

前言

一、栓菌的簡介

栓菌 (*Trametes* Fr.) (圖 1-1、圖 1-2) 是廣泛分佈於全世界的木材腐朽菌，目前被記述的種類大約有 60 種 (Hawksworth *et al.*, 1995)；而台灣栓菌屬目前的調查研究有 21 種 (王也珍等, 1999；Wu and Ryvardeen, 2003)。

栓菌之擔子果 (basidiocarp) 為一年或兩年生，有菌蓋 (pileus)，呈殼狀半圓形 (dimidiate)，單片或覆瓦狀，新鮮時堅硬富韌性，菌蓋平滑或毛狀，顏色為白色、乳白、灰色、或棕白相間。孔口面 (pore surface) 發亮、白色至棕色，其顏色隨時間變淡，孔口邊緣為鋸齒狀，少數種類則呈齒狀 (dentated)、迷路狀 (daedaleoid) 或褶狀 (lamellate)。菌肉層 (context) 堅硬如木質，白色至乳白或稻桿色，孔管 (tube) 不分層。三系菌絲 (trimitic)，生殖菌絲 (generative hypha) 含扣子體 (clamp connection)，纏繞菌絲 (binding hypha) 與骨骼菌絲 (skeletal hypha) 厚壁無色，孢子 (basidiospore) 呈橢圓形，常著生於闊葉樹，少在針葉樹發現 (Ryvarden and Johansen, 1980)。

二、雲芝的形態介紹

雲芝 *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát 又稱為彩絨栓菌 (吳聲華等, 2002、圖 2)，根據 Alexopoulos *et al.* (1996)，其分類地位為：

真菌界 (Fungi)

擔子菌門 (Basidiomycota)

帽菌綱 (Hymenomycetes)

無褶菌目 (Aphyllophorales)

多孔菌科 (Polyporaceae)

栓菌屬 (*Trametes*)

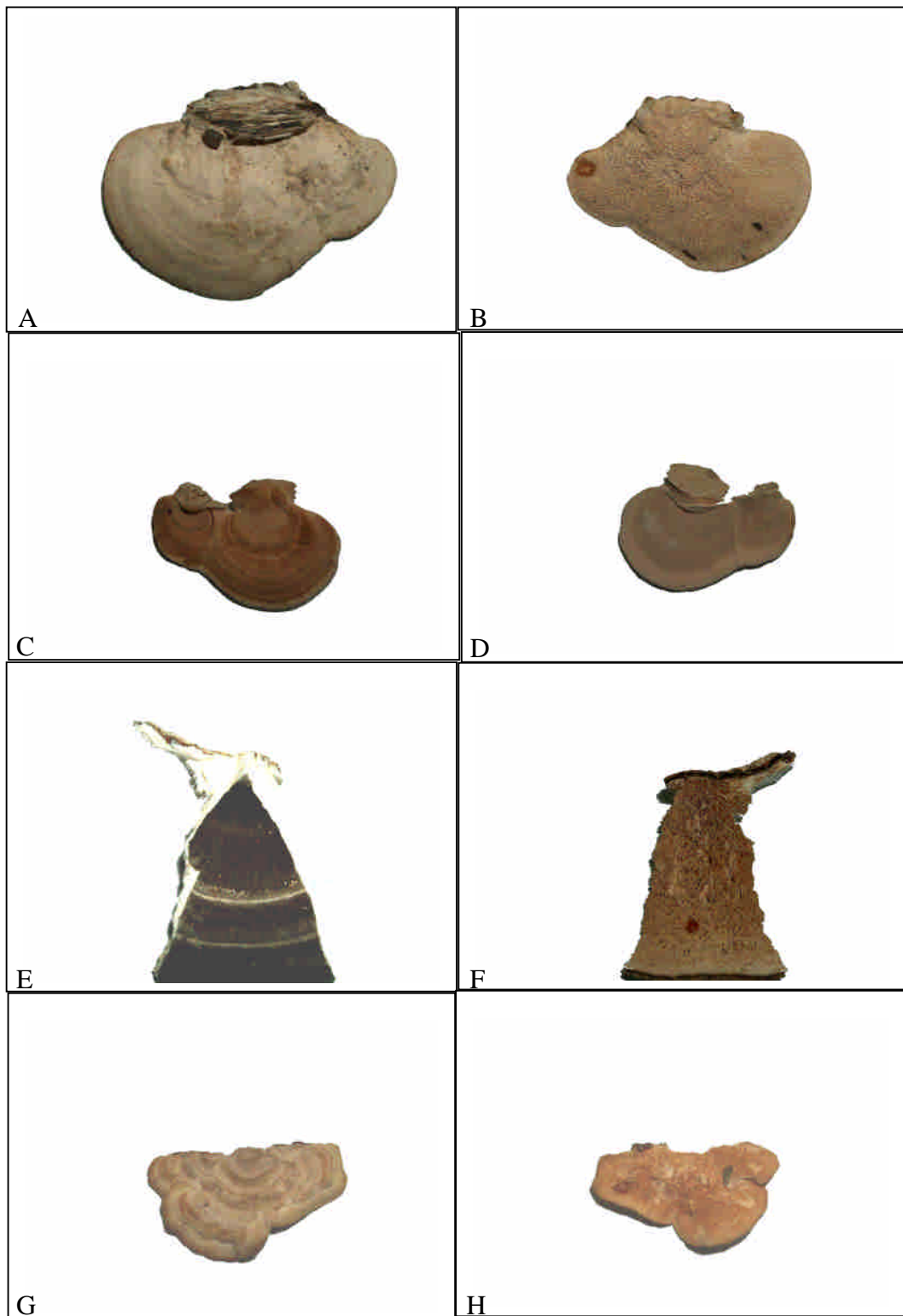


圖 1-1. 幾種本實驗使用之栓菌 (*Trametes*) 標本的子實體正反面形態，A 和 B：*T. elegans*；C 和 D：*T. feei*；E 和 F：*T. gibbosa*；G 和 H：*T. hirsuta*，標本為國立自然科學博物館館藏

Fig. 1-1. Morphology of fruiting bodies of some species of *Trametes* from National Meseum of Natural Science in Taiwan, A and B：*T. elegans*；C and D：*T. feei*；E and F：*T. gibbosa*；G and H：*T. hirsuta*.

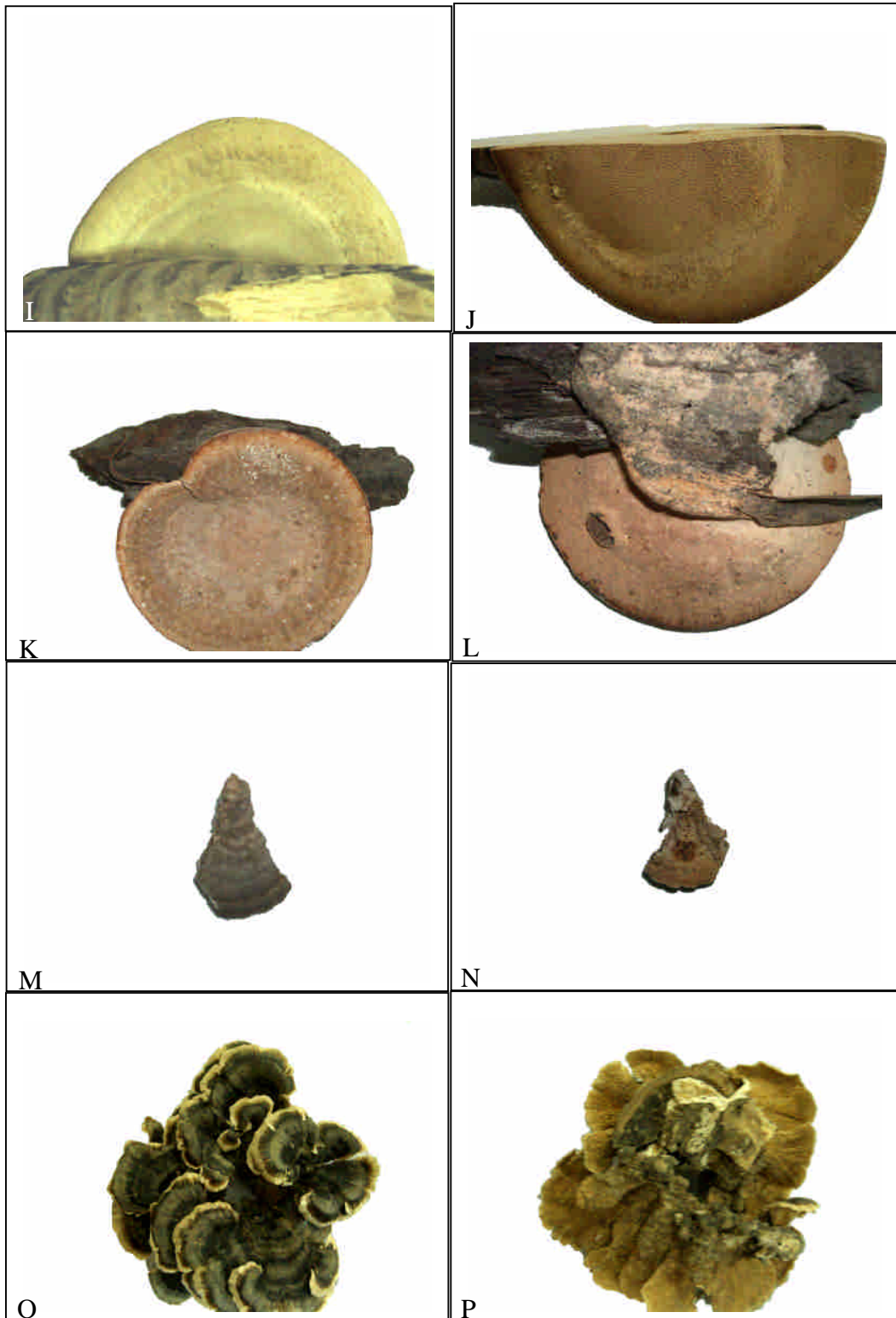


圖 1-2. 幾種本實驗使用之栓菌 (*Trametes*) 標本的子實體正反面形態, I 和 J : *T. lactinea* ; K 和 L : *T. orientalis* ; M 和 N : *T. pubscens*, ; O 和 P : *T. versicolor*, 標本為國立自然科學博物館館藏

Fig. 1-2. Morphology of fruiting bodies of some species of *Trametes* from National Meseum of Natural Science, **I and J** : *T. lactinea* ; **K and L** : *T. orientalis* ; **M and N** : *T. pubscens*, ; **O and P** : *T. versicolor*.

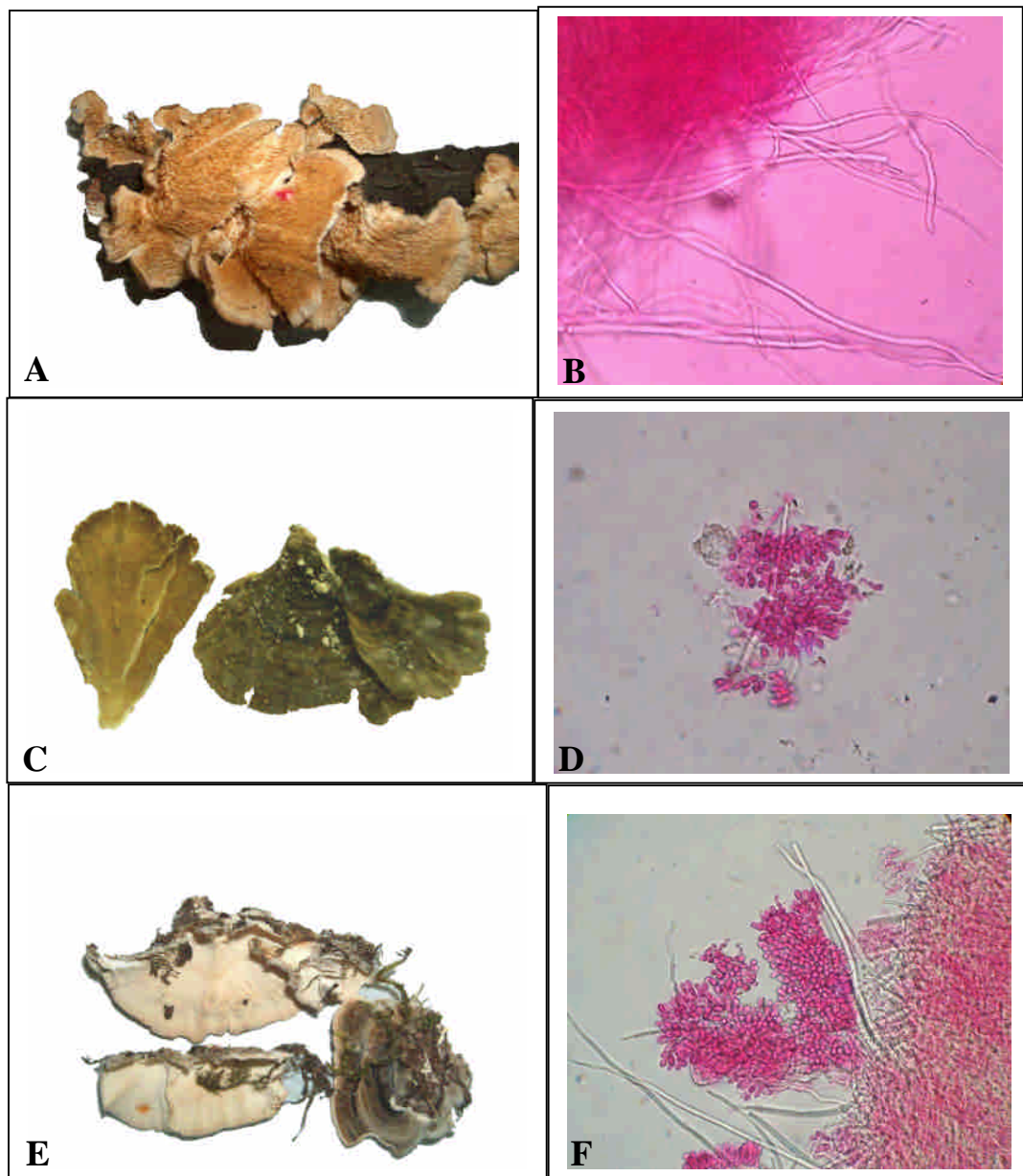


圖 2. 雲芝 (*Trametes versicolor*) 子實體及菌絲形態，**A** 和 **B** 菌株編號 Wu9507-7，**C** 和 **D** 菌株編號 Chen728，**E** 和 **F** 菌株編號 Wu0211-49，以上三個標本均為國立自然科學博物館館藏

Fig. 2. Morphology of fruiting bodies and hyphae of *Trametes versicolor* from National Museum of Natural Science. The specimen number of **A** and **B**, **C** and **D**, **E** and **F** are Wu 9507-7, Chen728, and Wu0211-49, respectively.

雲芝是著名的藥用真菌，為世界廣泛分布種，而以北半球溫帶地區較常見，菌蓋表面長絨毛，黑灰色，棕灰色，棕褐色或黃褐色等多種顏色相間組成之同心環帶，是林地鑑定的依據（張東柱等，2000）。子實體起初扁平形而後邊緣迅速捲起呈貝殼狀或半圓傘形，子實層孔狀，孔口呈圓形至角形，每公釐 5-6 孔，末端呈鋸齒狀；三系菌絲，生殖菌絲含孢子體，生殖、骨骼與纏繞菌絲皆無色，徑寬各為 2-3 微米、2.5-5 微米、2-4 微米；擔子棒狀，為四孢形，擔孢子圓柱形，略彎曲，平滑，薄壁 5.5-6.5×1.8-2.2 微米（吳聲華等，1996）。大陸地區也有形態上的相關描述，子實體常成群著生於枯木上，雲芝菌蓋革質且成瓦狀，無柄或平伏而反卷，半圓形至貝殼狀不等，往往相互連接，長徑 1 至 10cm，短徑 1 至 6cm，厚 1 至 3mm，有細絨毛且顏色多樣，狹窄的同心環帶，邊緣薄，完整或波狀，菌肉為白色，厚 0.5 至 1mm，菌管 0.5 至 2mm；管口圓形，每 mm 3 至 5 個，白色、淺黃至黑色（劉波，1981），其子實體大小形態及色澤常因寄主樹種或棲地環境之不同而有所差異。

三、雲芝的醫學效用

雲芝含 krestin（雲芝素）或稱 PSK（Polysaccharide K），是一種醣蛋白（ β -glucan protein），為一多醣類抗腫瘤製劑，能使帶 B16 黑色素細胞瘤(melanoma) 的 C57BL/62k 老鼠透過活化 T 細胞和巨噬細胞的機制，延長老鼠的壽命（Matsunaga *et al.*, 1994），若與化學治療藥物共同使用時，T4/T8 淋巴球細胞比例顯著增加，可減少化療藥物所產生的副作用（Kikuchi *et al.*, 1988），另外，經放射線治療的肺癌病人連續服用雲芝素 5 年，其存活率 39% 明顯高於未服用的患者 16%（Hayakawa *et al.*, 1993）。諸多臨床實例顯示出雲芝素確有其功效。由以上臨床實驗可對雲芝素的藥用特性做出歸論：

1. 刺激免疫系統，活化免疫細胞
2. 減緩及穩定癌症病情，增加存活率
3. 舒緩化學治療及放射療法的副作用

不只雲芝有藥用價值，同為栓菌屬的 *Tramete elegans*, *T. gibbosa*, *T. hirsuta* 等也曾報導具有除風濕、療肺病、止咳、化膿、活化免疫及抑制腫瘤等功效（應建浙等，1987），而除了體內實驗證明療效外，這些抗腫瘤藥物也同時具有抗微生物活性；lentinan（ β - glucan）能有效對抗結合桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）及單核球增多性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）兩種引起人類肺結核和人畜共通傳染病的細菌（Chihara, 1992），而 PSK 則是在抗大腸桿菌（*Escherichia coli*）、念珠菌（*Candida*）等有明顯效用（Tsukagoshi *et al.*, 1984；Wang *et al.*, 1996）。

四、栓菌屬的分類

栓菌是多孔菌的一群，過去在多孔菌類的分類上大多以形態特徵，像是菌蓋（basidiocarp）的形狀、菌絲系（hyphal system）、擔孢子（basidiospore）的大小和形狀、寄生樹種和腐朽型等（Donk, 1964；Ryvarden, 1991）。而要藉由三系菌絲的特徵將栓菌屬（*Trametes*）由其他近緣屬區中區分出來並不容易，屬間的界線是相當模糊的（Ko and Jung, 1999）。由於形態特徵上有許多重疊的地方，導致多孔菌的分類有些模糊不清，對研究相關分類的真菌學家造成困擾（Alexopolus *et al.*, 1996；Hibbett and Donoghue, 1995）。

栓菌的屬名在 1836 年首先被提到，而到 1838 年被認同（Donk, 1959）。早期 Jülich（1981）對擔子菌門下的分類地位做了調整，他將 *Cerrena*, *Corioloopsis*, *Datronia*, *Lenzites*, *Pycnoporus*, *Trametes* 和 *Tricaptum* 7 個屬歸類於革蓋菌目（Coriolales）下的革蓋菌科（Coriolaceae），此時栓菌屬（*Trametes*）隸屬於革蓋菌科（Coriolaceae）。後來 Corner（1989）發現了許多熱帶的物種有中間型的特徵，並且認為顏色和腐朽形態並不能將三系菌絲擔子菌中的各屬分門別類，例如 *T. pubescens* 和 *Corioloopsis polyzona* 在子實體乾枯老化、白色菌肉變成為赭紅色後便難以區分，於是他將 13 個屬一併認為是栓菌屬的同物異名。

Ryvarden（1991）則認為以菌絲系為主要的分類依據，多孔菌科可分為 11

群；若是再加上白色腐朽為分類條件的話，共有 16 個屬被歸類在栓菌群(*Trametes* group)，分別為 *Cerrena*, *Corioloopsis*, *Cryptoporus*, *Daedaleopsis*, *Datronia*, *Earliella*, *Elmerina*, *Fomitella*, *Hexagonia*, *Lenzites*, *Megasporoporia*, *Microporus*, *Mollicarpus*, *Pycnoporus*, *Trametes* 和 *Trichaptum*。這一群真菌有相同的形態特徵：平滑，無色透明、薄壁、柱狀、無澱粉粒、無糊精質反應的孢子，沒有真正的子實層囊狀體 (no true hymenial cystidium)，白色腐朽 (white rotting) 以及四孢型 (tetraspores)。此時栓菌屬 (*Trametes*) 才又正式獨立成一個屬，並且隸屬於多孔菌科 (Polyporaceae)。

經由過去學者對栓菌屬的分類定義可以知道，栓菌的分類地位一直在處在模糊的狀態，雖然現在栓菌的分類主要採用 Ryvar den (1991) 的分類系統，但是有一些問題仍然存在。例如 *T. consors* 原本歸類在革蓋菌屬 (*Corioloopsis*) 中，學名為 *C. consors*，但是卻因為外部、形態培養與栓菌類似而被認為是栓菌的一員；*T. trogii* 在以 partial mitochondrial small subunit rDNA 為 marker 下模擬的演化樹，結果顯示其親緣關係和 *C. gallacir* 較為接近而不與栓菌屬形成共系群 (Ko and Jung, 1999.)。另外，栓菌屬和革蓋菌屬在分類上只能以菌蓋顏色這項特徵來區分 (Ryvar den, 1991)，可見栓菌和其他近緣屬間的分類與親緣關係有待進一步釐清。

五、研究目的

根據過去真菌相關研究者的分類系統，栓菌與其他多孔菌和革蓋菌間有著尚未清楚的分類關係，因此本實驗想要探討栓菌屬在多孔菌科和革蓋菌科之間的演化地位，進而了解栓菌種間與雲芝種內之親緣關係。雲芝 (*Trametes versicolor*) 的分布海拔差異性大，常因棲地環境的不同而產生不同顏色或外形的子實體，因此能藉由本實驗探討雲芝是否具種內初步分化的現象。

現今真菌分類的研究中，分子系統生物學已經變成一個重要的分類工具。有許多分子生物學的方法，諸如 DNA-DNA 雜合 (hybridization)、限制片段長度

多型性 (RFLP)、DNA 定序分析 (DNA sequencing analysis) 等，而截至目前為止，咸信胺基酸與 DNA 定序的親緣關係之分析是最可靠的分析法 (Bruns *et al.*, 1991)。而核糖體 DNA (rDNA) 在分析擔子菌的演化現象上是具有價值性的序列 (Hughes *et al.*, 1999; Isikhuemhen *et al.*, 2000; Moncalvo *et al.*, 2000) 目前最廣為被分析的基因有 18S, 28S, ITS (internal transcribed spacer) 以及 mitochondrial rDNA。18S 是一段保守的基因，常被用來分析真菌較高分類階層的親緣關係，譬如綱或目 (Swann and Taylor, 1993.)。ITS 基因有相當大的變異，而被用在分析「屬」這個階層 (Moncalvo *et al.*, 1995a, b; Yan *et al.*, 1995)。mt SSU rDNA (mitochondrial small subunit ribosomal DNA) 的演化速率相比 18S 快 16 倍，但是其變異程度比 ITS 要小 (Bruns and Szaro, 1992.)，因此可以用來彌補 18S 和 ITS 分析上的不足。

根據前人研究發現，ITS1 的變異度比 ITS2 大 (Berbee *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1995; Morales, *et al.*, 1995)，因此，Jasalavich 等人 (1995) 提出，ITS I 的變異度適用於分析種 (species) 的階層，而 ITS II 則適用於分析屬 (genus) 的階層。此外，rDNA 大多是以 10kb 大小的隨意重複單位 (tandem repeat unit) 所構成，而以 60~200 次重複出現在單倍體 (haploid) 的真菌基因組上 (genome) (Garber *et al.*, 1988; Vilgalys and Gonzales, 1990)，由於此片段具有重複性，可增加偵測的靈敏度，因此目前許多真菌應用 rDNA 的內轉錄區 (ITS) 於物種間親源關係的鑑定分析為可行的方法 (Berbee *et al.*, 1995; Chippindale & Wiens, 1994; Chou & Wu, 2002; Dirk *et al.*, 1999; Francoise *et al.*, 2002; Garber *et al.*, 1988; Grameme *et al.*, 2002; Hofstetter *et al.*, 2002; Moncalvo *et al.*, 1995; Redecker *et al.*, 1999; Takaiwa *et al.*, 1985; Vilgalys and Gonzales, 1990)。但此片段的重複數多，每一個基因單位就如同個體一般會隨機演化，也因此會發生在同一個體內，不同的 ITS1-5.8S-ITS2 片段有些許甚至頗大的差異。雖然一群 ITS 片段的是呈現出均質化的演化 (Hill and Dixon, 1991.)，但是一些例子則顯示出一個個體可以同時擁有不同變異的 ITS 序列 (Garranza *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Fatehi

and Bridge, 1998.) 彼此間的差異程度甚低導致在解序的過程中，某些區間的核苷酸序號無法辨識或定序錯誤，或是不同源的片段出發點不同，比較的是非同源序列 (nonhomologous sequence)，對於之後的序列分析會造成一定程度的誤差，往往對演化或族群的解釋變得不客觀，因此必須找出能取代此片段的保守性序列，對於往後在演化的相關研究上能更正確地去解釋親緣關係。

粒線體基因 (mitochondrial DNA) 廣泛被用來研究真核生物的演化，本實驗除了以 ITS，另外以部分粒線體次單位核糖體基因 (Partial mitochondrial small subunit rDNA) 為標記進行分析，mitochondrial small subunit rDNA (mt SSU rDNA) 是存在於粒線體的核糖體基因；除了大部分的蛋白質是細胞供應外，粒線體本身也會製造少部分的蛋白質，因此也會有核糖體基因用來製造蛋白質合成的平台。

本實驗所用的 MS1, MS2 primer 與 ITS1, ITS4 一樣也是專一性真菌用普遍引子，MS1, MS2 所增幅出來的片段並非 mt SSU rDNA 的全長，而是部分片段，長約 500~600bp 左右，用來作為分析親緣關係頗為適當。在分析大尺度階層的親緣關係時，以 mt SSU rDNA 為 marker 要比 ITS 來的更佳。mt SSU rDNA 不像 ITS 具有許多重複片段，容易在定序過程中發生訊號重疊而無法判讀的現象，mt SSU rDNA 只有一套，因此有更加的正確性，建構出來的演化樹能更接近實際情況。