

逆境地區叢枝菌根菌接種源之生產與活力

鄔家琪¹ 張喜寧²

1. 國立宜蘭技術學院園藝系講師
2. 國立台灣大學園藝系教授

摘要

將取自台灣北海岸、東海岸及澎湖、金門等逆境地區之叢枝菌根菌種進行大量繁殖。結果顯示不同地區所採集之叢枝菌根菌種繁殖條件並不完全相同。取自澎湖之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以天人菊為宿主，砂+10% 田土為介質，有最高之產孢量，每 10 g 孢子土內有 2679 個孢子。但是在秋季，則以玉米為宿主，砂為介質，有最高的產孢量，每 10 g 孢子土內有 2121 個孢子。剛採收的四種叢枝菌根菌種孢子發芽率均不及 10%。但隨著貯藏時間的增長，發芽率逐漸升高。在 4°C 低溫貯藏下 5-6 個月孢子發芽率最高。超過 6 個月貯藏後發芽率逐漸下降。綜合試驗結果，取自澎湖之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以天人菊為宿主，砂+10% 田土為介質，可以得到每 10 g 孢子土內有 2679 個孢子的最高產孢量。並在 4°C 低溫下貯藏 6 個月可以有 92% 最高發芽率。在參試的四個大量繁殖叢枝菌根菌種中最具接種活力。

關鍵詞：叢枝菌根菌、大量繁殖、孢子發芽

Inoculum Production and Spore Germination of Arbuscular Mycorrhizal Fungi From Stress Areas

Chia-Chyi Wu¹ Doris Chi-Ning Chang²

1. Lecture, Department of Horticulture, National Ilan Institute of Technology
2. Professor, Department of Horticulture, National Taiwan University

Abstract

To study the mass inoculum production of arbuscular mycorrhizal fungi, fungal isolates were collected from Penghu, Kinmen, the north coast, and the east coast of Taiwan. For sporulation, there were many different combinations those depended on arbuscular mycorrhizal fungi, host plants, media, and seasons. In spring, blanket flower inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi those were collected from Penghu in sand+10% farm soil medium resulted in the best sporulation (2679/10 g). In autumn, corn inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi those were collected from Penghu in sand medium resulted in the best sporulation (2121/10 g). Low germination rate was found in newly harvested spores. The highest germination rate was reached at 4°C storage for five to six months. Cold storage spores at 4°C showed higher germination rate than those stored at room temperature. Storage over six months could reduce the germination rate and the viability of spores.

key words : arbuscular mycorrhizal fungi, mass inoculum production, spore germination

前言

植物的一生均與環境息息相關，所以植物要生長良好必須要有良好的生長環境。但自然條件經常瞬息發生改變，或因人為因素逐漸破壞，所造成的不良環境會直接或間接對作物造成傷害。這種傷害輕則抑制植物生長、發育，降低產量；重則造成植物死亡，農民收益損失。因此如何降低不良環境對作物生產之影響是極為重要的。叢枝菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi) 是屬於接合菌綱 (Zygomycetes) 繡球菌目 (Glomales)，五億年前便存在地球土壤中，且能與大多數植物根部形成共生關係的有益真菌。因其能以不同方式影響作物的代謝過程，影響作物生長發育，營養狀況，水分的吸收利用，促進生長與增加產量外【1,2,3】，還能增加宿主植物對環境逆境之忍耐性【4,5,6】或抗病性【7,8】。故被視為一種生物性肥料。而叢枝菌根促進生育之效果在環境逆境下似乎更為明顯。因此相較於一般減少環境壓力對作物生產的方法，為植物接種叢枝菌根菌似乎不失為另一種較為便捷可行的自然方式。但目前世界各國尚未普遍利用此一有益真菌主要是因為叢枝菌根菌是一類絕對共生菌，即需依賴宿主作物才能繁殖，且與宿主作物間也存在相互選擇性。因而限制了接種菌種的大量生產與應用。故要真正大量應用，必須先有適合之菌種與充足的接種源，且感染效率要高，才能有足夠的經濟效益。

欲篩選能耐環境逆境之叢枝菌根菌種，因此本試驗擬將台灣大學園藝系細胞生理研究室從本島濱海與離島等逆境地區採集而來的叢枝菌根菌，以盆鉢法進行菌種的大量繁殖，探討生產這些菌種適合之季節、宿主與介質，以期篩選出繁殖力強且適於逆境環境之優勢菌種，以利後續菌根作物之育成，並希望能增加作物對環境逆境之忍耐性及提高逆境地區作物之生產。其次，叢枝菌根菌在孢子形成後會有休眠現象發生【9,10,11】。欲成功完成接種工作必須避免接種休眠孢子。因此在進行任何接種試驗前，除了要瞭解接種數量是否足夠外，同時必須瞭解這些孢子的接種活力。由於打破休眠的步驟大多伴隨貯藏過程進行，且貯藏良好與否更影響到接種源使用之有效期限。故進行孢子發芽試驗，以瞭解在貯藏過程中這些接種源的接種活力與較適合之貯藏環境。

材料與方法

一、叢枝菌根菌接種源之大量繁殖

叢枝菌根菌接種源由台灣大學園藝系細胞生理研究室提供。其分別取自澎湖、金門、馬祖、台灣北海岸、東海岸、西海岸等濱海不利作物生產之地區，採集該區生長繁茂之植物根部土壤，取回研究室以濕篩傾倒法【12,13】先行鏡檢分析，若有叢枝菌根菌孢子則以玉米為宿主、滅菌砂為介質進行初次繁殖。剔除不能順利產孢的菌種樣本，最後以取自澎湖、金門、台灣北海岸、東海岸等地區之菌種 (*Glomus* spp.) 進行接種源之大量繁殖。繁殖法採盆鉢法。季節為春、秋二季。宿主植物為玉米、百喜草、天人菊。介質為砂、砂 + 1 % 木炭粉、砂 + 10 % 田土，介質均經高溫高壓滅菌過。以 5 吋塑膠盆中裝填上述各種介質，並將叢枝菌根菌種放入，宿主植物種子置於接種源上，接種後所有盆鉢均置於宜蘭技術學院園藝系溫室內。每

個處理三重複，生長期間為三個月，播種後 3 週開始施肥，每週施用尿素溶液 1000 ppm，三個月後開始進行斷水處理以利孢子形成。待宿主植物地上部分完全乾燥後，剪去地上部，將所有孢子土陰乾倒出封存於塑膠袋中。同時取出 10 g 孢子土，以濕篩傾倒法調查孢子數目，其餘孢子土標示儲存。

二、不同貯藏溫度下之孢子發芽試驗

孢子源是取自澎湖、金門、台灣北海岸、台灣東海岸，以玉米為宿主，滅菌砂為介質而繁殖之叢枝菌根菌種。採收後之叢枝菌根菌種分別貯放於室溫（20-27℃）與 4℃ 冷藏。孢子發芽試驗是取剛採收及貯藏 1、2、3、4、5、6、9、12 個月的孢子，在無菌塑膠培養皿（100 × 15mm）中放入 60 g 滅菌砂，加入 19 ml 蒸餾水，接著放入一張濾紙，在濾紙上放入四張 1/4 大小 47 mm 濾膜（milipore），濾紙與濾膜使用前先經高溫高壓滅菌，以微量吸管吸取每一菌種經濕篩傾倒法分離出之孢子於濾膜上，每張濾膜 50 個孢子。蓋上培養皿，以石蠟膜密封，再以鋁箔紙包住，在 25℃ 培養箱中黑暗培養四週。四週後取出濾膜，以 0.05 % 苯胺藍（aniline blue）為染劑，染色過夜，再以往去色劑去色，在立體顯微鏡下觀察計算孢子發芽數。

結果與討論

目前叢枝菌種的生產法主要有傳統盆栽法(pot culture)、氣霧式栽培法(aeroponic culture)、根器官培養法(root organ culture)。在進行任何接種試驗前，接種孢子的數目與孢子活力是確保接種效率的主要因素。根器官培養法雖然可以生產無雜菌的純種菌源，但目前只有少數菌根菌可以培養成功而未達實用階段。氣霧式菌種繁殖法雖然可生產質輕、清潔、無雜菌的新鮮菌根為接種源，但除需增設氣霧設備外，營養液的配置等生產步驟較為繁瑣以及所生產的新鮮根段不耐貯藏等，可能在一般應用上多所受限。傳統盆栽法仍有其操作簡單、方便利用之處。故本研究均以盆栽法進行菌種繁殖。

收集台灣北海岸、東海岸及金門、澎湖等逆境地區之叢枝菌根菌種進行大量繁殖。結果顯示不同地區所採集之叢枝菌根菌種繁殖條件並不完全相同。取自澎湖之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以天人菊為宿主，砂+10 % 田土為介質，有最高之產孢量，每 10 g 孢子土內有 2679 個孢子。但在秋季，則以玉米為宿主，砂為介質，有最高的產孢量，每 10 g 孢子土內有 2121 個孢子（表 1）。而取自金門之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以玉米為宿主，砂+10 % 田土為介質，有最高之產孢量，每 10 g 孢子土內有 569 個孢子。但在秋季則以天人菊為宿主，砂+1 % 木炭粉為介質，有最高的產孢量，每 10 g 孢子土內有 804 個孢子（表 2）。取自台灣北海岸之叢枝菌根菌種無論在何種季節產孢量均不高。在春季繁殖時，以天人菊為宿主，砂+10 % 田土為介質，有最高之產孢量，但是每 10 g 孢子土內也只有 192 個孢子。秋季則以百喜草為宿主，砂+1 % 木炭粉為介質，每 10 g 孢子土內有 285 個孢子是其最高產孢量（表 3）。取自台灣東海岸之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以百喜草為宿主，砂+10 % 田土為介質，最高之產孢量是每 10 g 孢子土內有 98 個孢子。在秋季則以天人菊為宿主，砂為介質，最高的產孢量為每 10 g 孢子土內有 909 個孢子（表 4）。

吳與林【14】曾調查台灣地區 69 個農地與坡地土壤的叢枝菌根菌族群數量後，發現菌根

菌數量普遍偏低。每 100g 土壤中總平均數為 66 個孢子。而這些樣品中，只有 5 個樣品超過 100 個孢子。其中 70 % 之孢子數少於 10 個/100g 土壤，更有 28 % 的樣品已經找不到任何孢子。顯然因人為耕種大量農藥、肥料等化學藥劑之施用致使台灣農地與坡地土壤中的叢枝菌根菌數量偏低。而根據 Kucey and Paul【15】之調查也以未翻動土壤中菌根菌孢子數較多。這可能也是無論何種繁殖宿主與介質之組合，採自耕種密度較低離島地區之叢枝菌根菌種產孢量普遍優於本島所採集之菌種原因之一。

一般都認為玉米是良好的宿主作物之一。但在本研究中發現玉米並不是所有繁殖菌種之最佳宿主。在叢枝菌根菌種生產上，各種宿主產孢能力不同，主要是受感染根段長度、生長週期及不同菌種與不同宿主之間親和力所影響【16】。同時在繁殖過程中玉米容易遭受病蟲害及較不耐旱，易增生產成本。楊【17】便曾建議以病蟲害少且耐旱的草類為宿主。本試驗中所選用之百喜草在做為繁殖取自台灣北海岸與東海岸之叢枝菌根菌之宿主上，均曾表現較玉米為佳。尤其因其耐陰、耐寒性強較適合為秋冬季宿主。天人菊是廣佈澎湖地區繁殖力強且生性強韌之植物之一。與同是取自澎湖之菌種在春季共生，可產生最高的孢子數量。因此所選用之玉米、百喜草、天人菊三種植物均為良好宿主作物，只是取自不同地區之菌種各有其最適合之繁殖組合。

參試之四種叢枝菌根菌種，剛採收後之孢子發芽率均不及 10 % (圖 1 至 4)。但隨著貯藏時間的增長，發芽率逐漸升高，尤其以貯藏在 4 °C 低溫下之孢子土發芽率的上升較為明顯。試驗的四個菌種均以貯藏在 4 °C 低溫下 5-6 個月有最高的孢子發芽率。超過 6 個月後發芽率便開始逐漸下降。在 4 °C 低溫下貯藏 12 個月後，孢子發芽率較最高發芽率降低了 15-35 %，其中以取自金門之菌種孢子發芽率降低的最多。室溫下貯藏 12 個月後，孢子發芽率較最高發芽率降低了 18-26 %，其中也以取自金門之菌種孢子發芽率降低的最多。顯示不同的貯藏方法確實會影響孢子發芽率。Tommerup【11】便觀察到將孢子貯藏數週有助於孢子發芽。Hepper and Smith【18】、Gemma and Koske【10】、Juge et al.【19】的研究更指出低溫 4-5 °C 的貯藏可顯著誘導孢子發芽。本試驗也有相似的結果，參試之四菌種皆須在 4 °C 低溫下 5-6 個月，才能有最高的孢子發芽率。

結論

在作物生產中約有 60-80 % 的變異是由環境變異所造成。因此環境逆境知識的探討與研究，不僅可以減少植物受不良環境的傷害，更可進一步增加植物對環境資源的利用，同時對農業生產有所裨益，對生態結構平衡更有貢獻。已有許多研究報告指出，接種適合之叢枝菌根菌能增加宿主植物對環境逆境的忍耐性。因此要落實叢枝菌根菌於逆境下之應用，需先有適合之菌種並能順利接種成功。而接種成功的首要條件仍在於接種源活力。要正確估算接種活力，則必須瞭解接種源中的總孢子數與有效的孢子發芽率。故綜合以上試驗結果，取自澎湖之叢枝菌根菌種在春季繁殖時，以天人菊為宿主，砂+10 % 田土為介質，可以得到每 10 g 孢子土內有 2679 個孢子的最高產孢量。並在 4 °C 低溫下貯藏 6 個月可以有 92 % 最高發芽率。在上述四個大量繁殖叢枝菌根菌種中最具接種活力。

參考文獻

1. 王均琍 (1996), 「囊叢枝菌根菌對洋蔥生長及產量之影響」, 中華農學會報 (新), 第 174 期, 第 56-71 頁。
2. 陳健忠、張喜寧 (1996), 「囊叢枝菌根菌在菊科花卉上之應用」, 科學農業, 第 44 卷, 第 5、6 期, 第 118-124 頁。
3. 程永雄 (1997), 「囊叢枝菌根菌對柑橘生長之效應」, 中華農業研究, 第 46 卷, 第 4 期, 第 324-332 頁。
4. Al-Karaki, G. N., R. Hammad, and M. Rusan (2001), “Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress”, *Mycorrhiza*, Vol.11, pp.43-47.
5. Azcon, R. and F. El-Atrash (1997), “Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation(¹⁵N) in *Medicago sativa* at four salinity levels”, *Biol Fertil Soils.*, Vol.24, pp.81-86.
6. Duan, X., D. S. Neuman, J. M. Reiber, C. D. Green, A. M. Saxton, and R. M. Auge (1996), “Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought”, *J. Exp. Bot.*, Vol. 47, No.303, pp.1541-1550.
7. Azcon-Aguilar, C. and J. M. Barea (1996), “Arbuscular mycorrhizae and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved”, *Mycorrhiza*, Vol.6, pp.457-464.
8. Dehne, H. W. (1982), “Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens”, *Phytopathol.*, Vol.72, pp.1115-1119.
9. Douds, D. D. and N. C. Schenck (1990), “Increased sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by manipulation of nutrient regimes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.56, pp.413-418.
10. Gemma, J. and R. Koske (1988), “Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potential of a dune soil”, *Mycologia*, Vol.80, pp.211-216.
11. Tommerup, I. C.(1983), “Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi”, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Vol.81, pp.37-45.
12. Gerdmann, J. W. and T. H. Nicolson(1963), “Spore of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting”, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Vol.46, pp.235-244.
13. Daniels, B. A. and H. D. Skipper(1982),” Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil”, *Methods and principles of mycorrhizal research*, pp. 20-45.
14. 吳繼光、林素楨 (1998), 「囊叢枝內生菌根菌在台灣代表性農地與坡地之分布」, 囊叢枝內生菌根菌應用技術手冊, 第 83-84 頁, 台灣省農業試驗所印行。
15. Kucey, R. M. N. and E. A. Paul(1983), “Vesicular arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculation with *Glomus mosseae* on faba bean growth in greenhouse and field trials”, *Can. J. Soil Sci.*, Vol.63, No.1, pp.87-95.

16. Barbara, A., D. Hetrick, and J. Bloom (1986) , “The influence of host on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores”, *Mycologia*, Vol.78, No.1, pp.32-36.
17. 楊坤忠 (1997) , 叢枝菌根菌接種源之大量生產與在四種果菜上之應用 , 第 121 頁 , 國立台灣大學園藝所碩士論文。
18. Hepper, C. M. and G. A. Smith(1976) , “Observations on the germination of Endogone spores”, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Vol.66, pp.189-194.
19. Juge, C., J. Samson, C. Bastien, H. Vierheiling, A. Coughlan, and Y. Piche (2002) , “Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* : a critical cold-storage period”, *Mycorrhiza*, Vol.12, pp.37-42.

表 1 取自澎湖之叢枝菌根菌在春、秋不同二季，以不同種類宿主與栽培介質大量繁殖後孢子數（個/10 克孢子土）

Table 1 Influence of different seasons, host plants and media on mycorrhizal fungal spore production (fungal isolate was collected from Penghu) (spore no./10 g)

季節 Season	宿主 Host plant	砂 Sand	砂+1 % 木炭粉 Sand+1 % Powder of carbonized wood	砂+10 % 田土 Sand+10 % Farm soil
春 Spring	玉米 Corn	310 b	75 c	689 a
	百喜草 Bahia grass	517 a	237 b	758 a
	天人菊 Blanket flower	226 b	18 c	2679 a
	-----	-----	-----	-----
秋 Autumn	玉米 Corn	2121 a	140 b	179 b
	百喜草 Bahia grass	261 b	493 a	282 b
	天人菊 Blanket flower	185 a	137 b	210 a
	-----	-----	-----	-----

3 replication were tested for each treatment

Means followed by different letters in each row are significantly different at 5% level by Duncan's Multiple Range Test

表 2 取自金門之叢枝菌根菌在春、秋不同二季，以不同種類宿主與栽培介質大量繁殖後孢子數（個/10 克孢子土）

Table 2 Influence of different seasons, host plants and media on mycorrhizal fungal spore production (fungal isolate was collected from Kinmen) (spore no./10 g)

季節 Season	宿主 Host plant	砂 Sand	砂+1 % 木炭粉 Sand+1 % Powder of carbonized wood	砂+10 % 田土 Sand+10 % Farm soil
春 Spring	玉米 Corn	33 c	121 b	569 a
	百喜草 Bahia grass	98 b	38 b	227 a
	天人菊 Blanket flower	88 b	166 b	377 a
秋 Autumn	玉米 Corn	543 a	277 b	463 a
	百喜草 Bahia grass	775 a	480 b	175 c
	天人菊 Blanket flower	629 a	804 a	167 b
	Blanket flower			

Same as Table 1

表 3 取自台灣北海岸之叢枝菌根菌在春、秋不同二季，以不同種類宿主與栽培介質大量繁殖後孢子數（個/10 克孢子土）

Table 3 Influence of different seasons, host plants and media on mycorrhizal fungal spore production (fungal isolate was collected from the north coast of Taiwan) (spore no./10 g)

季節 Season	宿主 Host plant	砂 Sand	砂+1 % 木炭粉 Sand+1 % Powder of carbonized wood	砂+10 % 田土 Sand+10 % Farm soil
春 Spring	玉米 Corn	28 b	37 b	185 a
	百喜草 Bahia grass	59 a	21 a	42 a
	天人菊 Blanket flower	57 b	78 b	192 a
秋 Autumn	玉米 Corn	108 a	73 a	140 b
	百喜草 Bahia grass	159 b	285 a	19 c
	天人菊 Blanket flower	50 b	246 a	87 b

Same as Table 1

表 4 取自台灣東海岸之叢枝菌根菌在春、秋不同二季，以不同種類宿主與栽培介質大量繁殖後孢子數（個/10 克孢子土）

Table 4 Influence of different seasons, host plants and media on mycorrhizal fungal spore production (fungal isolate was collected from the east coast of Taiwan) (spore no./10 g)

季節 Season	宿主 Host plant	砂 Sand	砂+1 % 木炭粉 Sand+1 % Powder of carbonized wood	砂+10 % 田土 Sand+10 % Farm soil
春 Spring	玉米 Corn	44 a	9 b	18 b
	百喜草 Bahia grass	17 c	34 b	98 a
	天人菊 Blanket flower	24 a	35 a	8 b
秋 Autumn	玉米 Corn	725 a	78 b	90 b
	百喜草 Bahia grass	232 b	478 a	138 c
	天人菊 Blanket flower	909 a	246 c	705 b

Same as Table 1

圖 1 貯藏溫度與時間對取自澎湖之叢枝菌根菌孢子發芽之影響

Fig. 1 Influence of storage temperature and time on the spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi (fungal isolate was collected from Penghu)

圖 2 貯藏溫度與時間對取自金門之叢枝菌根菌孢子發芽之影響

Fig. 2 Influence of storage temperature and time on the spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi (fungal isolate was collected from Kinmen)

圖 3 貯藏溫度與時間對取自台灣北海岸之叢枝菌根菌孢子發芽之影響
Fig. 3 Influence of storage temperature and time on the spore germination of
arbuscular mycorrhizal fungi (fungal isolate was collected from the
north coast of Taiwan)

圖 4 貯藏溫度與時間對取自台灣東海岸之叢枝菌根菌孢子發芽之影響
Fig. 4 Influence of storage temperature and time on the spore germination of
arbuscular mycorrhizal fungi (fungal isolate was collected from the
east coast of Taiwan)