

台灣二葉松菌根菌接種試驗

林子超* 陳建名

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 55224 南投縣集集鎮民生東路 1 號

*通訊作者：super@tesri.gov.tw

收件日期：2019 年 3 月 27 日；接受日期：2019 年 5 月 6 日

摘要

松科 (Pinaceae) 植物常與外生菌根菌 (ectomycorrhizal fungi, EMF) 形成共生，但是愈來愈多的研究在松科植物根系發現叢枝菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)，本研究藉由台灣特有種松科植物台灣二葉松 (*Pinus taiwanensis*) 菌根菌接種試驗來了解外生菌根菌與叢枝菌根菌對台灣二葉松苗木生長之影響，並探討其生態上的意義。結果顯示外生菌根菌與叢枝菌根菌均可與台灣二葉松形成菌根，而外生菌根菌對台灣二葉松之生長促進能力明顯優於叢枝菌根菌。

關鍵詞：台灣二葉松、外生菌根菌、叢枝菌根菌

Mycorrhizal fungi inoculation experiment of *Pinus taiwanensis*

Tzu-Chao Lin* and Chien-Min Chen

Endemic Species Research Institute, Jiji, Nantou, Taiwan

* Corresponding author: super@tesri.gov.tw

Received: March 27, 2019; Accepted: May 6, 2019

Abstract

Pinaceae plants often form symbiotic relationship with ectomycorrhizal fungi (EMF), but more and more studies have found arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the roots of Pinaceae plants. In this study, we investigated the effects of ectomycorrhizal fungi and arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Pinus taiwanensis*, an endemic species in Taiwan, by inoculation experiment, and explored the fungi's ecological significance. The results showed that both ectomycorrhizal fungi and arbuscular mycorrhizal fungi could form mycorrhiza with *Pinus taiwanensis*, and the growth-promoting ability of ectomycorrhizal fungi was significantly better than that of arbuscular mycorrhizal fungi to *Pinus taiwanensis*.

Keywords: *Pinus taiwanensis*, ectomycorrhizal fungi, arbuscular mycorrhizal fungi

前言

松科植物通常形成外生菌根，但部分研究在一些松科植物的野外樣本發現叢枝菌根 (Cázares and Trappe 1993)。然而，Smith 和 Read (1997) 認為叢枝菌根菌與大多數的維管束植物形成內生菌根但不包含松科植物。Horton 等 (1998) 於火災跡地的加州二葉松 (*Pinus muricata*) 小苗根系內也發現了根內菌絲、囊泡與叢枝體。Cázares 和 Smith (1996) 也在誘導培育試驗中發現北美黃杉 (*Pseudotsuga menziesii*) 及高山鐵杉 (*Tsuga mertensiana*) 可以形成叢枝菌根。然而，Smith 等 (1998) 以叢枝菌根菌 *Glomus intraradices* 的孢子進行接種試驗，在毛果冷杉 (*Abies lasiocarpa*)、美國黑松 (*Pinus contorta* var. *latifolia*)、美國西部黃松 (*Pinus ponderosa*)、加州鐵杉 (*Tsuga heterophylla*) 與北美黃杉等松科植物均無形成內生菌根。

台灣二葉松是典型的陽性樹種，當大規模的森林火災或地震崩塌跡地形成時，它通常最早進駐並形成優勢，這除了因為強陽性的生育環境有助於促進其種子萌發，更歸因於台灣二葉松常藉由與菌根菌共生，增強對養分的吸收，使其初期快速生長，在為數眾多的競爭物種中取得先機。Lin 等 (2019) 在地震崩塌跡地植生回復過程觀察到台灣二葉松根圈土壤初期出現大量叢枝菌根菌孢子，隨著稜線樣區上二葉松逐漸成為優勢樹種，樹冠層逐漸鬱閉，土壤腐植質增加，叢枝菌根菌的物種數及單位孢子數量逐漸下降，並在地震發生後第三年開始記錄到外生菌根菌。雖然內生菌根菌與外生菌根菌可能同時存在同一宿主的根系內 (Chilvers *et al.* 1987)，但它彼此之間的優勢度可能隨著時間而消長 (Bellei *et al.* 1992)，這種現象也顯示出不同種類共生真菌在不同共生階段可能扮演不同的角色 (Chen *et al.* 2000)。

本研究主要目的是藉由在台灣特有種松科植物台灣二葉松 (*Pinus taiwanensis*) 接種不同類型 (外生及內生) 的菌根菌，來評估內生與外生菌根是否能與台灣二葉松形成共生及其對台灣二葉松生長的影響，進而探討不同類型的菌根菌是否在不同的共生階段扮演了不同的角色。

材料與方法

本試驗主要分二部份探討菌根類型與台灣二葉松之共生關係，第一部份以接種試驗評估外生菌根菌與叢枝菌根菌對台灣二葉松之生長影響，試驗用台灣二葉松苗木以採取自九九峰原生育地 (24° 00' N, 120° 45' E) 台灣二葉松種子經表面消毒播種培育於滅菌河砂，苗高達 10cm 後移殖於 18 公分穴植管，穴植管內介質為經高溫高壓滅菌處理 (121 °C, 1.2 kg/cm²) 之九九峰地區原生育地土壤 (壤質砂土, pH 值 4-4.6)。第 1 種處理為接種外生菌根菌，菌種以分離自九九峰地震崩塌地演替較後期之彩色豆馬勃 (*Pisolithus tinctorius*) 為供試菌種，第 2 種處理為接種叢枝菌根菌，菌種以分離自九九峰地震崩塌地演替初期優勢菌種 *Acaulospora morrowiae* 為供試菌種，第 3 種處理為對照組不接種任何菌根菌。菌根接種處理於 2015 年 3 月 20 日進行，每種處理 8 重複，8 個月後取其中 4 重複量測植株高度，並進行外生菌根型態觀察及染根觀察。其餘 4 重複 3 年後量測其植株高度並進行外生菌根型態觀察及染根觀察。

第二部份以接種試驗評估外生菌根與內生菌根與台灣二葉松共生期間之消長關係，以及非原生育地內生菌根菌與台灣二葉松之宿主親和性。試驗用台灣二葉松苗木以採取自九九峰原生育地台灣二葉松種子經表面消毒播種培育於滅菌河砂，苗高達 10cm 後移植於 6 吋塑膠盆鉢，盆鉢內土壤採集自九九峰

地區原生育地土壤(壤質砂土, pH 值 4-4.6), 經高溫高壓滅菌處理 (121 °C, 1.2 kg/cm²), 每一盆鉢移植 4 株苗木。第 1 種處理同時接種演替初期優勢內生菌根菌 *A. morrowiae* 與演替較後期外生菌根菌黃白乳牛肝菌 (*Suillus placidus*), 第 2 種處理接種 *A. morrowiae*, 第 3 種處理接種分離自台灣東部石灰石礦區優勢菌種 *A. kentinensis*。菌根接種處理於 2015 年 3 月 20 日進行, 每種處理 4 重複, 8 個月後量測植株高度並採取根部樣本進行染根觀察根部感染率, 3 年後量測其植株高度與進行染根觀察根部感染率。感染率評估方法使用 Mcgonigle 等 (1990) 提出之計算方法。盆鉢試驗於農委會特有生物研究保育中心網室內進行, 以避免試驗期間其它因子之干擾。台灣二葉松接種不同菌根菌 3 年後外觀差異。試驗數據以 SPSS 進行單因子變異數分析 (one-way ANOVA), 並以最小顯著差異法 (Least Significant Difference method)(LSD) 分析各變數平均值間之差異。

結果

本研究以接種試驗評估外生菌根菌 *P. tinctorius* 與叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 對台灣二葉松之生長影響, 接種 8 個月後, 接種外生菌根菌與叢枝菌根菌處理在苗高上並無顯著差異 ($p>0.05$), 但 2 種接種菌根菌處理組苗高明顯高於未接菌之對照組 ($p<0.01$) (圖 1、圖 2)。而根部外觀形態, 接種外生菌根處理組根部形成許多外覆黃棕色菌絲之分叉形態菌根 (圖 3), 但根量與根毛明顯較接種叢枝菌根菌處理組及對照組少, 接種叢枝菌根菌處理組根部形成較多細根 (圖 1), 經染根處理發現根內菌絲與囊泡 (圖 4), 感染率約 25%。3 年後接種外生菌根之台灣二葉松之苗高多出接種叢枝菌根菌之處理組近 40% (圖 5、圖 6), 而未接菌處理之台灣二葉松於 2 年後陸續死亡 (圖 7)。



圖 1. 台灣二葉松接種菌根菌 8 個月後外觀差異 (由左至右分別為對照組、接種 *A. morrowiae* 與接種 *P. tinctorius*)。

Fig. 1. Difference in appearance of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after eight months. From left to right, the control group, inoculated with *A. morrowiae* and *P. tinctorius*, respectively.

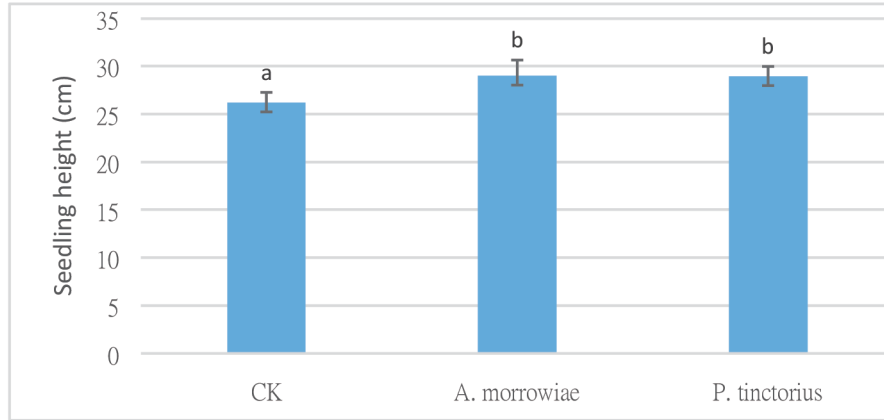


圖 2. 台灣二葉松接種菌根菌 8 個月後苗高差異。

Fig. 2. Difference in seedling height of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after eight months. Bars and lowercase letters at the column head indicate that means differ significantly (LSD, $P < 0.01$).



圖 3. 台灣二葉松接種 *P. tinctorius* 後形成許多外覆黃棕色菌絲之分叉型態菌根。

Fig. 3. *Pinus taiwanensis* forms dichotomous mycorrhiza coated in yellow brown mycelium after inoculating with *P. tinctorius*.

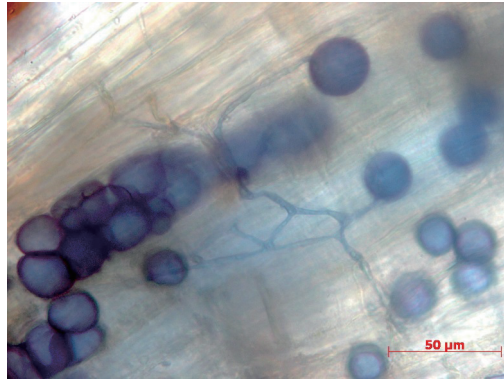


圖 4. 台灣二葉松接種叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 後根內產生根內菌絲與囊泡。

Fig. 4. *Pinus taiwanensis* forms Intraradical hyphae and vesicles after inoculating with *A. morrowiae*.



圖 5. 台灣二葉松接種菌根菌 3 年後外觀差異 (由左至右分別為接種 *P. tinctorius*、接種 *A. morrowiae*、對照組)。

Fig. 5. Difference in appearance of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after three years. From left to right, inoculated with *P. tinctorius*, inoculated with *A. morrowiae* and the control group, respectively.

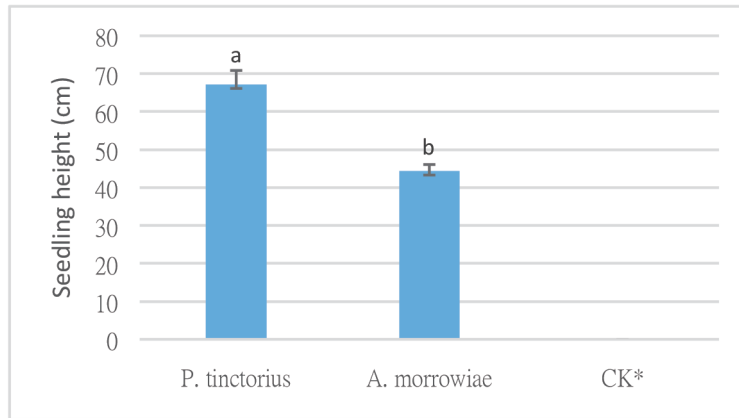


圖 6. 台灣二葉松接種不同菌根菌 3 年後苗高差異 (* 未接菌對照組植株於 2 年後陸續死亡，因此無法比較)。

Fig. 6. Difference in seedling height of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after three years. Bars and lowercase letters at the column head indicate that means differ significantly (LSD, $P < 0.01$). (*Seedlings in the control group died after two years, so the data were unavailable.)

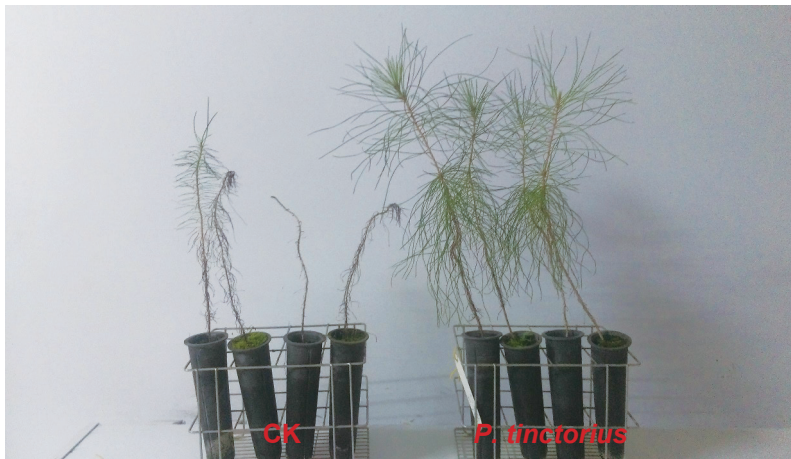


圖 7. 台灣二葉松接種菌根菌 2 年後外觀差異。

Fig. 7. Difference in appearance of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after two years. The left side is the control group and right side is inoculated with *P. tinctorius*.

另本研究以接種試驗評估外生菌根菌 *S. placidus* 與叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 與台灣二葉松共生期間之消長關係，以及非原生育地叢枝菌根菌 *A. kentinensis* 與台灣二葉松之宿主親和性。接種 8 個月後 3 種處理之台灣二葉松苗高並無顯著差異 ($p>0.05$) (圖 8)。而觀察根部外觀形態，同時接種外生菌根菌 *S. placidus* 與叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 之處理組，形成許多外覆菌氈之分叉結構，根量與根毛亦明顯少於僅接種叢枝菌根菌的其它 2 種處理。染根觀察發現同時接種外生菌根菌與叢枝菌根菌之處理組叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 感染率約 12%，僅接種叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 處理組感染率約 21%，接種叢枝菌根菌 *A. kentinensis* 處理組感染率約 7%。

3 年後同時接種外生菌根菌 *S. placidus* 與叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 之處理組苗高較其它僅接種叢枝菌根菌 2 種處理高出近 1 倍，而接種叢枝菌根菌 *Acaulospora morrowiae* 與 *Acaulospora kentinensis* 二種處理之苗高並無顯著差異 (圖 9、圖 10)。染根觀察發現同時接種外生菌根菌與叢枝菌根菌 *Acaulospora morrowiae* 之處理組叢枝菌根菌感染率約 6%，接種叢枝菌根菌 *Acaulospora morrowiae* 處理組感染率約 65%，接種叢枝菌根菌 *Acaulospora kentinensis* 處理組感染率約 8%。

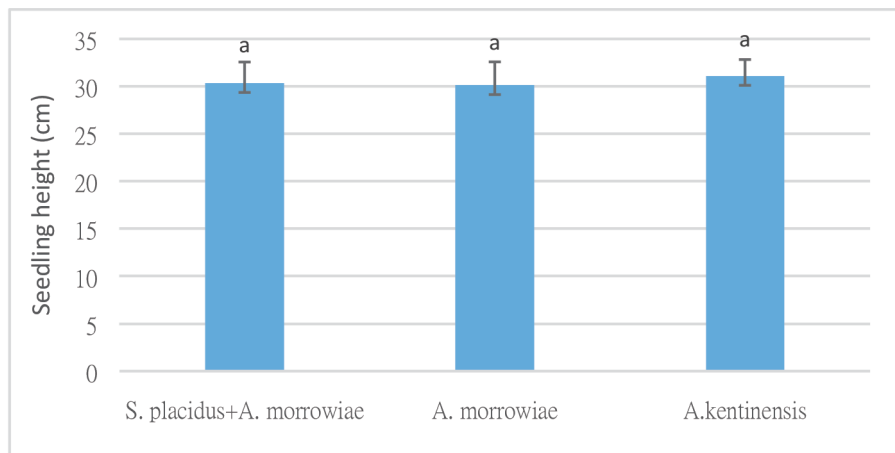


圖 8. 台灣二葉松接種不同菌根菌 8 個月後苗高差異。

Fig. 8. Difference in seedling height of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after eight months. Bars and lowercase letters at the column head indicate that means differ significantly (LSD, $P < 0.01$).



圖 9. 台灣二葉松接種不同菌根菌 3 年後外觀差異。

Fig. 9. Difference in appearance of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after three years.

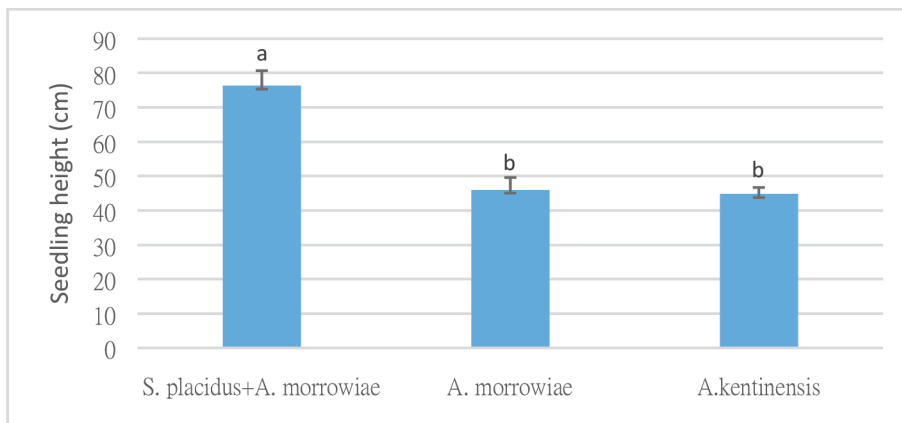


圖 10. 台灣二葉松接種不同菌根菌 3 年後苗高差異。

Fig. 10. Difference in seedling height of *Pinus taiwanensis* inoculated with mycorrhizal fungi after three years. Bars and lowercase letters at the column head indicate that means differ significantly (LSD, $P < 0.01$).

討論

接種試驗結果顯示接種外生菌根菌與叢枝菌根菌處理 8 個月後在苗高上明顯高於未接菌處理，但 2 種接種菌根菌處理組苗高並無明顯差異。而隨著時間拉長，接種菌根菌的差異更加明顯，未接菌處理組之台灣二葉松於 2 年後陸續死亡，接種外生菌根菌處理組 3 年後苗高超於接種內生菌根菌處理組近 40%。

外生菌根與內生菌根與台灣二葉松共生期間之消長關係，以及非原生育地叢枝菌根菌與台灣二葉松之宿主親和性試驗結果顯示，台灣二葉松可同時感染叢枝菌根及外生菌根。而對比同時接種外生菌根菌 *S. placidus* 與叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 之處理組與僅接種叢枝菌根菌 *A. morrowiae* 處理組之染根結果，發現感染外生菌根菌會降低叢枝菌根菌的感染率，Becklin 等 (2012) 調查研究中也觀察到相同的現象。然而，就台灣二葉松而言外生菌根菌對其生長促進能力明顯優於叢枝菌根菌。而不同生育地的叢枝菌根菌並無親和性的問題，亦可感染台灣二葉松，雖感染率明顯低於分離自原生育地的菌種，但在生長促進效益上並無明顯差異。

九九峰在歷經九二一地震後，菌根菌的調查發現叢菌根菌較外生菌根菌早出現於崩塌跡地，第 2 年就記錄到 13 種叢枝菌根菌，直到第 4 年才記錄到外生菌根菌 (Lin *et al.* 2019)。植物同時與叢枝菌根菌及外生菌根菌共生在許多植物被發現 (Toju *et al.* 2013)，Lin 等 (2019) 在調查中發現台灣二葉松也有這種現象，並認為此一現象可幫助植物在演替的過程順利建立其族群。在一些火災或地震崩塌的棲地，隨著植生回復樹冠層逐漸鬱閉，地表上的落葉層及腐植質也隨之增加，外生

菌根菌可產生不同種類的分解酵素 (Plett and Martin 2011)，這些酵素可幫助植物將一些礦物原素、殘材與落葉活化成可利用的形態。

Read (1993) 認為同時俱有叢枝菌根及外生菌根的植物，可能在生長初期先與叢枝菌根菌形成共生，隨之在演替的過程逐漸轉變為與外生菌根菌共生。然而，Helm 等 (1996) 發現形成外生菌根的植物與真菌常出現在演替的初期階段，因為外生菌根菌藉由風力傳播其孢子。Gehring 等 (2006) 認為外生菌根菌喜好於較潮濕的生育環境與宿主形成共生，相對而言叢枝菌根菌則偏好較乾燥的生育環境。地震崩場地所形成的乾燥環境可能營造適合叢枝菌根菌的生育環境，因此 Lin 等 (2019) 在地震崩場地調查發現叢枝菌根菌較外生菌根菌早出現於演替的初期階段，且隨著演替進行菌根菌的族群組成產生變化，而這種變化也影響了後續植群組成的變化。

引用文獻

- Becklin, K. M., M. L. Pallo and C. Galen. 2012. Willows indirectly reduce arbuscular mycorrhizal fungal colonization in understory communities. *Journal of Ecology* 100: 343-351.
- Bellei, M. M., J. Garbaye, and M. Gil. 1992. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (south Brazil). *Forest Ecology and Management* 54: 205-213.
- Cázares, E. and J. E. Smith. 1996. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon

- Coast Range soils. *Mycorrhiza* 6: 65-67.
- Cázares, E. and J. M. Trappe. 1993. Vesicular endophytes in roots of the Pinaceae. *Mycorrhiza* 2: 153-156.
- Chen, Y. L., M. C. Brundrett and B. Dell. 2000. Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *New Phytologist* 146: 545-556.
- Chilvers, G. A., F. F. Lapeyrie and D. P. Horan. 1987. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist* 107: 441-448.
- Gehring, C. A., R. C. Mueller and T. G. Whitham. 2006. Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecologia* 149: 158-164.
- Helm, D. J., E. B. Allen and J. M. Trappe. 1996. Mycorrhizal chronosequence near Exit Glacier, Alaska. *Canadian Journal of Botany* 74: 1496-1506.
- Horton, T. R., E. Cázares and T. D. Bruns. 1998. Ectomycorrhiza, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11-18.
- Lin, T. C., P. H. Wang and W. R. Lin. 2019. Changes of mycorrhizal fungal community occurring during the natural restoration after the chi-chi earthquake in Taiwan. *Symbiosis* 77: 177-184.
- Mcgonigle, T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild and J. A. Swan. 1990. A new method which give an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist* 115: 495-501.
- Plett, J. M. and F. Martin. 2011. Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* 27: 14-22.
- Read, D. J. 1993. Mycorrhiza in plant communities. *Advances in Plant Pathology* 9: 1-31.
- Smith, J. E., K. A. Johnson and E. Cázares. 1998. Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pineaceae and Betulaceae after spore inoculation with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 7: 279-285.
- Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd Edition, Academic Press, London, 605 p.
- Toju, H., S. Yamamoto, H. Sato and A. S. Tanabe. 2013. Sharing of diverse mycorrhizal and root-endophytic fungi among plant species in an oak-dominated cool-temperate forest. *PLoS One* 8: e78248.