

# 應用微生物緩解番荔枝低溫逆境研究

王誌偉<sup>1\*</sup>、陳志佳<sup>2</sup>、楊雅媛<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 農業部臺東區農業改良場作物環境科助理研究員。

<sup>2</sup> 農業部臺東區農業改良場計畫約用人員。

\* cwwang@mail.tdares.gov.tw

## 摘要

番荔枝(釋迦)與鳳梨釋迦在低溫或高溫逆境下易導致果實裂果或落果，對農民造成損失。許多文獻報導叢枝菌根菌於植物抵抗逆境與維持健康上扮演重要角色。本場從臺東地區鳳梨釋迦果園土壤中篩選並獲得無柄孢子屬菌根菌(*Acaulospora* sp.) (代號TDAu01)，本篇將探討叢枝菌根菌株(TDAu01)對番荔枝(釋迦)與鳳梨釋迦於低溫逆境之緩解效果。實驗發現，接種TDAu01的植株幼苗在根系密度、枝條累計增長與葉片數量上明顯較旺盛。在溫室進行葉綠素螢光檢測發現，接種TDAu01之幼苗植株在低溫逆境下最大光合作用效率下降幅度較小，顯示TDAu01可緩解番荔枝幼苗低溫逆境。將植株定植於本場賓朗果園試驗田區後，於寒流前後進行量測，發現番荔枝(釋迦)的光合作用效率在寒流後第7天快速下降，並在第14天時，AMF回升較對照組多。鳳梨釋迦於寒流後光合作用效率下降幅度較番荔枝(釋迦)小，推測與鳳梨釋迦父母本之一為溫帶性果樹-冷子番荔枝有關。定植於田間接種TDAu01試驗植株根部菌根菌感染率與根圈土壤孢子含量皆顯著高於未接种植株，但於試驗田間接種TDAu01於低溫時對光合作用效率下降雖稍有緩解但統計上卻無顯著差異，在電子傳遞率上番荔枝AMF組回升顯著高於對照組。未來我們將搭配施用其他微生物菌株進行番荔枝(釋迦)與鳳梨釋迦緩解溫度逆境之研究。

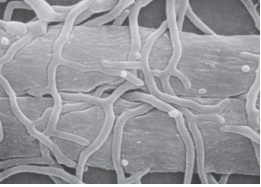
**關鍵字：**叢枝菌根菌、番荔枝(釋迦)、鳳梨釋迦、低溫逆境

## 前言

植物在生長過程中經常受到各種環境逆境影響，包括生物與非生物逆境。其中，極端氣候已成為限制全球作物生長和生產力的非生物逆境之一，同時也是造成農業損失的主要原因之一 (Meena *et al.*, 2018)。近期研究顯示出，極端氣候的強度、頻率 and 持續時間在過去幾年中一直在變化，特別是在溫度上

(Ummenhofer & Meehl, 2017)。

為抵抗極端溫度，科學家利用各種生物防治技術如共生菌、基因和賀爾蒙等，其中一項便是叢枝菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)。AMF為一種生長於植物根系之共生真菌，最早由德國植物學家 Albert Bernhard Frank發現其共生結構，並稱為菌根(mycorrhiza) (Koide & Mosse, 2004; Wang *et al.*, 2017)。後續各國學者也相繼投入研



究，臺灣則於民國 60 年代中旬陸續開始進行相關研究，至今約有 40 年研究歷史(張，2016)。先前的研究中指出接種AMF可增強根部土壤結構並調節不同養分的吸收，以促進宿主植物的生長(Kumar *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014)。在面對低溫逆境上，AMF 已被證明可改善宿主植物的生長並改變逆境下的形態和生理反應，促進作物生長和增加產量(Kumar *et al.*, 2015; Ahanger *et al.*, 2014)。此外，接種AMF可改善宿主植物的土壤條件，來提高光合作用能力，使其面對非生物逆境時具有較高的緩解能力(Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023)。

光合作用是植物獲取養分和能量代謝的關鍵過程之一，對環境逆境具有敏銳且直接的反應，可分為光反應和暗反應。光反應中，水被轉化為氧氣並產生ATP；暗反應則是將ATP用於把二氧化碳轉化為醣類。光合作用效率的一個重要指標是  $\Delta F/F_m'$ ，這是葉綠素光系統II (photosystem II, PSII)在光線照射下的實際光化學效率。而電子傳遞速率 (electron transport rate, ETR) 由  $\Delta F/F_m'$  乘以吸收的光能(光強度  $\times$  吸收率)計算得出，表示PSII吸收光能後，經電子傳遞鏈輸出的電子流量(Krall & Edwards 1992; Maxwell & Johnson 2000)。ETR可以直接推估葉片在光照下的即時光合速率。當陽光被PSII中的吸光團P680吸收時，啟動一連串的電子傳遞鏈，放氧複合體 (oxygen-evolving complex, OEC) 丟出一個電子以提升自身的氧化力，進而將水分解成氧氣。OEC分解水產生的質子會在膜內累積，形成膜內外的濃度差，驅動ATP合成酶製造ATP (Krall & Edwards 1992; Wong *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2023)。

類囊體膜中的PSII是光合作用中對溫度逆境最敏感的部位，容易受到溫度逆境的損害，會導致光合作用效率降低。 $F_v/F_m$  (黑

暗狀態下，PSII光學反應最大螢光值) 的比值是一個重要參數，用於描述光合作用胞器的生理狀況，通過葉綠素螢光(chlorophyll fluorescence) 的釋放量估算，可表示光合作用活性的高低。當逆境發生時，PSII電子的傳導受影響，進而降低 $F_v/F_m$ 的比值。因此在生理研究中， $\Delta F_v/F_m'$  常被用作描述逆境發生的指標。在低溫逆境下，植物的最大螢光參數( $F_v/F_m$ )和有效螢光參數( $\Delta F_v/F_m'$ )明顯下降，非光化學淬熄係數(non-photochemical quenching coefficient,  $q_N$ )則明顯上升。葉綠素螢光測定還可以測量光曲線(light curve)，光曲線不僅可以評估短期的 PSII 的光化學效率，也可以在大範圍光照強度下評估其潛在光化學效率。相較於傳統的光曲線 (photosynthesis-irradiance curve, P-I curve)，快速光曲線(rapid light curve, RLC)更能有效的測量出有效量子產率(effective quantum yield,  $\Phi_{PSII}$ )。因在野外光的波動很快，RLC可以評估葉子對光波動的光化學效率，且立即反應出光的短期歷程，可由 PAR 和 ETR的關係畫出(Schreiber *et al.*, 1995; White & Critchley, 1999; Ralph & Gademann, 2005)。

近年來隨著人工授粉技術的進步，番荔枝(釋迦)成為一年兩穫的農作物。然而冬期果正值寒流頻繁季節，每當冷氣團隨著東北季風南下且果實遭遇 $10^\circ\text{C}$ 以下低溫時，鱗溝處的細胞就可能受到損傷，引發裂果或落果等現象。裂果後會因為賣相不佳、不易保存等問題，使商品價值下跌，造成農民損失(江與盧，2014)。鳳梨釋迦產期調節於11至12月中旬者，遇高溫則易產生落果現象。本場從臺東地區鳳梨釋迦果園土壤中篩選獲得無柄孢子屬菌根菌 (*Acaulospora* sp.)，以百喜草進行菌根菌孢子培養。本研究的主要目的為探討叢枝菌根菌對番荔枝與鳳梨釋迦遭遇溫度逆境之緩解能力。

## 材料方法

### (一) 試驗田區規劃

本研究以番荔枝 (*Annona squamosa*) 和鳳梨釋迦 (*A. squamosa* × *A. cherimola* 或 *A. cherimola* × *A. squamosa*) 為試驗材料。使用之菌根菌孢子為無柄包屬菌根菌 (*Acaulospora* sp.)，代號TDAu01。試驗植株育苗並接種TDAu01後於2020年定植於臺東區農業改良場賓朗果園，種植第2年後於植株周邊種植含TDAu01(以下文章以AMF代稱)之百喜草植株以增加菌根菌感染率。截至2024年為止，試驗植株平均高度約為1.6m。試驗處理分別為A.番荔枝接種AMF、B.番荔枝未接種、C.鳳梨釋迦接種AMF與D.鳳梨釋迦未接種。每試驗處理種植10棵植株，取樣4棵生長勢較為接近之植株(4重複)進行果樹根系菌根菌感染率、根系土壤中菌根菌孢子含量或植株葉片葉綠素螢光等調查。

### (二) 菌根菌孢子懸浮液接種與繼代

在盆栽底部墊上濾紙作為土壤保存，然後將砂土填充至八分滿。取出另外一張濾紙折成漏斗狀後，置於砂土上再放入釋迦幼苗。將菌根菌孢子懸浮液沿著根部倒入，每株幼苗皆放入50顆孢子。將濾紙抽離後以砂土填充至滿，而後放置於溫室下進行正常照料(接種期間水份不宜過多、也不宜施肥過當)。

### (三) 土壤之濕篩及糖液梯度法

該方法由農試所提供之。將100 g土壤移至燒杯中並使用高壓水柱沖洗，靜置20 sec後將上層液體倒入3層篩網中，由孔目大至小、上至下進行排列(250  $\mu$ m、150  $\mu$ m、63  $\mu$ m)，重複上述步驟3次。後續將三層篩網上的殘留物分別以水柱沖洗進離心管中，清洗3

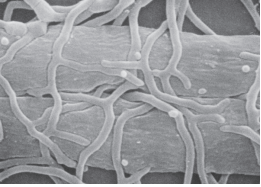
次以確保殘留物妥善清洗下來。將離心管以2000rpm在室溫下離心3 min後，順著斜面倒除上清液。而後加入40%白砂糖水溶液至離心管7分滿，並再次離心3000rpm 2 min。將砂糖上層溶液倒入63  $\mu$ m篩網內，以水柱清洗篩網內物質，並洗入50 ml離心管中，該動作重複3次。於解剖顯微鏡下觀察構造並計算孢子數。

### (四) 菌根之染色

將植物根部以清水進行清洗，取中間段並裁切成1.5 cm大小，放置於鋪有紗窗網的包埋盒中(50根/盒)。將數個包埋盒放置燒杯中，並倒入10%KOH使其淹過所有包埋盒。將燒杯放置於加熱台上以90 °C加熱3-10 min，中途可將根部撈出確認其軟化程度，而後將10% KOH去除並以清水沖洗3次。將包埋盒浸泡於3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中，放置於常溫下3分鐘(視漂白情況做調整)。倒去3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>後，根部以10% HCl潤洗，並將根部浸泡於10% HCl，放置於常溫下12 hr以上。

### (五) 葉綠素螢光之測定

葉綠素螢光之測定使用攜帶式葉綠素螢光分析儀(MINI-PAM-II Photosynthesis Yield Analyzer, WALZ)，待測葉片以鋁製葉片夾遮蓋進行暗適應(dark-adapted) 30 min後進行測量。使用機型為藍光版本，擁有最大發射波長約為475 nm的藍色LED，可藉由特殊光纖(Special Fiberoptic 2010-F)提供測定光及飽和脈衝光。儀器先檢測暗適應後之F0最低螢光值(minimum fluorescence)，再給予飽和脈衝光得到Fm最高螢光值(maximum fluorescence)，並且會自動換算出葉綠素螢光值Fv/Fm，計算方式為(Fm-F0)/Fm，此即PSII在暗適應後最高螢光效能(maximum quantum yield)。此數值可作為PSII是否受到



傷害的評估方式。除此之外亦計算實際PSII之光合效率(relative decline ration of Fv/Fm)，公式為  $\Delta F / F_m' = (F_v / F_m') / (F_v / F_m)$ 。由上述的螢光測值還可以得到兩種螢光參數，光化學淬滅(photochemical quenching, qP)與非光化學淬滅(non-photochemical quenching, qN or NPQ)，其公式為  $qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_0)$  與  $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$ 。實測快速光曲線(rapid light curve)用 MINI-PAM-II設定十個逐漸增強的光，每個強度維持 10 sec，並測量每個光強度的 Yield (Y)值，再經過公式計算ETR (relative electron transport rate)。

#### (六) 統計分析

將試驗之結果以 Excel內建函數計算平均值，並以學生 t 檢定分析進行最小顯著性差異檢定 (least significant difference test, LSD)，比較處理間之差異顯著性，其值是基於4株植物的平均值±SD。

### 結果與討論

#### (一) 叢枝菌根菌接種處理與番荔枝幼苗生長觀察

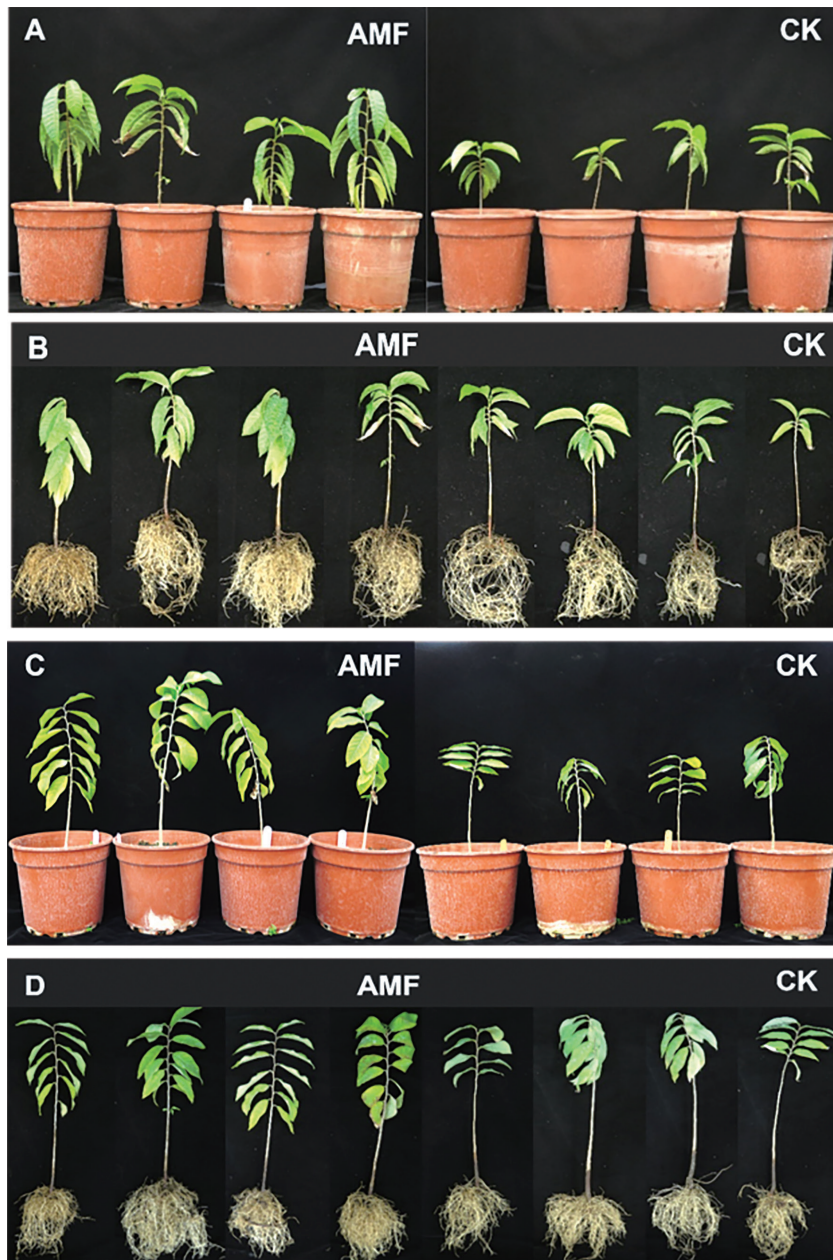
將土壤分離AMF孢子採集與定量後，進行孢子懸浮液接種幼苗試驗。待番荔枝臺東2號與鳳梨釋迦幼苗的2片子葉完全展開後，每株幼苗以100顆AMF孢子進行濾紙接種法。待接種後一年，進行苗木型態差異觀察並拍照。接種AMF孢子的番荔枝與鳳梨釋迦相較於未接種者(CK) 植株高度無顯著差異；接種AMF孢子的鳳梨釋迦葉片數量顯著多於CK組，番荔枝則沒有明顯差異；根系發育上，接種AMF孢子的番荔枝相較於CK組根系明顯較旺盛。番荔枝植株、根系照片如圖一、A和B；鳳梨釋迦植株、根系照片如圖一、C和D (n=4)。

#### (二) 於溫室進行番荔枝菌根菌苗木低溫處理後，PSII最大光潛能與PSII實際光效能試驗

番荔枝與鳳梨釋迦試驗幼苗經4°C 低溫處理8hrs後，光合作用效率如圖二所示。在經過低溫逆境後，番荔枝與鳳梨釋迦PSII最大光潛能在處理後1天內顯著受到影響，番荔枝的CK與AMF分別下降了30.4% 與15.3%；鳳梨釋迦同樣是CK組較AMF組受低溫影響較大，其PSII最大光潛能下降了25.7% 與12.3%。在處理後7天其PSII最大光潛能便回升至與處理前相同程度(圖二A, B)。PSII實際效能的檢測結果如圖二C和D，4°C 低溫處理8hr之低溫逆境未對番荔枝與鳳梨釋迦植株外觀造成顯著影響。

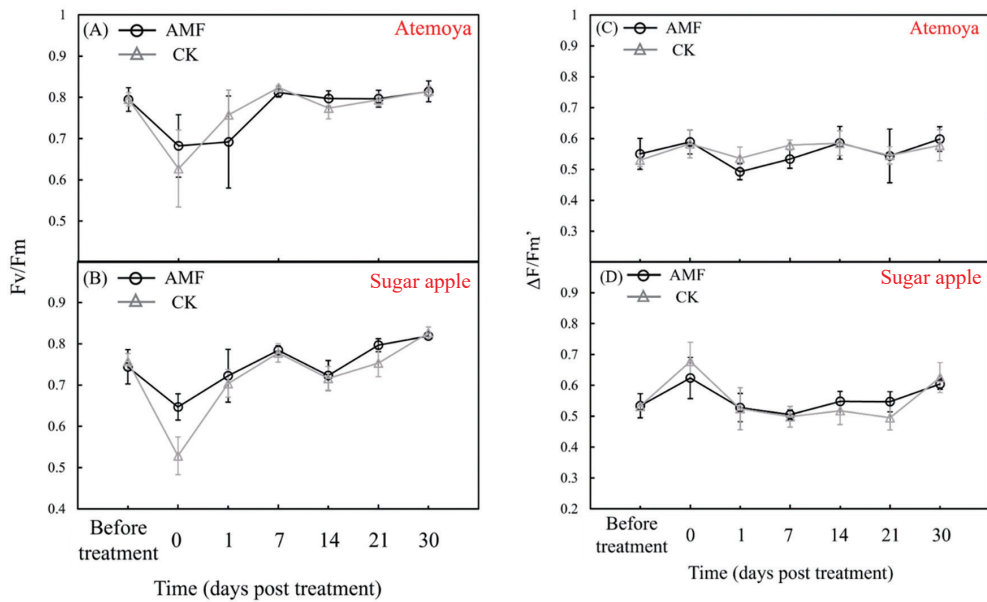
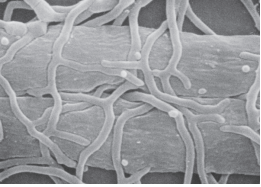
#### (三) 溫室番荔枝幼苗對於低溫處理後光合作用檢測。

在自然光照下，用MINI PAM II照射相同光強度並維持10sec，測量溫室內番荔枝與鳳梨釋迦植株的電子傳遞速率(ETR)、光化學淬熄係數(Qp) 與非光化學淬熄係數(NPQ)。經過低溫逆境後，大目釋迦CK與AMF組之ETR在逆境後一天皆略有下調，但整體並沒有顯著性差異；鳳梨釋迦的CK與AMF組在低溫逆境後，ETR皆不受到影響(圖三A)。光化學消散(photochemical quenching):天線系統吸收光能後將能量傳給反應中心，反應中心釋出電子經電子傳遞鏈產生ATP及NADPH以進行卡氏循環(Demmig-Adams *et al.*, 1996; Taiz & Zeiger, 2002)。在Qp的檢測上，番荔枝在低溫處理後，Qp值快速下降40%，但CK組與AMF組兩者並沒有顯著差異；鳳梨釋迦則是在低溫逆境1天後上升27%。可能與鳳梨釋迦其父母本之一方為溫帶性果樹冷子番荔枝(cherimoya) 有關，遺傳了部分基因使鳳梨釋迦相較於番荔枝對低溫較不敏感。



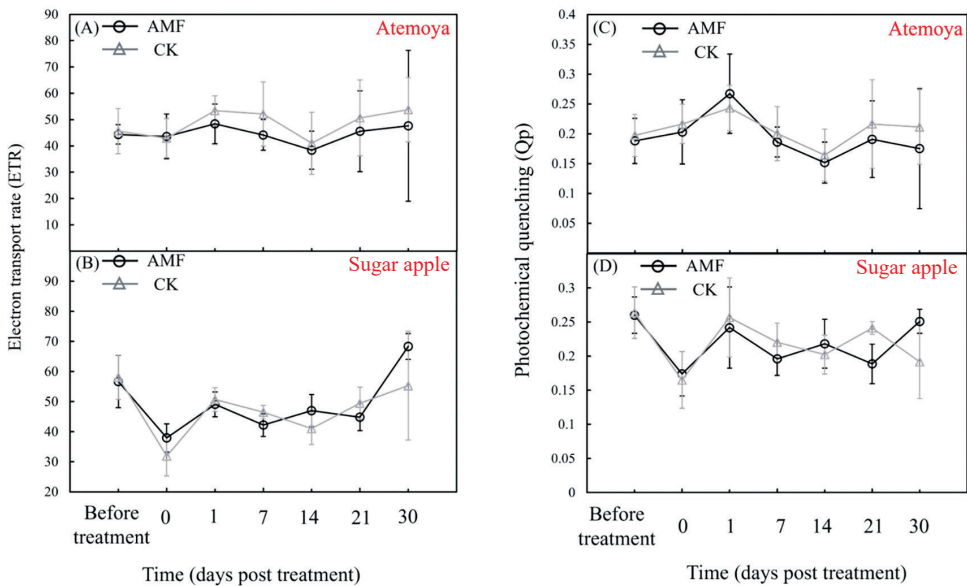
圖一、番荔枝和鳳梨釋迦幼苗接種與未接種(對照組)菌根菌生長差異。

Fig 1. Growth differences between sugar apple(A、B) and atemoya (C、D) with or without inoculation of AMF. There were no difference in plant height between atemoya and sugar apple seedlings inoculated with or without AMF spores. Regarding leaf number, the atemoya seedlings inoculated with AMF spores showed a significant increase compared to non-inoculated (CK) group, while sugar apple seedlings did not show significant differences. In terms of root development, sugar apple seedlings inoculated with AMF spores exhibited significantly more vigorous root growth compared to the CK group, while atemoya seedlings did not show significant differences. Photographs of sugar apple plants and roots are shown in (A) and (B); photographs of the atemoya plants and roots are shown in (C) and (D) (n=4).



圖二、溫室番荔枝苗木在低溫逆境下的最大與實際光合作用之測量。

Fig 2. The investigation of chlorophyll fluorescence parameters of AMF-inoculated atemoya and sugar apple after cold treatment (incubated at 4°C for 8 hour), including of PSII photochemistry after cold treatment that maximum quantum yield (Fv/Fm) (Fig.2 A-B) and actual quantum yield ( $\Delta F/Fm'$ ) (Fig.2 C-D).



圖三、接種叢枝菌根菌的溫室番荔枝苗木在低溫逆境下之電子傳遞速率與光化學淬熄係數。

Fig 3. Investigation of chlorophyll fluorescence parameters of AMF-inoculated atemoya and sugar apple in greenhouse, including electron transport rate (ETR) (A), photochemical quenching (Qp) (B) and non-photochemical quenching (NPQ) (C), after chilling treatment.

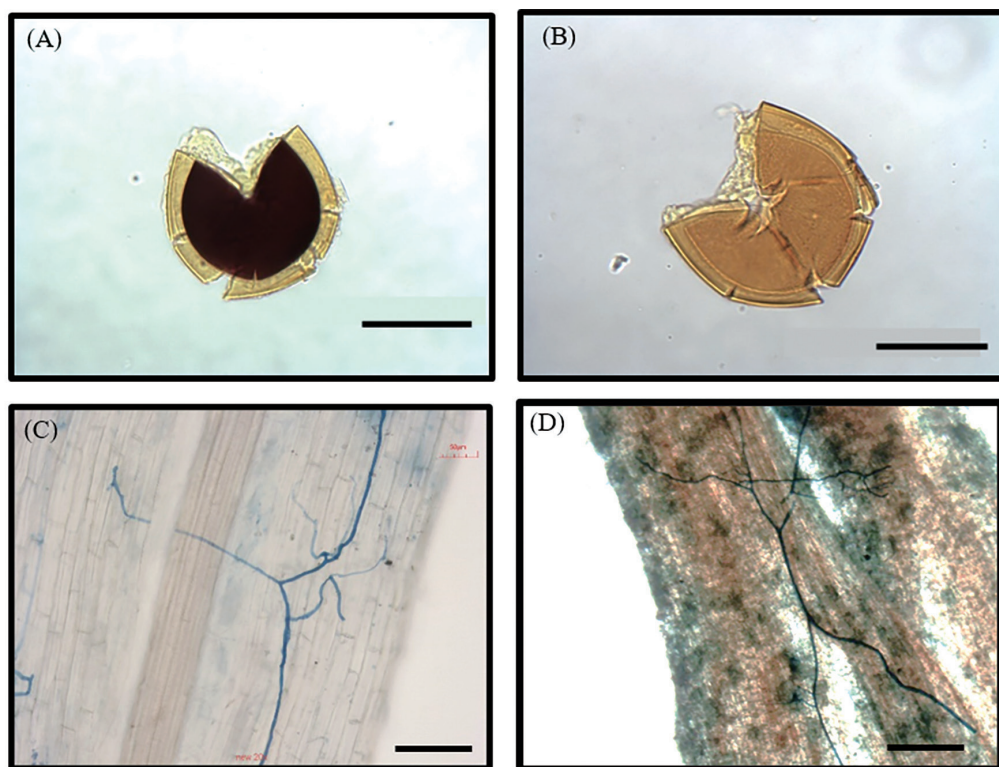
#### (四) 試驗田區接種AMF植株根部染色與根圍土壤AMF孢子型態觀察

為追蹤賓朗果園試驗區番荔枝和鳳梨釋迦試驗植株菌根菌感染情形與AMF種類。於定植後1年與3年時，挑選各試驗處理組4株植株，並將土壤和根部帶回實驗室進行清洗和過篩。孢子懸浮液則是利用濕篩和糖液梯度法收集至離心管中。隨後，利用解剖顯微鏡觀察和紀錄AMF孢子型態(圖四A、B)。根部

清洗後，選取中段根部，切成多段1.5 cm大小後，使用Aniline blue進行染色。染色後的菌根以5段一組壓製成玻片，並在顯微鏡下觀察其結構(圖四C、D)。

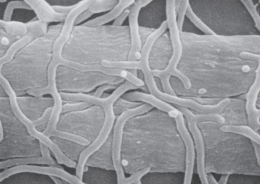
#### (五) 試驗區番荔枝與鳳梨釋迦根部菌根菌感染率調查

將試驗區番荔枝和鳳梨釋迦根部染色、壓製成玻片後，整理成4組並標記編號，分別為番荔枝CK、番荔枝AMF、鳳梨CK和鳳



圖四、賓朗果園試驗區接種菌根菌植株根圍分離之AMF孢子型態。

Fig 4. In 2020, seedlings of *Annona squamosa* and *Annona atemoya* were planted in the TTDARES orchard in Binlang. Additionally, *Paspalum notatum* infected with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and soil containing spores were planted around the seedlings. Subsequently, after two and four years of growth, the samples of soil and root were collected from four selected seedlings for each treatment and brought back to the laboratory for cleaning and sieving. The spores of soil were used wet sieving and sucrose gradient methods to suspended and collected into centrifuge tubes, and then observed and recorded under a dissecting microscope (Fig 4A and B). The roots were cleaned, and middle segments were selected and cut into multiple sections of 1.5 cm each. The roots were stained with Aniline Blue and pressed into slides in groups of five, then observed under an electron microscope to examine their structure (Fig 4C and D). Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .



梨AMF。在顯微鏡下發現到菌根構造即紀錄為感染，最後以感染根段數除以總根段數來計算感染率，種植後2年的感染率結果如表1；4年的感染率結果如圖五A和表2所示。使用移液管取1ml孢子液並在解剖顯微鏡下以針頭前端撥動並計數菌根菌土壤孢子(圖五B)。實驗結果之平均數使用Microsoft Excel 2021計算，統計分析使用t檢驗(Student's t-test)或Fisher的最小顯著差異性測驗(Fisher's protected least significant difference test, LSD test)，實驗結果以平均值±標準誤差(mean ± SD)表示， $p < 0.05$ 為具有顯著性差異。

表一、種植2年後果園鳳梨釋迦苗木菌根菌感染率調查

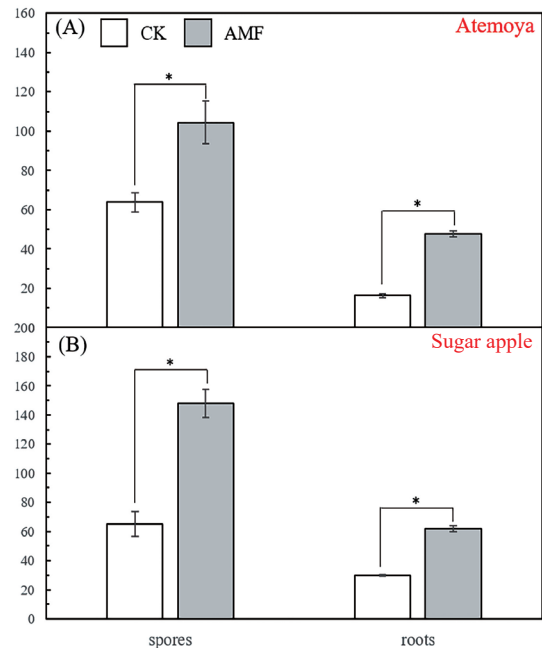
Table 1. Investigation of mycorrhizal fungi infection rates in *atemoya* seedlings in the orchard after 2 years of cultivation

Treatment	Colonization rate (%)
CK	26.6 ± 6.1
AMF	73.3 ± 12.2*

表二、種植4年後果園番荔枝苗木菌根菌感染率調查

Table 1. Investigation of mycorrhizal fungi infection rates in *Annona* seedlings in the orchard after 4 years of cultivation

	Treatment	Colonization rate (%)
Atemoya	CK	16.3 ± 1.1
	AMF	47.7 ± 1.6*
Sugar apple	CK	29.8 ± 0.7
	AMF	62.0 ± 2.0*



圖五、試驗田區番荔枝與鳳梨釋迦接種AMF與否植株菌根菌感染率與土壤AMF孢子數調查結果。

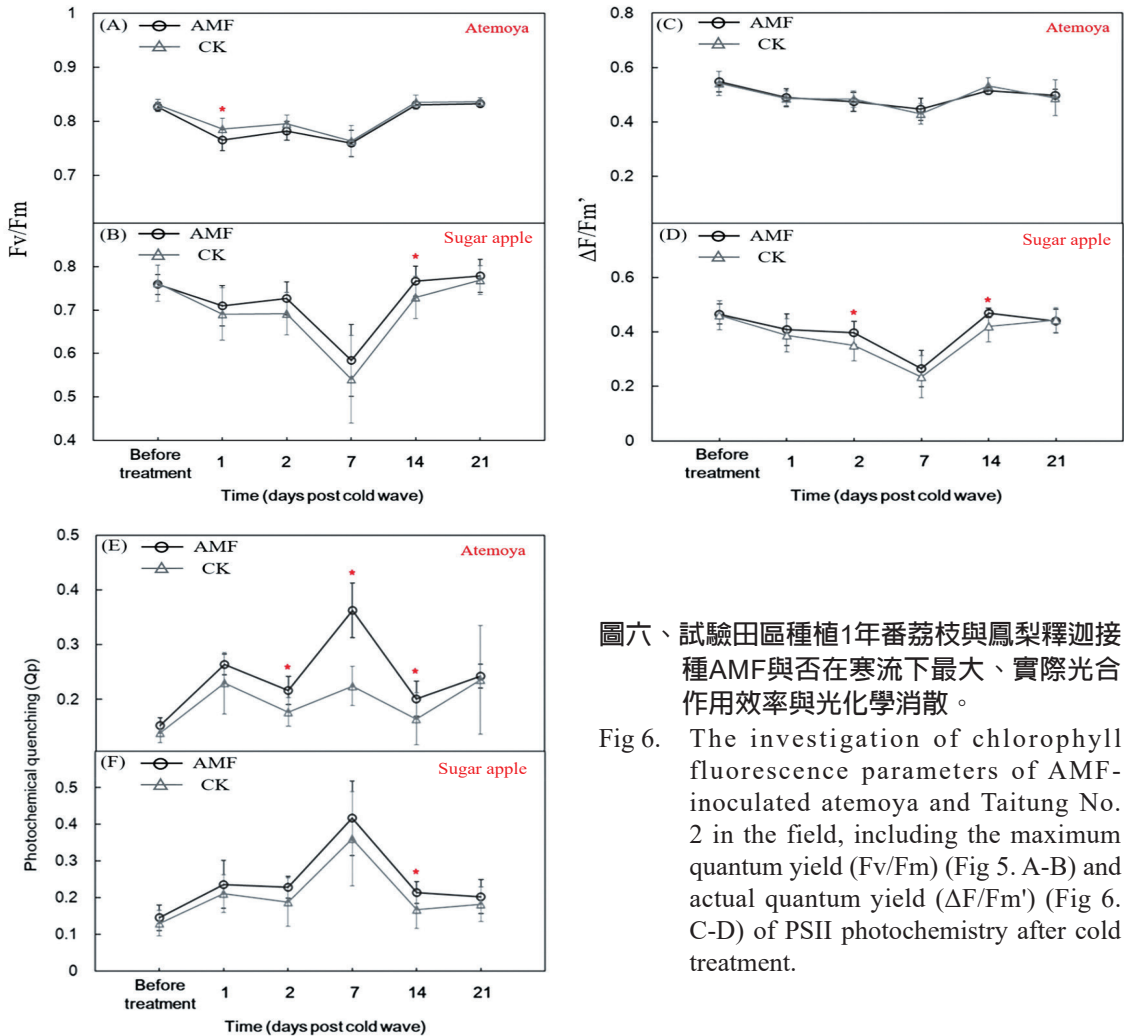
Fig 5. When the sugar apple and atemoya roots were stained by Aniline Blue, then mounted onto slides. They were organized into four groups labeled as atemoya CK, atemoya AMF, sugar apple CK, and Annona AMF. The slides were under the electron microscope observed, and the mycorrhizal structures were recorded as infections. The infection rate was calculated by dividing the number of infected root segments by the total number of root segments, recorded two years post-planting in Table 1 and four years in Fig 5A and Table 2. Using a micropipette, 1 ml of spore suspension was transferred and spores of mycorrhizal fungi in soil were counted under a dissecting microscope (Fig 5B). Investigation results of AMF symbiosis rate and soil spore number of Annona in orchards. The results average values based on the means ± SD. Indicated a significant difference using PASW Statistics 18 analysis by conducting Fisher's protected least significant difference test (LSD test) ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ). Mean comparisons were calculated using Microsoft Excel 2021.



(六) 試驗田區植株經寒流低溫逆境前後最大與實際光合作用效率 (Fv/Fm) 測量

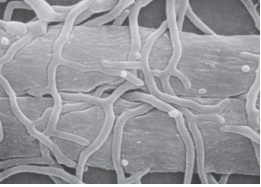
在賓朗果園中種植1年和3年的大目釋迦和鳳梨釋迦的光合作用效率如圖六所示。臺東在種植兩年時經歷了一次低溫寒流。大目釋迦的Fv/Fm在寒流的第7天快速下降，並在第14天回升。與CK相比下，AMF的回升較高且具有顯著的統計學差異。ΔF/Fm'在第2天和第14天時，AMF組別表現出顯著差異。這些結果顯示，處理了菌根菌的大目釋迦在低溫逆境下具有較好的恢復能力。在鳳梨釋迦方面，其Fv/Fm在低溫影響下的第一天，

AMF組別相比CK組別下降較多，但ΔF/Fm'沒有受到顯著影響(圖六A-B)。在種植4年時同樣經歷了一次低溫寒流，並再次檢測大目釋迦與鳳梨釋迦的光合作用效率。大目釋迦在經過低溫逆境後，其光合作用效率顯著受到影響，下降了55.6%與57.5%，後續經過1個月的恢復後也僅回升了8.5%與14.8%；鳳梨釋迦則是受到輕微影響，在經過低溫逆境後，其光合作用效率下降了59.7%與71.9%，後續經歷一個月的恢復後，鳳梨釋迦CK上升了10.3%，但鳳梨釋迦AMF下降3.4% (圖六C-D)。



圖六、試驗田區種植1年番荔枝與鳳梨釋迦接種AMF與否在寒流下最大、實際光合作用效率與光化學消散。

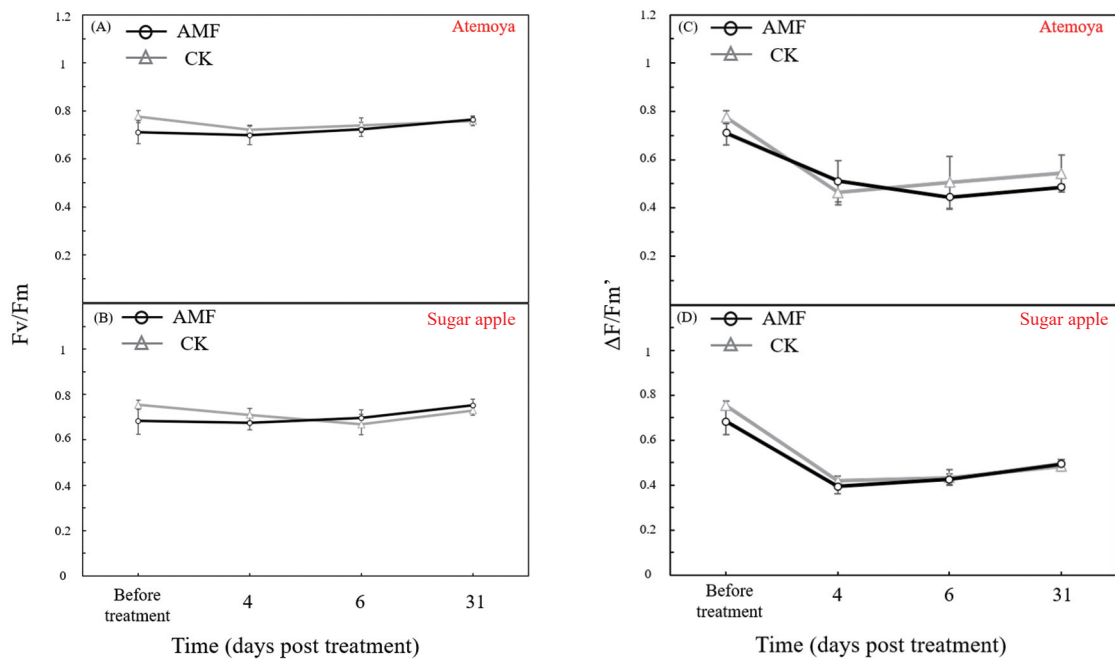
Fig 6. The investigation of chlorophyll fluorescence parameters of AMF-inoculated atemoya and Taitung No. 2 in the field, including the maximum quantum yield (Fv/Fm) (Fig 5. A-B) and actual quantum yield (ΔF/Fm') (Fig 6. C-D) of PSII photochemistry after cold treatment.



(七) 田間番荔枝苗木在低溫逆境下之電子傳遞速率

在自然光照下，用MINI PAM II內設十個逐漸增強的光，每個光強度皆維持10秒，測量大目釋迦與鳳梨釋迦植株的電子傳遞速率(ETR)，其 ETRs 隨著光強度 (PAR)變化趨勢，如圖七所示。當光強度增高時，則光合速率隨而增高。然而達某一限度時趨於極限，此時若光強度持續增高，光合速率則會開始下降，該點光強度稱為光的飽和點(light

saturation point)或稱最適光強度(optimum light intensity)，該狀態下的光合作用速率稱為最大光合速率 (Peter *et. al.*, 2005)。因此由結果可知，AMF能夠提供大目釋迦在低溫下有較高的抵抗能力，使其ETR下降幅度較小(圖七A-B)；鳳梨釋迦上，CK與AMF皆不受低溫的影響，其ETR都有上升的趨勢，這可能是因為其父母代其中一方為溫帶性植物，遺傳部分基因有著提供鳳梨釋迦抵抗低溫的能力(圖七C-D)。



圖七、試驗田區種植3年番荔枝與鳳梨釋迦接種AMF與否在寒流下最大、實際光合作用效率。  
Fig 7. The investigation of chlorophyll fluorescence parameters of AMF-inoculated atemoya and sugar apple in the field, including the maximum quantum yield (Fv/Fm) (Fig 5. A-B) and actual quantum yield (ΔF/Fm') (Fig 6. C-D) of PSII photochemistry after cold treatment.

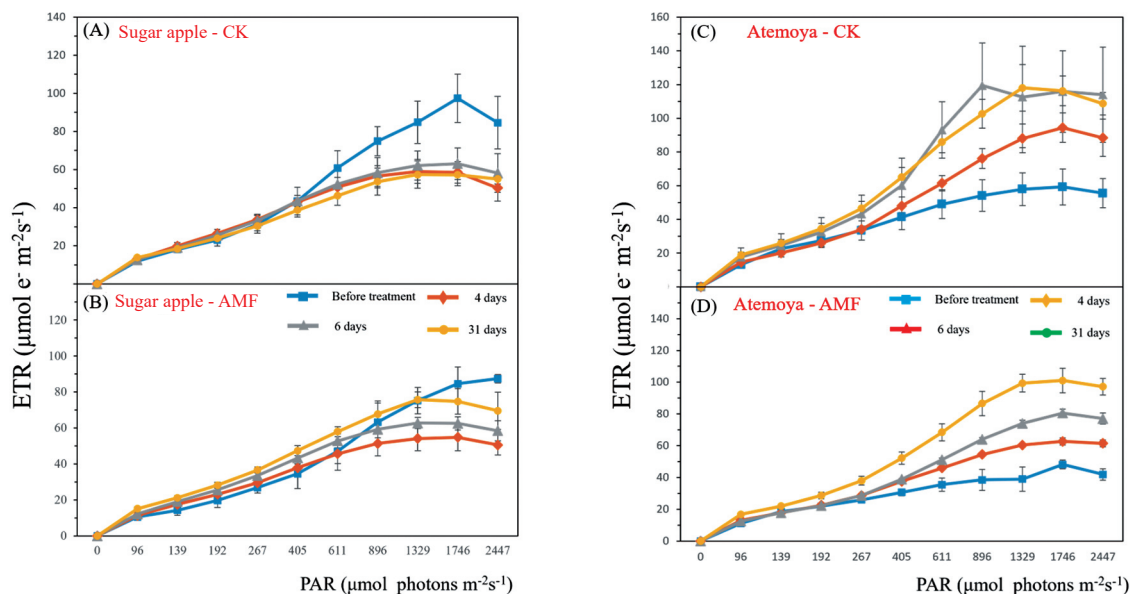
(八) 田間種植比較接種AMF之大目與鳳梨釋迦在低溫逆境下的光化學消散(Qp)差異。

光化學消散(photochemical quenching): 天線系統吸收光能後將能量傳給反應中心，

反應中心釋出電子經電子傳遞鏈產生ATP及NADPH以進行卡氏循環 (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Taiz & Zeiger, 2002)。在2年時，低溫逆境7天後造成鳳梨釋迦AMF組的Qp高度上升，跟CK組相比具有顯著性差異(P<0.05)

(圖八A)；1年的番荔枝CK跟AMF組歷經低溫逆境後的光化學消散都高度上升，在統計上沒有顯著性差異(圖八B)。當成長至3年時，寒流造成的低溫逆境使鳳梨釋迦CK與AMF組都在低溫逆境後4天檢測到光化學消散的緩慢

降低，其下降程度較番荔枝緩和(圖八C)；大目釋迦則是AMF組之光化學消散在4天後高度下降至22.2%，CK組也同樣降低至低點，歷經一個月的恢復期也沒法使其拉高(圖八D)。



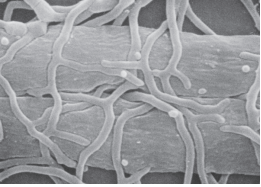
圖八、試驗田區種植3年番荔枝與鳳梨釋迦接種AMF與否在寒流下電子傳遞速率檢測。

Fig 8. The electron transfer rate of *Annona* inoculation AMF defense cold stress. Investigation of electron transport rate (ETR) of AMF-inoculated atemoya and sugar apple in greenhouse and orchard after cold stress. The ETR result of sugar apple that CK and AMF groups are shown in Fig.8 A and B; the ETR result of atemoya that CK and AMF groups are shown in Fig.8 C and D. The results indicated a significant difference using PASW Statistics 18 analysis by conducting Fisher's protected least significant difference test (LSD test) via ANOVA, and letters (a, b, c) indicated significant differences ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

## 結 論

本研究證實接種叢枝菌根菌對番荔枝(釋迦)和鳳梨釋迦在根系、葉片生長與光合作用效率等具有正面影響，菌根菌之接種於番荔枝(釋迦)和鳳梨釋迦幼苗期，能夠顯著提升植物的抗寒能力。定植於試驗田區的植株於1-3年後遭逢寒流前後進行葉綠色螢光光合作用

用效率各項參數檢測，接種菌根菌之番荔枝植株能夠一定程度上緩解低溫對光合作用造成的損害，例如光化學消散在寒流後7天時，接種菌根菌之植株顯著高於未接種者，這個結果顯示出根菌可使鳳梨釋迦很大程度消散過多能量以減少植物葉片受到損傷。叢枝菌根菌應可增加番荔枝(釋迦)和鳳梨釋迦對低溫逆境之緩解能力，但能否減少低溫造成番

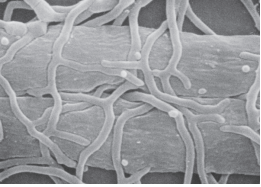


荔枝(釋迦)的裂果，或高溫造成的鳳梨釋迦落果則需要進一步的實驗觀察。未來我們將於賓朗果園試驗田，於現有已定植接種菌根菌與否之試驗植株，搭配施用其他微生物菌株如地衣芽孢桿菌等進行番荔枝(釋迦)與鳳梨釋迦緩解溫度逆境之研究。

### 參考文獻

1. 江淑雯、盧柏松。2014。番荔枝(釋迦)防範低溫裂果栽培技術。農政與農情，農業科技快訊，259期，P97-99。
2. Ahanger, M. A., Tyagi, S. R., Wani, M. R., Ahmad, P. 2014. Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*, vol.1, eds. Ahmad P., and Wani MR. pp. 25-55. New York, NY: Springer, 10.1007/978-1-4614-8591-9\_2
3. Edwards, G. E., Krall, J. P. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Physiol. Plant.* 86(1), 180-187.
4. Koide, R. T., Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14(3), 145-163.
5. Krall, J. P., Edwards, G. E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Plant Physiol.* 86, 180-187.
6. Kumar, A., Sharma, S., Mishra, S., Dames, J. F. 2013. Arbuscular mycorrhizal inoculation improves growth and antioxidative response of *Jatropha curcas* (L.) under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salt stress. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 149(2), 260-269.
7. Kumar, A., Meena, R. S., Nirmal, D. E., Gurjar, D. S., Singh, A., Yadav, G. S., Pradhan, G. 2020. Response of polymers and biofertilizers on soybean (*Glycine max*) yield under rainfed condition. *Indian J. Agric. Sci.* 90, 767-770.
8. Li, Z., Wu, N., Meng, S., Wu, F., Liu, T. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhance the tolerance of *Euonymus maackii* Rupr. at a moderate level of salinity. *PLoS ONE* 15(4), e0231497.
9. Liu, Y., Lu, J., Cui, L., Tang, Z., Ci, D., Zou, X., Zhang, X., Yu, X., Wang, Y., Si, T. 2023. The multifaceted roles of Arbuscular mycorrhizal fungi in peanut responses to salt, drought, and cold stress. *BMC Plant Biol.* 23(1), 36.
10. Liu, X., Xie, M., Hashem, A., Abd-Allah, E., Wu, Q. 2023. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia synergistically promote root colonization, plant growth, and nitrogen acquisition. *Plant Growth Regul.* 100, 691-701.
11. Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.
12. Meena, Y. K., Khurana, D. S., Nirmaljit Kaur, Kulbir Singh. 2018. Towards enhanced low temperature stress tolerance in tomato: an approach. *J. Environ. Biol.* 39 (4), 529-535.
13. Ralph, P. J., Gademann, R. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* 82(3), 222-237.
14. Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1995.

- Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo Photosynthesis. In *Ecophysiology of Photosynthesis*, eds. E. D. Schulze, and M. M. Caldwell, pp. 49-70 Springer-Verlag.
15. White, A. J., Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosyn. Res.* 59, 63-72.
16. Wong, S. H., Chen, C. W., Huang, H. W., Weng, J. H. 2012. Using combined measurements for comparison of light induction of stomatal conductance, electron transport rate and CO<sub>2</sub> fixation in woody and fern species adapted to different light regimes. *Tree Physiol.* 32, 535-544.
17. Wang, S., Auge, R. M., Toler, H. D. 2017. Arbuscular mycorrhiza formation and its function under elevated atmospheric O<sub>3</sub>: A meta-analysis. *Environ. Pollu.* 226, 104-117.
18. Ummenhofer, Caroline C., Meehl, Gerald A. 2017. Extreme weather and climate events with ecological relevance: a review. *Phil. Trans. R. Soc. B*37220160135.
19. Zhang, F., Wang, P., Zou, Y. N., Wu, Q. S., Ku, Ća K. 2019. Effects of mycorrhizal fungi on root-hair growth and hormone levels of taproot and lateral roots in trifoliolate orange under drought stress. *Arch. Agron. Soil Sci.* 65(9), 1316-1330.
20. Zhu, X. Q., Wang, C. Y., Chen, H., Tang, M. 2014. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, carbon content, and calorific value of black locust seedlings. *Photosynthetica* 52(2), 247-252.



# Application of Microbe for Increasing Low Temperature Stress Tolerance for Sugar Apple and Atemoya

Chih-Wei Wang<sup>1\*</sup>, Chi-Jia Chen<sup>2</sup> and Ya-Yuan Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Assistant Researcher, Crop Environment Section Taitung District Agricultural Research and Extension Station, Ministry of Agriculture, Taitung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, Ministry of Agriculture, Taitung, Taiwan, ROC.

\* Corresponding author, e-mail: cwwang@mail.ttdares.gov.tw

## ABSTRACT

The fruit of sugar apple (*Annona squamosa*) and atemoya (*A. squamosa* × *A. cherimola* or *A. cherimola* × *A. squamosa*) are cracking and dropping under low or high temperature conditions, and causing economic losses for farmers. Numerous research have reported that arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a crucial role in helping plants resist environmental stress. In this study, an AMF species belonging to the genus *Acaulospora* (strain TDAu01) was isolated from the soil of atemoya orchards in Taitung County in Taiwan. We investigated the alleviating effects of this AMF strain on sugar apple and atemoya under low-temperature stress. The results showed that *Annona* seedlings inoculated with TDAu01 exhibited significantly more vigorous root growth and greater leaf numbers. Chlorophyll fluorescence analysis indicated that the photosynthetic efficiency of AMF inoculated seedlings declined less than non-inoculated ones under low-temperature stress, demonstrating that TDAu01 can mitigate the cold stress on sugar apple seedlings. After transplanting the seedlings into our experimental orchard at Binlang, we measured their photosynthetic efficiency before and after a cold wave. For sugar apple, photosynthetic efficiency declined rapidly by the 7th day after the cold wave but recovered by the 14th day. Atemoya exhibited a smaller decline in photosynthetic efficiency post-cold wave, possibly due to the nature of one of its parent, cherimoya, which were grow at high altitudes. Examinations on root and rhizosphere soil revealed that TDAu01 inoculated plants compared to non-inoculated ones had significantly higher AMF colonization rates and spores. Although TDAu01 provided slight relief in terms of photosynthetic efficiency reduction under low-temperature conditions, the differences were not statistically significant. Future studies will focus on the application of other microbes such as *Bacillus* strains to further study the synergetic effects of AMF inoculated sugar apple and atemoya under temperature stress.

**Keywords:** Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF), Sugar apple, Atemoya, Low temperature stress