

砂床培育帶菌根杉木苗之研究 —優良菌種之篩選與繁殖(一)

鍾旭和 顏江河 簡光文

摘 要

本報告對杉木共生之優良菌根菌種進行篩選與繁殖研究。供試土樣採自本所蓮華池分所杉木林根域及苗圃地，研究結果顯示蓮華池地區自杉木根域分離出之VA菌根菌種計有 *Suctellospora nigra*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus mosseae*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. tortuosum*, *Acaulospora laevis*, *Sclerocystis sinuosa* 及其他四種尚未鑑定之 *Glomus* spp. 和一種 *Acaulospora* spp.。上述十二種菌根菌經純培養繁殖，僅 *A. laevis* 和 *Gl. mosseae* 可獲得大量孢子。盆栽試驗顯示此二種菌種均能有效地促進杉木苗之生長。而另外選自其他地區用以比較菌種有效性之 *A. laevis* 及 *Gi. margarita* 則效應較低或幾不具有效性。

關鍵字：VA菌根、杉木、砂床

鍾旭和、顏江河、簡光文。1991。砂床培育帶菌根杉木苗之研究—優良菌種之篩選與繁殖(一)。林業試驗所研究報告季刊 6(2):147-154, 1991

Cultivation of China Fir (*Cunninghamia lanceolata*) Mycorrhizal Seedlings in Sandy Nursery. — Select and Propagate the Effective Mycorrhizal Fungi. (I)

Hsu-ho Chung, Chinang-her Yen and Kuang-wen Chien

[Summary]

The purposes of this study were: (1) to survey the VA mycorrhizal fungi (VAMF) occurring in China Fir (*Cunninghamia lanceolata*) stands; and (2) to select and propagate the most effective mycorrhizal fungi which could form mycorrhizal association with China Fir.

Soil samples collected from the plantation and/or nurseries of China fir of Lien-Hua-Chin Branch Station, Taiwan Forestry Research Institute, were processed by wet sieving and decanting methods. Seven VAMF, namely, *Scutellospora nigra*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus mosseae*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. tortuosum*, *Acaulospora laevis*, *Sclerocystis sinuosa* along with 4 *Glomus* spp. and 1 *Acaulospora* spp. were noticed. These mycorrhizal fungi species were then propagated by sand culture in greenhouse. The results showed that only *Acaulospora laevis* and *Glomus mosseae* could produce mass spores from this culture.

1990年 8月送審

1991年 1月送審

Potting growth experiment were conducted to compare the effectiveness of these two fungi in improving the performance of China Fir seedlings. Two other mycorrhizal fungi, *Gl. margarita* and *A. laevis*, selected from Ro-Ton and Young-Ming Mountain, respectively, were also included in this experiment. The results indicated that *Gl. mosseae* and *A. laevis*, both from Lien-Hua-Chih, were most effective; whereas *A. laevis* from Young-Ming mountain and *Gl. margarita* from Ro-Ton were less effective in improving the performance of China Fir.

Key Words: VA mycorrhizae, Sand nursery, *Cunninghamia lanceolata*

Chung Hsu-ho, Chiang-her Yen and Kuang-wen Chien. 1991. Cultivation of China Fir (*Cunninghamia lanceolata*) Mycorrhizal Seedlings in Sandy Nursery. — Select and Propagate the Effective Mycorrhizal Fungi (I). Bull. Taiwan For. Res. Inst. New Series. 6(2)147-154,1991

一、緒 言

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)為本省中海拔重要造林樹種，造林面積極廣。惟各苗圃每年所培育之杉木苗常遭土壤病蟲為害，成苗率極低致不敷造林所需。據日人之研究顯示砂床育苗具有省工、低成本、管理方便及苗床無病蟲害等優點，且育成之苗木生長均勻、鬚根旺盛、成苗率高，造林容易(野上等1967；楠原，野上1968；野上，楠原1968)。有鑑於此，林試所乃於民國69年於蓮華池分所開始以砂床育苗法進行育苗，結果成苗率高達90%以上，惟其高生長則不若土床幼苗，雖經施肥處理，苗木仍呈生長遲滯現象(民國71年林試所蓮花池分所造林督導會報)。後經多次檢視，發現砂床苗之根系均無囊叢枝菌根(Vesicular-arbuscular mycorrhizae，簡稱VAM)之感染。由於苗圃作業在整個育林作業上所佔之成本費用頗高。因此，即使砂床作業具有高成苗率及低育苗費之優點，但若由於砂床苗缺乏VAM，以致苗木生長遲緩而須延長育苗期並增加育苗費用，其結果終將使育林成本大幅提高。因此，在砂床育苗系統中導入VAM接種措施確有其必要性。

VAM已經證實確能經由(1)增加宿主植物對磷、銅、鋅等不易移動養分(immobile nutrient)之吸收；(2)減少宿主植物根部病蟲害(如線蟲及*Fusarium* spp.)；(3)提高宿主植物對乾旱的抵抗力；(4)影響宿主植物其它的生理效應(如提高植物的生長激素活性及生長激素含量等)(Abbott & Robson, 1984; Bagyaraj, 1984)等直接或間接效應而促成宿主植物的生長。因此，砂床苗生長遲緩之現象極可能與此種苗木缺乏VAM有關。此一

推論是否屬實，有待接種實驗予以證明。因此本試驗研究中擬先就與杉木共生之VAM菌根菌(Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi；簡稱VAMF)，進行調查及接種源之大量繁殖試驗，並進而篩選菌根效應顯著，適應性優良之菌種，以供後續試驗中以砂床系統培育帶菌根杉木苗接種之用。

二、材料與方法

本試驗為獲得優良杉木VA菌根菌種，分下述三步驟進行：

(一)調查杉木林內及杉木苗圃中固有之菌根菌種

先將自林試所蓮華池分所杉木林根域及后崙苗圃所採得的土樣依濕篩傾倒法(Gerdeman & Nicolson 1963)處理，次將殘留在425~63 μm銅網篩上之碎屑與孢子混合物加於50%之蔗糖液上，用300rpm之速度離心3分鐘。離心所得之懸浮液用吸管取出，放置在63 μm銅網篩上，以自來水沖洗並收集在燒杯中，最後將收集液置於立體顯微鏡下逐一挑出各種類之孢子，並依其形態特徵作種類鑑定(Hall & Fish, 1979；Trappe, 1982)。

(二)接種用孢子的純種培養

於溫室中以砂為培養介質，將上述(一)項中分離所得之菌根孢子分別依下列方法進行孢子繁殖試驗：(1)鉢植培養法(pot culture)：用經水篩洗同時殺菌過之矽砂(>150 μm,<250 μm)為培養介質，將菌種孢子分別接種於剛發芽之玉米及台灣杉根部下方，每株接種50顆孢子，每盆(直徑14cm，高10cm)栽植一株，每星期添加1/4強度的Hogland's solution 20 ml，每一處理重覆4次，在

溫室中培養，玉米經3-4個月，台灣杉經7-8個月後，自根域中篩選孢子(Fergusson & woodhead, 1982)。(2)營養薄膜法(Nutrient film technique簡稱 NFT)：將栽植於矽砂培養介質中的玉米接種欲繁殖的菌根孢子，在確定玉米已獲得感染菌根後，小心地自培養介質中取出，用水洗淨後再栽植於NFT培養器上，經3-4個月後收穫培養盤中所形成的根層(root mat)，計算孢子含量。(Elmes & mosse, 1984; Mosse & Thompson 1984; Thompson, 1986)。

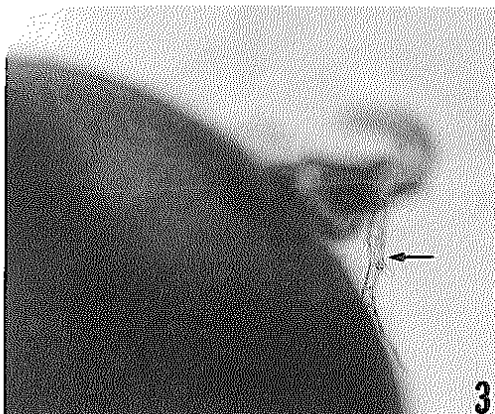
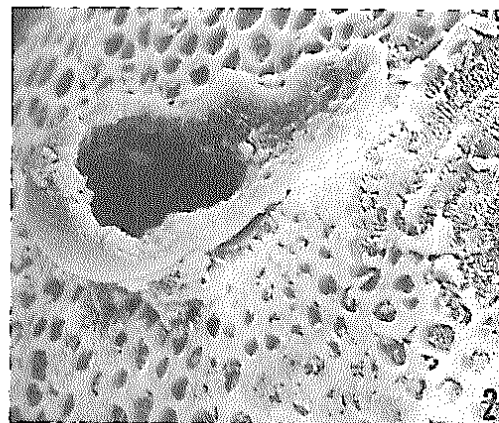
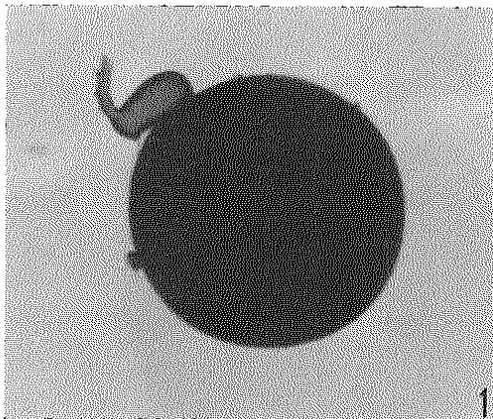
(三)不同菌種對杉木生長效應試驗：

將在無菌狀態下發芽生長達三個月之杉木苗移植於經高溫高壓殺菌消毒過之1公升砂介質中。供試組之苗木於其根域處分別加入50顆由上述試驗步驟2中培養所得之菌根孢子，而對照組則加入10ml之孢子濾液(翁建堯, 1981)。由於試驗步驟2之純種培養試驗中僅 *Acaulospora laevis* 及 *Glomus mosseae* 兩種可獲得大量孢子(見結果與討論部份)。因此，本項效應試驗中乃加入篩選自羅東木麻黃防風林下之 *Gigaspora margarita* 及陽明山地區台灣赤楊根域之 *A. laevis* 以作比較。

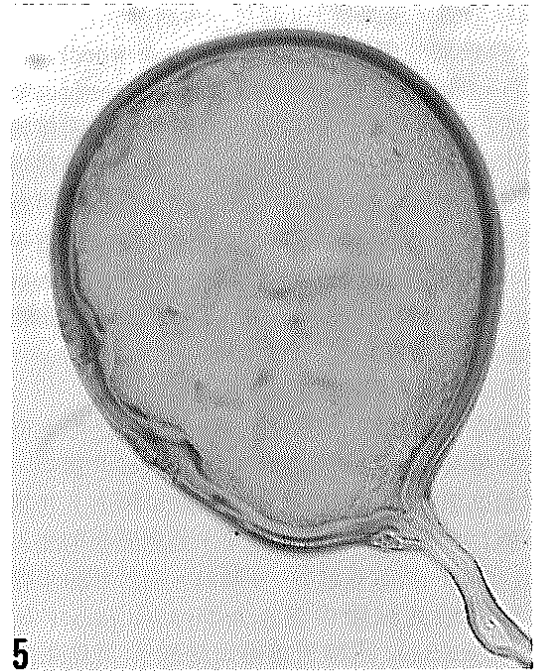
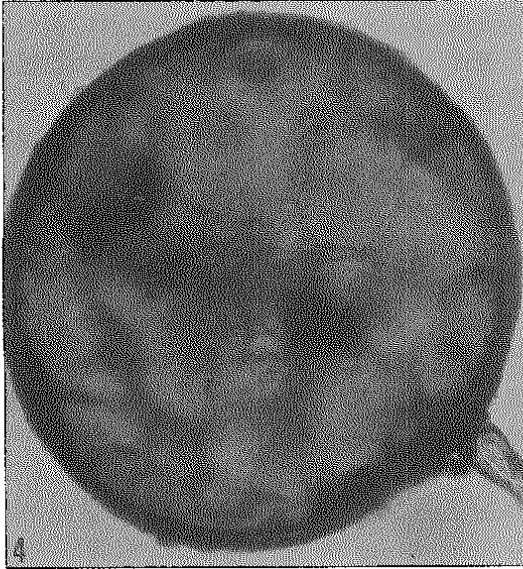
此二種菌種已經本實驗室證實可經由純培養繁殖而獲得大量孢子。試驗中每一處理重複四次，採完全逢機設計。每隔二個月施用1/2強度之 Hoagland's solution 50ml。苗木生長12個月後進行苗高、苗莖徑、地上部乾重及根部菌根感染率與地上部磷濃度含量的測定與統計分析。由此選出對杉木苗生長最具效益之菌種，以作為砂床接種菌根試驗之用。

三、結果與討論

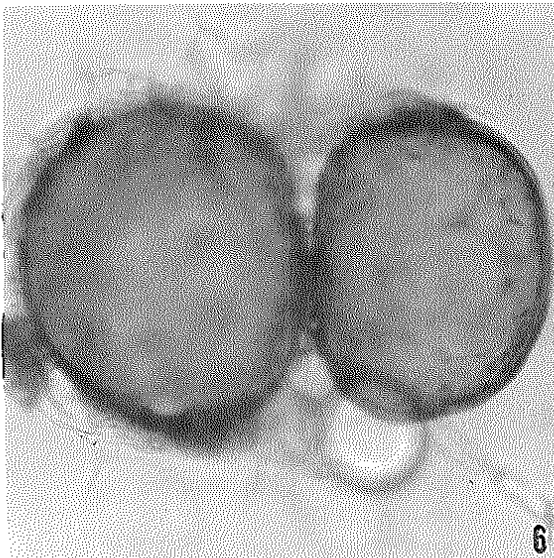
取自蓮華池分所杉木造林地及后崙苗圃之土壤經濕篩傾倒法及蔗糖液離心後挑出之孢子，依其形態特徵並按Trappe (1982)之檢索表進行鑑定後計得 *Scutellospora nigra*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus mosseae*, *Glomus marcrocarpum*, *Glomus tortuosum*, *Acaulospora laevis* 及 *Scleroeystis sinuosa* 等7種內生菌根孢子(圖1~9)，另有四種 *Glomus* spp. 及一種 *Acaulospora* spp. 尚未鑑定出。



- 圖1. *Scutellospora nigra* 之光學顯微照片，圖示具有明顯球狀(bulbous)及尾部彎曲之孢子柄(Subtending hypha)。×145
- 圖2. *Scutellospora nigra* 之掃描電子顯微照片。圖示孢子柄斷落處之微細構造，與孢子表面凹穴狀結構。×700
- 圖3.4. *Gigaspora gigantea* 之光學顯微照片，箭頭指處為似孢子柄菌絲(Suspensor-like hypha)，為該屬之重要特徵，惟常因外力而斷落。圖3.×200。圖4.×125



5 *Glomus mosseae* 之光學顯微鏡照片
• ×325



6. *Glomus tortuosum* 之光學顯微照片，
經常發現兩個孢子合生在一起，外被菌絲
• ×210



7. *Glomus macrocarpum* 之光學顯微照片
• 圖示孢子柄之基部為開口(open)的形態
• ×450

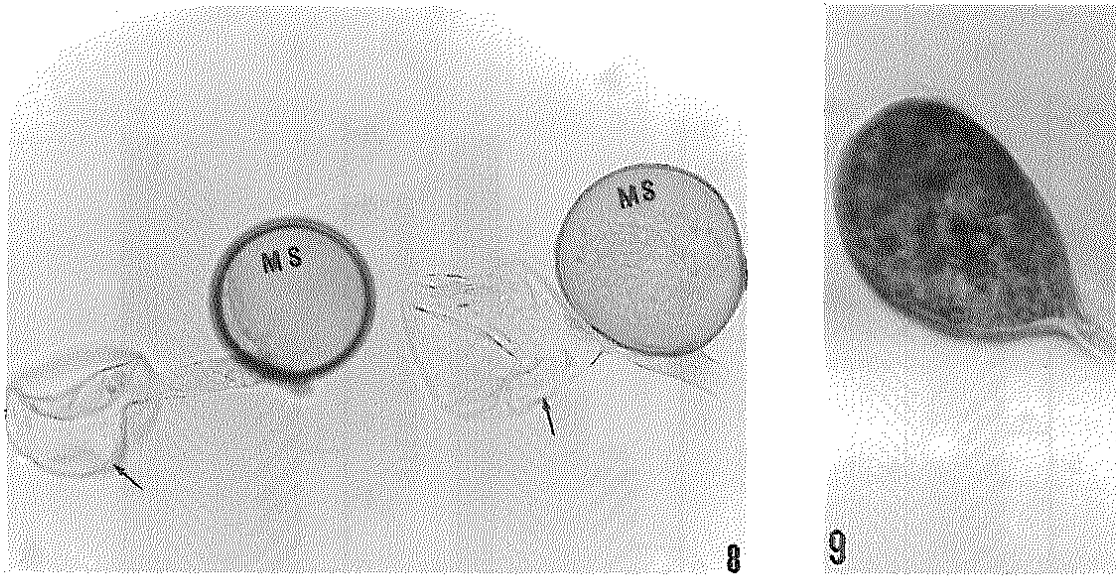


圖8. *Acaulospora laevis* 之光學顯微照片，圖示成熟之孢子mature spore(MS)及供應養分後已呈崩解的菌絲終點(collapsed hyphal terminus)(箭頭指處)×200。

圖9. *Sclerocystis sinuosa* 之光學顯微照片。圖示由孢子果中取出之單之孢子。×450

上述已鑑定出之7種菌種以玉米及台灣杉為宿主進行鉢植繁殖培養，其中*Gi. gigantea*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. tortuosum* 及 *Sclerocystis sinuosa* 無法與玉米或台灣杉形成菌根，亦無菌根孢子的產生。*Scutellospora nigra* 僅可與台灣杉形成菌根，其孢子產量為 48 ± 8 個 / 100g砂；而 *Acaulospora laevis* 則僅可與玉米形成菌根，其孢子產量為 1356 ± 78 個 / 100g砂；*Glomus mosseae* 則同時可與玉米或台灣杉形成菌根，其孢子產量分別為 1736 ± 104 個 / 100g砂與 186 ± 12 個 / 100g砂。將感染*Gl. mosseae*及*A. laevis*之玉米分別移植至NFT培養器培養經4個月後，各可獲得 978 ± 46 個 / 株及 736 ± 52 個 / 株孢子。

據Menge氏(1984)指出影響菌根孢子繁殖的因子包括共生宿主植物，培養介質種類，施肥處理，介質水分含量與通氣狀況、pH值、光及光週期、溫度等，其遷涉之生理因子極為複雜，因此各菌種各具有不同的培養繁殖條件。本試驗採用砂砂為培養介質主要乃因其具有優良通氣性，適合宿主根系發育，且經過篩洗的砂砂日後在回收孢子作業上極為便利。一般以鉢植栽培法亦皆以砂為主要介質。玉米為至今最常用來繁殖菌根孢子的宿主植物，主要因其根系發展容易，且為短期作物，有利孢子的發育成熟(Ferguson & woodhead, 1984)，惟玉米的短作物亦為其缺點，

每年必須重行接種以繁殖孢子，故本試驗室目前都改用根系發育良好，對各菌根孢子較不具專一性的台灣杉進行孢子的繁殖，其缺點為繁殖時間較長，初期孢子產量少，然其多年常綠性的特性不但兼具孢子的繁殖同時亦有保存孢子之效。以NFT方法繁殖孢子，雖可獲得極高的孢子密度，且回收孢子更為便利，甚至直接以玉米根系做為接種源即可達良好的接種效果，惟其所需之設備及栽培技術較複雜，且就本試驗結果而言，所產生的孢子總量並不如鉢植培養法，因此就實際應用或技術難易而言，仍以鉢植法較適合實際作業之需。

在菌種的有效性比較盆栽試驗，除了選用上述能以鉢植培養法大量繁殖成功的*Glomus mosseae*及*Acaulospora laevis*外，另以篩選自羅東地區木麻黃防風林地之*Gigaspora margarita*及陽明山地區赤楊林根域之*A. laevis*加以接種並觀察其生長效應。試驗結果顯示不同菌種對杉木苗之苗高，苗莖及地上部乾重之效應均呈極顯著之差異(圖10)。其中以*A. laevis*(蓮華池)及*Gl. mosseae*兩種菌種對杉木苗之生長發育最具功效，*A. laevis*(陽明山)次之，而以*Gi. margarita*之效應最差。杉木苗在接種*Gi. margarita*之後，其苗高及地上部乾重與對照組間並無極顯著差異。

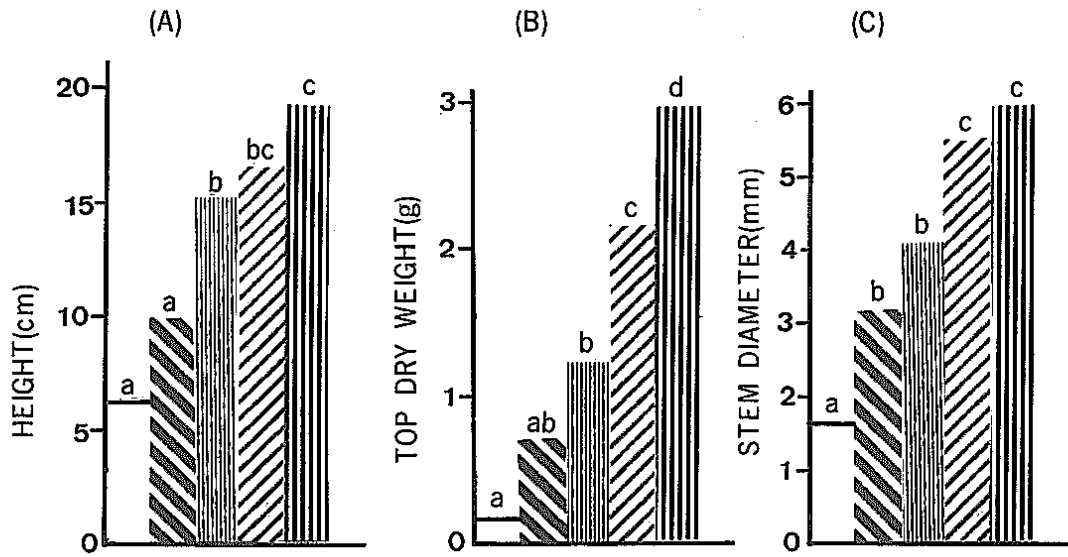


圖10. 不同VAMF對杉木苗之A.苗高(cm), B.地上部乾重(g), C.莖徑之影響(mm), □表未接種, ▨表接種*Gigaspora margarita*, ▤表接種*Acaulospora laevis* (陽明山), ▥表接種*Glomus mosseae*, ▧表接種*Acaulospora laevis* (蓮華池)。長條圖上方具有相同英文字母者表示不呈顯著差異($p < 0.05$)

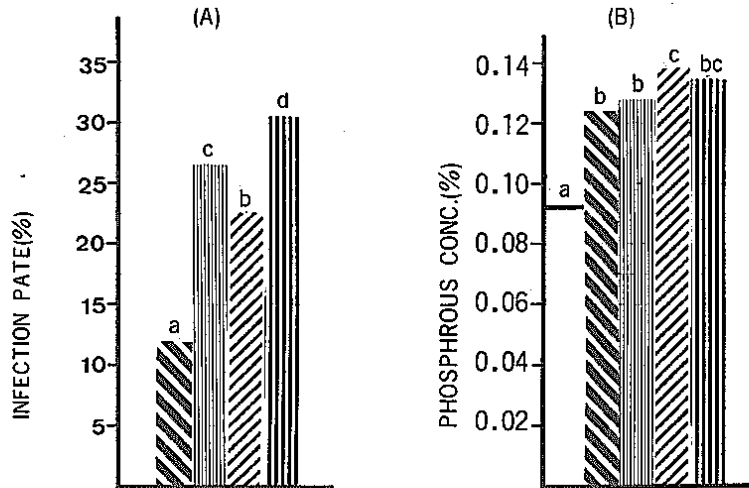


圖11. 不同VAMF接種杉木苗之A.菌根感染率%, B.地上部磷濃度之影響%。(長條圖上方具有相同英文字母者表示不呈顯著差異($p < 0.05$)), 圖例說明如圖10.

由於VAMF對培養條件需求之不同，且各菌種與宿主植物間較不具專一性(Harley & Smith, 1983)；因此必需特別強調其它菌種與杉木形成VAM的可能性，惟其接種用孢子的獲得仍需再行多方嚐試，其與杉木確切的共生關係及其對杉木的效應則亦有待進一步探討。

本試驗中所用4種不同菌種，與杉木根部形成菌根之感染率分別為*Gigaspora margarita* 12.4 ± 32%，*Acaulospora laevis* (陽明山) 26.7 ± 6.4%，*Acaulospora laevis* (蓮華池) 30.6 ± 5.7%，*Glomus mosseae* 22.7 ± 6.5% (圖11.A) 對照組則皆未感染菌根，*Gigaspora margarita* 為分離自海岸防風林之木麻黃根域，其適應之生態環境有別於本試驗所提供的培育條件，具有較低的感染率應屬正常，其感染率僅12.4%，致對杉木幼苗之生長效應並不顯著，僅在莖徑生長較對照組呈顯著差異。接種*Glomus mosseae* 的菌根苗感染率(22.7%)雖低於接種*Acaulospora laevis* (陽明山) 惟其對杉木幼苗的生長效應卻較大，不論高生長，地上部乾重與莖徑皆呈顯著性差異，其原因或可由地上部磷濃度加以解釋，接種*Glomus mosseae* 杉木幼苗地上部磷濃度為0.135%，而接種*Acaulospora laevis* (陽明山)者為0.128%，二者呈顯著差異(圖11.B)，菌根幫助宿主植物增加養分吸收已為不爭之事實，且廣為學者所證明(Schultz & Kormanik, 1982)，且不同菌種具有不同的生理效應，其效應往往依(1)菌種對宿主的感染能力，(2)菌絲吸收及運送土壤中低移動性元素(特別是磷)的能力，(3)菌絲在根域土壤中分佈能力大小而定(Abbott & Robson 1982)，因此圖10中所列不同菌種對杉木苗生長效益之差別應可據此三個原因予以解釋。綜而言之，在本試驗所提供之試驗條件下，接種*Glomus mosseae* 雖然感染率不比接種*Acaulospora laevis* (陽明山)高，然由於其對磷養分的吸收力較強，因此對杉木幼苗生長效應較大，接種*Acaulospora laevis* (蓮華池)則具有最高感染率，且其幼苗地上部磷濃度亦最高，故對幼苗生長助益最大，而接種*Gigaspora margarita* 幼苗則因低感染率及低磷濃度致菌根效應不顯著。惟值得注意的是同一菌種之不同品系對宿主之效應亦呈現生態差異(ecotypical difference)。分離自蓮華池杉木林及陽明山赤楊林之*A. laevis*其對杉木苗生長之影響呈顯著差異即為一例。較早胡弘道(1978)，張焜標(1984)，Sanders et al.(1977)等人之研究亦發現此種現象。

另外在育林作業菌根菌接種應用上一個重要

的考慮因子為菌根菌孢子休眠期間之長短(Siquera et al., 1985)。長休眠期者不適於作接種之用，雖然*A. laevis*對杉木之生長效應要優於*Gl. mosseae*，但在其後之砂床接種試驗中仍採用後者，其原因即因為*A. laevis*具有長期休眠現象(Mosse, 1970)之故。

四、結 論

根據林地與苗圃中之調查及孢子繁殖與不同菌種對杉木的生長試驗，本研究可獲致下述之結論：

- (一)蓮華池分所杉木造林地及苗圃之固有VAMF計有*Scutellospora nigra*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus mosseae*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. tortuosum*, *Acaulospora laevis* 及 *Sclerocystis sinuosa* 等七種，另有4種*Glomus* spp.及一種*Acaulospora* spp.尚未鑑定出。
- (二)上述已鑑定出之7種菌種分別以玉米、台灣杉進行鉢植培養法及以玉米進行NFT培養法，其中*Acaulospora laevis* 及*Glomus mosseae*能以鉢植培養法獲得大量孢子，其餘各種菌種僅能得到少量孢子或無法繁殖。
- (三)經苗木接種試驗結果顯示*Acaulospora laevis* (蓮華池)及*Glomus mosseae*對杉木苗之生長最具有效性，*Acaulospora laevis* (陽明山)居次，而*Gigaspora margarita* 幾乎不具菌根效應。

參考文獻

- 胡弘道. 1978. 內生菌根孢子接種對紅檜幼苗生長之影響. 科學發展月刊. 6(11):1044-1077.
- 翁建堯. 1981. 台灣杉、紅檜及台灣扁柏內生菌根之研究. 台大森林研究所碩士論文.
- 張焜標. 1984. 外來種相思樹之固氮作用與內生菌根之效應. 台大森林研究所碩士論文.
- 野上、楠原工藤. 1967. 砂栽培による林業用苗木の養成について. 日林九支研論集 vol. 21:6-7
- 楠原、野上. 1967. 砂栽培による林業用苗木の養成について(Ⅱ)砂栽培床替苗山出しよその後の生長. 日林九支研論集 vol.22:95-96.
- 野上、楠原. 1968. 砂栽培による林業用苗木

- の養成について(Ⅲ)砂栽培1年生苗の現地植栽
日林九支研論集 vol.22:97-99.
- Abbot, L. k. and A. D. Robson.** 1982. The role of vesicular mycorrhizal fungi in agriculture and selection of fungi for inoculation. *Aust. J. Agric. Res.* 33:389-408.
- Abbot, L. K. and A. D. Robson.** 1984. The effect of mycorrhizae on plant growth. In: VA mycorrhizae, (ed.) C. L. Powell and D. J. Bagyarai. PP. 113-130. Boca Raton, Fla: CRC Press. 234p.
- Bagyaraj, D. J.** 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: VA mycorrhizae, (ed.) C. L. Powell and D. J. Bagyarai. PP. 131-154. Boca Raton, Fla: CRC Press 234pp.
- Elmes, R.P. and B. Mosse.** 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Can J. Bot.* 62:1531-1536.
- Ferguson, J. J. and S. H. Woodhead.** 1982. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Methods and principles of mycorrhizal research. (ed.) N. C. Schenck. PP.47-55. The American Phytopathological Society. 244PP.
- Gerdemann, J. W. and T. H. Nicoloson.** 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46(2):235-244.
- Hall, I. R. and B. J. fish.** 1979. A key to the *Endogonaceae*. *Tran. Brit. Mycol. Soc.* 73(2):261-270.
- Harley, J. L. and S. E. Smith.** 1983. Mycorrhizal symbiosis. PP.357-386.
- Menge, J.L.** 1984. Inoculum production. In: VA mycorrhizae. (ed.) C. L. Powell D. J. Bagyarai. PP.187-204. Boca Rafon, Fla. CRC Press 234PP.
- Mosse, B.** 1970. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores I. life history. *Archives of Microbiology* 70:167-175.
- Mosse, B and J.P. Thompson.** 1984. Vesicular-arbuscular inoculum production I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.* 62:1523-1530.
- Sander, F. E., P. B. Tinker, R.L. Black and S.M. Palmerley.** 1977. Development of endomycorrhizal root system. I. spread of infection and growth-promoting effects with four species of VA endophte. *New Phytol.* 78:257-268.
- Siqueira, J. Q., D. M. Sylvia, J. Gibson and D. H. Hubbell.** 1985. Spores germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microbiol.* 31:965-972.
- Schultz, R. C. and P.P. Kormanik.** 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and soil fertility influence mineral concentrations in seedlings of eight hardwood species. *Can. J. For. Res.* 12:829-834.
- Thompson, J.P.** 1986. Soilless culture of vesicular-arbuscular mycorrhizae of cereals: effects of nutrient concentration and nitrogen source. *Can. J. Bot.* 64:2282-2294.
- Trappe, J. M.** 1982. Synoptic keys to the genera and species of zygomyceteous mycorrhizal fungi. *Phytopathology.* 72:1102-1107.