

褐根病菌與樹木根部微生物的角力！

劉則言^{1,2}、鍾嘉綾^{2*}、何攬寧³、陳昭翰¹、蔡怡陞⁴、楊玉良⁵

序言

樹木褐根病(Brown root rot disease)由褐根病菌(*Phellinus noxius*)所引起，該病原菌主要分布在熱帶、亞熱帶地區，寄主範圍廣泛，可危害的植物超過200多種，嚴重威脅臺灣、日本琉球群島、美屬西太平洋群島等地的森林和樹木。國內都市林常見的樹種如榕樹、樟樹、鳳凰木等，亦飽受褐根病危害，被認為是國內最嚴重的樹木病害之一。褐根病菌主要危害樹木的根基部，影響水分的吸收和運輸，導致樹木地上部呈現缺水萎凋的病徵，嚴重時全株枯萎死亡。當樹木遭受褐根病菌危害時，被感染的木材組織會開始劣化腐朽，逐漸失去支撐樹體的能力，嚴重時導致樹木傾倒。因褐根病菌屬於「木材白腐朽真菌」，具備木材腐朽能力，故除了植物病原菌的角色外，其在陸域生態系中還扮演著木材的分解者，使積存於樹木體內的碳元素得以被循環利用，同時也是森林演替的重要推手。

從褐根病菌到植物微生物族群

過去對於樹木褐根病的研究，多集中於褐根病菌的地理分布、病原性、寄主範圍、防治方法等，偏重於從病原菌的角度出發，探討

其對寄主植物所造成的影響。有別於過去的研究，我們從中性的角度出發，也就是不將褐根病菌局限於病原菌的角色，而將其視為存在於特定棲位(niche)的一個生物因子，探索褐根病菌與該棲位中其他植物微生物族群(plant microbiota)的相互關係，以此評估褐根病菌在自然生態中的角色。植物微生物族群涵蓋所有與植物相關的微生物，包含真菌、細菌、古細菌、病毒等，這些微生物形成的集合體，可存在於特定和植物體相關的棲位(如植物的組織、表面或是種植環境)中，並與植物產生不同面向的交互關係，如共生或寄生等，在植物的生長過程、環境適應及抗病性等方面扮演重要角色(圖1)。近年來隨著核酸定序技術和生物資訊的快速發展，使我們有機會將環境中

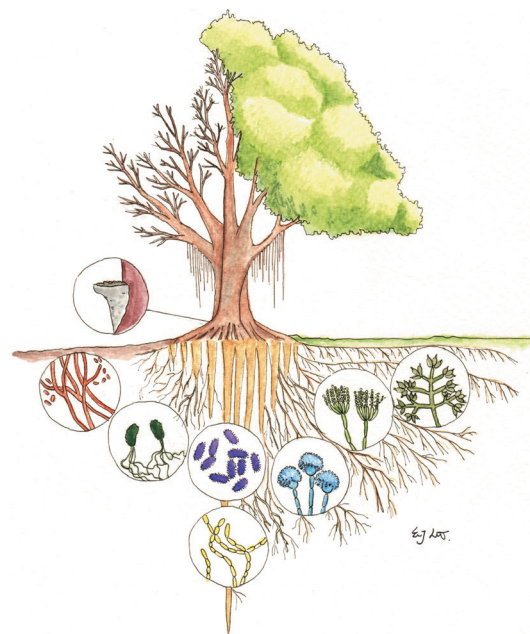


圖1 微生物族群對樹木生長及健康的影響(李怡潔 繪)

¹ 林業試驗所·森林保護組

² 臺灣大學植物病理與微生物學系

³ 海洋大學海洋生物研究所

⁴ 中央研究院生物多樣性中心

⁵ 中央研究院農業生物科技研究中心

* 通訊作者(clichung@ntu.edu.tw)

或植物內的微生物核酸進行大量定序，了解微生物群體存在情形，再經由分析褐根病菌與樹木根部其他微生物族群的互動關係，來探討褐根病菌在特定棲位中的生態角色。

我們以國內都市林常見的行道樹「榕樹」為研究對象，分別採取健康與感染褐根病的樹木根部樣本，再將根部樣本分為環境土、根圈土和根部組織，分別為微生物在樹木根部的三種不同棲位，以次世代定序(next generation sequencing, NGS)技術，對樣本中的真菌轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)和細菌16S核糖體RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)核酸進行定序，分析各樣本中存在的所有真菌和細菌、微生物多樣性、微生物組成結構和顯著存在的微生物類群等。最後藉由比較健康與感病樣本中微生物族群的差異，評估褐根病菌存在下，造成樹木根部各棲位微生物族群的變動情形。此外，我們更進一步透過根部環境微生物的分離培養，得到純培養的微生物菌株，用以驗證褐根病菌與榕樹根部其他微生物的關係(圖2)。

褐根病菌對樹木根部真菌族群的影響

經由比較健康和感染褐根病的榕樹樣本可發現，環境土、根圈土和根部組織在褐根病菌存在的情況下，真菌的物種多樣性會顯著降低(圖3)。非度量多維度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)，也反映出在褐根病菌存在的情況下，無論是何種根部棲位，真菌的組成均明顯有別於健康樣本(圖4)，顯示褐根病菌的存在，明顯破壞了樹木根部的真菌族群平衡。

進一步探索健康與感病榕樹地下部的真

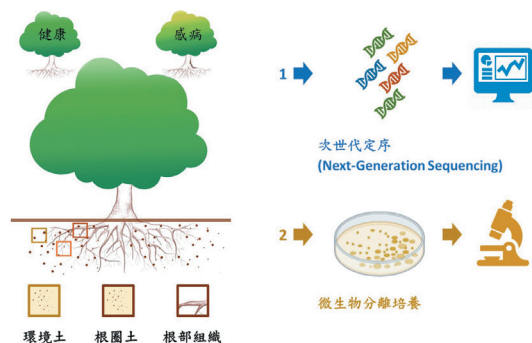


圖2 分別採取健康與罹病榕樹的環境土、根圈土與根部組織進行微生物族群分析(劉則言 繪)

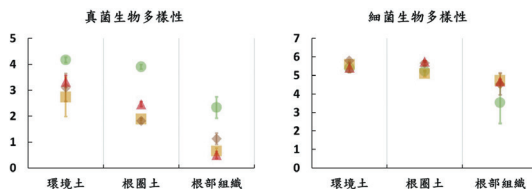


圖3 以Shannon生物多樣性指數評估褐根病菌對樹木地下各生態棲位真菌及細菌生物多樣性的影響，數值越大表示生物多樣性越高。(劉則言 繪)

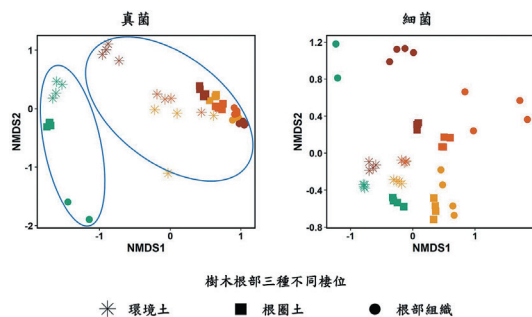


圖4 褐根病菌造成樹木根部各棲位真菌和細菌組成結構的改變。(劉則言 繪)

菌族群，以占比較高的真菌，如褐根病菌、麴菌(*Aspergillus*)、鐮孢菌(*Fusarium*)、傘菌綱(Agaricomycetes)、座囊菌綱(Dothideomycetes)、糞殼菌綱(Sordariomycetes)和毛霉菌目(Mucorales)等真菌類群進行討論，發現健康樣

本中的真菌種類較多，特別是傘菌綱、座囊菌綱和毛霉菌目等真菌所占比例較感病樣本高(圖5)。在感病樣本中，褐根病菌為最顯著的真菌族群，此外，囊殼菌綱*Cosmospora*屬的真菌占比亦顯著高於健康樣本。根據此類真菌與褐根病菌同時存在的現象，我們大膽推測，褐根病菌除了和其他真菌具有生存上的競爭外，亦有可能為某些真菌創造適合生存的環境，讓其他真菌得以存活。為了驗證這個假設，我們以木質素培養基分別培養褐根病菌和*Cosmospora*屬真菌的分離株，發現在較高濃度的木質培養基上，褐根病菌仍能夠維持正常的生長速度和菌落型態，但*Cosmospora*的菌落生長則受到抑制，顯示高濃度木質素的環境(例如木材組織)並不利於某些真菌的生長，而褐根病菌在分解寄主樹木木質素的同時，也提供其他真菌較為合適的生長條件。

褐根病菌對樹木根部細菌族群的影響

有別於褐根病菌的存在明顯影響到榕樹地下部的真菌族群，褐根病菌的存在與否，對榕樹地下部的細菌多樣性沒有造成明顯的影響(圖3)。樹木地下部各棲位的細菌組成，在健康與感病樣本間雖有差異，但不同的棲位對細菌造成的影響會更為明顯(圖4)。以占比較高的榕樹地下部細菌類群，如芽孢桿菌(*Bacillus*)、黃桿菌(*Flavobacterium*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas*)、鏈黴菌(*Streptomyces*)、放線菌(*Actinobacteria*)、 α -變形菌(*Alphaproteobacteria*)和硝化螺菌(*Nitrospira*)等來進行討論，發現褐根病菌的存在，仍會造成樹木根部細菌組成結構的差異。特別的是芽孢桿菌和鏈黴菌在健康與感病樣本中，都存在一定的

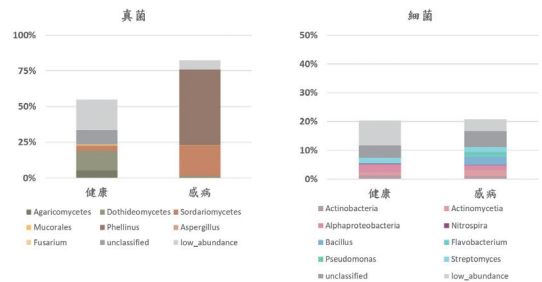


圖5 健康與感病榕樹根部各棲位中有差異的微生物族群，百分比表示該類真菌或細菌佔樣本中整體微生物族群的比例。(劉則言 繪)

含量，但卻對應到不同的細菌代表性序列，顯示這兩屬細菌在樹木健康和感病兩種不同的情況下，會發生族群結構上的變化，以不同的種類存在於健康或感病樣本中，並可能提供寄主樹木不同的功能。此外，感病樣本中的黃桿菌和綠膿桿菌，明顯高於健康樣本；健康樣本中 α -變形菌則有較多含量。上述細菌在先前的研究中，部分已被證實與植物的抗病或抗逆境有關，因此，樹木在受到褐根病菌感染後，是否會透過改變根部細菌族群來強化自身的抵抗能力，值得進一步的探討(圖5)。

褐根病菌與其他微生物的潛在交互關係

在微生物與寄主植物的互動過程中，植物的根系會分泌物質來吸引有對自身有益的微生物族群，這些微生物可提供植物生長所需的幫助，有些更可以提高植物抵抗植物病原菌的能力。以次世代定序分析褐根病菌與樹木根部微生物族群彼此的關聯時，發現多數真菌與褐根病菌呈現負相關(圖6)，顯示褐根病菌與根部真菌族群，可能存在著彼此生存上的競爭關係，特別是其中的麴菌和青黴菌(*Penicillium*)。我們也經由環境土、根圈土和根部組織的微生物

物分離培養，取得這兩屬真菌的分離株，並透過與褐根病菌的對峙培養，驗證此兩屬真菌對褐根病菌具有生長抑制的能力(圖7)。

與真菌不同的是，我們發現部分有益細菌，如芽孢桿菌和鏈黴菌會與褐根病菌呈現正相關，此現象是否與樹木在遭受褐根病菌威脅時，會經由根部菌相的改變，吸引對自身有益的微生物來抵抗病原菌危害，仍有待未來進一步的探索。從細菌的分離培養，以及與褐根病菌的對峙實驗，我們也發現，實驗中分離到的部分芽孢桿菌和綠膿桿菌分離株，具有抑制褐根病菌生長的能力。由於部分芽孢桿菌屬細菌已廣泛應用於多種植物病害的生物防治，或開發為生物性堆肥，被視為具有商品化潛力的有益微生物類群，故本次研究所分離到的菌株，將可視為未來發展褐根病菌生物防治製劑的候選菌株，應用於預防樹木褐根病的發生或傳染(圖7)。

結語

本研究從都市常見行道樹榕樹根部三個不同的棲位出發，探討環境土、根圈土和根部組織中的微生物族群，在褐根病菌存在的情況下會產生怎樣的變化，發現當褐根病危害都市樹木時，褐根病菌會成為樹木根部各棲位中，最具優勢的真菌族群，並導致環境土、根圈土和根部組織樣本中的真菌生物多樣性顯著降低，但對於細菌生物多樣性的影響卻不顯著。此外，褐根病菌的存在，會改變樹木根部各棲位原有的真菌和細菌族群結構，顯示褐根病菌會影響原棲位中的微生物族群平衡。最後，我們也探討了都市裡榕樹立地環境中，與褐根病菌呈現正相關或負相關的細菌和真菌

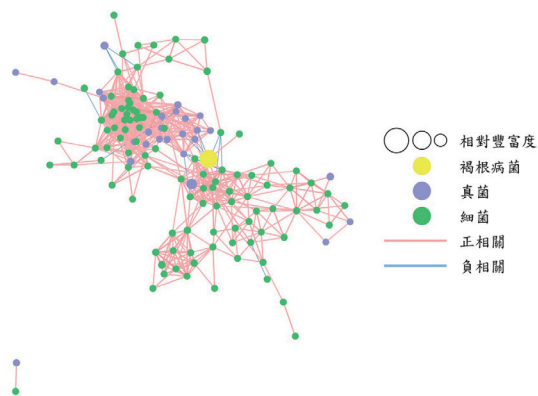


圖6 褐根病菌與其他榕樹根部微生物族群的關聯性分析。(劉則言 繪)

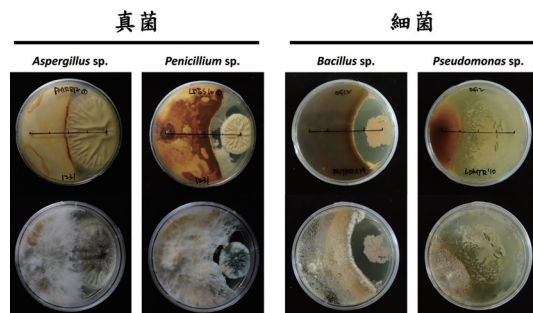


圖7 以對峙培養方式在馬鈴薯培養基上，驗證對褐根病菌具拮抗作用的微生物類群。(劉則言 攝)

類群，並經由對峙培養驗證褐根病菌與其他微生物間的交互關係；發現都市林環境中，仍自然存在著對褐根病菌具有拮抗能力的微生物，這些都可視為都市土壤環境中潛在的生物防治菌種。有趣的是，我們以 *Cosmospora* 屬真菌為模式，初步證實了褐根病菌不僅和其他真菌具有生存上的競爭關係；反之，透過其木材腐朽能力分解木質素之後，也可為其他微生物提供合適的生長環境，這也和褐根病菌在自然生態系中的分解者角色相互呼應。經由對都市樹木根部微生物族群的分析，拓展了我們對於褐根病菌的知識疆域，有助於我們更全面了解褐根病菌在自然生態中所扮演的角色。(參考文獻請逕洽作者) (▲)