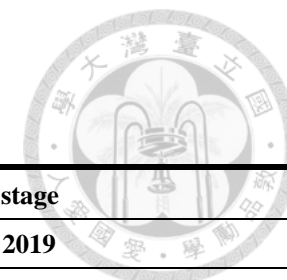
表 10、相對豐度受生育時期影響的細菌分類群。

Table 10. Taxa groups of bacteria which abundance was affected by growth stages.

The bacterial groups which were relatively abundant at the seedling stage, compared to tillering stage	
1 <sup>st</sup> cropping season, 2019	2 <sup>nd</sup> cropping season, 2019
<b>Phylum</b> Bacteroidetes, Epsilonbacteraeota, Firmicutes	Firmicutes, Epsilonbacteraeota, Spirochaetes
<b>Class</b> Bacteroidia, Campylobacteria, Clostridia, Deltaproteobacteria, Negativicutes	Bacilli, Campylobacteria, Gammaproteobacteria, Negativicutes, Spirochaetia
<b>Order</b> Bacteroidales, Campylobacterales, Clostridiales, Selenomonadales	Aeromonadales, Bacillales, Betaproteobacteriales, Campylobacterales, Candidatus_Nomurabacteria, Methylococcales, Opitutales, Selenomonadales, Sphingomonadales, Spirochaetales, Streptomycetales
<b>Family</b> Paludibacteraceae, Veillonellaceae	Aeromonadaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae_1, Gallionellaceae, Methylomonaceae, Opitutaceae, Paenibacillaceae, Paludibacteraceae, Prolixibacteraceae, Rhodocyclaceae, Spirochaetaceae, Streptomycetaceae, Veillonellaceae
<b>Genera</b> <i>Paludibacter</i>	<i>Ancalomicrobium, Azospira, Bacillus, Bradyrhizobium, Caulobacter, Clostridium_sensu_stricto_10, Clostridium_sensu_stricto_12, Curvibacter, Hydrogenophaga, Ideonella, Mobilitalea, Paenibacillus, Sideroxydans, Streptomyces, Sulfurospirillum, Tolumonas, Uliginosibacterium, WCHB1_32</i>
<b>Species</b>	

(續)表 10、相對豐度受不同生育時期影響的細菌分類群。

(Continued) Table 10. Taxa groups of bacteria which abundance was affected by growth stages.



The bacterial groups which were relatively abundant at the tillering stage, compared to seedling stage	
	<b>1<sup>st</sup> cropping season, 2019</b>
	<b>2<sup>nd</sup> cropping season, 2019</b>
Phylum	Patescibacteria, Planctomycetes, Proteobacteria
Class	Alphaproteobacteria, Bacilli, Gammaproteobacteria, Planctomycetacia
Order	Aeromonadales, Betaproteobacteriales, Enterobacteriales, Rhizobiales
Family	Aeromonadaceae, Burkholderiaceae, Chromobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Pleomorphomonadaceae, Rhodocyclaceae
Genera	<i>Acidovorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Caballeronia</i> , <i>Paraburkholderia</i> , <i>Pleomorphomonas</i>
Species	<i>Acidovorax delafieldii</i>

附錄

附表 1、以置換多元變方分析 2019 年第 1 期作內共生細菌群落組成之結果。

Supplementary table 1. PERMANOVA table of bacteria community structure and growth stages or field management (1<sup>st</sup> cropping season, 2019).



**PERMANOVA of field management and bacterial community structure**

Factor	Seedling stage						Tillering stage					
	Df	Sum of Sqs <sup>\$</sup>	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig <sup>\$\$</sup>	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig
Management	1	0.26844	0.08947	1.7686	0.09	.	1	0.5305	0.14767	3.1186	<0.001	***
Residual	18	2.73204	0.91053				18	3.0619	0.85233			
Total	19	3.00048	1				19	3.5923	1			

**PERMANOVA of growth stages and the bacterial community structure**

Factor	Organic management						Conventional management					
	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig
Growth stage	1	2.1607	0.38735	11.38	<0.001	***	1	3.0669	0.56343	23.23	<0.001	***
Residual	18	3.4176	0.61265				18	2.3763	0.43657			
Total	19	5.5783	1				19	5.4432	1			

\$ Sum of Sqs: Sum of squares

\$\$ Sig: significance: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

附表 2、以置換多元變方分析 2019 年第 2 期作樣品細菌群落組成之結果。

Supplementary table 2. PERMANOVA table of bacteria community structure and growth stages or field management (2<sup>nd</sup> cropping season, 2019).



PERMANOVA of field management and bacterial community structure												
Factor	Seedling stage						Tillering stage					
	Df	Sum of Sqs <sup>\$</sup>	Mean Sq	F	Pr (>F)	Sig <sup>\$\$</sup>	Df	Sum of Sqs	Mean Sq	F	Pr (>F)	Sig
Management	1	0.32821	0.15084	3.1975	0.002	**	1	1.0474	0.31589	8.3115	<0.001	***
Residual	18	1.84761	0.84916				18	2.2683	0.68411			
Total	19	2.17582	1				19	3.3157	1			

PERMANOVA of growth stages and the bacterial community structure												
Factor	Organic management						Conventional management					
	Df	Sum of Sqs	Mean Sq	F	Pr (>F)	Sig	Df	Sum of Sqs	Mean Sq	F	Pr (>F)	Sig
Growth stage	1	1.5006	0.38128	11.092	<0.001	***	1	1.4065	0.45556	15.062	<0.001	***
Residual	18	2.4351	0.61872				18	1.6808	0.54444			
Total	19	3.9357	1				19	3.0873	1			

\$ Sum of Sqs: Sum of squares

\$\$ Sig: significance: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

附表 3、2019 年第 2 期作樣品 Chao1 指數變方分析結果。

Supplementary table 3. ANOVA table of bacteria community Chao1 indices and growth stages or field management (2<sup>nd</sup> cropping season, 2019).



ANOVA of field management and bacterial community structure												
Factor	Seedling stage						Tillering stage					
	Df	Sum of Sqs <sup>s</sup>	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig <sup>ss</sup>	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig
Management	1	142485	142485	3.702	0.0703	.	1	169053	169053	3.04	0.0983	.
Residual	18	692806	38489				18	1001075	55615			
Total	19	835291	180974				19	1170128	224668			

ANOVA of growth stages and the bacterial community structure												
Factor	Organic management						Conventional management					
	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig	Df	Sum of Sqs	R <sup>2</sup>	F	Pr (>F)	Sig
Growth stage	1	4814	4814	0.079	0.781		1	736192	736192	21.99	0.000183	***
Residual	18	1091305	60628				18	602576	33476			
Total	19	1096119	65442				19	1338768	769668			

\$ Sum of Sqs: Sum of squares

\$\$ Sig: significance: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1