

行政院農業委員會林務局委託研究計畫 100-00-5-25 成果報告

銅山山毛櫸菌根菌對山毛櫸苗木生長
及生理特性之效應

Effects of Mycorrhizal Fungi on Growth and
Physiological Characteristics of
Fagus hayatae Seedlings



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：國立嘉義大學

中華民國 100 年 12 月 31 日

摘要

本研究以銅山臺灣山毛櫸 (*Fagus hayatae* Palib. ex Hay.) 根系結合體進行菌根菌之分離，並接種至山毛櫸幼苗，以探討菌根菌對山毛櫸幼苗的生長及生理效應，期能應用於臺灣山毛櫸之復育工作。

山毛櫸生育地土壤之分析結果顯示，0-20 cm 土層 pH 值為 3.47 ± 0.11 ，其全氮量 0.68 ± 0.11 (%)，有效磷 11.08 ± 4.40 ($\mu\text{g/g}$) 及可置換性陽離子鈣、鉀、鎂、鈉的濃度都甚低。

將去除種皮及未去除種皮兩種不同處理之臺灣山毛櫸種子進行發芽試驗 14 天之結果發現，去除種皮者之發芽率達 30.50 ± 5.41 %，而未去除種皮者均未發芽，顯示去除種皮可以促進臺灣山毛櫸種子之發芽。

本研究自銅山臺灣山毛櫸根系中分離出六株菌株，分別編號為 Fh6、Fh13、Fh15、Fh20、Fh21、及 Fh25，分別經培養和觀察，發現有分生孢子及分生孢子柄之構造；並經由 rDNA 序列，與 NCBI 資料庫比對，Fh6 菌株與 FN298753 菌株相似度達 99 %；Fh13 菌株與 FN678836 相似度達 98 %；Fh15 菌株與 DQ914733 相似度達 97 %；Fh20 菌株與 AY656940 相似度 99 %；Fh21 菌株與 AB219151 相似度達 99 %；F25 菌株與 FJ827172.1 相似度達 99 %。

臺灣山毛櫸苗木於 5 月 12 日進行接種至今達六個月，其淨高生長量以接種 Fh25 菌株為 6.90 ± 3.72 cm 最佳，未接種者 1.40 ± 0.74 cm 為最差，地際直徑淨生長量以接種 Fh13 菌株 0.69 ± 0.35 mm 為最佳，未接種者 0.19 ± 0.06 mm 較差；平均最高淨光合作用速率及平均光補償點以接種 Fh25 菌株者最佳，其最高淨光合作用平均速率為 4.221 ± 0.907 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 9.23 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，平均最高淨光合作用速率及平均光補償點以未接種者最差，其最高淨光合作用平均速率為 1.206 ± 0.078 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 22.34 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；乾重及葉片數、總葉面積都是以接種 Fh25 菌株為最佳，其乾重為 0.39 ± 0.18 g、葉片數為 10.75 ± 6.40 片、總葉面積為 20.85 ± 14.18 cm^2 ；葉綠素含量也是以接

種 Fh25 菌株其含量最高，葉綠素 a 含量為 4.26 ± 1.17 mg/g、葉綠素 b 含量為 2.40 ± 0.78 mg/g、葉綠素 a + b 含量為 6.65 ± 1.40 mg/g，以未接種者其葉綠素 a 及葉綠素 a + b 含量為最低，葉綠素 a 含量為 2.64 ± 0.17 mg/g、葉綠素 a + b 含量為 3.96 ± 1.17 mg/g；氣孔密度則是以接種 Fh13 菌株 962.00 ± 108.90 stomata/mm² 為最高，接種 Fh25 菌株 734.78 ± 51.75 stomata/mm² 次之，以未接種者 416.63 ± 67.18 stomata/mm² 為最低。

【關鍵字】 臺灣山毛櫸、外生菌根、生長、生理

目錄

摘要	1
目錄	3
表目錄	4
圖目錄	5
I、前言	7
II、材料與方法	9
(I) 材料採集	9
(II) 生育地土壤分析	9
(III) 野生菌根觀察	10
(IV) 菌根菌分離純化及培養	11
(V) 菌株形態觀察	11
(VI) 菌株 rDNA 序列鑑定	12
(VII) 苗木接種試驗	14
III、結果	19
IV、討論	55
V、結論	59
VI、參考文獻	60
VII、銅山山毛櫸菌根對山毛櫸苗木生長及生理特性之效應期末報告紀錄	64

表目錄

表 1 臺灣山毛櫸生育地土壤化學性質-----	19
表 2 Fh6 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	22
表 3 Fh13 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	23
表 4 Fh15 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	25
表 5 Fh20 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	27
表 6 Fh21 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	28
表 7 Fh25 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率-----	30
表 8 Fh6 之 rDNA 序列片段-----	32
表 9 Fh13 之 rDNA 序列片段-----	33
表 10 Fh15 之 rDNA 序列片段-----	34
表 11 Fh20 之 rDNA 序列片段-----	35
表 12 Fh21 之 rDNA 序列片段-----	36
表 13 Fh25 之 rDNA 序列片段-----	37
表 14 去除種皮及未去除種皮之臺灣山毛櫸種子發芽試驗 14 天之發芽率-----	38
表 15 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木淨高生長及地際直徑淨生長-----	38
表 16 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木各部位乾重-----	50
表 17 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木葉片數及總葉面積-----	50
表 18 接種處理六個月後臺灣山毛櫸苗木葉綠素含量-----	51
表 19 接種處理六個月後臺灣山毛櫸苗木之下表皮氣孔-----	52

圖目錄

圖 1 臺灣山毛櫸-----	9
圖 2 臺灣山毛櫸之種子-----	14
圖 3 介質添加硫酸處理後，介質 pH 隨時間之變化-----	15
圖 4 硫酸添加量與介質 pH 變化之相關性-----	16
圖 5 臺灣山毛櫸之外生菌根形態-----	20
圖 6 臺灣山毛櫸之外生菌根微細構造-----	21
圖 7 Fh6 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落-----	21
圖 8 Fh6 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態---	22
圖 9 Fh13 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態-----	23
圖 10 Fh13 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態-----	24
圖 11 Fh15 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態-----	24
圖 12 Fh15 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態-----	26
圖 13 Fh20 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 -----	26
圖 14 Fh20 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態-----	27
圖 15 Fh21 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態-----	28
圖 16 Fh21 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態-----	29
圖 17 Fh25 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態-----	29
圖 18 Fh25 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態-----	30
圖 19 臺灣山毛櫸分離菌株之 PCR 分析-----	31
圖 20 臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌及未接種處理六個月後之生長情形-----	39
圖 21 臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌之根外部形態-----	40
圖 22 臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌之根部顯微構造-----	41
圖 23 未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	43
圖 24 未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	43

圖 25	接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	44
圖 26	接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	44
圖 27	接種 Fh13 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	45
圖 28	接種 Fh13 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	45
圖 29	接種 Fh15 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	46
圖 30	接種 Fh15 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	46
圖 31	接種 Fh20 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	47
圖 32	接種 Fh20 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	47
圖 33	接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	48
圖 34	接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	48
圖 35	接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	49
圖 36	接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線-----	49
圖 37	未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	52
圖 38	接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	52
圖 39	接種 Fh13 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	53
圖 40	接種 Fh15 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	53
圖 41	接種 Fh20 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	53
圖 42	接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	54
圖 43	接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈-----	54

I、前言

臺灣山毛櫸 (*Fagus hayatae* Palib. ex Hay.) 又稱早田氏山毛櫸，為殼斗科 (Fagaceae) 山毛櫸屬 (*Fagus*) 植物，本屬植物在世界上的分佈約有十三種，分別分布在歐洲、北美、東亞及西亞，以亞洲擁有的山毛櫸種類最多，歐洲山毛櫸所占面積最大，而臺灣山毛櫸則是山毛櫸屬生長的最南界 (Shen, 1992)，主要分布於臺灣北部海拔 1,300 至 2,300 m 的山區，分別為台北縣:北插天山，南插天山等；宜蘭縣:銅山，阿玉山等，多生長在山頂稜脊上 (臺灣植物誌第二版第二卷，1996)。本次研究地區在宜蘭銅山，其中山毛櫸的分布於望洋山至銅山，下銅山之陵線，並延伸至鹿皮山附近；其森林與臺灣杜鵑、白花八角等闊葉樹混交；下層主要由玉山箭竹組成 (陳子英，2004)。

臺灣山毛櫸是為文資法所公告五種稀有珍貴樹種之一，為臺灣特有之子遺種，屬於小且分布狹隘之族群，實際占有面積小於 100 平方公里，易受害。目前已列入公告保護之珍貴稀有植物 (呂勝由，1996)，但其族群天然更新不佳，生育地山毛櫸幼齡木稀少，且幼苗受酸性土壤之影響頗大，造成其幼苗即使發芽，生長量也不佳 (歐辰雄、呂金誠，2000)。而黃立彥於 2000 年調查拉拉山地區的臺灣山毛櫸林植群生態與天然更新指出，地被植物的玉山箭竹和臺灣瘤足蕨生長迅速，容易覆蓋住剛萌發出來之臺灣山毛櫸小苗，造成當年生之臺灣山毛櫸小苗大量死亡，由上述研究可知臺灣山毛櫸生育地環境惡劣，小苗易被地被植物覆蓋，使其天然更新不易。

臺灣山毛櫸生育地土壤呈強酸性，此現象與淋溶作用有極大關係，表層土壤因強烈的降雨和過度的淋洗，會使土壤膠體之鹼性陽離子被淋失，而遺留者多為酸性陽離子，故土壤呈酸性。酸性土壤中植物因養分問題而生長不佳，而菌根能分解土壤中複合礦物及有機物，釋放重要的養分供寄主吸收 (金恒鑣，1989)。菌根在自然界與植物形成共生器官是普遍的行為，菌根與植物行互利共生，植物依賴菌根吸收養分、水分，而真菌則依賴植物供給碳水化合物，菌根還能對低 pH 值、高鋁含

量、高鹽分、高鹼性引起的植物毒害，具緩衝作用，同樣的菌根也可以改善土壤結構，保存土壤養分，以及對根部疾病有一定的防治作用（胡弘道，1990）。

山毛櫸菌根在國外經研究後，發現多數屬於外生菌根。外生菌根有兩個主要特徵，於植物根端有由菌絲纏繞而成的菌毯包裹，其菌絲並不侵入植物細胞內；並於根的橫切面上可看到表皮與皮層細胞間隙中有哈替氏網的構造。並且有多篇報告提到接種外生菌根可以擴大植物根部之吸收面積及增進養分吸收，增加植物抗病抗逆境之能力，並可以改善根域環境，及促進小苗的生長發育（顏江河，1996；弓明欽等，1997；胡弘道等，2002；Beyeler, M. and W. Heysler, 1997；Dunabeitia *et al.*, 2004）

本研究計畫旨在探討臺灣山毛櫸之外生菌根，以瞭解臺灣山毛櫸菌根之形態，並由根部分離出菌根菌，供幼苗接種之用，以期能經由外生菌根菌之接種，促進幼苗之生長，增加幼苗之存活率，以達成復育臺灣山毛櫸之目的。

II、材料與方法

(I) 材料採集

菌根及土壤採集自銅山地區的山毛櫸純林 (圖 1A)， $121^{\circ}38'14''$ E, $24^{\circ}30'07''$ N，海拔高約 1850 公尺，林內地表佈滿箭竹及腐質層，採集先把箭竹清除乾淨 (圖 1B)，之後再把腐質層清除，待採取菌根及土壤後，隨即回實驗室用一次水清洗菌根以及風乾土壤後，進行下列實驗。

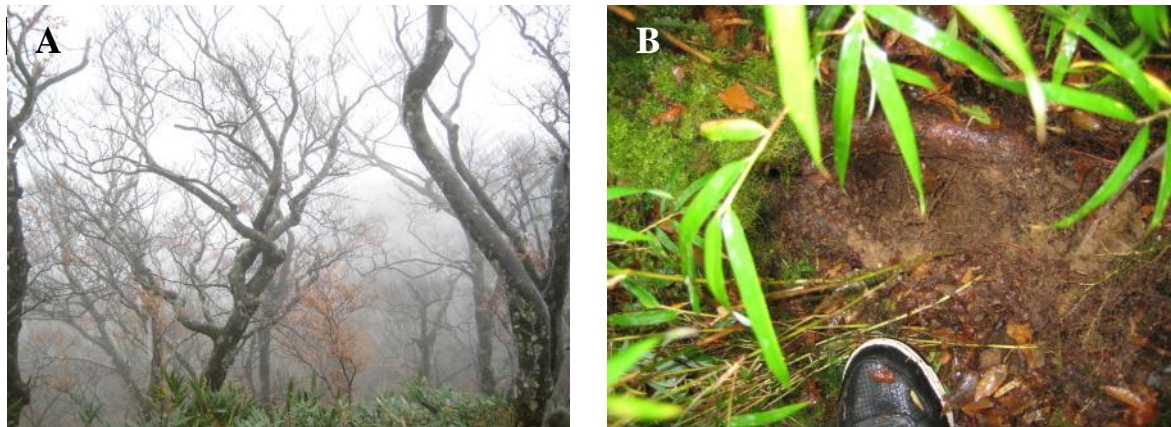


圖 1 臺灣山毛櫸生育地 (A) 及採集情況 (B)

(II) 生育地土壤分析

1. 土壤酸鹼值測定

將土壤風乾、過篩，取出 10 g 土壤樣本加入 20 ml 純水 (重量比 1:2)，震盪 30 min，並靜置懸浮液 30 min，使懸浮之土壤樣本沉澱，並以酸鹼值測定儀 (Inolab pH Level 2) 測定樣本溶液之酸鹼值 (洪國棟, 2008; 謝宛倫, 2009; 余旻儒, 2010)。

2. 土壤氮含量測定

將土壤過篩、烘乾，取出 1 g 樣本加入 15 ml 濃硫酸過夜 (24 hr)，再放入消化裝置 (2020 digester) 緩慢加熱到 375°C ，維持 3 小時，加入 10 ml H_2O_2 ，加熱到 380°C ，維持 1 hr 至樣本呈透明澄清液後過濾之並以蒸餾水定積至 100 ml，取 40 ml 置凱氏氮蒸餾裝置內蒸餾，加入適量之 40 % NaOH 溶液，以 30 ml 4 % 硼酸為接收劑，再以 0.1 NH_2SO_4 溶液滴定之，同時並進行空白試驗，計算出含氮量 (余旻儒, 2010; MacDonald, 1977)。

3. 土壤可置換性陽離子濃度測定

以醋酸銨 (NH_4OAc) 法測定，取 5 g 過篩風乾土壤置於 250 ml 角錐瓶中，加入 40 ml 1 N NH_4OAc ($\text{pH}=7$)，震盪 10 min 靜置過夜。抽氣過濾之，以 NH_4OAc 定積至 100 ml，取澄清濾液利用感應耦合電漿原子發射光譜儀 (ICP) 測定可溶解性及可置換性陽離子鉀、鈣、鎂和鈉濃度 (余旻儒，2010；Rhoades, 1982)。

4. 土壤有效磷含量測定

以鉬藍法測定，取 1 g 樣本置於 50 ml 角錐瓶中，加入 7 ml 萃取液 (0.5 N HCl -0.03 N NH_4F) 搖盪 1 min，以 ADVANTEC 5B 濾紙過濾。取 2 ml 樣液加入 5 ml H_2O 及 2 ml $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 溶液，混合均勻後加入 1 ml SnCl_2 稀釋液呈色後，以分光光度計 (Hitachi U-2000 spectrophotometer) 於波長 660 nm 下測定吸光值，比對磷標準曲線得出樣液之磷濃度 (余旻儒，2010；Olson and Sommer, 1982)。

(III) 野生菌根觀察

1. 立體顯微鏡下觀察

將野外所取回之菌根用一次水清洗乾淨，之後放置於立體顯微鏡下，觀察其菌根外觀、根部變化、菌根顏色、根部周圍有無菌絲包圍、菌絲體顏色等，並拍照紀錄。

2. 掃描式電子顯微鏡下觀察

選取長度約 1 mm 之根段，放置於 2.5 % 戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 固定液中 3 小時以上，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 ($\text{pH}7$) 清洗三次。經 10 %、20 %、30 %、50 %、70 %、80 %、90 %、95 %、100 % 酒精及 100 % 丙酮脫水後，進行臨界點乾燥 (HITACHI HCP-2 critical point dryer) 和真空鍍金機 (PELCO SC-6 sputter coater) 鍍金後，以掃描式電子顯微鏡 (HITACHI S-3500N scanning electron microscope) 觀察其細微構造，並照相紀錄。

(IV) 菌根菌分離純化及培養

1. 菌種分離及純化

將野外所取回之菌根以二次水清洗乾淨，隨即移入無菌操作台以 0.25 % 之次氯酸鈉 (NaOCl) 浸泡 3 min 後，以無菌水沖洗去殘留之化學藥劑，並放置在滅菌過之濾紙上吸去多餘液體，之後用滅菌過之解剖刀把根段分成每公分一段，再用滅菌過之鑷子把根段夾入 1 % 水洋菜培養基中，並用石臘膜密封，置於暗箱中及室溫下培養，待菌絲拓展後，取較邊緣之菌絲移入 MMN 培養基中進行純化處理 (高嘉鴻，2005)。

2. 菌株繼代及保存

將已純化之菌株，使用採菌器採取菌塊，移入 MMN 平板培養基中，並使菌絲生長面貼齊於培養基表面中心，倒置於黑暗培養箱中進行繼代。菌種之保存乃將已純化之菌落取邊緣活性強之菌絲塊移入含 MMN 斜面培養基之螺旋試管中，存放於 4 °C 黑暗環境。

(V) 菌株形態觀察

1. 菌落形態及生長量觀察

使用 MMN 培養基，於 70 °C 溫度下，以 1 N HCl 及 1 N NaOH 分別調配 pH 為 4、5、6、7，並以高溫高壓 (121 °C，1.5 kg/cm²，20 min) 滅菌後倒入無菌培養皿。之後使用無菌採菌器採取已純化菌株之菌塊移入 MMN 平板培養基中，使菌絲生長面貼齊於培養基表面中心，於培養基背面以菌塊為中心定出 X、Y 軸，倒置於 15 °C、20 °C、25 °C 及 30 °C 之黑暗培養箱中 30 天 (胡弘道等，2008)，每週測量菌落直徑，並計算平均生長量。

2. 菌絲形態光學顯微鏡觀察

光學顯微鏡觀察採用葉玉雲等 (1999) 玻片培養觀察法，於無菌操作台中，將已純化之菌株以採菌器採取菌塊，使菌絲生長面貼齊於滅菌之載玻片上，並置於含有濾紙及適量水份之 9 cm 玻璃培養皿中，於 25 °C 之黑暗生長箱中培養 7 至 14 天。

待菌絲於載玻片拓展後，挑除菌塊，使 1 % 之苯胺藍 (aniline blue) 水溶液，染色 1 hr 後，移入 1 % 鹽酸中 30 sec 以固定染劑，再以一次蒸餾水清洗去酸，即可以甘油封片，並以光學顯微鏡觀察紀錄菌絲形態。

3. 菌絲形態掃描式電子顯微鏡觀察

以採菌器採取菌塊，置於濾紙袋並浸於固定液中至少 4 hr，接著進行樣本固定步驟，以磷酸緩衝溶液浸泡 3 次，各 15 min；接著進行序列酒精脫水步驟、臨界點乾燥 (HITACHI HCP-2 critical point dryer) 和真空鍍金機 (PELCO SC-6 sputter coater) 鍍金後，以掃描式電子顯微鏡 (HITACHI S-3500N scanning electron microscope) 觀察其細微構造，並照相紀錄 (孫岩章等，2006)。

4. 試驗設計

採完全逢機複因子設計，使用 6 種菌種、4 種溫度及 4 種 pH 值處理，每處理 4 重複，總計樣本數 384 個。

5. 統計分析

菌株實驗數據以 SPSS17.0 軟體進行變異數分析 (ANOVA)，以鄧肯新多變域檢測法 (Duncan's New Multiple Range Test, MRT) 檢定各處理間之差異。

(VI) 菌株 rDNA 序列鑑定

1. DNA 萃取方法

利用 AxyprepTM Multisource Genomic DNA Miniprep Kit 來萃取菌株之 DNA，其步驟參考余旻儒 (2010) 之方法：

- (1) 由分離菌株取一塊菌塊置入研鉢內，加入液態氮磨粉末。
- (2) 用 600 μ l Buffer G-A 和 1.2 μ l RNase A 溶液，混合均勻後放入 65 °C 水浴槽 10 min。
- (3) 加入 400 μ l Buffer G-B 和 1 ml Buffer DV，離心 12000 rpm，2 min。
- (4) 取下層液放入另一個 2 ml microfuge tube 中，加入 1 ml Buffer DV，離心 12000 rpm，2 min。

- (5) 取下層液放入另一個 2 ml microfuge tube + Spin filter 中，離心 12000 rpm，1 min 以過濾雜質。
- (6) 取出 Spin filter 並加入 400 μ l Buffer BV (輕混合)。
- (7) 將樣本置入於另一個 2 ml microfuge tube + Miniprep column 中，離心 12000 rpm，1 min。
- (8) 倒掉離出液，加入 500 μ l Buffer W1，離心 12000 rpm，1 min。
- (9) 倒掉離出液，加入 700 μ l Buffer W2，離心 12000 rpm，1 min，重複兩次，再離心 12000 rpm，3 min，其目的為去除酒精。
- (10) 將 Miniprep column 放入新 1.5 ml microfuge tube 加入 65 $^{\circ}$ C、25 μ l 無菌水，放置 3 min 後，再離心 12000 rpm，1 min 重複兩次。
- (11) 過濾出來的 DNA 存放至 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增

本實驗所用引子對為 ITS1F 及 ITS4:

ITS1F:CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS4 :TCCTCCGCTTATTGATATGC

其 PCR 反應物及條件參照 Marc *et al.* (2004) 所用之方法，PCR 反應物如下： 2 μ l template DNA、2 μ l 1 \times incubation buffer、0.4 μ l dNTPs、0.4 μ l primers ITS1F 和 ITS4、0.1 μ l Taq DNA polymerase 和 14.7 μ l 無菌水。將上述試劑混和後 (共 20 μ l) 放入 PCR 機器內進行反應。其反應條件為: 最初溫度：94 $^{\circ}$ C，3 min；其次是 94 $^{\circ}$ C 裂解，30 sec；50 $^{\circ}$ C 鏈合，30 sec 和 72 $^{\circ}$ C 延伸，2 min 最後用 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 即完成 PCR 擴增反應。

3. 電泳 (electrophoresis) 染色及拍照

將 PCR 擴增產物，以 1% 之 Agarose I 洋菜瓊脂膠片置於 0.5 \times TBE 緩衝液之電泳槽中，以 100 V 之電壓進行電泳，電泳後膠片以溴化乙錠 (ethidium bromide) 進行染色，並使用紫外燈照相系統觀察膠片並拍照記錄。

4. DNA 定序

將反應後之 PCR 產物以及電泳圖，送交生物科技公司定序，並利用 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 進行序列比對。

(VII) 苗木菌根合成試驗

1. 種子發芽試驗

為促進種子在短期內可以快速發芽，因此進行促進發芽之實驗，將由林業試驗所植物園組種子庫所提供之種子，以 10 % 之次氯酸鈉進行表面消毒 3 min，再以 75 % 之酒精進行表面殺菌 30 sec，後以無菌水清洗數次，之後再將種子分別以去除種皮及未去除種皮二種處理後，移入滅菌過且鋪有一層濾紙之培養皿內，將其均勻鋪平，以未去除種皮之種子為對照組，去除種皮者為試驗組，每處理 25 顆，4 重複，共 100 顆。

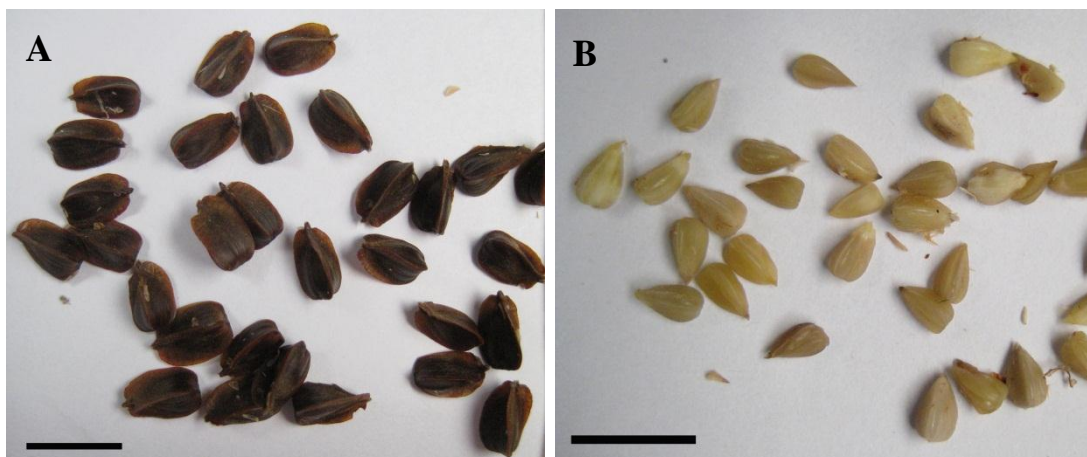


圖 2 臺灣山毛櫸之種子未去除種皮者 (A)、去除種皮者 (B) (橫線= 1 cm)

2. 苗木培育

臺灣山毛櫸幼苗為種子苗，係由林業試驗所植物園組種子庫所提供，經兩個月低溫層積後，將種子以 10 % 之次氯酸鈉進行表面消毒 3 min，再以無菌水清洗去除殘留之次氯酸鈉，隨即將種子置入蛭石與泥炭土之混和介質 (v/v=1:1) 中，待其發芽後，移入裝有混和介質之容器中使其繼續生長。

3.育苗之介質及容器

試驗容器為上徑 14 cm，下徑 10.6 cm，高 13.7 cm 之 5 吋盆，育苗介質採用蛭石與泥炭土混和介質 (v/v=1:1)，容器經漂白水浸泡 30 min，介質經高溫高壓滅菌後，放置在室溫通氣下至少 7 天，以減少因高溫高壓滅菌所產生之毒素。

4.介質 pH 調製

由於原生地土壤偏酸 (pH= 3.47 ± 0.11)，因此在進行接種試驗時，必需把介質 pH 調整與原生地土壤相等，因此引用蔡秀莉 (2005) 所使用之土壤 pH 調製方法，處理方法如下：

- (1) 先各取 100 g 混和介質蛭石與泥炭土 (v/v=1:1)，分別加入 100 ml 的水加 0 ml 的硫酸、100 ml 的水加 0.1 ml 的硫酸、100 ml 的水加 0.2 ml 的硫酸、100 ml 的水加 0.3 ml 的硫酸、100 ml 的水加 0.4 ml 的硫酸、100 ml 的水加 0.5 ml 的硫酸，充分混和後放入密封之玻璃罐內，置於常溫下，每隔 3 天測量一次罐內酸鹼度，共測 4 次。
- (2) 依加入的硫酸之量所測得的數值，來建立調製介質 pH 所需的添加量關係圖。

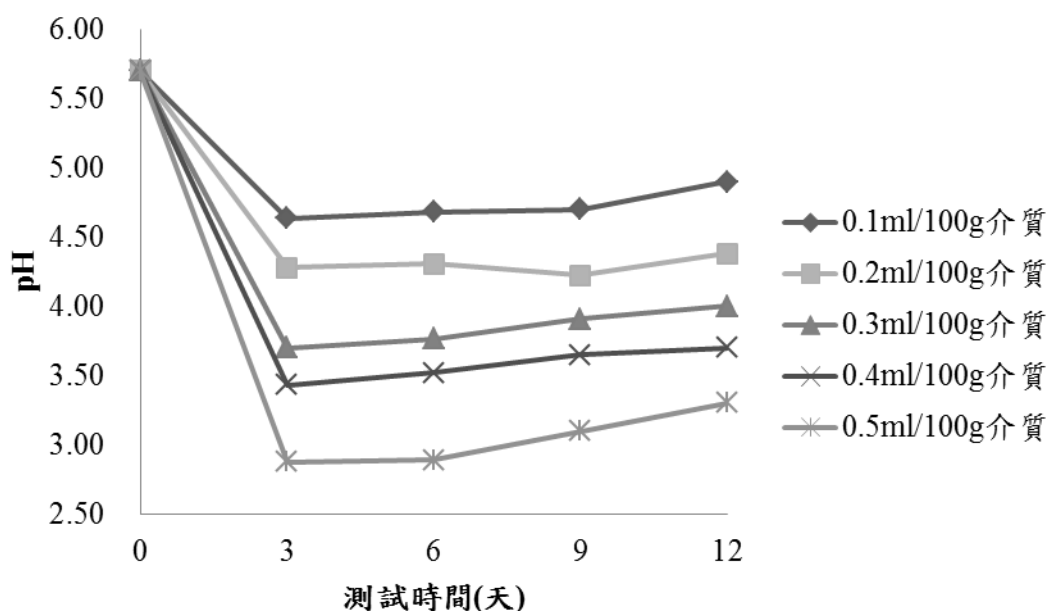


圖3 介質添加硫酸處理後，介質pH隨時間之變化

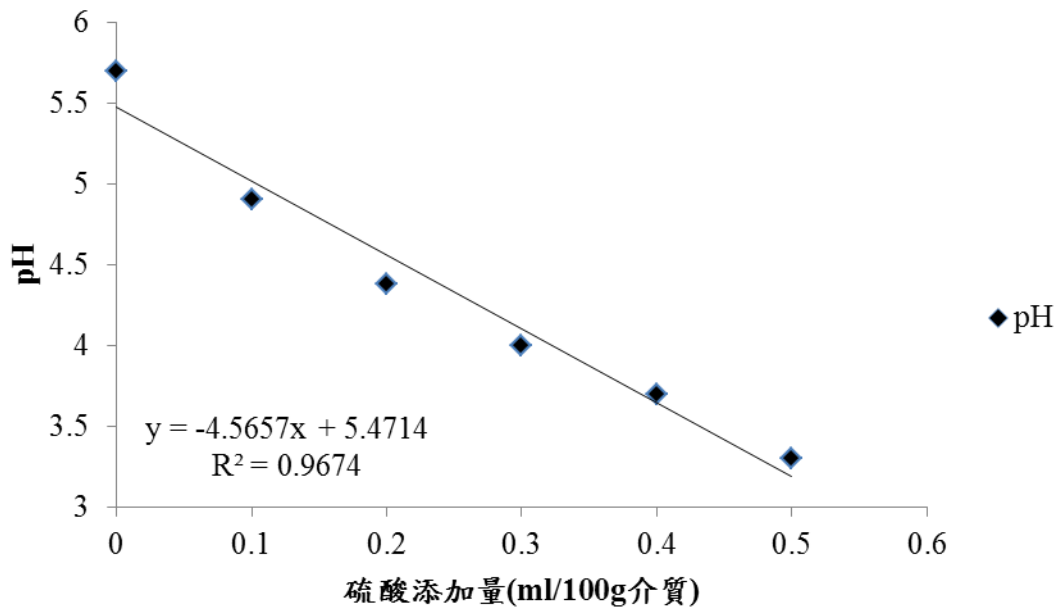


圖4 硫酸添加量與介質pH變化之相關性

5. 半合成試驗

將臺灣山毛櫸實生苗，種植於高溫高壓滅菌土供接種用。菌根合成試驗，是將所分離出來之菌株，以採菌器採取菌絲進行接種，每處理共 16 株，試驗期間為 100 年 5 月 12 日至 100 年 11 月 12 日，六個月後，再觀察接種及未接種之根部形態及構造，並進行下列生長量分析。

(1) 苗高、地際直徑

供試驗苗木配置後，開始調查苗高、地際直徑以作為起始值，每個月量測一次，將測得數值再扣除起始值，求得每個月之累積淨增長量。調查時注意不傷及葉片，以避免後續苗木生長受到干擾，且為避免每次量測地際直徑時之誤差，應於地際直徑量測點作標記。

(2) 淨光合作用合速率

試驗結束後，於每處理測定 4 株苗木，樣本選取其主梢頂端向下第三或四片已完全展開之成熟葉片進行淨光合作用速率測定。除測定光合速率之葉片外，其餘葉片均處於光照環境，未施予額外之光量。本測定係採用 LI-COR LI-6400 手提式光

合作用測定儀。系統參數設定：CO₂ 濃度 400 ppm，葉溫 28 °C，光量設定 0、5、10、15、20、25、50、100、300、600、900、1200、1500、1800 μmol photon m⁻²s⁻¹ 等 14 級，相對濕度 50~60%，系統設定自動儲存，每存取 1 筆資料，採其平均測值。苗木進行測定前一天先充分澆水，第二天進行測定，測定時必須俟 CO₂ 及水分變化穩定後再進行。

(3) 乾重

試驗結束後，每處理測定苗木 4 株。苗木先以葉面積儀 (LI-COR LI-3100) 搭配葉面積儀讀出紀錄主體 (LI-3000A) 量測葉面積及葉片數量後，再進行乾重處理。乾重處理苗木以清水沖洗乾淨，將其分為根、莖及葉三部分，稱其鮮重，然後分別放入烘箱內，以 70 ± 5 °C 烘至恆重，稱取各部位乾重。

(4) 葉綠素濃度

試驗結束時，於每處理測定苗木 4 株測葉綠素濃度。選取之苗木取梢頂下第 3 或第 4 片以完全展開成熟之葉片，稱取鮮重後置於研鉢中，加入液態氮磨碎，再以 80% 丙酮萃取，用 1 號濾紙過濾後，定積至 10 ml，取上層澄清液，以日立 U-2000 型雙光束分光光譜儀 (Spectrophotometer) 測定其在波長 645 nm、663 nm 時之吸光度，依下列計算式換算葉綠素含量 (王月雲，1981；余旻儒，2010)。

$$\text{葉綠素 a 含量 (mg/g)} = \{ 12.7 \times (D_{663}) - 2.69 \times (D_{645}) \} \times V / 1000W$$

$$\text{葉綠素 b 含量 (mg/g)} = \{ 22.9 \times (D_{645}) - 4.68 \times (D_{663}) \} \times V / 1000W$$

$$\text{葉綠素 a+b 總量 (mg/g)} = \{ 20.2 \times (D_{645}) + 8.02 \times (D_{663}) \} \times V / 1000W$$

V：萃取總體積 (L)

W：葉片鮮重 (g)

D_λ：萃取液在 λ 波長 (nm) 之吸光度

(5) 葉部氣孔形態、密度及葉組織構造之觀察

各處理苗木葉部樣本之製備過程如下：選取各處理苗木成熟且完全展開之葉片，剪取中央部位 2×2 mm 的葉圓片，放置於 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 固定液中 3 hr，以 0.1M 磷酸緩衝液 (pH7) 清洗，再以 1% 四氧化鐵 (OsO₄) 固定 1

hr，以 0.1M 磷酸緩衝液清洗。經 50%、70%、80%、90%、95%、100% 酒精及 100% 丙酮脫水後，進行臨界點乾燥 (HITACHI HCP-2, Critical Point Dryer) 和真空鍍金機 (PELCO SC-6 Sputter Coater) 鍍金後，以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, HITACHI S-3500N, SEM) 觀察。

(6) 統計分析

試驗數據以 SPSS17.0 軟體進行變異數分析 (ANOVA)，以鄧肯新多變域檢測法 (Duncan's New Multiple Range Test, MRT) 檢定各處理間之差異。

III、結果

(I) 土壤分析

由表可知臺灣山毛櫸之生育地性質，土壤 pH 值為 3.47 ± 0.11 ，可置換性陽離子分別為， Na^+ : $1.71 \pm 0.03 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$ 及 Mg^{2+} : $0.13 \pm 0.05 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$ ，全氮量為 $0.68 \pm 0.11 \%$ ，有效磷含量為 $11.08 \pm 4.40 \mu\text{g/g}$ 。

表 1 臺灣山毛櫸生育地土壤化學性質

測驗項目	0~20cm 土層
pH 值	3.47 ± 0.11
Na^+ (cmol (+) kg^{-1})	1.71 ± 0.03
Mg^{2+} (cmol (+) kg^{-1})	0.13 ± 0.05
N (%)	0.68 ± 0.11
P ($\mu\text{g/g}$)	11.08 ± 4.40

(II) 野生臺灣山毛櫸根系形態

1. 立體顯微鏡觀察

由立體顯微鏡觀察到菌根形態：(1)菌根依 Agerer (1995) 所分類之外生菌根形態，有單軸金字塔型、單軸羽狀型亦有單根型；(2)菌根顏色在幼年時呈淡黃色，成熟菌根呈深褐色 (圖 5)。

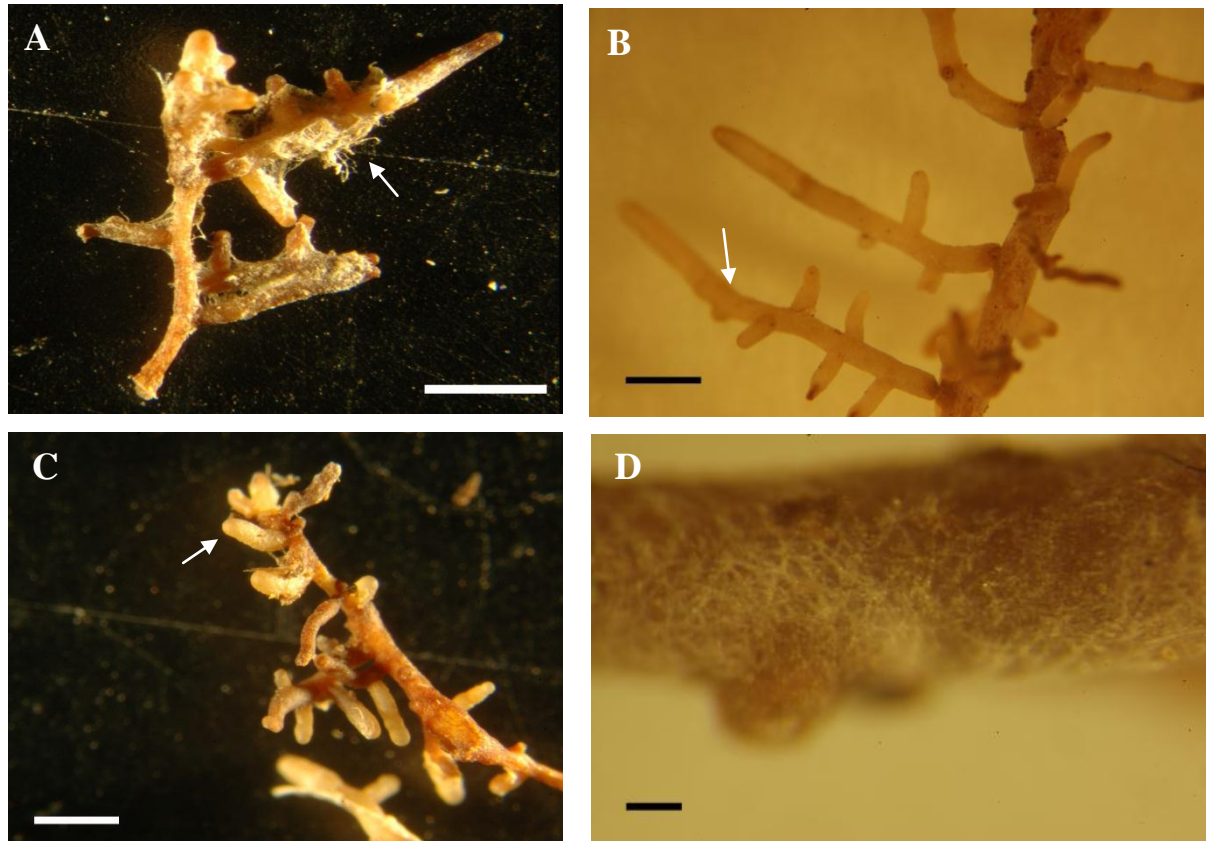


圖 5 臺灣山毛櫸之外生菌根形態

A:單軸金字塔型之根系結合體 (箭頭)；B:單軸羽狀型之根系結合體 (箭頭)；
 C:單根型之根系結合體 (箭頭)；D:根外菌絲佈滿根部 (橫線:A、B、C= 1 mm；
 D= 100 μ m)

2.掃描式電子顯微鏡觀察

由掃描式電子顯微鏡觀察到菌根形態:(1)菌毯依照 (Kingleby *et al.*,1990) 菌毯結構圖下去分類,如(圖 6-A) 為網狀密實菌絲;(2)在(圖 6-B) 中發現到菌毯包覆根段 (m) 及哈替氏網 (箭頭處) 入侵皮層細胞間隙。

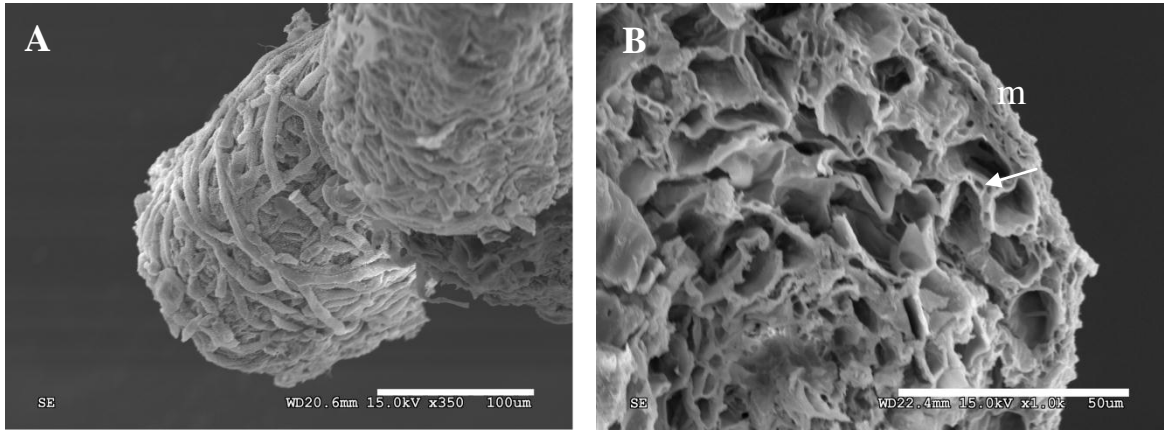


圖 6 臺灣山毛櫸之外生菌根微細構造

(A:根段被菌絲所包圍；B:菌毯 (m) 及哈替氏網 (箭頭處)；橫線: A= 100 μ m；
B= 50 μ m)

(III) 菌株形態觀察

本次試驗自臺灣山毛櫸根部分離出 6 株菌株分別是 Fh6、Fh13、Fh15、Fh20、Fh21、Fh25 其在 MMN 培養基上每日平均生長速率及菌株形態如下。

(1) Fh6 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 7-A) 顏色由中心淺棕色至外緣白色，菌落表面有稀疏的白色氣生菌絲，菌落背面 (圖 7-B) 顏色與正面相同，無代謝物的累積。

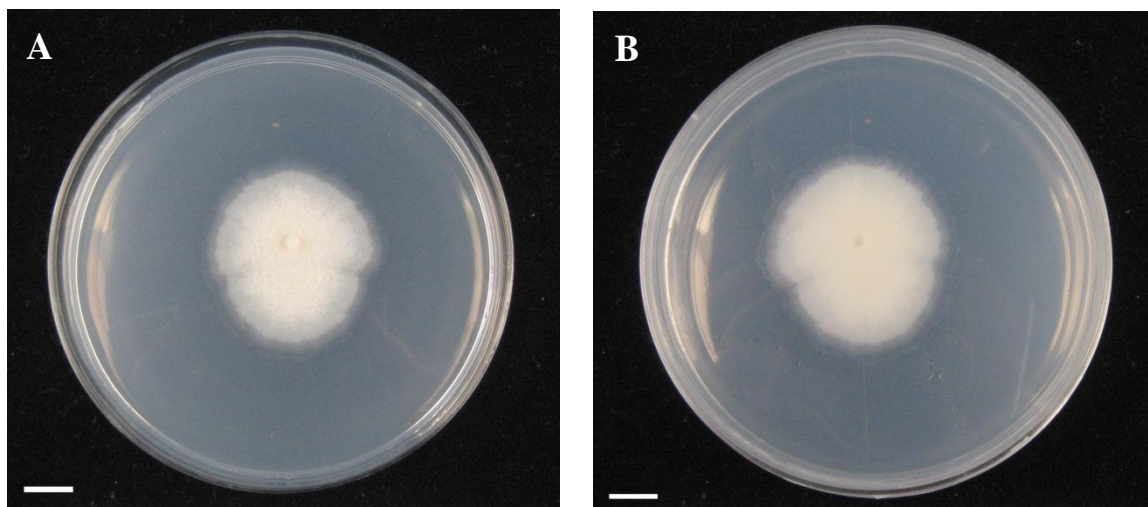


圖 7 Fh6 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面，B:背面，橫線= 1 cm)

2. 生長速率

Fh6 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 25 °C 下每日生長速率 0.91 ± 0.04 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 25 °C 下每日生長速率 0.79 ± 0.03 mm/day 為最高；在 pH 值 5 以 25 °C 下每日生長速率 0.82 ± 0.03 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 25 °C 下每日生長速率 0.66 ± 0.09 mm/day 為最高。

表 2 Fh6 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	0.37 ± 0.09^c	0.48 ± 0.02^c	0.55 ± 0.06^b	0.63 ± 0.02^b
20	0.46 ± 0.01^b	0.60 ± 0.05^b	0.57 ± 0.05^b	0.56 ± 0.06^c
25	0.66 ± 0.09^a	0.82 ± 0.03^a	0.79 ± 0.03^a	0.91 ± 0.04^a
30	0.46 ± 0.02^b	0.43 ± 0.03^c	0.45 ± 0.02^c	0.34 ± 0.03^d

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

在光學及電子顯微鏡下可以觀察到分生孢子，及分生孢子柄，分生孢子呈圓形長寬各約為 8 μm ，分生孢子柄較為短小，約 20 μm 。

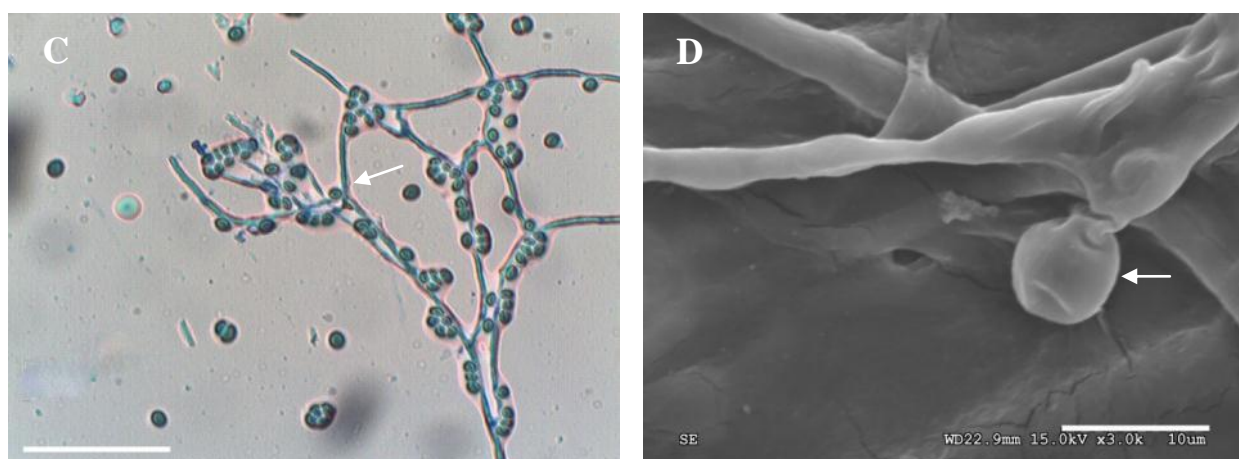


圖 8 Fh6 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態

(A:分生孢子柄 (箭頭)；B:分生孢子 (箭頭)；A 橫線= 50 μm ，B 橫線= 10 μm)

(2) Fh13 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 9-A) 顏色由中心黃色至外緣淡黃色，菌絲菌絲平鋪於培養基表面，菌落表面有淡黃色菌絲，菌落背面 (圖 9-B) 顏色與正面相同，菌絲呈波浪狀向外生長，無代謝物產生。

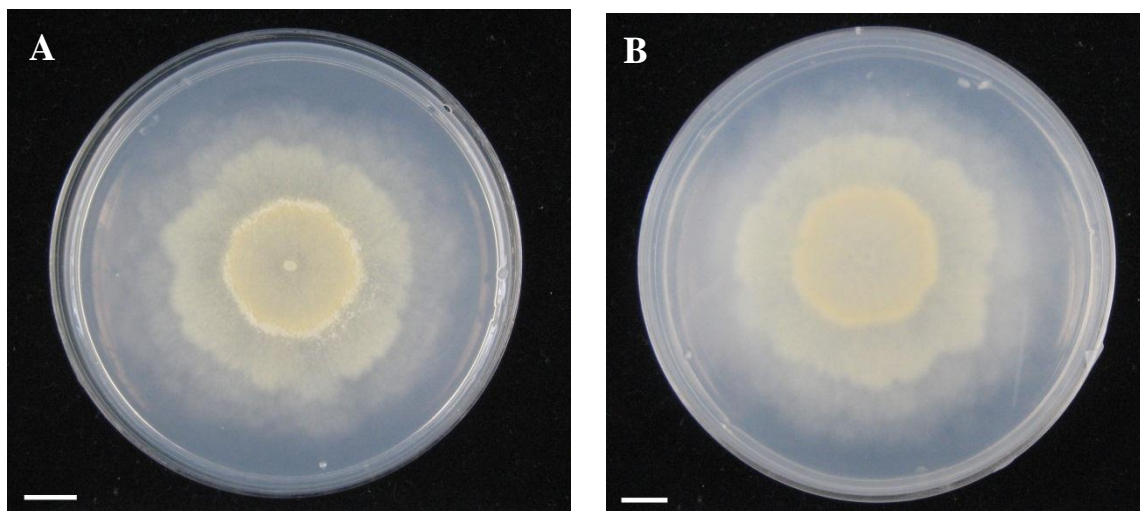


圖 9 Fh13 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面, B:背面, 橫線=1 cm)

2. 生長速率

Fh13 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 20 °C 下每日生長速率 2.07 ± 0.10 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 20 °C 下每日生長速率 2.56 ± 0.10 mm/day 為最高；在 pH 值 5 以 20 °C 下每日生長速率 2.55 ± 0.06 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 20 °C 下每日生長速率 2.28 ± 0.03 mm/day 為最高。

表 3 Fh13 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	2.15 ± 0.04^b	2.45 ± 0.28^a	2.43 ± 0.25^a	1.77 ± 0.18^a
20	2.28 ± 0.03^a	2.55 ± 0.06^a	2.56 ± 0.10^a	2.07 ± 0.10^a
25	1.76 ± 0.12^c	1.14 ± 0.25^b	1.02 ± 0.27^b	0.19 ± 0.07^b
30	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

在光學及電子顯微鏡下可以觀察到分生孢子，及分生孢子柄，營養菌絲可以清楚看到隔膜，分生孢子呈圓形長寬各約為 $5\ \mu\text{m}$ ，分生孢子柄約有 $15\ \mu\text{m}$ 。

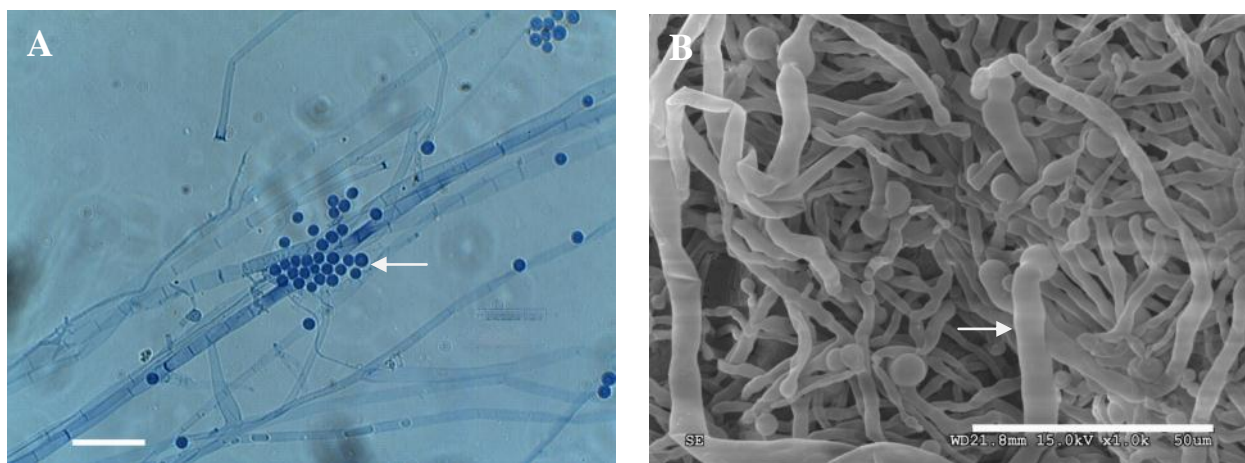


圖 10 Fh13 於光學顯微鏡(A)及掃描式電子顯微鏡(B)下之菌絲形態

(A:分生孢子 (箭頭); B:分生孢子柄 (箭頭); A、B 橫線= $50\ \mu\text{m}$)

(3) Fh15 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 11-A) 顏色由中心粉白至外緣淺棕色，菌絲平鋪於培養基表面，菌落表面具有白色菌絲，菌落背面 (圖 11-B) 顏色與正面不相同，中心淺棕色至外圍深棕色，菌絲呈放射狀生長，無代謝物形成。

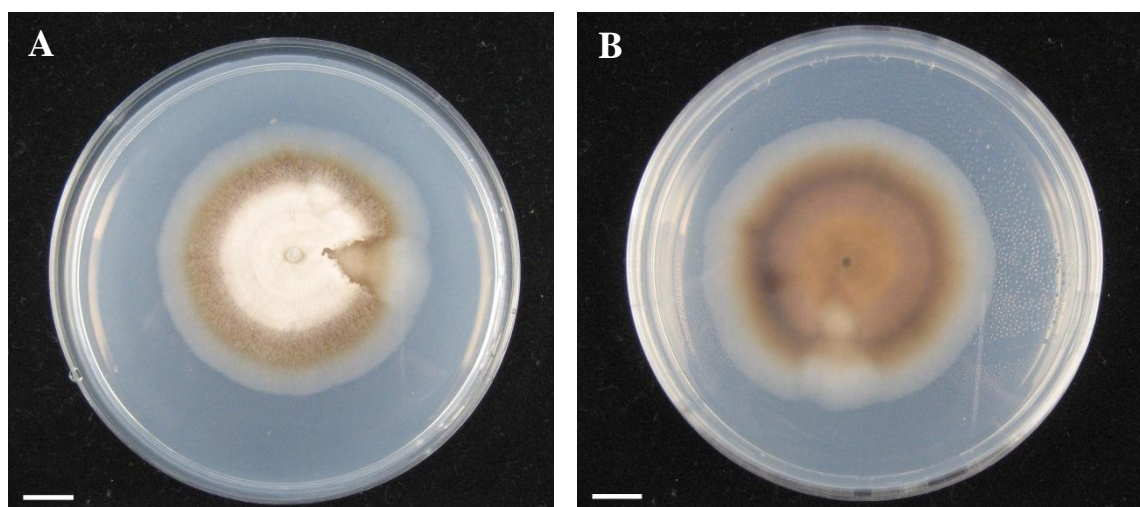


圖 11 Fh15 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面, B:背面, 橫線= $1\ \text{cm}$)

2. 生長速率

Fh15 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 25 °C 下每日生長速率 1.11 ± 0.02 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 20 °C 下每日生長速率 1.12 ± 0.03 mm/day 為最高；在 pH 值 5 以 20 °C 下每日生長速率 1.15 ± 0.09 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 25 °C 下每日生長速率 0.92 ± 0.10 mm/day 為最高。

表 4 Fh15 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	0.79 ± 0.06^b	1.08 ± 0.05^a	1.06 ± 0.02^b	1.03 ± 0.07^b
20	0.92 ± 0.10^a	1.15 ± 0.09^a	1.12 ± 0.03^a	1.05 ± 0.02^{ab}
25	0.98 ± 0.05^a	1.08 ± 0.04^a	1.08 ± 0.03^b	1.11 ± 0.02^a
30	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

由圖 12 可以看出 Fh15 的分生孢子以及分生孢子柄，並且可知其營養菌絲及繁殖菌絲顏色較深並具有隔膜，分生孢子柄呈骨骼狀，分生孢子長約 10 μm 寬約 3 μm ，分生孢子柄長約 5 至 15 μm 。

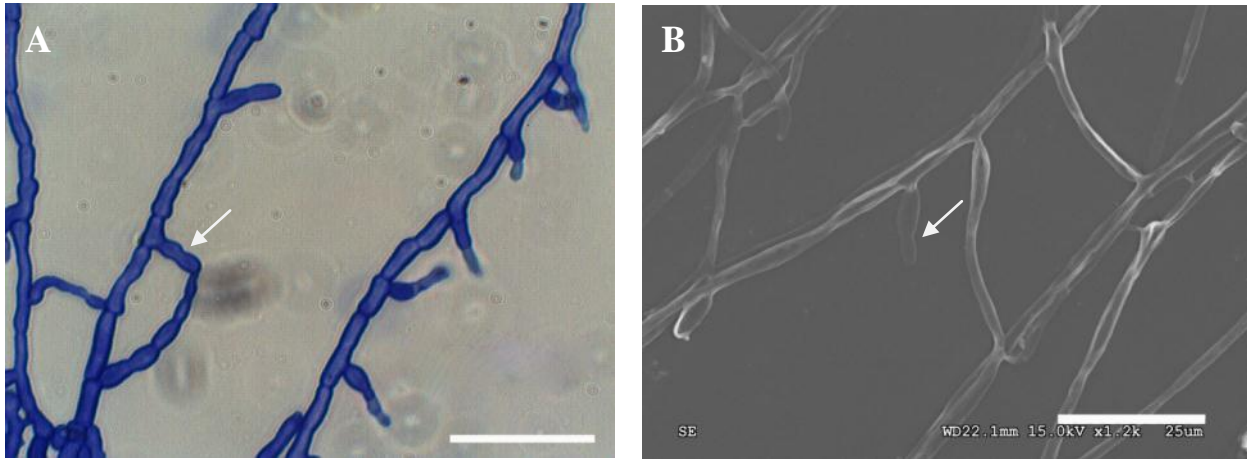


圖 12 Fh15 於光學顯微鏡(A)及掃描式電子顯微鏡(B)下之菌絲形態

(A:分生孢子柄 (箭頭)；B:分生孢子 (箭頭)；A 橫線= 50 μm ，B 橫線= 25 μm)

(4) Fh20 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 13-A) 顏色由中乳白色至外緣白色，菌絲平鋪於培養基表面，菌落表面有些微的皺褶，菌落背面 (圖 13-B) 顏色與正面相同，沒有代謝物的累積。

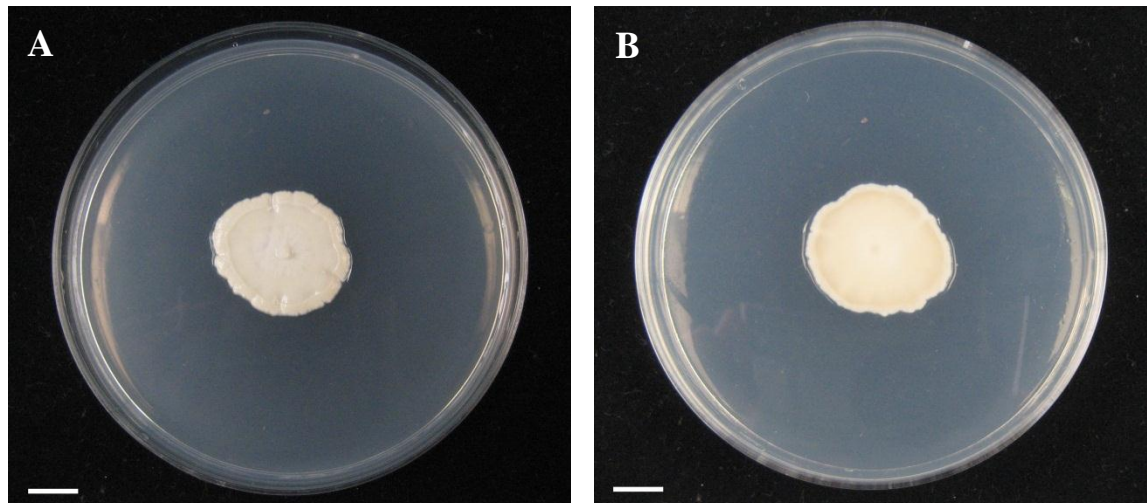


圖 13 Fh20 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面, B:背面, 橫線= 1 cm)

2. 生長速率

Fh20 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 25 $^{\circ}\text{C}$ 下每日生長速率 0.62 ± 0.06 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 25 $^{\circ}\text{C}$ 下每日生長速率 0.54 ± 0.06 mm/day 為最高；

在 pH 值 5 以 25 °C 下每日生長速率 0.61 ± 0.09 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 25 °C 下每日生長速率 0.45 ± 0.04 mm/day 為最高。

表 5 Fh20 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	0.30 ± 0.02^c	0.40 ± 0.02^b	0.43 ± 0.03^b	0.44 ± 0.04^b
20	0.35 ± 0.04^b	0.50 ± 0.11^b	0.47 ± 0.02^b	0.48 ± 0.03^b
25	0.45 ± 0.04^a	0.61 ± 0.09^a	0.54 ± 0.06^a	0.62 ± 0.06^a
30	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

在光學及電子顯微鏡下皆可以觀察到分生孢子鏈，及分生孢子柄，其營養菌絲較為細小，分生孢子長約 $8 \mu\text{m}$ 、寬約 $4 \mu\text{m}$ ，分生孢子柄長約 $8 \mu\text{m}$ 。

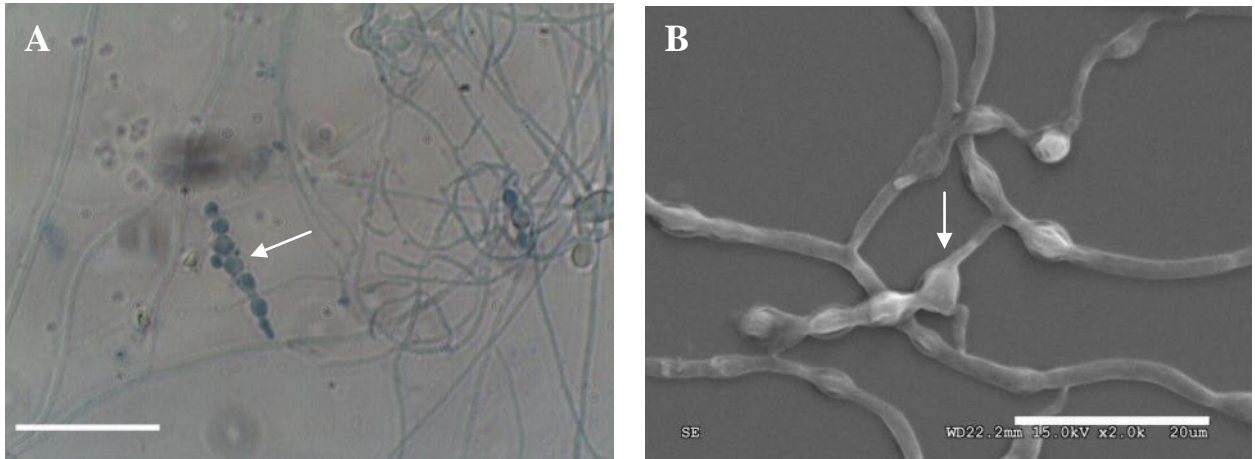


圖 14 Fh20 於光學顯微鏡(A)及掃描式電子顯微鏡(B)下之菌絲形態

(A:分生孢子鏈 (箭頭)；B:分生孢子 (箭頭)；A 橫線= $50 \mu\text{m}$ ，B 橫線= $25 \mu\text{m}$)

(5) Fh21 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 15-A) 顏色由中心淺墨綠色至外緣深墨綠，菌絲平鋪於培

養基表面，菌落中心具有淺墨綠色之氣生菌絲，菌落背面（圖 15-B）顏色與正面相同，菌絲呈放射狀生長，無代謝物產生。

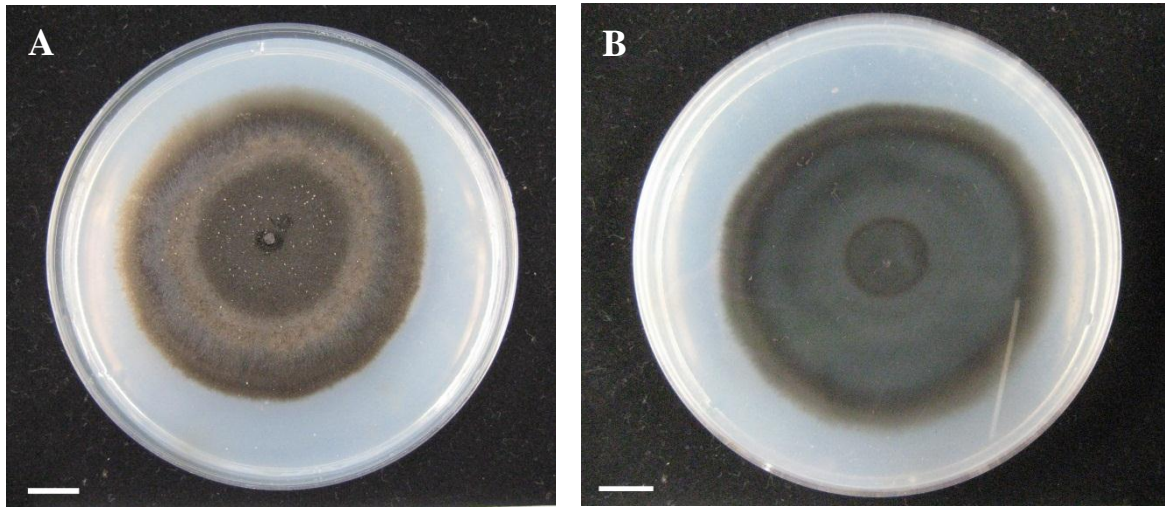


圖 15 Fh21 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面, B:背面, 橫線= 1 cm)

2. 生長速率

Fh21 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 25 °C 下每日生長速率 0.86 ± 0.08 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 25 °C 下每日生長速率 0.97 ± 0.02 mm/day 為最高；在 pH 值 5 以 25 °C 下每日生長速率 0.86 ± 0.03 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 25 °C 下每日生長速率 0.63 ± 0.01 mm/day 為最高。

表 6 Fh21 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	0.51 ± 0.08^b	0.56 ± 0.02^c	0.57 ± 0.60^b	0.72 ± 0.05^b
20	0.52 ± 0.04^b	0.65 ± 0.03^b	0.61 ± 0.06^b	0.80 ± 0.04^{ab}
25	0.63 ± 0.01^a	0.86 ± 0.03^a	0.97 ± 0.02^a	0.86 ± 0.08^a
30	0.16 ± 0.01^c	0.12 ± 0.00^d	0.16 ± 0.03^c	0.12 ± 0.03^c

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

在光學顯微鏡下可以看到骨骼狀營養菌絲，寬約 5 μm ，在電子顯微鏡下可以

發現有分生孢子的存在，分生孢子柄基部膨大，分生孢子呈圓形，分生孢子長寬約為 3 μm 。

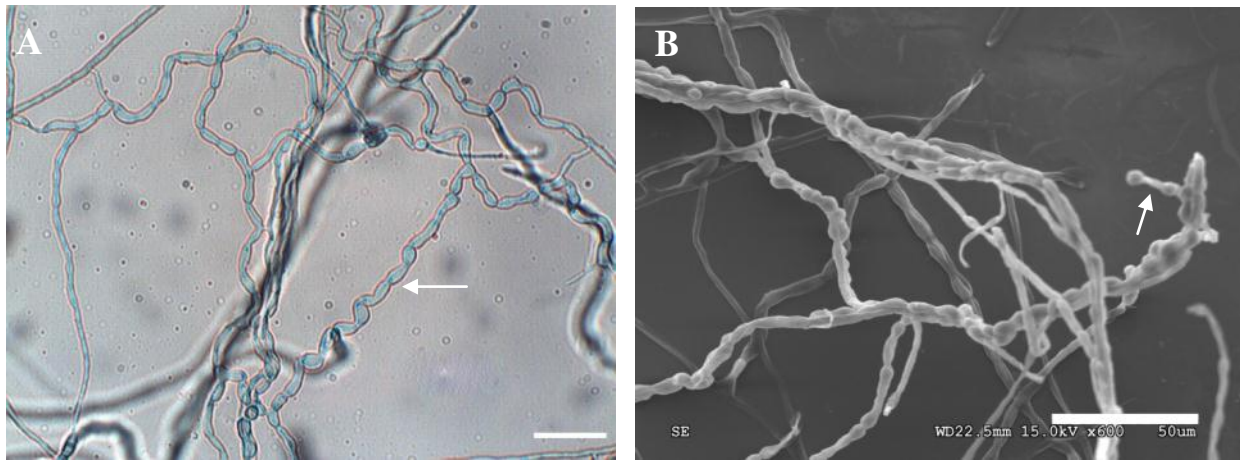


圖 16 Fh21 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態

(A:骨骼狀菌絲 (箭頭); B:分生孢子柄 (箭頭); A、B 橫線= 50 μm)

(6) Fh25 菌株

1. 菌落形態

培養基正面菌落 (圖 17-A) 顏色中心為象牙白色，中心外圍有一圈淺咖啡色圓圈，後至外緣都為象牙白色，菌絲平鋪於培養基表面，呈放射狀交叉生長，菌落具有象牙白色之氣生菌絲，菌落背面 (圖 17-B) 由中心深咖啡色至外緣象牙白色，並且有鵝黃色代謝物產生。

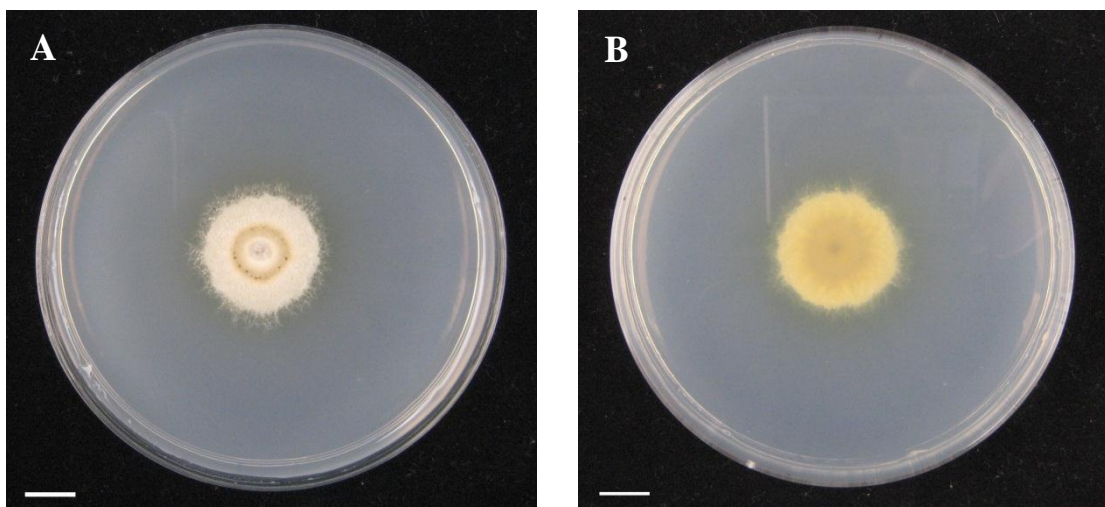


圖 17 Fh25 菌株培養於 MMN 平板培養基之菌落形態 (A:正面, B:背面, 橫線= 1 cm)

2. 生長速率

Fh25 菌株於培養基中，在 pH 值 7 時以 25 °C 下每日生長速率 1.55 ± 0.03 mm/day 為最高；在 pH 值 6 以 25 °C 下每日生長速率 1.35 ± 0.05 mm/day 為最高；在 pH 值 5 以 25 °C 下每日生長速率 1.25 ± 0.05 mm/day 為最高；在 pH 值 4 以 25 °C 下每日生長速率 1.12 ± 0.02 mm/day 為最高。

表 7 Fh25 菌株在 MMN 培養基上於不同溫度及 pH 每日平均生長速率 (mm/day)

溫度 (°C)	pH			
	4	5	6	7
15	0.82 ± 0.12^b	0.66 ± 0.08^b	1.10 ± 0.09^b	0.96 ± 0.09^c
20	1.00 ± 0.07^{ab}	0.76 ± 0.07^a	1.21 ± 0.13^b	1.40 ± 0.01^b
25	1.12 ± 0.02^a	1.25 ± 0.05^a	1.35 ± 0.05^a	1.55 ± 0.03^a
30	$0.30 \pm 0.00_c$	0.34 ± 0.04^c	0.40 ± 0.02^c	0.64 ± 0.05^d

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

3. 菌絲形態

在光學顯微鏡下可以觀察到營養菌絲，分生孢子柄及分生孢子的存在，同樣的在電子顯微鏡下也可以發現有分生孢子及分生孢子柄，分生孢子呈圓形至橢圓形，分生孢子長約 $10\mu\text{m}$ 寬約 $5\sim 8\mu\text{m}$ ，分生孢子柄長約 $5\mu\text{m}$ 。

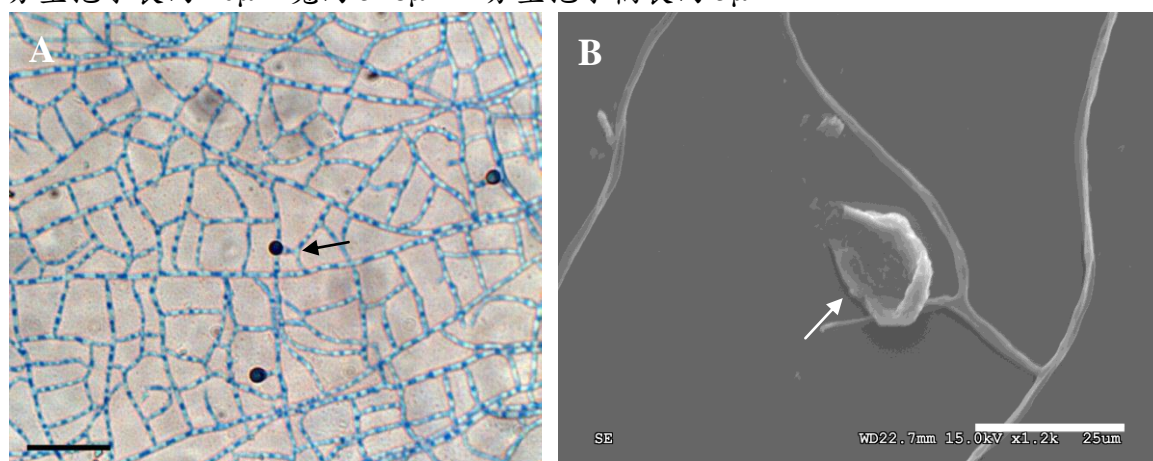


圖 18 Fh21 於光學顯微鏡 (A) 及掃描式電子顯微鏡 (B) 下之菌絲形態

(A:分生孢子柄 (箭頭); B:分生孢子 (箭頭); A 橫線= $50 \mu\text{m}$, B 橫線= $25 \mu\text{m}$)

(IV) 菌株 rDNA 序列鑑定

本試驗所分離出之五株菌種 Fh 6、Fh 13、Fh15、Fh20、Fh 21 及 Fh 25，以生物技術鑑定，使用 ITS1F 及 ITS4 primer 增幅 rDNA 片段，得到約 600 bp 至 700 bp 之 PCR 產物 (圖 20)，並送生物科技公司定序後，與 NCBI 網站中基因庫進行比對，Fh6 菌株與 FN298753 Uncultured fungus 菌株最接近相似度達 99 %；Fh13 菌株與 FN678836 *Mortierellales* sp. GF5V1a 最為相近相似度達 98 %；Fh15 菌株與 DQ914733 *Helotiales* sp.相似度達 97 %；Fh20 菌株與 AY656940 Uncultured mycorrhizal fungus 相似度 99 %；Fh21 菌株與 AB219151 Uncultured ectomycorrhizal fungus 相似度達 99 %；F25 菌株與 FJ827172.1 Uncultured *Helotiales* 相似度達 99 %。

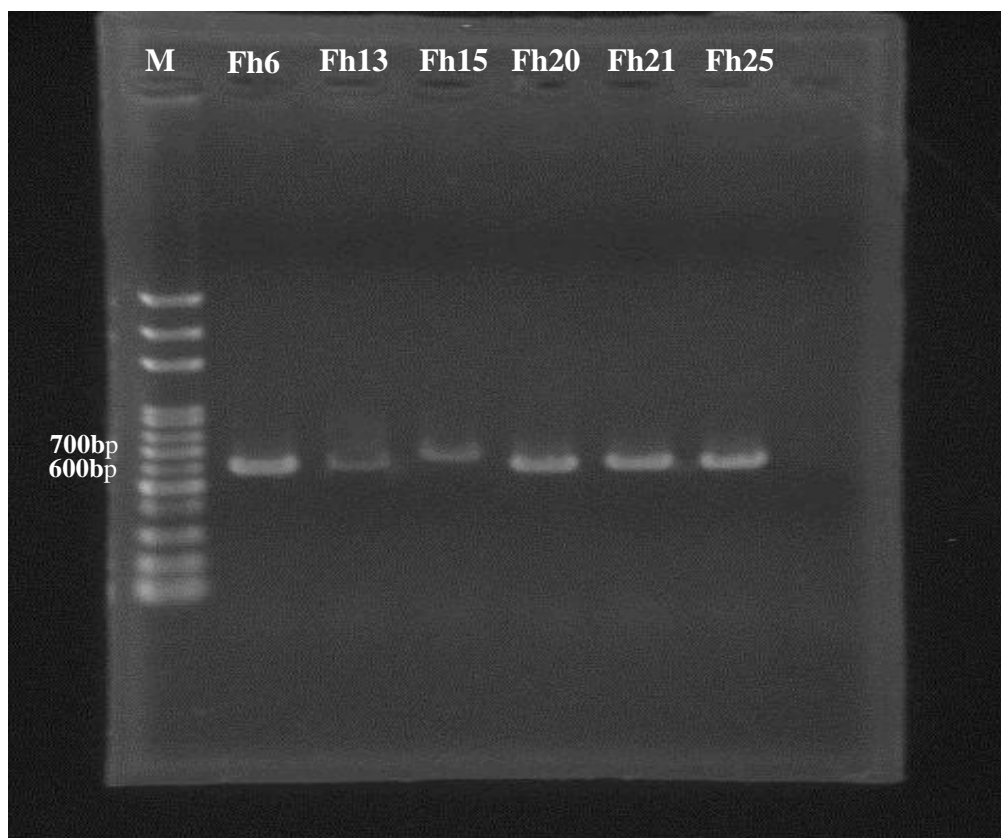


圖 29 臺灣山毛櫸分離菌株之 PCR 分析 (M:分子標記，Fh6, Fh13, Fh15, Fh20，Fh21, F25 strains)

表 8 Fh6 之 rDNA 序列片段

FN298753 Uncultured fungus

Score = 872 bits (472), Expect = 0.0

Identities = 475/477 (99 %), Gaps = 0/477 (0 %)

Strand=Plus/Plus

Fh6	1	TCATTACAGGACTCGCAAGACTCCTTAACCCTGTGAACTTACTATAAAGCGCGTTGCTTC	60
Sbjct	8	TCATTACAGGACTCGCAAGACTCCTTAACCCTGTGAACTTACTATAAAGCGCGTTGCTTC	67
Fh6	61	GGCGGGTGCCCCGGGTCTCCCGAGGCGCTAAGCCCGCCGGCAGCCTACAAATTCTGTTTC	120
Sbjct	68	GGCGGGTGCCCCGGGTCTCCCGAGGCGCTAAGCCCGCCGGCAGCCTACAAATTCTGTTTC	127
Fh6	121	TTTGCGTTGGCATCTCGAGTAAAACAAATAAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG	180
Sbjct	128	TTTGCGTTGGCATCTCGAGTAAAACAAATAAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG	187
Fh6	181	TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCG	240
Sbjct	188	TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCG	247
Fh6	241	TGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT	300
Sbjct	248	TGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT	307
Fh6	301	TCGAGCGTCATTGCAACCCTCAGGCCCTGCCTGGCGTTGGAGGACTGCACTGCAGCCTCC	360
Sbjct	308	TCGAGCGTCATTGCAACCCTCAGGCCCTGCCTGGCGTTGGAGGACTGCGCTGCAGCCTCC	367
Fh6	361	TAAAGCAAGCGGGCGGGCGGCGCCCAAAACCGAACGCAGTAATACATCTCGTTCTGGGTCT	420
Sbjct	368	TAAAGSAAGCGGGCGGGCGGCGCCCAAAACCGAACGCAGTAATACATCTCGTTCTGGGTCT	427
Fh6	421	GGGACGTTGTCCGGCCGAAAACCCCTCTTTTACGTGGTTGACCTCGAATCAGGTA	477
Sbjct	428	GGGACGTTGTCCGGCCGAAAACCCCTCTTTTACGTGGTTGACCTCGAATCAGGTA	484

表 9 Fh13 之 rDNA 序列片段

FN678836 *Mortierellales* sp. GF5V1a

Score = 1026 bits (555), Expect = 0.0

Identities = 577/588 (98 %), Gaps = 4/588 (1 %)

Strand=Plus/Plus

```

Fh13 1 GGATCATTTCATAACGAGTGTGTTTATGGCACTCTAAAAAATCCATACCCACCTTGTGTGCAT 60
      |||
Sbjct 45 GGATCATTTCATAACGAGTGTGTTTATGGCACTCTAAAAAATCCATACCCACCTTGTGTGCAW 104

Fh13 61 CGTTAAAGAGTCCTTTTGTCTTTTCTTTTAGAGAGGCATGGGATTTCTTTTAAATTAATC 120
      |||
Sbjct 105 CGTTAAAGAGTCCTTTTGTG-CCTCTCTTTTAGAGAGGCATGGGATTTCTTTTAAATTAATC 163

Fh13 121 TATTTTAAACCAGTTTGTCTGAAGCAATGTATCATGAATAACATAATTCAAAATACAAC 180
      |||
Sbjct 164 TATTTTAAACCAGTTTGTCTGAAGCAATGTATCATGAATAACATAATTCAAAATACAAC 223

Fh13 181 TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA 240
      |||
Sbjct 224 TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA 283

Fh13 241 ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCTCTGGT 300
      |||
Sbjct 284 ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCTCTGGT 343

Fh13 301 ATTCCGGAGAGCATGCTTGTGTTGAGTATCAGTAAACACCCTCAATCCTCTC-TTTATT- 358
      |||
Sbjct 344 ATTCCGGAGAGCATGCTTGTGTTGAGTATCAGTAAACACCCTCAATCCTCTCTTTTTTTG 403

Fh13 359 -GAGAGAATTGGACTTGAGTTATCCCAACGGCGGTGTTAAAACCGGTGGCGGGTCACTTG 417
      |||
Sbjct 404 AGAGAGAATTGGATTTGAGTTATCCCAACGGCGRTGTTAAAACCGCTGGCGGGTCACTTG 463

Fh13 418 AAATGCAGGTGCGGCTGGACACATCTTCTGAGCTATAAGCATTACTTATTTAGTCCCGTA 477
      |||
Sbjct 464 AAATGCAGGTGCGGCTGGACACATCTTCTGAGCTATAAGCATTACTTATTTAGTCCCGTA 523

Fh13 478 AAACGGATTATTTCTACTGCTACAGCTAATATAAAGGTCGATTGTCCGTTTGCCCGACTG 537
      |||
Sbjct 524 AAACGGATTATTTCTACTGCTACAGCTAATATAAAGGTCGATTGTCCGTTTGCCCGACTG 583

Fh13 538 ATGCAGAAAAAACAAGAGAAATCTTTGTTCACTCGATCTCAAATCAA 585
      |||
Sbjct 584 ATGCAGAAAAAACAAGAGAAATCTTTGTTCACTCGATCTCAAATCAA 663
    
```

表 10 Fh15 之 rDNA 序列片段

DQ914733 Helotiales sp.

Score = 789 bits (427), Expect = 0.0

Identities = 461/477 (97 %), Gaps = 3/477 (1 %)

Strand=Plus/Plus

Fh15	1	TCATTACAGAGTTCATGCCCTTCGGGGTAGATCTCCCACCCTATGTATTTATACCTTTGT	60
Sbjct	4	TCATTACAGAGTTCATGCCCTTCGGGGTAGATCTCCCACCCTATGTATTTATACCTTTGT	63
Fh15	61	TGCTTTGGTGGGCCGCTC-GGCTTCGGCCAGGCTACCGGCTCCGGCTGGTAAGCGCCCGC	119
Sbjct	64	TGCTTTGGTAGGCCG-TCAGGCTTCGGCCAGGCTACCGGCTCCGGCTGGTAAGTGCCTAC	122
Fh15	120	CAGAGAACCAAACCTCTGAATGTTAGTGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTC	179
Sbjct	123	CAGAGGACCAAACCTCTGAATGTTAGTGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTC	182
Fh15	180	AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG	239
Sbjct	183	AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG	242
Fh15	240	TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATT	299
Sbjct	243	TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATT	302
Fh15	300	CCGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCG	359
Sbjct	303	CCGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCG	362
Fh15	360	TCACCAGCTCTGGTGTGCCCTAAAATCAGTGGCGGTGCCGTCTGGCTCTAAGCGTAGTAC	419
Sbjct	363	TCACCAGTCTGGTGTGCTCTAAAATCAGTGGCGGTGCCGTCTGGCTCTAAGCGTAGTAC	422
Fh15	420	ATCTCTCGCTATGGATGCCTGGTGGATGCTTGCCAT-AACCCCAAATTTTTTTAGGT	475
Sbjct	423	ATCTCTCGCTACAGATGCCTGGTGGATACTTGCCAACAACCCTAATTTTTTAAGGT	479

表 11 Fh20 之 rDNA 序列片段

AY656940 Uncultured mycorrhizal fungus

Score = 857 bits (464), Expect = 0.0

Identities = 472/476 (99 %), Gaps = 0/476 (0 %)

Strand=Plus/Plus

```

Fh20 1 TCATTAAAGAATTTGGCCCGTCCTCTCGAGGATGGGTCTCTTCTAAACCGTGATAACAT 60
      |||
Sbjct 39 TCATTAAAGAATTTGGCCCGTCCTCTCGAGGATGGGTCTCTTCTAAACCGTGATAACAT 98

Fh20 61 ACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGTCTCGGCGTTGGCTTCGGCTGACTGTGCCCGCCA 120
      |||
Sbjct 99 ACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGTCTCGGCGTTGGCTTCGGCTGACTGTGCCCGCCA 158

Fh20 121 GAGAACCCCAACTCTTCTGTTTAGTATTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACTTTCA 180
      |||
Sbjct 159 GAGGACCCCAACTCTTCTGTTTAGTATTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACTTTCA 218

Fh20 181 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT 240
      |||
Sbjct 219 ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT 278

Fh20 241 GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTC 300
      |||
Sbjct 279 GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTC 338

Fh20 301 CGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTCAAGCCTCGGCTTGGTATTGGGG 360
      |||
Sbjct 339 CGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTCAAGCCTCGGCTTGGTATTGGGG 398

Fh20 361 TCTCGCGGTCTCGCGGCCCTTAAAACCAGTGGCGGTGCCATCTGGCTCTAAGCGTAGTAA 420
      |||
Sbjct 399 TCTCGCGGTCTCGCGGCCCTTAAAACCAGTGGCGGTGCCATCTGGCTCTAAGCGTAGTAA 458

Fh20 421 TTCTCTCGCTACAGGGTCCAGGTGGTTACTTGCCAAAACCCCTATTTTCTATGGT 476
      |||
Sbjct 459 TTCTCTCGCTACAGGGTCCAGGTGGTTACTTGCCAAAACCCCTATTTTCTATGGT 514
    
```

表 12 Fh21 之 rDNA 序列片段

AB219151 Uncultured ectomycorrhizal fungus

Score = 881 bits (477), Expect = 0.0

Identities = 481/483 (99 %), Gaps = 0/483 (0 %)

Strand=Plus/Plus

```

Fh21   1   TCATTACCGAGTTCATGCCCTTACGGGTAGATCTCCCACCCTGTGTTATCATTACCTTTG   60
      |||
Sbjct  55   TCATTACCGAGTTCATGCCCTTACGGGTAGATCTCCCACCCTGTGTTATCATTACCTTTG   114

Fh21   61   TTGCTTTGGCGGGCCGCCGGCCTCGGTCAGGCTATCGGCTTCGGCTGGTAAGCGCCCGC   120
      |||
Sbjct  115  TTGCTTTGGCGGGCCGCCGGCCTCGGTCAGGCTATCGGCTTCGGCTGGTAAGCGCCCGC   174

Fh21   121  CAGAGGACCCCAAATCCTGATTATTAGTGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACTT   180
      |||
Sbjct  175  CAGAGGACCCCAAATCCTGATTATTAGTGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACTT   234

Fh21   181  TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA   240
      |||
Sbjct  235  TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA   294

Fh21   241  TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTA   300
      |||
Sbjct  295  TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTA   354

Fh21   301  TTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCATTGCTTGGTCTTGGG   360
      |||
Sbjct  355  TTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCATTGCTTGGTCTTGGG   414

Fh21   361  CTTCGCTGCTTCCCCAGCGGGCCTTAAAATCAGTGGCGGTGCCGTGGGGCCCTGAGCGTA   420
      |||
Sbjct  415  CTTCGCTGCTTCCCCAGCGGGCCTTAAAATCAGTGGCGGTGCCGTGGGGCCCTGAGCGTA   474

Fh21   421  GTAAATCTTCTCGCTACAGGTGTCGATGGACGCTGGCCATCAACCTCCTTACTCTCTAA   480
      |||
Sbjct  475  GTAAATCTTCTCGCTACAGGTGTCGATGGACGCTGGCCATCAACCTCCTTACTCTCTAA   534

Fh21   481  GTT   483
      |||
Sbjct  535  GTT   537
    
```

表 13 Fh25 之 rDNA 序列片段

Score = 905 bits (490), Expect = 0.0
 Identities = 492/493 (99%), Gaps = 0/493 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Fh25	1	AACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTCATGCCCTTCGGGGTAGACCTCCCACCCAGTGT	60
Sbjct	49	AACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTCATGCCCTTCGGGGTAGACCTCCCACCCAGTGT	108
Fh25	61	ATTTATACCTTTGTTGCTTTGGCAGGCCGCTAGGCCTCGGTCTAGCTCCTGGCTCCGGCT	120
Sbjct	109	ATTTATACCTTTGTTGCTTTGGCAGGCCGCTAGGCCTCGGTCTAGCTCCTGGCTCCGGCT	168
Fh25	121	AGGGAGTGCCTGCCAGAGGACCCTAAACCTGAATGTTAGTGTCGTCTGAGTACTATACA	180
Sbjct	169	GGGGAGTGCCTGCCAGAGGACCCTAAACCTGAATGTTAGTGTCGTCTGAGTACTATACA	228
Fh25	181	ATAGTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA	240
Sbjct	229	ATAGTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA	288
Fh25	241	ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	300
Sbjct	289	ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	348
Fh25	301	GCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCT	360
Sbjct	349	GCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCT	408
Fh25	361	GCTTGGTGTGGGCGTCACCAGCCTTGGTGTGCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCGCTCTGG	420
Sbjct	409	GCTTGGTGTGGGCGTCACCAGCCTTGGTGTGCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCGCTCTGG	468
Fh25	421	CTCTAAGCGTAGTACATACTCTCGCTATGGACGCCTGGCGGATGCTTGCCAGCAAACCCC	480
Sbjct	469	CTCTAAGCGTAGTACATACTCTCGCTATGGACGCCTGGCGGATGCTTGCCAGCAAACCCC	528
Fh25	481	TAATTTATCAAGG	493
Sbjct	529	TAATTTATCAAGG	541

(V)臺灣山毛櫸苗木半合成試驗

1.種子發芽試驗

由試驗結果顯示，14天後兩種不同處理下有顯著差異，以去除種皮 30.50 ± 5.41 % 較未去除種皮 0.00 ± 0.00 % 佳。

表 14 臺灣山毛櫸種子在去除種皮及未去除種皮處理 14 天後之發芽率

處理	發芽率(%)
去除種皮	30.50 ± 5.41 ^a
未去除種皮	0.00 ± 0.00 ^b

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)

2. 苗木生長量調查

經六個月接種後，由表 15 可以看出淨高生長量呈現顯著差異以接種 Fh25 菌株之苗木生長平均 6.90 ± 3.72 cm 為最高，以對照組苗木生長平均 1.40 ± 0.74 cm 為最低；地際直徑淨生長以接種 Fh13 菌株平均 0.69 ± 0.35 為最佳。

由圖 20 可以看出接種菌根菌之苗木植株其生長量較未接種者佳；觀察根的外部形態可發現，接種菌根菌者其根部外觀有形狀上的改變，未接種者其根部外觀則沒有任何變化 (圖 21)；觀察根部顯微構造可以發現接種 Fh25 菌株者有產生菌毯及哈替氏網的構造，接種其它菌株者則可以在皮層細胞內發現菌絲的存在 (圖 22)，顯示臺灣山毛櫸苗木可能有其他類型之菌根的存在。

表 15. 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木淨高生長及地際直徑淨生長

處理	淨高生長量 (cm)	地際直徑淨生長 (mm)
CK	1.40 ± 0.74 ^c	0.19 ± 0.06 ^c
Fh6	2.73 ± 0.46 ^{bc}	0.17 ± 0.17 ^c
Fh13	5.18 ± 1.72 ^a	0.69 ± 0.35 ^a
Fh15	2.95 ± 0.48 ^{bc}	0.38 ± 0.39 ^b
Fh20	2.33 ± 0.85 ^c	0.48 ± 0.33 ^b
Fh21	2.15 ± 1.01 ^c	0.29 ± 0.21 ^{bc}
Fh25	6.90 ± 3.72 ^a	0.40 ± 0.38 ^b

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)

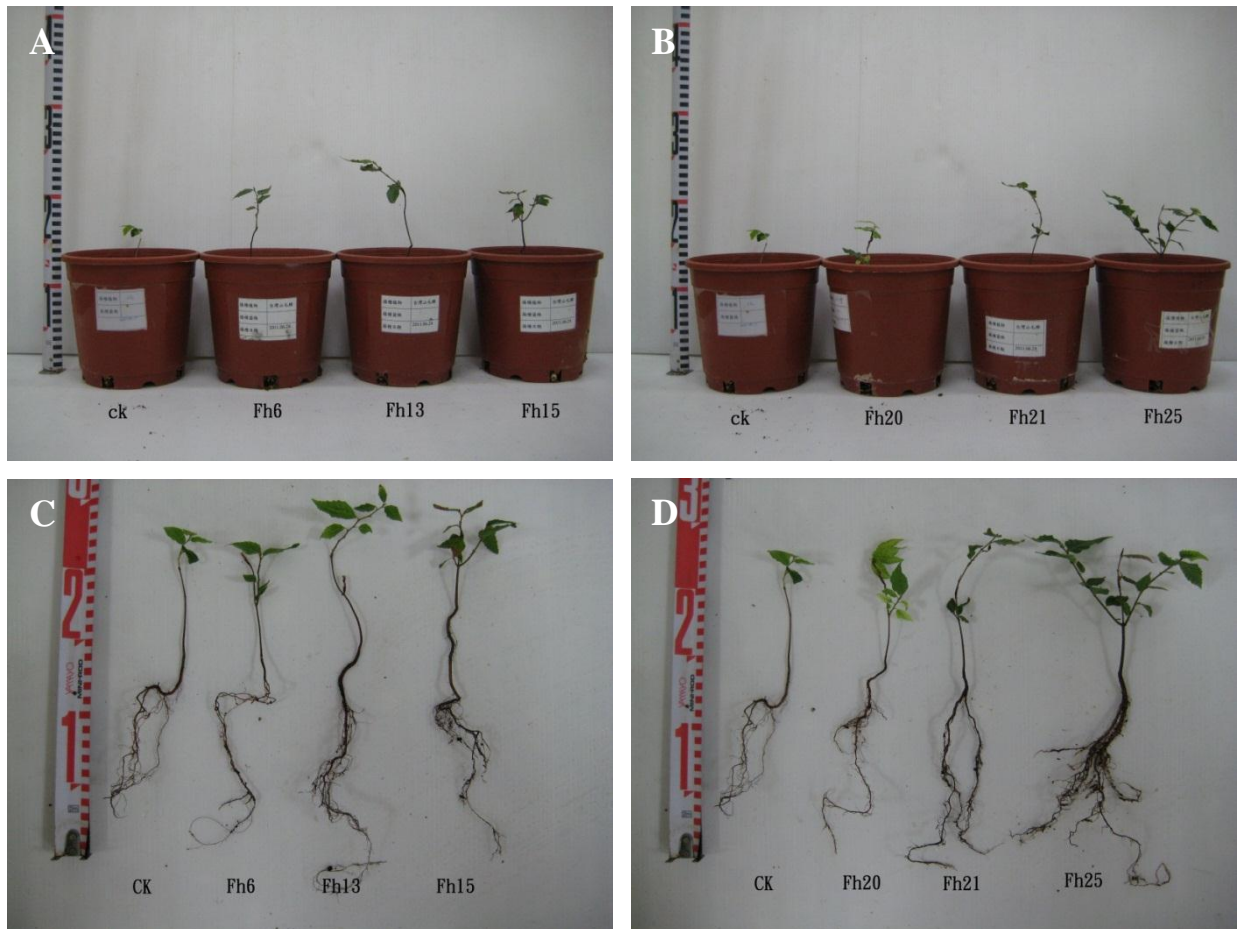


圖 20 臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌及未接種處理六個月後之生長情形

A：苗木地上部由左到右是對照組、接種 Fh6 菌株、接種 Fh13 菌株、接種 Fh15 菌株；B：苗木地上部由左到右是對照組、接種 Fh20 菌株、接種 Fh21 菌株、接種 Fh25 菌株；C：苗木全株由左到右是對照組、接種 Fh6 菌株、接種 Fh13 菌株、接種 Fh15 菌株；D：苗木全株由左到右是對照組、接種 Fh20 菌株、接種 Fh21 菌株、接種 Fh25 菌株

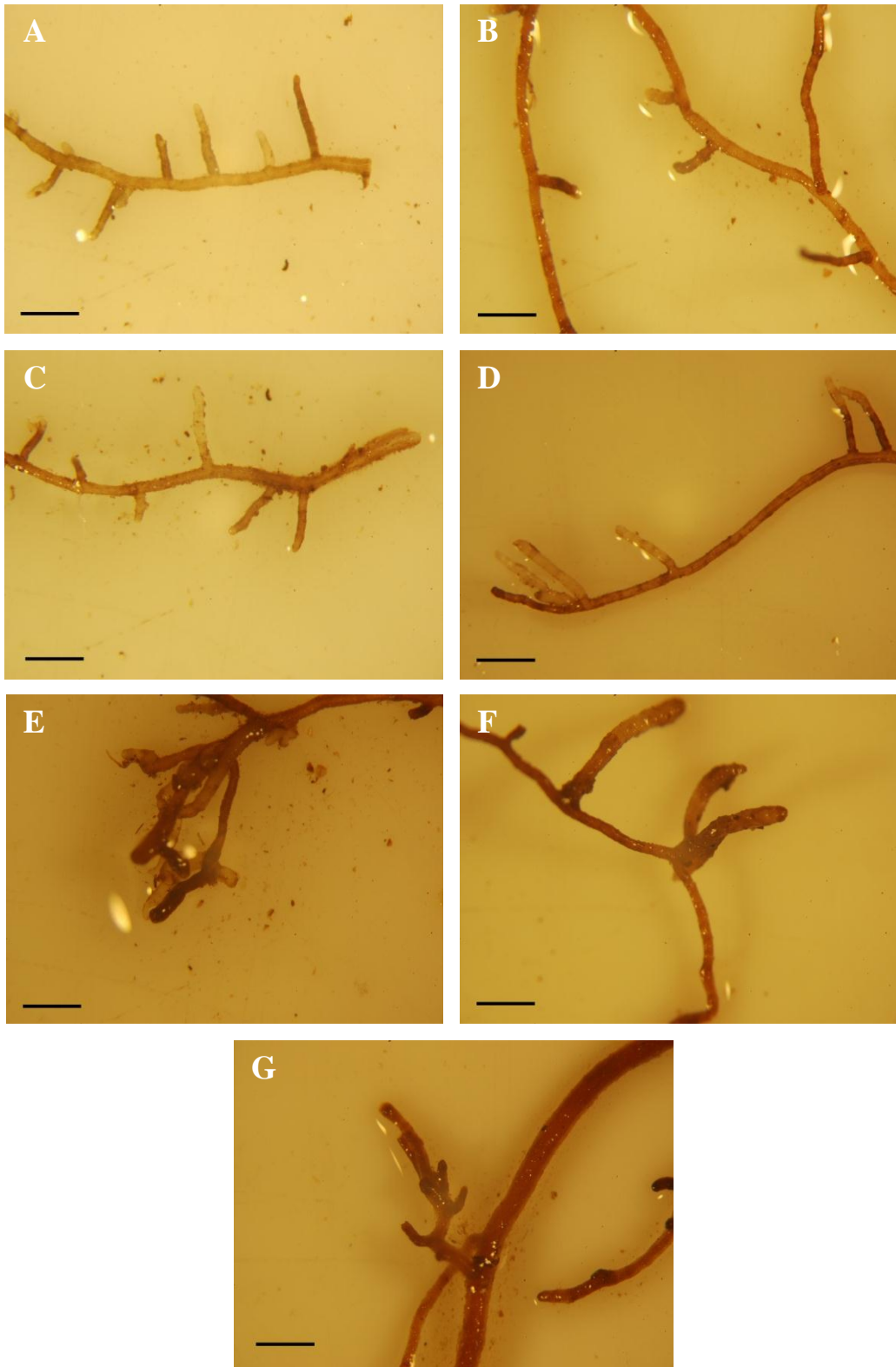


圖 21 臺灣山毛櫸苗木種不同菌根菌之根外部形態

A：未接種者；B：接種 Fh6 菌株；C：接種 Fh13 菌株；D：接種 Fh15 菌株；
E：接種 Fh20 菌株；F：接種 Fh21 菌株；G：接種 Fh25 菌株 (橫線=1mm)

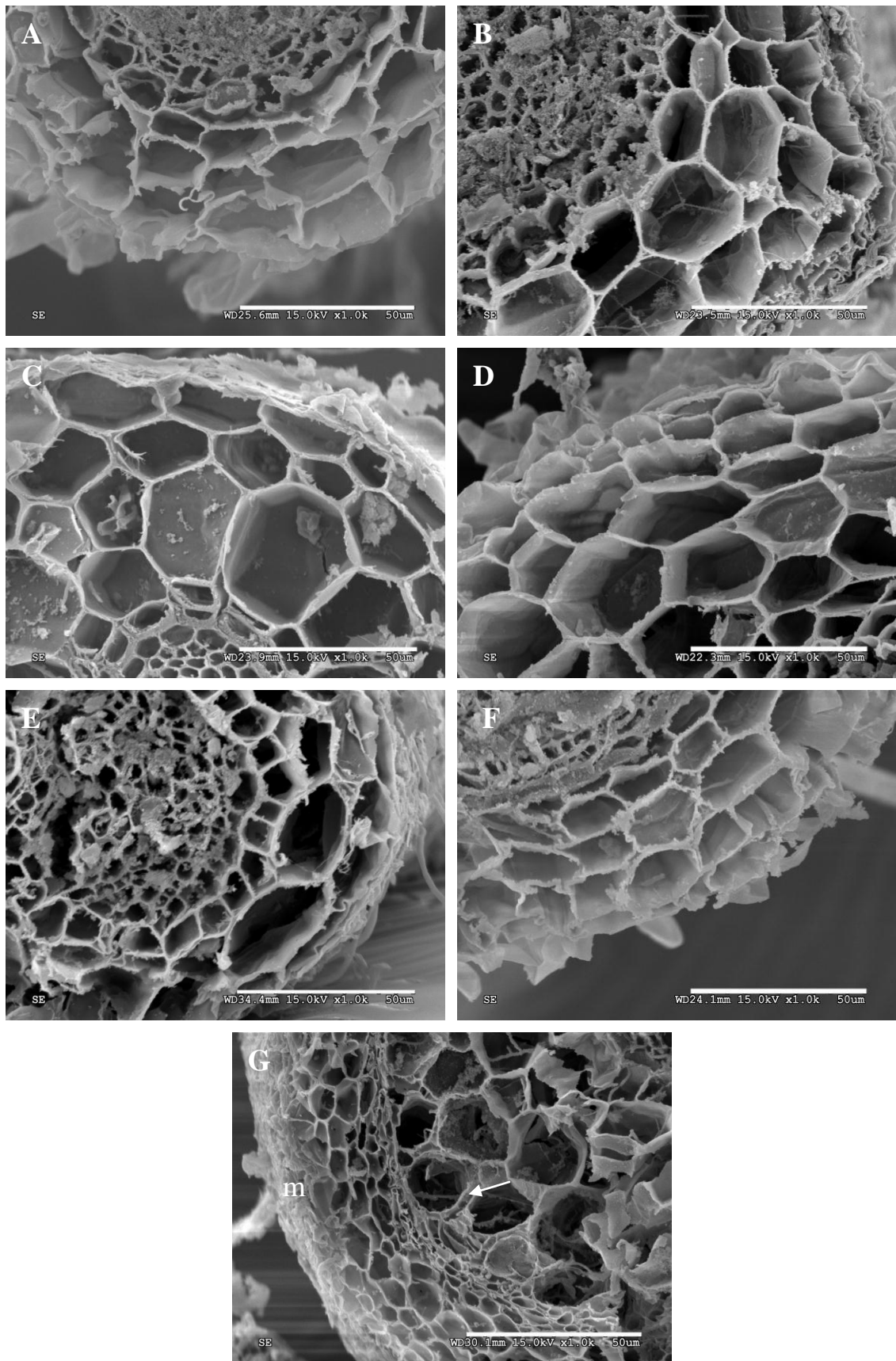


圖 22 臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌之根內部顯微構造

A：未接種者；B：接種 Fh6 菌株；C：接種 Fh13 菌株；D：接種 Fh15 菌株；

E：接種 Fh20 菌株；F：接種 Fh21 菌株；G：接種 Fh25 菌株（菌毯 (m) 及哈替氏

網（箭頭處））（橫線=50µm）

2. 淨光合作用速率

本研究以 LI-6400 型光合作用測定儀，經由不同光度處理臺灣山毛櫸苗木葉片，測定未接種及接種外生菌根菌苗木之光合作用反應曲線圖，結果顯示（圖 23-36），未接種者最高淨光合作用平均速率為 $1.206 \pm 0.078 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $22.34 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh6 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $3.807 \pm 0.653 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $13.66 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh13 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $3.726 \pm 0.096 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $9.35 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh15 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $2.476 \pm 1.525 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $15.69 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh20 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $3.105 \pm 0.367 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $10.80 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh21 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $2.264 \pm 1.083 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $13.68 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；接種 Fh25 菌株者最高淨光合作用平均速率為 $4.221 \pm 0.907 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光飽和點平均為 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光補償點平均為 $9.23 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

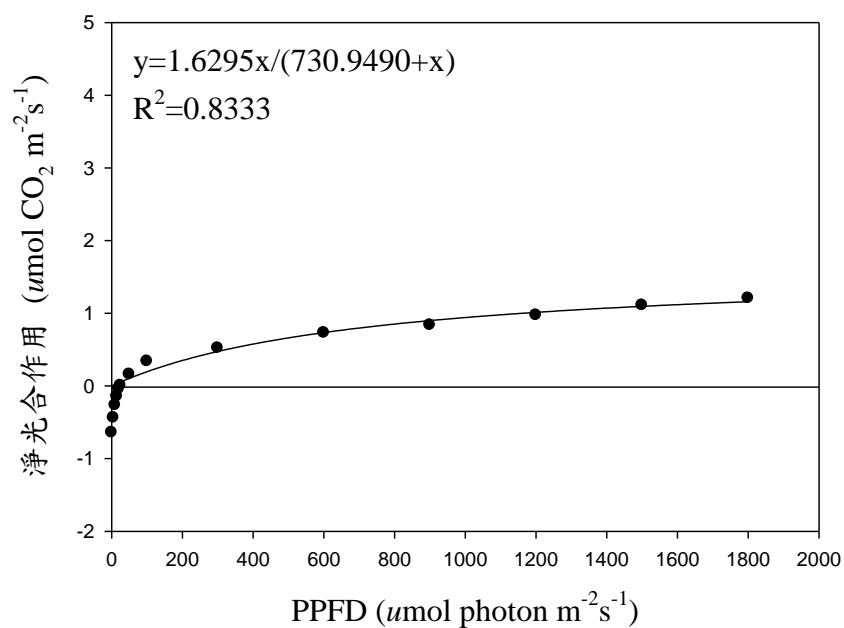


圖 23 未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

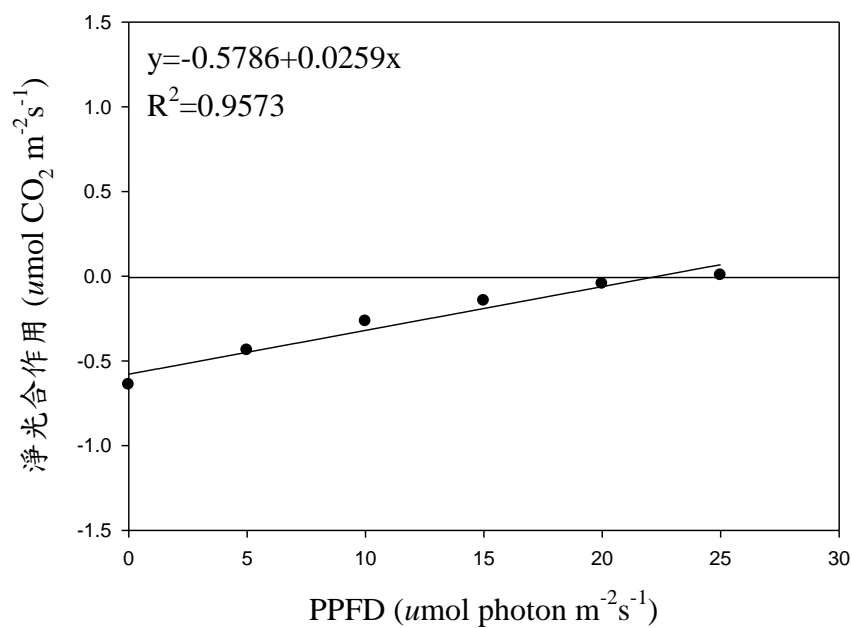


圖 24 未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時之光合作用反應

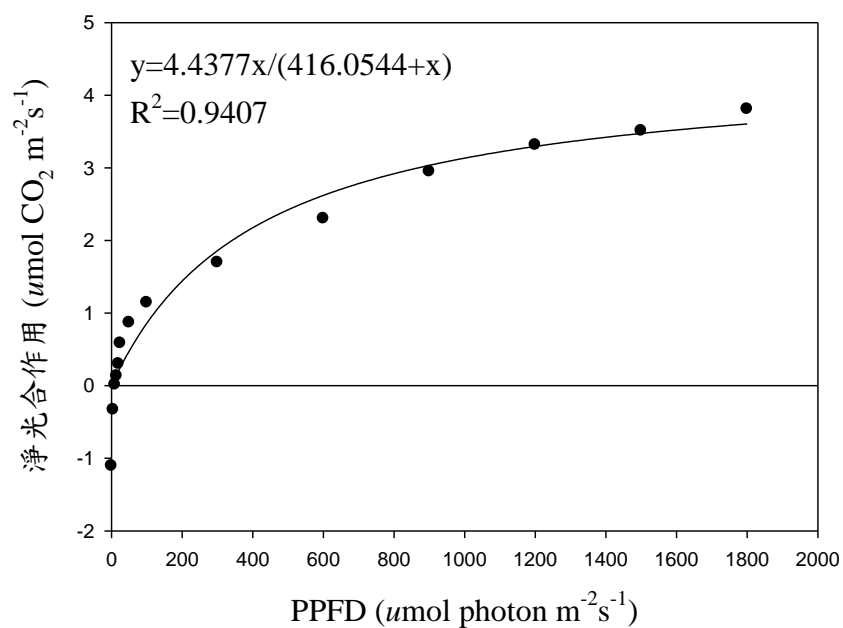


圖 25 接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

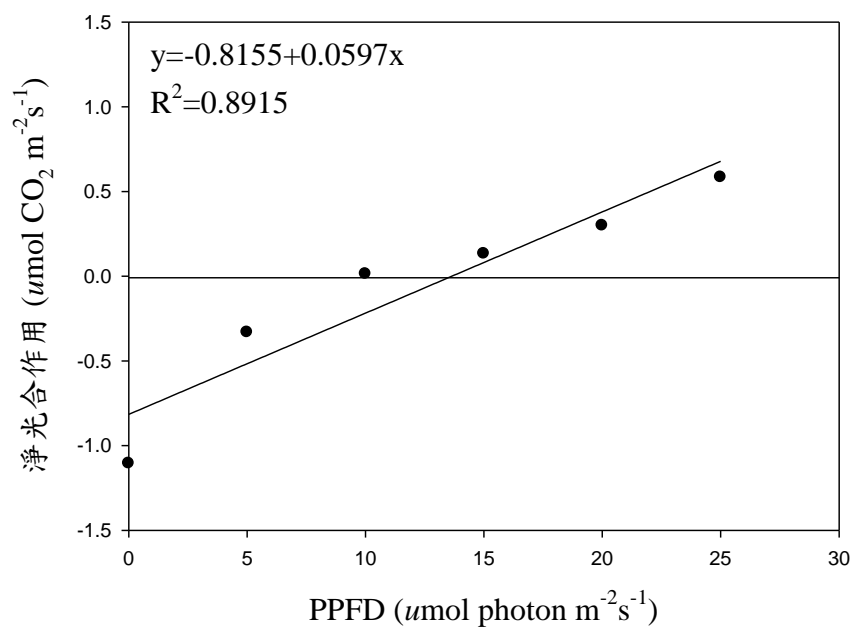


圖 26 接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時之光合作用反應

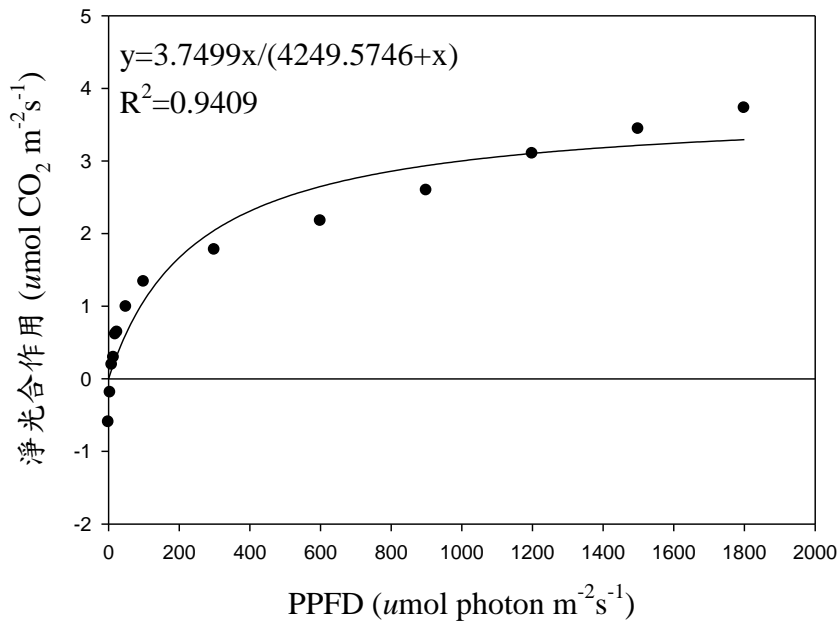


圖 27 接種 Fh13 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

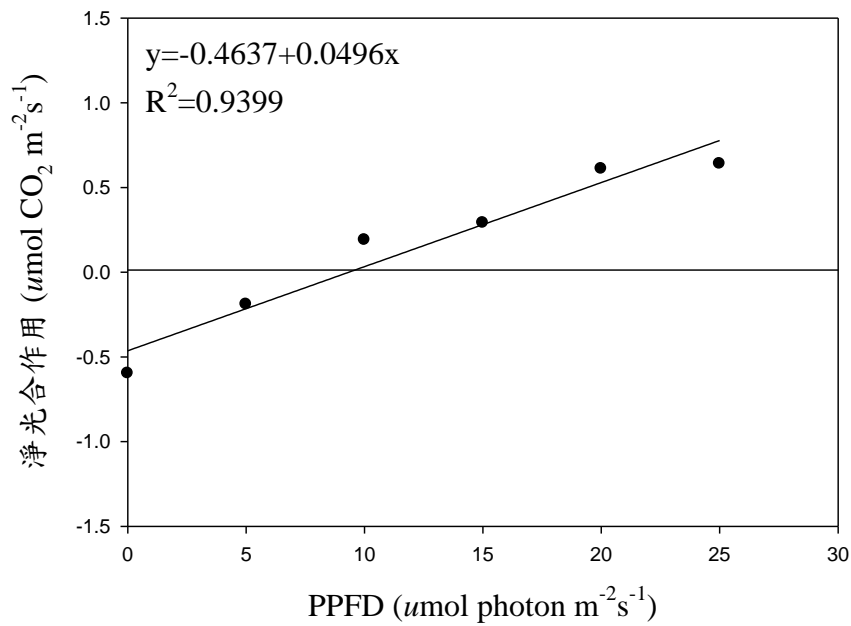


圖 28 接種 Fh13 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 時之光合作用反應

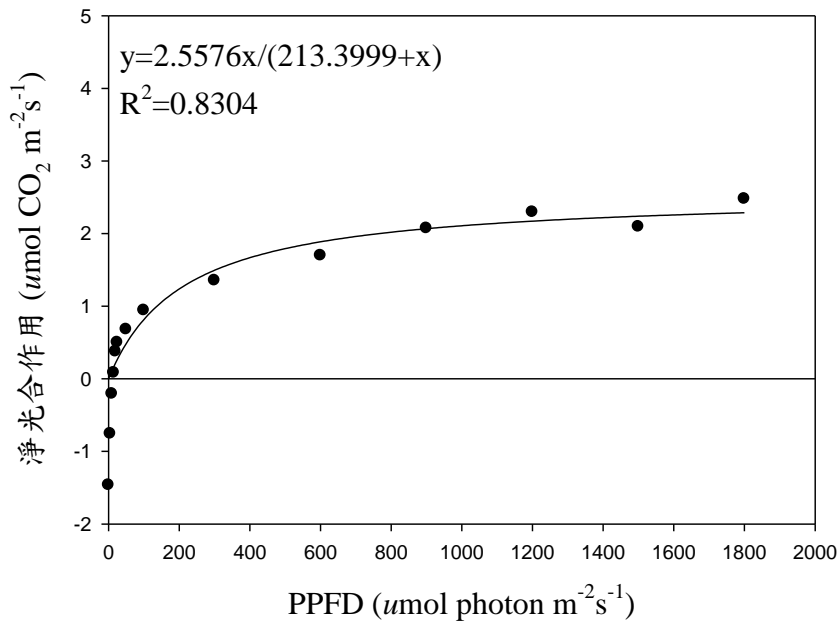


圖 29 接種 Fh15 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

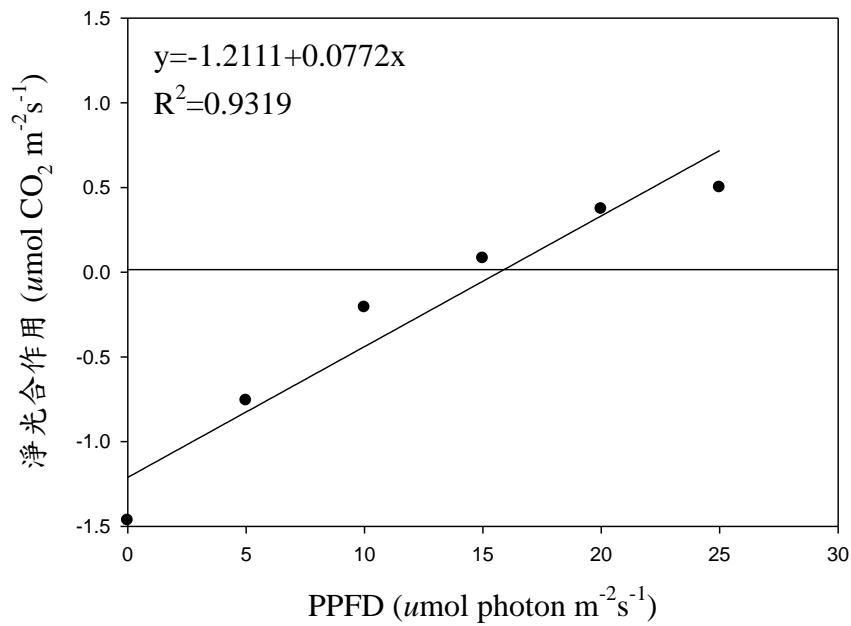


圖 30 接種 Fh15 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 時之光合作用反應

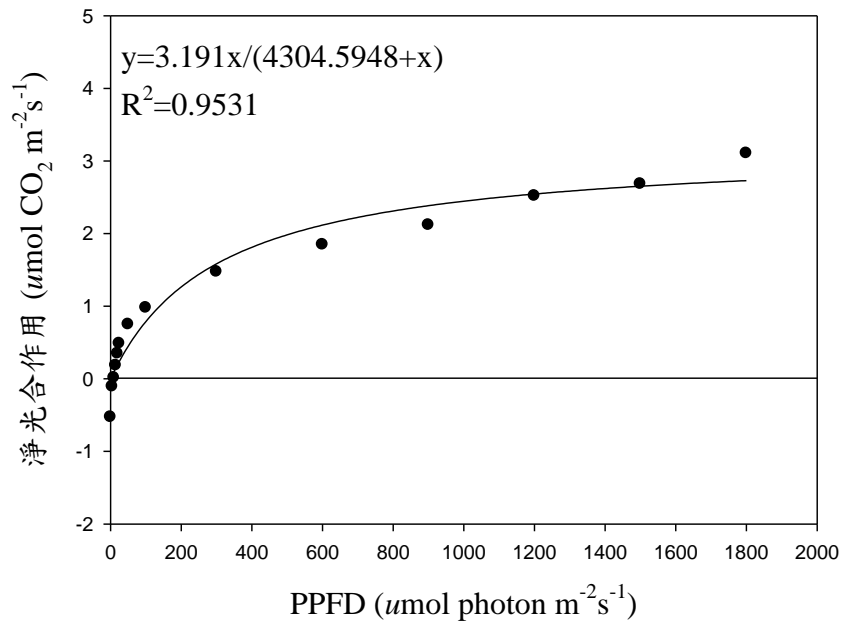


圖 31 接種 Fh20 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

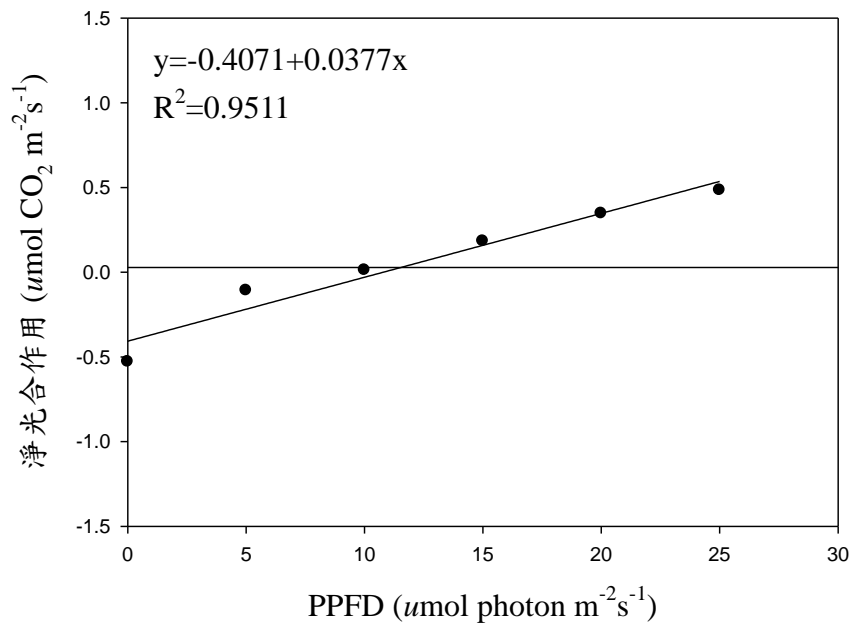


圖 32 接種 Fh20 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 時之光合作用反應

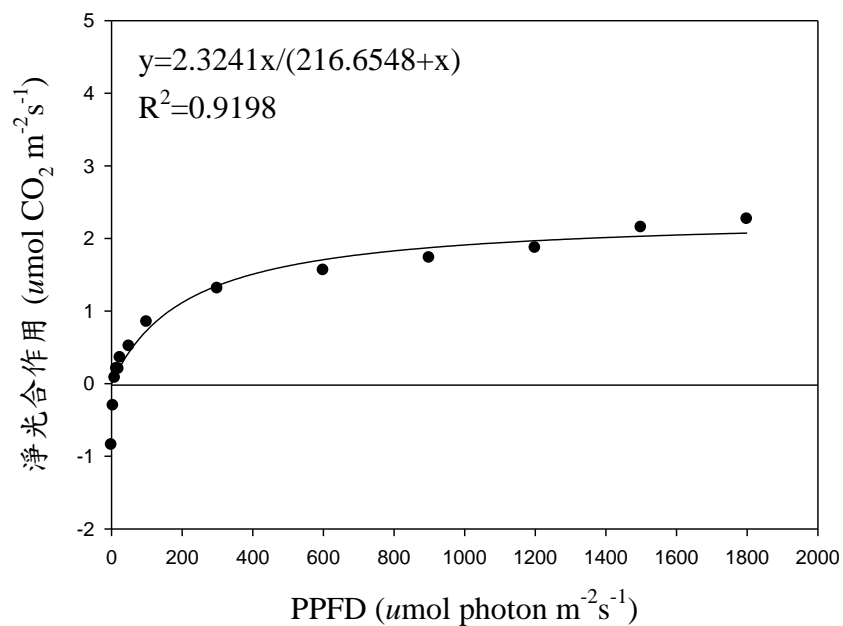


圖 33 接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

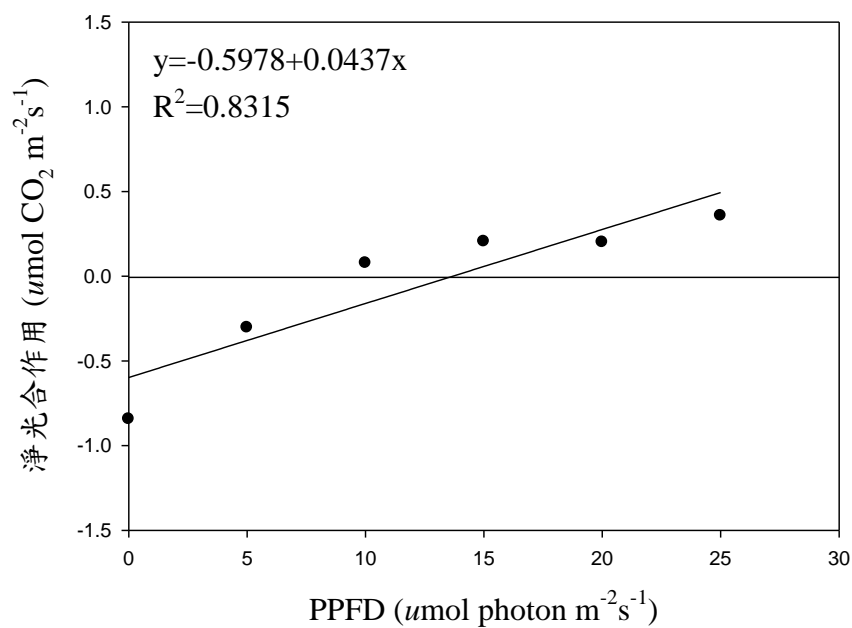


圖 34 接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 時之光合作用反應

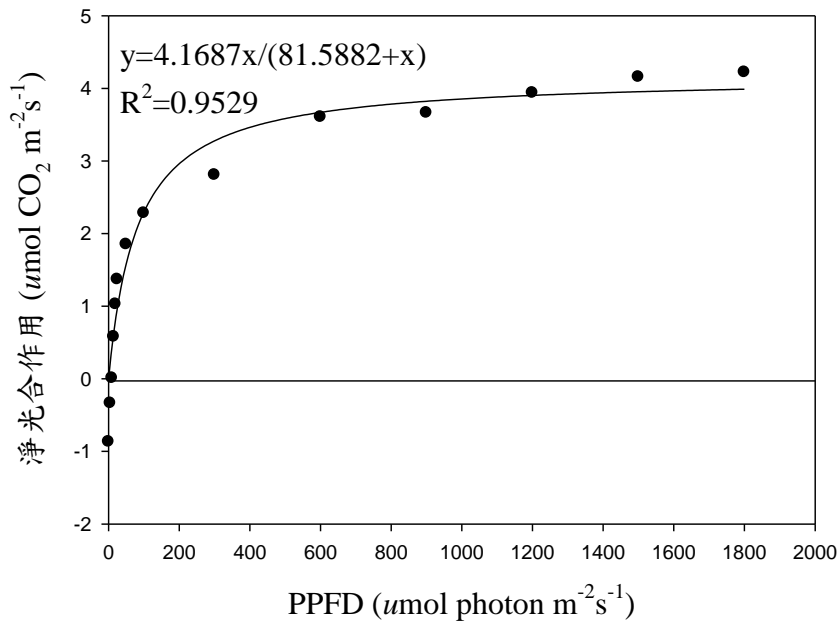


圖 35 接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木之光反應曲線

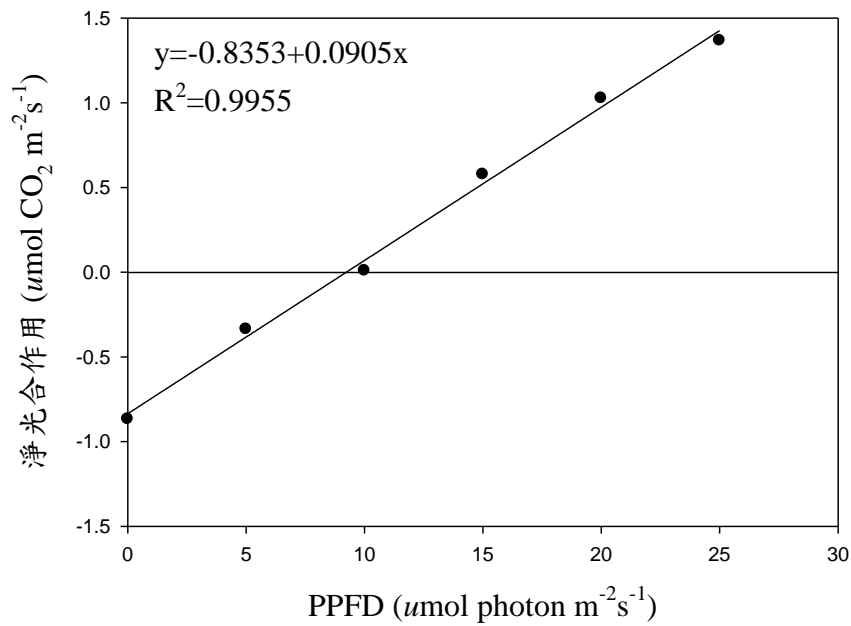


圖 36 接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木在光照低於 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 時之光合作用反應

3. 乾重及葉片數、總葉面積

由表 16 及表 17 可知臺灣山毛櫸苗木接種不同菌根菌後乾重及葉片數、總葉面積均有顯著差異，各部位乾重以接種 Fh25 菌株均為最佳，以接種 Fh13 菌株次之，在葉片數及總葉面積方面也是以接種 Fh25 菌株之苗木為最佳。

表 16 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木各部位乾重

處理	葉部乾重 (g)	莖部乾重 (g)	根部乾重 (g)	全株乾重 (g)
對照組	0.02 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.04 ^b	0.15 ± 0.05 ^b
Fh6	0.02 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.02 ^b	0.16 ± 0.04 ^b
Fh13	0.04 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.016 ^b	0.10 ± 0.04 ^{ab}	0.22 ± 0.04 ^b
Fh15	0.03 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.04 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.05 ^b
Fh20	0.03 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.04 ^b	0.16 ± 0.07 ^b
Fh21	0.02 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.04 ^b
Fh25	0.09 ± 0.05 ^a	0.14 ± 0.06 ^a	0.15 ± 0.08 ^a	0.39 ± 0.18 ^a

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)

表 17 接種不同菌根菌之臺灣山毛櫸苗木葉片數及總葉面積

處理	葉片數 (No.)	總葉面積 (cm ²)
對照組	5.75 ± 4.35 ^{ab}	6.50 ± 4.49 ^b
Fh6	4.75 ± 1.26 ^b	5.74 ± 1.81 ^b
Fh13	6.25 ± 1.90 ^{ab}	8.68 ± 1.81 ^b
Fh15	8.50 ± 2.38 ^{ab}	6.50 ± 1.72 ^b
Fh20	6.00 ± 3.56 ^{ab}	9.15 ± 2.47 ^b
Fh21	4.75 ± 2.50 ^b	5.67 ± 2.04 ^b
Fh25	10.75 ± 6.40 ^a	20.85 ± 14.18 ^a

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)

4. 葉綠素濃度

接種不同菌根菌對臺灣山毛櫸苗木之葉綠素濃度之影響，經 Duncan's 檢測由分析結果顯示，葉綠素 a 及葉綠素 a + b 濃度呈顯著差異之效應，而葉綠素 b 濃度則沒有達到顯著差異。

臺灣山毛櫸苗木其葉綠素 a、葉綠素 a+b 含量以接種 Fh25 菌株處理之 4.26 ± 1.17 mg/g、 6.65 ± 1.40 mg/g 顯著高於未接種菌根菌者 2.64 ± 0.17 mg/g、 3.96 ± 1.17 mg/g；葉綠素 b 含量雖然沒有顯著差異但也是以接種 Fh25 菌株之苗木其含量為最高。

表 18 接種處理六個月後臺灣山毛櫸苗木葉綠素含量

處理	葉綠素 a (mg/g)	葉綠素 b (mg/g)	葉綠素 a + b (mg/g)
對照組	2.64 ± 0.17^c	1.32 ± 1.22^a	3.96 ± 1.17^b
Fh6	2.93 ± 1.37^{bc}	1.28 ± 0.54^a	4.21 ± 1.54^b
Fh13	3.55 ± 0.35^{abc}	1.45 ± 0.87^a	5.00 ± 1.08^{ab}
Fh15	3.95 ± 0.22^{ab}	1.68 ± 1.08^a	5.63 ± 1.03^{ab}
Fh20	3.11 ± 0.70^{abc}	2.18 ± 1.57^a	5.28 ± 1.34^{ab}
Fh21	3.91 ± 0.54^{ab}	1.60 ± 1.17^a	5.52 ± 1.00^{ab}
Fh25	4.26 ± 1.17^a	2.40 ± 0.78^a	6.65 ± 1.40^a

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

5. 葉部組織構造之觀察

接種不同菌根菌對臺灣山毛櫸苗木之氣孔密度之影響，經 Duncan's 檢測由分析結果顯示，呈顯著差異之效應，由表 19 可看出接種 Fh13 菌株者其氣孔密度 962.00 ± 108.90 最密，接種 Fh25 菌株者其氣孔密度 734.78 ± 51.75 次之，而未接種者其氣孔密度 416.63 ± 67.18 最低；由圖 39 可看出接種 Fh13 菌株其氣孔密度最密，且由圖 37 可以看出未接種者其氣孔密度明顯較少。

表 19 接種處理六個月後臺灣山毛櫸苗木之下表皮氣孔密度

處理	氣孔密度 (Stomata/mm ²)
對照組	416.63 ± 67.18 ^d
Fh6	515.10 ± 24.74 ^{cd}
Fh13	962.00 ± 108.90 ^a
Fh15	590.85 ± 39.12 ^c
Fh20	568.12 ± 51.75 ^c
Fh21	704.48 ± 93.80 ^b
Fh25	734.78 ± 51.75 ^b

註:同列數值其英文字母不同者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)。

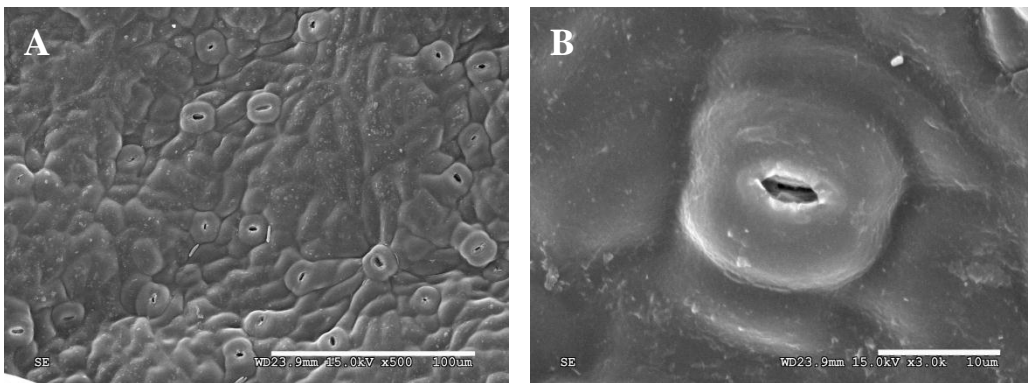


圖 37 未接種菌根菌之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

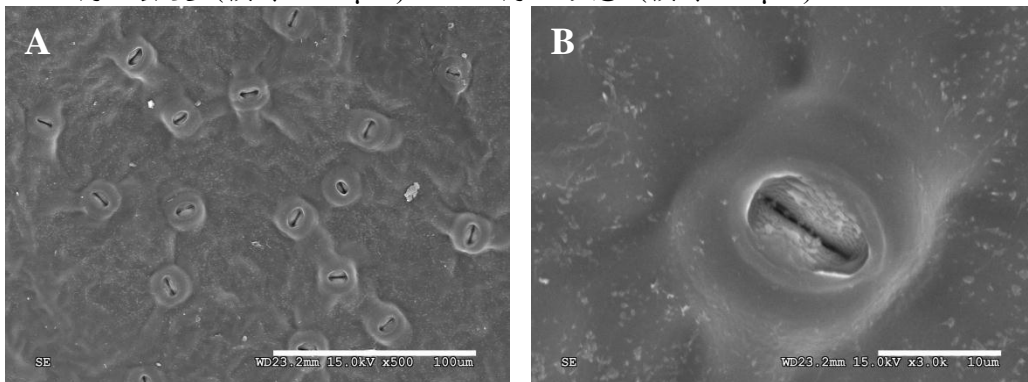


圖 38 接種 Fh6 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

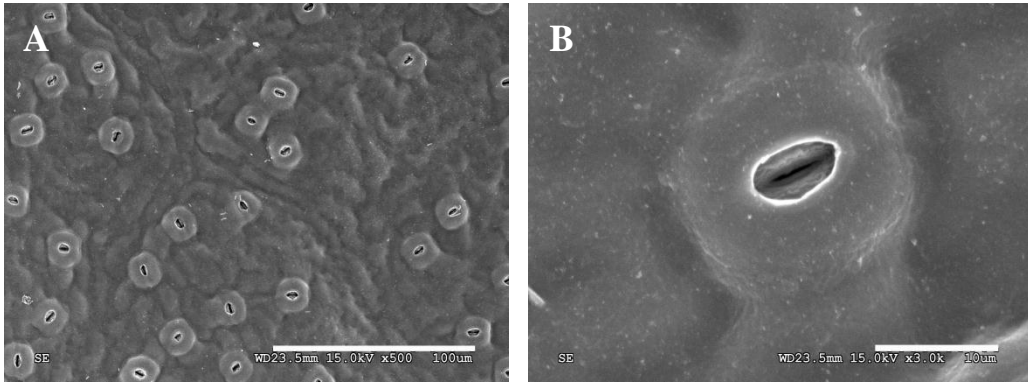


圖 39 接種 Fh13 菌株之之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

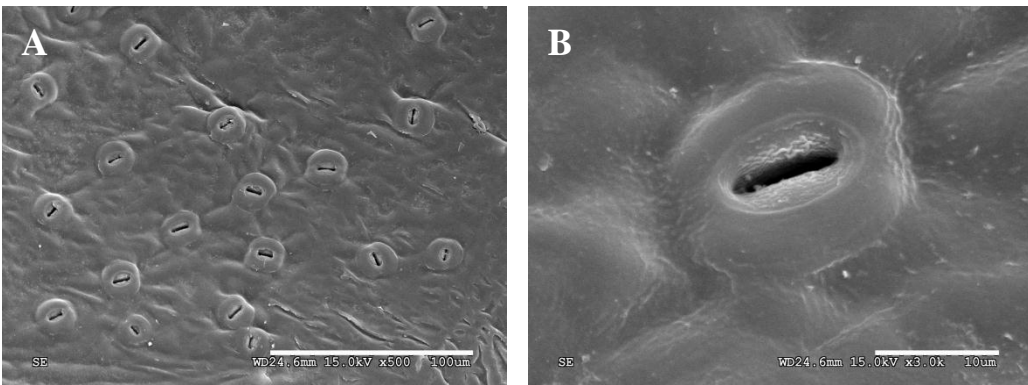


圖 40 接種 Fh15 菌株之之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

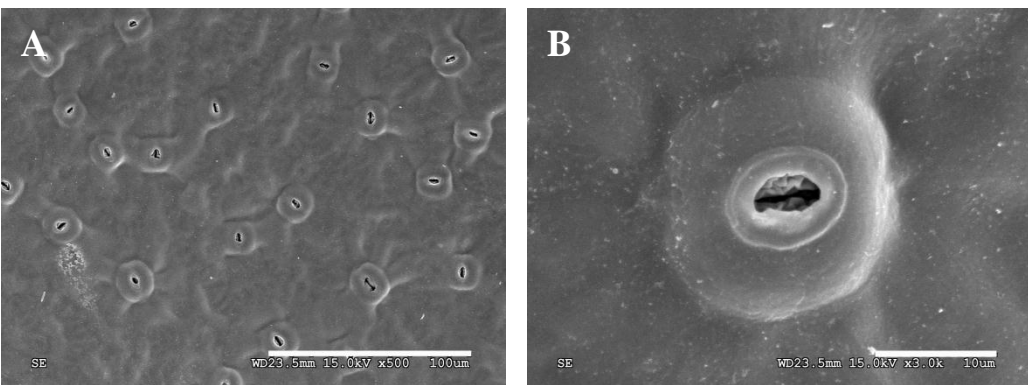


圖 41 接種 Fh20 菌株之之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

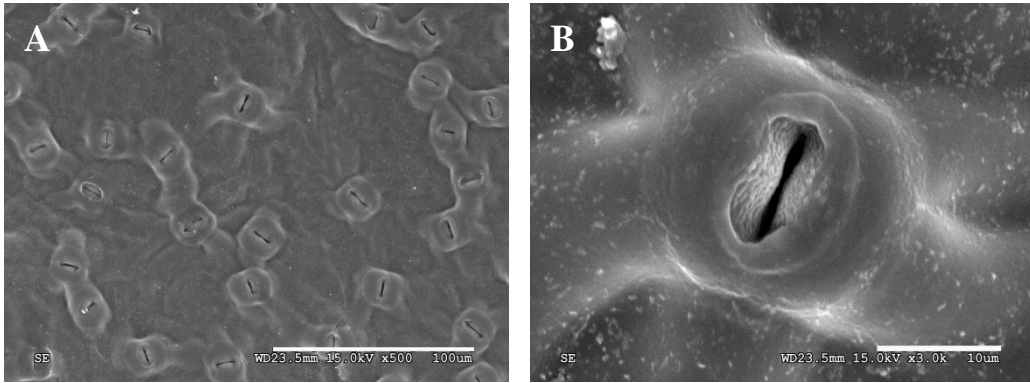


圖 42 接種 Fh21 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

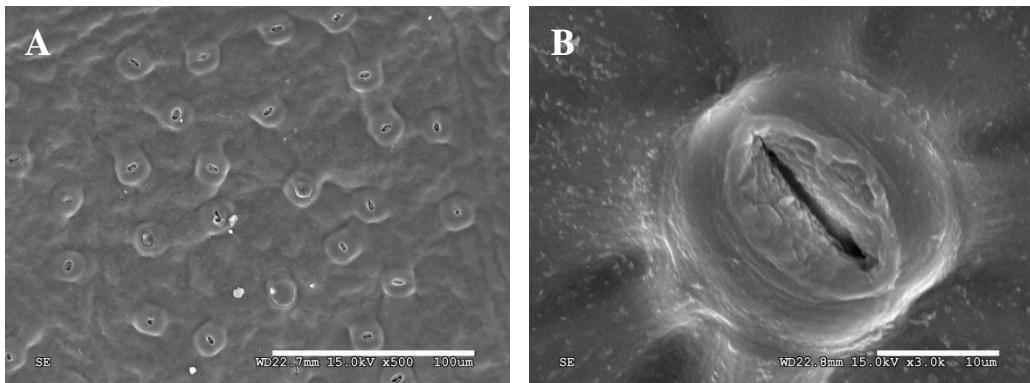


圖 43 接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木下表皮氣孔分佈

A：氣孔密度 (橫線=100µm)；B：氣孔形態 (橫線=10µm)

IV、討論

(I) 臺灣原生山毛櫸生育地土壤化學性質

臺灣 1500m 以上之山區，大多屬於濕潤之溫帶氣候，雨量豐沛，蒸發量低，無顯著乾濕季，造成淋洗作用明顯，土壤 pH 值偏低 (蔣先覺等，1994)。而各種植物對土壤 pH 之要求不同，有的能在較寬的 pH 範圍內生長，有些則只能在較窄的 pH 範圍內生長 (胡弘道，1999)。森林中土壤由於聚積大量的有機質，分解後所產生的有機酸，由土壤層往下淋洗，造成土壤中養分大量淋洗，而森林因經濟考量通常不施肥，故往往造成養分缺乏之現象 (王明光，2007)。在酸性環境中大部分的磷常與鐵或鋁螯合，致使一般植物無法直接利用。氮是植物必要的養分元素，但也必須配合其他元素才能順利讓植物生長，而鈣、鎂、鉀、鈉等巨量元素，在植物養分吸收上有很大的影響 (Larcher, 2003)。一般來說土壤 pH 值的高低會影響可置換性陽離子，鈣、鎂、鉀、鈉等鹽基離子在高山森林酸性土壤中，容易因淋溶作用而流失，造成養分貧瘠(胡弘道，1999；王明光，2007)。

由以上結果顯示，因臺灣山毛櫸生育地土壤 pH 值低，又因高山森林淋洗作用明顯導致其氮、磷，鈣、鎂、鉀、鈉等元素含量相當低。此次土壤化學分析其 pH 值偏強酸性且養分貧瘠與賀立行在 (2000) 調查宜蘭銅山山毛櫸土壤之 pH 值都屬於強酸性且養分含量也偏低，也與 Mueller 等學者在 (2009) 調查歐洲山毛櫸之土壤結果相符。

(II) 種子發芽試驗

山毛櫸屬種子最大特徵是總苞於堅果成熟後變硬成殼斗狀，包被果實全部且呈三角形 (劉業經等，1994)，因此造成種子不易吸收水分和接觸到空氣，而使種子發芽受到抑制造成休眠 (dormancy) 狀態。由種皮產生的休眠可以由三方面來解釋，種皮不透水、種皮不透氧氣、種皮的機械抗力 (易希道，1991)，通常在破除種殼後會促使種子產生 GA，之後影響到糊粉層開始分解澱粉供發芽之用。國內在

山毛櫸種子發芽之研究以低溫層積為主，需要低溫層積 2 個月再拿出等待約 15 天才會陸續發芽 (楊正釗等，2010)，但由層積到發芽平均都要 2 個半月左右，發芽時間相當漫長，因此破除種皮在育苗上是有一定的用處的，而在國外有學者試過把櫸屬 (*Quercus*) 植物之種子用去除種皮之處理發現可以打破大多數櫸屬植物種子之休眠，且都約在 3 週內發芽完成 (Bonner and Vozzo,1987)，也有學者輕輕劃破東方山毛櫸種子之種皮進行發芽試驗，結果發現與低溫層積後的發芽率差不多。本研究亦證實山毛櫸種子去種皮可以打破種子休眠並加速發芽時間。

(III) 野生山毛櫸之菌根形態觀察及菌株觀察及生長量觀察

經由外觀形態觀察及顯微構造觀察野生山毛櫸根段，可以發現有菌毯及哈替氏網的構造，在國外山毛櫸的菌根結構於 1950 年代早有人觀察過，Clowes 於 1951 年觀察歐洲山毛櫸之根系發現其含有菌毯以及哈替氏網的構造，而在近代也有許多學者觀察山毛櫸菌根且幾乎都是屬於外生菌根 (Kingleby *et al.*,1990)，顯示山毛櫸大多屬於外生菌根。

能與外生菌根菌結合成菌根的真菌大多是擔子菌門 (Basidiomycota)，和少部分子囊菌門 (Ascomycota)，及稀少的接合菌門 (Zygomycota) (胡弘道，1990)，Agerer 在 2006 年也提到能與植物形成外生菌根之真菌，大多是擔子菌門內的傘菌綱 (Hymenomycetes) 以及子囊菌門內的子囊菌綱 (Ascomycetes)，還有再特別的外生菌根中才能發現的接合菌綱 (Zygomycetes)。本研究所分離出之菌株，經電子顯微鏡及光學顯微鏡觀察其菌絲，沒有發現扣子體的存在，顯示這菌株屬於子囊菌門及接合菌門。

培養溫度對於菌根菌的生長及新陳代謝影響很大，大部分的外生菌根菌，其適宜之生長溫度為 8 至 27 °C。另外 pH 的高低與培養基養分的比例不同也會影響外生菌根菌菌絲體的生長(胡弘道，1990)。本研以 15 °C、20 °C、25 °C 及 30 °C 四種不同溫度進行對菌株隻生長影響試驗結果發現，由野生山毛櫸所分離出的菌株在 25 °C 及 20 °C 時生長良好，當溫度低於 15 °C 和高於 30 °C 時則生長不佳。

(IV) 接種菌根菌對山毛櫸苗木之生長反應

1. 苗高、地際直徑生長量及根部構造觀察

試驗結果顯示，臺灣山毛櫸苗木接種 F25 菌株者其淨高生長量最佳，接種 Fh13 菌株者其地際直徑淨生長為最佳，而未接種者其生長量明顯較接種菌根菌者低。在國內尚無有關山毛櫸接種外生菌根菌之研究，但在其他樹種已有多篇報告指出，接種外生菌根菌可以顯著提昇植物生長量。如林瑞進 (2000) 以三種外生菌根菌接種於青剛櫸幼苗上，經一年的試驗後，觀察發現所有接種菌根菌者其生長量皆大於未接種者。亦有其他學者以塊菌接種至青剛櫸幼苗上並顯著增加其生長量 (林健銘，2005)。陳潔音 (2001) 以彩色豆馬勃接種至二葉松及青剛櫸上，不僅可以增加其生長量還可以提升植株抗重金屬汙染之能力，顯示接種外生菌根不僅可以增加生長量，還能緩衝對植物有害之物質。而國外研究山毛櫸菌根已有悠久的歷史，由根部結構到生理特性實驗均有相當多的研究。Tyler (1992) 研究了 137 種大型真菌對山毛櫸屬 (*Fagus*) 形成菌根的能力，發現約有 30 種可以與山毛櫸屬形成外生菌根，Beyeler 等 (1997) 以歐洲山毛櫸 (*Fagus sylvatica*) 接種尖頂乳菇 (*Lactarius subdulcis*) 形成外生菌根且其生長量比未接種者佳，Dunabeitia 等 (2004) 在野外以打碎的孢子果接種至山毛櫸並形成優勢的菌根。由此可知國外在研究山毛櫸的菌根合成技術已趨於成熟，可以直接在野外進行接種，而國內尚無有關山毛櫸的菌根育苗研究，然待繼續努力。

由圖 21 及圖 22 可以看出有接種菌根菌之苗木根部有所變化，接種 Fh25 菌株之苗木根段與 Agerer (1995) 所分類之外生菌根形態一樣都呈現羽狀形，也與臺灣山毛櫸野外菌根根段相類似，根部顯微構造有菌毯及哈替氏網的構造與 Clowes (1951) 觀察歐洲山毛櫸之根系發現其含有菌毯以及哈替氏網的構造相同，顯示接種 Fh25 菌株可以與臺灣山毛櫸形成外生菌根。

2. 淨光合作用反應變化

光合作用是一動態系統，其光合作用速率會隨時改變，並且受到植物內在因素以及外在環境所影響，而環境因子包括光度、光質、二氧化碳濃度、溫度、水分等

因素之影響，其中影響最大的光度和光質，當光度增高時植物光合作用速率也會隨之提高，但當光度無論再如何提高其植物光合作用速率仍然維持一定時，此時我們稱之為光飽和點，光飽和點之大小會隨不同種類植物而有異（易希道，1991）。

本研究發現接種菌根菌與未接種者其光飽和點都在 $1800 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時，其最高光合作用速率以接種 Fh25 菌株 $4.221 \pm 0.907 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 為最高，未接種者 $1.206 \pm 0.078 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 為最低，顯示接種外生菌根菌可以有效提高光合作用速率。Reid 等 (1983) 於火炬松幼苗上接種外生菌根菌並經十個月後，試驗發現其光合作用速率是未接種外生菌根菌者的 2.1 倍；顯示接種外生菌根菌能有效提升光合作用率。

3. 植物體乾重及葉片數、總葉面積

由表 16、17 可看出苗木接種 Fh25 菌株其全株乾重 $0.39 \pm 0.18\text{g}$ 、葉片數 10.75 ± 6.40 片、總葉面積 $20.85 \pm 14.18\text{cm}^2$ 均顯著高於未接種者，未接種者全株乾重 $0.15 \pm 0.05\text{g}$ 、葉片數 5.75 ± 4.35 片、總葉面積 $6.50 \pm 4.49 \text{cm}^2$ 。林瑞進 (2000) 以三種外生菌根菌接種於青剛櫟幼苗上，經一年的試驗後，觀察發現所有接種菌根菌者其地上部乾重、地下部乾重，葉片數及葉面積皆大於未接種者；林健銘 (2005) 於青剛櫟小苗上接種塊菌並觀察其地上部及地下部乾重顯著高於未接種者，顯示接種外生菌根能促進植物體成長。

4. 葉綠素濃度之變化

由研究結果顯示臺灣山毛櫸苗木接種 Fh25 菌株其葉綠素 a 含量 $4.26 \pm 1.17 \text{mg/g}$ 、葉綠素 b 含量 $2.40 \pm 0.78 \text{mg/g}$ 、葉綠素 a + b 含量 $6.65 \pm 1.40 \text{mg/g}$ 均顯著高於未接種者之葉綠素 a 含量 $2.64 \pm 0.17 \text{mg/g}$ 、葉綠素 b 含量 $1.32 \pm 1.22 \text{mg/g}$ 、葉綠素 a + b 含量 $3.96 \pm 1.17 \text{mg/g}$ ，宋瑞清等 (2005) 研究指出紅皮雲杉幼苗接種外生菌根菌後，其葉綠素 a、葉綠素 b、葉綠素 a + b 含量均大於未接種者；而研究結果顯示接種 Fh25 菌株能提升葉綠素含量加速光合作用速率。

5. 葉部組織構造之觀察

由表 19 所示臺灣山毛櫸苗木接種 Fh13 其氣孔密度最高，接種 Fh25 菌株者次之，未接種者其氣孔密度最低。許崑衍 (2005) 指出羅氏鹽膚木、白匏仔、血桐苗木接種叢枝菌根菌後其氣孔密度顯著高於未接種者，而氣孔密度又光合作用有關，氣孔密度越高其氣體交換率越高，光合作用也隨之增加 (易希道，1991)。

目前國外已證實山毛櫸接種外生菌根菌可以幫助山毛櫸吸收土壤養分，且有效地提昇其生長量，並提昇幼苗存活率 (Beyeler, M. and W. Heyser, 1997; Dunabeitia *et al.*, 2004)。惟國內尚無針對山毛櫸菌根之探討，有待進一步努力。

V、結論

- I、以光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡觀察臺灣山毛櫸野生根段，發現根部具典型的外生菌根構造，且根部顯微構造也發現有菌毯及哈替氏網的構造，顯示臺灣山毛櫸菌根為外生菌根。
- II、由臺灣山毛櫸野生根段所分離之菌株，在 MMN 培養基中溫度於 20°C 至 25°C，pH 值 6 至 7 生長最快速。
- III、種子發芽試驗顯示，臺灣山毛櫸種子去除種皮後期發芽率顯著高於為去除種皮之種子，證實山毛櫸種子去種皮可以打破種子休眠並加速發芽時間。
- IV、接種試驗顯示，接種 Fh25 菌株能產生菌毯及哈替氏網，證實 Fh25 菌株能與臺灣山毛櫸苗木形成共生。
- V、接種 Fh25 菌株之臺灣山毛櫸苗木其淨高生長量、地際直徑淨生長、淨光合作用速率、葉綠素含量、氣孔密度，葉片數、總葉面積及乾重等均顯著高於未接種者，顯示接種 Fh25 菌株可以提高其生長量。

VI、參考文獻

- 弓明欽、陳應龍、仲崇祿 (1997) 菌根研究及應用。中國林業出版社，223 頁。
- 王月雲、陳是瑩、童武夫 (1981) 植物生理學實驗。國立臺灣師範大學出版組。78-79 頁。
- 王明光 (2007) 森林土壤化學。華香園出版社。台北。542 頁。
- 余旻儒 (2010) Frankia 對臺灣胡頹子苗木生長及生理特性之效應。國立嘉義大學農學院森林暨自然資源研究所碩士論文，86 頁。
- 宋瑞清、吳克 (2005) 紅皮雲杉外生菌根菌對苗木生長的影響。微生物學報 40(6):911-933。
- 呂勝由 (1996) 臺灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑(I)。行政院農委會，163 頁。
- 易希道 (1991) 最新植物生理學。環球書社，282 頁。
- 林健銘 (2005) 青剛櫟接種塊菌對其生長之影響及龜紋硬皮馬勃對塊菌菌根之競爭力，國立台灣大學森林學研究所碩士論文，64 頁。
- 林瑞進 (2000) 青剛櫟外生菌根苗在貧瘠地造林之研究，國立台灣大學森林學研究所碩士論文，67 頁。
- 金恒鑣 (1989) 森林土壤的性質與經營。國立編譯館，664 頁。
- 洪國棟 (2008) 臺灣馬醉木之杜鵑類菌根及臺灣馬醉木甲醇萃取物之抗白蟻活性之研究。國立嘉義大學農學院森林暨自然資源研究所碩士論文，76 頁。
- 胡弘道 (1990) 林木菌根。千華出版公司，666 頁。
- 胡弘道、王亞男、劉啟福 (2008) 溫度及 pH 對臺灣塊菌與印度塊菌菌落在洋菜培養基上生長之效應。中華林學季刊，1(1):43-58。
- 胡弘道、林瑞進、林麗貞 (2002) 青剛櫟外生菌根苗在貧瘠的造林之研究。台大實驗林研究報告 16(1)：45-60。
- 胡弘道 (1999) 森林土壤學，國立編譯館，435 頁。

- 孫岩章、林秀穗、謝煥儒 (2006) 茶白紋羽病及其病原菌。臺大實驗林研究報告 20(3):205-213。
- 高嘉鴻 (2005) 中果塊菌 (*Tuber mesentericum* Vitt.) 之分離、菌落生長及半無菌菌根合成，國立臺灣大學森林環境暨資源學研究所碩士論文，74 頁。
- 陳子英 (2004) 銅山地區山毛櫸林植物資源調查 (1/2)。農業委員會林務局保育研究系列第 92-7 號，80 頁。
- 陳潔音 (2001) 彩色豆馬勃菌根於重金屬汙染土壤之復育效應，國立中興大學森林學研究所碩士論文，67 頁。
- 許崑衍 (2005) 叢枝菌根菌對羅氏鹽膚木、白匏仔及血桐苗木生長及生理特性之效應。國立嘉義大學農學院森林暨自然資源研究所碩士論文，121 頁。
- 賀立行 (2000) 宜蘭銅山地區山毛櫸土壤動物初步研究。國立臺灣大學森林學研究所碩士論文，46 頁。
- 黃立彥 (2000) 拉拉山臺灣山毛櫸林植群生態與天然更新之研究。國立中興大學森林學系碩士論文，91 頁。
- 楊正釗、郭幸榮、黃群修 (2010) 臺灣山毛櫸種子的發芽與儲藏性質。臺灣森林經營之回顧與前瞻研討會育林組，92-106 頁。
- 葉玉雲、簡秋源 (1999) 臺灣產漏斗稜孔菌 (*Polyporus arcularius*) 性別行為和生活史之研究。Fungal Science, 14(1):43-52。
- 臺灣植物誌第二版編輯委員會 (1996) 臺灣植物誌第二版第二卷。國立臺灣大學，855 頁。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 臺灣樹木誌。國立中興大學農學院叢書，809 頁。
- 歐辰雄、呂金誠 (2000) 插天山自然保留區臺灣山毛櫸天然更新與繁殖之可行性研究 (II)。農委會林務局保育研究系列第 89-5 號，92 頁。
- 蔡秀莉 (2005) 介質及插穗處理對茶扦插發根之影響。國立中興大學土壤環境科學系碩士論文，99 頁。
- 蔣先覺、陳尊賢、林光清、洪富文 (1994) 臺灣高山森林土壤形態，性質與分類。

- 臺灣林業試驗所，391 頁。
- 謝宛倫 (2009) 西施花之杜鵑類菌根及其抗白蟻活性之研究。國立嘉義大學農學院森林暨自然資源研究所碩士論文，86 頁。
- 顏江河 (1996) 彩色豆馬勃琉球松菌根在煤礦棄土對土壤溶液中鋁、硫含量及吸收之效應。臺灣大學森林學研究所博士論文，110 頁。
- Agerer R (1995) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: An attempt towards a natural classification. pp.685-734 In Varma, A. and B. Hock (Eds). Mycorrhiza structure. Function. Molecular Biology and Biotechnology. 747pp.
- Agerer, R. (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. Mycological Progress 5: 67-107.
- Beyeler, M. and W. Heyser (1997) The influence of mycorrhizal colonization on growth in the greenhouse and on catechin, epicatechin and procyanidin in roots of *Fagus sylvatica* L. Mycorrhiza 7(4):171-177.
- Bonner, F. T. and J. A. Vozzo (1987) Seed biology and technology of *Quercus*. U. S. Dept of Agriculture Forest Service USA, 34pp.
- Clowes, F. A. L. (1951) The structure of mycorrhizal roots of *Fagus Sylvatica*. Department of Botany, University of Oxford, 17pp.
- Dunabeitia, M., N. Rodriguez, I. Salcedo and E. Sarrionandia (2004) Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country, Forest Ecology and Management 195:129-139.
- Kingleby, P. A., F. T. Mason and L. V. Fleming (1990) Identification of ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology, Edinburgh Research Station 64-65.
- Larcher, W. (2003) Physiological Plant Ecology. Springer, New York. 513pp.
- MacDonald, D. C. (1977) Methods of soil and tissue analysis used in the analytical laboratory. Canadian Forestry Service Information Report. MM-X-78.

- Marc, B., V. Dominique and J. Garbaye (2004) Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15: 235–245.
- Mueller, C. W., N. Brüggemann, K. Pritsch and G. Stoelken (2009) Initial differentiation of vertical soil organic matter distribution and composition under juvenile beech (*Fagus sylvatica* L.) trees. *Plant Soil* 323:111–123.
- Olson, S. R. and L. E. Sommers (1982) Phosphorus. *In*: Page A. L. *et al.*, eds. Methods of soil analysis. Part 2, 2nd ed. Agronomy Monogr. 9, ASA and SSSA. Madison, WI. 403-430.
- Reid, C. P. P., F. A. Kidd and S. A. Ekwebelam (1983) Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine, *Plant and Soil* 71, 415~432.
- Rhoades, J. D. (1982) Cation exchange capacity. *In* A. L. page *et al.* (eds) Methods of Soil Analysis. Part2. 2nd ed., Agronomy 9:149-157.
- Shen, C. F. (1992) A monograph of the genus *Fagus* Tourn. *ex* L. (Fagaceae). UMI.
- Tylera, G. (1992) Tree species affinity of decomposer and ectomycorrhizal macrofungi in beech (*Fagus sylvatica* L.), oak (*Quercus robur* L.) and hornbeam (*Carpinus betulus* L.) forests. *Forest Ecology and Management* 46(1):269-284.

VII、銅山山毛櫸菌根對山毛櫸苗木生長及生理特性之效應期末報告紀錄

一、 臺灣大學郭教授幸榮：

1. FH25 菌株的接種效果最佳，本菌株是否普遍存在於苗圃而且在一般育苗會與山毛櫸結合?或是在育苗實務方面如何接種?請在結論及建議提出。
2. 圖 23(P.42)的迴歸線近於直線，不合理，請修正。
3. 建議期末報告修正後通過。

二、 林業試驗所陳研究員財輝：

1. 野外取回之菌根菌與野生根菌根呈現分離狀，根圈土壤中有無菌根菌?
2. 山毛櫸外生菌根菌大量培育技術為何?
3. 台灣山毛櫸極為珍貴，由於林下更新小苗稀少，如何強化山毛櫸苗木復育技術，建議持續支持相關研究，建立整體性山毛櫸保育模式。

三、 林業試驗所邱研究員志明：

1. 本計畫藉由篩選菌根菌，用以促進台灣山毛櫸幼苗成活。本研究接種 6 種菌根菌，並比較接種後，葉、根、莖及全株乾重、葉片數、葉總面積、葉綠素 a、b 含量濃度，皆發現 FH25 菌株效果最佳，已達到本計畫之目標。
2. 為促進台灣山毛櫸種子發芽，研究顯示去除種皮為有效方法，可供相關單位參考。
3. P.14，苗木發芽試驗建議修正為種子發芽試驗。

四、 嘉義大學李校長明仁：

1. 本研究結果顯示以 FH25 菌株的接種效果最佳，而 FH25 菌株係自銅山原生山毛櫸根部分離純化之菌株，本菌株並不存在於一般苗圃土壤中，而且在一般育苗不會與山毛櫸結合形成菌根。所以，育苗實務方面必需以培養之 FH25 菌株菌絲懸浮液接種至山毛櫸幼苗根部，才能培育成菌根苗以供造林之用。
2. 圖 23 (P.42)的迴歸線近於直線，已依郭委員之意見作適當之修正。
3. 一般外生菌根菌之分離係採取原生育地野生苗之根段，進行分離純化、培養、鑑定、及繁殖外生菌根菌菌株。根圈土壤中也有菌根菌，但因土壤含有許多其他雜菌分離純化相當困難，所以外生菌根菌之分離一般不採用根圈土壤。
4. 台灣山毛櫸外生菌根菌之大量培育技術，可將分離純化之菌株以固態或液態 MMN 培養基進行大量培養繁殖菌絲作為接種原，以供接種山毛櫸幼苗之用。

5. 台灣山毛櫸極為珍貴，由於林下更新小苗稀少，可對生育地林床之雜草及箭竹加以整治，以增進山毛櫸種子之發芽，並接種外生菌根菌以促進幼苗之生長；也可以在苗圃育苗階段接種外生菌根菌以培育優良之菌根苗，再栽植至林地以強化山毛櫸苗木之復育。
6. 本計畫自山毛櫸根段完成分離篩選 6 株外生菌根菌，接種 6 種菌根菌至山毛櫸幼苗，並比較接種後，葉、根、莖及全株乾重、葉片數、葉總面積、葉綠素 a、b 含量濃度，皆發現以 FH25 菌株所表現之效果為最佳，已達到本計畫之目標。
7. 本研究結果證實為促進台灣山毛櫸種子之發芽，去除種皮為有效之方法，可供相關單位進行台灣山毛櫸育苗作業之參考。
8. P.14，苗木發芽試驗已依邱委員之建議修正為種子發芽試驗。