

茶樹、檫樹及樟樹內生菌根之研究

國中教師組生物科第二名

台北市立大同國民中學

作者：黃照

指導老師：簡秋源

一、摘要

在陽明山苗圃採到的樟樹和檫樹，以及木柵茶園採到的茶樹，它們根圈土壤所分離出來的內生菌根菌類，迄今所知共得7種，其中包括4種大孢菌屬（*Gigaspora* SPP.），2種繡球菌屬（*Glomus* SPP.）及1種厚孢菌屬（*Sclerocystis* SP.）。在這些作物的根圈土壤中，定量土壤所分出各種內生菌根孢子的含量，個別差異大，為逢機性。樟樹和檫樹根皮膚細胞內佈滿了泡囊，而茶樹內生菌根的自然形成率却很低。

二、緒論

菌根係指在自然條件下高等植物的根和真菌共生結合體，依其形態之不同可分外生菌根、內生菌根及外內生菌根。外生菌根多由擔子菌、子囊菌及少數的藻狀菌所形成，其特徵為菌絲在根表面形成菌套及侵入根內在細胞間隙形成哈氏網。而內生菌根多由低等內生菌所形成，初期菌絲穿梭於細胞間進而侵入皮層細胞後分叉成矮樹狀，佔據細胞腔稱叢囊，為吸收或交換養分的構造，在成熟時為寄主所消化分解，後期在中外皮層細胞內的菌絲末端膨大形成球狀或卵形的泡囊，為真菌貯藏養分的構造，因其在植物體內會形成泡囊及叢囊而特稱泡囊叢囊菌根（*Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza*），簡稱VAM，內生菌根菌多數形成大型厚壁孢子，而以單生或成群孢子果（*Sporocarp*）存在根的表面或土壤中。外內生菌根則兼具有外生菌根與內生菌根二者的特徵。

內生菌根菌的寄主甚為廣泛，在苔蘚、蕨類、裸子、被子植物中都有被發現，Gerdemann 指出世界上維管束植物 93 % 有菌根，而其中內生菌根菌約佔 97 %。內生菌根菌在土壤中分佈雖如此普遍，但研究成果反不如外生菌根菌的顯著，究其原因，主要是由於無法純系培養，不能獲得大量的接種源，使其在研究上受到限制，而不能達到其實際應用。

不同種類菌根菌的分佈，就地理位置而言，寒帶地區以外生菌根都有存在，而熱帶地區則以內生菌根菌佔優勢。若依感染作物種類而言，凡重要經濟林木大多與外生菌根菌形成共生，而大部分園藝及農作物則與內生菌根菌共生。

內生菌根菌感染植株後，利用蔓延於根部外面之菌絲，幫助寄主植物吸收土壤中的養分，而寄主植物以行光合作用所產生的含碳化合物，供真菌生長所需，二者行共生，由此可知有菌根植物，可利用在土壤中的菌絲做更大範圍的吸收養分，有利於植物的生存。

內生菌根菌在菌類分類上的地位如下：

真菌界 (Kingdom Mycetae)

無鞭毛菌群 (Division Amastigomycotina)

結合菌亞群 (Subdivision Zygomycotina)

結合菌綱 (Class Zygomycetes)

毛黴目 (Order Mucorales)

內生菌科 (Family Endogonaceae)

下分七屬；Endogone, Gigaspora, Glomus, Acaulospora, Sclerocystis, Modicella 及 Glagiella。

內生菌根菌的孢子無法藉風力傳播，一般認為是依賴小動物及被感染的根或土壤來傳播，其分佈受土壤質地，耕作程度、濕度、酸鹼度、成熟度、肥沃度、季節及雨量等因素的影響。

天然植物生態系之植物多具菌根之感染，兩者共生的現象與土壤狀況有關，如肥料的多寡、水分、酸鹼度及環境因子（溫度、光線的強弱等），也與植物生長程度有關。菌根感染程度與孢

子含量不相關，也有認為相關，既往研究者，定量內生菌根菌以孢子含量而定，現知孢子含量多寡不足以表示該處作物菌根感染程度且菌根感染受季節影響較微。土壤肥沃處，內生菌根菌無顯著的成效，但在土壤缺乏肥分下，內生菌根菌的存在與否，對作物的生長影響很大，如柑桔在接種內生菌根菌後，其幼菌生長量可大於未接種者二倍以上，可見土壤養分不夠，施肥困難處，內生菌根菌有其實用性。植物與內生菌根菌共生後，除了增強植株抵抗不良環境之能力外，還可增加植物的抗病力，減少施肥量，增加產量幫助植物吸收土壤中微量的無機營養主要為磷次為氮及促進植物對水的吸收等。

茶樹、檫樹和樟樹為本省重要的經濟作物，本實驗目的的確認它們是否有菌根菌的共生，以及分析根圈土壤中的孢子種類和數量，以期將來做進一步的探討。

三、材料與方法

1 材料：植株和土壤採自台北市陽明山苗圃及木柵茶園。

2 方法：

(1)根材料的處理

根材料係採用 Phillips & Hayman 根處理法；隨土壤採回的茶樹、樟樹及檫樹，將根切成1公分長的片段，放入10%氫氧化鉀水溶液中在攝氏90度加熱30分鐘，然後用鹼性過氧化氫水溶液泡20分鐘，再以清水洗淨，並以1%稀鹽酸酸化，取出用清水洗淨，再使用溶於乳酸酚中的錐藍（Trypan blue）0.05%染色約30分鐘，然後以乾淨的乳酸酚溶液褪染之，即可觀察，觀察法記述於後。

(2)孢子的收集

挖取植物根圈周圍5至15公分深的土壤，分別裝入塑膠袋內，標上記號及日期，攜回實驗室，並存於低溫培養箱或冰箱內。

利用 Gerdemann & Nicolson 濕篩沈降法，由土壤中分

離出內生菌孢子。取 1 公斤土壤加 4 倍水泡置幾分鐘後，加以攪拌，經靜置幾秒鐘，將懸浮液倒入不同網孔（約 600μ ， 250μ 及 106μ ）依順序疊起的銅網篩中，收集直徑在 250 至 600μ 及 106 及 250μ 之間的篩出粗物。

以燒杯（1 公斤）盛 200 毫升 30% 糖液，以滴管小心將收集之篩出粗物滴在糖液面上，經地心引力沈降後，孢子便浮在水與糖液界面間，以滴管小心吸出後，即用冷水洗去糖液，繼以 50 毫升離心管 4 支，分別加入 20 毫升 30% 的糖液，再用滴管小心將濃縮之篩出物加於糖液面上，以離心機（Centrifugator, HloobI, Kokusan）速度 2000g，離心 5 分鐘，這時孢子多浮於糖水和 water 之間的界面，以滴管小心吸出，隨之用冷水洗淨後，用洗瓶法至培養皿中，並使用解剖顯微鏡（Stereomicroscope, Wild Model 7A）觀察。

(3) 形態觀察及顯微照相

(a) 根的觀察—推壓法

處理好的根材料，先放在解剖顯微鏡下檢查，挑出有顯著藍色斑點的數段根，置於載玻片上，加以蓋玻片後並輕力推壓，並放在顯微鏡（Autophotography microscope, Wild M20）。

(b) 孢子的觀察

將盛有土壤篩出物的培養皿，置於解剖顯微鏡下挑出孢子，分別裝於小瓶中，並記錄孢子的種類及數量。再用光學顯微鏡觀察。

(c) 顯微照相

將所要的孢子、孢囊和叢囊，用指甲油暫行封埋標本，做上記號日期、標本名稱等，收集多片後，用光學顯微鏡觀察，並以柯達顯微軟片（Kodak Panatomic F $\times 402$ ）拍攝之，再翻成正片（幻燈片）。

四、結 果

1 孢子的種類和數量

植 株		孢子 個 數	大 孢 菌 屬				繡 球 菌 屬		厚 孢 菌 屬
			大黃 孢菌	褐孢菌	大黑 孢菌	黑孢菌	小繡 球菌	墨氏繡 球 菌	紅厚孢菌
檫 樹	第一次	27	10	8	42	40	3	0	
	第二次	34	10	13	16	22	2	0	
	第三次	58	16	25	21	71	24	0	
樟 樹	第一次	41	0	92	0	23	4	0	
	第二次	25	2	60	5	47	3	0	
	第三次	24	1	53	22	41	1	0	
※ 茶 樹	第一次	4	2	33	26	18	50	58	
	第二次	1	0	27	17	8	28	136	
	第三次	0	1	11	5	2	44	84	

(表一) 500 公克根圈土壤中所含孢子總數※ 250 公克

2 形態觀察

(1) 根部感染的內部形態

樟樹和檫樹的根部組織內，佈滿了菌絲及大小不等的泡囊，泡囊內含有油滴（圖 5），泡囊的形狀有球形、長橢圓形（圖 1、3）等。在樟樹根組織內被發現到叢囊（圖 4），而檫樹的皮膚細胞內有特殊的構造，是其叢囊。茶樹根組織有菌絲侵入，根部外有菌絲盤曲，皮膚細胞內有捲曲的菌

絲，菌絲不分隔，也有叢囊存在（圖9、10），但由先後二次自龜山採到的茶樹及木柵茶園採得的茶樹，根感染率都很低。

(2) 孢子的外形

(A) 大孢菌屬的無結合孢子 (azygospore)，大型者直徑在 600μ 、 2250μ 之間，亦有 $250\mu \sim 160\mu$ 之間的孢子、球狀，內含油滴，長在球狀似柄 (bulbous-suspensor like) 的菌絲頂上，依顏色分有黑孢菌、大黃孢菌及褐孢菌（圖12~16）。

(B) 繡球菌屬的孢子，直徑大小在 $250 \sim 106\mu$ 之間，小繡球菌為白色、球形或不規則形，孢子內充滿油滴，而墨氏繡球菌為黃色或褐色、球形、卵形甚或不規則形，孢子內亦含有油滴孢子柄呈漏斗狀（圖17~18）。

(C) 厚孢菌屬的紅厚孢菌，其孢子大小在 $250 \sim 106\mu$ 之間，深褐色、卵形或橢圓形，孢子壁厚常成串存在。（圖19~21）。

五、討 論

在陽明山苗圃中，樟樹與櫟樹根圈土壤中，所採到的孢子大部分為大孢菌屬及繡球菌屬，大孢菌屬依其顏色分為黑孢菌、大黃孢菌、白孢菌及褐孢菌四種，根據游淑媚，1980 所做的孢子萌發，斷定白孢菌與大黃孢菌為同種，兩者顏色的不同是其成熟度的差異所致，故本實驗大黃孢菌與白孢菌的孢子合併計算。而木柵茶園土壤中所篩到的孢子，則為繡球菌屬和厚孢菌屬者居多，前者的土質為壤土，而後者屬粘土，表示孢子的分布受土質的影響。有些孢子的大小在 106μ 以下，而本實體篩取的孢子大小在 $600\mu \sim 106\mu$ 之間，因此可能還有更小的孢子未收集到。

根經處理後，在解剖顯微鏡下檢視，發現內生菌根菌的感染並不很平均，有些根呈現密集式的感染，有些根則否，表示其感染為逢機性，同時發現嫩根及生長點處都沒有菌根菌的共生，表

示內生菌根菌與作物根的共生和根的成熟度有關。其作用機制，有待探討。

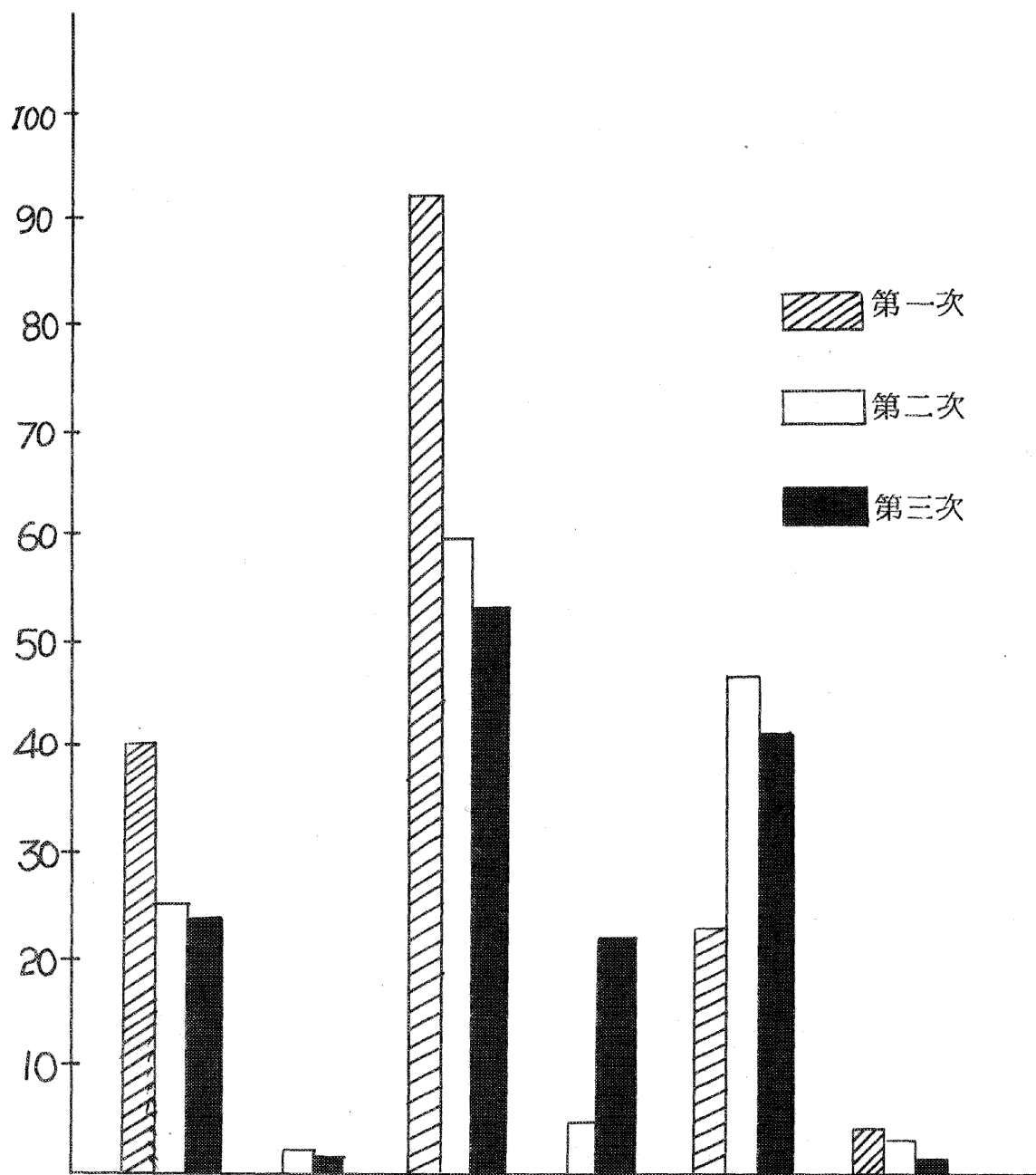
在樟樹和櫟樹的根經染色後，發現皮層細胞充滿泡囊且大小形狀不一，有球形、長橢圓形等，表示共生的內生菌不僅只是一種。依據大孢菌感染的特徵，只在根組織內形成叢囊而不產生泡囊，其泡囊是長在根周圍土壤的菌絲上，因此可判定此時樟樹和櫟樹的內生菌，主要為繡球菌屬，而土壤中所含的孢子，大部分是大孢菌，繡球菌屬的孢子只佔一小部分，因此也可確認根部感染程度與土壤中孢子數的多寡不成相關性，與 Hall, Hayman & Stouold 及 Rodhead 們所說吻合。在 Kham 認為泡囊、叢囊的出現與植物的成熟度有關，先有叢囊，俟植物成熟後，叢囊銳減，根內充滿泡囊，但在實驗中的樟樹和櫟樹，在一、二月及七、八月份中其幼苗的根經處理後，均發現根內佈滿了泡囊，顯然與上述說法不同，依據 Barbara Mosse 認為叢囊在細胞內生存的時間很短，只有 2~3 週就崩潰，因叢囊存在時間很短，故在一、二月及七、八月份的實驗很少找到叢囊與 Barbara Mosse 說法吻合。

前後二次採自龜山的茶樹，經根處理後，只找到侵入入根部的菌絲，第三次處理木柵茶園的茶樹，才在根內找到叢囊及侵入皮層細胞呈捲曲的菌絲，因此才確認茶樹是屬內生菌根，但是由這三次根處理的觀察，發現茶樹的菌根在自然情況下的感染率仍很低，而茶樹的根系很少，應是形成內生菌根的作物，是否由於殺蟲劑的過量使用，或土壤中微生物和共生菌間的相互關係，有待進一步探討。

目前內生菌根菌的純系培養還未成功，菌種的鑑定完全依賴孢子的外形，但常因孢子的成熟度不同而導致錯誤的判斷，以及大量接種源的獲得頗為困難，而至影響其研究發展，因此，似應以努力突破這些障礙為今後研究方向的指標。

六、參考文獻

- 1 Khanm A.G. 1975. Growth effects of VA mycorrhiza on crops in the field. In " Endomycorrhizas " Sanders, F.E. etal 419-435 pp.
- 2 Menge, J.A., R.G. Platt and E. L.V. Johnson, 1981, Vesiculararbuscular myeorrhizal fungi associated with citrus in Florida and California and notes on their distribution and ecology. Mycologia 73: 112-125.
- 3 Gerdemann, J.W. and J.M. Trappe, 1974, The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycol. Mem. 5, 25-27, 31-33, 36-40 pp.
4. 游淑媚 1980 , 大孢內生菌根菌之分佈及孢子萌發之研究 , 國立台灣師範大學生物研究所碩士論文共 43 頁。
5. 陳裕良 , 1980 , 內生菌根菌接種對蘆筍幼苗形態及生長之影響 , 國立台灣大學園藝研究所碩士論文共 33 頁。
6. Gerdemann, J.W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in the Development and Function of Roots. Acad. Press. 575-591 pp.
(黃瑞祥譯)



(表五) 樟樹每 500 公克根圈土壤中所含孢子數



圖 3 樟樹根皮層細胞內泡囊放大 300×



圖 4 樟樹根內的叢囊 300×

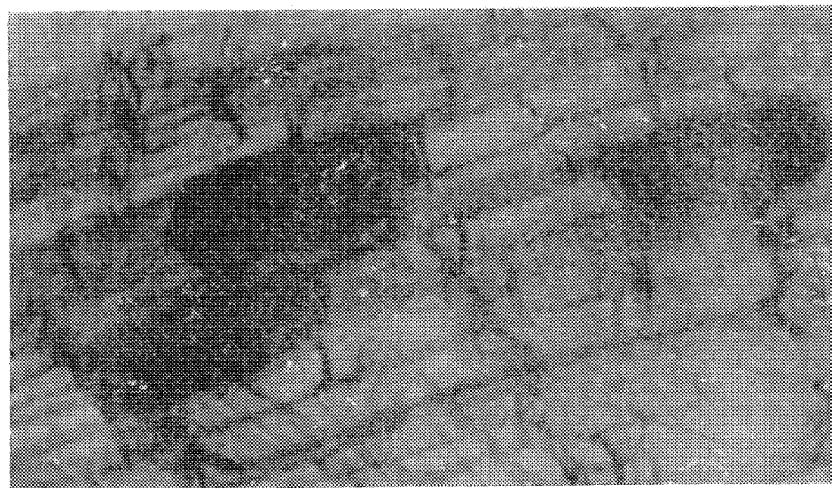


圖 5 檳樹根皮膚內西泡囊的放大，可看到泡囊內有油滴 300×

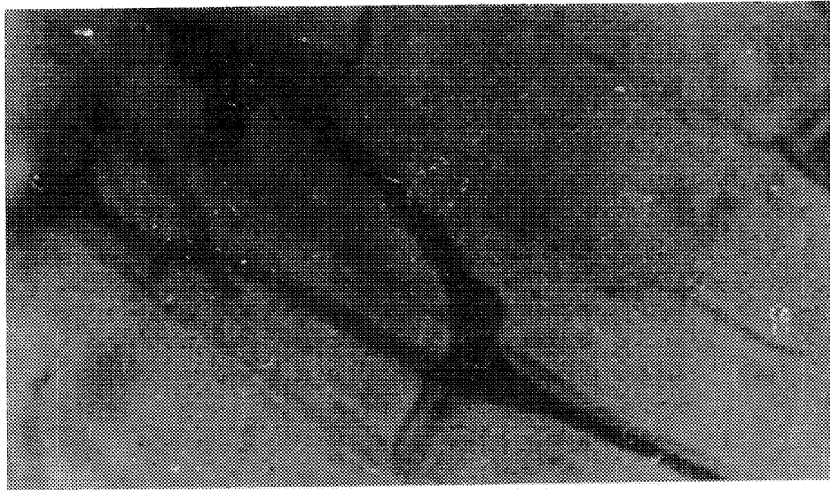


圖 7 檫樹根內菌絲末端膨將形成泡囊 300 ×

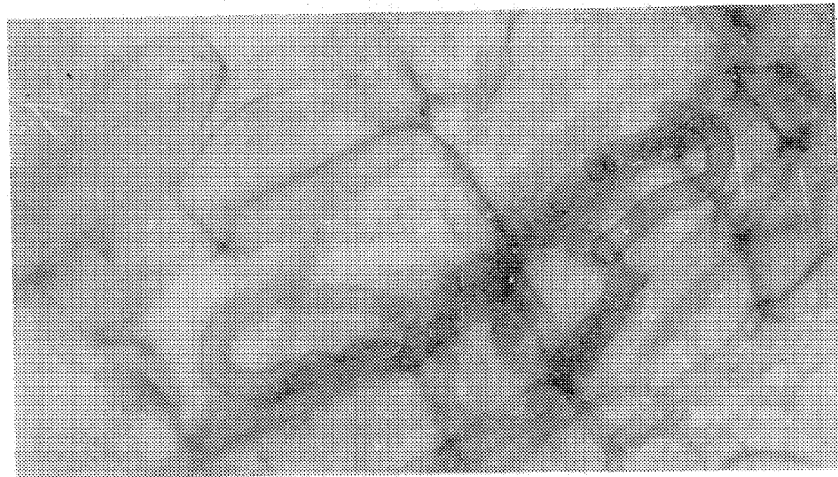


圖 9 茶樹根皮層細胞內有捲曲的菌絲 300 ×

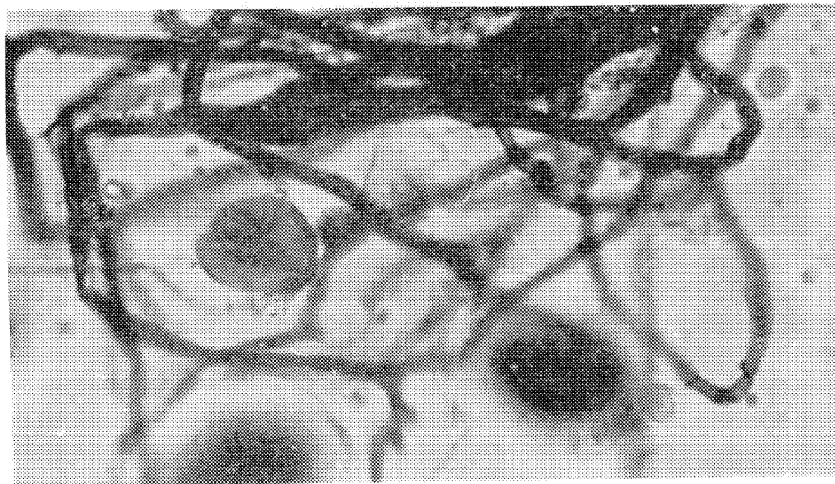


圖 10 茶樹根外的盤曲菌絲 150 ×

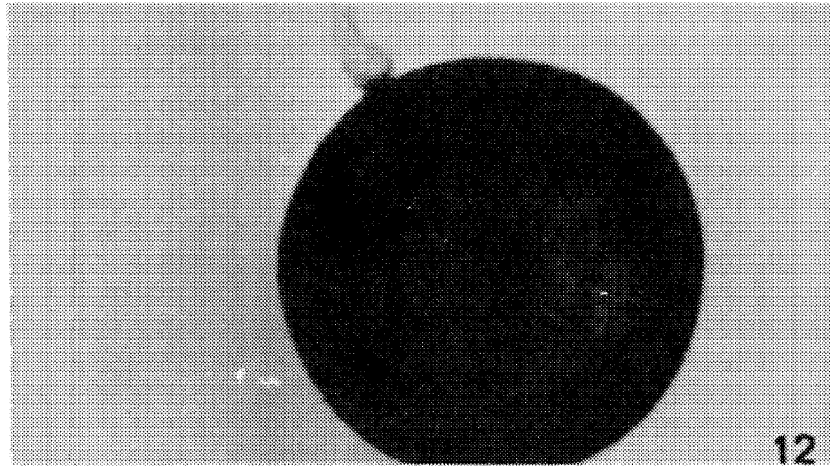


圖 12 大黃孢菌孢子的放大 60 ×

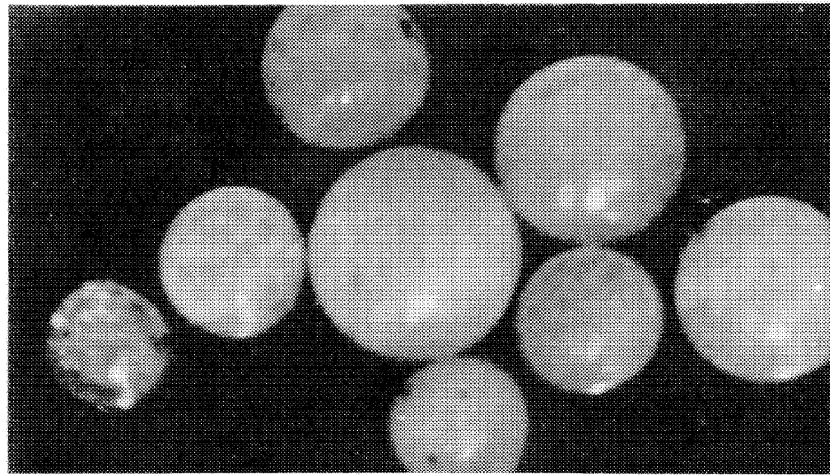


圖 13 大黃孢菌的孢子黃色充滿油滴 30 ×

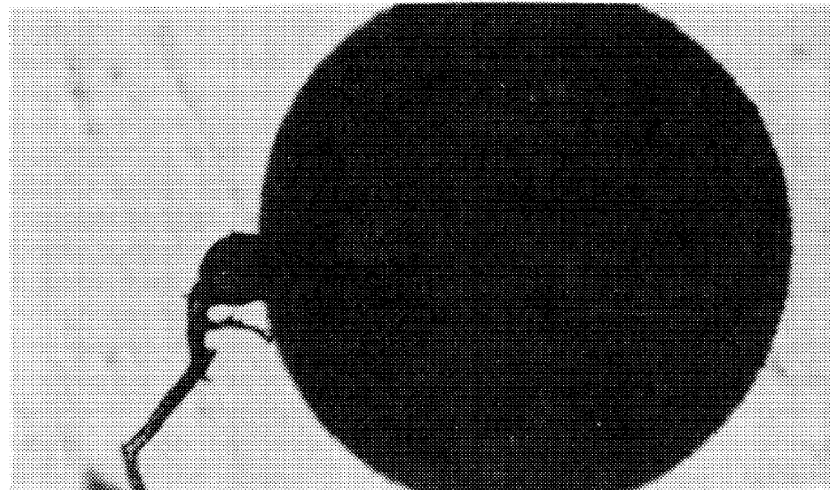


圖 14 黑孢菌孢子的放大 60 ×

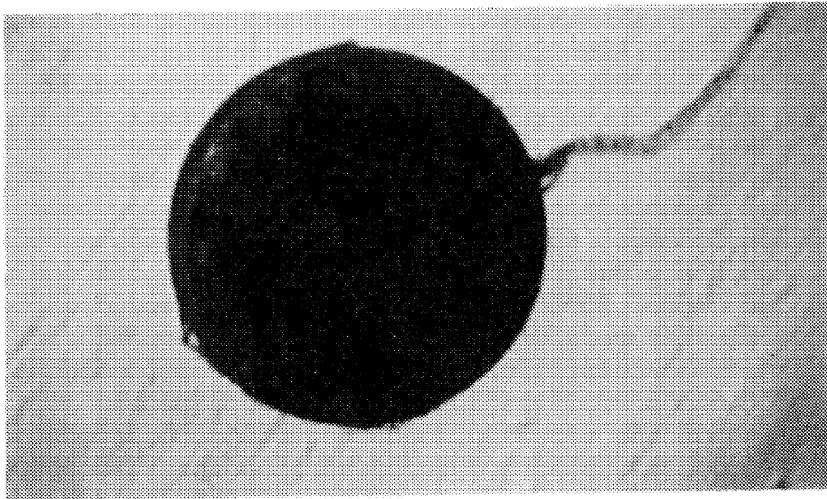


圖 16 褐色的褐孢菌孢子 60 ×

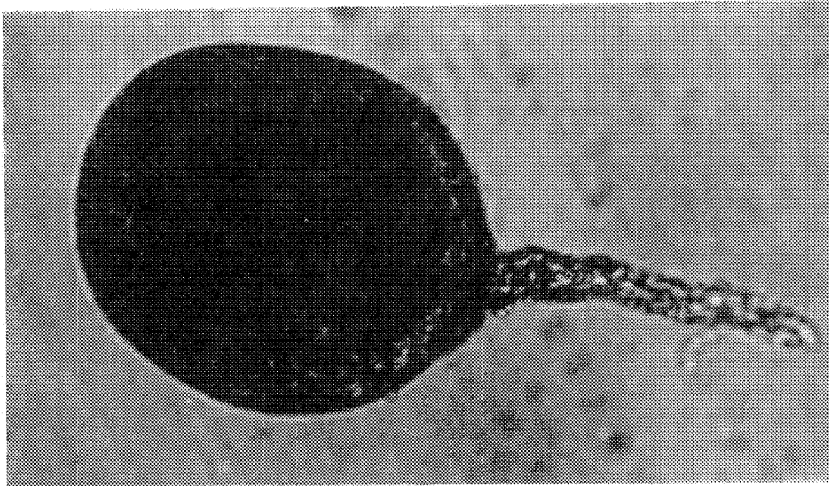


圖 17 小繡球菌孢子 150 ×

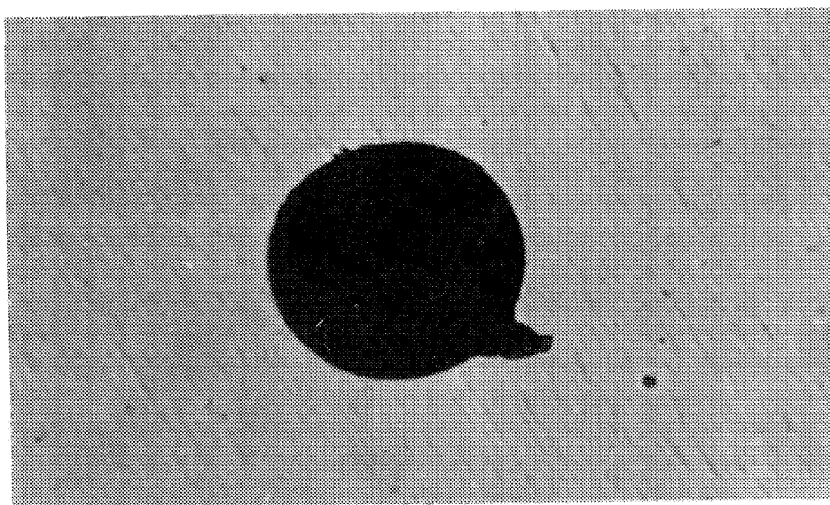


圖 18 墨氏繡球菌孢子 60 ×

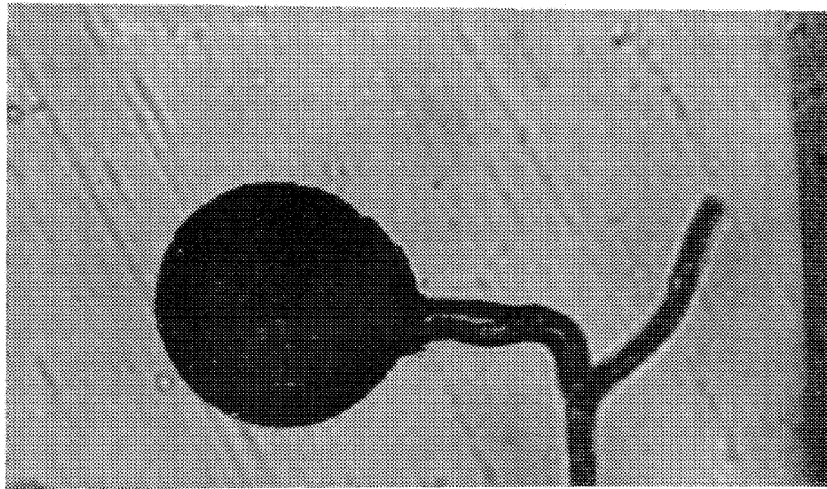


圖 19 紅原孢菌孢子 150 ×

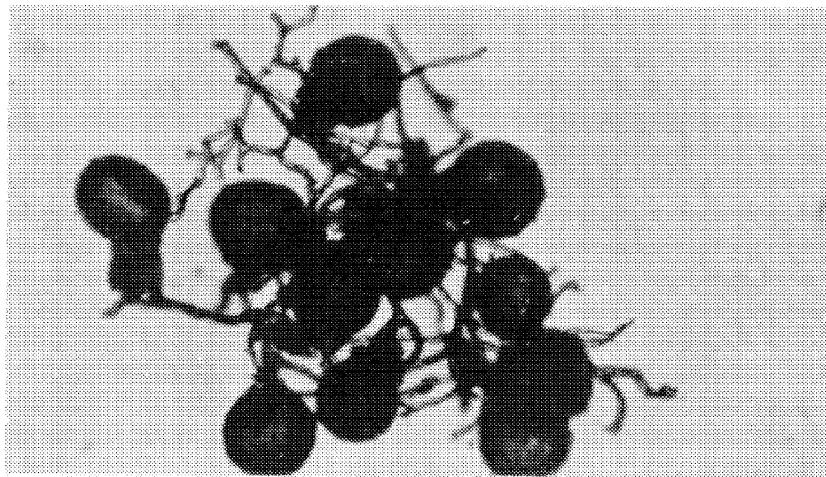


圖 20 成串的紅厚孢菌孢子 60 ×

評語：植物的發育成分，過去僅注意到施肥、灌溉等，今日的農作研究，發現內生菌根，在根內的存否以及在土壤中的含量等，更是重要。

作者把台北地區生長的樟樹、櫟樹及茶樹根圍土壤中的大孢菌類 4 種，繡花菌類 2 種以及厚孢菌一種，作了初步的形態觀察，頗屬難能可貴，希望作者繼續作進一步的研究，比為菌種的鑑定，菌種的培養以及接種等，以便能促使彼等樹木之良好成長及繁殖。