

人工林不同疏伐強度作業對真菌組成結構與多樣性之影響

東海大學 生命科學系 汪碧涵

計畫內容

(一) 已完成之重要計畫成果摘要

1. 初步測試及建立樣區真菌多樣性之研究方法

參考 Mueller 等人 (2004) 的方法，初步建立採集菌根真菌多樣性時的採樣方法，以直線橫截樣區方式穿越已設立好的樣區（一公頃樣區，橫軸為 100 公尺，縱軸亦為 100 公尺）進行真菌採集。採集到的樣本，再參考 Lodge 等人 (2004) 的記錄方法先記錄外觀形態特徵資料，再保存於採樣袋中。

實際執行採樣工作後，發現由於樣區林下植被非常茂密，進行直線穿越樣區的方式採樣時，在某些無法打樁的特定點上，會因為樁點不在而難以辨認。比較分析四種小樣區設置方法，經各方法的實地勘查試作，評估考慮樣區的代表性及實際執行的困難度，決定整合穿越線調查與圓形樣區定位調查的模式，於每一公頃各樣區內分別設立直徑十公尺之圓形小樣區六個，以現有樁點為圓心，將位於圓周上的樹木以紅白斑馬膠帶進行標記，座標軸分別為 A (1, 1)、B (2, 2)、C (3, 3)、D (4, 2)、E (4, 4)、F (1, 4)，圓形樣區內採定位調查，各圓形樣區間則採穿越線調查。目前已完成打樁的九個樣區，除了易崩塌的第四和第五樣區外，其餘皆已完成樣區的標示。

2. 蕈菇類真菌相之調查

在多雨或高濕度的季節，適合真菌產生子實體，今年度颱風頻繁，雨量充沛，由部分樣區採集到的真菌其中 2 種屬於馬勃類 (*Lycoperdon* spp.)，7 種為多孔菌 (*polyporus*)，3 種為黏菌，3 種為盤菌，其餘 36 種則為傘菌類。樣本 57 和樣本 73 的這類多孔菌類出現在第六樣區之後的頻率明顯高於前面的三個樣區。

本研究在天然林共採集得到 13 個樣本，其中包括 5 個蕈菇樣本、1 個土壤樣本、2 種植物樣本及 5 個植物根部樣本，人工林則共採得 75 個樣本，其中包括 41 種蕈菇樣本、3 種黏菌樣本、3 種盤菌樣本、3 個土壤樣本、3 種植物樣本及 22 個植物根部樣本。將土壤中的植物根部分離出來後，以解剖顯微鏡觀察記錄可能為菌根的部位。

共獲得 32 個真菌樣本 DNA、4 個植物樣本 DNA 及 27 個菌根樣本 DNA。以擔子菌的廣效性引子對 ITS1F/ITS4B 進行 PCR 增幅後，幾乎都能增幅出擔子菌 ITS DNA 產物。但由萃取得到的植物根部 DNA，不論是以廣效性引子 ITS5/ITS4 或是 ITS1F/ITS4B 進行 PCR 擴增時，都無法獲得產物；甚至以 ITS1F/ITS4B 進行 booster PCR 再一次擴增都無法獲得產物，表示目前採到的植物根部樣本中可能都未含菌根真菌，或是菌根真菌的量極低，無法以現在的 PCR 方式偵測到。目前根據我們的實地調查，在柳杉林中都沒有發現任何外生菌根

菌，以 PCR 方式對根部 DNA 進行擴增也沒有得到真菌的產物，初步驗證了文獻中沒有柳杉外生菌根菌之記載。

將得到的 PCR 產物進行解序，共獲得 15 個真菌的核酸序列。將這些核酸序列上網至 NCBI 的 GenBank 資料庫中，以 Blastn 與其中的序列資料進行比對，序列的片段大小相近而可以完全比對的 DNA 序列資料共有 5 筆，其他則由於比對出來所得數值太低，完全無法以序列資料輔助鑑別，仍需進一步鑑定。真菌的 DNA 序列可協助進行真菌菌種的確認，另一方面則交叉比對植物、菌根和真菌的 DNA 資料，可以幫助釐清所採子實體是否為菌根菌，以了解台灣菌根真菌之多樣性。

(二) 擬解決問題

1. 全程目標

為探討人工林生態系經營與生物多樣性保育間的關係，本子計畫研究不同之疏伐作業，對該人工林中真菌組成結構與多樣性之影響，供作人工林生態系經營及生物多樣性保育之參考。

2. 本年度計畫緣起

由於過去造林偏重於造林木之木材利用，因此形成大面積單純林相之林分結構。為符合人工林永續發展—生態系經營之理念，杉木人工林有必要實施疏伐作業，配合林下人工間植或天然更新方式形成混濁或複層林，以增加杉木人工林結構之異質度和生物多樣性，達到生態系經營之目的。然而不同疏伐處理對生物多樣性及森林功能的影響，以及對原生樹種更新及復育的影響等基本資料極度不足。研擬因應策略，需要精確之實測資料來作分析依據，本計畫主要目的之一即為取得相關之資料，以做為研擬因應策略之依據。

隨著森林的生長發育，植物群落發生一系列的變化，這些變化也使得植物、動物，特別是真菌的物種多樣性，隨之改變，森林鬱閉之前，隨著樹齡的增加，多樣性隨即增加 (Dighton et al., 1985)，林木鬱閉後，物種多樣性隨之降低，如果下層草本植物衰退，則分解菌的資源可利用性也變得越來越差，繼而導致分解者真菌群落的衰退。成熟的杉木人工林經疏伐後，將使原生樹種進入，造成新的生態演替發生，總計畫將調查與了解疏伐方式與強度造成樹種更新與復育的變化，本計畫將持續同步調查疏伐前後人工林生態變遷過程中，真菌多樣性與群聚結構之變化，以及分析環境因子與其相關性。真菌種群數量、動態是真菌個體生存能力與外界環境相互作用的結果，研究不同生境條件下真菌種群結構可以反映種群現況外，還可以展現植物總群結構與森林生態系中分解者的活性。計畫疏伐作業將於年底展開，本年度主要目標在完成疏伐前全年的基礎資料調查收集，鑑定森林裡的真菌種類，描述它們在時間和空間的族群結構，以瞭解未來人工林疏伐等經營作業對森林裡真菌的動態消長之衝擊。

3. 本年度計畫目標

九十五年度 - 調查收集疏伐前各樣區真菌多樣性的基礎資料。

(三) 重要工作項目

1. 完成樣區內小樣區的設置
2. 逐月調查蕈菇類真菌相。
3. 統計分析與撰寫報告。

(四) 執行程序

1. 文獻回顧

收集國內外有關蕈菇類真菌之相關文獻，包括蕈菇類真菌種類、森林蕈菇類真菌群聚結構與多樣性，林相演替對蕈菇類真菌種類的豐富度和基本組成的影響。

2. 完成小樣區的設置

圓形樣區內採定位調查，各圓形樣區間則採穿越線調查。定期調查記錄柳杉林產生的蕈菇種類，在野外進行子實體調查的時候，新鮮樣本需以照相與圖表完整記錄形態、顏色、氣味等資料，詳細記錄每個種的著生基質、分佈、頻率和數量等，再依調查狀況將分佈頻率與分佈數量區分等級。

3. 蕈菇子實體調查與採樣

採集回實驗室後，子實體根據圖鑑進行初步分類至屬的階層，根據各屬的顯微特徵鑑定至種。由於菌種鑑定不易，需請不同類群真菌之真菌學家指導與協助，待熟悉這些真菌子實體的特徵與種類，之後便毋須採樣而以紙筆記錄調查結果，以保護林中的真菌族群；若有不同於以往發現的蕈菇出現，再攜回實驗室鑑定。

4. 樣本處理

(1) 孢子印標本

取一張適當大小，一半白色一半黑色的紙平鋪於桌面，將新鮮的子實體以衛生紙擦乾，切掉菌柄放在紙的黑白交界處，蓋上一個稍大的燒杯裡面，以小容器裝些水，用來保持潮濕的環境以便落孢，隔夜移開菌傘，用素描保護膠以較遠的距離噴灑讓膠水自然落下，覆蓋整個孢子印的範圍，將有孢子印的紙放入密封袋中，於袋中加入少許乾燥劑置於冷氣房內室溫保存。

(2) 顯微觀察

將採回來的樣本放在顯微鏡下觀察其形態，並將其切片觀察孢子及擔子的形態。

(3) 菌株分離與純化

所有器材必須先經高溫高壓滅菌，將子實體表面以無菌水清洗數次，以刀片切開子實體再以鑷子取中間部分的菌肉通常取菌傘或菌柄的部分，將菌肉移至培養基上分離，待其長出新的菌絲，為確保沒有其他雜菌的存在最好在新菌

絲長出後立即以接種針取部分菌絲，移至新的培養基上，待新菌絲長出後，就可得到純化的菌株。

(4) 乾燥標本

將子實體以 35°C~45°C，烘乾約需 2~5 天(依菌體大小)，烘乾後置入密封袋或封口袋中，於袋中加入少許乾燥劑，置於室溫或冷氣房內保存。

(5) 植物樣本

參考 Dolye 和 Doyle (1990) 的方法萃取採集之植物樣本 DNA。取植物葉片切小塊置於微量離心管(eppendorf)中，加入適量金剛砂，以研磨棒(pestle)研磨後，萃取 DNA。在微量離心管中加入已於 65°C 預熱的 500 µl CTAB 萃取緩衝液 (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% PVP-40 [w/v], 20 mM cetyl trimethyl ammonium bromide [CTAB])後，於 65°C 加熱 10 分鐘，再加入等體積的 dichloromethane/isoamyl alcohol (24:1)，輕緩混合後，以桌上型超高速微量離心機(centrifuge 5415c, Eppendorf, Germany) 14,000 rpm 離心二分鐘。取出上層液，加入 0.6 倍體積的異丙醇(isopropanol)沈澱 DNA，輕緩混合後，再以 14,000 rpm 離心二分鐘，倒掉上清液。沈澱物加入 500 µl wash buffer(76% ethanol, 10 mM ammonium acetate)清洗，靜置二分鐘後，再以 14,000 rpm 離心二分鐘，倒掉上清液以去除鹽類物質。將微量離心管內的 DNA 置於無菌操作台吹乾後，以 20 µl 無菌水加以溶解，保存於 -20°C。

5. PCR 擴增及 RFLP 分析

增量複製真菌樣本中含有的 rDNA 中的 ITS 區域，選用擔子菌根菌的廣效性引子對 ITS1F (5' -CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') 及 ITS4B (5' -CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG- 3') (Gardes and Bruns 1993) 並參考 Wang 等人 (2003) 的方法進行 PCR 增幅反應。每 100 µl PCR 反應液中含引子各 100 nM，4 U *Taq* polymerase (MBI Fermentas, Lithuania)，50 µM dNTPs (Roche, Germany) 及 1.5 mM MgCl₂ 及 50 ng DNA 模版。反應以溫度循環控制器進行 40 個循環，DNA 在 94°C 之下變性，第一個循環作用二分鐘，之後各循環各作用一分鐘，58°C 下引子煉合 20 秒，72°C 延展 10 秒。PCR 產物先取 5 µl，以 0.5X 的 TBE 緩衝溶液，在 1.2% 電泳膠體(Agarose, Amresco, USA)上，以 100 V 電壓電泳 40 分鐘，與 50-bp 分子量標幟(MBI Fermentas) 比對產物的分子量大小，經 ethidium bromide 染色後，在 UV 光下照相記錄。

檢測過後的 PCR 產物分別取 8 µl 加入 10 單位的內切酶 1 µl 及 1 µl 相對應之緩衝液。在 37°C 下作用 16 小時，產物以 1.2% 電泳膠體染色分析後，用影像分析儀(Ultra Violet Product Imagestore 7500, UVP, USA) 照相存檔，以影像解析軟體 Gel-Works 1D (UVP) 分析 RFLP 指紋。

6. 菌種鑑定及菌根菌分析

將蕈菇類真菌及子實體經 PCR 分析後所獲得的主要亮帶 (band) 溶洗 (elute) 出來後直接解序，所得序列以 Blast 與 GenBank 中的所有序列資料比對後，獲得相關菌株資料，鑑別出主要的蕈菇類真菌種以了解台灣蕈菇類真

菌的多樣性。

(五) 預期效益

瞭解疏伐前試驗區之蕈菇類真菌相，以及建立真菌多樣性研究方法，供疏伐作業造成森林生態系干擾後，真菌與菌根菌之族群結構變遷研究分析比對使用。這些基礎資料可供：一、林木保育；二、森林群聚結構變化指標；三、蕈菇類真菌多樣性與生態研究；四、稀有真菌種的保育；五、開發真菌棲地模式；六、人工林生態系經營及生物多樣性保育之參考。