

# 牛樟生育地之共生菌多樣性及其效益

林瑞進<sup>1</sup>

## 前言

牛樟(*Cinnamomum kanehirai* Hay.)為樟科(Lauraceae)樟屬(*Cinnamomum*)之臺灣特有原生種植物，由於材質細緻，不易腐朽，為臺灣珍貴闊五木之一，主要分布於海拔200~2,000 m山區(Liao 1996)。近年來因牛樟芝(*Antrodia camphorata*)的特定療效，使得牛樟再次成為臺灣主要的造林樹種之一。起初，牛樟的研究都以地上部為主，包括扦插繁殖(林鴻忠，1997、Cho et al. 2011)及種子繁殖(楊正釧，2013)、親緣關係(Hung et al. 2014)及精油成分(高郁婷，2004)等，直到2013年才開始有地下部之共生微生物之研究(陳源郢，2013、李佳峰，

2014)。但到了2014年發現，牛樟母樹根系中不僅具有叢枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)的共生特徵，亦具有暗色隔膜內生菌(dark septate endophyte, DSE)之共生構造(洪祥凌等，2014)，以下就其共生微生物及菌相分別敘述。

## 一、牛樟根系共生微生物

不同土壤類型會有不同的菌根菌和植物共生，而每一種菌根菌對植物養分獲取都有不同的貢獻(Read 1991)，而且菌根菌對寄主植物的效益已被證實的效益，包括具有促進寄主植物生長及吸收養分等功效(Lin et al. 2011、Lin et al. 2019)、提高寄主林木之抗旱性(Otgonsuren and Lee 2011)、耐凍性



嘉義地區牛樟母樹。

<sup>1</sup> 國立嘉義大學森林暨自然資源學系

(Otgonsuren and Lee 2011)、耐酸和有毒物質 (Lin et al. 2011)、耐鹽性(潘怡帆, 2010)、耐養分貧瘠(Lin et al. 2010)及抗重金屬(Lin 2020)等功效, 亦證實菌根菌不僅能促進植物生長, 在地下部(根系)生長的效益上更具顯著性(Lin 2016)。由於牛樟根系已證實具有叢枝菌根和暗色隔膜內生菌等二類菌根構造(洪祥凌等, 2014), 以下就針對這二類菌根菌進行論述:

### 叢枝菌根菌

叢枝菌根為內生菌根(endomycorrhiza)之一, 與寄主植物共生後會在其根系形成叢枝體(arbuscular)為其特徵。根據陳源郅於2013年針對林業試驗所的信賢苗圃人工牛樟林、宜蘭大學大礁溪實驗林場標本園和太麻里牛樟天然林等3個牛樟生育地進行叢枝菌根菌調查, 結果得知信賢苗圃牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩選出2屬4種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *Acaulospora morrowiae*, *A. foveata*, *A. rugosa* and *Glomus macrocarpum*; 大礁溪實驗林場牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 僅篩選出1屬1種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *Scutellospora pellucida*; 太麻里牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩選出3屬5種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *A. morrowiae*, *A. laevis*, *G. macrocarpum*, *G. rubiforme*和 *S. pellucida*(陳源郅, 2013)。隔年李佳峰針對福山植物園、花蓮玉里的三民苗圃和嘉義奮起湖的中興苗圃的牛樟生育地叢枝菌根菌的篩選得知, 福山植物園牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩

選出2屬4種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *Entrophospora kentinensis* and *G. deserticola*, *G. fasciculatum*和 *G. mosseae*; 三民苗圃牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩選出2屬2種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *E. kentinensis*和 *G. mosseae*; 中興苗圃牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩選出2屬5種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *A. morrowiae* and *G. constrictum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*和 *G. mosseae*(李佳峰, 2014)。2016年行政院農業委員會林務局委託作者於花蓮、南投及嘉義等地區牛樟生育地進行叢枝菌根菌調查得知, 南投地區牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 僅篩選出1屬1種優勢之叢枝菌根菌孢子, 為: *G. claroideum*; 嘉義地區牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤經分離及鑑定後, 共計篩選出3屬4種優勢之叢枝菌根菌孢子, 分別為: *Acaulospora koskei*、*A. morrowiae*、*Glomus deserticola*、*Scutellospora cerradensis*; 花蓮處牛樟生育地叢枝菌根菌, 其根圈土壤, 經分離及鑑定後, 共計篩選出2屬4種優勢之叢枝菌根菌孢子, 分別為: *Glomus constrictum*、*Acaulospora mellea*、*A. scrobiculata*、*Acaulospora* sp.(林瑞進, 2016)。綜合上述這3次至生育地進行傳統調查結果證實, 牛樟生育地在叢枝菌根菌的種類上包括無柄孢子屬(*Acaulospora*)、內柄生孢子屬(*Entrophospora*)、繡球孢子屬(*Glomus*)和盾蓋孢子屬(*Scutellospora*)等4類。

### 暗色隔膜內生菌

暗色隔膜內生菌亦為內生菌根之一，與寄主植物共生後會在其根系形成微菌核(microsclerotia)為其特徵，經洪祥凌等(2014)證實牛樟根系結合體具有暗色隔膜內生菌後就展開一系列研究。首先，在嘉義縣達邦地區的牛樟母樹，利用其根系所誘導的可培養內生菌中，有2株菌株不僅可以和牛樟苗共生，還可以於其根系結合體中產生微菌核的構造。因此，證實這2株內生菌為暗色隔膜內生真菌(dark septate endophytic fungi, DSEF)，其分別命名為CkDB2(圖1A)和CkDB5(圖1B)(林瑞進等，2015)。雖然證實這2株暗色隔膜內生真菌可以和牛樟苗共生，但其效益呢？於是於2016年利用牛樟扦插苗進行生長效益試驗，經培育9個月後，證實接種這2株暗色隔膜內生真菌都可以較對照組提升1倍以上

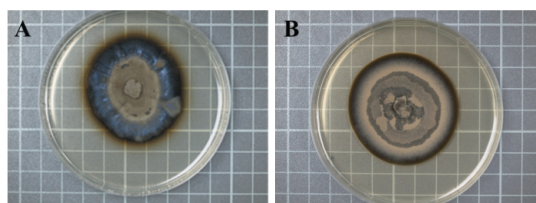


圖1 2株能和牛樟苗共生之內生菌：A.CkDB2；B.CkDB5菌株。(林瑞進等，2015)

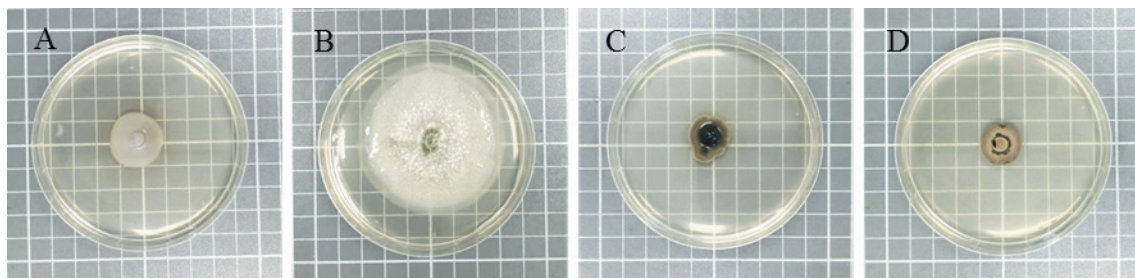


圖2 4株暗色隔膜內生菌：A.CkYCP2；B.CkYCP14；C.CkYLP14；D.CkDB5菌株。

的生長效益，其中CkDB5菌株不僅具有最顯著促進植物整體生長，還對於寄主植物在地下部(根系)生長量的表現上更為突出(Lin 2016)。於是，行政院農業委員會林務局委託作者進行花蓮、南投及嘉義等地區進行牛樟根系可培養內生菌調查，結果顯示，在南投地區共計分離出132株內生菌，依據其菌落生長速度及形態，並經致病性試驗選出6株對油菜不具致病性的菌株，其編號分別為CkYCP；在嘉義地區共計分離出150株內生菌，依據其菌落生長速度及形態，並經致病性試驗選出5株對油菜不具致病性的菌株，其編號分別為CkDBP；在花蓮地區共計分離出192株內生菌，依據其菌落生長速度及形態，並經致病性試驗選出6株對油菜不具致病性的菌株，其編號分別為CkYLP。隨後利用這17株菌株來進行和牛樟苗木的合成試驗，經培養30天後結果顯示，CkYCP2、CkYCP14和CkYLP14等3株菌株的接種苗都較對照組呈現顯著性差異(林瑞進，2016)。之後，為讓菌根效益落實到牛樟苗木培育，行政院農業委員會林務局嘉義林區管理處委託作者將上述4株內生菌(CkDB5、CkYCP2、CkYCP14和CkYLP14菌株)(圖2)直接應用至中興苗圃牛樟扦插苗的育苗作業，希望釐清這些菌株直接應用在苗圃

育苗作業，是否還具有效益？試驗經培養7個月後證實，CkDB5、CkYCP14和CkYLP14這3株菌株的接種苗在生物量的表現較佳，其中CkDB5和CkYLP14菌株接種苗的平均值生長量都較對照組多出將近1倍，且與對照組呈現顯著性差異(圖3)。根據上述研究指出，CkDB5菌株菌株分離自牛樟母樹，經合成試驗後證實不僅能和牛樟苗木共生，還能促進牛樟苗木生長，尤其是地下部(根系)生長。

## 二、牛樟生育地微生物多樣性

但牛樟生育地真的只有這幾株暗色隔膜內生真菌嗎？目前尚無法釐清，如繼續利用上述傳統誘導菌株產生的方法，是無法完整呈現牛樟根系中天然棲息於其中的微生物多樣性。近年來，分子生物技術發展迅速，其辨識能力已可達到種(species)及菌株(strains)，同時與生物標記物一樣，DNA為微生物皆有的生化組成成分，能較客觀地反應微生物群落的組成情況(林亦識，2006)。因此，可精確地闡釋了微生物種類和遺傳的多樣性。變性梯度膠體電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是Fischer及Lerman



圖3 不同處理牛樟扦插幼苗及根部形態。

於1980年代開始發展並應用，Muyzer et al. (1993)首次將這個方法應用在生物膜的菌種族群分析上。理論上，DGGE圖譜上的一個條帶就代表一個微生物類群，其精確度可達種的分類地位，且由條帶的強度可對不同族群的進行半定量判斷，故指紋圖譜不僅直觀反應了微生物菌相結構和多樣性，更方便找出優勢菌或功能菌。DGGE利用變性梯度的原理，分離不同序列的DNA產物，不需選殖文庫(clone library)即可分離PCR產物，可避免大量勞力的耗費，研究土壤微生物結構組成也相對容易。透過DGGE的資料庫，可直接了解牛樟天然族群的土壤微生物結構，藉此探討牛樟苗木培育之最適微生物族群。

因此，本研究室執行行政院農業委員會林務局委託計畫，至南投、嘉義及花蓮等3處牛樟生育地，利用DGGE技術分析這3處牛樟生育地土壤及根部之真菌相和叢枝菌根菌相。

首先，在不同牛樟生育地之土壤及根部真菌多樣性部分，結果顯示土壤及根部皆具有相當豐富之真菌多樣性(圖4A)。其序列經比對後顯示，嘉義達邦(DB)與花蓮玉里(YL)土壤及根部真菌組成較為相似，大部分真菌多屬於被孢霉屬(*Mortierella*)、隱球菌屬(*Cryptococcus*)、腐質霉屬(*Humicola*)和晶杯菌科(*Hyaloscyphaceae*)。

另在叢枝菌根菌相部分，以DGGE技術分析不同生育地之牛樟土壤及根部叢枝菌根菌組成，結果顯示土壤及根部皆具有相當豐富之叢枝菌根菌多樣性，且三個地區具有部分類似的多樣性(圖5)。其序列經比對後顯示，這些叢枝菌根菌屬於無柄孢子屬(*Acaulospora*)、繡球菌屬(*Glomus*)和盾蓋孢子屬(*Scutellospora*)。

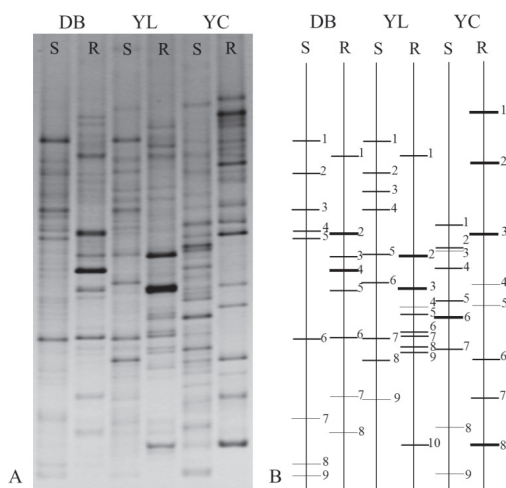


圖4 南投魚池(YC)、嘉義達邦(DB)、花蓮玉里(YL)地區之土壤及根部樣本DGGE電泳圖(A)，以及切膠定序樣本示意圖(B)。

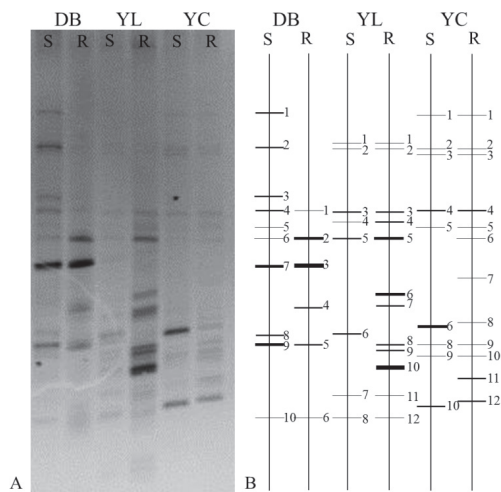


圖5 南投魚池(YC)、嘉義達邦(DB)、花蓮玉里(YL)地區土壤及根部樣本AMF DGGE電泳圖(A)，以及切膠定序樣本示意圖(B)。

綜合上述結果顯示，土壤中的某些菌株可與牛樟形成共生關係，南投魚池多為繡球菌屬菌種，嘉義達邦與花蓮玉里則多為無柄孢子屬及盾蓋孢子屬。然而，傳統分離之 *Glomus constrictum*、*Acaulospora mellea*、*A. koskei*、*A. scrobiculata* 及 *Scutellospora cerradensis* 可能是當地優勢且適與牛樟共生的菌種。

### 結論

由於扦插苗不具主根，導致牛樟扦插苗在造林後常有生長遲滯和易遭風倒等問題，因此如何促進扦插苗根系生長應為提升階段牛樟育苗技術的一大課題。目前本研究室已成功證實牛樟具有叢枝菌根菌及暗色隔膜內生真菌與其共生(洪祥凌等，2015)，並證實從牛樟根系中分離純化的CkDB5菌株，不僅能與牛樟扦插苗形成暗色隔膜內生菌的特徵(林瑞進等，2015)，亦能幫助牛樟扦插苗較對照組多出1倍的根系生長量(Lin 2016)。

牛樟做為我國重要經濟造林樹種，為提升苗木品質及造林績效，林業育苗作業未來應積極選擇優良的菌根菌接種於苗圃所培

育苗木，使苗木在出栽前就能形成良好的菌根，以提升成苗在造林地的適應能力及存活率。林木菌根效益在學界已有長久的研究證實，惟在實務上一直難以將學術上成果應用到林業森林苗圃，其原因主要為菌根菌接種源難以大量生產提供穩定接種來源。叢枝菌根菌須仰賴寄主植物繁殖，因此推廣上較易受限(Varma et al. 1999)，但暗色隔膜內生真菌卻無此缺點(林瑞進等，2015)。暗色隔膜內生菌近年來已被證實在生態系中扮演著與菌根菌相似功能的角色，並且不需宿主植物就能進行繁殖，利用此類真菌特性，我們能以人工方式大量生產菌根菌的接種源，解決菌根應用面臨的困境。另外，在苗圃現場進行的接種試驗亦證實暗色隔膜內生菌可促進牛樟扦插苗生長。隨著暗色隔膜內生菌的學術研究逐漸進展，期望其在實務的應用上也能成為林業新尖兵，而在未來若能將菌根技術應用於全省牛樟苗培育，不僅可利用其促進牛樟苗木生長的特性，更能促進苗木根部發展，培育品質更加健壯之苗木，以利在造林階段提升苗木對環境之適應力。☼