

阿里山根節蘭根菌結合體之微細構造及內生菌

Ultrastructure and Endophytes of Root-Fungus Association of *Calanthe arisanensis*

林瑞進* 林育慧

Lei-Chen Lin* and Yu-Huei Lin

國立嘉義大學森林暨自然資源學系 60004 嘉義市鹿寮里學府路 300 號

Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan

*通訊作者：linerm@mail.ncyu.edu.tw

*Corresponding author: linerm@mail.ncyu.edu.tw

摘 要

阿里山根節蘭為臺灣特有種植物；本研究採之樣本在根菌結合體中所誘導純化之 4 株內生菌，經分子生物鑑定分別應屬於 *Sordariomycetes*、*Neonectria* 和 *Xylaria* 菌株。另於根菌結合體可觀察到腫大及其表面有稠密的菌絲覆蓋；利用電子顯微鏡進行微細構造觀察，發現在內皮層有菌絲團及老化的菌絲團。因此，本研究結果證實，南投縣郡大林道之阿里山根節蘭之根菌結合體具有蘭花菌根之構造。

Abstract

The objectives of this study were to investigate the root-fungus association characteristics of *Calanthe arisanensis*, an endemic species in Taiwan. The isolated fungal strains from *Calanthe arisanensis* have been identified as *Sordariomycetes*, *Neonectria* and *Xylaria* by a DNA sequence analysis. The root-fungi associations from the site were found swollen and densely adhered to the surface by hyphae under a stereomicroscopy. Young and old peloton structures in the root cortex of *Calanthe arisanensis* were observed with a scanning electron microscope. These results demonstrate that *Calanthe arisanensis* could form orchid mycorrhiza in the field.

關鍵詞：內生菌、阿里山根節蘭、蘭花菌根、微細構造

Key words: *Calanthe arisanensis* Hayata, endophyte, orchid mycorrhiza, ultrastructure

收件日期：2013 年 09 月 11 日

接受日期：2014 年 1 月 06 日

Received: September 11, 2013

Accepted: January 06, 2014

前 言

臺灣蘭科植物根據臺灣植物誌第二版中共計記錄 101 屬 336 種，為臺灣植物中包含最多物種的科 (Su *et al.* 2000)；臺灣位於亞熱帶，正是蘭花生長最繁盛的地域，加上臺灣的地形錯綜複雜，海拔高差從海濱一直上升到將近 4,000 m，在這其間包括熱帶、亞熱帶、溫帶和亞寒帶等多種氣候帶，使得臺灣的蘭花種類多樣，從保育物種多樣性的觀點來看，它應是不可忽視的一群。近年來，蘭花生育地受到破壞與物種遭受濫採等情形日漸嚴重，許多過去曾被記錄的物種，現已難覓其蹤跡 (鐘等 2006)。

菌根 (mycorrhiza) 是自然界中普遍存在的植物共生現象，是由土壤中的真菌與植物根系共生後所形成之一種根菌結合體 (root-fungus association) (Frank 1885)。菌根形態共計有 6 種，主要分為外生、內生及外內生菌根等三大類 (弓 1997; Larcher 2003)。蘭花菌根 (orchid mycorrhiza) 係屬內生菌根 (edomycorrhiza)；最早在 1840 年首由 Link 學者於蘭科植物根段內分離出內生真菌 (endophytic fungus)；之後，在 1886 年 Wahrlich 學者亦證實超過 500 種蘭科植物都具有內生真菌 (Arditti 1967)；而在國內也有多位學者針對臺灣原生蘭科植

物之內生真菌進行研究 (陳 2007; 鄭 2012)。

阿里山根節蘭 (*Calanthe arisanensis*) 係屬蘭科 (Orchidaceae) 根節蘭屬 (*Calanthe*) 中型地生蘭花植物，為臺灣原生特有種，分布於全臺灣 1,000-2,000 m 的森林中；花色全白或有的微泛淡紫暈，花期是 2-3 月。

目前，雖然已有學者針對阿里山根節蘭之葉部進行化合物萃取，並其活性成分部分對於多種癌症細胞具有顯著毒殺作用 (Lee *et al.* 2008)；而在蘭花菌根的研究上，尚無相關研究探討阿里山根節蘭之根菌結合體及其內生菌。本研究是以此臺灣特有種為材料，進行菌根構造觀察，探討其根菌結合體是否具有蘭菌根之構造特徵；並觀察根系所分離菌株之多樣性。

材料與方法

I、材料

本研究樣本於春季採自於臺灣省南投縣郡大林道 15 km 處 (東經 120°54'42.375"，北緯 23°37'51.083")。

II、根系結合體形態觀察

利用自來水將野外採集的樣本流動清洗三分鐘後，置入超音波震盪機，再將根系結合體置於光學顯微鏡觀察下觀察形態 (Usuki and

Narisawa 2005)。

將一部份樣本浸置於 2.5 % 戊二醛 (glutaraldehyde) 固定液中，固定一天，再以磷酸緩衝溶液 (0.1M) 清洗 3 次，每次 15 分鐘，隨後以酒精 (10、30、50、70、80、90、95、100%) 及 100 % 丙酮進行序列脫水，再以液態二氧化碳進行臨界點乾燥 (CPD, Critical Point Drying) (陳等 1991)。隨後將材料以雙面膠黏於鋁台 (stub) 鍍金後，處理後利用掃描式電子顯微鏡進行觀察 (蔡 2003)。

III、菌種分離與純化

將本次採集 5 株阿里山根結菌之根菌結合體先以清水清洗後，利用立體顯微鏡進行觀察；再將 100 份根段樣本清洗後，置於無菌操作台上以 30% H₂O₂ 溶液中殺菌 1 分鐘 (Berch *et al.* 2002)，再用無菌水清洗 3 次。隨後將清洗後的根段置於 1% water agar 培養基中 (Xiao and Berch 1992)。置於 20°C 黑暗環境下培養 14-21 天後，菌株會從根段邊緣長出，再將此菌絲移入 1% MEA (malt extract agar) 培養基中進行純化 (Johansson 2001)。

IV、菌落形態及生長觀察

將已純化之菌株，移至 2% MEA 及 PDA 培養基上，在黑暗生長箱中培育 (23°C)，定時紀錄菌落生長及形態觀察 (Hambleton and Currah 1997)。

V、菌種保存

將菌株移入 PDA 培養基試管中，進行菌種保存 (蔡 2003)。

VI、DNA 萃取、PCR 擴增、序列分析和資料分析

將分離純化之菌株培養於 PDA 培養基，利用 Puregene DNA Purification Kit 來進行菌株 DNA 之萃取；利用引子 ITS1-F 和 TW13 來進行 ITS/5.8S rDNA 序列之聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，再將純化後之 PCR 產物定序，並與 NCBI 網站資料進行序列比對，最後利用 MEGA 軟體繪製親緣關係樹狀圖 (Sigler *et al.* 2005)。

VII、統計分析

將各菌株生長資料 (3 重複)，以變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 進行各處理間之顯著性分析，再以 Duncan 氏多變異檢定法進行同質性檢定。

結果與討論

I、野外採集菌根結合形態

在南投縣郡大林道所採集的阿里山根結菌，其根菌結合體經攜回實驗室清洗乾淨後，利用光學顯微鏡觀察，可發現其植株僅有腫大的主根，並無其他細根 (圖 1A)；另於其根菌結合體上有稠密的菌絲覆蓋在表面 (圖 1B)。

II、顯微構造

本研究在郡大林道所採集的阿里山根結菌之根菌結合體，利用掃描式電子顯微鏡觀察時，在樣本表面可發現稠密菌絲覆蓋 (圖 2A)；另在樣本橫切面上無發現菌毯 (mantle) 及哈替氏網 (hartig net) 等外生菌根的構造，但於此樣本之內皮層細胞內可發現菌絲團之構造 (圖 2B)，於菌絲團之構造中又可發現老化的菌絲團，此相鄰 2 個細胞間之老化菌絲團有菌絲相連之現象 (圖 2C)。

依據菌根分類指出蘭花菌根係屬內生菌根之一(弓 1997; Larcher 2003); 然而, 蘭花菌根的形態特徵係指在蘭科植物根系表皮細胞中菌絲會穿透細胞壁, 並在皮層細胞內會出現初期及老化的菌絲團 (young and old pelotons) 構造(Hadley 1982; Chang and Chou 2007)。

III、菌株分離純化後菌落形態及生長觀察

本研究將分離之內生菌分別置於不同培養基 (2%MEA及PDA) 下培養 (圖3及表1), 觀察菌株在不同培養基下之形態變化, 以作為菌株鑑別之依據。

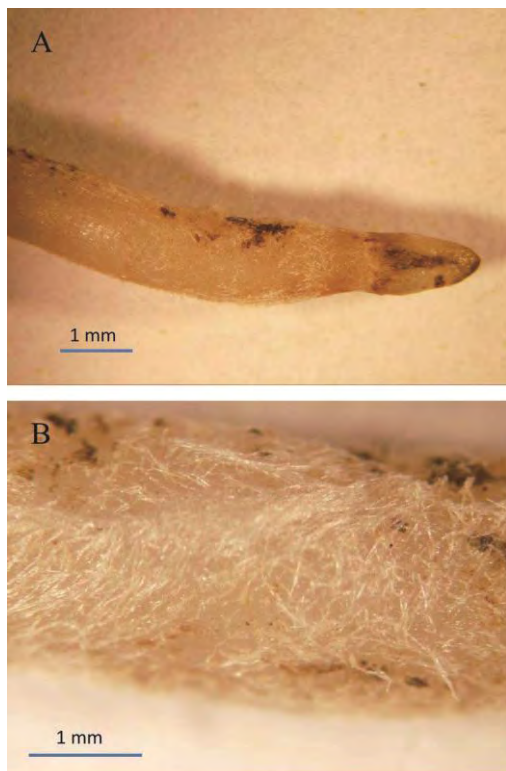


圖 1 阿里山根節蘭之根菌結合體形態。
A: 腫大的主根(標尺=1mm); B: 表面有菌絲覆蓋(標尺=1mm)。
Fig. 1 Morphology of *Calanthe arisanensis* root-fungus association.

A: swollen association (bar = 1mm); B: association surface with hyphae (bar = 1mm)

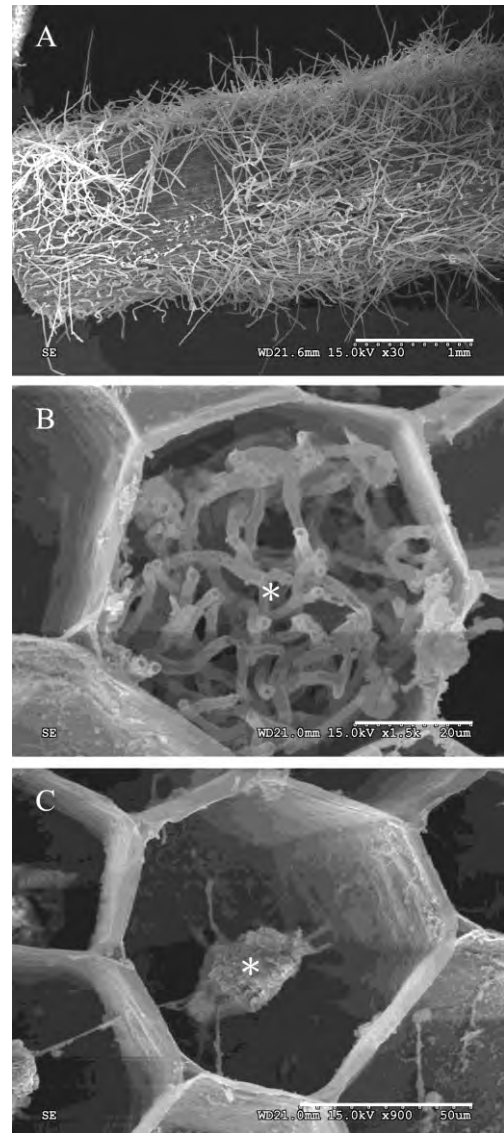


圖 2 阿里山根節蘭根菌結合體之微細構造。
A: 表面有稠密的菌絲覆蓋; B: 菌絲團構造 (*); C: 老化菌絲團 (*)。 **Fig. 2** Ultrastructure of *Calanthe arisanensis* root-fungus association.
A: association surface with numerous fungal hyphae; B: young peloton; C: old peloton.

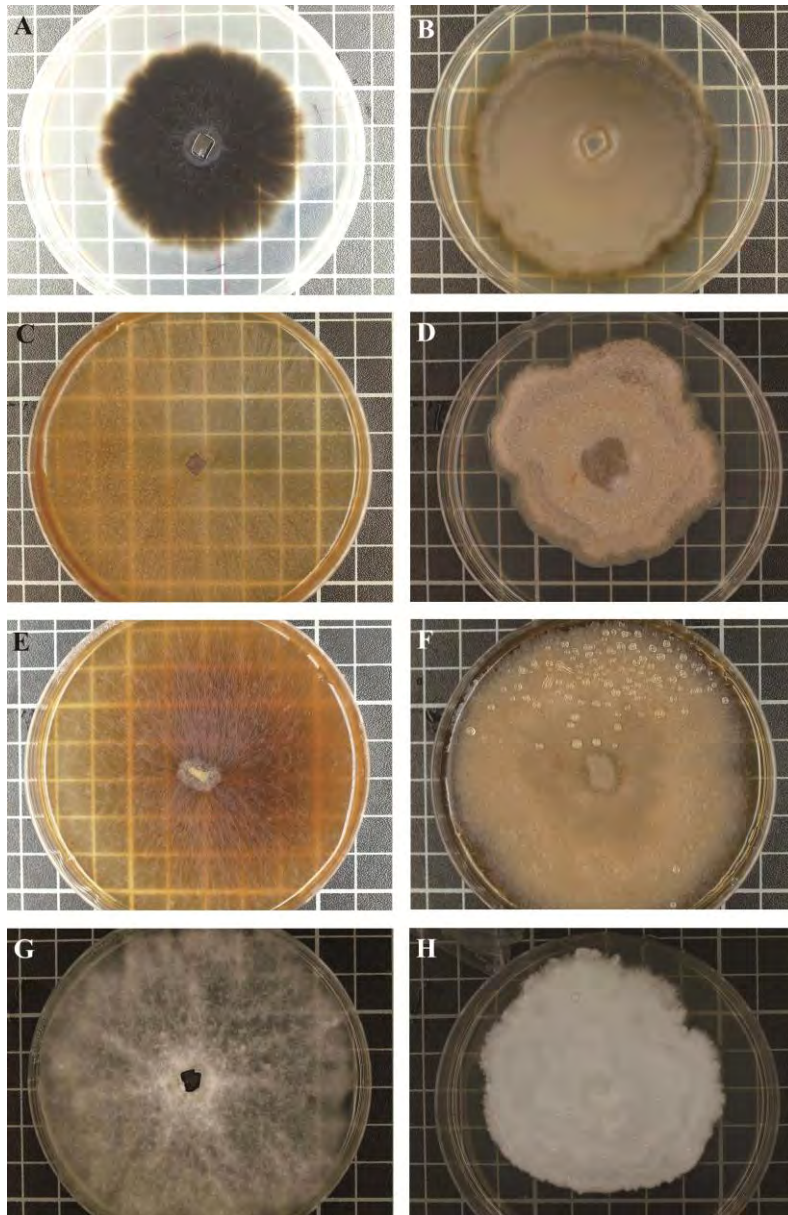


圖 3 阿里山根結蘭根系結合體內生菌之菌落形態。

A : Ca2 菌株 2% MEA 菌落形態 ; B : Ca2 菌株 PDA 菌落形態 ; C : Ca4 菌株 2% MEA 菌落形態 ; D : Ca4 菌株 PDA 菌落形態 ; E : Ca5 菌株 2% MEA 菌落形態 ; F : Ca5 菌株 PDA 菌落形態 ; G : Ca6 菌株 2% MEA 菌落形態 ; H : Ca6 菌株 PDA 菌落形態。

Fig. 3 Colony morphology of endophytes from *Calanthe arisanensis* fungal-root association after 27d. A and B, colony of Ca2 on 2% MEA and PDA, respectively; C and D, colony of Ca4 on 2% MEA and PDA, respectively; E and F, colony of Ca5 on 2% MEA and PDA, respectively; G and H, colony of Ca6 on 2% MEA and PDA, respectively.

表 1 阿里山根結蘭根菌結合體內生菌於不同培養基下之生長速率

Table 1 Growth rate of *Calanthe arisanensis* root-fungus association on and under different media and temperatures after 12ds

菌株	培養基	溫度	平均值±標準偏差 (mm/d)
Strain	Medium	Temperature	Means±SD
Ca2	MEA	23°C	2.6±0.1 ^{bc}
Ca2	PDA	23°C	2.4±0.1 ^b
Ca4	MEA	23°C	2.6±0.1 ^c
Ca4	PDA	23°C	3.1±0.1 ^d
Ca5	MEA	23°C	3.0±0.1 ^d
Ca5	PDA	23°C	3.1±0.1 ^d
Ca6	MEA	23°C	2.2±0.3 ^a
Ca6	PDA	23°C	3.1±0.1 ^d

All values reported as means±standard deviation for four replicates. (Duncan test, $P < 0.05$)

Ca2菌株在2%MEA培養基中，菌落呈現深橄欖綠色（圖3A），生長速度為 2.6 ± 0.1 mm/d；另在PDA培養基中，菌落呈現褐色（圖3B），生長速度為 2.4 ± 0.1 mm/d。

Ca4菌株在2%MEA培養基中，菌落呈現淡褐色（圖3C），生長速度為 2.6 ± 0.1 mm/d；另在PDA培養基中，菌落呈現淡咖啡色（圖3D），生長速度為 3.1 ± 0.1 mm/d。

Ca5菌株在2%MEA培養基中，菌落呈現淡褐色（圖3E），生長速度為 3.0 ± 0.1 mm/d；另在PDA培養基中，菌落呈現淡咖啡色（圖3F），生長速度為 3.1 ± 0.1 mm/d。

Ca6菌株在2%MEA培養基中，菌落呈現灰白色（圖3G），生長速度為 2.2 ± 0.3 mm/d；另在PDA培養基中，菌落呈現深白色（圖3H），生長速度為 3.1 ± 0.1 mm/d。

IV、菌株分子生物分析

本研究利用ITS1-F/TW13為引子組，萃取

阿里山根結蘭根菌結合體中所分離之內生菌與親緣相近之菌株比對之結果如圖4所示：Ca2菌株與NCBI基因庫中糞殼菌綱菌株 *Sordariomycetes* sp. (GQ153034) 歸為同群，支持度達89%；另Ca4與Ca5菌株經比對後和基因庫中 *Neonectira* sp. (XJ243906) 歸為同群，支持度達100%；Ca6菌株與基因庫中炭角菌目菌株 *Xylariales* sp. (HQ207035.1) 及炭角菌屬菌株 *Xylaria* sp. (EU678668) 歸為同群，支持度達100%。

鄭淑芬於2012年針對64種臺灣原生蘭科植物根部内生菌進行研究，共計分離出500多株内生真菌，經形態及分子生物鑑定是以木黴菌 (*Trichoderma* spp.)、鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 及炭角菌 (*Xylaria* spp.) 等三屬真菌佔優勢。本次研究所分離純化之內生菌僅有Ca6菌株是應屬於炭角菌屬。

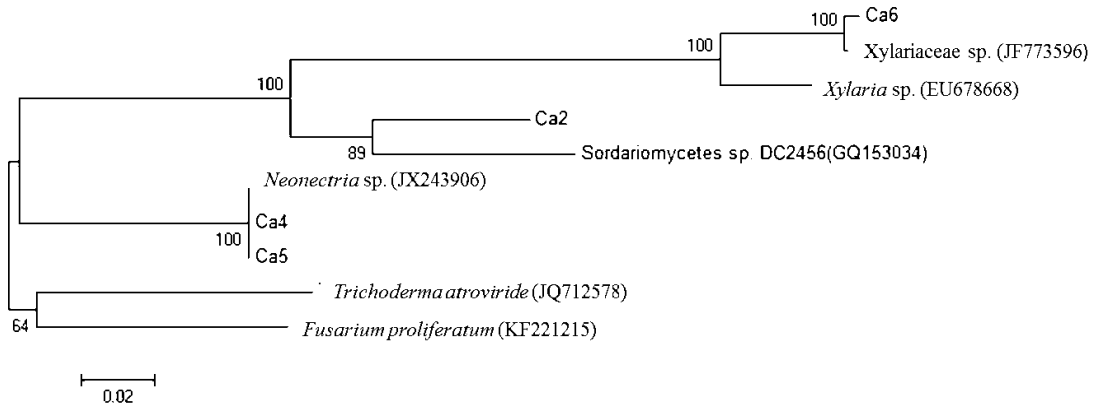


圖 4 阿里山根結蘭根系結合體之內生菌與基因庫中高相似度菌株之鄰接樹狀關係圖。

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on rDNA ITS sequence data from endophytes isolated from *Calanthe arisanensis*, along with selected high similarity fungal species from GenBank.

結論

本研究自南投縣郡大林道上所採集的阿里山根節蘭；在內生菌部分，於根菌結合體中共計誘導出 4 株內生菌，將這 4 株內生菌分別在 23°C 及不同培養基（MEA 及 PDA）等處理下培育，其生長速度分別為 Ca2 菌株（MEA: 2.6±0.1 mm/d 及 PDA: 2.4±0.1 mm/d）、Ca4 菌株（MEA: 2.6±0.1 mm/d 及 PDA: 3.1±0.1 mm/d）、Ca5 菌株（MEA: 3.0±0.1 mm/d 及 PDA: 3.1±0.1 mm/d）及 Ca6 菌株（MEA: 2.2±0.3 mm/d 及 PDA: 3.1±0.1 mm/d）；並經 ITS 分子序列比對後，內生菌 Ca2 菌株應屬於 *Sordariomyces*、Ca4 和 Ca5 菌株應屬於 *Neonectria*、Ca6 菌株應屬於 *Xylaria*。在根菌結合體形態觀察部分，利用立體顯微鏡觀察可發現，有白色菌絲覆蓋在根菌結合體上；利用掃描式電子顯微鏡觀察，在根菌結合體橫切面之皮層細胞中發現菌絲團及老化的菌絲團等構造；以上特徵皆符合蘭花菌根之特性，因此

可證實阿里山根節蘭根系結合體屬於蘭花菌根。

引用文獻

- 弓明欽、陳應龍、仲崇祿。1997。菌根研究及應用。中國林業出版社。
- 陳家全、李家維、楊瑞森。1991。生物電子顯微鏡學。國科會精儀中心編印。
- 陳效儀。2007。臺灣原生蘭科植物菌根真菌多樣性之研究。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 蔡麗君。2003。蘭菌與植物生長激素對拖鞋蘭生長發育之影響。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 鄭淑芬。2012。臺灣原生蘭科植物內生真菌之分布與其應用。國立台灣大學園藝學研究所博士論文。
- 鐘詩文、許天銓、楊智凱。2006。台灣稀有蘭科植物圖鑑。農委會林務局。

- Arditti J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33(1): 1-97.
- Berch, S. M., T. R. Allen and M. L. Berbee. 2002. Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 55-66.
- Chang, C. N. and L. C. Chou. 2007. Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by *Rhizoctonia* Orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Botanical Studies* 48: 445-451.
- Frank, A. B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Aust. J. Biol. Sei.* 20:915-926
- Hadley, G. 1982. Orchid Mycorrhiza. Pages 84-118 in Arditti, J. ed. 'Orchid Biology, Reviews and Perspectives II', Cornell University Press, Ithaca, New York, 390 pp.
- Hambleton, S. and R. S. Currah. 1997. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Canadian Journal Botany* 75(9): 1570-1581.
- Johansson, M. 2001. Fungal associations of Danish *Calluna vulgaris* roots with special reference to ericoid mycorrhiza. *Plant and Soil* 231: 225-232.
- Larcher, W. 2003. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg
- Lee, C. L., Nakagawa-Goto, K., Yu, D., Liu, Y. N., Bastow, K. F., Morris-Natschke, S. L., Chang, F. R., Wu, Y. C. and K. H. Lee. 2008. Cytotoxic calanquinone A from *Calanthe arisanensis* and its first total synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18:4275-4277.
- Link, H. F. 1840. *Icones selectae anatomico-botanicae*. II. Berlin.
- Sigler, L., Allan, T., Lim, S. R., Berch, S. and M. Berbee. 2005. Two new *Cryptosporiopsis* species from roots of ericaceous hosts in western North America. *Studies in Mycology* 53:53-62
- Su, H. J., C. S. Leou, J. J. Chen and C.Y. Hu. 2000. In : Huang, T. C. (eds.), *Orchidaceae*. Flora of Taiwan, 2nd ed. 5:729-1086. Editorial Committee, Dept. Bot., NTU, Taipei, Taiwan.
- Usuki, F. and K. Narisawa. 2005. Formation of structures resembling ericoid mycorrhizas by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* within roots of *Rhododendron obtusum* var. *kaempferi*. *Mycorrhiza* 15: 61-64.
- Wahrlich, W. 1886. Beitrag zur kenntnis der orchideen-wurzelpilze. *Botanische Zeitung* 44(28): 481-488.
- Xiao, G. and S. M. Berch. 1992. Ericoid mycorrhizal fungi of *Gaultheria shallon*. *Mycologia* 84(3): 470-471.