

磷酸根離子對叢枝菌根菌孢子發芽 與菌絲生長之影響¹

林素禎^{2,4} 吳繼光³

摘要：本文主要探討磷酸根離子對本省土壤中較常見的幾種叢枝菌根菌孢子的發芽率與菌絲生長之影響。所使用的菌種有六種，*Acaulospora scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Entrophospora kentinensis*, *Glomus mosseae*, *G. occultum* 與 *G. versiforme*。試驗結果發現，*E. kentinensis*, *G. mosseae* 這兩種菌根菌孢子，當磷酸根離子濃度在 0.4~10 mM 時，孢子發芽率最高，分別為 73.3~90.0%，71.8~85.8%。當磷酸根離子濃度增加至 20mM 時，這兩種菌根菌孢子之發芽率皆降至 20%以下，當磷酸根離子濃度達 40 mM 時，這兩種菌根菌孢子之發芽率皆為 0。*A. morrowiae* 與 *A. scrobiculata* 在磷酸根離子濃度 4 mM 以下時，孢子發芽率較高，分別為 44.3~58.5 % 與 49.7~63.8 %。*G. versiforme* 在磷酸根離子濃度 2 mM 時，孢子發芽率最高為 45.5%。*G. occultum* 對磷最敏感，當磷酸根離子濃度在 1 mM 以上，則菌根菌發芽率與菌絲生長明顯下降。*E. kentinensis* 在磷酸根離子濃度 0.4~10 mM 時，菌絲長度為 0.3~0.5 mm/spore，當磷酸根離子濃度在 20 mM 以上時，孢子全數不發芽。*G. mosseae* 在磷酸根離子濃度 2 mM 時，發芽率不受影響，但菌絲生長長度開始明顯下降。*A. morrowiae*, *A. scrobiculata* 與 *G. versiforme* 這三種菌根菌孢子，當磷酸根離子濃度在 10 mM 以上時，菌絲生長明顯受抑制。*A. morrowiae* 與 *E. kentinensis* 在硫酸鉀溶液中孢子發芽率與菌絲生長情形，與其在鉀-磷酸鹽溶液中類似，因此，這兩種菌根菌孢子在鉀-磷酸鹽溶液中發芽與生長除了受到磷酸根離子的影響外，可能亦受到鉀離子之影響。

關鍵詞：菌根菌、磷、鉀。

前 言

磷肥的施用常造成植物菌根的感染率下降及菌根菌孢子數量減少；例如呂等人⁽²⁾ 發現每週施用一次 1/4 磷量的 Johnson solution (15mg/kg-P)，番茄的菌根菌感染率為 73.4%，每週施用一次 1/2 磷量的 Johnson solution (31 mg/kg-P)，番茄的菌根菌感染率下降為 55.5%，每週施用一次全磷量的 Johnson solution (62 mg/kg -P)，番茄的菌根菌感染率更降為 24.2%。Menge 等人⁽¹⁹⁾ 發現加州土壤中磷的含量與菌根菌的孢子數成反比。Kucey and Paul⁽¹⁷⁾ 亦報導，在不施磷肥的土壤中，蠶豆的菌根菌感染率為 47%，而施用 45kg-P/ha 後，蠶豆的菌根菌感染率下降為 15%，在施肥區土壤中，菌根菌的孢子數為 30 個/100g soil，在未施肥區土壤中，菌根菌的孢子數為 65 個/100g soil。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2118 號。接受日期：91 年 7 月 3 日。

2. 本所農化系助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

3. 原行政院農業委員會農業試驗所副研究員，現為臺灣寶業股份有限公司生技二廠廠長。臺灣省 臺南市。

4. 通訊作者，電子郵件：linmay@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302805。

造成菌根菌感染率下降及菌根菌孢子數量減少，主要是因土壤中磷之改變，抑或植體磷濃度之影響？許多研究者對此提出不同之看法。Miranda 等人⁽²¹⁾報導，土壤磷直接影響菌根菌的拓展，而較明顯的時期在叢枝內生菌根菌早期的根外菌絲拓展時。Miranda and Harris⁽²²⁾ 接著發現，菌根菌孢子在 soil-agar plate 上發芽時，叢枝內生菌根菌 *Glomus etunicatum* 與 *Scutellospora heterogama* 孢子的發芽率與菌絲的生長受到不同土壤磷添加量的影響；當磷添加量為 0 時，*G. etunicatum* 與 *S. heterogama* 孢子的發芽率分別為 53% 與 57%，菌絲的長度分別為 0.93 mm/spore 與 1.55 mm/spore，當磷添加量為 250 μ g/g soil 時，*G. etunicatum* 與 *S. heterogama* 孢子的發芽率分別為 31% 與 33%，菌絲的長度分別 0.44 mm/spore 與 0.66 mm /spore，可見孢子的發芽率與菌絲生長，因磷肥的添加而明顯受到抑制。這個試驗結果，支持了菌根菌孢子早期在土壤中拓展時是受土壤磷濃度的影響之假說。在另一方面，Mosse⁽²⁵⁾ 發現苜蓿植體磷含量超過 0.4% 時，就無法感染叢枝內生菌根菌。Sanders⁽²⁶⁾ 以葉面施用磷肥的方法，使洋葱地上部磷含量增加，這使得接種菌根菌(*G. mosseae*)之洋葱菌根菌感染率下降而減少根外菌絲的重量，並使得原由菌根菌供應給植株之磷量下降。Menge 等人⁽²⁰⁾ 以“分根”(split root) 的方法，發現當蘇丹草 (*Sorghum vulgare* Pers.) 植體磷含量低時，即使土壤磷含量高達 600 mg/kg，菌根菌 *G. fasciculatum* 的感染率與孢子數均未減少；而當植體磷含量高時，即使土壤磷含量只有 6 mg/kg，菌根菌的感染率與孢子數皆明顯下降。

由 Menge 等人⁽²⁰⁾ 的試驗中可知菌根菌 (*Glomus fasciculatum*) 在土壤含磷量 600 mg/kg 時，孢子尚可正常發芽，且菌絲生長不受影響，是否每一種菌根菌皆可在 600 mg/kg 的土壤中正常發芽與生長？由於直接在田間土壤中測試孢子的發芽與生長不容易做到，故研究孢子的發芽與生長多在實驗室中進行。Mosse⁽²⁴⁾ 設計了孢子發芽皿，使菌根菌 *Endogone* 孢子在 3-4 天時，發芽率可達 80% 以上。Hepper⁽¹²⁾ 利用 Difco Bacto agar 加入磷酸鹽(KH_2PO_4 與 K_2HPO_4)，探討磷濃度對菌根菌孢子發芽與菌絲生長之影響，發現兩種不同來源之 *G. mosseae* 孢子，當磷濃度在 30mM (930 mg/kg-P) 時，兩種孢子之發芽仍高達 70 與 90%，當磷濃度達 40mM (1240 mg/kg-P) 時，則發芽率降低 50% 以上；菌絲長度則在磷濃度 20mM (620 mg/kg-P) 時，下降為低磷濃度 5mM (155mg/kg-P) 之 1/3，當磷濃度達 40mM 時，菌絲無法生長。而另一種菌根菌 *G. caledonium* 在磷濃度 30mM 時，兩種不同來源之 *G. caledonium* 孢子，其發芽率皆在 60% 以上，磷濃度達 40mM 時，孢子發芽率下降至 20% 以下；菌絲長度在磷濃度 10mM (310 mg/kg-P) 時，菌絲生長不受影響，當磷濃度在 30mM 時，菌絲長度平均為磷濃度 10mM 時之 1/2。Koske⁽¹⁵⁾ 發現 *Gigaspora gigantea* 在磷濃度達 500 mg/kg 時亦可正常發芽。呂⁽³⁾ 發現 *Gi. gigantea* 在磷濃度達 310 mg/kg 時，孢子發芽率可達 77% 且菌絲生長不受影響，而當磷濃度達 620 mg/kg 時，孢子發芽率下降為 43%，且菌絲生長也受影響。

菌根菌對磷濃度的敏感度因種類不同而異，在菌種選擇上有其實用的價值。本文主要探討本省土壤中較常見的幾種菌根菌⁽⁴⁾，在不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液下，孢子的發芽率與菌絲的生長。試驗中所使用之鉀-磷酸鹽緩衝液由 K_2HPO_4 與 KH_2PO_4 配製而成，文中除了探討磷酸根離子濃度對菌根菌孢子發芽與菌絲生長之影響外，亦探討鉀離子與滲透壓所可能造成之影響。

材料與方法

供試菌種

本試驗所使用之叢枝菌根菌菌種為本省土壤中較常見的六種菌種，分屬於三個屬，這六種菌根菌為 *Acaulospora scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Entrophospora kentinenis*, *Glomus mosseae*, *G. occultum* 與 *G. versiforme*。六種菌根菌菌種皆以百喜草(*Paspalum notatum* Flüge) 當宿主，百喜草種在以砂為介質的盆栽中，百喜草收穫時，將根與砂一起採收，檢查菌根菌純度及密度，根與砂風乾後以塑膠袋密封，置於冷房 4°C 中保存，此即為菌土。本試驗所使用之菌根菌菌種乃由菌土分離而得，而菌土在冷房中保存 6~18 個月。利用濕篩法與糖度離心法⁽⁸⁾ 分離菌根菌孢子，以 polyvinyl alcohol lactophenol glycerol (PVLG)⁽¹⁶⁾ 與 Melzer's⁽¹¹⁾ 製成半永久片，在穿透式光學顯微鏡下鑑定菌根菌種類。試驗用之孢子乃挑選形狀大小相當，顏色相同，有油滴，具有活力之年輕孢子。

鉀-磷酸鹽溶液之配製

鉀-磷酸鹽溶液(pH=7.0)母液之配製，乃以 61 ml 的 0.4M K_2HPO_4 加 39 ml 的 0.4M KH_2PO_4 配製而成⁽¹⁰⁾，母液中所含磷酸根離子濃度為 400 mM (12400 mg/kg-P)，以去離子水稀釋為 40 mM，20 mM，10 mM，4 mM，2 mM，1 mM，0.4 mM，0.2 mM 之鉀-磷酸鹽溶液。高濃度之溶液除了離子濃度會影響菌根菌孢子的發芽外，溶液的滲透壓亦可能是因子之一，故溶液之滲透壓亦須測定。直接測定溶液之滲透壓很麻煩，可透過電導度之換算而得知，電導度(EC)與滲透壓(OP)之關係為： $OP(atm.) = EC (dS /m) \times 0.36$ ⁽⁶⁾。不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液之電導度與滲透壓如表 1。

對照溶液硫酸鉀之配製

上述鉀-磷酸鹽溶液中除了含有磷外，亦含有鉀，菌根菌孢子之發芽究竟是受到磷之影響，或是鉀之影響，需要探討。上述鉀-磷酸鹽母液所含鉀濃度為 25116 mg/kg。以硫酸鉀 56 g/L (25116 mg/kg-K)為母液⁽¹²⁾，以去離子水稀釋為 32 mM，16 mM，8 mM，3.2 mM，1.6 mM，0.8 mM，3.2 mM 與 1.6 mM 之硫酸鉀溶液，作為對照溶液，探討鉀離子是否亦會影響菌根菌孢子之發芽。不同濃度的硫酸鉀溶液之電導度與滲透壓如表 2。

孢子發芽試驗

在無菌的塑膠培養皿(100×15mm)中，放入 60g 石英砂(10~18 mesh)。石英砂之前處理為：以自來水洗淨，以 3N H_2SO_4 浸泡 2 天，以自來水洗至 pH 接近 7，以蒸餾水洗三次，在 105°C 下烘乾 24hr 放涼備用。以藥勺抹平石英砂，加入配好的鉀-磷酸鹽溶液或硫酸鉀溶液 19 ml，19ml 的溶液可使石英砂完全浸潤而有一層薄薄水膜。接著放入一張濾紙(TOYO ADVANTEC 5A)，在濾紙上放入 4 張 1/4 大小 47mm 濾膜(milipore, ADVANTEC MFS, Inc., 0.2 μm)，濾紙與濾膜使用前先經高壓殺菌(121°C，45 min)。以微量吸管

表 1. 不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液之電導度與滲透壓

Table 1. Conductivity and osmotic pressure of potassium phosphate solution at different concentration

Phosphate concentration (mM)	Conductivity (dS /m)	Osmotic pressure (atm)
0.2	0.042	0.015
0.4	0.080	0.03
1	0.196	0.07
2	0.387	0.14
4	0.747	0.27
10	1.710	0.62
20	3.200	1.15
40	5.740	2.07

表 2. 不同濃度的硫酸鉀溶液之電導度與滲透壓

Table 2. Conductivity and osmotic pressure of potassium sulfate solution at different concentration

K_2SO_4 concentration (mM)	Conductivity (dS /m)	Osmotic pressure (atm)
0.16	0.051	0.02
0.32	0.099	0.04
0.8	0.243	0.09
1.6	0.469	0.17
3.2	0.900	0.32
8	2.040	0.73
16	3.720	1.34
32	6.530	2.35

吸取已挑選好之未經表面殺菌之孢子，滴在濾膜上，每張濾膜 20 或 50 個孢子。孢子移入後，蓋上培養皿上蓋，以石蠟膜(parafilm)密封，再以鋁箔紙包住，在培養箱中 25°C 黑暗培養。

孢子發芽率、囊狀體個數與菌絲總長之調查

孢子發芽皿在培養箱中 25°C 黑暗培養 28 天後，取出濾膜，以改良式乳酸甘油法染色^(1,14)。改良式乳酸甘油法為將 0.5g aniline blue 溶於 386 ml lactic acid, 354 ml glycerin 與 230 ml H₂O 之混合液中。以染色劑染色後，過夜，以去色劑去色，在光學顯微鏡下觀察，計算孢子發芽率、囊狀體個數 (vesicle no.)與菌絲總長。孢子發芽之認定為孢子發芽管生長的長度超過 5 μm，則視為已發芽⁽²⁷⁾。菌絲總長的計算採格子線交叉法 (gridline intersect method)⁽⁹⁾，在顯微鏡的接目鏡放入畫有 10×10 格之正方形方格鏡片，以測微尺測定不同觀察倍數時小方格之邊長(h)，在顯微鏡下計數菌絲與方格之交叉點數(n)，利用下列方程式計算菌絲總長： $R = \pi A \times n / (2H)$ ，R 為菌絲總長，A 為菌絲分佈之面積 ($A = (10h)^2$)，n 為菌絲與方格之交叉點數，H 為方格線全長 ($H = 10h \times 10 \times 2$)。

結 果

不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子發芽率之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液中發芽率列於表 3，由表 3 可知，*Glomus mosseae* 孢子在磷酸根離子濃度 0.4 ~ 10 mM 五個濃度時發芽率較高，在 72~86 %之間，*G. mosseae* 在這範圍外的磷酸根離子濃度反而不適合孢子的發芽。*Acaulospora scrobiculata* 孢子的發芽率，在磷酸根離子濃度 0.2 ~ 4 mM 五個濃度下有較高之發芽率，而磷酸根離子濃度超過 10 mM 時，則發芽率顯著下降。*A. morrowiae* 孢子的發芽率，在磷酸根離子濃度 0.2 ~ 4 mM 時，發芽率較高，在 44~59 % 之間，當高於 20 mM 後，則顯著下降。*Entrophospora kentinensis* 孢子的發芽率，在 0.4 ~ 10 mM 五個濃度下發芽率較高，當濃度高於 20 mM 後發芽率則降為 0 %。*G. occultum* 孢子的發芽率，在磷酸根離子濃度 0.4 mM 時發芽率(73 %)最高，而磷酸根離子濃度在 1 mM 以上時，發芽率明顯下降。*G. versiforme* 孢子的發芽率，在磷酸根離子濃度 2 與 4 mM 時發芽率最高，分別為 46, 36 %，磷酸根離子濃度超過 4 mM 時，則發芽率顯著下降。

不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子發芽菌絲總長度之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液中發芽菌絲總長度列於表 4，由表 4 可知，*Glomus mosseae* 孢子在磷酸根離子濃度 0.4 與 1 mM 兩個濃度時之菌絲長度較長，磷酸根離子濃度 2 mM 以上菌絲生長明顯降低。*Acaulospora scrobiculata* 發芽菌絲長度在磷酸根離子濃度 0.4 ~ 4 mM 四個濃度時，菌絲

表 3. 不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子發芽率之影響

Table 3. Effect of different concentration of the potassium phosphate solution on spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	% Germination under different phosphate concentration (mM)							
	0.2	0.4	1	2	4	10	20	40
<i>Glomus mosseae</i>	6 bc ^z	82 a	85 a	86 a	79 a	72 a	17 b	0 c
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	62 a	64 a	50 a	57 a	50 a	25 b	8 c	0 c
<i>Acaulospora morrowiae</i>	59 a	— ^y	44 ab	44 ab	51 ab	39 b	20 c	0 d
<i>Entrophospora kentinensis</i>	8 b	90 a	73 a	88 a	73 a	79 a	0 b	0 b
<i>Glomus occultum</i>	28 b	73 a	21 bc	14 bc	13 bc	7 c	7 c	3 c
<i>Glomus versiforme</i>	9 c	23 b	28 b	46 a	36 ab	9 c	0 c	0 c

^z Means in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

^y No detected.

總長較長，為 6.0~7.6 mm/spore，磷酸根離子濃度低於 0.4 mM 或高於 4 mM 皆不利於發芽菌絲的生長。*A. morrowiae* 在磷酸根離子濃度 0.2~4 mM 時其發芽菌絲較其他濃度長。*Entrophospora kentinensis* 在磷酸根離子濃度 0.4~10 mM 範圍下，每個孢子有較長的發芽菌絲，當磷酸根離子濃度高於 20 mM 時，孢子全數不發芽。*G. occultum* 孢子在磷酸根離子濃度 0.4 mM 時最適合發芽菌絲生長，而磷酸根離子濃度在 1 mM 以上時，則發芽菌絲長度明顯下降。*G. versiforme* 孢子菌絲長度在磷酸根離子濃度 0.2 與 4 mM 時最長，當磷酸根離子濃度在 10 mM 以上時，發芽菌絲長度明顯下降。

不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子囊狀體個數之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液中之囊狀體個數列於表 5，由表 5 可知，*Glomus mosseae* 每個孢子的囊狀體個數在磷酸根離子濃度 1~4mM 時較多。*Acaulospora scrobiculata* 與 *A. morrowiae* 孢子在磷酸根離子濃度 4 mM 以下時有較多的囊狀體，當磷酸根離子濃度在 10 mM 以上時，則不利於囊狀體的產生。*Entrophospora kentinensis* 孢子的囊狀體個數，除了在磷酸根離子濃度 10 mM 時為 0.2 個/spore 外，其餘各磷酸根離子濃度之囊狀體個數皆為 0 個。*G. occultum* 與 *G. versiforme* 兩種孢子在八個磷酸根離子濃度中之囊狀體個數皆為 0 個。

表 4. 不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子發芽菌絲總長度之影響

Table 4. Effect of different concentration of the potassium phosphate solution on the hyphal length of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	Hyphal length (mm) under different phosphate concentration (mM)							
	0.2	0.4	1	2	4	10	20	40
<i>Glomus mosseae</i>	1.1 d ^e	12.5 a	13.0 a	5.6 b	6.5 b	3.3 c	0.4 d	0 d
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	4.6 bc	6.8 a	6.5 ab	6.0 ab	7.6 a	3.8 c	0.5 d	0 d
<i>Acaulospora morrowiae</i>	3.3 ab	— ^y	3.7 a	2.9 ab	2.3 bc	1.1 d	1.3 cd	0 e
<i>Entrophospora kentinensis</i>	0.1 c	0.3 b	0.4 b	0.5 b	0.4 b	0.5 b	0 c	0 c
<i>Glomus occultum</i>	0.9 b	12.5 a	0.7 b	1.6 b	1.2 b	2.5 b	0.3 b	0.2 b
<i>Glomus versiforme</i>	39.3 a	28.5 ab	23.5 ab	15.7 bc	36.8 a	11.7 bc	0 c	0 c

^zMeans in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

^yNo detected.

表 5. 不同濃度的鉀-磷酸鹽溶液對叢枝菌根菌孢子囊狀體個數之影響

Table 5. Effect of different concentration of the potassium phosphate solution on vesicle formation of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	No. vesicle under different phosphate concentration (mM)							
	0.2	0.4	1	2	4	10	20	40
<i>Glomus mosseae</i>	0 c ^z	0.5 b	1.1 a	1.0 a	1.0 a	0.3 bc	0 c	0 c
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0.5 bc	1.2 a	0.7 ab	0.5 bc	1.1 a	0 c	0 c	0 c
<i>Acaulospora morrowiae</i>	0.9 ab	— ^y	1.0 a	0.6 b	0.6 b	0.2 c	0.1 c	0 c
<i>Entrophospora kentinensis</i>	0	0	0	0	0	0.2	0	0
<i>Glomus occultum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glomus versiforme</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

^zMeans in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

^yNo detected.

不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子發芽率之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的硫酸鉀溶液中之發芽率列於表 6，由表 6 可知，*Glomus mosseae* 孢子在八個硫酸鉀濃度下其發芽率很低，皆小於 14 %。*Acaulospora scrobiculata* 在硫酸鉀濃度為 0.32 與 0.8mM 時，其孢子發芽率最高，當硫酸鉀濃度達 16 mM 時，孢子之發芽率才明顯受影響，而當硫酸鉀濃度達 32 mM 時，還有 16 % 的孢子可發芽。*A. morrowiae* 在硫酸鉀濃度為 0.8 mM 時，有最高的發芽率。硫酸鉀濃度在 0.16 ~ 8 mM 範圍時，發芽率皆可高於 36 % 以上，至硫酸鉀濃度 32 mM 時，孢子發芽率仍可達 7 %。*Entrophospora kentinensis* 在硫酸鉀濃度 0.16 ~ 8 mM 時，其孢子發芽率皆很高，發芽率在 61~90 % 之間，而硫酸鉀濃度在 16 與 32 mM 時，其孢子則全數不發芽。*G. occultum* 孢子在硫酸鉀濃度為 8 mM 時，孢子發芽率(68 %)最高，硫酸鉀濃度在 16 mM 時，孢子之發芽率還可達 46 %，在硫酸鉀濃度為 32 mM 時，則降至 3 %。*G. versiforme* 孢子在八個硫酸鉀濃度發芽率皆很低，在 6 % 以下。

不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子發芽菌絲總長度之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的硫酸鉀溶液中之發芽率列於表 7，由表 7 可知，*Glomus mosseae* 孢子在八個硫酸鉀濃度下其發芽率皆低於 15 %，發芽菌絲亦很短，在 0.2 mm/spore 以下。*Acaulospora scrobiculata* 孢子在硫酸鉀濃度為 0.32 mM 與 0.8 mM 時，其發芽菌絲長度較其他濃度的發芽菌絲長，而當硫酸鉀濃度達 32 mM 時，孢子仍可發芽，其菌絲長度為 0.8 mm/spore。*A. morrowiae* 在 K_2SO_4 濃度為 0.32 mM 與 0.8 mM 時，其發芽菌絲長度最長，在 16 mM 以上菌絲生長明顯下降。*Entrophospora kentinensis* 孢子在硫酸鉀濃度 0.16 ~3.2 mM 時，每個孢子菌絲總長為 0.3~0.9 mm/spore，硫酸鉀濃度在 8 mM 以上時，菌絲總長在 0.1 mm/spore 以下。*G. occultum* 孢子在硫酸鉀濃度 0.8 ~ 16 mM 之間，發芽菌絲較長，菌絲長度為 0.8~1.1 mm/spore。*G. versiforme* 在八個濃度的硫酸鉀溶液中之發芽率皆低於 10 %，雖然菌絲最長可達 4.9 mm/spore，但發芽率太低。

不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子囊狀體個數之影響

六種叢枝菌根菌孢子在不同濃度的硫酸鉀溶液中之發芽率列於表 8，由表 8 可知，*Glomus mosseae* 孢子 in K_2SO_4 濃度為 0.16 mM 時之囊狀體個數為 0.7 個，其他 7 個濃度的 *G. mosseae* 孢子囊狀體個數皆為 0 個。*Acaulospora morrowiae* 孢子的囊狀體個數，在硫酸鉀濃度 0.16 ~ 16 mM 時為 0.3 ~ 0.9 個/spore，在硫酸鉀濃度 32 mM 時降為 0 個。*A. scrobiculata*，*Entrophospora kentinensis*，*G. occultum* 與 *G. versiforme* 四種孢子在八種濃度的硫酸鉀溶液之囊狀體個數皆為 0 個。

表 6. 不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子發芽率之影響

Table 6. Effect of different concentration of the potassium sulfate solution on spore germination rate of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	% Germination under different K_2SO_4 concentration (mM)							
	0.16	0.32	0.8	1.6	3.2	8	16	32
<i>Glomus mosseae</i>	14 a ²	0 b	1 b	3 b	4 b	1 b	0 b	0 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	28 ab	53 a	52 a	42 ab	22 ab	32 ab	20 b	16 b
<i>Acaulospora morrowiae</i>	36 bc	48 ab	54 a	46 ab	49 ab	36 bc	23 c	7 d
<i>Entrophospora kentinensis</i>	83 ab	66 ab	67 ab	90 a	61 b	70 ab	0 c	0 d
<i>Glomus occultum</i>	43 b	26 b	45 b	44 b	36 b	68 a	46 b	3 c
<i>Glomus versiforme</i>	6 a	2 ab	0 b	0 b	1 ab	1 ab	4 ab	0 b

² Means in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 7. 不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子發芽菌絲總長度之影響

Table 7. Effect of different concentration of the potassium sulfate solution on hyphal length of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	Hyphal length (mm) under different K ₂ SO ₄ concentration (mM)							
	0.16	0.32	0.8	1.6	3.2	8	16	32
<i>Glomus mosseae</i>	0.1 a ^z	0 a	0.1 a	0.2 a	0.1 a	0.1 a	0 a	0 a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	1.2 ab	2.3 a	2.2 a	1.4 ab	2.0 ab	1.4 ab	1.4 ab	0.8 b
<i>Acaulospora morrowiae</i>	1.9 bc	3.4 a	3.5 a	2.2 b	1.7 bc	1.5 bc	0.9 cd	0.2 d
<i>Entrophospora kentinensis</i>	0.4 b	0.3 bc	0.4 b	0.9 a	0.4 b	0.1 bc	0 c	0 c
<i>Glomus occultum</i>	0.4 bc	0.5 b	0.8 a	0.9 a	0.8 a	0.9 a	1.1 a	0.2 c
<i>Glomus versiforme</i>	3.0 a	0.3 a	0 a	0 a	0.3 a	0.1 a	4.9 a	0 a

^zMeans in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 8. 不同濃度的硫酸鉀溶液對叢枝菌根菌孢子囊狀體個數之影響

Table 8. Effect of different concentration of the potassium sulfate solution on vesicle formation of arbuscular mycorrhizal fungi

Species of VAM	No. vesicle under different K ₂ SO ₄ concentration (mM)							
	0.16	0.32	0.8	1.6	3.2	8	16	32
<i>Glomus mosseae</i>	0.7	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora morrowiae</i>	0.3 c	0.7 ab	0.8 a	0.9 a	0.7 ab	0.7 ab	0.4 bc	0 d
<i>Entrophospora kentinensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glomus occultum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glomus versiforme</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

^zMeans in each raw with the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

討 論

本試驗中用來進行孢子發芽試驗之六種叢枝菌根菌孢子，孢子表面皆未經殺菌處理，未經表面殺菌的孢子，其發芽情形較接近土壤中孢子之發芽。早期的孢子發芽試驗，孢子皆先經殺菌處理^(13,23,24)。Koske⁽¹⁵⁾發現，表面不經殺菌處理的孢子之發芽率，與表面經過殺菌處理的孢子之發芽率，並沒有明顯之差異。Mayo 等人⁽¹⁸⁾發現 *Glomus versiforme* 孢子發芽時，若孢子表面不經殺菌處理，則孢子發芽率比經表面殺菌處理之孢子之發芽率高，高 1.5~2.2 倍。Willson 等人⁽²⁸⁾亦發現，孢子表面經殺菌處理後，孢子發芽率降低 45%。根據前人研究結果，本試驗之菌根菌孢子乃採用不消毒方式進行發芽試驗。

在鉀-磷酸鹽溶液的發芽試驗中，*Glomus mosseae*、*Entrophospora kentinensis*、*G. versiforme* 與 *G. occultum* 這四種菌種，在磷酸根離子濃度 0.2 mM 時，其發芽率分別為 6.0%，7.5%，8.8%，28%，當磷酸根離子濃度提高為 0.4 mM (12.4 mg/kg-P) 時，這四種菌種孢子之發芽率分別提高為 82.2%，90.0%，23.3%，73.4%。Wilson 等人⁽²⁸⁾亦有類似之報導，在不殺菌的土壤中添加 60 mg/kg 的磷後，可明顯促進 *G. etunicatum* 與 *G. mosseae* 的發芽率。

由表 1 可知，當鉀-磷酸鹽溶液在磷酸根離子濃度 20 mM 時，滲透壓為 1.15 atm，在磷酸根離子濃度 40 mM 時，滲透壓為 2.07 atm。由表 2 可知，硫酸鉀濃度為 16 mM 時，滲透壓為 1.34 atm，在硫酸鉀濃度為 32 mM 時，滲透壓為 2.35 atm。當土壤溶液之滲透壓在 0.72~1.44 atm 時，對鹽敏感的作物，生長受阻礙，當土壤溶液之滲透壓在 1.44~2.88 atm 時，多數作物生長受阻礙⁽⁶⁾，菌根菌孢子之發芽與菌絲生長在高

濃度的鹽類溶液中亦可能受到阻礙。由此可知，當磷酸根離子濃度在 20 mM 以上時，菌根菌孢子在鉀-磷酸鹽溶液中發芽情形，除了受溶液離子濃度之影響外，亦應考慮滲透壓之影響。

Acaulospora morrowiae 與 *Entrophospora kentinensis* 在硫酸鉀溶液中孢子發芽與菌絲生長情形，與其在鉀-磷酸鹽溶液中類似。Hepper 的 *Glomus caledonium* 與 *G. mosseae* 孢子發芽試驗⁽¹²⁾，以及呂氏的 *Gigaspora gigantea* 孢子發芽試驗⁽³⁾皆有類似的結果，Hepper 認為菌根菌孢子在鉀-磷酸鹽溶液中發芽與生長除了受磷的影響之外，亦受鉀離子之影響⁽¹²⁾。在硫酸鉀溶液的發芽試驗中，*G. mosseae* 與 *G. versiforme* 兩種菌根菌孢子在硫酸鉀溶液八個濃度中之發芽率皆低於 20%，造成發芽率不高之原因不明尚待探討。

Acaulospora morrowiae 在磷酸根離子濃度 20 mM 仍保有 20% 的發芽率；在硫酸鉀濃度 16 mM 時也有 23% 的發芽率，由於本菌株在酸性土壤中十分普遍⁽⁴⁾，可能是因為此菌株能適應在高磷及高鹽份的土壤中之故。*A. scrobiculata* 孢子在高硫酸鉀濃度 (16, 32 mM) 下，孢子仍然可發芽，發芽率分別為 20.0% 與 15.9%，菌絲較短但依然可生長，由此可知，*A. scrobiculata* 孢子可耐較高之鉀濃度，本項事實或可說明本菌種經常可在海邊或鹽分地較高的土壤中發現之原因。

在六種菌根菌孢子的發芽試驗中，*Glomus mosseae* 孢子發芽率最高可達 85.8%，菌絲長度平均最長可達 13.0 mm/spore，而單一孢子菌絲長度最長可達 37 mm；*G. occultum* 孢子發芽率最高可達 73.4%，菌絲長度平均最長可達 12.5 mm/spore，而單一孢子菌絲長度最長可達 35 mm，由此可知，本試驗所使用之發芽條件適合這兩種菌種。*Entrophospora kentinensis* 孢子發芽率最高可達 90.0%，但菌絲長度平均最長為 0.9 mm/spore，而單一孢子菌絲長度最長為 1.8 mm，孢子發芽率很高，但菌絲長度不算長，適合菌絲生長之條件尚需進一步研究。*Acaulospora morrowiae* 孢子發芽率最高為 58.5%，菌絲長度最長為 3.7 mm/spore。根據筆者先前之調查結果⁽⁵⁾，*A. morrowiae* 孢子大部份分布在土壤 pH 值 7.0 以下，較喜歡酸性土壤，而本試驗所採用的 pH 值為 7.0，若降低溶液的 pH 值，應可再提高發芽率與菌絲生長。*G. versiforme* 孢子發芽率最高為 45.5%，菌絲長度最長為 39.3 mm/spore，根據 Daniels and Trappe⁽⁷⁾ 報導，適合 *G. versiforme* 孢子發芽的條件為 18~25°C，水份在 30% 以上，pH 值在 7.0~7.4，發芽率可達 80%。本試驗所使用之發芽條件皆符合上述條件，而發芽孢子的菌絲長度夠長，但發芽率只有 45.5%，造成發芽率偏低的原因，可能是孢子冷藏的時間過久，本菌種在 5°C 中冷藏時間長達 18 個月。在 *G. occultum* 的孢子發芽試驗中發現，*G. occultum* 菌絲不易被染色劑染色，這種特殊現象已有研究者提出(Morton, 1998, <http://invam.caf.wvu.edu>)，但原因尚不清楚。

由孢子的發芽試驗可知，*Acaulospora scrobiculata*、*A. morrowiae*、*Entrophospora kentinensis* 與 *Glomus versiforme* 在磷酸根離子濃度 4 mM (124 mg/kg-P) 以下，菌根菌孢子皆可順利發芽，菌絲正常生長。*G. mosseae* 在磷酸根離子濃度 2 mM (62 mg/kg-P) 時，發芽率不受影響，但菌絲生長開始明顯下降。*G. occultum* 對磷較敏感，在磷酸根離子濃度 0.4 mM (12.4 mg/kg-P) 時，菌根菌孢子可順利發芽，菌絲正常生長，磷酸根離子濃度 1 mM (31 mg/kg-P) 以上，則菌根菌發芽率明顯下降。叢枝菌根菌孢子在鉀-磷酸鹽溶液中發芽率與菌絲生長，雖不能與孢子在土壤中之發芽情形劃上等號，但亦可作為篩選菌根菌之參考。

引用文獻

1. 呂斯文、張喜寧。1989。蘆筍菌根之生理研究(二) 菌根染色法之比較。國立臺灣大學農學院研究報告 29:112-117。
2. 呂斯文、張簡秀容、張喜寧。1995。利用穴植盤培育番茄菌根苗及其田間生長之反應。中國園藝 41: 54-67。
3. 呂斯文。1994。囊叢枝菌根菌之無土介質接種，接種源生產及菌種篩選研究。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文。
4. 林素禎。1998。臺灣囊叢枝內生菌根菌之生態與其應用之研究。國立臺灣大學農業化學研究所博士論文。P.12-50。

5. 林素禎、洪崑煌、吳繼光。2000。囊叢枝內生菌根菌在臺灣代表性土壤中之分布。中華農業研究 49(4) : 65-80。
6. 郭魁士。1974。土壤學。中國書局印行。之宜出版社。臺灣省永和市。P.245-246。
7. Daniels, B. A., and J. M. Trappe. 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus Epigaeus*. Mycologia 72: 457-471.
8. Daniels, B. A., and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of progogules from soil. pp. 20-45. In : Methods and Principles of Mycorrhizal Research . (Schenck, N. C., ed.). The American Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota, USA.
9. Giovannetti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500.
10. Gomori, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In : Methods in Enzymology 1 (S. P. Colowick & N. O. Kaplan, eds.), pp.138-146. Academic Press, New York.
11. Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Satton, and D. N. Pegler. (Eds.) 1995. Dictionary of the Fungi. Eighth edition. p.437. University Press, Cambridge.
12. Hepper, C. M. 1983. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 80: 487-490.
13. Hepper, C. M., G. A. Smith. 1976. Observation's on the germination of *Endogone* spores. Trans. Br. Mycol. Soc. 66:189-194.
14. Kormanik, P. P. and A. C. McGraw. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. pp. 37-45. In : Methods and Principles of Mycorrhizal Research. (Schenck, N. C., ed.). The American Phytopathological Soc., St. Paul. MN.
15. Koske, R. E. 1981. *Gigaspora Gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. Mycologia 73: 288-300.
16. Koske, R. E., and B. Tessier. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. Newsletter Mycol. Soc. Amer. 34: 59.
17. Kucey, R. M. N. and E. A. Paul. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculation with *Glomus mosseae* on faba bean growth in greenhouse and field trials. Can. J. Soil Sci. 63:87-95.
18. Mayo, K., R. E. Davis., And J. Motta. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. Mycologia. 78:426-431.
19. Menge, J. A. S., N. M. Davis, and V. Minassian. 1977. Mycorrhizal fungi associated with citrus and their possible interactions with pathogens. Proc. Int. Soc. Citriculture 3:872-876.
20. Menge, J. A., D. Steirle, D. J. Bagyaraj, E. L. V. Johnson, and R. T. Leonard. 1978. Phosphorus concentration in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytol. 80:575-578.
21. Miranda, J. C. C.DE, P. J. Harris, and A. Wild. 1989. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. New Phytol. 112:405-410.
22. Miranda, J. C.C.DE., and P. J. Harris. 1994. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 128: 103-108.
23. Mosse, B. 1959. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular mycorrhiza. Trans. Brit. Mycol. Soc. 42:273-286.
24. Mosse, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J. Gen. Microbiol. 27:509-520.
25. Mosse, B. 1972. Growth of *Endogone* Mycorrhiza in Agar Medium. 93pp. Rothamsted Experimental Station. Annual Report for 1971.

26. Sanders, F. E. 1975. The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal infection of onion roots. p. 261-276. In : *Endomycorrhizae*. (Sanders, F. E., B. Moss ,and P. B. Tinker, eds.). Academic Press, London.
27. Tommerup, I. C. 1983. Spores dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81:37-45.
28. Wilson, G. W. T., B. A. Daniels Hetrick, and D. Gerschevske Kitt. 1989. Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by nonsterile soil. *Can. J. Bot.* 67:18-23.

The Influence of Phosphate on the Spore Germination and Hyphal Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi¹

Su-Chen Lin^{2,4} and Chi-Guang Wu³

Summary

This study was mainly conducted to explore the influence of phosphate on the spore germination and hyphal growth of six common arbuscular mycorrhizal fungi in Taiwan soil. The six tested mycorrhizal fungi included *Acaulospora scrobiculata*, *A. morrowiae*, *Entrophospora kentinensis*, *Glomus mosseae*, *G. occultum*, and *G. versiforme*. Among these species, the best condition for spore germination of *E. kentinensis*, and *G. mosseae* was achieved at the $[\text{PO}_4^{-3}]$ 0.4~10 mM and their ranges of germination rate were 73.3~90.0% and 71.8~85.8% respectively. As the $[\text{PO}_4^{-3}]$ increased to 20 mM, the spore germination rates of both species declined to <20%. The spore germination was completely inhibited when $[\text{PO}_4^{-3}]$ reached to 40 mM. Both *A. morrowiae* and *A. scrobiculata* showed better spore germination rate at the ranges of 44.3~58.5% and 49.7~63.8% respectively, when $[\text{PO}_4^{-3}]$ was lower than 4 mM. The highest spore germination rate of *G. versiforme* was 45.5% at $[\text{PO}_4^{-3}]$ 2 mM. *G. occultum* seemed very much sensitive to phosphorus, and could not tolerate more than $[\text{PO}_4^{-3}]$ 1 mM. The hyphal length of *E. kentinensis* was only 0.3~0.5 mm/spore at $[\text{PO}_4^{-3}]$ 0.4~10 mM. As the $[\text{PO}_4^{-3}]$ reached to 20 mM, all of the spore germination was suppressed. The germination rate of *G. mosseae* was not affected at $[\text{PO}_4^{-3}]$ 2 mM, but the length of hyphal growth decreased significantly. The hyphal growth of *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, and *G. versiforme* was significantly suppressed when $[\text{PO}_4^{-3}]$ was higher than 10 mM. Both spore germination and hyphal growth of *A. morrowiae* and *E. kentinensis* were similar as found in potassium sulfate and potassium phosphate solutions. It was inferred that not only phosphate but also potassium ion might exert certain influence to these two species.

Key words: Mycorrhiza, Phosphorus, Potassium.

1. Contribution No.2118 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 3, 2002.

2. Assistant Researcher, Department of Agricultural Chemistry, TARI., Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Formerly, Associate Researcher, Department of Agricultural Chemistry, TARI. Presently, Director, Taiwan Salt Biotech. 2nd Factory, Tainan, Taiwan, ROC.

4. Corresponding author, E-mail: linmay@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302805.