

阿里山地區玉山杜鵑(森氏杜鵑)根菌結合體形態及其內生菌

Morphology and endophytes of root-fungus association of *Rhododendron pseudochrysanthum* (*R. morii*) in Alishan area

林瑞進^{1,*} 張儷馨¹ 廖一光² 李志珉² 曾聰堯³

Lei-Chen Lin^{1,*}, Li-Hsin Chang¹, I-Kuang Liao², Tsu-Ming Lee² and
Tsung-Yao Tseng³

¹ 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

² 行政院農業委員會林務局嘉義林區管理處 60049 嘉義市林森西路 1 號

³ 行政院農業委員會林業試驗所 10066 台北市中正區南海路 53 號

¹ Department of Forestry and Natural Resources, National, Chiayi University, Chiayi, Taiwan

² Chiayi Forest District Office, Forest Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan, Chiayi, Taiwan

³ Taiwan Forestry Resources Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan

*通訊作者：linerm@mail.ncyu.edu.tw

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

摘 要

本研究主要在探討嘉義縣阿里山鄉阿里山森林遊樂區內的玉山杜鵑之根菌結合體特性。經試驗結果得知，在光學顯微鏡下觀察，其外觀型態為膨大短棒狀；以掃描式電子顯微鏡觀察，於根菌結合體表面可發現有稀疏菌絲覆蓋，在皮層細胞中可發現菌絲圈之顯微構造。另在內生菌部分，共計誘導分離出 5 株內生菌，經分子生物鑑定，Rm7 與 Rm28 菌株應屬於不完全菌 *Phialocephala* 屬；Rm9 菌株應屬於子囊菌 *Hyaloscyphaceae* 科；Rm15 菌株應屬於子囊菌 *Rhizoscyphus* 屬；Rm42 菌株應屬於不完全菌 *Cryptosporiopsis* 屬。綜合以上研究結果得知，阿里山地區玉山杜鵑之根菌結合體是屬於杜鵑類菌根。

Abstract

This study is an investigation of the root-fungus association characteristics of *Rhododendron pseudochrysanthum* in Alishan area. Light microscopy found the association swollen, short and stout. Under electron microscope scan, the ultrastructure showed the hyphae sparsely attached to the surface of association and the hyphal coil in its cortical cells. Molecular analysis of five strains isolated from samples demonstrated that strains Rm7 and Rm28 belong to the genus *Phialocephala*, Rm9 to Hyaloscyphaceae, Rm15 to *Rhizoscyphus*, and Rm42 to *Cryptosporiopsis*. These results indicate that the root-fungus association of *R. pseudochrysanthum* from the Alishan area belongs to the ericoid mycorrhiza.

關鍵字：內生菌、杜鵑類菌根、玉山杜鵑、菌絲圈

Key words: endophyte, ericoid mycorrhiza, *Rhododendron pseudochrysanthum*, hyphal coil

收件日期：2014 年 03 月 04 日

接受日期：2014 年 05 月 29 日

Received: March 04, 2014

Accepted: May 29, 2014

緒 言

杜鵑花科 (Ericaceae) 植物為世界著名之觀賞性顯花植物，主要分布於溫帶及亞熱帶至高山寒帶地區，全世界的杜鵑花科植物共有 70 屬 1,500 種(劉等 1994)；在台灣杜鵑花科杜鵑花屬 (*Rhododendron*) 植物中有 15 種原生種，其中 11 種為特有種，特有種比例高達 73% (曾與呂 2003)。

杜鵑類菌根 (ericoid mycorrhiza) 為內生菌根之一，其構造特徵為菌絲有隔膜 (septate)、根系結合體之皮層細胞具有菌絲複合體 (hyphal complex) 或菌絲圈 (hyphal coil) 等構造，並缺少叢枝體 (arbuscular)、菌毯 (mantle)、哈替氏網 (hartig net) 及囊狀體 (vesicular)

等構造 (弓等 1997)。菌絲圈為菌絲入侵後於皮層細胞內所形成的菌絲複合體 (Read 1996)，而判定是否為杜鵑類菌根的依據，主要是依據根系皮層細胞內是否有菌絲圈 (Peterson *et al.* 1980)。Tian *et al.* (2011) 指出，目前在杜鵑類菌根的研究仍以杜鵑科植物中的帶石楠屬 (*Calluna*) (Bradley *et al.* 1981; Johansson 2001) 及越橘屬 (*Vaccinium*) (Stribley *et al.* 1975; Martino *et al.* 2007; Villarreal-Ruiz *et al.* 2004) 植物為主；在台灣已開始進行杜鵑屬植物 (*Rhododendron*) 之研究 (Lin *et al.*, 2010)。由於杜鵑花科植物本身富含脂質 (lipid) 與酚類 (phenolic) 化合物，其枯落物 (litter) 經微生物轉化，使土壤含許多脂肪族 (aromatic) 與芳香族 (aliphatic) 之化合物 (Jalal and Read 1983)，這

些酚酸類化合物不利於植物與菌類的生長，進而抑制微生物分解土壤中有機質，因此，導致酸性的腐植質累積，土壤 pH 值偏低(Bending and Read 1996)。而此種土壤性質極酸及養分貧瘠的生育地特稱為石南原(heathland)，由於杜鵑花科植物能與菌根菌共生形成杜鵑類菌根，因此能在石南原生育地中形成優勢族群(Cairney and Meharg 2003; Rowe *et al.* 2008)。並已證實杜鵑類菌根對此生育地之有機質具分解的能力(Piercey *et al.* 2002; Lin *et al.* 2011)，是由於此類杜鵑類菌根菌能分泌兩種酵素，包括能分泌將木質素(lignin)、多酚類(polyphenols)和丹寧(tannic acid)等有機物分解的漆氧化酵素(laccase)及過氧化酵素(peroxidase)等(Bending and Read 1996; 1997; Lin *et al.* 2011)，可保護或加速必要養分之溶解；另一種是直接促進獲得所需之養分，如胞外酸性蛋白酶(extracellular acid protease)等(Bending and Read 1996)；故杜鵑類菌根具有幫助分解不易分解的有機物，並從中獲取其他植物無法利用的養分(Read 1996; Read and Perez-Moreno 2003)。

玉山杜鵑 (*Rhododendron pseudochrysanthum* Hayata) 係屬杜鵑花科杜鵑花屬植物，葉(厚)革質，特產台灣高山(劉等 1994; Li *et al.* 1998)。目前，已有學者針對 10 種台灣本土杜鵑之葉部進行化合物萃取，並證實玉山杜鵑之葉部甲醇粗萃物具有最佳的抗氧化能力(林等 2011)；但玉山杜鵑在杜鵑類菌根的研究上，仍有探討研究的空間。

本研究以採集自阿里山森林遊樂區之玉山杜鵑為材料，觀察根菌結合體之外觀形態與微細構造，探討其根菌結合體是否具有杜鵑類菌根之構造特徵；並從根菌結合體中分離純化共生於其中的內生菌，觀察其菌株形態與內生菌多樣性。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗材料採集自嘉義縣阿里山鄉阿里山森林遊樂區內之玉山杜鵑林(東經 120°48'3"，北緯 23°31'10")，海拔高為 2,189 m；於春季逢機採取玉山杜鵑根菌結合體。

二、玉山杜鵑根菌結合體形態觀察

(一) 外部形態觀察

將自野外採集之玉山杜鵑根系樣本攜回實驗室後，使用流動自來水清洗 3 min 去除土壤，再置入超音波震盪機清除附著物，瀝除多餘的水分後，使用立體顯微鏡觀察根菌結合體之外部形態並拍照記錄(Usuki and Narisawa 2005)。

(二) 顯微構造觀察

將清洗後的根系樣本，用刀片切取成 1 mm 根段，浸泡於 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 固定液中，於室溫下固定 1 天。以 0.1 M 磷酸緩衝溶液沖洗 3 次後，進行脫水步驟：依序以 10、20、30、50、70、80、90 和 95% 乙醇 (ethanol) 各脫水 3 次，最後以 100% 乙醇及丙酮 (acetone) 各脫水 6 次，每次 10 min。經序列脫水後，於臨界點乾燥機 (critical point dryer, CPD) 以液態二氧化碳進行臨界點置換乾燥處理，再將乾燥之樣本以雙面膠固定於鋁座 (stub) 上，以離子覆膜機 (ion coater)，鍍金 90 sec，最後以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 觀察其微細構造，並照相紀錄 (Nakamura *et al.* 2002)。

三、內生菌之分離與純化

取玉山杜鵑根系以清水洗淨後，挑選腫大根段，使用 30% H₂O₂ 溶液進行表面殺菌 30 -

60 sec，再用無菌水清洗 3 次。將清洗後的根段切成約 1 mm 片段，置於 1% 水洋菜培養基 (water agar) 中，於 23°C 黑暗生長箱中倒置培養 14 - 21 天。待菌絲從根段邊緣長出，挑取菌絲移入 1% MEA (malt extract agar) 培養基進行純化 (Johansson 2001)。

四、菌落形態及生長率觀察

將純化之菌株採取菌塊，移入 2% MEA 培養基上，置於培養基之表面中心，於背面以菌塊為中心定出 X、Y 軸。倒置培養於 23°C 黑暗生長箱中，定時觀察菌株生長狀況，在 7-14 天後，測量菌落直徑並計算平均生長速率，並觀察菌落形態拍照及記錄之 (Hambleton and Currah 1997)。

五、菌種 DNA 鑑定

此試驗方法改良 Sigler *et al.* (2005) 發表之方法。將培養於 PDA 培養基之菌塊，利用 Puregene DNA Purification Kit 進行菌株之

DNA 萃取。利用引子：ITS1-F 和 TW13 進行 ITS/5.8S rDNA 序列之聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增 DNA 序列，再將純化之 PCR 產物定序，與 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的基因資料庫進行序列比對，最後使用 MEGA 軟體繪製親緣關係樹狀圖。

結果與討論

一、玉山杜鵑根菌結合體之形態

(一) 外部形態觀察

本研究利用立體顯微鏡觀察玉山杜鵑根菌結合體之外觀形態及顏色等特徵。結果顯示，根菌結合體多呈膨大棒狀，依顏色可區分出 4 種差異：分別初生型為黃白色 (圖 1A and B)、中期為紅黃色 (圖 1C)、後期為深褐色 (圖 1D)。與台灣杜鵑之根菌結合體形態有顯著差異 (Lin *et al.* 2010)。



圖 1. 玉山杜鵑根菌結合體之形態。(A)、(B) 初期；(C) 中期；(D) 後期。(Bar= 1mm)

Fig. 1. Morphology of root-fungus association of *Rhododendron pseudochrysanthum*. A and B: the initial stage; C: the middle stage; D: the mature stage.

(二) 顯微構造觀察

本研究利用掃描式電子顯微鏡觀察，可發現玉山杜鵑之根菌結合體之表面有稀疏的菌絲覆蓋 (圖 2A)；在橫切面觀察中 (圖 2B)，無發現菌毯及哈替氏網等外生菌根特徵，僅於皮層細胞內發現有菌絲圈的構造 (圖 2C and

D)。

以上結果符合杜鵑類菌根特徵(弓等 1997; Peterson *et al.* 1980)；並與台灣杜鵑之根菌結合體相似(Lin *et al.* 2010)，於顯微構造顯微觀察中都可發現菌絲圈的構造。

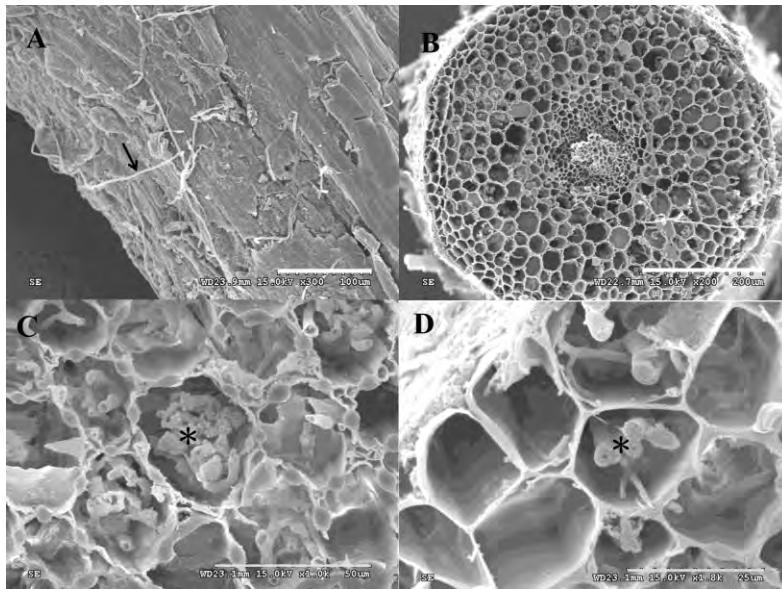


圖 2. 玉山杜鵑根菌結合體之顯微構造。A: 表面有稀疏菌絲覆蓋(箭)；B: 橫切面；C、D: 菌絲圈(*)

Fig. 2. Ultrastructure of root-fungus association of *Rhododendron pseudochrysanthum*. A: surface of hairy root covered with hyphae (arrow); B: cross-section; C and D: hyphal coil (*).

二、菌落生長及形態觀察

本試驗從阿里山地區玉山杜鵑之根菌結合體中共分離出 42 株內生菌，依據杜鵑類菌根菌篩選標準(Curlevski *et al.* 2009; Tian *et al.* 2011)，去除生長快速的菌株，保留生長緩慢的菌株，結果共計保留 5 株內生菌，分別為：Rm7、Rm9、Rm15、Rm28 和 Rm42，分別培養於 2% MEA 培養基，並於 11 天後計算其各株菌株之平均生長速率：

Rm7 菌株在 2% MEA 培養基培養時，其

菌落顏色為深橄欖綠色，最外圈白色，菌落平鋪於培養基表面，上方密布白色的菌絲 (圖 3A)；無代謝物產生；其平均生長速度為 0.77 ± 0.06 mm/d。

Rm9 菌株在 2% MEA 培養基培養時，其菌落顏色為淡橄欖綠色，最外圈為白色，上方有稀疏的白色氣生菌絲及滴狀物 (圖 3B)；無代謝物產生；其平均生長速度為 1.08 ± 0.03 mm/d。

Rm15 菌株在 2% MEA 培養基培養時，

其菌落顏色為白色，並有橄欖綠色不均勻分布(圖 3C)；無代謝物產生；其平均生長速度為 1.07 ± 0.02 mm/d。

Rm28 菌株在 2% MEA 培養基培養時，其菌落顏色為深橄欖綠色，最外圈為白色，平鋪於培養基表面，上方覆蓋有白色的菌絲(圖

3D)；無代謝物產生；其平均生長速度為 0.64 ± 0.04 mm/d。

Rm42 菌株在 2% MEA 培養基培養時，其菌落顏色白色近似透明，菌絲平鋪於培養基表面(圖 3E)；無代謝物產生；其平均生長速度為 2.07 ± 0.06 mm/d。

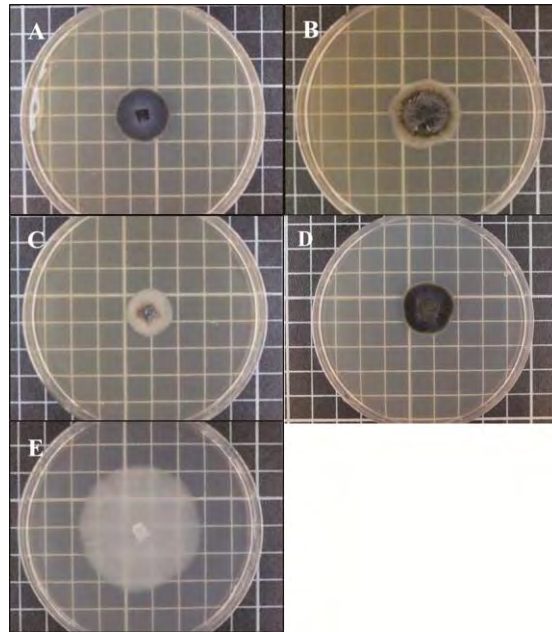


圖 3. 玉山杜鵑內生菌培養 18 天後，在 23°C 及 2%MEA 培養基之菌落形態。(A) Rm7 菌株；(B) Rm9 菌株；(C) Rm15 菌株；(D) Rm28 菌株；(E) Rm42 菌株。

Fig. 3. Colony morphology of endophytes from *Rhododendron pseudochrysanthum* cultured on 2%MEA medium and 23°C for 18 days. A: Rm7 strain; B: Rm9 strain; C: Rm15 strain; D: Rm28 strain; E: Rm42 strain.

三、菌株分子生物之鑑定

本研究自玉山杜鵑之根菌結合體所分離之內生菌，利用 ITS1-F 和 TW13 引子對，分析菌株內轉錄區間與 5.8S rDNA 基因，經 PCR 放大產物後，委託生技公司定序，再將定序後菌株之分子序列與 NCBI 網站親緣關係最近的菌株分子序列進行比對；一般從杜鵑類菌根中

所誘導及純化的內生菌都是子囊菌門 (Ascomycota) (Harley and Harley 1987; Smith and Read 2008)，所以本試驗以擔子菌美味牛肝菌 (*Boletus edulis* Bull.) 為外群，並將相近著名杜鵑類菌根菌 (*Rhizoscyphus ericae* (D. J. Read) W. T. Zhuang & Korf, *Cryptosporiopsis ericae* Sigler, *Phialocephala fortinii* C. J. K. Wang & H.

E. Wilcox, *Oidiodendron maius* G. L. Barron)等菌株分生資料繪製鄰接親緣樹狀圖(Neighbor-joining phylogenetic tree)。

本試驗共計分離純化出 5 株菌株，其 ITS 分子序列與 NCBI 相近菌株所繪製之鄰接親緣樹狀圖(圖 4)。其結果將 Rm7 與 Rm28 菌株歸為同群，這 2 株菌株亦與 *P. fortinii* (AY394921) 歸為同群，其支持度高達 100%(相

似度亦高達 100%)；而 Rm15 菌株與 *R. ericae* (AY394907)歸為同群，其支持度高達 99%(相似度亦達 97%)；Rm9 菌株與 Hyaloscyphaceae (晶杯菌科) (JF519071) 歸為同群，其支持度達 74%(相似度 94%)；Rm42 菌株與 *C. ericae* (AY853167) 歸為同群，其支持度高達 100%(相似度亦高達 99%)。

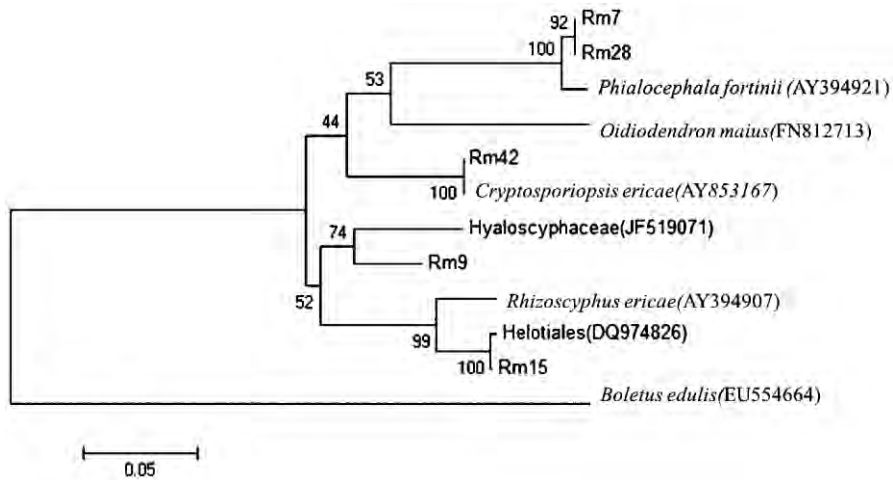


圖4. 玉山杜鵑內生菌與基因庫高相似度著名杜鵑類菌根菌之鄰接樹狀關係圖。

Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on rDNA ITS sequence data from endophytes of *Rhododendron pseudochrysanthum*, along with well-known ericoid mycorrhizal fungi and selected high similarity fungal species from GenBank.

結 論

本研究自阿里山地區採集的玉山杜鵑根菌結合體之樣本，其葉部甲醇粗萃物已被證實具有最佳的抗氧化能力(林等 2011)；而其根菌結合體部分，經試驗觀察形態、內生菌誘導與純化、菌株之菌落形態以及菌株分子生物鑑定相關試驗，其結論如下：

一、菌根形態，於立體顯微鏡下觀察外觀特

徵，玉山杜鵑之根菌結合體形態，呈膨大棒狀；另利用掃描式電子顯微鏡觀察，在根菌結合體之皮層細胞內可發現菌絲圈之杜鵑類菌根特殊構造，由此可證實阿里山地區玉山杜鵑的根菌結合體是杜鵑類菌根。

二、內生菌部分，共計分離出 5 株菌株，分別為 Rm7、Rm9、Rm15、Rm28 及 Rm42 等；經 ITS 分子生物技術鑑定結果，Rm7

與 Rm28 菌株之序列應同屬於不完全菌 *Phialocephala* 屬、Rm9 菌株應屬於子囊菌晶杯菌科 (Hyaloscyphaceae)、Rm15 菌株應屬於子囊菌 *Rhizoscyphus* 屬；Rm42 菌株應屬於不完全菌 *Cryptosporiopsis* 屬；在分離之 5 株內生菌中，利用分子生物技術鑑定，其中就有 4 株菌株與著名杜鵑類菌根菌歸為同群，因此利用此試驗所分離之菌株來進行後續合成試驗，以確認這些內生菌是否為杜鵑類菌根菌，是值得更深入探討的議題。

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。
- 林奕均、何尚哲、林瑞進、吳志鴻。2011。台灣本土杜鵑葉部抽出物抗氧化活性初探。建國百年森林資源永續經營研討會論文集。
- 曾彥學、呂勝由。2003。台灣野生杜鵑花資源介紹。自然保育季刊 43:18-30。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄。1994。台灣樹木誌。國立中興大學農學院出版委員會。
- Bending, G. D. and D. J. Read. 1996. Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 28:1595-1602.
- Bending, G. D. and D. J. Read. 1997. Lignin and soluble-phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 101: 1348-1354.
- Bradley, R., A. J. Burt and D. J. Read. 1981. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292:335-337.
- Cairney, J. W. G. and A. A. Meharg. 2003. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *Eur. J. Soil Sci.* 54:735-740.
- Curlevski, N. J. A., S. M. Chambers, I. C. Anderson and J. W. G. Cairney. 2009. Identical genotypes of an ericoid mycorrhiza-forming fungus occur in roots of *Epacris pulchella* (Ericaceae) and *Leptospermum polygalifolium* (Myrtaceae) in an Australian sclerophyll forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:411-420.
- Hambleton, S. and R. S. Currah. 1997. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Can. J. Bot.* 75(9):1570-1581.
- Harley, J. L. and E. L. Harley. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 1105:1-102.
- Jalal, M. A. F. and D. J. Read. 1983. The organic acid composition of *Calluna* heathland soil with special reference to phyto-toxicity and fungitoxicity II. Monthly quantitative determination of the organic acid content of *Calluna* and spruce dominated soils. *Plant and Soil* 70:273-286.
- Johansson, M. 2001. Fungal associations of Danish *Calluna vulgaris* roots with special reference to ericoid mycorrhiza. *Plant and Soil* 231:225-232.
- Li, H. L., S. Y. Lu, Y. P. Yang and Y. H. Tseng. 1998. Ericaceae. In Huang et al. (ed) *Flora of Taiwan*, 2nd ed. 4:17-39. Editorial

- Committee, Dept. Bot., NTU, Taipei, Taiwan.
- Lin, L. C., M. J. Lee and Y. Z. Wang. 2010. Morphology and Ultrastructure of Root-Fungus Association of *Rhododendron formosanum* Hemsl. in Sanlinchi Forest of Central Taiwan. *Taiwan Journal of Biodiversity* 12(2): 225-233.
- Lin, L. C., M. J. Lee and J. L. Chen. 2011. Decomposition of organic matter by the ericoid mycorrhizal endophytes of Formosan rhododendron (*Rhododendron formosanum* Hemsl.) *Mycorrhiza* 21: 331-339.
- Martino, E., C. Murat, M. Vallino, A. Bena, S. Perotto and P. Spanu. 2007. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. *Curr. Genet.* 52:65-75.
- Nakamura, H., K. I. Ikeda, M. Arakawa and N. Matsumoto. 2002. Conidioma production of the white root rot fungus in axenic culture under near-ultraviolet light radiation. *Mycoscience* 43:251-254.
- Peterson, T. A., W. C. Mueller and L. Englander. 1980. Anatomy and ultrastructure of a *Rhododendron* root-fungus association. *Can. J. Bot.* 58: 2421-2433.
- Piercey, M. M., M. N. Thormann and R. S. Currah. 2002. Saprobic characteristics of three fungal taxa from ericalean roots and their association with the roots of *Rhododendron groenlandicum* and *Picea mariana* in culture. *Mycorrhiza* 12:175-180.
- Read, A.J. 1996. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Ann. Botany* 77:365-374.
- Read, D. J. and J. Perez-Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems- a journey towards relevance? *New Phytol.* 157:475-492.
- Rowe, E. C., S. M. Smart, V. H. Kennedy, B. A. Emmett and C. D. Evans. 2008. Nitrogen deposition increases the acquisition of phosphorus and potassium by heather *Calluna vulgaris*. *Environ. Pollut.* 155:201-207.
- Sigler, L., T. Allan, S. R. Lim, S. Berch and M. Berbee. 2005. Two new *Cryptosporiopsis* species from roots of ericaceous hosts in western North America. *Studies in mycology* 53:53-62.
- Smith, S. E. and D.J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. London: Academic Press.
- Stribley, D. P., D. J. Read and R. Hunt. 1975. The biology of mycorrhizas in the Ericaceae V. The effects of mycorrhizal infection, soil type and partial soil sterilization (by gamma irradiation) on growth of cranberry, *Vaccinium macrocarpon* ait.). *New Phytologist* 75:119-130.
- Tian, W., C. Q. Zhang, P. Qiao and R. Milne. 2011. Diversity of culturable ericoid mycorrhizal fungi of *Rhododendron decorum* in Yunnan, China. *Mycologia* 103(4):703-709.
- Usuki, F. and K. Narisawa. 2005. Formation of structures resembling ericoid mycorrhizas by the root entophytic fungus *Heteroconium chaetospora* within roots of *Rhododendron*

obtusum var. *Kaempferi*. *Mycorrhiza*
15:61-64.

Villarreal-Ruiz L., I. C. Anderson and I. J.
Alexander. 2004. Interaction between an
isolate from the *Hymenoscyphus ericae*
aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*.
New Phytologist 164:183-192.