

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系

博士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture


College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

臺灣原生蘭科植物內生真菌之分佈與其應用

**The Distribution and Application of Root Fungal
Endophytes in Taiwan Native Orchids**



鄭淑芬

Shu-Fen Cheng

指導教授：張喜寧博士

Advisor: Dr. Doris C. N. Chang

中華民國 101 年 12 月

December, 2012

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

臺灣原生蘭科植物內生真菌之分佈與其應用
The Distribution and Application of Root Fungal
Endophytes in Taiwan Native Orchids

本論文係鄭淑芬君（學號 D92628004）在國立臺灣大學園藝暨
景觀學系、所完成之博士學位論文，於民國 101 年 12 月 19 日承下
列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張喜寧

（簽名）

（指導教授）

沈偉強

劉祖惠

許朝

曾頌璇

誌謝

九年半的歲月，歷經多少個挑燈夜戰，集結多少人的幫忙，克服多少個困難，數也數不清，謝也謝不完，終於把博士論文完成了。

首先感謝張喜寧老師悉心教導、關懷、督促與包容。稿成復蒙曾顯雄教授、沈偉強教授、劉祖惠博士、許輔教授及張喜寧教授對本論文細心審閱簽正，並提供寶貴意見，使之更臻完善，陳誠教授協助內生真菌菌種的鑑定，陳右人教授、馮丁樹教授，好友 krisa 及 潔盈協助英文稿件的指正，張正博士及黃怡菁博士協助資料的收集，曹定人教授、歐潤芝教授時刻的關懷與鼓勵，謹致衷心謝忱。也要特別感謝林曜松院長、何國傑主任及郭城孟館長，同意留職停薪兩年，得以完成艱辛的課業。

試驗進行期間蒙許輔老師、徐源泰老師、沈偉強老師、王自存老師、許圳塗老師、王淑美老師慨借試驗儀器，桃園區農業改良場五峰工作站、陳義男同學、劉家源先生慨借試驗場地。謝英雄老師對於統計分析問題之解惑，余勝焜大哥、林維明先生、林信雄先生、謝東佑博士協助原生蘭科植物的採集，吳輝鏞老師及好友淑君協助實驗材料的運送，效儀、碧蓮、心慧、羅梅、怡蒂、思錦、耕生、哲佑、誠漢、淑貞、志新等之研究工作幫忙與協助，使得試驗得以順利進行。黃鏡諺博士、明治、張佳惠小姐協助圖表製作，貴貞及貴美協助論文初稿的校對，使得論文得以順利完成。

實驗室同仁玲勤、明治、柏宏、亦青、繼文、志平、瓊瑩、映齡、孟妘、佩陸、奕松、文南、君豪、博勳、元甫，在學習及實驗上相互的砥勵、切磋與協助，謹致由衷感謝。更感謝在我生命中曾經給我指導鼓勵及協助予我的人，使本論文得以順利完成，在此一併致謝。

感謝家人及周遭好友的加油與打氣，特別要感謝最支持我、疼愛我之我最敬愛的雙親，總是善體人意，處處為我著想，時時給我溫暖，在精神上及物質上給我最大的鼓勵與支持，使我能心無旁騖地兼顧工作與學業。感謝上天所賜予我的這一切，心中無限的感激。

鄭淑芬

2013年1月

於臺灣大學園藝暨景觀學系

中文摘要

為了瞭解臺灣原生蘭科植物根部內生真菌之資源，並開發其有益微生物之共生資源，本研究於臺灣北、中、南三地區，自桃園縣復興鄉東眼山、新竹縣尖石鄉及五峰鄉鳥嘴山、苗栗縣南庄、南投縣仁愛鄉春陽、嘉義縣阿里山、屏東縣大漢山等 25 處，共採集得到分屬於 34 屬之 69 種原生蘭科植物，其中包括根節蘭屬 (*Calanthe*) 10 種、豆蘭屬 (*Bulbohyllum*) 9 種，及羊耳蘭屬 (*Liparis*) 8 種等；此外，並進行根部內生真菌的分離與鑑定，共分離到內生真菌 500 餘株，經形態及分子鑑定結果顯示，以木黴菌 (*Trichoderma* spp.)、鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 及炭角菌 (*Xylaria* spp.) 等三屬真菌佔優勢，並且也分離出已有較多研究報導的絲核菌屬 (*Rhizoctonia* spp.) 之蘭菌。由此資源調查結果得知，同種類的蘭科植物分布在不同的地域環境，其根內內生真菌種類有所不同；而不同的蘭科植物種類，其根部內生真菌的種類也有所不同。

進一步地，利用本研究及本研究室過去自原生蘭科植物分離之蘭菌，進行藥用與觀賞蘭科植物，包括臺灣金線連、綬草及紅鶴頂蘭等之接種試驗，觀察其對種子發芽、種苗生長與發育之影響，並進行蘭菌與生長環境對臺灣金線連藥效之影響評估。於臺大(海拔 10 公尺)、新店(海拔 500 公尺)、新竹縣五峰(海拔 1,000 公尺)等三個不同海拔地區，以塑膠袋栽培法(plastic bag cultivation method; PBCM) 將臺灣金線連 B(原生種與紅骨種雜交)及 R(紅骨種)等兩種不同品系之盆栽，置於完全封閉的塑膠袋內，接種絲核菌屬蘭菌 R02 及 R04，結果顯示以此法栽培 7 個月之所有 B 品系及 R 品系臺灣金線連組培苗，出瓶後之成活率均在 80% 以上，且可顯著提高植株產量，又不需施用任何化學農藥。此外，種植於臺大之臺灣金線連 B 及 R 兩品系，接種 R02 蘭菌之植株均有較高的總酚類及保肝活性成分金線連苷(AFEE)之含量。

綬草種子接種發芽實驗結果顯示，絲核菌屬蘭菌普遍具有促進綬草種子發芽之能力，其中以接種生長於燕麥培養基之 R02 蘭菌，其促進發芽之效果最好，

也最穩定。接種 R02 處理者，播種後 15 天可發芽，較無菌播種者(播種後 75 天才發芽)，約可提早 2 個月發芽。將綬草種子播種於預接種 R02 15 天之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基，播種前刮除菌絲，可促進綬草種子發芽，40 天後發芽率高達 80.2%；未刮除菌絲者發芽率僅有 11.2%，而未接種者發芽率為 0%。將泥炭土與椰纖 2:1 體積比例，充分混合做為介質，種植綬草三個月有最高的成活率 100%，及較佳的營養生長；利用 20/15°C 之溫度處理 86 天，以接種 R02 者所需到花日數最短；綬草於四種不同溫度處理 86 天後，移往簡易溫室 120 天，均以接種 R15 者，可促進地上部的生長，具較多的葉數；接種 R19 者，則可促進地下部的生長，具較多的根數及較重的根鮮重；於 15/13°C 及 20/15°C 下，分別以接種蘭菌 R15 及 R19 者，可以促進綬草的生殖生長，增加其花梗數及花穗長。

紅鶴頂蘭根部接種試驗，接種不同蘭菌 R01、R02、R15、R19 結果顯示，相較於對照組，接種適當的蘭菌可顯著提高紅鶴頂蘭瓶苗之移植成活率 27-31%(R15) 及 26-30%(R02)，增加株高 6.3 公分(R15)、葉長 3.5 公分(R15)、花軸長度 10.2 公分(R19)，及每枝花軸之花朵數 3.5 朵，並增加其花的產量 (R19)。接種絲核菌 R02 的植株，其光合作用速率平均 $3.73 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，顯著高於對照組，以及並可增加葉及假球莖之總碳水化合物含量，分別為 $24.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 $90.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

綜合本研究結果得知，臺灣原生蘭科植物根部具有豐富的內生真菌資源，原生蘭科植物所在的生長環境直接影響內生真菌的多樣性，各地區的環境和氣候為影響蘭科植物內生真菌種類的重要因子，蘭科植物的種類則為次要因子。應用絲核菌屬蘭菌於蘭科植物的接種試驗，臺灣金線連利用塑膠袋栽培法，配合蘭菌的接種，種植於海拔 1,000 公尺(日夜溫 22/18°C)，可以快速大量生產無農藥的金線連，並提升其藥用效能；綬草接種蘭菌，可促進其種子發芽及營養生長，配合低溫春化及高溫處理，能促使花芽分化及花軸抽長之生殖生長；而紅鶴頂蘭接種適當種類的絲核菌屬蘭菌，亦可以增加組織培養小苗移植存活率，並藉由提高光合

作用速率，進而促進其生殖生長，增加植株之花梗與花朵數。因此，蘭菌接種技術的應用，具有保護與復育原生蘭科植物的目的，並具有開發為商業化大量生產蘭科植物之潛力。

關鍵詞：原生蘭科植物、內生真菌、臺灣金線連、綬草、紅鶴頂蘭



Abstract

To investigate the diversity of endophytic fungi in Taiwan indigenous orchids and explore the resources of symbiotic microorganisms, wild indigenous orchids were extensively collected from 25 sites in the northern, central and southern parts of Taiwan. A total of 69 orchid species belonging to 34 genera in Orchidaceae, including 10 species of *Calanthe*, 9 species of *Bulbophyllum*, and 8 species of *Liparis*, were collected. More than 500 isolates of endophytic fungi from roots were isolated. Morphological and molecular identification suggested that *Trichoderma*, *Fusarium*, and *Xylaria* spp. were predominant fungal species and *Rhizoctonia* spp., a group of endophytic fungi in orchids, were also isolated. Our surveys reveal that the same species of orchid plants from different geographic areas exhibit different microbial communities in their roots and the roots of different orchid plant species contains diverse and different endophytic fungi.

To evaluate the effects of orchid mycorrhizal fungi on the germination, seedling growth, and development of Taiwan native ornamental and medicinal orchids (including *Anoectochilus formosanus*, *Spiranthes sinensis*, and *Phaius tankervilleae*) and on the contents of active components in *A. formosanus*, orchid mycorrhizal fungi isolated from this study and prior studies in our laboratory were selected for inoculation tests. Two micropropagated lines, B and R, of *A. formosanus*, were separately inoculated with

orchid mycorrhizal fungi *Rhizoctonia* spp., R02 and R04, and grown for seven months by plastic bag cultivation method (PBCM) at three different elevations above sea level, including National Taiwan University (NTU, 10 m elevation), Xindian (500 m elevation) and Wufong (1,000 m elevation). The results showed that the survival rates for *ex vitro* growth were more than 80% and plant production was also significantly increased without the application of agrichemicals. Both lines of *A. formosanus*, inoculated with R02 and cultivated at National Taiwan University, contained higher levels of phenolic compounds and hepatoprotective agent AFEE (*A. formosanus* extraction with ethyl acetate) compared to the non-mycorrhizal control.

Seed inoculation with mycorrhizal fungi revealed that most of *Rhizoctonia* spp. tested enhanced *Spiranthes sinensis* seed germination. However, R02 isolate displayed the most effective and stable activity for promoting seed germination. The R02-inoculated seeds grown on oatmeal agar readily germinated 15 days after sowing, which was two months earlier than non-symbiotic treatment (usually germinated after 75 days). Inoculation with R02 also increased the germination rate of *S. sinensis ex vitro* seeds on potato dextrose agar. *Spiranthes sinensis* seeds sown on PDA that had been grown with R02 for 15 days showed germination rate up to a 80.2% after 40 days when the hyphae grown on the surface of PDA media were scraped off prior to seeding. Germination rate reduced to 11.2% if the hyphae were not scraped off, or to 0% in the

non-mycorrhizal control. When *S. sinensis* cultivated under 20/15 °C day/night temperature treatment, R02 inoculated samples flowered within the shortest period. When *S. sinensis* plants were grown under four different temperature conditions for 86 days and then moved to greenhouse for a 120 days, samples inoculated with R15 isolate showed the best shoot and leaf growth. On the other hand, R19 isolate enhanced the root growth of *S. sinensis*, which more root and higher fresh weight were observed. Under 15/13°C and 20/15°C day/night temperature treatments, inoculated with R15 and R19 isolates respectively, promoted *S. sinensis* reproductive growth and more and longer flower stalks were recorded.

Four orchid mycorrhizal fungi, R01, R02, R15 and R19, were further inoculated onto the roots of *Phaius tankervilleae*. R15 and R02 increased survival rates of 27-31% and 26-30% respectively; R15 increased plant height 6.3 cm and leaf long 3.5 cm; R19 also increased reproductive growth and flower stalk length 10.2 cm and 3.5 flowers per flower stalk were recorded on *ex vitro* seedlings. When the plants of *P. tankervilleae* were inoculated with R02, photosynthetic rate and carbohydrate content significantly increased.

In summary, our studies reveal that the roots of Taiwan indigenous orchids are full of rich and diverse endophytic fungi. The distribution of fungal species is directly

influenced by host growth environments. The environmental and climate conditions of specific geographic location are the most important factors, whereas orchidaceae species also influence the presence of endophytic species in their roots. Applications of identified *Rhizoctonia* spp. in different orchidaceous plants reveal dramatic effects on the vegetative and reproductive growth. R02、R04 inoculated *A. formosanus* cultivated by plastic bag cultivation method at an altitude of 1,000 m under 22/18°C day and night temperature can produce lots of agrichemical-free plants. The presence of *Rhizoctonia* sp. also enhances the medicinal effectiveness of this orchid plant. Inoculation of *Rhizoctonia* spp. (R02, R15, R19) promotes seed germination and vegetative growth of *Spiranthes sinensis*. In combination of low temperature vernalization and high temperature treatment, mycorrhizal fungi also enhance reproductive growth such as flower bud differentiation and flower stalks elongation. Inoculation of *Rhizoctonia* isolates (R02, R15 and R19) also promotes transplant survival rates of *P. tankervilleae* seedlings and increases the number of flower stalk which resulted from the increased photosynthetic rate. Taken together, exploration and application of orchid mycorrhizal fungi not only can preserve and restore indigenous orchid species, but also can be potentially adopted for commercial mass production of orchid plants.

Keywords: indigenous orchids, endophytic fungi, *Anoectochilus formosanus*, *Spiranthes sinensis*, *Phaius tankervilleae*

目錄

口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	vi
圖目錄	xiii
表目錄	xvi
縮寫表	xvii
第一章、前言、蘭科植物簡介及植物的內生真菌	
研究目的	1
蘭科植物簡介	2
植物的內生真菌	15
參考文獻	29
第二章、臺灣原生蘭科植物內生真菌多樣性之探討	
摘要	53
前言	54
材料與方法	56
結果與討論	59
結論	63
參考文獻	66
圖表	72
英文摘要	97
第三章、臺灣金線連於不同海拔地區接種蘭菌後之生長發育 及有效成分之變化	
摘要	99
前言	100

材料與方法	101
結果與討論	104
結論	108
參考文獻	109
圖表	113
英文摘要	120
第四章、絲核菌共生對綬草種子發芽之反應、構造變化與開花	
摘要	122
前言	123
材料與方法	125
結果與討論	127
結論	135
參考文獻	136
圖表	143
英文摘要	156
第五章、鶴頂蘭之生長、發育與蘭共生菌之相關性及菌根構造變化	
摘要	158
前言	159
材料與方法	160
結果與討論	163
結論	166
參考文獻	167
圖表	173
英文摘要	182
第六章、總結	183

附錄一、絲核菌屬蘭菌 R02 的形態與應用.....189

附錄二、Growth responses and changes of active components as influenced by
elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus*
Hayata.195

附錄三、Growth and development of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume when
inoculated with orchid mycorrhizal fungi.....203



圖目錄

- 圖 2-1. 臺灣原生蘭與內生真菌採集地點分布圖.....72
- 圖 2-2. 六種分離自臺灣原生蘭根部優勢內生真菌的菌落形態.....73
- 圖 2-3. 從採集自阿里山之反捲根節蘭及黃鶴頂蘭分離出之 21 株真菌菌株之
ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖.....74
- 圖 2-4. 從採集自尖石之黃根節蘭及黃鶴頂蘭，分離出之 10 株真菌菌株之
ITSr DNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖.....75
- 圖 2-5. 從採集自大漢山之阿里山根節蘭、竹葉根節蘭及細莖鶴頂蘭，分離
出之 32 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列，以鄰位相連算法計算 1,000 次
所得親緣關係樹狀圖..... 76
- 圖 2-6. 從採集自尖石及五峰之黃根節蘭，分離出之 11 株真菌菌株之
ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖.....77
- 圖 2-7. 從採集自尖石、南庄及阿里山之黃鶴頂蘭分離出之 21 株真菌菌株之
ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖..... 78
- 圖 2-8. 從採自阿里山不同質地(土壤、枯木、石壁)之反捲根節蘭分離出之 8
株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣
關係樹狀圖..... 79
- 圖 3-1. 臺灣金線連塑膠袋栽培法.....113
- 圖 3-2. 利用塑膠袋栽培法種植接種與未接種蘭菌之臺灣金線連品系(B)置於
臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)及新竹五峰(1,000 公尺)生長七個月
之生育情況..... 114
- 圖 3-3. 利用塑膠袋栽培法種植接種與未接種蘭菌之臺灣金線連品系(R)，置
於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)及新竹五峰(1,000 公尺)，生長
七個月之生育情況.....115
- 圖 3-4. 利用塑膠袋栽培法種植接種及未接種蘭菌之臺灣金線連品系(B 及 R)
置於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)及新竹五峰(1,000 公尺)生長

七個月之葉綠素讀值(CMR 值)	116
圖 3-5. 兩不同品系臺灣金線連(B 及 R)接種兩種不同的蘭菌 (R02 及 R04) ，生長於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)、新竹五峰(1,000 公尺)七個 月後酚類化合物含量之變化.....	117
圖 3-6. 兩不同品系臺灣金線連(B 及 R)接種兩種不同的蘭菌(R02 及 R04) ， 生長於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)、新竹五峰(1,000 公尺) ，七 個月後 TEAC 數值(測抗氧化能力用)之分析.....	118
圖 4-1. 綬草種子之無菌播種(NM-OMA, NM-1/2MS)及與蘭菌共生(於 OMA 培養基接種 R01, R02, R15, R16, R17, R20, R22 蘭菌)和(1/2MS 培養 基接種 R02 蘭菌)65 天之共生發芽情形.....	143
圖 4-2. 綬草種子接種蘭菌 R02 之共生種子發芽試驗，15 天(A)及 3 個月(B)之 發芽情形.....	144
圖 4-3. 綬草種子經蘭菌菌絲感染發育成原球體及其內部構造的改變.....	145
圖 4-4. 以掃描式電子顯微鏡觀察綬草種子接種蘭菌(R02)發育成原球體， 其外部菌絲侵入及感染情形.....	146
圖 4-5. 以掃描式電子顯微鏡觀察綬草種子發芽至原球體階段內部受蘭菌感 染之構造變化.....	147
圖 4-6. 綬草種植於三種不同生長介質 3 個月之成活率.....	149
圖 4-7. 綬草移入人工氣候室四種不同溫度處理 3 個月，再置於簡易溫室 2 個 月之開花情況.....	149
圖 5-1. 紅鶴頂蘭組培苗接種絲核菌屬蘭菌(R01, R02, R15, 或 R19)22 個月後 存活率之比較.....	173
圖 5-2. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類的絲核菌 26 個月後之淨 CO ₂ 吸收 率的變化.....	174
圖 5-3. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類絲核菌 30.5 個月後之營養生長與	

生殖生長.....175

圖 5-4. 紅鶴頂蘭根部受絲核菌 R02 感染 22 個月之構造經 0.05% 苯胺藍染色
之光學顯微鏡觀察.....176

圖 5-5. 以掃描式電子顯微鏡觀察紅鶴頂蘭根內部受蘭菌 R02(A-D), R15(E)及
R19(F)感染 22 個月之構造變化..... 177



表目錄

表 2-1. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌種數量及鑑定結果一覽表	80
表 2-2. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌株以傳統形態與分子方法鑑定結果一覽表	88
表 2-3. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌株以傳統形態與分子方法鑑定結果相同 相異一覽表	90
表 2-4. 採集自六個地方之六種根節蘭及二種鶴頂蘭之內生真菌代碼、鑑定結 果及數量一覽表	91
表 2-5. 分離自六種根節蘭及二種鶴頂蘭根部優勢真菌菌種統計一覽表	95
表 3-1. 培養於臺大 7 個月之菌根與非菌根臺灣金線連植株其保肝活性成分金 線連苷 AFEE 之分析	119
表 4-1. 蘭菌之分離及寄主蘭花採集資料	150
表 4-2. 綬草種子播於 HIT、1/2MS 培養基及接種蘭菌之燕麥培養基 75 天之發 芽率	151
表 4-3. 綬草種子播於接種不同日數之蘭菌 PDA 培養基 40 天之 發芽率	152
表 4-4. 以三種不同介質種植綬草 3 個月之營養生長	152
表 4-5. 綬草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌之營養生長	153
表 4-6. 綬草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌之生殖生長	154
表 4-7. 綬草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌第一朵花開放之到花日數	155
表 5-1. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類的絲核菌 22 個月之營養生長	179
表 5-2. 紅鶴頂蘭組培苗接種絲核菌(R02, R15) 26 個月其葉子及假球莖之碳 水化合物含量之變化	180
表 5-3. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類絲核菌屬蘭菌之始花日數及 28.5 個月 之生殖生長	181

縮寫表

ABA	abscisic acid
AFEE	<i>A. formosanus</i> extraction with ethyl acetate, kinsenoside
BA	6-Benzylaminopurine
BLAST	basic local alignment search tool
CAM	crassulacean acid metabolism
COMF	commercial orchid mycorrhizal fungi
CPD	critical point dryer
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	ferric-reducing antioxidant potential
GA ₃	Gibberellic acid
GOT	glutamate oxaloacetate transaminase
GPT	glutamic pyruvic transaminase
HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	Indole acetic acid
ITS	internal transcribed spacer
LDL	low density lipoprotein
MDA	malondialdehyde
MTT	methylthiazoletetrazolium
NAA	α -Naphthalene acetic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	neighbor-joining
NM	non-mycorrhizal
OMA	oat meal agar
OMF	orchid mycorrhizal fungi
OPP	O-phenylphenol
PBCM	plastic bag cultivation method
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PDB	Potato Dextrose Broth
SEM	scanning electron microscope

SOD	superoxide dismutase
TBA	thiobarbituric acid
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
Z	Zeaxanthin
ZR	Zeatin Riboside



第一章、前言、蘭科植物簡介及植物的內生真菌

研究目的

植物內生真菌是存在於植物內部與植物密不可分的一類微生物，幾乎每種植物都有內生真菌存在，而植物內生真菌種類的多樣性則與植物的種類和生長環境密切相關。前人研究報告指出，內生真菌能誘發宿主產生多種二次代謝產物，具有幫助宿主植物耐乾旱及高溫，提高抗病及抗蟲性，促進種子發芽及植株生長，提高藥用植物有效藥用成分含量等生理生態功能。而植物組織則提供內生真菌足夠的碳、氮源，及保護的功能，具有相對穩定的生存環境。由此可知植物與其內生真菌之間存在著互利共生之關係。以往在生物多樣性調查監測與利用模式方面，多偏向同一界甚至同種物種；然而國際間近來之研究顯示，跨生物界種間之相互依存或競合，將顯著影響地方特有生物資源之豐富度與歧異度。以永續利用層次而言，生物間互動模式與機制角色之釐清，尤其是植物與微生物間，更為顯著與重要。

臺灣蘊藏著相當豐富的蘭科植物，種類多達400餘種，所以我們從臺灣北、中、南等不同地區採集具觀賞及藥用價值之原生蘭科植物，並對其根部內生真菌類群進行調查、收集、保存與研究。以開發臺灣原生蘭科植物與有益真菌之共生資源。並進行以下幾點之研究探討：

- (1)臺灣原生蘭科植物多樣性，及其內生真菌多樣性。
- (2)臺灣原生蘭科植物及其內生真菌之共生關係中，跨種間相互依存競合之關係。
- (3)臺灣原生蘭科植物與真菌共生，與本土原產地的依存關係。
- (4)以傳統形態分類及生物技術法鑑定內生真菌種類。
- (5)共生真菌對我國原生蘭科植物(包括具藥用與觀賞發展潛力之臺灣金線連、紅鶴頂蘭及綬草)種子發芽、種苗生長與發育之影響。
- (6)探討臺灣金線連生長環境對其藥效之影響，並分析其具藥效之有用成分。
- (7)建議新種類真菌性生物肥料種類。

預期成果將可提高開發利用這些生物資源的可行性，以上研究中所探討的各項重點包括臺灣原生蘭科植物及其內生真菌的多樣性、探討蘭共生菌(簡稱蘭菌)對原生蘭科植物種子發芽、種苗生長與發育之影響(尋找最有效促進原生蘭科植物生長的共生真菌，確定最適宜雙方共生的環境條件)等，不僅具學術性且可拓展內生真菌菌種遺傳資源的利用價值，及了解內生真菌對臺灣原生蘭科植物發展為經濟性作物的相關性，並深入探討蘭科植物內生真菌形態結構及其營養狀況，為原生蘭科植物引種馴化、胚培養、細胞工程和永續開發利用等技術提供理論依據。期望對臺灣原生蘭科植物之保育及復育等工作有所助益。

蘭科植物簡介

一、蘭科植物的分布及其多樣性與特異性

蘭科植物的分布相當廣闊，幾乎遍及全世界，除了最乾燥的沙漠和最嚴寒的二極之外，生長在平原、森林、高山和沼澤地裏。主要匯聚滋生於熱帶和亞熱帶，高溫多濕的叢林裏。臺灣島正好位處於北迴歸線貫穿的亞熱帶，因此蘭科植物相當普及，從海平面沙灘上直上玉山山巔均有各種適應性不同的蘭花滋生著。

在植物界中，蘭科植物為被子植物中最大的一科(Dressler, 1993)，是屬於相當進化的高等植物，和其他開花植物相比，演化十分活躍，因此形成多達 800 屬，25,000~30,000 種以上的龐大族群(Teob, 1980)，臺灣由於自然地理演化環境特殊，島內高山林立，因而具有垂直分布的植物生態帶，蘊育出豐富多樣且生物歧異度高之生物相，據統計臺灣維管束植物約有 4,000 多種，其中蘭科植物亦可說是最大的一群，約有 104 屬 400 餘種的蘭科植物被記錄，約佔維管束植物的十分之一(Huang, 2003)，近幾年臺灣蘭科植物的新種陸續被發表，種數仍在持續增加中，其中不乏許多原生特有種，具相當豐富之多樣性(林, 2006)。

大部份的蘭科植物花形奇特色彩優美，部份具特殊香味，極具觀賞價值，有些則具藥用功效。但因受氣候變遷，環境污染及山林開發與濫採等人為因素的影響

響，授粉昆蟲及共生真菌的消失，野生蘭花的生存空間遭到極大破壞，自然增殖速率慢，野生資源亦日漸匱乏，種群數量日漸減少，多數物種瀕危，且部份物種在野地幾乎已經滅絕，因此保育及復育的工作實為刻不容緩。為保護蘭科植物族群延續，在瀕臨絕種野生動植物國際貿易公約(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora，簡稱為 CITES；又稱華盛頓公約)中，將蘭花列入國際保育的重要物種，名列華盛頓公約附錄一及二(CITES Appendix I and II)，嚴禁無故出口(鐘氏等, 2006)。

蘭花為特異性的植物，其器官構造與一般栽培的習性均異於其他植物(邱及王, 1985)。其種子非常的小，數量非常的多，長度 0.05-6 mm，最長為最短的 120 倍，寬 0.001 mm - 0.9 mm，最寬為最窄的 90 倍，重 0.31 μg -24 μg ，最重為最輕的 78 倍，管狀或球形，種皮大部份是透明的，外層細胞壁平滑或網狀，蘭花種子有一個氣室，類似氣球，種子因而可以在空氣中長期的散布，使具有長距離傳播的特性，果莢內含種子最高可達 4,000,000 粒，最低 20-50 粒(80,000-200,000 倍) (Arditti 及 Ghani, 2000)。胚由 8-100 個細胞所組成，胚乳發育不完全或完全沒有(Harvais 及 Hadley, 1967a)，所以種子發芽困難，在自然界中種子必須與蘭菌共生才能發芽(Bernard, 1899)。但是數以百萬計的蘭花種子，僅有少數的種子能在自然界中與蘭菌共生而發芽(Arditti 氏等, 1984)。造成蘭科植物種子發芽困難的原因除了胚發育不全之外，還有以下幾點原因：

1. 胚細胞數目較少而細胞較大：不易發芽的臺灣喜普鞋蘭(*Cypripedium formosana*)，芭菲爾鞋蘭金童(*Paphiopedilum armeniacum*)與玉女(*P. micranthum*)胚細胞數目較少而細胞較大，易發芽的櫻草拖鞋蘭(*P. primulinum*)與越南美人(*P. delenatii*)的胚細胞數目則較多且細胞較小。顯示發芽較為困難的原生種在胚細胞發育上，停留在較早期的階段(李, 1998)。
2. 胚體外有一層膜狀物質包被：以 SEM 觀察黃花根節蘭、繡邊根節蘭、白鶴蘭與素心蘭的胚體，認為胚體外有一層膜狀物質包被而導致發芽不易(葉,

1990；利, 1992)。

3. 種子細胞壁木質化較嚴重：兩種發芽較為困難的芭菲爾鞋蘭金童(*P. armeniacum*)與玉女(*P. micranthum*)細胞壁木質化較嚴重(李, 1998)。
4. 種子的氣室體積太大：Kano(1968)則認為 *Cypripedium acaule* 種子的氣室體積太大，妨礙水分的通透。
5. 果莢中含有較高濃度的 ABA：成熟的金線連果莢中含有高濃度的 ABA，對種子的發芽具有抑制作用(蕭氏等, 1995)。

1921 年 Knudson 開始第一次的蘭花種子非共生發芽試驗(Knudson, 1922)。由於 Knudson's 的非共生種子繁殖的方法，效果非常好而被廣為利用，該方法雖具有高的發芽率，且可以發育至原球體階段，但是還是有一些問題存在：一、適當的培養基成分需要測試尋找，且種與種之間適當的培養基成分也不一樣(Tan 氏等, 1998)。二、組織培養需要設備和專家，且不是很容易被利用(Tan 氏等, 1998)。三、蘭花種子很小很難掌控，數以萬計的種子在一個容器內發芽，發芽種子生長成為叢生的原球體，種苗需進一步以人工進行分離並定期繼代培養，這些過程易令人產生厭煩，且頗需勞力(Khor 氏等, 1998)。而且並不是所有蘭花種子均可於非共生狀態下發芽(Arditti, 1992)，如溫帶具球莖或根莖的蘭花，於無菌培養基繁殖是困難或不可能的(Arditti 氏等, 1990)。也有多種野生蘭以無菌播種時發芽困難，仍須與真菌共生方能發芽。所以蘭菌與蘭花種子共生發芽亦仍有很大的利用與研究空間。近年來很多的研究，將蘭菌與蘭花種子的共生應用於蘭科植物的復育(Clements 氏等, 1986; Dixon, 1987; Rasmussen 及 Whigham, 1993; Zettler, 1996; Zettler 氏等, 2001; Batty 氏等, 2001; Beltran-Nambo 氏等, 2010; Phillips 氏等, 2011; Ruangwut 氏等, 2011)，足見蘭菌的利用已再度引起研究學者的注目。

瀕臨滅絕原生蘭科植物種質保存及蘭花栽培皆需要有效的繁殖方法，共生與非共生種子繁殖方法之研究應同時並行，以適用於不同的種類、環境、條件及目的。

二、臺灣金線連

1. 分布及形態

全世界金線連屬之植物約有 35 種，分布於印度、喜馬拉雅山脈、東南亞各國、印尼、新喀里多尼亞以及夏威夷一帶(劉氏等, 1987)，臺灣自產金線連屬之植物有二種：臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)、恒春金線連(*Anoectochilus koshunensis* Hayata)(Su, 2000)。

臺灣金線連(*A. formosanus* Hayata)，葉橢圓形或卵形，表面為暗綠色，葉背呈紫紅色，黃白色葉紋構成網紋(蘇, 1975)，植株於開花時可見唇瓣爪部為魚骨狀，花期 8-11 月，果莢色暗紅，長 1-1.5 公分。遍布於全省 1,500 公尺以下的闊葉林中(Su 氏等, 2000)，北自新北市的北插天山，新竹縣竹東，苗栗縣南庄、大湖，臺中縣武陵農場、青山、谷關、白冷，南投縣仁愛鄉、蘆山、溪頭，嘉義縣吳鳳鄉，南至高雄縣旗山、扇平、阿卑縣，屏東縣霧臺、來義、潮州萬金庄、南仁山，東至臺東太魯閣等陰濕森林內皆可見其蹤跡(劉氏等, 1987)。

2. 栽培管理

組織培養苗之馴化、假植與定植：金線連組織培養瓶苗應先置於栽培地點 3-7 天，使其逐漸適應當地之溫度與光線後，再取出瓶苗，經消毒殺菌後之幼苗先假植於育苗箱內，育苗箱內之介質材料以珍珠石、蛇木屑及蛭石為主，再摻以少量之腐葉土。經 1-2 個月後選取健株移植於定植圃內。定植後立即澆水以增加或確保成活率。較適宜溫度 20-25°C，所需光量為正常日光量的 1/3，最忌夏秋中午左右之直射強光，故應於栽培場上架設遮光網，一般可利用 60-70%遮光網高架鋪設兩層。施肥種類應以緩效性有機肥料為主，如以黃豆餅經醱酵後之稀釋液施用之效果較佳(劉氏等, 1987)。臺灣金線連是典型的陰性植物，生長在低光強度 $PPF\ 30-50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，可促進生長及提高類黃酮(flavonoid)的含量(Ma 氏等, 2010)。

盆栽套袋方式栽培臺灣金線連：利用不同材質的塑膠袋栽培金線連，對植株的生長有不同的差異性，其中以除霧袋的生長勢較使用 OPP 塑膠袋為佳，例如株

高、葉數、葉長等都達顯著差異(張, 1999)。

金線連氣孔位於葉片下表皮，在無套袋的環境下栽培，氣孔在白天關閉，晚間張開，其 CO₂ 的淨吸收率的趨勢為夜間的吸收率較強；在套袋栽培下氣孔無論白天或夜晚均為開張狀態，於光照時 CO₂ 的淨吸收率大於黑暗時期，以套袋栽培 4 個月便可達傳統栽培 8-10 個月的大小，因此利用套袋栽培臺灣金線連能達到增產與減少損失的目的，並有效縮短栽培期。推測套袋栽培之臺灣金線連，其 CO₂ 固定模式由 CAM 型轉變成 C3 型，可能為其生長較未套袋者生長快速之主要原因(李, 2001)。在臺灣金線連耐病品種尚未選育成功之前，套袋栽培方式確實是一種降低生產成本，增加收益且能生產無農藥金線連的良方。使用塑膠袋可以有效取代組培用的玻璃容器，不僅在育苗期，甚至植株生長至可出售為止皆可使用。且可以有效防止病蟲害，促進植株生長，並可減少澆水與施肥等之人力需求，降低成本，以生產無農藥的藥用植物。使用塑膠袋栽培法之金線連，可以達到 80% 以上的存活率，並可維持至少六個月不必澆水或施肥，極為省工。透明塑膠袋使用後之廢棄，考量其產生的環保問題，需選擇或開發使用能自動分解的環保塑膠袋為宜(李, 2001)。

無菌播種暨組織培養技術：利用無菌播種暨組織培養技術可大量繁殖臺灣金線連，以含 1/4 B5 基本鹽類培養基，添加 0.2 g/L 花寶一號(N:P:K=7:6:19)，並搭配 5%椰子汁進行無菌播種，臺灣金線連之種子萌芽率達 83%(張, 1999)。將金線連莖節以不同濃度及不同的生長調節劑，進行不同的組合試驗，結果以添加 2,4-D 有利芽體的生成，加入低濃度的 NAA (0.6 ppm)有利發根，添加 3-5 ppm 之 BA 可促進莖節的生長(戴, 1986)。金線連組培苗進行莖段培養過程中，利用液體與固體交互培養，可在短時間內大量增殖芽數，且使幼苗莖幹粗壯生長良好(許及邱, 1999)。

目前利用人工繁殖技術組織培養，可以大量繁殖臺灣金線連，但由於生長緩慢，栽培期長，人工集約式栽培，易遭受莖腐病(*Fusarium oxysporum*)及基腐病(*Pythium ultimum*) (謝氏等, 1994)、細菌性軟腐病、疫病、紅蜘蛛及介殼蟲等病蟲

為害。在栽培過程中添加幾丁質，能有效抑制莖腐病的發生，而亞磷酸則能有效抑制基腐病病菌菌絲的生長(莊, 1989)。利用拮抗菌與菌根菌混合施用可有效抑制莖腐病的發生(張, 1998)。栽培過程中受到紅蜘蛛的危害，會造成植物葉片被其所吐出的絲纏繞，植株生長因而受阻而無法存活，所以臺灣金線連的溫室栽培，須大量且經常使用農藥才能存活，而人們拿它做藥物食用，故此問題急待解決，以本研究室所創塑膠袋栽培法栽培臺灣金線連，最為安全且有效。

蘭菌的利用：蘭共生菌利用於臺灣金線連之栽培，已證實具有促進種子發芽及生長的功能(蔡, 1997; 李, 1999)。蔡以蘭菌接種臺灣金線連，結果在高溫或低溫之下接種絲核菌，對株高、鮮、乾重都有顯著促進效果(蔡, 1997)。李以兩種絲核菌接種金線連與彩葉蘭雜交種，結果混合菌種處理雜交種無論在葉長、株高與鮮重上皆優於其它處理(李, 1999)。臺灣金線連種子播種於接種蘭菌(R02)之燕麥培養基中，於 60 天後發芽率為 80~86%。培養基覆蓋濾紙及接種蘭菌，可促進臺灣金線連種子發芽及後續生長。瓶內或瓶外接種蘭菌後，都可顯著促進植株的生長，並可增加植株的葉綠素含量(周, 2004)。以盆栽套袋方式栽培臺灣金線連，並接種不同的蘭共生菌(R01-R09)，經過 120 天栽培後，顯示接種 R01 菌種的植株，其株高明顯高於其他菌種接種者的表現(李, 2001)。將金線連接種多種混合菌種，進行比較試驗，在套袋的混合菌種處理當中，R04,7,8,9 處理組有最大株高，平均每株有 4.53 公分，而對照組平均僅有 3.56 公分，根數以 R04,7,8,9 最多，平均每株 4.4 條，鮮重與乾重皆以 R02,7,8,9 最高(李, 2001)。將金線連接種商業蘭菌(COMF)，亦有促進生長之效果，但觀察其液體菌種並無菌絲之發現，推測可能並非透過菌絲而達到促進植株生長之效果，而是利用生長荷爾蒙、高濃度養分或細菌等達到目的(Wilkinson 氏等, 1994)。

3. 藥用價值

文獻記載及相關的研究報告指出，金線連可治療胃炎、肺炎、支氣管炎、腎炎、膀胱炎、風濕性關節炎、高血壓、高燒不退、重症肌無力、蛇傷、肝脾病、

肺癆病、咳嗽、吐血、小兒發育不良。抗癌、抗氧化、抗菌、預防動脈硬化、降血糖、改善糖尿病、護肝、防止骨質疏鬆、改善記憶力、免疫調節、腸道益生菌增生等藥效，甚至可用來減肥瘦身，去除自由基，抗發炎(甘, 1965; 梁氏等, 1991; Lin 氏等, 1993; 林, 2000; Lin 氏等, 2000; Shih 氏等, 2001; Wang 氏等, 2002; Cheng 氏等, 2003; Du 氏等, 2003; Wu 氏等, 2007; 林, 2004; Hsieh 氏等, 2011)。

4.生理活性

(1)保肝作用

臺灣金線連水萃物能保護大鼠初代肝細胞對抗四氯化碳引起的損傷(Du氏等, 2003)，改善四氯化碳及二甲基亞硝胺(dimethylnitrosamine)所引起的慢性肝炎(Shih 氏等, 2004; 2005)，促進二甲基亞硝胺肝損傷後的肝臟再生(Shih 氏等, 2004)。

以乙醯氨基酚(Acetaminophen)誘發大白鼠肝細胞毒性，證實臺灣金線連之氯仿(CHCl_3)及乙酸乙酯(EtOAc)有機分劃層在 200 $\mu\text{g/mL}$ 時具有明顯的保肝作用；臺灣金線連乙酸乙酯(EtOAc)有機分劃層及水粗提取物具有降低肝功能指數(sGOT、sGPT)之能力，且乙酸乙酯有機分劃層之效果遠優於水粗提取物(林和顏, 2000)；將大白鼠以腹腔注射半乳糖氨(D-galactosamine)，模擬急性肝炎病症，經投予 100 $\mu\text{g/mL}$ 臺灣金線連乙酸乙酯有機分劃層後，亦可降低 sGOT 及 sGPT 指數，而在肝臟組織病理病變的觀察中，亦顯示臺灣金線連乙酸乙酯有機分劃層具有修護肝細胞的作用(林和顏, 2000)；在慢性酒精性肝炎之保肝活性研究結果顯示，大白鼠連續投予絕對酒精 28 天，其 sGOT、sGPT 指數及肝細胞脂質過氧化指標 MDA 濃度明顯上升，而臺灣金線連之水粗提取物及甲醇粗提取物可降低肝指數及 MDA 含量，且甲醇提取物效果較水提取物佳(林和顏, 2000)。

以四氯化碳(CCl_4)誘導雄性 wistar 大鼠肝纖維化，再以口投方式投予臺灣金線連水粗萃物，可舒緩四氯化碳所誘發的肝臟重量減輕、蛋白質含量減少、膠原蛋白中的羥基脯氨酸(hydroxyproline)含量增加、出現腹水現象及大鼠體重減輕等症狀；亦可改善生化值麩草酸轉氨酶(glutamate oxaloacetate transaminase,

GOT)，但對谷丙轉氨酶(glutamic pyruvic transaminase, GPT)則無明顯影響；在病理切片纖維化之染色觀察中亦有改善纖維化的情形(林, 2000)。

在體外試驗當中顯示，臺灣金線連對於肝癌細胞有明顯生長抑制效果。利用肝癌細胞 HepG2、Hep3B、Mal5、SK 進行實驗，結果顯示在分化良好的 HepG2 細胞株中對臺灣金線連的反應特別好，在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下即有抑制近 50% 生長率的效果出現，但對於分化較差的惡性肝癌 Mal5 及 SK 細胞株則需 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 才具有顯著的抑制生長效果(謝, 2002)。

以四氯化碳(CCl_4)所誘導的慢性肝炎，肝的羥脯氨酸及血清 GPT 的含量及脾臟的重量會增加。臺灣金線連新鮮全株的粗萃取物可抑制小鼠經由四氯化碳所誘導的慢性肝炎。利用生物活性製導分餾及光譜分析(bioactivity-guided fractionation and spectroscopic analysis)，得知金線連苷(kinsenoside, *A. formosanus* extraction with ethyl acetate, AFEE)，為最具活性的成分，顯著具有保肝之作用(Wu 氏等, 2007)。

(2) 抗氧化及清除自由基

臺灣金線連含有槲皮素(quercetin)、二氫槲皮素(dihydroquercetin)、異鼠李素(isorhamnetin)等黃酮類成分及特殊的金線連酮(kinsenone)，這些具有很強的抗氧化作用(Wang 氏等, 2002)。臺灣金線連水萃物有很好的清除含氧自由基的作用(Shih *et al.*, 2003)，高血脂倉鼠投予臺灣金線連水萃物，能有效抑制低密度脂蛋白的氧化(Shih 氏等, 2003)，糖尿病大鼠投予臺灣金線連水萃物，能增加腎臟谷胱甘(glutathione)的含量及減輕腎臟的脂質過氧化作用(Shih 氏等, 2002)。

以 TBA 法測試臺灣金線連抗脂質過氧化之能力，結果顯示臺灣金線連甲醇萃取物抗脂質過氧化之效果優於水粗萃取物，甲醇萃取物之清除超氧陰離子自由基效果優於水粗萃取物(林及顏, 2000)。

臺灣金線連水粗萃取物對高血脂倉鼠之低密度脂蛋白(LDL)具有抗氧化的作用。正常雌鼠在餵食臺灣金線連水粗萃取物後，可降低雌鼠腦部過氧化程度、提升腦部 glutathione peroxidase 的活性，並且能抑制子宮脂質氧化；對去卵巢雌鼠而

言，攝食臺灣金線連水粗萃取物更可降低腦部、腎上腺、腎臟、肺臟、子宮、主動脈等之脂質過氧化程度(林, 2000)。

人類 HL60 血癌細胞於 H_2O_2 處理下，會造成細胞程序性死亡(apoptosis)，但以金線連水萃物處理，可顯著降低此現象的發生，且此結果與正控制組之 catalase 處理組的效果相當(鄭, 2001)。

Wang 等人於 2002 年以 n-butanol 及酸水解(acid-hydrolysis)的方式，萃取臺灣金線連中之有效物質，所得之 acid-hydrolyzed BuOH fraction 可清除超氧陰離子(superoxide anion)，並且能保護 HL-60 細胞中 ϕ x174 supercoiled DNA 不受 H_2O_2 氧化壓力之破壞。

(3)提升免疫功能

金線連經水萃後進行小鼠體內試驗。經口服投予金線連水萃物後，能降低人體直腸癌細胞於小鼠體內的菌落數，生成的腫瘤亦顯著減少，而巨噬細胞的 MTT 活性也有明顯上升的趨勢(鄭, 2001)。

三、綬草

1.形態及分布

蘭科綬草屬植物，全球約有 50 種，分布於全球北溫帶，少數種類也見於熱帶亞洲與南美洲，在臺灣分布於海拔 1,000 公尺以下之平原、山坡地(Su, 2000)，臺北、花蓮、南投、屏東等地，皆有採集記錄。綬草(*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames)，是一種生長於平地向陽的草本蘭科植物，高 15-50 公分。莖直立，基部簇生數條白色肥厚肉質根，近基部生 2-4 片葉。葉長條狀倒披針形，長 10-20 公分，寬 4-10 公厘。花序螺旋狀排列頂生，長 10-20 公分，具多數白色或粉紅色的密生小花；唇瓣近長圓形，長 4-5 公厘，寬約 2.5 公厘，呈淺囊狀。每年於清明節前後盛開，所以又叫「清明草」；螺旋狀排列的花序由下而上綻放白色或粉紅色的小花，就像廟宇門前石柱上的龍形石雕，因此，在園藝利用上，綬草可栽培為袖珍盆景，觀賞

其雅緻花朵所展現出來的清新淡雅之美，觀花期可達一個月之久(陳, 2010)。又具有白色肥厚的肉質根，狀如人參，因此也稱為「盤龍參」。平均每隔 1 天開花 1 枚，最後開放至先端，開花至花謝平均需 17 天，花謝至果熟平均需 15 天。盛花期後植株枯萎，地下部 8—9 月重新萌芽，翌年春季開花(余及陳, 2001; 董及楊, 2006)。

2. 繁殖及栽培方法

綬草是地生蘭中，種子成熟較快的一種，由授粉至種子成熟平均不超過 15 天，其種子沒有胚乳，由未分化的胚和薄膜狀的種皮構成(李, 1990)，在自然環境下發芽屬異營性，需要共生菌幫助製造養分，才能順利發芽，平均發芽率極低(劉氏等, 2001)；亦可利用未熟種子進行無菌播種，最快約需一個月才能發芽，或應用組織培養以不定芽的方式進行增殖(陳, 2010)。綬草栽培介質以排水良好、通氣性佳、腐植質高之介質條件較為理想，日照為全日照至半日照皆可(陳, 2010)。

3. 藥用價值

綬草(*S. sinensis*)，兼具觀賞與藥用價值，其味甘苦、性平；有益氣養陽、清熱解毒之效，主治病後虛弱、陰虛內熱、頭暈、腰痛酸軟及燙火傷等；具治療蛇傷、癰腫、咳血、糖尿病、心胃痛、帶狀泡疹等功效(中華本草編委會, 1999)。經化學分析，肉質根內含有盤龍參酚(spiranthol)A、B、C；盤龍參新酚(spirasineol)A、B 及盤龍參二聚菲酚(spiranthesol)等(Tezuka 氏等, 1989; 1990)。其中 spirasineol-A 經體外試驗顯示，對癌化的纖維細胞及格蘭氏陽性細菌稍具抑制效果(Tuzuka 氏等, 1989)。從綬草(*S. sinensis*)植株之地上部，分離出五種已知的二氫菲衍生物，紅門蘭酚(dihydrophenanthrene)-orchinol，盤龍參醌(spiranthoquinone)，盤龍參酚-A (spiranthol-A)，盤龍參新酚-A (spirasineol-A)，以及 shancidin 和六種新的二氫菲衍生物(dihydrophenanthrene)-sinensols A-F(1-6) (Lin 氏等, 2000)；使用綬草(*S. sinensis*)植株之地上部，分離出一種新的 homocyclotirucallane-sinetirucallol 及兩種新的二氫菲(dihydrophenanthrenes)-sinensols G 和 H(Lin 氏等, 2001)。最近的研究亦指出綬草植株於抗氧化能力表現極佳，可以提供未來化妝品開發應用的參考原料(梁氏等,

2012)。在臺灣已有民間業者栽培生產，並利用綬草植株乾燥製成茶包出售。

四、根節蘭與鶴頂蘭

現有記錄中，原生於臺灣之根節蘭屬植物有 19 種，鶴頂蘭屬植物有 4 種，共計 23 種。針對臺灣原生根節蘭及鶴頂蘭之生育地分析及保育評估之研究結果得知，羽唇根節蘭(*Calanthe fimbriata*)、黃根節蘭(*C. striata* var. *sieboldii*)及紅鶴頂蘭(*Phaius tankervilleae*)為漸危種，細花根節蘭(*C. graciliflora*)、矮根節蘭(*C. angustifolia*)、棒距根節蘭(*C. clavata*)、輻射根節蘭(*C. actinomorpha*)及粗莖鶴頂蘭(*P. takeoi*)則屬於稀有種(蘇和陳, 1991)。根節蘭屬植物包括溫帶種與熱帶種，全世界約有 150 種左右，分布地區可自南非、馬達加斯加島、中國、日本、熱帶亞洲、印尼至澳洲、大溪地(Su, 2000)。分布於臺灣海拔 500 公尺到 2,500 公尺，也能適應平地及較高海拔之栽培環境，生性強健，花形、花色變化大，葉片修長，翠綠優美，可做為盆花、切花、或切葉，亦可當庭園植物來栽培，為一群甚具園藝潛力的野生蘭花資源(李和蔡, 1991)，隨著山林開發及濫採之結果，許多根節蘭屬之種類已瀕於絕種。

根節蘭(*Calanthe*)之名是 1982 年美國植物學家 Robert Brown 所命名，由希臘語的 kalos(美麗的)以及 anthe(花)之合成語，引喻其屬中有許多種具有美麗的花朵(加古, 1968; Bechtel 氏等, 1986)。根節蘭屬因其唇瓣與蝦子尾巴相似故又名蝦脊蘭。大部份為地生蘭，兼有地下莖及具有摺扇式皺紋的假球莖(pseudo-bulbs)，葉由假球莖長出，大而薄。花軸直立，自葉腋或假球莖上伸出，花為小型或中型大小，排列成總狀花序。苞片小而宿存或是為大型但會凋落；萼片略相等；花瓣寬窄隨種類而不同，唇瓣為爪狀，基部與蕊柱合生成管狀；在唇瓣邊緣多有三裂，通常基部會有龍骨狀突起，有或無距。蕊柱有長有短，為斜截形，整個與唇瓣基部連合。花藥近圓錐形或呈弓形，具二室，有 8 個花粉塊，棍棒形，蠟質，常成對由粘質腺體附著在花藥囊中，果莢長橢圓形且下垂(蘇, 1975; 楊氏等, 2001; Su,

2000)。根節蘭屬植物在胚珠發育完全之後，內含 5-6 核(Nagashima, 1982)，較一般典型的 8 核胚囊核數為少，這種現象稱為 striking phenomemnon (Abe, 1972)。此現象乃因蘭花為了避免浪費養分，所以在同一個果莢裡同時生長有成千上萬個胚珠，而致核數減少，striking phenomenon 可以調整保存養分及種子快速發育兩者間的衝突，因為相較於其他被子植物，蘭科植物供給種子的養分極少(Law 及 Yeung, 1989)。根節蘭的胚柄為 Onagrad type，胚柄創始細胞不再分裂，只會長長或稍作伸展，所以能形成管狀或圓錐形等，而其胚柄通常不會伸長至超過珠被頂端(Withner, 1974)。根節蘭屬之胚體小，細胞數少，再加上其胚體外有層膜狀物包裹，增加其發芽困難度。根節蘭其種皮很薄可用超音波振盪去除，其胚的外層包裹了一層很厚的壁，振盪處理可能使得這層厚壁破裂，胚因此能吸收到水分及養分，因而促進種子發芽(Kazumitsu 及 Mii, 1988)。

鶴頂蘭之屬名於 1790 年由 Loureiro 氏命名，*Phaius* 衍生自希臘語“phaios”(暗的)之意，以表其花朵易因老化或受傷後，傷口快速轉為暗褐色之故(楊, 1984; Bechtel 氏等, 1986)。鶴頂蘭屬全球約有 40-50 種，是一分布很廣的種，分布於非洲至亞洲的熱帶、亞熱帶地區及大洋洲中，從喜馬拉雅山西北、斯里蘭卡、泰國、緬甸、寮國、越南、中國、日本、臺灣、菲律賓、馬來西亞、印尼、新幾內亞、澳大利亞、庫克群島、東加、斐濟等，海拔 600-1,300 公尺的低地及森林中亦可見其踪跡(林, 1976; Alphonso, 1980; Bechtel 氏等, 1986; 葉氏等, 2007)。

鶴頂蘭屬大部份為地生蘭，少數為附生蘭，大型地生蘭植株高度可達 1-2 公尺以上，具莖或/及假球莖。葉寬大具有褶扇狀脈。花莖由假球莖基部或莖基部生出。花大而豔麗；萼片與花瓣相似；唇瓣基部狹，略包住蕊柱，前端變大，淺或不明顯 3 裂，具囊或距；蕊柱細長；花粉塊 8 個，蠟質，具柄(楊氏等, 2001; Su, 2000)。臺灣產的鶴頂蘭屬 (*Phaius*) 蘭科植物，總共有四種，黃花鶴頂蘭(*Phaius flavus* (Bl.) Lindl.)、細距鶴頂蘭 (*P. mishmensis* (Lindl.) Reichb. f.)、粗莖鶴頂蘭 (*P. takeoi* (Hayata) H. J. Su) 與紅鶴頂蘭(*P. tankervilleae* (Banks ex L'Her.) Bl.)。紅鶴頂蘭為臺

灣產同屬蘭花中最常見且花朵最大而鮮麗者。紅鶴頂蘭種小名 *tankervilliae* (或做 *tancarvilliae*)，是為了紀念法國 Tancarville 地方女伯爵。最早是由 Joseph Banks 爵士 1788 年在 l'Herit, Setum Anglicum 上，以 *Limodorum tancarvilliae* 為名發表。1856 年荷蘭植物學家 Carl Blume 在 Museum Botanicum Ludunum Batavium 把它移到了 *Phaius* 下(廖, 2009)。

紅鶴頂蘭分布於亞洲至大洋洲熱帶雨林中，臺灣主要分布於 1,000 公尺以下低海拔山區，性喜高溫潮濕但較不耐寒，蘭嶼亦有野生者(葉氏等, 2007)。紅鶴頂蘭為大型地生蘭(林, 1976)，株高 60-80 公分，花期約在 3-5 月，花朵壽命 15-20 天。綠色假球莖，圓錐或卵圓形，肉質且節間很密，約 2.5-6 公分長，葉片基部(leaf base)著生於假球莖(pseudobulb)上(Bechtel 氏等, 1986; 蘇, 1990)。葉互生呈橢圓披針形，尾部漸尖，長 30-100 公分，寬可達 20 公分；葉柄 15-25 公分長，葉面具褶痕。約於自基部算起第 4 節開始，每節節間含有一肉眼明顯可見的潛伏芽，若為葉芽，則一旦萌發，葉片展開後，其基部會漸漸膨大，而形成新生假球莖。通常在第 10 節節間(即第 9 片葉之葉腋)會形成花芽，有時在同一假球莖上可出現雙花軸，分別位於第 9 與第 10 節間(李及蔡, 1989)，花軸約 60-200 公分，總狀花序上可開 10-20 朵花；小花梗強韌，苞片長可達 5 公分，早凋易落。花朵直徑 10-12.5 公分，花瓣外側粉白色，內部邊緣白色，中央為紅褐色，唇瓣喇叭形，外白內紫紅，花色柔中帶艷頗具特色，而且還帶有淡淡芳香(葉氏等, 2007)。唇瓣 3 裂，約 5 公分長，4.5 公分寬，前緣呈波浪形皺縮而向外反捲，頂端有短距(Bechtel 氏等, 1986)，蕊柱(column)7.3 公分長，花粉塊 8 個(林, 1976)，蠟質，分為兩群，每群 4 個(Su 氏等, 2000)。

紅鶴頂蘭的有性繁殖可利用種子與真菌共生萌發，亦可利用無菌播種取得實生苗，無性繁殖則利用瓶內實生苗莖頂無菌培養，分株繁殖(每個新株需有兩個以上的假球莖)，或者利用花軸無菌培養，及花謝後採收花軸埋於土壤中，於每個花節

處會長出一株小苗(李, 1989; 吳, 1991; 蔡, 2010)。紅鶴頂蘭的花芽於夏秋之際形成, 但花梗並不立刻抽長, 幾乎處於靜止狀態, 須待次年二、三月間, 氣溫回升後, 方加速其花梗抽長速度, 而於四月開花(李, 1989)。紅鶴頂蘭的成熟植株經三種不同日/夜溫度處理, 於日/夜溫為 25/20°C 時開花較早, 但花梗較短; 日夜溫為 20/15°C 時, 花朵數較多且開花壽命較長; 30/25°C 時, 則不抽出花梗, 抑制開花(吳, 1991)。

植物的內生真菌

植物內生菌是指那些在其生活史的一定階段或全部階段, 生活於健康植物的組織和器官內部的微生物, 使宿主植物不表現出外在病徵(至少是暫時不表現), 並可通過組織學方法和嚴格地表面消毒的植物組織中, 分離或從植物組織內直接擴增出微生物 DNA 的方法, 來證明其內生(Stone 氏等, 2000)。人們不僅從不同植物體內分離出內生菌, 而且從不同部位也分離得到內生菌, 包括胚珠、胚根、種子、花、葉(葉鞘)、莖(塊莖)和根等(McInory 及 Koepper, 1995)。對於一種植物而言, 從中可分離數種至數十種, 甚至多達上百種內生菌(Liu 氏等, 1998)。隨著分子生物學技術應用於植物內生菌分析, 一些生長緩慢或很難獲得純培養的種類也能被發現, 從而有利於了解內生菌的群體組成及動態變化(Gargas 及 Taylor, 1992; Chiang 氏等, 2001)。苔蘚、蕨類植物、裸子植物和被子植物中, 都發現有內生真菌的存在(Zou 及 Tan, 1999)。

真菌與植物的共生一般表現為兩種情況: 一是真菌生長於植物組織的內部, 但通過菌絲延伸至宿主組織外, 典型的如 VA 菌根真菌和外生菌根真菌, 這些真菌往往能與宿主形成特殊的共生結構而易於辨認; 另外一類是真菌生長於植物內部, 外表無任何肉眼可見的菌體結構, 因而難於辨認, 這一類真菌被稱為內生真菌(Rodriguez 氏等, 2004)。已有的研究結果表明真菌同時具有「病害徵狀寄主」(symptomatic host)和「非病害徵狀寄主」(asymptomatic host), 在植物體內的真菌

群體中，導致植物病害的真菌是特殊現象，而以某種方式與植物共生則是普遍現象(Rodriguez 氏等, 2004)。

真菌與綠色植物的共生，可能是地球上最古老和最普遍的生物和諧共處的方式之一(Yuan 氏等, 2005; Redecker 氏等, 2002)，對植物的生長、發育、進化及生態的適應性產生重要的影響；有些內生真菌與植物之共生關係甚至密不可分(Bush 氏等, 1997)。前人研究顯示內生真菌可影響宿主植物對動物取食、病蟲害、乾旱、高溫、水澇和重金屬污染等不同逆境條件的抗性(Rodriguez 氏等, 2004; Azevedo 氏等, 2000)。內生真菌可在寄主體內和純培養中，產生豐富多樣的，具有生物活性的次生代謝物，包括激素、酶、抗生素及其它殺蟲抑菌物質(Azevedo 氏等, 2000; Strobel 及 Daisy, 2003)，這些內生真菌所產生的生理活性物質將可對醫藥、農藥和植物生長促進劑的發展有所助益。植物內生真菌是一類重要的微生物資源，可以在增強植物的生態適應性，緩解全球氣候變化對植物和人類的壓力方面發揮其重要的作用，因而具有良好的應用前景(謝氏等, 2006)。

蘭科植物的內生真菌是影響其生態系統，決定其分布的重要因子之一，尤其是與其共生的菌根真菌更是蘭科植物生存與生長所不可或缺的，1886 年瓦利斯(Wahrlich)已證實超過 500 種蘭科植物根內含有內生真菌。前人研究對於其他非菌根內生真菌也已有很多的成果與記錄(Bayman 氏等, 1997; Jumpponen, 2002; Bayman 及 Otero, 2006; Yuan 氏等, 2009)，世界各國都十分重視對該類真菌種質資源，包括分布特徵、生物多樣性及生態功能的研究 (Bayman 氏等, 1997; Otero 氏等, 2002; Penelope, 2004; Suarez 氏等, 2008; Yuan 氏等, 2009)。

野生蘭科植物健康的根部，分離出內生真菌的研究資料中，所分離出之內生真菌包括有頂孢黴菌屬(*Acremonium* spp.)、頂柱黴屬(*Acrocyndrium* spp.)、曲黴菌屬(*Aspergillus* spp.)、鏈格孢菌屬(*Alternaria* spp.)、角菌根菌屬(*Ceratohiza* spp.)、枝穗黴屬(*Clonostachys* spp.)、炭疽菌屬(*Colletotrichum* spp.)、柱孢屬(*Cylindrocarpon* spp.)、柱孢黴屬(*Cylindrosporium* spp.)、枝梗莖點菌屬(*Dendrophoma* spp.)、瘤菌根

菌屬(*Epulorhiza* spp.)、鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)、粘帚霉屬(*Gliocladium* spp.)、微囊菌屬(*Microascus* spp.)、串珠霉屬(*Monilia* spp.)、卵形孢霉屬(*Oospora* spp.)、束絲菌屬(*Ozonium* spp.)、青霉屬(*Penicillium* spp.)、盤多毛孢屬(*Pestalotia* spp.)、擬盤多毛孢屬(*Pestalotiopsis* spp.)、擬莖點霉屬(*Phomopsis* spp.)、棘殼孢屬(*Pyrenochaeta* spp.)、絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)、小核菌屬(*Sclerotium* spp.)、木霉屬(*Trichoderma* spp.)、炭角菌屬(*Xylaria* spp.)等等(范氏等, 1996; 曾, 2002; Bayman 氏等, 1997; Bayman 及 Otero, 2006; 張氏等, 2008; Yuan 氏等, 2009; 孟氏等, 2009; Ruangwut 氏等, 2011; Leake 及 Cameron, 2012)。於大陸雲南, 四川等地採集的野生鐵皮石斛(*Dendrobium candidum*)和金釵石斛(*D. nobile*)根中分離得到 25 株內生真菌, 主要屬於擔子菌(Basidiomycota)和半知菌(Deuteromycotina)(郭氏等, 2000)。魏等人於 1999 年調查了雲南西雙版納和昆明幾種熱帶蘭栽培基質真菌區系的生態分布、組成和數量, 鐮孢菌屬占熱帶蘭基質總菌數的 9.86%, 木霉屬佔總菌數的 9.66%。范黎等報導, 分離自狹葉紫毛兜蘭的木霉菌株能促進報春石斛(*Dendrobium bryerianum*)和長蘇石斛的種子發芽, 能與種子形成共生關係(范氏等, 1996)。孟等人於 2009 年, 從叢生於甘蔗林和荒山中的黃花美冠蘭植株之新鮮營養根段中, 共分離出 52 株內生真菌, 鑑定為 17 個屬, 絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp., 13.46%)和鐮孢菌屬(*Fusarium* spp., 13.46%)為優勢屬, 這與許多學者研究其它蘭科植物菌根真菌的結果相符, 由此也證明蘭科植物與菌根真菌之間的專一性並不十分嚴格(孟氏等, 2009)。不同生長環境中黃花美冠蘭內生真菌的豐富度有明顯的不同, 生於未開墾荒山上的植株中內生真菌的豐富度明顯高於甘蔗林裏的; 不同生長環境中黃花美冠蘭根部內生真菌的相似性均小; 而相同生長環境中黃花美冠蘭根部內生真菌的相似性較大(朱氏等, 2009b)。

Masuhara 提出了生態專一性(ecological specificity)和潛在專一性(potential specificity)的概念, 前者指在自然環境條件下, 可與蘭花的某個特定種形成菌根的範圍, 後者指在實驗室條件下, 可與同一種蘭花形成菌根真菌的範圍。從鵝毛玉

鳳蘭根部分離得到 186 個菌株，與鵝毛玉鳳蘭共生的菌根菌，因季節的不同而有所差別，秋季所分離到優勢菌群是不產孢的蘭科絲核菌類的絲核菌屬、瘤菌根菌屬、產孢的是鐮孢菌屬、變孢黴屬、叢梗孢屬、莖點黴屬等；春季所分離到的優勢菌群是不產孢的蘭科絲核菌類的念珠菌根菌屬、角菌根菌屬，產孢的是鐮孢菌屬、木黴菌屬等，顯然的，秋季分離的菌根真菌其種類和數量都高於春季，可能是因為秋季菌絲團已完全定殖，達到了一個平衡點，也證實了不同菌在蘭科植物不同的生長階段發揮著不同的作用(陳氏等, 2008)。

感染內生真菌的植物一般比未感染的植物更具生長優勢，具體表現在種子發芽、幼苗存活、分蘖生長、增加花數和生物量等方面。內生真菌促進植物生長可以從兩方面來解釋。一方面，內生真菌影響被感染植物體內的物質代謝，提高植物的資源利用效率。Lyons 等人，發現內生真菌對感染植株的氮代謝和氮積累有顯著的影響，且內生真菌能夠改變植物體中碳水化合物源-庫的關係，迅速地將蔗糖轉變成植物不能代謝的糖醇，從而減少或阻止對光合作用反饋抑制，促進植物的光合作用。另一方面，內生真菌可以產生促進植物生長之激素類物質。如內生真菌能促進藥用蘭科植物產生激勃素(GA₃)、吲哚乙酸(IAA)、離層酸(ABA)、玉米素(Z, Zeaxanthin)和玉米素核苷酸(ZR, Zeatin Riboside)，這些激素對植物的生長發育都有很好的促進作用(張氏等, 1999)。福建金線連接種內生真菌提高成活率和產量，其中 β -1,3 葡聚糖酶、幾丁質酶是防禦性酶，提高寄主植物的抗性；多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶是木質素降解酶，提高植物利用外界營養的能力(唐氏等, 2008)。

一、蘭菌(菌根菌)

瓦利斯(Wahrlich)於 1886 年，提出蘭花成熟植株根部會和內生菌根菌結合，並證實超過 500 種蘭科植物根內含有內生真菌，之後貝爾納於 1899 年也提出鳥巢蘭(*Neottia nidus-avis*)在原球體階段，於體內已有內生真菌之生長，因而認為根內的內生菌根菌能促進種子發芽，而至 1903 年貝爾納將分離的真菌接種在嘉德麗亞

蘭的種子發芽成功後，才證明蘭菌共生與種子發芽的關係(Hadley, 1982)。

貝爾納在 1959 年寫的《蘭花根菌》中說到：蘭花是與根菌共生的，「蘭花與根菌之間保持平衡是蘭花生長良好的必要條件」。在自然條件下蘭科植物的根系與菌根真菌共生，形成蘭科菌根，幫助蘭科植物礦物質營養的吸收和增強植株的抗逆性。蘭科植物為典型的菌根植物，其種子在自然狀態下不能獨立萌發成苗，從種子萌發至形成具光合作用能力的幼苗期間，完全依賴共生菌根菌提供營養，不能進行光合作用的蘭科植物則終生需要菌根真菌提供營養，具有伴菌萌發及菌根營養的習性(朱氏等, 2009a)。

1. 蘭菌(菌根菌)的分類

凡能與蘭科植物建立共生關係之真菌，謂為「蘭共生菌」，所形成之菌根屬於菌絲有隔膜型之內生菌根。一般蘭花的共生菌大部份屬於絲核菌類(*Rhizoctonia*)，*Rhizoctonia* 為一形態屬名(form-genus)(Hadley, 1970)，Downie(1959)發現即使是寄生的品系 *Rhizoctonia solani* Kuhn. (從稻米及番茄中分離出)也能夠在幾種蘭花中形成共生，和促進種苗及原球體的生育。但後經李於 2001 年利用融合群分析(anastomosis group analysis-簡稱 AG)之方法分析，其分析結果證實，能和蘭花形成共生之 *R. solani* 為 AG-6 型，而寄生品系之 *R. solani* 為 AG-2，或 AG-4 型(李, 2001)。

絲核菌菌種間的分類非常不易，在分類上以菌絲細胞核數、菌核形態、菌落外觀、細胞化學測定、隔膜孔微細構造和擔子器形態等做為鑑定依據(Sneh 氏等, 1991; Ogoshi, 1996)。除某些未發現有性世代而分類地位不明者外，絲核菌類真菌，主要包含於膠膜菌目(Tulasnellales)、角擔菌目(Ceratobasidiales)和黑耳目(Exidiales)，其中又以角擔菌目(Ceratobasidiales)真菌最多。部份絲核菌類真菌之分類地位(Kristiansen 氏等, 2004)如下：

Heterobasidiomycetes 異擔子菌綱

Ceratobasidiales 角擔菌目

Ceratobasidiaceae 角擔菌科

Ceratobasidium (teleomorph of *Ceratorhiza*) 角擔菌屬

Thanatephorus (teleomorph of *Rhizoctonia* and *Moniliopsis*) 亡革菌屬

Waitea (teleomorph of *Rhizoctonia* and *Moniliopsis*)

Tulasnellales 膠膜菌目

Tulasnellaceae 膠膜菌科

Tulasnella (teleomorph of *Epulorhiza*) 膠膜菌屬

Exidiales 黑耳目

Exidiaceae 黑耳科

Ceratosebacina

Endoperplexa (teleomorph of *Opadorhiza*)

Heteroacanthella (teleomorph of *Acanthellorhiza*)

Oliveonia (teleomorph of *Oliveorhiza*)

Serendipita

絲核菌菌株的種類多且形態複雜，不易分類，目前最被學者所接受的形態分類方法，是依菌絲間之融合現象(hyphal anastomosis)歸類成數個菌絲融合群(anastomosis group，簡稱AG)，目前 *R. solani* 已發現 AG-1 至 AG-11 及 AG-BI 等十二個群，且有些群內又可細分成幾個亞群。此外，有些菌絲在形態上類似 *Ceratobasidium* spp.，菌絲間亦以菌絲融合現象分成十九個群(AG-A 至 AG-S)，其中報導可與蘭科植物形成共生者包括 AG-A、AG-C、AG-E、AG-I 等四羣(Oniki 氏等, 1986)。

最近蘭科植物真菌微生物鑑定之進展，依據 Rasmussen (2002)之整理回顧，全球的真菌微生物透過分子生物技術很大的數量已被鑑定。主要的蘭微生物真菌種類屬於擔子菌類(Rasmussen, 2002)，但是令人注意的是火燒蘭屬(*Epipactis*)的共生真菌。Selosse 氏等，分析生長於法國之超過三個地方的 *Epipactis microphylla* (Ehrh.)

Swartz 具葉綠素與不具葉綠素之根部感染真菌之 ITS 基因片段，78%的根段分析具有塊菌(*Tuber* spp.)，其他還有一部分的子囊菌類及少部分的擔子菌類真菌 (Selosse 氏等, 2004)。電子顯微鏡觀察根部可看到沒有桶孔的子囊菌菌絲形成菌絲團。Bidartondo 氏等，在其它種類的 *Epipactis* spp. 也發現 *Tuber*(塊菌)，蘭花中也存有 *Wilcoxina* 及 *Phialophora* 等二屬之子囊真菌(Bidartondo 氏等,2004)。

2. 蘭菌(菌根菌)對蘭科植物生長發育的效益

蘭科植物菌根和菌根真菌是隨著蘭科植物不同生長階段和環境條件的變化而變化的(Masuhara 氏等, 1988; Harvais 及 Hadley, 1967b ; Currah 氏等, 1988; Rasmussen, 2002; Zelmer 氏等, 1996)。蘭科植物種子和幼苗期以生長慢、競爭力差、需要可以提供特殊營養物質的菌根真菌共生，成年蘭科植物菌根真菌侵染力強、菌絲發達、能利用多種營養物質，這將有助於為蘭科植物提供足夠的營養物質，促進蘭科植物的生長和發育(朱氏等, 2009a)。與天麻(*Gastrodia elata*)共生的菌根真菌，由種子階段的萌發菌-紫萁小菇(*Mycena osmundicola*)，轉變成為成年階段的促生菌蜜環菌(*Armillaria mellea*) (徐及牟, 1990)，不同生長時期，需有不同種類的菌根真菌與其共生。菌根真菌不僅能夠促進蘭科植物種子發芽，及促進組織培養苗出瓶後之移植存活率和增進種苗的生長(郭氏等, 2000; 林, 2002; 蔡, 2003; Ramsay 及 Dixon, 2003; Chou 及 Chang, 2004; 唐及郭, 2004; Zettler 氏等, 2005; 郭氏等, 2008; Jin 氏等, 2009)，內生真菌可增強植物對氮、磷、鉀等營養元素的吸收，進而影響植物的生長，如從蘭科植物分離出的內生真菌接種大花蕙蘭後，植株吸收氮、磷、鉀養分的能力明顯增強，其中 *Mycena anoectochila* GC945 菌株使幼苗吸收氮和鉀的量比對照組分別提高了 175.5%和 97.5%，*M. orchidocol* GC943 菌使植株對磷的吸收量比對照組提高了 7 倍(趙氏等, 1999)，此外，亦能調節開花的時期(藍, 2001)。促進藥用蘭科植物有效成分糖及生物鹼的生成或積累(陳和郭, 2005)。

菌根真菌為蘭科植物種子提供所必須的養分，促進其萌發，還可以擴大蘭科植物的根際範圍，增強植物體吸收養分的能力(趙氏等, 1999；陳氏等, 2003)；同時

產生植物激素和維生素，促進植物生長(張氏等, 1999； 吳氏等, 2002)，還可做為真菌誘導子，增強蘭科植物的抗性等(潘氏等, 2004)。

3.促成有效成分的生成或積累

植物內生菌侵入寄主植物後，在特定的環境和生理條件下，除了能脅迫寄主促進寄主體內二次代謝產物的形成和累積，也能將植物體內和外源的化學物質轉化，產生在正常情況下，不能發現的小分子抗菌物質-植物保衛素，經誘導分泌的植物保衛素的化學結構多是萜類、生物鹼、皂苷、黃酮、酚類和多炔類等化合物，這些植物保衛素在藥用植物中，通常是能產生療效的有效物質(陳氏等, 2006)。利用離體共培養的方式，研究四種內生真菌對金釵石斛無菌苗生長及其多醣和總生物鹼含量的影響，結果四種內生真菌都能提高金釵石斛中多醣的含量，而內生真菌 MF23 能使金釵石斛總生物鹼含量提高 18.3%(陳和郭, 2005)。

4.蘭菌(菌根菌)與蘭科植物之間的專一性

蘭菌與蘭科植物之間的共生關係是否具專一性，各研究學者的觀點不一，其中受研究的植物種類、生長環境及實驗方法之不同，使得研究的結果有所不同。

伍等人於 2006 年，對於雲南各地區不同種類的蘭科植物菌根真菌之分離結果得知，不同地區的同種蘭科植物可以具有不同的菌根真菌，相同地區的不同蘭科植物具有同種菌根真菌，證明蘭科植物與菌根真菌之間的專一性並不十分嚴格。1936 年貝納爾(Bernard)指出蘭花與真菌間並沒有嚴格的專一性，但某種菌根真菌同哪種蘭科植物更能有效地共生卻有明顯的傾向。瓦卡普(Warcup)認為，至少在屬的水平上，蘭科植物與其菌根真菌之間存在專一性，現在被廣泛接受的觀點是：(1) 同種蘭花在不同的發育階段、不同生長環境的共生真菌，可能是不同的；(2)環境條件對共生真菌種類，以及共生關係的平衡有影響。大部份的地生蘭均要藉由菌根的幫忙，開始其生活史，多種真菌可以和地生蘭共存，故其菌與地生蘭之間並沒有專一性(Harvais 及 Hadley, 1967a)。Sneh 等人認為同種、同屬的蘭花，不同植株常含有同一種真菌，且從同種、同屬的蘭科植物分離出的真菌，才有能力促進

本種、本屬種子的發芽與生長，亦即蘭菌與蘭科植物間有專一性的存在，包括了種與種、種與屬、屬與屬間的專一性(Sneh 氏等, 1991)。 *Spiranthes sinensis* var. *amoena* 之種子於原生育地中之發芽主要受到 *Rhizoctonia repens* Bernard 所誘發。該菌種亦為與成熟蘭株共生之優勢菌種。可見在原生育地之 *S. sinensis* var. *amoena* 與蘭菌共生具專一性。而在無菌播種接種 *Rhizoctonia* spp. 觀察種子發芽的試驗中卻不具專一性(Masuhara 及 Katsuya, 1994)。從蘭科植物根部分離出數種菌株，這些菌株中，有些可以與其他種蘭科植物形成菌根，有些則不能，而這些分離出來的菌株中甚至不一定可以和同種蘭科植物形成菌根，因此專一性並非絕對存在，乃因種的不同而有所變異(莊和李, 1985；Masuhara 及 Katsuya, 1994)。

Rasmussen (2002)認為行光合作用的蘭花，內生真菌微生物較微生物異營的蘭花具較寬廣的真菌感染範圍。一些行光合作用的蘭花，收集自各地的廣範圍蘭花，具備單一且具優勢的菌根真菌(McCormick 氏等; 2004, 2006; Shefferson 氏等, 2005, Irwin 氏等, 2007)。行光合作用的地生蘭與單一真菌進行完全專一的連結，特別是 Tulasnellaceae 及 Ceratobasidiaceae 等成員(Otero 氏等, 2002; Ma 氏等, 2003; Suarez 氏等, 2006)。相對的真菌異營蘭花含沒有相關專一的真菌(Julou 氏等, 2005; Dearnaley 2006)。行光合作用的蘭花休眠期長者及生長在重遮陰棲地的環境下，較常綠植物，一年生開花植物及生長在無遮蔽處的植物還要依賴真菌碳素(Girlanda 氏等, 2006)。因此有效及專一的連結是有益的。假如真菌菌種是稀有的或者不規則的分布在各處，真菌的專一性及蘭花的稀有性也許可能連結(Brundrett 氏等, 2003; Bonnardeaux 氏等, 2007)。專一性可以讓菌根之間的交互作用更有效性(Otero 氏等, 2004)。專一性可能誘導蘭科植物種子之發芽(Bonnardeaux 氏等, 2007)。

5. 共生發芽

蘭花種子的發芽有別於一般植物，必須透過與自然界的蘭菌共生或利用無菌播種的方式方能達成，一般人不容易為之且並不是所有蘭花種子均可於非共生狀

態下發芽(Arditti, 1992)。

1970年 Hadley 以多種真菌為材料，人工接種真菌於各種類之原球體上，發現有下列四種生長情形：(A).原球體未受真菌感染；(B).原球體因未知之原因死亡（非因真菌寄生所致）；(C).真菌形成寄生狀態，導致原球體死亡；(D).真菌與原球體形成可共存之感染。成共生感染之原球體方可繼續發育；發育中，原球體尚會因過敏作用或消化作用將真菌殺死，而它本身也無法繼續生長。故他認為共生狀態之被肯定，須待原球體發育至某一成熟度方可；且幼苗期之共生良好，並不保證成株即可形成良好之共生狀態。1922年 Knudson 曾認為原球體僅底部受真菌感染時，生長快速；但如真菌繼續生長至原球體體積 1/3 時，原球體即告死亡。後來他又提出「無論任何菌種，只要生長不蓋過原球體，即可形成共生，促進生長」之說法。蘭科植物種子受蘭菌感染，種子的基部細胞逐漸發育成懸柄，真菌菌絲由懸柄孔口處穿透而進入胚內生長(Arditti, 1967)，或經由原球體上的吸收毛進入(Hadley, 1970； Muir, 1987)。菌絲進入胚後，會先在表皮細胞內形成菌絲團，並逐漸形成消化區，消化後所產生的養分運送至細胞分裂區，提供種子往後分化芽體時所需的養分(Uetake 氏等氏, 1992)。

蘭菌可促進種子發芽之原因歸納如下：蘭花種子接種蘭菌以後，因可促進種子自由水的吸收而促進其發芽(Yoder 氏等, 2000; Arditti, 1967)，蘭菌的共生可以提供種子發芽所需的菸鹼酸，促進種子的發芽(Uedan 及 Torikata, 1972)。1966年 Smith 證實幾乎所有共生真菌均具分解纖維素成葡萄糖之能力。代謝後所產生的有機酸可調節 pH 值(Bernard, 1899)，在早期 1925年 Knudson 以嘉德麗亞蘭為材料，行共生培養，僅以澱粉為碳水化合物，觀察種子發芽與小苗生長；發現真菌不但能將澱粉分解成葡萄糖，且可因代謝產生之有機酸，使培養基之 pH 值由 5.5 降至 4.7，此種酸度正適合小苗生長。菌根外部菌絲也會進行養分的運移，例如：磷和礦物質等(Hadley, 1984)。因此蘭科植物未成熟的胚接種相容的共生真菌，對於「難發芽」的蘭花種類，是一種良好的解決方法(Rasmussen 及 Rasmussen, 1991)。有報告指出

這可能與蘭菌具有水解澱粉等功能，在種子發芽的過程中，提供其生長所需的營養成分，使種子能順利的發芽，學者認為蘭菌感染蘭科植物，所提供給種子的營養成分，可能為荷爾蒙或維生素等(周, 1997)。

茲將蘭花與蘭菌共生發芽之相關研究，分成瓶內、瓶外、棲地等三種狀態說明如下：

(1).瓶內共生

取臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)及彩葉蘭(*Haemaria discolor* var. *dawsoniana*)之種子，培養於燕麥培養基並接種絲核菌屬蘭菌 R02，於播種後 60 天發芽率分別為 80-86%及 65.6% (周, 2004)。春石斛 *Dendrobium* Snow Flake，瓶內接種蘭菌 PH 處理之種子，發芽率達 72.3% (林, 2002)。將佛羅里達三種半水生蘭花 *Habenaria* species (鵝毛玉鳳蘭)(*Habenaria quinqueseta*, *H. macroceratitis*, *H. repens*)，在試管內利用接種蘭菌，促使種子發芽，及 *H. repens* 種苗從試管中移植至土壤進行試驗。結果三種半水生蘭花可以利用蘭菌共生繁殖成功，可利用該繁殖技術進行濕地復育計畫(Stewart 氏等, 2002)。*Dactylorhiza majalis* 與絲核菌之瓶內共生發芽與溫度十分相關。當溫度高於 23-25°C，種子萌芽率下降；在 26°C 高溫或低於 13°C 環境生長的植株，體內的儲存養分及生長情形，都不如生長於適溫之植株(Rasmussen 氏等, 1990)。

(2).瓶外共生

素心蘭(*Cybidium sinense* Willd)種子以瓶外接種蘭菌發芽成功(王, 1999)。彩葉蘭及彩葉蘭道生種種子，以泥炭土為培養介質，加入 1,000 ppm 之花寶 3 號溶液，混合均勻後置於 17.5x12 公分之塑膠盆中，每個塑膠盆中播種一個成熟果莢，種子均勻灑於介質表面並進行接種處理。以接種 R02 及混合菌種 R01、R02 處理之發芽情形最佳；將彩葉蘭未經消毒種子直接播種於培養 R02 菌種之 PDA 培養基中，可促使彩葉蘭種子快速發芽(張, 2001)。經培養 2 週之泥炭苔帶菌基質充分混合後，置於直徑 9 公分塑膠培養皿中，培養皿中灑佈春石斛(*Dendrobium* Snow Flake)

種子，再以石蠟膜密封住。播種四十天後，以接種蘭菌 PH 處理之種子發芽率最高，達 84.5%。以泥炭苔為帶菌基質播種黃花石斛(*Dendrobium tosaense*)種子，40 天後其發芽率最高達 75.1%左右(林, 2002)。

(3). 棲地共生

使用五種原生種蘭科植物種子，利用田間播種技術進行種子發芽試驗，其中 *Corallorhiza odontorhiza*, *Goodyera pubescens*, *Galearis spectabilis* 於播種後 20-30 個星期發芽，若無蘭菌感染的種子則無法繼續後期的發育(Rasmussen 及 Whigham, 1993)。於自然棲息地，在靠近 *Caladenia arenicola* 成熟株附近，其發芽情況增加，而其他鉀含量及葉子碎屑，均和種子發芽有相互關係(Batty 氏等, 2001)。測量蘭花種子於棲息地之發芽能力，可以說明該地可以增加新株的能力。該訊息可用以評估大自然新增植株的能力，及蘭花重新導入自然棲地的潛勢(Batty 氏等, 2001)。

6. 蘭科植物菌根基因表現之研究

蘭科植物菌根的分子生理已經有初步的研究，Watkinson 及 Welbaum 以 *Cypripedium parviflorum* var *pubescens* (Willd.) Knight 為材料，分析其菌根及非菌根植株之基因表現。從非菌根植株及初期感染的菌根植株抽取 mRNA，透過 amplified fragment length polymorphism (AFLP) 互補 DNA 不同的展現，鑑定不同條帶的表現。菌根植株 trehalose-6-phosphate synthase 及 phosphatase 減少，改變蘭科植物碳水化合物的轉移 (Watkinson 及 Welbaum, 2003)。

二、木黴菌(*Trichoderma*)

木黴菌是一種重要的植物病害生防因子，尤其經常被應用在植物病原真菌病害之防治。木黴菌依靠其菌株在包括趨向生長、識別、接觸、纏繞與穿透等步驟，真菌寄生過程中，分泌產生的幾丁質酶、葡聚糖酶、纖維素酶、蛋白酶等一系列細胞壁降解酶，進行重寄生作用，拮抗其他植物病原菌，行使其生防功能(李氏等, 2009)。

從 Weindlong 於 1932 年首次發現木素木黴菌(*Trichoderma lignorum*) 對多種

植物病菌具有寄生作用以來，已廣為應用於植物病害的防治。木黴菌可以防治的病原菌種類包括：*Botrytis cinerea* Pers、*Colletotrichum truncatum* Schwein、*Cylindrocladium floridanum* Sobers & Seymour、*Gaeumannomyces graminis* Sacc.、*Pythium* spp.、*Phytophthora citrophthora* Smith & Smith、*Rhizoctonia solani* Kuhn 與 *Sclerotinia sclerotiorum* Lib.等(Bailey 及 Lumsden, 1998)。其中以對腐黴菌(*Pythium* spp.)(Sivan 氏等, 1984; Wolffhechel 及 Jensen, 1992)、菌核病菌(*Sclerotinia* spp.)(Latunde-Dada, 1993)與立枯絲核菌(*Rhizoctonia* spp.)(Aziz 氏等, 1997; Lewis 及 Papavizas, 1987; Trillas 氏等, 2006)等多種作物危害至為嚴重的土壤傳播性植物病原菌，防治效果至為顯著；另外對嚴重危害小麥(Dal Bello 氏等, 2002)及水稻(Kumakura 氏等, 2003)等作物，且藥劑防治殊為不易之鐮孢菌感染，防治效果也相當優異，研究指出 *Trichoderma asperellum* TA 菌株確為金線連莖腐病(由 *Fusarium oxysporum* Schl.感染危害)生物防治上極具應用潛力之菌株(蔡氏等, 2008)。除了病害防治效果外，木黴菌的應用已知同時具有促進種子發芽、植株生長及提升作物產量(Bailey 及 Lumsden, 1998; Lindsey 及 Baker, 1967)等功效。

三、鐮孢菌(*Fusarium*)

利用分離出的 *Fusarium* 可以誘導試管中 *Cypripedium reginae* 之種子發芽及原球體的形成(Vujanovic 氏等, 2000)。Bernard 最先提出 orchid fusaria 可以促進種子發芽(Bernard, 1909)。而 *Fusarium* 對於種子種殼的分解也許有相關，或藉由原生的微生物(*Fusarium*)阻礙種子病原菌的感染(Vujanovic 氏等, 2000)，可能是促進種子發芽之原因。

四、炭角菌(*Xylaria*)

野生炭角菌大多生於腐木或木材上，其成熟子囊果的大小，形狀，子囊孢子的結構和自然生態特性為分類的主要依據。炭角菌也是一種分布較廣的內生真菌，在苔類，被子植物以及昆蟲的巢穴中均有發現(陳和胡, 1995; Davis 氏等, 2003)。某些炭角菌有很高藥用價值，如黑柄炭菌(*Xylaria nigripes*)，叢生炭角菌

(*Xylaria bipindensis*)，鹿角炭角菌(*Xylaria hypoxylon*)，其藥用活性成分主要為多醣類和蛋白類物質(樂及文, 2004; 朱及張, 2005)。



參考文獻

- 王美琇. 1999. 蘭共生菌對數種蘭科植物生長與發育之影響與應用。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 81 頁。
- 加古舜治. 1968. シュンラン種子の發芽に關する研究 引自“ラン科植物の種子形成と無菌播”(鳥博高編)。誠文堂新光社 東京 p:174-232。
- 甘偉松. 1965. 臺灣植物藥材誌 第二輯 p86。
- 伍建榕、韓素芬、朱有勇、呂梅、王光平、郭文林. 2006. 雲南蘭科植物菌根內生真菌種類研究。西南林學院學報 26:5-10。
- 朱志熊、張澤文. 2005. 黑柄炭角菌的菌種分離及其培養特性。中國食用菌 24(5):15-18。
- 朱國勝、桂陽、劉作易. 2009a. 獨蒜蘭共生菌根真菌動態變化研究。湖北農業科學 48(10):2484-2488。
- 朱艷秋、張榮意、孟銳、譚志瓊、王玉洁. 2009b. 黃花美冠蘭根部內生真菌研究。西南農業學報 22(3):675-680。
- 余德發、陳任芳. 2001. 小巧玲瓏的原生植物—綬草。花蓮區農業專訊 36:5-7。
- 利幸貞. 1992. 素心蘭與四季蘭之無菌播種、溫度對四季蘭開花之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 53 頁。
- 吳新棋. 1991. 紅花鶴頂蘭無菌播種與開花之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 95 頁。
- 吳靜萍、錢吉、鄭師章. 2002. 蘭花菌根菌分泌成分的初步分析。應用生態學報 13(7):845-848。
- 李自強. 1999. 蘭共生菌對一葉蘭與(彩葉蘭 x 金線蓮)雜交種生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 110 頁。
- 李沐磬. 1989. 紅花鶴頂蘭之生長習性研究與繁殖。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 128 頁。

- 李勇毅. 1998. 原生拖鞋蘭胚發育與無菌發芽之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 75 頁。
- 李晔、蔡牧起. 1989. 黃根節蘭和鶴頂蘭開花習性及種子發芽生理之研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
- 李晔、蔡牧起. 1991. 根節蘭與鶴頂蘭之種子發芽生理及光合作用之研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
- 李晔. 1990. 蘭之胚培養 中國園藝 36:223-224。
- 李國基. 2001. 臺灣金線連與蘭菌之鑑定及生產技術改進。國立臺灣大學園藝研究所博士論文, 191 頁。
- 李焱、產祝龍、檀根甲、丁克堅、高智謀、承河元. 2009. 木黴菌防治植物真菌病害研究進展。生物技術通訊 20(2):286-290。
- 周玲勤. 1997. 彩葉蘭之大量繁殖與蘭菌的利用。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 124 頁。
- 周玲勤. 2004. 臺灣金線連、彩葉蘭和其 F₁ 雜交種之菌根生理與培育。國立臺灣大學園藝研究所博士論文, 169 頁。
- 孟銳、張榮意、朱艷秋、譚志瓊、王玉洁. 2009. 野生黃花美冠蘭根部內生真菌多樣性研究。廣西農業科學 40(5):556-558。
- 林文川. 2000. 藥用及保健植物-臺灣金線連之開發與利用 臺灣金線連水粗萃取物的毒理學及藥理學研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。
- 林文川. 2004. 臺灣金線連的研究近況。國際藥用植物產業發展研討會專刊。231-238。
- 林俊清、顏銘宏. 2000. 臺灣產生藥金線連之保肝效果及抗脂質過氧化、清除自由基活性機轉研究。行政院國家科學委員會成果報告。
- 林秋芬. 2002. 蘭菌對石斛蘭種子發芽與幼苗生長之影響。國立中興大學園藝研究所碩士論文, 78 頁。

- 林維明. 2006. 臺灣原生蘭賞蘭大圖鑑(上)。天下遠見出版股份有限公司。
- 林讚標. 1976. 臺灣蘭科植物。會風公司 臺北 p:234。
- 邱金春、王博仁. 1985. 嘉德麗雅蘭與蕙蘭種子發芽與芽的形成。中國園藝 31(1):10-22.
- 范黎、郭順星、曹文岑. 1996. 墨蘭共生真菌一新種的分離、培養、鑑定及其生物活性。真菌學報 15(4):251-255。
- 唐明娟、孟志霞、郭順星、陳曉梅、肖培根. 2008. 內生真菌對福建金線連栽培及酶活性的影響。中國藥學雜誌 43(12):890-893。
- 唐明娟、郭順星. 2004. 內生真菌對臺灣金線連栽培及酶活性的影響。中國中藥雜誌 29(6):517-520。
- 徐錦堂、牟春. 1990. 天麻原球莖生長發育與紫萁小菇及蜜環菌的關係。植物學報 32: 26-31。
- 國家中醫藥管理局中華本草編委會. 1999. 中華本草(8):7915-7917. 上海科學技術出版社。
- 張乃文. 1999. 臺灣金線連之組織培養繁殖技術。中興大學農藝研究所碩士論文, 83 頁。
- 張淑芬. 1998. 金線連基腐病與莖腐病之綜合防治。中興大學植物病理學研究所碩士論文, 100 頁。
- 張棋雯. 2001. 彩葉蘭與彩葉蘭道生種之大量繁殖與蘭菌之利用。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 121 頁。
- 張集慧、王春蘭、郭順星. 1999. 蘭科藥用植物的 5 種內生真菌產生的植物激素。中國醫學科學院學報 21(6):460-465。
- 張禧慶、康冀川、何勁、韓曉麗、黃慶華 2008. 兩株石斛內生炭角菌的鑑定及活性成分初步研究。西南農業學報 21(2):317-322。
- 梁文俐、陳榮進、江育人、蘇慶華、楊玲玲、顏焜熒 1991. 臺灣金線連之研究 I 金

- 線連之生理活性研究。藥用保健植物研討會專輯。臺東區農業改良場編印, p:99-110。
- 梁健成、許瑋真、黃克峯 2012. 綫草植物於化妝品應用開發之研究。美容科技學刊 9:23-30。
- 莊維仁. 1989. 金線連莖腐病及基腐病病原學及其防治之研究。中興大學植物病理學研究所碩士論文, 105 頁。
- 莊錦華、李晔. 1985. 蘭苗於共生下之生長生理。中國園藝 31(4):189-200。
- 許家言、邱木丹. 1999. 金線連以液體與固體交互培養進行大量繁殖之研究。興大園藝 24:59-65。
- 郭順星、曹文岑、高微微. 2000. 鐵皮石斛及金釵石斛菌根真菌的分離及其生物活性測定。中國中藥雜誌 25(6):338-341。
- 郭寧、王娣、林毅、蔡永萍. 2008. 霍山石斛與內生真菌共培養體系的建立。激光生物學報 17(3):423-427。
- 陳季呈. 2010. 可供觀賞又保健的清明草之組織培養技術開發。花蓮區農業專訊 49:5-7。
- 陳宛如、胡銀忠. 1995. 白蟻巢上生長的子囊菌—黑柄炭角菌的深層培養及其生理研究。真菌學報 14(4):269-276。
- 陳美蘭、黃璐琦、歐陽少華、邵愛娟、林淑芳. 2006. 植物內生菌對道地藥材形成的影響。中藥研究與開發 13:40-42。
- 陳姪姪、朱國勝、毛堂芬、劉作易. 2008. 鵝毛玉鳳蘭內生真菌的初步研究。貴州農業科學 36(3):12-13。
- 陳瑞蕊、林先貴、施亞琴. 2003. 蘭科菌根的研究進展。應用與環境生物學報 9(1):97-101。
- 陳曉梅、郭順星. 2005. 四種內生真菌對金釵石斛無菌苗生長及其多醣和總生物鹼含量的影響。中國中藥雜誌 30(4):253-256。

- 曾千容. 2002. 石斛蘭菌之分離、鑑定與培養及其對石斛蘭生長之影響。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 128 頁。
- 楊恭毅. 1984. 楊氏園藝植物大名典. P:5477-5480, 中國花卉雜誌社。
- 楊遠波、劉和義、林讚標. 2001. 臺灣維管束植物簡誌(第五卷)。
- 葉志新、廖芳心、鄭隨和. 2007. 臺灣原生鶴頂蘭屬簡介。桃園區農業專訊 59:17-19。
- 葉淑如. 1990. 黃根節蘭、繡邊根節蘭及白鶴蘭植株之生長習性與種子發芽生理。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 133 頁。
- 董必慧、楊小蘭. 2006. 沿海灘涂瀕危物種綫草的生長利用特性和保護策略。江蘇農業科學 3:193—195。
- 廖仁滄. 2009. 又見鶴頂蘭開。科博電子報 第 432 期。
- 趙楊景、郭順星、高薇薇. 1999. 三種內生真菌與大花蕙蘭共生對礦物質營養吸收的影響。園藝學報 26(2):110-115。
- 劉祖惠、許乃文、顏家瑜、吳瑞鈺. 2001. 利用不定芽再生進行綫草微體繁殖。中國園藝 47(1):51-58。
- 劉新裕、蔡新聲、徐原田、劉柏煙. 1987. 金線連之繁殖與栽培技術。科學農業 35(5-6):125-129。
- 潘超美、賀紅、林群英. 2004. 真菌誘導子對鐵皮石斛組織培養物生長的影響。中醫藥學刊 22(1):54-55。
- 蔡金池、曾德賜、謝式垵鈺. 2008. 木黴菌 *Trichoderma asperellum* TA 菌株在臺灣金線連莖腐病防治上之應用。植物病理學會刊 17(3):243-254。
- 蔡雅竹. 2010. 紅鶴頂蘭遠緣雜交及花梗培養。國立中興大學園藝研究所碩士論文, 105 頁。
- 蔡靜怡. 1997. 菌及溫度對臺灣金線連生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 80 頁。

- 蔡麗君. 2003. 蘭菌與植物生長素對拖鞋蘭生長發育之影響。臺灣大學園藝研究所碩士論文, 79 頁。
- 鄭可大. 2001. 金線連水萃取物之抗氧化力。農業生物技術國家型科技計畫成果發表會。
- 蕭翌柱、陳威臣、呂佳宜、蔡新聲. 1995. 臺灣金線連之組織培養 I: 改進種子萌芽率之研究。中華農業研究 44(3):279-286。
- 戴國興. 1986. 珍貴藥用植物金線連之組織培養繁殖。中華農學會報(新)137:42-54。
- 謝式鉉鈺、莊維仁、黃士峰. 1994. 金線連莖腐病及其病原菌。植物病理學會刊 3:140-146。
- 謝俊生. 2002. 臺灣金線連抑制肝癌細胞生長抗氧化機制的探討。中國醫藥學院醫學研究所碩士論文, 69 頁。
- 謝麗華、王國紅、楊民和. 2006. 內生真菌及其對宿主植物生態適應性的影響。菌物研究 4:98-106。
- 藍亦青. 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 93 頁。
- 魏勤、張麗梅、赫曉蕾. 1999. 雲南幾種熱帶蘭根際真菌調查。雲南大學學報(自然科學版) 21(3):222-225。
- 蘇鴻傑、陳子英. 1991. 臺灣野生根節蘭及鶴頂蘭之生育地及氣候環境。臺大農學院研究報告 31(4):40-55。
- 蘇鴻傑. 1975. 臺灣野生蘭。豐年社. 79-81 頁。
- 蘇鴻傑. 1990. 臺灣野生根節蘭及鶴頂蘭之分類及生態研究 II、根節蘭屬柱唇節蘭、鶴頂蘭屬及肖頭蕊蘭屬。臺大實驗林研究報告 4:81-96。
- 鐘詩文、許天詮、楊智凱. 2006. 臺灣稀有蘭科植物圖鑑。農委會林務局。
- 樂洋、文華安. 2004. 多型炭角菌的培養及多醣提取。菌物學報 23(4):536-547。

Abe, K. 1972. Contributions to the embryology of the family Orchidaceae. VI
Development of the embryo sac in 15 species of Orchids; Sci. Rep. Tôhoku Univ.
36:135-178.

Alphonso, A. G. 1980. Some colourful orchid species of Malaysia. In: Proceedings of the
9th World Orchid Conf. Edited by M. R. Sukshom Kashemasanta. Bangkok,
Thailand. Amarin Press. Thailand. p:97-106.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33:1-97.

Arditti, J. and A. K. A. Ghani. 2000. Tansley review no. 110 numerical and physical
properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol.
145:367-421.

Arditti, J., M. Arditti, R. Ernst. 1984. Some structural and physiological features which
facilitate the survival of orchids. In: Tan WK(ed) Proceedings of the 11th world
orchid conference. International Press, Miami, p:102-105.

Arditti, J., R. Ernst, T. W. Yam, and C. Glabe. 1990. The contributions of orchid
mycorrhizal fungi to seed germination: A speculative review. Lindleyana,
5(4):249-255.

Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley and Sons, Inc, New York.
p:505-506.

Azevedo, J. L., W. J. Maccheroni, J. O. Pereira, and W. L. Araujo. 2000. Endophytic

microorganisms : a review on insect control and recent advances on tropical plants.

Electron Biotechnol. 3:40-65.

Aziz, N. H., A. A. El-Essawy, and M. A. Khalaf. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. Bot. Bull. Acad. Sin. 38:33-39.

Bailey, B. A., and R. D. Lumsden. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. Pages 185-204 in: *Trichoderma and Gliocladium*, vol 2. C. P. Kubicek, and G. E. Harman, eds., Taylor & Francis, London, 393 pp.

Batty, A. L., K.W. Dixon, M. Brundrett and K. Sivasithamparam. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. New Phytol. 152:511-520.

Bayman, P., J. T. Otero. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. In: Schulz B., Boyle C., Sieber T. (eds) Microbial root endophytes. Springer, New York, pp. 153-173.

Bayman, P., L. Lebron., R. L. Tremblay and D. J. Lodge. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytol. 135:143-149.

Bechtel, H., P. Cribb and E. Lannert. 1986. The manual of cultivated orchid species. The

MIT Press, Cambridge. pp. 72-74, 361-362.

Beltran-Nambo MA, Carreon-Abud Y, Ortega-Larrocea MP. 2010. Mycorrhizal Colonization Patterns of Three *Bletia* Species in a natural forest reserve in Michoacán, Mexico. *Acta Hort.* 878:43-52.

Bernard, N. 1899. Sur la germinaison du *Neottia nidus-avis*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 128:1253-1255.

Bernard, N. 1909. L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leurs champignons commensaux. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 9:1-196.

Bidartondo M. I., B. Burghardt, G. Gebauer, T. D. Bruns, and D. J. Read. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc R Soc Lond B* 271:1799–1806.

Bonnardeaux Y., M. Brundrett, A. Batty, K. Dixon, J. Koch, and Sivasithamparam. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi in terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycol. Res.* 111:51–61.

Brundrett M. C., A. Scade, Batty A. L., Dixon K. W., and Sivasithamparam K. 2003. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycol. Res.* 107:1210–1220.

Bush, L. P., H. H. Wilkinson, C. L. Schardl. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology.* 114(1):1-7.

- Cheng, H. Y., W. C. Lin, F. M. Kiang, L. Y. Wu, and W. H. Peng. 2003. *Anoectochilus formosanus* attenuates amnesia induced by scopolamine in rats. *J. Chin Med.* 14: 235-245.
- Chiang, Y. C., C. H. Chou., P. R. Lee. and T. Y. Chiang. 2001. Detection of leaf-associated fungi based on PCR and nucleotide sequence of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in *Miscanthus*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:39-44.
- Chou, L. C., D. C. N. Chang. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and F₁ hybrids. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:143-147.
- Clements, M. A. Muir, H., and P. J. Cribb. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull.* 41:437-445.
- Currah, R. S., S. Hambleton, A. Smreciu. 1988. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*. *Amer. J. Bot.* 75:739-752.
- Dal, Bello, G. M. C. I. Monaco, and M. R. Simon, 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:627-636.
- Davis, E. C., J. B. Franklin, A. J. Shaw and R. Vilgalys. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms phylogenetics, distribution and symbiosis. *Am. J. Bot.* 90:1661-1667.

- Dearnaley J. D. W. 2006. The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides*—is this orchid saprophytic or parasitic? *Australas Mycol.* 25:51–57.
- Dixon, K. 1987. Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris, W. K. (ed.). *Modern orchid growing for pleasure and profit*. Orchid club of S. Australia, Inc., Adelaide, S. Australia, p:47-100.
- Downie, D. G. 1959. The mycorrhiza of *Orchis purpurella*. *Trans. Proc. Bot. Soc. Edinb.* 38:16-29.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314p.
- Du, X. M., N.Y. Sun, J. Hayashi, Y. Chen, M. Sugiura, and Y. Shoyama. 2003. hepatoprotective and antihyperliposis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*. *Phytother. Res.* 17:30-33.
- Gargas, A., J. W. Taylor. 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S Rdna from lichenized fungi. *Mycologia.* 84:589-592.
- Girlanda M., M. A. Selosse, D. Cafasso, F. Brilli, S. Delfine, R. Fabbian, S. Ghignone, P. Pinelli, R. Segreto, F. Loreto, S. Cozzolino, and S. Perotto. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Mol. Ecol.* 15: 491–504.
- Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New*

Phytol. 69:1015-1023.

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza In: Arditti (eds). Orchid biology: review and perspectives II. p. 83-118. Cornell University Press, Ithaca. New York.

Hadley, G. 1984. Uptake of ^{14}C glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms. New phytol. 96:263-273.

Harvais, G. and G. Hadley. 1967a. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytol. 66:217-230.

Harvais, G. and G. Hadley. 1967b. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. New Phytol. 66:205-215.

Hsieh, W. T., T. T. Chia, J. B. Wu, H. B. Hsiao, L. C. Yang, and W. C. Lin. 2011. Kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus formosanus*, inhibits carbon tetrachloride induced Kupffer cells mediated liver damage. J. Ethnopharmacol. 135:440-449.

Huang T. C., Editorial Committee of the Flora of Taiwan (2003): Flora of Taiwan 2nd. Edition, Vol. VI Taipei, Taiwan, ROC.

Irwin M. J., J. J. Bougoure, J. D. W. Dearnaley. 2007. *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two Ceratobasidium root associated fungi across its range in Eastern Australia, Mycoscience 48:231–239.

Jin, H., Z. X. Xu, J. H. Chen, S. F. Han, S. Ge, and Y. B. Luo, 2009. Interaction

- between tissue-cultured seedlings of *Dendrobium officinale* and mycorrhizal fungus (*Epulorhiza* sp.) during symbiotic culture. *Chin. J. Plant Ecol.* 33:433-441.
- Julou T., B. Burghardt, G. Gebauer, D. Berveiller, C. Damesin, and M. A. Selosse. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol.* 166:639–653.
- Jumpponen, A. 2002. Non-mycorrhizal root endophytes-aspects on their ecology. The 7th international mycological congress. IMC7 book of abstracts. 57 pp.
- Kano, K. 1968. Acceleration of the germination of so-called "hard to germinate" orchid seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 37:690-697.
- Kazumitsu, M. and Mii. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in symbiotic culture. *Sci. Hortic.* 35:127-130.
- Khor, E., W. F. Ng, and C. S. Loh. 1998. Two-coat systems for encapsulation of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds and protocorms. *Biotechnol. Bioeng.* 59:635-639.
- Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73:1-25.
- Knudson, L. 1925. Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds *Bot. Gaz.* 77:345-379.
- Kristiansen, K. A., J. V. Freudenstein, F. N. Rasmussen, and H. N. Rasmussen. 2004.

Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Mol. Ecol.* 33:251-258.

Kumakura, K., S. Watanabe, J. Toyoshima, T. Makino, H. Iyozumi, T. Ichikawa, and K. Nagayama. 2003. Selection of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. For effective control of rice seedborne pathogens. *Jpn. J. Phytopathol.* 69:393-405.

Latunde-Dada, A. O. 1993. Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningi*. *Plant Pathol.* 43:522-529.

Law, S. K. and E. C. Yeung. 1989. Embryology of *Calypso bulbosa*. I. ovule development. *Amer. J. Bot.* 76(11):1668-1674.

Leake, J. R.;D. D. Cameron. 2012. Untangling above- and belowground mycorrhizal fungal networks in tropical orchids. *Mol. Ecol.* 21:4921-4924.

Lewis, J. A., and G. C. Papavizas. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.* 36:438-446.

Lin, C. C., P. C. Huang, J. M. Lin. 2000. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am. J. Chin. Med.* 28:87-96.

Lin, J. M., C. C. Lin, H. F. Chiu, J. J. Yang, and S. G. Lee. 1993. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*,

Ganoderma lucidum and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. Am. J. Chin. Med. 21:59-69.

Lin, Y. L., R. L. Huang, M. J. Don. and Y. H. Kuo. 2000. Dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis*. J. Nat. Prod. (63):1608-1610

Lin, Y. L., W. Y. Wang, Y. H. Kuo, and Y. H. Liu. 2001. Homocyclotirucallane and Two Dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis*. Chem. Pharm. Bull. 49(9):1098-1101.

Lindsey, D. L., and R. Baker. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. Phytopathology 57:1262-1263.

Liu, G., S. M. Chambers, and J. W. G. Cairney. 1998. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal endophytes isolated from *Woollsia pungens*. New Phytol. 140:145-153.

Ma M., T. K. Tan, S. M. Wong. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. Mycol. Res. 107:1041–1049.

Ma, F. Z. Li, M. Zhang, S. Jiang and Y. Xiao. 2010. Light Intensity Affects Growth, Photosynthetic Capability, and Total Flavonoid Accumulation of *Anoectochilus* Plants. Hort. Sci. 45(6) : 863-867.

Masuhara G., S. Kimura, and K. Katsuya. 1988. Seasonal changes in the Mycorrhizae of *Bletilla-Striata* Orchidaceae. Trans. Mycol. Soc. Japan, 29:25-31.

- Masuhara, G., and K. Katsuya. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127:711-718.
- McCormick M. K., D. F. Whigham, D. Sloan, K. O'Malley, and B. Hodkinson. 2006. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87:903–911.
- McCormick M. K., D. F. Whigham, J. O'Neill. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytol.* 163:425–438.
- McInory, J. A., and J. W. Koepper. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil.* 173:337-342.
- Muir, H. 1987. Symbiotic micropropagation of orchid seed. *Orchid Rew.* 91:44-48.
- Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Bletilla striata* Rchb. f. and *Calanthe discolor* Lindl. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 51:82-93.
- Ogoshi, A. 1996. In : *Rhizoctonia* species : taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer academic publishers. p:1-5.
- Oniki, M., K. Kobayashi, T. Araki, and A. Ogoshi. 1986. A new disease of turf-grass caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-Q. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:850-853.
- Otero, J. T., D. J. Ackerman, and P. Bayman. 2004. Differentiation in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13:2393-2404.

Otero, J. T., J. D. Ackerman, and P. Bayman. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Amer. J. Bot.* 89:1852-1858.

Penelope, S. H. B. 2004. Mycorrhizal specificity in endemic Western Australian terrestrial orchids (tribe Diurideae) : Implications for conservation. PhD dissertation, Graduate Institute of Philosophy, Murdoch University, 210 pp.

Phillips, R. D.; M. D. Barrett;; K. W. Dixon;; S. D. Hopper. 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *J. Ecol.* 99 : 858-869.

Ramsay, M. M., K. W Dixon. 2003. Opagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids//Dixon K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett, and P. J. Cribb. *Orchid conservation* Kota Kinabalu Sabah: Natural History Publications (Borneo):259-288.

Rasmussen H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244:149–163.

Rasmussen, H. and F. N. Rasmussen. 1991. Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* inferred from symbiotic experiments. *Lindleyana* 6(4):221-227.

Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244:149-163.

Rasmussen, H. N. and D. F. Whigham. 1993. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *Amer. J. Bot.* 80(12):1374-1378.

Rasmussen, H., T. F. Andersen, and B. Johansen. 1990. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell Environ.* 13:171-177.

Redecker, D., R. Kodner, and L. E. Gaham. 2002. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science.* 289(5486):1920-1921.

Rodriguez, R. J., R. S. Redman, J. M. Henson. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plant to high stress environments. *Mitigation Adapt. Strat. Global Change* 9:261-272.

Ruangwut C., B. Dell., S. Vessabutr, B. Bussaban and S. Lumyong. 2011. Endophytic fungi from *Pecteilis Susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza* 21:221-229.

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

Shefferson R. P., M. Weiß, T. Kull, and D. L. Taylor. 2005. High specificity generally

characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. Mol. Ecol. 14:613–626.

Shih, C. C., Y.W. Wu, C. C. Hsieh, and W. C. Lin. 2004. Effect of *Anoectochilus formosanus* on fibrosis and regeneration of the liver in rat. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31:620-625.

Shih, C. C., Y. W. Wu, and W. C. Lin. 2002. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 29:684-688.

Shih, C. C., Y. W. Wu, and W. C. Lin. 2003. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by the aqueous extraction of *Anoectochilus formosanus*. Am. J. Chin. Med. 31:25-36.

Shih, C. C., Y. W. Wu, and W. C. Lin. 2005 Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Phytomedicine 12:453-460.

Shih, C. C., Y. W. Wu, W. C. Lin. 2001. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. J. Ethnopharmacol. 77:233-238.

Sivan, A., Y. Elad, , and I. Chet. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. J. Phytopathol.

74:498-501.

Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhiza fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65:488-499.

Sneh, B., L. Burpee, and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. 133pp. The American Phytopathological Society press. Minnesota, U. S. A..

Stewart, S. L. and L. W. Zettler. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany* 72:25-35.

Stone, J. K., C. W. Bacon, and J. F. Jr. White 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial Encophytes.* 3:29.

Strobel, G. B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4):491-502.

Su, H. J., C. S. Leou, J. J. Chen, and C. Y. Hu. 2000. In : Huang, T. C. (eds.), *Orchidaceae. Flora of Taiwan*, 2nd ed. 5:729-1086. Editorial Committee, Dept. Bot., NTU, Taipei, Taiwan.

Suarez J. P., M. Weiß, A. Abele, S. Garnica, F. Oberwinkler, and I. Kottke. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110:1257–1270.

Suarez, J. P., M. Weiß, A. Abele, F. Oberwinkler, and I. Kottke. 2008. Members of

Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol. Progress* 7:75-85.

Tan, T. K., W. S. Loon, E. Khor. And C. S. Loh. 1998. Infection of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports*. 18:14-19.

Teob, E. S. 1980. *Orchids of Asia* Times Book International, Singapore. 317pp.

Tezuka, Y., L. Ji, H. Hirano, M. Ueda, K. Magashima and T. Kikuchi. 1990. Studies on the constituents of Orchidaceous plants. IX. Constituents of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames var. *amoena* (M. Bieberson) Hara. (2). Structures of spiranthesol, spiranthoquinone, spiranthol-C, and spirantheol-B, new isopentenyl dihydro-phenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.* 38:629-635.

Tezuka, Y., M. Ueda and T. Kikuchi. 1989. Studies on the constituents of Orchidaceous plants. VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames var. *amoena* (M. Bieberson) Hara. (1). Isolation and structure elucidation of spiranthol-A, spiranthol-B, and spirasineol-A, new isopentenyl dihydro-phenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.* 37:3195-3199.

Trillas, M. I., E. Casanova, L. Cotxarrera, J. Ordovas, C. Borrero, and M. Aviles. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Control* 39:32-38.

Uedan, H. and H. Torikata. 1972. Effect of light and culture medium on adventitious

root formation by *Cymbidiums* in aseptic culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 41:322-327.

Uetake, Y, K. Kobayashi, and A. Ogoshi. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia anastomosis* group C. Mycol. Res. 96:199-209.

Vujanovic, V., M. ST-Armaud, D. Barabe, and G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination Ann. Bot. 86:79-86.

Wang, S. Y., Y. H. Kuo, H. N. Chang, P. L. Kang, H. S. Tsay, K. Lin, N. S. Yang, and L. F. Shyur. 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. J. Agric. Food Chem. 50:1859-1865.

Watkinson J. I., and G. E. Welbaum. 2003. Characterization of gene expression in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* incubated with a mycorrhizal fungus. Acta. Hort. 624:463-470

Weindlong, R. 1932. Studies on a lethal principle effective in the parasitication of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology 22:837-845.

Wilkinson, K. G., K. W Dixon, K. Sivasithamparam, and E. L. Ghisalberti. 1994. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by

orchid-associated bacteria. *Plant and Soil* 159:291-295.

Withner, C. L. 1974. Developments in orchid physiology. In: *The Orchids, a Scientific Survey*. ed. by Withner C. L., H. Wolffhechel, and D. F. Jensen. 1992. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergent damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. *J. Phytopathol.* 136:221-230.

Wolffhechel, H., and D. F. Jensen. 1992. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergent damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. *J. Phytopathol.* 136:221-230.

Wu, J. B., W. L. Lin, C. C. Hsieh, H. Y. Ho, H. S. Tsay, and C. L. Wen. 2007. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*. *Phytotherapy Research* 21:58-61.

Yoder, J. A., L. W. Zettler, and S. L. Stewart. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci.* 156(2):145-150.

Yuan, X., S. Xiao, T. N. Taylor. 2005. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science.* 308(5724):1017-1020.

Yuan, Z. L., Y. C. Chen, and Y. Yang. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and

characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:295-303.

Zelmer, C. D., L. Cuthbertson, and R. S. Currah. 1996. Currah Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seed and protocorms. *Mycoscience.* 37:439-448.

Zettler, L. W. 1996. Symbiotic seed germination of terrestrial orchids in North America during the last decade: a progress report. In: Allen, C. (Ed.), *Proceedings of the North American Native Terrestrial Orchid Propagation and Production Conference.* National Arboretum, Washington, D.C., USA.

Zettler, L. W., K. A. Piskin, S. L. Stewart, J. J. Hartsock, M. L. Bowels, and T. J. Bell 2005. Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings *Studies in Mycology* 53:163-171.

Zettler, L. W., S. Stewart, M. Bowles and K. A. Jacobs. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *The Am. Midl. Nat.* 145(1):168-175.

Zou, W. X., and R. X. Tan. 1999. Biological and chemical diversity of endophytes and their potential applications. Li G. S. *Advances in Plant Sciences.* Beijing: China Higher Education Press, p:183-190.

第二章、臺灣原生蘭科植物內生真菌多樣性之探討

摘要

蘭科植物是廣為人們所喜愛的一群物種，內生真菌可以做為蘭科植物抗病及促進生長的有益真菌，在自然環境中，共生的菌根真菌對於蘭科植物的生長及生存扮演重要的角色。為了瞭解臺灣原生蘭科植物根部內生真菌資源狀況，並開發其有益微生物之共生資源，於臺灣北、中、南三地區，如桃園縣復興鄉東眼山、新竹縣尖石鄉、五峰鄉鳥嘴山、苗栗縣南庄、南投縣仁愛鄉春陽、嘉義縣阿里山、屏東縣大漢山等 25 處，共採集到分屬於 34 屬之 69 種原生蘭科植物，包括根節蘭屬(*Calanthe*)10 種、豆蘭屬(*Bulbohyllum*)9 種及羊耳蘭屬(*Liparis*)8 種等，並於根部進行內生真菌的分離與鑑定。共分離到內生真菌 500 餘株，經形態鑑定及以核酸序列比對之分子鑑定結果，以木黴菌(*Trichoderma* spp.)、鐮孢菌(*Fusarium* spp.)及炭角菌(*Xylaria* spp.)等三屬真菌佔優勢；此外，也分離出已有較多研究報導的絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)蘭菌。本研究亦利用內轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)，進行分離自原生於臺灣之根節蘭及鶴頂蘭根部的內生真菌之親緣關係分析，樣品取得則分別採集自臺灣北、中、南六處地方之六種原生根節蘭(*Calanthe* spp.)〔反捲根節蘭(*C. puberula*)、黃根節蘭(*C. sieboldii*)、細點根節蘭(*C. alisimifolia*)、長葉根節蘭(*C. matsudai*)、竹葉根節蘭(*C. densiflora*)、阿里山根節蘭(*C. arisanensis*)〕及二種原生鶴頂蘭(*Phaius* spp.)〔黃鶴頂蘭(*P. flavus*)、細莖鶴頂蘭(*P. mishmensis*)〕。由此資源調查結果得知，同種類的蘭科植物分布在不同的地域環境，其根內內生真菌種類有所不同；而不同的蘭科植物種類，其根部內生真菌的種類也有所不同。地區的環境和氣候，是影響蘭科植物內生真菌種類的重要因子，蘭科植物的種類則為次要因子。臺灣原生蘭科植物內生真菌實具有豐富的多樣性，尤其炭角菌屬(*Xylaria*)，對蘭科植物具有何種功能未見任何報導，值得更進一步的探討與研究。

關鍵詞：生物多樣性、臺灣原生蘭科植物、內生真菌、傳統形態鑑定、分子鑑定

前言

蘭科植物遍及全世界，除了最乾燥的沙漠和最嚴寒的二極之外，它生長在平原、森林、高山和沼澤地裏。主要匯聚生長於熱帶和亞熱帶之溫高濕大的叢林裏。臺灣島正好位處於北迴歸線貫穿的亞熱帶，因此蘭科植物相當普及，從海平面沙灘上，直上玉山山巔，均有各種適應不同環境的蘭花滋生。依據臺灣植物誌第二版，第六卷之資料(Huang, 2003)，本省的維管束植物有 4339 種，蘭科植物共有 336 種，為種數最多的一科，亦即在 13 種維管束植物中必有一種是蘭科植物，具相當豐富之多樣性，但因植物體小，產量少，其實並不易見。經參考、收集暨彙整藥用植物之相關資料，臺灣可供藥用的蘭科植物約 20 餘種。但因受環境污染及山林開發與濫採等人為因素的影響，原生蘭科植物的棲地遭到極大破壞，很多有益的生物因子，如對於蘭科植物之營養與生殖生長有很大影響的授粉昆蟲及共生真菌，於自然界中逐漸衰退，族群逐漸下降，及多數蘭科植物物種的瀕危，且部份物種在野地幾乎已經滅絕，因此保育及復育的工作實為刻不容緩。

蘭科植物的內生真菌是影響其生態系統，決定其分布的重要因子之一，尤其是與其共生的菌根真菌，更是蘭科植物生存與生長所不可或缺的，前人研究對於其他非菌根內生真菌亦有很多的成果與記錄(Bayman 氏等, 1997; Jumpponen, 2002; Bayman 及 Otero, 2006; Yuan 氏等, 2009; Leake 及 Cameron, 2012)，世界各國都十分重視對該類真菌種質資源，包括分布特徵、生物多樣性及生態功能的研究 (Bayman 氏等, 1997; Otero 氏等, 2002; Penelope, 2004; Suarez 氏等, 2008; Yuan 氏等, 2009)。相關的研究顯示，菌根真菌不僅能夠促進蘭科植物種子發芽，及促進組織培養苗出瓶後之移植存活率 (林, 2002; 蔡, 2003; Chou 及 Chang, 2004; Jin 氏等, 2009)，亦能增進種苗的生長、調節開花的時期與抗病(藍, 2001; Wu 氏等, 2011)。共生關係對於維護地球上的生物多樣性具有重大的影響，微生物多樣性的研究，其物種的調查是最先必須進行的重要工作。我們必須對於現有的天然資源有一定的瞭解，才能進一步加以利用於生物多樣性之保護工作。前人研究已有自

野生蘭科植物健康的根部分離出內生真菌的資料，其中所分離出之內生真菌，包括有頂孢黴菌屬(*Acremonium* spp.)、頂柱黴屬(*Acrocylindrium* spp.)、曲黴菌屬(*Aspergillus* spp.)、鏈格孢菌屬(*Alternaria* spp.)、角菌根菌屬(*Ceratohiza* spp.)、枝穗黴屬(*Clonostachys* spp.)、炭疽菌屬(*Colletotrichum* spp.)、柱孢屬(*Cylindrocarpon* spp.)、柱孢黴屬(*Cylindrosporium* spp.)、枝梗莖點菌屬(*Dendrophoma* spp.)、瘤菌根菌屬(*Epulorhiza* spp.)、鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)、粘帚黴屬(*Gliocladium* spp.)、微囊菌屬(*Microascus* spp.)、串珠黴屬(*Monilia* spp.)、卵形孢黴屬(*Oospora* spp.)、束絲菌屬(*Ozonium* spp.)、青黴菌屬(*Penicillium* spp.)、盤多毛孢屬(*Pestalotia* spp.)、擬盤多毛孢屬(*Pestalotiopsis* spp.)、擬莖點黴屬(*Phomopsis* spp.)、棘殼孢屬(*Pyrenochaeta* spp.)、絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)、小核菌屬(*Sclerotium* spp.)、木黴菌屬(*Trihoderma* spp.)、炭角菌屬(*Xylaria* spp.)等等(范氏等, 1996; 曾, 2002; Bayman 氏等, 1997; Bayman 及 Otero, 2006; 張氏等, 2008; Yuan 氏等, 2009; 孟氏等, 2009; Ruangwut 氏等, 2011; Leake 及 Cameron, 2012)。綜觀以上研究結果顯示，蘭科植物根部與其內生真菌的共生與結合，應是具有其特殊的生態意義。

臺灣蘭科植物之內生真菌的相關資訊，及蘭科植物種內與種間之與其結合的內生真菌之種類為何，其調查與研究的資料很少。為了探索及保存蘭科植物的內生真菌，擬針對生長於臺灣北、中、南等不同地區之原生蘭科植物根部，進行內生真菌菌種調查、收集與保存，本研究是探討蘭科植物和內生真菌之間相互作用關係的最先步驟，對於蘭科植物內生真菌於自然界中所扮演的角色也將有所瞭解。並利用形態與分子鑑定的方法，鑑定從蘭科植物的根部分離出之內生真菌，期待分離出的內生菌種能應用於幫助蘭科植物種子發芽、植株生長發育等，並希望此資料之建立對臺灣原生蘭科植物之保育及復育工作有所助益。

材料與方法

蘭科植物的採集

於 2005 年 1 月至 2005 年 9 月期間，在臺灣北、中、南等共 25 處，採集具有觀賞及藥用價值之原生種蘭科植物，蘭株採集地點包括 2 市(臺北市、新北市)，9 縣(宜蘭、桃園、新竹、苗栗、臺中、南投、嘉義、屏東、臺東)，共採集約 69 種原生蘭科植物。採集時將全株連同根部採集裝袋，並快速送回臺灣大學，進行物種鑑定及根部內生真菌之分離。其採集的地點標識於圖 2-1，採集的地點及蘭科植物種類詳列如表 2-1。

內生真菌的分離和鑑定

分離：

收集原生蘭的根段，將表面的雜物與砂土去除，以 1% 次氯酸鈉消毒 15—20 分鐘，再以無菌水(dH₂O)清洗三次後，將根段切成約 5 mm 之長度，放入 1/6 PDA 培養基，於 25°C 黑暗環境下培養，並觀察菌絲生長狀況。菌絲長出後，切取菌絲塊繼代於水洋菜(water agar)培養基上，進行純化(Sneh 氏等, 1991; Masuhara & Katsuya, 1989; Wang, 1999)。之後挑取單菌絲繼代培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato Dextrose Agar; PDA)，並觀察菌落形態、代謝物顏色及生長速率；分離純化的真菌其菌絲塊或孢子，貯放於-80°C 的超低溫冷凍櫃。為檢查材料表面消毒的效果，做如下對照實驗，將上述同樣表面消毒過的一部份材料不做剪切，直接放置於 PDA 平板上，做對照培養處理，結果對照材料周圍均無任何真菌長出，證明表面消毒徹底，從而保證了所分離出的真菌是植物的內生真菌，而不是空氣中的，或組織塊表面附生的微生物(Liao, 2006)。本計畫所分離出之菌種，均已寄存在新竹食品科學研究所的菌種中心及臺灣大學植物病理與微生物學系，沈偉強教授實驗室。

形態鑑定：

針對已分離真菌進行形態的分類，將已純化之菌株，培養於含有 PDA 培養基之直徑 9 公分培養皿及試管斜面上，觀察記錄菌落(colony)變化，待產孢後，切取菌體置於載玻片，蓋上蓋玻片，直接於光學顯微鏡下觀察菌株形態特徵，而生長及產孢較快的真菌，如 *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* 等屬真菌，則採用平板培養進行鑑定。挑起菌絲置於載玻片上進行平板培養，以苯胺藍(aniline blue)染色，利用光學顯微鏡觀察。真菌形態分類觀察的重點包括：菌株之菌落(colonies)、菌絲(hyphae)、分生孢子(conidia)/分生孢子柄(conidiophores)/產孢細胞(conidiogenous cells)、孢子囊(sporangia)/孢子囊柄(sporangiophores)/孢子囊孢子(sporangiospores)/囊軸(columellae)、厚膜孢子(chlamydoconidia)、子座(stroma)，子囊(asci)/子囊果(ascocarps)/子囊孢子(ascospores)等，相關形態特徵以及其產孢方式(conidiogenesis)。形態鑑定係委由嘉南藥理科技大學醫務管理系陳城箴教授執行。

平板培養步驟：將 v 形管、載玻片及蓋玻片依序放於鋪有潮濕濾紙之玻璃培養皿中，以鋁箔紙包裹，放入高溫高壓殺菌釜滅菌 20 分鐘，冷卻後於無菌操作臺內，打開玻璃培養皿，將菌種(0.2 平方公分)接種於載玻片上，蓋上玻璃培養皿，以石蠟膜封住，培養於 25°C 的暗處。約三天後，將接種於載玻片上的菌塊小心移開，留存在載玻片上的菌絲以苯胺藍進行染色，蓋上蓋玻片後於光學顯微鏡下觀察。

分子鑑定

由於某些真菌屬、種之間的形態學差異極不顯著，而且形態特徵有時還會受環境因素的影響。所以有些真菌採用形態學方法進行鑑定很困難，此時就需要借助於分子生物學鑑定方法，其鑑定結果具相當的準確度。

先進行真菌菌株去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)之萃取，已純化的菌株培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato Dextrose Agar, PDA)培養基，挑取菌落前緣菌絲塊 2-3 塊，置入裝有液態 2.4%馬鈴薯葡萄糖(Potato Dextrose Broth, PDB)培養基之三角瓶中，於 28°C 下震盪培養 3-5 天後，進行 DNA 萃取。菌絲先進行過濾收集，

以無菌水清洗後，立即放入液態氮磨成粉末。將粉末放入 DNA 之抽取液，依照使用手冊的說明，進行基因組去氧核糖核酸(genomic DNA)的萃取純化。以萃取之 DNA 進行分光光度計量測及瓊脂糖凝膠電泳，以確定其濃度和數量。再以 White 等學者所設計的真菌專一性引子組 ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 及 ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 以 PCR 擴增菌體核糖體基因 ITS 區域(White 氏等, 1990)，擴增所得 ITS 區域的序列長度約在 600 bp，依菌株的不同在長度上有些許差異。

以 DNA 為模板進行聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，放大可區別真菌菌種之特定序列 ITS rDNA 片段，聚合酶鏈鎖反應試劑：0.1 mM dNTP, 0.2 μ M of each primer, 0.5 unit DNA polymerase, 100 ng DNA template, 1X PCR 緩衝溶液，反應總體積 25 μ L。真菌的 ITS rDNA 片段，以真菌通用核糖核酸引子對 (universal primer pair) ITS1 及 ITS4 進行擴增，以區別所分離之真菌(White 氏等, 1990)。放大真菌 ITS rDNA 片段之反應條件：95 $^{\circ}$ C 3 分，再進行 95 $^{\circ}$ C 30 秒，58 $^{\circ}$ C 10 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，進行 35 次的增殖反應後 72 $^{\circ}$ C 7 分。聚合酶鏈鎖反應產物以 2.0% 瓊脂膠片進行電泳，確定放大產物的大致長度(陳, 2007)，本試驗部份分離菌種之 DNA 萃取及聚合酶鏈鎖反應由加工館徐源泰教授實驗室之陳效儀同學所完成。聚合酶鏈鎖反應擴增之基因產物，委託源資國際生物科技股份有限公司進行核酸序列分析。DNA 定序係利用自動定序儀(ABI PRISM 377-96DNA-Sequencer, Perkin-Elmer, CA, USA)，以試劑(ABI PRISM BigDye, Terminator Cyclor Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystem, USA)進行標定分析。核酸序列以 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 提供的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 序列搜尋服務，與 Gene bank 中收集的已知菌種序列資料庫進行相似度比對，鑑定菌株之菌種。

以 software *PAUP** 4.0，利用 neighbor-joining (NJ) 之方法進行親緣關係的分析 (Saitou 及 Nei, 1987)。

結果與討論

從臺灣北、中、南等三地區，25 處地方(圖 2-1)，採集到分屬於 34 屬之 69 種原生蘭科植物之根部樣品中，共分離到 500 餘株內生真菌(表 2-1)。在分離出的 500 餘株內生真菌菌株中，目前鑑定結果分屬 51 屬(表 2-2)。

共完成 109 株形態鑑定，其中以木黴菌屬(*Trichoderma* spp.) 36 株佔多數，其次則為鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.) 19 株，及盤多毛孢菌屬(*Pestalotia* spp.) 10 株。

共完成 123 株分子鑑定，其中以木黴菌屬(*Trichoderma* spp.) 29 株最多，其次則為炭角菌屬(*Xylaria* spp.) 14 株，及小叢殼菌屬(*Glomerella* spp.) 8 株。

因為同時以形態與分子方法鑑定之菌株總共有 24 株，所以就進行此 24 株之比對。結果相同者有 21 株，相異者有 3 株，相異者有待更進一步的研究(表 2-3)。

形態鑑定結果木黴菌(*Trichoderma* spp.)及鐮孢菌(*Fusarium* spp.)等兩屬真菌佔優勢；另以核酸序列比對之分子鑑定結果，以木黴菌(*Trichoderma* spp.)及炭角菌(*Xylaria* spp.)兩屬廣泛分布於所採集的蘭科植物植株根部。與前人的研究，在蘭科植物的根部分離出頂孢黴菌屬(*Acremonium* spp.)、頂柱黴屬(*Acrocyndrium* spp.)、曲黴菌屬(*Aspergillus* spp.)、鏈格孢菌屬(*Alternaria* spp.)、角菌根菌屬(*Ceratophiza* spp.)、枝穗黴屬(*Clonostachys* spp.)、炭疽菌屬(*Colletotrichum* spp.)、柱孢屬(*Cylindrocarpon* spp.)、柱孢黴屬(*Cylindrosporium* spp.)、枝梗莖點菌屬(*Dendrophoma* spp.)、瘤菌根菌屬(*Epulorhiza* spp.)、鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)、粘帚黴屬(*Gliocladium* spp.)、微囊菌屬(*Microascus* spp.)、串珠黴屬(*Monilia* spp.)、卵形孢黴屬(*Oospora* spp.)、束絲菌屬(*Ozonium* spp.)、青黴菌屬(*Penicillium* spp.)、盤多毛孢屬(*Pestalotia* spp.)、擬盤多毛孢屬(*Pestalotiopsis* spp.)、擬莖點黴屬(*Phomopsis* spp.)、棘殼孢屬(*Pyrenochaeta* spp.)、絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)、小核菌屬(*Sclerotium* spp.)、木黴菌屬(*Trihcoderma* spp.)、炭角菌屬(*Xylaria* spp.)等內生真菌具有相似的結果(范氏等, 1996; 曾, 2002; Bayman 氏等, 1997; Bayman 及 Otero, 2006; 張氏等, 2008; Yuan 氏等, 2009; 孟氏等, 2009; Ruangwut 氏等, 2011; Leake 及 Cameron, 2012)。木黴菌屬

(*Trichoderma* spp.)及鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)等真菌在相關的共生生長試驗研究中，被證實對蘭科植物生長發育階段有影響(Currah 氏等, 1997; Vujanovic 氏等, 2000)，此結果不但說明臺灣原生蘭科植物的共生真菌也有部份菌相與國外的相關研究結果相似，更可以確定所分離菌株的確為幫助蘭科植物生長發育所需菌種。此外，也分離出較常見的絲核菌屬蘭菌 *Rhizoctonia* spp.及 *Ceratobasidium* spp.。六種分離自蘭花根部優勢內生真菌菌落形態如圖 2-2。

鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)真菌普遍存在於植株及土壤中，然而絕大部份為引起許多植物病害之病原菌(Booth, 1971)。少部份鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)真菌與蘭科植物建立共生關係，並具促進宿主種子發芽能力(Currah氏等, 1997; Vujanovic氏等, 2000)。在與蝴蝶蘭的共生試驗中，也發現其加速植株的營養生長，及促進蝴蝶蘭提早開花(藍, 2001; 蔡, 2003)。本試驗共分離出22株鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.，19株形態鑑定及4株分子鑑定，其中有一株同時進行形態與分子鑑定)，將所分離出之每株鐮孢菌屬(*Fusarium* sp.)真菌，以臺灣大宗作物，水稻、綠豆、甘藍及胡瓜進行致病性分析(Chang, 2008)，結果有84.4%之菌株無致病性；由於金線連之莖腐病係由鐮孢菌(*Fusarium*)所引起，為一傳染性病害，病害一旦發生，會很快蔓延整個栽培場(Yen氏等, 1996; 張, 1999)，故以兩不同品系金線連(B品系及R品系)，接種本試驗分離之無致病性鐮孢菌，結果其成活率均顯著較對照組高(未發表資料)。

已有許多試驗證實木黴菌屬真菌(*Trichoderma* spp.)可利用做為生物防治之拮抗微生物(Papavizas, 1985; Kubota, 1996; Batta, 2007)，目前已有許多國家將木黴菌屬真菌(*Trichoderma* spp.)應用在生物防治製劑上，包括防治草皮的褐斑病、圓斑病、根腐病(Lo 氏等, 1996)、鐮孢病菌、腐黴菌、核盤菌及立枯絲核菌等(黃與謝, 1999, Wolffhechel 及 Jensen, 1992; Latunde-Data, 1993, Trillas 氏等, 2006)，及防治臺灣金線連之莖腐病(*Fusarium oxysporum*)(蔡氏等, 2008)。

菌根菌普遍存在於地生蘭及附生蘭中，不同屬的蘭花在其根或莖處會有不同的真菌感染(Batty 氏等, 2000)。以從本研究中於臺灣北、中、南等三地區，六處地

方(新竹縣尖石鄉、五峰鄉鳥嘴山、苗栗縣南庄鄉、南投縣仁愛鄉春陽、嘉義縣阿里山、屏東縣大漢山)所採集的蘭科植物植株當中，選取六種臺灣原生根節蘭(反捲根節蘭、黃根節蘭、細點根節蘭、長葉根節蘭、竹葉根節蘭、阿里山根節蘭)，及二種原生鶴頂蘭(黃鶴頂蘭、細莖鶴頂蘭)分離之菌株為例(表 2-4)，比較其自同一地區採集的不同蘭花植株的菌相，及採集自不同地區的同種蘭花植株的菌相，並進行親緣關係分析。以菌株的 ITS rDNA 序列與已知生物序列資料庫比對最相近菌種，結果顯示 84 株分離菌株經比對後歸屬於 25 屬，充分展現其根部菌相之多樣性。其中木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)內之菌株 24 株佔最多數，其次依序為炭角菌屬(*Xylaria* spp.)有 14 株，杓蘭菌根菌屬(*Neonectria* spp.)有 6 株(表 2-5)。

木黴菌屬(*Trichoderma* spp.):主要分離自大漢山的細莖鶴頂蘭(13 株)，阿里山根節蘭(6 株)，竹葉根節蘭(3 株)，尖石的黃鶴頂蘭(1 株)，阿里山的黃鶴頂蘭(1 株)。炭角菌屬(*Xylaria* spp.):主要分離自尖石的黃根節蘭(7)，阿里山的黃鶴頂蘭(3)，反捲根節蘭(1)，五峰的細點根節蘭(1)，竹葉根節蘭(1)，苗栗南庄的黃鶴頂蘭(1)。杓蘭菌根菌屬(*Neonectria* spp.):主要分離自阿里山的反捲根節蘭(2)，大漢山的阿里山根節蘭(1)，細莖鶴頂蘭(1)，阿里山的黃鶴頂蘭(2)。 *Trichoderma* spp.、*Xylaria* spp.、*Podospora* spp.及 *Glomerella* spp.等四屬內生真菌，均分離自 3-4 處地方，判斷為較不具地域性的菌種。無柄盤菌屬(*Cryptosporiopsis* spp.):主要分離自阿里山的反捲根節蘭及黃鶴頂蘭，本屬菌種只在阿里山分離得到，判斷為具地域性的菌種。同樣的在本調查研究中，只在一處地方分離得到一至二菌種的屬是否也均具地域性，值得更進一步的探究(表 2-5)。

同樣採集自阿里山之反捲根節蘭及黃鶴頂蘭兩不同種類植株之間，其根部內生真菌菌相不盡相同，同時存在於兩不同種類植株的內生真菌為 *Neonectria* spp.、*Xylaria* spp.、*Cryptosporiopsis* spp.，而只存在反捲根節蘭植株的內生真菌為 *Podospora* sp.、*Phoma* sp.，只存在黃鶴頂蘭植株的內生真菌為 *Daldinia* sp.、*Glomerella* sp.、*Hypoxylon* sp.、*Pichia* sp.、*Trichoderma* sp. (圖 2-3)。同樣採集自

尖石之黃根節蘭及黃鶴頂蘭兩不同種類植株之間，其根部內生真菌菌相完全不同，從黃根節蘭分離出 *Gibberella* (鐮孢菌的有性世代, teleomorph of *Fusarium*), *Penicillium*, *Xylaria* 等三屬之內生真菌，而從黃鶴頂蘭則分離出 *Trichoderma*, 及 *Fusicoccum* 等二屬之內生真菌，黃根節蘭 a 植株及 b 植株同時分離出 *Xylaria* 屬真菌，而只有在 a 植株分離出 *Gibberella* 屬真菌，只有在 b 植株分離出 *Penicillium* 屬真菌。因此於黃根節蘭之不同植株之間，其根部內生真菌菌相不盡相同(圖 2-4)。

同樣採集自大漢山之阿里山根節蘭、竹葉根節蘭、細莖鶴頂蘭等三種不同種類植株之間，其根部內生真菌菌相不盡相同，同時存在三種不同種類植株的內生真菌為木黴菌屬 (*Trichoderma* spp.) 共分離出 19 株，推測木黴菌屬 (*Trichoderma*) 為該地域之優勢菌種，三種不同種類植株之間，以細莖鶴頂蘭分離出 *Annulohyposylon*、*Botryosphaeria*、*Diaporthe*、*Fusarium*、*Neonectria*、*Trichoderma*、*Verticillium* 等七屬真菌，及阿里山根節蘭分離出 *Diaporthe*、*Neonectria*、*Pestalotiopsis*、*Podospora*、*Trichoderma* 等五屬真菌較具多樣性，竹葉根節蘭則只有分離出 *Trichoderma* 及 *Fusarium* 等二屬真菌(圖 2-5)。

探討於不同地區內相同種類蘭科植物之內生真菌菌相，以採集自尖石及五峰之黃根節蘭為例，於兩不同地區採集之黃根節蘭植株根部分離得到之內生真菌完全不同，採自尖石之植株分離出七株 *Xylaria* spp.，而採自五峰者則均無 *Xylaria* sp. 菌株之分離(圖 2-6)，在尖石分離出的菌種為 *Xylaria*、*Gibberella*、*Penicillium*，在五峰分離之菌種為 *Fusarium* 及 *Podospora*。可見因環境地域之不同，同種植物根部內生真菌菌相亦不盡相同。

以本研究於不同地區採集之臺灣原生蘭所分離之內生真菌之數量與種類等資料為依據，自北部(新竹尖石鄉)、中部(苗栗南庄)、南部(阿里山)等臺灣三處不同地點所採集之同種類蘭花植株，以黃鶴頂蘭為例，分離出之 21 株真菌菌株，分屬於 11 屬(*Cryptosporiopsis* spp.、*Daldinia* spp.、*Fusicoccum* sp.、*Glomerella* spp.、*Hypoxylon* sp.、*Neonectria* spp.、*Phoma* spp.、*Pichia* sp.、*Tetracladium* sp.、*Trichoderma*

spp.、*Xylaria* spp.)。足見其菌相之多樣性，其中以採集自阿里山之植株根部，所分離之內生真菌最具多樣性與豐富度(圖 2-7)。採集自尖石的植株分離出穗枯病菌(*Fusicoccum* sp.)、木黴菌(*Trichoderma* sp.)，採集自苗栗南庄的植株分離出小叢殼菌(*Glomerella* spp.)、莖點菌(*Phoma* spp.)、四枝孢菌(*Tetracladium* sp.)及炭角菌(*Xylaria* sp.)等，採集自阿里山的植株則分離出無柄盤菌(*Cryptosporiopsis* spp.)、輪層炭殼菌(*Daldinia* spp.)、小叢殼菌(*Glomerella* sp.)、香灰菌(*Hypoxylon* sp.)、杓蘭菌根菌(*Neonectria* spp.)、酵母菌(*Pichia* sp.)、木黴菌(*Trichoderma* sp.)及炭角菌(*Xylaria* spp.)等八種。發現三處植株菌相分布不盡相同，說明蘭科植物的內生真菌受地理位置及土壤質地所影響(表 2-4、圖 2-7)。

從阿里山採集生長於土壤(S)、枯木(DW)、石壁(SW)等三種不同質地之反捲根節蘭，於根部所分離出之 8 株內生真菌菌株，其中同樣採自土壤之二種不同植株，分別分離出 *Cryptosporiopsis* sp. 及 *Podospora* sp. 二不同屬菌株。採自枯木之植株分離出 *Neonectria* sp. 及 *Xylaria* sp. 二屬之菌株。採自石壁之植株分離出 *Phoma* sp.、*Cryptosporiopsis* sp. 及 *Neonectria* sp. 三屬之菌株，其中 *Neonectria* 屬同樣出現在採自枯木的植株，*Cryptosporiopsis* 屬同樣出現在採自土壤的植株。此結果顯示採集自同一個地點、同一種類的植株，其根部內生真菌菌相亦不盡相同(圖 2-8)，同一種植物不同植株或採自生長於不同環境之植株其分離出之菌種可能具有相同與相異之種類。推測蘭科植物根部內生真菌的種類與生長介質之種類、pH 值、EC 值、土壤有機質含量與土壤水分含量等均存在顯著的相關。

結論

本試驗從臺灣原生蘭植株根部中，共分離出 500 餘株內生真菌，其中以木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)、鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)及炭角菌屬(*Xylaria* spp.)為前三種佔優勢的菌種，也分離出屬於蘭科植物重要的共生菌種，絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)蘭菌，其中炭角菌屬(*Xylaria* spp.)及杓蘭菌根菌屬(*Neonectria* spp.)等真菌對於蘭花

生長之功效，尚待進一步探討。目前已有很多應用木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)真菌相繼開發成生物防治製劑的產品問世，本試驗所分離的木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)菌株亦具開發之潛力，利用本試驗所分離之不具致病性之鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)真菌，做為防治以感染鐮孢菌(*Fusarium*)所致病害的利用，亦應進一步研究其實用性。本試驗所分離之內生真菌，經進一步之研究與試驗，應用於促進植株生長與病害的防治，將有助於逐漸遭受破壞之臺灣原生蘭科植物之保育與復育。

本試驗顯示，從不同地區之蘭科植物的根部所分離之內生真菌數量和種類存在著一定的差異，於不同地區採集之蘭科植物，其根部内生真菌具有一定的多樣性。

採集自阿里山的黃鶴頂蘭(*P. flavus*)和採集自尖石的黃根節蘭(*C. sieboldii*)，其分離的菌種主要歸屬於炭角菌，因此炭角菌是存在於這兩種植物根部的優勢種。其他的地區其分離的菌種，並沒有出現優勢的菌種。不同地區及不同植物所分離之菌種均表現其多樣性。採集自阿里山的反捲根節蘭及黃鶴頂蘭，同時均可以分離出*Cryptosporiopsis* sp.，林氏等自臺灣杜鵑分離出*Cryptosporiopsis* sp.菌種，為臺灣子囊菌類皮盤菌科之新紀錄種(林氏等, 2010)，在溫帶地區，*Cryptosporiopsis* 屬真菌是木本植物寄主的枝幹病原菌，包括槭樹、榛木及果樹(Verkley, 1999)。Strobel氏等從雷公藤(*Tripterigeum wilfordii*)的莖中分離到一株内生真菌*Cryptosporiopsis quercina*，能產生一種肽類抗生素Cryptocandin，它不但能抑制灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)等一些植物病原真菌，而且還能抑制白色念珠菌(*Candida albicans*)等人類病原真菌，而前人研究尚未見自蘭科植物分離出*Cryptosporiopsis* 屬的真菌，本研究首次紀錄自蘭科植物分離出*Cryptosporiopsis* 屬的真菌，至於是否具有抗病的效用或是為植物的病原真菌，則有待更進一步的研究。

真菌在土壤中的分布，隨著時間與空間而變化(Rasmussen 及 Whigham, 2002)，蘭株於不同時期的生長，尤其在種苗期和成熟期，其所利用的真菌為不同種類 (Zelmer 及 Currah, 1997)，而不同屬的蘭花具有不同的專一性(Warcup,

1973)，因此蘭花的內生真菌隨著種類的不同、生長環境的差異及季節交替，而顯現出不同的菌相多樣性。植物內生真菌是一類相對來說開發較少、次生代謝物豐富、應用前景廣闊的資源微生物。目前所有分離到的真菌，寄放在新竹食品研究所及臺灣大學植物病理與微生物學系中，希望將可做為篩選有益真菌的重要資源。



參考文獻

- 孟銳、張榮意、朱艷秋、譚志瓊、王玉洁. 2009. 野生黃花美冠蘭根部內生真菌多樣性研究。 廣西農業科學 40(5)：556-558。
- 林秋芬. 2002. 蘭菌對石斛蘭種子發芽與幼苗生長之影響。 國立中興大學園藝研究所碩士論文, 78 頁。
- 林瑞進、李明仁、王也珍. 2010. 臺灣杜鵑與內生菌 *Cryptosporiopsis* sp. 共生形成杜鵑類菌根。 中華林學季刊 43(1):171-179。
- 范黎、郭順星、曹文岑. 1996. 墨蘭共生真菌一新種的分離、培養、鑑定及其生物活性。 真菌學報 15(4):251-255。
- 張淑芬. 1999. 金線連基腐病與莖腐病之綜合防治。 國立中興大學植物病理學系研究所碩士論文, 100 頁。
- 張禧慶、康冀川、何勁、韓曉麗、黃慶華 2008. 兩株石斛內生炭角菌的鑑定及活性成分初步研究。 西南農業學報 21(2):317-322。
- 陳效儀. 2007. 台灣原生蘭科植物菌根真菌多樣性之研究。 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 84 頁。
- 曾千容. 2002. 石斛蘭蘭菌之分離、鑑定與培養及其對石斛蘭生長之影響。 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 128 頁。
- 黃睿志、謝式垚. 1999. 木黴菌(*Trichoderma*)及黏帚黴菌(*Gliocladium*)防治土煤病害的實力與展望。 農業世界雜誌186:16-21。
- 蔡金池. 2008. 臺灣金線連莖腐病之生物防治。 國立中興大學植物病理學系研究所博士論文, 145 頁。
- 蔡麗君. 2003. 蘭菌與植物生長素對拖鞋蘭生長發育之影響。 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 79 頁。
- 藍亦青. 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響。 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 93 頁。

Strobel, G. A., R. V. Miller, C. Miller, M. Condron, D. B. Teplow, and W. M. Hess, 1999.

Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* Microbiol. 145:1919-1926.

Batta, Y. A. 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. Postharvest Biol. Technol. 43:143-150.

Batty, A. L., K. W. Dixon and K. Sivasithamparam. 2000. Soil seed-bank dynamics of terrestrial orchids. Lindleyana 15:227-236.

Bayman, P., L. Lebron., R. L. Tremblay and D. J. Lodge. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytol. 135:143-149.

Bayman, P., J. T. Otero. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. In: Schulz B., C. Boyle, and T. Sieber (eds) Microbial root endophytes. Springer, New York, pp. 153-173.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England. 237 pp.

Chang, D. C. N. 2008. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In: Chen, W. H. and H. H. Chen, Orchid Biotechnology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Joh Tuck Link, Singapore, pp.77-98.

Chou, L. C., D. C. N. Chang. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of

- Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and F₁ hybrids. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:143-147.
- Currah, R. S., L. W. Zettler, and T. M. McInnis. 1997. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) a key to *Epulorhiza* species. Mycotaxon 61:335-342.
- Huang, Editorial Committee of the Flora of Taiwan (2003): Flora of Taiwan 2nd. Edition, Vol. VI Taipei, Taiwan, ROC.
- Jin, H., Z. X. Xu, J. H. Chen, S. F. Han, S. Ge, and Y. B. Luo. 2009. Interaction between tissue-cultured seedlings of *Dendrobium officinale* and mycorrhizal fungus (*Epulorhiza* sp.) during symbiotic culture. Chin. J. Plant Ecol. 33:433-441.
- Jumpponen, A. 2002. Non-mycorrhizal root endophytes-aspects on their ecology. The 7th international mycological congress. IMC7 book of abstracts. 57 pp.
- Kubota, T. 1996. *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus, fungicide containing it, and method of manufacture of the same and its use. Biotechnol. Adv.14:387.
- Latunde-Data, A. O. 1993. Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningi*. Plant Pathol. 42:522-529.
- Leake, J. R., D. D. Cameron. 2012. Untangling above- and belowground mycorrhizal fungal networks in tropical orchids. Mol. Ecol. 21:4921-4924.

- Liao, Y. Y., S. R. Zeng, J. B. Ma, F. Liu, and R. J. Wang. 2006. Isolation of endophytic fungi from *Moringa* sp. And preliminary analysis of antimicrobial activity of the isolates. *J. Zhuzhou Inst. Tech.* 20:36-38.
- Lo, C. T., E. B. Nelson and G. E. Harman. 1996. Biological control of turf grass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 80:736-741.
- Masuhara, G. and K. Katsuya. 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Sci. Hort.* 37:331-337.
- Otero, J. T., J. D. Ackerman, and P. Bayman. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Amer. J. Bot.* 89:1852-1858.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:23-54.
- Penelope, S. H. B. 2004. Mycorrhizal specificity in endemic Western Australian terrestrial orchids (tribe Diurideae): Implications for conservation. PhD dissertation, Graduate Institute of Philosophy, Murdoch University, 210 pp.
- Rasmussen, H. N. and D. F. Whigham. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytol.* 154:797-807.
- Ruangwut C., B. Dell., S. Vessabutr, B. Bussaban and S. Lumyong. 2011. Endophytic

- fungi from *Pecteilis Susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza* 21:221-229.
- Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425
- Sneh, B., P. Burpee, and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press, St. Paul , Minnesota. USA. 133 pp.
- Suarez, J. P., M. Weiß, A. Abele, F. Oberwinkler, and I. Kottke. 2008. Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol. Progress* 7:75-85.
- Trillas, M. I., E. Casanova, L. Cotxarrera, J. Ordovas, C. Borrero, and M. Aviles. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Control* 39:32-38.
- Vujanovic, V., M. St-Arnaud, D. Barabe and G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Ann. Bot.* 79-86.
- Wang, M. H. 1999. Effects and applications of orchid symbiotic fungi on the growth and development of several orchids. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, 169 pp.
- Warcup, J. H. 1973. Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytol.* 72:387-392.

- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : Innis M. A., D. H. Gelf, J. J. Sninsky, T. J. White (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. pp. 315-322.
- Wolffhechel, H. and D. F. Jensen. 1992. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergent damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*. J. Phytopathol. 136:221-230.
- Wu, P. H., D. D. Huang, and D. C. N. Chang. 2011. Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's Growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. Afr. J. Biotechnol. 10(50):10095-10100.
- Yen, D. M., S. C. Chen, and C. T. Liao. 1996. The art for propagation of Jin-Shiann Lian. Dong-Kung Farmer Association Published, 294 pp.
- Yuan, Z. L., Y. C. Chen, and Y. Yang. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:295-303.
- Zelmer, C. D. and R. S. Currah, 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. Lindleyana 12:142-148.
- Verkley G. J. M. 1999. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. Stud. Mycol. 44:1-180.

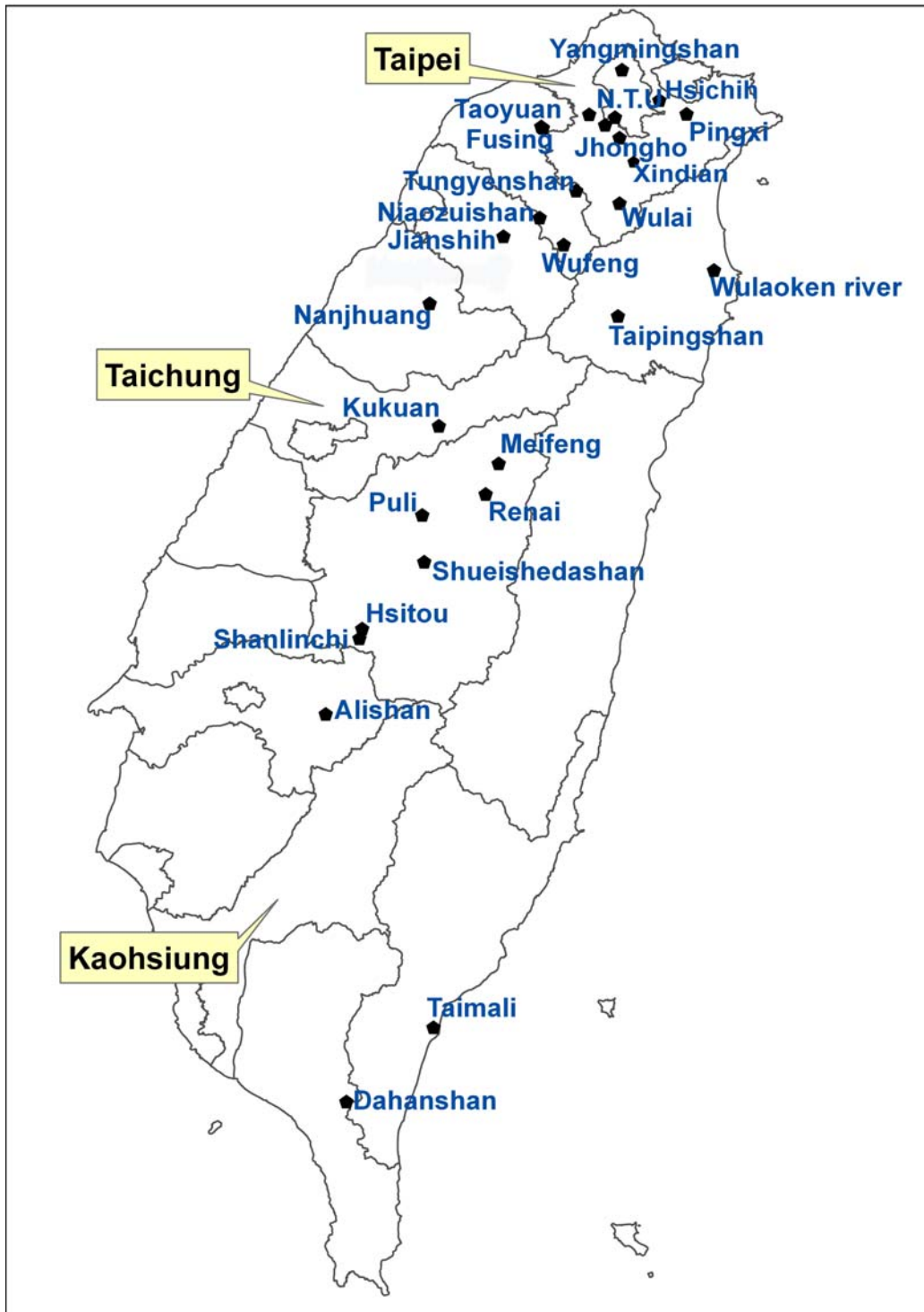


圖 2-1. 臺灣原生蘭與內生真菌採集地點分布圖。

Fig. 2-1. Original collection sites of Taiwan indigenous orchids and endophytic fungi.

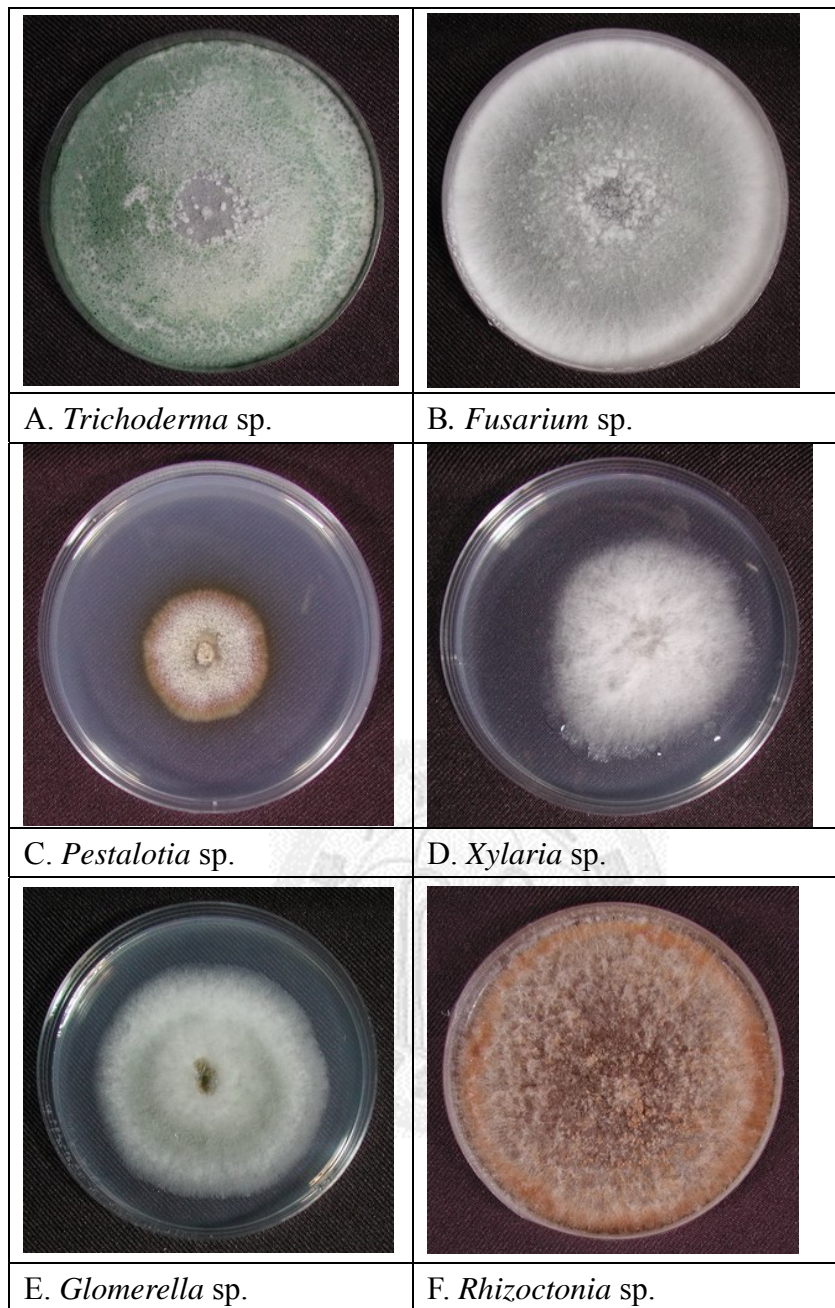


圖 2-2. 六種分離自原生臺灣蘭根部優勢內生真菌的菌落形態。
 Fig. 2-2. Colony morphology of 6 species of endophytic fungi isolated from Taiwan native orchid roots.

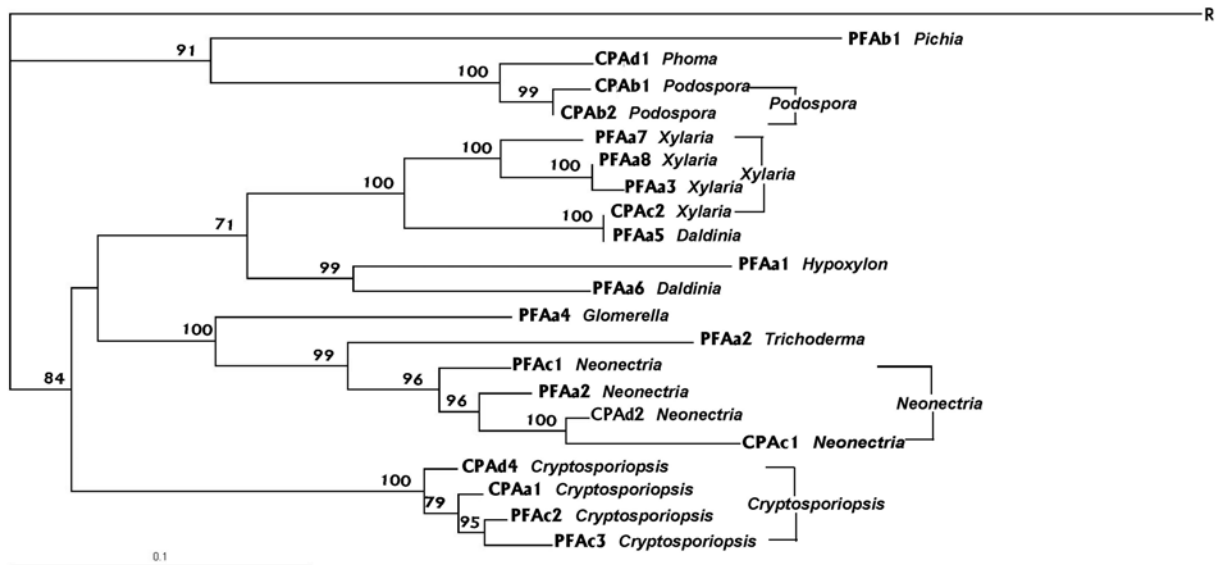


圖 2-3. 從採集自阿里山(A)之反捲根節蘭(CP)及黃鶴頂蘭(PF)分離出之 21 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330) 為外群, 自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-3. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 21 fungal strains isolated from specimens of *Calanthe puberula* (CP) and *Phaius flavus* (PF) collected in Alishan (A). *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

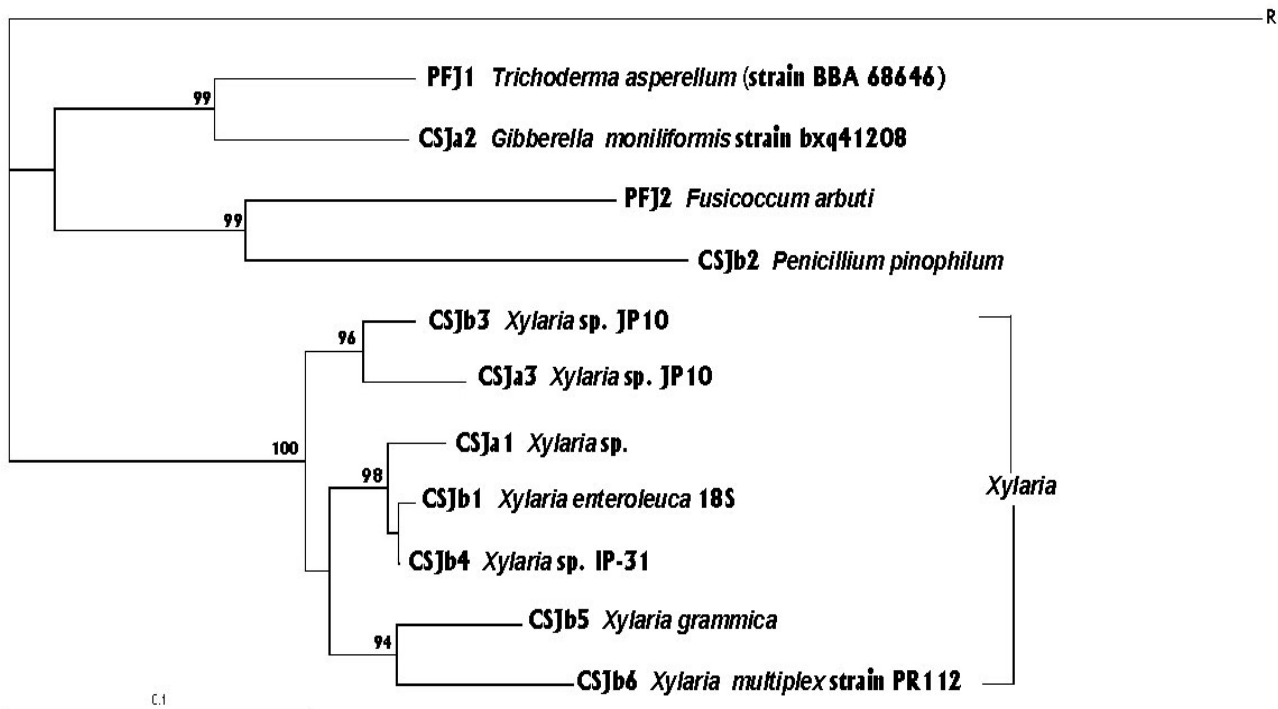


圖 2-4. 從採集自尖石(J)之黃根節蘭(CS)及黃鶴頂蘭(PF)分離出之 10 株真菌菌株之 ITSr DNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330) 為外群, 自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-4. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 10 fungal strains isolated from specimens of *Calanthe sieboldii* (CS) and *Phaius flavus* (PF) collected in Jianshi (J). *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

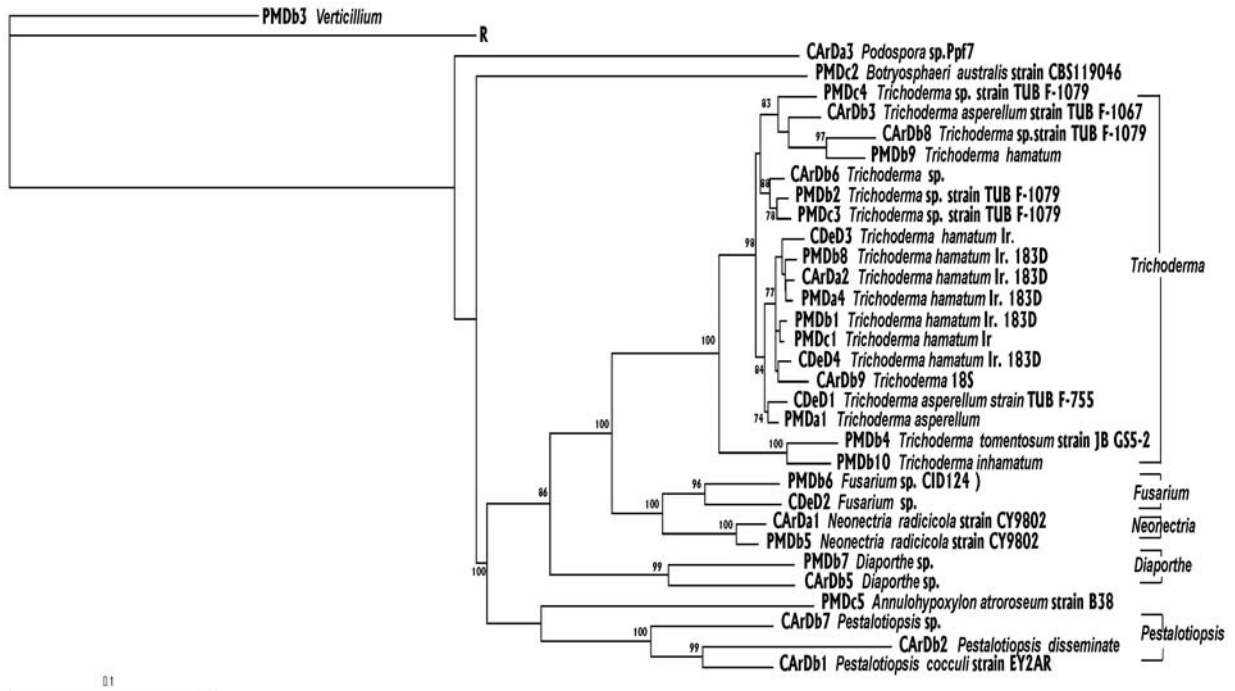


圖 2-5. 從採集自大漢山(D)之阿里山根節蘭(Car)、竹葉根節蘭(CDe)及細莖鶴頂蘭(PM)分離出之 32 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330) 為外群, 自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-5. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 32 fungal strains isolated from specimens of *Calanthe arisanensis* (CAr), *Calanthe densiflora* (CDe) and *Phaius mishmensis* (PM) collected in Dahanshan. *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

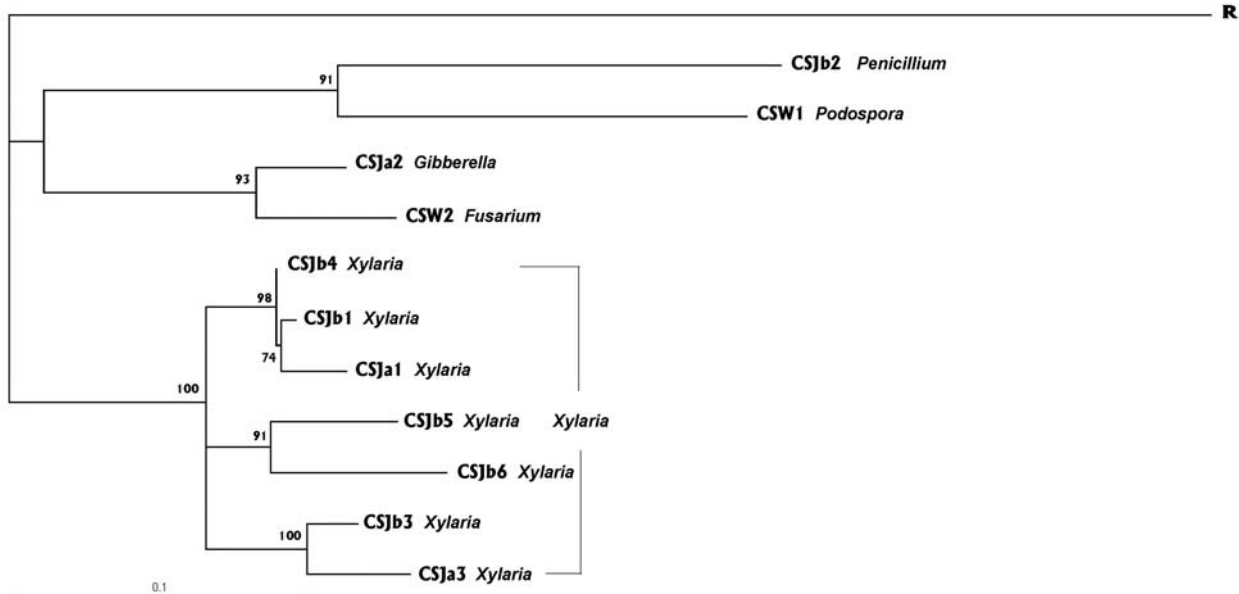


圖 2-6. 從採集自尖石(J)及五峰(W)之黃根節蘭(CS)分離出之 11 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330)為外群,自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-6. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 11 fungal strains isolated from specimens of *Calanthe sieboldii* (CS) collected in Jianshi (J) and Wufong (W). *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

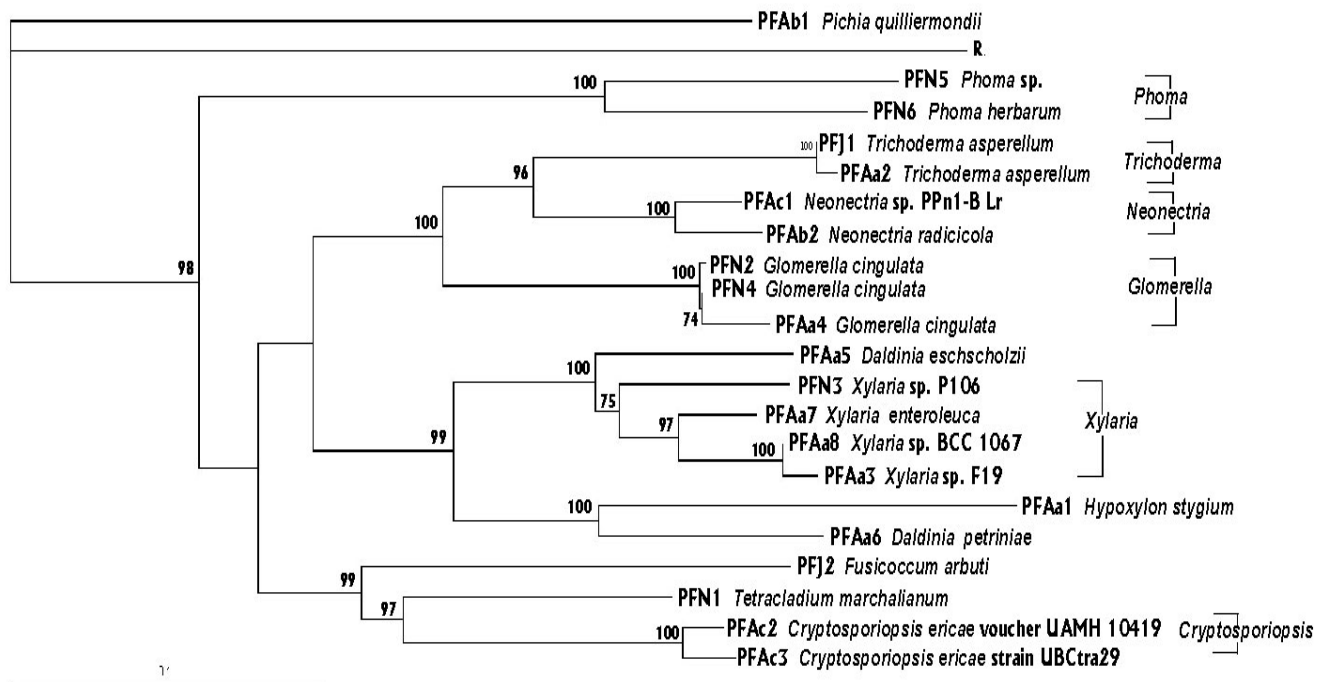


圖 2-7. 從採集自尖石(J)、南庄(N)及阿里山(A)之黃鶴頂蘭(PF)分離出之 21 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330) 為外群, 自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-7. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 21 fungal strains isolated from specimens of *Phaius flavus* (PF) collected in Jianshi (J), Nanchuang (N) and Alishan (A). *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

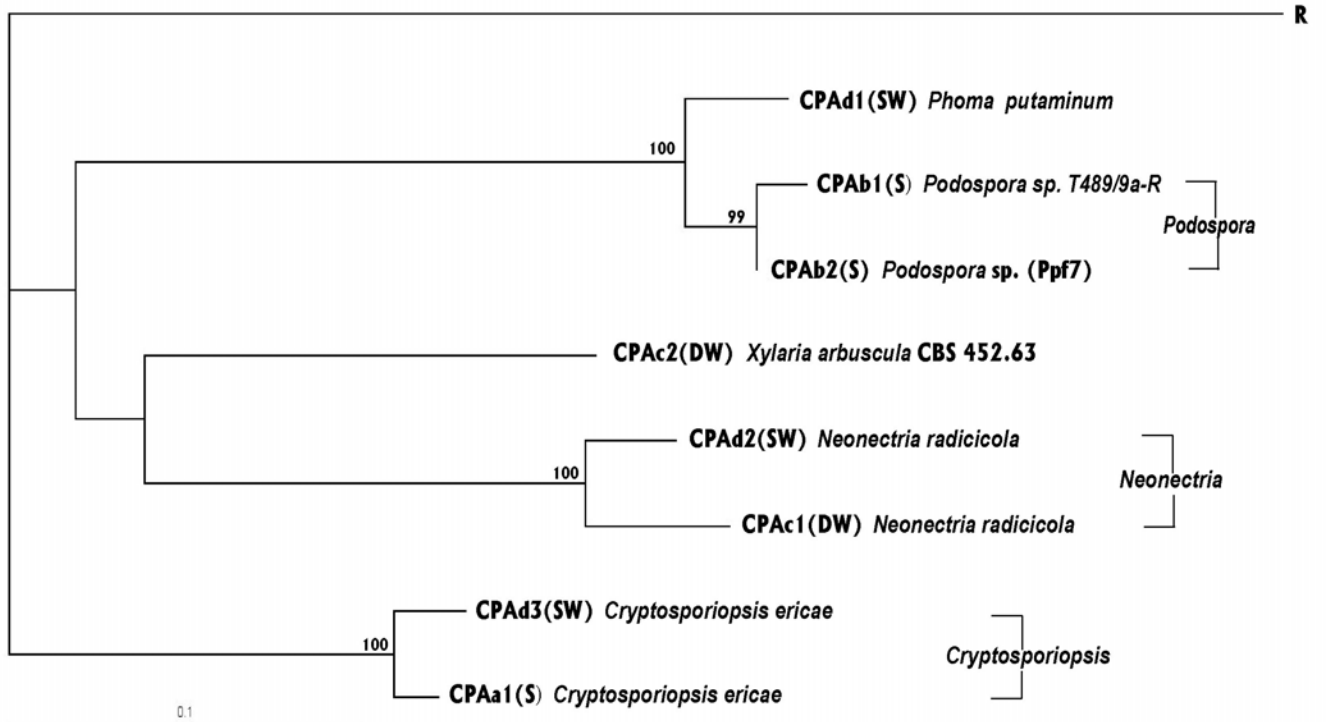


圖 2-8. 從採自阿里山不同質地土壤(S)、枯木(DW)、石壁(SW)之反捲根節蘭(CP)分離出之 8 株真菌菌株之 ITS rDNA 序列以鄰位相連算法計算 1,000 次所得親緣關係樹狀圖。在本試驗中選定 *Rhizopus oryzae* (DQ990330) 為外群, 自舉分析值均大於 70%。

Fig. 2-8. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method based on ITS rDNA sequence of 8 fungal strains isolated from specimens of *Calanthe puberula* (CP) collected from different growth media soil (S), dead wood (DW) and stone wall (SW) in Alishan (A). *Rhizopus oryzae* (DQ990330) were selected as outgroups in the study. The bootstrap values were obtained from 1,000 replicates and values >70% were indicated next to the nodes.

表 2-1. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌種數量及鑑定結果一覽表。

Table 2-1. The identification results and number of endophytic fungi isolated from roots of indigenous orchid species of Taiwan.

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
N	Wulaoken river, Yilan County	940810a	<i>Saccolabiopsis wulaokenensis</i>	14	<i>Penicillium</i> sp. <i>Nodulisporium</i> sp.	—
N	Taipingshan, Yilan County	940421a	<i>Phaius flavus</i>	2	—	<i>Xylariales</i> sp. F17 <i>Arthrographis cuboidea</i>
N	Pingxi, Taipei County	940415a	<i>Liparis nigra</i>	1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	—
N	Pingxi	940415b	<i>Liparis nigra</i>	6	<i>Verticillium</i> sp. <i>Verticillium</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i> strain TSG003
N	Pingxi	940415c	<i>Liparis formosana</i>	3	—	—
N	Pingxi	940415d	<i>Zeuxine nervosa</i>	3	—	<i>Glomerella cingulata</i> strain CMUBE1814
N	Pingxi	940415e	<i>Liparis nakaharae</i>	2	—	—
N	Pingxi	940415f	<i>Cephalantheropsis gracilis</i>	2	—	—
N	Pingxi	940415g	<i>Diploprora championii</i>	8	—	<i>Rhizoctonia</i> sp. Bi8 <i>Pestalotiopsis paeoniicola</i> <i>Tetracladium marchalianum</i> strain ccm-F26399 <i>Glomerella cingulata</i> partia <i>Xylaria</i> sp. P106 <i>Glomerella cingulata</i> <i>Leptosphaeria</i> sp <i>Podospora</i> sp. Ppf7
N	Pingxi	940415h	<i>Cephalantheropsis gracilis</i>	2	—	—
N	Yangmingshan Taipei City	940912	<i>Anoectochilus formosanus</i>	2	<i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. Tm1-4
N	Yangmingshan	940914	<i>Eulophia zollingeri</i>	14	—	—
N	N.T.U [†]	940317b	<i>Spiranthes sinensis</i>	2	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	—
N	N.T.U	940317e	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	<i>Trichoderma</i> sp.	—
N	N.T.U	940317f	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	—	—

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
N	Sijhih City, Taipei County	940429a	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	—
N	Sijhih City	940429c	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	—	<i>Macrophomina phaseolina</i>
N	Wulai, Taipei County	940410b	<i>Bulbophyllum pectinatum</i>	5	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phoma glomerata</i> <i>Trichoderma viride</i> strain Tr21 <i>Gibberella avenacea</i>
N	Wulai, Taipei County	940730a	<i>Calanthe triplicata</i>	4	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T115 <i>Trichoderma spirale</i> <i>Trichoderma pubescens</i>
N	Jhongho City, Taipei County	940310a	<i>Spiranthes sinensis</i>	2	<i>Cylindrocarpon</i> sp. <i>Periconia</i> sp.	<i>Haematonectria haematococca</i> (<i>Nectria haematococca</i>)
N	Jhongho City	940310c	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	—
N	Jhongho City	940310d	<i>Spiranthes sinensis</i>	1	—	—
N	Xindian City, Taipei County	940724a	<i>Goodyera procera</i>	2	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> strain GJS 98-170
N	Xindian City	940724b	<i>Goodyera procera</i>	9	<i>Mucor</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Beltrania</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. Gr22 <i>Thanatephorus cucumeris</i> (anamorph: <i>Rhizoctonia solani</i>)
N	Xindian City	940724c	<i>Bletilla formosana</i>	11	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Coniothyrium</i> sp. <i>Circinotrichum</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>
N	Fusing Township, Taoyuan County	940918a	<i>Habenaria polytricha</i>	1	<i>Fusarium</i> sp.	—
N	Fusing Township	940918b	<i>Haraella retrocalla</i>	9	<i>Trichoderma</i> sp.	—
N	Fusing Township	940918c	<i>Cymbidium cochleare</i>	2	—	—
N	Fusing Township	940918d	<i>Bulbophyllum japonicum</i>	2	—	—

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
N	Tungyenshan Taoyuan County	940130	<i>Calanthe arisanensis</i>	5	— ^L	—
N	Niaozuishan, Hsinchu County	940311a	<i>Calanthe sieboldii</i>	2	—	<i>Podospora</i> sp. Ppf7 <i>Fusarium</i> sp. 464
N	Niaozuishan	940311b	<i>Calanthe davidii</i>	5	—	<i>Muscodor vitigenus</i>
N	Niaozuishan	940311c	<i>Calanthe alismifolia</i>	5	—	<i>Colletotrichum</i> sp. IP-53 <i>Xylaria</i> sp. <i>Glomerella cingulata</i> strain CMUBE812
N	Niaozuishan	940311d	<i>Calanthe densiflora</i>	1	—	<i>Xylaria</i> sp.
N	Niaozuishan	940311f	<i>Calanthe arisanensis</i>	2	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.
N	Wufeng Hsinchu County	940422	<i>Anoectochilus formosanus</i>	3	—	—
N	Jianshih Township, Hsinchu County	940308a	<i>Phaius flavus</i>	3	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma asperellum</i> strain BBA 68646 <i>Fusicoccum arbuti</i>
N	Jianshih Township	940308b	<i>Calanthe puberula</i>	1	—	—
N	Jianshih Township	940308d	<i>Calanthe sieboldii</i>	6	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Xylaria enteroleuca</i> 18S <i>Penicillium pinophilum</i> <i>Xylaria</i> sp. JP10 <i>Xylaria</i> sp. IP-31 <i>Xylaria grammica</i> <i>Xylaria multiplex</i> strain PR112
N	Jianshih Township	940308e	<i>Calanthe sieboldii</i>	4	—	<i>Xylaria</i> sp. F4 <i>Gibberella moniliformis</i> strain bxq41208 <i>Xylaria</i> sp. JP10
N	Jianshih Township	940308f	<i>Calanthe alismifolia</i>	1	—	—
N	Jianshih Township, Hsinchu County	940316b	<i>Goodyera daibuzanensis</i>	3	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp.	—
N	Nanjhuang Township, Miaoli County	940417a	<i>Phaius flavus</i>	9	—	<i>Phoma</i> sp. (AF218789) <i>Phoma herbarum</i> (AY337712)
N	Nanjhuang Township	940417c	<i>Calanthe densiflora</i>	3	—	—
C	Kukuan Township, Taichung County	940314	<i>Chiloschista segawae</i>	4	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Amphisphaeria</i> sp. MAFF235878 <i>Tricholomataceae</i> sp. ATCC 28344

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
						<i>Paraphaeosphaeria solitaria</i>
C	Meifeng Township, Nantou County	940128a	<i>Gastrochilus fuscopunctatus</i>	3	—	—
C	Meifeng Township	940128b	<i>Holcoglossum quasipinifolium</i>	3	—	—
C	Meifeng Township	940128c	<i>Sunipia andersonii</i>	5	—	—
C	Meifeng Township	940128d	<i>Calanthe arcuata</i>	2	—	<i>Phomopsis eucommicola</i>
C	Renai Township, Nantou County	940504a	<i>Goodyera kwangtungensis</i>	1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. C-610
C	Renai Township, Nantou County	940407b	<i>Calanthe arisanensis</i>	4	—	<i>Diaporthe</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. C-610 <i>Cylindrocarpon</i> sp. IBL 03149
C	Renai Township, Nantou County	940504b	<i>Calanthe arcuata</i>	1	—	—
C	Renai Township	940802a	<i>Calanthe alismifolia</i>	7	<i>Fusarium</i> sp.	—
C	Puli Township, Nantou County	940407a	<i>Erythrodes blumei</i>	4	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i> strain G133
C	Shueishedashan, Nantou County	940525a	<i>Calanthe densiflora</i>	6	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	—
C	Shueishedashan	940525b	<i>Anoectochilus koshunensis</i>	3	<i>Trichoderma</i> sp.	—
C	Shanlinchi, Nantou County	940821b	<i>Calanthe arcuata</i>	5	—	—
C	Hsitou, Nantou County	940223a	<i>Liparis keitaoensis</i>	2	<i>Trichoderma</i> sp.	—
C	Hsitou,	940223b	<i>Bulbophyllum chitouense</i>	4	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> strain Tr21
C	Hsitou,	940223c	<i>Eria corneri</i>	3	—	—
C	Hsitou,	940223d	<i>Liparis nakaharae</i>	3	—	—
C	Hsitou,	940223e	<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>	8	—	<i>Entonaema cinnabarinum</i>
C	Hsitou, Nantou County	940223e	<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>	8	—	<i>Entonaema cinnabarinum</i>
S	Alishan, Chyi County	940527a	<i>Phaius flavus</i>	10	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i> <i>Xylaria enteroleuca</i> CBS 651.89 <i>Xylaria</i> sp. F19 <i>Xylaria</i> sp. BCC

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
						1067 <i>Daldinia eschscholzii</i> <i>Daldinia petriniae</i> <i>Hypoxylon stygium</i> <i>Trichoderma asperellum</i>
S	Alishan	940527b	<i>Liparis formosana</i>	11	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940527c	<i>Phaius flavus</i>	3	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Pichia quilliermondii</i> <i>Neonectria radiculicola</i>
S	Alishan	940527d	<i>Phaius flavus</i>	3	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Neonectria</i> sp. PPn1-B Lr <i>Cryptosporiopsis ericae</i> voucher UAMH 10419 <i>Cryptosporiopsis ericae</i> strain UBCtra29
S	Alishan	940528a	<i>Platanthera</i>	2	<i>Rhizoctonia</i> sp.	—
S	Alishan	940528b	<i>Calanthe puberula</i>	3	—	<i>Cryptosporiopsis ericae</i>
S	Alishan	940528c	<i>Calanthe puberula</i>	2	—	<i>Podospora</i> sp. T489/9a-R <i>Podospora</i> sp. (Ppf7)
S	Alishan	940528d	<i>Calanthe puberula</i>	6	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Neonectria radiculicola</i> <i>Xylaria arbuscula</i> CBS 452.63
S	Alishan	940528e	<i>Calanthe puberula</i>	5	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Phoma putaminum</i> <i>Neonectria radiculicola</i> <i>Cryptosporiopsis ericae</i>
S	Alishan	940528f	<i>Dendrobium moniliforme</i>	4	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningii</i> <i>Diaporthe phaseolorum</i> strain FAO125
S	Alishan	940528g	<i>Cremastra appendiculata</i>	1	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940528i	<i>Ascocentrum pumilum</i>	1	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940528j	<i>Galeola lindleyana</i>	5	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. Pr15 <i>Mucor</i> sp. 02MIN3S1

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
S	Alishan	940528k	<i>Malaxis matsudae</i>	7	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	—
S	Alishan	940528l	<i>Liparis bootanensis</i>	4	<i>Pestalotia</i> sp.	—
S	Alishan	940528n	<i>Liparis formosana</i>	7	—	<i>Neonectria radicola</i> strain IFO31882 <i>Xylariaceae</i> sp. F13
S	Alishan	940528p	<i>Acanthephippium striatum</i>	4	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940528q	<i>Malaxis matsudae</i>	5	—	—
S	Alishan	940528r	<i>Chrysoglossum ornatum</i>	5	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940528s	<i>Liparis nervosa</i>	6	—	—
S	Alishan	940528t	<i>Erythrodes blumei</i>	4	—	—
S	Alishan	940727a	<i>Habenaria ciliolaris</i>	4	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-G
S	Alishan	940727b	<i>Malaxis matsudae</i>	1	<i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Alishan	940727c	<i>Liparis condylobulbon</i>	3	—	—
S	Alishan	940727e	<i>Bulbophyllum umbellatum</i>	4	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Entonaema cinnabarinum</i>
S	Alishan	940727f	<i>Cleisostoma paniculatum</i>	7	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Mucor indicus</i> <i>Pestalotiopsis theae</i> strain PSH2000I-083
S	Alishan	940727g	<i>Malaxis latifolia</i>	4	—	—
S	Alishan	940727h	<i>Dendrobium chryseum</i>	4	—	—
S	Dahanshan	940909a	<i>Epigeneium nakaharae</i>	5	<i>Cylindrocarpon</i> sp. <i>Curvularia</i> sp.	—
S	Dahanshan, Pingtung County	940909b	<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>	8	<i>Fusarium</i> sp. <i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> strain Tr21
S	Dahanshan	940909c	<i>Bulbophyllum fimbriperianthium</i>	12	<i>Fusarium</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909d	<i>Eria tomentosiflora</i>	2	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> strain Tr21
S	Dahanshan	940909f	<i>Goodyera foliosa</i>	4	—	—
S	Dahanshan	940909g	<i>Liparis sootenzanensis</i>	4	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909h	<i>Bulbophyllum japonicum</i>	5	<i>Pestalotia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909i	<i>Bulbophyllum pectenveners</i>	10	<i>Fusarium</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909j	<i>Eria</i>	1	<i>Fusarium</i> sp.	—

Area [^]	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
<i>tomentosiflora</i>						
S	Dahanshan	940909k	<i>Eria ovata</i>	2	<i>Fusarium</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909l	<i>Eria ovata</i>	5		—
S	Dahanshan	940909m	<i>Calanthe densiflora</i>	5	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Trichoderma asperellum</i> strain TUB F-755 <i>Fusarium</i> sp. <i>Trichoderma hamatum</i> Ir. <i>Trichoderma</i> sp.
S	Dahanshan	940909n	<i>Cephalantheropsis gracilis</i>	14	—	—
S	Dahanshan	940909o	<i>Bulbophyllum drymoglossum</i>	5	<i>Fusarium</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909p	<i>Calanthe arisanensis</i>	5	—	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D <i>Podospora</i> sp.Ppf7 <i>Neonectria radicularis</i> strain CY9802
S	Dahanshan	940909q	<i>Calanthe arisanensis</i>	8	<i>Gloeosporium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	<i>Pestalotiopsis coccull</i> strain EY2AR <i>Pestalotiopsis disseminate</i> <i>Trichoderma asperellum</i> strain TUB F-1067 <i>Trichoderma hamatum</i> <i>Diaporthe</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079
S	Dahanshan	940909r	<i>Dendrobium nobile</i>	4	<i>Mucor</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909s	<i>Phaius mishmensis</i>	5	<i>Phoma</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909t	<i>Phaius mishmensis</i>	4	—	<i>Trichoderma asperellum</i> <i>Hypocrea vinosa</i> <i>Trichoderma hamatum</i> Ir. <i>Hypocrea vinosa</i> strain GJS 94-81
S	Dahanshan	940909u	<i>Phaius mishmensis</i>	11	<i>Mucor</i> sp.	<i>Trichoderma asperellum</i> <i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183 D

Area ^X	Collection locality	Strain code	Orchid species	No. of fungi species	Morphological method	DNA sequence method
						<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079 <i>Verticillium</i> sp. 04M 157 <i>Trichoderma tomentosum</i> strain JB GS5-2 <i>Neonectria radiculicola</i> strain CY9802 <i>Fusarium</i> sp. CID124 <i>Diaporthe</i> sp. <i>Trichoderma hamatum</i> <i>Trichoderma inhamatum</i>
S	Dahanshan	940909v	<i>Phaius mishmensis</i>	8	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. <i>Botryosphaeria australis</i> strain CBS119046 <i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079 <i>Annulohyphoxylon atroroseum</i> strain B38
S	Dahanshan	940909w	<i>Phreatia taiwaniana</i>	3	<i>Dactylaria</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909x	<i>Tainia dunnii</i>	9	<i>Fusarium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	—
S	Dahanshan	940909z	<i>Liparis sootenzanensis</i>	10	<i>Fusarium</i> sp.	—
S	Taimali, Taitong County	940814a	<i>Calanthe lyroglossa</i>	13	<i>Curvularia</i> sp. <i>Corynespora</i> sp. <i>Coniothyrium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	—
S	Taimali	940814b	<i>Calanthe sylvatica</i>	1	—	—
Total				531		

^X Indigenous orchids were collected in 25 sites in northern (N), central (C) and southern (S) Taiwan.

^Y N.T.U=National Taiwan University

^Z “—” = non-identification

表 2-2. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌株以傳統形態與分子方法鑑定結果一覽表。

Table 2-2. The identification of the endophytic fungi isolated from the roots of indigenous orchid species of Taiwan with both morphological method and DNA sequence method.

Genus	No. of fungi species by morphological method	No. of fungi species by DNA sequence method
<i>Acremonium</i>	1	—
<i>Alternaria</i>	2	—
<i>Amphisphaeria</i>	—	1
<i>Annulohyphoxylon</i>	—	1
<i>Arthrographis</i>	—	1
<i>Beltrania</i>	1	—
<i>Botryosphaeria</i>	—	1
<i>Ceratobasidium</i>	—	1
<i>Chaetomium</i>	2	—
<i>Circinotrichum</i>	1	—
<i>Cladosporium</i>	1	—
<i>Colletotrichum</i>	3	1
<i>Coniothyrium</i>	2	—
<i>Corynespora</i>	1	—
<i>Cryptosporiopsis</i>	—	4
<i>Curvularia</i>	2	—
<i>Cylindrocarpon</i>	4	1
<i>Dactylaria</i>	1	—
<i>Daldinia</i>	—	2
<i>Diaporthe</i>	—	4
<i>Entonaema</i>	—	2
<i>Fusarium</i>	19	4
<i>Fusicoccum</i>	—	1
<i>Gibberella</i>	—	2
<i>Gloeosporium</i>	1	—
<i>Glomerella</i>	—	8
<i>Haematonectria</i>	—	1
<i>Hypocrea</i>	—	2
<i>Hypoxyton</i>	—	1
<i>Leptosphaeria</i>	—	2
<i>Macrophomina</i>	—	1
<i>Mucor</i>	6	4

Genus	No. of fungi species by morphological method	No. of fungi species by DNA sequence method
<i>Muscodor</i>	—	1
<i>Neonectria</i>	—	7
<i>Nigrospora</i>	1	—
<i>Nodulisporium</i>	1	^z —
<i>Paraphaeosphaeria</i>	—	1
<i>Penicillium</i>	1	1
<i>Periconia</i>	1	—
<i>Pestalotia</i>	10	—
<i>Pestalotiopsis</i>	—	5
<i>Phoma</i>	1	2
<i>Phomopsis</i>	—	2
<i>Pichia</i>	—	1
<i>Podospora</i>	—	6
<i>Rhizoctonia</i>	9	4
<i>Tetracladium</i>	—	1
<i>Thanatephorus</i>	—	1
<i>Trichoderma</i>	36	30
<i>Verticillium</i>	2	1
<i>Xylaria</i>	—	15
Total	109	123

^z— = non-identification

表 2-3. 臺灣原生蘭內生真菌分離菌株以傳統形態與分子方法鑑定結果相同相異一覽表。

Table 2-3. Sameness and differences of the identification results of the endophytic fungi isolated from the roots of indigenous orchid species with both morphological method and DNA sequence method.

Result (D ^x or S)	Strain code	Morphological method	DNA sequence taxon		
			Nearest taxon	Accession No. in genbank	Match (%)
D	0724b-6-2-1	<i>Mucor</i> sp.	<i>Rhizomucor variabilis</i>	DQ119006	95
D	0909t-5-2-1	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D	AYA54937.1	99
D	0909u-3-2-2	<i>Mucor</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079	AY857251	99
S	0223b-1-1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> (strain Tr21)	AJ230675	99
S	0308d-1-1-1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium pinophilum</i>	AB194281	100
S	0310a-2-1-1	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Haematonectria</i> <i>haematococca</i> (<i>Nectria</i> <i>haematococca</i>)	AY310442	100
S	0410b-3-2-3	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371	98
S	0415d-2-3-2	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i> strain CMUBE1814	AY266378	99
S	0415g-3-2-2	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. Bi8	AJ318438	95
S	0504a-2-1-1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. C-610	AJ242895	98
S	0528f-1-2-1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningii</i>	AF218790	99
S	0528j-5-2-1	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. 02MIN3S1	AY305376	92
S	0528j-3-1-1	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. Pr15	AJ301977	99
S	0528j-3-1-2	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp. Pr15	AY210329	96
S	0724a-4-1-1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> strain GJS 98-170	DQ109530	98
S	0727a-2-2-2	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-G	DQ102402	99
S	0727f-1-2-2	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor indicus</i>	DQ118994	90
S	0730a-6-2-2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> <i>aureoviride</i> strain T115	AF359400	98
S	0909d-1-3-2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> (strain Tr21)	AJ230675	98
S	0909k-1-4-1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> (strain Tr21)	AJ230675	98
S	0909x-1-1-2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningii</i>	DQ379015	99
S	0912-3-3-1	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. Tm1-4	AJ242895	98
S	0912-4-1-2	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. Tm1-4	AY433813	96

^x Twenty four isolate species were identified with Morphological method and DNA sequence of cultured pellets at the same time, the results different (D) or same (S).

表2-4. 採集自六個地方之六種根節蘭及二種鶴頂蘭之內生真菌代碼、鑑定結果及數量一覽表。

Table 2-4. The identification results and number of endophytic fungi isolated from roots of six *Calanthe* species and two *Phaius* species were collected in six locations.

Orchid species	Collection Location	Fungi species code	Putative taxonomic affinity (Gen Bank no.)	Similarity (%)
<i>P. flavus</i>	Jianshih	PFJ1	<i>Trichoderma asperellum</i> strain BBA 68646 (AJ230680)	99
<i>P. flavus</i>	Jianshih	PFJ2	<i>Fusicoccum arbuti</i> (AY819725)	92
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJa1	<i>Xylaria</i> sp. (AY315405)	95
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJa2	<i>Gibberella moniliformis</i> strain bxq41208 (EF556212)	100
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJa3	<i>Xylaria</i> sp. JP10 (AB255244)	98
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb1	<i>Xylaria enteroleuca</i> 18S (AM084368)	99
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb2	<i>Penicillium pinophilum</i> (AF176660)	99
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb3	<i>Xylaria</i> sp. JP10 (AB255244)	91
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb4	<i>Xylaria</i> sp. IP-31 (DQ780440)	99
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb5	<i>Xylaria grammica</i> (DQ322146)	96
<i>C. sieboldii</i>	Jianshih	CSJb6	<i>Xylaria multiplex</i> strain PR112 (AY909020)	92
<i>C. sieboldii</i>	Wufong	CSW1	<i>Podospora</i> sp. Ppf7 (EF495232.1)	99
<i>C. sieboldii</i>	Wufong	CSW2	<i>Fusarium</i> sp. 464 (AY729072.1)	96
<i>C. davidii</i>	Wufong	CDW1	<i>Muscodor vitigenus</i> (AY100022)	97
<i>C. alismifolia</i>	Wufong	CAW1	<i>Colletotrichum</i> sp. IP-53 (DQ780415.1)	99
<i>C. alismifolia</i>	Wufong	CAW2	<i>Xylaria</i> sp. (AB255244.1)	95
<i>C. alismifolia</i>	Wufong	CAW3	<i>Glomerella cingulata</i> strain CMUBE812 (AY266400)	95
<i>C. densiflora</i>	Wufong	CDeW1	<i>Xylaria</i> sp. (AB255244.1)	95
<i>C. arisanensis</i>	Wufong	CArW1	<i>Phomopsis</i> sp. (DQ145731.1)	97
<i>C. arisanensis</i>	Chunyang	CArC1	<i>Diaporthe</i> sp. (EF488448)	98
<i>C. arisanensis</i>	Chunyang	CArC2	<i>Rhizoctonia</i> sp. C-610 (AJ242895)	98
<i>C. arisanensis</i>	Chunyang	CArC3	<i>Cylindrocarpon</i> sp. IBL 03149	98
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa1	<i>Hypoxylon stygium</i> (AJ390409)	94
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa2	<i>Trichoderma asperellum</i> (DQ093705)	100
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa3	<i>Xylaria</i> sp. F19 (AY315404)	93

Orchid species	Collection Location	Fungi species code	Putative taxonomic affinity (Gen Bank no.)	Similarity (%)
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa4	<i>Glomerella cingulata</i> (AJ301977)	98
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa5	<i>Daldinia eschscholzii</i> (AB284189)	99
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa6	<i>Daldinia petriniae</i> (AF176975)	94
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa7	<i>Xylaria enteroleuca</i> (AM084368)	99
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAa8	<i>Xylaria</i> sp. BCC 1067 (DQ139271)	98
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAb1	<i>Pichia quilliermondii</i> (EF643595)	98
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAb2	<i>Neonectria radicola</i> (AY295325)	99
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAc1	<i>Neonectria</i> sp. PPn1-B Lr (EF601622)	98
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAc2	<i>Cryptosporiopsis ericae</i> voucher UAMH 10419 (AY853167)	99
<i>P. flavus</i>	Alishan	PFAc3	<i>Cryptosporiopsis ericae</i> strain UBCtra29 (AF149087)	96
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAa1	<i>Cryptosporiopsis ericae</i> (AY853167)	99
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAb1	<i>Podospora</i> sp. T489/9a-R (AY345351)	97
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAb2	<i>Podospora</i> sp. (Ppf7) (EF495232)	99
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAc1	<i>Neonectria radicola</i> (AY295325)	99
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAc2	<i>Xylaria arbuscula</i> CBS 452.63 (AF163029)	93
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAd1	<i>Phoma putaminum</i> (AM691009)	97
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAd2	<i>Neonectria radicola</i> (AY295325)	99
<i>C. puberula</i>	Alishan	CPAd3	<i>Cryptosporiopsis ericae</i> (AY853167)	98
<i>C. densiflora</i>	Dahanshan	CDeD1	<i>Trichoderma asperellum</i> strain TUB F-755 (AY857217.1)	99
<i>C. densiflora</i>	Dahanshan	CDeD2	<i>Fusarium</i> sp. (AY924269)	98
<i>C. densiflora</i>	Dahanshan	CDeD3	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. (AY154937)	99
<i>C. densiflora</i>	Dahanshan	CDeD4	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AY154937)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDa1	<i>Neonectria radicola</i> strain CY9802 (AY295325.1)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDa2	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AY154937)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDa3	<i>Podospora</i> sp. Ppf7 (EF495232)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb1	<i>Pestalotiopsis cocculi</i> strain EY2AR (EF055192)	99

Orchid species	Collection Location	Fungi species code	Putative taxonomic affinity (Gen Bank no.)	Similarity (%)
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb2	<i>Pestalotiopsis disseminate</i> (AB251918)	91
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb3	<i>Trichoderma asperellum</i> strain TUB F-1067 (AY857244)	97
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb4	<i>Trichoderma hamatum</i> (DQ248967)	98
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb5	<i>Diaporthe</i> sp. (EF432257.1)	96
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb6	<i>Trichoderma</i> sp. (AY857251.1)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb7	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (EF423541)	99
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb8	<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079 (AY857251)	98
<i>C. arisanensis</i>	Dahanshan	CArDb9	<i>Trichoderma hamatum</i> 18S (DQ682602)	97
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDa1	<i>Trichoderma asperellum</i> (AY857244)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDa2	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. (AY154937)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDa3	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AYA54937.1)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDa4	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AY154937.1)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb1	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AY154937)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb2	<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079 (AY857251)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb3	<i>Verticillium</i> sp. 04M 157 (AY842392)	97
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb4	<i>Trichoderma tomentosum</i> strain JB GS5-2 (AY605718)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb5	<i>Neonectria radicola</i> strain CY9802 (AY295325)	98
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb6	<i>Fusarium</i> sp. CID124 (EF589878)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb7	<i>Diaporthe</i> sp. (EF488448)	98
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb8	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir. 183D (AY154937)	100
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb9	<i>Trichoderma hamatum</i> (DQ248967)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDb10	<i>Trichoderma inhamatum</i> (AF455502)	98
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDc1	<i>Trichoderma hamatum</i> Ir (AY154937)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDc2	<i>Botryosphaeria australis</i> strain CBS119046 (DQ299244)	93
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDc3	<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB	99

Orchid species	Collection Location	Fungi species code	Putative taxonomic affinity (Gen Bank no.)	Similarity (%)
			F-1079 (AY857251)	
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDc4	<i>Trichoderma</i> sp. strain TUB F-1079 (AY857251)	99
<i>P. mishmensis</i>	Dahanshan	PMDc5	<i>Annulohyphoxylon atroroseum</i> strain B38 (EF488415.1)	92
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN1	<i>Tetracladium marchalianum</i> strain ccm-F26399 (AY204623)	97
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN2	<i>Glomerella cingulata</i> (AM403718)	99
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN3	<i>Xylaria</i> sp. P106 (EF423545)	95
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN4	<i>Glomerella cingulata</i> (DQ682572)	98
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN5	<i>Phoma</i> sp. (AF218789)	90
<i>P. flavus</i>	Nanchuang	PFN6	<i>Phoma herbarum</i> (AY337712)	96



表 2-5. 分離自六種根節蘭及二種鶴頂蘭根部優勢真菌菌種統計一覽表。

Table. 2-5. List of dominant species of root endophytic fungi isolated from six *Calanthe* and two *Phaius* species.

Code* Fungal genus	CA W	CD W	CDe W	CS W	Car W	CS J	Car C	CP A	Car D	CDe D	PF J	PF N	PF A	PM D	Total
<i>Trichoderma</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	6	3	1	—	1	13	24
<i>Xylaria</i>	1	—	1	—	—	7	—	1	—	—	—	1	3	—	14
<i>Neonectria</i>	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	2	1	6
<i>Podospora</i>	—	—	—	1	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—	4
<i>Cryptosporiopsis</i>	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	—	4
<i>Glomerella</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	4
<i>Diaporthe</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	1	3
<i>Fusarium</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	3
<i>Pestalotiopsis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	3
<i>Phoma</i>	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—	—	3
<i>Daldinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2
<i>Gibberella</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Annulohyoxylon</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
<i>Botryosphaeria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
<i>Colletotrichum</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Cylindrocarpon</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Fusicoccum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
<i>Hypoxyton</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
<i>Muscodor</i>	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Penicillium</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Phomopsis</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Pichia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1

<i>Rhizoctonia</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Tetracladium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Verticillium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Total	3	1	1	2	1	9	3	8	12	4	2	6	13	19	84

*Refer to Table 4 for codes.



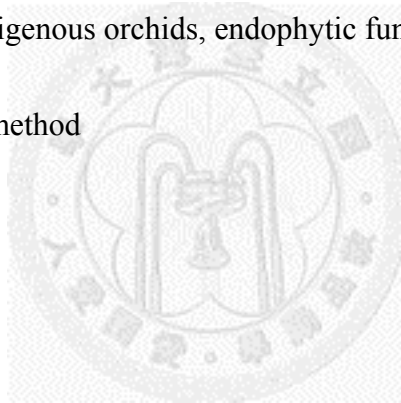
Abstract

Orchidaceae is a group of plant species with worldwide interest. Endophytic fungi may serve as beneficial fungi for against fungal plant pathogens and enhancement of orchid plant growth. Symbiotic association of mycorrhizal fungi and orchids play important roles in the growth and survival of orchids in natural environments. To investigate the diversity of endophytic fungi in Taiwan indigenous orchids and explore the resources of symbiotic microorganisms, wild indigenous orchids were extensively collected from 25 sites in the northern, central and southern parts of Taiwan. A total of 69 orchid species belonging to 34 genera in Orchidaceae, including 10 species of the *Calanthe*, 9 species of *Bulbophyllum*, and 8 species of *Liparis*, were collected. More than 500 isolates of endophytic fungi from roots were isolated. Morphological and molecular identification suggested that *Trichoderma*, *Fusarium*, and *Xylaria* spp. were predominant fungal species and *Rhizoctonia* spp. a group of endophytic fungi in orchids, were also isolated. In this study, we also utilized the internal transcribed spacer (ITS) to generate the phylogenetic relationship of endophytic fungi in *Calanthe* and *Phaius* species endemic to Taiwan, specimens of six *Calanthe* species (*C. puberula*, *C. sieboldii*, *C. alisimifolia*, *C. matsudai*, *C. densiflora*, and *C. arisanensis*) and two *Phaius* species (*P. flavus* and *P. mishmensis*) were collected in six locations in the northern, central and southern parts of Taiwan. Our surveys reveal that the same species of orchid plants

from different geographic areas exhibit different microbial communities in their roots and the roots of different orchid plant species contains diverse and different endophytic fungi, and the environment and climate of the geographic area were important factors that influenced the endophytic fungi of orchids, while orchidaceae species as comparatively were the secondary factor. Our studies suggest that endophytic fungi are widely and diversely existed in Taiwan indigenous orchids and exploration of these endophytic fungi especially *Xylaria* requires further investigation.

Keywords: biodiversity, indigenous orchids, endophytic fungi, morphological method,

DNA sequence method



第三章臺灣金線連於不同海拔地區接種蘭菌其生長發育

及有效成分之變化

摘要

於臺大(海拔 10 公尺)、新店(海拔 500 公尺)、新竹縣五峰(海拔 1,000 公尺)等三個不同海拔地區，種植臺灣金線連，泥炭土和椰纖以 7:4 的比例混合做為介質，將 1,000 ppm 之花寶五號水溶液肥料，加入介質至田間容水量，種植於五寸塑膠盆中，並將盆栽置於完全封閉的 OPP 透明塑膠袋內，是為塑膠袋栽培法(plastic bag cultivation method, PBCM)，以此法種植接種絲核菌屬蘭菌 R02 及 R04 之 B(野生種)及 R(野生種和紅莖種的雜交種)等兩種不同品系的臺灣金線連，結果顯示以塑膠袋套袋栽培法，栽培 7 個月之所有臺灣金線連組培苗，於出瓶後其成活率均在 80% 以上，且可顯著提高植株產量，及不需施用任何化學農藥，假使臺灣金線連，使用一般方法栽種，則在溫室中栽培 3-4 個月後，每 1-2 個星期若不進行殺蟲劑與殺菌劑的噴施，則所有植株將會因病害或蟲害而死亡，且塑膠袋栽培法可比傳統栽培法縮短栽培期 1-2 個月。其中種植於五峰，且接種蘭菌之植株生長最佳，鮮重亦較對照組高，B 品系則以接種蘭菌 R04，R 品系以接種蘭菌 R02 可顯著促進生長。種植於臺大之臺灣金線連 B 及 R 兩品系，均以接種 R02 之菌根植株有較高的總酚類及保肝活性成分金線連苷(AFEE)之含量。以 Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)的方法，分析測試其抗氧化能力，結果顯示大部份菌根植株較非菌根植株為高。本研究結果證實塑膠袋栽培法，為一非常省工之法，即將植株置入封閉的塑膠袋內，之後不需再澆水與施肥，可省下載培期間之所有灌溉與施肥之人力，且不需噴施任何殺蟲劑及殺菌劑等化學藥劑，即可大量生產無農藥的臺灣金線連，且接種蘭菌 R02 及 R04，可顯著增加臺灣金線連的產量，並提高抗氧化能力及保肝成分之含量。本研究結果得知，種植於海拔 1,000 公尺(日夜溫 22/18°C)，並利用塑膠袋栽培法，配合蘭菌的接種(R02、R04)，可以快速大量生產無農藥的臺灣金線連，並提升其藥用效能。

關鍵詞：臺灣金線連、塑膠袋栽培法、絲核菌、抗氧化能力、保肝成分

前言

臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)為生長於臺灣森林野地的地生蘭，兼具有觀賞及藥用價值。廣泛被用於治療高血壓、高血脂、低血糖症，及控制糖尿病、肝病、肺病等(Yen 氏等, 1996; 張, 1999)。也具有抗腫瘤及抗病毒之效用(Lin, 2007; Wu, 2007)。因其藥效廣泛，遭受人為採摘破壞嚴重，致使野生臺灣金線連數量急速銳減。由於組織培養等相關的繁殖與栽培技術之成熟，業者已可利用實生苗及組培苗進行大量繁殖，經研究臺灣金線連是典型的陰性植物，生長在低光強度 $PPF\ 30-50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，可促進生長及提高類黃酮(flavonoid)的含量(Ma 氏等, 2010)。具有廣闊的開發利用前景。但是傳統人工集約式之栽培方法，除了組培瓶苗移植存活率低、生長緩慢、栽培期長外，更經常伴隨著病蟲害的發生，且易感染莖腐病(*Fusarium oxysporum* Schlecht.)及基腐病(*Pythium ultimum* Trow)、細菌性軟腐病、疫病及遭受紅蜘蛛及介殼蟲等蟲危害，致栽培過程中，需不斷的噴施農藥。如何提高出瓶後組培苗的存活率及控制或調節栽培環境，使後續的生長期縮短並減少罹病機會，是目前金線連栽培產業上亟需克服的難題。

本研究主要的目的有三：(1)擬利用本實驗室研發之具省時、省工及不需施用農藥等優點之塑膠袋套袋栽培方法(Chang 氏等, 2007)，進行臺灣金線連接種蘭菌(絲核菌代碼 R02 及 R04)的栽培試驗，評估利用此栽培方法，用於大量商業生產的可行性。(2)已有研究指出，臺灣金線連適合生長於低溫的環境，發生病害的機率較低(李, 2001; Chang 及 Chou, 2007)，而基於實用性的考量，也有很多人於低海拔試植臺灣金線連，因此本試驗擬分別於臺大(海拔 10 公尺)、新北市新店(海拔 500 公尺)、新竹五峰(海拔 1,000 公尺)等三個不同海拔高度，具不同生長溫度的地方進行測試接種蘭菌(絲核菌代碼 R02 及 R04)之菌根植株與栽培環境之間的交互影響與作用，以找出最適合臺灣金線連的生長環境與栽培條件。(3)一般認為組培苗繁

殖的臺灣金線連，其藥效較野生植株差，市售價格亦有 3-5 倍的差距，已有研究指出金線連之藥效受共生蘭菌影響，金線連菌根植株有較高的超氧化歧化酶及酸性與鹼性磷酸酶活性，亦含有較高的抗壞血酸、多酚類、類黃酮、多醣類及磷酸等成分之含量，因而使其成為較有效的藥用植物(Chang 及 Chou, 2007)。因此擬以接種蘭菌之臺灣金線連植株，進一步進行其抗氧化能力及保肝活性成分之分析與探討。

材料與方法

菌根菌接種源

用於本試驗的二個品系絲核菌屬蘭菌 R02 (*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-A)及 R04 (*Rhizoctonia solani* AG-6)，為本研究室自野生蘭花分離，並持續進行十年以上的研究，具有穩定的成果，並經本研究室進行多次的致病性分析，均證明為無致病性(Chang, 2008)之菌種。接種源的製作乃將菌種培養於加入 20% V8 果汁至田間容水量的泥炭土(Chang 及 Chou, 2007)。試驗中兩種不同品系的臺灣金線連，均只接種單一菌種。每一株植株於根部接種的量約 0.1 至 0.2 克。R02 經鑑定為雙核絲核菌屬蘭菌(*Ceratobasidium* sp. AG-A, accession NO. DQ102413. 99% match, 未發表資料)，R04 是多核的絲核菌屬蘭菌(*Rhizoctonia solani* AG-6) (李, 2001)。

植物材料

臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)的微體繁殖苗，購自埔里的組織培養公司，用於本試驗的兩個品系，品系 B 為野生種，品系 R 為野生種和紅莖種的雜交種。將臺灣金線連的莖段，培養於洋菜培養基 8 個月，直到根及芽長出，苗高 6 公分左右選為試驗材料。組織培養苗出瓶移植前，先將瓶苗置於溫室馴化一個星期。

栽培介質與栽種方法

使用之培養介質為泥炭土和椰纖 7:4 充分混合調配；二種臺灣金線連栽培品系(B 品系)和(R 品系)；分別進行三種處理，不接種蘭菌之對照組(NM)及分別接種絲核菌屬蘭菌 R02(*Rhizoctonia* sp.)及 R04 (*R. solani*)，種植培養方法採用塑膠袋套袋栽培法(plastic bag culturing method；簡稱 PBCM) (Chang 氏等, 2007)，在 5 寸塑膠盆中種植 10 株植株，每 2 盆再以 OPP 透明塑膠袋包覆(35.5 x 55 公分)。將花寶五號的 1,000 ppm 溶液加入栽培介質中(泥炭土:椰纖=7:4)，調至田間含水量。實驗地點分成三個(1).臺大 D 棟溫室，海拔約 10 公尺，平均光合光子通量(photosynthetic photon flux, PPF) 為 $58.3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (於中午最大為 $63.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，溫度 32/25°C。(2).新店獅仔頭山，海拔約 500 公尺，平均光合光子通量 PPF 為 $53.2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (於中午最大為 $57.7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，溫度 27/22°C。(3).桃園區農業改良場五峰工作站(Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station-Wu fong workstation)，海拔約 1,000 公尺，平均光合光子通量 PPF 為 $55.4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (於中午最大為 $60.9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，溫度 22/18°C。每個處理均種植有 400 株之多，以做為評估大量繁殖實際應用的可行性。各處理的排列採用完全隨機設計(completely randomized design, CRD)，以塑膠袋栽培法栽培的植株，於 2005 年 4 月 14-15 日，分別移送至新店和五峰兩處。於 2005 年 11 月 14-16 日，將所有植株運送回臺灣大學，從每個處理種植 40 盆的植株中，每盆隨機取樣 5 株，共 200 株進行生統分析。

抗氧化能力分析

抗氧化能力之測定共分下列 2 種：

- 1.總酚量 (Total phenolic contents) 之測定係採 Folin-Ciocalteu 法 (Kujala 氏等, 2000)。
- 2.Trolox 當量抗氧化能力(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)參考 Arnao 等人的方法(Arnao 氏等, 1996)，以分光光度計 spectrophotometer (HITACHI, 2800) 測量 734 nm 之吸光值，根據吸光值與 trolox 濃度之關係求出標準曲線之迴歸方

程式，將樣品吸光值代入公式，即可獲得樣品之 TEAC 值。

保肝成分分析

純化：精確秤取金線連乾品，加入適量的水，利用超音波萃取三次，接著重力過濾，再將濾液定容後，借助高效液相層析儀(high performance liquid chromatography; HPLC)定量指標成分(kinsenoside)。

分析：

KIN 的分析條件：

移動相：100% H₂O 溶液

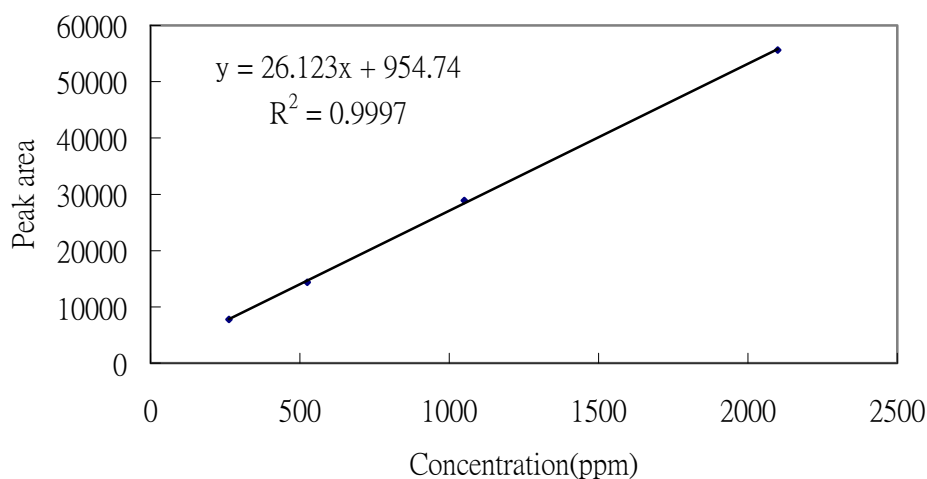
流速：0.5ml/min 檢測溫度：25°C 注入量：20μL

檢出器：折射光檢出器(shimadzu RID-10A)

Column：Mightysil RP-18 Aqua

檢測方法：將檢品與標準品經過前處理後，利用高效液相層析儀檢測標準品與檢品溶液，做出標準溶液之檢量線，再將檢品溶液得出之數據值，代入標準溶液之迴歸方程式，計算金線連甘(*A. formosanus* extraction with ethyl acetate, AFEE)含量 (Wu 氏等, 2007)。本分析委由世華生物科技股份有限公司代為操作分析(412 台中縣大里市西湖路 191 號，電話號碼：04-24938418，傳真號碼：04-24952616)。

Kinsenoside 檢量線



結果與討論

塑膠袋栽培法

先前的預備試驗中，臺灣金線連在栽培的過程中，於栽培 3-4 個月後，每 1~2 星期需施行殺蟲劑及殺菌劑的噴施，否則植株極易感染蟲及病而致死，所以採用 PBCM 的栽培方法。塑膠袋栽培法已經被應用於臺灣金線連的栽培(圖 3-1)，應用此法栽培有以下幾項優點，可保護植株免於水分的散失，於栽培期中不需再行施肥及灌溉，且可減少病蟲害的危害及節省栽培管理所需之人力(Chang 及 Chou, 2007)。本研究首次利用塑膠袋栽培法於三個不同海拔高度處，大量種植臺灣金線連，其成活率均在 80%以上，和一般栽培於溫室的植株需密集噴藥，若 3-4 個月不進行噴藥，即可能全軍覆沒相較，塑膠袋栽培法為一快速生產大量，安全無農藥殘餘金線連之方法。因本研究結果最近已證實，由臺北醫學大學鄭可大教授主導，利用塑膠袋栽培法技術(plastic bag cultivation method, 簡稱 PBCM)實際推廣至五峰地區，應用於大量及周年生產之商業栽培，栽種的植株超過 100,000 株，成活率也達 90%以上。

臺灣金線連於不同生長地區之蘭菌接種試驗

以塑膠袋栽培法及接種絲核菌屬蘭菌(R02 及 R04)，於二不同品系金線連出瓶苗(B 及 R 品系)，分別放置到新竹五峰工作站(海拔約 1,000 公尺)，新店獅仔頭山(海拔約 500 公尺)及臺大溫室(海拔約 10 公尺)中，7 個月後以放置於新竹五峰工作站的臺灣金線連植株生長得最好，量測之葉數、鮮重及葉綠素讀值等數值均較高(圖 3-2、3-3、3-4)，其中有接種蘭菌(R02 及 R04)的處理之植株，又比對照組的植株生長良好，B 及 R 品系則分別以接種 R04 及 R02 具較重的鮮重(圖 3-2、3-3)，由此可知接種蘭菌，對不同品系植株生長反應，會有生長上的差異，但若與對照組比較，皆具有明顯促進植株生長與發育的效果。由圖 3-2 及圖 3-3 的結果顯示，無論種植於臺大、新店或五峰，均以接種蘭菌之植株所測得鮮重之數值較高，其中株高以種植於臺大及新店的植株較高，但在鮮重上卻以種植於五峰者較重，由植

株的外表觀察，生長於五峰之植株，節與節之間的節間較短，但莖徑較粗，而生長於臺大溫室與新店的植株，則是節與節之間的節間較長，但莖徑較細。而鮮重以種植於五峰之植株較重，推測其可能原因為臺大溫室及新店之溫度分別約 32/25°C、27/22°C，五峰之溫度約為 22/18°C，對照栽培於人工氣候室溫度控制在 20/15°C 下的臺灣金線連植株生長較慢，節間較短但莖徑較粗，溫度控制在 30/25°C 下的植株較高，莖徑較細(unpublish data)，則可得知以生長於五峰的植株鮮重較重乃受溫度所影響，由圖 3-2 及圖 3-3 亦顯示，B 及 R 品系之臺灣金線連，其鮮重隨海拔增高，栽培溫度下降而增高，足見溫度為臺灣金線連生長之重大影響因子。

結果顯示臺灣金線連適合生長在海拔較高，溫度較低，日夜溫差較大之環境。臺灣金線連 C 及 T 品系接種絲核菌屬蘭菌 R02 或 R04，可顯著促進植物的生長(Chang 氏等, 2007)，本試驗選用另外兩種不同的品系，B 及 R 品系，並接種絲核菌屬蘭菌 R02 或 R04，同樣得到促進生長的效果；推測臺灣金線連接種蘭菌後，能夠顯著促進種苗生長及移植出瓶後的生長勢，可能是因為蘭菌可顯著增加根的吸收面積，促進養分及水分的吸收；增加葉綠素含量(朱, 2000；張, 2000；周, 2004；陳, 2005)，並進而促進光合作用效率；本試驗部份接種蘭菌的臺灣金線連植株其葉綠素讀值較對照組高(圖 3-4)，但其數值與鮮重之量測數值相對照，並未呈正相關，乃因生長受多種因子所影響。

抗氧化能力分析

總酚類含量之分析比較

多酚類化合物普遍存於植物中，主要為植物的二次代謝產物，常被當作植物抗氧化力的指標(Castelluccio 氏等, 1995)，B 品系總酚類化合物測得的含量，以種植於五峰地區之各處理含量較高，未接種蘭菌處理之對照組(non mycorrhizal control; NM)及分別接種 R02、R04 等各處理其含量分別為 5.44 mg/g、5.14 mg/g、5.03 mg/g，接種蘭菌的處理並未具提高總酚類含量之效果(圖 3-5A)。但是種植於臺大及新店地區接種蘭菌處理之總酚類含量均較未接種蘭菌之處理為高(圖

3-5A)。R 品系接種 R04 者，其放置於臺大、新店及五峰等地區所測得之總酚類量數值相近分別為 4.04 mg/g、3.91 mg/g、4.07 mg/g；種植於臺大及五峰地區之未接種及接種蘭菌 R02 之處理所測得之總酚類含量較高，且以接種 R02 有較高的總酚類含量(依次為 5.06 mg/g 及 4.96 mg/g)；至於為何種植於新店地區測得的總酚類含量較低，推測可能是受光度所影響(Cronin 氏等, 2003)，因為新店地區所放置的地點為參試三個地點中光線最弱之處。考慮植株生長較快的稀釋效應，將測得的總酚類含量換算以株為單位如圖 3-5B，顯示兩不同品系金線連(B 及 R)各處理均以種植於五峰地區之總酚類含量較高，且大部份接種蘭菌的處理均較未接種的處理含量高，前人之研究報告指出，植物生長之環境因子會影響其酚類化合物的種類及含量 (Dumas 氏等, 2003; Roussos 氏等, 2007)，本試驗結果顯示較冷涼之五峰地區為適合臺灣金線連生長之環境，其測得之總酚類含量也較高。

抗氧化能力之測定

預備試驗中以 TEAC、FRAP 及 DPPH 等三種方法進行臺灣金線連抗氧化能力的測定，選定 TEAC 測定法為本次實驗進行抗氧化能力的測定方法，因其試驗數據較為穩定且菌根植株與非菌根植株之間其讀值表現出較大的差異。由圖 3-6 的結果顯示，B 品系臺灣金線連植株放置於臺大及新店其 TEAC 的量均以接種蘭菌者較未接種蘭菌者高。R 品系臺灣金線連植株放置於臺大及五峰以接種 R02 有較高的 TEAC 數值。前人研究指出臺灣金線連之抽出物具去自由基之功能(Wang 氏等, 2002)；加臺灣金線連處理過的 HepG22 細胞對自由基、過氧化氫有比較強的清償能力，可有效維持抗氧化能力(謝, 2001)；臺灣金線連含有多種抗氧化酵素，包括 SOD、catalase、peroxidase、ascorbate peroxidase (王, 1999)；周於 2004 年以臺灣金線連接種蘭菌之菌根植株，以根、莖及葉進行酵素活性與成分分析，植株同時具有過氧化酶、酸性磷酸酶及 CuZnSOD 與 MnSOD 二種超氧歧化酶，另外測定 SOD、多醣、多酚類化合物、維生素 C 及磷酸根離子含量分析，接種蘭菌皆較未接種者具有較高之含量，亦表示接種蘭菌之植株具有較高之抗氧化能力。本試驗

結果顯示，B 品系臺灣金線連植株放置於臺大及新店其 TEAC 的量均以接種蘭菌者較未接種蘭菌者高。R 品系放置於臺大、五峰以接種 R02 有較高的 TEAC 數值。表示於不同環境中接種適當蘭菌之臺灣金線連植株其抗氧化能力均較高。

保肝成分分析

前人研究結果顯示臺灣金線連具有保肝的成分與效用，臺灣金線連之乙酸乙酯(EtOAc)之萃取物可降低肝細胞之 GOT、GPT 濃度，提升 glutathione 量，並降低肝細胞脂質過氧化產物 malondialdehyde (MDA)之量，顯示金線連確實具有解毒及抑制肝細胞被過氧化的保肝效果(顏氏等, 1999)；臺灣金線連能顯著降低 CCl₄ 所引起之麩氨酸草醋酸轉氨基酵素(glutamic oxaloacetic transaminase, 簡稱 GOT) 及 GP-轉胺基酵素(glutamic pyruvic transaminase, 簡稱 GPT)急速上升，具有保肝效果(林氏等, 1991)；在大白鼠活體肝臟保護研究中，金線連之乙酸乙酯層可以對抗對位乙烯胺基酚和 D-半乳糖氨(D-Galactosamine)誘發大白鼠急性肝損傷，除了降低血清中的轉胺基酵素(GOT 及 GTP)濃度外，並降低肝細胞脂質過氧化產物 malondialdehyde (MDA)之量，具有實質之肝細胞保護效果，故金線連之乙酸乙酯層亦具有最強之抗脂質過氧化、清除超氧自由基及肝細胞保護效果(黃, 2000)；利用肝癌細胞 HepG2、Hep3B、Mal5、SK 進行實驗，結果顯示在分化良好的 HepG2 細胞株中對臺灣金線連的反應特別好，在 10 μ g/mL 濃度下即有抑制近 50%生長率的效果(謝, 2002)，本研究經初步試驗，接種蘭菌可以提高臺灣金線連保肝活性成分金線連苷 AFEE 之含量，種植於臺大的 B 品系及 R 品系臺灣金線連接種 R02 及 R04，每克所含 AFEE 的量均較未接種蘭菌的對照組高，其中 B 品系臺灣金線連接種 R02 及 R04，每克所含 AFEE 的量為未接種蘭菌的對照組之 2 倍以上(表 3-1)。而種植於較高海拔五峰之臺灣金線連，AFEE 之含量並未因接種而提高，可能接種蘭菌對 AFEE 合成之影響與溫度有關。

本試驗結果顯示，接種蘭菌可有效促進臺灣金線連生長，並提高藥效相關之成分與作用活性，如提高保肝成分 AFEE 之含量及抗氧化活性。

結論

本研究結果顯示利用塑膠袋栽培法可以在不施用化學農藥的情況下大量繁殖臺灣金線連。將試驗材料接種與不接種蘭菌之臺灣金線連植株放置於臺大、新店、五峰等三種不同海拔高度進行測試，結果顯示臺灣金線連最適合生長在海拔較高，溫度較低，日夜溫差較大之五峰地區。臺灣金線連接種絲核菌屬蘭菌可顯著促進生長，但不同品種及不同生長環境其促進生長的最適菌種也有所不同。臺灣金線連之總酚類含量及抗氧化能力之測試與保肝成分 AFEE 分析的結果顯示，臺灣金線連抗氧化能力及保肝成分 AFEE 之含量，受環境、品系及蘭菌種類的影響，本試驗結果顯示溫度及光度是影響臺灣金線連植株生長與藥效的重要環境因子，於不同環境中接種適當絲核菌屬蘭菌，其菌根植株可較非菌根植株含有較多的總酚類含量、較佳的抗氧化能力及較多的保肝成分 AFEE 含量，可以推測野生臺灣金線連植株受野外蘭菌感染為菌根植株，而較一般溫室栽培之植株更具藥效。目前在臺灣民間，野生金線連一斤賣價約六千元至一萬多元，且經調查後幾乎全屬菌根植株，而人工栽培者則在三千元左右，故栽培金線連時接種蘭菌之植株其藥效成分將與野生金線連相近，值得業者應用。依據本實驗結果，建議可利用塑膠袋栽培法大量生產無農藥的臺灣金線連，臺灣適合生長金線連的環境為海拔 1,000 公尺左右，光合光子通量 PPF 為 $55-60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右的地區，接種絲核菌 R02 或 R04，可以增加臺灣金線連抗氧化能力及保肝成分而增進其藥效。

參考文獻

- 王淑君. 1999. 臺灣金線連抗氧化酵素之研究。國立臺灣大學藥學研究所碩士論文, 82 頁。
- 朱俊南. 2000. 蘭花菌根菌之分離與接種對文心蘭幼苗生長之影響。屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文, 101 頁。
- 李國基. 2001. 臺灣金線連與蘭菌之鑑定及生產技術改進。國立臺灣大學藥學研究所博士論文, 191 頁。
- 周玲勤. 2004. 臺灣金線連、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與培育。國立臺灣大學園藝研究所博士論文, 169 頁。
- 林哲民、林俊清、吳佩珊、邱慧芬、李興進. 1991. 臺灣生藥金線連、靈芝、絞股藍之抗炎症及保肝作用研究。藥用保健植物研討會專輯, 89-98 頁。
- 張淑芬. 1999. 金線連基腐病與莖腐病之綜合防治。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文, 100 頁。
- 張喜寧. 2003. 蘭菌的量產與應用。農業生物技術國家型研發應用計畫第二年期末報告。
- 陳孟妘. 2005. 環境因子蘭菌與植物生長物質對帶花梗蝴蝶蘭貯運後生長及開花品質之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 127 頁。
- 黃大峰. 2000. 金線連及苧麻屬植物之保肝活性機轉研究。高雄醫學大學天然藥物研究所碩士論文, 95 頁。
- 謝俊生. 2002. 臺灣金線連抑制肝癌細胞生長抗氧化機制的探討。中國醫藥學院醫學研究所碩士論文, 69 頁。
- 顏銘宏、黃大峰、王芬郁、洪文俊、林俊清. 1999. 臺灣產生藥金線連之保肝、抗脂質過氧化及清除自由基之體外及體內活性研究。中國藥學會年會暨藥學學術研討會論文。
- Arnao, M. B., A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, and M. Acosta. 1996.

Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* 236:255-261.

Castelluccio, C., G. Paganga, N. Melikian, G. Bolwell, J. Pridham, J. Sampson, and C.

A. Rice-Evans. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 368:188-192.

Chang, D. C. N. 2008. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their

Applications. In: W. H. Chen and H. H. Chen (eds), *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Joh Tuck Link, Singapore, pp.77-98.

Chang, D. C. N. and L. C. Chou. 2007. Growth responses, enzyme activities, and

component changes as influenced by *Rhizoctonia* orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Bot. Stud.* 48:445-451.

Chang, D. C. N., L. C. Chou, and G. C. Lee. 2007. New cultivation methods for

Anoectochilus formosanus Hayata. *Orchid Sci. Biotechnol.* 1:56-60.

Cronin, G. and D. M. Lodge. 2003. Effects of light and nutrient availability on the

growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia* 137:32-41.

Dumas, Y., M. Dadomo, G. D. Lucca, and P. Grolier. 2003. Effects of environmental

factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomato. J. Sci. Food Agric. 83:369-382.

Kujala, T. S., J. M. Loponen, K. D. Klika, and K. Pihlaja. 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. J. Agric. Food Chem. 48:5338-5342.

Lin, W. C. 2007. Study of health keeping effects of *Anoectochilus formosana* Hayata. Agric. World 288:8-13.

Ma, F. Z. Li, M. Zhang, S. Jiang and Y. Xiao. 2010. Light Intensity Affects Growth, Photosynthetic Capability, and Total Flavonoid Accumulation of *Anoectochilus* Plants. Hortic. Sci. 45(6) : 863-867.

Roussos, P. A., A. Matsoukis, C. A. Pontikis, and A. Chronopoulou-Sereli. 2007. Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants. Sci. Hortic. 113:100-102.

Wang, S. Y., Y. H. Kuo, H. N. Chang, P. L. Kang, H. S. Tsay, K. Lin, N. S. Yang, and L. F. Shyur. 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. J. Agric. Food Chem. 50:1859-1865.

Wu, J. B., W. L. Lin, C. C. Hsieh, H. Y. Ho, H. S. Tsay, and W. C. Lin. 2007. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*.

Phytother. Res. 21:58-61.

Wu, K. B. 2007. The use and potential for *Anoectochilus formosanus* Hayata. Agric.

World 288:14-19.

Yen, D. M., S. C. Chen, and C. T. Liao. 1996. The art for propagation of Jin-Shiann

Lian. Dong-Kung Farmer Association Published, 294 pp.



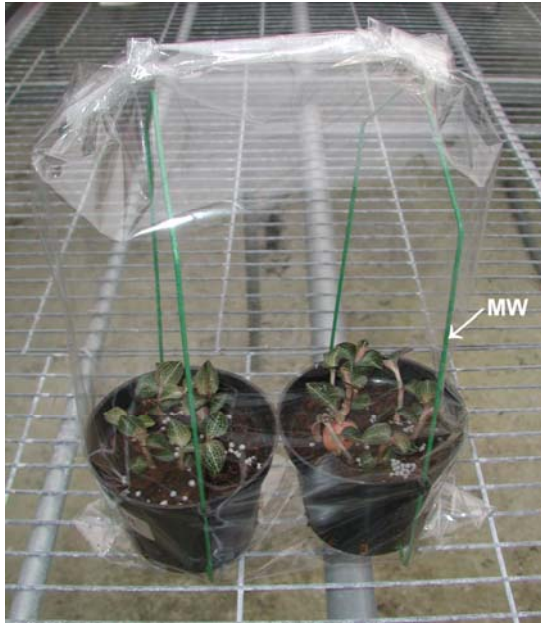


圖 3-1. 臺灣金線連塑膠袋栽培法。
鐵絲支撐著塑膠袋，可防放於野地時塑膠袋塌陷。

Fig. 3-1. Plastic bag cultivation method (PBCM) for *Anoectochilus formosanus* Hayata.
The metal wire (MW) could prevent the collapse of plastic bag in the wildness.

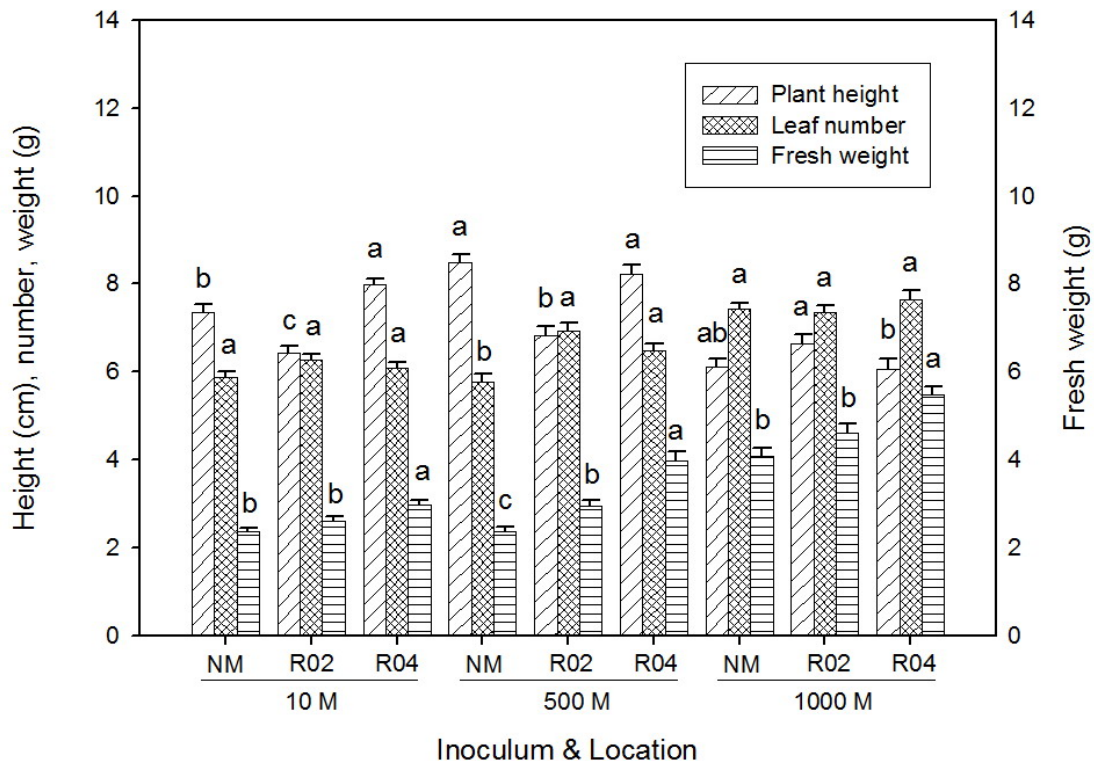


圖 3-2. 利用塑膠袋栽培法種植接種與未接種蘭菌之臺灣金線連品系(B)置於臺大(10公尺)、新店(500公尺)及新竹五峰(1000公尺)生長七個月之生育情況。

Fig. 3-2. Growth of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoctochilus formosanus* Hayata (line B) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (NTU, 10 m of elevation), Xindian (500 m) and Hsinchu Wufong (1000 m) for seven months.

Each treatment had 50 replicates.

Different letter (a-c) on bar means significant difference at 5% as determined by ANOVA test.

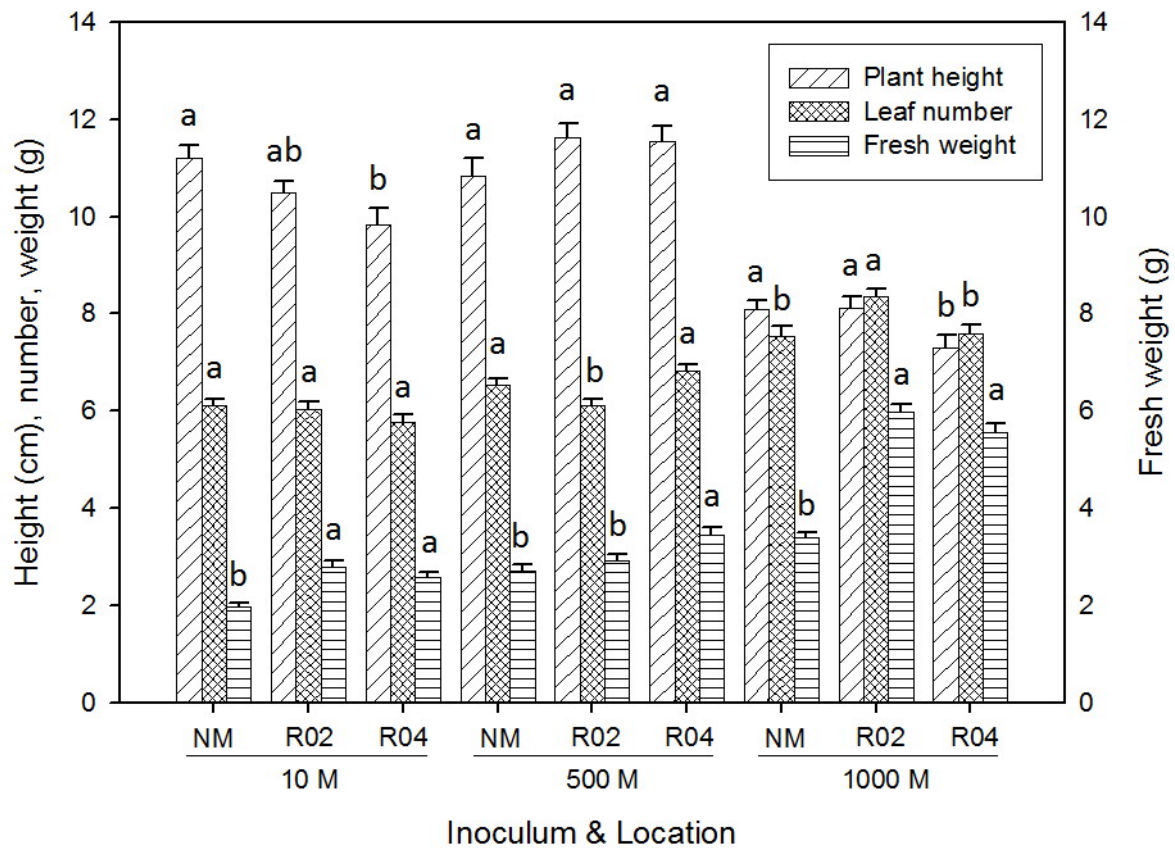


圖 3-3. 利用塑膠袋栽培法種植接種與未接種蘭菌之臺灣金線連品系(R)置於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)及新竹五峰(1000 公尺)生長七個月之生育情況。

Fig. 3-3. Growth of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoectochilus formosanus* Haytat (line R) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (NTU, 10 m of elevation), Xindian (500 m) and Hsinchu Wufong (1000 m) for seven months.

Each treatment had 50 replicates.

Different letter (a-c) on bar means significant difference at 5% as determined by ANOVA test.

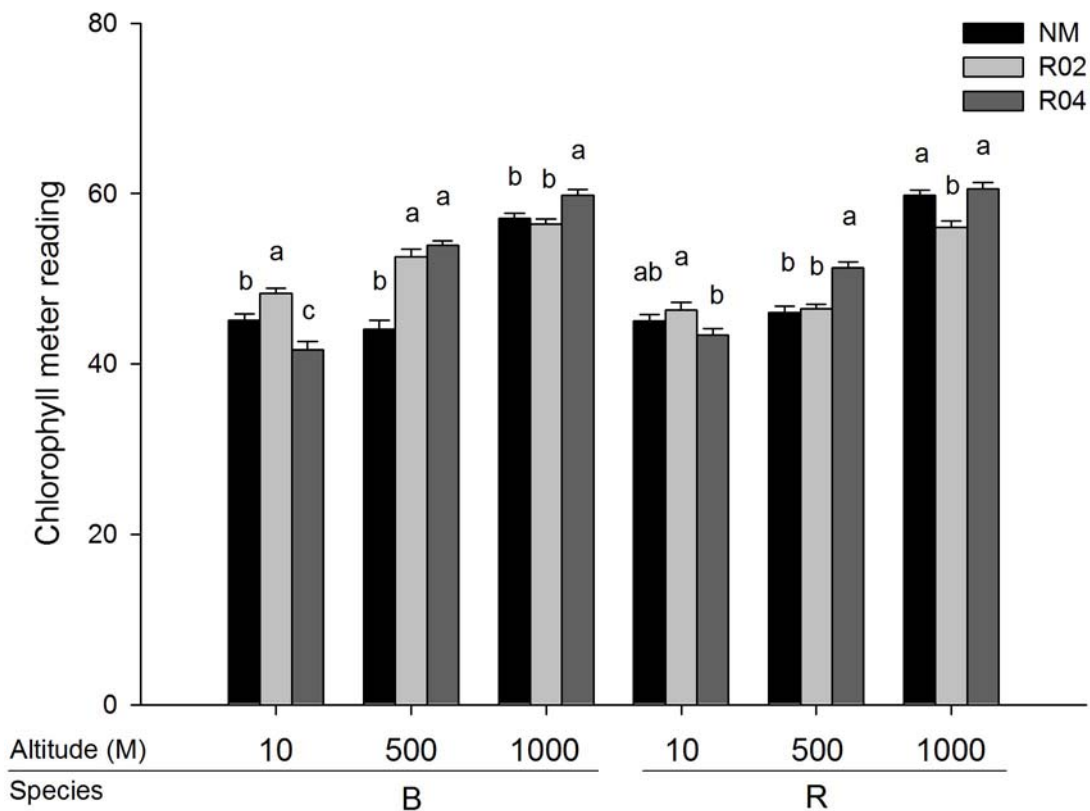


圖 3-4. 利用塑膠袋栽培法種植接種及未接種蘭菌之臺灣金線連品系(B 及 R) 置於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)及新竹五峰(1000 公尺)生長七個月之葉綠素讀值(CMR 值)。

Fig. 3-4. Chlorophyll meter reading value of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoectochilus formosanus* Hayata (line B and line R) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (10 m of elevation), Xindian (500 m) and Hsinchu Wufong (1000 m) for seven months.

Each treatment had 50 replicates.

Different letter (a-c) on bar means significant difference at 5% as determined by ANOVA Test.

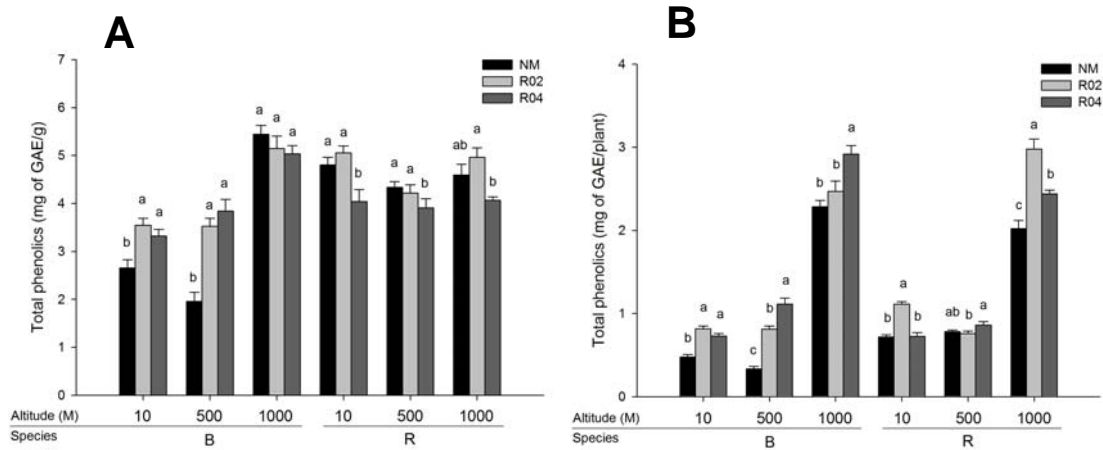


圖 3-5. 兩不同品系臺灣金線連(B 及 R)接種兩種不同的蘭菌 (R02 及 R04), 生長於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)、新竹五峰(1000 公尺)七個月後酚類化合物含量之變化。A. 每克所含酚類化合物含量。B. 每株所含酚類化合物含量。

Fig. 3-5. Changes of phenolic compounds level of two lines of *Anoectochilus formosanus* Hayata (B and R) inoculated with *Rhizoctonia* sp. R02 and R04 in the bag culture at National Taiwan University (10 m of elevation), Xindian (500 m) and Hsinchu Wufong (1000 m) for seven months. A, level of phenolic compounds per gram. B, level of phenolic compounds per plant. Each treatment had 6 replicates. Different letter (a-c) on bar means significant difference at 5% as determined by ANOVA test.

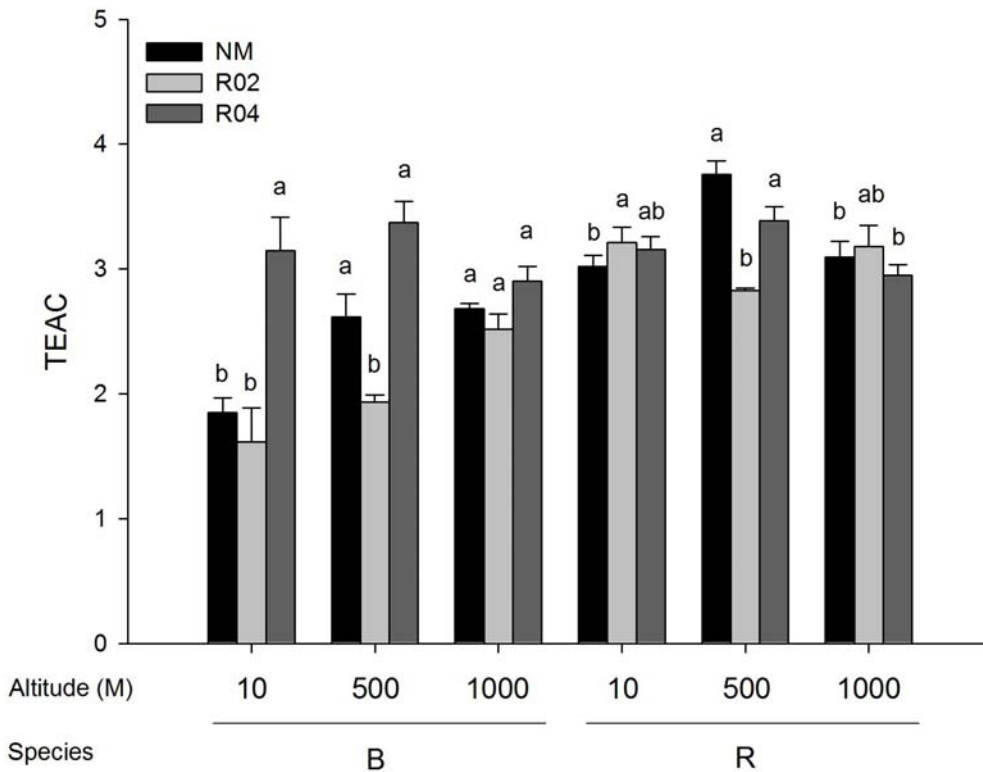


圖 3-6. 兩不同品系臺灣金線連(B 及 R)接種兩種不同的蘭菌(R02 及 R04)，生長於臺大(10 公尺)、新店(500 公尺)、新竹五峰(1,000 公尺)，七個月後 TEAC 數值(測抗氧化能力用)之分析。

Fig. 3-6. The analyses of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values (to measure antioxidant capacity) for two lines of *Anoectochilus formosanus* Hayata inoculated with *Rhizoctonia* sp. R02 and R04 and cultivated at NTU (10 m of elevation), Xindian (500 m) and Hsinchu Wufong (1,000 m), for seven months.

Each treatment had 6 replicates.

Different letter (a-c) on bar means significant difference at 5% as determined by LSD test.

表 3-1. 培養於臺大7個月之菌根與非菌根臺灣金線連植株其保肝活性成分金線連苷 AFEE 之分析。

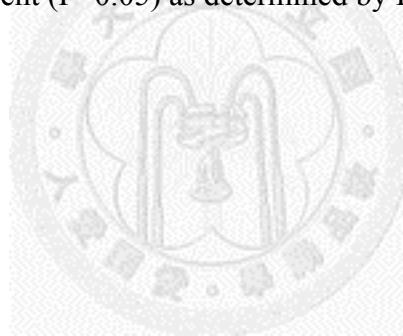
Table 3-1. The analysis of hepatoprotective activity of kinsenoside (AFEE) derived from mycorrhizal and non-mycorrhizal *Anoectochilus formosanus* Hayata plants cultivated at NTU campus for seven months.

cultivar	<i>Rhizoctonia</i> inoculum	AFEE(g/g)
B	NM	0.0174±0.0003 b
	R02	0.0417±0.0011 a
	R04	0.0400±0.0019 a
R	NM	0.0126±0.0004 c
	R02	0.0242±0.0029 a
	R04	0.0191±0.0025 b

NM: non-mycorrhizal control group.

Three replicates were conducted for each treatment.

Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.



Abstract

Two micropropagated lines, B and R, of *Anoectochilus formosanus* Hayata, were separately inoculated with orchid mycorrhizal fungi (OMF), *Rhizoctonia* sp. R02 [a bi-nucleated isolate of *Rhizoctonia* sp. (*Ceratobasidium* sp. AG-A)] and R04 [a multi-nuclei isolate of *Rhizoctonia solani*, AG-6], and grown by plastic bag cultivation method (PBCM) at three elevations above sea level, including National Taiwan University (NTU, 10 m elevation), Xindian (500 m elevation) and Wufong (1,000 m elevation) for seven months. Results showed that the survival rates for *ex vitro* growth were more than 80%, and plant production was significantly increased and there was no need to apply any agrichemical. If this orchid was not grown by PBCM, then after 3-4 months of cultivation, all plants would die, if pesticide or fungicide were not sprayed for every one or two weeks in greenhouse, and the cultivation period was shortened to 1-2 months compared with traditional cultured method. Plants grew in Wufong achieved the best growth performance among three elevations. The fresh weight of mycorrhizal *A. formosanus* was significantly higher than the non-mycorrhizal (NM) control. In Wufong, R04 showed better growth-enhanced effect on line B, while R02 stimulated growth enhancement for line R. For both lines of *A. formosanus* cultivated at National Taiwan University (NTU), R02 inoculated plants contained higher level of phenolic compounds and hepatoprotective agent AFEE (*A. formosanus*

extraction with ethyl acetate) compared with the non-mycorrhizal (NM) control. Analyses and measurements of antioxidant capacity by Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) showed that most of the antioxidant index of mycorrhizal plants were significantly higher than the non-mycorrhizal control. PBCM was proven to be a very labour saving, i.e. this cultural method can save all the human cost of irrigation and fertilization during the rest of cultivation period, and this is an effective method for mass production of agrichemical free *A. formosanus* plants. Inoculation of orchid mycorrhizal fungi such as R02 or R04 can significantly increase the production of this orchid with higher antioxidant capacity and hepatoprotective agent content for medicinal use.

Keywords: *Anoectochilus formosanus*, plastic bag cultivation method, *Rhizoctonia*, antioxidant capacity, hepatoprotective agent

第四章 絲核菌共生影響綫草種子發芽、構造變化與開花

摘要

綫草種子接種發芽實驗結果顯示，可促進綫草種子發芽的絲核菌屬蘭菌，包括 R01(*Rhizoctonia solani* Kuhn), R02(*Ceratobasidium* sp. AG-A), R15(*Ceratobasidium* sp. AG-Fb), R16(*Ceratobasidium* sp. AG-Fb), R17(*Rhizoctonia* sp. AG-G), R20(*Rhizoctonia* sp.)及 R22(*Rhizoctonia* sp. AG-G)等七種蘭菌菌種，其中以接種新菌種 R02 (未發表資料)之燕麥培養基(OMA)，其促進發芽之效果最好，也最穩定，接種蘭菌 R02 處理者，播種後 15 天可發芽，較無菌播種者(播種後 75 天才發芽)，約可提早 2 個月發芽。接種 R02 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)，可促進綫草種子發芽，並提高發芽率；播種於先行接種 R02 15 天之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)，播種前刮除菌絲，可以促進綫草種子發芽，40 天後提高發芽率達 80.2%，未刮除菌絲者，發芽率僅有 11.2%，而未接種者，發芽率為 0%，種子貯放於 4°C 的冰箱內一年，仍具 75%以上之發芽率，一年四季均可利用成熟種子，進行瓶外共生種子發芽，大量生產綫草種苗，以上方法已證實可供業者做大量繁殖之用，將有助於綫草在野地的復育。利用光學顯微鏡、掃描式電子顯微鏡及共軛焦顯微鏡，觀察到受蘭菌感染之綫草種子，其菌絲穿破種皮及原球體的皮層細胞內佈滿菌絲團塊，其感染模式屬於菌球消化型，無菌播種發芽的原球體無菌絲感染，於皮層細胞內則充滿澱粉粒。將泥炭土與椰纖 2：1 體積比例，充分混合做為介質，種植綫草三個月，有最高的成活率 100%，及較佳的營養生長；20/15°C 之溫度處理下，以接種 R02 所需到花日數最短，於不同溫度處理 86 天後移到簡易塑膠溫室，平均 59 天後第一朵花開放，較其他各處理均提早 10 天以上開花；綫草於不同溫度處理 86 天後，移往簡易溫室 120 天觀察及測量其生育狀況，於四種不同溫度處理下之營養生長，其中均以接種 R15 (*Ceratobasidium* sp. AG-Fb)可促進地上部的生長，具較多的葉數，接種 R19 則可促進地下部的生長，具較多的根數及較重的根鮮重；15/13°C 下以接種蘭菌 R15，

每株的花梗數最多(7.2 枝)；於 20/15°C 下以接種蘭菌 R19 (*Ceratodasidium* sp. AG-G)，每株的花梗數最多(8.8 枝)；花穗也最長(16.9 公分)。故建議接種 R02 可促進綬草種子發芽，可為業者利用做為大量生產綬草種苗之法，接種蘭菌 R15 及 R19 可促進營養生長，利用 20/15°C 之溫度促使綬草開花，配合接種蘭菌 R19 可得最佳的生殖生長，接種 R02 則可提早開花。本研究結果得知種植綬草之介質，以泥炭土加椰纖 2:1 體積比例混合之介質較佳，並證實綬草的花芽分化需經低溫之春化作用，所需春化作用之臨界溫度約為 20°C，且低溫處理後，必需再經較高溫處(25/20°C)處理，才能促使花芽發育及花梗抽長，也就是必須要有二階段的溫度感受。接種絲核菌屬蘭菌(R02、R15、R19)可促進綬草之營養與生殖生長，具推廣應用潛能。

關鍵詞：綬草、絲核菌、溫度、發芽、生殖生長



前言

綬草〔*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames 〕在中國大陸、西伯利亞、朝鮮、日本、琉球、印度、東南亞及澳洲均有分布(邱及張, 1998)，本省主要生長於海拔 1,000 公尺以下之平原、山坡地(Leou, 2000)，為兼具觀賞與藥用價值之蘭科植物(Lin 氏等, 2000、2001; 余和陳, 2004)，雖然植株外表形態有如禾本科之雜草不易辨識，但每逢四至五月，螺旋狀排列之白色或粉紅色小花由下而上陸續綻放，頗具觀賞價值；又因其為本省民間常利用之藥用植物，全草有滋腎壯陽，補陰虛，強筋骨，益陰清熱，潤肺止咳，涼血活血，健脾胃之效，治咽喉腫痛、頭暈、腦膜炎、腎臟炎、糖尿病等症(邱及張, 1998)，最近的研究亦指出綬草植株於抗氧化能力表現極佳，可以提供未來化妝品開發應用的參考原料(梁氏等, 2012)。因而常常遭受愛蘭者與採藥者的採集與挖掘，其原棲地的生態環境也常因人們的開墾而遭破壞，使得綬草的族群數量逐漸銳減當中，相關的維繫與保育措施，實應予以

重視。

綬草開花授粉至種子成熟，平均不超過 15 天(劉氏等, 2001)，種子不具胚乳，由未分化的胚和薄膜狀的種皮構成(李, 1990)，在自然環境下發芽屬異營性，需要共生菌幫助製造養分，才能順利發芽，否則平均發芽率極低(劉氏等, 2001)。綬草未成熟種子，無菌培養一個月後，大多已發芽(70-80%)，實生苗生長整齊旺盛。果莢成熟開裂後，種子顏色轉為咖啡色，此時種子的休眠性變深，種子不易發芽(劉氏等, 2001)。

目前國內已有民間業者以種子進行人工田間播種繁殖，但發芽率不高(王, 2004)。研究機構則有國立自然科學博物館(張氏等, 2003)、生物技術開發中心(劉氏等, 2001)、及花蓮區農業改良場(余和陳, 2001; 王, 2004; 陳, 2010)等單位，針對綬草進行微體繁殖、無菌播種等大量繁殖的相關研究，雖具初步成果，在經濟栽培的原則上，仍有其改進之空間。有關蘭菌促進綬草種子發芽的相關研究成果也已相繼被報導(Tsutsumi 及 Tomita, 1986、1988; Masuhara 及 Katsuya, 1989、1994; Masuhara 氏等, 1993; Zelmer 及 Cueeah, 1997; Uetake 及 Peterson, 1997、1998; Stewart 及 Kane, 2007)，其中包括綬草種子與蘭菌共生後，促進發芽並發育成原球體(Tsutsumi 及 Tomita, 1986; Uetake 及 Peterson, 1997、1998; Stewart 及 Kane, 2007)及其原球體內部之構造如肌動蛋白絲(actin filament)及微管(microtubules)的變化(Uetake 及 Peterson, 1997、1998)等，但是有關綬草與蘭菌的共生關係，以不同的接種方式，進行瓶內外共生發芽測試，應用於大量繁殖的報告則不多見，且有關綬草經接種蘭共生真菌後，生長性狀及栽培條件之探討亦很少。本試驗乃利用本實驗室已研究多年，具穩定效果及至野外採集綬草植株分離得到之蘭菌種類，進行綬草種子瓶內外共生發芽試驗，以尋找促進發芽之最適菌種及方法，俾供快速且大量繁殖之利用。並藉由三種顯微鏡術觀察共生與非共生種子發芽成原球體，其種子表面及原球體內部構造之差異及變化。進一步尋找並探討，促進綬草生長之適合菌種及環境條件，俾利該物種之種原保存、復育及觀賞與藥用價值之推廣。

材料與方法

蘭共生菌菌種來源

由本實驗室前人所分離，並經多年試驗具穩定研究成果之 R01(*Rhizoctonia solani*)、R02(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-A)、R15(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-Fb)等三種菌種。及筆者自綫草新分離之 R16(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-Fb)、R17(*Rhizoctonia* sp. AG-G)、R20(*Rhizoctonia* sp.)、R22(*Rhizoctonia* sp. AG-G)等四種菌種(表 4-1)，並經致病性分析(Chang, 2008)均不具致病性；以上七種菌種均屬絲核菌屬蘭菌。蘭菌分離之方法如下：將綫草根洗淨，以 1%次氯酸鈉消毒 15 分鐘，置於無菌操作臺內，以無菌水清洗三次，切成約 0.5 公分之根段，放入 1/6 PDA 培養基，培養於 25-27°C 黑暗之環境，約 3-5 天，於根段周圍切取約 1x1mm² 之菌絲塊繼代至水洋菜(water agar)培養基，3-5 天後挑單菌絲至 PDA 培養基進行純化培養(Masuhara 及 Katsuya, 1989; Sneh 氏等, 1991; 王, 1999)。本計畫所使用及分離出之菌種，均已寄存在新竹食品科學研究所的菌種中心，及臺灣大學植物病理與微生物學系沈偉強教授實驗室。

瓶內共生發芽試驗

取授粉 12-14 天之未裂蒴果，以 70 %酒精擦拭表面，置入加有 1-2 滴 Tween 20 之 1 %次氯酸鈉約 10 分鐘，無菌水清洗 3 次，於無菌操作臺內將果莢取出，置於消毒的濾紙上晾乾，將果莢切開，並刮下種子播於含有培養基之試管內(劉氏等, 2001; 張氏等, 2003)，每個試管播種約 200-250 粒種子。培養基的配方分為三種：(1) HIT：每升中添加花寶一號 3 克、半量 MS 維生素、蛋白胍類 2 克、洋菜(Sigma, St. Louis, MO, USA) 8 克、蔗糖 10 克，調整 pH 值 5.8(劉氏等, 2001)。(2) 1/2 MS：每升中添加 1/2 MS 巨量元素、1 MS 微量元素及維生素、蛋白胍類 2 克、洋菜 8 克、蔗糖 10 克，調整 pH 值 5.8(王, 2004)；以上兩種為無菌播種培養基。(3) OMA(oat meal agar)：每升中添加 2.5 克燕麥、8 克洋菜及調整 pH 值 5.7(Chou 及 Chang, 2004)；OMA 為接種蘭菌的培養基，培養基斜面，分別進行接種 1mm²(約 0.2 克

重)之 R01、R02、R15、R16、R17、R20、R22 等菌絲塊蘭菌及不接種等處理，進行接種後再行播種；以 HIT 及 1/2MS 等二種培養基進行無菌播種以為雙重對照，接種及播種完成後，培養於 25°C 及 16 小時光照，8 小時黑暗之環境，定期觀察種子發芽情況並拍照記錄。

瓶外共生發芽試驗

PDA 培養基以高溫 (121°C) 高壓(1.2kg/cm²) 滅菌釜滅菌 20 分鐘，稍做冷卻後，在無菌操作臺分裝於直徑 9 公分的無菌塑膠培養皿中，於播種的 5 天、10 天、15 天之前，分別接種 3 塊約 1 mm² 之 R02、R15、R17 之菌絲塊及不接種等四種處理各四重複備用。將綫草種子播於各處理之培養基中，播種前需先將菌絲刮除，播種後培養於 25°C 及 16 小時光照，8 小時黑暗之環境。以解剖顯微鏡定期觀察種子發芽情況，並以數位相機拍照記錄。

三種顯微鏡術觀察原球體受蘭菌感染情形

綫草種子接種蘭菌後，約 15 天即可吸水膨大成白點狀的原球體。將原球體切成薄片，以 0.05 % 苯胺藍(aniline blue)染色(Koske 及 Gemma, 1989)，置於載玻片上，在光學顯微鏡(OLYMPUS BH-2)下觀察，同一樣品並於共軛焦顯微鏡(Leica TCS SP2)，在 488 nm 波長之穿透光及 543 nm 波長之激發光下觀察(Schelkle 氏等, 1996)。另以掃描式電子顯微鏡，觀察接菌與未接菌原球體外部菌絲侵入及內部感染情形與構造變化；將整粒及縱切之原球體放入 2.5% 戊二醛(glutaraldehyde)固定約 12 小時之後，經 50% 至 100%(每步驟遞升 5-10%)之丙酮系列脫水，以液態二氧化碳臨界點乾燥機(critical point dryer, CPD)進行乾燥後，將樣品黏貼於載臺上，放入 Biorad 離子覆膜機進行鍍金 90 秒，並於掃描式電子顯微鏡(ABT-60)進行觀察(Dawes, 1971; Uetake 氏等, 1992; Chou 及 Chang, 2004)。各種觀察結果，均以數位相機拍照記錄。

栽培介質、蘭菌及溫度和綫草之生育關係

本次試驗所採用之綫草瓶苗，係由生物技術開發中心所培育提供，苗株性狀

平均鮮重約 1.1 克。

一、介質試驗

綬草瓶苗出瓶並水洗後(將根部的洋菜培養基清洗乾淨)，種植於 3 吋白色塑膠盆中，介質分三種不同的處理，泥炭土、泥炭土加椰纖 2：1(v/v)、椰纖，每個處理五重複，每重複三株，每盆施用奧妙肥 14-14-14 (Scotts,美國) 2 克，每星期澆水一次，每二星期施液肥一次，初期施用 Peter's 30-10-10 (Scotts, Marysville, 美國) 500 ppm 液肥，後期施用 Peter's 10-30-20 500 ppm 液肥。

二、接種蘭菌及不同溫度處理試驗

將清洗完成之綬草瓶苗，以泥炭土為介質種植於 3 吋白色塑膠盆中，於種植時除對照組不接種蘭菌外，其他各處理分別接種絲核菌 R01、R02、R04、R15、R19(每株接種 0.7 克)，以上六種處理於出瓶 2 個月後，並分別放置於日/夜(15/13, 20/15, 25/20, 30/25)°C 等四種不同溫度的人工氣候室中進行實驗，每個溫度及每個接種蘭菌處理五重複，每重複三株，澆水施肥同介質試驗處理。

三、記錄項目

試驗結果之評估方式，記錄成活率，到花日數及葉數、葉長（每株量取三片最長的葉片平均）、根數、根鮮重、花梗數、花穗長、小花數（由預備試驗得知，第一枝花梗最長最具觀賞價值，所以以其為量測基準）。

結果與討論

瓶內共生發芽試驗

綬草種子無菌播種與接種七種絲核菌屬蘭菌(R01、R02、R15、R16、R17、R20、R22) 65 天後，其中分別接種七種不同蘭菌的處理均可促使種子發芽(圖 4-1)，可見促進綬草種子發芽的蘭菌種類不具專一性，和前人研究 *Spiranthes sinensis* var. *amoena* 在棲地與蘭菌(*Rhizoctonia repens* Bernard)共生具專一性，而在瓶內播種接種 *Rhizoctonia* spp.的發芽試驗中卻不具專一性之結果相同 (Masuhara 及 Katsuya,

1994; Stewart 及 Kane, 2007)，在所有菌種中，以接種 R02 效果最好也最穩定，播種後二個星期即可見發芽；而未接種蘭菌的處理 NM-OMA 及 NM-1/2MS(圖 4-1)則尚未發芽，播種於接種 R02 之 HIT 及 1/2MS(圖 4-1)培養基，種子均因受到快速且大量生長的菌絲包埋而無法發芽，前人研究指出，為了維持共生狀態，蘭科植物與蘭共生菌之營養狀況和生長勢，需達到某一程度之平衡(Arditti, 1967; Harvais 及 Hadley, 1967; Knudson, 1922)，所以接種蘭菌的培養基成分不能太營養，促進菌絲大量生長的培養基就不適用，接種蘭菌之種子發芽試驗必須慎選適當的培養基及接種量，才能達到促進種子發芽，提高發芽率及生長勢之功能。於播種後 80 天，評估各處理之發芽率，以接種 R02 的處理，平均發芽率最高為 86.4%。而做為雙重對照播種於未接種處理的 HIT 與 1/2MS 培養基，則於播種後 2.5 個月才見發芽，播種後 80 天，其發芽率分別為 11.8%及 19.2%(表 4-2)。接種蘭菌處理者較無菌播種者約可提早 2 個月發芽，且發芽率提高約 67.2-74.6%，而本次試驗結果顯示，接種蘭菌所產生的小苗無白化苗，可解決無菌繁殖常會產生白化苗之問題(張氏等, 2003)。

瓶外共生發芽試驗

取授粉 15-18 天已裂蒴果之種子，分別播於接種 R02、R15 及 R17 等三種不同菌種之預接種 5 天、10 天、15 天之 PDA 培養基，15 天後其大多數種子均已吸水膨大成白點狀之原球體前期。在解剖顯微鏡下，已可清楚的看出原球體成圓錐形，一端圓形，另一端尖形，且原球體外表已著生有吸收毛，1 個月後圓端除了繼續膨大之外，慢慢開始變綠長出芽點，尖端則繼續長出更多的吸收毛，之後慢慢長成小苗；於播種後 40 天觀察並計數各種處理之發芽率，以接種蘭菌 R02 之發芽率最高，種子之發芽及發育也較為整齊(圖 4-2A、圖 4-2B)，R15 次之，R17 最低，其總平均的發芽率依序為 69.4%、34.4%、15.4%(表 4-3)達顯著差異。瓶外共生發芽採用授粉 15-18 天之開裂蒴果種子，接種 R02 菌種，可促進種子發芽並提高發芽率，而無菌播種的種子，則需取材授粉後 12-14 天的未裂蒴果(劉氏等, 2001)，

未裂蒴果因含較多水分保存不易，蒴果採收後必需儘快完成播種，而若採用授粉後 15-18 天已裂蒴果種子，必須進行種子消毒，且種子休眠性強、發芽不易。而本實驗利用瓶外共生發芽方式，則可打破種子之休眠，令成熟種子快速發芽，而成熟種子適當處理，保存時間可延長，貯放於 4°C 的冰箱內一年，仍具 75% 以上之發芽率(未發表資料)，於不是果莢成熟季節，亦可利用成熟種子播種，一年四季均可利用瓶外共生種子發芽的方式，大量生產綫草種苗；整個播種過程，不必在無菌狀態下操作，不用擔心播種後的污染問題，因為培養基已覆蓋上很多的菌絲(播種前需將菌絲刮除)，方法簡便易學，適合推廣給農民；和組織培養無菌播種的方式相較，更可減少相當的人力、物力及財力。

接種 R02 菌種之處理，以播種於接種 15 天的培養基之發芽率最高為 80.2%，其次則為接種後 10 天(73.2%)及 5 天(54.8%)者，其中接種 15 天及 10 天的處理，其發芽率顯著高於接種 5 天者，表示 R02 的菌種必需接種 10 天以上，促進種子發芽的效率才可提高。接種蘭菌 R15 則以預接種 5 天者，發芽率最高為 46.9%，其次為接種 10 天(42.2%)及 15 天(14.0%)者，表示 R15 預接種 5 天，種子發芽率即最佳，不因增加接種日數而提高發芽率；接種蘭菌 R17 之處理，其促進種子發芽的效果均不佳。本試驗中之對照組，由於未預先接種蘭菌，未發芽之前，培養基已遭黴菌感染，發芽率為零。接種三種菌種代碼 R02、R15、R17 之 PDA 蘭菌培養基中，最適播種的預接種日數，分別為 15 天、5 天、5 天，推測每種菌種最適發芽之預接種天數相異，乃因不同菌種菌絲生長活力不一，活力較強者，預接種日數需增長，活力較弱者，則需縮短預接種日數，才可促進發芽，也有可能是其代謝產物的種類及數量的不同，而有此變化。本試驗結果最適合綫草種子發芽的處理為菌種 R02，預接種 15 天的 PDA 培養基。瓶外共生發芽試驗，利用蘭菌的接種可提高種子發芽率，並促進發芽後之生長與發育，且不必經過繼代培養即可培育成小苗，進行移植。故利用瓶外共生方式來促使種子發芽，可做為另一種繁殖法，並可利用於測試不同菌種對不同蘭花種類種子發芽之影響，進行有效蘭菌之

初步篩選。

三種顯微鏡術觀察種子及原球體受蘭菌感染情況

以共軛焦顯微鏡觀察綬草共生發芽之情形，原球體皮層細胞內，受蘭菌感染形成的菌絲團，經 0.05% 苯胺藍(aniline blue)染色後，於共軛焦顯微鏡下觀察呈現草綠色的螢光反應，由圖 4-3A 顯示蘭菌菌絲沿著細胞壁之細胞間隙侵入種皮，可見蘭菌感染種皮，使部份種皮因為菌絲侵入而破裂，藉此提高水分及養分的吸收能力。前人研究指出蘭菌亦可提供種子，磷、碳源、維生素、礦物質、菸鹼酸及其他營養物質，供種子發芽後發育之所需(Smith, 1966; Arditti, 1967; Alexander 及 Hadley, 1984; Alexander 氏等, 1984; Hadley, 1984; Smith 氏等, 1994)。以光學顯微鏡觀察綬草原球體受蘭菌感染模式，播種感染一個半月後，圓球體橫切後經 0.05% 苯胺藍(aniline blue)染色後觀察，於圓球體皮層細胞形成很多菌絲團(圖 4-3B)，以同一樣品於共軛焦顯微鏡下觀察，菌絲團呈現草綠色的螢光反應(圖 4-3C)。比較無菌播種及接種蘭菌 R02 之 6 個月後苗株，接種蘭菌 R02 之原球體及苗株均較未接種者大(圖 4-3D)，接種蘭菌之原球體較未接種者大，可能接種蘭菌之原球體內部成分產生變化，增加原球體內之蛋白質、脂質及多醣的含量(Uetake 氏等, 1992; 周, 2004)。

本研究瓶內、外共生發芽試驗中，接種蘭菌處理者，其發芽均較無菌播種者早，蘭花種子接種蘭菌後，因可促進自由水的吸收而促進其發芽(Yoder 氏等, 2000)，以掃描式電子顯微鏡觀察綬草無菌播種與接種蘭菌共生發芽，原球體外部受蘭菌感染之情形，未接種蘭菌之原球體，只著生吸收毛但不被覆菌絲(圖 4-4A)，而接種蘭菌之原球體則除了著生吸收毛外，並被覆菌絲(圖 4-4B、4-4C、4-4D)，接種蘭菌的原球體，其表面所被覆的菌絲，可以增加水分吸收的面積而促進其發芽。菌絲從懸柄處侵入且其種皮被菌絲穿破(圖 4-4C、4-4D)，可能因此促進水分的吸收而加速種子發芽。以掃描式電子顯微鏡觀察綬草種子發芽至原球體，其內部受蘭菌感染之構造變化，於無菌播種發芽之原球體其皮層細胞內具澱粉粒(圖

4-5A、4-5B)，原球體受蘭菌感染，其內部皮層細胞形成菌絲團(圖 4-5C、4-5D、4-5E、4-5F)，於圖 4-5D、4-5E、4-5F，則可見原球體內部受菌絲感染，形成菌絲團之不同階段發育時期，由此可知蘭菌的感染造成原球體內部構造及成分的變化，而前人研究認為，蘭菌具有分解原球體內的物質包括澱粉、蛋白質等，增加原球體內蛋白質、脂質及多醣的含量，藉由這些含量的增加及改變，提供原球體生長所需之養分需求 (Uetake 氏等, 1992; 周, 2004)。

以光學顯微鏡、掃描式電子顯微鏡及共軛焦顯微鏡觀察綬草原球體與蘭菌共生的感染模式屬於菌球消化型。本研究結果以瓶內及瓶外共生的方式，均可有效促進綬草種子發芽，其中以接種絲核菌屬蘭菌 R02，促進種子發芽的效果最佳，可較未接種之無菌播種處理，提早 2 個月發芽。

栽培介質、蘭菌及溫度和綬草之生育關係

一、介質試驗

綬草分別種植於泥炭土、泥炭土加椰纖 2:1 體積比例、椰纖等三種不同的介質，於 3 個月後調查其成活率，結果以種植於泥炭土及泥炭土加椰纖，其成活率均達 100%，而種植於椰纖者則僅達 53.4%(圖 4-6)，種植 3 個月後觀察其營養生長情況，結果葉數及葉長也均以泥炭土及泥炭土加椰纖為介質者表現較佳，並達顯著差異，以泥炭土加椰纖為介質者有最多的葉數 (9.8 片)，葉的長度最長 (11.9 公分) (表 4-4)，建議種植綬草的介質採用泥炭土加椰纖 2:1 體積比混合介質，因為該介質兼具有良好的保水、保肥力及通氣性，所以種植效果表現較佳。

二、不同溫度處理及接種蘭菌試驗

綬草瓶苗出瓶分為不接種蘭菌及接種五種不同的蘭菌，共六種處理，出瓶定植 80 天後，分別放置於四種不同的溫度處理 3 個月(日/夜為 15/13、20/15、25/20、30/25 °C)，於 2005 年一月底移回自然溫度下的簡易塑膠溫室，結果於日夜溫 15/13、20/15 °C 等二種溫度，具誘導綬草開花之效果(圖 4-7)，綬草於不同溫度處理 3 個月後，移往簡易溫室 4 個月，觀察並測量其營養與生殖生長，在營養生長

部份，於四種不同溫度處理下，均表現出 R15 促進地上部的生長，均具較多的葉數，R19 促進地下部的生長，均具較多的根數及較重的根鮮重(表 4-5)。由此得知有益於綬草營養生長之蘭菌菌種，其地上部及地下部分屬於不同的菌種，而促進綬草種子發芽，具最佳效果的蘭菌種類也不一樣，是為 R02。在生殖生長部份，於 15/13°C 下以接種蘭菌 R15 效果較佳，每株的花梗數最多(7.2 枝)；於 20/15°C 下以接種蘭菌 R19 效果較佳，每株的花梗數最多(8.8 枝)，花穗也最長(16.9 公分)；於 25/20°C 下接種 R19 具有最多花梗數(4.5 枝)、最長的花穗長(13.5 公分)及花穗具最多的花朵數(36.5 朵)；30/25°C 下以接種蘭菌 R15 效果較佳，每株的花梗數最多(5.8 枝)、花穗最長(12.8 公分)、及具最多的花朵數(35.5 朵)(表 4-6)；溫度對綬草葉數、根數、根鮮重、第一枝花穗長具極顯著的影響。25/20°C 及 30/25°C 等不同溫度處理之生殖生長乃在溫度處理後，一月底移往簡易塑膠溫室接受自然環境之低溫刺激。於 15/13°C 下第一朵花的到花日數，以未接種蘭菌的對照組所需到花日數最短，於移到簡易塑膠溫室平均 58 天後，第一朵花開放，較有接種蘭菌的處理平均提早約 10 天以上開花。而於 20/15°C 之溫度處理下以接種 R02 所需到花日數最短，於移到簡易塑膠溫室，平均 50.8 天後第一朵花開放，較其他各處理也均提早 10 天以上開花。除了接種 R19 和 R01 與對照組之到花日數相近之外，其他各接種蘭菌的處理均較對照組提早開花(表 4-7)，可見於 20/15°C 下接種蘭菌，對綬草具促進提早開花之效果，於 15/13°C 下接種蘭菌，對綬草不具促進提早開花之效果，溫度、蘭菌及其之間的交感作用對綬草到花日數極具影響。

前人對於接種蘭菌可促進綬草種子發芽之研究已相當多(Terashita, 1982; Tsutsumi 及 Tomita, 1986; Masuhara 及 Katsuya, 1989、1994; Masuhara 氏等, 1993; Zelmer 及 Cuceah, 1997; Uetake 及 Peterson, 1997、1998; Stewart 及 Kane, 2007)，甚至對受蘭菌感染之綬草原球體內部超微結構之研究，也已相當透徹 (Uetake 氏等, 1992; Uetake 及 Peterson, 1997、1998)，但有關蘭菌促進綬草營養與生殖生長之相關報導並不多。而接種蘭菌可以促進其他蘭科植物如文心蘭母球植株高度、偽莖

長度及子球株高與寬度，另外在葉片數、葉片厚度、鮮重、面積、葉片葉綠素含量及可溶性蛋白質含量均增加(朱, 2000)，拖鞋蘭(*Paphiopedilum delenatii*)接種蘭菌 R04 可以促進植株鮮重及葉長的生長(蔡, 2003)，蝴蝶蘭臺灣阿嬾(*Phalaenopsis amabilis*)、及黃花品種(*P. Sogo Manager*)接種蘭菌後，於花梗長、抽梗數、花苞數及花朵直徑，均有顯著增加的趨勢，臺灣阿嬾品系接種蘭菌 R01 可增加花梗長，接種蘭菌 R02 則可顯著增加其花朵直徑(張, 2002、2003)。在臺北自然溫度下，紅花蝴蝶蘭雜交種(*Dtp. Luchia Davis x Doritaenopsis Taisuco Firebird*)接種 R02 處理的開花株數最多達 40%，而對照組則無開花株(藍, 2001)。彩葉蘭接種蘭菌 R01 可增加花梗長度及花朵數目(周, 2004)。本實驗結果，綬草接種蘭菌 R15 及 R19，促進其營養(促進地上部與地下部的生長)與生殖生長(提早開花、增加每株花梗數、花梗長、花穗長及花朵數)的效果最好。可見綬草接種蘭菌具促進其生育之效益，其可能的原因如下：1. 蘭共生菌的大量感染，除了提供碳源外，蘭共生菌尚會提供礦物質、維他命等養分的運移(Bernard, 1911; Hadley, 1984; Alexander 及 Hadley, 1985)及促進幼苗對氮、磷及鉀的吸收(Alexander 及 Hadley, 1984; 趙氏等, 1999)，Alexander 等人於 1984 年發現 *Goodyera repens* 之菌根植株所獲得的磷較非菌根植株多了超過 100 倍以上。磷和氮從真菌轉移給植物藉由輻射標誌試驗已經被證實(Cameron 氏等, 2006、2007)。2. 由實驗證實幾乎所有的共生真菌均具有分解纖維素之功能，並使纖維素轉變成為可被植物體吸收之碳水化合物(Smith, 1966)。3. 當植株與蘭菌形成共生或寄生後會使植物體內 IAA 及 Cytokinins 含量增加(Beyrle 氏等, 1991)，可能因為 cytokinesis 增加，為真菌進入蘭株組織之先前準備(Watkinson 及 Welbaum 2003)。蘭菌可以提供蘭科植物小苗生長所需，但小苗無法自行合成的菸鹼酸(niacin)，還可提供胺基酸及細胞分裂素(Uedan 及 Torikata, 1972)。4. 蘭花接種蘭菌能顯著提高葉綠素含量，增加對光的利用效能(朱, 2000; 張, 2003; 周, 2004; 陳, 2005)。

各種蘭花開花環境條件需求各異，如蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)最適開花條件為

18.5°C，短日(Rotor, 1951)，文心蘭(*Oncidium*)，於 15-25°C 有利抽梗及花序品質的提升(陳, 2002)，而本實驗，綬草未接種蘭菌之對照組及接種五種不同蘭菌(R01、R02、R04、R15、R19)之處理，分別置於四種不同的溫度(30/25、25/20、20/15、15/13 °C)，於 3 個月後，移於簡易塑膠溫室 2 個月，結果以置於 15/13°C 及 20/15°C 等兩種溫度之處理均已開花，置於 30/25、25/20°C 兩種溫度處理，大部份尚未開花(圖 4-7，以未接菌種之對照組於四種不同溫度下之圖示代表)，可見綬草之開花，需經低溫的春化作用，且溫度比適合蝴蝶蘭的催花溫度 25/20°C 還要低。推測促進綬草花芽分化，所需春化作用之臨界溫度約為 20°C，且低溫處理後，必需再移往較高溫處(25/20°C)處理，才能促使花芽分化及花序軸抽長，也就是必須要有二階段的溫度感受，有別於蝴蝶蘭於 25/20°C 的溫度處理下，可見花梗直接抽出。依據 Rotor 氏(1951)所做研究，將溫度與日長對蘭科植物開花之影響，分為如下四種：一、低溫促進花芽分化，但與日長無關：如東亞蘭及拖鞋蘭。二、低溫與短日促進花芽分化：此型又可分為低溫與短日並存，才有促進效果者，如一些嘉德麗亞蘭類，及短日或低溫任一因子均可開花者，如秋石斛類與蝴蝶蘭。三、短日促進花芽分化，但溫度影響光週效應。四、不同溫度影響花芽分化與發育：如蝴蝶蘭。推測綬草之花芽分化應屬於第一、二或第四種。推測低溫誘導綬草開花，可能是內生荷爾蒙種類及含量產生變化，Su 等人認為涼溫會誘導蝴蝶蘭屬植物開花莖的頂端之 GA₁、GA₂₀、GA₁₉ 及 GA₅₃ 含量較高，而相較於 GA₃ 處理和涼溫促進 (cool-induced)，其溫暖控制 (warm controls) 之花梗尖端，具較高含量的 GA₈ 及較低濃度 GA₁ (Su 氏等, 2001)。非蘭科植物之研究中，以阿拉伯芥模式植物為材料，研究開花時間的遺傳基礎(genetic basis)，已揭示一複雜的基因網，可用於偵察環境與植物體內部之訊息，其中將開花時間的遺傳路徑區分為四，包括有自發性路徑 (Autonomous pathway)、春化作用路徑 (Vernalization)、需光路徑 (Light-dependent pathway)、激勃素路徑 (Gibberellin pathway) (Fabrice 氏等, 2006)，推測控制綬草開花之遺傳路徑，應為春化作用路徑。

結論

本研究結果得知種植綬草之介質，以泥炭土加椰纖 2:1 體積比混合介質較佳，並證實綬草的花芽分化需經低溫之春化作用，所需春化作用之臨界溫度約為 20°C，且低溫處理後，必需再經較高溫處(25/20°C)處理，才能促使花芽發育及花梗抽長，也就是必須要有二階段的溫度感受。接種絲核菌屬蘭菌(R02、R15、R19)可促進綬草之營養與生殖生長，具推廣應用潛能。本文為在臺灣所進行綬草接種蘭菌能促進生殖生長之首次發表。



參考文獻

- 王美琇. 1999. 蘭共生菌對數種蘭科植物生長與發育之影響。臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 81 頁。
- 王啓正. 2004. 兼具觀賞及藥用綬草之組織培養技術。花蓮區農業專訊 49:17-19。
- 朱俊南. 2000. 蘭花菌根菌之分離與接種對文心蘭幼苗生長之影響。屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文, 101 頁。
- 余德發、陳任芳. 2001. 小巧玲瓏的原生植物-綬草。花蓮區農業專訊 36:5-7。
- 余德發、陳任芳. 2004. 觀賞兼保健的蘭科植物-綬草。花蓮區農業專訊 49:5-7。
- 李咩. 1990. 蘭之胚培養。中國園藝 36(4): 223-244。
- 周玲勤. 2004. 臺灣金線連、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與培育。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 169 頁。
- 邱年永、張光雄. 1998. 原色臺灣藥用植物圖鑑(3), 279 頁。南天書局。
- 張正、陳盈君、嚴新富. 2003. 綬草無菌播種與生長發育。中國園藝 49:407-410。
- 張喜寧. 2002. 蘭菌的量產與應用 農業生物技術國家型研發應用計畫第一年期末報告。
- 張喜寧. 2003. 蘭菌的量產與應用 農業生物技術國家型研發應用計畫第二年期末報告。
- 梁健成、許瑋真、黃克峯. 2012. 綬草植物於化妝品應用開發之研究。美容科技學刊 9:23-30。
- 陳玉蓮. 2002. 溫度、光度及模擬儲運對文心蘭‘埔里貴妃’、‘火山皇后’和 *Colmanaras Wildcat* 生育與開花之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 147 頁。
- 陳孟妘. 2005. 環境因子蘭菌與植物生長物質對帶花梗蝴蝶蘭貯運後生長及開花品質之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 127 頁。
- 陳季呈. 2010. 可供觀賞又保健的清明草之組織培養技術開發。花蓮區農業專訊

49:5-7。

趙陽景、郭順星、高薇薇、杜淑燕. 1999. 三種內生真菌與大花蕙蘭共生對礦物營養吸收的影響。園藝學報 26:110-115。

劉祖惠、許乃文、顏家瑜、吳瑞鈺. 2001. 利用不定芽再生進行綫草微體繁殖。中國園藝 47(1):51-58。

蔡麗君. 2003. 蘭菌與植物生長素對拖鞋蘭生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 79 頁。

藍亦青. 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文. 93 頁。

Alexander, C. and G. Hadley. 1984. The effect of mycorrhizal infectin of *Goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytol.* 97:391-400.

Alexander, C. E. and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and endophytol during the development of the orchid *Goodyera repens*. *Br. New Phytol.* 101:657-665.

Alexander, C., I. J. Alexander, and G. Hadley. 1984. Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal. *New Phytol.* 97:401-411.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.

Bernard, N. 1911. Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydees. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 14:223-234.

Beyrle, H., F. Penningsfeld and B. Hock. 1991. The role of nitrogen concentration in determining the outcome to the interaction between *Dactylorhiza incarnate* L.

Soo and *Rhizoctonia* sp. *New Phytol.* 117:665-672.

Cameron, D. D., I. Johnson, J. R. Leake, and D. J. Read. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Ann Bot* 99:831–834

Cameron, D. D., J. R. Leake, and D. J. Read. 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.

Chang, D. C. N. 2008. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In: Chen, W. H. and H. H. Chen, *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Joh Tuck Link, Singapore, pp.77-98.

Chou, L. C., D. C. N. Chang. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and F₁ hybrids. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:143-147.

Dawes, C. J. 1971. Biological techniques in electron microscopy. *International Textbook Series*, Barnes & Noble Inc. N. Y. 193 pp.

Fabrice, R., T. Pascal, C. Joel and L. C. Valerie. 2006. How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 11(8):375-381.

Hadley, G. 1984. Uptake of C¹⁴-glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorm. *New Phytol.* 96:263-273.

- Harvais, G. and G. Hadley. 1967. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytol.* 66:217-230.
- Knudson, L. 1922. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Bot. Gaz.* 73:1-25.
- Koske, R. E. and J. N. Gemma. 1989. A modified procedure staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486-488.
- Leou, C. S. 2000. *Spiranthes*. In : Huang, T. C. *et al.* (eds.), *Orchidaceae*. *Flora of Taiwan*, 2nd ed. 5:1034. Editorial Committee, Dept. Bot., NTU, Taipei, Taiwan.
- Lin, Y. L., R. L. Huang, M. J. Don and Y. H. Kuo. 2000. Dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis*. *J. Nat. Prod.* 63:1608-1610.
- Lin, Y. L., W. Y. Wang, Y. H. Kuo, and Y. H. Liu. 2001. Homocyclotirucallane and Two Dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 49:1098-1101.
- Masuhara G., K. Katsuya and K. Yamaguchi. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. amoean (Orchidaceae) *in vitro*. *Mycol. Res.* 97:746-752.
- Masuhara, G. and K. Katsuya. 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Sci. Horticu.* 37(4):331-337.

- Masuhara, G. and K. Katsuya. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127(4):711-718.
- Rotor, G. B. 1951. Day length and temperature in relation to growth and flowering of orchids. *Cornell Univ. Agr. Exp. Bull.* 85:3-45.
- Schelkle, M., M. Ursic, M. Farquhar and R. L. Peterson. 1996. The use of laser scanning confocal microscopy to characterize mycorrhizas of *Pinus strobus* L. and to localize associated bacteria. *Mycorrhiza* 6:431-440.
- Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65:488-499.
- Smith, S. E., V. Gianinazzi-pearson, R. Koide and J. W. G. Cairney. 1994. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* 159:103-113.
- Sneh, B., P. Burpee and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 133PP.
- Stewart S. L. and M. E. Kane. 2007. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:178-186.

- Su, W. R., W. S. Chen, M. Koshioka, L. N. Mander, L. S. Hung, W. H. Chen, Y. M. Fu and K. L. Huang. 2001. Changes in gibberellin levels in the flowering shoot of *Phalaenopsis hybrida* under high temperature conditions when flower development is blocked. *Plant Physiol. Biochem.* 39:45-50.
- Terashita, T. 1982. Fungi inhabiting in Japan (II). Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 23:319-328.
- Tsutsumi, K. and M. Tomita. 1986. Symbiotic germination of *Spiranthes sinensis* Ames associated with some orchid endophytes. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. Sapporo.* 62:440-452.
- Tsutsumi, K. and M. Tomita. 1988. Differences in the symbiotic capacity among isolates of mycorrhizal fungi on some terrestrial orchids. *J. of the Faculty of Agriculture.* 63(4):345-353.
- Uedan, H. and H. Torikata. 1972. Effect of light and culture medium on adventitious root formation by *Cymbidiums* in aseptic culture. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 41:322-327.
- Uetake, Y. and R. L. Peterson. 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(10):1661-1669.
- Uetake, Y. and R. L. Peterson. 1998. Association between microtubules and symbiotic

fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*. New Phytol. 140(4):715-722.

Uetake, Y., K. Kobayashi and A. Ogoshi. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia anastomosis* group C. Mycological Research. 96(3):199-209.

Watkinson J. I., and G. E. Welbaum. 2003. Characterization of gene expression in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* incubated with a mycorrhizal fungus. Acta. Hortic. 624:463-470

Yoder, J. A., L. W. Zettler, and S. L. Stewart. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. Plant Sci. 156:145-150.

Zelmer, C. D. and R. S. Cuceah. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. Lindleyana 12:142-148.

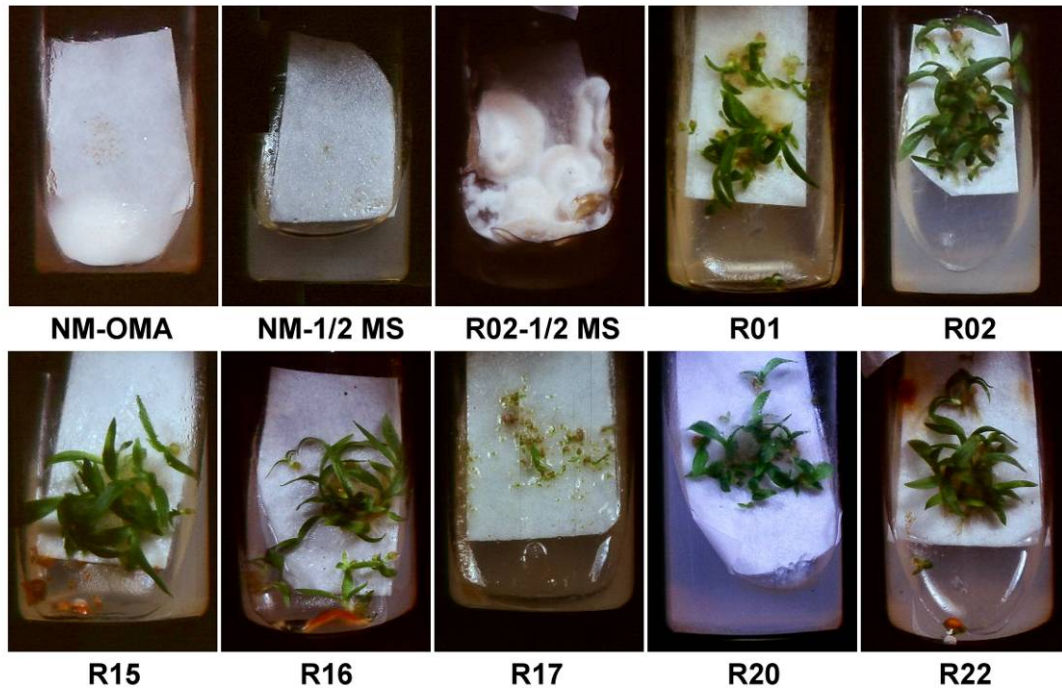


圖 4-1. 綬草種子之無菌播種(NM-OMA, NM-1/2MS)及與蘭菌共生(於 OMA 培養基接種 R01, R02, R15, R16, R17, R20, R22 蘭菌)和(1/2MS 培養基接種 R02 蘭菌)65 天之共生發芽情形。

Fig. 4-1. *In-vitro* asymbiotic (NM-OMA, NM-1/2 MS) and symbiotic (R01, R02, R15, R16, R17, R20, R22)-OMA, (R02-1/2 MS) *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames seed germinations 65 days after sowing. Symbiotic germination on an oatmeal agar (OMA) medium inoculated with different *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi (OMF).

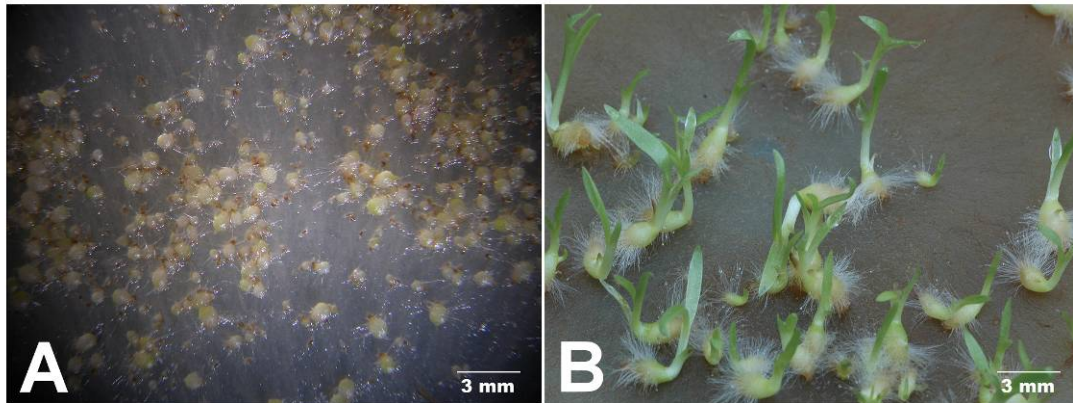
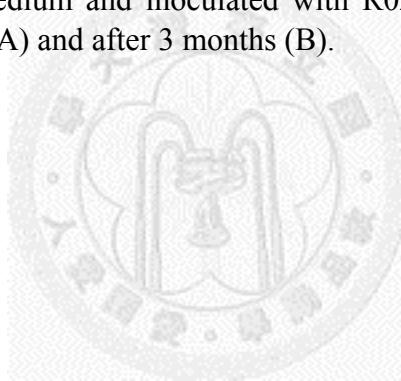


圖 4-2. 綫草種子接種蘭菌 R02 之共生種子發芽試驗,15 天(A)及 3 個月(B) 之發芽情形。

Fig. 4-2. Symbiotic seed germination of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames cultured in PDA medium and inoculated with R02 orchid mycorrhizal fungi after 15 days (A) and after 3 months (B).



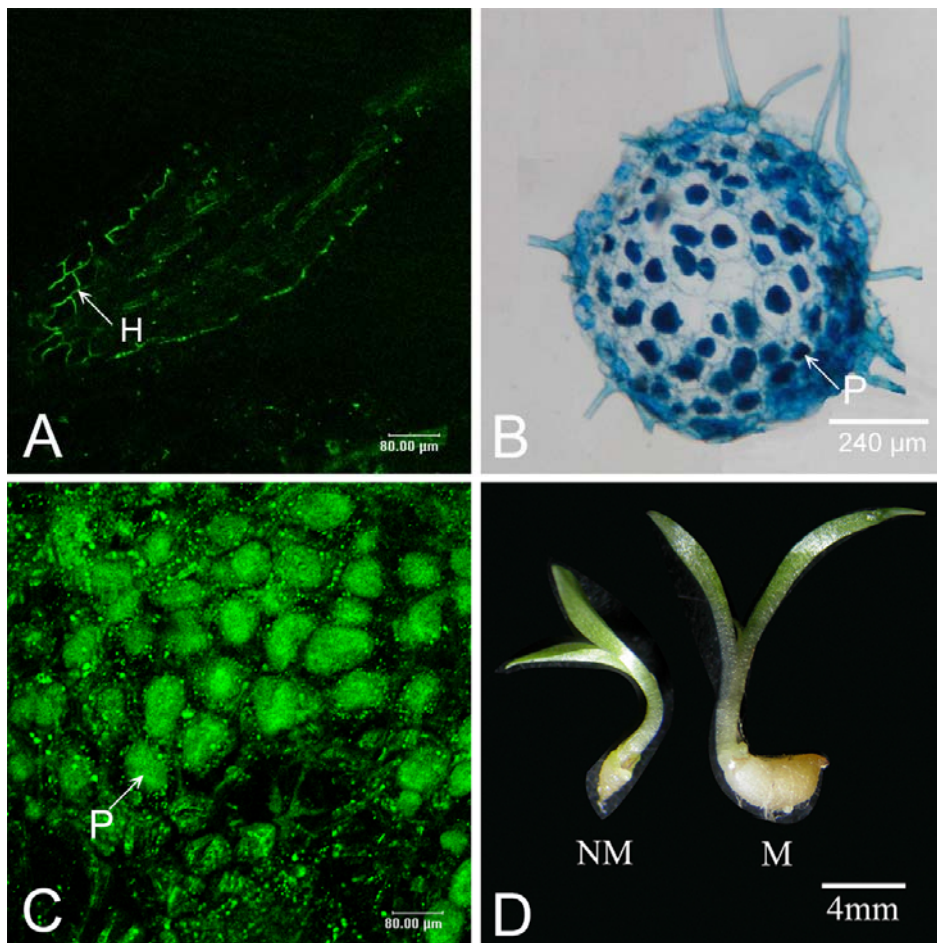


圖 4-3. 綬草種子經蘭菌菌絲感染發育成原球體及其內部構造的改變。
 A. 綬草種子發芽外部受蘭菌菌絲(H)侵入之共軛焦顯微鏡觀察，蘭菌菌絲沿著細胞壁侵入種皮。
 B. 綬草種子接種蘭菌絲核菌 R15，45 天發育成原球體，其橫切面經 0.05% 苯胺藍染色以光學顯微鏡觀察，於皮層細胞形成很多菌絲團(P)。
 C. 綬草原球體內部受蘭菌感染，在共軛焦顯微鏡下觀察，於皮層細胞形成很多菌絲團。
 D. 解剖顯微鏡觀察綬草種子，未接種與接種蘭菌 6 個月之生長情形。

Fig. 4-3. Germinated *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames seed with hyphal infection in protocorm and internal structural change.
 A. Mycorrhizal hypha (H) penetrated the seed coat (testa) through the cell wall, as observed by confocal microscopy.
 B. Cross section of an R15-inoculated protocorm staining with aniline blue. Forty-five days after sowing, numerous pelotons (P) appeared in the cortex cells, as observed by optical microscopy.
 C. Numerous pelotons formed in the cortex cells of an R15-inoculated protocorm, as observed by confocal microscopy.
 D. Six-month-old non-mycorrhizal (NM) and mycorrhizal (M) *S. sinensis* seedlings, as observed by dissecting microscopy.

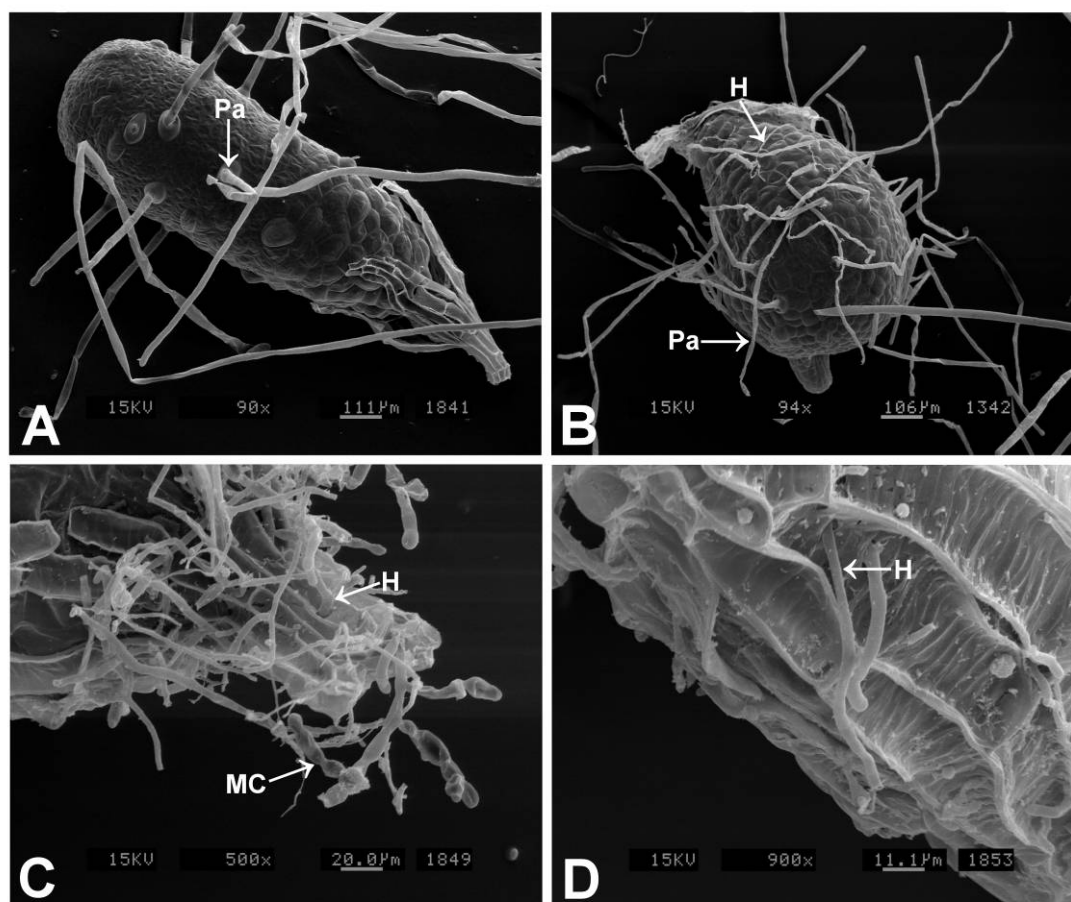


圖 4-4. 以掃描式電子顯微鏡觀察綬草種子接種蘭菌(R02)發育成原球體，其外部菌絲侵入及感染情形。

- A. 對照組(NM)，原球體著生吸收毛(Pa)但不被覆菌絲(H)。
- B. 接種蘭菌的發芽種子，原球體著生吸收毛(Pa)並被覆菌絲(H)。
- C. 接種蘭菌的發芽種子，菌絲從懸柄侵入，並有念珠狀細胞(MC)產生。
- D. 接種蘭菌的發芽種子，菌絲穿透種皮。

Fig. 4-4. Scanning electron microscopical (SEM) observation of protocorm stages of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames seeds inoculated with orchid mycorrhizal fungi (R02) and the surface of protocorm hyphae invasion and infection conditions.

- A. Non-mycorrhizal (NM) germinated seed on which protocorm with papillae (Pa) but no hyphae formed.
- B. Mycorrhizal germinated seeds. A mycorrhizal protocorm with papillae (Pa) and adherent hyphae (H).
- C. Mycorrhizal germinated seeds. A mycorrhizal protocorm with orchid mycorrhizal fungi hyphae (H) penetrating suspensor; and the formation of monilioid cell (MC).
- D. Mycorrhizal germinated seeds. A mycorrhizal protocorm with orchid mycorrhizal fungi hyphae (H) penetrating the seed coat.

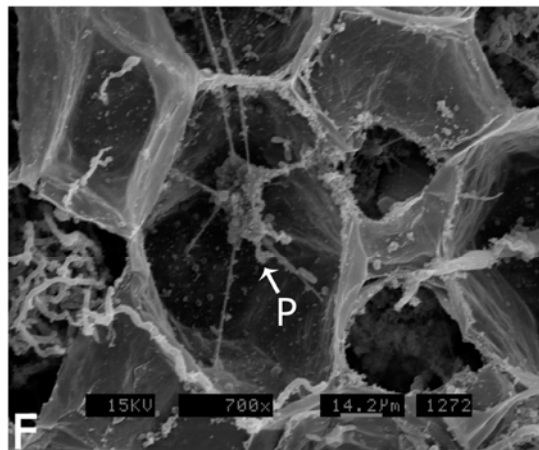
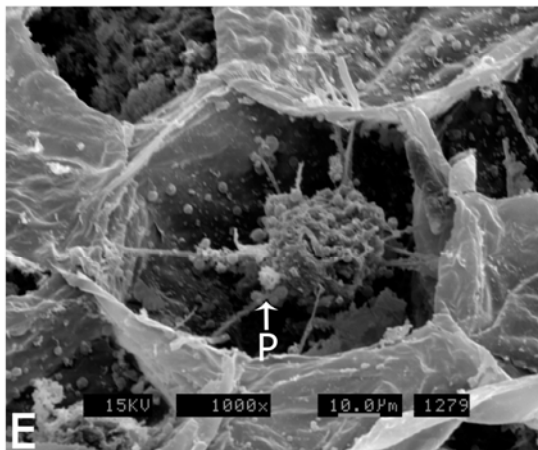
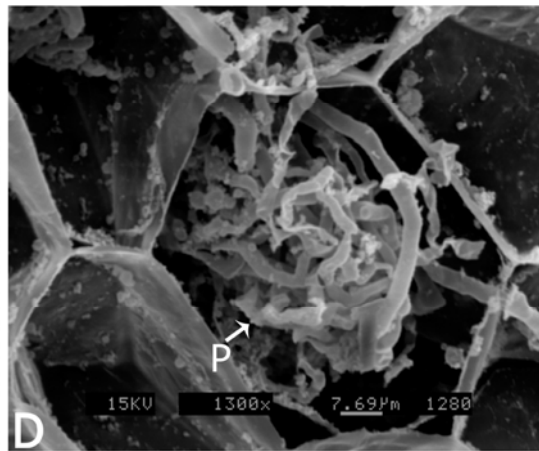
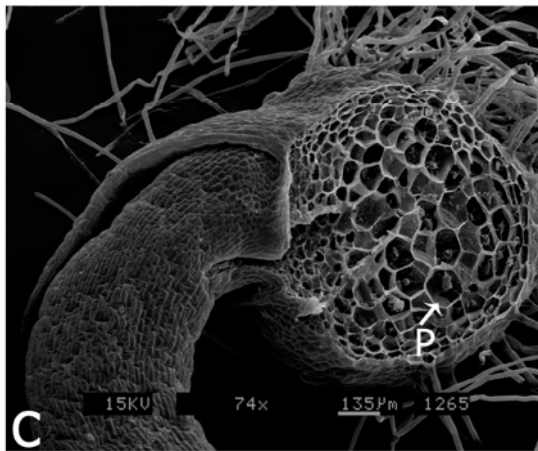
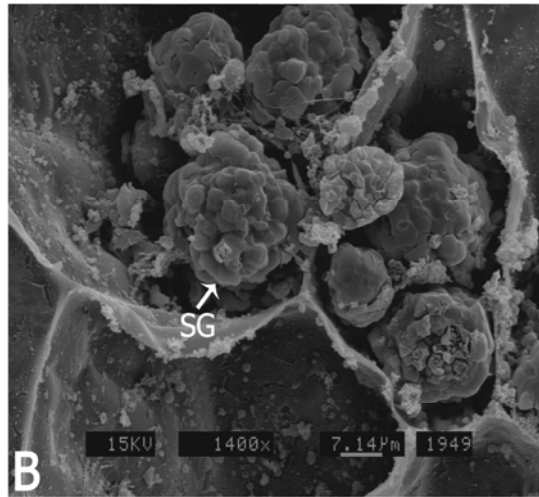
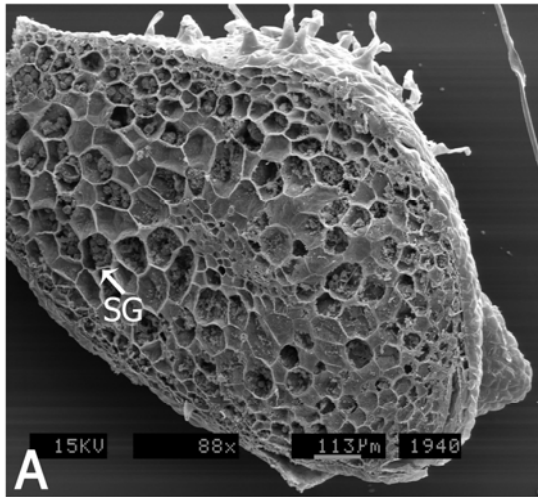
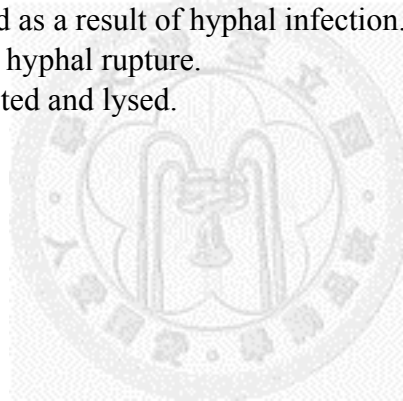


圖 4-5. 以掃描式電子顯微鏡觀察綾草種子發芽至原球體階段內部受蘭菌感染之構造變化。

- A. 對照組(原球體皮層細胞內具澱粉粒(SG))。
- B. 對照組(澱粉粒(SG)放大)。
- C. 原球體發育成小苗，皮層細胞感染情形。
- D. 菌絲感染細胞形成之菌絲團(P)。
- E. 細胞內即將崩解之菌絲團塊(P)。
- F. 菌絲團塊(P)正被消化而解體。

Fig. 4-5. Internal structural changes on cortex cells of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames seed with orchid mycorrhizal hyphal infection, from germination to protocorm stage. Observed by scanning electron microscopy (SEM).

- A. Control protocorm, containing starch grains (SG) in the cortex cells.
- B. Close-up of the control protocorm containing numerous starch grains.
- C. Hyphal infection observed in cortex cells after protocorm developed into seedling.
- D. Pelotons (P) formed as a result of hyphal infection.
- E. Peloton under went hyphal rupture.
- F. Pelotons were digested and lysed.



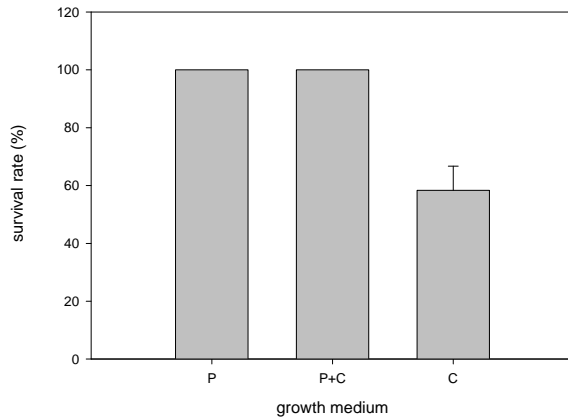


圖 4-6. 綬草種植於三種不同生長介質 3 個月之成活率。

Fig. 4-6. Survival rates (%) of *Spiranthes sinensis* (Pers) Ames cultured in different growth media.

P: peat moss ; P+C: peat moss + coconut fiber (2:1,v/v) ; C: coconut fiber.



圖 4-7. 綬草移入人工氣候室四種不同溫度處理 3 個月，再置於簡易溫室 2 個月之開花情況。

Fig. 4-7. *Spiranthes sinensis* (Pers) Ames grew in 4 different day/night temperature (15/13°C 、 20/15°C 、 25/20°C 、 30/25°C and 35/30°C) with natural sunlight condition of phytotron after 3 months, followed by transferring to plastic house for 2 months.

表 4-1. 蘭菌之分離及寄主蘭花採集資料。

Table 4-1. Mycorrhizal isolates and their host orchids.

Isolate	*Accession No.	Identification	Host orchid
R01	2F-M1	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Haemaria discolor</i> (Ker Gawler) var. <i>dawsoniana</i>
R02	2F-M6	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-A	<i>Calanthe arisanensis</i> Hayata
R04	2F-M11	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata
R15	2F-M21	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-Fb	<i>Spiranthes sinensis</i> (Pers.) Ames
R16	2F-M46	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-Fb	<i>Spiranthes sinensis</i> (Pers.) Ames
R17	2F-M76	<i>Rhizoctonia</i> sp. AG-G	<i>Spiranthes sinensis</i> (Pers.) Ames
R19	2F-M66	<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-G	<i>Phalaenopsis aphrodite</i> Rchb. f.
R20	2F-M91	<i>Rhizoctonia</i> sp	<i>Spiranthes sinensis</i> (Pers.) Ames
R22	2F-M26	<i>Rhizoctonia</i> sp. AG-G	<i>Spiranthes sinensis</i> (Pers.) Ames

* All the OMF were assigned accession numbers when stored in the laboratory of Prof. Wei-Chiang Shen, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University.

Identification methods used were molecular identification, anastomosis group A (AG-A), anastomosis group Fb (AG-Fb), anastomosis group G (AG-G).

表 4-2. 綬草種子播於 HIT、1/2MS 培養基及接種蘭菌之燕麥培養基 75 天之發芽率。

Table 4-2. Germination rates of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames Mycorrhizal inoculated seeds on HIT, 1/2 MS and OMA media, 80 days after sowing.

Medium	<i>Rhizoctonia</i> * inoculum	Average germ. rate (%)
HIT	NM	11.8 f
1/2 MS	NM	19.2 d
OMA	R01	10.4 f
OMA	R02	86.4 a
OMA	R15	22.3 c
OMA	R16	31.7 b
OMA	R17	17.0 e
OMA	R20	32.0 b
OMA	R22	30.8 b

* The number of germinated seeds divided by the number of seeds sown.

NM: non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R16, R17, R20, R22: orchid mycorrhizal fungi.

HIT: containing 3 g L⁻¹ Hyponex 1, 1/2 MS vitamin, 2 g L⁻¹ peptone, 8 g L⁻¹ agar, and 10 g L⁻¹ sucrose.

1/2 MS: containing 1/2 MS macronutrient, 1MS micronutrient and vitamin per liter, 2 g L⁻¹ peptone, 8 g L⁻¹ agar, and 10 g L⁻¹ sucrose.

OMA (oat meal agar): containing 2.5 g L⁻¹ oats, and 8 g L⁻¹ agar.

Each treatment containing five replicates.

Means in each column followed by different letters were significantly different (p=0.05) as determined by least significance difference (LSD) test.

表 4-3. 綬草種子播於接種不同日數之蘭菌 PDA 培養基 40 天之發芽率。

Table 4-3. The germination rate of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames seeds cultured on mycorrhizae pre-cultured PDA medium with various pre-cultured periods. The data were collected 40 days after sowing.

Medium & <i>Rhizoctonia</i> inoculum	No. of pre-cultured days				Average germ. rate (%)
	0 days	5 days	10 days	15 days	
PDA, NM	0	-	-	-	0
PDA, R02	0	54.8 b	73.2 a	80.2 a	69.4 a
PDA, R15	0	46.9 bc	42.2 bc	14.0 e	34.4 b
PDA, R17	0	21.2 de	7.9 e	17.0 e	15.4 c

R02, R15, R17: orchid mycorrhizal fungi.

Four replicates were tested for each treatment.

Means in each column followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by LSD test.

表 4-4. 以三種不同介質種植綬草 3 個月之營養生長。

Table 4-4. Vegetative growth of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames^X in three growth media for three months.

Medium ^Y	Leaf no.	Leaf length (cm)
P	8.44ab	10.94a
P+C	9.78a	11.84a
C	6.67b	7.86b

x: The plants were placed in the phytotron from August 22, to November 21, 2004. Each treatment had 5 replicates, and 3 plants for each.

y: P: peat moss ; P+C: peat moss + coconut fiber (2:1,v/v) ; C: coconut fiber
Means in each column on the same temperature treatments followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by LSD test.

表 4-5. 綬草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌之營養生長。

Table 4-5. Vegetative growth of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames^x inoculated with various orchid mycorrhizal fungi in different day/night temperatures.

Temperature (day/night) °C	<i>Rhizoctonia</i> inoculum	Leaf no.	Leaf length (cm)	Root no.	Root fresh weight. (g)
15/13	NM ^y	13.8h	11.7efg	5.4gh	3.3ghi
	R02	23.4cdef	11.6efg	5.3h	2.7j
	R15	24.8cde	11.4efg	6.6defg	4.4bcde
	R19	15.4gh	12.4cdef	7.5de	5.7a
20/15	NM	15.9gh	11.9efg	6.2efgh	3.4gh
	R02	16.1gh	12.0cdef	5.3h	3.0hij
	R15	25.5cd	11.5efg	5.6gh	3.2hij
	R19	22.8cdef	12.5bcdef	7.6d	5.8a
25/20	NM	20.8defg	12.2cdef	10.2bc	4.6bcd
	R02	17.8fgh	13.3bcd	9.8bc	4.9b
	R15	28.3bc	12.6bcdef	9.8bc	4.8bc
	R19	23.7cdef	14.0ab	10.2bc	6.0a
30/25	NM	24.7cde	10.4g	7.1def	3.1hij
	R02	24.4cdef	11.5efg	9.0c	2.1k
	R15	35.0a	13.4abc	9.1b	3.8efg
	R19	33.6ab	12.7bcdef	11.9a	4.3cdef
Main Effects					
Temperature		**** ^z	*	***	***
Mycorrhiza		***	*	***	***
Interaction					
Temperature*Mycorrhiza		***	**	***	***

^x: *S. sinensis* grew in 4 different day/night temperature (15/13°C, 20/15°C, 25/20°C, 30/25°C and 35/30°C) with the natural sunlight condition of phytotron after 86 days, followed by transferring to plastic house for 120 days.

^y: NM: non-mycorrhizal control; R01, R02, R04, R15, R19: orchid mycorrhizal fungi.

Nine replicates were tested for each treatment.

^z: ns, *, **, *** Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05, 0.01$ or 0.001 , respectively.

Mesns in each column on the same temperature treatments followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by LSD test.

表 4-6. 綫草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌之生殖生長。

Table 4-6. Reproductive growth of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames inoculated with various orchid mycorrhizal fungi in different day/night temperatures.

Temperature (day/night) °C	<i>Rhizoctonia</i> inoculum	Stalks/ plant	Spike length (First spike) (cm)	Floret no. (First spike)
15/13	NM ^Y	5.5bcdefgh	15.5abcd	51.5a
	R02	6.9abc	12.0fghi	39.9cde
	R15	7.2ab	15.2abcd	44.7abc
	R19	5.2bcdefgh	14.6bcde	44.8abc
20/15	NM	4.4efgh	15.8abc	47.2abc
	R02	5.0cdefgh	16.5ab	49.6ab
	R15	6.6bcd	14.1cdef	43.6bcd
	R19	8.8a	16.9a	47.0abc
25/20	NM	3.7h	11.6ghi	34.5efgh
	R02	3.7h	10.4ij	28.0hi
	R15	4.5efgh	8.1k	25.4i
	R19	4.5efgh	13.5defg	36.5def
30/25	NM	3.8gh	9.1jk	28.0hi
	R02	4.6efgh	11.5ghi	30.8fghi
	R15	5.8bcdefg	12.8efgh	35.5efg
	R19	4.8defgh	11.6ghi	30.9fghi
Main Effects				
Temperature		*** ^Z	***	***
Mycorrhiza		*	*	ns
Interaction				
Temperature*Mycorrhiza		ns	***	*

^X: *S. sinensis* grew in 4 different day/night temperature (15/13°C 、 20/15°C 、 25/20°C 、 30/25°C and 35/30°C) with the natural sunlight condition of phytotron after 86 days, followed by transferring to plastic house for 120 days.

^Y:NM: non-mycorrhizal control; R01, R02, R04, R15, R19: orchid mycorrhizal fungi.

Nine replicates were tested for each treatment.

^Z:ns,*,**,***Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05, 0.01$ or 0.001 , respectively.

Mesns in each column on the same temperature treatments followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by LSD test.

表 4-7. 綬草於不同溫度處理及接種不同種類蘭菌第一朵花開放之到花日數。

Table 4-7. The emergence dates of the first flower in *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames inoculated with orchid mycorrhizal fungi and grown at different temperatures.^X

Temp.(°C) (day/night)	<i>Rhizoctonia</i> inoculum	Days for flowering after treatment
15/13	NM ^Y	58.0f
	R01	69.5cd
	R02	76.5a
	R04	68.8d
	R15	71.7bc
	R19	72.7b
20/15	NM	65.0e
	R01	64.5e
	R02	50.8h
	R04	60.7f
	R15	60.3f
	R19	65.3e
Main Effects		
Temperature		*** ^Z
Mycorrhiza		***
Interaction		
Temperature*Mycorrhiza		***

^X: The plants which flowered in the spring of 2005 were placed in the phytotron 86 days (from November 6, 2004 to January 26, 2005) and then transferred to plastic house.

Six replicates were tested for each treatment.

^Y:NM: non-mycorrhizal control; R01, R02, R04, R15, R19: orchid mycorrhizal fungi.

Nine replicates were tested for each treatment.

^Z:ns, *, **, ***Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05, 0.01$ or 0.001 , respectively.

Mesns in each column on the same temperature treatments followed by the different letters were significantly different ($p=0.05$) as determined by LSD test.

Abstract

To determine which mycorrhizal fungi could promote the most rapid germination of *S. sinensis* for mass propagation in Taiwan, we examined the relationship between symbiotic mycorrhiza and orchidaceous seeds. Seven orchid mycorrhizal fungi (OMF) were isolated from wild grown orchid roots of *Rhizoctonia* spp. and studied. By far, the most effective and stable promoters of *in vitro* seed germination were those of a new strain, R02 (unpublished data). The R02-inoculated cultivars grown on oatmeal agar (OMA) germinated 15 days after sowing, more than two months earlier than the asymbiotic seeds, which germinated after 75 days. The R02 inoculation also promoted and increased the germination rate of *S. sinensis ex vitro* seeds on potato dextrose agar (PDA). *Spiranthes sinensis* seeds sown on PDA that had been grown with R02 for 15 days showed germination rate up to a 80.2% after 40 days when the hyphae grown on the surface of PDA media were scraped off prior to seeding. Germination rate reduced to 11.2% if the hyphae were not scraped off, or to 0% in the non-mycorrhizal control. After one year of low temperature (4 °C) preservation, these *S. sinensis* seeds maintained a germination rate of about 75 % and were used for *ex-vitro* symbiotic seed germination all year round. This modified method proved very effective and should be applied for large-scale production of this endangered orchid, which will have a positive effect on the conservation of *S. sinensis* in the wild.

Three-month old *S. sinensis* seedlings transplanted to medium mixed with peat moss and coconut fiber in the ratio of 2:1 showed 100% survival rates and best vegetative growth. When *S. sinensis* cultivated under 20/15°C day/night temperature treatment, R02 inoculated samples flowered within the shortest period. The first flower opened in the average of 59 days after translocated to the plastic house, which was 10 days earlier than other treatments. When *S. sinensis* plants were grown under four different temperature conditions for 86 days and then moved to greenhouse for a 120 days, samples inoculated with R15 isolate showed the best shoot and leaf growth. On the other hand, R19 isolate enhanced the root growth of *S. sinensis*, which more root and higher fresh weight were observed. Under 15/13°C day/night temperature treatment, *S. sinensis* inoculated with R15 isolate showed the best number of flower stalk (7.2/plant). However, *S. sinensis* inoculated with R19 isolate gave the best number of flower stalk (8.8/plant) and longest stalk length (16.9 cm in average) at 20/15°C condition. The *S. sinensis* inoculated with the R15 and R19 isolate were able to promote vegetative growth. Symbiotic seed germination is an effective method for mass production of *S. sinensis* seedlings. It was Suggested that the flowering *S. sinensis* could be improved at 20/15°C and have the best reproduction by inoculated with the R19 isolate of *R. spp.*

Keywords: *Spiranthes sinensis*, *Rhizoctonia*, temperature, germination, reproductive

第五章 紅鶴頂蘭之生長、發育與蘭共生菌之相關性及菌根構造變化

摘要

紅鶴頂蘭是臺灣原生鶴頂蘭中最美也最具園藝價值者，但因為山林開發及濫採，野地已瀕臨滅絕，栽培繁殖此蘭花有助於其復育。鶴頂蘭屬植物可以利用組織培養進行繁殖，但其瓶苗在出瓶移植時其成活率低，已知蘭科植物接種蘭菌後可以促進組培苗移植存活率，其營養生長與生殖生長皆被促進。由臺灣野生的地生蘭根部，分離出四種絲核菌屬之蘭共生菌 R01 (*Rhizoctonia solani*)，R02 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-A), R15 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-Fb) and R19 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-G)，以上分離之菌種在臺大實驗室進行培育試驗超過十年，均已證明為非致病性的菌種，故利用以上菌種進行紅鶴頂蘭根部接種試驗。結果顯示接種適當的蘭共生菌，與對照組相較可顯著提高紅鶴頂蘭瓶苗之移植成活率 27-31% (R15;R02)及增加株高 6.3 公分(R15)、葉長 3.5 公分(R15)、花莖長度 10.2 公分(R19)及每枝花莖之花朵數 3.5 朵而增加其花的產量(R19)。接種絲核菌 R02 的植株其光合作用速率平均 $3.73 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 顯著高於對照組，且可比對照組增加葉及假球莖之總碳水化合物含量 $24.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 $90.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。顯微鏡觀察顯示蘭共生菌會在紅鶴頂蘭植株根部皮層細胞內形成菌絲團，所以其蘭菌感染模式屬於菌球消化型。建議可接種蘭菌 R15 而提升紅鶴頂蘭的瓶苗移植成活率，且接種蘭菌 R02 或 R15 或 R19 可促進生殖生長，故建議重視其實用性。本研究結果得知，紅鶴頂蘭接種適當種類的絲核菌屬蘭菌，可以增加組織培養小苗移植存活率(R02、R15)，並藉由提高光合作用速率，進而促進其生殖生長，增加植株之花梗與花朵數(R02、R19)，建議可以利用接種蘭菌的技術進行大量的商業化生產而達到保護與復育之目的。

關鍵詞：紅鶴頂蘭、絲核菌、生殖生長、淨 CO₂ 吸收率、碳水化合物

前言

紅鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae* (Banks) Blume)，分布於印度、斯里蘭卡、華南地區，經泰國、馬來西亞至印尼，澳洲與太平洋群島一帶；臺灣則分布於全島1,000公尺以下低海拔山區，性喜高溫潮溼但較不耐寒，蘭嶼亦有野生者(Su, 2000; 葉氏等, 2007)；屬於大型地生蘭，生性強健，容易開花，紅鶴頂蘭株高60~200公分。假球莖為扁球形、肉質且節間很密，葉互生，卵狀披針形或闊披針形3~5枚，長達40~60公分，紙質，表面有波狀皺曲。花莖自假球莖側面抽出，花軸粗大壯觀，可高達60~100公分，著花6~20朵，花徑8~10公分，花瓣外側粉白色，內部邊緣白色，中央為紅褐色，唇瓣喇叭形，外白內紫紅，花色柔中帶艷頗具特色，而且還具有淡淡芳香，是臺灣原生鶴頂蘭中最美也最具園藝價值者(Bechtel 氏等, 1986; 蘇, 1990; 葉氏等, 2007)。盛花期3-5月，花朵大且花色豔麗，小花壽命可達20天，花序壽命可達45天(張及簡, 2010)，葉片修長，翠綠優美，可做為盆花、切花或切葉，亦可當庭園植物栽培(Mukherjee, 1979; 李, 1989; 張及簡, 2010)，也可做為盆花栽培，為一種甚具園藝潛力的野生蘭花資源。因為山林開發及濫採，野地已瀕臨滅絕(Su, 1989)，紅鶴頂蘭的花中型而漂亮極具觀賞及經濟價值((Mukherjee, 1979; 李, 1989; 張和簡, 2010)，在臺灣的花卉市場僅有少量的紅花鶴頂蘭之販售，蘇於1989年的報告即指出紅鶴頂蘭在野外已逐漸減少，是亟需進行保育的瀕危蘭科植物(Su, 1989)，但臺灣民間僅有少數人栽培。

紅鶴頂蘭可利用花梗扦插繁殖(李, 1989; 吳, 1991; 蔡, 2010)，花梗扦插於第4~7節位發根較佳(李, 1989)；花梗無菌培養，以源自花梗花芽為培植體之小苗，存活率最高為87.5%(蔡, 2010)。利用無菌播種繁殖，授粉後130天之果莢的種子其發芽率最好(李, 1989)；同為鶴頂蘭屬的粗莖鶴頂蘭在臺灣族群非常稀少，經研究亦可利用無菌播種的方式繁殖(鄭氏等, 2006)。將紅鶴頂蘭與9種異屬植物雜交，共有11種組合，結果均可獲得雜交後代(蔡, 2010)。已知蘭科植物接種蘭菌後其營養生長與生殖生長皆被促進(朱, 2000; 藍, 2001; Takahashi 氏等, 2006; Chang

及 Chou, 2007; Smith 氏等, 2009; Wu 氏等, 2011), 朱於 2000 年指出, 接種蘭菌可以促進文心蘭母球及子球之植株高度、偽莖長度、寬度, 另外在葉片數、葉片厚度、鮮重、面積、葉片葉綠素含量及可溶性蛋白質含量均增加; 接種蘭菌 R04 及 PaR2 於拖鞋蘭(*Paphiopedilum delenatii* Guillanmin)上, 顯示可以促進植株鮮重及葉長的生長(蔡, 2003), 臺灣阿嬤品系接種蘭菌 R01 可增加花梗長, 接種蘭菌 R02 則可顯著增加其花朵直徑(藍, 2001)及抽梗率(王, 2005)。在臺北自然溫度下, 紅花蝴蝶蘭雜交種(*Doritaenopsis Luchia* Davis x *Doritaenopsis Taisuco* Firebird)接種 R02 處理的開花株數最多達 40%, 而對照組則無開花株(藍, 2001)。彩葉蘭(*Haemaria discolor* (Ker) Lindl. var. *dawsoniana*)接種蘭菌 R01 可增加花梗長度及花朵數目(周, 2004)。鶴頂蘭屬的蘭科植物雖然已可利用無菌繁殖, 但出瓶成活率較低, 且目前有關紅鶴頂蘭接種蘭菌的相關研究記錄很少, 故本研究擬探討接種蘭菌對紅鶴頂蘭出瓶苗生長與發育之影響, 尋求提高紅鶴頂蘭出瓶苗成活率及增進營養與生殖生長之相關蘭菌種類, 以為促進種苗大量繁殖、調節花期及提升花卉產量與品質, 俾利此具觀賞價值及經濟潛力之原生種蘭花之種原保存、復育及開發做為園藝觀賞作物並進行推廣。

材料與方法

接種源

用於本試驗的四個品系絲核菌屬蘭菌 R01(*Rhizoctonia enophytica*), R02(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-A), R15(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-Fb)及 R19(*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-G), 以上菌種鑑定方法採用 DNA 分子鑑定, 所有菌種均為本研究室自野生蘭花分離並持續進行十年以上的研究, 具有穩定的成果, 並經本研究室進行多次的致病性分析結果均無致病性(Chang, 2008)。接種源的製作乃將菌種培養於加入 20% V8 果汁至田間容水量的泥炭土, 將介質與養液混勻後, 經高溫高壓消毒後, 於無菌操作臺下, 將介質移

入太空包中，並加入約 0.5x0.5 平方公分之絲核菌屬菌種，置於 25°C，黑暗之恆溫生長箱中，進行菌種繁殖(Stevens, 1974; 周, 1997; 周, 2004)。紅鶴頂蘭接種試驗均只接種單一菌種。所有試驗菌種均寄存在新竹食品工業發展研究所菌種保存中心及臺灣大學植物病理與微生物學系沈偉強教授實驗室。

植物材料

本次試驗所採用之紅鶴頂蘭(*Phaius tankenvilleae* (Banks) Blume)瓶苗，由行政院農業委員會桃園區農業改良場(Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station)所培育提供，紅鶴頂蘭種子播種於MS之洋菜培養基，培養於25°C及16小時光照，8小時黑暗之環境，4個月後進行繼代培養，2個月後再進行一次繼代培養，出瓶苗株高8-10公分，葉片4-5片，根數4-5根。

栽培介質與栽培方法

紅鶴頂蘭瓶苗去除洋菜培養基，並清洗乾淨後，將泥炭土、椰纖、蛇木屑以1:1:1(v/v/v)的比例充分混合做為介質，並種植於直徑7公分之黑色塑膠盆中，於蘭株根部分別接種 *Rhizoctonia* spp.，例如 R01 (*Rhizoctonia enophytica*)、R02 (*Ceratobasidium* sp.)、R15 (*Ceratobasidium* sp. AG-Fb)、R19 (*Ceratobasidium* sp. AG-G)等四種不同的菌種，接種量為0.3克的接種源，連同不接種蘭菌之對照組合計五處理，每處理各種植36株，各處理採用逢機排列設計(completely randomized design, CRD)，於出瓶後隨著苗株的長大，分別使用直徑15公分及直徑18公分的盆子，陸續進行二次的換盆，初期每盆施用奧妙肥 N-P-K=14-12-14 (Hi-Control, 日本) 2g，每星期澆水一次，每二星期施液肥一次，營養生長期施用 Peter's N-P-K=30-10-10 (Scotts, Marysville, 美國) 0.5 g/L，生殖生長期施用 Peter's N-P-K=10-30-20 0.5 g/L。實驗地點為位於臺灣大學園藝分場的塑膠布溫室(海拔10公尺)，中午光合作用光量子(photosynthetic photon flux, PPF)平均值約 200-250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，平均最高溫為 32.21°C，平均最低溫為 15.21°C。

碳水化合物測試

分析方法修改自 Luchsinger 及 Cornesky (1962); Yoshida 等人(1972) 及 Lindsay (1973)。取種植 26 個月之紅鶴頂蘭植株之成熟葉片(由上往下數第 3、4 葉，並切取假球莖，先行乾燥磨粉。澱粉分析方法：1.以 80% EtOH (v/v)萃取二次及二次水萃取一次。2.取樣品殘渣加入 20 mL (20 mM, pH 6.9)的磷酸鈉緩衝液，沸水浴 15 分鐘。3.加入 0.5 mL α -澱粉酶(α -amylase)，於 37°C 水浴 16 小時。4.取 1 mL 粗萃物加入 2 mL 3,5 二硝基水楊酸(3,5-dinitrosalicylic acid)，沸水浴 10 分鐘，冷卻至室溫，加 2 mL 二次水，以分光光度計測 A_{570} 波長之數值，測得 A_{570} 波長之數值必需再除以 0.392 方為估得之澱粉含量值。總糖分析法：1.樣品以 80% EtOH(v/v)進行二次萃取後，收集二次之萃取液。2.以振盪式真空濃縮機在 40°C 下將乙醇抽乾。3.加入氯仿及二次水。3.冰浴中緩慢加入蒽酮溶液(anthrone solution)，煮沸 7.5 分鐘，於分光光度計中測 A_{630} 波長之數值，測得 A_{630} 波長之數值必需再除以 6.63 方為估得之可溶性糖含量值。

光合作用速率測定

取種植 26 個月之紅鶴頂蘭之植株，以 LI-6400 可攜帶式光合作用測定儀 (LI-COR Inc., Nebraska, U.S.A.)測定(Jiang, 1996)，測量時間為上午 9:00 至 12:00。每次測量面積為 6 平方公分，測量部位為子球(daughter pseudobulb)上第二片葉 (L_2)，距假球莖頂端 5-10 公分處。

植株性狀調查

量測植株高度、葉數、葉長、葉寬、假球莖直徑、花莖數、花莖長、花數等性狀。從每個處理 36 株重複植株中，逢機取樣 15 株進行統計分析，以 ANOVA 及 LSD 統計分析進行顯著性測驗($p < 0.05$)。

蘭菌根解剖觀察

取紅鶴頂蘭接種與未接種蘭菌的根，置於以冰醋酸調配之 0.05% 苯胺藍染液中(Koske 及 Gemma, 1989)，於室溫染色四小時，並於光學顯微鏡下(Olympus BH-2)觀察根中蘭菌的感染情形。取紅鶴頂蘭接種與未接種蘭菌的根段，以 2.5% 戊二醛

(glutaraldehyde)進行固定 12 小時，並經丙酮系列脫水後，以液態二氧化碳臨界點乾燥機(CPD)乾燥後，立即以 Biorad 離子覆膜機進行鍍金 90 秒(Dawes, 1971)，再利用掃描式電子顯微鏡(ABT-60)觀察根內感染菌根之形態，並以數位相機拍照記錄。

結果與討論

紅鶴頂蘭瓶苗接種蘭菌 22 個月後成活率調查結果，出瓶苗接種四種蘭菌之成活率均較對照組高，其中以接種 R15 及 R02 其成活率分別可達 79-81%及 78-80%，和對照組成活率僅達 48-54%相較，可提高成活率達 27-31%(R15)及 26-30%(R02)(圖 5-1)，與前人研究成果，接種蘭菌促進蘭科植物種苗成活率具相同之研究成果(Cheng 及 Chang, 2009、2011; Smith 氏等, 2009)。

調查紅鶴頂蘭瓶苗接種蘭菌22個月後之生育狀況，其中接種R02、R15所測得株高、葉長之數值均比對照組高且達顯著差異，接種R15者，其株高及葉長分別較對照組高6.3公分及長3.5公分(表5-1)，接種R01的植株其株高及葉長的數值均較對照組少。顯示紅鶴頂蘭接種絲核菌R15及R02可有效促進其存活率及營養生長，而接種R01反而對生長有不良的影響。

依據紅鶴頂蘭瓶苗接種蘭菌 22 個月後之生長結果，以接種蘭菌 R02、R15 之營養生長較好，所以於接種 26 個月後再比較對照組與接種蘭菌 R02 及 R15 蘭株之生長狀況，並進一步測量光合作用效率及分析植體內碳水化合物的含量。其中接種蘭菌之處理其營養生長表現如株高及鮮乾重等與未接種蘭菌的對照組相較已無顯著差異，可能因各種處理之蘭株均已完成 S 生長曲線之快速生長期並進入生長緩慢期，其葉數、株高等生長量已達到某種程度，營養生長接近停止，將轉入生殖生長期所致(Vacin, 1952)。

紅鶴頂蘭組培苗接種絲核菌 26 個月後，以接種 R02 之植株具較高的淨 CO_2 吸收率，平均為 $3.73 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，顯著高於接種 R15 者及對照組植株，後兩者之

差異不顯著(圖 5-2)。

文心蘭其明顯而膨大的假球莖為重要之儲存器官，其營養狀況對植株開花極具影響(Yong 及 Hew, 1995；張及李, 1999)；蕙蘭屬的植物花芽能否形成，其中假球莖內碳水化合物累積量是否達到足量以供花芽分化及開花所需為影響的要件之一(小森, 1986)。紅鶴頂蘭亦為具有假球莖之蘭科植物(蘇, 1990; Tsai 及 Chang, 2009)，因此分析接種蘭菌 26 個月後(於花芽分化初期)之紅鶴頂蘭植株之葉子及假球莖中碳水化合物之含量，以探討接種蘭菌對於紅鶴頂蘭植株生殖生長之影響及其與碳水化合物含量之相關性。結果顯示接種蘭菌 R02 之植株，其葉及假球莖之 80%乙醇可溶性糖及澱粉含量均較未接種蘭菌之對照組植株高(表 5-2)；而其中以接種蘭菌 R02 之植株其葉之 80%乙醇可溶性糖含量($95.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 及假球莖之澱粉含量($321.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)分別較對照組($73.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; $235.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)高，達顯著差異，葉及假球莖之總碳水化合物含量($122.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; $412.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)也分別較對照組高($98.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; $321.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)，亦均達顯著差異。顯然地，總碳水化合物含量大部份累積在假球莖中，且接種蘭菌 R02 之植株，其含量較對照組為高。

本實驗結果紅鶴頂蘭接種蘭菌 R02 及 R19 其第一朵花開放之到花日數約 914 天與對照組 919 天相較，約可提早 5 天開花(表 5-3)。紅鶴頂蘭種苗接種蘭菌 28.5 個月後，接種蘭菌 R01 有較高的株高，但其葉數最少，其他各處理間之營養生長未有顯著差異，接種蘭菌 R02、R15、R19 之處理其花梗長較未接種蘭菌的對照組高，接種 R02 或 R15 之花數較對照組多但未達顯著差異。接種蘭菌 R19 其花梗長 64.1 公分最長，總花數也最多 15.4 朵(圖 5-3、表 5-3)，與對照組相較達顯著差異。由以上結果可見紅鶴頂蘭接種適當蘭菌具促進其生育之效益，如接種蘭菌 R19，可促進其生殖生長。與 Lee 等人(1997)、朱(2000)、Takahashi 等人(2006)、Chang 及 Chou(2007)、及 Smith 等人(2009)在其他蘭科植物上之研究結果相近。紅鶴頂蘭植株於接種蘭菌 R02 或 R15，22 個月後其株高及葉長顯著增加(表 5-1)，所以取材接種 R02 或 R15，26 個月的植株及未接種蘭菌的對照組植株，進行碳水化

合物含量及光合作用速率之檢測。接種蘭菌 R02 之植株，可促進其光合作用且其總碳水化合物含量比對照組為高(表 5-2)，可能是與蘭花接種蘭菌後可顯著提高葉綠素含量，增加對光的利用效能有關(朱, 2000；張, 2003；周, 2004；陳, 2005)；此外，蘭菌分解纖維素使纖維素轉變成為可被植物體吸收之碳水化合物(Smith, 1966)，蘭科植物除了碳來自於真菌之外，Alexander 等人於 1984 年發現 *Goodyera repens* 之菌根植株所獲得的磷較非菌根植株多了超過 100 倍以上。磷和氮從真菌轉移給植物藉由輻射標誌試驗已經被證實(Cameron 氏等, 2006,2007)，蘭共生菌的大量感染，可提供碳源外，蘭共生菌尚會提供礦物質、維他命等養分的運移(Bernard, 1911; Hadley, 1984; Alexander 及 Hadley, 1985)及促進幼苗對氮、磷及鉀的吸收(Alexander 及 Hadley, 1984; Zhao 氏等, 1999)，而促進其生育，導致生長與開花會優於對照組。

菌根感染模式

利用光學顯微鏡觀察，紅鶴頂蘭未接種蘭菌之對照組，其根部皮層細胞無菌絲團塊形成(圖 5-4A)，接種蘭菌 R02 之根部皮層細胞具由菌絲纏繞而成之菌絲團塊(圖 5-4B)，由光學顯微鏡之觀察可快速得知蘭株受蘭菌感染情況，但只能觀察到感染狀態之平面構造，因此進一步以 ABT-60 之掃描式電子顯微鏡進行觀察，未接種蘭菌之對照組，其根部皮層細胞無菌絲團塊形成(圖 5-5A)，接種蘭菌 R02 之根部皮層細胞具由菌絲纏繞而成之菌絲團塊(圖 5-5B)，局部放大後可觀察到菌絲感染細胞形成之菌絲團塊(P) (圖 5-5C)，及細胞內正在解體消化之菌絲團塊(P) (圖 5-5D)，菌絲團塊崩解之後，菌絲會再向細胞的四周延伸，再穿過另一個未感染的細胞進行感染，如此不斷的侵入感染及形成菌絲團塊，以進行整個根部的感染，由以上的觀察結果推斷，紅鶴頂蘭接種絲核菌屬蘭菌之感染模式應該屬於菌球消化型。紅鶴頂蘭根部接種蘭菌 R15 及 R19 之根內部皮層細胞也可看到類似正在解體消化之菌絲團塊(P) (圖 5-5E、F)，可見紅鶴頂蘭根部接種不同種類絲核菌其根內部受感染的構造相類似。

結論

綜合絲核菌屬蘭菌在紅鶴頂蘭生產上之效益包括增加組織培養苗移植存活率、促進生長及開花、增加花朵數等。紅鶴頂蘭接種蘭菌 R02 及 R15 其總碳水化合物含量較對照組高，其總花朵數之數值亦均較未接種蘭菌之對照組高，接種蘭菌 R02 及 R15 之植株其淨 CO₂ 吸收率亦均較對照組高，由此推測接種蘭菌可提升紅鶴頂蘭植株光合作用速率，進而促進其生殖生長。建議可接種蘭菌 R15 而提升紅鶴頂蘭的瓶苗移植成活率且接種蘭菌 R02 或 R15 或 R19 可促進生殖生長。本試驗結果得知，紅鶴頂蘭接種蘭菌可以促進光合作用速率、植株活力及生殖生長。藉由蘭菌的應用，一些瀕危蘭花，將可進行大量的商業化生產而達到保護與復育之目的。蘭科植物與蘭菌的共生研究，應用於蘭科植物的復育已有很多相關的報導(Batty 氏等, 2001; Beltran-Nambo 氏等, 2010; Phillips 氏等, 2011; Ruangwut 氏等, 2011)，利用蘭菌的研究成果，將可更進一步地應用於瀕危蘭科植物的復育，及做為商業化生產的應用技術之一。蘭科植物進行蘭菌的接種，其方法非常地簡單，只需於每株蘭科植物的根部接種 0.3 克左右的蘭菌接種源，接種技術容易學習，接種的蘭科植物植株可以大大地提高其成活率，促進生長與發育，希望此接種技術能有助於瀕危蘭科植物種類的復育。本文為在臺灣所進行紅鶴頂蘭接種蘭菌能促進營養生長與生殖生長之首次發表。

參考文獻

- 小森照彥. 1986. シビジウムの光管理と生育開花および光合成産物の關係。農耕と園藝 43(12):122-125。
- 王元甫. 2005. 蘭菌與植物生長素對蝴蝶蘭生長與開花之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 80 頁。
- 朱俊南. 2000. 蘭花菌根菌之分離與接種對文心蘭幼苗生長之影響。屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文, 101 頁。
- 吳新棋. 1991. 紅鶴頂蘭無菌播種與開花之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 95 頁。
- 李沐馨. 1989. 紅鶴頂蘭之生長習性研究與繁殖。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 128 頁。
- 周玲勤. 1997. 彩葉蘭之大量繁殖與蘭菌的利用。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文, 124 頁。
- 周玲勤. 2004. 臺灣金線連、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與培育。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 169 頁。
- 張允瓊、李咩. 1999. 文心蘭‘Gower Ramsey’假球莖與花序之生長、形態與解剖。中國園藝 45(1):87-99。
- 張正、簡婉婷. 2010. 紅鶴頂蘭庭園栽培之生長評估。植物種苗 12:13-22。
- 張喜寧. 2003. 蘭菌的量產與應用 農業生物技術國家型研發應用計畫第二年期末報告。
- 陳孟妘. 2005. 環境因子蘭菌與植物生長物質對帶花梗蝴蝶蘭貯運後生長及開花品質之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 127 頁。
- 葉志新、廖芳心、鄭隨和. 2007. 臺灣原生鶴頂蘭屬簡介。桃園區農業專訊 59:17-19。
- 蔡雅竹. 2010. 紅鶴頂蘭遠緣雜交及花梗培養。國立中興大學園藝研究所碩士論文,

105 頁。

蔡麗君. 2003. 蘭菌與植物生長素對拖鞋蘭生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 79 頁。

鄭誠漢、鄭淑芬、張喜寧. 2006. 臺灣稀有原生蘭科植物-粗莖鶴頂蘭種子之發芽研究初報 8:39-47。

藍亦青. 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 93 頁。

蘇鴻傑. 1990. 臺灣野生根節蘭及鶴頂蘭之分類及生態研究 II、根節蘭屬柱唇節蘭、鶴頂蘭屬及肖頭蕊蘭屬。臺大實驗林研究報告 4:81-96。

Alexander C, and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol 101:657-665.

Alexander, C. and G. Hadley. 1984. The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. New Phytol. 97:391-400.

Alexander, C. E. and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol. 101:657-665.

Batty, AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. New Phytol. 152:511-520.

Bechtel, H., P. Cribb and E. Lannert. 1986. The Manual of Cultivated Orchid Species.

The MIT Press, Cambridge. pp.72-74, 361-362.

Beltran-Nambo MA, Carreon-Abud Y, Ortega-Larrocea MP. 2010. Mycorrhizal Colonization Patterns of Three *Bletia* Species in a natural forest reserve in Michoacán, Mexico. *Acta Hort.* 878:43-52.

Bernard, N. 1911. Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydees. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 14:2 23-234.

Cameron, D. D., I. Johnson, J. R. Leake, and D. J. Read. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Ann Bot* 99:831–834

Cameron, D. D., J. R. Leake, and D. J. Read. 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.

Chang, D. C. N. 2008. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In: W. H. Chen and H. H. Chen (eds), *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Toh Tuck Link, Singapore, pp.77-98.

Chang, D. C. N. and L. C. Chou. 2007. Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by *Rhizoctonia* orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Bot. Stud.* 48:445-451.

Cheng, S. F. and D. C. N. Chang. 2009. Growth responses and changes of active

components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata. Bot. Stud. 50:549-466.

Cheng, S. F. and D. C. N. Chang. 2011. Growth responses and changes of active components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata. In: W. H. Chen and H. H. Chen (eds), Orchid Biotechnology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Toh Tuck Link, Singapore, pp.49-63.

Dawes, C. J. 1971. Biological techniques in electron microscopy. International Textbook Series, Barnes & Noble Inc. N. Y. 193 pp.

Hadley, G. 1984. Uptake of C¹⁴ glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorm. New Phytol. 96:263-273.

Jiang, G. 1996. LI-6400 portable photosynthesis system principle, function, basic operation and main problems and solutions during measurement. Chin. Bull. Bot. 13:72-76.

Koske, R. E. and J. N. Gemma. 1989. A modified procedure staining roots to detect VA mycorrhizas. Micol. Res. 92:486-505.

Lee, S. S., S. S. Park, T. J. Kim, and K. Y. Paek. 1997. Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium kanran* and *Cymbidium goeringii*, and root infection of orchid mycorrhizal fungus. Kor. Soc. Hort. Sci. 38:176-182.

Lindsay, H. 1973. A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with

3,5-dinitrosalicylic acid. *Potato Res.* 16:176-179.

Luchsinger, W. W., and R. A. Cornesky. 1962. Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal. Biochem.* 4:346-347.

Mukherjee, A. 1979. Ornamental *Phaius* as house plant. *Indian Hort.* 24:23-28.

Phillips, R. D., M. D. Barrett, K. W. Dixon, S. D. Hopper. 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *J. Ecol.* 99 : 858-869.

Ruangwut C., B. Dell., S. Vessabutr, B. Bussaban and S. Lumyong. 2011. Endophytic fungi from *Pecteilis Susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza* 21:221-229.

Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seeding nutrition. *New Phytol.* 65:488-499.

Smith, Z., E. A. James, M. J. McDonnell and C. B. McLean. 2009. Planting conditions improve translocation success of the endangered terrestrial orchid *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae). *Aust. J. Bot.* 57:200-209.

Stevens, R. B. 1974. *Mycology guidebook*. University of Washington, Seattle.

Su HJ. 1989. Numerical taxonomy on the native species of *Calanthe* and *Phaius* (Orchidaceae) in Taiwan. *Quart. J. Exp. Forest Nat. Taiwan Univ.* 3:57-79.

Su, H. J. 2000. *Phaius*. In: Huang, T. C. *et. al.* (eds.), *Orchidaceae*. *Flora of Taiwan*, 2nd edition. 5:1001-1003. Editorial Committee, Dept. Bot., NTU, Taipei, Taiwan.

- Takahashi, K., H. Kumagai, and I. Ogiwara. 2006. Effect of orchid mycorrhizal fungi on the growth of daughter tubers in *Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng. Plantlets raised from tubers *in vitro*. Hort. Res. (Japan) 5:13-17.
- Tsai, Y. C. and C. Chang. 2009. The breeding history and parents analysis of *Phaius tankervilleae*. Seed & Nursery (Taiwan) 11:37-50.
- Vacin, E. F. 1952. Growth and flowering of cymbidiums in the original habitats. Amer. Orchid Soc. Bull. 21:601-613.
- Wu, P. H., D. D. Huang, and D. C. N. Chang. 2011. Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's Growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. Afr. J. Biotechnol. 10(50):10095-10100.
- Yong, W. H. and C. S. Hew. 1995. The importance of photoassimilate contribution from the current shoot and connected back shoots to inflorescence size in the thin-leaved sympodial orchid *Oncidium* 'Goldiana' Int. J. Plant Sci. 156:450-459.
- Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cock, and K. Z. Gomez. 1972. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice (2nd ed.) p.38 International Rice Res. Inst., Los Banos.
- Zhao, Y., S. Guo, W. Gao, and S. Du. 1999. The symbiosis of three endophytic fungi with *Cymbidium* sp. and its effects on the mineral nutrition absorption. Acta Horti. Sinica. 26:110-115.

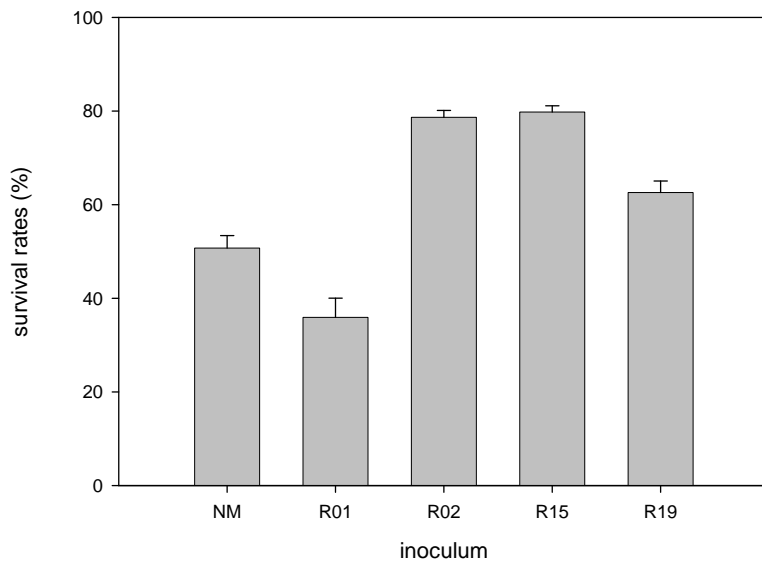


圖 5-1. 紅鶴頂蘭組培苗接種絲核菌屬蘭菌(R01, R02, R15, 或 R19)22 個月後存活率之比較。

Fig. 5-1. Survival rates (%) of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume seedlings inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R15, or R19) of orchid mycorrhizal fungi after 22 months of *ex vitro* growth. NM indicates non-mycorrhizal control.

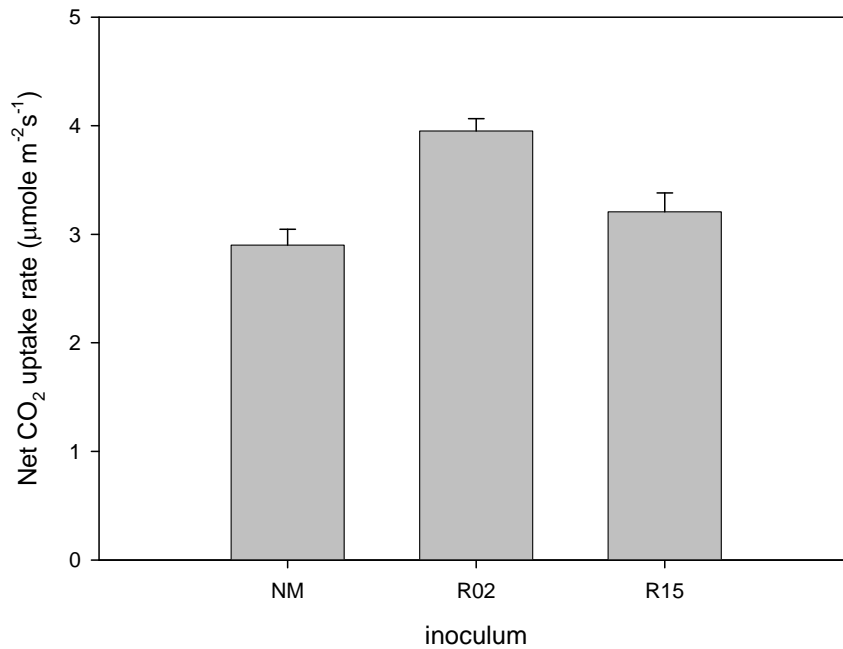


圖 5-2. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類的絲核菌 26 個月後之淨 CO₂ 吸收率的變化。

Fig. 5-2. Net CO₂ uptake rate for *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume seedlings after inoculated with orchid mycorrhizal fungi for 26 months. NM indicates non-mycorrhizal control.

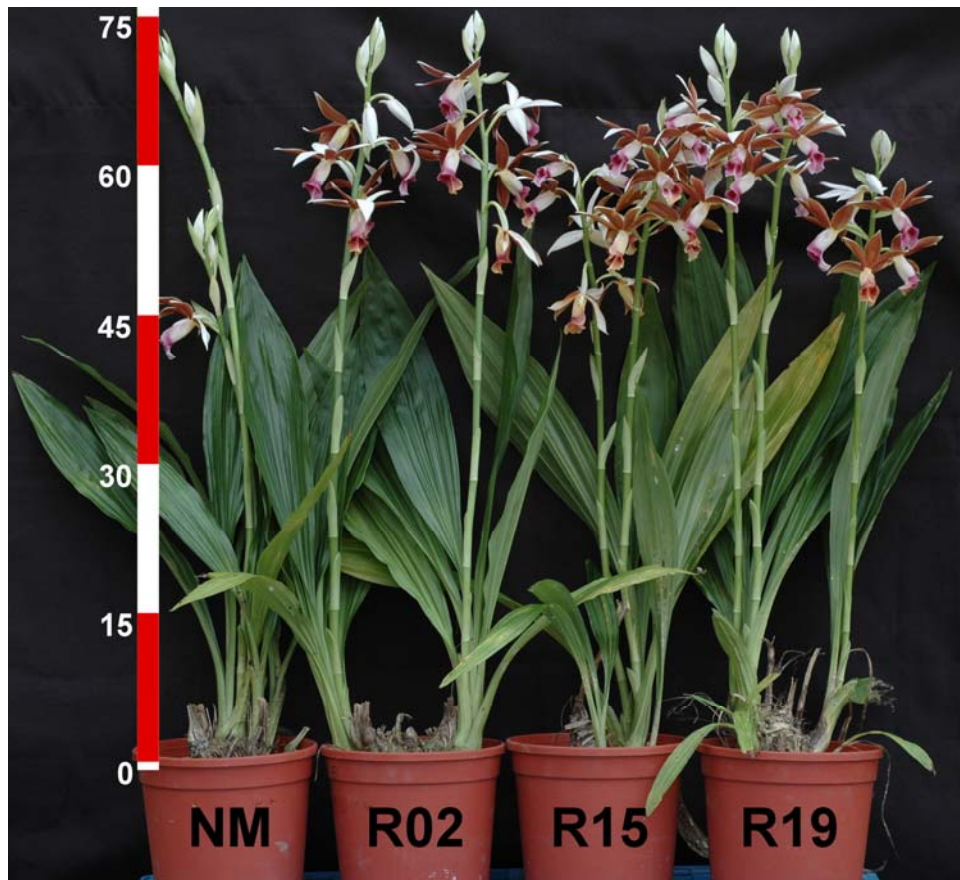


圖 5-3. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類絲核菌 30.5 個月後之營養生長與生殖生長。

Fig. 5-3. Vegetative and reproductive growth of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume seedlings after inoculated with various *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi for 30.5 months. NM indicates non-mycorrhizal control.

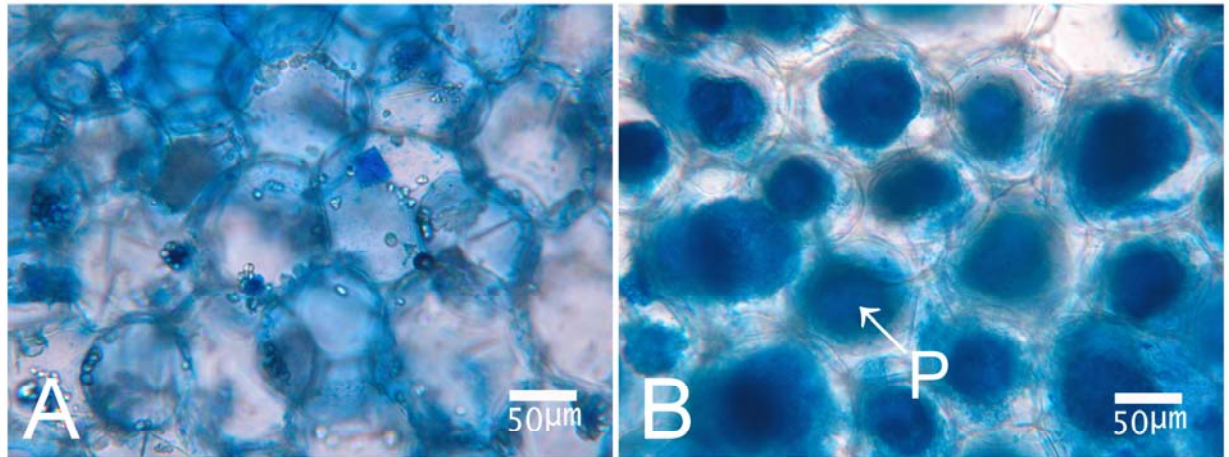


圖 5-4. 紅鶴頂蘭根部受絲核菌 R02 感染 22 個月之構造經 0.05% 苯胺藍染色之光學顯微鏡觀察。A. 對照組。B. 根部接種 R02 菌絲內部皮層細胞感染情形。

Fig. 5-4. Optical microscopic observation of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume roots as inoculated with *Rhizoctonia* sp. of orchid mycorrhizal fungus (R02) for 22 months and stained with aniline blue (0.05%). A, Control. B, Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) as inoculated with R02. A, Control. B, Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) as inoculated with R02.

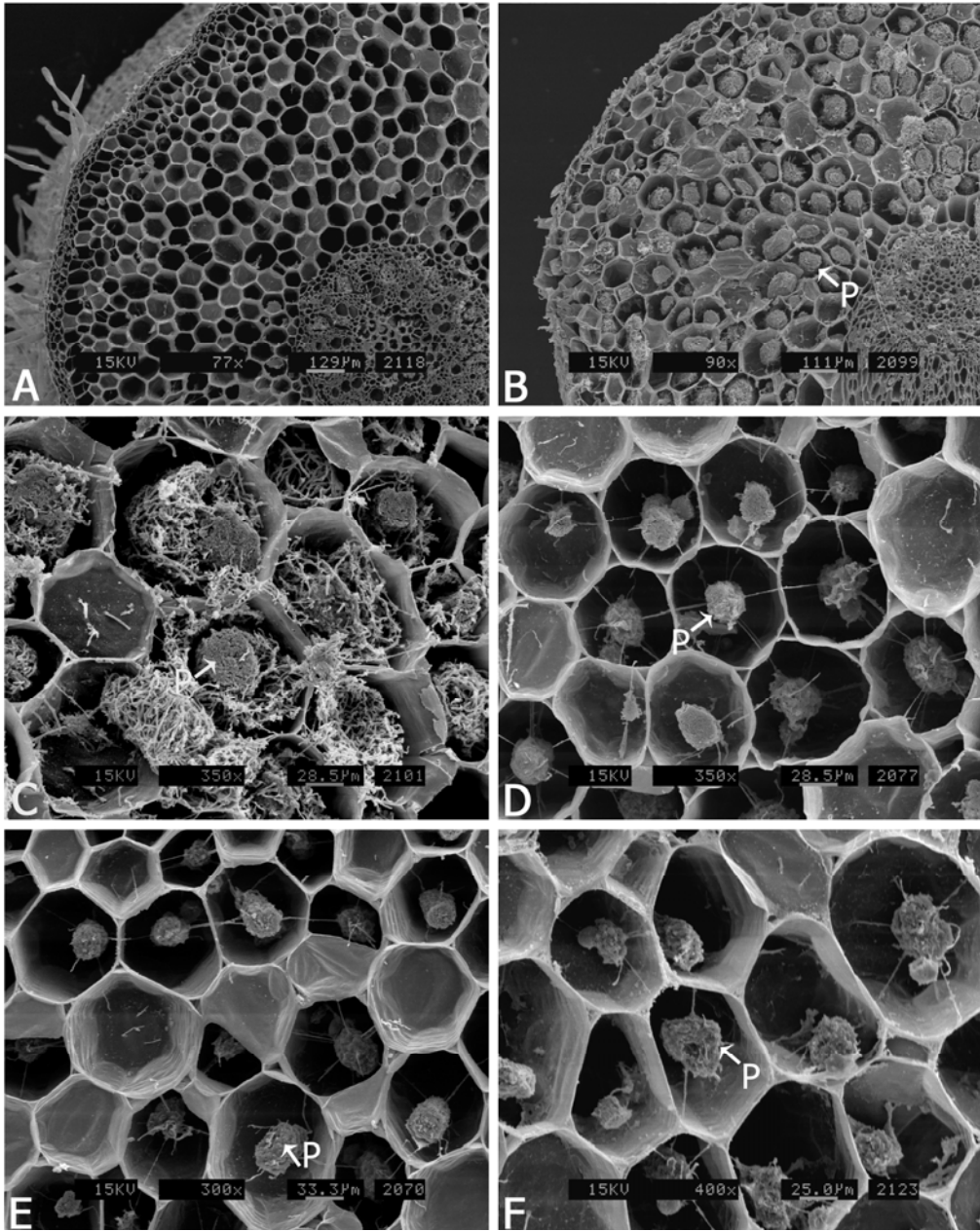


圖 5-5. 以掃描式電子顯微鏡觀察紅鶴頂蘭根內部受蘭菌 R02(A-D), R15(E) 及 R19(F) 感染 22 個月之構造變化。

- A. 對照組。
- B. 根部接種 R02 菌絲內部皮層細胞感染情形。
- C. 根部接種 R02 菌絲其菌絲感染細胞形成之菌絲團(P)。
- D. 根部接種蘭菌 R02, 細胞內正在解體消化之菌絲團塊(P)。
- E. 根部接種蘭菌 R15, 細胞內正在解體消化之菌絲團塊(P)。
- F. 根部接種蘭菌 R19, 細胞內正在解體消化之菌絲團塊(P)。

Fig. 5-5. SEM observation of structural changes by hyphal infection in the cortex cells of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume roots after inoculated with *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi R02 (A-D), R15 (E), or R19 (F) for 22 months.

- A. Control.
- B. Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02.
- C. Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02 and the formation of peloton (P).
- D. Later stages of pelotons (P), which were digested in the roots of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02.
- E. Later stages of pelotons (P), which were digested in the root of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R15.
- F. Later stages of pelotons (P), which were digested in the root of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R19.

表 5-1. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類的絲核菌 22 個月之營養生長。

Table 5-1. Vegetative growth of micropropagated *Phaius tankervilleae* seedlings after inoculated with various *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi for 22 months.

<i>Rhizoctonia</i> inoculum	Plant height (cm)	no. of leaves	leaf length (cm)	leaf width (cm)
NM ^x (CK)	25.2 cd	4.0 a	19.4 b	4.7 ab
R01	21.8 d	3.3 b	16.4 c	4.3 b
R02	30.6 ab	3.9 ab	22.9 a	5.2 a
R15	31.5 a	4.2 a	22.9 a	5.0 a
R19	28.4 abc	3.7 ab	20.5 ab	4.8 ab
ANOVA F values (df=4,70)	2.04 8.8	2.2	7.2	2.9

^xNM = non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R19 = orchid mycorrhizal fungi
Each treatment had 15 replicates.

The effect of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Mmeans in each column followed by the different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

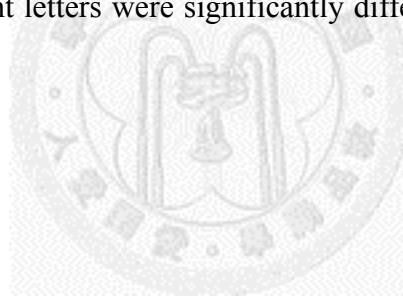


表 5-2. 紅鶴頂蘭組培苗接種絲核菌(R02, R15) 26 個月其葉子及假球莖之碳水化合物含量之變化。

Table 5-2. Carbohydrate content of leaf and pseudobulb for seedlings of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume after inoculated with orchid mycorrhizal fungi (R02, R15) *ex vitro* for 26 months.

<i>Rhizoctonia</i> spp. of inoculum	Leaf		Pseudobulb	
	80% EtOH soluble sugars (mg·g ⁻¹)	Total carbohydrate (mg·g ⁻¹)	Starch (mg·g ⁻¹)	Total carbohydrate (mg·g ⁻¹)
NM ^X (CK)	73.8 b	98.3 b	235.4 b	321.2 b
R02	95.5 a	122.8 a	321.5 a	412.1 a
R15	91.3 ab	110.0 ab	313.6 a	389.5 a
ANOVA F values 2.53 (df=2,26)	6.3	8.1	23.7	24.1

^XNM = non-mycorrhizal control; R02, R15 = orchid mycorrhizal fungi.

Each treatment had 9 replicates

The effect of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

表 5-3. 紅鶴頂蘭組培苗接種不同種類絲核菌屬蘭菌之始花日數及 28.5 個月之生殖生長。

Table 5-3. Dates to flower and reproductive growth of micropropagated *Phaius tankervilleae* seedlings after inoculated with various *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi for 28.5 months.

<i>Rhizoctonia</i> spp. of inoculum	Days to flower after OMF inoculation	Plant height (cm)	Flower stalk length (cm)	no. of flowers
NM ^x	918.8 a	46.2 b	53.9 c	11.9 b
R01	916.1 ab	54.2 a	62.6 ab	11.6 b
R02	914.0 b	41.6 b	59.6 ab	14.2 ab
R15	915.6 ab	41.7 b	60.2 ab	14.2 ab
R19	914.4 b	45.0 b	64.1 a	15.4 a
ANOVA F values 2.04 (df=4,70)	4.1	10.5	9.2	7.7

^xNM = non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R19 = orchid mycorrhizal fungi. Each treatment had 15 replicates.

The effect of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

Abstract

Four orchid mycorrhizal fungi (OMF), R01 (*Rhizoctonia solani*), R02 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-A), R15 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-Fb) and R19 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-G) were isolated from native orchid roots in Taiwan then were inoculated on the root of *Phaius tankervilleae* (Banks). Inoculated with the appropriate OMF will increase survival rate 27-31% (R02;R15), plant height 6.3 cm (R15), leaf length 3.5 cm (R15), flower stalk length 10.2 cm (R19) and number of flowers per flower stalk (3.5) on *ex vitro* growing of *P. tankervilleae*. When the plants of *P. tankervilleae* were inoculated with OMF (R19), reproductive growth was promoted, and photosynthetic rate and carbohydrate content increase significantly by inoculated with OMF (R02). Microscopic studies showed that infection of *P. tankervilleae* by *Rhizoctonia* spp. was a tolypophagy type, with hyphal coils and pelotons (mycelial masses) formed in the cortical regions of roots. The *P. tankervilleae* inoculated with the R15 isolate had a higher seedling survival rate than other treatments. Additionally, inoculation with the R02, R15, or R19 isolate of *Rhizoctonia* spp. promoted *P. tankervilleae* reproductive growth, thus their practical uses were recommended.

Keywords: *Phaius tankervilleae*, *Rhizoctonia*, reproductive, Net CO₂ uptake rate,

carbohydrate

第六章 總結

1. 由臺灣北、中、南等不同地區，採集不同種類蘭科植物根部分離內生真菌，得知不同的蘭科植物種類，其根內生真菌的種類也有所不同；同種類蘭科植物在不同地域環境，根內亦含有不同種類的內生菌；地區的環境和氣候是影響蘭科植物內生真菌種類的重要因子。臺灣野生蘭科植物內生真菌實具有豐富的多樣性，尤其炭角菌(*Xylaria*)對蘭科植物具有何種功能未見任何報導，值得更進一步的探討與研究。
2. 目前已有很多應用木黴菌屬(*Trichoderma*)真菌相繼開發成生物防治製劑的產品問世，本試驗所分離的木黴菌屬(*Trichoderma*)菌株亦具開發之潛力，利用本試驗所分離之不具致病性之鐮孢菌(*Fusarium*)，做為防治以感染鐮孢菌(*Fusarium*)所致之病害的利用，亦應進一步研究其實用性。
3. 本試驗顯示從不同地區之蘭科植物的根部所分離的內生真菌數量和種類存在一定的差異，於不同地區採集之蘭科植物其根部內生真菌具有一定的多樣性。植物內生真菌是一類相對來說開發較少、次生代謝物豐富、應用前景廣闊的資源微生物。本試驗所分離之內生真菌經進一步之研究與試驗，應用於促進植株生長與病害的防治，將有助於逐漸遭受破壞之臺灣原生蘭科植物之保育與復育。
4. 利用塑膠袋套袋栽培法栽培臺灣金線連組培苗，七個月後成活率均在 80%以上，在不需施用任何化學農藥的條件下成功培育並顯著提高植株產量，且比傳統栽培法縮短栽培期 1-2 個月，且已經證實具有實用價值。
5. 種植於臺大之臺灣金線連 B 及 R 兩品系均以接種 R02 之菌根植株有較高的總酚類及保肝活性成分金線連苷(AFEE)之含量。以 Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)的方法分析測試其抗氧化能力，結果顯示大部份菌根植株較非菌根植株為高。接種蘭菌 R02 及 R04 可顯著增加臺灣金線連的產量，並提高抗氧化能力及保肝成分之含量，建議金線連業者能多加應用在其栽培上，以生產無農藥殘餘之

金線連植株。

6. 臺灣金線連接種絲核菌屬蘭菌可顯著促進生長，但不同品種及不同生長環境其促進生長的最適菌種也有所不同。臺灣金線連之總酚類含量及抗氧化能力之測試與保肝成分 AFEE 分析的結果顯示，臺灣金線連抗氧化能力及保肝成分 AFEE 之含量，受環境、品種及蘭菌種類的影响，本試驗結果顯示溫度及光度是影響臺灣金線連植株生長與藥效的重要環境因子，於不同環境中接種適當絲核菌屬蘭菌，其菌根植株可較非菌根植株含有較多的總酚類含量、較佳的抗氧化能力及較多的保肝成分 AFEE 含量，可以推測野生臺灣金線連植株受野外蘭菌感染為菌根植株而較一般溫室栽培之植株更具藥效。
7. 綬草種子以接種 R02 之燕麥培養基(OMA)，其促進發芽之效果最好，也最穩定，接種蘭菌 R02 處理者，播種後 15 天可發芽，較無菌播種者(播種後 75 天才發芽)，約可提早 2 個月發芽。
8. 接種 R02 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)可促進綬草種子發芽，並提高發芽率；播種於先行接種 R02 於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)15 天(播種前先刮去生長於培養基表面的菌絲)，於播種 40 天後發芽率最高達 80.2%，而未接種者，發芽率為 0%。
9. 種植三個月的綬草採用泥炭土加椰纖 2:1 體積比之混合介質，有最高的成活率 100%，及較佳的營養生長；20/15°C 之溫度處理下，以接種 R02 所需到花日數最短，於移到簡易塑膠溫室平均 59 天後第一朵花開放，較其他各處理均提早 10 天以上開花。
10. 綬草於不同溫度處理 86 天後，移往簡易溫室 120 天觀察及測量其生育狀況，於四種不同溫度處理下之營養生長，其中均以接種 R15(*Ceratobasidium* sp. AG-Fb)可促進地上部的生長，具較多的葉數，接種 R19 則可促進地下部的生長，具較多的根數及較重的根鮮重；15/13°C 下以接種蘭菌 R15 每株的花梗數最多(7.22);於 20/15°C 下以接種蘭菌 R19(*Ceratodasidium* sp. AG-G)每株的花梗

數最多(8.78)，花穗也最長(16.91 公分)。本研究證實綬草之種子發芽及出瓶後之生長與發育皆可被蘭菌接種之顯著促進，極具實用價值。

11. 紅鶴頂蘭接種適當的蘭共生菌，與對照組相較可顯著提高紅鶴頂蘭瓶苗之移植成活率 27-31%(R15)和 26-30%(R02)及增加株高 6.3 公分(R15)、葉長 3.5 公分(R15)、花莖長度 10.2 公分(R19)及每枝花莖之花朵數 3.5 朵，而增加其花的產量(R19)。接種絲核菌 R02 的植株，其光合作用速率平均 $3.73 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 顯著高於對照組，且可比對照組增加葉及假球莖之總碳水化合物含量 $24.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 $90.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。
12. 用於進行試驗的絲核菌屬蘭菌 R02 (*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp.;AG-A)，為本研究室持續進行十餘年的研究，具有穩定的成果，並經本研究室進行多次的致病性分析，均證明為無致病性之菌種，經前人研究得知，絲核菌屬蘭菌 R02 可以促進彩葉蘭、金線連、蝴蝶蘭、拖鞋蘭、石斛等之種子發芽與植株生長，本論文試驗研究亦證明接種絲核菌屬蘭菌 R02 可以促進金線連、綬草、紅鶴頂蘭之種子發芽與植株生長，絲核菌屬蘭菌 R02 是一個廣泛推廣應用於蘭科植物種類的菌種，其相關的資料彙整於附錄一。

蘭菌分離調查及尚待進行之相關研究

1. 蘭科植物是一類具觀賞及藥用價值之高經濟作物，雖然大部份種類已可利用組培方法進行繁殖，但仍存在著移植無菌苗生長緩慢，甚至不開花，生長勢明顯劣於原生地自然狀態之相關困境，本試驗從臺灣北、中、南三區之 25 處地方，採集 69 種原生蘭科植物，共分離到內生真菌 500 餘株，足見臺灣原生蘭科植物內生真菌之多樣性，建議擴大調查的空間與時間，繼續被分離之蘭科植物內生真菌將無可限量，可說是巨大的基因多樣性的寶庫。
2. 本計畫試驗分離出之蘭科植物內生真菌，菌種均已寄存在新竹食品科學研究所的菌種中心及臺灣大學植物病理與微生物學系沈偉強教授實驗室，這些內生真

菌種相關效用是否可促進蘭科植物種子發芽、是否可產生植物激素和維生素，促進植物生長，是否可做為真菌誘導子增強蘭科植物的抗性等，仍需要進一步一一驗證，亟需有興趣者共同努力研究。目前已有很多應用木黴菌屬 (*Trichoderma*) 真菌相繼開發成生物防治製劑的產品問世，本試驗所分離的木黴菌屬 (*Trichoderma*) 菌株亦具開發之潛力，利用本試驗所分離之不具致病性之鐮孢菌 (*Fusarium*)，做為防治已感染鐮孢菌 (*Fusarium*) 所致之病害的利用，亦應進一步研究其實用性。本試驗所分離之內生真菌經進一步之研究與試驗，應用於促進植株生長與病害的防治，將有助於逐漸遭受破壞之臺灣原生蘭科植物之保育與復育。至今炭角菌屬 (*Xylaria*) 對蘭科植物生育的影響仍有待探討。

3. 為了增加農作物產量，噴施農藥遂成為重要的手段，化學殺菌劑對生態環境，有益生物及人體所引致副作用也因而逐漸加大，植物病原菌之抗藥性也日益增加，部分内生真菌可做為生物殺菌劑來防治植物病害，以減輕化學農藥對環境污染。近幾年已有多種商品化木黴製劑研製開發成功，並實際應用於植物的生物防治上，其他如無致病性鐮孢菌亦可能具有生物防治的商業價值，透過蘭科植物内生真菌的分離，可進一步尋找開發出具生物防治功能之生物防治製劑。
4. 内生真菌能誘發宿主產生豐富與多樣的二次代謝產物，類似於生長素能促進植物生長，且來自天然，與環境相容性較好，不易造成環境污染，從蘭科植物根部分離之內生真菌，尋找各種蘭科植物之促進生長與發育之適當菌種，並將該菌種開發成生物肥料製劑。
5. 經前人及本計畫的研究得知，原生蘭科植物根部中可分離出很多的内生真菌，採用不同表面消毒時間，獲得的内生菌群落組成有較大差異，分離效果不一。而不同的内生真菌，適用的分離培養基不同，分離培養溫度也不同，甚至有些菌種無法透過分離的方式成功培養。自然條件下，微生物本來就是混居的，並不是單獨存在的，不少微生物至今難以人工培養和檢測，許多微生物只有混合培養時才能生長，而在純培養時就不能生長，因此内生真菌的分析研究有待深

入，在分析方法上更有待改進；現在沒有一種理想的培養方法可以檢測到所有的植物內生菌，尋找一種確實可行的植物內生菌檢測方法對於植物內生真菌生物學和生態學研究尤為重要。利用環境基因組學(metagenomics)的發展如異源DNA 表達技術，也許可直接躍過難控的培養環節直接發現不可培養內生真菌。從原生蘭科植物(宿主)根部分離出之內生真菌，兩者之間的相互關係及精確過程為何？兩者之間基因轉移重組如何進行，及對進化，對各自的產物合成積累又發揮了什麼樣的作用？宿主對內生真菌生命過程有那些重要作用？內生真菌對提高宿主生態適應力的共生機制又是什麼？均有待進一步之探討。

6. 從蘭科植物根部分離出大量的內生真菌菌株，分離培養工作量大，鑑定過程繁瑣複雜，因此建立快速、簡單、能夠更好反映微生物群落結構的方法，顯得十分迫切。
7. 經前人及本計畫的研究得知，促進蘭科植物種子發芽、營養生長、與生殖生長等不同生長階段需求不同種類的菌根真菌，了解各種蘭科植物於不同生長階段其菌根真菌的動態變化特點，有助於對實際應用菌根真菌於蘭科植物之繁殖與商業化生產。
8. 經前人及本計畫的研究得知，內生真菌具提高藥用蘭科植物之藥用成分，內生真菌對藥用蘭科植物具體的作用及促進產生藥用活性物質的機理作用均有待更進一步的研究。
9. 將植物內生真菌應用於實際生產，需要解決的問題很多，植物的栽培條件，栽培措施，自然環境，微生態環境，內生真菌的形態穩定性等因素都影響內生真菌發揮作用，因此利用植物內生真菌做為病害防治之生物農藥或促進生長之生物肥料，必須考慮其生態學，病理學和形態學等方面的影響。
10. 蘭科植物內生真菌是蘭科植物與真菌形成的共生聯合體，真菌在蘭科植物的生長和生命活動中具有重要的作用，深入了解蘭科菌根的特點，篩選優良的蘭科內生真菌資源，加強對防禦和次生代謝相關酵素之研究，將菌劑技術應用於蘭

科植物工業化生產上，對解決蘭科植物的種植方面的問題有重大幫助，因此擴展蘭科植物及其內生真菌之間的研究，對理論探討和生產應用都具有重要意義。

11. 持續針對蘭科植物內生真菌進行全面性及系統性的調查與研究，並借助於其他學科的研究方法和手段，才能推動蘭科植物內生真菌研究的不斷深入。



附錄一

絲核菌屬蘭菌 R02 的形態與應用

用於進行試驗的絲核菌屬蘭菌 R02 (*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp. AG-A)，為本研究室蔡靜怡同學，於 1995 年 8 月，自南投縣梅峰山區採集白雁根節蘭(*Calanthe arisanensis* Hayata)植株根部所分離得到，並持續進行十餘年的研究，具有穩定的成果，並經本研究室進行多次的致病性分析，均證明為無致病性 (Chang, 2008)之菌種，並申獲專利權(發明第 I 267499 號)。在核糖體基因及轉錄區間的 DNA 序列比對中，R02 與多核 *Rhizoctonia* AG-6 較為接近(李國基, 2001)。

絲核菌屬蘭菌 R02，其菌種的形態特徵說明如下(蔡, 1997)：

1. 菌落(Colony)特徵：

正面：呈黃白色(yellowish white)，具棉絮狀(floccose)。

背面：同正面顏色。

2. 菌絲顏色：黃白色(yellowish white)

3. 菌絲寬度：介於 4-5 μm ，平均寬度 4.34 μm 。

4. 念珠狀細胞(monilioid cell)：

長度 14-25 μm ，平均 19.4 μm 。

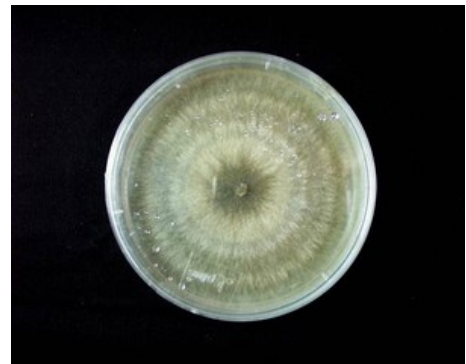
寬度 9.6-14 μm ，平均 11.9 μm 。

長寬比 L/W，1.4-1.8，平均 1.58。

5. 菌絲生長速率：每天生長 10-11 mm。

6. 核數：雙核。

7. 不產菌核。



R02 菌落正面形態

絲核菌屬蘭菌 R02，其菌種繁殖條件說明如下(李明治, 2001)

以 GY 培養基(glucose 2%、yeast extract 1%)來培養 R02 菌株，結果顯示，R02 菌株喜黑暗環境，在溫度 25~30°C，培養基 pH 5.5~6.5，葡萄糖濃度為 2~4%，酵母抽出物濃度為 1~2%等條件下培養 10 天，即能生產出具有高活力且高產量之菌絲。

絲核菌屬蘭菌 R02 菌株為蘭科植物良好之蘭共生真菌，經過本研究室十餘年的研究，得知絲核菌屬 R02 之菌種，接種台灣金線連，可促進其側芽數、節間數、根數、葉片數、株高及鮮重等之生長(蔡, 1997)；R02 之菌種接種彩葉蘭，具有最佳的促進生長效果；R02 之菌種接種彩葉蘭與金線連的雜交種種子，其共生發芽的效果較佳(周, 1997)；R02 之菌種接種彩葉蘭與金線連雜交種小苗可促進葉長、株高、鮮重之生長，且可促進其根、莖、葉之生長，以 R01 與 R02 兩種菌種混合接種彩葉蘭與金線連之雜交種，其生長勢與對照組相較，植株均較壯碩且高大(李, 1999)；套袋栽培之台灣金線連接種混合菌種 R02、R07、R08、R09 (即 R02+R07+R08+R09)具顯著促進生長效果(李明治, 2001)；R02 之菌種接種臺灣金線連及彩葉蘭道生種種子其共生發芽之促進效果最佳(張, 2001；周, 2004)。R02 之菌種接種紅花蝴蝶蘭雜交種(*Dtp. Luchia Davis* x *Dtp. Taisuco Firebird*; J21)和白花蝴蝶蘭雜交種(*Dtp. Taisuco Beauty* x *Phal. Luchia Lip*; DF) 等兩品種的蝴蝶蘭均有顯著的生長促進效果，R02 之菌種接種紅花蝴蝶蘭雜交種(*Dtp. Luchia Davis* x *Dtp. Taisuco Firebird*; J21)具促進開花之效果，接種一年後約有 40%的植株開花，且根部不定根數量較對照組多(藍, 2001)；種植兩年的芭菲爾鞋蘭(*Paph. Maudiae* type)小苗接種蘭菌 R02 可增加鮮重(藍, 2001)；鐵皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Linkl.)出瓶苗接種蘭菌 120 天後，以接種 R01 及 R02 皆可促進生長，其中以接種 R02 之植株其株高最高。植株分蘖數以接種 R02 菌種者為最多，為對照組之 1.5 倍。以接種 R02 菌種之銅皮石斛(*D. moniliforme*)假球莖長度和寬度達顯著差異。接種 R02 菌種之銅皮石斛其植株鮮重達顯著差異，約比對照組植株高出一倍或以上(康, 2004)。接種 R02 有助於大白花蝴蝶蘭(*Phalenopsis Sogo Yukidian* x *Taisuso Snow*)及紅花朵麗蝶蘭(*Dtps. Plum Rose* x *Fu Shin Wine*)之生長及貯運後開花之影響，大白花蝴蝶蘭接種 R02，並於貯運前施用移植生長素(Lysine #3, L3)500ppm+氨基酸螯合劑(Aminosong, A)500ppm 七次，可提高抽梗率，紅花朵麗蝶蘭以接種 R02 菌種配合施用 20-20-20 肥料抽梗率最高(陳, 2005)。R02 之菌種接種拖鞋蘭 Alma Gavaert

‘Goto’ x Maudiae ‘Silverado’ AM/AOS 及 Alma Gavaert ‘HB’ x Janet Kunkle ‘Grace Hsinying’ 兩不同品種，對拖鞋蘭小苗生長有促進的效果，且能提高小苗的存活率，拖鞋蘭斑葉原生種 *Paphiopedilum delenatii* 接種 R02 配合太空精的施用可以增加葉數及鮮重，拖鞋蘭雜交種 *Impulse* ‘376-1’ x *fairrieanum* ‘Bounds’ 接種蘭菌 R02 配合品全王的施用對其葉數、第二葉片長度及鮮重有顯著的增加，接種蘭菌 R02 配合太空精的施用，其葉數、第一葉片長、及葉綠素讀值及鮮重與對照組相比，都達到顯著差異。

拖鞋蘭雜交種 Alma Gavaert ‘Goto’ x Maudiae ‘Silverado’ AM/AOS，單純接種 R02 而不施用藥劑，或接種 R02，配合品全王處理其植株鮮重與對照組相比都有顯著的促進，R02 配合太空精施用則對第二葉片長和葉綠素讀值的增加有顯著效果(陳, 2005)；接種蘭菌 R02 皆能提高蝴蝶蘭台灣阿嬪(*Phalaenopsis amabilis* var. *formosana*)的抽梗率，不同濃度的 GAs+R02 處理，皆有效提高蝴蝶蘭台灣阿嬪及大白花抽梗率，台灣阿嬪蝴蝶蘭品種，推薦可用 R02+GA₃ 150ppm 或 100ppm 處理，可促進其開花；大白花則以 R02+GA₃ 處理之表現較為穩定，推薦使用 R02+GA₃ 150ppm、100ppm 或 GA₄₊₇ 150ppm 處理，可促進其開花(王, 2005)；於葉面噴施萜素內酯(Brassinosteroids, BRs)、水楊酸(salicylic acid, SA)與接種蘭菌 R02 可減緩蝴蝶蘭‘綠花紅心’PSII 光化學效率值(PSII photochemical efficiency, Fv/Fm)的下降，並減少電解質滲漏(electrolyte leakage, EC) 值的升高與丙二醛(malondialdehyde, MDA)，並提升抗氧化酵素的活性，超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，過氧化酶(peroxidase, POD)及過氧化氫酶(catalase, CATs)的活性(張, 2006)；蝴蝶蘭帶盆貯運(20°C, 1 至 4 週)，接種蘭菌 R02 可促進帶盆貯運後葉長生長，白花朵麗蝶蘭雜交種或紅花火鳥雜交種接種蘭菌 R02，配合 LED 可提高抽梗率及減少花苞萎凋數，蝴蝶蘭以裸根或帶盆貯運方式，可於蝴蝶蘭出瓶時或中大苗時期接蘭菌 R02，有助於蝴蝶蘭貯運後生育及開花品質，大白花蝴蝶蘭雜交種(*Phalaenopsis Sogo Yukidian* x *P. Taisuco koaladian*) 接種蘭菌 R02，可促進其植株之生長

(呂,2007)；仙履蘭 *Paph. Alma Gavaert* 'HB' x *Janet Kunkle* 'Grace Hsingying' 中苗接種絲核菌屬蘭菌 R02，並配合施用氯化膽鹼加環己六醇溶液，可促進植株根系發育，芭菲爾鞋蘭 *Paph. Hsingying Makurow* x *Supersulk* 'Knerr' 瓶苗接種 R02，可促進種苗生長(王, 2007)。銅皮石斛接種絲核菌屬蘭菌 R02，增加其假球莖寬並促使其分蘖。鐵皮石斛接種絲核菌屬蘭菌 R02，可促進株高、假球莖長及寬之生長。銅皮石斛接種絲核菌屬蘭菌 R02，搭配根毛王、太空精、甲殼素、氨基酸或氨基酸加有機肥則能促進假球莖寬的生長以及促進其分蘖。

鐵皮石斛接種 R02 搭配太空精或氨基酸的施用能促使鐵皮石斛在株高、假球莖長和寬的生長(張, 2008)。



參考文獻

- 王元甫, 2005. 蘭菌與植物生長素對蝴蝶蘭生長與開花之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 80 頁。
- 王瓊瑩, 2007. 六種芭菲爾鞋蘭之生產改進。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 94 頁。
- 李自強, 1999. 蘭共生菌對一葉蘭和(彩葉蘭 x 金線連)雜交種生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 110 頁。
- 李明治, 2001. 蘭菌(絲核菌)之生理、菌種生產及其對臺灣金線連生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 89 頁。
- 李國基, 2001. 臺灣金線連與蘭菌之鑑定及生產技術改進。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文, 191 頁。
- 周玲勤, 1997. 彩葉蘭之大量繁殖與蘭菌的利用。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 124 頁。
- 周玲勤, 2004. 臺灣金線連、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與培育。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文, 169 頁。
- 康繼文, 2004. 蘭菌與植物生長素對藥用石斛蘭生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 69 頁。
- 張君豪, 2006. 蝴蝶蘭植株耐寒性之快速檢測與耐寒性提升。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 89 頁。
- 張博勛, 2008. 蘭菌、植物生長物質與石斛蘭的生長及有效成分 moscatilin 含量的相關性。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 78 頁。
- 張棋雯, 2001. 彩葉蘭與彩葉蘭道生種之大量繁殖與蘭菌之利用。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 121 頁。
- 陳孟妘, 2005. 環境因子、蘭菌與植物生長物質對帶花梗蝴蝶蘭貯運後生長及開花品質之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 127 頁。

陳俊成, 2005. 蘭菌配合植物生長物質對拖鞋蘭生育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 77 頁。

蔡靜怡, 1997. 蘭菌(*Rhizoctonia* spp.) 及溫度對臺灣金線連生長之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 80 頁。

藍亦青, 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文, 93 頁。



Growth responses and changes of active components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata

Shu-Fen CHENG and Doris Chi-Ning CHANG*

Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 10617, ROC

(Received February 6, 2009; Accepted April 17, 2009)

ABSTRACT. Two micropropagated lines, B and R, of *Anoectochilus formosanus* Hayata, were separately inoculated with orchid mycorrhizal fungi (OMF), *Rhizoctonia* sp. R02 [a bi-nucleated isolate of *Rhizoctonia* sp. (*Ceratobasidium* sp. AG-A)] and R04 [a multi-nuclei isolate of *Rhizoctonia solani*, AG-6], and grown by plastic bag cultivation method (PBCM) at three elevations above sea level, including National Taiwan University (NTU, 10 m elevation), Xindian (500 m elevation) and Wufong (1,000 m elevation) for seven months. Results showed that the survival rates for *ex vitro* growth were more than 80%, and plant production was significantly increased and there was no need to apply any agrichemical. If this orchid was not grown by PBCM, then after 3-4 months of cultivation, all plants would die if pesticide or fungicide were not sprayed for every one or two weeks in greenhouse, and the cultivation period was shortened to 1-2 months compared with traditional cultured method. Plants grown in Wufong achieved the best growth performance among three elevations, the fresh weight of mycorrhizal *A. formosanus* was significantly higher than the non-mycorrhizal (NM) control. In Wufong, R04 showed better growth-enhanced effect on line B, while R02 stimulated growth enhancement for line R. For both lines of *A. formosanus* cultivated at National Taiwan University (NTU), R02 inoculated plants contained higher level of phenolic compounds and hepatoprotective agent AFEE (*A. formosanus* extraction with ethyl acetate) compared with the non-mycorrhizal (NM) control. Analyses and measurements of antioxidant capacity by Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) showed that most of the antioxidant index of mycorrhizal plants were significantly higher than the non-mycorrhizal control. PBCM was proven to be a very labour saving, i.e. this cultural method can save all the human cost of irrigation and fertilization during the rest of cultivation period, and this is an effective method for mass production of agrichemical free *A. formosanus* plants. Inoculation of orchid mycorrhizal fungi such as R02 or R04 can significantly increase the production of this orchid with higher antioxidant capacity and hepatoprotective agent content for medicinal use.

Keywords: *Anoectochilus formosanus* Hayata; Antioxidation capacity; Hepatoprotective agent; Orchid mycorrhizal fungi (OMF); Phenolic compounds; Plastic bag cultivation method (PBCM).

Abbreviations: ACP, acid phosphatase; AFEE, *A. formosanus* extraction with ethyl acetate; CCl₄, carbon tetrachloride; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, Ferric reducing antioxidant power; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; MDA, malondialdehyde; NM, non-mycorrhizal; NTU, National Taiwan University; OMF, orchid mycorrhizal fungi; PBCM, plastic bag cultivation method; PPF, photosynthetic photon flux; R02, *Rhizoctonia* sp. (*Ceratobasidium* sp. AG-A); R04, *Rhizoctonia solani* AG-6; AG-6, Anastomosis group 6; SOD, superoxide dismutase; TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

INTRODUCTION

Anoectochilus formosanus Hayata is a terrestrial orchid species from wild forests in Taiwan. It is an ornamental plant with medicinal value, and is widely used for treating high blood pressure and hyperliposis, lowering blood

sugar level, and improving control of diabetes, liver diseases, heart diseases and lung diseases (Yen et al., 1996). It also displays anticancer and antiviral effects (Lin, 2007; Wu, 2007). Due to its multitudinous medicinal effects, the number of *A. formosanus* in the wild has been greatly reduced by intentional picking and uprooting. In recent years, with the advance of tissue culture techniques, large-scale propagation can be achieved by using seedlings and micropropagated plantlets. Future prospects for the

*Corresponding authors: E-mail: chengsf@ntu.edu.tw; Tel: +886-2-33662463 ext. 102; Fax: +886-2-83695732.

development and application of these techniques to *A. formosanus* are therefore very bright. However, traditional intensive culture has several drawbacks. Survival rates of transplanted tissue-cultured plantlets are low, and plants tend to grow slowly and cultivation period is long. Additionally, the occurrence of diseases such as root and stem rots caused by *Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum*, bacterial soft rot disease, and pest infections by red spider mites and scale insects often result in the continuous usage of pesticides and fungicides during cultivation (Yen et al., 1996; Chang, 1999). How to raise the survival rate of the seedlings or plantlets for *ex vitro* growth and control cultivating environment for shortening growth period as well as reducing the chances of harmful infection are the major concern for the cultivation of *A. formosanus*.

In this study, we applied the plastic bag cultivation method (PBCM), which was developed in our laboratory (Chang et al., 2007), and combined with the inoculation of *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi (OMF) (R02 and R04) for the cultivation of *A. formosanus*. The PBCM offered several advantages such as timesaving, labour saving, and pesticide or fungicide free. Appropriate ecological conditions are important determinants for the successful artificial culture of *A. formosanus*. Low temperature has been known to favor the growth of *A. formosanus* and lower pathogen occurrence (Lee, 2001; Chang and Chou, 2007). However, many people tried to grow this orchid in low elevations for practical reasons. Therefore, we decided to conduct the experiments in three locations with different elevations and growth temperature including NTU campus (10 m elevation above sea level), Shihzihtou Mountain in Xindian (500 m elevation) and Wufong (1,000 m elevation) to determine the most suitable site for the cultivation of *A. formosanus*.

The tissue cultured *A. formosanus* plants are considered to be less medicinally effective than the wild plants, which generally have 3-5 fold higher prices on the market. Previous studies demonstrated that *A. formosanus* inoculated with OMF exhibits higher level of superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP) activities, and higher ascorbic acid, phenolic compounds, flavonoids, polysaccharides and phosphoric acid contents, and as a result they are more effective as medicinal source (Chou, 2004; Chang and Chou, 2007). In this study, we would like to achieve three goals. (1) To evaluate the possibility for using the PBCM for the mass production of *A. formosanus*. (2) To understand the interactions between the cultivating lines and the environments such as elevation and temperature. (3) To analyze and determine the antioxidant capacity and hepatoprotective activity among the mycorrhizal and non-mycorrhizal *A. formosanus*.

MATERIALS AND METHODS

Mycorrhizal inocula

In this experiment, two strains of *Rhizoctonia* spp.

including R02 (*Rhizoctonia* sp.; *Ceratobasidium* sp.; AG-A) and R04 (*Rhizoctonia solani*; AG-6) were isolated and obtained stable research results in our laboratory for more than ten years. Their pathogenicity was tested in our laboratory for many times and was indicated by Chang (2008), and all proved to be nonpathogenic. They were cultured on the medium which is prepared by mixing peat with 20% V8 juice to reach field capacity (Chang and Chou, 2007). All *A. formosanus* lines in this experiment were inoculated with single fungal strain. Each isolate is evenly inoculated under the roots of per plant in an amount of 0.1-0.2 g of inoculum. R02 was identified as a bi-nucleated isolate of *Rhizoctonia* sp. (*Ceratobasidium* sp.; AG-A, accession NO. DQ102413. 99% match, unpublished data), while R04 was a multi-nuclei isolate of *Rhizoctonia solani*; AG-6 (Lee, 2001).

Plant materials

The micropropagated plantlets of *A. formosanus* were purchased from a tissue culture company Puli, Taiwan. Two lines of *A. formosanus*, line B (wild type) and line R (hybrid of the wild type and red stem type), were used in the experiment. The parental plants for both lines were collected from the wild-grown *A. formosanus*. The cutting segments of *A. formosanus* were cultivated on the agar medium for eight to ten months until root growth and bud burst, and then the plantlets over 6 cm height were selected. The tissue culture vessels were placed in the greenhouse for a week before transplanting for acclimation.

Culture medium and method for the cultivation

The culture medium for *A. formosanus* used is a compost of peat and coconut fiber blended in a ratio of 7:4 (v:v). The plants for each line including non-mycorrhizal (NM) control and mycorrhizal treatment and the *ex vitro* plants were cultivated by PBCM (Chang et al., 2007), to culture 10 plants of *A. formosanus* in 5 inch plastic pot, and every two of the 5 in. pots were covered with an OPP transparency plastic bags (35.5×55 cm). In preliminary experiments, all cultivars would die if pesticide or fungicide were not sprayed every one or two weeks after three or four months of cultivation, thus PBCM was applied in this experiment. One gram Hyponex No. 5 re-suspended in one liter water was added into the growth medium and field capacity of water was attained. Totally three experimental sites were included: 1) Greenhouse in the campus of National Taiwan University [10 m elevation above sea level, an average photosynthetic photon flux (PPF) at 58.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (maximum 63.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon)], 2) Shihzihtou Mountain in Xindian [500 m elevation, an average PPF at 53.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (maximum 57.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon)], and 3) Wufong [(1,000 m elevation, an average PPF at 55.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (maximum 60.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon)]. Each treatment contained 400 plants for evaluating the practical use of mass production, and treatments were arranged by a completely randomized design (CRD). The plants cultured by PBCM were

transported to the Xindian and Wufong on April 14-15, 2005 respectively. All plants were shipped back to NTU, than random sampling (5 plants per pot, total of 40 pots, i.e. 200 plants per treatment) for statistical analyses on Nov. 14-16, 2005.

Analysis of the antioxidant capacity

Two methods were used to examine the antioxidant capacity. The Folin-Ciocalteu method was used to examine the total phenolic contents (Kujala et al., 2000). And Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) was measured according to the method reported by Arnao et al. (1996). Spectrophotometer was used to determine the absorbance at 734 nm. Regression equation of standard curve was obtained based on the relation of absorbance and concentration of trolox. The absorbance was substituted into the equation to attain the TEAC value of the sample.

Analysis of the hepatoprotective agent

Analysis of the concentration of hepatoprotective agent was performed according to the method reported by Wu et al. (Wu et al., 2007). The weight of a dry *A. formosanus* plant was precisely measured and suitable quantity of water was added. The sample was extracted for three times using ultrasonic treatment and then processed by gravity filtration. The filtrate was diluted, the target ingredient AFEE was determined quantitatively by high-performance liquid chromatography (HPLC). Test samples and reference standard were processed following the procedures described above and then examined by HPLC. After obtaining the standard calibration curve, the values of test samples were substituted into the regression equation of the standard reference to calculate their concentrations. The analyses were performed by Shih Hwa Biotech Co.

RESULTS AND DISCUSSION

Plastic bag cultivation method (PBCM)

PBCM has been applied for the cultivation of *A. formosanus* (Figure 1). This method offers several advantages. No more watering or fertilization is needed during the whole cultivation period, and the potential threat of pest attack and labor need for the in cultivation management are greatly reduced (Chang and Chou, 2007). In this study, PBCM was applied to large-scale cultivation of *A. formosanus* in three sites with different elevations, and more than 80% survival rate was reached. Cultivation of *A. formosanus* in greenhouse, chemical spray program is intensively needed and regularly performed. Most of the plants would be attacked, if pesticide, fungicide and mites-killing chemical are not regularly sprayed. By PBCM, survival rate of the *ex vitro* growth of plantlets and thus plant production are greatly increased without applying any pesticide, fungicide or any other agrichemicals and the growth period is also shortened. As a result of our

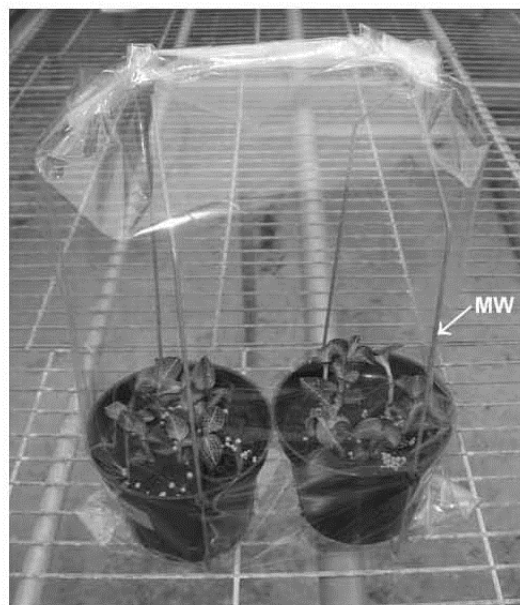


Figure 1. Plastic bag cultivation method (PBCM) for *Anoectochilus formosanus*. The metal wire (MW) was to prevent the collapse of plastic bag in the wildness.

studies, PBCM has now been promoted in the Wufong area and applied to large-scale and year-round commercial cultivation for more than 100,000 plants, and the survival rates were more than 90%.

Inoculation of OMF for the cultivation of *A. formosanus*

PBCM was adopted for the vessel cultivation of line B and line R of *A. formosanus* for both mycorrhizal and non-mycorrhizal control plants. After seven months of growth in three locations, the best plant growth was achieved in Wufong (1,000 m elevation). The number of leaves, fresh weight and chlorophyll meter reading of the plants in this location were all higher than those placed in other sites (Figures 2, 3 and 4). In addition, among the plants in Wufong, those inoculated with OMF (either R02 or R04) attained better growth than the non-mycorrhizal control. Based on the fresh weight, R04 showed better growth-promoting effect on line B, while R02 stimulated better growth for line R (Figures 2 and 3). Therefore, different lines of *A. formosanus* plants appeared to react differently to different OMF, and OMF inoculation does influence the growth of plants. Compared to the non-mycorrhizal control, OMF inoculation obviously promoted the plant growth and development. The fresh weight of mycorrhizal plants was consistently higher in all three elevations (Figures 2 and 3). We also found that fresh weight of plants in Wufong was the heaviest in all three treatments even though taller plants were observed in two lower elevations such as NTU and Xindian (Figures 2 and 3). Further exam-

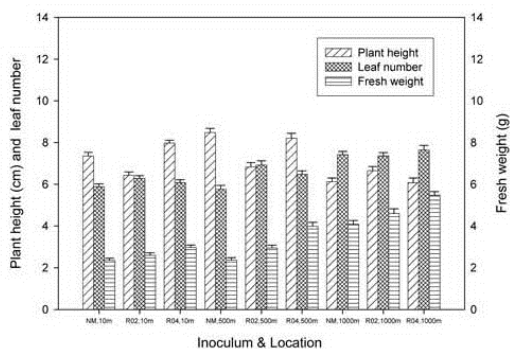


Figure 2. Growth of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoectochilus formosanus* (line B) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (NTU, 10 m of elevation), and in Xindian (500 m) and Wufong (1,000 m) for seven months.

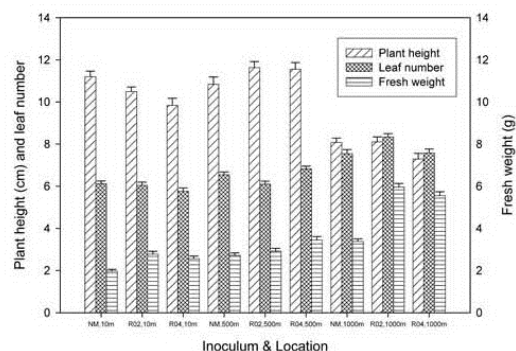


Figure 3. Growth of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoectochilus formosanus* (line R) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (NTU, 10 m of elevation), and in Xindian (500 m) and Wufong (1,000 m) for seven months.

ination found that the plants in Wufong displayed shorter internodes but thicker stems, while the plants at NTU generally showed the opposite features with longer internodes and thinner stems. We speculate that temperature probably was the cause of heavier fresh weight for the Wufong's plants. The average temperatures of the NTU and Xindian were about 30-23°C and 27-18°C respectively, while the Wufong site was around 25-15°C. When comparing *A. formosanus* plants cultivated in phytotron, those cultivated under controlled temperature at 20/15°C (day/night) had shorter internodes and thicker stem; samples cultivated in phytotron at 30/25°C (day/night) grew taller and had thinner stem (unpublished data). Based on our studies, we conclude that temperature plays a critical role on the growth of *A. formosanus*, and is the main reason for the higher fresh weight of the plants grown in Wufong. Therefore, the ideal growing location for *A. formosanus* is at high elevation which has lower temperature and greater day/night temperature difference. Previous studies reported that when line C and line T of *A. formosanus* was inoculated either with *Rhizoctonia* sp R02 or R04, growth-promoting effects are obviously observed (Chang et al., 2007). In this experiment, two other different lines, line B and line R, were chosen and also inoculated with R02 or R04, and similar growth-enhancing effects were also observed. The results indicated that OMF inoculation can promote the growth of *A. formosanus* both in the cultivation vessel and after transplantation. The absorbing areas of roots are increased as a result of OMF inoculation and therefore the plantlets can efficiently absorb nutrients and water. It was also reported that the quantity of chlorophyll as well as the efficiency of photosynthesis are increased due to OMF inoculation (Chu, 2000). In our experiments, the chlorophyll meter readings among mycorrhizal plants were generally higher than the controls (Figure 4). However, when fresh weight and chlorophyll meter readings were cross-referenced, positive correlation was not found.

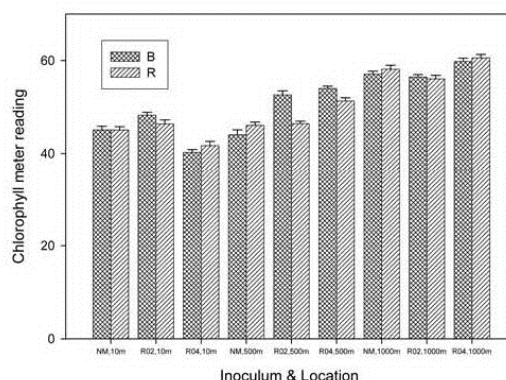


Figure 4. Chlorophyll meter reading value of orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia* sp. R02 and R04) inoculated and non-mycorrhizal (NM) plants of *Anoectochilus formosanus* (line B and line R) with plastic bag cultivation method (PBCM) at National Taiwan University (10 m of elevation), and in Xindian (500 m) and Wufong (1,000 m) for seven months.

This may be due to the fact that plant growth is indeed influenced by various factors.

Analysis of the antioxidant capacity

1. Comparison and analysis of the phenolic compounds. Phenolic compounds are widely distributed in the plant kingdom. They are plant secondary metabolites which are often used as an index for antioxidant capacity (Castelluccio et al., 1995). Our analyses revealed that *A. formosanus* line B grown in Wufong contained higher level of phenolic compounds; however the levels of phenolic compounds of the NM control and mycorrhizal plants in this location were no significant difference (Figure 5A). The levels of phenolic compounds of mycorrhizal plants at

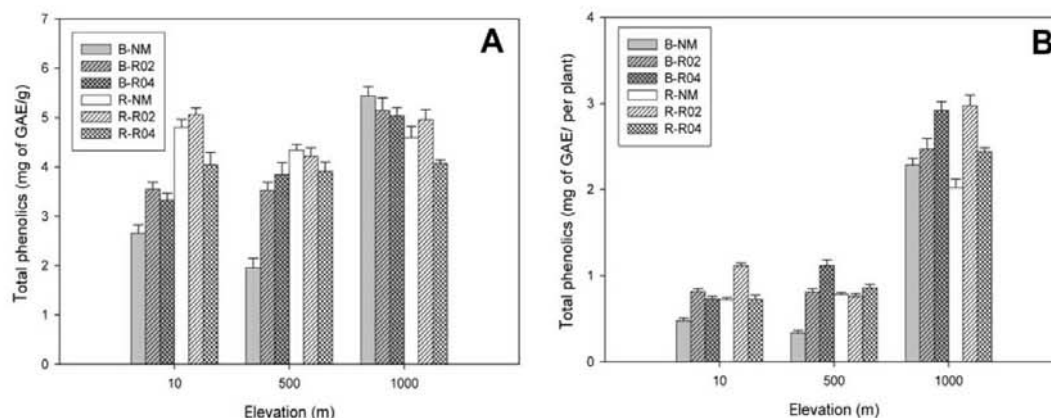


Figure 5. Changes of phenolic compounds level of two lines of *Anoectochilus formosanus* inoculated with *Rhizoctonia* sp. R02 and R04 in the bag culture at National Taiwan University (10 m of elevation), and in Xindian (500 m) and Wufong (1,000 m) for seven months. A, level of phenolic compounds per gram; B, level of phenolic compounds per plant.

NTU and in Xindian were higher than the non mycorrhizal control (Figure 5A). The levels of phenolic compounds among line R plants inoculated with R04 in three locations were similar (Figure 5A). For the NM and R02-inoculated, the levels of phenolic compounds were higher at NTU and in Wufong; the R02-inoculated group had higher phenolic compounds level, with 5.06 mg/g in the NTU plants and 4.96 mg/g in the Wufong ones. Considering the dilution effect of fast-growing plants, we converted the level of phenolic compounds into the whole plant basis as shown in Figure 5B. Results showed that the level of phenolic compounds was the highest among the plants grown in Wufong both for line B and line R, and the phenolic compound levels found in the OMF inoculated plants were higher than the NM plants (Figure 5B). Previous studies indicated that the cultivation environment affects the types and quantity of phenolic compounds in a plant (Dumas et al., 2003; Roussous et al., 2007). Our results demonstrate that cooler area such as Wufong was more suitable for the growth of *A. formosanus* and the level of phenolic compounds found obtained from these plants was higher.

2. Test of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). In previous experiments, antioxidant capacity of *A. formosanus* was tested by TEAC, FRAP (Ferric reducing antioxidant power) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. In this study, TEAC was chosen to determine of the antioxidant capacity by its comparative stability and significant differences in data reading between the mycorrhizal and non-mycorrhizal plants.

Our results showed that the TEAC readings of the mycorrhizal line B at NTU and in Xindian were higher than the NM plants. In line R plants, the R02-inoculated ones at NTU and in Wufong had higher TEAC readings (Figure 6).

Previous studies showed the *A. formosanus* extract displays free radical scavenging activity (Wang et al., 2002).

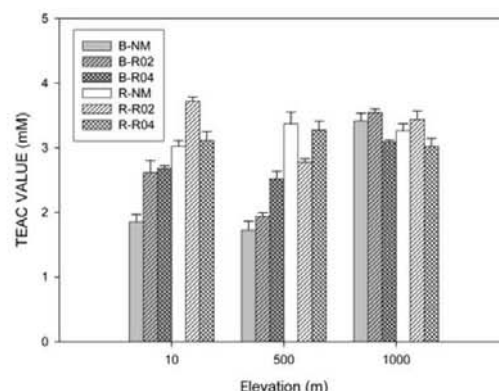


Figure 6. The analyses of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values for two lines of *Anoectochilus formosanus* inoculated with *Rhizoctonia* sp. R02 and R04 and cultivated at NTU (10 m of elevation), and in Xindian (500 m) and Wufong (1,000 m), for seven months.

Under the treatment of *A. formosanus*, HepG22 cell demonstrated stronger solvency over free radicals and hydrogen peroxide and maintain effective antioxidant capacity (Hsieh, 2001). *Anoectochilus formosanus* also contains various enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase (Wang, 1999). In 2004, analyses of the enzyme activities and the plant components demonstrated that stronger antioxidant capacity was found in the mycorrhizal *A. formosanus* plants. Our results showed that mycorrhizal line B plants at NTU and in Xindian exhibited higher level of TEAC than the NM control plants. R02 inoculated line R plants cultivated at NTU and in Wufong had higher TEAC reading as well. The results demonstrated that the mycorrhizal

A. formosanus plants showed different antioxidant capacity under different environments.

Analysis of the hepatoprotective components

Previous studies revealed that *A. formosanus* contains hepatoprotective components and thus displays hepatoprotective effect (Huang, 2000). Ethyl acetate (EtOAc) extract from *A. formosanus* can lower the GOT and GPT concentrations of liver cells, increase the quantity of glutathione, and decrease the quantity of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, and thus the hepatoprotective effect is achieved (Lin et al., 1991). Our studies demonstrated that OMF inoculation can increase the quantity of hepatoprotective agent AFEE, an ethyl acetate-philic fraction of the extracts of *A. formosanus*. The levels of AFEE were higher in either R02 or R04 inoculated line B and line R plants than those of the NM control plants at NTU. The level of AFEE found in the mycorrhizal line B plants was more than two folds higher than that of the NM control plants (Table 1). Therefore, our results showed that OMF inoculation can effectively promote the growth of *A. formosanus*, and also increase the levels of their medicinal components, their antioxidant capacity and the quantity of AFEE (Table 1).

Our studies demonstrated that PBCM is an effective mass production method for producing agrichemical free *A. formosanus* plants. Both NM and mycorrhizal plants grew well in Wufong, due to the higher elevation, lower temperature and greater temperature difference for day and night. Inoculation of OMF (R02 or R04) significantly promoted the growth of *A. formosanus*, but the effects might vary dependent upon the combination of OMF and orchid line and as well as the growth environment. Generally our results showed that the mycorrhizal plants contained higher amount of phenolic compounds, stronger antioxidant capacity, and more abundance of the hepatoprotective agent AFEE in comparing to NM plants of all locations, but varied with the different environments. We presume

Table 1. The analysis of hepatoprotective activity of kinsenoside (AEEE) derived from mycorrhizal and non-mycorrhizal *Anoectochilus formosanus* plants cultivated at NTU campus for seven months.

Cultivar	<i>Rhizoctonia</i> inoculum	AFEE (g/g)
B	NM	0.0174±0.0003 b
	R02	0.0417±0.0011 a
	R04	0.0400±0.0019 a
R	NM	0.0126±0.0004 c
	R02	0.0242±0.0029 a
	R04	0.0191±0.0025 b

NM: non-mycorrhizal control group.

Three replicates were conducted for each treatment.

Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

that the wild plants of *A. formosanus* may be all infected with some kind of OMF fungi and thus result in better medicinal effects than the tissue-cultured NM plants in greenhouse. Based on the results, we highly recommend PBCM for mass production of agrichemical free *A. formosanus* plants. One thousand meter of elevation is an ideal place for cultivating *A. formosanus* plants in Taiwan. The inoculation of *Rhizoctonia* sp, either R02 or R04, can significantly increase the production of *A. formosanus* containing higher antioxidant capacity and hepatoprotective agent for medicinal use.

Acknowledgments. This project was financially supported by the Forestry Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan (94AS-9.4.1-FB-e1, 95AS-11.4.1-FB-e1, 96AS-11.4.1-FB-e1). We thank Dr. Tsu-Hwie Liu in the Development Center for Biotechnology, Xizhi, Taipei, Taiwan and Dr. Wei-Chiang Shen in the Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University for improving the manuscript.

LITERATURE CITED

- Arnao, M.B., A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Cano, and M. Acosta. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* **236**: 255-261.
- Castelluccio, C., G. Paganga, N. Melikian, G. Bolwell, J. Pridham, J. Sampson, and C.A. Rice-Evans. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* **368**: 188-192.
- Chang, D.C.N. 2008. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In W. H. Chen and H. H. Chen (eds.), *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Joh Tuck Link, Singapore, pp. 77-98.
- Chang, D.C.N. and L.C. Chou. 2007. Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by *Rhizoctonia* orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Bot. Stud.* **48**: 445-451.
- Chang, D.C.N., L.C. Chou, and G.C. Lee. 2007. New cultivation methods for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Orchid Sci. Biotechnol.* **1**: 56-60.
- Chang, S.F. 1999. Integrated control of basal stem rot and stem rot of *Anoectochilus*. Master thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 100 pp.
- Chou, L.C. 2004. The mycorrhizal physiology and cultivation of *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and their F1 hybrids. PhD dissertation, Graduate Institute of Horticulture, National Taiwan University, 169 pp.
- Chu, J.N. 2000. Isolation and inoculation of orchid mycorrhizal fungi and their effects on the seedling growth of *Oncidium Goldiana* X *Onc. Guiana* Gold. Master thesis, Department

- of Tropical Agriculture, National Ping Tung University of Science and Technology, 101 pp.
- Dumas, Y., M. Dadomo, G. D. Lucca, and P. Grolier. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomato. *J. Sci. Food Agric.* **83**: 369-382.
- Hsieh, J.S. 2001. Oxidative stress mediate the anti-proliferative effect of *Anoectochilus formosanus* on hepatoma cells. Master thesis, Graduate Institute of Medicinal Science, China Medical College, 69 pp.
- Huang, D.F. 2000. The mechanism study of hepatoprotective control of *Boehmeria* species and *Anoectochilus* species. Master thesis, Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, 90 pp.
- Kujala, T.S., J. M. Lopenen, K.D. Klika, and K. Pihlaja. 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 5338-5342.
- Lee, G.C. 2001. Identification and improvement of production techniques for *Anoectochilus formosanus* Hayata and orchid mycorrhizal Fungi. PhD dissertation, Graduate Institute of Horticulture, National Taiwan University, 191 pp.
- Lin, J.M., C.C. Lin, H.F. Chiu, and S.G. Lee. 1991. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. Paper presented at the seminar on the plants of medicinal and health, pp. 89-98.
- Lin, W.C. 2007. Study of health keeping effects of *Anoectochilus formosana* Hayata. *Agric. World* **288**: 8-13.
- Roussous, P.A., A. Matsoukis, C.A. Pontikis, and A. Chronopoulou-Sereli. 2007. Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants. *Sci. Hortic.* **113**: 100-102.
- Wang, S.C. 1999. Studies on antioxidative enzymes in *Anoectochilus formosanus* Hayata. Master thesis, School of Pharmacy, National Taiwan University, 82 pp.
- Wang, S.Y., Y.H. Kuo, H.N. Chang, P.L. Kang, H.S. Tsay, K. Lin, N.S. Yang, and L.F. Shyur. 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1859-1865.
- Wu, J.B., W.L. Lin, C.C. Hsieh, H.Y. Ho, H.S. Tsay, and W.C. Lin. 2007. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*. *Phytother. Res.* **21**: 58-61.
- Wu, K.B. 2007. The use and potential for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Agric. World* **288**: 14-19.
- Yen, D.M., S.C. Chen, and C.T. Liao. 1996. The art for propagation of Jin-Shiann Lian. Dong-Kung Farmer Association Published, 294 pp.

台灣金線連於不同海拔地區接種蘭菌後其生長發育及有效成分之變化

鄭淑芬 張喜寧

國立台灣大學 園藝學研究所

於台大(海拔 10 公尺)、新店(海拔 500 公尺)、五峰(海拔 1000 公尺)等三個不同海拔地區以塑膠袋栽培法(PBCM),種植接種絲核菌屬蘭菌 R02 及 R04 之 B 及 R 等兩種不同品系的台灣金線連,栽培七個月,結果顯示以塑膠袋套袋栽培法栽培之所有臺灣金線連組培苗,於出瓶後其成活率均在 80% 以上,且可顯著提高植株產量,及不需施用任何化學農藥,假使台灣金線連不是利用塑膠袋培法(PBCM)栽種,則在溫室中栽培 3-4 個月後,每 1-2 個星期若不進行殺蟲劑與殺菌劑的噴施,則所有植株將會死亡,和傳統栽培方法相比較,則可縮短栽培期 1-2 個月。其中種植於五峰,且接種蘭菌之植株生長最佳,鮮重亦較對照組高,B 品種則以接種蘭菌 R04, R 品種以接種蘭菌 R02 可顯著促進生長。種植於台大之台灣金線連 B 及 R 兩品系均以接種 R02 之菌根植株有較高的總酚類及保肝活性成分 AFEE 之含量。以 TEAC 的方法分析測試其抗氧化能力,結果顯示大部分菌根植株較非菌根植株為高。本研究結果證實塑膠袋栽培法為一非常省工(可省下栽培期間之所有灌溉與施肥之人力),且不需噴施任何殺蟲劑及殺菌劑等化學藥劑即可大量生產臺灣金線連之有效方法,接種蘭菌 R02 及 R04 可顯著增加台灣金線連的產量,並提高抗氧化能力及保肝成分之含量。

關鍵詞：台灣金線連；抗氧化能力；保肝成分；蘭菌；總酚類含量；塑膠袋栽培法。

Full Length Research Paper

Growth and development of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume when inoculated with orchid mycorrhizal fungi

Shu-Fen Cheng^{1,2}, Chih-Hsing Yeh³, Chen-Han Jan⁴ and Doris Chi-Ning Chang^{1*}

¹Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 10617, Republic of China.

²Herbarium (TAI), College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 10617, Republic of China.

³Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taoyuan, Taiwan 327, Republic of China.

⁴Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 10617, Republic of China.

Accepted 14 September, 2012

Phaius tankervilleae (Banks) Blume is the most attractive and most horticulturally valuable native *Phaius* species in Taiwan. Due to overharvesting in the wild, however, the plant is on the verge of extinction. Successful cultivation of *P. tankervilleae* has been achieved through *in vitro* seeding or tissue culture propagation, but plantlet survival rates are low upon transplantation. Previous studies demonstrated that inoculation with mycorrhizal fungi markedly improved plantlet survival rates, vegetative and reproductive growth in Orchidaceae plants. Four orchid mycorrhizal fungi (OMF), R01 (*Rhizoctonia solani*), R02 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-A), R15 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-Fb) and R19 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp. AG-G) were isolated from Taiwanese native orchid roots that were cultured for more than seven years in our laboratory. These fungi all proved to be non-pathogenic and were inoculated onto the root of *P. tankervilleae*. Inoculation with the appropriate OMF increased seedling survival rate 27 to 31% (R02; R15), plant height 6.3 cm (R15), leaf length 3.5 cm (R15), flower stalk length 10.2 cm (R19) and number of flowers per stalk (3.5) in *ex vitro*-grown *P. tankervilleae*. Inoculation with OMF (R19) promoted reproductive growth in *P. tankervilleae*, while OMF (R02) inoculation significantly increased photosynthetic rate and carbohydrate content. *P. tankervilleae* seedlings inoculated with the R15 isolate had a higher survival rate than with other treatments. Inoculations with *Rhizoctonia* spp. isolates R02, R15, or R19 also promoted reproductive growth in *P. tankervilleae*.

Key words: Pelotons, *Phaius tankervilleae*, reproductive growth, *Rhizoctonia* species, survival rate, vegetative growth.

INTRODUCTION

Phaius tankervilleae (Banks) Blume is a large terrestrial orchid native to Taiwan that is distributed from India, Sri Lanka and Southern China, through Thailand and Malaysia to Indonesia, Australia and the Pacific islands. In Taiwan, it grows in broad leaved forests at elevations

below 1000 m and throughout Lanyu Island. The orchid favors high temperatures and wet environments, and is not cold-resistant (Su, 2000). *P. tankervilleae* is a robust plant that blooms easily. Plant height 60 to 200 cm, without slender stems, fleshy pseudo bulbs ovoid-elliptic and internode very close, alternate leaves, ovate-lanceolate or broad lanceolate 3 to 5, 40 to 60 cm long, leaves papery, surface wrinkle. Flower stalk thick 60 to 100 cm long, formation from the side of pseudo bulb, 6 to 20 flowers of one inflorescence, flower diameter 8 to 10

*Corresponding author. E-mail: chengsf@ntu.edu.tw. Tel: +886-2-33662463. Fax: +886-2-83695732.

cm. Sepals white outside, white to yellowish white and tinged with red-brown inside, petals red-brown or purplish, lip yellowish white, tinged with red and decorated with dark purple spots (Bechtel et al., 1986; Su, 1990; Yeh et al., 2007). Horticulturally, the flowers are large and beautiful and flower from April to July. A single flower lasts about 20 days; the inflorescence itself lasts up to 45 days (Chang and Jian, 2010). *P. tankervilleae* has slender leaves, graceful greenery, and can be used as a potted plant, a garden plant, or as cut flowers or leaves (Mukherjee, 1979; Lee, 1989; Chang and Jian, 2010). *P. tankervilleae* has been overharvested in the wild and is on the verge of extinction (Su, 1989). The flower of *P. tankervilleae* is big and beautiful with great ornamental and economic value (Mukherjee, 1979; Lee, 1989; Chang and Jian, 2010). Only a small amount of *P. tankervilleae* could be found in the flower market of Taiwan. Su (1989) reported that the wild population of *P. tankervilleae* was gradually reduced (Su, 1989). It is urgent to preserve this endangered orchid.

The sexual reproduction of *P. tankervilleae* is accomplished through seed germination with fungal symbiosis and *in vitro* seed germination to obtain a seedling. In asexual reproduction, the top of the stem or flower stalk are used to culture an *in vitro* seedling, reproductive ramets and the flower stalk are buried in the soil and a seedling forms on the node of flower stalk (Lee, 1989; Wu 1991; Tsai, 2010). Previous studies demonstrated that inoculation with mycorrhizal fungi markedly improved vegetative and reproductive growth in Orchidaceae plants (Rasmussen et al., 1990; Chu, 2000; Takahashi et al., 2006; Chang, 2008; Smith et al., 2009; Wu et al., 2011). Orchid mycorrhizal fungi (OMF)-inoculated mother and daughter *Oncidium* sp. showed increased plant height and pseudo bulb length and width compared to the non-mycorrhizal control; leaf quantity, thickness, fresh weight, surface area, chlorophyll and soluble sugar content were also greater (Chu, 2000). Leaf length and fresh weight of *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin orchids was greatly increased by OMF R04 and PaR2-inoculation (Tsai, 2003). *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. *Aphrodite* (Reichb. f.) Ames inoculated with R01 showed higher stalk length, and R02-inoculated plants showed increased floral diameter and higher bolting rates (Lan, 2001). *Doritaenopsis Luchia* Davis × *Doritaenopsis Taisuco* Firebird seedlings inoculated with R02 had a 40% flowering rate compared to 0% in the non-mycorrhizal control kept at the natural temperature in Taipei (Lan, 2001). *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* showed greater stalk length and flower number when inoculated with R01 (Chou, 2004).

Orchidaceae *Phaius* species can be produced through *in vitro* seeding or tissue culture propagation, but plantlet survival rates decrease during the transplantation (personal communication). Since there is relatively little data on *P. tankervilleae*, identifying the effects that some OMF have on its growth and development was the main focus in selecting the appropriate fungi to improve its

survival rate during the transplant period, and on enhancing the vegetative and reproductive growth of *P. tankervilleae*. We also investigated the effects of OMF on orchid growth during the seedling stage, flowering period regulation and flower production promotion. This horticultural research can be useful for mass production of the seedling, regulating flowering periods, and improving the yield and quality of *P. tankervilleae* flowers. It can show the ornamental value and economic potential of this native Taiwanese orchid and promote its preservation, restoration and development as an ornamental plant.

MATERIALS AND METHODS

Mycorrhizal inocula

In this experiment, we isolated four strains of *Rhizoctonia* spp. including R01 (*Rhizoctonia solani*), R02 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp.; AG-A), R15 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp.; AG-Fb) and R19 (*Rhizoctonia* sp., teleomorph = *Ceratobasidium* sp.; AG-G), identified through DNA analysis, that were cultured in our laboratory for more than seven years. They all proved to be non-pathogenic (Chang, 2008). They were cultured on a medium prepared by mixing peat with 20% V8 juice to reach field capacity (Stevens, 1974). All *P. tankervilleae* plants used in this experiment were inoculated with a single fungal strain. All OMF used in this research are stored in the Bioresource Collection and Research Center at the Food Industry Research and Development Institute in Hsinchu, Taiwan.

Plant materials

The *P. tankervilleae* seedlings were provided by the Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station Taiwan. *P. tankervilleae* seeds were sown and grown on agar medium for four months, subcultured, then subcultured again two months later. A sowing medium of 3 g L⁻¹ Hyponex 1 (7N-6P-19K), 150 ml L⁻¹ coconut water, 9 g L⁻¹ agar (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 20 g L⁻¹ sucrose, was adjusted to pH 5.2. A subculture medium containing 2 g L⁻¹ NPK fertilizer (7N-6P-19K), 9 g L⁻¹ agar (Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 g L⁻¹ sucrose, and activated carbon 1 g L⁻¹, was adjusted to pH 5.2. The seedlings were about 8 to 10 cm in height.

Medium and culturing method

The tissue culture container seedlings of *P. tankervilleae* were obtained and removed from glass containers, then planted in 7.5 cm-diameter black plastic pots with the mix media at a 1:1:1 (v:v:v) (volume) ratio of peat moss, coconut fiber and tree fern fiber. Samples were divided into five groups of 36 seedling each, including the non-mycorrhizal (NM) control and mycorrhizal treatment (*Rhizoctonia* isolates R01, R02, R15 and R19). Treatments were arranged in a completely randomized design (CRD). The roots of each seedling received 0.2 g of fungal inocula. As the plants became larger, they were transplanted with same medium into 18 cm-diameter plastic pots. Each pot initially received 2 g of Osmocote (14N-5.2P-11.6K) and was watered once every week. Water-soluble fertilizer (Peters, Scotts, Marysville, USA) was applied every two weeks, changing from 0.5 g L⁻¹ of 30N-4.3P-8.3K water-soluble fertilizer (Peters, Scotts, Marysville, USA) at the vegetative stage to 0.5 g L⁻¹ of 10N-12.9P-16.6K water-soluble fertilizer at the reproductive stage. The experimental site was a

plastic greenhouse on the National Taiwan University campus (10 m above sea level), the average value of the photosynthetic photon flux (PPF) was 200 to 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon, and the average values of the highest and lowest temperatures were 32.21 and 15.21 °C respectively.

Carbohydrate content measurement

The analytical method for measuring carbohydrate content was modified from the method described in the study of Luchsinger and Cornesky (1962), Yoshida et al. (1972) and Lindsay (1973). The third and fourth leaves from the distal end and pseudo bulbs were taken from matured *P. tankervilleae* plants after 26 months of cultivation and the dried sample pulverized for testing. To evaluate starch content, the following steps were taken: (i) the sample was extracted with 80% EtOH and distilled water, (ii) 20 mM (pH 6.9) of sodium phosphate buffer was added to the precipitate, and then the sample was heated in a boiling water bath for 15 min. 0.5 ml α -amylase was then added and the sample placed in a 37 °C water bath for 16 h. 1 ml crude extract was obtained to which was added 2 ml DNSA (3,5-dinitrosalicylic acid reagent) before returning to a boiling water bath for 10 min. cooled to room temperature and 2 ml distilled water was then added. Absorbance was then (iii) measured by a spectrophotometer (HITACHI, 2800 JP, Japan) at A_{570} wavelength and the value estimated. To evaluate total soluble sugar content, we took the following steps: (i) the sample was extracted twice with 80% EtOH; (ii) the extract was heated in the boiling water bath to remove ethanol, (iii) then chloroform and distilled water were added; (iv) anthrone solution was slowly added in an ice bath and then boiled in the water bath for 7 min 30 s before (v) measuring the absorbance by a spectrophotometer (HITACHI, 2800 JP, Japan) at A_{630} wavelength to estimate the value.

Photosynthetic rate estimation

The photosynthetic rate for matured *P. tankervilleae* plants after 26 months growth was detected on a 6 cm² leaf area using LI-6400 portable photosynthesis system (LI-COR Inc., Nebraska, U.S.A) (Jiang, 1996). The photosynthetic rate was measured at the second leaf of the daughter pseudo bulb from 5 to 10 cm above the pseudo bulb from 9 to 11 AM.

Plant growth and development

Plant height (leaf tip), number of leaves, leaf length and width, pseudo bulb diameter, number and length of flower stalks and number of flowers were measured for each *P. tankervilleae* plant. Each treatment involved 36 plants, 15 from each of these groups of 36 were randomly selected for statistical analyses, using ANOVA (analysis of variance) and LSD (least significant difference) test to compare the effects of treatments.

Anatomic observation of orchid mycorrhizal

We collected roots of *P. tankervilleae* with or without OMF inoculation and cleaned and stained them with aniline blue in acidic glycerol (Koske and Gemma, 1989) for optical microscopy (Olympus BH-2 USA). For scanning electron microscope (SEM) observations, the collected roots were dissected into sections, fixed with 2.5% glutaraldehyde for 10 to 12 h, dehydrated in an acetone series, critical point dried (SPI # 13200-AB Manual CPD) by liquid carbon dioxide, coated with gold for 90 s by a Biorad Ion Coater (Dawes, 1971), then examined and digitally recorded using the SEM Topcon-60.

RESULTS AND DISCUSSION

The survival rates (SR%) of *P. tankervilleae* seedlings were significantly increased for 22 months after inoculation with R02, R15, R19 when compared to those of the non-mycorrhizal (NM) control plants. The SR% of *P. tankervilleae* seedlings after treatments with the R15 and R02 isolates were 79 to 81% and 78 to 80%, respectively, a 27 to 31% higher SR% compared with 48 to 54% for the NM control plants (Figure 1). Plant height and leaf length were greatly increased in *P. tankervilleae* plants inoculated with R02 or R15 for 22 months. Plant height and leaf length were lower in R01-treated plants as compared with the non-mycorrhizal (NM) control plants (Table 1). The NM control, R02, and R15-inoculated plants were thus used to measure the carbohydrate content and photosynthetic rates. Results showed that when plants were inoculated with the R02 isolate, the rate of net CO₂ fixation increased significantly as compared with that for plants inoculated with R15 or NM control group (Figure 2).

Oncidium orchids typically have large pseudo bulbs that store the carbohydrates necessary for flowering (Yong and Hew, 1995; Chang and Lee, 1999). *Cymbidium* orchids only produce flowers when the amount of carbohydrates stored in their pseudo bulbs is sufficient (Komori, 1986). Since *P. tankervilleae* plants also have large pseudo bulbs (Tsai and Chang, 2009), we wanted to determine their carbohydrate content during the early stage of flower bud differentiation. Analytical results indicated that 80% EtOH-soluble sugars in leaves and starch content in pseudo bulbs of plants at 26 months after inoculation with R02 were higher than those in NM control plants (Table 2). Total carbohydrate content in leaves and pseudo bulbs of OMF (R02)-inoculated plants was also higher than in NM control plants.

Furthermore, *P. tankervilleae* plants inoculated with *Rhizoctonia* spp. flowered early (Figure 3), and plants inoculated with R02 or R19 isolates flowered 5 days earlier than did NM control plants (Table 3 and Figure 3). Other than greater height as compared to the NM control, no other vegetative growth differences, such as number of leaves and pseudo bulbs, occurred between the R01-inoculated plants and the control. Compared to the NM control plants, plants inoculated with R01, R02, R15 or R19 isolates for 28.5 months had significantly increased flower stalk length, with R19 isolates also significantly increasing the number of flowers (Table 4 and Figure 3).

The NM *P. tankervilleae* plants did not have any pelotons in their root cortex cells (Figure 4A), while plants infected with R02 had pelotons built by a number of mycelia (Figure 4B). Although, SEM showed no pelotons in the cortex cells of control group roots (Figure 5A), they were present in the R02-infected plant roots (Figure 5B).

Figure 5C gives details on the infected cells that formed pelotons while Figure 5D shows digested hyphae. The mycelia extended into the surrounding non-infected cells after the pelotons had degraded into amorphous clumps,

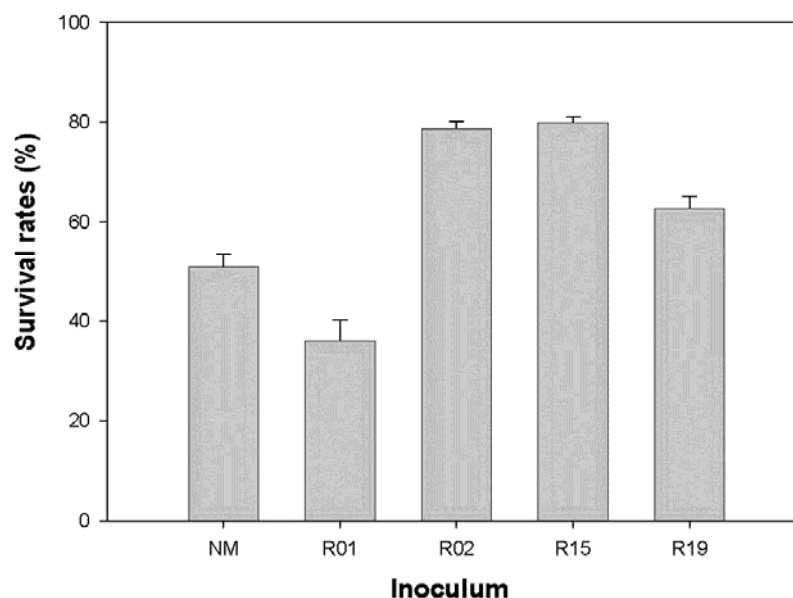


Figure 1. Survival rates (%) of *Phaius tankervilleae* seedlings inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R15, or R19) of orchid mycorrhizal fungi after 22 months of *ex vitro* growth. NM indicates non-mycorrhizal control.

Table 1. Vegetative growth for seedlings of *Phaius tankervilleae* after inoculated with various *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi for 22 months.

<i>Rhizoctonia</i> inoculum	Plant height (cm)	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)
NM*(CK)	25.2 ^{cd}	4.0 ^a	19.4 ^b	4.7 ^{ab}
R01	21.8 ^d	3.3 ^b	16.4 ^c	4.3 ^b
R02	30.6 ^{ab}	3.9 ^{ab}	22.9 ^a	5.2 ^a
R15	31.5 ^a	4.2 ^a	22.9 ^a	5.0 ^a
R19	28.4 ^{abc}	3.7 ^{ab}	20.5 ^{ab}	4.8 ^{ab}
ANOVA F values 2.04 (df=4,70)	8.8	2.2	7.2	2.9

*NM = non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R19 = orchid mycorrhizal fungi. Each treatment had 15 replicates. The effects of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by the different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

Table 2. Carbohydrate content of leaf and pseudo bulb for seedlings of *Phaius tankervilleae* after inoculated with orchid mycorrhizal fungi (R02, R15) *ex vitro* for 26 months.

<i>Rhizoctonia</i> spp of inoculum	Leaf		Pseudo bulb	
	80% EtOH soluble sugars (mg·g ⁻¹)	Total carbohydrate (mg·g ⁻¹)	Starch (mg·g ⁻¹)	Total carbohydrate (mg·g ⁻¹)
NM*(CK)	73.8 ^b	98.3 ^b	235.4 ^b	321.2 ^b
R02	95.5 ^a	122.8 ^a	321.5 ^a	412.1 ^a
R15	91.3 ^{ab}	110.0 ^{ab}	313.6 ^a	389.5 ^a
ANOVA F values 2.53 (df=2,26)	6.3	8.1	23.7	24.1

*NM = non-mycorrhizal control; R02, R15 = orchid mycorrhizal fungi. Each treatment had 9 replicates. The effect of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* was tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

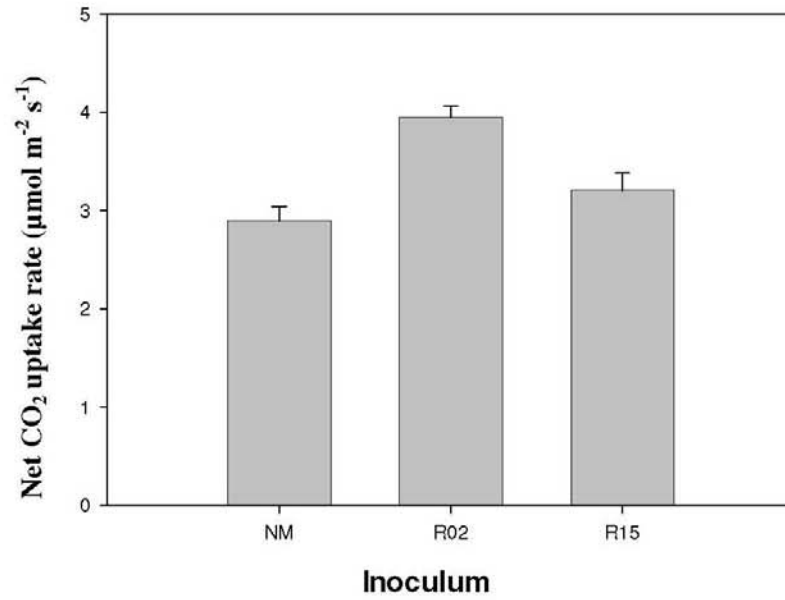


Figure 2. Net CO₂ uptake rate for *Phaius tankervilleae* seedlings after inoculation with orchid mycorrhizal fungi for 26 months. NM indicates non-mycorrhizal control.

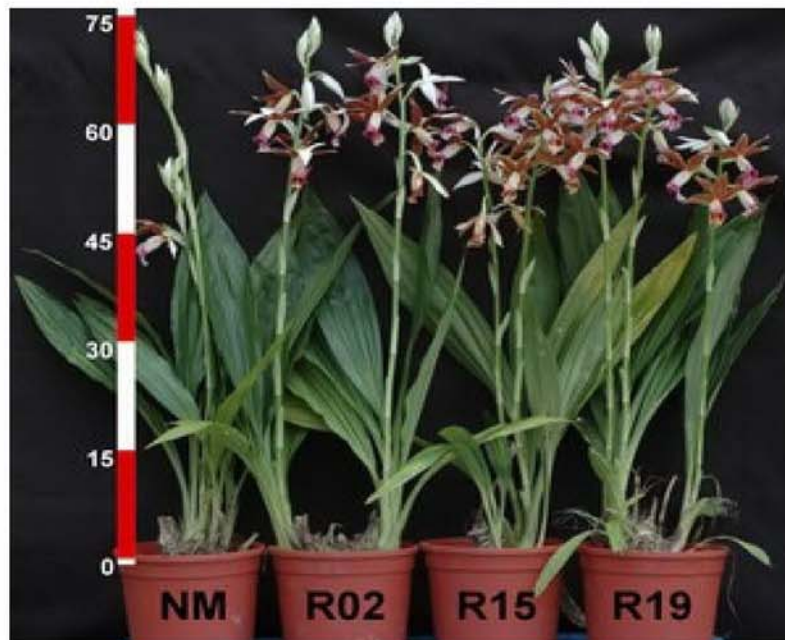


Figure 3. Vegetative and reproductive growth of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume seedlings after inoculation with various *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi for 30.5 months. NM indicates non-mycorrhizal control.

Table 3. Days before flowering in *Rhizoctonia* spp.-inoculated *Phaius tankervilleae*.

<i>Rhizoctonia</i> spp of inoculum	Days to flower after OMF inoculation
NM*(CK)	918.8 ^a
R01	916.1 ^{ab}
R02	914.0 ^b
R15	915.6 ^{ab}
R19	914.4 ^b
ANOVA F values 2.04 (df=4,70)	4.1

*NM = non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R19 = orchid mycorrhizal fungi. Each treatment had 15 replicates. The effects of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

Table 4. Comparison of growth and development of *Rhizoctonia* spp-inoculated *Phaius tankervilleae* seedlings at 28.5 months.

<i>Rhizoctonia</i> spp of inoculum	Plant height (cm)	Flower stalk length (cm)	No. of flowers
NM*	46.2 ^b	53.9 ^c	11.9 ^b
R01	54.2 ^a	62.6 ^{ab}	11.6 ^b
R02	41.6 ^b	59.6 ^{ab}	14.2 ^{ab}
R15	41.7 ^b	60.2 ^{ab}	14.2 ^{ab}
R19	45.0 ^b	64.1 ^a	15.4 ^a
ANOVA F values 2.04 (df=4,70)	10.5	9.2	7.7

*NM = non-mycorrhizal control; R01, R02, R15, R19 = orchid mycorrhizal fungi. Each treatment had 15 replicates. The effects of mycorrhizal infection of *Phaius tankervilleae* were tested by ANOVA. The F values of ANOVA are presented in the table. Means in each column followed by different letters were significantly different (P=0.05) as determined by LSD test.

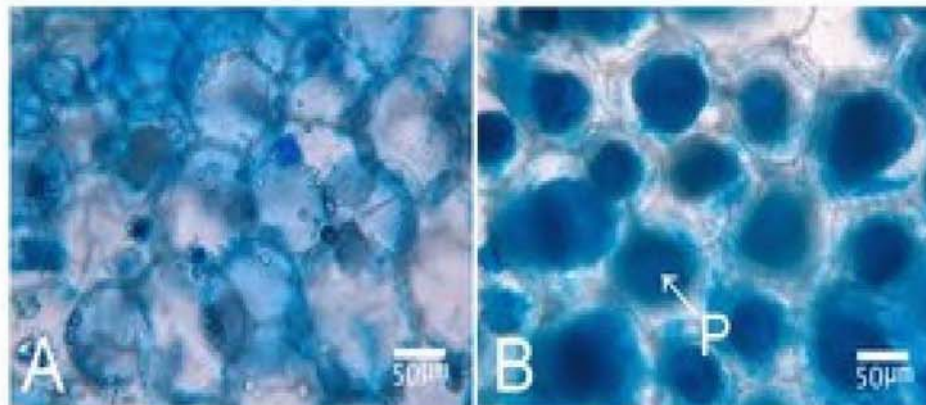


Figure 4. Optical microscopic observation of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume roots inoculated with *Rhizoctonia* sp. of orchid mycorrhizal fungus (R02) for 22 months and stained with aniline blue (0.05%). A, Control. B, Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) as inoculated with R02.

after which pelotons formed until the entire root was infected. This particular infection process is known as tolypophagy. Plants infected with R15 or R19 also produced pelotons, the digested amorphous clumps

also can be observed (Figure 5E and F). The Mycorrhizal structures formed by different *Rhizoctonia* species in *P. tankervilleae* roots were all similar.

The advantages of using mycorrhizal *P. tankervilleae*

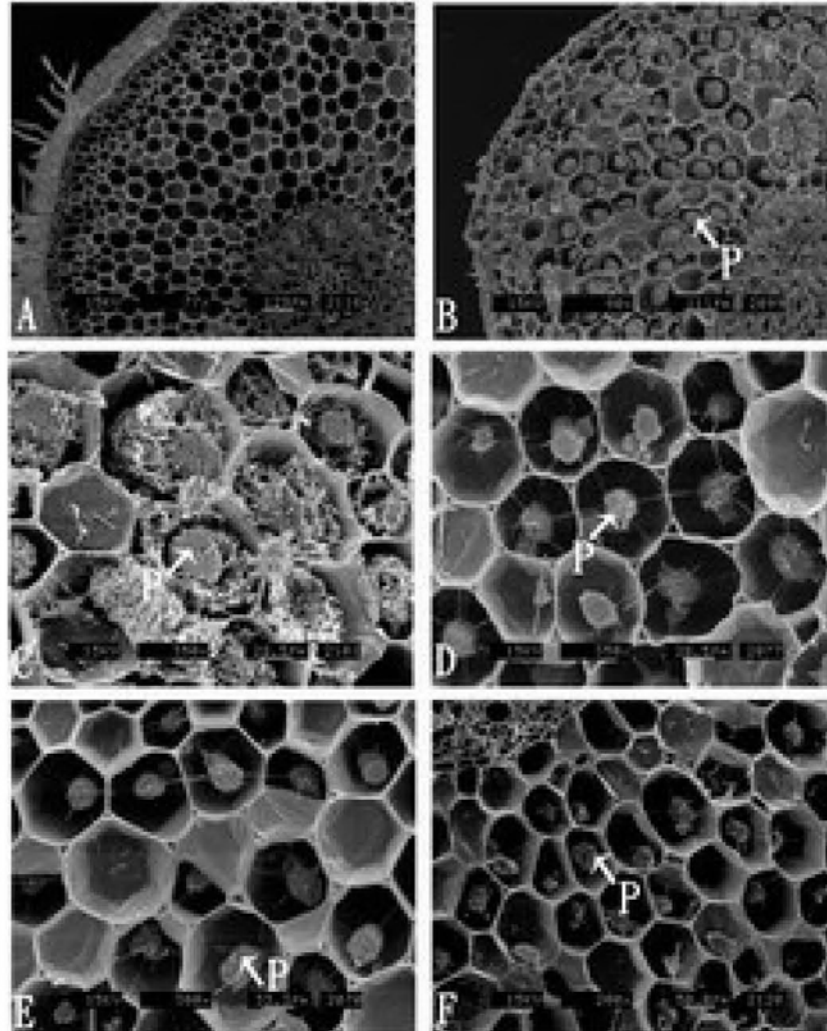


Figure 5. SEM observation of structural changes by hyphal infection in the cortex cells of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume roots after inoculation with *Rhizoctonia* spp. of orchid mycorrhizal fungi R02 (A-D), R15 (E), or R19 (F) for 22 months. A, Control. B, Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02. C, Root cortex cells of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02 and the formation of peloton (P). D, Later stages of pelotons (P), which were digested in the roots of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R02. E, Later stages of pelotons (P), which were digested in the root of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R15. F, Later stages of pelotons (P), which were digested in the root of *P. tankervilleae* (Banks) Blume as inoculated with R19.

include an increased transplant survival rate for seedlings grown in glassware. Tsai (2003), Jin et al. (2009) and Smith et al. (2009) had similar results with other Orchidaceae species. Inoculation with an appropriate OMF (R19) was thus beneficial for *P. tankervilleae*

reproductive growth, earlier flowering, increased number of flower stalks, and increased flower count. Similar results were obtained by Lee et al. (1997), Chu (2000), Takahashi et al. (2006) and Smith et al. (2009) with other Orchidaceae plants. Plants inoculated with the R02 isolate

of *Rhizoctonia* sp. had higher total carbohydrate content and more flower stalk length than did NM control plants; those inoculated with R02 also had a higher CO₂ fixation rate (higher rate of photosynthesis). Inoculation with orchid mycorrhizal fungi increased chlorophyll content (Chu, 2000; Chou, 2004). The fungi also help turn plant cellulose into carbohydrates that are easily absorbed, and can act as a carbon source for orchids (Smith, 1966). Furthermore, OMF provides minerals, vitamins, and other nutrients for plants (Bernard, 1911; Hadley, 1984; Alexander and Hadley, 1985), promotes the absorption of nitrogen, phosphorus and potassium for seedlings (Alexander and Hadley, 1984; Zhao et al., 1999), and promotes plant growth and development, which finally leads to better reproductive growth than in NM control plants. These results lead to the conclusion that the symbiotic relationship between OMF and *P. tankervilleae* enhances the photosynthetic rate, seedling viability, and reproduction growth. Many researches focused on the Orchidaceae symbiosis with mycorrhizal for restoration of orchids (Batty et al., 2001; Beltran-Nambo et al., 2010). Further application of OMF may preserve and restore the endangered orchid species for future commercial production.

Conclusion

In conclusion, the inoculation of OMF was done with just a small amount (about 0.3 g/plant) of inoculum under the roots of orchid; hence, it was very simple. However, this treatment could highly increase the survival rate, growth and development of this orchid. Hopefully, this practice will help to preserve and restore more of the endangered orchid species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Taiwan Forestry Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan, for financially supporting this research under Contract No. 96AS-11.4.1-FB-e1, and Drs. Iou-Zen Chen, Din-Sue Fon, Tsu-Hwei Liu and Wei-Chiang Shen for improving the manuscript.

REFERENCES

- Alexander C, Hadley G (1984). The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytol.* 97:391-400.
- Alexander CE, Hadley G (1985). Carbon movement between host and endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytol.* 101:657-665.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytol.* 152:511-520.
- Bechtel H, Cribb P, Lannert E (1986). *The Manual of Cultivated Orchid Species*. The MIT Press, Cambridge. pp. 72-74, 361-362.
- Beltran-Nambo MA, Carreon-Abud Y, Ortega-Larrocea MP (2010). Mycorrhizal Colonization Patterns of Three *Bletia* Species in a natural forest reserve in Michoacán, Mexico. *Acta Hort.* 878:43-52.
- Bernard N (1911). Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydees. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 14:223-234.
- Chang C, Jian WT (2010). The growth evaluation of *Phaius tankervilleae* cultivation in botanical garden. *Seed Nursery.* 12:13-22.
- Chang DCN (2008). The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. In: W. H. Chen and H. H. Chen (eds), *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Joh Tuck Link, Singapore, pp.77-98.
- Chang DCN. 2008. Research and application of orchid mycorrhiza in Taiwan. *Acta Hort.* 766:299-305.
- Chang YC, Lee N (1999). Growth, morphology and anatomy of pseudobulb and inflorescence in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *J. Chin. Soc. Hortic. Sci.* 45:87-99.
- Chou LC (2004). Mass propagation of *Haemaria discolor* var. *dowsoniana* and the use of *Rhizoctonia* spp. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, p. 169.
- Chu JN (2000). Isolation and inoculation of orchid mycorrhizal fungi and their effects on the seedling growth of *Oncidium Goldiana* X *Onc. Guiana* Gold. Master thesis, Department of Tropical Agriculture, National Ping Tung University of Science and Technology, p. 101
- Dawes CJ (1971). Biological techniques in electron microscopy. *International Textbook Series*, Barnes & Noble Inc. N. Y. 193 p.
- Hadley G (1984). Uptake of C¹⁴-glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorm. *New Phytol.* 96:263-273.
- Jiang G (1996). LI-6400 portable photosynthesis system principle, function, basic operation and main problems and solutions during measurement. *Chin. Bull. Bot.* 13:72-76.
- Jin H, Xu ZX, Chen JH (2009). Interaction between tissue-cultured seedlings of *Dendrobium officinale* and mycorrhizal fungus (*Epulorhiza* sp.) during symbiotic culture. *Chin. J. Plant Ecol.* 33:433-441.
- Komori T (1986). Effects of light control on the growth, flowering and photosynthesis products of *Cymbidium*. *Agric. Hortic.* 43:122-125.
- Koske RE, Gemma JN (1989). A modified procedure staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486-505.
- Lan YC (2001). Effects of orchid mycorrhizal fungi on the growth and development of *Phalaenopsis* and *Paphiopedilum* spp. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, p. 93.
- Lee MC (1989). A study of growth habits and propagation of *Phaius tankervilleae*. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, p. 95.
- Lee SS, Park SS, Kim TJ, Paek KY (1997). Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium kanran* and *Cymbidium goeringii*, and root infection of orchid mycorrhizal fungus. *Korean Soc. Hortic. Sci.* 38:176-182.
- Lindsay H (1973). A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid. *Potato Res.* 16:176-179.
- Luchsinger WW, Cornesky RA (1962). Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal. Biochem.* 4:346-347.
- Mukherjee A (1979). Ornamental *Phaius* as house plant. *Indian Hortic.* 24:23-28.
- Rasmussen H, Andersen TF, Johansen B (1990). Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without its mycorrhizal fungus. *Plant. Cell Environ.* 13:171-177.
- Smith SE (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 45:488-499.
- Smith Z, James EA, McDonnell MJ, McLean CB (2009). Planting conditions improve translocation success of the endangered terrestrial orchid *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae). *Aust. J. Bot.* 57:200-209.
- Stevens RB (1974). *Mycology guidebook*. University of Washington, Seattle.
- Huang TC, Hsieh CF, Kuoh CS, Boufford DE, Ohashi H, Su HJ (2000). *Phaius*. In: eds., *Orchidaceae. Flora of Taiwan*, 2nd edition. 5:1001-1003. Edition Committee, Dept. Bot. NTU, Taipei, Taiwan.
- Su HJ (2000). *Phaius*. In: Huang TC, Hsieh CF, Kuoh CS, Boufford DE, Ohashi H, Su HJ (eds.), *Orchidaceae. Flora of Taiwan*, 2nd edition. 5:1001-1003. Edition Committee, Dept. Bot. NTU, Taipei, Taiwan.

- Takahashi K, Kumagai H, Ogiwara I (2006). Effect of orchid mycorrhizal fungi on the growth of daughter tubers in *Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng. Plantlets raised from tubers *in vitro*. Hortic. Res. (Japan) 5:13-17.
- Tsai YC, Chang C (2009). The breeding history and parents analysis of *Phaius tankervilleae*. Seed Nursery (Taiwan) 11:37-50.
- Tsai LJ (2003). Effects of orchid mycorrhizal fungi and plant growth substances on the growth and development of *Paphiopedilum* spp. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, p. 79.
- Tsai YC (2010). Outbreeding cross and the flower stem culture of *Phaius tankervilleae*. Master thesis, Department of Horticulture, National Chung-Hsing University, p. 105.
- Wu PH, Huang DD, Chang DCN (2011). Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's Growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. Afr. J. Biotechnol. 10(50):10095-10100.
- Wu SC (1991). Studies on seed germination *in vitro* and flowering of *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume. Master thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University, p. 95.
- Yeh CH, Liao FS, Cheng SH (2007). Introduction to native orchid *Phaius* in Taiwan. Taoyuan Dist. Agric. Res. Ext. Str. 59:17-19.
- Yong WH, Hew CS (1995). The importance of photoassimilate contribution from the current shoot and connected back shoots to inflorescence size in the thin-leaved sympodial orchid *Oncidium 'Goldiana'* Int. J. Plant Sci. 156:450-459.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KZ (1972). Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice (2nd ed.) International Rice Res. Inst., Los Banos. p. 38
- Zhao Y, Guo S, Gao W, Du S (1999). The symbiosis of three endophytic fungi with *Cymbidium* sp. and its effects on the mineral nutrition absorption. Acta Hortic. Sin. 26:110-115.