

材料與方法

一. 形態觀察與整理

本實驗研究之菌株主要透過野外採集乾燥標本及國立自然科學博物館館藏之菌株標本進行形態觀察，另外形態資料則是參考 Glibertson 和 Ryvardeen(1986) 對於多孔菌所做的 synoptic key。

二. 菌株來源 (Collection)

野外採集到的新鮮子實體，經由實驗室無菌操作分離後所得的純菌株始可作為親緣關係分析用的材料。本實驗的菌株來源主要購買自新竹食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心 (Bioresouce Collection and Research Center)，以及國立自然科學博物館 吳聲華博士提供之栓菌純菌株 (表 1)；另外，採集自翡翠水庫與梅峰農場的兩株毛栓菌 *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pilát (Lee0719, Lee0813) 也一併加入研究。

三. 菌絲體之培養及保存 (Culture and preservation)

由生物資源保存及研究中心購買及吳聲華博士提供之栓菌純培養菌株，在無菌操作台(Laminar Flow)中進行菌株轉移，野外採得之子實體則取菌肉組織層(cortex)，皆以 2%之 MEA(Malt Extract Agar)培養基分離培養，並置於 25°C 之恆溫培養箱，約 4 至 5 日便能獲得純培養菌絲，以備做進一步的液態培養。菌種保存則是將純菌絲體接種於相同 MEA 配方之斜面培養基，於 15°C 恆溫箱中保存。

MEA 培養基配方為 20g Malt Extract、20g Agar powder 加入 1000ml 的 double distilled water，經 121°C、12.kg/cm³ 高壓滅菌後倒入 petri dish，冷卻後即可用於菌種轉移。

表 1. 本實驗所使用栓菌屬 (*Trametes*) 菌株之編號、採集地與來源

Table 1. The specimen number, collecting localities and sources of *Trametes* in this study

Taxa	Specimen NO.	Collecting localities	Sources
<i>T. elegans</i>	BCRC35262	新竹	BCRC
<i>T. feei</i>	BCRC35357		BCRC
<i>T. gibbosa</i>	BCRC35301	南投	BCRC
<i>T. heteromorpha</i>	BCRC35315	南投	BCRC
<i>T. hirsuta</i>	BCRC35307	高雄	BCRC
<i>T. hirsuta</i>	BCRC35313	台北	BCRC
<i>T. hirsuta</i>	Lee0719	翡翠水庫	李肇晉
<i>T. hirsuta</i>	Lee0813	梅峰農場	李肇晉
<i>T. hirsuta</i>	BCRC35650	台中鞍馬山	吳聲華
<i>T. lactinea</i>	BCRC35358	台南	BCRC
<i>T. orientalis</i>	BCRC35306	宜蘭	BCRC
<i>T. pubescens</i>	BCRC35302	花蓮	BCRC
<i>T. suaveolens</i>	BCRC35297	南投	BCRC
<i>T. versicolor</i>	Chen728	苗栗泰安	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36093	台中谷關	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36135	台中佳保台	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC37503	南投仁愛	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC35644	南投翠峰	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	CWN05295	南投翠峰	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36450	南投東埔	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36089	南投東埔	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC35683	台東知本	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	Wu0211-49	雲南楚雄山	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	Wu9507-7	雲南昆明	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36199	日本	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC36525	國外	吳聲華
<i>T. versicolor</i>	BCRC35759	桃園大關山	吳聲華

四. 液態培養

取培養基上之純培養菌絲體，置入經高壓滅菌之液態培養基（2%之 ME）內，並於 28°C 恆溫培養箱中以 250rpm 之 shaker 震盪，約 4 到 5 天產生便能獲得球狀的純菌絲體，此菌絲體即可作為基因體 DNA (Genomic DNA) 萃取的材料，以 250ml / flask 為一個單位。

ME 液態培養配方為 3g Malt Extract 溶於 150ml double distilled water，置於 250 ml 錐形瓶，經 121°C, 12kg/cm³ 高壓滅菌後冷卻即可用作液態培養的材料。

五. 染色體 DNA 之製備 (DNA extraction)

主要參考 Graham *et al.*, 1994 所發表之方法。將菌絲體過濾，置於 1.5 ml 微量離心管中以約 0.03g 海沙研磨。加入 500 μ l 已預熱之 2% CTAB buffer，置於 65°C 水浴槽水浴 10 分鐘後再加入 500 μ l dichloromethane:isoamyl alcohol (24:1)，充分混合以除去蛋白質與其他雜質。室溫下以 13000rpm 離心 10 分鐘後，抽取離心後的上層澄清液體，加入 300 μ l isopropanol 以沈澱 DNA，接著在室溫下以 13000rpm 離心 10 分鐘，此時已得到沉澱之基因體 DNA，將上層澄清液倒掉，加入 500 μ l wash buffer，靜置 2 分鐘後，在室溫下再以 13000rpm 離心 7 分鐘，再倒掉上層液體。沉澱之染色體 DNA 風乾 20-30 分鐘，加入 30 μ l ddH₂O，置於 37°C 恆溫箱 30 分鐘。再將已抽取完成的基因體 DNA 保存於 4°C 冰箱，若要長期保存則須放置於負 20°C 冷凍庫。

CTAB buffer 配方(500 ml)為 2%CTAB (100 ml 10% stock)、1.4M NaCl (140 ml 5M)、20mM EDTA (20 ml 0.5M)、100mM Tris(pH 8) (50ml 1M)、PVP-40 solid (10g)、1% 2-mercaptoethanol (MERCK, Germany) (3 μ l)。

wash buffer 配方(500ml)為 76% ethanol(380 ml ethanol)、10mM Ammonium acetate (5 ml 1M)、ddH₂O (115 ml)。

六. 染色體 DNA 純度與定量分析 (Genomic DNA purification and quantitative analysis)

將萃取完成的染色體 DNA 以分光光度計測量 OD260/OD280 的比值。當比值越接近 1.8，表示所萃取出來的 DNA 純度越高。

當 DNA 在波長 260nm 所測得之吸光值為 1 時，此時 DNA 濃度為 50 μ g/ml，DNA 定量分析便是依據此一準則。

七. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

本實驗所使用的 ITS1, ITS4 及 MS1, MS2 primer (表 2) 是參考自 White *et al.* (1990) 所設計之非專一性引子 (universal primer)。

將 5 μ l 菌絲體的基因體 DNA 溶液、5 μ l 10 X PCR 緩衝溶液、0.5 μ l dNTPs、38 μ l 無菌去離子水及各 0.5 μ l 之 primer，0.5 μ l *Taq* DNA polymerase，分別加入至 0.2 ml 的聚合酶連鎖反應管 (PCR reaction tube) 內，PCR 擴增則是採用溫度週期自動反應，反應條件為：預熱 (preheat) 94°C 10 分鐘，1 個循環；變性反應 (denature) 94°C 5 分鐘、煉合反應 (annealing) 53°C 1 分鐘、延展反應 (extension) 72°C 1 分鐘，35 個循環；延展溫度 72°C 10 分鐘，1 個循環，最後在聚合酶連鎖反應機器中維持 4°C 短暫保存，再將完成 PCR 之產物置於 -20°C 冰箱中保存。

表 2. 核醣體序列基因所使用之引子 (White *et al.*, 1990)

Table 2. The primers used for PCR in this study (White *et al.*, 1990)

primer	5' → 3'	Product size (bp)	T _m (°C)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290	65
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	300	58
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716	65
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC	600	63

八. 聚合酶連鎖反應產物之檢測

取 1g 洋菜膠粉 (Agarose gel) 加入 100ml 的 TBE buffer 緩衝溶液製備膠片，並加入 2 μ l ethidium bromide。將電泳膠片置於電泳槽內，並注入適量之 TE 緩衝溶液。取 5 μ l PCR 產物與 2 μ l 10 倍濃度的 DNA loading dye 混合均勻，依序加入電泳膠片的樣品槽內，並使用 3 μ l (100bp–1300bp) 之已知分子量大小的 DNA marker 作為標記，以 100 伏特之電壓進行電泳約 35 分鐘。電泳完成後在 UV 照射下觀察電泳膠片上之 PCR 產物，並加以照相記錄。

九. DNA 定序 (DNA sequencing)

經過核酸分光光度計檢測的 PCR 產物，生技公司以自動雷射螢光去氧核糖核酸定序儀進行核酸定序反應 (Autosequencing reaction) 以得到各菌株 rDNA 之 ITS1、ITS2 及 mitochondrial rDNA 之 MS1、MS2 所增幅 DNA 片段的核酸序列，其所採用的定序系統為 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit，並配合自動核酸定序儀。

十. 序列分析 (Sequence analysis)

1. 序列修補

定序完成之序列以 Sequencher 4.0 Demo vision (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) 分析序列影像所得之數位影像檔，進行人工判讀以修正正反向序列訊號。由於 DNA 品質或定序訊號的重疊，導致同一定序之雙向排序發生某些核苷酸無法互補的狀況，可能採用序號錯誤的序列分析而使得接下來的親緣關係樹不符合實際狀況，因此必須採用此一動作進行序列的修補。

2. 序列比對與網路序列搜尋 (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool)

GenBank 是隸屬於美國國家衛生院 NIH (National Institute of Health, USA) 底下的 NCBI (National Center for Biotechnology Information)，這個資料庫是世界最

大的公共生物資料庫，收集來自不同物種的 DNA 序列。而本實驗從 GenBank 搜尋特定之相關序列，以 FASTA 檔案格式儲存，做更進一步的親緣關係之探討，下載之菌株名及基因登錄號如表 3。

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 在生物資訊中是使用最多的一個工具，能用來分析蛋白質資料庫或 DNA 資料庫進行相似性比較。BLAST 採用一種局部的算法獲得兩個序列中具有相似性的序列，主要的功用是資料庫的搜尋，只要將要比對的序列輸入，Nucleotide BLAST 程式便會根據使用者的設定進行資料庫比對。本實驗將定序完成之序列於 NCBI 上進行 BLAST 比對，以期解序出來的序列具有較高之正確性，能用以彌補定序人員的錯誤，並作為參考。

表 3. 由 GenBank 所下載相關菌株 ITS1-5.8S-ITS2 及 mt SSU rDNA 序列之基因登錄號

Table 3. The accession numbers of ITS1-5.8S-ITS2 and mt SSU rDNA of related polypores from GenBank of NCBI

Taxa	ITS1-5.8S-ITS2	mt SSU rDNA
<i>Antrodia heteromorpha</i>	AF533964.1	AF352888.1
<i>Polyporus melanopus</i>	AF518759.1	U27062.1
<i>Polyporus tuberaster</i>	AY218420.1	AF358739.1
<i>Polyporus umbellatus</i>	AY322495.1	AY322495.1
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	AF363772.1	AF214465.1
<i>Trichaptum abietinum</i>	AY089745.1	AF408708.1

3. 序列排序 (Alignment)

序列排對以 Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) 程式進行，Clustal W 係為 DNA 與蛋白質多條序列比對程式，它可從不同序列的比對中找出具有生物意義的序列，序列間的演化關係可經由設定 Output 格式以做進一步的分析。本實驗將定序修補完成之序列以及 NCBI 網站的 GenBank 所下載之菌種序列分成 2 個探討方向排序：

1. 以 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 爲 marker 探討本實驗所採用之栓菌及 NCBI 下載之多孔菌科真菌的親緣關係。
2. 以 partial mt SSU rDNA 爲 marker 探討本實驗所採用之栓菌及 NCBI 下載之多孔菌科真菌的親緣關係。

以栓菌屬爲分析範圍時，採用革蓋菌科（Coriolaceae）的 *Antrodia heteromorpha* 序列當作外群（outgroup）；而以廣義的多孔菌科包含所分析的 27 株栓菌以及 NCBI 所下載的 5 株多孔菌序列：*Polyporus melanopus*, *Polyporus tuberaster*, *Polyporus umbellatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Antrodia heteromorpha*（廣義的多孔菌）爲分析範圍時，則以 *Trichaptum abietinum* 爲外群。

4. 遺傳距離（Genetic distance）

本實驗所分析的 32 株菌株之遺傳距離以 MEGA（Molecular Evolutionary Genetic Analysis Program version 2.1, Kumar *et al.*, 2001）分析，採用的分析模式爲 Kimura 2-parameter（Kimura, 1980），其理論主要認爲所有的鹼基是獨立演化且頻率相同，而 transitions 和 transversions 是以不同的機率發生（ α and β ）。

將完成序列排序之副檔名爲 .aln 之檔案轉換成 .mag 後進行分析；或是由 DnaSP 4.0 version 4.0（DNA sequence polymorphism, Rozas *et al.*, 2003）將 .aln 轉檔爲 phylip 格式，再由 MEGA 進行轉檔分析，較能降低出錯的機率。

5. 中性假說（neutral theory）檢測

中性假說（Kimura, 1983）的立論基礎爲遺傳變異存在族群與否是受到隨機性遺傳漂變（genetic drift）的影響，而非天擇（Natural selection），因此核苷酸的置換取代只受到突變的影響，演化快速的基因在種內及種間會有更多的遺傳變異。

Tajima D-test（Tajima, 1989）可計算 π 和 θ 是否有顯著差異， π 主要計算核苷酸變異出現的頻率，而 θ 是計算核苷酸變異位置的數目，若核苷酸的變異是在

逢機交配下達成平衡，則 $\pi = \theta$ 。所使用的統計 D 值若為 0 即符合中性假說的預測。Tajima D-test 針對本實驗的 10 株台灣產雲芝進行進行中性檢測。

Fu and Li test (Fu and Li, 1993) 則是假設所有的突變皆為中性，且不受天擇影響，在任一族群的譜系內，其譜系分支可區分為外部 (external) 突變和內部 (internal) 突變，而在中性假說的前提下，外部突變的期望值與 $\theta = 4N\mu$ 相同， N 為有效族群數， μ 為核苷酸突變率，期望值取決於有效族群數之大小，若分析族群受到天擇效應影響，會導致外部突變數目脫離期望值。本實驗假設所分析之 DNA 片段為中性，再以 DnaSP version 4.0 (DNA sequence polymorphism, Rozas *et al.*, 2003) 分析 Tajima's (1989), Fu and Li (1993) D-test 及 Fu and Li (1993) F-test 三種中性檢測。

6. 親緣關係樹之建構 (Phylogenetic tree construction)

採用 ITS-5.8S-ITS2 rDNA 及 mt SSU rDNA 為 marker，以褐腐真菌 *Antrodia heteromorpha* 為外群，分析本實驗之栓菌及 NCBI 所下載 5 株多孔菌科之序列，除了外群之外，所分析的多孔菌皆為白色腐朽，且皆被 Ryvardeen 認為關係較近，屬於栓菌群 (*Trametes group*)。

序列經由 Clustal W 完成電腦自動排對後，再透過人工目視做些微校正，將檔案儲存為 NXS 格式，於麥金塔作業系統 (iMac G4) 下執行 PAUP* Version 4.0 beta (Sworfford, 1998) 建構 MP tree (Maximum parsimony tree) 與 NJ tree (Neighbor-joining tree) 系統演化關係樹，PAUP* Version 4.0 beta 套裝軟體是 1998 年由 Sworfford 所開發出來，在現今生物資訊的研究上是一項很重要的統計分析軟體，其最主要的功能為根據輸入的物種特徵資料 (taxa character)，及選取的分析方法建構系統演化關係樹。Maximum parsimony 的演算法是先找出發生變異的變異點 (variable site)，若在兩條以上的序列中，有某一位點發生取代成相同的鹼基，此位點即為 informative site，以此作為特徵 (character) 計算出最簡約的樹狀圖 (multiple most parsimonious trees)，並計算 consistency index (CI) (Kluge

and Farris, 1969) 及 retention index (RI) (Archie, 1989 ; Farris, 1989), 而本實驗之 Maximum parsimony tree 的 bootstrap 則設定為 1000 次, 以期嚴格檢視所建構親緣關係樹之支持度。而 Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 則是將各樣本間序列置換的情形換算成遺傳距離, 再由此遺傳距離的矩陣分析所有可能接近真實的親緣關係樹, 並找出分支長度、即演化步驟最短的樹形圖。