

鳳梨釋迦 果園叢枝菌根菌種之調查研究

文、圖/ 楊雅媛、王誌偉

前言

叢枝菌根菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)為一群可與植物根系結合並共生的真菌，在不同宿主植物上可產生各種效益，除促進植物生長與減少肥料施用外，可幫助植物緩解鹽害、乾旱、淹水、高溫與寒害等非生物環境逆境，許多報告指出AMF可增加植物抗病性，對抗根部多種病原菌。為緩解氣候變遷，作物可能面臨之挑戰，本場透過臺東地區番荔枝果樹菌根菌之研究，期望以微生物製劑減緩該果樹面臨之各種逆境。本文旨在分享如何以分子檢測技術與孢子型態鑑定等方法，研究臺東地區鳳梨釋迦果園之菌根菌種類。

鳳梨釋迦菌根菌種類調查

一、鳳梨釋迦根部及土壤採樣

於臺東地區4處鳳梨釋迦果園進行採樣，包括斑鳩、新園、賓朗與頂岩灣，每取樣果園隨機挑選10株健康植株，每植株選取4個點進行細

根與土壤之採集，進一步將4個樣本混合後，分別進行DNA萃取與土壤分析。不同種類的菌根菌對於栽培介質或土壤酸鹼值具偏好性，如無柄孢子屬(*Acaulospora* spp.)大多存在於酸性土壤，大孢子屬(*Gigaspora* spp.)從酸性到鹼性環境中皆可發現，目前市售之繡球菌屬(*Glomus* sp.)菌根菌產品則是偏好中性到酸性土壤，因此採樣前進行果園土壤分析(表1)，做為重要參考資訊。

二、鳳梨釋迦細根以菌根菌專一性引子對進行分子檢測

將收集之鳳梨釋迦細根以清水洗淨後，切取中段並進行DNA萃取，接著利用分子檢測方法進行AMF種類鑑定。一般而言，真菌鑑定是以核糖體DNA(rDNA)轉錄區間1(ITS1)及轉錄區間2(ITS2)作為目標片段進行增幅，而AMF分子檢測則

表1. 臺東地區4處鳳梨釋迦採樣果園土壤分析結果

| 田區代號 | 地點 | 酸鹼度 pH | 導電度 EC (mS/cm) | 有機質 O.M. (%) | 有效性磷 P ₂ O ₅ (mg/Kg) | 交換性鉀 K ₂ O (mg/Kg) | 交換性鈣 CaO (mg/Kg) | 交換性鎂 MgO (mg/Kg) |
|------|-----|---------|----------------|--------------|--|-------------------------------|------------------|------------------|
| F1 | 斑鳩 | 3.9±0.3 | 0.47±0.27 | 7.4±2.4 | 217.7±10.6 | 438.1±159.7 | 1,886.2±849.6 | 172.0±58.7 |
| F2 | 新園 | 7.0±0.1 | 0.13±0.02 | 3.1±0.4 | 111.1±29.5 | 216.8±58.2 | 3,449.8±312.7 | 443.1±39.3 |
| F3 | 賓朗 | 7.4±0.2 | 0.18±0.04 | 2.1±0.2 | 135.9±35.3 | 212.2±74.6 | 5,271.1±1,179.0 | 219.9±34.5 |
| F4 | 頂岩灣 | 6.0±0.4 | 0.10±0.04 | 1.7±0.3 | 201.0±5.8 | 273.2±57.1 | 2,281.8±753.9 | 168.4±46.8 |

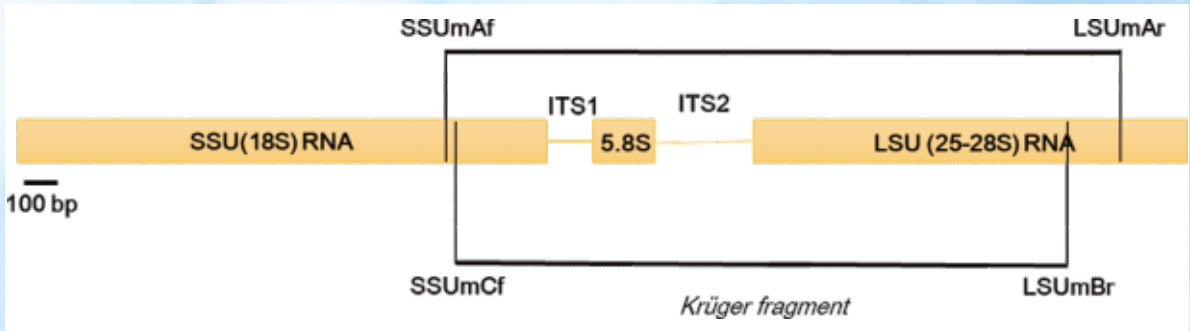


圖1.本研究使用引子於真核生物核醣體DNA之相對位置

表2. 本研究使用之核酸引子對

| 引子名稱 | 序列(5'→3') | 備註 |
|---------|-------------------------|--|
| SSUmCf | GCTGCTGTTATGGCGGACT | rDNA上小次單元(SSU)及大次單元(LSU)之內側引子對 |
| LSUmBr | AACACTCGCAYAYATGYTAGA | |
| SSUmAf1 | TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA | rDNA上小次單元(SSU)及大次單元(LSU)之外側引子對 |
| SSUmAf2 | TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA | |
| LSUmAr1 | GCTCACACTCAAATCTATCAAA | SSUmAf為混合SSUmAf1與SSUmAf2 LSUmAr為混合LSUmAr1-4 |
| LSUmAr2 | GCTCTAACTCAATTCTATCGAT | |
| LSUmAr3 | TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA | |
| LSUmAr4 | GCTCTTACTCAAACCTATCGA | |

是針對rDNA上小次單元(SSU)及大次單元(LSU)(圖1)。

本研究利用Krüger等人(2009)發表的混和引子對組合SSUmCf與LSUmBr進行多重聚合酶連鎖反應(multiplex PCR)。其中賓朗採樣區果園，利用上述SSUmCf/LSUmBr混和引子對無法增幅出預期條帶，改以較外圍的混和引子對SSUmAf與LSUmAr(表2)進行PCR後，再以內側SSUmCf/LSUmBr混和引子對進行巢式聚合酶

連鎖反應(nested-PCR)。結果顯示，此4處果園均有不同數目的鳳梨釋迦植株被增幅出大小約為1,500 bp的條帶(圖2)。

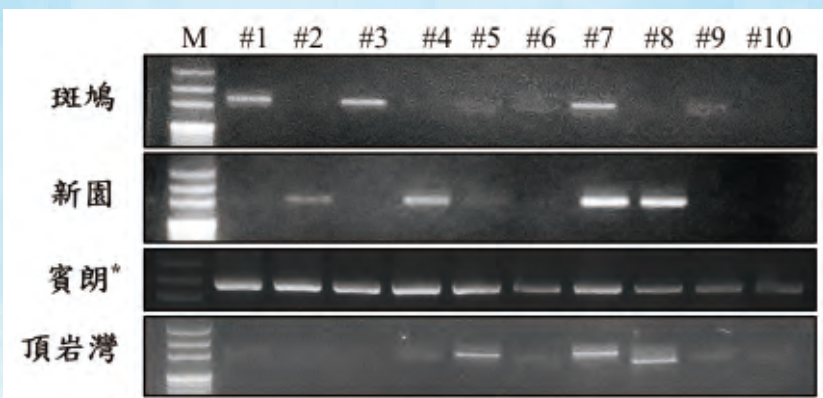


圖2.田間採集之鳳梨釋迦根部組織，萃取DNA後，利用SSUmCf與LSUmBr引子對進行PCR及瓊脂膠體電泳之結果。

(*賓朗地區之樣本先利用較外圍之SSUmAf與LSUmAr引子對進行PCR後再進行nested-PCR)



三、以序列親緣關係分析採樣果樹根部之菌根菌種類

為進一步確認AMF種類，每果園挑選2個已增幅出預期條帶之DNA樣本進行選殖(TA cloning)及定序，結果共得51筆AMF相關序列，經序列分析整理後歸納3處鳳梨釋迦果園AMF可歸類為5個不同屬(genus)或種(species)的族群，包括幼套球囊黴(*Glomus etunicatum*)與根狀孢子屬(*Rhizophagus* spp.)，此2類群僅於斑鳩果園被偵測到，推測可能與該果園土壤酸鹼度較低且樹齡較老(25年以上)有關。繡球孢子屬(*Glomus* spp.)序列在新園與賓朗之採樣果園分別獲得18與9條同一類群序列，占所有序列53%(27/51)，推測可能與兩處果園土壤性質(酸鹼度偏中性)與樹齡(約10年)較相近有關。聚繡球孢子菌(*Glomus aggregatum*)與漏斗狀孢子屬(*Funneliformis* spp.)主要分別於

賓朗與新園採樣果園偵測到。頂岩灣採樣果園因試驗時PCR產物增幅效果不佳，未獲得任何AMF相關序列。此外，4處果園種植樹苗時皆未刻意接種菌根菌，本試驗增測到之AMF菌種應為自然感染鳳梨釋迦根系。總結本研究以分子檢測方式偵測鳳梨釋迦根部AMF種類之試驗結果，不同果園間偵測到之AMF序列差異大，但多歸屬於繡球孢子屬。本研究偵測到之菌種資訊為未來自鳳梨釋迦果園分離篩選AMF之標的。

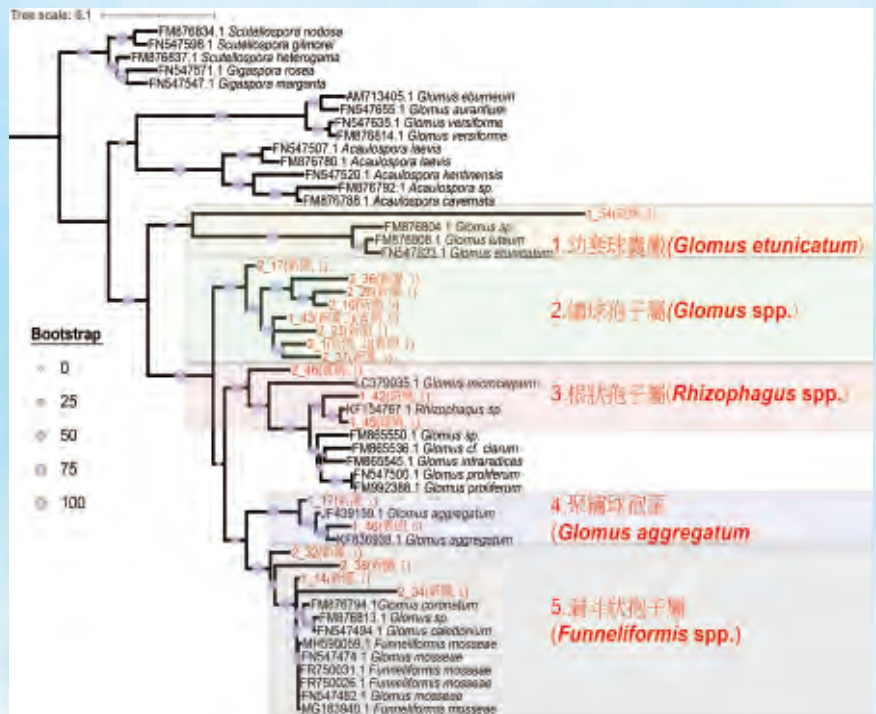


圖3.臺東地區鳳梨釋迦AMF序列與資料庫上不同種類AMF序列比對後進行親緣關係樹分析之結果

(紅色字體表示自鳳梨釋迦根部所偵測到之序列；括號內字體表示該序列之樣本採集地點；括號內數字表示該序列於51筆AMF相關序列中所佔數目)

四、自土壤分離篩選、純化菌根菌孢子並進行型態鑑定

為獲得長久存在於鳳梨釋迦果園之AMF菌種，本研究採集位於頂岩灣栽培鳳梨釋迦逾25年歷史果園土壤，利用濕篩法(wet sieving)及糖液梯度離心法(sucrose gradient centrifugation)分離土壤中AMF孢子，於解剖顯微鏡下將形態類似之孢子經挑選後，以番荔枝幼苗與百喜草進行擴增培養。孢子利用梅式染劑(Melzer's reagent)與PVLG(Polyvinyl-Lacto-Glycerol)染色後，以大小、細胞壁層數、顏色、發芽管生長發育方式等型態作為鑑定依據。由行政院農業委員會農業試驗所農業化學組林素禎博士協助其鑑定結果為毛氏無柄囊黴(*Acaulospora morrowiae*) (圖4A)，為本研究完成孢子挑選與純化之AMF菌種。根據吳與林(2016)之研

究報告，*Acaulospora* sp.孢子於產孢囊泡(sporiferous saccule)的柄內或柄上，隨著時間孢子壁逐漸脫落分解，最終孢子成熟後有別於其它AMF菌種(圖4B)不會有任何菌絲連接(圖4A)。

結語

叢枝菌根菌對宿主生長與增加環境逆境耐受性等正面效益之相關研究甚多，但各種農作物廣泛且實際應用較少，推測可能原因包括(一)市售菌根菌產品種類少，菌種較單一。(二)菌根菌對宿主生長效益需長時間作用，且易受化學肥料與農藥等影響，無法如一般肥料可快速呈現促進生長效果，因此難以得到大多數農友青睞。近年來，永續農業理念日漸受重視，希望透過菌根菌等有益微生物之研究與運用，為農作物塑造天然健康之土壤環境。

參考文獻

1. 吳繼光、林素禎。2016。叢枝菌根菌分類學：繡球菌門之最新定義。臺灣農業研究65(3)：238-260。
2. Krüger, M., H. Stockinger, C. Krüger, and S. Schüßler. 2009. DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183 : 212-223.

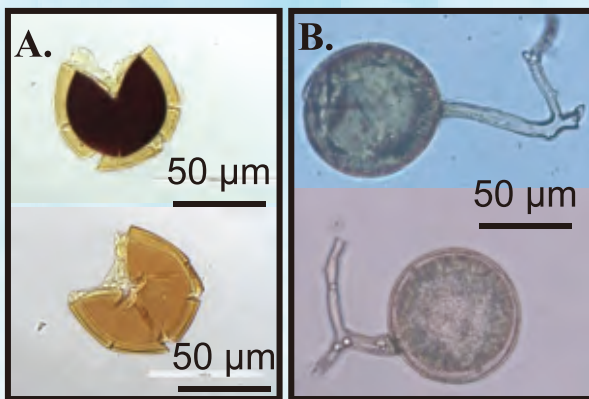


圖4.本研究完成孢子挑選與純化之AMF菌種(A)，經染色並鑑定為*Acaulospora morrowiae*。