

國立清華大學
分子與細胞生物研究所
碩士論文

南投赤箭形態觀察與培養及
分離其共生菌

Morphological Observation and Seed
Germination of *Gastrodia nantoensis*, and
Isolation of Symbiotic Fungi

姓名：張毓倫(Zhang, Yu-Lun)

學號：9780595

指導教授：李家維教授(Li, Chia-Wei, PH. D.)

中華民國九十九年七月

致謝

在新竹這兩年要感謝的人真的很多！

首先感謝這兩年在實驗曾經幫助過我的人：當然一開始要先感謝我的老闆—李家維教授，教導我如何將實驗邏輯化、精準用字以及在實驗過程中所有的幫助。蘭花達人—林維明老師、屏東保種中心的蘭花守護者—王義富先生以及蘭花顧問—林士賢先生（三伯），這是一開始教導我如何在野外找尋蘭花的老師，蘭花的生長環境與形態差異非常大，使得找蘭花這項任務變得十分有趣，由其是看到正盛開的蘭花。台大農藝系技正—鄭誠漢老師，教導我蘭花相關的組織培養與分離真菌的技術；與桃園農改場—葉志新先生，增加我對培養高赤箭的了解。行政院農委會林業試驗所—張東柱先生，感謝利用真菌形態分辨菌種。台大植物病理與微生物學系—沈偉強教授，教導我在真菌領域中相關的技術。口試委員徐邦達教授、沈偉強教授所有實驗和論文的指導。最後感謝同實驗室的吳筱曼學妹，因為有你陪伴使得實驗的路途不孤單。

接下來感謝實驗室的夥伴：感謝出其不意放冷箭好厝邊的美華學姐、實驗室吃飯 key man 的其昌學長、同是化學人的子洵學長。在剛進入清大生科時，因為有你們的照顧，讓我有一個有趣的碩一生活；之後感謝陸續進入實驗室的各位，女朋友是大正妹的士銜、酷斃了的緬甸小姑娘樹梅學妹、一定要 11 點睡覺 7 點起床的小曼學妹以及未來的新星們：小竹、眨眨、下巴、國強。

感謝樓下 106w 休息室的夥伴，感謝你們豐富我的碩二生活，每次的聚餐每次的談天每次的搞笑都讓我回味不已：嬌小又親切的美璇

摘要

南投赤箭屬於稀有台灣特有種的非光合作用蘭，非光合作用蘭一生皆需依賴其共生菌維生，目前尚未成功繁殖以及分離其共生菌。本研究主要分成兩部分，第一部分為觀察南投赤箭生長形態；第二部分為人工繁殖南投赤箭，利用無菌播種培養南投赤箭以及分離南投赤箭共生菌。

第一部分：實地到野外觀察南投赤箭的生長環境，觀察其詳細之生長情形。同時利用光學顯微鏡和掃描式電子顯微鏡來觀察南投赤箭的地下塊莖、根和種子細胞內的細微構造。第二部分：無菌播種培養南投赤箭種子，經過十週後，其種子生長到魚雷型胚階段，但其生長速度開始減慢。於是我們改變培養基成分，卻無明顯改善種子的生長速度。為了分離出南投赤箭的共生菌，我們將其地下部分切片培養分離，並把種子埋回原生地鈎菌，交叉比對兩種方法，挑選出較為可能的真菌。

Abstract

Gastrodia nantoensis is one kind of rare and endemic non-photosynthetic orchids in Taiwan. Non-photosynthetic orchids depend on their symbiotic fungi during whole life cycle, and people have not yet artificially cultivated and isolated their symbiotic fungi successfully. Here the research works contain three parts. The first part is morphological observation, the second part is seeding under sterile condition, and isolation of symbiotic fungi.

First, we observed the habitat of *Gastrodia nantoensis* to investigate their life cycle. In the mean time investigated the fine structure of their rhizomes, roots and seeds under light microscope and scanning electron microscope. Second, we sowed the sterile seeds on the artificial medium, After 10 weeks the embryos were held at torpedo-shaped stage, and they started to grow slowly. We tried to change the ingredients of artificial medium but in vain. We sectioned their underground parts to isolate the symbiotic fungi, and put their seeds under their habitat to retrieve symbiotic fungi as well. After comparing the two isolated methods, we sieved the candidates out.

目錄

致謝	II
摘要	IV
Abstract	V
圖目錄	IX
表目錄	XI
一、緒論	1
二、簡介	2
1 非光合作用蘭 (non-photosynthetic orchids)	2
2 赤箭屬(<i>Gastrodia</i>)	4
2.1 赤箭屬世界分布情形	4
2.2 赤箭屬台灣分布情形	6
2.3 台灣赤箭屬物種之外部形態	9
2.4 南投赤箭 (<i>G. nantoensis</i>)	12
3 蘭科植物與共生真菌之研究	13
3.1 文獻回顧	13
3.2 菌根結構 (Mycorrhiza)	14
3.3 蘭科植物內生菌根之結構(Orchid endomycorrhizae)	16
3.4 非光合作用蘭是否具有特定的共生真菌?	18
4 蘭科植物無菌播種培養	21
4.1 種子消毒問題	21
4.2 培養基組成	22

5	實驗動機與目標	23
5.1	實驗動機	23
5.2	實驗目標	24
三、	實驗材料與方法	25
1	實驗材料	25
2	實驗方法	25
2.1	無菌播種	25
2.2	顯微鏡觀察	26
2.2.1	光學顯微鏡	26
2.2.2	掃描式電子顯微鏡	27
2.3	共生菌之分離	28
四、	實驗結果	30
第一部分:	南投赤箭形態觀察	30
1	原生地生態觀察	30
2	南投赤箭之外部形態	32
3	真菌於南投赤箭地下組織之生存形態	37
3.1	地下塊莖	37
3.2	根	40
第二部分:	人工繁殖南投赤箭	43
1.	無菌播種	43
2	共生菌之分離	47
五、	討論	52
5.1	南投赤箭之形態探討	52
5.2	真菌於南投赤箭地下組織之生存形態探討	52

5.3 無菌播種探討	53
5.4 分離共生菌探討.....	54
六、 結論	56
七、 參考文獻.....	57
附錄	65



圖目錄

圖 1 赤箭屬之世界分佈圖.....	5
圖 2 赤箭屬物種於台灣島內分布情形.....	6
圖 3 赤箭屬物種根部形態.....	9
圖 4 南投赤箭於台灣分布圖.....	12
圖 5 菌根的生長形態.....	15
圖 6 南投赤箭原生地生態.....	31
圖 7 南投赤箭植株.....	32
圖 8 南投赤箭之地下塊莖與根形態.....	33
圖 9 南投赤箭花之形態.....	34
圖 10 南投赤箭之結果植株.....	35
圖 11 南投赤箭之種子形態.....	36
圖 12 地下塊莖外部之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	37
圖 13 地下塊莖內部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	38
圖 14 地下塊莖內部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	39
圖 15 菌根外部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	40
圖 16 菌索纏繞根段切面之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	41
圖 17 菌絲於根部侵入方向之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	42
圖 18 南投赤箭成長的種子之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	44
圖 19 南投赤箭成長中的種子之解剖顯微鏡照片.....	46
圖 20 釣菌裝置之結果.....	48
圖 21 釣菌種子之解剖顯微鏡照片.....	49
圖 22 釣菌種子之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片.....	50

圖 23 鈎菌種子橫切面之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片51

圖 24 分離之共生菌的形態.....68

圖 25 分離之共生菌 DNA 序列69



表目錄

表 1 台灣的非光合作用蘭屬	3
表 2 台灣的赤箭屬物種、其分類亞屬以及於台灣分布情形	7
表 3 非光合作用蘭與其共生真菌物種之對照表	19
表 4 南投赤箭種子之成長發芽率	43
表 5 南投赤箭種子成長培養基之改變成分	45



一、緒論

全世界的顯花植物約有 25 萬種，而蘭科植物占 10 %，約有 800 屬和 25,000 種(Dressler, 1993; Mabberley, 1997; Cribb et al., 2003)，數量仍再持續增加。蘭科植物(Orchidaceae)為顯花植物中，數量最多且最具多樣性的一科，為相當重要的天然植物資源。另外於花卉、醫藥保健等領域更具有極高的市場需求與重要經濟價值。

台灣特殊的地理位置及地形條件，為典型潮濕多雨的島嶼型氣候，適合蘭科植物生長。但由於人類過度的開發，對自然環境造成破壞，導致珍貴的蘭科物種因無法適應氣候的快速變遷而瀕臨絕種。因此，為了維護自然生態的平衡，生物的多樣性和資源的永續利用，保育稀少的特有種已是刻不容緩的事。

本研究選擇台灣特有種中，稀有的非光合作用蘭—南投赤箭 (*Gastrodia nantoensis*)為研究對象，其中非光合作用蘭一生皆需依賴共生菌來維生，而目前尚未成功將其繁殖，且其共生菌之種類也尚未得知。因此，本研究將於野外實地觀察南投赤箭的生長環境，並嘗試以無菌播種方式，期望能將其成功繁殖下來。最後分離南投赤箭之共生菌，並藉由形態及分子鑑定此共生菌之種類。

二、簡介

1 非光合作用蘭 (non-photosynthetic orchids)

一般蘭科植物的營養方式為自行光合作用製造養份，另外有許多蘭科植物本身不具有行光合作用的色素，因此其生長時所需的養分需依賴真菌的提供，以往稱之為腐生蘭 (saprophytic orchids)。由於蘭科植物本身並無腐生之能力，因此較精確的用法稱之為「非光合作用蘭 (non-photosynthetic orchids)」(Taylor and Bruns, 1997)或是「真菌異營蘭 (myco-heterotrophic orchids)」(Leake, 2005; Bidartondo, 2005)。

非光合作用蘭與一般蘭科植物的營養器官形態有些差異。非光合作用蘭不具有正常功能的葉片，於非開花期的時間，非光合作用蘭以地下塊莖的形式存活，至開花期才由地下塊莖抽出花莖，因此僅在開花期與結果期能觀察到植株的地上部分，如：花以及果實。每種非光合作用蘭出現於地面上的時間長短差異很大，例如：烏來赤箭(*G. uraiensis*)的開花期與結果期大約為兩個月，但有些皿柱蘭屬(*Lecanorchis*)物種的結果期很長，直到下次開花仍然能觀察到前次所結的果莢，原因為皿柱蘭果梗的質地具有高度纖維化。

目前台灣的蘭科植物約有 380 種(Chung, 2009)，占顯花植物種類

的 10 %，也是台灣最大的科。台灣的非光合作用蘭物種有 12 屬，至少 41 種（表 1）（Lin, 2006; Hsu, 2008; Chung, 2009）。

表 1 台灣的非光合作用蘭屬。括號代表非光合作用蘭物種數量。

屬名	<i>Genus</i>
無葉蘭屬	<i>Aphyllorchis</i> (1)
肉果蘭屬	<i>Cyrtosia</i> (1)
錨柱蘭屬	<i>Didymoplexiella</i> (1)
雙唇蘭屬（鬼蘭屬）	<i>Didymoplexis</i> (2)
上鬚蘭屬	<i>Epipogium</i> (3)
倒吊蘭屬	<i>Erythrorchis</i> (1)
山珊瑚屬	<i>Galeola</i> (2)
赤箭屬	<i>Gastrodia</i> (19)
皿柱蘭屬	<i>Lecanorchis</i> (7)
鳥巢蘭屬	<i>Neottia</i> (1)
堅藥蘭屬	<i>Stereosandra</i> (1)
長花柄蘭屬	<i>Yoania</i> (2)

2 赤箭屬(*Gastrodia*)

2.1 赤箭屬世界分布情形

赤箭屬源於 1810 年英國植物學家 Robert Brown 建立，其模式種 (type species) 為澳洲東部的 *G. sesamoides*。「*Gastrodia*」是由希臘文 *gaster* 與 *-odes* 組合而成，意思為「形狀相似胃袋」，描述其花被的基部合生成相似袋狀的形態特徵。

赤箭屬在世界的分布主要於亞洲地區，北起韓國、西伯利亞東緣及中國大陸北部，西到喜馬拉雅山和印度東側，南至澳洲與紐西蘭 (Pridgeon et al., 2005)。除此區域之外，有零星物種發表於非洲中部和馬達加斯加西側的小島 (Bossert, 2006)。另外，有一物種 *G. entomogama* 發現於南非地區 (Jones, 1991) (圖 1)。

赤箭屬為蘭科中最大的真菌異營屬。目前赤箭屬物種在世界的總數約為 50-60 種左右，包含過去相關文獻上所記載的 17 至 41 種以及近年來陸續發表的新種 (Chen et al., 1999; Leou, 2000; Chase et al., 2003; Chung, 2009; Hsu, 2008; Pridgeon et al., 2005)。



圖 1 赤箭屬之世界分佈圖。包含灰色區塊以及箭頭所指的小島。

2.2 赤箭屬台灣分布情形

目前台灣的赤箭屬物種總共有 19 種 (Hsu, 2008)。在已確認的台灣赤箭屬物種中，廣域性分布於東亞地區為 *G. elata*，東南亞地區為 *G. javanica* 及 *G. callosa*；狹窄分布為 *G. nipponica*、*G. gracilis*、*G. pubilabiata* 及 *G. shimizuana*；其餘 12 種僅分布於台灣地區。目前赤箭屬物種於台灣島內之分布情形如圖 2，單一物種的分布情形可分為四類：泛全島分布、區域分布、間斷分布與侷限分布，如表 2 所示。



圖 2 赤箭屬物種於台灣島內分布情形。

赤箭屬物種再細分成三個亞屬：赤箭亞屬 *Gastrodia*、珊瑚亞屬 *Corallogastrodia*、小赤箭亞屬 *Demorchis* (Hsu, 2008)。分類方式依據近代研究者提出植株營養與花部的特徵不同所區分，例如：花被萎縮狀態、果梗延長程度以及根部生長情形(Tuyama, 1966; Maekawa, 1971; Jones & Clements, 2004)。台灣赤箭屬物種的分類亞屬如表 2 所示。

表 2 台灣的赤箭屬物種、其分類亞屬以及於台灣分布情形。

學名	中文名稱	亞屬	台灣分布情形
<i>G. albid</i>	白赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. appendiculata</i>	無蕊喙赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. callosa</i>	緋赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. clausa</i>	閉花赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	間斷分布
<i>G. confusoides</i>	擬八代赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	區域分布
<i>G. elata</i>	高赤箭	赤箭亞屬 <i>Gastrodia</i>	區域分布
<i>G. flavilabella</i>	夏赤箭	珊瑚亞屬 <i>Corallogastrodia</i>	區域分布

<i>G. flexistyla</i>	摺柱赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. fontinalis</i>	春赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. gracilis</i>	細赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	泛全島分布
<i>G. javanica</i>	爪哇赤箭	赤箭亞屬 <i>Gastrodia</i>	區域分布
<i>G. leoui</i>	柳氏赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. nantoensis</i>	南投赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. nipponica</i>	日本赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	區域分布
<i>G. peichatieniana</i>	北插天赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	區域分布
<i>G. pubilabiata</i>	冬赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	區域分布
<i>G. shimizuana</i>	清水氏赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	間斷分布
<i>G. taitungensis</i>	台東赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布
<i>G. uraiensis</i>	烏來赤箭	小赤箭亞屬 <i>Demorchis</i>	侷限分布

2.3 台灣赤箭屬物種之外部形態

由於赤箭屬物種為真菌異營植物，並無正常莖部及葉片。其莖部特化成地下儲存營養的器官，稱之為地下塊莖（rhizome）。一般常發現有多塊相連的地下塊莖，其由不同時期所生長的地下塊莖相連組合而成，而單塊地下塊莖的長度大多不超過 8 cm，其中 *G. javanica* 與 *G. gracilis* 較長，可至 10 cm 以上。地下塊莖為不規則扭曲的紡錘型，各物種的直徑差異很大，一般物種大多在 1.5 cm 以內，其中以 *G. elata* 之地下塊莖最大，直徑可達 5 cm。地下塊莖的表面具有密集的環節，節上有鱗片（Scales），其為葉片的同源器官。鱗片皆呈淡褐色的三角形，輪長於節間，其長度在 1-5 mm 間。

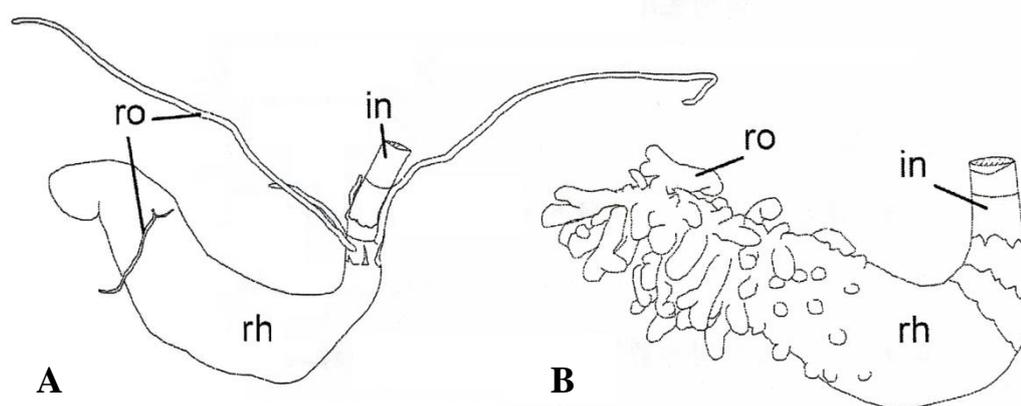


圖 3 赤箭屬物種根部形態。A 一般赤箭屬物種的根部結構。B 珊瑚狀短根生長於地下莖中後段。根(ro); 地下塊莖(rh); 花序基部(in)。

赤箭屬物種之根部是由花序軸與莖交界處生長出輻射狀的細長的長根，長度可延展至 10 cm，直徑約 1mm，有時地下莖中段也會長出長根，但少見 (Hsu, 2008)。而其中 *G. elata* 與 *G. javanica* 尚未觀察到其根部結構。赤箭屬物種中，最特殊的根部結構為 *G. flvailabella*，由地下莖之中下段生出密集的珊瑚狀短根，長度不超過 2 cm，直徑 1.5 - 2 mm (圖 3)。

赤箭屬物種的花序 (inflorescence) 皆為頂生總狀花序，種間的花序高度差異很大，可分長花序、短花序兩類。長花序類的高度大多約為 20-30 cm，其中以 *G. elata* 最高，其花序高度可超過 1 m，花朵排列間距約在 5 mm。矮花序類的高度通常在 10 cm 以下，花朵排列如撒型花序，間距較短，小於 3 mm。

一般蘭科植物基本花器構造，由外而內分別為三片瓣化花萼 (sepals)、三片花瓣 (petals) 包含一片特化的唇瓣 (lip/labellum)、中間為雌蕊與雄蕊特化合生成蕊柱 (column/gynandrium)，蕊柱包含頂端的內曲花藥 (anther) 與腹面的柱頭 (stigma)。

赤箭屬物種的蕊柱基本形態為半圓柱狀，其基部具有向下延伸的足部，與唇瓣基部之間無明顯的分隔。蕊柱頂端具有一枚花藥位於藥床 (clinandrium) 上方，花藥由藥帽 (operculate) 與傳粉體 (pollinarium) 構成，藥帽為半球狀的兩室，直徑為 1 mm。傳粉體是由兩枚無柄花

粉塊 (pollinia) 以及其基部的黏質盤 (viscidium) 所組合而成。赤箭屬的花粉塊均為不規則塊狀的花粉小塊 (massulae) 所組成的，其為黏附於柱頭的傳粉單位。柱頭位於蕊柱腹面，由兩裂片組成的。柱頭與花藥之間為淺溝槽，中間有蕊喙 (rostellum) 隔開。

赤箭屬物種的花器有一特殊特徵為花被合生成筒狀，稱之花筒 (Floral tube)。大多數赤箭屬物種的花筒是由三片花萼與兩片花瓣 (不包含唇瓣) 相連合生，但末端仍有獨立部分，稱之五裂花筒 (5-lobed floral tube)。少數物種的唇瓣與其他花被合生成花筒為六裂花筒。

赤箭屬物種的果實為三心皮構成的蒴果 (capsule)。台灣赤箭屬物種的蒴果。外型為拉長桿攪球型，但蒴果成熟時各心皮從頂端裂到基部，並且是由中間與相連處裂開裂成六瓣，但每瓣的兩端仍然相連而形成燈籠狀。其顏色為褐色系列，淡褐色至深黑褐色皆有。蒴果的長度分為兩群：長果實 (長度約在 2-3.5 cm)，短果實 (長度約在 1-2 cm)。赤箭屬物種皆為直立蒴果。有些物種在花朵授粉後果梗會拉長，已發長的程度分成三類群：果梗不拉長 (長度約在 1 cm)、稍微拉長 (長度約在 10 cm 以下)、極度拉長 (長度約在 40~50 cm)。赤箭屬物種的種子均呈紡錘型，由外種皮 (seed coat) 與球型胚 (embryo) 所組成，兩端有時會彎曲。種子的長度分為兩群：短種子 (長度約在 0.6-1.3 mm)，長種子 (長度約在 1.5-2.5 mm)。

2.4 南投赤箭 (*G. nantoensis*)

南投赤箭 *Gastrodia nantoensis* T. C. Hsu & C. M. Kuo 由許天銓等人發現 (Hsu, 2008)。從他們發表的研究中，我們得知南投赤箭分布於台灣南投一帶，生長於海拔約 800-1000 m (圖 4)，其族群主要被發現生長於孟宗竹 (*Phyllostachys pubesens*) 林中。可觀察於地面的時期為開花期 (九月初至十月初) 與結果期 (九月中至十月底)，但對於其生長環境、菌根形態的細節，目前並沒有清楚了解。

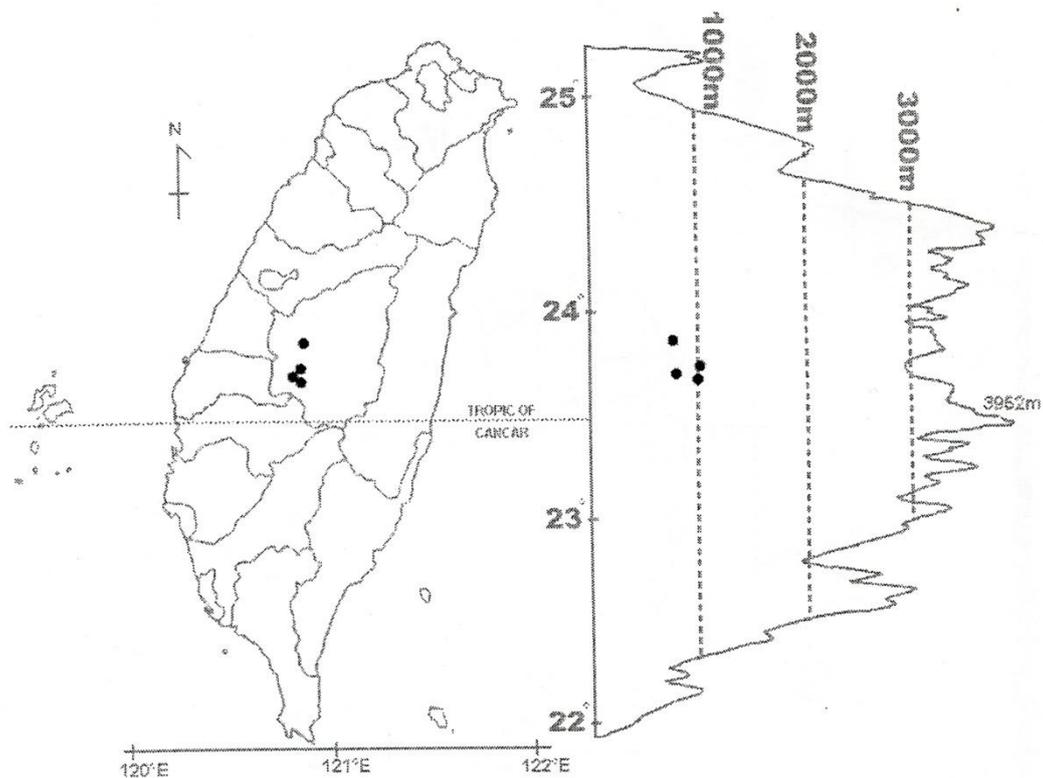


圖 4 南投赤箭於台灣分布圖。

3 蘭科植物與共生真菌之研究

3.1 文獻回顧

第一位於蘭花的根部觀察到真菌的科學家是德國植物學家 Heinrich Friedrich Link。之後 Link 在 *Goodyera procera* 的根部記錄並繪製蘭根細胞內的菌絲結構，但當時並未鑑定菌種。1853 年 Irmisch 發表非光合作用蘭 *Corallorhiza innata* 之根莖內真菌與蘭花營養關係。之後，許多科學家持續在蘭花根部觀察並研究蘭花與真菌結合的結構。1886 年 Wahrlich 研究蘭花對真菌的消化作用，亦奠定了蘭科植物普遍具有菌根。1891 年 Frank 率先以其他型菌根的營養關係，提出蘭科植物與內生菌根菌的營養作用為互惠關係 (mutualism)，內生菌根菌因特殊營養需求，幾乎不可能生存於蘭根外。1885 年德國植物學家 Albert Bernhard Frank 定義高等植物根部與真菌菌絲結合的狀態為菌根 (Mycorrhiza)。1900 年 Magnus 確定蘭科植物具有「消化區」 (digestion zones)，而在宿主細胞 (host cell) 中的真菌仍有活性 (Arditti, 1967)。

1899 年 Bernard 發現 *Neottia nidus-avis* 的種子有被真菌感染，推測蘭花萌芽必須受到真菌的感染。1909 年 Bernard 與 Burgeff 分別自蘭花菌根分離出其共生真菌，並於試管中成功合成菌根幼苗，證明萌

芽作用需內生菌根菌的協助，他們最初分離出的共生菌屬為絲核菌屬 (*Rhizoctonia*)。

在此之後，引發科學界對於蘭花與真菌的營養關係，以及菌根的細胞學、生理、生態方面的興趣。2000年，McKendrick 等人利用同位素 C^{14} 標記方法，發現由樺樹 (*Betula pendula*)、柳樹 (*Salix repens*) 和非光合作用蘭 (*Corallorhiza trifida*) 所形成的真菌菌根系統，其養分會藉有真菌將其轉移至蘭花。2006年，Cameron 等人研究顯示碳會從蘭花 (*Goodyera repens*) 藉由光合作用蘭的菌根轉移至真菌。在2007年 Dearnaley 總結了光合作用蘭花及真菌的物質交換整體情況。所有的蘭花皆需要真菌提供無機和有機的養分使種子發芽和球莖的初期生長。在成熟光合作用蘭，其氮、磷和水皆由真菌持續供給，然而供給碳為顛倒流向，由蘭花提供給予真菌，推測藉此激勵真菌定植。(Yoder et al. 2000; McKendrick et al. 2000; Cameron et al. 2006, 2007).

3.2 菌根結構 (Mycorrhiza)

Mycorrhiza 定義為高等植物根部與真菌菌絲結合的狀態。一般可將植物的菌根依生長的形態分成三大類型：(圖 5)

I. 內生菌根 (Endomycorrhizae)

i. 菌絲無隔版型 (Mycelium aseptate type)

囊叢枝菌根 (Vesicular-arbuscular mycorrhizae, VAM)

ii. 菌絲有隔版型 (Mycelium septate type)

楊梅類內生菌根 (Arbutoid endomycorrhizae)

杜鵑類內生菌根 (Ericoid endomycorrhizae)

蘭科內生菌根 (Orchid endomycorrhizae)

II. 外生菌根 (Ectomycorrhizae)

III. 內外生菌根 (Ectendomycorrhizae)

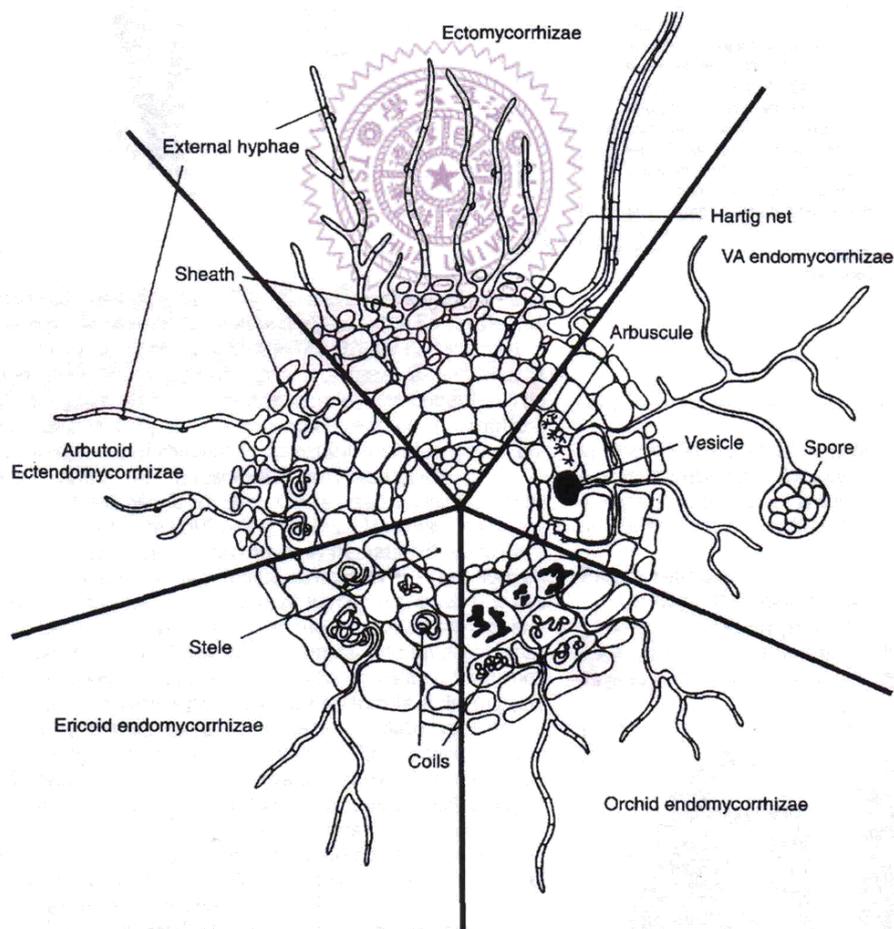


圖 5 菌根的生長形態

內生菌根的主要特徵為菌絲侵入植物根部的皮層細胞內，並且在植物細胞內部形成特殊構造，使菌絲與宿主細胞的接觸面積更緊密。囊叢枝菌根菌的菌絲一般不具隔版，在根的內皮層細胞中形成叢枝體 (arbuscule)，是屬於結合菌 (Zygomycetes)，通常無法與杜鵑花科或蘭科植物共生。杜鵑類內生菌根部的內皮層細胞，充滿菌絲捲 (hyphal coil) 且根內菌絲有隔版，屬於子囊菌。

外生菌根的主要特徵，菌根的菌絲並不侵入植物皮層細胞內，而是在表皮與皮層細胞的間隙形成哈氏網 (Hartig net) 的構造。並且在植物根部外圍有菌絲纏繞和包裹組成菌鞘 (hyphal sheath)。形成外生菌根的真菌是屬於子囊菌或擔子菌，具有隔版，包括松茸 (Matsutake)、歐洲人在森林中趕著豬或狗所尋找的塊菌 (Truffle)，皆屬於外生菌根所產生的子實體。而內外生菌根除了能在細胞間隙形成哈氏網，也同時能侵入植物細胞內，兼具內生與外生菌根的特徵，如赤楊 (Alnus spp.)。

3.3 蘭科植物內生菌根之結構 (Orchid endomycorrhizae)

蘭科植物的菌根結構可分成兩種類型：菌球消化 (tolypophagy) 及胞質逸出 (ptyophagy)。此兩種結構的形成由決定於宿主的物種，菌球消化存在於大部分的蘭科植物，胞質逸出僅存在於非光合作用蘭物種中。第一種菌根類型—菌球消化的形成過程：當真菌侵入皮層細

胞後，於細胞間擴張，延伸菌絲於細胞內形成菌絲團 (hyphal coil)，其菌絲團被宿主細胞原生質膜緊密的包附，菌絲不會破壞、貫穿細胞膜。菌絲感染宿主後僅維持數天活性，接著會崩解於宿主細胞中，形成看似結晶的結構。雖然菌球消化的超細微過程為未知狀態，Uetake 等人觀察到菌絲侵入細胞後，微管 (microtubule) 包附菌絲團，並且充滿在菌絲團內的菌絲之間，形成皮層微管系統 (the cortical microtubule system) (Uetake et al., 1997; Uetake and Peterson, 1998)。

另外 Dearnaley 等人觀察到在菌絲侵入細胞期間，微絲重組形成微絲網界於圍繞菌絲的細胞膜以及細胞壁之間，稱之為微絲系統 (the cortical actin filaments system) (Dearnaley and McGee, 1996)。這兩種系統皆穩定菌絲團運送物質予宿主細胞。

第二種菌根類型—胞質逸出的結構，可由蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 侵染高赤箭 (*G. elata*) 的根部結構得知。真菌菌絲侵入根內的皮層細胞後，橫向擴張於類似運河的皮層細胞層，並且菌絲以運送皮層細胞層為基礎向內入侵內皮層的消化細胞。當菌絲侵入消化細胞時，消化細胞會產生溶解小泡圍繞於菌絲壁表面，溶解小泡將溶解的物質釋出於此界面中，接著溶解小泡延伸形成輻射的管狀系統，之後消化細胞的內質網形成大量的消化小泡破壞菌絲壁 (Rasmussen, 1995; Wang et al., 1997)。

3.4 非光合作用蘭是否具有特定的共生真菌？

蘭科植物與真菌共生前需要突破相容性的屏障，目前這些障礙仍然是未知的，但通常無法到達物種間之階層。然而，非光合作用蘭是否如同有些動物僅掠食特定物種般，與特定真菌物種專一性共生？或者，非光合作用蘭與真菌之共生具有特定專一性範圍，即共生於物屬間之階層呢？

由目前已發表的文獻整理得知，非光合作用蘭與真菌的專一性的共生關係並非為物種間，較可能為物屬間。赤箭屬 (*Gastrodia*) 與小菇屬 (*Mycena*)、蜜環菌屬 (*Armillaria*) 有特定的專一性共生關係，高赤箭 (*G. elata*) 的萌芽階段需紫萁小菇 (*Mycena osmundicola*) 共生，植株成熟需蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 共生 (Kusano., 1911; Lan et al., 1994; Lan et al., 1996)。其他赤箭屬的物種也能與小菇屬和蜜環菌共生，如：八代赤箭 (*G. confuse*) -小菇屬真菌；*G. cunninghamii* —*Armillaria mellea* (Campbell., 1962; Ogura-Tsujita Y., 2009) (表 3)。

表 3 非光合作用蘭與其共生真菌物種之對照表

Orchid species	Dominant mycobiont taxa present	Country of study	Author and year of publication
<i>Cephalanthera austinae</i> (A.Gray) Heller	<i>Thelephoraceae sp.</i>	USA	Taylor & Bruns. (1997)
<i>Corallorhiza maculata</i> (Rafin.) Rafin.	<i>Russulaceae spp.</i>	USA	Taylor and Bruns (1999)
<i>Corallorhiza maculata</i> (Rafinesque) Rafinesque	Russulaceae	USA	Taylor et al. (2004)
<i>Corallorhiza mertensiana</i> Bongard	<i>Russulaceae spp.</i>	USA	Taylor and Bruns (1999)
<i>Corallorhiza sp.</i>	Russulaceae	USA	Whitridge and Southworth (2005)
<i>Dipodium hamiltonianum</i>	Russulaceae	Australia	Dearnaley and Le Brocque (2006)
<i>Dipodium variegatum</i>	Russulaceae	Australia	Bougoure and Dearnaley (2005)
M. Clements & D. Jones			
<i>Epipactis microphylla</i>	Tuberaceae, Sebacinaceae et al.	France	Selosse et al. (2004)
<i>Epipogium roseum</i>	Coprinaceae	Japan	Yamato et al. (2005)
(D. Don) Lindl.			
<i>Erythrorchis cassythoides</i>	Russulaceae, Sebacinaceae et al.	Australia	Dearnaley (2006)
<i>Erythrorchis ochobiensis</i>	<i>Lentinula edodes</i>	Japan	Umata. (1998)
<i>Eulophia zollingeri</i>	Psathyrellaceae	Asiatic	Ogura-Tsujita Y. (2008)

<i>Galeola altissima</i> (Bl.) Bl.	<i>Erythromyces</i> <i>crociareas</i>	Japan	Umata. (1995)
<i>Galeola septentrionalis</i> Reichb.f.	<i>Armillaria jezoensis</i>	Japan	Cha and Igarishi (1996)
<i>Gastrodia confusa</i>	<i>Mycena</i>	Japan	Ogura-Tsujita Y. (2009)
<i>Gastrodia cunninghamii</i>	<i>Armillaria mellea</i>	New Zealand	Campbell. (1962)
<i>Gastrodia elata</i>	<i>Armillaria nabsnona</i>	China	Haruo et al. (2008)
<i>Gastrodia elata</i> Bl.	<i>Armillaria mellea</i>	China;Japan	Lan et al. (1994); Kusano. (1911)
<i>Gastrodia elata</i> Bl.	<i>Mycena osmundicola</i> Lange	China	Lan et al. (1996)
<i>Gastrodia sesamoides</i>	Marasmiaceae	Australia	Dearnaley et al. (2009)
<i>Hexalectris revoluta</i> Correll	Sebacinaceae	USA	Taylor et al. (2003)
<i>Hexalectris spicata</i> var. <i>arizonica</i>	Sebacinaceae	USA	Taylor et al. (2003)
<i>Hexalectris spicata</i> (Walt.) Barnh.	Sebacinaceae	USA	Taylor et al. (2003)
<i>Neottia nidus-avis</i>	Sebacinaceae	Germany	McKendrick et al. (2002)
<i>Neottia nidus-avis</i>	Sebacinaceae	France	Selosse et al. (2002a)
<i>Neottia nidus-avis</i> (L.) Rich.	Sebacinaceae	Britain	McKendrick et al. (2002)
<i>Rhizanthella gardneri</i> Rogers	<i>Thanatephorus gardneri</i> Warcup nom dub.	Australian	Warcup. (1991)

4 蘭科植物無菌播種培養

蘭科植物的種子由種皮與胚所構成，未分化的胚具有約一百個細胞，其缺少胚乳，即缺少發芽時所需要的營養。在自然界中，蘭科植物都由真菌侵染，誘使種子發芽，當然一般人普遍認為蘭科植物發芽必須配合蘭菌才能使其發芽生長。最初蘭花的人工培養方法很簡單，將種子播於蘭花母盆內，藉由母盆內的真菌使其生長，此方法雖然簡單，但缺點為種子發芽率低，發芽的種子也參差不齊。直到 1922 年美國康乃爾大學 Prof. Knudson 提出真菌可分解種子內的澱粉，戊聚醣，極可能產生刺激生長的化合物藉以刺激萌芽。並且發現將必需的養分如糖以直接吸收的方式供給蘭花種子，使其於無菌環境下萌芽生長。之後 Knudson 再進一步發明了無菌播種法，此方法僅需注意種子消毒問題以及培養基的配方。

4.1 種子消毒問題

Spmmer 和 Caldas(1981)提出消毒的基本做法，先以清水沖洗 1-2 小時，再用消毒溶液殺死無法沖洗的雜菌，使其置於容器中培養時為無菌狀態。現今常用消毒溶液的種類與濃度為 1-10 %的次氯酸鈉，配合超音波機震盪及無菌水的沖洗。

一般種子表面上附有蠟質，而消毒溶液為水溶液，因此在消毒溶

液中加入界面活性劑可破壞種皮之表面張力，使消毒溶液快速滲入種子，減少無菌播種的汙染(Durand et al., 1975; Bennett et al., 1982)。

4.2 培養基組成

培養基組成可分為兩類：高鹽類培養基（如 MS、B5、SH）和低鹽類培養基（如 White）。高鹽類培養基有利於體胚成長，低鹽類培養基有利於擬胚化懸浮培養（Mouras et al.,1980）。現今最常用的基本培養基配方為 MS 培養基（Murashige and Skoog, 1962），將培養基的基本成分可分為：鹽類，醣類，活性碳，其他添加物。

鹽類包含氮、磷、鉀、鈣、鎂及硫六種元素，皆為植物成長不可或缺的養分，各元素皆有其重要性。氮的來源可分為無機氮源（硝酸鹽及銨鹽）和有機氮源（胺基酸及其衍生物），於培養基中添加硝酸態氮有助於體胚培養（Reinert et al.,1967）。磷酸鹽有助於植物分化成長，且可抑制培養時所產生的二次代謝產物（Smith, 1990）。而缺少其他離子使植物成長受到抑制，缺少鉀離子，會降低 serotonin 的形成，缺鈣與鎂抑制生物鹼的生合成（Sasse et al. 1982），而提高鈣與鎂則有助於植物的生長（Goleniowski et al. 1999）。

醣類主要功能為充當碳源以提供能量，調節滲透壓。常用的醣類有蔗糖、果糖、葡萄糖及麥芽糖等。培養種子通常以蔗糖為佳，濃度

為 3 %。添加活性碳可吸附植物成長時所分泌的毒素，並抑制褐化現象。其他添加物為馬鈴薯泥、香蕉泥、椰子汁、柳橙汁及番茄汁等，常用於培養種子萌芽為椰子汁，其為椰子種子的胚乳，含有大量生長激素，可促進胚的生長，也有緩衝 pH 的功能。

5 實驗動機與目標

5.1 實驗動機

位於台灣屏東的辜嚴倬雲保種中心是台灣最大的植物保種中心，蒐藏蘭科物種數量為世界第一，於 2010 年蒐藏了 6000 種以上的蘭科物種，超過全世界蘭科物種的 1/5。但是保種中心無法保存一類型的蘭科植物—非光合作用蘭，這是最初保存非光合作用蘭的實驗動機。

保存非光合作用蘭是一項艱難的工作。由於其無可行光合作用的色素，想要培養非光合作用蘭，必須讓非光合作用蘭吸收營養成長。所以我們設想兩種方法：第一模仿以人工培養基成功繁殖蝴蝶蘭的例子，將其所需的營養製成萬用培養基，在將非光合作用蘭的種子培養於萬用培養基；第二依照自然界的規則而行，與目前成功繁殖非光合作用蘭的文獻相同。先找尋能幫助非光合作用蘭成長的共生真菌，並且於實驗室中將蘭花與真菌共同培養，使其完成生命週期。

我們從台灣的非光合作用蘭中挑選出南投赤箭，是由於其為台灣特有種，並且在南投有一穩定族群，可方便觀察植株、生態以及實驗。目前南投赤箭的相關文獻只有分類特徵，有關植株的形態，如花。對於植株的微細結構並沒有相關研究。

5.2 實驗目標

基於以上的理由，我們將實驗目標分為觀察部分與培養部分：觀察部分為觀察南投赤箭的生態環境及細微結構；培養部分為找尋可培養繁殖南投赤箭的方法：以化學培養基培養南投種子，使其生長並完成生命週期；尋找能幫助南投赤箭成長的共生菌。



三、實驗材料與方法

1 實驗材料

本研究材料為南投赤箭，來自台灣南投縣的竹林（海拔約 900 m）。

2 實驗方法

2.1 無菌播種

2008 年 10 月 24 日，從溪頭收集南投赤箭的成熟種子，在 27 日播種，為了避免種子汙染，先完全浸於 70 % 乙醇 (alcohol) 讓其表面自然晾乾，再利用 0.5 % 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite, NaOCl) 消毒種子表面 20 分鐘，再用無菌水沖洗三次以清除餘氯及界面活性劑，待無菌水滴乾之後，用消毒過之藥匙將蘭花種子由濾紙上收集起來，並加入於已定量的無菌水中。取無菌吸管吸取 0.5 ml 含有蘭花種子的溶液，使其滴在培養基上，加上蓋子，然後進行各項培養試驗。

基本培養基的成分：2.2g /1.1g MS，coconut water 10 %，sucrose 2.5 %，Agar 1 %，charcoal 1.2 %，先將培養基於高壓高溫下滅菌，裝在 90x90x15 mm³ 的 petri dish 中。

2.2 顯微鏡觀察

2.2.1 光學顯微鏡

a. 樣本之固定

將樣品裁切成體積小於 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ ，浸於混合固定液中，將含有樣品之混合固定液以真空抽氣幫浦抽氣半小時，接著使樣品於真空環境下再固定一個半小時，固定後浸於 0.1 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 15 分鐘，重複兩次。

混合固定液之配製成分：取 1 mL 4 % 戊二醛 (glutaraldehyde) 與 2.5 mL 16 % 甲醛 (para-formaldehyde) 混合，再以 0.1 M, pH=7 之磷酸緩衝液將其配製成 10 ml 的 2 % 戊二醛與 4 % 甲醛的混合固定液。

b. 乙醇系列 (alcohol series) 脫水

接著以乙醇系列脫水，依序為 20 %、30 %、50 %、70 %、80 %、90 %、100 %、100 %，每種濃度皆置換三次，各 20 分鐘。

c. 石蠟 (paraffin) 包埋

乙醇系列脫水完後，浸入二甲苯 (Xylene) 中置換乙醇 20 分鐘，重複三次。再以熔融狀態的石蠟置換二甲苯，重複三次，最後使石蠟凝固並完成包埋。

d. 石蠟切片

將已包埋樣品的石蠟塊修整成梯型，利用迴轉式切片機切出薄片，使切片於 45°C 的溫水浴中展開，並排列整齊於玻片上。

e. 脫蠟染色

將附有切片的玻片浸於二甲苯 10 分鐘，重複兩次。再以乙醇系列 100 %、95 %、80 %、70 %，各 10 分鐘，然後用二次水浸泡 10 分鐘，接著以染劑染色，染色完浸於 95 % 乙醇、100 % 乙醇各 10 分鐘，再浸於二甲苯 10 分鐘，重複兩次。風乾後蓋上蓋玻片並用阿拉伯膠封片，等阿拉伯膠凝固後即可在光學顯微鏡下觀察。



2.2.2 掃描式電子顯微鏡

a. 樣本之固定

與光學顯微鏡樣本處理流程之第一步驟一樣本固定相同。接續之第二步驟，浸於固定溶液兩個小時，固定後浸於 0.1 M 磷酸緩衝液 15 分鐘，重複兩次。

固定溶液之配製成分：以 0.1 M，pH = 7 之磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 將 2 % 四氧化鐵 (osmium tetroxide) 配製成 1 % 的四氧化鐵固定溶液。

b. 乙醇脫水

與光學顯微鏡樣本處理流程之第二步驟－乙醇脫水系列相同。

c. 臨界點乾燥

以液態二氧化碳使用做臨界點乾燥(Critical point dryer, Hitachi HCP-2)，以雙面膠或阿拉伯膠將樣品黏於鋁台 (aluminum stub) 上，再以離子覆器(Ion Coater, Eiko Engineering IB-2)於真空下用金批膜，最後用掃瞄式電子顯微鏡 (SEM, Hitachi S-470) 觀察樣品。

2.3 共生菌之分離

a. 分離純化



首先以清水將根與地下莖之表面清洗乾淨。再浸於 1.5 % 的次氯酸鈉溶液中消毒樣品之表面 20 分鐘，包含先以超音波震盪機震盪 5 分鐘。於無菌操作下，用無菌水沖洗樣品三次。接著將樣品切成 1-2 mm 之薄片，置於濃度為 16.67 % 之無菌馬鈴薯洋菜培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 之表面上，使其生長出單一共生真菌菌種。

馬鈴薯洋菜培養基之成分：Agar 15 g/L，Glucose (Dextrose) 20.0 g/L，Potatoes 4.0 g/L。

b. 原生地鈎菌

將成熟種子放入 2.5x4 cm² 不織布袋 (三邊封口)，以幻燈片外框

固定住不織布袋，並用鐵線連接於標記牌上，一標記牌連接三個不織布袋。埋於原有生長南投赤箭的附近，距離地表 1-3 cm 的土壤中。接著與分離純化真菌之實驗步驟相同。



四、實驗結果

第一部分：南投赤箭形態觀察

1 原生地生態觀察

根據發表南投赤箭的文獻，我們到實地觀察南投赤箭的植被以及生長環境，春夏之間其植被環境均被其他植物覆蓋，秋冬之間乃為南投赤箭之花期，其植被為孟宗竹葉覆蓋（圖 6）。南投赤箭之原生地土壤為孟宗竹落下的竹葉累積而成的腐植土，偏酸性（ $\text{pH}=5.6$ ），濕度大約為 50-60 %。

我們從結果期觀察南投赤箭在竹林中生長的分布。此南投赤箭大多生長於人工步道的兩旁，此步道是竹子推積成的圍牆（圖 6A），而少部分生長於竹林中的南投赤箭，沒有在距離超過竹子 1 公尺以外發現，都生長在竹子旁（圖 7）。



圖 6 南投赤箭原生地生態：A, C 秋季時原生地的植被；B, D 春季時，原生地的植被。

因南投赤箭除了花期與結果期外，無法觀察其生長狀態，為了觀察南投赤箭於地面下的生長，我們於南投赤箭之結果期隨機挑選一株植株作為觀察對象。其地下塊莖生長於土壤的表土層，大約距離地表約 1-3 cm，其植株的地下部分為兩棵相連的地下塊莖，較大地下塊莖之長度為 3 cm，較小者為 0.8 cm，自相連處以輻射狀生長出三條根，其一無碰觸到任何植物的向右延伸生長，長度為 22 cm。另一細根於沿著孟宗竹的表面向下生長，長度為 14 cm。其最特殊的根則沿著孟

宗竹的表面長出並以細根為主軸的短根串，主軸長度為 5.3 cm，每個短根長度在 0.5-1 cm 間，並與孟宗竹的表面之間有菌索相連(圖 7)。

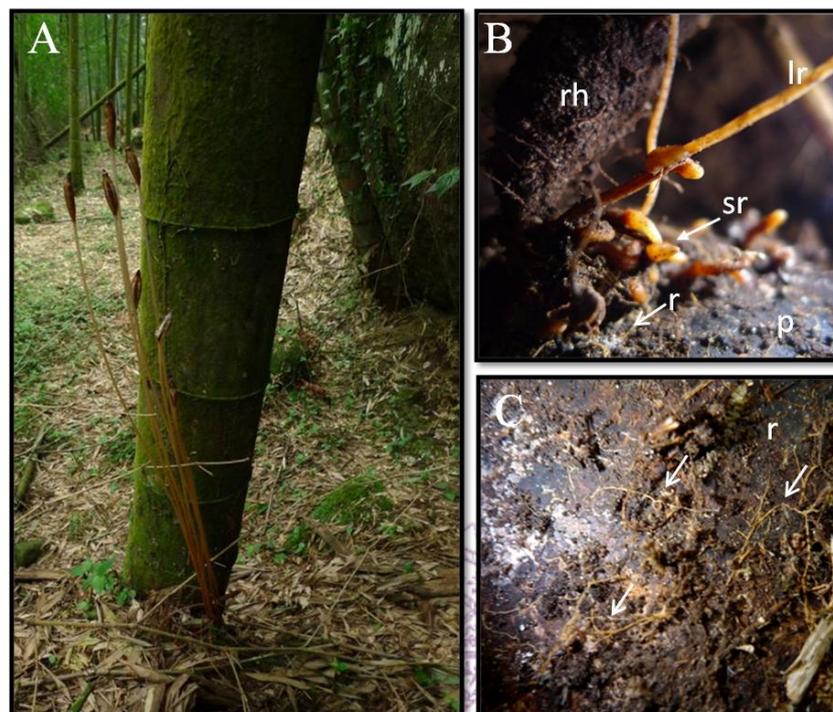


圖 7 南投赤箭植株：**A** 結果植株；**B** 植株的短根(sr)與孟宗竹的表面(p)之間以菌索(r)相連。地下塊莖(rh)、長根(lr)；**C** 孟宗竹表面的菌索(Rhizomorph, r)。

2 南投赤箭之外部形態

地下塊莖的形態為紡錘型，會多個相連一起。單一塊的地下塊莖最大長度可達到 5 cm，寬可至 2 cm，其上的節環約為 2-3 mm，地下莖表面附有單細胞毛，長度約為 1-2 mm (圖 8A, B)。

根的形態有兩種，一為纖細生長直徑約為 1-2 mm，長度可延伸

至 30 cm。另一種短根為生長於主軸長根上，其根形態為三角錐，直徑比細根稍寬約為 2-4 mm，但長度較短約為 5-10 mm（圖 8 C, D）。

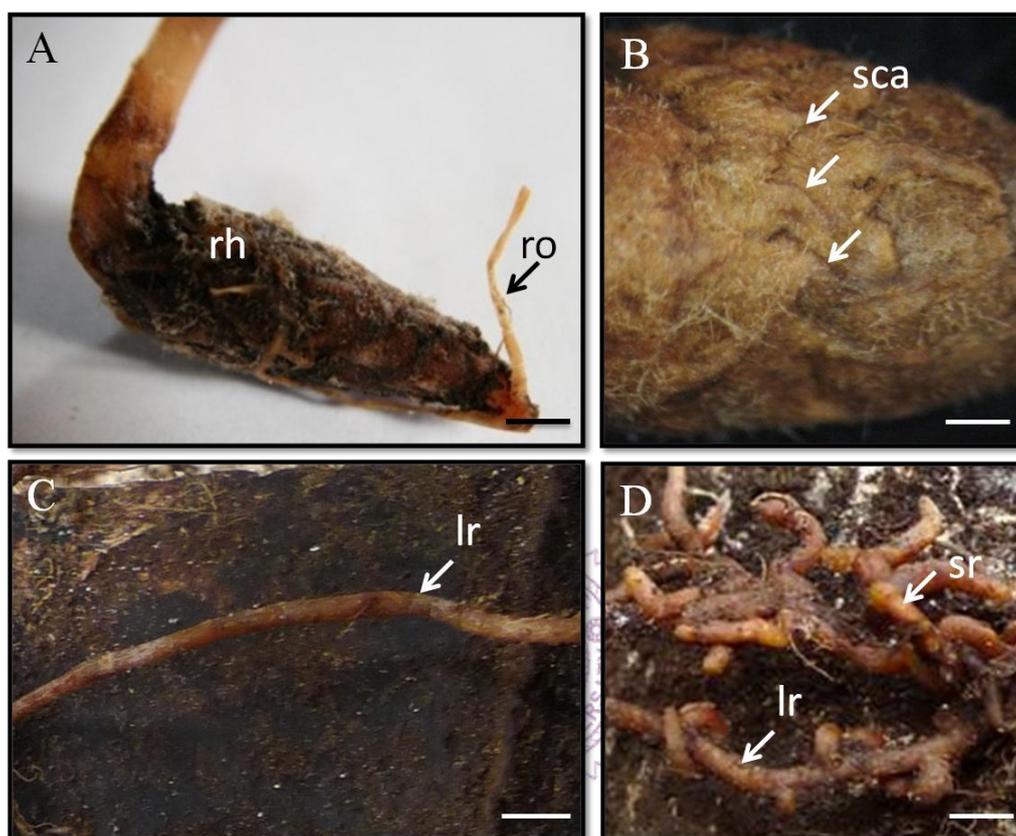


圖 8 南投赤箭之地下塊莖與根形態：A 地下塊莖(rh)末端具有輻射狀的根(ro)；B 可見地下塊莖表面具有環節，環節上有鱗片(sca)，即箭頭所指的位置；C 長根(lr)；D 生長於長根(lr)上許多的短根(sr)。Scale bars：A, C, D 5 mm; B 2 mm。

花的外型為鐘形，其形態為六裂花筒，花筒開口於頂端，已開展的花筒長度為 0.8-1.5 cm。其唇瓣與花筒合生之部分有增厚的現象，且長度較長。花瓣為卵型，長度為 2-4 mm，顏色與花萼相似。花萼

之形狀相似於平直的卵狀三角形，其內、外側面均具有許多小突起，長度均為 0.8-1 cm。南投赤箭之蕊柱長度為 5 mm，其較特殊部分為其柱頭與藥床之間的溝槽合而為一，其唇瓣失去吸引傳粉者的能力，由此可知南投赤箭為自花授粉，其花朵展開時，花粉小塊已散開且掉落於唇瓣上。南投赤箭的花柄為斜出而平展。其花序屬於短花序，高度大約為 10 cm，花短排列間距約 2-3 mm (圖 9)。

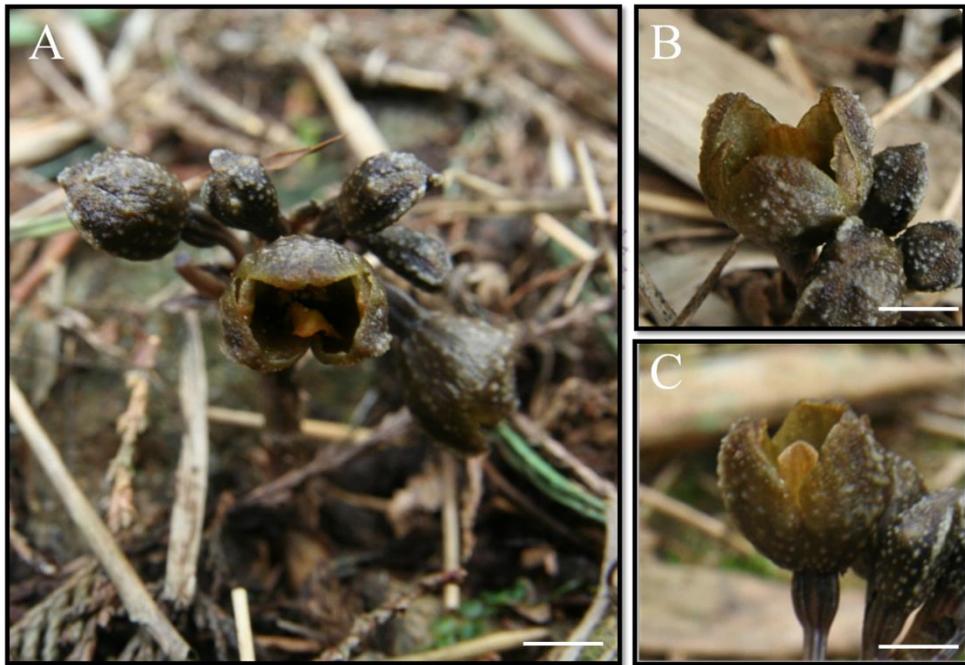


圖 9 南投赤箭花之形態：A 開花植株，中間為花朵正面觀；B 背面觀；C 腹面觀。Scale bars：A, B, C 0.8 mm。

南投赤箭與一般赤箭屬物種的蒴果形態相同。蒴果的外型為拉長桿攪球型，顏色偏淡咖啡色，蒴果成熟時期裂開成燈籠狀。蒴果為長

果實長度約在 2.5-3.5 cm，直徑為 0.7-1.2 cm，果梗於花朵授粉後伸長的程度為極度伸長（長度約在 40~50 cm）（圖 10）。

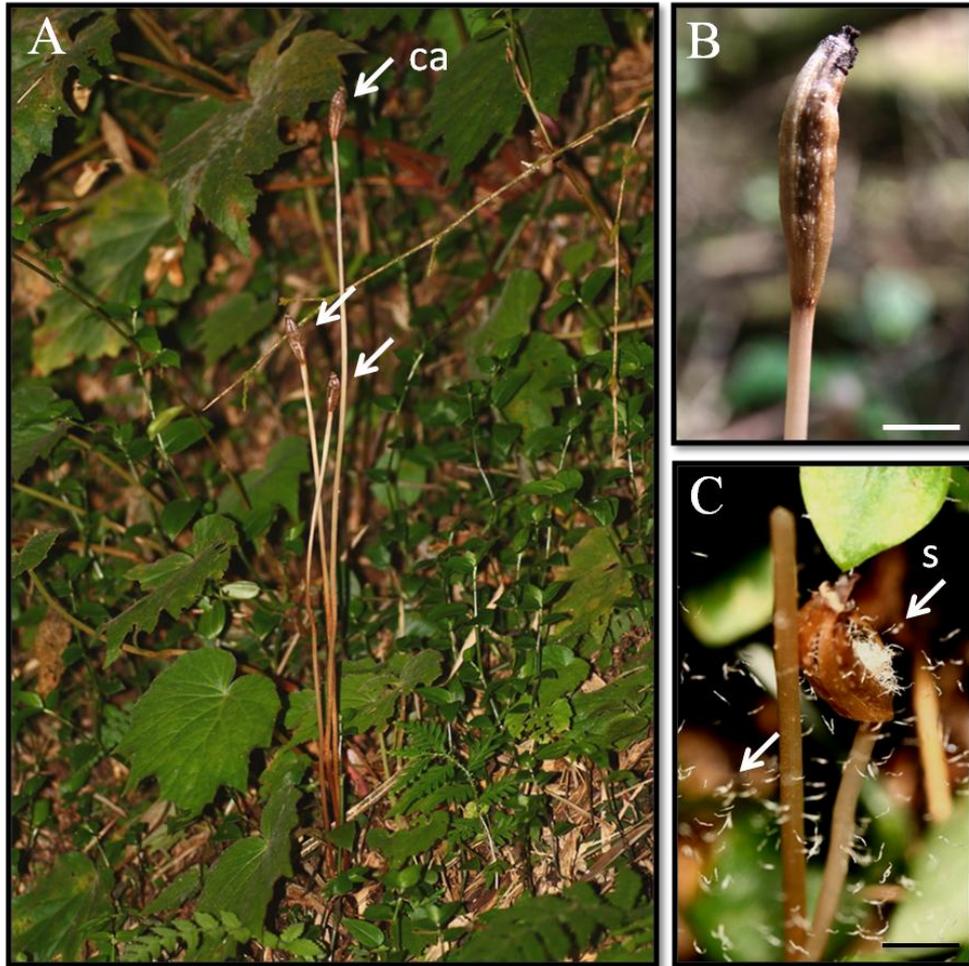


圖 10 南投赤箭之結果植株：A 成熟結果植株，其為極度拉長的果梗且具有三個蒴果(ca)；B 成熟果莢；C 成熟的蒴果內有大量的種子(s)，並散佈於環境中。Scale bars：B, C 1 cm。

而南投赤箭的種子屬於長種子類群，長度約為 1-2 mm，中間的寬度為 0.12 mm，越往兩端寬度越窄，從種子外表可觀察到細胞壁不

規則的增厚形成的紋路，內部具有胚，長度約為 100 μm (圖 11)。

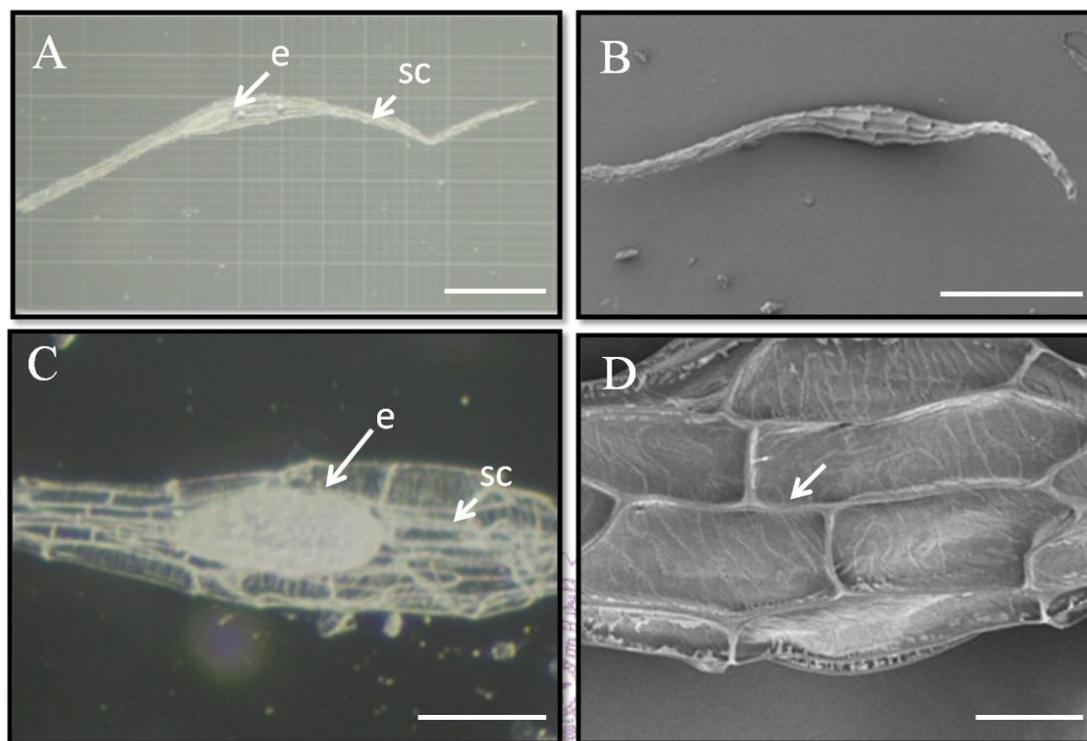


圖 11 南投赤箭之種子形態：A, C 為種子的光學顯微鏡照片，透明種皮(sc)不規則白色線條為種皮的細胞壁，種皮內部為胚(e)；B, D 為種子的掃描式電子顯微鏡(SEM)照片，箭頭所指為細胞壁增厚的紋路。

Scale bars : A, B 500 μm ; C 100 μm ; D 50 μm 。

3 真菌於南投赤箭地下組織之生存形態

選取南投赤箭的地下塊莖及短根，進行掃描式電子顯微鏡觀察其外部以及細胞內部。

3.1 地下塊莖

首先地下塊莖外部的表面觀察到入侵的菌絲、其他植物的根及菌索(Rhizomorpha) 纏繞於表面的單細胞毛中，以及與單細胞毛及菌絲糾結的土粒 (圖 12)。菌索即為真菌以菌絲聚合而成。

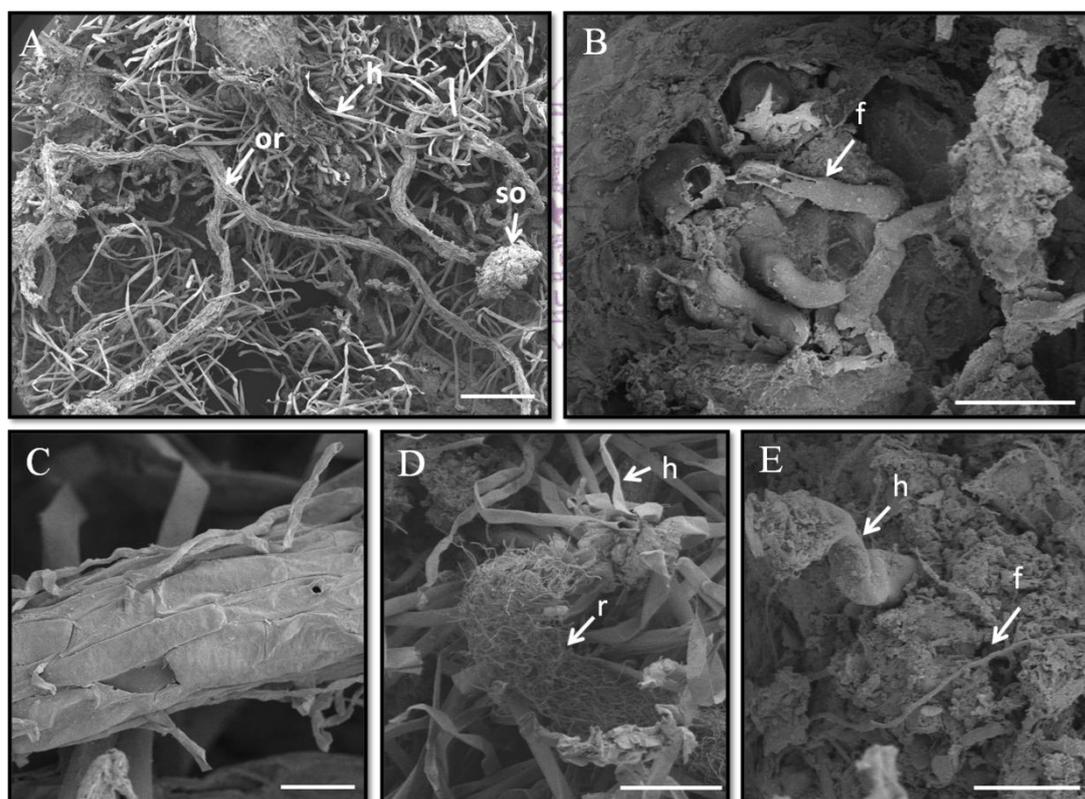


圖 12 地下塊莖外部之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 地下塊莖之表面具有單細胞毛(h)，土粒(so)及其他物種的根(or)糾纏其中；B 菌絲(f)侵入地下塊莖表面；C 其他物種的根的放大圖；D 於地下塊莖表面之菌索(r)；E 與吸收毛和菌絲糾結一起的土粒。Scale bars：A, B 100 μ m；C, E 50 μ m；D 150 μ m。

自南投赤箭地下塊莖之橫切面觀察，可見地下莖的內皮層細胞充滿澱粉顆粒 (starch granules)，地下莖的表面被菌絲佈滿，菌絲直徑為 3 μm 。而且觀察菌絲的侵入地下莖的表皮細胞，並於細胞中產生兩種大量的孢子(spore)，大孢子為桿狀，長度為 3 μm ，寬度為 1 μm ，小孢子為球狀，直徑約為 1.5 μm (圖 13)。

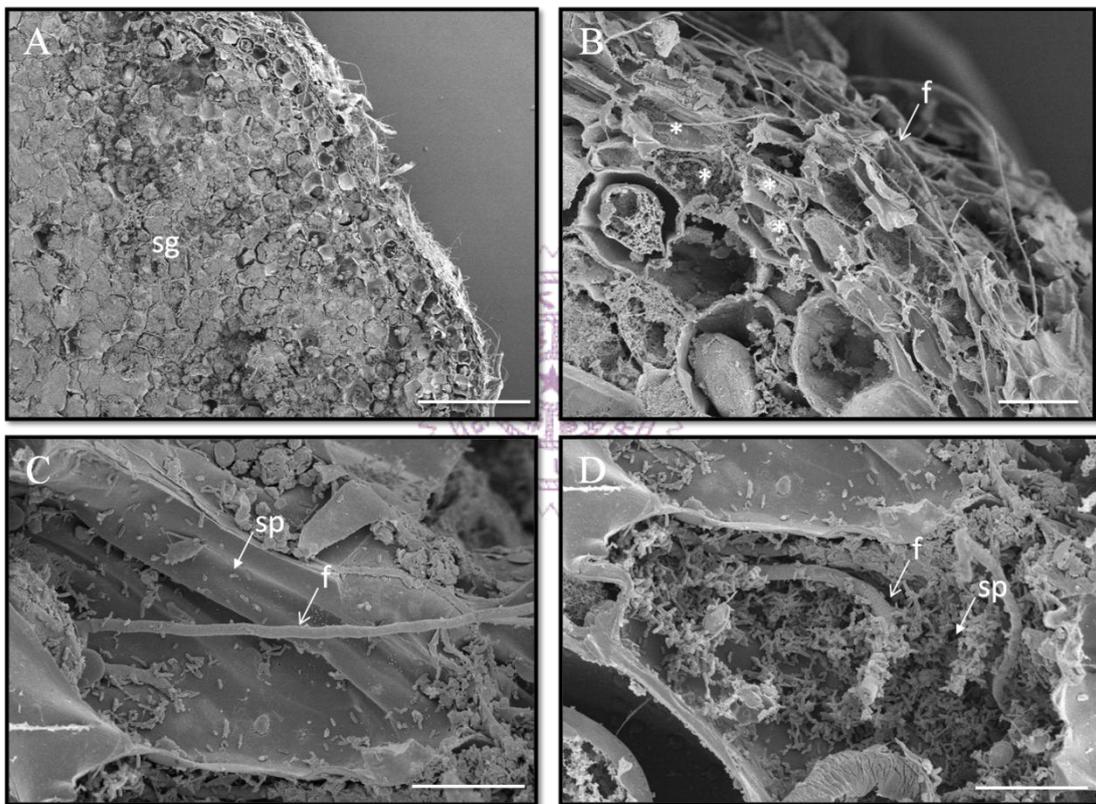


圖 13 地下塊莖內部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 南投赤箭地下塊莖之橫切面，內皮層細胞充滿澱粉顆粒(sg)；B 地下塊莖表面佈滿菌絲(f)，星星(*)代表菌絲侵染的細胞；C 菌絲(f)穿透地下塊莖的表皮細胞，並在其中觀察到孢子(sp)；D 菌絲與孢子充滿於表皮細胞中。Scale bars : A 500 μm ; B 50 μm ; C, D 15 μm 。

菌絲也侵入表皮細胞下層的皮層細胞，並在其中生長且形成菌絲團，而皮層細胞利用微管包圍菌絲團並填滿菌絲之間的空隙，用以消化菌絲，如圖 14 所示。

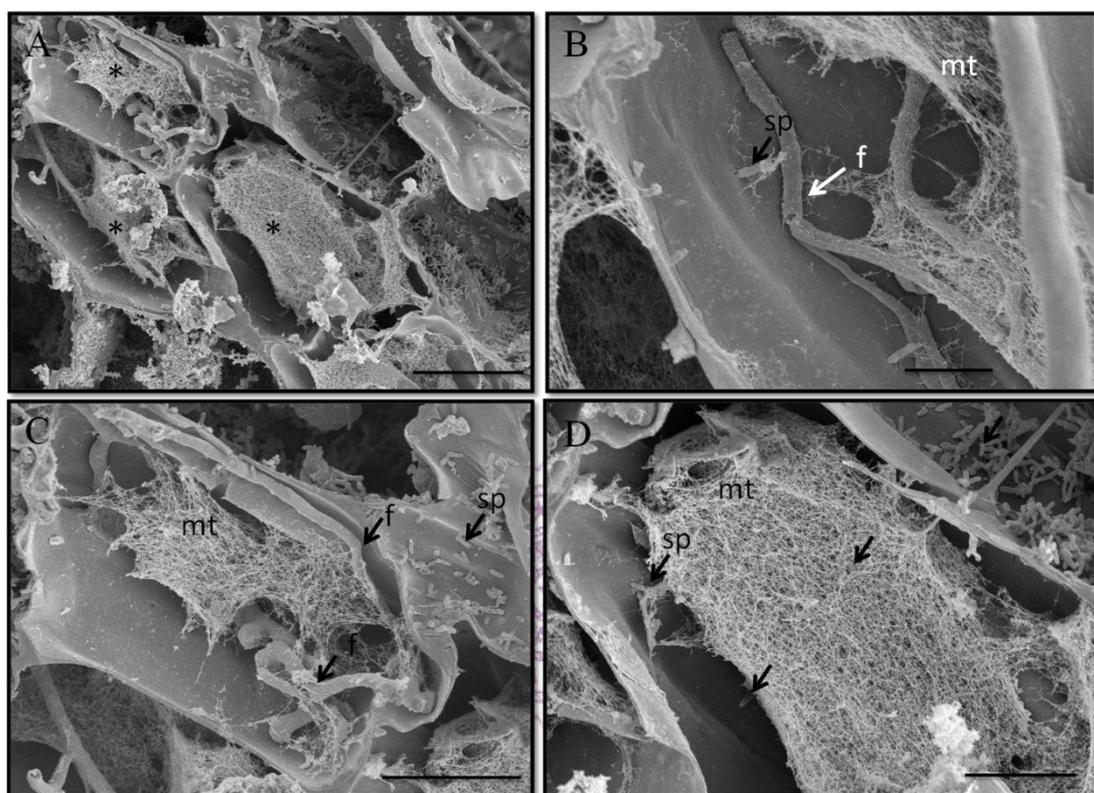


圖 14 地下塊莖內部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 靠近表面之表皮與皮層細胞，星星(*)代表具有菌絲侵入的皮層細胞；B, C 皮層細胞中具有侵入菌絲(f)，孢子(sp)以及微管結構(mt)；D 微管結構消化菌絲，可觀察到散落孢子於微管結構中，箭頭(↓)代表散落孢子。

Scale bars : A 25 μm ; B 5 μm ; C 15 μm ; D 10 μm 。

3.2 根

觀察南投赤箭的根段外部，可知真菌以菌索的形式纏繞於根段上，即為真菌以菌絲聚合而成似繩索般的中空結構，直徑約為 100 μm 。當菌索接觸根段時，菌索展開於根段表面，藉此增加與根段的接觸面積，而且菌索也會將其他植物的根與南投赤箭根段纏繞一起(圖 15)。

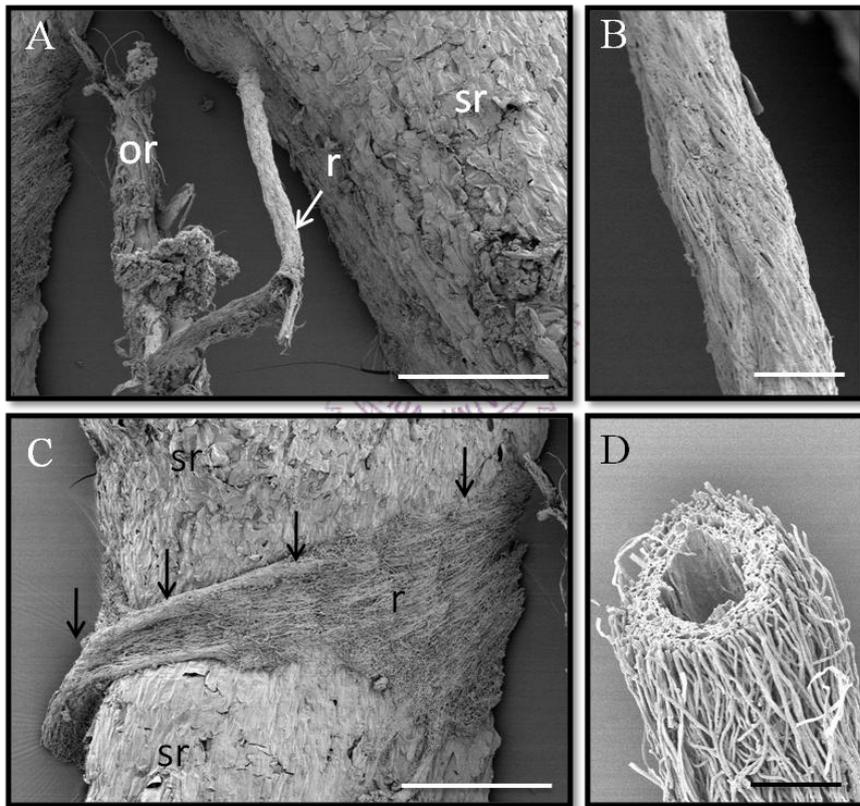


圖 15 菌根外部形態之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 菌索(r)將南投赤箭根段(sr)與其他植物的根(or)纏繞一起；B 菌絲聚合而成的菌索；C 菌索(r)纏繞並展開於根段(sr)，箭頭(↓)代表纏繞並展開的菌索；D 菌索之橫切面，其為中空結構。Scale bars：A 0.5 mm；B 100 μm ；C 0.5 mm；D 50 μm 。

觀察南投赤箭根段之橫切面，可知菌索纏繞於根段後，以菌絲穿透根段的表皮細胞，並向內侵入且延伸形成菌絲團(圖 16)。菌絲於根內生長方向可分為橫向和縱向，縱向侵入為菌絲自表皮細胞開始向內入侵至皮層細胞，可達到第四層皮層細胞(圖 17A)。橫向延伸為菌絲縱向侵入後，在第三層的皮層細胞橫向擴展形成菌絲團，並且以此層細胞為根基向內入侵(圖 17B)。

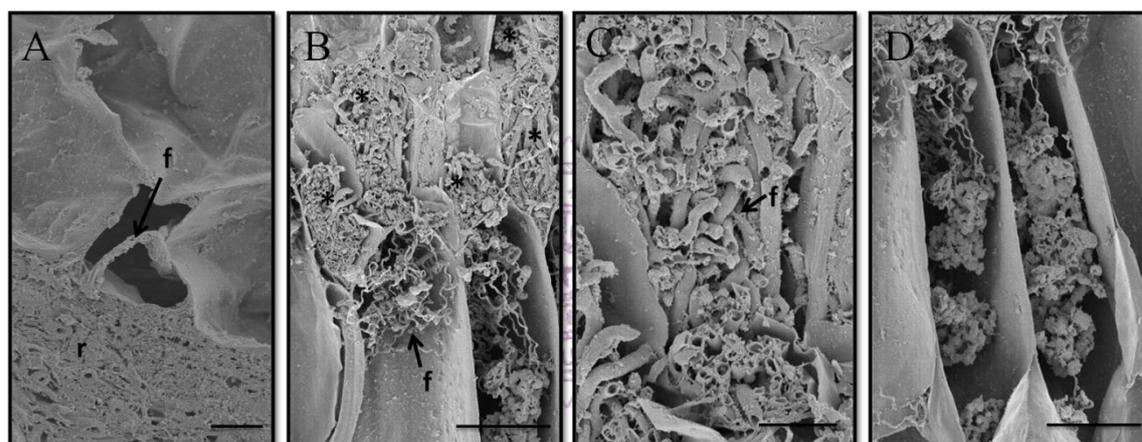


圖 16 菌索纏繞根段切面之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 在菌索(r)纏繞的根段，菌絲(f)侵入表皮細胞；B 菌絲(f)由表皮侵入於皮層細胞，形成菌絲團，星星(*)代表已於皮層細胞中形成的菌絲團；C 菌絲填滿皮層細胞中；D 菌絲侵入下層細胞。Scale bars：A 10 μm ；B, C, D 50 μm 。

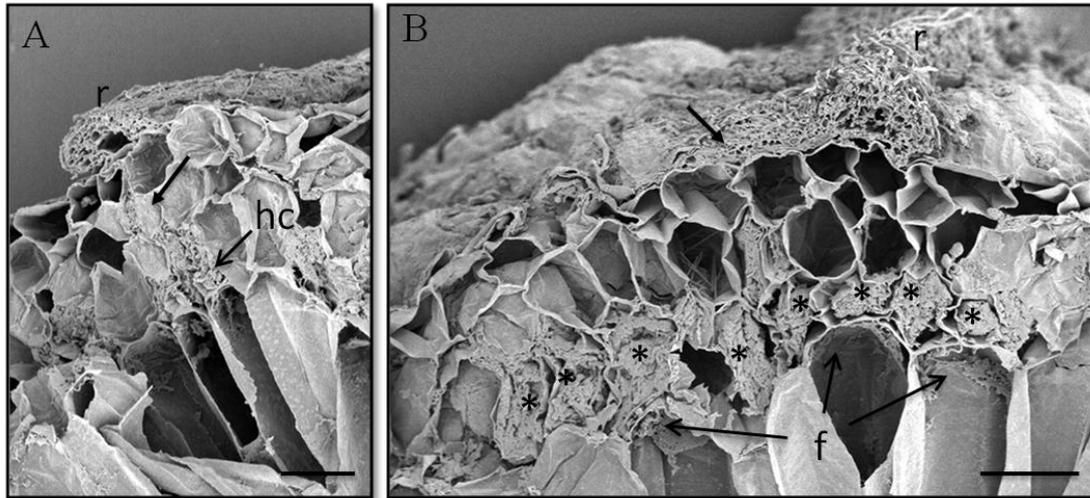


圖 17 菌絲於根部侵入方向之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 菌索(r)纏繞並以縱向入侵根部，於皮層細胞內形成菌絲團(hc)；B 真菌在第三層細胞橫向擴展，並以此層細胞為根基利用菌絲(f)向內入侵。箭頭(↓)代表真菌縱向侵染根段的路徑，星星(*)代表已於皮層細胞中形成的菌絲團。Scale bars：A, B 50 μm 。

第二部分：人工繁殖南投赤箭

1. 無菌播種

自無菌播種後的第 6 週，南投赤箭種子的種皮開始有膨大的現象。第 8 週，種子的胚生長膨大以至突破種皮(圖 18)，發芽率為 1.02 %。第 10 週，種子的發芽率達到 1.30 % (表 4)，有些種子的胚也成長為直徑 0.4 mm，進入魚雷型胚階段。此時種子成長停滯，胚的表面呈黃色。為了改善種子成長，我們改變了培養基的配方(表 5)。自改變培養基後的 8 週，觀察種子在 10 種培養基上的成長變化，發現胚的表面顏色從黃色變成淡黃色，但胚無明顯的成長，直徑仍約為 0.4-0.5 mm，如圖 18 所示。



表 4 南投赤箭種子之成長發芽率。

Number of weeks after seed sowing	8	10	12
Seed germination rate	1.02%	1.15%	1.30%

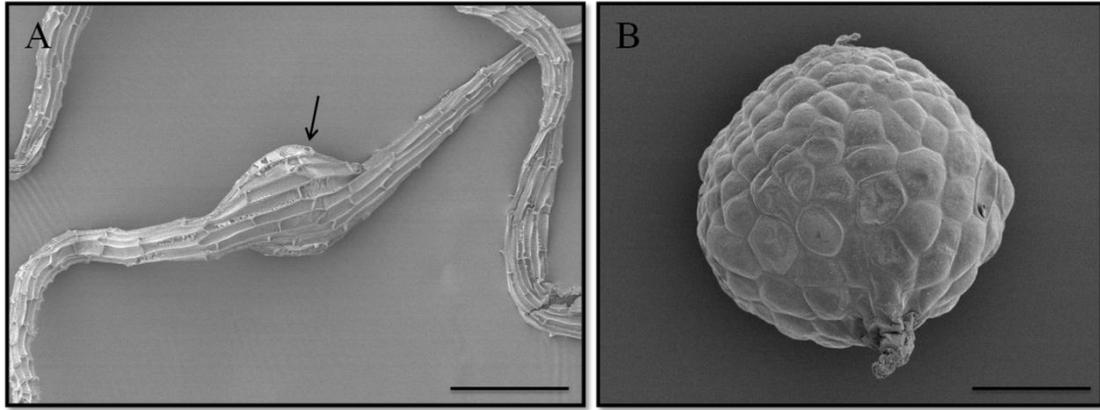


圖 18 南投赤箭成長的種子之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：**A** 6週，箭頭(↓)代表膨大的種皮；**B** 8週，突破種皮後的胚。Scale bars: **A** 250 μm ; **B** 100 μm 。



表 5 南投赤箭種子成長培養基之改變成分。

Ingredients Numbers	MS	sugar	active carbon	agar	other
A	2.2g	30g	1.2g	10g	potato 50g peel potato
B	2.2g	30g	1.2g	10g	potato 100g peel potato
C	2.2g	30g	1.2g	10g	potato 100g within pericarp
D	2.2g	60g	1.2g	10g	potato 100g peel potato
E	1.1g	30g	1.2g	10g	potato 50g peel potato
F	1.1g	30g	1.2g	10g	potato 100g peel potato
G	1.1g	30g	1.2g	10g	potato 100g within pericarp
H	1.1g	60g	1.2g	10g	potato 100g peel potato
I	2.2g	30g	1.2g	10g	coconut water 100c.c.
J	1.1 g	30g	1.2g	10g	coconut water 100c.c.

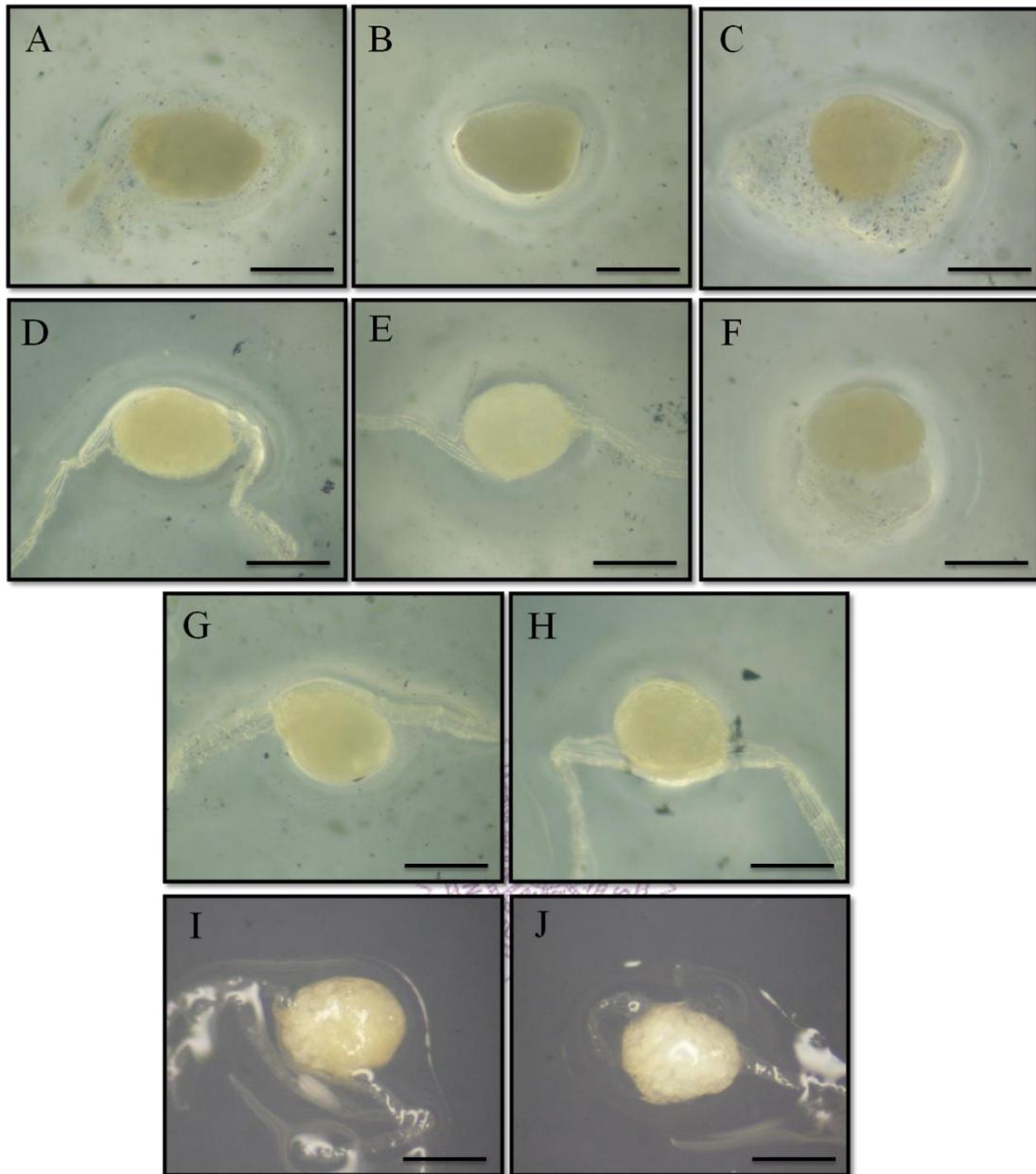


圖 19 南投赤箭成長中的種子之解剖顯微鏡照片：每張圖左上方之編號可對照至表 5 之編號。Scale bars: A- J 200 um。

2 共生菌之分離

我們參考 1993 年 Rasmussen 等人所發表的文獻來設計釣菌裝置 (Rasmussen et al,1993)。將成熟種子置入釣菌裝置中，並將南投赤箭之原生地區分成五個區 (每區的直徑大約為 1-2 m)，每區設置一個裝置，每個裝置均具有 3-4 個不織布袋，每袋裝入約 450 顆種子。

於 8 週後，回到原生地觀察釣菌裝置中種子生長狀況，其每區皆有一不織布袋被共生菌侵入，且種子有發芽的現象，即為胚長大突破種皮。從具有發芽種子的不織布袋中，選其中一袋估算種子發芽率，大約為 9.4 %。

不織布外觀上可看到有菌索以及其他植物的根侵入並穿透之。接著打開不織布袋，可見深咖啡色的菌索由外向內穿透不織布的孔隙進而侵染種子 (圖 20)。

接著，以解剖顯微鏡初步觀察釣菌種子，可看到菌絲侵入並充滿於種子的種皮腔，使原本透明的種皮呈現淡咖啡色。菌絲沿著種子的種皮侵染周圍其他種子的種皮，並使其纏繞在一起。另一種子受到菌絲侵入後，自種皮的裂口露出菌絲 (圖 21)。

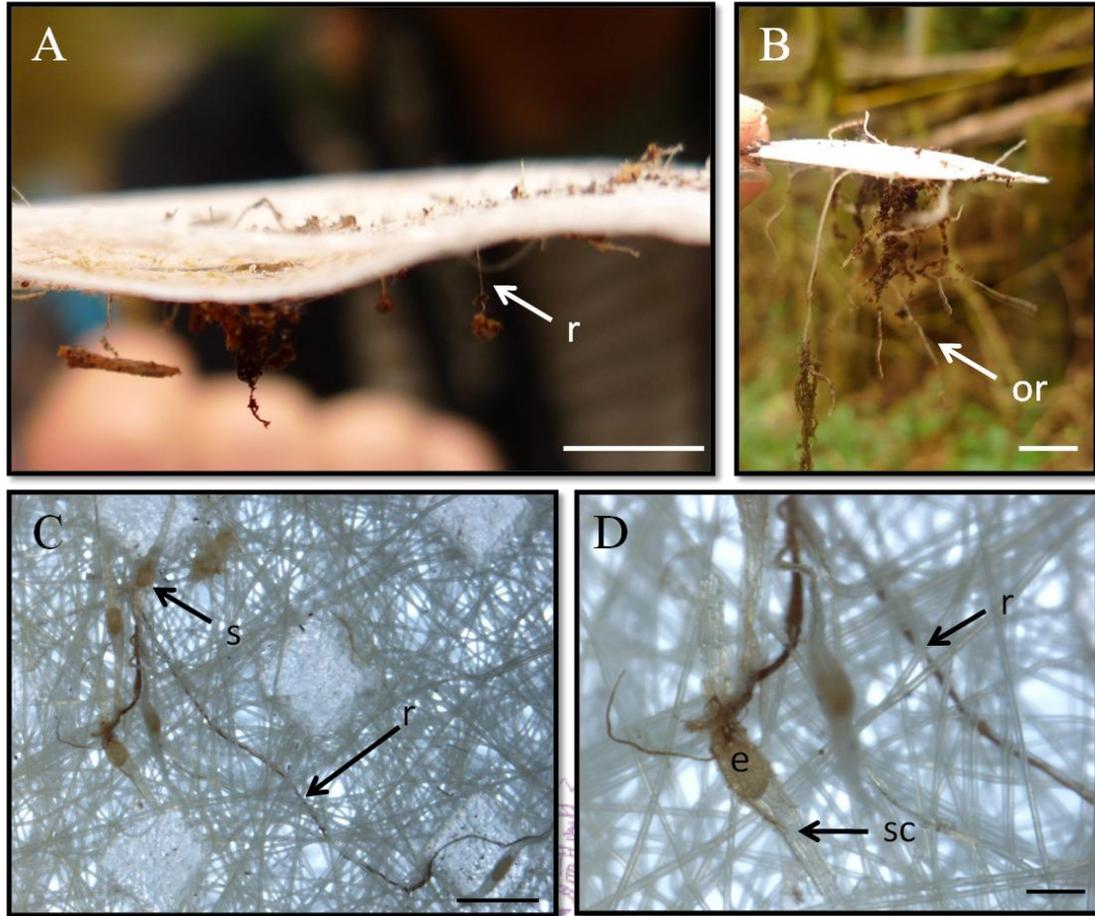


圖 20 釣菌裝置之結果：A 菌索(r)侵入不織布；B 植物的根(or)生長
 穿透不織布；C, D 菌索(r)穿透不織布的孔隙，進而侵入感染南投赤箭
 的種皮(sc)和胚(e)。Scale bars：A, B 1 cm; C 1 mm; D 100 μm。

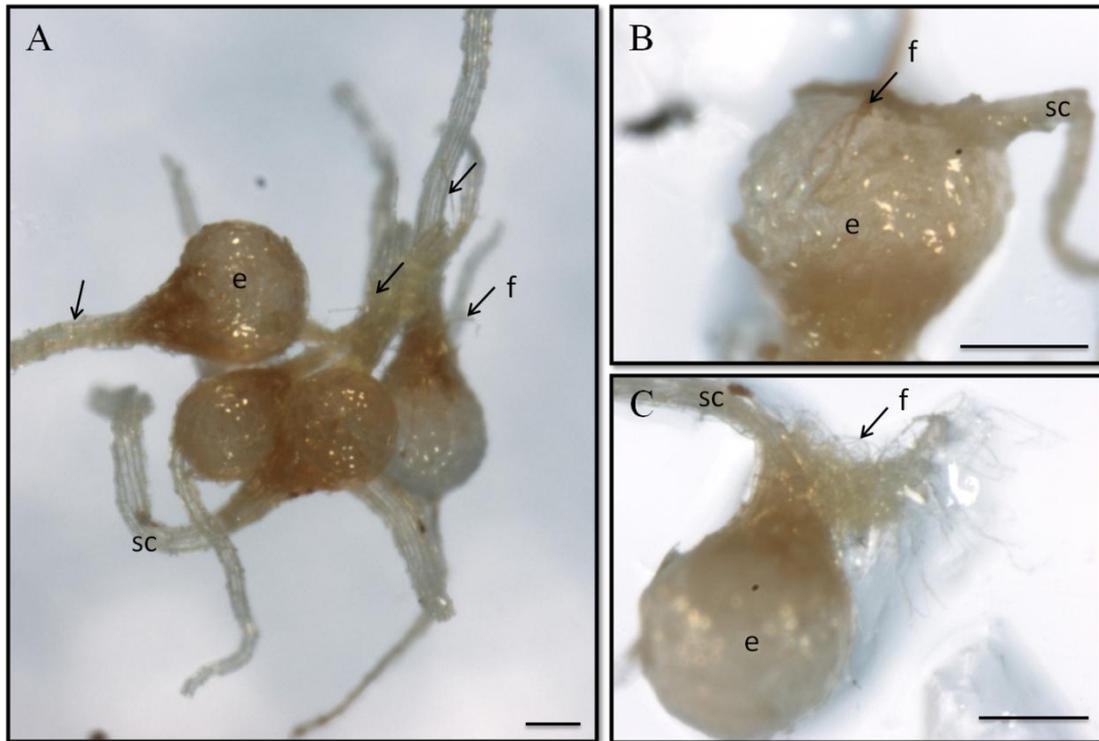


圖 21 鈎菌種子之解剖顯微鏡照片：A 菌絲(f)侵入種子的種皮(sc)和胚(e)後，藉由種子的種皮將周圍種子纏繞一起；B 菌索侵入種子；C 菌絲侵入種皮和胚，胚生長突破種皮後，菌絲由種皮裂口露出。箭頭(↓)代表真菌菌絲。Scale bars：A, B, C 100 μm。

以掃描式電子顯微鏡觀察菌絲之侵染途徑。菌絲由種子正上方的尖端部位侵入胚中，在種子其他部位並沒有發現菌絲的蹤跡。而菌絲藉由種皮侵染周圍的種子(圖 22)。仔細觀察種子的表面及細胞內部，由圖 23 鈎菌種子橫切面得知，菌絲佈滿於種子的表面，並由種子正上方的尖端部位侵入種子內部，而得以往下侵染至第三層細胞形成菌絲團；在種子的頂端其餘細胞中，我們並無觀察到入侵菌絲。

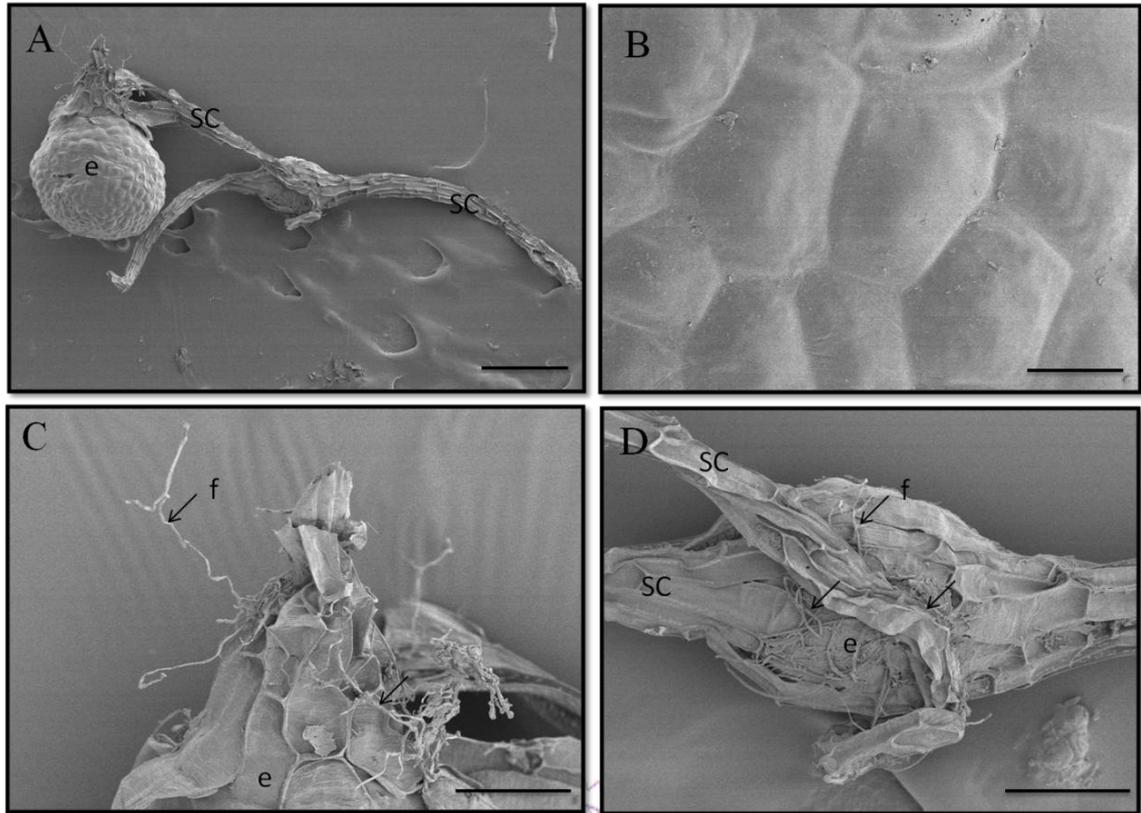


圖 22 釣菌種子之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：A 菌絲(f)侵入種子後，將周圍種子纏繞於一起；B 胚的表面；C 種子正上面的尖端部分的種皮裂口露出菌絲；D 菌絲藉由種皮(sc)侵染另一種子的胚(e)。箭頭(↓)代表真菌菌絲。Scale bars：A 250 μm ；B 25 μm ；C, D 100 μm 。

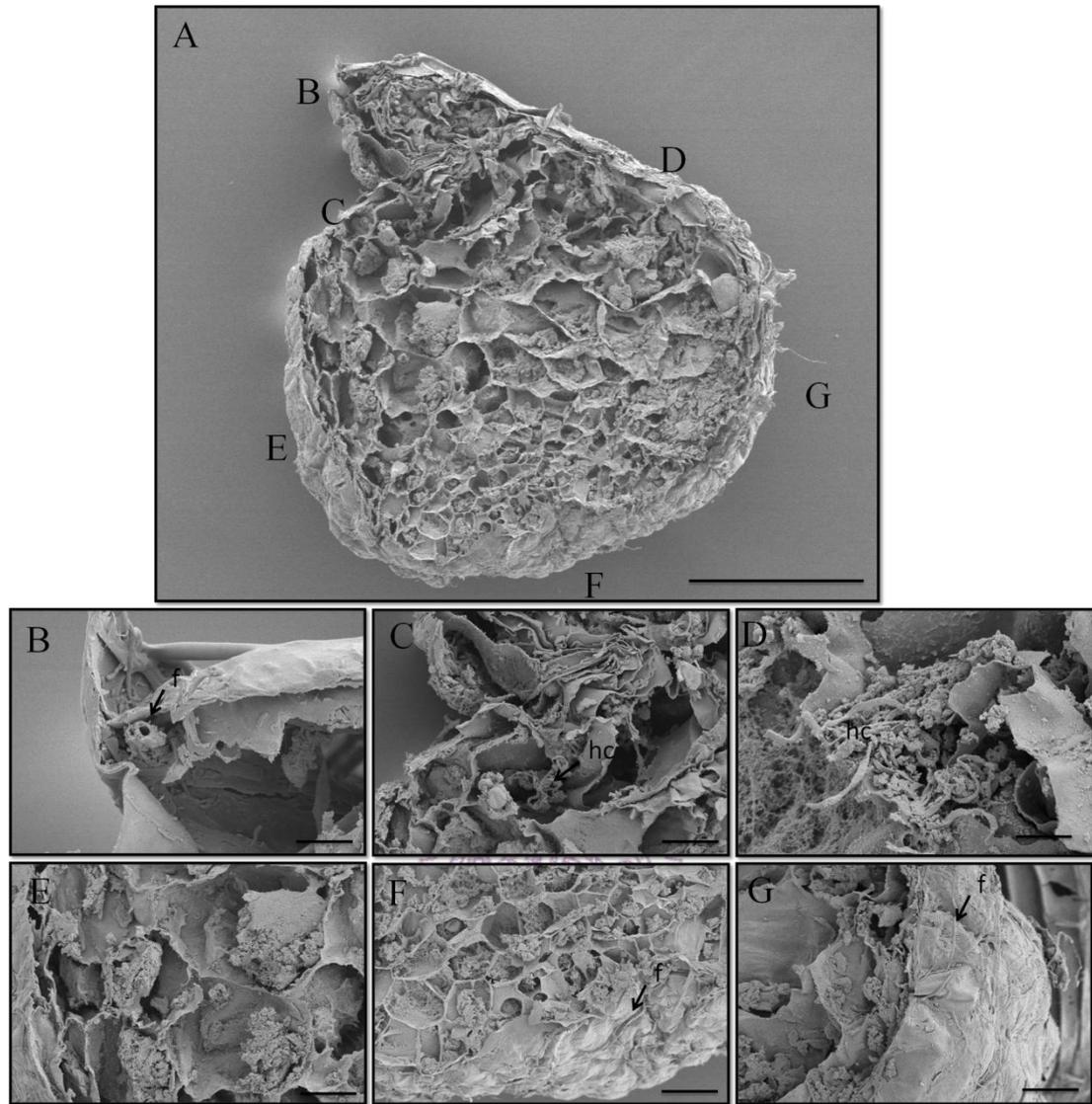


圖 23 釣菌種子橫切面之掃描式電子顯微鏡(SEM)照片：**A** 釣菌種子之橫切面，圖中編號對應下方的放大圖標號；**B** 種子正上方，其尖端位置為菌絲(f)的侵入點；**C, D** 種子左上方及右上方，可看見菌絲侵入細胞中並形成菌絲團(hc)；**E, F, G** 種子左下方、正下方及右下方，種子表面佈滿菌絲，但頂端的內部細胞無觀察到侵入菌絲。Scale bars：A 150 μm ；B 5 μm ；C 25 μm ；D 10 μm ；E, F, G 25 μm 。

五、討論

5.1 南投赤箭之形態探討

南投赤箭屬於小赤箭亞屬，外部形態與其他同屬物種相似，但其根部形態最為特殊，其根部生長時接觸到孟宗竹而形成短根，因短根上有菌索纏繞，推測原因為存在於孟宗竹上的真菌所導致的結果，此情形與一般赤箭屬物種所記錄的根部結構相異。

5.2 真菌於南投赤箭地下組織之生存形態探討

南投赤箭地下塊莖的細微構造：真菌以匍匐菌絲佈滿地下塊莖表面，隨機入侵地下塊莖的表皮細胞，細胞內的營養物質被菌絲消化，向內入侵至第三層皮層細胞，並於細胞內形成菌絲團，皮層細胞以微管結構包圍且消化菌絲。根的細微構造：真菌先以菌索的方式纏繞根部，之後菌絲侵入至根的第三層皮層細胞，於細胞內形成菌絲團後以此層細胞為根基往橫向侵略，以菌絲再侵入第四層細胞，不會在此層細胞形成菌絲團。

蘭科物種的菌根形態有菌球消化和孢質逸出兩種。真菌於南投赤箭地下塊莖的生存形態與蘭科物種的菌球消化較為相似

(Dearnaley and McGee, 1996)。而真菌於根部的生存形態與蜜環菌侵染高赤箭的孢質逸出相似 (Rasmussen, 1995; Wang et al., 1997)。

5.3 無菌播種探討

本實驗最初的生長培養基是參考台大農藝系鄭誠漢技正常用的蘭花培養基，而我們在確定南投赤箭為實驗材料前，嘗試尋找其他非光合作用蘭，並且利用此生長培養基培養其他的非光合作用蘭，例如：密麟長花柄蘭、小鬼蘭、皿柱蘭、烏來赤箭、閉花赤箭。我們發現在這些非光合作用蘭物種中，只有赤箭屬物種的生長反應最好，大約在三個月時種胚開始長大，並突破種皮。密麟長花柄蘭、小鬼蘭以及皿柱蘭皆沒有發芽現象。

在成熟果莢裂開前，內部的種子皆為無菌狀態。一旦裂莢後，有菌空氣進入果莢，其內部成為有菌環境。所以我們所收集的種子為裂開蒴果的有菌成熟種子。消毒種子所選擇濃度之考量因素，為如何以最小破壞力去除微生物，而不破壞種子的生命力。但種皮由單層表皮細胞所構成，容易被消毒液滲透；再加上種胚只有幾十個細胞，所以高濃度的消毒液會將種胚殺死，使其失去生命力。本無菌播種實驗所採用的條件：1-1.5%的次氯酸鈉溶液，參考與南投赤箭種子相同形態的蘭花播種實驗，以及考慮到南投赤箭種子的生長活性而定。

本實驗所配製之不同培養基組成成分如表 5 所示，培養基 I(2.2 g MS)為最為廣泛使用的基本配方，另外將 MS 含量降低 1.1 g 為(J)做為比較，進行種子生長培養，發現 10 週後種子皆進入生長停滯，外表未有明顯差異，因此將培養基 I、J 種子移至馬鈴薯培養基(A~H)表面，來促進種子進入下一階段生長期，而種子於馬鈴薯培養基兩週後開始變白。針對培養基 2.2gMS 中，去皮馬鈴薯 50g(A)與 100g(B)，對於種子的成長並無明顯效果。另外在 100g 保留薯皮之馬鈴薯(C)與去皮馬鈴薯中增加糖份含量(D)，但是結果一樣未能有效地促進種子繼續成長。而培養基 1.1gMS 的實驗結果皆與培養基 2.2gMS 相同。顯示馬鈴薯未能如預期般促進種子成長，此外，MS 的含量減半後，種子發芽的結果一樣。所以 MS 含量對種子的影響，需更進一步的實驗才能得知。

5.4 分離共生菌探討

一開始設想自野外成熟植株的地下部分分離共生菌，即為地下莖、根。其地下部分長期存活於地面以下，具有每個階段所需的共生菌，所以地下部分所分離出的真菌，不只是共生菌，還包括其他的寄生菌以及腐生菌。我們由地下部分分離出的真菌種類大多為土壤中的腐生真菌，為了縮小分離種子共生菌的範圍，因此將南投赤箭的種子當作

真菌的誘餌，設計釣菌實驗。

釣菌實驗的設計的探討，每一區所設置的位置是依照原有發現南投赤箭的位置。每個種子袋與孟宗竹有不同的距離：竹子圍牆的正下方（與竹子之間只有 5 mm 的土壤分隔）、距離竹子圍牆約為 2 cm、5 cm、7 cm。8 週後的結果，發現有發芽的種子袋皆較靠近已死亡的孟宗竹圍牆，推測孟宗竹與南投赤箭的共生菌有密切的關係，但仍需進一步實驗證明。

此釣菌方法與自地下部分分離共生菌的方法比較，其優點為縮小共生菌的範圍，真菌與種子共生之後，便可利用種子快速分離出共生菌，再以此共生菌與種子一起共生培養，繁殖南投赤箭。

共生菌侵染南投赤箭種子過程的探討，我們所觀察的侵染過程：共生菌菌絲自種子的尖端侵入，隨種子發育入侵菌絲擴展至胚的皮層細胞，並於細胞內形成菌絲團。此情形與同屬的高赤箭與其萌發菌的過程相同 (Fan et al, 1999; Fan et al, 2001)。種子的尖端為種子的基部細胞，即為與蒴果的胚座相接的位置，其可接受營養。菌絲佈滿種子的表面卻以尖端入侵種子，原因可能為此部位較脆弱。

六、結論

1. 南投赤箭外部形態與其他同屬物種相似，但在其根部形成短根，與一般赤箭屬物種所記錄的根部結構較為不同。
2. 南投赤箭中，真菌於地下塊莖的生存形態與蘭科物種的菌球消化較為相似；而真菌於根部的生存形態與蜜環菌侵染高赤箭的孢質逸出相似。
3. 組織培養方面，添加馬鈴薯未如預期促進種子進入下一階段成長；而不同 MS 含量對種子發芽結果一樣。
4. 鈎菌方法比起自地下部分分離共生菌方法，可有效縮小共生菌的範圍，並在真菌與種子共生之後，快速分離出共生菌。
5. 共生菌侵染南投赤箭種子過程，菌絲自種子的尖端侵入，隨種子發育入侵菌絲擴展至胚的皮層細胞，並於細胞內形成菌絲團。

七、參考文獻

- Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot Rev* **33**: 1-97
- Arditti J (1992) Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, Inc. pp 419-451
- Bennett IJ, Fowke LC (1982) Propagation of jarrah(*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. *Aust For Res* **12**: 232-127
- Bidartondo MI (2005) The evolution of myco-heterotrophy. *New Phytol* **167**:335–352
- Bosser J (2006) Contribution to the study of Orchidaceae from Madagascar, the Comoro islands and the Mascarenes. 35. Description of a new Oeceoclades from Madagascar, and notes on three new genera for the Mascarenes. *Adansonia* **28**: 45-54
- Bougoure JJ, Dearnaley JDW (2005) The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). *Australas Mycol* **24**: 15–19
- Burgeff H (1959) Mycorrhiza of orchids. In ‘The orchids a scientific study.’ (Ed. CL Withner) pp 361–395
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol* **171**: 405–416
- Campbell EO (1962) The mycorrhiza of *Gastrodia cunninghamii* Hook. f. *Trans R Soc New Zeal* **1**: 289–296
- Cha JY, Igarishi T (1996) *Armillaria jezoensis*, a new symbiont of

Galeola septentrionalis (Orchidaceae) in Hokkaido. *Mycoscience* **37**: 21–24

Chase MW, Barrett RL, Cameron KM, Freudenstein JV (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon, K.M., S. P. Kell, R. L. Barrett & P. J. Cribb (eds.): *Orchid Conservation*: pp 69-89. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Chen XQ, Ji JH, Lang KY, Lo YB (1999) *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* 18. Science Press, Beijing.

Chung S-W (2009) *Orchids of Taiwan*. (Vol.1, 2) 臺北市：農委會林務局

Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barrett RL (2003) *Orchid conservation: a global perspective*. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah, Natural History Publications, pp 1–24

Dearnaley JDW (2006) The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides*—is this orchid saprophytic or parasitic? *Australas Mycol* **25**: 51–57

Dearnaley JDW, Le Brocque AF (2006) Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Yellow hyacinth orchid). *Aust J Bot* **54**: 487–491

Dearnaley JDW, McGee PA (1996) An intact microtubule cytoskeleton is not necessary for interfacial matrix formation in orchid protocorm mycorrhizas. *Mycorrhiza* **6**: 175–180

Dearnaley JWD, Bougoure JJ (2009) Molecular identification of

Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoïdes*—evidence for direct orchid parasitism. Fungal Ecol; In press.

Dressler RL (1993) Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press, Portland, OR, USA

Durand-Cresswell RJ, Nitsch C (1977) Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. Acta Hort **78**: 149-155

Goleniowski M, Trippi VS (1999) Effect of growth medium composition on psilostachyinolides and altamisine production. Plant Cell Tiss Org Cult **56**: 215-218

Griesbach RJ (2002) Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. In: Janick J, Whipkey A (eds) Trends in new crops and new uses. ASHS, Alexandria, USA

Hsu, TC (2008) Taxonomy of *Gastrodia* (Orchidaceae) in Taiwan. National Taiwan University

Jones DL (1981) The pollination of selected Australian orchids. In: Lawler, L. & R. D. Kerr (eds.), Proceedings of the Orchid. Symposium. 13th International Botany Congress, Sydney. Orchid Society of New South Wales, Sydney, pp 40-43

Jones DL, Clements MA (2004) Miscellaneous new species, new genera, reinstated genera and new combinations in Australian Orchidaceae. The Orchadian Sci Suppl **14**: 1-16

Lan J, Xu J and Li J (1996) Study on the infecting process of *Mycena osmundicola* on *Gastrodia elata* by autoradiography. Acta Mycol Sin

15: 197–200

Lan J, Xu J T and Li J S (1994) Study on symbiotic relation between *Gastrodia elata* and *Armillariella mellea* by autoradiography. *Acta Mycol Sin* **13**, 219–222

Leake JR (2005) Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the “saprophytic” plant myth. *Mycologist* **19**: 113–122

Leou, CS (2000) *Gastrodia*. In: Huang, T. C. et al. (eds.), *Flora of Taiwan*, 2nd ed. **5**: 890-896. Editorial Committee, Dept Bot, NTU, Taipei

Lin, WM (2006) *A Field Guide To Wild Orchids Of Taiwan (I, II, III)*. Bookzone

Mabberley DJ (1997) *The plant book*. Cambridge: Cambridge University Press.

Maekawa, F (1971) *The Wild Orchids of Japan in Colour*. Seibundo-shinkousha, Tokyo.

Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, et al. (2009) Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytol* **184**: 668-681

McKendrick SL, Leake JR, Read DJ (2000) Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytol* **145**: 539–548

McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ (2002) Symbiotic

germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina spp.* *New Phytol* **154**: 233–247

Murashige J, Shoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 437-497

Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T (2009) Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proc R Soc Lond B* **276**: 761-767

Ogura-Tsujita Y, Yukawa T (2008) High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *Am J Bot* **95**: 93-97

Peterson, RL, Massicotte HB, Melville LH (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press, Ottawa.

Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (2005) *Genera Orchidacearum 4. Epidendroideae (Part One)*. Oxford University Press, Oxford.

Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rasmussen HN, Whigham DF (1993) Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Amer J Bot* **80**: 1374-1378

Reinert J, Tazawa M, Siminoff S (1967) Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. *Nature* **216**: 417-437

Sasse F (1982) Accumulation of B-Carbolin alkaloids and serotonin by

cell cultures of *Peganum harmala* L. correlation between plants and cell cultures and influence of medium constituents. *Plant Physiol* **69**: 400-404

Sekizaki H, Kuninaga S, Yamamoto M, Asazu SN, Sawa S, Kojoma M, Yokosawa R, Yoshida N (2008) Identification of *Armillaria nabsnona* in Gastrodia Tubers. *Biol Pharm Bull* **31**: 1410-1414

Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb Ecol* **47**: 416–426

Selosse M-A, Wei M, Jany J-L, Tillier A (2002) Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol Ecol* **11**: 1831–1844

Selosse, M-A. & Le Tacon, F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *TREE* **13**: 15-20

Smith DL, Krikorian AD (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep* **9**: 34-37

Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4510-4515

Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc*

Nat Acad Sci **94**: 4510–4515

Taylor DL, Bruns TD (1999) Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Mol Ecol* **8**: 1719–1732

Taylor DL, Bruns TD, Hodges SA (2004) Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc R Soc Lond B* **271**: 35–143

Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA (2003) Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am J Bot* **90**: 1168–1179

Tuyama T, Sugino T (1966) Notes on *Gastrodia* of Japan 3. *J Jap Bot* **41**: 339-346

Uetake Y, Peterson RL (1997) Changes in actin filament arrays in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*, induced by the symbiotic fungus *Ceratobasidium cornigerum*. *Can J Bot* **75**: 1661–1669

Uetake Y, Peterson RL (1998) Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*. *New Phytol* **140**: 715–722

Umata H (1995) Seed germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous orchid, with aphylophorales fungi. *Mycoscience* **36**: 369–372

Umata H (1998a) In vitro symbiotic association of an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, with orchid and nonorchid fungi. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* **34**: 97-107

Umata H (1998b) A new biological function of shiitake mushroom,

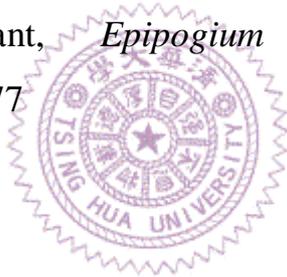
Lentinula edodes, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. *Mycoscience* **39**: 85–88

Wang H, Wang Z, Zhang F, Liu J, He X (1997) A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. *Acta Bot Sin* **39**: 500–504

Warcup JH (1991) The *Rhizoctonia* endotypes of *Rhizanthella* (Orchidaceae). *Mycol Res* **95**: 656–659

Whitridge H, Southworth D (2005) Mycorrhizal symbionts of the terrestrial orchid *Cypripedium fasciculatum*. *Selbyana* **26**: 328–334

Yamato M, Yagame T, Suzuki A, Iwase K (2005) Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience* **46**: 73–77



附錄

鑑定共生菌之方法

a. 液態培養

先將生長單一菌種的馬鈴薯洋菜培養基切成 5-10 塊（大小為 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ），置入馬鈴薯液態培養基（potato dextrose broth, PDB）培養二到四天。待真菌成長約為直徑 2 cm 的菌絲團，在無菌操作下，以無菌均質機將真菌團打碎，之後在馬鈴薯液態培養基中培養三天。然後用抽氣過濾收集真菌菌絲。接著將所收集的真菌菌絲快速冷凍於液態氮，最後將真菌冷凍塊儲存於 -20°C 冰箱中。

馬鈴薯液態培養基的成分：Glucose (Dextrose) 20 g/L, Potatoes 4 g/L。

b. 萃取 DNA (deoxyribonucleic acid)

本實驗使用 EasyPure genomic DNA Spin mini kit 純化 DNA。首先取 100 mg 的真菌菌絲置於研鉢，加入液態氮磨碎成粉末。將真菌粉末移入離心管，加入 400 ul GP1 Buffer 和 5 ul RNase A 混合震盪，接著將裝有真菌的離心管置入 65°C 的溫水浴 10 分鐘。加入 400 ul GP2 Buffer 混合震盪並置於冰桶 3 分鐘。將 Filter Column 裝於 Collection tube 上，並整個 Lyaste 移入上管的 Filter Column，以 13000 rpm 離心 3 分鐘。移去上管的 Filter Column 後，將裝有澄清液的 Collection tube 移入新的離心管，加入 1.5 倍的 GP3 Buffer 於離心管

中，使其混合震盪。將 GD column 裝於 Collection tube 上，並把 700 ul 的混合液移入上管的 GD column，以 13000 rpm 離心 2 分鐘。移去下管的液體，再以 13000 rpm 離心 2 分鐘。加入 400 ul W1 Buffer 於上管的 GD column 中，並以 13000 rpm 離心 30 秒。再加入 600 ul Wash Buffer 於上管的 GD column 中，並以 13000 rpm 離心 30 秒。移去下管的液體，再以 13000 rpm 離心 3 分鐘。將上管的 GD column 移入新的離心管中，接著滴置 100 ul 的 Elution Buffer 於 GD column 之中心，靜置 3-5 分鐘，接著以 13000 rpm 離心 30 秒，重複兩次，最後將下管離心管置於 4 °C 的冰浴中。

c. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

本實驗進行的聚合酶連鎖反應使用可控制熱循環溫度的 Master cycler 系統，聚合酶為 Taq DNA polymerase，引子(primer)為 5.8S rDNA 的 internal transcribed spacers(ITS)1。

反應條件：94 °C 5 分鐘、94 °C 30 秒、55 °C 30 秒、72 °C 30 秒、70 °C 10 分鐘、完成溫度 25 °C。

PCR 後，將追蹤染劑與 0.2 mg 的 DNA 混合，注入於 1.2 % 洋菜膠片 (5x5 cm²) 之樣品槽內，並以 70 伏特的電壓通電 40 分鐘。完成電泳後，加入 Tris-EDTA Buffer 於洋菜膠中，染色 40 分鐘，進行

DNA 電泳之觀察。之後將 DNA 送至國立臺灣大學生物技術研究中心
核酸定序分析核心實驗室定序，最後利用 NCBI (National Center for
Biotechnology Information) 網站上的 BLAST 比對 DNA 序列。



鑑定共生菌之結果

我們將南投赤箭地下部分的真菌分離，發現真菌種類大多為土壤中的腐生真菌，如地下塊莖：*Gilmaniella*、*Torula*；根部：*Xylaria*、*Trichodema*、*Phomopsis*。將地下部分可能為共生的真菌與釣菌種子所分離出的真菌進行交叉比對，結果發現兩者真菌可能為同一菌種，因此將其培養於馬鈴薯固態培養基上，觀察其菌落形態，菌落初時為白色（圖 24A），並不會產生孢子，但將其白色菌落切開後，菌落開始產生孢子，其孢子形態為圓形，直徑為 2.5 μm 。但菌落生長速度非常緩慢，歷經兩週菌落直徑僅增長 1 cm，最後菌落老化轉為淡橘色。

分離之共生菌經分子鑑定結果如圖 25，其序列經由 blast 比對得到最相近序列為青黴屬（*Penicillium*）。

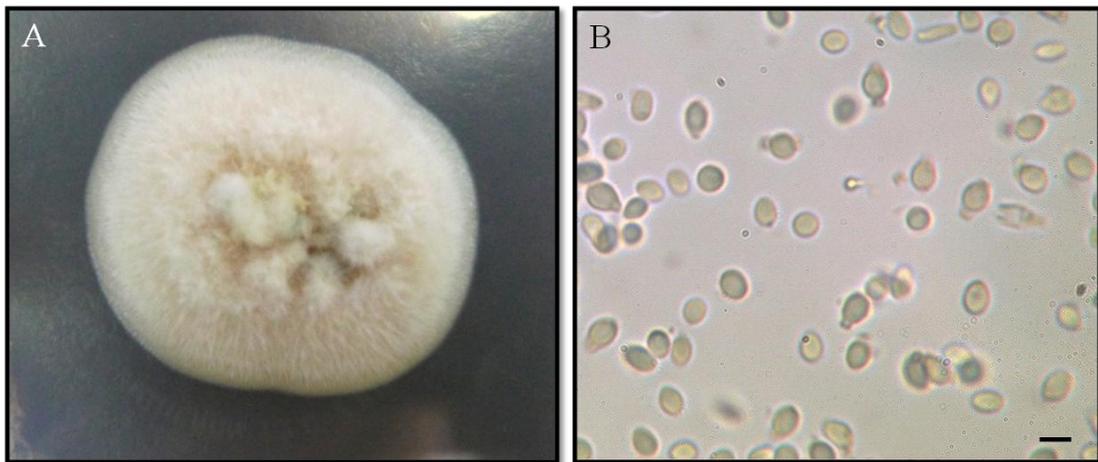


圖 24 分離之共生菌的形態：**A** 可能共生菌菌落；**B** 其孢子形態。Scale bar：**B** 2.5 μm 。

```

1 | GTTCGGGGGT GGGGGTTCA CGAGCCCAAC CCCACCCGT GTTTACCGTC
61 | ACCGCGTTGC CTCGGCGGGC CCACTGGGGC CTGACCCCGG TCGCCGGGGG
101 | GCACCTGCCC CCGGGCCCGC GCCCGCCGAA GCGCCCTGGA ACCCTGCCTG
161 | AATAGTGAGT CTGAGTGAGA TTTTGAATCA TTAAACTTT CAACAACGGA
201 | TCTCTTGGTT CCGGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAATTAAT
261 | GTGAATTGCA GAATTCCGTG AATCATCGAG TTTTGAACG CACATTGCGC
301 | CCCCTGGCAT TCCGGGGGGC ATGCTGTCC GAGCGTCATT TCTGCCCTCC
361 | AGCACGGCTG GGTGTTGAGC GCTGTCCCC CGGGGACACG CCCAAAGGC
401 | AGTGGCGGCG CCGCATCGGG TCCTCGAGCG TATGGGGCTT TGTCACCCGC
461 | TCGGGAGGGA CTCGTGCGCG CTGGTCTTCC CCAAGGCGA AACCTTCGG
501 | GGTCCGTCTT CTTTCCGTT GACCTCGGAT CAGGTAGGGC TACCCGCTGA
561 | ACTTAAGCAT ATCAATAAGC

```

圖 25 分離之共生菌 DNA 序列

鑑定共生菌之探討

分離之共生菌鑑定結果為青黴屬，但在發表赤箭屬共生菌種的文獻中，並無青黴屬菌種，甚至蘭科物種的共生菌種皆無青黴屬的記錄。推測可能有兩種結果：第一為汙染菌種，汙染可能來自於分離共生菌的過程。一般孢子生長於菌落的中央，但此共生菌的白色菌落周圍生長出綠色孢子囊；第二種可能情形為共生菌種。因高赤箭的萌發菌一小菇屬真菌，在鑑定之前也是無文獻蘭花共生紀錄，所以需要再重複分離共生菌及使其與無菌種子共同培養，方能檢測是否為共生菌。