

第八屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA8-316

作品名稱：田園美麗的綬帶-校園地生蘭
綬草根部分生菌之調查與應用

姓名：楊哲嘉

關鍵字：綬草、蘭共生菌、地生蘭

壹、研究題目

田園美麗的綬帶-校園地生蘭綬草根部分生菌之調查與應用

貳、研究動機

每年春天四至五月間，校園草坪上常見一種美麗的小草，開著紫紅色的小花，排列如螺旋狀上升，有如綬帶般的美麗。有一次在自然課時，問老師這種花的名字，才知道這是一種地生蘭花，名叫綬草。

綬草(*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames.)為蘭科綬草屬之地生蘭植物(圖一)，根系肥厚，如人參一般。每年清明節前後會自花莖基部抽出花穗，屬於穗狀花序。花軸上密生小花，並環繞花軸盤旋上升，故有盤龍參或清明草之稱(余與陳, 2001)。

綬草除了具有觀賞價值，亦具有藥用保健功能。依據《中華本草》記載，其性平味甘，有益氣補陽、清熱解毒之效。

蘭科植物的種子細小，在自然界中，常有真菌共生才能順利萌發(李, 1990)。查文獻得知，蘭科植物的根部亦常有不同的真菌共生。故期望能藉由此實驗調查校園內野生綬草根部分生菌種類，並加以分離純化及鑑定。以整理校園內野生綬草根部分生真菌種類及多樣性。

參、研究目的

期望能藉由這個實驗能調查並整理校園內野生綫草根部的共生真菌種類及多樣性。

肆、研究過程

一、真菌分離、純化及培養：

1.真菌分離：於校園內採集野生綫草，先將其根部表面的雜物與砂土去除並以清水洗淨。以 1% 次氯酸鈉(NaOCl)間歇搖動消毒 15-20 分鐘後，於無菌操作台中以無菌水清洗三次。於無菌操作台內將根段切成相同長度(≈3~5mm)，放入 1/6PDA(表一)培養基中，於 25°C 黑暗環境下培養 24- 48 小時後，觀察菌絲自根段生長的情形(圖二)。

2.真菌的純化與培養：將分離出的真菌繼代至 WA 培養基進行純化，待菌絲生長後，挑取單一菌絲至 PDA 培養基中，使其生長。將真菌之培養基置於 25°C 黑暗環境下培養，觀察菌絲生長的情形。

二、真菌種類觀察及鑑定：

1.將培養之真菌菌落以數位相機對其正反面進行拍照，以記錄其菌落形態。

2.將真菌培養於載玻片上進行平板培養，待菌絲長出後，以苯胺

藍染液進行染色，並以光學顯微鏡進行觀察，並拍攝菌絲等形態，以便調查真菌種類。

伍、結論

一、真菌分離、純化及培養：

自野外取得的綫草根經消毒培養後，共有 11 個根段長出真菌菌絲(圖三)，經多次分離及純化後，因細菌污染等因素，僅得 6 種純系的真菌(圖四)。

二、真菌種類觀察及鑑定：

根據之前所看到的資料指出，與蘭科植物具有共生關係的真菌，多屬於絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)真菌。絲核菌屬真菌之主要特徵為
1.年輕營養菌絲在菌絲先端隔膜附近分枝。2.分枝菌絲於其分枝點附近形成隔膜。3.分枝基部會有縊縮現象。4.菌絲隔膜為擔子菌特有之桶狀隔膜 (dolipore septum)。5.菌絲無扣子體 (clamp)。6.只產生念珠狀細胞 (monilioured cells)，無其他無性孢子(康與張, 2005.)。

由實驗一所分離之 6 種真菌，經平板培養後，觀察並記錄其菌絲或孢子形態(圖五-圖十)。僅發現一種具有絲核菌屬真菌(圖五)之特徵，其他 5 種真菌尚待進一步鑑定調查。

陸、討論與應用

本次實驗僅分離出 6 種純系的真菌，其中只有一種符合絲核菌屬真菌的特徵，其他 5 種真菌尚待鑑定。由於遭受細菌污染或消毒不確實等因素，以至於純化過程產生許多污染。文獻指出，絲核菌屬真菌雖然跟蘭花具有共生關係，但有些品系對於其他農作物具有病害。

未來除了完成本次實驗所分離之其他菌種鑑定之外，可能需要進一步實驗本次分離之絲核菌屬真菌是否具有致病性。以免菌種外流後，對於其他作物產生危害。康與張在 2005 年的研究指出，絲核菌屬真菌對於蘭科植物具有多種生長促進效果。本次實驗所分離之絲核菌種對於綬草種子及組培苗是否具有具體促進效果，仍需進一步試驗。

柒、參考資料

- 1.李岷. 1990. 蘭之胚培養. 中國園藝. 36(4): 223-244.
- 2.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: 8-10.
- 3.康繼文、張喜寧. 2005. 蘭菌的量產與應用-**菌種生產手冊**. 國科會國家型科技計畫產學合作計畫報告. 50 頁.

附錄

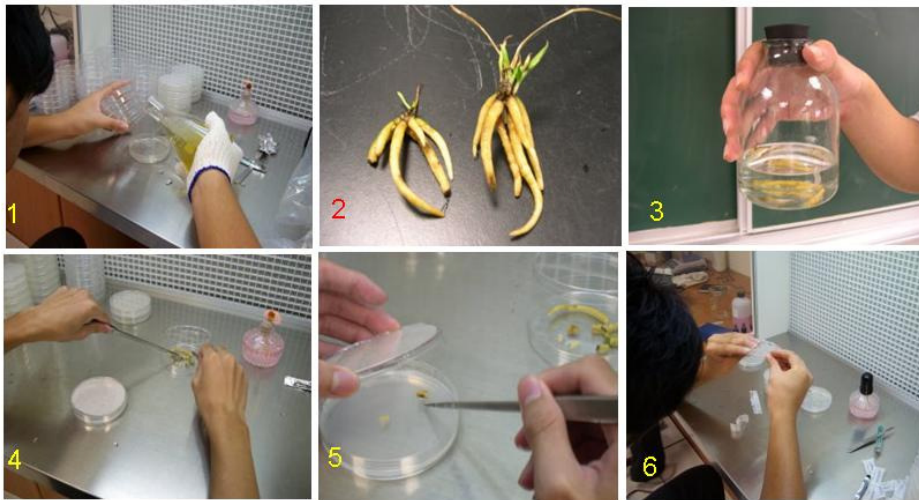
表一、本次實驗所使用之培養基

名稱	用途	配方 ^b
全量 PDA^a (Potato Dextrose Agar)	菌種繼代用	秤取 PDA 粉末 39g 加 1000ml 二次蒸餾水 ，攪拌均勻後放入高溫滅菌釜 ^c 中滅菌，待滅菌後取出，於無菌操作台內倒入培養皿，靜置冷卻後即可使用。
1/6PDA	分離菌種用	秤取 PDA 粉末 6.5g 及 agar(台製)粉末 12g 加 1000ml 二次蒸餾水 ，攪拌均勻後放入高溫滅菌釜 ^c 中滅菌，待滅菌後取出，於無菌操作台內倒入培養皿，靜置冷卻後即可使用。
WA (Water Agar)	菌種純化用	秤取 agar 粉末 13g 加 1000ml 二次蒸餾水 ，攪拌均勻後放入高溫滅菌釜 ^c 中滅菌，待滅菌後取出，於無菌操作台內倒入培養皿，靜置冷卻後即可使用。

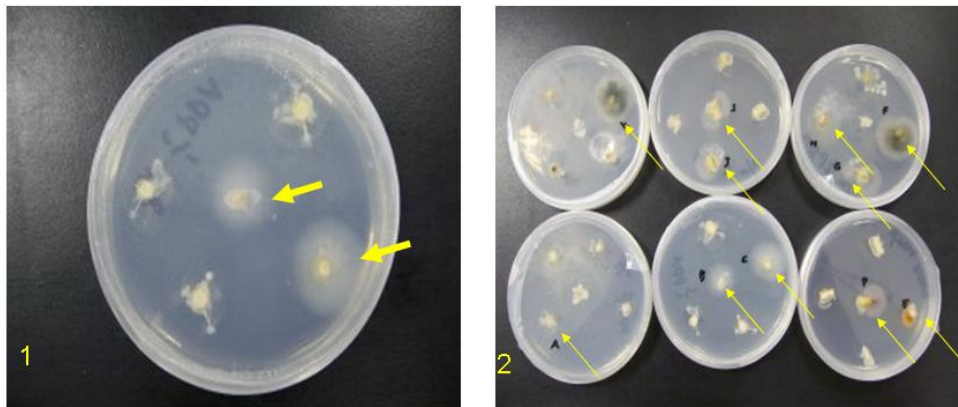
註：a: PDA: Potato Dextrose Agar (Difco™) b:每公升固體培養基可倒滿 80 個 9cm 培養皿，每個培養皿平均含 13ml 養液。c:高溫滅菌釜(Tomin Medical equipment Co., LTD.)以 121℃; 1.2Kg/cm²; 滅菌 20 分鐘。(康與張, 2005)



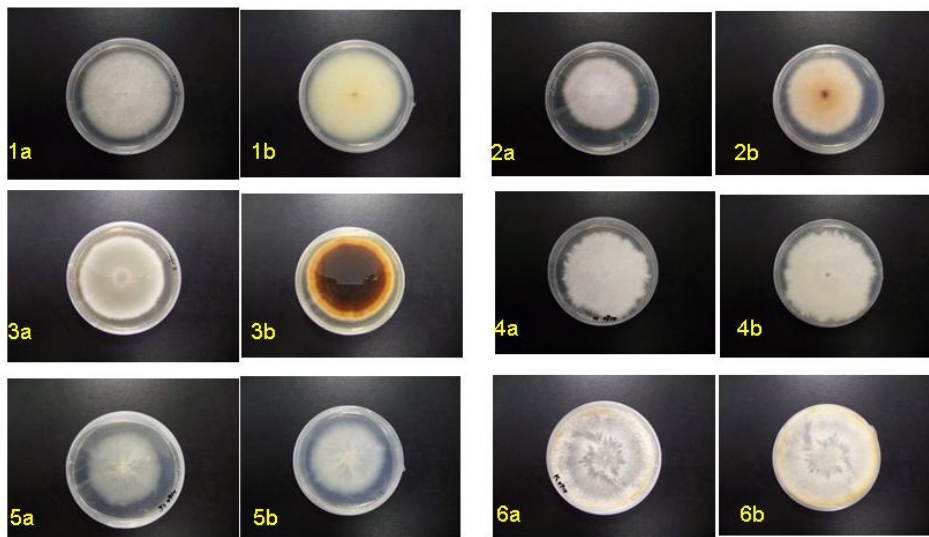
圖一、地生蘭花綬草之形態與開花狀況。1.盆栽生長狀況，2.野外生長狀況(日本，兼六園)。



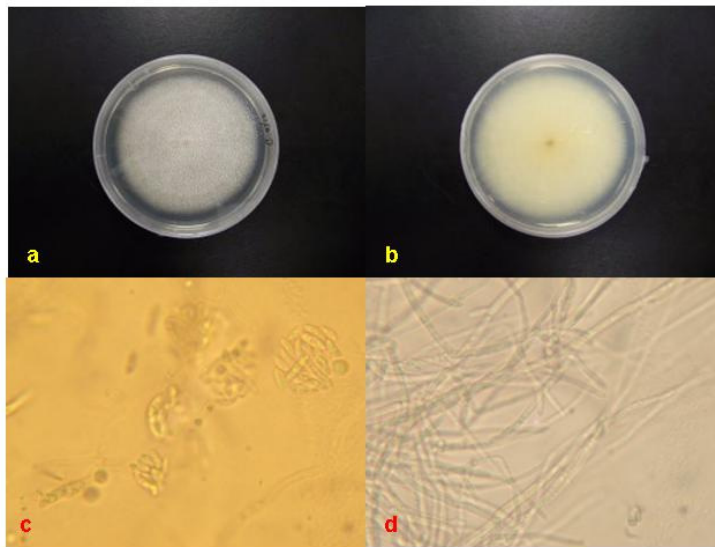
圖二、綬草根部分離實驗操作。1.調配1/6PDA並置備培養基。2.校園內採集的綬草植株。3.將根段剪下，以1%NaOCl進行消毒。4.將消毒過之綬草根部分取備用。5.將根段放置於培養基上。6.以石蠟膜封存培養基。



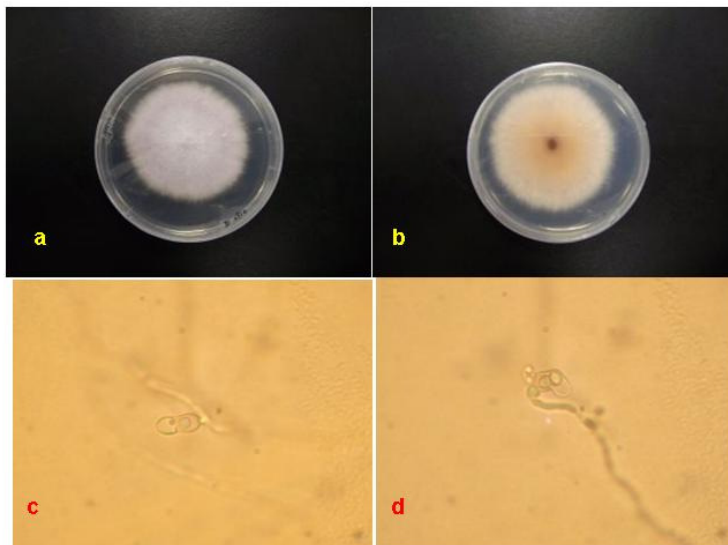
圖三、綬草根部分離之六種真菌菌落狀況。1.真菌自根段切面生長狀況(黃色箭頭)。2.共發現11個根段長出真菌菌絲(黃色箭頭處)。



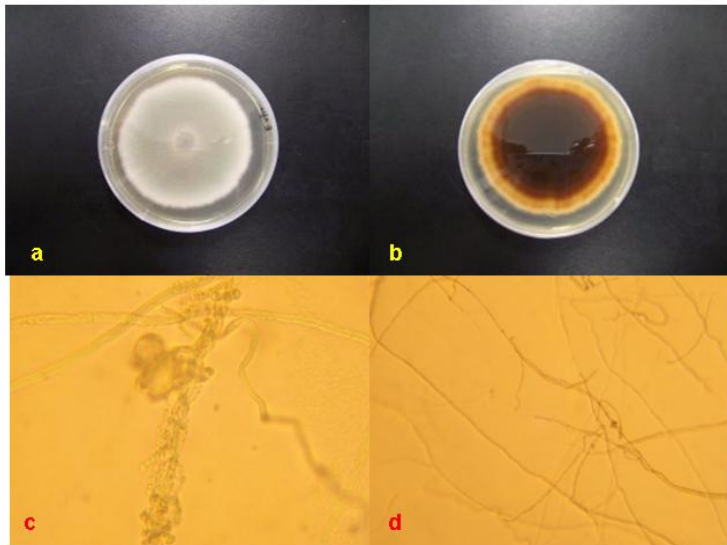
圖四、綬草根部分離之六種真菌菌落狀況。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面。



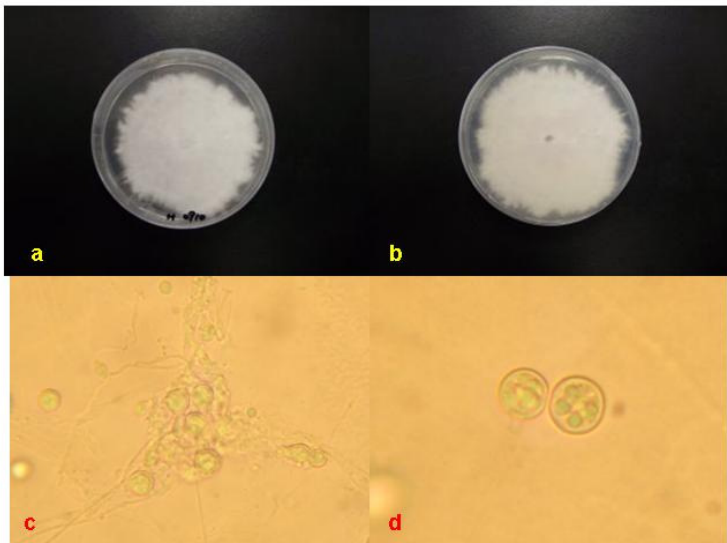
圖五、綬草根部分離之真菌-1。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)孢子，(d)菌絲。



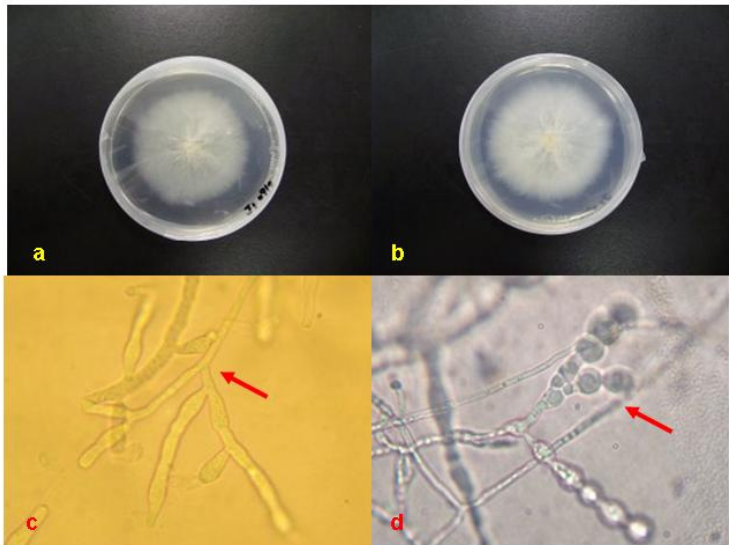
圖六、綬草根部分離之真菌-2。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)、(d)菌絲形態。



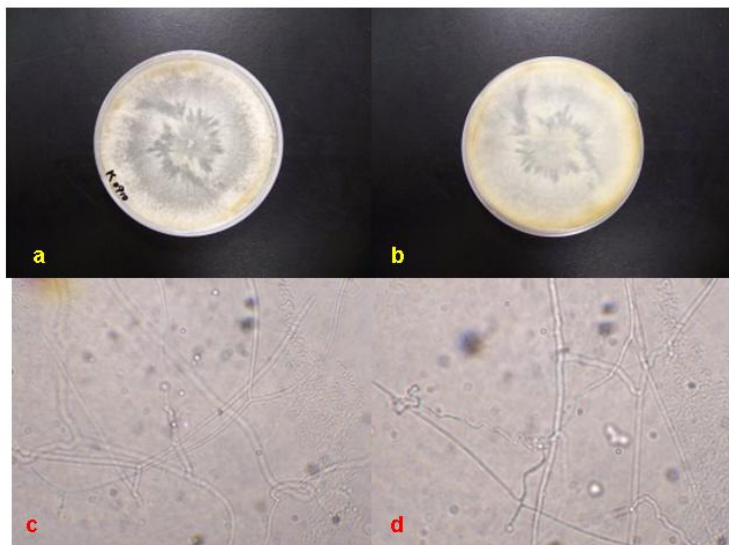
圖七、綫草根部所分離之真菌-3。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)、(d)菌絲形態。



圖八、綫草根部所分離之真菌-4。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)、(d)孢子形態。



圖九、綬草根部分離之真菌-5。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)、(d)菌絲形態。經觀察本種真菌之菌絲分枝基部會有縊縮現象，且老熟菌絲會生念珠狀細胞(紅色箭頭)。應為絲核菌屬真菌。



圖十、綬草根部分離之真菌-6。真菌生長於PDA培養基上5天後拍攝情形。(a)為正面，(b)為反面，(c)、(d)菌絲形態。