



前言

壹、細胞黏菌的簡介

一、細胞黏菌發現和分類地位

西元 1869 年，德國真菌學家 Oskar Brefeld 觀察馬糞中真菌相時，發現一種與真菌中的毛黴(*mucor mucedo*)類似的生物，但因孢子萌發並無菌絲產生，而孢子囊堆(*sorus*)也無外壁(*enveloping walls*)，故將其命名為 *Dictyostelium mucoroids*，此為最早被命名的細胞黏菌。

西元 1880 年，生物學家 van Tieghem 注意到 *D. mucoroids* 的黏菌變形細胞在聚集時期，並未產生如黏菌(*Myxomycetes*)細胞融合的現象，每個細胞仍然是獨立的細胞。van Tieghem 稱此種由黏菌變形細胞聚集而成一團多細胞的構造為偽原生質體(*pseudoplasmodium*)，而細胞黏菌(*cellular slime mold*)的名稱也是因此構造的意義而命名。

細胞黏菌由於其特殊的生活史，在分類學上的地位一直不穩定，有時置於動物界，有時置於植物界。1956 年 Copeland 將生物分成四界，即動物、植物、原生生物及原核生物界。他將細胞黏菌歸在原生生物界(*Kingdom Protista*)原生動物門(*Phylum Protoplasta*)中。1969 年 Whittaker 創生物五界之說，增加了真菌界(*Kingdom Fungi*)，細胞黏菌被置於真菌界的裸菌亞界(*Subkingdom Gymnomycota*)中的細胞黏菌門(*Phylum Acrasiomycota*)，與真黏菌門(*Phylum Myxomycota*)並列。

1975 年 Olive 依據細胞黏菌具有動物性的營養期而將細胞黏菌放在原生生物界中，並將原生生物界分為兩門，一個是真原生動物門(*Phylum Euprotista*)，包括原生動物和藻類；另一門為裸菌門(*Phylum Gymnomyxa*)，包括黏菌、細胞黏菌和其他相關生物。

根據 Olive (1975) 的分類系統，細胞黏菌的分類階層如下：

原生生物界(*Kingdom Protista*)

裸菌門(*Phylum Gymnomyxa*)

動物菌亞門(*Subphylum Mycetozoa*)

真動物菌綱(*Class Eumycetozoa*)

網柱細胞黏菌亞綱(*Subclass Dictyostelia*)

集胞細胞黏菌綱 (Class Acrasea)

根據此分類系統，其中集胞細胞黏菌綱和網柱細胞黏菌亞綱，由於皆會產生由黏菌變形細胞構成的偽原生質體，都被稱做細胞黏菌 (cellular slime molds)，但是因集胞細胞黏菌綱的黏菌變形細胞具有葉狀偽足 (lobose pseudopodia)，又被稱為 acrasid cellular slime molds (集胞細胞黏菌)；而網柱細胞黏菌亞綱的黏菌變形細胞則是具有絲狀偽足 (filose pseudopodia)，且孢子囊柄是細胞排列成網狀的構造，因此特稱為 dictyostelid cellular slime molds (網柱細胞黏菌)。

其中網柱細胞黏菌亞綱 (Subclass Dictyostelia) 含有 1 目 2 科 4 屬。除 *Coenonia denticulata* 此單屬單種由 van Tieghem 於 1884 年鑑定發表後，不再為他人所採得

(Alexopoulos, *et al.*, 1996)；網柱細胞黏菌目 (Order Dictyosteliida) 其餘二科三屬如下：

纖管細胞黏菌科 (Acytosteliidae)

纖管細胞黏菌屬 (*Acytostelium*)

網柱細胞黏菌科 (Dictyosteliidae)

網柱細胞黏菌屬 (*Dictyostelium*)

輪生細胞黏菌屬 (*Polysphondylium*)

其中纖管細胞黏菌屬種類及數量較少；而同屬於網柱細胞黏菌科的網柱細胞黏菌屬和輪生細胞黏菌屬則廣泛分布於自然界中。目前上述兩屬種類已被記述的約有 70 餘種 (Brefeld, 1869; Singh, 1947; Cavender and Raper, 1965, 1968; Bonner, 1967; Anderson *et al.*, 1968; Cavender, 1970, 1973, 1976, 1978; Hagiwara, 1989, 1990, 1991; Cavender *et al.*, 1995, 2002; Yeh and Chien, 1983; Hagiwara *et al.*, 1992; Vadell *et al.*, 1995, 1998; Swanson *et al.*, 1999, Hodgson and Wheller, 2001; Cavender *et al.*, 2002)。這兩科三屬的種類的形態主要的分別在於纖管網柱細胞黏菌科的種類孢子囊體的柄為非細胞的構造，而網柱細胞黏菌科則由細胞構成 (Olive, 1975; Raper, 1984)。網柱細胞黏菌屬和輪生細胞黏菌屬主要的差別在於後者具有規則的輪狀分枝，而前者無 (Brefeld, 1884)。

二、細胞黏菌的生活史

細胞黏菌是一群構造簡單的低等的真核生物 (eukaryotes) , 屬於原生生物界 (Kingdom Protista) , 生活史可明顯表現出二個時期: 動物性營養期(vegetative or trophic stage) 和植物性的子實體期 (fruiting stage) 。 動物性營養期: 是黏菌變形細胞期, 特徵為不具細胞壁, 只有原生質膜, 含有單個細胞核及單套染色體, 可伸出偽足 (pseudopodium) 攝取細菌、酵母菌或真菌的分生孢子 (conidia) 為營養來源, 再進行有絲分裂 (mitosis) 增殖。

植物性的子實體期: 包括聚集現象 (Acumination) 偽原生質體時期以及孢子囊體 (sorocarp) 時期。

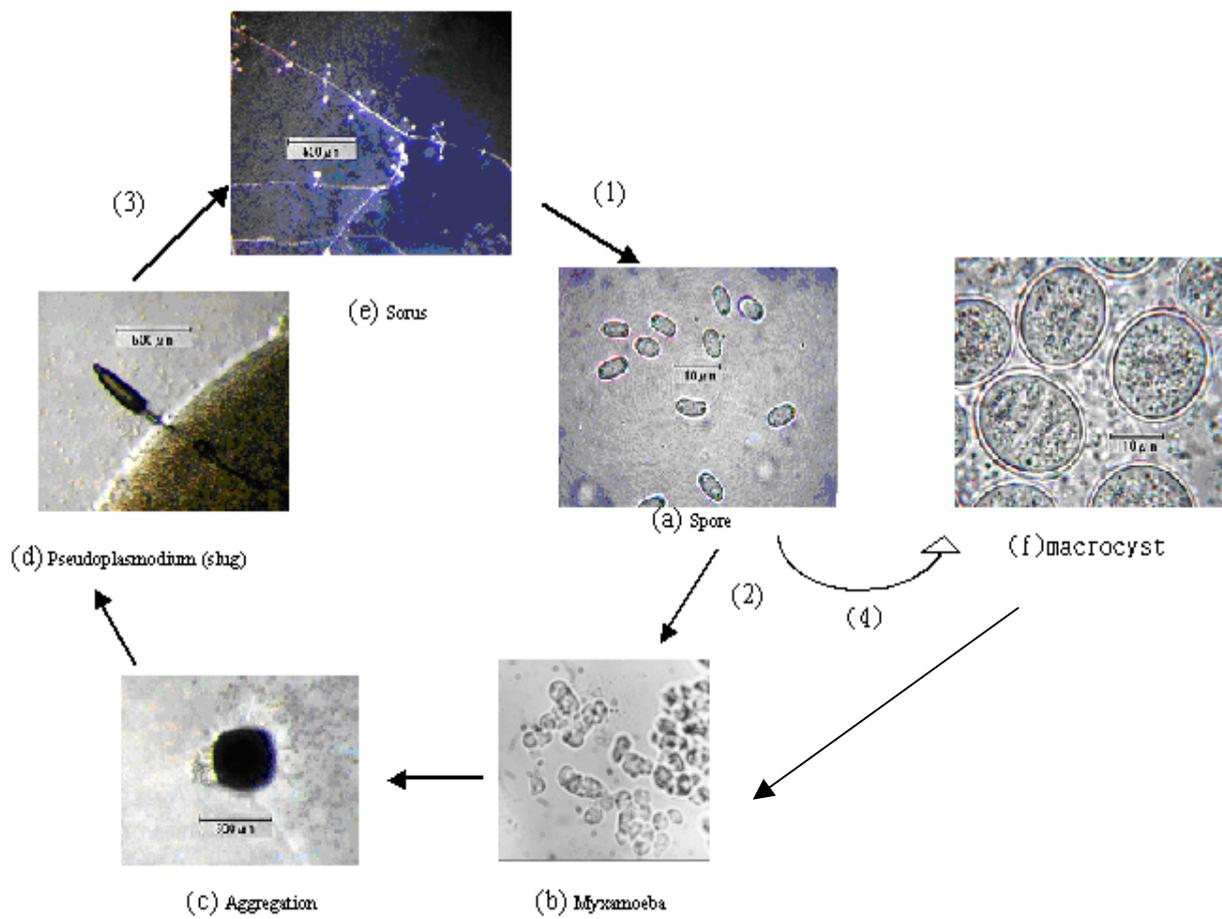
1. 聚集現象: 當黏菌變形細胞增殖的數量達某一階段時, 在聚集中心的黏菌變形細胞開始分泌某些化學物質, 使周圍的黏菌變形細胞受到這些物質的吸引而聚集, 再形成偽原生質體。這類可以使黏菌變形細胞聚集的化學物質亦稱為誘菌質 (acrasin) , 例如: 由 *D. discoideum*, *D. mucoroides*, *D. purpureum* 及 *D. rosarium* 等種類所分泌的 cAMP (cyclic AMP) 以及由 *Polysphondylium violaceum* 等釋放的化學物質 glorin (一種 dipeptide) 都是能使黏菌變形細胞誘引聚集而形成偽原生質體的誘菌質 (Hagiwara, 1989) 。
2. 偽原生質體時期: 這時黏菌變形細胞仍然各自保有其獨立的特性, 每個黏菌變形細胞的原生質膜並不融合, 而且能在水中分散成個別的細胞, 保有細胞的獨立性。因此和真黏菌 (true slime molds) 會形成多核的原生質體 (plasmodium) 有著極大的不同。大多數細胞黏菌的偽原生質體會發生轉移 (migration) 位置的現象, 並且在轉移時會產生長柄 (stalk) 。
3. 孢子囊體時期: 偽原生質體在轉移完成後即形成孢子囊體, 在末端有一個孢子囊堆 (sorus) , 用以支持孢子囊堆的長柄稱為孢子囊柄 (sorophore) , 通常是由許多薄壁狀的細胞所組成。孢子囊堆內含有許多孢子 (spore) , 孢子掉落後萌發又可形成黏菌變形細胞。

細胞黏菌的孢子囊體長度多半自 0.2 mm 到數 mm 之間, 大多數種類為無色, 少數

帶有紫、黃、褐等色素。有些細胞黏菌的孢子囊柄具有分枝，例如輪生細胞黏菌屬具有輪狀分枝，而網柱細胞黏菌屬多不具分枝或僅有不規則分枝。孢子與孢子囊堆的大小沒有絕對的相關。細胞黏菌的孢子多半為橢圓形（elliptical）或長橢圓形（oblong），僅有少數種類（例如：*D. lacteum* 和 *D. rosarium*）具有圓球形（spherical）的孢子。孢子多為透明無色，僅少數種類的孢子帶有紫色、黃色、褐色等顏色，外表由纖維質（cellulose）構成的細胞壁光滑且具有黏性物質（slime substance）（Hagiwara, 1989）。

在光學顯微鏡下觀察，有許多種類的細胞黏菌的孢子在兩端或有時在較靠近中央的位置會具有能折射光線的顆粒，稱為極粒（polar granule；PG）（Traub and Hohl, 1976）。Traub and Hohl 發現不具有極粒【PG(-)】的種類，例如：*D. mucoroides* 等，其黏菌變形細胞對 cAMP 具有趨化反應（chemotactic response），能以 cAMP 做為其誘菌質；而具有明顯極粒【PG(+)]的種類，例如目前所知的輪生細胞黏菌屬的種類，則對 cAMP 不具趨化反應。因此，極粒的存在與否，可視為細胞黏菌分類鑑定上一個穩定且容易觀察到的特徵（Hagiwara, 1989）。

某些細胞黏菌能形成由許多黏菌變形細胞融合而具有厚壁構造的大胞囊（macrocyt）。首先，有二個黏菌變形細胞會出現配對融合現象，形成巨大細胞（giant cell），並且開始吞噬周圍的其他黏菌變形細胞，使得巨大細胞逐漸增大，最後形成大胞囊。在形成大胞囊的過程中，巨大細胞會於細胞膜外先產生一層疏鬆的初生細胞壁（primary wall），然後在內側再產生一層堅韌的次級壁（secondary wall），最後才在內層產生具有彈性的第三級壁（tertiary wall），此時這個具有三層厚壁的構造即是成熟的大胞囊（Nickerson and Raper, 1973a；Kawakami and Hagiwara, 1999）。剛開始由兩個黏菌變形細胞融合而成的巨大細胞是雙核的二倍體（diploid）細胞，在形成大胞囊的時候，先進行減數分裂（meiosis）產生單倍體（haploid）細胞，再進行多次的有絲分裂（mitosis）複製大量的細胞核，在經過數週或數月的休眠時期後，開始進行細胞質分裂（cytoplasmic cleavage），最終形成許多單核的黏菌變形細胞，之後大胞囊的細胞壁破裂而釋放出大量的黏菌變形細胞，再繼續行營養時期的生活史（葉增勇，1982；Nickerson and Raper, 1973b）。由於大胞囊在形成過程中有減數分裂的過程，學者多認為大胞囊的產生是細胞黏菌具有有性生殖（sexual reproduction）的現象。



圖一、細胞黏菌的生活史（以本實驗所採之 Hue1802PF 樣本為代表）

Fig. 1. Life cycle of the Dictyosteliidae(Sampling from Hue1802PF strain).

- (1)孢子萌發 (spore germination)
- (2)細胞黏菌變形細胞聚集 (myxamoeboid acumination)
- (3)孢子囊體發育期 (development of sorocarps)
- (4)大孢囊時期 (macrocyst stage)

貳：輪生細胞黏菌 (*Polysphondylium*) 的形態研究

一、網柱細胞黏菌科 (*Dictyosteliidae*) 的形態分類

網柱細胞黏菌科之種類在形態的分類上，通常可用下列所敘特徵做為分類依據。

1. 孢子(spore)的大小、形狀、極粒(polar granules)的有無及形態。(附錄圖一)
2. 孢子囊堆(sori)的顏色。
3. 孢子囊體(sorocarp)的長短。
4. 孢子囊柄末端(tip) 的型式。(附錄圖二)
5. 孢子囊體基部 (base)的型式。(附錄圖三)
6. 聚集(Acumination or acumination) 的形式 (附錄圖四)
7. 生長形態是否對稱。



圖二、孢子囊體的對稱性。(左:對稱; 右:不對稱)

Fig. 2. The symmertry of sorophore (Left :symmertry; Right:asymmetry).

8. 其他。

而在輪生細胞黏菌屬(*Polysphondylium*)中各種，通常則用下列特徵做為分類依據。

- 1、孢子囊體的分節 (node) 數目。
- 2、孢子囊體每節分枝 (branch per whorle) 的數目。
- 3、孢子囊體末節 (terminal segment) 的長短。

目前全世界已發表之輪生細胞黏菌種類共有 12 種(Hagiwara 1989; Vadell & Cavender 1998; Hogson & Wheller 2001; Cavender *et al.* 2002)，茲將它們的形態特徵資料彙整如表一，檢索表整理如表二。

表一、全世界已發表之輪生細胞黏菌形態特徵資料

Table 1. Morphological data of *Polysphondylium* published in the world

	Node	Brch/ Whole	Brch/ Length (μ m)	Terminal Segment (μ m)	Stalk/Sori color	Sori size (μ m)	Spore (μ m) L/W	Spore granules	Sorocarp length(mm)	Base Length (μ m)	Habitat	Acumination
<i>P. pallidum</i> Olive (Hagiwara 1989)	1-11	2-6	172- 300	W:2-5	Colorless /white	40-170	6.0-8.2 3.4-4.6	Uncon- solidated	1.91- 7.3	10-32	Solitary;cluste red; prostrate	Violaceum type
<i>P. candidum</i> Hagiwara (Hagiwara 1989)	1-6 2Br	2-10	268-3 96	W:3-8	Colorless /white	30-130	8.0-11.4 3.7-5.5	Uncon- solidated	0.3- 7.02	12.5-52. 5	Prostrate	Violaceum type
<i>P. pseudo-candidum</i> Hagiwara (Hagiwara 1989)	1-5 2Br	2-8	100-2 58	L: 700- 5000	Colorless /white	20-110	6.2-7.9 3.0-3.7	Uncon- solidated	0.7- 3.73	10.0-32. 5	Erect	Violaceum type
<i>P. tenussium</i> Hagiwara (Hagiwara 1989)	3-14	1-10	108-2 46	L:310-706 W; 2-5.5	colorless	20-70	5.0-6.2 2.7-3.5	Uncon- solidated	2.41-11.6 1	10-40	Prostrate	Violaceum type
<i>P. filamentosum</i> Cavender (Hagiwara 1989)	2-4 2Br	2-3	268-3 96	W: 5	Colorless /white	30-70	7.2-11.5 3.6-5.15	Uncon- solidated	6-15	26	Erect	Violaceum type
<i>P. acuminatum</i> Cavender (Vadell & Cavender 1998)	1-8	1-5	80-13 0	L: 600-800	Pale vin	50	6.5 3.5	Con- solidated	3-8	30	Solitary,erect or prostrate	Violaceum or mucoroid type
<i>P. asymmetricum</i> Cavender (Vadell & Cavender 1998)	5-10	2-4	80-22 0	L: 240	Yellow White	65	6.8 3.9	Uncon- solidated	2-5.5	?	Clustered	Violaceum type
<i>P. colligatum</i> Cavender (Vadell & Cavender 1998)	4-15	1-5	80-13 0	L: 200-300	Yellow~ Brown/Wt	55	5.5 3.6	Uncon- solidated	4-10	30-60	Clustered	Violaceum or mucoroid type
<i>P. violaceum</i> Brefeld (Vadell & Cavender 1998)	3-8	2-5	130- 300	L: 400-800	Vin/Dark viol	90	5.25 3.5	Con- solidated	3.-6.5	30-40	Erect or prostrate	Violaceum type
<i>P. tikaliensis</i> Cavender (Cavender 1998)	7-25	2-4	50-12 0	L: 400-600	White or cream	40	5.6 3.35	Uncon- solidated	1.8-8	?	Erect or prostrate	Violaceum type
<i>P. aureum</i> Hodgson (Hogson & Wheller 2001)	2-13	2-7	40-27 0	W: 7-18 L:460-760	Pale yellow	25-70	4.5-7.0 2.5-4.0	Uncon- solidated	3-4	18-40	?	Violaceum type
<i>P. anisocaula</i> Cavender (Cavender <i>et al.</i> 2002)	1-7	2-6	90-20 0	W: 2-5	Colorless /White	20-80	5-10 3-5.5	Uncon- solidated	0.8-1.5	15-40	Erect or prostrate	Violaceum type

表二、全世界已發表之輪生細胞黏菌檢索表

Table 2. Key to the *Polysphondylium* published in the world

1 孢子囊堆非白色-----	2
孢子囊堆為透明至白色-----	3
2 孢子囊堆淡黃色-----	<i>P. aureum</i> Hogson & Wheller
孢子囊堆紫色-----	4
3 孢子囊體末端加長-----	5
孢子囊體末端未加長-----	8
4 孢子囊堆淺紫色，同型大孢囊-----	<i>P. acuminatum</i> Cavender
孢子囊堆深紫色，多為非同型大孢囊-----	<i>P. violaceum</i> Brefeld
5 分節數目多 (3-25)-----	<i>P. tikaliensis</i> Cavender
分節數目較少(1-13)-----	6
6 中型孢子(7×3.3μm)，分枝短(173±32μm)-----	<i>P. pseudo-candidum</i> Hagiwara
大型孢子(9.4×4.0-5.0μm)，分枝長(200-600μm)-----	7
7 有次級分枝，每節分枝數平均 = 3-----	<i>P. filamentosum</i> Cavender
次級分枝少，每節分枝數平均 = 3-----	<i>P. candidum</i> Hagiwara
8 孢子囊體形態對稱-----	9
孢子囊體形態不對稱-----	10
9 孢子囊體較短，約 0.8-1.5mm-----	<i>P. anisocaula</i> Cavender
孢子囊體較長，1.9-11.6mm-----	11
10 孢子囊體顏色為黃至棕色-----	<i>P. colligatum</i> Cavender
孢子囊體顏色為黃至白色-----	<i>P. asymmetricum</i> Cavender
11 小型孢子(5.65×3.15)，分枝短(169±33μm)-----	<i>P. tenuissimum</i> Hagiwara
中型孢子(7*4μm)，分枝中等(238±62μm)-----	<i>P. pallidum</i> Olive

二、台灣輪生細胞黏菌的研究現況

在台灣有關輪生細胞黏菌的研究，最早於 1983 年，葉增勇及簡秋源(Yeh and Chien, 1983)自台灣本島及蘭嶼地區分離及鑑定得到透明輪生細胞黏菌 (*P. pallidum* Olive) 台灣新紀錄種。

Hagiwara 在 1992 年於台灣西半部，自台北至鵝鑾鼻共採集 37 處不同環境的土壤樣品，調查細胞黏菌種類，爾後三人共同發表「台灣的網柱細胞黏菌」，其中輪生細胞黏菌種類採集到 *P. pallidum* Olive 及紫色輪生細胞黏菌 (*P. violaceum* Brefeld) 共 2 種 (Hagiwara *et al.*, 1992) 林詩蓓和葉增勇 (1999) 自台北市陽明山地區採取各類型植被下具有腐植質之表層土壤，分離出偽純白輪生細胞黏菌 (*P. pseudo-candidum* Hagiwara)。

以上三種輪生細胞黏菌中，*P. pallidum* 及 *P. violaceum* 廣泛分佈於台灣，而 *P. pseudo-candidum* 只有 1999 年的採集紀錄，並無樣本保存下來。

在輪生細胞黏菌屬中，*P. pallidum* 的分類地位一直有所爭議。*P. pallidum* 最早於由 Olive 於 1901 年觀察紀錄，其特徵為具白色孢子囊，橢圓形孢子，孢子囊體末端無延長現象。然而，目前發現之 *P. pallidum* 在孢子囊大小、分枝數目、全長等形態特徵及生理之特性上卻有許多差異(Hohl & Raper, 1963)。例如 Hagiwara 在 1989 年將分枝較短，分節較多的 *P. tenuissium* 從 *P. pallidum* 中分出來成立新種，並提出 *P. pallidum* 為一複合種(species complex)的概念。

1992 年 Hagiwara 來台灣研究，認為台灣 *P. pallidum* 複合種在形態上可分為五群：標準型之 *P. pallidum* (standard)；具多分枝孢子囊體的 *P. pallidum* (profuse)；輪狀分枝數目稀少的 *P. pallidum* (spares)；可自行形成大孢囊的 *P. pallidum* (homothallic) 和不會形成大孢囊的 *P. pallidum* (no macrocyst)；這些不同形態的輪生細胞黏菌，是否為 *P. pallidum* 種內的遺傳變異，亦或不同的種類，後人並無進一步的研究，且這些樣本在台灣並未保存下來。

近年來，核糖體 rDNA 序列常被應用於探討生物體的親緣關係。rDNA 可分為演化速度較慢的譯碼基因(coding region)，包括 5.8S，小次單元(small subunit SSU；又稱 17S 或 18S)和大次單元(large subunit LSU；又稱 25S 或 28S)，以及演化速率較快的內轉錄

間隔區(internal transcribed spacer , ITS)。轉譯基因區域適合分析分類階層較高的親緣關係研究，內轉錄間隔區則常用來重建近緣種間親緣關係及探討族群遺傳結構(Hills & Dixon, 1991; Hibbett, 1992; Page and Holmes, 1998)。近年來，多位真菌學者亦利用 ITS 來探討各類群真菌的親緣關係，如 *Penicillium* (Berbee *et al.*, 1995) , *Pythium* (Wang and White, 1997) , *Aspergillus* (汪等, 1999) , *Alternaria* (Chou and Wu, 2002) , *Cordyceps* (Liu *et al.*, 2002) , *Polymyxa* (Legrève *et al.*, 2002)等。在原生生物動物菌亞門 (Subphylum Mycetozoa) 的研究，則有 *Spongospora subterranea* (Qu and Christ, 2004)。至於細胞黏菌親緣關係的研究上，則有陳梅珍(2004)碩士論文：台灣網柱細胞黏菌屬分子類緣關係研究及王毓棻(2004) 行政院國科會大專生參與研究計畫專題報告：台灣數種網柱細胞黏菌遺傳多樣性之研究。

參、研究目的

本研究將台灣各地所採集分離之輪生細胞黏菌為材料，併以日本 Hagiwara 所贈之日本菌株，於實驗室內純培養及觀察。此外並抽取這些樣本之基因體 DNA (genomic DNA)，以 rDNA 之 ITS1-5.8S-ITS2 區域之分子序列做分析，加入美國國家衛生院 NIH (National Institute of Health, USA) 所屬之 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站登錄的序列一起比對，探討台灣產之輪生細胞屬內各種之親緣關係，並了解台灣產 *P. pallidum* 複合種遺傳變異。