

應用核糖體 DNA 片段鑑別木棲性 大型真菌

游婉婷 林亞立*

國立宜蘭大學森林暨自然資源學系

摘要

本研究以採集並經形態鑑定所得之木棲性大型真菌子實體為材料，萃取基因組 DNA，進行 PCR 反應，增幅 rDNA 序列部分，包含 ITS、18S rDNA、28S rDNA (D1~D3 domain) 之片段，並利用 NCBI 網站進行序列比對。以 43 支菌株之 rDNA 序列比對與形態鑑定結果相比，序列比對至種名者 28 株，至屬名者 12 株，形態鑑定至種名及屬名者分別為 22 及 6 株。由形態鑑定至屬以上分類階層的 15 支菌株，經由序列比對得知其中 7 株的種名及 5 株的屬名。同時由形態鑑定及序列比對分別得知種名者有 17 支菌株，其中 16 株種名相同。由此可知，rDNA 序列部分片段可應用於菌種鑑定分類，雖然鑑定結果不一定與子實體形態鑑定結果相同，但確實可有效輔助形態鑑定上的不足。

以增幅之 rDNA 序列部分為標記(marker)，子囊菌群為外群(outgroup)，採用 PAUP* version 4.0 beta 10 軟體進行序列演算及建構樹型圖。分析結果顯示，本實驗所使用的菌株大致分為多孔菌群(Polyporales group)及傘菌群(Agaricales group)兩類群；外群部分，子囊菌群(Ascomycota group)皆形成一穩定共群。三段序列所建構的樹圖中，以栓菌群(*Trametes* group)分群最為穩定，且支持 *Trametes* 屬及 *Pycnoporus* 屬歸為一群。

關鍵詞：宜蘭大學實驗林場、木棲性大型真菌、ITS region、18S rDNA、28S rDNA、D1~D3 domain

Application of Ribosomal DNA Sequence to Identify Wood-inhabiting Macrofungi

Wan-Ting You Ya-Lih Lin*

Department of Forestry and Natural Resources, National Ilan University

Abstract

The genome extracted from the colonies obtained from collected and morphologically identified macrofungal fruiting bodies were amplified at the rDNA segments of ITS, 18S rDNA and 28S rDNA (D1~D3 domain) and the nucleotide

sequences of these segments were matched with the DNA sequence data base of NCBI to reveal the names of these macrofungi. Among the 43 kinds of macrofungi specimens used for comparison in this study, 28 species and 12 genus names were revealed by rDNA sequences matching, and 22 species and 6 genus names were identified by morphological characteristics recognition. Seven species names and 5 genus names were suggested by rDNA sequences matching of the 15 specimens identified morphologically to classification hierarchy of family and above. Only 1 of the 17 kinds of macrofungi identified to their species individually by morphological characteristics and rDNA sequences matching carries different species names. It appears that nucleotide sequences of rDNA segments used in this study are relevant to fungal identification, though the results might not be consistent with that from morphological identification, it still provides great help on fungi identification.

Applying ITS region, partial region of 18S rDNA, and 28S rDNA (D1 ~ D3 domain) sequences as markers, using ascomycota as outgroup, with PAUP * version 4.0 beta 10 software, tree diagrams were calculated and constructed. The specimens used in this study were divided into polyporales and agaricus groups; outgroup for ascomycota group indicates a stable group. The tree diagrams constructed with the three rDNA segments used for sequence matching denote *Trametes* group the most stable cluster, and genera *Trametes* and *Pycnoporus* could be classified into a group.

Keywords: Experimental Forest of National Ilan University, wood-inhabiting macrofungi, ITS region, 18S rDNA, 28S rDNA, D1~D3 domain

*Corresponding author. E-mail: linyl@niu.edu.tw.

前 言

傳統上，大型真菌的鑑別多以子實體外觀形態特徵為主，鑑定結果經常受到子實體特徵變異及鑑定者個人經驗與認知的影響而有差異。為了提升鑑定的正確性及減少分類上的爭議與疑慮，許多學者應用分子生物技術方法於菌種鑑別，做為鑑定的輔助。由於分子生物技術主要是採用遺傳物質 DNA 或是基因表現之信息做為資料基礎，加上統計分析其差異性、相似性，所建構而成之分類系統，因此在物種分類上，有較可靠之依據且不易受形態特徵與認知差異的影響。

核糖體基因序列(ribosomal DNA, rDNA)為目前物種分類鑑定上最廣泛使用的片段，包含 18S、5.8S、28S rRNA 之基因及變異較高的內轉錄區(internal transcribed spacers, ITS)，其序列為重複性高且存在著可變區與高變異區(刑等, 1999; White *et al.*, 1990)。核糖體 DNA 中，最早用於解決物種間分類關係之片段為 5S rDNA，但其序列片段過短，可提供資訊有限而漸少使用(林, 2003; Valente *et al.*, 1999)。

18S rDNA 為保守性高之區域，長度約 1800 bp，序

列演化較為緩慢，常用於探討屬或科之分類階層(Swann and Taylor, 1993; White *et al.*, 1990)。謝坤憲(2003)以 18S rDNA 部分序列分析牛肝菌之分類關係，於科、目之分類上，可將牛肝菌分為牛肝菌科(Boletaceae)與松塔牛肝菌科(Strobilomycetaceae)兩大群。張鴻泰(2005)則利用 18S rDNA 辨識屬及種間之差異，並將四種蟲草歸屬於同一類群。

ITS 區域包含了 ITS1-5.8S-ITS2，長度約 600 bp，以 ITS1 及 ITS2 為變異性較高之片段，經常使用於種、屬之物種分類研究上。李清福(2002)利用 ITS 片段區分 *Trichoderma* 屬之下的五個類群，並以 ITS 片段之差異成功地區分出各類群中形態類似之菌種，並加以更名。黃莉嫻(2003)以 ITS 序列鑑定臨床上引起感染之黴菌，可快速分辨出 30 種臨床菌株。

28S rDNA 序列具有高保守性及高變異之區域，其長度約 3000 bp，以 D1~D3 區域為變異性較高之片段。林秋玲(2003)論文指出利用 28S rDNA 序列中 D1、D2 區域，可準確地區分出不同屬及不同種之酵母菌，但較無法區別同種之菌株。Thomas *et al.* (2008)以 D1~D3 區域，自可可樹(*Theobroma gileri*)中所分析出 31 個不同類

群的內生真菌。28S rDNA 與 ITS 序列皆使用於種、屬之物種分類研究，兩者配合可探討同屬之菌種種間差異(黃與許，2004)。

以序列或蛋白質資料，分析物種演化關係，利用分子層級上的差異，進行資料運算，並依據演算結果建構出物種分類關係圖或樹狀圖(phylogenetic tree)，可用以了解菌種種系發生之關係，其研究對象多為相似菌種之關係或分類上較具爭議之菌種(何，1996；呂，2003；張鴻泰，2005)。樹狀圖主要以遺傳距離或相似性的遠近計算及演化上分子遺傳特徵的改變次數等兩種方式來建構，進行隨機重複取樣(bootstrapping) 1000 次的演算，以獲得分枝支持度較高與遺傳距離步驟最短之樹型。

本研究以宜蘭大學實驗林場所採集之木棲性大型真菌菌種為主要試驗材料。利用目前被廣泛使用 rDNA 序列中之 ITS 區域、18S rDNA 及 28S rDNA 序列片段，比對鑑定菌種並與子實體形態鑑定結果比較，對有疑慮之真菌菌種加以區分。另外，利用樹狀圖的建構，探討分子層級上之分類關係是否與形態分類結果相近，期許 rDNA 序列分析提供的資訊，能使菌種分類與鑑定更接近事實。

材料與方法

一、實驗菌株

(一) 菌株採集

2007 年 11 月至 2009 年 6 月以國立宜蘭大學實驗林場為主，另於宜蘭大學校園、宜蘭縣員山鄉長嶺苗圃、宜蘭縣部分山區及花蓮縣部分地區，採集得子實體標本 326 份。

(二) 菌種分離與純化

由子實體切取內部小塊菌絲組織或由孢子印取得的孢子培養純系菌株，純化後的菌株，觀察其菌落外觀及菌絲形態，參照菌落培養圖鑑(吳等，2000；張等，1996；1997)，以確定接種菌種無誤，做為菌種保存及後續研究的材料。

二、形態特徵鑑定

依據採集記錄之資訊及孢子印、子實體外觀與顯微特徵，參考比對圖鑑書籍(卯，2000；吳等，1996；周與

張，2005；張等，2001；張等，2005；黃，1998；彭等，1991)。

三、實驗菌株

實驗菌株為野外收集之子實體所分離之 94 支純系菌株及購自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)之 3 支標準菌株，共 97 株。

四、基因組 DNA 萃取

真菌總體 DNA 抽取，係參考 Talbot(2001)及涂與呂(2004)所使用之方法，修改部分條件，利用 CTAB 與 Chloroform/Isoamyl alcohol 溶液，抽取菌體之 DNA。方法如附錄 1。

五、核糖體 DNA 片段增幅及定序

聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)所增幅之目標序列為 ITS 區域、18S rDNA 片段及 28S rDNA 片段(D1~D3 domain)，其反應位置，如圖 1 所示。

PCR 反應之引子組(primers)，增幅 ITS 區域及 18S rDNA 片段，選用 White *et al.*(1990)所設計之廣泛性引子；增幅 28S rDNA 片段，則依據 Zhang *et al.*(2004)及 Blair *et al.*(2008)所使用之引子。各引子組之序列及煉合設定溫度，如表 1 所示。PCR 反應中每一離心管(0.2 ml tube)各物質含量，如表 2 所示。

反應結束後，取部分 PCR 產物，以 1%的洋菜膠體(agarose gel)進行電泳，並以 EtBr (ethidium bromide)染色。其餘 PCR 產物則委託基龍米克斯生技公司以 ABI 3730 系統代為定序。

六、序列比對與分析

將各序列之定序結果上傳至 NCBI 網站(National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，利用該網站之 BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)進行序列搜尋與 GenBank 資料庫內之序列資料比對，以確定所擴增之序列為本次實驗之目標序列。

經比對無誤之 rDNA 序列資料，利用 BioEdit 軟體內建之 Clustal W Multiple alignment 功能進行序列整理與編排(alignment)，並以人工手動方式調整序列資料。

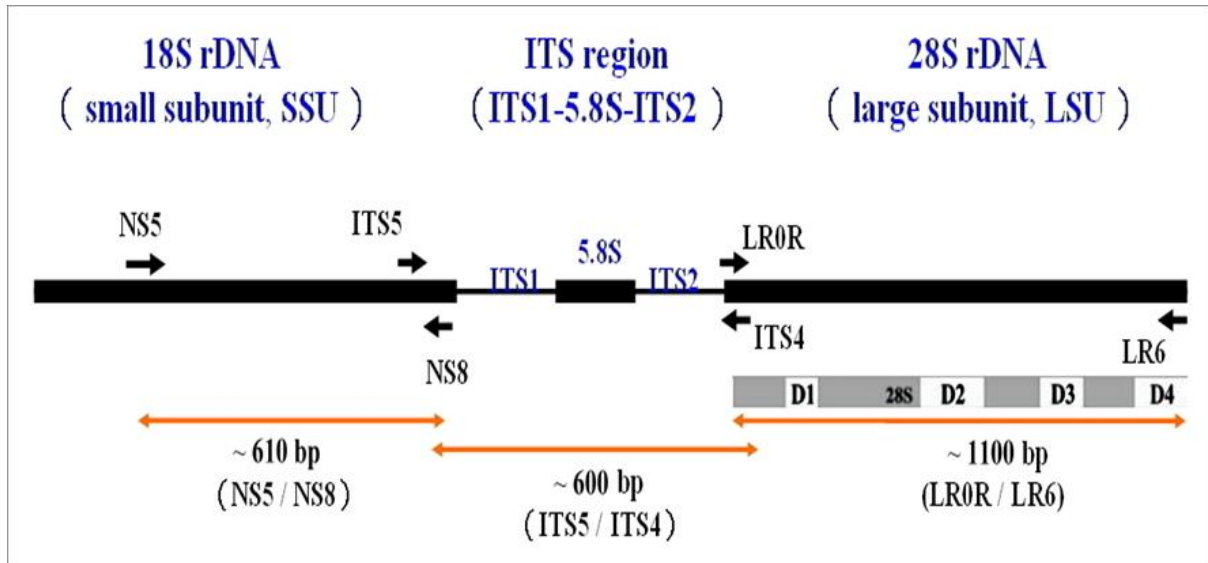


圖 1 擴增核糖體基因(rDNA)序列片段所使用之引子(Primers)位置及其延伸方向示意圖。改繪自 Tedersoo *et al.*(2009)及 White *et al.*(1990)。

Fig.1 Primers used on the amplification of rDNA segments and their cohering points and elongation directions. Redrawn from Tedersoo *et al.*(2009)and White *et al.*(1990).

表 1 增幅 ITS、18S rDNA、28S rDNA 序列片段之引子組及煉合設定之溫度

Table 1 Primer pairs and annealing temperature settings of the amplification of ITS, 18S rDNA, and 28S rDNA segments

目標序列	Primer sequences (5'→3')	煉合溫度 (Annealing, °C)
ITS	ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC	54.5 ^a
18S rDNA (partial)	NS5 : AACTTAAAGGAATTGACGGAAG NS8 : TCCGCAGGTTACCTACGGA	55 ^b
28S rDNA (D1~D3 domain)	LR0R : ACCCGCTGAACTTAAGC LR6 : CGCCAGTTCTGCTTACC	52.5 ^c

a : 參考張(2002)及 Zhang *et al.*(2004)所使用之條件，略作調整。

b : 參考 Romeralo *et al.*(2009)所使用之條件，略作調整。

c : 參考 Kodsueb *et al.*(2006)及 Zhang *et al.*(2004)所使用之條件，略作調整。

表 2 PCR 反應試劑配製

Table 2 PCR chemicals

PCR 反應試劑 (1 管用量)	體積 (μl)
DNA template (約 10 ng/μl)	5
10X PCR buffer	5
10 mM dNTP	0.5
primer 1 (10 μM)	1
primer 2 (10 μM)	1
HiFi Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.25
ddwater (Distillation-Distillation water)	37.25
總體積	50

將調整過後之序列資料，編寫為 NEXUS 格式，利用 PAUP* version 4.0 beta 10 軟體(Swofford, 2002)進行分析並建構出樹圖。依據上述方法所得之樹型圖，皆以 TreeView 軟體呈現之。

結果與討論

一、菌種採集與鑑別

自 2007 年至 2009 年間，於宜蘭、花蓮等地區採集所得之大型真菌標本，共計 326 份，97 個種類，依形態特徵鑑定至種名者有 75 個種類，其中以 *Auricularia*

polytricha 之採集次數最多，共計 12 份標本；*Trametes elegans*、*T. hirsuta* 次多，各為 9 份標本；採集於銅山山毛櫸林的 *Omphalotus japonicus* 為台灣新紀錄種。以分類群而言，多孔菌類、傘菌類及皮殼菌類為較常被採集之木棲性大型真菌類群。

二、菌種分離與純化

由 326 份標本，分離出 291 株菌株，扣除同採集地點及遭污染的菌落，得單一菌落者 154 株。將所得到的單一菌落，參考比對圖鑑書籍，以菌落外觀特徵(菌落顏色、形態、培養基顏色改變等)或顯微特徵(菌絲樣式、扣子體有無等)做進一步確認，經確認為單一純系菌落者，則作為實驗材料，共得純系菌株 94 株 44 種類。

三、PCR 增幅反應產物檢測

以 94 株純系菌株及 3 株 BCRC 標準菌株共 97 支菌株，進行基因組萃取及核糖體 DNA 片段增幅。以電泳圖檢視 97 株實驗菌株之增幅結果，顯示共有 5 株菌株各增幅片段皆無 PCR 產物，推測可能為 DNA 粗萃取時菌絲量過少，DNA template 濃度不足，導致無 PCR 產物產生。

電泳結果顯示 ITS 區域及 28S rDNA 片段皆可成功增幅出目標 DNA 片段，二者之產物大小分別約為 600~700 bp 及 1.1~1.2 kb。多數 18S rDNA 片段之增幅產物約 600~700 bp，3 株達 1 kb 左右，另有 3 株無法成功增幅出產物，推測可能 Tm 溫度條件不符合或是其他反應試劑濃度不足有關，需另行調整之。

四、PCR 增幅反應產物定序結果

將 PCR 增幅反應之產物委託基龍米克斯生技公司代為定序，結果顯示 PCR 產物大小與以電泳圖推估者相近，增幅 ITS 區域，約 630~700 bp；增幅 18S rDNA 片段，約 610~660 bp，少數至約 1 kb；增幅 28S rDNA 片段，約 1000~1090 bp。

定序後所得之序列資料結果顯示，各片段之 PCR 產物皆可成功解序，但有 24 支菌株之序列圖譜出現 Two pattern 的情形(同一個鹼基位置上出現兩個不同高度的峰型)，顯示 PCR 增幅時，其 DNA 並非單一模板，產生非預期之產物。推測可能部分樣本於培養時遭黴菌或細菌污染所致。此情形於電泳圖檢視時無法區分辨識，大

多於解序時才能發現。由於序列訊號混合，產生偽訊號，使得序列判讀不正確，導致解序錯誤，雖經校正，但仍無法進行後續序列分析。

五、序列 BLAST 搜尋與 GenBank 資料庫比對結果

本實驗菌株原為 97 株，移除 DNA 模板污染(24 株)及無 PCR 增幅產物(5 株)之菌株後，確認其定序序列無誤者，共計 68 株。將確認之序列經 NCBI 網站之 BLAST search 比對，由 ITS 區域、18S rDNA 片段及 28S rDNA 片段比對結果綜合判定菌株之種類，為 rDNA 鑑定結果。為避免重複計算，影響分析討論，將分別由子實體形態鑑定及 rDNA 鑑定結果皆相同的菌株列為重複，共有 14 個種類 39 支重複菌株，具重複的各種類僅以一株為代表，共使用 43 個種類進行分析討論。

用於分析討論的 43 個種類之形態及 rDNA 各片段序列與綜合鑑定結果整理於附表 1，其中以 18S rDNA 片段序列比對者有 1 株無法比對出，另有 3 株未能成功定序而無法比對。將各種鑑定方法所得的結果以分類層級整理，結果如表 3 所示。由表 3 可知，綜合 rDNA 三個片段之序列比對鑑定結果，可將 43 個菌株鑑別出 28 個種名及 12 個屬名，種鑑別率 65%，至屬的鑑別率則高達 93%，相對於以形態鑑別所得的 22 個種名及 6 個屬名之 51%種鑑別率及 65%至屬鑑別率為高，顯示以綜合本實驗使用的三個 rDNA 片段與資料庫比對結果的方式，對於本實驗所採用的菌株有較佳的鑑別能力。形態及綜合 rDNA 三個片段之序列比對皆鑑定至種名的 17 個種類中，有 1 個種類(R61)兩者鑑定為同屬不同種名，以形態鑑定至種名的 22 個種類為分母，則本實驗 rDNA 序列鑑別確認率為 73%。扣除重複的 16 個種類，以形態鑑定及 rDNA 片段序列比對至種名的菌株合計有 34 個種類，種鑑別率為 79%，加上鑑別至屬的 7 個種類，綜合兩種鑑定方法，至屬的鑑別率可達 95%，顯示本實驗所採用的 rDNA 片段序列可有效的輔助形態鑑定，提供有價值的參考資料，提升鑑別的成果。

此外，由 rDNA 片段序列比對出的菌種中，有 6 種疑似台灣新紀錄之菌種，分別為 *Ceriporia lacerate*、*Fomitopsis ostreiformis*、*Gymnopilus dilepis*、*Melanotus subcuneiformis*、*Mycoaciella bispora* 及 *Resinicium friabile*，因所採集的子實體樣本尚無法提供足夠特徵，

有待進一步確認。

六、rDNA 各片段之序列比對鑑別效能

(一) ITS 區域

ITS 區域包含了 ITS1-5.8S-ITS2, 此區域為變異性較高之區域, 經常使用於區分種、屬之物種鑑定分析(李, 2002; 李, 2004; 沈, 2001; 張仲豪, 2005; 張鴻泰, 2005; 黃, 2001; White *et al.*, 1990)。

本次實驗菌株, 以 ITS 之序列資料與 NCBI 之 GenBank 資料庫比對搜尋結果, 其比對之序列相似度可達 96~100%, 比對出種名者 23 株或至屬名者 13 株(表 3), 至屬的鑑別率達 83%。

(二) 18S rDNA 片段

18S rDNA 為重複性高及高保守性之區域, 可作為屬、科(或類群之間)的分類依據(張, 2002; 張鴻泰, 2005; 謝, 2003; 顧, 2003)。以 18S rDNA 片段之序列資料與 NCBI 之 GenBank 資料庫比對, 其序列相似度可達 98~100%, 因資料庫中菌種序列資料較少, 所得之序列資料大多比對至屬(20 株)或科(1 株)、目(11 株)之分類群, 至種名者僅 7 株(表 3)。

(三) 28S rDNA 片段

28S rDNA 因具有高變異之區域, 可區別分類關係相近之物種及菌種間之差異(林, 2003; 黃, 1999; Blair *et al.*, 2008; Kodsueb *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004)。本實驗所增幅之片段為 D1~D3 domain, 其中 D1、D2 domain 含有 28S rDNA 變異性較高之部分, 對於分析相近之菌種可明顯區分至種(林, 2003; Kurtzman and Robnett, 1998)。以 28S rDNA 片段(D1~D3 domain)之序列資料與 NCBI 之 GenBank 資料庫比對, 其相似度可達 96~100%, 所得之序列資料多數可比對至種名(24 株)或屬名(10 株), 至屬的鑑別率為 79%(表 3)。

檢視各段序列比對結果(附表 1), 單獨以 ITS 或 28S rDNA 比對出種名者分別有 4 株及 6 株, 18S rDNA 部分, 則未有單獨比對至種名者; 單獨以 ITS 或 18S rDNA 比對至屬者分別有 3 株及 1 株, 28S rDNA 片段則未有單獨比對至屬者。若以鑑定為目的, 則 ITS 及 28S rDNA 的序列比對成效較佳, 綜合所有以 rDNA 序列比對鑑定種名的 28 個種類, 皆可由二片段之序列結果得知; 至屬名的 10 個種類, 也僅有 1 個種類靠 18S rDNA 區域序列

比對確認。本實驗進行比對時(2010 年 5 月), 於 GenBank 資料庫內所收錄之真菌核糖體基因序列資料量, ITS 序列資料約 310 萬筆, 18S rDNA 約 14 萬筆, 28S rDNA 約 12 萬筆。對照資料筆數及鑑別率, 比對至種名及屬的效果, 似乎又以 28S rDNA 片段略優於 ITS 區域。

以菌種鑑定方法而言, 序列比對似較為準確, 但比對結果仍受資料庫內供比對之資料量是否完整及收錄之序列資料是否持續更新而影響。此外, 菌種分離純化、DNA 萃取過程、PCR 條件設定以及定序序列資料判讀等過程, 皆會影響後續序列比對結果。因此資料庫內相關菌種資料, 仍須建立在菌種名之確認、形態分類及物種演化研究等傳統分類的基礎上, 以減少分類系統與演化之爭議。

七、序列排比及基因樹之建構

藉由 BLAST 比對後, 確認菌種之序列以 BioEdit 軟體進行序列資料整理與排列, 並以人工手動方式調整序列資料。將調整過後之序列資料, 編寫為 NEXUS 格式, 以 PAUP* version 4.0 beta 10 軟體(Swofford, 2002)進行 Neighbor Joining Tree 之建構並以隨機重複取樣(bootstrapping)1000 次的演算, 重複建構 1000 個樹型圖, 以計算分枝支持度。分枝支持度較高者, 其分群關係較具有可信度及穩定度。

近鄰相接法(Neighbor Joining method)以遺傳距離之遠近, 表現各分類群間之關係。由序列算出每一對物種間的演化距離, 將所有的演化距離資料整理成一個距離矩陣, 再利用距離矩陣的資料畫出樹型。當各分類群之間的距離越遠, 表示其遺傳距離越大; 反之, 距離越近, 表示其遺傳距離越小, 因此所建構之樹型圖為不齊頭式。

以 ITS 區域、18S rDNA 片段及 28S rDNA 片段為分析之資料所建構之 NJ Tree, 由於各樹圖間差異不大, 僅少數幾個分支因 bootstrap 值低於 50% 而有所差異, 故以 ITS 區域之 NJ Tree 呈現, 如圖 2 所示。

以子囊菌作為外群(outgroup)時, 可將擔子菌大致分為兩類群, 多孔菌類群(Polyporales group)及傘菌類群(Agaricales group)。由於實驗菌株中, 多數菌株為多孔菌及傘菌, 因此內群主要群為多孔菌群及傘菌群, 其他類群之菌種分類關係, 因菌種數量不足, 則較為不明確。

多孔菌群分為兩大分枝, 其分枝 bootstrap 值較低

(50~55)，但仍構成一分類單元。另外，多孔菌類中 *Trametes* 屬及 *Pycnoporus* 屬皆歸為同一群，且其 bootstrap 值高於 60，形成一族群：栓菌群(*Trametes* group) 內相比，*Pycnoporus sanguineus* 與 *T. lactinea* 兩者雖於菌體外觀明顯有差異，於關係上 *P. sanguineus* 明顯趨近於 *T. lactinea*，表示 *Pycnoporus* 屬確實較近於栓菌群，此分類現象於李肇晉(2004)之研究亦有相同結果。

傘菌類群部分，以 *Pleurotus eryngii* (Pleurotaceae) 最先分開，其 bootstrap 值為 98，*Gymnopilus* sp.

(Cortinariaceae)與 *Melanotus subcuneiformis* (Strophariaceae) 為分枝末端，其 bootstrap 值為 93，並形成一姐妹群。由此可得知，*Gymnopilus* sp. (Cortinariaceae) 與 *M. subcuneiformis* (Strophariaceae)應為傘菌類中遺傳距離較近的一群，實際是否如此情形後續仍需相關研究佐證之。

整體而言，三段序列所建構的樹圖中，以栓菌群 (*Trametes* group)分群最為穩定，皆支持 *Trametes* 屬及 *Pycnoporus* 屬歸為一群。

表 3 子實體形態特徵鑑定與 rDNA 片段序列比對結果於各分類階層種類數之對照比較

Table 3 Comparison between the number of specimen identified by fruiting body morphology and rDNA sequences in individual classification category

sequence matching	Morphological identification						Sum.
	Species	Genus	Family	Order	Class	Division	
rDNA	Species	17(16) ^a	4	6	1		28
	Genus	4	2(1)	4	1	1	12
	Family	1					1
	Order					2	2
	Class						0
sequence matching	Species	Genus	Family	Order	Class	Division	Sum.
ITS	Species	15(14)	4	4			23
	Genus	3	2(1)	6	2		13
	Family	2					2
	Order	2				2	4
	Class					1	1
sequence matching	Species	Genus	Family	Order	Class	Division	Sum.
18S	Species	4(4)	1	2			7
	Genus	10	2(2)	6	1	1	20
	Family	1					1
	Order	4	3	2	1	1	11
	Class						0
	U ^b	1					
X ^c	2					1	3
sequence matching	Species	Genus	Family	Order	Class	Division	Sum.
28S	Species	15(14)	3	5	1		24
	Genus	4	3(3)	2	1		10
	Family	2		2(2)			4
	Order	1		1		3	5
	Class						0
Sum.	22	6	10	2	0	3	43

a: numbers in the parenthesis are the number of specimens of identical identification results from fruiting body morphology and rDNA sequences

b: unable to make a match

c: no PCR products

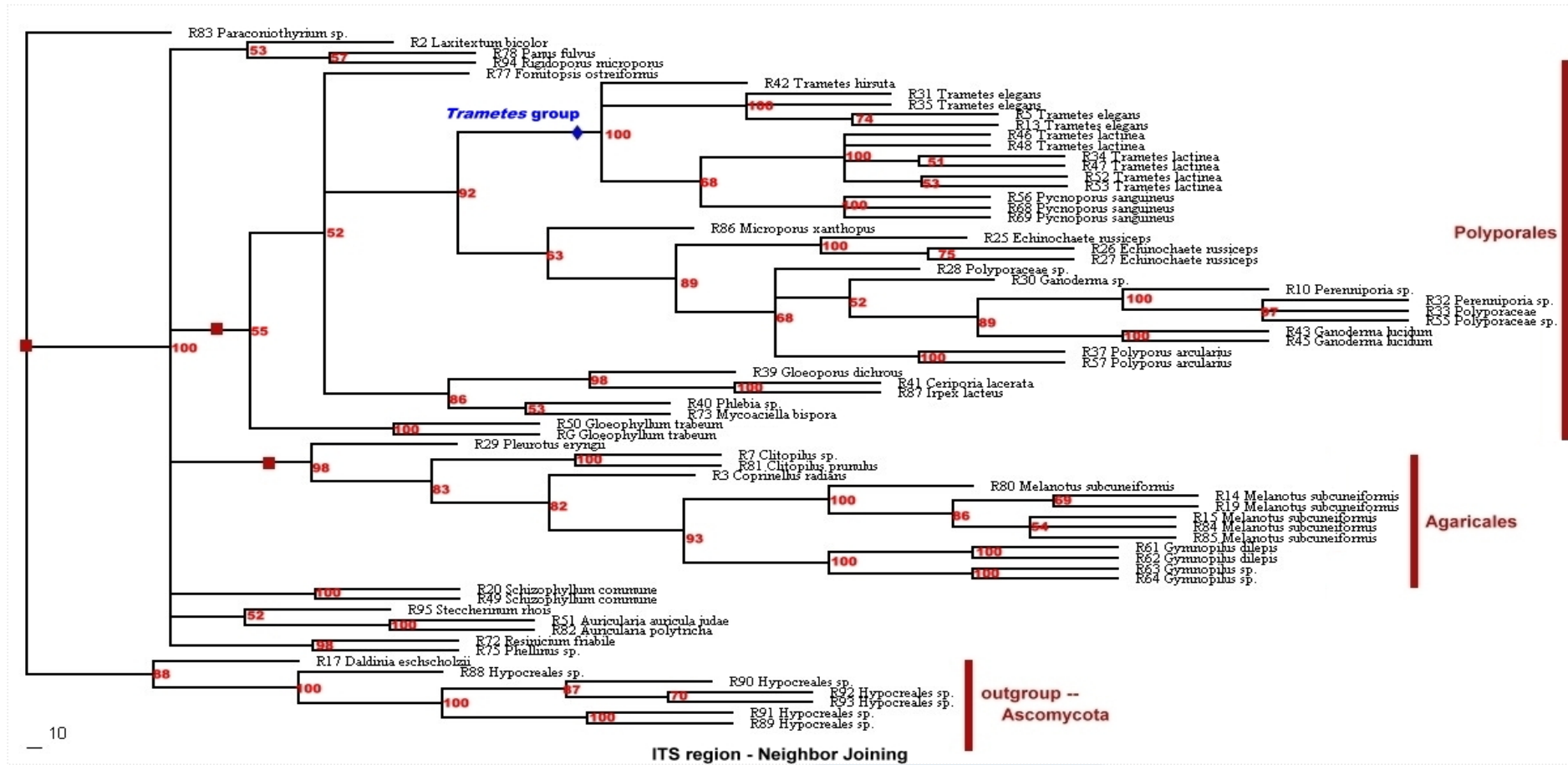


圖 2 以 ITS 區域為標記，經 PAUP* 分析所得之 Neighbor Joining Tree；隨機重複取樣(bootstrapping)1000 次。
 Fig. 2 The Neighbor Joining Tree obtained from PAUP* analysis based on ITS region with a random sampling (bootstrapping) of 1000 times.

結 論

此次調查研究中，於宜蘭、花蓮等地區採集所得之大型真菌標本，共計 326 份。菌種鑑定方面，主要以外觀形態特徵做為初步分類之依據。而形態初步可鑑定至種名者共 75 種，其中 *Omphalotus japonicus* 為疑似台灣新紀錄種。調查期間，鑑定至種名者，以毛木耳 (*Auricularia polytricha*)、小孔硬孔菌 (*Rigidoporus microporus*)、裂褶菌 (*Schizophyllum commune*)、優美栓菌 (*Trametes elegans*)、毛栓菌 (*Trametes hirsute*) 為宜蘭大學實驗林場最常見之菌種；另外，區分至分類群者，以多孔菌類、皮殼菌類及傘菌類為常見之真菌種類。

由本實驗結果得知，依據不同核糖體基因片段之序列可將真菌菌株比對至種、屬及屬以上之分類階層。核糖體 DNA 的 ITS 區域及 28S rDNA(D1~D3 domain)片段的序列，可輔助形態鑑定，將真菌菌株分類至種名及屬名。就真菌菌種鑑定方法而言，形態鑑定為真菌研究之基礎，鑑定者須具備相當之真菌學相關基礎知識及豐富的菌種鑑定經驗，以確保菌種名鑑定無誤。對於鑑定初學者或非相關領域之研究者，為了減少經驗不足導致誤判，而以序列比對方式鑑定是較為準確的。但菌種分離純化、DNA 萃取過程、PCR 反應條件設定以及定序序列資料判讀，皆會影響後續序列呈現結果。此外，序列比對結果亦受限於資料庫內可供比對之資料是否完整無誤以及收錄之序列資料是否有持續更新，而影響菌種鑑定結果。

三段序列所建構之樹圖中，以栓菌群 (*Trametes group*) 分群最為穩定，且 *Pycnoporus* 屬歸於栓菌群內，*Trametes* 屬與 *Pycnoporus* 屬形態、顯微特徵相似，主差異在於菌體顏色，是否該將 *Trametes* 屬與 *Pycnoporus* 屬併為同一屬或重新界定，仍需進一步探討。

研究過程中，以子實體形態特徵及 rDNA 片段序列，確認 *Omphalotus japonicus* 為新紀錄種。另由 rDNA 片段序列比對結果，發現 6 種疑似台灣新紀錄之菌種，分別為 *Ceriporia lacerate*、*Fomitopsis ostreiformis*、*Gymnopilus dilepis*、*Melanotus subcuneiformis*、*Mycoaciella bispora* 及 *Resinicium friabile*，由於採集所得的子實體形態特徵不夠明確，因此仍需進一步的確認。

參考文獻

- 卯曉嵐。2000。中國大型真菌。河南科學技術出版社。pp. 76-405。河南。
- 何一正。1996。惠蓀林場實驗林場關刀溪流域靈芝屬與烏芝屬之分類研究。國立中興大學植物學研究所碩士論文。台中。
- 吳聲華、周文能、王也珍。1996。台灣高等真菌一子囊菌與擔子菌的認識。國立自然科學博物館。pp. 57-144。台中。
- 吳聲華、周文能、王也珍、王伯徹。2000。台灣潛在食藥用真菌培養彩色圖鑑。食品工業發展研究所。pp. 24-135。新竹。
- 呂宗霖。2003。臺灣小皮傘屬的形態與分子鑑定。國立中興大學生命科學系碩士論文。台中。
- 李清福。2002。以分子特徵研究木腐菌之遺傳相關性。國立清華大學生命科學系博士論文。新竹。
- 李肇晉。2004。台灣地區栓菌屬親緣關係之研究。國立台灣師範大學生命科學研究所碩士論文。台北。
- 沈義隆。2001。台灣地區牛肝菌之分子鑑定。國立中興大學植物學研究所碩士論文。台中。
- 邢來君、李明春。1999。普通真菌學。高等教育出版社。pp. 270-274。北京。
- 周文能、張東柱。2005。野菇圖鑑。遠流出版社。pp. 33-420。台北。
- 林秋玲。2003。應用核糖體核酸基因序列鑑定食品酵母菌。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中。
- 涂景瑜、呂維茗。2004。教育部顧問室「生物技術科技教育改進計劃」：植物基因轉殖與分子檢測技術。國立中興大學生物技術教學資源中心。pp.195-196。台中。
- 張仲豪。2005。台灣產囊生尾柄孢殼菌屬和柄孢殼菌屬的分類與分子親緣關係。國立中興大學生命科學系碩士論文。台中。
- 張東柱、周文能、王也珍、朱宇敏。2001。大自然的魔法師—台灣大型真菌。行政院農業委員會。pp.283-516。台北。
- 張東柱、周文能、黃崑謀。2005。野菇入門。遠流出版社。pp.64-98。台北。

- 張東柱、邱文慧、華傑。1996。台灣木生性無褶菌培養彩色圖誌-第 1 輯。食品工業發展研究所。pp.39-121。新竹。
- 張東柱、邱文慧、華傑。1997。台灣木生性無褶菌培養彩色圖誌-第 2 輯。食品工業發展研究所。pp.30-113。新竹。
- 張益軒。2002。牛樟芝分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學系碩士論文。台北。
- 張鴻泰。2005。蟲草類的 DNA 基原鑑定及其理化特性之研究。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。彰化。
- 彭金騰、陳啟楨、華傑。1991。台灣野生菇彩色圖鑑-第 1 輯。食品工業發展研究所。pp.30-36。新竹。
- 黃年來。1998。中國大型真菌原色圖鑑。中國農業出版社。pp.91-183。北京。
- 黃良玉。2001。應用 rDNA 內轉錄區間(ITS)序列特性探討萎凋病菌之親緣關係及利用聚合酶連鎖反應技術檢測番茄萎凋病菌。國立中興大學植物病理學系碩士論文。台中。
- 黃莉嫻。2003。以核糖體核酸基因內轉錄區(ITS)之序列鑑定臨床黴菌。國立成功大學醫學工程研究所碩士論文。台南。
- 黃雅惠、許瑞祥。2004。利用核糖體核糖核酸基因序列進行巴西蘑菇親緣關係之探討。台灣農業化學與食品科學 42(2): 75-82。
- 黃雅惠。1999。巴西洋菇分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學系碩士論文。台北。
- 謝坤憲。2003。以核糖體 DNA 序列進行台灣產牛肝菌之分子親緣分析。國立中興大學生命科學系碩士論文。台中。
- 顧曉哲。2003。蟲草屬真菌核酸資料庫之建立與應用。國立成功大學生物科技研究所碩士論文。台南。
- Blair, J. E., M.D. Coffey B, S.Y. Park, D.M. Geiser, and S. Kang. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266-277.
- Kodsueb, R., V. Dhanasekaran, A. Aptroot, S. Lumyong, E.H.C. McKenzie, K. D. Hyde, and R. Jeewon. 2006. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetics perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. *Mycologia* 98(4): 571-583.
- Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant. van. Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Romeralo, M., S.L. Baldauf, and J.C. Cavender. 2009. A new species of cellular slime mold from southern Portugal based on morphology, ITS and SSU sequences. *Mycologia* 101(2): 269-274.
- Swann, E.C. and J.W. Taylor. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods) version 4.0 beta 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Talbot, N.J. 2001. Nucleic acid isolation and analysis. *In: Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi. A Practical Approach.* pp.25-26. Oxford University Press Inc., New York.
- Tedersoo, L., K. Pärtel, T. Jairus, G. Gates, K. Põldmaa, and H. Tamm. 2009. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology* 11(12):3166-3178.
- Thomas, S. E., J. Crozier, M.C. Aime, H.C. Evans, and K.A. Holmes. 2008. Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycological Research* 112: 852-860
- Valente, P., J. P. Ramos, and O. Leoncini. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* 45: 949-958.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols. A Guide to Methods and Applications.* pp.315-322. Academic Press Inc., New York.

Zhang, L.F., J.B. Yang, and Z.L. Yang. 2004. Molecular phylogeny of eastern Asian species of *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): taxonomic and biogeographic implications. *Fungal Diversity* 17: 219-238.

101 年 5 月 15 日投稿
101 年 7 月 3 日接受

附 錄

附錄 1 基因組 DNA 萃取方法

刮取適量菌絲體（約 50~100 mg）至 1.5 ml 微量離心管，加入 600 μ l 之 Lysis buffer (2% CTAB、100 mM Tris-HCl, pH 8.0、20 mM EDTA、1.4 M NaCl、1% β -mercaptoethanol、1% Polyvinylpyrrolidone)，置於 65 $^{\circ}$ C 之乾浴槽內作用 1 小時，使菌體能充分溶解，釋出 DNA。接續以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新離心管中，再加入等體積 Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1, v/v)，均勻混合後，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘；取上清液至新離心管中並加入等體積之 Chloroform/Isoamyl alcohol 溶液，混合後於 13,000 rpm 離心 5 分鐘；取上清液至另一微量離心管，加入等體積之 Isopropanol，混合均勻後，靜置於 4 $^{\circ}$ C 約 10 分鐘；以 13,000 rpm 離心 20 分鐘後，小心緩慢地移除上清液，再加入等體積之 70% 酒精，置入冰浴約 10 分鐘；以 13,000 rpm 離心 20 分鐘，小心緩慢地移除上清液，輕輕倒扣離心管待自然風乾後，以適量之 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA, pH 8.0) 加以溶解 DNA 沉澱物，置於 4 $^{\circ}$ C 中備用。

附表

附表 1 使用於分析討論之 43 個真菌種類的子實體形態特徵鑑定及 rDNA 片段序列比對結果

App. Table 1 The results from fruiting body morphological characteristics identification and rDNA sequences matching of the 43 specimens for comparison and discussion.

編號	菌株名稱	ITS 區域	18S rDNA 片段	28S rDNA 片段	rDNA 比對結果	determinants
R02	Corticiaceae	<i>Laxitextum bicolor</i>	<i>Laxitextum bicolor</i>	<i>Laxitextum bicolor</i>	<i>Laxitextum bicolor</i>	ITS, 18S, 28S
R03	<i>Coprinus radians</i>	<i>Coprinellus radians</i>	Agaricales	<i>Coprinellus radians</i>	<i>Coprinellus radians</i>	ITS, 28S
R05	<i>Trametes elegans</i>	<i>Trametes elegans</i>	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes elegans</i>	<i>Trametes elegans</i>	ITS, 28S
R07	Agaricales	<i>Clitopilus</i> sp.	Agaricales	<i>Clitopilus</i> sp.	<i>Clitopilus</i> sp.	ITS, 28S
R10	Polyporaceae	<i>Perenniporia</i> sp.	Polyporales	Polyporaceae	<i>Perenniporia</i> sp.	ITS
R14	Agaricales	<i>Psilocybe</i> sp.	<i>Psilocybe</i> sp.	<i>Melanotus subcuneiformis</i> ^a	<i>Melanotus subcuneiformis</i> ^{a,b}	28S
R17	<i>Daldinia eschscholzii</i>	<i>Daldinia eschscholzii</i>	×	<i>Daldinia</i> sp.	<i>Daldinia eschscholzii</i>	ITS
R19	Strophariaceae	<i>Psilocybe</i> sp.	<i>Psilocybe</i> sp.	<i>Melanotus subcuneiformis</i> ^a	<i>Melanotus subcuneiformis</i> ^{a,b}	28S
R20	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	×	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	ITS, 28S
R25	<i>Echinochaete russiceps</i>	<i>Echinochaete</i> sp.	Polyporales	Polyporaceae	<i>Echinochaete</i> sp.	ITS
R28	Polyporaceae	<i>Dichomitus</i> sp.	Polyporales	Polyporaceae	<i>Dichomitus</i> sp.	ITS
R29	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	ITS, 28S
R30	<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma</i> sp.	ITS, 18S, 28S

應用核糖體 DNA 片段鑑別木棲性大型真菌

R32	<i>Polyporus</i> sp.	<i>Perenniporia</i> sp.	Polyporales	<i>Perenniporia</i> sp.	<i>Perenniporia</i> sp.	ITS, 28S
R37	<i>Polyporus arcularis</i>	<i>Polyporus arcularius</i>	Polyporaceae	Polyporaceae	<i>Polyporus arcularis</i>	ITS
R39	<i>Gloeoporus dichrous</i>	<i>Gloeoporus dichrous</i>	unknown	<i>Gloeoporus dichrous</i>	<i>Gloeoporus dichrous</i>	ITS, 28S
R40	Corticiaceae	<i>Phlebia</i> sp.	<i>Phlebia</i> sp.	<i>Phlebia</i> sp.	<i>Phlebia</i> sp.	ITS, 18S, 28S
R41	Polyporaceae	<i>Ceriporia lacerata</i>	<i>Ceriporia</i> sp.	Polyporales	<i>Ceriporia lacerata</i> ^b	ITS
R42	<i>Trametes hirsuta</i> BCRC 35313	<i>Trametes hirsuta</i>	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes hirsuta</i>	<i>Trametes hirsuta</i>	ITS, 28S
R43	<i>Ganoderma lucidum</i> BCRC 36111	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	ITS, 18S, 28S
R45	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	ITS, 28S
R46	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Trametes elegans</i> (or <i>T. lactinea</i>)	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes lactinea</i> ^a	<i>Trametes lactinea</i> ^a	28S
R48	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes elegans</i> (or <i>T. lactinea</i>)	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes lactinea</i> ^a	<i>Trametes lactinea</i> ^a	28S
R50	<i>Gloeophyllum</i> sp.	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	ITS, 18S, 28S
R51	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	ITS, 18S, 28S
R55	<i>Microporus vernicipes</i>	Polyporaceae	Polyporales	Polyporales	Polyporaceae	ITS
R56	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Pycnoporus</i> sp.	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	ITS, 28S
R61	<i>Gymnopilus aeruginosus</i>	<i>Gymnopilus dilepis</i>	<i>Gymnopilus</i> sp.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	<i>Gymnopilus dilepis</i> ^b	ITS, 28S
R63	<i>Gymnopilus</i> sp.	<i>Gymnopilus</i> sp.	Agaricales	<i>Gymnopilus</i> sp.	<i>Gymnopilus</i> sp.	ITS, 28S
R72	Corticiaceae	<i>Resinicium friabile</i>	<i>Resinicium friabile</i>	<i>Resinicium friabile</i>	<i>Resinicium friabile</i> ^b	ITS, 18S, 28S

應用核糖體 DNA 片段鑑別木棲性大型真菌

R73	Corticiaceae	<i>Phlebia</i> sp.	<i>Phlebia</i> sp.	<i>Mycoaciella bispora</i> ^a	<i>Mycoaciella bispora</i> ^a	28S
R75	Hymenochaetales	<i>Phellinus</i> sp.	<i>Phellinus</i> sp.	<i>Phellinus</i> sp.	<i>Phellinus</i> sp.	ITS, 18S, 28S
R77	Polyporaceae	<i>Fomitopsis ostreiformis</i>	<i>Fomitopsis</i> sp.	<i>Fomitopsis ostreiformis</i>	<i>Fomitopsis ostreiformis</i> ^b	ITS, 28S
R78	<i>Panus fulvus</i>	Polyporales	<i>Panus</i> sp.	<i>Panus</i> sp. ^a	<i>Panus</i> sp.	ITS, 18S, 28S
R81	<i>Clitopilus</i> sp.	<i>Clitopilus prunulus</i>	Agaricales	<i>Clitopilus</i> sp.	<i>Clitopilus prunulus</i>	ITS
R82	<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Auricularia polytricha</i>	ITS, 18S, 28S
R83	Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	Pleosporales	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	18S
R86	<i>Microporus xanthopus</i>	<i>Microporus</i> sp.	<i>Microporus xanthopus</i>	<i>Microporus xanthopus</i>	<i>Microporus xanthopus</i>	18S, 28S
R87	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	<i>Irpex lacteus</i> ^a	<i>Irpex lacteus</i> ^a	ITS, 28S
R88	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreales	Hypocreales	Hypocreales	ITS, 18S, 28S
R90	Ascomycota	Hypocreales	×	Hypocreales	Hypocreales	ITS, 28S
R94	<i>Rigidoporus microporus</i>	Polyporales	<i>Rigidoporus</i> sp.	<i>Rigidoporus microporus</i> ^a	<i>Rigidoporus microporus</i>	28S
R95	<i>Steccherinum rhois</i>	Polyporaceae	<i>Steccherinum</i> sp.	<i>Steccherinum</i> sp. ^a	<i>Steccherinum</i> sp.	ITS, 18S, 28S

附註：× 號為無 PCR 產物；a 為 NCBI 之 Nucleotide BLAST 資料庫僅 28S rDNA(或僅少數)之資料供比對；b 為由序列比對結果得到之疑似新記錄種。

Notes: × denotes no PCR products; a denotes there were only 28S rDNA or limited data for matching in the NCBI nucleotide BLAST inventory; b denotes the possible neo species identified by rDNA sequences matching.