

# 丁基拉草施用於稻田對 可培養性固氮細菌族群變化之影響<sup>1</sup>

陳玟瑾<sup>2</sup>、顏瑞泓<sup>3</sup>、王一雄<sup>3</sup>

## 摘 要

丁基拉草的施用可提升土壤固氮能力，為進一步了解丁基拉草的施用與土壤固氮細菌族群的關係，並篩選丁基拉草施用下之可培養固氮細菌，本研究施用10倍推薦量的丁基拉草於稻田土壤中，並於不同水稻生長時期測量土壤固氮活性的變化，之後分析可培養性固氮細菌數量的變化、分離篩選型態及16S rDNA編碼相異之可培養之土壤固氮細菌菌株。結果顯示，丁基拉草的施用造成土壤固氮量上升，尤其以孕穗期時之下層土壤其增加量最大。但於水稻成熟期時，上下層土壤固氮能力與對照組相較各增加7.20%及3.40%，顯示一次施用丁基拉草的情形下，土壤固氮能力可於水稻生育期間持續提升。分析土壤固氮細菌族群數量結果顯示，於孕穗期時（約為水稻移植後39天），固氮菌數量有顯著的上升。自控制組及處理組之稻田土壤中篩選出 $\alpha$ -、 $\beta$ -及 $\gamma$ -變形菌門、厚壁菌門及放線菌門之可培養性固氮菌。比較兩組樣品所篩選出之菌株，發現無論在上層或下層土壤中，其族群組成亦有差異。因此，施用丁基拉草不但可以增加土壤游離性固氮菌的數量，並可改變其族群組成，兩者同時可能為造成土壤固氮能力上升的原因。

**關鍵字：**丁基拉草、固氮細菌、稻田。

## 前 言

丁基拉草(Butachlor)(圖一)，化學名為*N*-butoxymethyl-2-chloro-2', 6'-diethylacetanilide，是具選擇性的系統性除草劑，於1971年引進臺灣，為臺灣使用最廣泛的水田除草劑。本劑的水溶性低，土粒附著力強，故土壤滲漏作用輕微，淋溶深度很少超過1~2 cm<sup>(1)</sup>。欲防除插秧前雜草，每公頃田地可施用5%的丁基拉草粒劑30 kg（相當於1.5 g are<sup>-1</sup>的丁基拉草標準品），可防治水稗、鴨舌草、球花蒿草、母草、紅骨草、牛毛氈及螢蘭等水田雜草<sup>(2)</sup>。

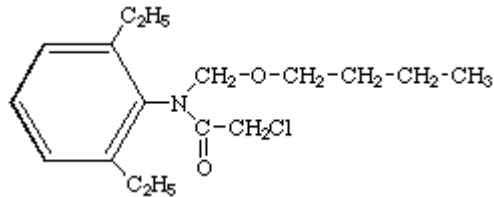
前人研究中，將丁基拉草施用於稻田，可有效防除雜草及增加稻米產量，但施用丁基拉草的土壤，不論是其微生物菌相，或是其酵素活性均受到影響<sup>(21)</sup>。Min等人於稻田中施用丁基拉草，發現放線菌數量顯著減少，而細菌及真菌的數量增加<sup>(15)</sup>。Quesada等人的研究顯示，稻田中生物固氮作用(Biological Nitrogen Fixation)每作每公頃可貢獻75 kg的氮素<sup>(18)</sup>；而於培

<sup>1</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0775號。

<sup>2</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

<sup>3</sup>國立臺灣大學農業化學系教授、名譽教授。

營養中，每公頃亦可貢獻相當於8到30 kg的氮素。由於其效能甚高，固氮作用為許多科學家所欲積極開發與應用的標的。



圖一、除草劑丁基拉草之化學結構。

Fig. 1. The chemical structure of butachlor.

Mishra及Pandey發現 $100 \text{ mg mL}^{-1}$ 的丁基拉草雖然不會使藍綠菌*Nostoc linckia*的生長及固氮活性產生改變，卻會使其吸收 $\text{NO}_3^-$ 及 $\text{NH}_4^+$ 的能力下降<sup>(16)</sup>。Jena等人的研究顯示，低濃度的丁基拉草可促進固氮酵素活性<sup>(12)</sup>。Patnaik等人於每公頃農地施用1.8 kg的丁基拉草，發現固氮酵素的活性有些微提升<sup>(17)</sup>。Min等人施用不同濃度(5.5、11及 $22 \text{ mg kg}^{-1}$ )的丁基拉草於稻田中，發現固氮酵素活性於施用初期即提升，且施用濃度越高，其還原力越高；但在一個月後，其活性即受抑制，且濃度越高者抑制情況越顯著<sup>(15)</sup>。顯示丁基拉草的施用的確可能對固氮菌的生態或其活性產生改變。

由前人研究可知，固氮細菌的族群及其相對應的土壤固氮活性受到丁基拉草施用的影響，但其原因則有待探討。本研究的目的即在分析除草劑丁基拉草施用下稻田土壤固氮活性及可培養之游離固氮細菌種類的變化，以了解其間的關係。

## 材料與方法

### 水稻種植及實驗處理

種植臺梗9號水稻(*Oryza sativa*)於日溫 $30^\circ\text{C}$ ，夜溫 $25^\circ\text{C}$ ，相對濕度75~90%之人工氣候室(Pytotron)中。實驗開始前於1/5000華格納鉢(Wagner's Pot)，各3.5 kg的土壤樣品(約15 cm高)中各添加基肥： $240 \text{ kg ha}^{-1}$ 硫酸銨 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $200 \text{ kg ha}^{-1}$ 過磷酸鈣(主要成分為 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 及 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )及 $120 \text{ kg ha}^{-1}$ 氯化鉀(KCl)並與土壤樣品混合拌勻，之後於盆栽中添加灌溉水至其較土表高3~5 cm處。

發芽約15天的水稻幼苗於丁基拉草施用後一天由苗床移植到華格納鉢中，每鉢三株，單本植。處理為不添加丁基拉草之對照組及添加10倍推薦用量( $15 \text{ g are}^{-1}$ )丁基拉草處理。施用方法為於10 g土壤中添加20 mL去離子水，並加入相當濃度的丁基拉草，劇烈震盪混合後均勻施用在含有3 kg土壤樣品的華格納鉢表面。

分別於下列時間點採集土壤樣品：7、37、67及100天，大約對應於水稻之成活期、孕穗期、開花期及成熟期。土壤樣品採集時分為上層0~3 cm及下層3~15 cm分別採取，每種處理三重複。

## 固氮活性測定

本研究由乙炔還原量代表固氮活性<sup>(3)</sup>，實驗方法並經修改<sup>(19)</sup>。秤取10 g土壤樣品於30 mL樣品瓶中，之後添加0.5%葡萄糖溶液，並攪拌均勻。將上述樣品瓶以矽膠塞密封後，以針筒抽取上部10%之空氣，並以乙炔氣體置換之。於30°C下孵育上述樣品24 hr，之後以GC-FID (China Chromatography GC9800, China)測量乙炔的生成量。GC-FID之分析條件為注射部溫度150°C、管柱溫度150°C及偵測器溫度200°C，載行氣體為一般純度氮氣(99%)。層析管柱為Supel毛細管柱，長度15 ft，內徑1/8 in，內膜2.1 mm (Supelco, U.S.A.)。固氮活性以 $\mu\text{moles of C}_2\text{H}_4 \text{ formed g}^{-1} \text{ dry soil day}^{-1}$ 表示之。

## 可培養性游離固氮菌群的計數、分離與鑑定

為分析可培養性游離固氮菌群受丁基拉草施用的影響，本研究於平面NFB無氮培養基上分離丁基拉草施用第7天與第39天時，控制組與10倍推薦用量(15 g are<sup>-1</sup>)丁基拉草處理下表觀型態相異的菌落，並以NFB培養基加以震盪增殖<sup>(10)</sup>。以UltraClean™ Soil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc.)萃取該土壤微生物的total DNA，以PCR擴增其16 S rDNA片段後以核酸定序儀(ABI PRISM<sup>R</sup> 3700 DNA Analyzer, Perkin Elmer Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA)偵測該微生物的16S rDNA序列。所得序列以BLAST-N程式(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比對GenBank資料庫確認其菌屬名。

## 親緣關係樹

前述所得之DNA序列以BioEdit程式<sup>(11)</sup>進行多重序列比對，並刪除相同處理下重複之序列，並保留不同處理下重複之序列。選取BLAST結果中與該DNA序列最相近之一或兩組序列，以Phylogenetic Web Repeater (POWER, <http://power.nhri.org.tw/power/home.htm>)<sup>(14)</sup>繪製親緣關係圖。其方法設定為最大簡約性分析法(Heuristic Maximum Parsimony Method)<sup>(9)</sup>，並以靴帶式分析法(Bootstrapping Method)<sup>(20)</sup>，重複1,000次確認其分析結果。

# 結果與討論

## 土壤固氮能力之變化

前人研究顯示，丁基拉草於砂質壤土中的移動大多停留於表土3 cm以內<sup>(5)</sup>。因此，本研究將土壤分為上層(0~3 cm)及下層(3~15 cm)分別進行調查。表一為添加15 g are<sup>-1</sup>的丁基拉草於種植水稻的盆栽中，並於不同水稻生長期採取土壤樣品測量其乙炔還原反應的改變，以代表土壤固氮活性的變化情形。結果顯示，水稻移植後第7天，施用15 g are<sup>-1</sup>丁基拉草處理使上層土壤的乙炔還原反應較控制組減低12.6%；但在第37天時則使反應增加23.3%。在水稻開花期(第67天)時，高濃度的丁基拉草施用並無顯著影響，然而在成熟期(第100天)時乙炔還原反應則有顯著的上升(+7.20%)。這個現象顯示上層土壤的游離固氮菌群可能因丁基拉草的施用而造成菌相長久的變異，並且，也使得土壤固氮作用上升。

表一、丁基拉草施用下水稻不同生長時期對應之土壤乙烯產生量

Table 1. Ethylene production at each growing stage of rice plant by treating with butachlor

Treatment	Growing stage	Transplanting	Booting	Flowering	Ripening
		Day - 7	Day - 37	Day - 67	Day - 100
		----- Ethylene production, $\mu\text{mols g}^{-1}$ (dry soil) -----			
	0-3 cm				
	Control	5.55 $\pm$ 0.0490 aB	6.64 $\pm$ 0.380 bA	4.53 $\pm$ 0.0650 aC	4.52 $\pm$ 0.120 bC
	15 g are <sup>-1</sup> Butachlor	4.85 $\pm$ 0.330 bB (-12.6%)	8.18 $\pm$ 0.0980 aA (+23.3%)	4.50 $\pm$ 0.0290 aC (-0.530%)	4.84 $\pm$ 0.0790 aB (+7.20%)
	3-15 cm				
	Control	4.59 $\pm$ 0.0850 aB	6.61 $\pm$ 0.500 bA	4.41 $\pm$ 0.0270 bB	4.32 $\pm$ 0.00970 bB
	15 g are <sup>-1</sup> Butachlor	4.24 $\pm$ 0.0260 aB (-7.50%)	9.32 $\pm$ 0.570 aA (+41.0%)	4.47 $\pm$ 0.0100 aB (+1.40%)	4.47 $\pm$ 0.0700 aB (+3.40%)

Statistically significant differences shown by Duncan's multiple range test ( $\alpha=0.05$ ); similar small letters within same columns are not significantly differences among butachlor concentrations treated and similar capital letters within same rows are not significantly differences among growing stages of rice plant. Differences of ethylene products compared to control show in parenthesis.

於水稻移植後第7天時，施用15 g are<sup>-1</sup>丁基拉草處理使下層土壤的乙炔還原反應較控制組減低7.5%；但自第37天開始則分別使反應增加41.0%、1.40%及3.40%。這個現象顯示下層土壤的游離固氮菌族群可能因丁基拉草的施用而造成菌相長久的變異，並且，於水稻全生長時期皆使得土壤固氮作用上升。

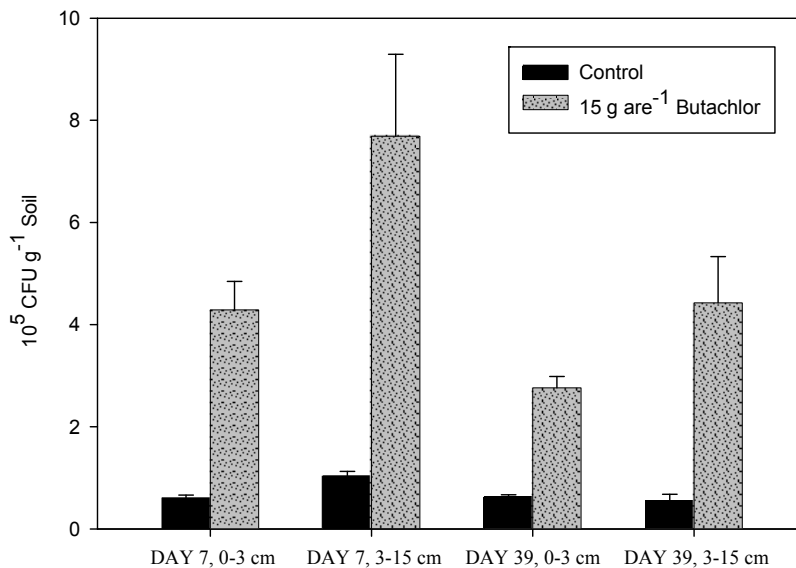
以鄧肯氏多變域測驗( $\alpha=0.05$ )分析丁基拉草施用(顯示欄的變異，以小寫字母表示)及不同水稻生長期(顯示列的變異，以大寫字母表示)所造成的乙炔還原反應變化的顯著性。結果顯示不同的水稻生育期其土壤固氮作用具有顯著的差異，尤其以孕穗期時具有最大的土壤固氮量。丁基拉草施用於孕穗期時亦會造成土壤固氮量的上升，尤其以孕穗期時之下層土壤其增加量最大。

前人的研究結果中顯示，丁基拉草的施用可以增進藍綠菌*Anabaena sphaerica*的生質量及固氮作用<sup>(22)</sup>。施用2.9 kg a.i. ha<sup>-1</sup>的丁基拉草可提升31.6%游離固氮菌族群的數目，且可提升土壤固氮活性達10%<sup>(7)</sup>。因此，吾人認為稻田土壤固氮作用的提升可能導因於游離固氮菌總體生質量的提升，或者是游離固氮菌相組成的改變。

#### 可培養性游離固氮菌數量之變異

圖二為水稻種植第7天及第39天時，15 g are<sup>-1</sup>丁基拉草施用對土壤固氮菌數之影響。由圖可知，於水稻種植第7天時之上層土壤中(0~3 cm)，丁基拉草的施用使固氮菌數目增加了70.6%；但於下層土壤中(3~15 cm)，兩種處理的族群菌數則無顯著的差異。

於水稻種植第39天時之上層土壤中(0~3 cm)，丁基拉草的施用使固氮細菌數增加了79.3%；於下層土壤中(3~15 cm)，丁基拉草的處理使固氮菌的族群數目則增加了60.2%。



圖二、施用丁基拉草後培養 7 及 39 天之固氮細菌族群數量變化。

Fig. 2. The population of diazotrophs after butachlor application for 7 and 39 days.

此結果顯示，高劑量的丁基拉草施用使土壤游離固氮菌群的數目增加。上述結果與Das的研究結果趨勢相同，即丁基拉草的施用可提升土壤固氮活性與固氮微生物族群數目，但其原因則尚需進一步的研究<sup>(7)</sup>。

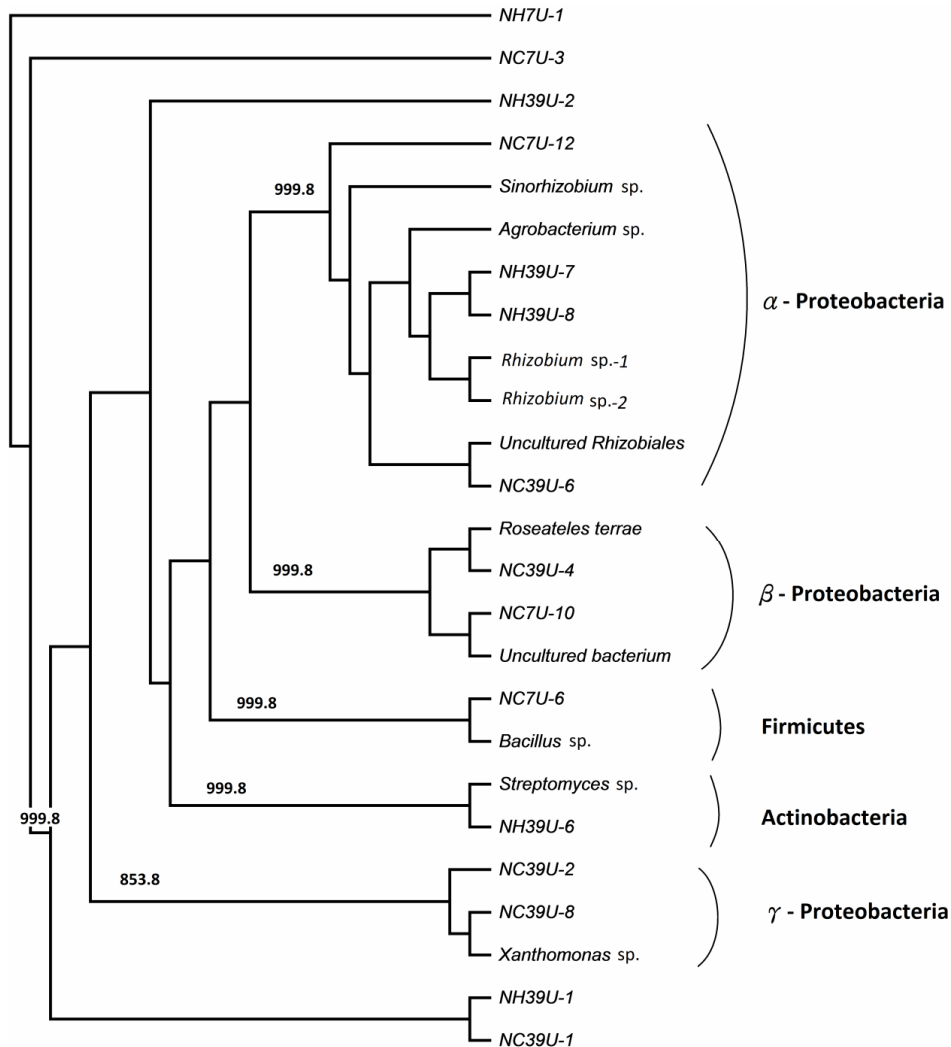
#### 上層土壤(0~3 cm)之可培養固氮細菌族群變化

圖三為丁基拉草施用下，由0~3cm稻田土壤所篩選出之可培養性固氮菌菌株。相同處理下所得序列相同之菌株已事先予以刪除，避免重複。由圖可知，自稻田土壤中可篩選出 $\alpha$ -、 $\beta$ -及 $\gamma$ -變形菌門、厚壁菌門及放線菌門之可培養性固氮菌，且於添加丁基拉草處理下，可篩選出*Rhizobium*及*Streptomyces*屬之菌株，為控制組中所未篩選出之菌株。於控制組中，則可篩選得到丁基拉草處理組中所未篩選出之*Sinorhizobium*、*Roseateles*、*Rhizobium*及*Bacillus*菌株。由此結果顯示，丁基拉草施用下可改變表層土壤菌相，此結果與前人研究結果相同<sup>(4,7,8)</sup>。

#### 下層土壤(3~15 cm)之可培養固氮細菌族群變化

圖四為丁基拉草施用下，由3~15 cm稻田土壤所篩選出之可培養性固氮菌菌株。相同處理下所得相同之菌株亦事先予以刪除，避免重複。由圖可知，自稻田土壤中可篩選出 $\alpha$ -及 $\beta$ -變形菌門及放線菌門之可培養性固氮菌，且有一與其他菌門均不相似之菌群(Unknown Group)，可能為互相類似之新菌株。大多數之菌株均可於控制組及添加丁基拉草之處理組中同時發現，但於控制組中，則可篩選出未於處理組中得到之*Sinomonas*及*Paenibacillus*菌株。由菌株篩選結果顯示，不論於表層或裏層土壤中，均可發現其特殊存在之菌株，可以推論丁基拉草的施

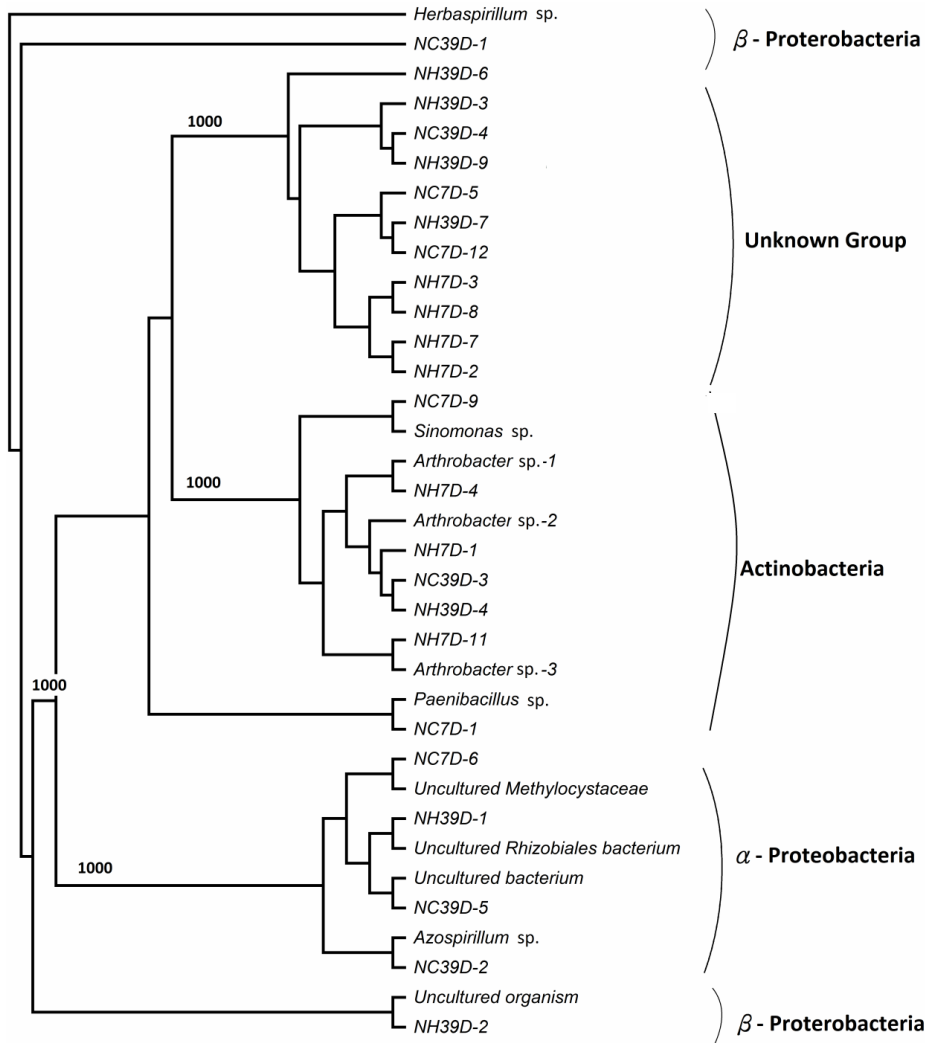
用的確可以造成土壤固氮菌相之改變，且可能為土壤固氮能力上升的原因。許多前人研究中均顯示，丁基拉草的施用可提升土壤固氮能力，但於其原因則並無定論。吾人之前的研究結



圖三、丁基拉草施用下 0-3 cm 土壤中可培養性固氮細菌親緣關係圖。代號 C 表示為對照組處理下篩選之菌株；代號 H 表示為 15 g are<sup>-1</sup> 丁基拉草施用下篩選之菌株；數字 7 或 39 代表培養日數；橫線後的數字代表菌株號碼。關係圖分叉處的數字表示由靴帶式分析法(1,000 次)所得重複數。

Fig. 3. The phylogenetic dendrogram of cultivable nitrogen-fixing bacteria under butachlor application in 0-3 cm soil. C, control; H, 15 g are<sup>-1</sup> butachlor application; number 7 or 39 indicates the days after rice transplantation. Numbers after the dash indicate the strain number. Numbers at the forks indicate the number of times these forks occurred among the 1,000 replicates with bootstrap analysis.

果顯示，施用丁基拉草可顯著改變不經培養之土壤微生物組成<sup>(4)</sup>，本研究顯示，丁基拉草的施用可增加土壤游離固氮菌的數量，且亦可改變其族群組成。前人推論為土壤游離固氮菌可能利用丁基拉草或其降解產物作為細胞代謝所需之碳源及養分來源<sup>(6,7,8,13)</sup>。但因本研究中，丁基拉草的施用量為 $15 \text{ g are}^{-1}$ ，僅可能提供土壤微生物相當微量的碳氮來源，因此吾人推論於本研究中，丁基拉草可能對某部分游離固氮菌群外的微生物產生生存壓力，而使該部分游離固氮菌群之族群數目增加，但其原因則尚待進一步研究。



圖四、丁基拉草施用下 3~15 cm 土壤中可培養性固氮細菌親緣關係圖。圖標說明如同圖三。

Fig. 4. The phylogenetic dendrogram of cultivable nitrogen-fixing bacteria under butachlor application in 3-15 cm soil. Figure legends resemble those from figure 3.

## 結 論

由本研究結果可知，丁基拉草的施用可提升土壤固氮能力，且於水稻生長期間其固氮能力與控制組相較有顯著之差異，此差異於水稻孕穗期時更為顯著。可培養性固氮細菌數量於水稻孕穗時期有顯著的增加，且其族群組成亦有不同，可能為造成土壤固氮能力上升之原因。

## 參考文獻

1. 邱建中 1985 醃胺類殺草劑 臺中區農推專訊 行政院農業委員會臺中區農業改良場。
2. 植物保護手冊 2004 雜草防除 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。
3. Burris, R. H. 1975. The acetylene-reduction technique. p. 249-257. In: W.D.P. Stewart (Ed.) "Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms". International Biological Programme. Cambridge University Press. Cambridge.
4. Chen, W.C., J. H. Yen, C. S. Chang and Y. S. Wang. 2009. Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 72: 120-127.
5. Chiang, H. C., J. R. Duh and Y. S. Wang. 2001. Butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen movement in subtropical soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 1-8.
6. Cork, D. J. and J. P. Krueger. 1991. Microbial transformations of herbicides and pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 1-66.
7. Das, A. C. and A. Debnath. 2006. Effect of systemic herbicides on N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere*. 65: 1082-1086.
8. Debnath, A., A. C. Das and D. Mukherjee. 2002. Rhizosphere effect of herbicides on nitrogen fixing bacteria in relation to availability of nitrogen in rice soil. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 50: 463-466.
9. Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum charge for a specific tree topology. *Sys Zool.* 2: 406-416.
10. Haahtela, K., T. Wartiovaara, V. Sundman and J. Skujins. 1981. Root-associated N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction) by *Entereobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate Spodosol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 203-206.
11. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
12. Jena, P. K., T. K. Adhya and V. R. Rao. 1990. Nitrogen-fixing bacterial populations as influenced by butachlor and thiobencarb in rice soil. *Microbiol. Res.* 145: 457-460.
13. Kole, S. C. and B. K. Dey. 1989. Effect of aromatic amine herbicides on microbial population and phosphate solubilizing power of the rhizosphere soils of groundnut. *Indian Agric.* 33: 1-8.



14. Lin, C. Y., F. K. Lin, C. H. Lin, L. W. Lai, H. J. Hsu, S. H. Chen and C. A. Hsiung. 2005. POWER: Phylogenetic WEb Repeater--an integrated and user-optimized framework for biomolecular phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Research*. 33: W553-W556.
15. Min, H., Y. F. Ye, Z. Y. Chen, W. X. Wu and D. Yufen. 2001. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *J. Environ. Sci. Health B*. 36: 581-595.
16. Mishra, A. K. and A. B. Pandey. 1989. Toxicity of three herbicides to some nitrogen-fixing cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 17: 236-246.
17. Patnaik, G. K., P. K. Kanungo, B. T. S. Moorthy, P. K. Mahana, T. K. Adhya and V. Rajaramamohan Rao. 1995. Effect of herbicides on nitrogen fixation ( $C_2H_2$  reduction) associated with rice rhizosphere. *Chemosphere*. 30: 339-343.
18. Quesada, A., F. Leganés and E. Fernández-Valiente. 1997. Environmental factors controlling  $N_2$  fixation in mediterranean rice fields. *Microbial Ecol*. 34: 39-48.
19. Rao, V. R., J. L. N. Rao and T. K. Adhya. 1986. Heterotrophic nitrogen fixation ( $C_2H_2$  reduction) as influenced by phosphorus application in paddy soils. *Plant Soil*. 92: 125-132.
20. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 4: 406-425.
21. Singh, S. P. and K. G. Pillsi. 1993. Weed control in direct seeded rice under puddle conditions. *Indian J. Plant Protec*. 21: 224-227.
22. Suseela, M. R. 2001. Effect of butachlor on growth and nitrogen fixation by *Anabaena sphaerica*. *J. Environ. Biol*. 22: 201-203.

# Effects of Butachlor Application on the Cultivable Nitrogen-Fixing Bacterial Community Variation in the Rice Paddy<sup>1</sup>

Wen-Ching Chen<sup>2</sup>, Jui-Hung Yen<sup>3</sup> and Yei-Shung Wang<sup>3</sup>

## ABSTRACT

The previous research, reported that the application of butachlor raised soil nitrogen-fixing ability in paddy soils. To the further understanding of correlation between butachlor onto soil diazotrophic community and, to isolate the nitrogen-fixing bacteria under butachlor application, 10-fold butachlor was applied in the rice paddy. Afterward, the soil nitrogen-fixing ability, the population of nitrogen-fixing bacteria, and isolated cultivable diazotrophs based on different morphology and 16 rDNA sequences were measured at different rice growth stages. The results indicated that the application of butachlor could increase soil nitrogen-fixing ability in lower layer, especially at rice flowering stage. And at rice ripening stage, the 7.20% and 3.40% enhancement of soil nitrogen-fixing ability in the upper layer and lower layer, respectively. It was also indicated that only one time of butachlor application, the soil nitrogen-fixing ability increased throughout rice growth stages in the paddy soils. The population of diazotrophs increased significantly at rice booting stage around 39 days after transplanting. Moreover,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria were isolated both from control and treatment in the paddy soils. The composition of the diazotrophs was different in the two samples. Therefore, the application of butachlor will increase the soil nitrogen-fixing ability and changes the diazotrophic composition as well, which is contributed to the increase of soil nitrogen-fixing ability.

**Key words:** butachlor, nitrogen-fixing bacteria, rice paddy.

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0775 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Assistant Horticulturist of Taichung DARES, COA.

<sup>3</sup> Professor, Professor Emeritus, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University.