

國立臺灣大學生物資源暨農學院森林環境暨資源學系

博士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

臺灣兩種固有塊菌之親緣關係及溫度對青

剛櫟接種塊菌在菌根形成與苗木生長之影響

Phylogenetic Relationships of Two Native Taiwan Truffles
and Effects of Temperature on the Mycorrhiza Formation
and Growth of *Cyclobalanopsis glauca* (Qerst.) Seedlings



黃鏡諺

Jing-Yang Huang

指導教授：胡弘道 博士、沈偉強 博士

Advisor: Hung-Tao Hu, Ph.D.

Wei-Chiang Shen, Ph.D.

中華民國 98 年 5 月

May, 2009

誌 謝

回首博士班的研究生活，慶幸自己終在學業、工作兩頭忙的日子中熬過來了，五年半的時間雖不算長，卻是自己三十餘年來最為充實的一段時間。由衷感謝恩師胡弘道與沈偉強兩位教授，胡老師不僅在學業、論文方向與研究方法等，皆給予最大的啟迪與教導，更讓我學習到老師待人處世嚴謹的態度；沈老師則在分子生物技術、SCI 文章撰寫與投稿等，給予莫大的協助、鼓勵與指正，誠如胡老師所說，博士班求學中最幸運的事情，莫過於認識了沈老師，並能讓沈老師指導，否則要畢業，SCI 這關不知道還要再花多少年。兩位業師之師恩浩蕩，特誌卷首，謹誌個人之謝忱於萬一。

本文初稿承蒙宜蘭大學林教授世宗、中興大學顏博士江河、台灣大學曲博士芳華與中華技術學院胡博士寶元等師長，惠予詳細審閱及逐字斟酌，並且提供諸多寶貴的修正意見，使論文更臻完備，在此謹對辛苦的您們致上萬分之感激。此外，在 SCI 英文報告撰寫期間，感謝胡博士哲明在親緣關係演化上的細心指導，以及繁博士玉萍在分子鐘計算的幫忙，更感謝丁博士照棟在報告 Revised 前，熬夜到半夜三點，將英文報告逐字斧正並提供寶貴的修改意見，使得論文可以順利在短期內，獲得 SCI 期刊收錄並刊登發表。

特別感謝林博士虔隆在統計分析上的指導與幫忙，感謝楊院長平世在博士班入學考試時，惠予撰寫推薦函。在羅東林區管理處台北工作站工作期間，感謝親愛的同事陳大為老師、陳華政、簡碧秋、黃群策、杜興東、陳美惠、何家名、高德璉、張麗慧、林大權、賴錦樑、郭瑞東、江國樑、張家禎、王彥仁、高秀蓮、游輝毅等的協助與鼓勵。在研究期間，簡光文、詹明勳、劉啟福、張耀聰、林瑞進等學長，陳秋萍、賴鴻寬、黃子銘、張勵婉等同學，陳珈后、陳怡君、許桂蓮、劉廣宏、劉啟宏、王綾雲等學弟妹，以及所有關心與愛護我的長輩、朋友們，於修業期間的協助與照顧，因論文匆促付梓，未能逐一答謝，在此一併致上最深忱之感謝。

感謝老婆微雯這些年來的陪伴與鼓勵，求學期間總把家庭責任先擺一邊，尤其是愛子衍凱出生後，把小孩照顧的健康又可愛，讓我更能心無旁騖的把學業完成，辛苦妳了！也謝謝岳父母的支持，感謝您們這段日子幫忙照顧衍凱。

最後，感謝培育、叮嚀我的父母，以及一直鼓勵我的姐姐，由於家人不斷的付出與包容，方能使我克服所有困難，順利完成博士論文，取得博士學位，在此謹以本文的成果獻給您們。

摘要

塊菌為珍貴的共生性食用真菌之一，普遍引起世界各地研究學者的興趣。在台灣，目前僅有台灣塊菌 (*Tuber formosanum*) 與屑塊菌 (*Tuber furfuraceum*) 被發現報導，雖然這兩種塊菌的形態特徵已被描述，而缺乏分子鑑定的證據可確立二者與其他塊菌間的關係。本研究的目的有二，一在利用 5.8S-ITS2 與 β -微管蛋白質(β -tubulin)基因序列，建立台灣塊菌及屑塊菌與世界其他塊菌屬種類的親緣關係，並以分子鐘 (molecular clock) 模式建立台灣與大陸塊菌間之分化時間 (divergence time)；二為利用台灣塊菌及夏塊菌 (*Tuber aestivum*) 為材料，探討塊菌接種青剛櫟後，溫度對於菌根形成、形態、菌根感染率及塊菌接種對青剛櫟苗木生長之影響。利用 5.8S-ITS2 序列建立的親緣演化樹顯示，所分析塊菌屬種類可分為五個主要的支序群(clade)，台灣塊菌位於第五支序群(clade V)，並與黑孢塊菌、喜馬拉雅塊菌、印度塊菌、中國塊菌形成第二次支序群(subclade V-2)；屑塊菌則與會東塊菌、*T. ferrugineum*、棕紅塊菌、*T. candidum*、*T. quercicola* 形成第三支序群(clade III)。而利用 β -微管蛋白質基因所建立的親緣演化樹，則得到三個主要的支序群(clade)，屑塊菌與棕紅塊菌位於第一支序群；第三支序群亦可分成四個次支序群，台灣塊菌與印度塊菌 B 群形成第四次支序群(subclade III-4)，subclade III-1 包括偽凹孔塊菌，subclade III-2 包括黑孢塊菌，subclade III-3 包括印度塊菌 A 群。親緣分析結果，與各塊菌間的形態特徵大致相符，而台灣塊菌與印度塊菌 B 群最為親近，屑塊菌則是與會東塊菌最親近。根據分子鐘(molecular clock)推算，台灣塊菌與印度塊菌 B 群的分化時間在 4.1 百萬年(Ma)前，屑塊菌與會東塊菌的分化時間則在 10.2 百萬年前。基於本研究結果，可以推測台灣的兩種塊菌，應是與大陸相近的塊菌種類有著共同的祖先，然因為較長的分化時間及地理隔離效應後，進而演化為台灣特有塊菌種類。

在研究不同溫度對青剛櫟接種台灣塊菌與夏塊菌兩種塊菌在菌根形成與苗木生長之影響方面，由試驗結果得知，在不同溫度下生長的台灣塊菌及夏塊菌之菌根，以立體解剖顯微鏡觀察，外部形態並無明顯差異，台灣塊菌菌根呈單根或不規則羽狀，淡黃色至深褐色，具有或無明顯之剛毛；夏塊菌菌根主要為單根狀，淡黃色至深褐色，具有羊毛狀之菌絲。進一步以掃描電子顯微鏡觀察菌根，則可

發現在較高溫度的組合（35/30°C、30/25°C）中生長的菌根，其菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，且其皮層細胞內，澱粉粒累積出現之頻率亦較高。台灣塊菌之菌毯厚 15~25 μm，哈替氏網延伸菌絲可侵入至第二層皮層細胞間；夏塊菌之菌毯厚 18~30 μm，哈替氏網延伸菌絲亦侵入至第二層皮層細胞間。菌根感染率以 25/20°C 為最高，且與其他溫度組呈顯著差異，20/15°C 與 30/25°C 次之，15/12°C 再次之，35/30°C 為最低；兩種菌根感染率在接種處理間，則以台灣塊菌較夏塊菌高，但兩者間之差異不顯著。苗高方面，各處理均以 35/30°C 為最高，與其他溫度組呈顯著差異；不同接種試驗方面，苗高以接種夏塊菌者最高，台灣塊菌次之，未接種者最低，三者間呈顯著差異。苗木根頸方面，則是以 25/20°C 最高，35/30°C、30/25°C 與 20/15°C 等次之，但四者間之差異呈不顯著，而 15/12°C 則最低；根頸以接種台灣塊菌者最高，夏塊菌次之，兩者差異不顯著，未接種者最差，與有接種者互呈顯著差異。葉部養分元素方面，在碳、氮、鉀、鈣、鎂、鈉、磷等元素方面，都是 35/30°C 者最高，且與其他溫度組合相互呈顯著差異，顯示高溫組合對苗木之生長與養分元素吸收有利，但對菌根形成是不利的。溫度與菌根感染率呈負相關（ $r = -0.57$ ），溫度與苗高、根頸、及葉部之碳、氮、鉀、鈣與鈉濃度（ $r = 0.52、0.54、0.69、0.43、0.51、0.47、0.55$ ），均呈顯著正相關（ $P < 0.05$ ）；菌根感染率與苗高、根頸、及葉部之鉀、磷濃度（ $r = 0.49、0.47、0.42、0.67$ ），呈顯著正相關（ $P < 0.05$ ）；苗高與根頸、葉部之氮、鉀、磷濃度（ $r = 0.51、0.71、0.46、0.42$ ），呈顯著正相關（ $P < 0.05$ ）；根頸同樣與葉部之氮、鉀、磷濃度（ $r = 0.62、0.44、0.47$ ）呈顯著正相關（ $P < 0.05$ ）；葉部之鉀、鈣與鎂濃度三者之間，則是互呈負相關（ $r = -0.48、-0.54、-0.43$ ）。

關鍵詞：台灣塊菌、屑塊菌、分子親緣分析、分子鐘、青剛櫟、外生菌根、溫度、養分元素

Abstract

Truffles are one of the most valuable edible fungi that have drawn extensive research interests worldwide. In Taiwan, two species of truffles, *Tuber formosanum* and *T. furfuraceum*, have been identified and reported. Although morphological features of these two truffles have been described, lack of molecular identification can firmly establish their relatedness to other truffles. The goals of this study are to: 1) utilize the ITS and β -tubulin gene sequences to generate the phylogenetic relationship and divergence time of *T. formosanum* and *T. furfuraceum* with other taxonomic relatives; 2) study the effects of temperature on the mycorrhizae formation and growth of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings inoculated with *T. formosanum* and *T. aestivum*. Our phylogenetic analyses revealed five major phylogenetic clades according to the 5.8S-ITS2 gene sequences and corroborated with their morphological characterization. In the 5.8S-ITS2 phylogenetic tree, *T. formosanum* was included in Clade V and *T. furfuraceum* was located in Clade III. Clade V was divided into two subclades. Subclade V-1 was formed by two species, *T. brumale* and *T. pseudoexcavatum*, and Subclade V-2 was formed by five species, *T. melanosporum*, *T. himalayense*, *T. indicum*, *T. sinense* and *T. formosanum*. Clade III consisted of six species, *T. ferrugineum*, *T. rufum*, *T. candidum*, *T. quercicola*, *T. furfuraceum* and *T. huidongense*. Based on the β -tubulin gene sequences, three major phylogenetic clades were revealed. Clade I contained two species, *T. rufum* and *T. furfuraceum*. Clade III was divided into four subclades. Subclade III-1 and subclade III-2 comprised of *T. pseudoexcavatum* and *T. melanosporum* respectively. Subclade III-3 contained *T. indicum* A complex. *T. formosanum* and *T. indicum* B complex were located in subclade III-4. In conclusion, *T. formosanum* highly resembles to *T. indicum* B complex, while *T. furfuraceum* is most similar to *T. huidongense*. Based on molecular clock, we estimated that *T. furfuraceum* and *T. formosanum* would have diverged from the close relatives in mainland China between 10.2 and 4.1 Ma, respectively. Taken together, we propose that these two *Tuber* species found in Taiwan might originate from the common ancestors with some

truffle species in China. However, with long divergence time and geographical separation, they have evolved into indigenous species of Taiwan.

In the second part of this study, we set to determine the effects of temperature on the mycorrhizae formation and growth of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings inoculated with *T. formosanun* and *T. aestivum*. No obvious morphological difference was seen in the ectomycorrhizae formed by *T. formosanum* and *T. aestivum* with different temperature treatment under stereomicroscope. The ectomycorrhizae formed by *T. formosanum* were monopodial or pinnate, and the color was light yellow to dark brown with or without bristles. The ectomycorrhizae formed by *T. aestivum* were monopodial, and the color was light yellow to dark brown with woolly hyphae. However, futher examination by scanning electron microscope revealed different structures. In the 35/30°C and 30/25°C treatment, fungal mantle was thinner and mycorrhizal structure was looser. In addition, the starch grain appeared more frequently in the cortical cells. The fungal mantle of *T. formosanum* was 15~25 µm thick, and the Hartig nets extended to the second layer of the cortex cells. The fungal mantle of *T. aestivum* was 18~30 µm thick, and the Hartig nets also extended to the second layer of the cortex cells. The mycorrhizal infection rate was highest in the 25/20°C treatment, which was significantly different ($P < 0.05$) with other treatments. Treatments with 20/15°C and 30/25°C were second and their mycorrhizal infection rates showed no significantly different ($P > 0.05$). Treatments with 15/12°C and 35/30°C showed the lowest infection rate. The mycorrhizal infection rate was higher in seedlings inoculated with *T. formosanum*; however, the rate was not significantly different ($P > 0.05$) from that inoculated with *T. aestivum*. The temperature effect on the height of seedlings was also examined. Treatment with 35/30°C showed highest seedlings, which was significantly different ($P < 0.05$) from other treatments. Seedlings inoculated mycorrhizae exhibited higher growth than noninfected plants; whereas *T. formosanum* displayed better growth effects than *T. aestivum*. Treatment with 25/20°C showed best growth in the root collar diameter of seedlings and treatments with 35/30°C, 20/15°C and 30/25°C were second.

However, no significant difference ($P>0.05$) was seen among these four treatments. Treatment with 15/12°C showed the worst growth of root collar diameter. Seedlings inoculated mycorrhizae also exhibited better root collar growth than noninfected plants; whereas *T. formosanum* also enhanced better root collar growth than *T. aestivum*, but both treatments showed no significant difference ($P>0.05$). The concentrations of all macro-nutrient elements in the leaves exhibited the highest level in the 35/30°C sample, which was significantly different ($P<0.05$) from other treatments. Overall, these results indicate that plants grow faster with higher nutrient contents in the high temperature; however, high temperature displayed negative effects on mycorrhizal development. Temperature exhibited negative relationship with mycorrhizal infection rate ($r= -0.57$), but showed positive relationships with the height and root collar diameter of seedlings, and the contents of C, N, K, Ca and Na ($r= 0.52, 0.54, 0.69, 0.43, 0.51, 0.47, 0.55$) in the leaves. As for the mycorrhizal infection rate, it showed positive relationships with the height and root collar diameter of seedlings, and the contents of K and P ($r= 0.49, 0.47, 0.42, 0.67$) in the leaves. The height of seedlings showed positive relationships with root collar diameter of seedlings, and the contents of N, K and P ($r= 0.51, 0.71, 0.46, 0.42$) in the leaves and the root collar diameter of seedlings showed positive relationship with the contents of N, K and P ($r= 0.62, 0.44, 0.47$) in the leaves as well. Finally, K, Ca and Mg showed negative relationships with each other ($r= -0.48, -0.54, -0.43$).

Key words: *Tuber formosanum*, *Tuber furfuraceum*, molecular phylogeny, molecular clock, *Cyclobalanopsis glauca*, ectomycorrhizae, temperature, nutrient elements

目 錄

口試委員會審定書	
誌謝	
中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
第一章 序言.....	1
一、塊菌之介紹.....	1
二、塊菌的採收與經濟價值.....	2
三、塊菌人工栽培與菌根苗商業化.....	4
四、塊菌生長的生態條件.....	5
五、塊菌資源多樣性與地理分布.....	6
六、本試驗之研究方向.....	8
七、研究目的.....	9
第二章 以內轉錄區間(ITS)、 β -微管蛋白(β -tubulin)基因進行塊菌之親緣分析.....	10
一、前人研究.....	10
(一) 塊菌形態特徵鑑定.....	10
(二) 分子生物技術之應用與發展.....	16
(三) 內轉錄區間與 β -微管蛋白基因的特性.....	18
(四) 分子生物鑑定在研究塊菌方面的應用.....	19
(五) 分子鐘模式的建立與分化時間之推估.....	25
二、材料與方法.....	26
(一) 塊菌菌種採集.....	26
(二) 去氧核糖核酸萃取.....	26
(三) 聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase Chain Reaction).....	28
(四) 瓊脂電泳.....	29

(五) 聚合酵素連鎖反應產物之純化與定序.....	29
(六) 核酸排序比對與基因資料庫搜尋.....	30
(七) 分子親緣關係之分析.....	30
(八) 分子鐘與分化時間之建立.....	30
三、結果.....	36
(一) 台灣塊菌及屑塊菌之 PCR 反應結果.....	36
(二) 台灣塊菌及屑塊菌與其他塊菌菌種之 ITS、 β -微管蛋白基因序列分析比較.....	36
(三) 台灣塊菌及屑塊菌與其他塊菌菌種之相同度比較.....	37
(四) 台灣塊菌及屑塊菌之 5.8S-ITS2 序列親緣分析.....	58
(五) 台灣塊菌及屑塊菌之 β -微管蛋白基因親緣分析.....	58
(六) <i>Indicum complex</i> 之親緣分析.....	59
(七) 台灣塊菌及屑塊菌與大陸相關塊菌種間之分化時間的建立.....	59
四、討論.....	64
五、結論.....	70
第三章 不同溫度對青剛櫟接種兩種塊菌在菌根形成與苗木生長之影響.....	71
一、前人研究.....	71
(一) 試驗宿主青剛櫟與兩種接種塊菌之介紹.....	71
(二) 溫度對外生菌根菌之影響.....	72
(三) 溫度對外生菌根族群與菌根菌子實體之影響.....	75
(四) 菌根與苗木生長、葉部養分之關係.....	79
二、材料與方法.....	85
(一) 苗木培養.....	85
(二) 生長栽培介質之處理與苗木移植.....	85

(三) 塊菌之接種源.....	85
(四) 青剛櫟與兩種塊菌之半無菌合成.....	85
(五) 立體顯微鏡之觀察.....	86
(六) 掃描電子顯微鏡之觀察.....	86
(七) 塊菌菌根之鑑定.....	88
(八) 菌根感染率之計算.....	88
(九) 苗木養分分析.....	88
(十) 試驗設計與統計分析.....	89
三、結果.....	90
(一) 青剛櫟苗木與兩種塊菌半無菌合成菌根試驗.....	90
(二) 溫度對苗木菌根形成、苗木生長與葉部大量養分元素之 影響.....	98
四、討論.....	122
(一) 青剛櫟苗木與兩種塊菌之半無菌合成.....	122
(二) 溫度對青剛櫟苗木菌根形成、生長與葉片養分之影 響.....	126
五、結論.....	133
第五章 塊菌研究之未來展望.....	135
參考文獻.....	136

圖目錄

圖 1. 本試驗採集台灣塊菌與屑塊菌之位置圖.....	27
圖 2. ITS、 β -微管蛋白基因序列與本試驗使用引子位置圖.....	29
圖 3. 5.8S-ITS2 之序列排列比對.....	38
圖 4. β -微管蛋白基因之序列排列比對.....	43
圖 5. <i>Indicum</i> complex ITS 全長度之序列排列比對.....	49
圖 6. 31 種塊菌之 5.8S-ITS2 區域，以矩陣推演法演算之演化樹圖譜.....	61
圖 7. GenBank 資料庫中，所有塊菌屬之 β -微管蛋白基因，以最大儉約法演算之演化樹圖譜.....	62
圖 8. <i>indicum</i> complex 之 ITS 全長度，以最大儉約法演算之演化樹圖譜.....	63
圖 9. 台灣塊菌之規則羽狀菌根.....	91
圖 10. 台灣塊菌菌根表面之典型剛毛.....	91
圖 11. 台灣塊菌之老化期菌根.....	91
圖 12. 夏塊菌初期菌根.....	91
圖 13. 夏塊菌菌根表面之典型羊毛狀剛毛.....	91
圖 14. 夏塊菌之老化期菌根，剛毛消失.....	91
圖 15. 在 35/30°C 溫度下，台灣塊菌菌根形態.....	92
圖 16. 在 30/25°C 溫度下，典型成熟期台灣塊菌菌根，表面呈金黃色有延伸菌絲.....	92
圖 17. 在 25/20°C 溫度下，台灣塊菌菌根表面延伸菌絲相當明顯.....	93
圖 18. 在 20/15°C 溫度下，成熟期之台灣塊菌菌根呈褐色且有剛毛及延伸菌絲.....	93
圖 19. 在 15/12°C 溫度下，初期之台灣菌菌根表面有明顯剛毛及延伸菌絲且呈金黃色.....	93
圖 20. 在 35/30°C 溫度下，夏塊菌菌根形態，菌根表面平坦.....	93
圖 21. 在 30/25°C 溫度下，典型成熟期夏塊菌菌根.....	94
圖 22. 在 25/20°C 溫度下，成熟期之夏塊菌菌根，單根狀且表面有剛毛.....	94

圖 23. 在 20/15°C 溫度下，初期之夏菌菌根表面有明顯剛毛且呈金黃色.....	94
圖 24. 在 15/12°C 溫度下，初期夏塊菌菌根形態，呈現短棒狀且有剛毛.....	94
圖 25. 台灣塊菌之超微細結構.....	96
圖 26. 夏塊菌之超微細結構.....	97
圖 27. 各連續月份之菌根感染率在不同溫度處理下之柱狀圖.....	101
圖 28. 各連續月份之菌根感染率在不同菌種處理下之柱狀圖.....	101
圖 29. 不同溫度下之菌根感染率生長趨勢及其直線迴歸關係.....	102
圖 30. 不同菌種之菌根感染率與接種月份間之變化趨勢.....	103
圖 31. 不同溫度處理與兩種菌種組合之青剛櫟苗木生長情形.....	107
圖 32. 各連續月份之苗木苗高在不同溫度處理下之柱狀圖.....	108
圖 33. 各連續月份之苗木苗高在不同菌種處理下之柱狀圖.....	108
圖 34. 不同溫度下之苗木苗高生長趨勢及其直線迴歸關係.....	109
圖 35. 接種台灣塊菌、夏塊菌與未接種者苗高，在第 5~8 月份之生長趨勢.....	110
圖 36. 各連續月份之苗木根頸在不同溫度處理下之柱狀圖.....	113
圖 37. 各連續月份之苗木根頸在不同菌種處理下之柱狀圖.....	113
圖 38. 不同溫度下之苗木根頸生長趨勢及其直線迴歸關係.....	114
圖 39. 不同菌種對苗木根頸與接種月份間之變化趨勢.....	115

表目錄

表 1. 主要可食塊菌的種類與栽培研究現況.....	3
表 2. 冬塊菌、黑孢塊菌與台灣塊菌的形態區分.....	13
表 3. 本試驗分析所使用之引子.....	28
表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類.....	31
表 5. 5.8S-ITS2 基因序列，以 Clustal X 1.81 軟體進行兩兩相比的相同度 (identity) 分析.....	56
表 6. β -微管蛋白基因序列之，以 Clustal X 1.81 軟體進行兩兩相比的相同度 (identity) 分析.....	57
表 7. 不同溫度處理與不同菌種對菌根感染率在接種後各月份的顯著性分 析.....	100
表 8. 不同溫度處理與不同菌種對苗木苗高在接種後各月份的顯著性分 析.....	106
表 9. 不同溫度處理與不同菌種對苗木根頸在接種後各月份的顯著性分 析.....	112
表 10. 不同溫度處理與不同菌種對苗木葉片養分濃度在接種 8 個月後的顯 著性分析.....	118
表 11. 不同溫度處理、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分間之相關性.....	120
表 12. 菌種、溫度對菌根感染率、苗高、根頸之變異數分析與交感效應.....	121

第一章、緒言

一、塊菌之介紹

塊菌 (truffles) 為塊狀之地下真菌 (hypogeous fungi) 的通稱，一般專指塊菌屬 (*Tuber spp.*) 的真菌，在分類學上是屬於子囊菌亞門 (Ascomycotina)、盤菌綱 (Discomycetes)、塊菌目 (Tuberales)、塊菌科 (Tuberaceae)、塊菌屬 (*Tuber*)。塊菌被認為是由子囊盤在地上部之盤菌屬演化而成，經演化後子囊盤向下埋於土中，且子實層亦向內形成脈狀彎曲，基部亦由有裂片開口逐漸形成整個封閉之堅實菇體，全埋或半埋於土中約 1~20 公分深處 (Delmas, 1983)。

在日本稱其子實體為「松露」，中國大陸有稱「土菇」或「無娘果」，在台灣又稱之為「塊菌」，而英語系國家通稱其為 truffle，是西歐許多國家喜愛的食品，法國料理則視其與魚子醬、鵝肝醬為同等級，並列為三大食材之一。塊菌因會散發出特殊而持久之香味，加上富含蛋白質、維生素、礦物質與纖維素等營養價值而受大眾喜愛 (Danell and Eaker, 1992)，商業價值舉世矚目；此外，Claus 等 (1981) 以黑孢塊菌 (*Tuber melanosporum*) 的子囊果 (ascocarp) 進行營養成分的分析，發現一種 5-androst-16-en-3ol 的化合物，此種化合物可能是雄性酮前體類物質，能夠引起人的性慾，另外 Claus 等 (1981) 還發現另一種叫新鞘脂類化合物 (new soyasphingosines)，這類化合物能參與調節細胞之多種生物學過程，如生物訊息傳遞、抗原抗體反應等，因此具有某種的藥物功能，能夠調節免疫、並具有保肝的效用等，此等保健功能也使塊菌更受世界的關注 (Claus *et al.*, 1981)。人類對塊菌的認識最早是由歐洲地中海一帶，西元前 350 年的古希臘哲學家 Theophrastus 認為塊菌的形成是雷擊所造成，之後古羅馬學者 Pliny 則表示塊菌的產生是「生物界的奇蹟」，其認為塊菌能在沒有根系的條件下生長發育，乃是大自然的造化，由此可反映出當時人們對於塊菌生長現象仍缺乏科學性的認知；直到 19 世紀初，Persoon 與 Vittadini 對於幾種塊菌進行詳細的描述後，塊菌才有真正的分類地位，塊菌的生活史也才逐漸的為人們所接受 (陳應龍與弓明欽，2000)。

二、塊菌的採收與經濟價值

塊菌因為人工栽培不易，加上栽培所需時間長等因素，使其價值不菲，相當珍貴，其中法國的黑孢塊菌、義大利白塊菌 (*Tuber magnatum*)、夏塊菌 (*Tuber aestivum*)、冬塊菌 (*Tuber brumale*) 以及勃良第塊菌 (*Tuber uncinatum*) 等，均是商業中相當重要的塊菌種；其中，依據 Mello 等 (2006) 的報告指出，義大利白塊菌在 2004 年時的價錢，大約是每 100 公克 300~400 歐元，價錢相當昂貴。王曉娥等 (2005) 針對目前世界上幾種重要的商業塊菌進行初步整理 (表 1)，提供研究塊菌的人員參考。塊菌採收目前面臨最大的問題即是產量的減少，過去法國於 19 世紀時，塊菌的自然產量約為 2000 噸，而根據近年來法國的記載，20 年以來塊菌的產量均僅能維持在每年二十至數十公噸，但是市場上仍有相當高的需求 (Oliver, 2002)。近年來產量相對提高的中國大陸，因印度塊菌 (*Tuber indicum*)、中國塊菌 (*Tuber sinense*)、擬凹孔塊菌 (*Tuber pseudoexcavatum*) 等陸續發現與採收，使中國大陸的塊菌貿易一度興盛，但由於印度塊菌在外形、顏色等與黑孢塊菌相似，造成某些不法商人將前者充當後者，藉以牟取暴利，此一情形也引起法國、義大利等國家一度禁止中國生產的塊菌進口，使中國經營公司與採收農民等遭受莫大的損失 (譚著明與傅紹春, 2002)。

塊菌屬於共生菌根真菌，會與林木形成互利共生的關係，子實體的形成必須仰賴宿主(host)提供碳水化合物為營養來源，且在適當環境下才會形成菇體 (Smith and Read, 1997)。塊菌也與世界其他種高經濟價值的菇類一樣，到目前為止，仍然無法在人工培養基的狀態下產生子實體，唯有與林木共生才能形成，無法像腐生性 (saprobic) 真菌一般的栽培子實體。

表 1. 主要可食塊菌的種類與栽培研究現況 (引自王曉娥等, 2005)

塊菌種類	主要產地	常見宿主	子實體型態特徵	人工栽培現況
黑孢塊菌 <i>T. melanosporum</i>	法國、義大利、西班牙	橡樹、榛子樹	近黑色，表面佈有小疣，產孢組織為黑白相間的大理石條紋狀	商業化生產
夏塊菌 <i>T. aestivum</i>	義大利、匈牙利、中國北方及西南部	紅橡樹、黑白楊、歐洲角樹	深棕色近黑色，有明顯多角形小疣，產孢組織為白色	商業化生產
勃良第塊菌 <i>T. uncinatum</i>	法國、歐洲中部、東部	橡樹、榛子樹、櫟樹	黃褐色近黑色，有扁平的小疣，產孢組織棕色	商業化生產
義大利白塊菌 <i>T. magnatum</i>	義大利、法國	紅橡樹、黑白楊	灰白色，凹陷無疣，產孢組織白色至灰黃色，具白色紋路	商業化生產
冬塊菌 <i>T. brumale</i>	義大利、法國、荷蘭	榛子樹、櫟樹	黃褐色，有扁平小疣，產孢組織白至灰色	正在研究中
波奇塊菌 <i>T. borchii</i>	法國、義大利、中國四川、雲南	橡樹、榛子樹	棕黃色，較平坦無疣狀突起，產孢組織棕黃色	開始人工培養
印度塊菌 <i>T. indicum</i>	中國雲南、四川攀枝花	雲南松、麻櫟、土瓜、馬桑	深棕黑色，有明顯小疣，產孢組織為黑白相間的大理石條紋狀	正在研究中
中國塊菌 <i>T. sinense</i>	中國四川、貴州高原	雲南松、華山松、櫟樹、水紅木	褐色至深褐色，外表佈小疣，產孢組織灰白色	正在研究中
喜馬拉雅塊菌 <i>T. himalayense</i>	喜馬拉雅山區	雲南松、華山松、櫟樹	灰色，有扁平小疣，產孢組織灰白色	正在研究中
台灣塊菌 <i>T. formosanum</i>	台灣	青剛櫟	深棕黑色，有較明顯小疣，產孢組織為暗褐—黑，白至紫色菌脈	開始人工培養

在法國、義大利、西班牙、紐西蘭與澳大利亞等國家，通常是訓練豬或狗來尋找塊菌，不僅效率高，而且不會破壞菌根區域，對於產量比較不會有太大的影響。由於塊菌的高經濟價值，使世界各地的研究人員積極研究塊菌的人工馴化與栽培技術，法國、義大利等國家於 1970 年代，即積極發展塊菌的人工栽培研究，並有一定的研究成果，其中，法國最早實現了塊菌苗商業化生產，為菌根食用菌人工栽培提供了良好的典範（陳應龍，2000）。

三、塊菌人工栽培與菌根苗商業化

塊菌與大多數菌根菌一樣，對於宿主樹種有較強的選擇性與專一性，並且在苗木時期即有所表現，因此，選擇適宜的宿主進行接種，不僅是菌根苗生產的前提，也是塊菌栽培成敗的關鍵（陳應龍，2000）。塊菌菌根化苗木的生產通常是要採用透氣性良好、質地鬆軟的混合性基質，並且要經過高溫高壓滅菌消毒，以減少其他土壤中的共生真菌競爭性影響。基質的理化特性對塊菌的菌根合成亦有顯著的影響，包括土壤的 pH 值、碳/氮比、CaCO₃ 等。Dupre 等（1982）曾以土壤、蛭石、泥炭土與珍珠石等不同基質以及土壤不同氮、磷含量等因素，進行黑孢塊菌的菌根合成影響試驗，結果發現以泥炭土及蛭石為基質最有利菌根形成，其次為珍珠石，效果最差的則為林地表土土壤。

目前，一般塊菌菌根化苗木生產所使用的接種源，主要多為子囊孢子，一般不採用純培養的菌絲體；接種源多為自野外採集或於市場購買塊菌子實體，經打碎、過篩後，加入無菌水即製成孢子懸浮液，此種孢子懸浮液在低溫條件下，可以保存 1 年以上，苗木接種菌根菌後，則需在苗圃中培育約 1~2 年，即可移植至野外出栽。另外，菌根苗通常需採用特殊的柱形育苗容器，這種容器有利於根系的發展，而菌根苗如適當的修剪，亦可使幼根密集分支，提高菌根感染率；適宜的水分除有利宿主根系發展外，亦可減少土壤有害微生物，促進塊菌菌根的合成（Bardet *et al.*, 1996）。Giovannetti 與 Fontana（1982）的研究則表示適度的施肥策略，對於塊菌的產量、菌根感染情形均有顯著的效益。

法國農業科學研究院(French National Institute for Agricultural Research, INRA)在 1971 年建立了第一個塊菌菌根化苗圃，並且也是商業菌根苗的認證與檢測機構，所有出售的塊菌菌根苗，均需通過其檢測與認證，只有菌根感染率符合其標準，且沒有其他非目標共生菌根感染的塊菌苗，才能對外販售，目前約有三十多種不同塊菌與樹種組合的菌根苗上市販賣(陳應龍，2000)。在台灣，Hu 等(2005)於 1987 年使用台灣塊菌的孢子懸浮液，接種青剛櫟(*Cyclobalanopsis glauca*)並形成良好菌根後，先置於溫室培養兩年，之後選取感染率高之 150 株健壯苗木，於 1989 年出栽至台大實驗林，期間施予每公頃 3,000 公斤的 $\text{CaCO}_3:\text{MgCO}_3$ (1:1 mol/mol)，藉以修正土壤的酸鹼度，使適合台灣塊菌的生長；結果於 1996 年成功開始採收台灣塊菌，於 1997 年間收穫約 10 公斤的台灣塊菌，最大的直徑可達 9~10 公分，重量 350 公克；這是台灣塊菌菌根人工化栽培的先例。

四、塊菌生長的生態條件

1. 氣候條件

天然塊菌主要分布於北溫帶和寒帶地區，其他地區分布則較少，這表示塊菌的分布與氣候條件有著一定的關係。例如，黑孢塊菌分布約在北緯 40 度至 47 度之間。海拔約 100~1,000 公尺，而且 Plattner 與 Hall (1995) 表示，黑孢塊菌的最適宜氣候條件為：年降雨量 600~1,500 mm，夏季日均溫 16.5~22 °C (7 月)，冬季日均溫 1~8 °C。此外，Plattner 與 Hall 亦發現，塊菌的生長有著一定的方位性，在法國東南部的 Marseilles 沿海一帶，塊菌生長在較冷的西北向坡面上，這樣可以阻隔乾燥南風的影響；同樣的在 Haute 省，塊菌則多發生在西南向坡面上，這樣可使其免受寒冷北風的侵襲。此外，坡度亦是影響塊菌生長的因素之一，在法國，黑孢塊菌產量最高的區域，通常是坡度、起伏較小的林地，坡度一般不超過 5 度，這種坡度比較不會發生土壤流失與侵蝕的現象，有利塊菌生長；然而義大利中部有一些區域，於塊菌種植園的斜坡上，挖掘出層層的階段，藉以減緩土壤的侵蝕，對塊菌的產量亦有所幫助(陳應龍，2000)。

2. 土壤條件

塊菌對於土壤條件要求嚴苛，在自然條件下，多生長在石灰質土壤中，鈣質頁岩為其生活的典型土壤結構，Barry 等（1994）表示，土壤的 pH 值為 7.9 時，最適宜塊菌的生長與發育；而除土壤酸鹼度外，表土組成結構與礦質營養也會影響塊菌的生長，例如具有較高的微孔性與低體積密度的土壤有利於塊菌生長，而表土抗沖蝕能力、質地、有機物、腐植層類型、根際結構、通氣狀況、水分滲透等，對於塊菌菌根共生體系的建立，也有一定的影響。

3. 宿主範圍

塊菌在自然的條件下，通常可以與櫟 (*Quercus*)、榛 (*Corylus*)、鐵木 (*Ostrya*)、鵝耳櫪 (*Carpinus*)、椴 (*Tilia*)、楊 (*Populus*)、柳 (*Salix*)、赤楊 (*Alnus*)、水青岡 (*Fagus*)、栗 (*Castanea*)、松 (*Pinus*)、雪松 (*Cedrus*)、冷杉 (*Abies*)、胡桃 (*Juglans*) 等屬的樹木形成菌根 (陳應龍, 2000)。另外有研究指出，在西藏地區發現杜鵑 (*Rhododendron* spp.) 林下發現有塊菌共生的情形 (徐阿生, 1999)；而 Giovannetti 與 Fontana (1982) 則以半日花科的灌木 (*Cistus* spp.)，成功的合成了六種塊菌並形成菌根，因此可知塊菌的宿主並不僅限於較為人常知的幾種樹種。

五、塊菌資源多樣性與地理分布

目前在世界，*Tuber* 屬約有 140 種與 65 個亞種，然而，曾被有效且正確的描述之種約有 70~75 個 (Hawksworth *et al.*, 1995; Bougher and Lebel, 2001)，其中，中國大陸約有 26 種 (陳應龍與弓明欽, 2000)，台灣則有兩種。

1. 歐洲地區

歐洲地區是塊菌的主要發祥地，全球約有 80% 以上的塊菌種類分布於此，而且歐洲的一些國家，不僅成為全球商業塊菌及其初級產品的生產與集散地，更是塊菌的重要消費國，全球約有 95% 的塊菌都在歐洲交易後成為當地人們的美味佳餚。在法國，以黑色金剛鑽的黑孢塊菌最有名，最初是發現於法國波爾多 (Bordeaux) 東部的 Périgord 省石灰岩高原地，因此「Périgord truffle」成為黑孢塊菌的代名詞，

Périgord 市也因出產黑孢塊菌而被喻為世界塊菌之都。在法國，還有白塊菌、勃良第塊菌、冬塊菌、中果塊菌 (*Tuber mesentericum*) 與大孢塊菌 (*Tuber macrosporum*) 等，都是分佈較廣且有商業價值的塊菌 (Meotto *et al.*, 1995)。

義大利也是黑孢塊菌的另一出產大國，在義大利的北部與中部，如 Marche、Piedmonte、Umbria 等地區，義大利白塊菌亦是另一重要商業塊菌，主要分布在 Piedmonte、Umbria 與 Tuscany 等地區，除了上述兩種最大產量的塊菌外，還有夏塊菌、冬塊菌、中果塊菌、*T. albidum*、*T. moschatum* 等 (Fanelli, 1998)。此外，匈牙利與西班牙也有多種塊菌分布，如黑孢塊菌、凹孔塊菌 (*Tuber excavatum*)、夏塊菌、棕紅塊菌 (*Tuber rufum*)、波奇塊菌與 *T. foetidum* 等。

2. 中國地區

塊菌在中國主要分布於西南的四川與雲南，西北的新疆和西藏等地，而山西、陝西、遼寧、吉林及福建等省份也都陸續發現有塊菌的分布；中國地區最早發現的塊菌種類，即是印度塊菌，之後又有中國塊菌、喜馬拉雅塊菌 (*Tuber himalayense*)、凹孔塊菌、擬凹孔塊菌、偽喜馬拉雅塊菌 (*Tuber pseudohimalayense*)、遼東塊菌 (*Tuber liaotongense*)、天山塊菌 (*Tuber tianshanense*)、陀孢塊菌 (*Tuber turbinatosporum*) 及會東塊菌 (*Tuber huidongense*) 等，其中有許多新發現的塊菌菌種，對於其相關的分類問題與確切分布狀態，仍然有待深入之研究 (陳應龍與弓明欽, 2000)。

3. 其他區域

在美國的喬治亞州，則有德州塊菌 (*Tuber texense*) 的發現，而在奧勒岡州，則有兩種主要塊菌，即奧勒岡白塊菌 (*Tuber oregonense*) 與 *T. gibbosum* 的分布，此二種塊菌亦為美洲最主要的商業塊菌。在南半球的紐西蘭與澳大利亞，也都有塊菌的分布，例如 Chu-Chou 與 Grace (1981) 在花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*) 林下採集到一種未定名的塊菌 (*Tuber sp.*)，以及歇爾氏塊菌 (*Tuber shearii*)。

4. 台灣地區

台灣地區至目前為止發現了兩種塊菌菌種的分布，Hu (1992) 在 1987 年於台灣省南投縣東埔地區，海拔約 1,300 公尺的青剛櫟天然林分下，採集到了一種形態與黑孢塊菌相似的子囊果，經過以電子顯微鏡將孢子與產孢組織等作詳細觀察後，確定為新種，並命名為台灣塊菌 (*Tuber formosanum*)。之後，Hu 與 Wang (2005) 於台大實驗林和社營林區之青剛櫟根圈附近，又發現了一種褐色的塊菌子囊果，經過觀察比對孢子形態及產孢組織等發現，與大陸發現的會東塊菌等相當類似，但子實體的外部形態略有不同，因果皮表面有頭屑狀特徵，故命名為屑塊菌 (*Tuber furfuraceum*)。

六、本試驗之研究方向

目前台灣對於塊菌之研究，除已發表兩種新種外，也成功以人工合成方法栽培出塊菌子實體 (Hu *et al.*, 2005)，然而每一種菌根菌皆有其最適生長之環境與各自之較佳忍受性與功能，例如彩色豆馬勃 (*Pisolithus tinctorius*) 可耐較高溫 (Marx, 1973)，有菌索之菌根菌可增加根系之耐旱力 (Bowen, 1973)，並有助於養分吸收 (胡弘道等, 1999)。因此，若比較此兩種菌根菌在同一介質下對宿主林木生長及養分吸收之影響，與不同溫度下對菌根化育產生之效益，將可作為日後選擇接種源之依據，尤其以溫度不同時所產生之變化，將可以預知各菌種之適應力。菌根的質與量對苗木之生長與養分吸收影響甚大 (Marx *et al.*, 1989)，而菌根的質與量又受溫度影響最大，故本研究即基於溫度作為首要考慮。

外生菌根分類原本是仰賴傳統的外部形態觀察 (Agerer, 1995)，然而傳統的形態學鑑定方法，常因環境和地理條件等因素的影響而發生分歧，塊菌的分類原本多是利用子實體的外觀與孢子形態來進行，然而此一方式容易有所爭議 (Ceruti *et al.*, 2003)，因此最近年來以分子生物技術如 PCR、RFLP、RAPD 等，來進行菌根之分類，以技術方面來講不僅日新月異，以分類來講更是提供更精確的結果 (王曉娥與姚方杰, 2006)。台灣塊菌與屑塊菌是目前台灣已發表的兩種塊菌，因此利用 PCR 技術分析台灣塊菌與屑塊菌，兩種台灣特有且瀕臨滅絕的塊菌菌種，與世

界其他各種塊菌間，在 rDNA 內轉錄區間 (internal transcribed spacer)、 β -微管蛋白 (β -tubulin) 基因之差異，並進行親緣關係分析，將有助於確定台灣塊菌與屑塊菌之分類地位。

七、研究目的

本研究之目的為 (1) 比較台灣塊菌、屑塊菌及世界其他塊菌屬在以 5.8S-ITS2 以及 β -微管蛋白基因的親緣關係比較；(2) 以分子鐘 (molecular clock) 模式建立台灣與大陸塊菌間之分化時間 (divergence time)；(3) 確定溫度對台灣塊菌及夏塊菌接種青剛櫟後，菌根形成、形態、菌根感染率之影響；(4) 確定溫度對青剛櫟苗木接種台灣塊菌及夏塊菌生長之影響。



第二章、以內轉錄區間 (ITS)、 β -微管蛋白 (β -tubulin) 基因進行塊菌之親緣分析

一、前人研究

(一) 塊菌形態特徵鑑定

菌根的分類向來是研究菌根最基礎工作，菌種種類繁多卻無有規則的菌根形態特徵可供分類時，則會產生相互間不易比較差異且混亂之情形，因此，為了進一步瞭解林木—真菌間的關係，作好菌根分類確有其必要性。胡弘道 (1990) 指出，基於四種研究需求而須針對菌根進行分類：(1) 生理研究—因真菌種間之生理特徵不同，故菌種能改變菌根之生理與形態，並間接影響林木生理之行為；(2) 病理研究—菌根因有菌毯形成機械障礙、分泌抗生素以及避免根吸收土壤毒素等因素，因而有抗病之機制；(3) 生態研究—針對瞭解外生菌根之地理分布與其在自然環境中季節變化等關係；(4) 研究結果之應用—目前菌根接種仍少應用在苗圃及森林之原因，即是因為分類不全之故，若分類健全，則對接種或野外之菌根型，自能預知其功用。

傳統之外生菌根分類及形態特徵研究，是以光學顯微鏡為基礎，進行菌根或子實體表面觀察，但是如菌毯菌絲表面之微細差異，只靠光學顯微鏡之觀察是無法分辨的，因此利用電子顯微鏡技術來觀察菌根之微細構造，給予菌根鑑定、分類等提出更可靠之方法 (Massicotte *et al.*, 1987)。其他如利用不同化學試劑進行菌根試劑反應、細胞化學的利用與其他染色技術等，都可以增加顯微鏡在區別鑑定菌根之效率 (胡弘道, 1990)。描述新發表的塊菌菌種時，也多藉由上述幾種方法，塊菌的形態特徵描述，可以從兩大方向來作觀察，第一種為進行肉眼可觀察到的宏觀特徵 (macroscopic character)，另外一種則是以電子顯微鏡進行微觀特徵 (microscopic character)。宏觀特徵如塊菌子實體的外形、果皮形態是否具疣 (warts)、基部有無凹孔、果肉顏色、產孢組織之菌脈特徵等作簡單的區分，而微

觀特徵則是針對孢子構造、孢子飾紋 (spore ornamentation)、孢子在子囊內的排列、菌絲形態等，作為分類的依據，依據孢子形態更可將塊菌細分為兩大類，一為具刺狀 (spines)，另一種則為蜂巢網狀 (reticulata) (Trappe, 1979)。

最先進行塊菌菌根的外部形態描述為 Fontana 與 Palenzona (1979)，他們是以義大利白塊菌接種毛櫟 (*Quercus pubescens*) 後，以顯微鏡觀察塊菌菌根並描述特徵，之後有許多研究者 (Fontana *et al.*, 1990; Zambonelli *et al.*, 1993) 也以苗木接種塊菌，在形成菌根後，進行形態上的描述。Comandini 與 Pacioni (1997) 則是首先針對兩種形態相類似的塊菌，進行詳細比對形態的研究人員，他們指出兩種亞洲塊菌—印度塊菌與喜馬拉雅塊菌，均與在歐洲有黑色金剛鑽 (black diamond) 之稱的黑孢塊菌有著相類似的外形，此二種亞洲塊菌於 1993 年引進歐洲後，即有許多商人因為他們的價錢較低，而將亞洲塊菌的菌根苗以黑孢塊菌的菌根苗名義出售，造成歐洲地方性塊菌族群受到生物性污染 (biopollution) 的風險，有鑑於此，他們針對此二種亞洲塊菌的菌根形態作詳細的描述與比較。試驗結果發現，以菌根的外部形態來講，兩者之間非常相近，僅可藉由菌毯最外層的部分作區別，喜馬拉雅塊菌的菌毯表面相當明顯，菌絲大多為同種形式且菌絲細胞皆有相似的形狀與大小；印度塊菌的菌毯表面結構異質性相當高，菌絲通常由四邊形或形狀不規則的細胞所組成，且菌絲細胞間隙比較大。此外，Zhang 與 Minter (1988) 的研究指出，印度塊菌的孢子屬於刺狀，喜馬拉雅塊菌的孢子則為網狀，但是研究中卻發現，印度塊菌與喜馬拉雅塊菌，均可發現同時有兩種孢子存在於同一子囊的情形，因此，以形態來觀察兩種亞洲塊菌的方法至今仍存在許多爭議。

Halász 等 (2005) 以外觀形態法進行歐洲白塊菌之分類，他們使用子實體外部形態 (平滑或具疣狀突起)、子囊盤 (excipulum) 外部特徵、表皮囊狀體 (dermatocystidia)、孢子大小、每一個子囊內的孢子數目等五種特徵進行分類，結果成功的將歐洲白塊菌分成五大類，分別為波奇塊菌、*T. foetidum*、*T. maculatum*、*T. puberulum*、*T. rapaeodorum*。而 Halász 等更表示，在他們所研究的塊菌屬中，

表皮囊狀體與子囊盤外部特徵為相當可信賴的分類特徵，然而表皮囊狀體卻在塊菌老化時，會有分解 (collapse) 與消失的情形 (Mello *et al.*, 2000)。此外，Halász 等也針對塊菌形態會因外在環境條件而改變的特性作出建議，他們認為如果要以形態來分類，應該要在各種子實體形成的過程中，針對氣候因子作控制，以減少環境的干擾。

Moreno 等 (1997) 則是在進口自亞洲的喜馬拉雅塊菌中，發現有一些在形態上與傳統的喜馬拉雅塊菌略有不同的新種，因此將其命名為偽喜馬拉雅塊菌，他們也是以孢子與子實體的形態來作區別，結果發現，偽喜馬拉雅塊菌的孢子有一種獨特的特徵，即是網刺狀孢子 (reticulated-spiny)，而且其孢子壁較其他種塊菌薄，子實體顏色與喜馬拉雅塊菌比較起來呈較偏暗褐色；然而此一塊菌菌種若以子實體外部形態來觀察，與喜馬拉雅塊菌、印度快菌、黑孢塊菌與 *T. spinoreticulatum* 等四種塊菌容易混淆。

Wang 等 (1998) 從中國四川地區的雲南松林下發現另一塊菌新種—擬凹孔塊菌，擬凹孔塊菌的最大特徵即是具有褐色的子實體，呈現橢圓狀，且果皮有很深的孔 (deeply excavate)，每一個子囊內具有 1~8 個孢子，孢子形態呈刺網狀。Wang 等指出，世界上主要的有孔塊菌原為兩種，一為凹孔塊菌，另一則為中果塊菌，擬凹孔塊菌為第三種發現的有孔塊菌，三者之間明顯差異為，凹孔塊菌具有較平滑的子實體果皮，每一子囊有 3~5 個孢子，孢子的形態為網狀不具刺；中果塊菌的子實體則呈暗黑色，每一子囊內有一個孢子，但孢子形態亦為網狀不具刺。Wang 與 He (2002) 則發現另一新種，稱之為會東塊菌，他們指出此種塊菌與波奇塊菌、*T. maculatum* 等兩種塊菌，在形態上相當類似，但在孢子的彎曲度不同，且子囊比上述兩種塊菌小很多，子實體的外壁有兩層，孢子形態亦是刺網狀。有趣的是，Wang 與 He 指出，在會東附近所採集到的四種塊菌（中國塊菌、擬凹孔塊菌、*T. giagansporum* 與會東塊菌），孢子形態均為刺網狀。

在台灣，Hu (1992) 所發現的塊菌新種—台灣塊菌，依據其菌根與子實體的

特徵觀察後發現，台灣塊菌與黑孢塊菌的形態相類似，因此將台灣塊菌、黑孢塊菌以及冬塊菌的子實體形態作一比較（表 2），供作分類時的參考。此外，該研究中也提到，依據塊菌的孢子形態可分成刺狀或網狀兩大類，而子實體的果皮形態亦可分成兩大類，分別為表面有疣或表面無疣。但是若以子實體果皮顏色來分，可以分成四大類：*Excavatum*、*Rufum*、*Puberulum* 與 *Aestivum*，其中前三類屬非黑色，最後一類則為黑褐色到黑色，台灣塊菌可以明確的分類為孢子網刺狀與 *Aestivum* 類。此外，冬塊菌也被認為易與台灣塊菌混淆，但是主要可以藉由產孢組織的菌脈顏色與芳香氣味作出區別（表 2）。

表 2. 冬塊菌、黑孢塊菌與台灣塊菌的形態區分（引自 Hu, 1992）

difference in	Species		
	<i>brumale</i>	<i>melanosporum</i>	<i>formosanum</i>
gleba	dark grayish brown to black	dark violet to reddish brown, stained by spore to black	dark brown to black
spore	26-34 x 18-26 μ m, 20-30 x 15-20 μ m, 21-42 x 17-28 μ m	27-35 x 21-28 μ m, 40-55 x 22-33 μ m, 29-55 x 22-35 μ m	12-35 x 10-18 μ m
vein	young and mature light gray to slightly white, color not changed when exposed to air	young roseate, mature yellow, color changed to red when exposed to air	white only when very young, mature yellowish brown to light purple, color not changed when exposed to air
odor	aromatic like nutmeg	very aromatic	slight aromatic

Hu 與 Wang (2005) 發現台灣的另一塊菌新種—屑塊菌，研究報告指出，屑塊菌與大陸的會東塊菌相當類似，但是其子實體果皮顏色較淡，果皮上有頭屑狀特徵，孢子比會東塊菌大且窄（屑塊菌孢子長度平均 1.3~2.3 mm；會東塊菌 1.1~1.4 mm）。有趣的是，屑塊菌之形態與生育環境條件和會東塊菌相類似，同樣情形亦發生在台灣塊菌與印度塊菌等大陸黑塊菌上，這樣的結果證明且支持台灣與大陸間的塊菌，可能有著相同的親緣關係，但是仍需作進一步的分子生物技術分析方可確認。

一般認為形態研究僅限於種間(interspecific)，而無法使用在種內(intraspecific)的區別，但是 Giomaro 等 (2000) 則使用共軛焦 (confocal) 顯微鏡，觀察五種不同品系 (1BO、71BO、43BO、17BO 與 10RA) 的波奇塊菌，波奇塊菌在接種 *Tilia platyphyllos* 後，由其所形成菌根之形態與解剖上的特徵發現，五種品系之菌根形態與菌絲囊狀體 (cystidia) 均相似而無法區分；但是觀察其菌毯表面及內部菌絲解剖形態，則可以將五種品系區分出來，分別為菌絲細胞呈多邊形的有 1BO 與 71BO 兩個品系；細扁平狀的有一個品系為 43BO；處於兩者之間的形態者為 17BO 與 10RA 兩個品系。

胡弘道與黃鏡諺 (2004) 則是以青剛櫟接種印度塊菌及台灣塊菌，在形成菌根後，藉由菌根外部形態與電子顯微鏡技術觀察菌根之微細構造，並比較兩者之間的區別。該試驗結果得知印度塊菌及台灣塊菌與青剛櫟所形成之菌根特徵歸納敘述如下：(1) 印度塊菌：菌根為單根或不規則羽狀，菌根表面粗糙，菌根顏色在幼期為淺褐色，成熟期為褐色，老化期為深褐色；菌毯外層為毯狀原形菌絲結構，內層為規則密實菌絲結構，菌絲表面粗糙有明顯的突紋構造，哈替氏網延伸菌絲侵入至皮層細胞第三層，有菌絲侵入至皮層細胞第三層，菌毯內層菌絲及哈替氏網菌絲內有球狀內容物。(2) 台灣塊菌：菌根為單根或不規則羽狀，菌根表面平坦，菌根顏色在幼期為淺褐色，成熟期為金黃色，老化期為黃褐色—深褐色；菌毯外層為毯狀原形菌絲結構，內層為規則密實菌絲結構，菌絲表面是平滑狀，

哈替氏網延伸菌絲侵入約皮層細胞第二層。此外，胡弘道與黃鏡諺亦以不同化學試劑進行菌根試劑反應，結果發現印度塊菌 (Ti) 及台灣塊菌 (Tf) 菌根元素對化學試劑反應之明顯差異分別為 (1) Ti 之菌根外延伸菌絲與濃硫酸呈紅褐色，與濃氨水呈淡綠色，與 37% formalin 呈淺灰色，然 Tf 者與濃硫酸、濃氨水及 37% formalin 皆不變色；(2) Ti 之菌毯與 10% FeSO₄ 溶液呈深褐色，Tf 者呈深綠色；(3) Ti 之哈替氏網與 10% FeSO₄ 溶液呈淺藍色，與 Tf 者則是綠色；(4) Ti 之哈替氏網與濃氨水呈綠色，然 Tf 者則呈深褐色。

最近幾年以形態學來分類的技術，因科技的進步有所突破，例如以電腦數值化的方法、資料庫整理、套裝統計軟體運用，以及自動影像分析、電子粒子大小等等，均可提供在形態上的分析運用(陳怡君, 2004)。DELTA(Description Language for Taxonomy) 為一套可供查詢各種不同塊菌之所有鑑定資料庫，主要是將十八種已被描述之塊菌形態特徵，包括宏觀與微觀特徵、菌根形態、子實體描述、孢子形態、原產地、宿主、生態特性與該種類的 DNA 序列等，屬於可描述的特性全部輸入建檔，結合可供上網查詢與下載的方式供研究人員利用。此外，還提供許多塊菌在電子顯微鏡下之照片，或是利用手繪圖解外觀的方式作為輔助參考，並結合許多搜尋的功能，例如可以單一或重複輸入某種特徵，即可找出具有此種特徵之所有可能的塊菌種類。而且還有交叉比對的功能，如果欲找出兩種不同塊菌之差異性，則將該兩種塊菌進行交叉分析後，即可出現兩種塊菌間，所有特徵上的差異 (Zambonelli *et al.*, 2000)。

雖然塊菌以孢子、子實體與菌根等形態作分類，可以鑑定與分類出不少種類，然受限於環境因子可能產生之差異，以及人為判斷錯誤等因素而導致誤判，另一方面，常會有不同種菌根卻因外部形態過於相似，而將其歸納為同一種之情形：因此許多學者仍舊對形態分類方式有著爭論 (RiOUSset *et al.*, 2001; Ceruti *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006a)。隨著分子生物技術開發，而有新興鑑定模式的發展，從分子生物的層次配合傳統分類形態鑑定，來探討分類演化關係，將能提供另一

項更佳的分類參考依據。

(二) 分子生物技術之應用與發展

近年來，分子生物技術如雨後春筍般的蓬勃發展，例如：同功異構酶(isozyme) 圖譜 (Marlatt *et al.*, 1996)、脈衝電泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 染色體多形性 DNA 分析 (Segal *et al.*, 1992)、南方雜合反應 (Southern blot hybridization) (Lee *et al.*, 1993)、限制片段長度多形性圖譜 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Gardes *et al.*, 1990)、隨機增幅核酸多形性圖譜 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Warburton *et al.*, 1996)、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) (Young *et al.*, 2002) 等，其中，最常使用在真菌分類鑑定的方法為後四種。

(1) 南方雜合分析

南方雜合分析是利用 ITS 序列設計核酸探針進行雜合分析，藉此可以分析真菌菌種間之差異，其所需的核酸濃度約為 0.1~1 ng。雖然南方雜合分析可以同時檢測許多樣本，但是相對地步驟繁雜、耗時、費用高，且有時會有非專一性反應的問題發生，靈敏度也多半較低，目前侷限於實驗室以純量 DNA 層次作測試，極少延伸至田間進行實務檢測的應用 (Martin *et al.*, 2002)。

(2) 限制片段長度多形性圖譜

限制酶具有切割雙股 DNA 的活性，能夠辨識一段特定核酸序列並予以切割，產生各種大小的 DNA 片段。由於不同生物個體其染色體上限制酶切位之分佈情形，以限制酶切割後產生的核酸片段會有差異，與此 DNA 片段作雜合 (hybridization) 後，經自動顯影 (autoradiography) 可在 X 光底片上看到不同分子量之 DNA 片段，檢定個體間的遺傳變異；然而進行 RFLP 分析時，要特別慎重，因為 RFLP 是對不同大小的 DNA 片段進行分析，故對於帶有不同的核酸序列卻具有相近大小的 DNA 片段，用電泳的方法是不易區分開的 (弓明欽等，1997)。

(3) 隨機增幅核酸多形性圖譜

RAPD 是應用一任意設計約 10 個核苷酸左右的引子 (arbitrarily-designed primer)，與欲鑑識樣品之核酸，以較低之黏合溫度 (annealing temperature) 條件下進行聚合酶連鎖反應，可以產生高度多形性 PCR 產物，所以 RAPD 又稱之為 Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR) (Paavanen-Huhtala *et al.*, 1999)。利用 RAPD 分析遺傳變異的特性有四：(1) 無須解序的資訊即可設計引子；(2) 不必經過選殖序列或放射性的探針；(3) 經由設計引子偵測不等程度的變異；(4) 可以應用於大量分離株與可分析一個位點以上之差異性 (Paavanen-Huhtala *et al.*, 1999)。

(4) 聚合酶連鎖反應

PCR 反應的檢測流程有簡便、靈敏且快速等優點，利用 PCR 大量增幅 DNA 的技術，配合一些後續分析技術之應用，已蔚為分子檢測的發展主流 (黃麗君，2003)。最常利用的檢測方法，就是藉由專一性引子對的設計，進行 PCR 擴增反應，產物則由瓊脂膠體電泳進行分析來做檢測 (Schubert *et al.*, 1999)，而 PCR 試驗則已廣泛應用於實務檢測的工作。PCR 的基本循環反應分為三個階段：變性 (denaturation)，使雙股 DNA 分開變成單股；黏合 (annealing)，引子黏合至模版 DNA 上序列與其鹽基互補之片段，操作溫度視需求而有所不同，一般溫度介於 37~60°C 間；延長 (extension)，以聚合酶之作用形成互補之目標 DNA。

此外，PCR 還有一些改良的方法，例如 Nested-PCR、Multiplex-PCR、PCR-ELISA 技術等，可以使整個分析流程更加便利與迅速，並可增加分析時的靈敏度與專一性 (Bailey *et al.*, 2002)。近年來，定量 PCR (real time PCR) 在微生物檢測方面也有相當多的應用 (Weller *et al.*, 2000)，可以在進行 PCR 時，同步偵測原始 DNA 量，並且省去膠體電泳分析的步驟，簡便且靈敏度高，但相對成本也較高。

(三) 內轉錄區間與 β -微管蛋白基因的特性

近年來越來越多的研究，傾向以分子生物學的方法，來解決形態分類無法解決的問題，PCR 即提供了快速且特異性高的診斷方式。核酸為所有生物的遺傳物質，在所有現存的生物體中，rDNA、 β -微管蛋白基因等都具有相同的遺傳功能，由此可知在演化發生之前，核糖核酸基因即已存在於生物體內，在演化上是高度保留的基因 (Blaxter *et al.*, 1998)，因此這些基因片段適用於親緣關係分析的研究上。

利用 rDNA 來作為分類的依據，已經被許多分類學者廣泛應用，rDNA 因為具有下面特性：(1) 普遍存在於所有生物細胞內；(2) DNA 片段長度適中；(3) 具高重複數 (high copy number)，在生物體內有數百到數千個重複的特性，所以極適合用於分子層次的研究 (徐希世，2006)。此外，rDNA 中有保守性較高的編碼區 (coding regions)，也有變異性高的間隔區 (spacer regions)，在真核細胞中，一個轉錄單位 (transcribed unit) 主要是由小的次單位核糖體 DNA (small subunit ribosomal DNA, 18S)、ITS1 (internal transcribed spacer 1)、5.8S rDNA、ITS2 (internal transcribed spacer 2)，與大的次單位核糖體 DNA (large subunit ribosomal DNA, 28S) 所組成，其中 ITS1、5.8S、ITS2 合稱為 internal transcribed spacer，簡稱 ITS 區域，此區域乃為非保守區域，因此該區域之序列常被用來作為分類鑑定與分析親緣關係之依據 (Hibbet *et al.*, 1995)。

選用真核生物核糖核酸基因來作為分類的依據，小的次單位核糖體 DNA (18S) 可作為偵測的目標，因為細胞內存有多量且充足的演化資訊，可供推論其相近的親緣關係，同時具有演化中高保留性 (Woese and Olsen, 1996) 與高重複數等優點，因此演化速率較慢，雖經過百萬年的歷史，序列變異有限，可用於遠緣生物 (distantly related organism) 之比較，故多作為屬之間的分類依據 (Dams *et al.*, 1988)。至於 ITS 區域，因不受功能限制，可以保留較多的突變 (mutation)，演化速率較快，在屬內種 (species) 間有高度的變異存在，可以用在近緣生物間的比較

(White *et al.*, 1990)。

微管蛋白是由球狀多肽微管蛋白 (globular polypeptide tubulin) 所組成的管狀聚合物，主要是由 α -微管蛋白及 β -微管蛋白兩種主要的微管蛋白所組成，分子量皆約為 50 Kilo Dalton (陳炳宏，2000)。在真核生物的整個演化過程中，微管蛋白氨基酸序列是屬於保留性相當高的序列，且不同物種間微管蛋白氨基酸序列的同質性 (identity) 也相當高，例如蕈類與動、植物間微管蛋白氨基酸序列相似性約為 70% (Silflow *et al.*, 1987)。由藻類、真菌、動物以及植物等的微管蛋白基因結構比對發現，微管蛋白基因的插入子 (intron)，分布位置的保留現象多發生於相同生物界內的相近物種間，推測不同生物界的微管蛋白基因結構間具有演化上的歧異性，因此可進一步在種間的分類上作使用 (Cleveland and Sullivan, 1985)。

(四) 分子生物鑑定在研究塊菌方面的應用

塊菌有其重要的商業價值，許多塊菌因子實體形態過於相似，致使常有以較低價的塊菌充當高價塊菌買賣之情形，有鑑於此，發展分子生物鑑定塊菌的種類有其必要性。

在塊菌的分子生物技術中，種內的鑑定多以 ITS、5.8S-ITS2 與 β -微管蛋白等基因來進行，而屬之間的分類依據則是以在演化中具有高保留性、高重複數的 18S 核糖體 DNA 來進行。Percudani 等 (1999) 以真菌的 18S rDNA 通用引子對 NS1/NS8，進行塊菌屬與地菇屬 (*Terfezia*) 的 PCR 反應，根據最大可能性 (maximum-likelihood, ML) 分析方法繪出親源關係圖，結果顯示六種塊菌屬 (*T. panniferum*、*T. magnatum*、*T. excavatum*、*T. rapaeodorum*、*T. borchii* 與 *T. gibbosum*) 與兩種地菇屬 (*Terfezia terfezioides*、*T. arenaria*) 分別位於不同的支序群 (clade) 中。O'Donnell 等 (1997) 也是以 18S rDNA 來作塊菌科內，屬間的親緣分析，結果顯示塊菌科下有 5 個屬，包含 *Dingleya* 屬、*Reddellomyces* 屬、網黏菌屬 (*Labyrinthomyces*)、*Choiromyces* 屬以及塊菌屬，這均表示 18S rDNA 確實可作為塊菌屬與其他屬間的分類依據。

Iotti 等(2002)成功分離出六種塊菌(*T. maculatum*、*T. rufum*、*T. melanosporum*、*T. aestivum*、*T. brumale*、*T. macrosporum*)，並以菌絲體培養繁殖後，使用通用引子對 ITS1、ITS4 進行 PCR 反應，獲得該六種塊菌之 ITS 區域後，至 NCBI 進行 Blast search，比對 GenBank 中與該六種塊菌菌種最相近的 ITS 序列，結果發現 *T. maculatum* 最相近序列為 *T. maculatum*(AF003919)、*T. rufum* 最相近序列為 *T. rufum* (AY112894)、*T. melanosporum* 最相近序列為 *T. melanosporum* (U89359)、*T. aestivum* 最相近序列為 *T. aestivum*(AF106886)、*T. brumale* 最相近序列為 *T. brumale* (AF001010)、*T. macrosporum* 最相近序列為 *T. macrosporum* (AY112895)；之後再以搜尋自 GenBank 的 ITS 序列與該六種塊菌之 ITS 序列，進行演化樹 (phylogenetic tree) 分析，得到的演化樹可以分成六個支序群，而六種分離成功的塊菌，與各自在 GenBank 所 Blast search 最相近的序列，均落在同一支序群中，再次確認該實驗所分離的菌絲為其目標塊菌。

Baciarelli-Falini 等(2006)以毛櫟接種黑孢塊菌的塊菇園為研究對象。他們從試驗地中採集到 140 個菌根樣本，初步以形態方式分類後，發現所有樣本中有 6 種為塊菌屬的菌根，而此 6 種又可以藉由形態判定出四種分別為波奇塊菌、冬塊菌、黑孢塊菌與夏塊菌，其他兩種(ECMm1、ECMm3)則僅能判斷至屬(*Tuber* sp.)。Baciarelli-Falini 等針對該 6 種塊菌進行 PCR 增幅反應，在獲得 ITS 區域後，至 NCBI 進行 Blast search，結果發現 ECMm1 與 *T. scruposum* 有極高的相似度(92~98%)，而 ECMm3 則是與棕紅塊菌有極高相似度(91%)；此 6 種塊菌與從 GenBank 中獲得的 13 種塊菌之 ITS 區域作親緣分析後，發現 ECMm1 確實與 *T. scruposum* 為同一支序群中，ECMm3 則是與棕紅塊菌及 *T. ferrugineum* 位於同一支序群中 (bootstrap=100%)。

Frank 等(2006)以美國奧勒岡州所發現的兩種新種塊菌 (*T. quercicola*、*T. whetstonense*)，與該兩種形態類似的塊菌 (*T. candidum*) 作分子生物鑑定，該研究使用另一種通同引子對 ITS1F 與 ITS4 進行 PCR 反應，所得到的 ITS 序列與從

GenBank 中選出的七種白塊菌（波奇塊菌、*T. malculatum*、*T. puberulum*、*T. dryophilum*、*T. foetidum*、*T. rufum*、*T. ferrugineum*），以 PAUP 4.0 作親緣分析，所得的結果與孢子形態分類相同，分成兩個支序群，一種為網狀孢子群（波奇塊菌、*T. malculatum*、*T. puberulum*、*T. dryophilum*、*T. foetidum*、*T. whetstonense*），另一支序群則為刺狀孢子群（*T. rufum*、*T. ferrugineum*、*T. quercicola*、*T. candidum*）。

許多塊菌的外部形態過於相類似，因此造成研究人員間的爭論，夏塊菌與勃良第塊菌即是最典型的例子。Riousset 等（2001）提出兩者之間應該是兩個種，孢子網紋的長度與氣味不同，是兩者間最大區別特徵；然而卻也有些學者（Gandeboeuf *et al.*, 1997; Urbanelli *et al.*, 1998）認為勃良第塊菌僅是夏塊菌的亞種（*subspecies*）。Mello 等（2002）從不同生育地蒐集了 20 個品系的勃良第塊菌，以及 12 個品系的夏塊菌，於增幅兩種塊菌的 ITS 區域後，繪出親緣關係圖，結果成功的將夏塊菌與勃良第塊菌分成兩個支序群，因此 Mello 等推斷兩者為不同的種。然而 Paolocci 等（2004）再以不同品系的夏塊菌與勃良第塊菌作 ITS 區域之增幅，另外並以 EFtFw/EFtBw 引子對，進行 β -微管蛋白基因之增幅作佐證；結果卻發現無論是 ITS 區域或 β -微管蛋白基因之分析，兩者間均呈現為同一個種，因此 Paolocci 等認為生態環境的差異，使兩者間產生些微的基因、孢子形態、氣味等差異。

此外，黑孢塊菌與大陸的黑色塊菌群（印度塊菌、喜馬拉雅塊菌、中國塊菌）間，也有著形態相似的困擾，前文有提到許多商人將兩者混合之後以高價買賣，因此有許多學者投入研究黑孢塊菌與中國黑塊菌間的區別。Paolocci 等（1997）以通用引子對 ITS1/ITS4 增幅黑孢塊菌與四品系印度塊菌之 ITS 區域後，根據 alignment 結果顯示可以明顯發現黑孢塊菌與印度塊菌間的區別。Rubini 等（1998）則使用了三種黑色塊菌（黑孢塊菌、冬塊菌與印度塊菌）作 PCR 試驗，結果發現三種塊菌間的 ITS 區域長度呈現多型性（*polymorphism*），尤其冬塊菌的 ITS1 區域較其他兩種塊菌長約 300 bp。Roux 等（1999）蒐集了 10 種歐洲與大陸的塊菌（黑孢塊菌、印度塊菌、偽喜馬拉雅塊菌、冬塊菌、夏塊菌、凹孔塊菌、義大利白塊

菌、*T. puberulum*、*T. dryophilum*、*T. maculatum*) 子實體，成功增幅出塊菌的 ITS 區域後，再至 GenBank 中搜尋五種 (中果塊菌、*T. panniferum*、*T. ferrugineum*、波奇塊菌、勃良第塊菌) 相類似的塊菌之 ITS 序列，使用軟體進行矩陣推演 (NJ) 方式繪出親緣關係圖，結果呈現 3 個支序群，義大利白塊菌並未與其他白塊菌 (*T. maculatum*、波奇塊菌、*T. dryophilum*、*T. puberulum*) 位於同一支序群，卻是與棕色塊菌且孢子為刺狀的一群 (*T. panniferum*、中果塊菌) 位於同一支序群；黑色塊菌群 (黑孢塊菌、冬塊菌、印度塊菌、喜馬拉雅塊菌) 均位於同一支序群，且相關性非常密切 (bootstrap=100%)。Zhang 等 (2005) 則是針對中國具有商業價值的黑色塊菌群 (印度塊菌、喜馬拉雅塊菌、擬凹孔塊菌、偽喜馬拉雅塊菌) 作研究，以通用引子對 ITS4/ITS5 作 PCR 增幅反應，經解序得到 ITS 區域後，於 GenBank 中搜尋四種塊菌 (凹孔塊菌、冬塊菌、波奇塊菌、中果塊菌) 作比較，Zhang 等是使用 PAUP 4.0 軟體以最大節省性 (maximum-parsimony, MP)、最大可能性 (ML)、矩陣推演 (NJ) 方式產生親緣關係圖，結果顯示 MP、ML 與 NJ 的分析成果均相類似，而印度塊菌各品系間並非呈單一族群，分別位於兩個支序群 (Group A、B) 中；喜馬拉雅塊菌之兩個品系也分別位於印度塊菌的兩個支序群 (Group A、B) 中，偽喜馬拉雅塊菌則位於印度塊菌 Group A 中，而 Group A 與 B 之間序列最大不同，是在於 ITS 2 的長度差異；凹孔塊菌與中果塊菌位於同一支序群中 (bootstrap=98%)，但擬凹孔塊菌則與 Group A、B 位於同一支序群中 (bootstrap=83%)。有趣的是，Zhang 等還發現有些以前發表過的菌種，經過分子生物方式鑑定後，推斷以前可能被誤鑑定 (misidentified) 為其他種的現象。

Wang 等 (2006 a) 以通用引子對，增幅擬凹孔塊菌的 ITS 與 β -微管蛋白基因序列，結果發現擬凹孔塊菌與冬塊菌一樣，ITS 1 的區域均比其他黑塊菌長約 300 bp，而 Wang 等自 GenBank 擷取其他 18 種塊菌之 ITS 區域，並以 5.8S-ITS2 及 β -微管蛋白基因序列進行親緣分析，經使用矩陣推演方式繪出親緣關係圖後，在 5.8S-ITS2 的部分形成五個主要支序群：支序群 I 稱為黑孢塊菌群 (包含亞洲黑塊

菌)；支序群 II 稱為義大利白塊菌群；支序群 III 為棕紅塊菌群；支序群 IV 為凹孔塊菌群；支序群 V 為夏塊菌群；在 β -微管蛋白基因方面，則是形成兩個支序群，支序群 I 包含黑孢塊菌群，支序群 II 則有義大利白塊菌、夏塊菌以及中果塊菌。然印度塊菌與中國塊菌在中國地區分布廣泛，且品系甚多，因此 Wang 等 (2006 b) 在使用 67 個印度塊菌、2 個喜馬拉雅塊菌、1 個偽喜馬拉雅塊菌與 5 個中國塊菌的 ITS 與 β -微管蛋白基因，以 MEGA version 2.1 進行親緣關係分析後，認為在中國發現的四種塊菌 (印度塊菌、喜馬拉雅塊菌、中國塊菌、偽喜馬拉雅塊菌)，均推測屬於同一個種。

分子生物技術除了有進行黑色塊菌的分類外，亦有針對一些外部形態相類似之白塊菌進行鑑定，其中以波奇塊菌與 *T. maculatum* 最常被拿來作比較；Henrion 等 (1994) 的研究指出，以 PCR 擴增 *T. ferrugineum*、義大利白塊菌與棕紅塊菌的 ITS 區域後，藉由塊菌之間的 ITS 長度不同，而可將該三種塊菌鑑定出來。之後，Mello 等 (2000) 使用波奇塊菌與 *T. maculatum* 的專一性引子 (specific primers) 進行 PCR 增幅試驗，比較兩者之間的差異，結果顯示三種新模式 (neotype) 的波奇塊菌，所增幅出來的 PCR 產物均落在 430 bp 之間，而三種新模式的 *T. maculatum* 則是落在 400 bp 之間，由此發現兩者之間的 ITS 區域長度不同，可以使用 PCR 的方式將兩者鑑定出來。Mello 等 (1999) 以專一性引子，進行波奇塊菌與義大利白塊菌的種內差異研究，結果發現採集自不同地區、國家的兩種塊菌，其種內不同品系間的 ITS 區域差異呈現非常小的情形，但是種間則仍然有差異。Kovács 與 Jakucs (2006) 則是自 GenBank 中選取 46 個白塊菌之 ITS 序列，以 PAUP 4.0 之矩陣推演方式產生親緣關係圖，結果顯示歐洲中的白塊菌可以分成兩大分類群，一群包含 *T. rapaeodorum*、*T. maculatum*、*T. foetidum*，另一群則包含 *T. puberulum*、波奇塊菌、*T. oligospermum* 與 *T. dryophilum*，然而這樣的分類結果，卻與從前以子實體外觀特徵為分類依據的結果不相符，因此 Kovács 與 Jakucs 指出，依據菌根解剖特徵或子實體外觀特徵等形態分類方法，不是良好的分類方法，因為這些特徵

(表皮、菌毯特徵、細胞壁厚度、細胞角度與囊狀體大小等) 重複性高且變化情形太大。

另外，有一些塊菌因分布的地理範圍較廣(黑孢塊菌、印度塊菌等)，因此種內的變異因分布區域不同而有所不同；一般來說，塊菌的自然分布與族群的基因結構受限於至少五個因子：(1) 宿主的分部情形(例如：落葉性外生菌根菌樹種)；(2) 食真菌性(mycophagous)動物散撥孢子的情形；(3) 生態限制因子(例如：石灰質土壤與溫度狀態等)；(4) 地理屏障(例如：黑孢塊菌因為地中海的地理屏障，無法向非洲擴展)；(5) 歷史因素(例如：冰河殘存塊菌菌種從歐洲北部向南方擴展的途徑)等(Murat *et al.*, 2004)。為了釐清分布在不同區域的黑孢塊菌，其種間的基因變異情形，Murat 等(2004)自法國的(1) 東北部(Lorraine、Burgundy)；(2) 阿爾卑斯山旁(Jura、Isere、Drome)；(3) 南法沿海地區(Piedmont、Rhone provence、Inner provence、Languedoc)；(4) 庇里牛斯山區(Roussillon、Ariege) 以及(5) 法國西部(Tarn、Lower-Quercy、Périgord-Quercy、Charentes、Touraine) 等五大生產黑孢塊菌的區域，各以 PCR 的方式增幅出不同產地的 ITS。結果顯示，法國的黑孢塊菌可以分成三大支序群，分別為 Burgundy 支序群、東部支序群(Lorraine、Drome、Isere、Piedmont、Lower-Quercy、Jura、Languedoc) 以及西部支序群(Rhone provence、Tarn、Inner provence、Roussillon、Touraine、Ariege、Charentes、Périgord-Quercy)；但是，這些不同區域所生產的黑孢塊菌，種間的基因多樣性呈現不顯著差異，Gandeboeuf 等(1997)針對不同區域的黑孢塊菌之種內差異比較，亦有相類似的結果。

土壤中因為同時存在許多不同的非目標菌種，因此從田間直接採取菌根或菌絲，進而作分子生物鑑定有相當大的風險；有鑑於此，有學者(Iotti and Zambonelli, 2006)投入此一方面之研究，他們發現了一種比傳統方式更快速、經濟，且更敏感與適用於微細樣品的方法，於萃取採集於田間之 3 種塊菌(波奇塊菌、棕紅塊菌、黑孢塊菌)菌根樣本 DNA 後，在進行 PCR 反應前加入約 20 至 40 μg 的牛血

清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)，這樣的步驟可以幫助 PCR 反應，增幅出正確的目標菌種組織，藉此可避免其他非目標菌種的污染，使用此一方式之成功機率約在 80% 左右。

(五) 分子鐘模式的建立與分化時間之推估

分子鐘的觀念是 Zuckerkandl 與 Pauling (1965) 首先提出來的，他們認為蛋白質與 DNA 序列的演化是依恆定的速度 (constant rates) 進行，因此比較不同生物間之序列差異，即可以推算出種間分化的時間與種源間的關係。最常被引用的分子鐘，是 Brown 等 (1982) 所提出的，在同源的一組動物粒腺體 DNA 間，每百萬年約發生 2% 的序列差異。但是 global clock 是否存在，仍有爭議 (Avice, 1998)，因為不同種群生物之演化速度可能不同，不過若是採用相同 DNA 序列比較相近種類時，仍可推測 local clocks，即不同種群生物可能各有其恆定的演化速率。目前分子鐘的推算，大都是以地理事件或化石定年的方式定出時間，其中以生物地理學 (biogeography) 為背景，探討地理事件對於目前不同地理區間的物種，所造成的遺傳分化，又稱之為親緣地理學 (Phylogeography) (Avice *et al.*, 1987)。親緣地理學建構在傳統生物地理學的角度上，結合了分子遺傳學 (Molecular genetics)、族群遺傳學 (Population genetics)，甚至是動物行為學 (Ethology) 的知識 (Avice, 1998)，若將這些知識加以統合，即可推估出符合的分化時間。在塊菌方面則有 Jeandroz 等 (2008)，依照塊菌屬與 *Peziza* 屬間，開始分化的時間為 529 Ma，依此推算所有塊菌間的 5.8S-ITS2 序列之分化時間。該試驗結果顯示，所有塊菌主要形成五個支序群，支序群 I 為 *Aestivum* group，分化時間為 160 Ma；支序群 II 為 *Excavatum* group，分化時間為 111 Ma；支序群 III 為 *Rufum* group，分化時間為 70 Ma；支序群 IV 為 *Melanosporum* group，分化時間為 76 Ma；支序群 V 為 *Puberulum* group，分化時間為 65 Ma。

二、材料與方法

(一) 塊菌菌種採集

台灣塊菌子實體採集於 2005、2006 及 2007 年之 11~12 月份，地點位於台灣大學實驗林和社營林區第 27 林班地與東埔山區，地理位置屬於台灣省南投縣信義鄉(圖 1)。和社營林區第 27 林班地，原屬 25 年生之杉木(*Cunninghamia lanceolata*)造林地，經皆伐後將青剛櫟苗木栽植於該地，另東埔山區則為青剛櫟天然次生林。該兩地點之年平均溫度約為 16.5°C，年平均雨量為 1128—2272mm，夏季平均雨量最大，春季平均雨量最少。屑塊菌子實體則於 2006 年，採集於和社營林區第 27 林班地內。

(二) 去氧核糖核酸萃取

將所採集到的台灣塊菌及屑塊菌子實體，小心切取 0.1~0.5 克之產孢組織 (gleba)，以液態氮研磨，研磨到呈粉末狀；將已分離成功之台灣塊菌菌絲體，使用 YMT (Hu and Liou, 1995) 營養液培養 7 天後，先將其過濾並以無菌水洗淨，並以液態氮研磨，研磨到呈粉末狀。之後再以 VIAGEN 公司之 Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System Kit 抽取 DNA，抽取步驟依據廠商之操作手冊進行。首先將研磨成粉的組織置於離心管 (eppendorf) 中，立即加入 400 μ l 的 PX 1 與 4 μ l 的 RNase A solution 混合溶液。加入完成後以震盪器 (vortex) 震盪至混合均勻後，將其放入 65 °C 的水浴槽中 10~15 分鐘，在這過程中需將離心管每隔 3 分鐘搖動使內容物均勻。之後，加入 130 μ l 的 PX 2，將其上下搖晃，不可太大力，然後置於冰上約 5 分鐘，旋將上層液吸至 shearing tube 中 (裝於 collection tube 中)，注意取出時不可太快，避免吸到下面之殘渣，以 13,000 rpm 全速離心 3 分鐘，然後將離心後流出之液體另外置於新的離心管中。取 0.5 倍的 PX 3 及等體積的 100% 酒精，與之前流出的液體均勻混和，然後置入 Plant Genomic DNA Mini Column (裝於 collection tube 中)，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，後丟棄濾液，再將剩餘的含 DNA 液體再依序操作一次。之後，以 0.7 ml 的 Washing Solution 清洗 Column，以 13,000

rpm 全速離心 30 秒，洗兩次，兩次都將濾液倒掉，洗完兩次後再全速離心 2 分鐘，徹底移除 Washing Solution。把 Column 移到新 tube 中，分兩次各加入 65 °C，100 μ l 的 dd H₂O，以 13,000 rpm 全速離心 1 分鐘，使 DNA 洗出液（各兩次，每次均加 100 μ l）。將所萃取出來的 DNA 保存於 4 °C 的冰箱中以備用。

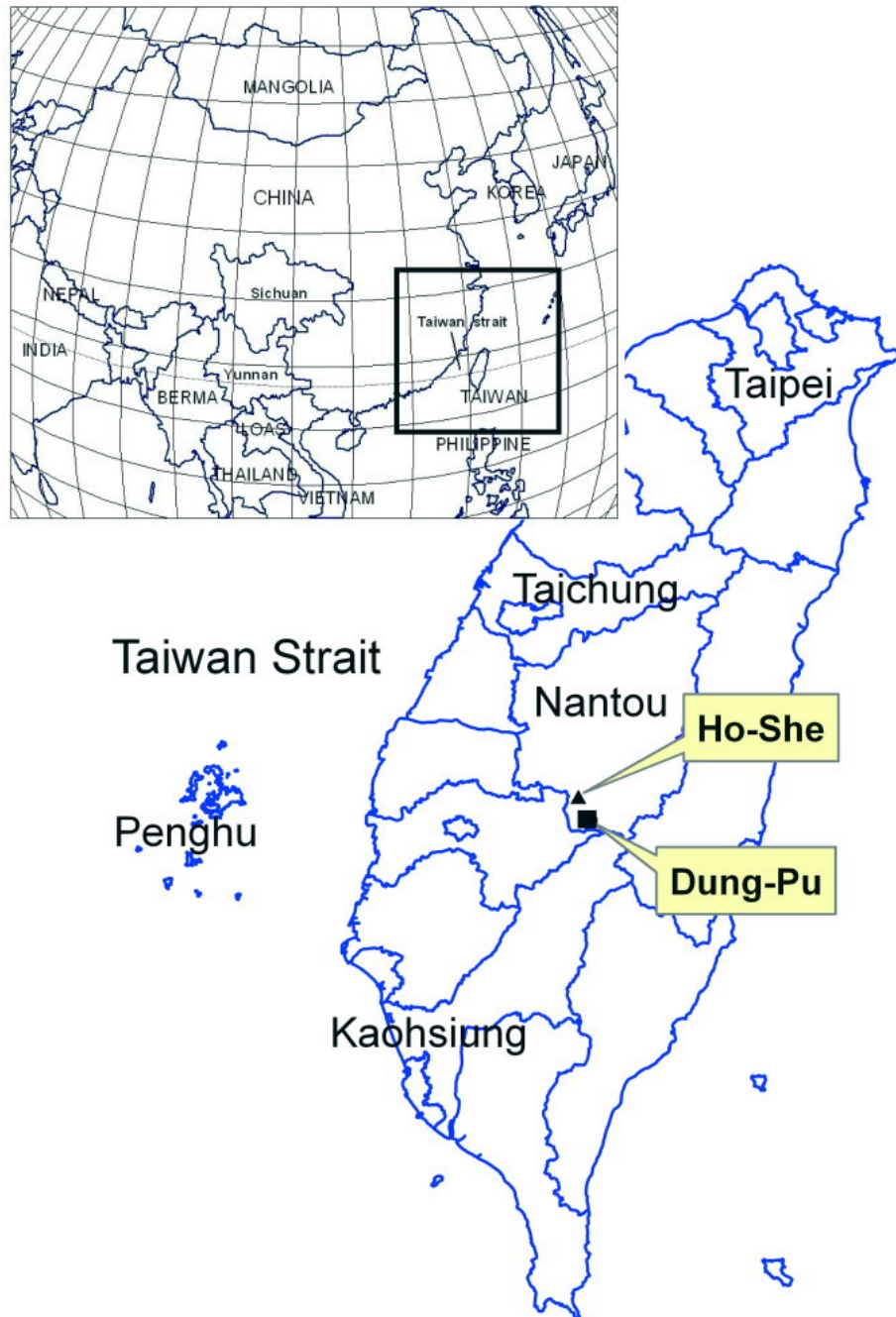


圖 1. 本試驗採集台灣塊菌與屑塊菌之位置圖

(三) 聚合酶連鎖反應 (PCR, Polymerase Chain Reaction)

根據真菌 rDNA、 β -微管蛋白基因之保守性序列，本試驗以通同引子對 (universal primer pair) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)、Bt2a/Bt2b (Glass and Donaldson, 1995)，其基因位置、引子序列詳見表 3、圖 2。PCR 的反應物如下：每一樣品 50 μ l 反應液中，分別加入 1 μ l template DNA (100 μ g/ μ l)、4 μ l dNTP (2.5 mM)、5 μ l 10 \times PCR buffer、0.5 μ l Bioman *Taq* DNA polymerase (5 unit/ μ l, Bioman, Taipei, Taiwan) 與 37.5 μ l 的 dd H₂O，再於每一個樣品中，分別加入個別引子濃度為 3.2 pmol/ μ l 之二種組合的引子對 2 μ l (體積比為 1:1) 進行聚合酶連鎖反應。反應器條件如下：先以 94 $^{\circ}$ C、10 分鐘，使雙股 DNA 分開成為單股，再以 94 $^{\circ}$ C、30 秒變性 (denaturing)，55 $^{\circ}$ C (ITS) 或 58 $^{\circ}$ C (β -微管蛋白基因)、1 分鐘黏合 (annealing)，72 $^{\circ}$ C、1 分鐘延長 (extension)，進行 35 個循環 (cycles)，最後再以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，進行最後產物之延長。

表 3. 本試驗分析所使用之引子 (White *et al.*, 1990; Glass and Donaldson, 1995)

Primers	Mers	序列 (5'→3')	使用目的
ITS1	19	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	真菌 ITS 區域
ITS4	20	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	真菌 ITS 區域
Bt2a	24	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	真菌 β -tubulin 區域
Bt2b	24	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	真菌 β -tubulin 區域

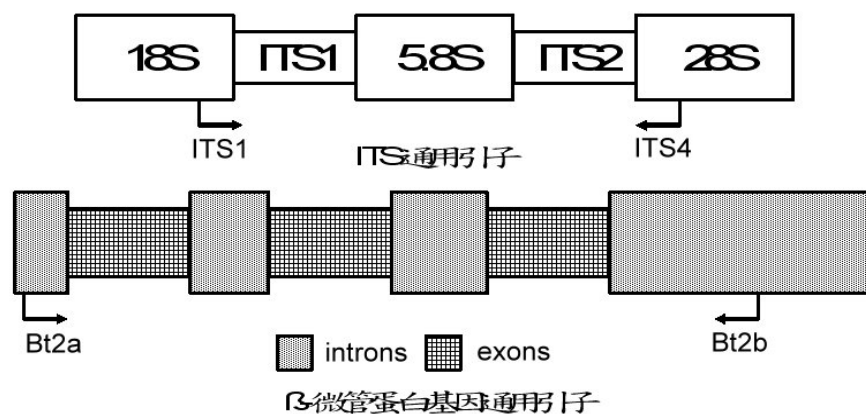


圖 2. ITS、β-微管蛋白基因序列與本試驗使用引子位置圖

(四) 瓊脂電泳

PCR 反應完成後，即進行電泳，使用的試劑有 1.5% (w/v) 的洋菜電泳膠體、電泳緩衝液 (TAE 0.5×)、電泳染色液 (Ethidium Bromide) (0.05 μl/ml) 以及 DNA Loading Dye。先取 9 μl 的 PCR 增幅產物混合 1 μl 的 DNA Loading Dye，均勻混合後注入電泳膠片凹槽內。將電泳槽之電源開啟，並調電壓至 110 V，當染劑顏色達到電泳膠體之 2/3 時 (約 25 分鐘) 停止電泳。取出電泳膠並置入 Ethidium Bromide 中染色約 20 分鐘，染色完成後以紫外光觀察 DNA 片段，並使用數位相機拍照記錄。

(五) 聚合酵素連鎖反應產物之純化與定序

在 PCR 產物純化的實驗中，是採用 GFXTM PCR DNA and Gel Brand Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., U. S. A.)，依據廠商之建議步驟進行。將 PCR 產物 (40 μl) 移至 tube 中，與 200 μl 的 PG buffer 以震盪器混合均勻。把混合好的液體移至 spin column，置於 collection tube 中，以 8,000 rpm 離心 30 秒，後丟棄液體部分。加入 500 μl wash buffer，以 8,000 rpm 離心 30 秒。把 spin column 移至新 tube，加 50 μl 65 °C 的水，靜置 5 分鐘後，以 13,000 rpm 全速離心 2 分鐘。把 spin column 丟棄，將其置於 4 °C 冰箱中備用。定序工作則將 PCR 產物直接送交定序公司進行定序。

(六) 核酸排序比對與基因資料庫搜尋

將定序所得的 ITS、 β -微管蛋白基因序列，至 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中，選取 BLAST，輸入序列及屬名，透過電腦搜尋 GenBank 中的資料。藉由資料庫比對結果可得到與本試驗最相近的菌種，然後再以 Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI) 進行核酸排序，並比較序列間之差異。另外，於基因序列資料庫 PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) 中，搜尋所有 *Tuber* 屬之 ITS、 β -微管蛋白基因區域，作為本試驗中親緣分析使用。

(七) 分子親緣關係之分析

將自 NCBI 中所搜尋得到的確定種名、完整 ITS 與 β -微管蛋白基因序列的 *Tuber* 菌種，與本試驗所解序得到的兩種塊菌序列 (表 4)，存取成 EditSeq 檔案型式 (DNASTAR, Inc.)，並以手動刪除 18S 與 28S 區域。將 5.8S-ITS2 與 β -微管蛋白基因序列，先以 ClustalX 1.81 進行排序後 (Thompson *et al.*, 1997)，再以 MACCLADE 4.0 手動檢視並調整排序狀況。以 PAUP 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony 4.0, Sinauer Associates, Inc. Publishers) 軟體 (Swofford, 2002)，使用矩陣推演法 (Neighbor-joining) (Saitou and Nei, 1987) 與最大儉約法 (maximum parsimony) (Felsenstein, 2004) 兩種方式，進行親緣關係演化樹的計算，然後以 Tree View 3.0 (Diving of Environmental and Evolutionary Biology IBLS) 建構演化樹。

(八) 分子鐘與分化時間之建立

各塊菌間之親緣關係距離 (Phylogenetic distance)，使用 5.8S-ITS2 序列，並以 MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) 軟體計算。首先將 5.8S-ITS2 序列以 Tajima's relative rate test (Tajima, 1993)，測試是否符合分子鐘之假說，當序列符合該假說，則可使用 MEGA 3.1 進行後續之估算。台灣與大陸間的塊菌菌種分化時間，則是依照 Jeandroz 等 (2008) 之研究來推估。

表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類

Taxon	Voucher or code	Geographical origin	GenBank ITS	GenBank β -tub
<i>T. aestivum</i>	E32	Molise , Italy	AF516779	AY170361
<i>T. aestivum</i>	E5	Molise , Italy	AF516791	AF516809
<i>T. aestivum</i>	TaeW075S-W056	Gotland, Sweden	AJ888073	
<i>T. aestivum</i>	E144	Unknown	AY226040 ^b	AY226031
<i>T. aestivum</i>	E2	Abruzzo, Italy		AF516801
<i>T. aestivum</i>	Ep7	Piemonte, Italy		AF516802
<i>T. aestivum</i>	E29	Abruzzo, Italy		AF516803
<i>T. aestivum</i>	E60	Umbria, Italy		AF516804
<i>T. aestivum</i>	E1	Abruzzo, Italy		AF516805
<i>T. aestivum</i>	E18	Abruzzo, Italy		AF516806
<i>T. aestivum</i>	E24	Emilia Romagna, Italy		AF516807
<i>T. aestivum</i>	E50	Umbria, Italy		AF516810
<i>T. aestivum</i>	E58	Umbria, Italy		AF516811
<i>T. aestivum</i>	E61	Umbria, Italy		AF516812
<i>T. aestivum</i>	Ep8	Piemonte, Italy		AF516813
<i>T. aestivum</i>	E40	Abruzzo, Italy		AY226029
<i>T. aestivum</i>	E26	Abruzzo, Italy		AY226030
<i>T. aestivum</i>	E17	Abruzzo, Italy		AY226032
<i>T. aestivum</i>	E142	Unknown		AY226033
<i>T. aestivum</i>	E75	Abruzzo, Italy		AY226034
<i>T. aestivum</i>	E141	Lombardia, Italy		AY226035
<i>T. aestivum</i>	Taes-eu03	Vaucluse, France		DQ336290
<i>T. aestivum</i>	Taes-eu04	Vaucluse, France		DQ336291
<i>T. borchii</i>	Unknown	Unknown	AF132505	
<i>T. borchii</i>	Bo6	Umbria, Italy	AF106890	
<i>T. borchii</i>	17Bo	Italy	DQ679802	
<i>T. brumale</i>	B44	Marche, Italy	AF106880	
<i>T. brumale</i>	Unknown	Unknown	AF132504	
<i>T. brumale</i>	Tbru-eu02	Vaucluse, France	DQ329359	
<i>T. brumale</i>	Tbru-eu03	Vaucluse, France	DQ329360	
<i>T. candidum</i>	SOC 727	Oregon , USA	AY830856	
<i>T. excavatum</i>	B-2597	Miskolctapolca , Hungary	AJ557545	
<i>T. excavatum</i>	MT8-IBL	Nida's Valley, Poland	EU326693	
<i>T. ferrugineum</i>	Unknown	Unknown	AF132506	
<i>T. foetidum</i>	B-2452	Gare, Hungary	AJ557543	
<i>T. foetidum</i>	B-2489	Szigetujfalu, Hungary	AJ557544	
<i>T. himalayense</i>	Th20	Huidong , China	AF132503	
<i>T. huidongense</i>	Thui-pzh09	Panzhihua, Sichuan, China	DQ486031	
<i>T. huidongense</i>	Thui-pzh08	Panzhihua, Sichuan, China	DQ486032	
<i>T. indicum</i>	HKAS 39501	Yunnan, China	AY514305	
<i>T. indicum</i>	HKAS 39506	Yunnan, China	AY514306	
<i>T. indicum</i>	HKAS 39515	Yunnan, China	AY514307	
<i>T. indicum</i>	HKAS 39516	Yunnan, China	AY514308	
<i>T. indicum</i>	HKAS 39507	Yunnan, China	AY514309	
<i>T. indicum</i>	C98-9	China	AF106881	
<i>T. indicum</i>	CU3	China	AF106882	
<i>T. indicum</i>	C4	China	AF106883	

表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類 (續)

Taxon	Voucher or code	Geographical origin	GenBank ITS	GenBank β -tub
<i>T. indicum</i>	D3	China	AF106884	
<i>T. indicum</i>	Ascocarpe I1	China	AF300822	
<i>T. indicum</i>	Ascocarpe I15	China	AF300823	
<i>T. indicum</i>	Ascocarpe I17	China	AF300824	
<i>T. indicum</i>	Ti17	Huili, China	AF132502	
<i>T. indicum</i>	HKAS 38933	Yunnan, China	AY773357	
<i>T. indicum</i>	ascocarpe Y1	China	Y09791	
<i>T. indicum</i>	ascocarpe Y2	China	Y09792	
<i>T. indicum</i>	Unknown	China	U89360	
<i>T. indicum</i>	Unknown	China	U89362	
<i>T. indicum</i>	Tind-ho01	Huili, China	DQ329364	DQ379275
<i>T. indicum</i>	Tind-ho02	Huili, China	DQ375496	DQ379276
<i>T. indicum</i>	Tind-ho04	Huili, China	DQ375497	DQ379278
<i>T. indicum</i>	Tind-ho05	Huili, China	DQ375498	DQ379279
<i>T. indicum</i>	Tind-gs01	Gongshan, Yunnan, China	DQ375490	DQ379268
<i>T. indicum</i>	Tind-gs05	Gongshan, Yunnan, China	DQ375491	DQ379269
<i>T. indicum</i>	Tind-gs06	Gongshan, Yunnan, China	DQ329363	DQ336292
<i>T. indicum</i>	Tind-gs07	Gongshan, Yunnan, China	DQ375492	
<i>T. indicum</i>	Tind-gs09	Gongshan, Yunnan, China	DQ375493	DQ379271
<i>T. indicum</i>	Tind-gs11	Gongshan, Yunnan, China	DQ375494	DQ379272
<i>T. indicum</i>	Tind-gs13	Gongshan, Yunnan, China	DQ375495	DQ379274
<i>T. indicum</i>	Tind-my02	Miyi, Sichuan, China	DQ329365	
<i>T. indicum</i>	Tind-my03	Miyi, Sichuan, China	DQ375499	DQ379280
<i>T. indicum</i>	Tind-my04	Miyi, Sichuan, China	DQ375500	DQ379281
<i>T. indicum</i>	Tind-my05	Miyi, Sichuan, China	DQ375501	DQ379282
<i>T. indicum</i>	Tind-my06	Miyi, Sichuan, China	DQ375502	DQ379283
<i>T. indicum</i>	Tind-pzh01	Panzhuhua, Sichuan, China	DQ329366	
<i>T. indicum</i>	Tind-pzh03	Panzhuhua, Sichuan, China	DQ329367	DQ336294
<i>T. indicum</i>	Tind-pzh04	Panzhuhua, Sichuan, China	DQ375503	DQ379284
<i>T. indicum</i>	Tind-pzh05	Panzhuhua, Sichuan, China	DQ375504	
<i>T. indicum</i>	Tind-pzh06	Panzhuhua, Sichuan, China	DQ375505	DQ379285
<i>T. indicum</i>	Tind-yn02	Yunnan, China	DQ375506	DQ379286
<i>T. indicum</i>	Tind-yn03	Yunnan, China	DQ375507	DQ379287
<i>T. indicum</i>	Tind-yn04	Yunnan, China	DQ375508	
<i>T. indicum</i>	Tind-yn06	Yunnan, China	DQ375509	DQ336295
<i>T. indicum</i>	Tind-yn09	Yunnan, China	DQ375510	
<i>T. indicum</i>	Tind-yn10	Yunnan, China	DQ375511	DQ379288
<i>T. indicum</i>	Tind-yn11	Yunnan, China	DQ375512	DQ379289
<i>T. indicum</i>	Tind-yn13	Yunnan, China	DQ375513	
<i>T. indicum</i>	Tind-yn14	Yunnan, China	DQ375514	
<i>T. indicum</i>	Tind-yn20	Yunnan, China	DQ375515	DQ379290
<i>T. indicum</i>	Tind-yn21	Yunnan, China	DQ375516	DQ336298
<i>T. indicum</i>	Tind-yn22	Yunnan, China	DQ375517	DQ379291
<i>T. indicum</i>	Tind-yn23	Yunnan, China	DQ375518	DQ379292
<i>T. indicum</i>	Tind-yn25	Yunnan, China	DQ375519	
<i>T. indicum</i>	Tind-yn26	Yunnan, China	DQ375520	DQ379294
<i>T. indicum</i>	Tind-yn29	Yunnan, China	DQ375521	DQ379295
<i>T. indicum</i>	Tind-yn30	Yunnan, China	DQ375522	DQ336299

表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類 (續)

Taxon	Voucher or code	Geographical origin	GenBank ITS	GenBank β -tub
<i>T. indicum</i>	Tind-yn31	Yunnan, China	DQ375523	DQ336300
<i>T. indicum</i>	Tind-yn32	Yunnan, China	DQ375524	
<i>T. indicum</i>	Tind-hl03	Huili, China		DQ379277
<i>T. indicum</i>	Tind-gs08	Gongshan, Yunnan, China		DQ379270
<i>T. indicum</i>	Tind-gs12	Gongshan, Yunnan, China		DQ379273
<i>T. indicum</i>	Tind-my01	Miyi, Sichuan, China		DQ336293
<i>T. indicum</i>	Tind-yn12	Yunnan, China		DQ336296
<i>T. indicum</i>	Tind-yn18	Yunnan, China		DQ336297
<i>T. indicum</i>	Tind-yn24	Yunnan, China		DQ379293
<i>T. indicum</i>	Tind-yn33	Yunnan, China		DQ379296
<i>T. indicum</i>	Tind-AF516823	Unknown		AF516823
<i>T. liui</i>	HKAS 48269	Xizang, China	DQ898182	
<i>T. latisporum</i>	HKAS 42380	Yunnan, China	DQ898184	
<i>T. latisporum</i>	HKAS 30838B	Yunnan, China	DQ898185	
<i>T. macrosporum</i>	Macro1	central Umbria, Italy	AF106885	
<i>T. macrosporum</i>	Tmc1	Ferrara, Italy	AY112895	
<i>T. maculatum</i>	Mac1	central Umbria, Italy	AF106889	
<i>T. maculatum</i>	A15	Piedmont, Italy	AM406673	
<i>T. maculatum</i>	Vittad. TL5974	Gurre So, Denmark	AJ969627	
<i>T. magnatum</i>	B2	Piedmont Zanco (AT), Italy	AJ586267	
<i>T. magnatum</i>	Ma2	Umbria, Italy	AF106888	
<i>T. magnatum</i>	TM32	Unknown	AJ002509	
<i>T. magnatum</i>	TmgW085-D044	Unknown	AJ888042	
<i>T. magnatum</i>	MAG258	Unknown		AF516819
<i>T. magnatum</i>	B2	Unknown		AJ579842
<i>T. magnatum</i>	B1	Unknown		AJ579843
<i>T. magnatum</i>	E1	Unknown		AJ579844
<i>T. magnatum</i>	Tm2	Unknown		AJ579845
<i>T. magnatum</i>	D1	Unknown		AJ579846
<i>T. magnatum</i>	Z	Unknown		AJ579847
<i>T. magnatum</i>	XL	Unknown		AJ579848
<i>T. magnatum</i>	Y	Unknown		AJ579849
<i>T. magnatum</i>	A2	Unknown		AJ586424
<i>T. magnatum</i>	A3	Unknown		AJ586425
<i>T. magnatum</i>	C2	Unknown		AJ586426
<i>T. magnatum</i>	C12	Unknown		AJ586427
<i>T. magnatum</i>	B6	Piedmont, Italy		AJ586428
<i>T. magnatum</i>	GO1	Motovun-Montona, Croatia		AJ586429
<i>T. magnatum</i>	GO2	Motovun-Montona, Croatia		AJ586430
<i>T. melanosporum</i>	A71	Spain	AF106877	
<i>T. melanosporum</i>	Unknown	Unknown	AF167097	
<i>T. melanosporum</i>	Ascocarpe MelW	Unknown	AF300825	
<i>T. melanosporum</i>	Tm13	Vaucluse, France	AF132501	
<i>T. melanosporum</i>	M249	Rhone-Alpes, France	AJ583575	
<i>T. melanosporum</i>	MEL142	Unknown		AF516822
<i>T. melanosporum</i>	Tmel-eu05	Vaucluse, France		DQ336301
<i>T. melanosporum</i>	Tmel-eu07	Vaucluse, France		DQ336302
<i>T. mesentericum</i>	Unknown	Unknown	AF132508	

表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類 (續)

Taxon	Voucher or code	Geographical origin	GenBank ITS	GenBank β -tub
<i>T. mesentericum</i>	Mes04	Piedmont, Italy	AM407406	
<i>T. mesentericum</i>	M9	Unknown	AF516797	
<i>T. mesentericum</i>	Mg	Unknown		AF516814
<i>T. mesentericum</i>	Mg2	Unknown		AF516815
<i>T. mesentericum</i>	M2	Unknown		AF516816
<i>T. mesentericum</i>	M4	Unknown		AF516817
<i>T. mesentericum</i>	M9	Unknown		AF516818
<i>T. mesentericum</i>	M14	Unknown		AY170362
<i>T. mesentericum</i>	M13	Unknown		AY170363
<i>T. mesentericum</i>	M1	Unknown		AY170364
<i>T. oligospermum</i>	Oli5	Unknown	AF106891	
<i>T. panniferum</i>	Unknown	Unknown	AF132507	
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-hl01	Huili, China	DQ329368	DQ336303
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-pzh02	Panzhuhua, China	DQ329371	
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-yn05	Yunnan, China	DQ329374	
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-pzh01	Panzhuhua, China		DQ336304
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-yn01	Yunnan, China		DQ336305
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-yn02	Yunnan, China		DQ336306
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-yn03	Yunnan, China		DQ336307
<i>T. pseudoexcavatum</i>	Tpse-yn04	Yunnan, China		DQ336308
<i>T. puberulum</i>	B-1553	Nagykoros, Hungary	AJ557530	
<i>T. puberulum</i>	TL3857	Suserup, Denmark	AJ969625	
<i>T. quercicola</i>	SOC 733	Unknown	AY918957	
<i>T. rapaeodorum</i>	B-2113	Felsoszentmarton, Hungary	AJ557523	
<i>T. rapaeodorum</i>	B-1226	Tompa, Hungary	AJ557527	
<i>T. rapaeodorum</i>	CMI-UNIBO 2483	Dilijan, Armenia	DQ011849	
<i>T. rufum</i>	Truf-eu01	Vaucluse, France	DQ329375	DQ336309
<i>T. rufum</i>	1780	France	EF362474	
<i>T. rufum</i>	ZGT1-IBL	Czestochowa Upland, Poland	EU326690	
<i>T. scruposum</i>	CMI-UNIBO 2201	Dilijan, Armenia	DQ011845	
<i>T. scruposum</i>	CMI-UNIBO 2192	Dilijan, Armenia	DQ011846	
<i>T. sinense</i>	Tsin-hd01	Huidong, China	DQ375526	
<i>T. sinense</i>	Tsin-hd02	Huidong, China	DQ375527	DQ379297
<i>T. sinense</i>	Tsin-hl01	Huili, China	DQ375528	DQ379298
<i>T. sinense</i>	Tsin-hd03	Huidong, China	DQ329376	DQ336310
<i>T. sinense</i>	Tsin-hl03	Huili, China		DQ379299
<i>T. uncinatum</i>	Unknown	Unknown	AF132509	
<i>T. uncinatum</i>	397c	Menconico, Italy	AJ492201	
<i>T. whetstonensis</i>	SOC 756	Oregon, USA	AY830855	
<i>T. zhongdianense</i>	HKAS 45388B	Yunnan, China	DQ898186	
<i>T. zhongdianense</i>	wang0299	Yunnan, China	DQ898187	
<i>T. furfuraceum</i>	HoShe01	Ho-She, Nantou, Taiwan	EU380275 ^a	FJ238062 ^a
<i>T. furfuraceum</i>	HoShe02	Ho-She, Nantou, Taiwan	FJ176920 ^a	FJ238063 ^a
<i>T. formosanum</i>	HoShe01	Ho-She, Nantou, Taiwan	EU380276 ^a	FJ238054 ^a
<i>T. formosanum</i>	HoShe02	Ho-She, Nantou, Taiwan	FJ176913 ^a	FJ238055 ^a
<i>T. formosanum</i>	DungPu01	Dung-Pu, Nantou, Taiwan	FJ176914 ^a	FJ238056 ^a
<i>T. formosanum</i>	HoShe03	Ho-She, Nantou, Taiwan	FJ176915 ^a	FJ238057 ^a
<i>T. formosanum</i>	HoShe04	Ho-She, Nantou, Taiwan	FJ176916 ^a	FJ238058 ^a

表 4. 本試驗所使用的塊菌與外群種類 (續)

Taxon	Voucher or code	Geographical origin	GenBank ITS	GenBank β -tub
<i>T. formosanum</i>	HoShe05	Ho-She, Nantou, Taiwan	FJ176917 ^a	FJ238059 ^a
<i>T. formosanum</i>	DungPu02	Dung-Pu, Nantou, Taiwan	FJ176918 ^a	FJ238060 ^a
<i>T. formosanum</i>	DungPu03	Dung-Pu, Nantou, Taiwan	FJ176919 ^a	FJ238061 ^a
<i>Lophiostoma caulium</i>	taxon:45291	Unknown	AF383953 ^b	
<i>Pyricularia variabilis</i>	CMUZE0229	Thailand	AY265333 ^b	
<i>Terfezia boudieri</i>	Isolate 1	kuwait		DQ899176 ^b

^a 本試驗獲得之序列，其餘則取自 GenBank。

^b 外群之序列。



三、結果

(一) 台灣塊菌及屑塊菌之 PCR 反應結果

本試驗共分析了從不同位置所採集到之 8 個樣品的台灣塊菌，以及 2 個樣品的屑塊菌，以 ITS1/ITS4 及 Bt2a/Bt2b 為引子，經過 PCR 反應增幅塊菌的 rDNA 與 β -微管蛋白基因後，ITS 區域增幅出的片段，主要包含部分 18S rDNA 及 ITS1、5.8S、ITS2 全長度以及部分的 28S rDNA，另外 β -微管蛋白基因則為部分區域。而將 29 個不同種的塊菌 rDNA 序列，刪除截去前段 18S rDNA 與後段 28S rDNA 後，得到全長度的 ITS 區域，可以發現所有樣品之 ITS 序列長度約在 550 bp，而 β -微管蛋白基因的長度則約在 500 bp。本試驗中 8 個樣品之台灣塊菌，ITS 全長度約在 532~533 bp 間，而兩個樣品之屑塊菌，ITS 全長度均為 549 bp。

(二) 台灣塊菌及屑塊菌與其他塊菌菌種之 ITS、 β -微管蛋白基因序列分析比較

為了找出在 GenBank 中，與台灣塊菌及屑塊菌最相近的塊菌種類，至 NCBI 的資料庫中，輸入台灣塊菌與屑塊菌之序列進行 BLAST searches，結果發現台灣塊菌的 ITS 與 β -微管蛋白基因序列，都是與印度塊菌有著最高的相似度 (similarity)；而屑塊菌的 ITS 序列，則是與會東塊菌有著最高的相似度，但其 β -微管蛋白基因序列，卻是與棕紅塊菌有著最高的相似度，這是因為經過搜尋比對後發現，在 GenBank 資料庫中，沒有會東塊菌的 β -微管蛋白基因序列存在。

本研究主要是將台灣固有的兩種塊菌菌種，經由 PCR 反應並解序所得的序列，與目前在 GenBank 資料庫中有註冊的塊菌菌種之 ITS、 β -微管蛋白基因作比較，每一塊菌種選取數個序列下載，共計下載了 124 條 ITS 及 99 條 β -微管蛋白基因，再利用 Clustal X 1.81 軟體進行序列排列比對與分析。經過排列比對後發現，塊菌屬的 ITS1 區域變異性 (variation) 相當大，且序列長度歧異性大，因此本試驗將所有供試之序列，ITS1 區域全部刪除，僅保留 5.8S-ITS2 區域作親緣分析。排列 5.8S-ITS2 序列後 (圖 3) 發現，各塊菌菌種間的 5.8S rDNA 序列是屬於非常保守的區域。在 β -微管蛋白基因方面，則可以發現每一序列內，都包含了兩個插入子

(intron) 區域 (圖 4)。此外，為了更進一步比較台灣塊菌與印度塊菌間之關係，本試驗將台灣塊菌與 GenBank 資料庫中，所有已登錄之印度塊菌序列，以 ITS 全長度作排列比較 (圖 5)，藉以了解此二種塊菌之序列差異。

(三) 台灣塊菌及屑塊菌與其他塊菌菌種之相同度比較

將各塊菌種之 5.8S-ITS2 序列排列比較後發現 (表 5)，所有品系的台灣塊菌與印度塊菌 B 群有著最高的相同度 (identity)，範圍在 86~97% 間，其次為黑孢塊菌群，範圍為 84~92%，而所有品系的台灣塊菌，與其他塊菌種類間之相同度均低於 78%。屑塊菌方面，與會東塊菌之相同度，範圍在 95~97% 間，與棕紅塊菌則為 84~88% 間，其他塊菌種類與屑塊菌間之相同度均低於 82%。在 β -微管蛋白基因方面 (表 6)，所有品系的台灣塊菌，仍是與印度塊菌 B 群有著最高的相同度，範圍在 84~95% 間，與黑孢塊菌、擬凹孔塊菌間則分別為 86~94%、80~92% 間，其他塊菌種類與台灣塊菌間之相同度均低於 60%。在 GenBank 資料庫中，因為缺乏屑塊菌的 β -微管蛋白基因登錄資料，因此屑塊菌是與棕紅塊菌有著最高的相同度，範圍在 88~90% 間，與其他塊菌種間則都低於 80%。

Sequence alignment for 5S-ITS2 region. The alignment shows 110 positions. The top sequence (C5) is the reference: AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGA. The alignment includes sequences for various species such as T. indicum, T. himalayense, T. sinense, T. brumale, T. psuedoexcatatum, T. zhongdianense, T. liuid, T. oligospermum, T. borchii, T. puberulum, T. latisporum, T. foetidum, T. rapaeodorum, T. maculatum, T. rufum, T. huidongense, T. candidum, T. quercicola, T. aestivum, T. uncinatum, T. mesentericum, T. panniferum, T. magnatum, T. macrosporum, T. excavatum, T. pyricularis, and T. lophiostomacaulium.

Sequence alignment for 5S-ITS2 region (continued). The alignment shows 110 positions. The top sequence (T. rapaeodorum) is: AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAGGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGA. The alignment includes sequences for various species such as T. rapaeodorum, T. maculatum, T. rufum, T. huidongense, T. candidum, T. quercicola, T. aestivum, T. uncinatum, T. mesentericum, T. panniferum, T. magnatum, T. macrosporum, T. excavatum, T. pyricularis, and T. lophiostomacaulium.

圖 3. 5.8S-ITS2 之序列排列比對

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
C5	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C7	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C3	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C4	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C1	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C2	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
C6	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumAF106882	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ329367	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumAF132502	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375500	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumAF300823	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375502	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ329363	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375494	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375521	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375506	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375515	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumAF300824	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. himalayenseAF132503	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. sinenseDQ375526	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. sinenseDQ375527	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375516	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375497	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. sinenseDQ375528	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. sinenseDQ329376	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumAF106881	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. indicumDQ375511	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. melanosporumAF106877	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. melanosporumAF300825	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. melanosporumAF132501	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. melanosporumAJ583575	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. melanosporumAF167097	AATGTCGGTCTAC	GGAAAGTATCCAGCAGT	ACACAAT	GCTAAAAAATA	TGGGAAGGTTAC	CAGATATGAACAA	CAGACTTTGTAA				
T. brumaleAF132504	GATTGTTGGGTATATTTAGTACATATGCTCACGAG	ATACTCT	GCTAAAAATCA	CAGGTGGGATAC	CAGGTATATAATA	CAGACTTTGTAA					
T. brumaleDQ329359	GATTGTTGGGTATATTTAGTACATATGCTCACGAG	ATACTCT	GCTAAAAATCA	CAGGTGGGATAC	CAGGTATATAATA	CAGACTTTGTAA					
T. brumaleAF106880	GATTGTTGGGTATATTTAGTACATATGCTCACGAG	ATACTCT	GCTAAAAATCA	CAGGTGGGATAC	CAGGTATATAATA	CAGACTTTGTAA					
T. brumaleDQ329360	GATTGTTGGGTATATTTAGTACATATGCTCACGAG	ATACTCT	GCTAAAAATCA	CAGGTGGGATAC	CAGGTATATAATA	CAGACTTTGTAA					
T. pseudoeccavatumDQ329371	GGTGATAGTATGT	GGAGACATGCTTATAA	CACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CAGATATGGCCAA	TAGACTTTGTAA				
T. pseudoeccavatumDQ329374	GGTGATAGTATGT	GGAGACATGCTTATAA	CACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CAGATATGGCCAA	TAGACTTTGTAA				
T. pseudoeccavatumDQ329368	GGTGATAGTATGT	GGAGACATGCTTATAA	CACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CAGATATGGCCAA	TAGACTTTGTAA				
T. zhongdianenseDQ898186	GGTAG TACTAA	CAAAATAGTACTTGTCT	TACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CGGCACATGGTAG	TAGACTCCAGGA				
T. zhongdianenseDQ898187	GGTAG TACTAA	CAAAATAGTACTTGTCT	TACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CGGCACATGGTAG	TAGACTCCAGGA				
T. liuidDQ898182	GGT G TAGTA	CACAAATGCTTGTCT	TACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CGGCACATGGTAG	TAGACTCCAGGA				
T. oligosporumAF106891	GGTAG TGCTA	AAAGCACCTTTGTC	TACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	CGGCACATGGTAG	TAGACTCCAGGA				
T. borchiaAF132505	GATGG TACTA	ACACTACTTTGTC	GACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	TTGACCGTGGTAA	TAGACTCCAGGA				
T. borchiaAF106890	GATGG TACTA	ACACTACTTTGTC	GACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	TTGACCGTGGTAA	TAGACTCCAGGA				
T. borchiaDQ679802	GATGG TACTA	ACACTACTTTGTC	GACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	TTGACCGTGGTAA	TAGACTCCAGGA				
T. puberulumAJ557530	GATAG TACTA	ACACTACTTTGTC	GACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	TTGACCGTGGTAA	TAGACTCCAGGA				
T. puberulumAJ969625	GATAG TACTA	ACACTACTTTGTC	GACTCT	ACTGAAATGAA	TAGCCAGGATAC	TTGACCGTGGTAA	TAGACTCCAGGA				
T. latiporumDQ898184	GGTTG CACTT	GCAGTGCAT ATCT	CATTGT	GCTGAAATGGA	TGGCCAGGACAA	GAGCAATGGCCAA	CAGACTTTGTAA				
T. latiporumDQ898185	GGTTG CACTT	GCAGTGCAT ATCT	CATTGT	GCTGAAATGGA	TGGCCAGGACAA	GAGCAATGGCCAA	CAGACTTTGTAA				
T. foetidumAJ557543	GGTGG GACTA	TAAGGGAC CTTC	CACTCT	GCTGAAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGTATATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. foetidumAJ557544	GGTGG GACTA	TAAGGGAC CTTC	CACTCT	GCTGAAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGTATATAGCAA	CAGACTTTGTAA				

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
T. rapaeodorumAJ557523	GTCGG GGCTA	TCAGGCGTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. rapaeodorumAJ557527	GTCGG GGCTA	TCAGGCGTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. maculatumAF106889	GTCGG GGCTA	TCAGTCTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. maculatumAM406673	GTCGG GGCTA	TCAGGCGTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. maculatumAJ969627	GTCGG GGCTA	TCAGGCGTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. rapaeodorumDQ011849	GATAT GGCTG	TCAGGCGTCTGC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGATCATAGCAA	CAGACTTTGTAA				
T. scruposumDQ011845	GGTAG GGCTG	GCATTGCTG GTCC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGACCATAGTAA	CAGACTTTGTAA				
T. scruposumDQ011846	GGTAG GGCTG	GCATTGCTG GTCC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGACCATAGTAA	CAGACTTTGTAA				
T. whiptonenseAY830855	GGTAG GGCTA	GCAGTGTCT GTCC	CACTCT	GCTGGAATGAA	TAGGCTGGAAAAG	TAGACCATAGTAA	CAGACTTTGTAA				
T. ferrugineumAF132506	AAGTG AGGACAG	TAATGTGCCTCGGT	CACCCC	ATTGAAATGTA	TTGGCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. rufumDQ329375	AAGTG AGGACAG	TAATGTGCCTCGGT	CACCCC	ATTGAAATGTA	TTGGCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. rufumEF326474	AACTG AGGCTAT	CAGTCTGCCTGGGT	CACCCC	ATCGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. rufumEF326690	AACTG AGGCTAT	CAGTCTGCCTGGGT	CACCCC	ATCGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. huidongenseDQ486031	AACTG AGTCAAA	CAATGTACTTTGGGT	CACCCC	ATTGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. huidongenseDQ486032	AACTG AGTCAAA	CAATGTACTTTGGGT	CACCCC	ATTGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
D1	AACTG AGTCAAA	CAATGTACTTTGGGT	CACCCC	ATTGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCAA	TGAACTTTGTAA				
T. candidumAY830856	AACTG TTGGCAC	TAAGATGTGTGGAT	CACCCC	ATCGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCTAG	CTGACTTTGTAA				
T. quercicolaAY918957	AAACC TTGGCAC	TAATATGCTTAGAT	CATTCC	ATTGAAATGTA	TAGCCAGGACAA	TTAAACCTCTGCTAG	CTGACTTTGTAA				
T. aestivumAF16779	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. aestivumAY226040	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. aestivumAF16791	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. aestivumAJ88073	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. uncinatumAF132509	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. uncinatumAJ92201	GTGTCGATCGGGCCGCGAT	GGC GGCCCGGTCTCCCAACCC	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. mesentericumAM407406	GAGAGAGTCGGGCT	CCCCAGCCCGCCG	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. mesentericumAF132508	GAGAGAGTCGGGCT	CCCCAGCCCGCCG	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. mesentericumAF516797	GATGGCCCGGGCT	GGC AGCCCGCCG	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. panni ferumAF132507	GAACGTGTCGGGCT	GGC AGCCCGCCG	CACCCC	GCCGAAATGTA	TGGGGAGCA	ACACGCAATGGCCGAG	CCGACTTTGTAG				
T. magnatumAF106888	GCTTGGTACCCGACGCG	GGT GGCCGGTCT	CACCC	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. magnatumAJ880042	GCTTGGTACCCGACGCG	GGT GGCCGGTCT	CACCC	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. magnatumAJ586267	GCTTGGTACCCGACGCG	GGT GGCCGGTCT	CACCC	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. magnatumAJ002509	GCTTGGTACCCGACGCG	GGT GGCCGGTCT	CACCC	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. macrosporumAF106885	GTTC GCCCTCCC	GGC GACAGGCC	CACCCG	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. macrosporumAY112895	GTTC GCCCTCCC	GGC GACAGGCC	CACCCG	GTCGAAATTTCA	TTGGGAGGA	TGACGCAACCCCGGCTG	CTGACTTTGTAG				
T. excavatumAJ557545	TTTCGCTGTTGTT	CCCTTGGACGCGGT	GCAGCTCCGCTGAAATGCA	TAAGCAGGACAAA	TGGGCCCGCCGAG	GACTTAGTAA					
T. excavatumUJ326693	TC CACTGTGCC	CCCTTGGACGCGGT	GCAGCTCCGCTGAAATGCA	TAAGCAGGACAAA	TGGGCCCGCCGAG	GACTTAGTAA					
PyriculariaavariabilisAY265333	TCCTGCTCCGCTTT	GGGTCG TGG	ACTCG CCTCAAAAGCA	TTGGCCCGGCTG	TTCCAGCAGGCAA	CGAGCCGACGAG					
LophostomacauliumAF383953	TCCTGCTCCGCTTT	GGGTCG TGG	ACTCG CCTCAAAAGCA	TTGGCCCGGCTG	TTCCAGCAGGCAA	CGAGCCGACGAG					

圖 3. 5.8S-ITS2 之序列排列比對(續)

	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
C5	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C7	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C3	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C4	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C1	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C2	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C6	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
C	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GG				
T.indicumAF106882	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ329367	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumAF132502	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375500	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumAF300823	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375502	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ329363	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375494	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375521	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375506	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375515	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumAF300824	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.himalayenseAF132503	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.sinenseDQ375526	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.sinenseDQ375527	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375497	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.sinenseDQ375528	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.sinenseDQ329376	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumAF106881	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.indicumDQ375511	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.melanosporumAF106877	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.melanosporumAF300825	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.melanosporumAF132501	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.melanosporumAF585375	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.melanosporumAF167097	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.brumaleAF132504	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.brumaleDQ329359	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.brumaleAF106880	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.brumaleDQ329360	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.pseudoexcavatumDQ329371	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.pseudoexcavatumDQ329374	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.pseudoexcavatumDQ329368	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.zhongdianenseDQ98186	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.zhongdianenseDQ98187	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.liuidDQ98182	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.oliigosporumAF106891	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.borchiiAF132505	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.borchiiAF106890	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.borchiiDQ679802	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.puberulumAJ557530	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.puberulumAJ969625	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.latisporumDQ98184	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.latisporumDQ98185	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.foetidumAJ557543	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				
T.foetidumAJ557544	AA ATGGTTGTA	GGAC CTAGATCAGTC	ACAAAGTCATGTC	TGGTCCCTTA	CCTTAAGGAC	CCCCATCCTAGATGAAC	TAT	GGG				

	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
T.rapaedorumAJ557523	CA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	CTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.rapaedorumAJ557527	CA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	CTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.maculatumAF106889	CA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	CTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.maculatumAM406673	CA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	CTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.maculatumAJ969627	CA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	CTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.rapaedorumDQ11849	GA GTATTTT	C - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	TGGAACCCAGG	CCAT	TTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.scruposumDQ11845	GA GTATTTT	A - AGATGCTAAATCAGTT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	CAGAATCCATG	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.scruposumDQ11846	GA GTATTTT	A - AGATGCTAAATCAGTT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	TGTATGCTGGT	CAGAATCCATG	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.whetstonensisAY830855	GA GTATTTT	G - AAATGCTAAATTAGTT	TGAA	CCTGAT	TGAA	CCTGAT	CGGAACCTAAG	CCAT	TTGAC	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.ferrugineumAF132506	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.rufumDQ329375	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.rufumBF362474	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.rufumEU326690	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.huidongenseDQ486031	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.huidongenseDQ486032	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
D	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
D1	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.candidumAY830856	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
T.quericicolaAY918957	AA CTGTTTGA	AGAC ATCAATCAGTC	AAATGCGAGGTT	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CTGGCCCTGGC	CCAT	TGGAT	CCCCATCCTGCGTAAAGCAGTAAAG		
LophiostomacauliumAF383953	AG AT	T - TCGCTGAGC	GTC	GG G	CGGACG	GGCTCTCCAG	TAAAGCAAAACCCCA	TAAT				GACCTCGGA
PyriculariavariabilisAY2653	AG AG	C - AAGCGTGA	GTC	GG G	CGGACG	GGCTCTCCAG	TAAAGCAAAACCCCA	TAAT				GACCTCGGA
T.aestivumAF516779	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.aestivumAY226040	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.aestivumAF516791	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.aestivumAJ888073	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.uncinatumAF132509	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.uncinatumAJ492201	AG ACGCTGTGGT	TAGC GTGGAGCAGTC	CGGGGCCATT	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGTGTCCCTCC	CGCTCTGAG	CCCGTGGCGGATCTCC				GGGGCATCT CGTCA - GGT
T.mesentericumAM407406	AG ACGTTGTGAT	AAGC GTAGAGCAGTC	GTGGC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC				GAGGGCTCTTC TCA - GGT
T.mesentericumAF132508	AG ACGTTGTGAT	AAGC GTAGAGCAGTC	GTGGC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC				GAGGGCTCTTC TCA - GGT
T.mesentericumAF516797	AG ACGTTGTGAT	AAGC GTAGAGCAGTC	GTGGC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC				GAGGGCTCTTC TCTCTGGT
T.panniferumAF132507	AG ACGTTGTGAT	AAGC GTAGAGCAGTC	GTGGC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC	CCGTC				TGGGCATCTTCATCA - GGT
T.magnatumAF106888	AG ACATCGCCTTGA	AATGCGTGTAGTT	GCCAGTCAGGC	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA				TTGCCAATCTGGG
T.magnatumAJ888042	AG ACATCGCCTTGA	AATGCGTGTAGTT	GCCAGTCAGGC	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA				TTGCCAATCTGGG
T.magnatumAJ586267	AG ACATCGCCTTGA	AATGCGTGTAGTT	GCCAGTCAGGC	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA	CCGGTCCGCA				TTGCCAATCTGGG
T.magnatumAJ002509												

	430	440	450	460
C5				
C7				
C3				
C4				
C1				
C2				
C				
C6				
T.indicumAF106882				
T.indicumDQ329367	CGTACGAGTACCA			
T.indicumAF132502				
T.indicumDQ375500	TGTATGAATACCC			
T.indicumAF300823	GGTAGGAATACC			
T.indicumDQ375502	GGTAGGAATACCC			
T.indicumDQ329363	GGTAGGAATACCC			
T.indicumDQ375494	GGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCGAT			
T.indicumDQ375521	GGTAGGGATACCC			
T.indicumDQ375506	GGTAGGGATACCC			
T.indicumDQ375515	GGTAGGGATACCC			
T.indicumAF300824	GGTAGGGATACC			
T.himalayenseAF132503				
T.sinenseDQ375526	GGTAGGGATACCC			
T.sinenseDQ375527	GGTAGGGATACCC			
T.indicumDQ375516	GGTAGGGATACCC			
T.indicumDQ375497	GGTAGG ATACCC			
T.sinenseDQ375528	GGTAGGGATACCC			
T.sinenseDQ329376				
T.indicumAF106881				
T.indicumDQ375511	GGTAGGGATACCC			
T.melanosporumAF106877				
T.melanosporumAF300825	GGAGGGGATCC			
T.melanosporumAF132501				
T.melanosporumAJ583575	GGGAGGGATACCCGCTGA			
T.melanosporumAF167097	GGGAGGGATACC			
T.brumaleAF132504				
T.brumaleDQ329359				
T.brumaleAF106880				
T.brumaleDQ329360				
T.pseudoexcavatumDQ329371				
T.pseudoexcavatumDQ329374	GGTAG			
T.pseudoexcavatumDQ329368	GGTAGGGATACCC			
T.zhongdianenseDQ898186	GGTAGG			
T.zhongdianenseDQ898187				
T.liuidQ898182	GGTAGGGA			
T.oligospermumAF106891				
T.borchiiAF132505				
T.borchiiAF106890				
T.borchiiDQ679802				
T.puberulumAJ557530				
T.puberulumAJ969625				
T.latisporumDQ898184	GGTAGGGA			
T.latisporumDQ898185	GGTAGGGAT			
T.foetidumAJ557543				
T.foetidumAJ557544				
	430	440	450	460
T.rapaeodorumAJ557523				
T.rapaeodorumAJ557527				
T.maculatumAF106889				
T.maculatumAM406673				
T.maculatumAJ969627				
T.rapaeodorumDQ011849				
T.scruposumDQ011845				
T.scruposumDQ011846				
T.whetstonensisAY830855				
T.ferrugineumAF132506				
T.rufumDQ329375	GGTAGGGATACCC			
T.rufumEP362474				
T.rufumEU326690				
T.huidongenseDQ486031	TGTATGGATACCC			
T.huidongenseDQ486032	GGTA			
D	GGTAGGGATACCC			
D1	GGTAGGGATACCC			
T.candidumAY830856				
T.querccicolaAY918957				
T.aestivumAF516779	GGTT			
T.aestivumAY226040	GGTT			
T.aestivumAF516791	GGTT			
T.aestivumAJ888073				
T.uncinatumAF132509	GGT			
T.uncinatumAJ492201	GGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGGTACCC			
T.mesentericumAM407406	GGT			
T.mesentericumAF132508	GGT			
T.mesentericumAF516797	GGTT			
T.panniferumAF132507	GGT			
T.magnatumAF106888				
T.magnatumAJ888042				
T.magnatumAJ586267				
T.magnatumAJ002509				
T.macrosporumAF106885	CTCAGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAA			
T.macrosporumAY112895	G			
T.excavatumAJ557545	GG			
T.excavatumEU326693				
PyriculariavariableisAY265333	GGTA			
LophiostomacauliumAF383953				

圖 3. 5.8S-ITS2 之序列排列比對(續)，註：C 代表台灣塊菌之序列，D 代表屑塊菌之序列

Multiple sequence alignment of microtubule protein genes. The alignment shows conserved regions across various species, including Drosophila (D1-D11), Tribolium (T. indicum), and Drosophila (T. pseudoeexcavat). The alignment is presented in a grid format with sequence positions 260-380 indicated at the top. Conserved motifs are highlighted in red and green. The sequences are aligned to a reference sequence: C A T A G C T A T G G A G A A C C T C T G A T A T T C A A T T G G A G C G T A T G A G T G T A T A C T T C A A C G A G G T A T T T T T T A T A C T T T T T C C C C C C T G G T A A T G A C C C C T T T C A C G T T T T G G G C T T A G C G T A C

Continuation of the multiple sequence alignment, showing additional species and their corresponding sequences. The alignment maintains the same format as the first block, with positions 260-380 indicated at the top. Conserved motifs are highlighted in red and green. The sequences are aligned to the same reference sequence as the first block.

圖 4. B-微管蛋白基因之序列排列比對(續)



圖 4. *B. microtubulin* 基因之序列排列比對(續)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
T.indicumAF132502				ATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375490				AAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF106882				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF106883				TAAATAC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF106884				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ329367				ATACATAC	TTTGGGATACCAT	TGC	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ329365				ATATATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375500				ATATATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375504				ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375505				ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375503				ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375501				ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375502				ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumU89360	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT			ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ329366				ATATATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C6				TACATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	ATCAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C1				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C2				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C3				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C4				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C5				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
C7				TAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.himalayenseAY773356											
T.indicumDQ375494					GGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTGATACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ375492					GGGATACC	TTG	TGTATT	CCTGAACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ329363					GGGAATACCAT	TGT	GTATTC	CTGTAACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ375493					GGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375495					ATACCAT	TGT	GTATTC	CTGATACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ375491					AAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTG	AACAC	AAACCT
T.indicumAF300823					ATAAATAC	TTTGGGATACCAT	TGT	GTATTC	CCTGAACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAY514305				GATCATTATGATGCTTTGGGAT	CCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAY514309											ACCT
T.indicumAY514308											AACT
T.indicumAY514307											AACT
T.himalayenseAF132503				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375513				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375509				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF106881				TGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375512				ATGCAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375519				ATGCAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAY514306					TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF300824				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375522					CTGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375524					GCCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375523					TGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375511					CTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375521					TGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375520					TGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375506					TGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375515					TGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375507					ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ATAC	AAACCT
T.indicumDQ375508					ATGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ATAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAY773357				CATTATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumU89362	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT			ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375514				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375510				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375497				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.sinenseDQ329376				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.sinenseDQ375527				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375526				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375517					GGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTGATACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.sinenseDQ375528					GT	GTATTC		CTGA	ACAC	GAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375516				ATGCTTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ375518				GGGATACCAT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC	
T.indicumDQ375498				ATGGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGG	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ375496				AAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumDQ329364				ATGAATGC	TTTGGGATACCGT	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumAF300822				AATGAATGC	TTTGGGATACCCAC	TGT	GTATTC	CTGA	ACAC	AAACCT	CTCTGCGTATTACTCCATGTTGCTTCC
T.indicumY09791								TTT			
T.indicumY09792								TTT			
T.aestivumAY226040				GACAAGCCGGT	GACGCCAG	TGGGGCGGCCA	CCAGAGCACC	AAACACACGCTGCGTACAATGCCATGTTGCTTCCCCG			

圖 5. *Indicum* complex ITS 全長度之序列排列比對

	680	690	700	710
T.indicumAF132502				
T.indicumDQ375490				
T.indicumAF106882				
T.indicumAF106883				
T.indicumAF106884				
T.indicumDQ329367	AGTACCA			
T.indicumDQ329365	GA			
T.indicumDQ375499	AATACCC			
T.indicumDQ375500	AATACCC			
T.indicumDQ375504	ACTACCC			
T.indicumDQ375505	ACTACCC			
T.indicumDQ375503	ACTACCC			
T.indicumDQ375501	AATACCC			
T.indicumDQ375502	AATACCC			
T.indicumU89360	AATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA			
T.indicumDQ329366	AATACCC			
C				
C6				
C1				
C2				
C3				
C4				
C5				
C7				
T.himalayenseAY773356	AATACCCGCTGAACT			
T.indicumDQ375494	AATACCCGCTGAACTTAAGCATATCGAT			
T.indicumDQ375492	AATACCC			
T.indicumDQ329363	AATACCC			
T.indicumDQ375493	AATACCC			
T.indicumDQ375495				
T.indicumDQ375491	AATACCC			
T.indicumAF300823	AATACC			
T.indicumAY514305				
T.indicumAY514309				
T.indicumAY514308				
T.indicumAY514307				
T.himalayenseAF132503				
T.indicumDQ375513				
T.indicumDQ375509				
T.indicumAF106881				
T.indicumDQ375512				
T.indicumDQ375519				
T.indicumAY514306				
T.indicumAF300824	GATACC			
T.indicumDQ375522	GATACCC			
T.indicumDQ375524	GATACCC			
T.indicumDQ375523	GATACCC			
T.indicumDQ375511	GATACCC			
T.indicumDQ375521	GATACCC			
T.indicumDQ375520	GATACCC			
T.indicumDQ375506	GATACCC			
T.indicumDQ375515	GATACCC			
T.indicumDQ375507	GATACCC			
T.indicumDQ375508	GATACCC			
T.indicumAY773357	GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA			
T.indicumU89362	GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA			
T.indicumDQ375514	GATACCC			
T.indicumDQ375510	GATACCC			
T.indicumDQ375497	ATACCC			
T.sinenseDQ329376				
T.sinenseDQ375527	GATACCC			
T.sinenseDQ375526	GATACCC			
T.indicumDQ375517	GATACCC			
T.sinenseDQ375528	GATACCC			
T.indicumDQ375516	GATACCC			
T.indicumDQ375518	GATACCC			
T.indicumDQ375498	GATACCC			
T.indicumDQ375496	ATACCC			
T.indicumDQ329364	GATACCC			
T.indicumAF300822	GATACC			
T.indicumY09791				
T.indicumY09792				
T.aestivumAY226040				

圖 5. *Indicum* complex ITS 全長度之序列排列比對(續)，註：C 代表台灣塊菌之序列

表 5. 5.8S-ITS2 基因序列，以 Clustal X 1.81 軟體進行兩兩相比的相同度 (identity) 分析 (單位%)

	T.formo sanum	T.indicu mB	T.indicu mA	T.melan osporum	T.bruma le	T.pseudoe xcavatum	T.borchii	T.puber ulum	T.zhong dianense	T.liui	T.oligos permum	T.latispo rum	T.rapae odorum	T.macul atum	T.foetid um	T.scrup osum	T.whetst onensis	T.rufum	T.candi dum	T.querci cola	T.ferrug ineum	T.huido ngense	T.furfur aceum	T.aestiv um	T.uncin atum	T.mesent ericum	T.pannif erum	T.magn atum	T.macro sporum	T.excav atum				
T.formosanum	99~100	86~97	86~93	84~92	73~76	72~78	68~69	69~70	66~70	63~64	66~67	64~65	70~71	69~70	70~71	70~71	70~71	67~73	72~73	71~72	71~72	66~68	65~66	61~63	58~62	63~65	61~62	55~60	61~62	67~68				
T.indicumB	/	93~100	83~93	85~92	72~77	67~75	61~69	62~70	65~70	64~69	62~67	65~70	62~69	65~70	66~71	65~70	65~69	67~73	66~70	66~70	64~70	66~73	65~72	55~62	55~61	57~64	59~62	52~58	55~61	59~66				
T.indicumA	/	/	92~100	86~93	68~77	73~79	65~71	65~71	55~72	66~70	63~68	65~70	65~71	65~72	65~71	65~70	65~70	68~75	68~73	67~72	68~74	68~74	67~74	59~62	58~63	60~65	59~63	56~60	59~64	63~67				
T.melanosporum	/	/	/	92~100	70~76	70~77	63~70	65~71	64~70	65~69	61~67	65~69	64~70	64~71	64~70	64~70	64~70	67~74	66~72	65~71	67~73	67~73	67~73	59~63	58~63	60~64	57~62	55~61	58~64	61~68				
T.brumale	/	/	/	/	95~100	70~75	66~69	66~69	66~69	63~67	66~69	61~64	65~68	65~67	66~69	66~68	64~67	63~70	66~69	67~69	67~70	64~69	64~68	56~61	53~58	59~61	57~59	55~63	58~61	61~64				
T.pseudoexcavatum	/	/	/	/	/	92~100	68~72	68~72	67~74	67~72	66~70	66~71	64~68	63~68	64~68	64~68	64~68	67~72	65~71	65~70	67~72	66~73	67~73	55~61	55~59	58~62	57~59	58~64	57~61	60~66				
T.borchii	/	/	/	/	/	/	98~100	95~98	85~89	83	89	76~77	78~79	77~79	78~79	80	80~81	66~72	71~72	72	71~72	66~67	67	60~61	57~61	60~62	59~60	55~59	61~63	66~67				
T.puberulum	/	/	/	/	/	/	/	96~100	84~89	82~83	87~88	76	77~79	77~79	78	79~80	80~81	66~73	72	71~72	70~72	65~57	66~67	59~61	56~60	60~61	58~60	55~59	62~63	64~67				
T.zhongdianense	/	/	/	/	/	/	/	/	93~100	89~95	83~88	77~82	73~77	73~78	74~78	74~79	76~79	65~70	68~71	68~70	67~70	66~72	66~72	57~60	56~60	59~61	57~59	56~61	59~63	64~67				
T.liui	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	83	81	74	74~75	75	75	77	66~69	67	67	65	69	71	56~58	57~58	57~58	57	56~58	59~60	61~62				
T.oligospermum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	77	80	79~80	81	80	81	65~72	72	71	69	66~67	66	60~61	57~60	60~62	59	56~59	63~64	66				
T.latisporum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	99~100	74	74~75	75	75	78	64~67	64	64	63	67	69	56~57	56~57	55~56	54	54~56	58	62				
T.rapaeodorum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	99~100	97~99	94~95	87	89	63~69	67	68	67	63~64	64	59~61	56~61	61	61~62	55~59	63~64	64~65				
T.maculatum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	98~100	94~93	86~87	89~90	62~68	66~67	67~68	66~67	63~64	63~64	59~61	55~60	60~62	60~61	55~59	63~64	63~64				
T.foetidum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	87	90	63~67	68	68	67	62~63	63	60~61	57~61	61	61	56~59	63~64	64~65				
T.scruposum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	93	63~68	67	69	68	64~66	65	59~60	56~60	60~61	59	55~59	62~63	65~66				
T.whetstonensis	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	63~68	68	68	66	64~65	65	60~61	57~61	61	60	56~59	63~64	64				
T.rufum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	84~100	81~89	81~87	90~92	83~87	84~88	57~61	57~61	60~65	60~64	55~60	59~66	64~69				
T.candidum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	89	87	81~83	82	61	57~61	63~64	63	58~62	64~65	66~67				
T.querccicola	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	87	81~82	80	62	58~62	64~66	64	56~60	65	67~68				
T.ferrugineum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	81~83	81	61~62	57~62	64~66	64	55~60	63	69				
T.huidongense	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	97~100	95~97	56~58	57~59	59~61	59~60	57~59	59~61	62~65			
T.furfuraceum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	56~57	57~59	59~60	59	57~59	60	62~63		
T.aestivum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	91~100	86~98	78~83	73~76	64~72	67~69	64~67		
T.uncinatum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	92~100	76~83	71~76	62~71	63~68	62~66
T.mesentericum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	88~100	81~85	65~70	68~69	65~70		
T.panniferum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100	66~70	68	65~66			
T.magnatum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	86~100	62~66	59~62			
T.macrosporum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	97~100	65~66			
T.excavatum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	89~100			

表 6. β -微管蛋白基因序列之，以 Clustal X 1.81 軟體進行兩兩相比的相同度 (identity) 分析 (單位%)

	T.formosanum	T.indicumB	T.indicumA	T.melanosporum	T.pseudoexcavatum	T.aestivum	T.mesentericum	T.magnatum	T.furfuraceum	T.rufum
T.formosanum	99~100	84~95	84~92	86~94	80~92	45~50	44~46	45~57	59~60	60
T.indicumB	/	97~100	89~96	89~93	84~91	45~47	44~47	49~59	51~53	54~56
T.indicumA	/	/	94~100	86~96	83~92	44~46	43~47	48~58	49~54	54~60
T.melanosporum	/	/	/	89~100	80~91	44~47	43~46	44~57	49~50	52~60
T.pseudoexcavatum	/	/	/	/	94~95	42~50	42~45	45~58	48~57	51~60
T.aestivum	/	/	/	/	/	97~100	87~93	57~66	61~67	64~69
T.mesentericum	/	/	/	/	/	/	93~100	55~64	60~63	62~66
T.magnatum	/	/	/	/	/	/	/	99~100	79~80	79~80
T.furfuraceum	/	/	/	/	/	/	/	/	100	88~90
T.rufum	/	/	/	/	/	/	/	/	/	100

(四) 台灣塊菌及屑塊菌之 5.8S-ITS2 序列親緣分析

為了瞭解台灣固有兩種塊菌之分類地位，我們首先使用 5.8S-ITS2 區域進行親緣分析，在 GenBank 資料庫中，將每一塊菌種選取 2 至 6 個序列，並以 PAUP 4.0 軟體，使用矩陣推演法、最大儉約法演算出演化樹圖譜。兩種演算方法都顯示 31 種塊菌，可以分成五個支序群（圖 6；僅顯示矩陣推演法之演化樹圖譜）。Clade I 僅有一個歐洲種：凹孔塊菌。Clade II 則有六個歐洲種，包含夏塊菌、勃良第塊菌、*T. panniferum*、中果塊菌、義大利白塊菌、大孢塊菌，此支序群被稱之為夏塊菌群（bootstrap=98%）。Clade III 則被認為是棕紅塊菌群，其中包含兩個歐洲種：*T. ferrugineum* 與棕紅塊菌，兩個北美洲種：*T. candidum* 與 *T. quercicola*，以及兩個東亞種：屑塊菌與會東塊菌（bootstrap=100%）。Clade IV 則被認為屬於 *T. puberulum* 群，且可以分成兩個 Subclade，Subclade IV-1 有四個歐洲種：*T. maculatum*、*T. rapaeodorum*、*T. foetidum* 與 *T. scruposum*，以及一個北美洲種：*T. whetstonensis*（bootstrap=99%）；Subclade IV-2 則有三個歐洲種：*T. oligospermum*、波奇塊菌與 *T. puberulum*，以及三個中國大陸種：*T. zhongdianense*、*T. liui* 與 *T. latisporum*（bootstrap=90%）。Clade V 則被認為是黑孢塊菌群（bootstrap=98%），也可以分成兩個 Subclade，Subclade V-1 有一個歐洲種：冬塊菌，以及一個中國大陸種：擬凹孔塊菌（bootstrap=84%）；Subclade V-2 則是由一個歐洲種：黑孢塊菌，以及四個東亞洲種：喜馬拉雅塊菌、印度塊菌、中國塊菌與台灣塊菌所形成（bootstrap=100%），所有品系的台灣塊菌菌株都位於此一支序群，且與印度塊菌 B 群有最高的親緣關係。

(五) 台灣塊菌及屑塊菌之 β -微管蛋白基因親緣分析

本試驗另外使用了具有高保守性的 β -微管蛋白基因進行親緣分析，以更進一步確認台灣塊菌及屑塊菌之分類地位。使用矩陣推演法、最大儉約法所演算出的演化樹圖譜，兩種方法均顯示相類似的結果，都是形成三個支序群（圖 7；僅顯示最大儉約法之演化樹圖譜）。Clade I 包含有兩個種：棕紅塊菌與屑塊菌（bootstrap

=87%)。Clade II 則可以分成三個 Subclade，分別為 Subclade II-1：義大利白塊菌 (bootstrap=100%)，Subclade II-2：中果塊菌 (bootstrap=73%)，Subclade II-3 則為夏塊菌 (bootstrap=100%)。Clade III 亦可分成四個 Subclade，Subclade III-1：擬凹孔塊菌(bootstrap=99%)，Subclade III-2：黑孢塊菌(bootstrap=98%)，Subclade III-3：印度塊菌 A 群 (bootstrap=89%)，Subclade III-4：包含台灣塊菌與印度塊菌 B 群。

(六) *Indicum complex* 之親緣分析

以 5.8S-ITS2 區域進行親緣分析的結果顯示，所有品系的台灣塊菌菌株都與中國大陸的印度塊菌 B 群有著最高的親緣關係，為了更進一步確認台灣塊菌與中國產之印度塊菌群間的關係，我們將 GenBank 資料庫中，所有印度塊菌 complex 之序列都下載，並與台灣塊菌進行 ITS 全長度之親緣分析。以矩陣推演法、最大儉約法所演算出的演化樹圖譜，均顯示相類似的結果，都是形成兩個支序群 (圖 8；僅顯示最大儉約法之演化樹圖譜)。Clade I 可以分成兩個 Subclade (bootstrap=99%)。Subclade I-1 包含所有品系的台灣塊菌 (bootstrap=93%)，而 Subclade I-2 則包含了所有的印度塊菌 B 群，以及一個品系的喜馬拉雅塊菌。Clade II 包含了所有的印度塊菌 A 群、所有品系之中國塊菌以及一個品系的喜馬拉雅塊菌。此一部份之結果，更加支持台灣塊菌與印度塊菌 B 群有著高度演化關係。

(七) 台灣塊菌及屑塊菌與大陸相關塊菌種間之分化時間的建立

台灣與大陸塊菌種間的分化時間之建立，主要是使用 5.8S-ITS2 區域，依照 Jeandroz 等 (2008) 的推估，塊菌種的共同祖先是於 140 Ma (Million years ago) 時開始分化，依照此一分化時間，即可在本試驗所得之演化樹圖譜，往下推估 subclade V-2 的分化時間為 25 Ma (圖 6，節點 A；*Melanosporum* group)，而 Clade III 的分化時間則為 42 Ma (圖 6，節點 B；*Rufum* group)。接著並以 MEGA 3.1 計算台灣塊菌/印度塊菌 B 群間的演化速率 (substitution rate) 為 0.00266/nucleotide per million years；屑塊菌/會東塊菌間的分化時間 (substitution rate) 則為

0.00293/nucleotide per million years。依照這些數據，即可得到台灣塊菌與印度塊菌 B 群的分化時間為 4.1 Ma (圖 6，節點 C)，而屑塊菌與會東塊菌的分化時間為 10.2 Ma (圖 6，節點 D)。



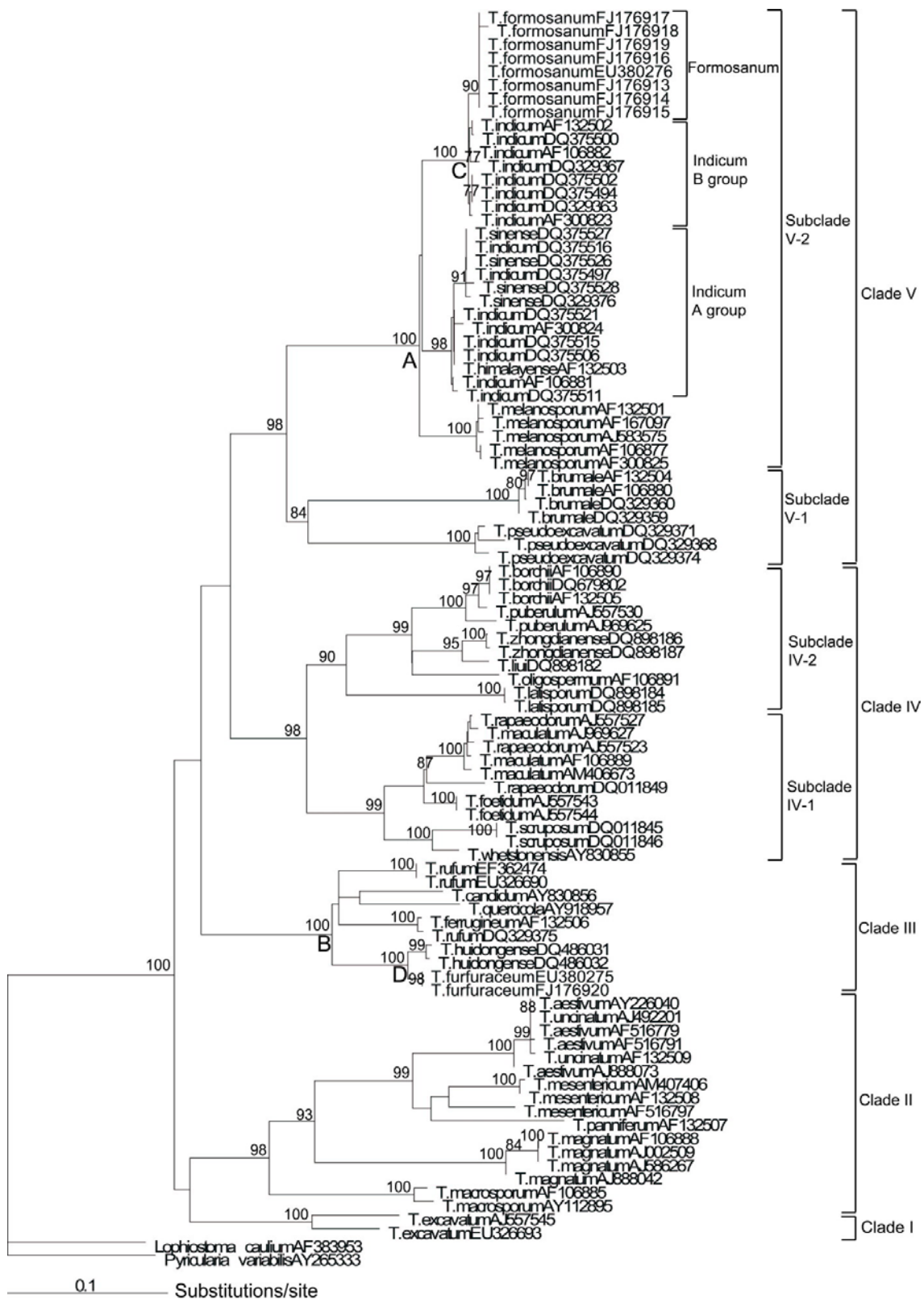


圖 6. 31 種塊菌之 5.8S-ITS2 區域，以矩陣推演法演算之演化樹圖譜。Bootstrap 值經過 1000 次計算，並且僅顯示超過 70 %者。節點 A 與 B 表示 Jeandroz 等(2008)所建立的分化時間；節點 C 與 D 表示台灣塊菌與大陸塊菌間之分化時間

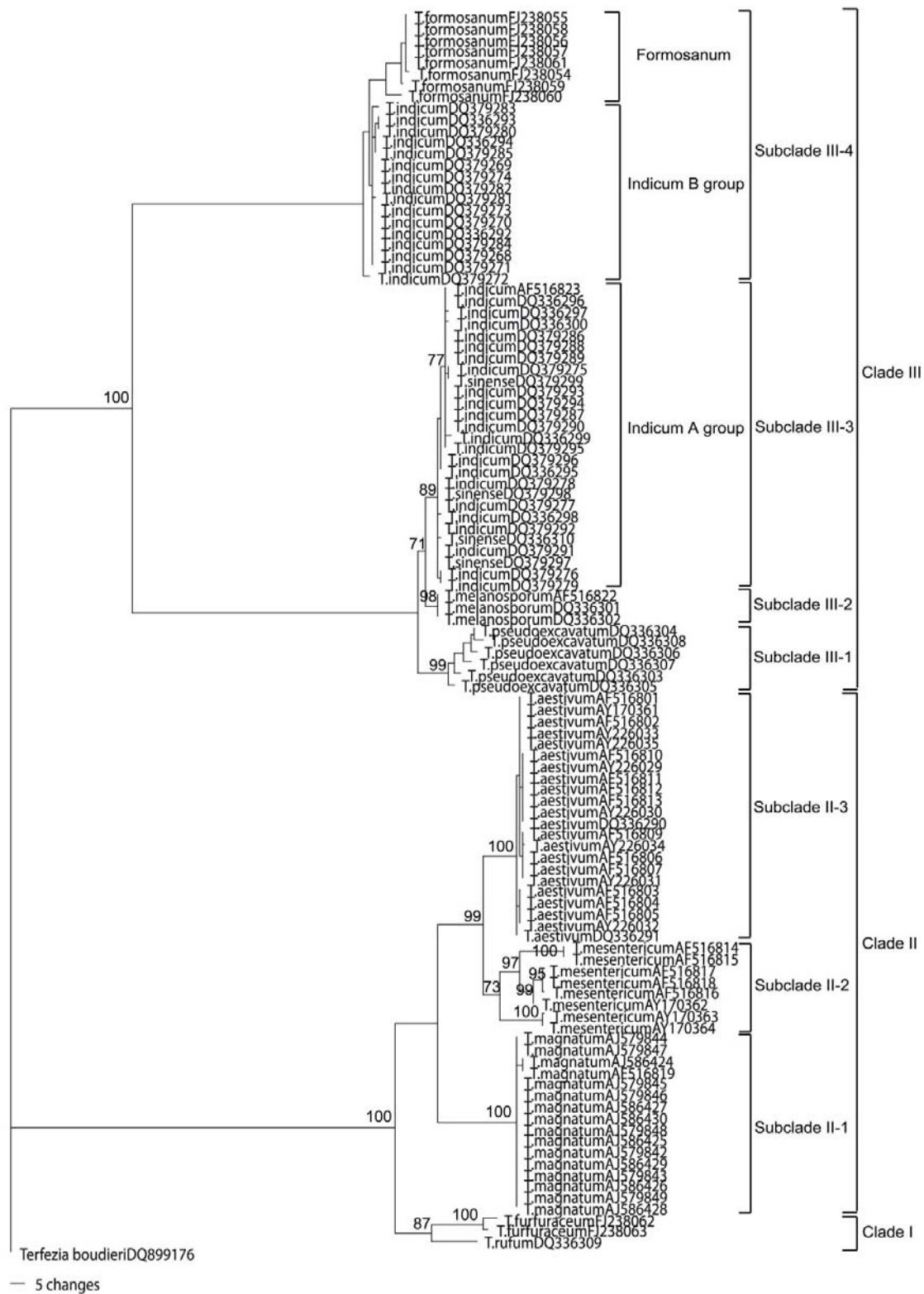


圖 7. GenBank 資料庫中，所有塊菌屬之 β -微管蛋白基因，以最大儉約法演算之演化樹圖譜。Bootstrap 值經過 1000 次計算，並且僅顯示超過 70% 者

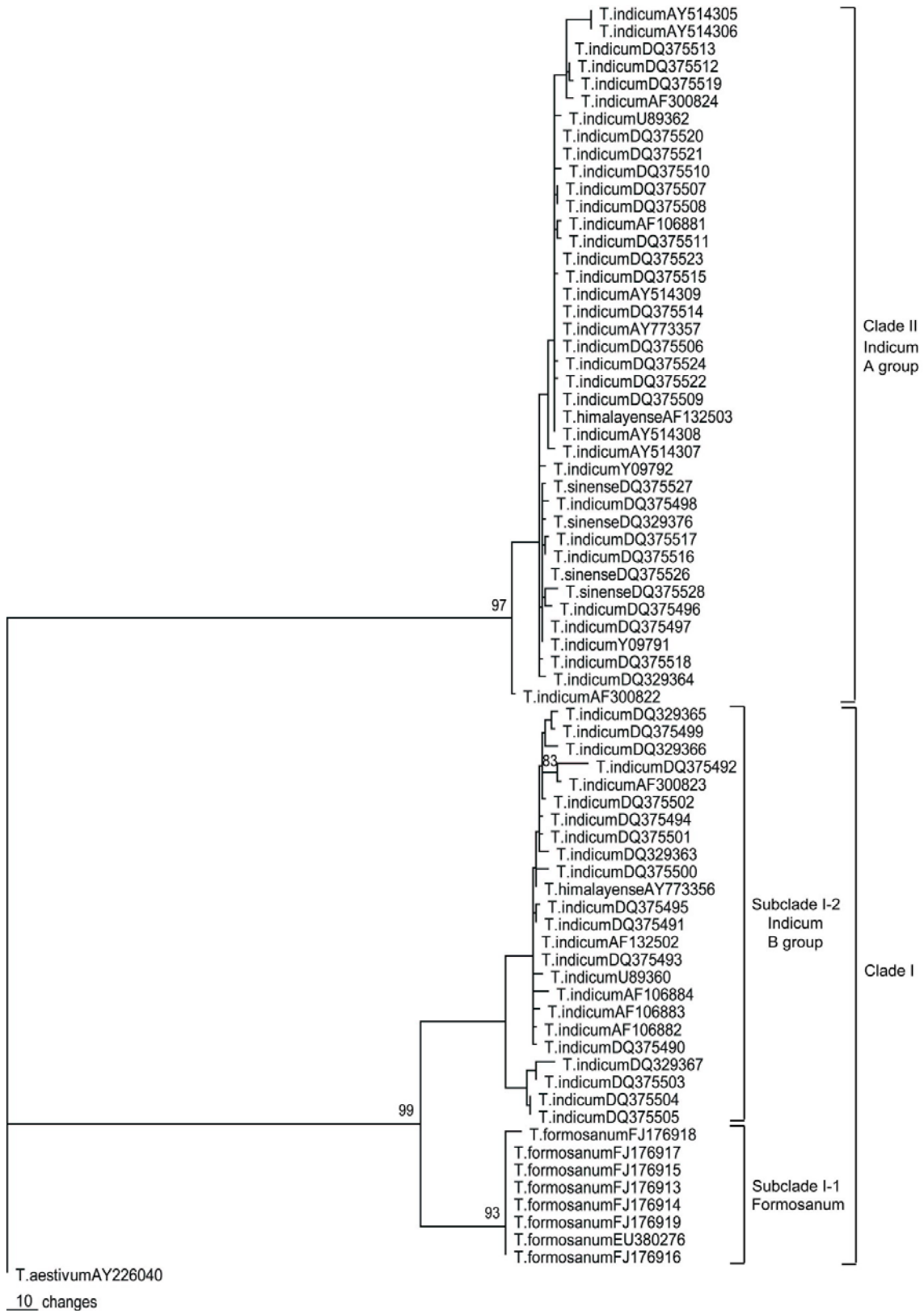


圖 8. *Indicum* complex 之 ITS 全長度，以最大儉約法演算之演化樹圖譜。Bootstrap 值經過 1000 次計算，並且僅顯示超過 70 % 者

四、討論

利用 PCR 等分子生物技術來進行塊菌種間的分類是有效且成功的 (Pinkas *et al.*, 2000), 其中包含塊菌種間的分類 (Henrion *et al.*, 1994; Gandeboeuf *et al.*, 1997; Bertault *et al.*, 1998; Pinkas *et al.*, 2000; Mabru *et al.*, 2001)、塊菌的基因多樣性 (Mello *et al.*, 2002; Mabru *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2004), 以及他們的親緣關係 (Roux *et al.*, 1999; Murat *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2005); 此外, 在以 rDNA、 β -微管蛋白基因等序列作分類之研究中, 所得到的基因序列還可以進行共享與累積, 如 GenBank、EMBL 資料庫等, 即是提供世界各物種 DNA 資料彙整的功能, 如果已經有相似物種、序列之發表記錄, 即可以進行參考、對照或比較。本研究即將台灣固有的兩種塊菌, 使用真菌通用引子予以增幅 ITS、 β -微管蛋白基因序列並解序, 再選取於 GenBank 中已經完整登錄的世界其他塊菌之序列, 進行序列排列與比對, 藉以分析、比較不同塊菌菌種間相似程度及其親緣關係。

分類物種早期是以外部形態解剖特徵為主, 這些特徵都是屬於物種的表現型, 而基因型則是物種內部原始之架構, 經過基因轉錄、轉譯, 才轉變為表現型。當無法直接由表現型分辨其不同時, 可以應用生物最基本的基因型來協助物種之鑑定, 尤其在物種演化與親緣關係上, 這些基因資料更是提供可靠的證據。以 DNA 的同源性與保留性作為分析依據之要件, 惟此段基因必須是具有相同功能, 與相近的演化速率, 而且在細胞中最好只存在一條基因組 (genome) 或似單複製 (single copy), 其中最常用的莫過於 ribosomal DNA、 β -微管蛋白基因等區域; 這些序列中, 有某些片段由於變異性大, 常被用來作為屬與屬, 或種與種間的鑑別工具 (Inderbitzin *et al.*, 2002; Jyan *et al.*, 2002)。親緣分析之樹枝狀圖表現, 就是以其序列鹼基取代、插入或刪除為比較的基礎。

近年來定序的技術逐漸發展成熟, 且 GenBank 的序列資料庫快速的累積, 序列的取得更加方便。一般以通用引子擴增真菌的一段特定之片段長度後, 即與基因庫內之序列進行比對, 依據相似度的遠近不僅可用於鑑定菌種、菌株的差異,

而且還可以順利的將 18S、ITS1、5.8S、ITS2 與 28S 等區域區別出來，即可進行後續之親緣分析等工作 (Francis *et al.*, 1998; Kristiansen *et al.*, 2004)。在分析塊菌屬之 ITS 全長度後發現，各個菌種間的 ITS 全長度序列具有很大的變異性 (variations)，經過排列比對後進一步發現，ITS1 區域的歧異度，更遠比 5.8S 與 ITS2 區域大，這樣的結果與 Morales 等 (1993) 研究 *Leptosphaeria* 屬、Jasalavich 等 (1995) 研究 *Alternaria* 屬、Jeandroz 等 (2008) 研究塊菌屬等的研究結果相同。本試驗在進行塊菌屬的親緣關係時，為了避免在建構演化樹圖譜時，有複合的演化率與改變 (multiple substitutions and changes) 等情形，進而會建構出錯誤之樹狀圖結果，因此我們依據 Jeandroz 等 (2008) 的建議，僅使用 5.8S-ITS2 區域推算演化樹。

本試驗將解序後的台灣塊菌之 ITS、 β -微管蛋白基因序列，至 NCBI 進行 BLAST search 後發現，與台灣塊菌最相近的菌種分別有印度塊菌、中國塊菌及黑孢塊菌等，這些塊菌子實體都是屬於黑色；此外，屑塊菌之 ITS、 β -微管蛋白基因進行 BLAST search 後，與其相近的種則為會東塊菌、棕紅塊菌、波奇塊菌等，這些塊菌之子實體則是屬於淡色塊菌。因此，台灣塊菌與屑塊菌之 ITS、 β -微管蛋白基因，和中國大陸產的塊菌如：印度塊菌、中國塊菌、黑孢塊菌與會東塊菌等，關係最相近，經由 BLAST search 後可更進一步予以確認。

以 5.8S-ITS2 序列進行親緣分析後，結果顯示形成五個主要的支序群 (圖 6)，這與先前許多針對塊菌屬，研究其親緣關係之報告 (Wang *et al.*, 2006a; Jeandroz *et al.*, 2008) 結果相同。在 Clade I，僅有凹孔塊菌一個種，許多研究 (Wang *et al.*, 2006a; Jeandroz *et al.*, 2008) 亦有相同的結果。雖然凹孔塊菌、中果塊菌、擬凹孔塊菌等塊菌種，若以子實體外觀來分類，都被歸類為具有凹孔 (cavity) 的塊菌群，但親緣關係結果卻發現此三種塊菌，都落在不同的支序群中。因此，ITS 的譜系分析結果，並未支持子實體之凹孔特徵，自成為一群的分類論點，且具有中空 (orifice) 或凹孔等特徵之塊菌，則是朝多方向作演化 (Zhang *et al.*, 2005)。

此外，夏塊菌、勃良第塊菌、*T. panniferum*、中果塊菌、義大利白塊菌、大孢塊菌等，均位於 Clade II。先前的許多研究（Ginkley, 1954；Paolocci *et al.*, 2004）就指出，這些塊菌之孢子為網狀，除了義大利白塊菌具有白色子實體外，其餘都為暗棕色子實體。義大利白塊菌在塊菌貿易市場中，因為其獨特的大蒜味（garlic）芳香，因而成為最昂貴的塊菌種之一，然而義大利白塊菌在子實體、孢子等形態方面，都與 Clade IV 的塊菌群相似。多數的親緣關係研究（Baciarelli-Falini *et al.*, 2006；Wang *et al.*, 2006a；Jeandroz *et al.*, 2008）指出，義大利白塊菌是屬於夏塊菌群的一員。因此，義大利白塊菌的演化方向與其他白色塊菌群不同，而是與夏塊菌群比較親近。夏塊菌與勃良第塊菌間的分類關係，長久以來一直是備受爭議的（Gandeboeuf *et al.*, 1994；Henrion *et al.*, 1994；Urbanelli *et al.*, 1998）。Mello 等（2002）的研究認為可以明確將兩個種分開來；然而 Paolocci 等（2004）蒐集更為廣泛的樣品後發現，兩個菌種間並無法區分，因此認定夏塊菌與勃良第塊菌為同一個菌種。在本研究中，選取了四個品系的夏塊菌與兩個品系的勃良第塊菌，結果此六個品系的菌種都分化至同一個 group 中，bootstrap 值達 100%，因此本試驗支持 Paolocci 等（2004）的論點，認為該二菌種應是屬於同一個種。中果塊菌、*T. panniferum* 與大孢塊菌，同樣被分化在夏塊菌群中，這與先前的許多研究（Roux *et al.*, 1999；Mello *et al.*, 2002；Iotti *et al.*, 2002；Paolocci *et al.*, 2004；Baciarelli-Falini *et al.*, 2006；Wang *et al.*, 2006a；Jeandroz *et al.*, 2008）結果相同。

在 Clade IV 中，可以分成兩個 subclade，Subclade IV-1 包含 *T. maculatum*、*T. rapaeodorum*、*T. foetidum*、*T. scruposum* 與 *T. whetstonensis*；Subclade IV-2 則有 *T. oligospermum*、波奇塊菌、*T. puberulum*、*T. zhongdianense*、*T. liui* 與 *T. latisporum*。這些塊菌是被歸類為“*puberulum*” group，形態方面是具有網狀孢子、子實體為淡棕色等特徵，先前許多親緣關係研究（Halász *et al.*, 2005；Baciarelli-Falini *et al.*, 2006；Frank *et al.*, 2006；Kovács and Jakucs, 2006；Chen and Liu, 2007；Jeandroz *et al.*, 2008）亦支持此一論點。

屑塊菌與會東塊菌，和其他五種塊菌種都在 Clade III 中（圖 6），另一方面，在 β -微管蛋白基因所建構的演化樹圖譜中（圖 7；Clade I），屑塊菌則是與棕紅塊菌位於同一支序群中。這是因為在 GenBank 資料庫中，並未有會東塊菌、*T. ferrugineum*、*T. candidum*、*T. quercicola* 等的 β -微管蛋白基因序列註冊資料。先前有研究（Frank *et al.*, 2006）即指出，會東塊菌、棕紅塊菌、*T. ferrugineum*、*T. candidum*、*T. quercicola* 等塊菌，都是具有相同的形態特徵，如子實體為淡棕色、孢子呈刺狀等。依照 Hu 與 Wang（2005）的研究指出，屑塊菌與會東塊菌的子實體形態十分相似，惟兩者間最大差異點，在屑塊菌之果皮上有頭屑狀特徵，且屑塊菌孢子長度比會東塊菌長，寬度亦較窄。此外，Frank 等（2006）與 Jeandroz 等（2008）的研究，均指出 *T. candidum*、*T. quercicola*、*T. ferrugineum* 與棕紅塊菌等，都位於同一支序群中。本研究除支持這些淡棕色塊菌群間的關係十分密切外，並且論證了屑塊菌與會東塊菌，無論在形態或是親緣關係方面，都是具有最為親近的關係。

台灣塊菌在以 5.8S-ITS2 分析所得的演化樹圖譜中，與其他黑色塊菌群如印度塊菌、喜馬拉雅塊菌、中國塊菌、黑孢塊菌、冬塊菌、擬凹孔塊菌等，都位於 Clade V 中（圖 6）。其中可以分成兩個 subclade，Subclade V-1 有冬塊菌與擬凹孔塊菌；Subclade V-2 則是包含了喜馬拉雅塊菌、印度塊菌、中國塊菌與台灣塊菌，台灣塊菌是與印度塊菌 B 群最為相近。印度塊菌在中國大陸的分布相當廣泛，而依照先前的研究（Roux *et al.*, 1999；Zhang *et al.*, 2005）指出，主要是可以分成 A、B 兩大群。然而 Wang 等（2006a）與 Wang 等（2006b）的研究中，則是蒐集範圍更為廣泛，採集地點更多的印度塊菌樣品，於進行親緣分析後認為無論是印度塊菌、中國塊菌、喜馬拉雅塊菌等，都是因為地理隔離而形成的生態型（ecotype），並判定他們都是屬於同一個種。在本研究中，無論是 5.8S-ITS2 或 β -微管蛋白基因所得到的演化樹中，所有樣品的台灣塊菌都是與印度塊菌 B 群關係最為親近（圖 6、7）。就形態方面來看，黑色塊菌群都具有相類似的形態，具有黑色的子實體與網狀的

孢子；Hu (1992) 的研究指出，台灣塊菌與黑孢塊菌形態最為相似，但是也有許多學者 (Roux *et al.*, 1999；Zhang *et al.*, 2005) 指出，黑孢塊菌的子實體與中國產的幾種塊菌 (印度塊菌、喜馬拉雅塊菌及中國塊菌等) 形態都十分類似，基於上述形態的相關論點，台灣塊菌或許無法以形態方面和其他黑色塊菌作出明顯的區別，但是根據相關的分子證據，吾人認為台灣塊菌與印度塊菌 B 群有著最相近的親緣關係。

為了更進一步確認台灣塊菌與印度塊菌間的關係，我們自 GenBank 資料庫中，蒐集了所有印度塊菌的 ITS 全長度序列，並進行親緣分析。結果顯示，台灣塊菌與印度塊菌 B 群形成同一支序群，且與印度塊菌 A 群明顯分開，這結果仍與先前許多研究 (Roux *et al.*, 1999；Zhang *et al.*, 2005) 結果相同，主要是將印度塊菌分成 A、B 兩群。此外，所有品系的台灣塊菌形成 subclade I-1，印度塊菌 B 群則形成 subclade I-2 (圖 8)，此一部分的試驗結果，更進一步論證了台灣塊菌與印度塊菌 B 群間，有著最親近的親緣關係。

在本研究中，兩種台灣固有的塊菌種都是採集自青剛櫟林份中。青剛櫟是屬於台灣原生種，但是又分布於東亞的許多區域如中國大陸、琉球群島以及日本等地，因此青剛櫟又被認為是非特有種 (non-endemic specie)，雖然青剛櫟在台灣島內，是屬於最常見的 50 種原生樹種之一，分布十分廣泛 (Liao, 1996)，然台灣塊菌與屑塊菌至今僅在本研究所採集的兩個地點被發現，吾人推測此兩種塊菌，無法與其宿主青剛櫟一樣，分布範圍廣泛之主要原因，應是與台灣島內多數森林區域中，土壤的 pH 值並非塊菌之最適宜範圍有關，因而限制了台灣塊菌與屑塊菌之散播與生長範圍。然而，在中央山脈的其他區域，或許仍可發現台灣塊菌或屑塊菌之存在。

根據本試驗之分子鐘推算，台灣塊菌與印度塊菌 B 群的分化時間在 4.1 Ma，屑塊菌與會東塊菌的分化時間則在 10.2 Ma。根據地理學與考古學等證據推測，台灣島約在 5~6 Ma 時形成 (Sibuet and Hsu, 2004)，而台灣島在更新世 (Pleistocene)

時，約在 1~0.015 Ma 間，因為冰河時期海退而幾度造成海平面下降，進而形成陸橋(land bridge)，使中國大陸與台灣島相互連接 (Kizaki and Oshiro, 1977; Sibuet and Hsu, 2004)。較為溫暖的南端區域如台灣、南中國大陸等地區，因為有此種陸橋的機制，許多生物因而遷徙至這些區域，這些區域即被稱之為冰河時期避難所 (refugia) (Huang *et al.*, 2002)。有趣的是，許多研究亦指出，台灣島內之多數殼斗科樹種，包含本試驗中塊菌的宿主植物—青剛櫟，都與中國大陸東南方的殼斗科樹種，有著極為類似的形態與親緣關係，據此推測這些樹種應是源自於同樣的祖先 (Luo and Zhou, 2001; Huang *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2003)。Wang 等 (2006b) 亦指出，印度塊菌在冰河時期，也是遷徙到較為南方的區域如四川、雲南等地避難。在 Wang 等 (2006 a) 的研究中則指出，黑孢塊菌群具有共同之祖先，原始應位於歐、亞洲交界處生存，推測其可能位置是在印度西側，根據這些塊菌群的親緣關係演化樹、演化速率等資料來推算，可知冬塊菌/擬凹孔塊菌最先開始遷移並分化，冬塊菌往歐洲方向發展，擬凹孔塊菌往亞洲方向發展，隨後黑孢塊菌/印度塊菌也開始遷移分化，黑孢塊菌往歐洲方向發展，印度塊菌往亞洲方向發展。依據這些研究結果，吾人可以推測，台灣塊菌與印度塊菌群間，源自同一發源地，具有共同的祖先，而台灣塊菌/印度塊菌 B 群，以及屑塊菌/會東塊菌，應是於上新世 (Pliocene) 時，在中國大陸即已各自開始分化成不同的 group，台灣塊菌與屑塊菌則是隨著其宿主植物，藉由陸橋遷徙至台灣，不過推測在中國大陸東南方，靠近台灣海峽的區域，亦有可能發現與台灣塊菌/屑塊菌相似的品系。

最後，經由本試驗各結果證實，目前 GenBank 中有登錄 ITS 與 β -微管蛋白基因序列的 31 種塊菌，可以形成五/三個主要的支序群 (ITS / β -微管蛋白基因)，且大致上與塊菌的外部形態如子實體顏色、孢子形態等相符。台灣塊菌是與印度塊菌 B 群最為相近，屑塊菌則是與會東塊菌最相近。根據他們之間相似的形態特徵與親緣關係，吾人推測台灣的兩種塊菌，應是與大陸的塊菌種有著相同的祖先。然而，因為較長的分化時間與之後的地理隔離效應，進而演化成台灣特有種。

五、結論

本試驗首先以 5.8S-ITS2 序列進行親緣分析，主要可以形成五個支序群。Clade I 僅有一個歐洲種：凹孔塊菌。Clade II 則有六個歐洲種，包含夏塊菌、勃良第塊菌、*T. panniferum*、中果塊菌、義大利白塊菌、大孢塊菌。Clade III 則包含兩個歐洲種：*T. ferrugineum* 與棕紅塊菌；以及兩個北美洲種：*T. candidum* 與 *T. quercicola*；兩個東亞種：屑塊菌與會東塊菌。Clade IV 可以分成兩個 Subclade，Subclade IV-1 有四個歐洲種：*T. maculatum*、*T. rapaeodorum*、*T. foetidum* 與 *T. scruposum*，以及一個北美洲種：*T. whetstonensis*；Subclade IV-2 則有三個歐洲種：*T. oligospermum*、波奇塊菌與 *T. puberulum*，以及三個中國大陸種：*T. zhongdianense*、*T. liui* 與 *T. latisporum*。Clade V 亦可以分成兩個 Subclade，Subclade V-1 有一個歐洲種：冬塊菌，以及一個中國大陸種：擬凹孔塊菌；Subclade V-2 則是由一個歐洲種：黑孢塊菌群，以及四個東亞洲種：喜馬拉雅塊菌、印度塊菌、中國塊菌與台灣塊菌。

另外以 β -微管蛋白基因進行親緣分析，結果是形成三個支序群。Clade I 包含有兩個種：棕紅塊菌與屑塊菌。Clade II 則可以分成三個 Subclade，分別為 Subclade II-1：義大利白塊菌，Subclade II-2：中果塊菌，Subclade II-3 則為夏塊菌。Clade III 亦可分成四個 Subclade，Subclade III-1：擬凹孔塊菌，Subclade III-2：黑孢塊菌，Subclade III-3：印度塊菌 A 群，Subclade III-4：包含台灣塊菌與印度塊菌 B 群。

此外，根據分子鐘之推算，台灣塊菌與印度塊菌 B 群的分化時間在 4.1 Ma，而屑塊菌與會東塊菌的分化時間則在 10.2 Ma。最後，經由本試驗之相關結果證實，台灣塊菌是與印度塊菌 B 群最為相近，而屑塊菌則是與會東塊菌最相近。而根據他們之間相似的形態特徵與親緣關係，吾人推測台灣的兩種塊菌，應是與大陸的塊菌種有著相同的祖先。然而，因為較長的分化時間與之後的地理隔離效應，進而演化成台灣特有種。

第三章、不同溫度對青剛櫟接種兩種

塊菌在菌根形成與苗木生長之影響

一、前人研究

(一) 試驗宿主青剛櫟與兩種接種塊菌之介紹

本試驗中所選用之接種源，一為外來種塊菌—夏塊菌，原產地為歐洲如法國、義大利等國家，宿主植物多屬櫟屬 (*Quercus* spp.) 的植物如橡樹 (oak)、水青岡屬 (*Fagus* spp.) 的山毛櫟 (beech) 等；此外，台灣固有種台灣塊菌，宿主則主要為青剛櫟，與櫟屬同為殼斗科植物，為本土防火造林樹種。青剛櫟屬於殼斗科 (Fagaceae) 櫟屬 (*Cyclobalanopsis*) (黃增泉, 1993)，為常綠闊葉喬木，高可達 20 公尺；樹皮淡褐灰色，多不開裂，小枝條有皮孔，但光滑無毛。葉互生，有時叢生於小枝條的先端，呈長橢圓形，先端漸尖或呈短尾狀，葉緣上半部有鋸齒。其木材堅韌呈淡黃褐色，心邊材區分明顯，彈力大，耐摩擦，常做為建築及車輛用材；亦常栽培於庭園供觀賞用，樹皮及其殼斗富含單寧。廣泛分布於日本、韓國、中國大陸與台灣，在本省普遍生長於低至中海拔約 300~2000 公尺的山地 (劉崇瑞, 1960)。青剛櫟之堅果呈長橢圓形，其種苞之鱗片合生成同心環帶，頗易辨識；其常綠濃密之樹冠具有防風、遮蔭、防止噪音等功能，為良好之園林樹種；以前更被養菇業者認為是香菇之上好段木 (胡弘道等, 1999)。基於青剛櫟上述之優點，本試驗之宿主植物，選擇青剛櫟為塊菌菌根合成之對象。

台灣塊菌，子囊果直徑 2~10 公分，不規則球形或不規則橢圓形，暗褐至棕黑色，表面具 4~7 脊的金字塔形凸起，中間略呈凹陷，產孢組織暗褐~棕黑色，具白色~黃褐至紫色的菌脈 (veins)。子囊球形或長橢圓形，大小約 22~50 × 33~55 μm，子囊柄基短，內具 2~4 個孢子。孢子暗褐色，橢圓形，大小約 12.5~25 × 10~18 μm，表面具網狀的刺 (spiny-reticulate)，刺高 3 微米左右。子實體於 8 月底至 2 月生長於石灰質的青剛櫟林內 (Hu, 1992)。夏塊菌，子囊果直徑 1.5

~5 公分，不規則球形或不規則橢圓形，淺棕色至黑色，表面有明顯 3~6 角小疣，產孢組織初期為白色，成熟會變淡黃色或褐色。子囊不規則球形或橢圓形，大小約 $40\sim 72 \times 55\sim 88 \mu\text{m}$ ，無子囊柄或短柄，內有 1~6 個孢子。孢子暗褐色或黃褐色，不規則球狀或多角形，大小約 $7\sim 15 \times 6\sim 12 \mu\text{m}$ ，有厚壁，表面網狀不具刺，子實體於 5 月底至 10 月生長在橡樹林內（陳娟等，2005）。

（二）溫度對外生菌根菌之影響

菌根的形成是菌根菌與宿主植物（host plant），在一定的環境條件下所形成，因此，宿主植物、共生菌根菌與環境條件，就成為菌根形成之三個最主要因子，在菌根的形成過程中，三者之間相互依賴與制約，缺一不可。實際上，在每個因子中，還包括有許多的附帶因子，就宿主植物而言，包括植物的品種或品系、不同無性系或地理種源、植物年齡以及營養根系發育狀況等；就菌根菌言，則包括菌種、菌株、繁殖體數量等；至於適宜的環境條件範圍則更廣，例如：土壤的養分狀態、溫度、pH 值、溼度以及水分等（弓明欽等，1997）。此外，還有一些外在因子如光照強度、人為土壤施肥與耕犁、人為皆伐、酸雨、噴藥與消毒，以及重金屬污染等，均也影響著菌根菌的生長與形成（Az'con-Aguilar, 1981）。

每一種菌根菌皆有其最適宜生長之環境，與其各自較佳之忍受性與功能，Bowen（1973）指出，彩色豆馬勃是一種能夠適應較廣範圍溫度之菌種，此外，有菌索的菌根菌可增加根系之耐旱力。胡弘道（1990）指出，大部分的外生菌根菌，其適宜之生長溫度約在 $8\sim 27^{\circ}\text{C}$ 左右，但生長速率對於溫度之曲線形式，可能顯示出明顯或不明顯的適宜溫度。Theodorou 與 Bowen（1970）則指出，pH 值影響培養介質中菌根菌生長，不管是生長在一般或具有較強緩衝能力之介質，皆有一定之影響力。Lahio（1970）則發現卷邊樁菇（*Paxillus involutus*）各品系之適宜 pH 值在 3.1 與 6.4 之間，在適合的 pH 值中各品系之生長速率有很大的差異，且適宜生長曲線之形式亦不相同。此外，胡弘道（1990）指出，對於大多數的外生菌根真菌而言，偏酸性條件是合適的，一般最適宜的 pH 值為 4~6。弓明欽等（1997）

亦指出，宿主之生長與養分吸收，受到菌根之質與量影響甚鉅，而菌根之質與量，又以溫度及 pH 值影響最大。大多數針對宿主與菌根菌間生長之研究，亦多以此二因子為試驗之首要考慮。塊菌與此二因子間的關係，先前已有陳怡君（2004）針對義大利白塊菌與不同 pH 介質，對其菌根形成與苗木葉部大量養分元素效益作分析與研究，惟溫度對塊菌菌根、宿主生長與養分吸收之關係等研究，至今仍付之闕如。

早期 Theodorou 與 Bowen（1971）以黃色鬚腹菌（*Rhizopogon luteolus*）、點柄乳牛肝菌（*Suillus granulatus*）與環乳牛肝菌（*S. luteus*）等，進行最適宜溫度試驗，結果發現黃色鬚腹菌於 20~25°C 時生長最好，點柄乳牛肝菌 20°C 生長最佳，環乳牛肝菌為 25°C。Cline 等（1986）以彩色豆馬勃、土生空團菌（*Cenococcum geophilum*）、疣格菌（*Teheophora terrestris*）與點柄乳牛肝菌等四種外生菌根菌，在各種外生菌根菌種間又有採集自不同緯度的分離株，並將四種外生菌根菌培養於 MMN 培養基中，分別置於 16、21、27、32 與 38°C 等五種不同溫度，藉以瞭解不同菌種、不同菌株間受溫度影響之生長效益。試驗結果顯示，彩色豆馬勃在 21、27、與 32°C 時生長良好；土生空團菌在 21°C 時生長良好，32、38°C 下則幾乎呈現無法生長的現象；疣格菌於 27°C 時生長最好，但 38°C 無法生長；點柄乳牛肝菌生長範圍從 16~27°C，於 32°C 時被限制，在 38°C 時則完全無法生長。Moore 與 Peterson（1992）以不同溫度（6、8、10、12、14、25°C），對於卷邊樁菇（*Paxillus involutus*）產生菌核之影響作研究，他們指出有許多種類的真菌會形成菌核，而菌核是由菌絲聚集所形成，並會形成黑色外皮，可以幫助真菌在養分逆境、乾旱與極限溫度等不利環境中存活，其結果顯示 10°C 時形成最大的菌核，這可能與養分從菌絲轉移至菌核的速度有關，因為 Cooke（1970）指出，在 10°C 時對樁菇科（*Paxillaceae*）真菌來講，養分從菌絲轉移至菌核的速度應該是最快之溫度，當菌核較小或未形成時，則是養分的轉移速度變慢所致。此外，Wilcoxson 與 Subbarayudu（1968）也表示菌絲的年齡，會影響養分從菌絲轉移至菌核的速度，因為新生長的菌絲養

分轉移速度快，進而產生最多的菌核，此觀點可解釋在 Moore 與 Peterson (1992) 的試驗中，菌絲生長速度最大者為 10°C，此溫度亦是菌核生長量最大的試驗組。在野外狀態，當土壤溫度呈低溫狀態時，應會對真菌菌絲產生誘導的機制，使其產生菌核，惟這部分的研究仍無，因此無法取得相關資訊。Sanchez 等 (2001) 以八種分離自地中海旁森林的外生菌根菌 (*Hebeloma edurum*、*Lactarius deliciosus*、*Suillus luteus*、*Suillus granulatus*、*Rhizopogon roseolus*、*Suillus collinitus*、*Tricholoma focale*、*Tricholoma striatum*)，進行 5 種不同溫度 (5、10、18、23、30°C) 的生長試驗，他們先以 MMN 培養基固定 pH 值為 5.5 培養六星期後，再測量菌絲直徑生長與菌絲乾重，結果顯示多數菌種在 23°C 時生長較佳，在所有菌種中，低於 18°C 的試驗組，菌落直徑生長與菌絲乾重方面均顯著較小，但在 30°C 時則僅有兩種菌種有生長現象 (*R. roseolus*、*S. collinitus*)。此外，該研究亦指出，菌種對於溫度的忍受度，與其原生地之溫度狀況有很大的關聯性。

在國內，則有洪玲玲 (1977) 於培養彩色豆馬勃與乳牛肝菌時，發現彩色豆馬勃最適宜的生長溫度為 28~36°C，乳牛肝菌則為 20°C 生長最佳。許碧如 (1987) 針對夏塊菌進行溫度、pH 值及葡萄糖濃度等，對於生長效益之研究發現，菌落生長在 30°C 時最好。Hu 與 Liou (1995) 以分離自八通關之松茸，進行 4 種不同溫度之菌落直徑生長試驗，在經過 130 天的培養後，結果顯示松茸菌落之最適宜生長溫度為 20°C，但是隨著溫度升高至 25°C，或是下降至 15°C，均形成不利於菌落生長之情形，且相互間呈顯著差異；此外，當溫度再升高至 30°C 時則菌落完全無法生長。但如果於實驗結束後，將菌絲菌落自 30°C 中移出，置於室溫 (約 20~25°C) 中，經過七天之後菌絲即會再恢復生長活力。由 Hu 與 Liou (1995) 的試驗結果發現，松茸應能在本省海拔 800~1,000 公尺左右之生育地中生長良好，若在較低海拔生長，出菇時間可以更為提早，更能提高其經濟價值；在本省低海拔之台灣二葉松林份中雖未見松茸之子實體，惟經由其溫度生長試驗結果，可以針對其適宜的生長條件作半人工繁殖。高嘉鴻 (2005) 以中果塊菌進行不同溫度的試驗後發現，

該菌種在 15~30°C 皆在其耐性範圍內，菌落生長效應最好的溫度為 25°C 及 30°C。許桂蓮（2007）將已分離成功的冬塊菌、印度塊菌、台灣塊菌、擬凹孔塊菌、黑孢塊菌以及義大利白塊菌等六種塊菌，分別置於 15°C、20°C、25°C、30°C 及 34°C 的生長控制箱中進行培養，並以 33、34、35 與 36°C 作最高致死溫度試驗，藉以找出各塊菌種間的最高致死溫度。結果顯示各菌落的生長直徑以 25°C 時生長最佳，34°C 時則最差，其菌落生長優劣順序為 25°C ≥ 20°C > 30°C ≥ 15°C > 34°C。其中冬塊菌在各溫度下，菌落生長均最佳且最快速，其他塊菌菌落在 34°C 時均停止生長，35°C 則為義大利白塊菌與印度塊菌菌落之最高致死溫度，36°C 則是黑孢塊菌與台灣塊菌之最高致死溫度。此外，胡弘道等（2008a、2008b）發現以 YpSs 培養基培養台灣塊菌、印度塊菌、黑孢塊菌、義大利白塊菌與擬凹孔塊菌後發現，在台灣塊菌與印度塊菌方面，菌落生長最適宜的溫度是以 25°C 最佳，最差的則是 33°C，在黑孢塊菌、義大利白塊菌與擬凹孔塊菌方面，則是 20 及 25°C 最佳，最差同樣是 33°C。

（三）溫度對外生菌根族群與菌根菌子實體之影響

近年來，由於人類經濟活動頻繁，加上工業革命興起，致使全球氣候變遷，全球暖化的現象與衍生出之問題層出不窮。溫室效應（greenhouse effect）造成氣候急劇變遷，影響著全球的氣溫、降雨變化，使氣溫升高、海平面上升以及生態系統失去平衡（Pendall *et al.*, 2004）；此外，有學者（Carter *et al.*, 1995）指出，未來 50 年內，全球的平均氣溫會增加 0.3~3.6°C，這樣必然也會使土壤中的溫度增加，進而影響到土壤中微生物，其中也包含菌根菌等的生育環境。

由於外生菌根菌都是生長在土壤中，而土壤溫度直接影響著菌根真菌之形成與生長。環境溫度對於菌根在植物根圈的菌落化與感染情形，及之後對於植物體生長、養分狀態等的影響，均是重要且顯著的（Bowen and Theodorou, 1967）。雖然許多研究（Harley, 1969）指出，實驗室內以培養基培養外生菌根菌的最適宜溫度，多落在 18~29°C 之間，惟植物生長季節時，這樣的溫度卻不常發生，而菌根

菌菌落化與接種感染的決定時期，常發生在播種後的數週內。因此，如何掌控環境、土壤溫度狀況，配合菌根菌接種，對於造林成功與否也是重要的，且亟待研究人員進行更進一步之探討 (Theodorou and Bowen, 1970)。

不同真菌對於溫度的要求都不一樣，熱帶地區有些菌種可以耐熱達 45°C 的高溫，有些耐寒的菌種在 5°C 的情況下仍可生存。菌種能夠生長的溫度範圍一般稱之為生長溫度範圍，而生長最快、最好的溫度範圍叫作適溫範圍，不適合菌種生長的最高溫度或最低溫度稱之為最高極限或最低極限溫度，每個菌種無論是分離出來的菌絲體，或是與宿主形成共生關係後的菌根，都有其自己的適溫範圍、生長溫度範圍以及最高極限或最低極限溫度 (弓明欽等，1997)。

Moser (1958) 曾成功的使用低溫品系的 *Suillus plorans* 接種 *Pinus cembra*，再將苗木移植至阿爾卑斯山的樹木界線海拔高處，結果菌根成功與樹種共生，這表示菌根生長受溫度影響甚鉅；研究溫度與菌根菌間的關係可以預期是重要的，例如溫度與養分吸收、運轉與代謝物的分泌等 (胡弘道，1990)。

Theodorou 與 Bowen (1970) 使用放射松 (*Pinus radiata*) 接種三種菌根菌 (環乳牛肝菌、點柄乳牛肝菌與黃色鬚腹菌)，其中環乳牛肝菌與點柄乳牛肝菌各 2 種品系，黃色鬚腹菌 1 種品系，放置在 16、20、25°C 的溫度下培養四個星期。結果顯示，根系菌落化的情形，在所有菌種中，16 與 25°C 間，皆呈現顯著差異，25°C 的菌落化情形均較 16°C 良好；於 16 與 20°C 之間，則是除了點柄乳牛肝菌中的 1 個品系外，其餘均是呈顯著差異，且亦是 20°C 的菌落化情形均較 16°C 良好；此一研究結果顯示，所有菌種在 16°C 時，生長受到抑制，其中點柄乳牛肝菌在 25°C 與 16°C 間，菌根菌生長受到 31% 的抑制，環乳牛肝菌則是受到了 42% 的抑制，黃色鬚腹菌則受到最大的抑制影響，達到 75%。此外，同一菌種但不同品系間，菌落化的情形亦不相同，環乳牛肝菌的 2 種品系在三種不同溫度下，其菌根菌落化的情形均呈顯著差異，點柄乳牛肝菌雖有差異但呈不顯著。

Theodorou 與 Bowen (1970) 更進一步將黃色鬚腹菌以放射松為宿主，於形成

良好的菌根後，將苗木放置在 15、20、25 與 30°C 的溫室內，經過 12 週培養後，計算其菌根感染率並測量根系乾重與枝條乾重。結果發現，在 25°C 與 20°C 下生長的苗木，菌根感染率均顯著高於 15°C 下生長的苗木，25°C 與 20°C 下生長的苗木，菌根感染率亦顯著高於 30°C 下生長的苗木，但 15°C 與 30°C 之間則呈差異不顯著。最後則是比較根系乾重與枝條乾重，兩種乾重結果大致相同，均是 15°C 下生長的苗木，其兩項數據均顯著小於 20、25 與 30°C 下生長的苗木。

Parke 等 (1983) 在美國奧勒岡州的西北方，一處約 1.5 年生的花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*)、龐德羅莎松 (*Pinus ponderosa*) 人工林內，進行一年內於不同溫度下的菌根形成狀態評估，該地區的溫度範圍為最冷 7.5°C，最熱為 35°C。結果顯示，菌根形成最大的數量，發生在溫度約 18.5~24°C 間；在觀測受到皆伐干擾的人工林同時，也同時觀測未受干擾的天然森林內菌根生長情形，結果顯示，受到干擾的人工林與未受干擾之天然林間，兩者間菌根的質與量，差異均呈不顯著。此外，在最低溫狀態時 (7.5°C)，菌根量有緩慢增加之趨勢，反之，當溫度超過 29.5°C 時，菌根的生長狀態則大量被抑制，甚至完全被阻礙而停止生長。在該研究中，有提到林地內原生菌根菌種，可以使小苗在出栽至造林地後，遭遇乾燥溫暖的夏季或濕冷的冬季等極端氣候下，仍可以適應環境而存活。

McInnes 與 Chilvers (1994) 使用紙三明治技術 (paper-sandwich technique)，以藍桉 (*Eucalyptus globulus*) 接種彩色豆馬勃，其中，紙三明治技術是由 Chilvers 等 (1986) 所發明，優點是可以提供一個苗木與菌根菌間，良好環境因子 (養分、光照以及溫度等) 的控制狀態，並可將各因子間分開控制。McInnes 與 Chilvers (1994) 將接種好的藍桉苗木，分別置於 12 與 22°C，培養介質以高或低濃度的氮、磷養分，培養約 2 個月後，結果在菌根根尖形成數量方面，高濃度或低濃度的氮、磷養分施予，並無任何顯著的影響；但是溫度方面，22°C 狀態下培養的苗木，其菌根形成根尖數量，比 12°C 狀態下要高出了 55%；且菌根菌在根域的菌落化半徑，於 22°C 狀態下亦比 12°C 狀態下高了 10%。由此可以證明，22°C 比 12°C 適合彩色

豆馬勃與藍桉間的接種組合。

Domisch 等 (2002) 針對不同的土壤溫度下 (5、9、13 與 17°C)，對於歐洲赤松苗 (*Pinus sylvestris*) 之菌根族群生長與發育作研究。該試驗是先將已經自然感染外生菌根的歐洲赤松苗移植至溫室，並控制不同溫室之溫度，然後培育約 9 週後即收穫，並評估菌根之生長與發育情形。試驗結果發現，在第 3 週時，溫度對菌根數與短根數的效益並未表現出來，但是當第 6 週至第 9 週收穫時，菌根數與短根數隨著溫度增加而明顯增加，最後收穫時發現，短根數最多發生在溫度為 17°C 的試驗組，且其中的菌根數亦同樣呈現相對最豐富之狀態，不同土壤溫度與不同時間所收穫的菌根總數間呈顯著關係。這表示菌根與短根之發育在不同溫度下均有不同之情形，惟在較高的溫度下，菌根與短根的數目均一致地比低溫度時高。

此外，Domisch 等 (2002) 針對松屬 (*Pinus*) 樹種所具有之典型外生菌根分叉情形作觀察，結果發現在較高的溫度 (13、17°C) 中，菌根之分叉情形顯著高於低溫度的試驗組，此一情形在第 6~9 週更加明顯，在第 3~9 週中，土生空團菌之菌根總合數，於高溫度中 (13 與 17°C) 較低溫度試驗組 (5 與 9°C) 高；另外，在 17°C 時並發現有一種珊瑚狀 (coral) 分叉菌根之存在。就溫度對於菌根總數、根系總生物量或根系總長影響方面來看，在第 3 週時，發現是無相關效益，但是於第 6 及第 9 週中，菌根總數、根系總生物量與根系總長，都是隨溫度增高而增加，相反地，在高溫度狀態下短根總數卻比低溫狀態時少。總合來看，菌根數與短根數均隨溫度升高而顯著增加，菌根數在高溫度中的增加率比短根數高。

Debaud 與 Gay (1987) 以法國海岸松接種 *Hebeloma cylindrosporum*，苗木接種形成菌根後，一組放置於 18°C 的生長控制室內，另一組則施予 ± 6°C 的溫度 (18-24-18°C 與 18-12-18°C) 衝擊干擾，希能瞭解適度的溫度干擾，是否對其子實體之生產有影響。經過 9 個月的培育，結果顯示 18°C 的試驗組中，每一苗木平均產生 3.46 ± 0.55 個子實體；18-24-18°C 試驗組中，每一苗木平均產生 3.33 ± 0.551 個子實體；18-12-18°C 試驗組中，每一苗木平均則產生 2.80 ± 0.59 個子實

體。經統計分析後發現，三組間的差異呈不顯著，然而，溫度衝擊干擾則使子實體產生的高峰值增加，尤其在前兩個月（60 天）內。18°C 的試驗組中，子實體產生的最高峰發生在第 20 天與第 45 天，平均每一株苗木產生約 4~4.5 個子實體；在 18-24-18°C 試驗組中，最高峰發生在第 45 天，平均每一株苗木產生約 6.2 個子實體；18-12-18°C 試驗組中，最高峰同樣發生在第 45 天，平均每一株苗木產生約 9 個子實體。然而，培養時間大約超過 60 天起，三組的子實體產量，開始趨於減少，約 70 天時，三組子實體的產量也都趨於相同水平。

Godbout 與 Fortin (1990) 為探求溫度對於菌根菌產生子實體之效益，使用白松(*Pinus strobus*)、德達松 (*Pinus taeda*) 及白雲杉 (*Picea glauca*) 等三種樹種接種 *Laccaria bicolor*，分別以兩種不同日夜溫度組合 (24/18°C ; 18/12°C) 為影響因子，測試 *L. bicolor* 在不同溫度下子實體生產狀況。接種約 5 週後，苗木已形成典型的淡紫色蠟蘑屬菌根。該試驗結果顯示，以白松為宿主的試驗組中，溫度為低溫處理 (日：18°C，夜：12°C) 狀態時，苗木均無法形成子實體，惟當溫度改成高溫 (日：24°C，夜：18°C) 處理狀態時，則會有 84% 的苗木，有子實體的產生；以白雲杉為宿主的試驗組中，溫度為高溫處理狀態者，有 50% 的苗木形成子實體，但是低溫處理狀態者，僅有 8% 的苗木形成子實體，因此，苗木與菌根菌形成子實體的比率，高溫度處理者較低溫處理者高 6 倍；在德達松為宿主的試驗組中，高溫度處理狀態者，有 33% 的苗木有子實體產生，低溫度處理狀態中，則僅有 13% 的苗木有子實體產生，低溫處理狀態者形成子實體的比率僅為高溫度處理狀態的 40%。Rudawska (1986) 指出當溫度過低時，不利於菌根菌產生子實體，因此子實體的產生亦與溫度息息相關。

(四) 菌根與苗木生長、葉部養分之關係

菌根是菌根菌與宿主植物間，互利共生所達到高度平衡之共生體，兩者間互利互助、依賴，互相從對方獲取自己所需要的物質，也皆可供應對方所需的營養，此種共生現象相互有益，可以促進兩者間的生長與繁殖，而菌根技術的應用也促

進植物在生長、抗旱、抗病與養分吸收上，可以獲得改善，並在許多菌根研究中，皆已證實菌根對植物的有益功效（陳怡君，2004）。

菌根對於苗木生長與葉部養分吸收之最大效益，最明顯者為磷的吸收。任何土壤中都含有一定的磷，惟這些磷酸根不易流動，卻易與鐵、鈉、鋁等金屬離子結合，被固定或與土壤中的膠體結合變成難溶性磷，因此無法被植物直接吸收利用，其中約有 1/2~1/3，甚至可達約 95%~99%的磷，無法被植物所吸收，只有一小部份為可溶性磷，可供植物利用。植物生長過程中，根系吸收根際周圍的磷，但是磷在土壤中不易流動，無法及時補充根際的含磷量，常導致根際出現「貧磷區」，在貧磷區內無可溶性磷可以提供植物生長所需。菌根能分泌磷酸酶、草酸鹽，改變土壤之養分狀態，尤其在貧瘠的土壤更為顯著。另外，菌根侵染會影響植物的生理代謝活動，對根系分泌物產生影響，並導致植物吸收陽離子比例的變化，進而造成土壤 pH 值的變化，pH 值的變化又影響著吸附態磷的有效性，此作用在酸性土壤中對植物生長十分不利。無論外生菌根或是內生菌根，根部表面均有許多體外菌絲，都是菌根的主要吸收器官，其可穿越根際範圍的「貧磷區」，深達貧磷區以外的土壤中吸收磷等養分，提供植物利用（弓明欽等，1997）。Bougher 等（1990）指出，外生菌根之菌絲能穿越貧磷區，從土壤中吸收磷，藉以改善植物中磷養分之濃度。

此外，菌根對土壤中的其他微量元素，如鋅、銅、錳、鐵等養分吸收，亦都有些許的效益。Melin 與 Nilsson（1955）的研究報告即指出，在松屬的樹種中，接種外生菌根菌並形成菌根後，可以增加植物體鋅、銅、鐵等微量元素的吸收。有相當多的研究報告指出，多數植物於接種菌根菌後，生長反應會比未接種的良好。這些研究通常是在溫室中以殺菌的土壤作試驗，有些則在苗圃作試驗，也有些試驗是在林地或田間中進行，反應結果大部分都是呈正效益，但亦有些試驗是呈減少者，這是因為自然發生之菌根菌未能感染，或是因為人工接種沒有成功所造成（Mosse, 1979）。接種後的植物，其根與莖生長以及某些離子之吸收量均顯著

增加，這是因為菌根反應而增加土壤中少量、不易移動離子之吸收，或部分是由其他離子吸收隨著植物生長而增加之結果（胡弘道，1990）。

菌根促進苗木養分吸收或生長之效益，及其應注意的地方，可以歸納成四大點（胡弘道，1990），分別為：（1）苗木接種適宜之菌根菌，可以從根本上改變土壤的生產潛力，與後續肥料的供需估算；（2）忽略菌根因素，可能會造成植物需肥量之研究產生誤差，因為多數有關植物養分需求的研究，在事先並未能確認菌根感染是否存在；（3）對於目前進行貧瘠土壤植物基因型研究的多數研究人員而言，應在其計畫中了解使用適應菌根菌的重要性，這些真菌類可能關係到選拔育種之成敗。在貧瘠土壤狀態下進行生產力選拔，應包括低供給量養分之有效吸收，以及被吸收養分之有效利用，因為低供給量養分之吸收，可以經由菌根作用達成；（4）菌根菌促進低溶解度離子的吸收，可能會對豆科或一些非豆科固氮性植物（如相思樹、木麻黃以及赤楊等）之固氮作用，產生相當大的影響。有研究人員（El-Giahmi *et al.*, 1976）指出，菌根能促進磷、硫、鋅、鈷、鉬、銅與鐵等離子之吸收，這些離子又與上述植物之固氮作用有關。此外，Mosse 等（1979）指出，在某些土壤中極端缺乏磷，且該土壤中又無菌根菌存在，一些具固氮作用的先驅樹種均無法產生根瘤，因此菌根的形成與否亦與氮素有關。

Lamb 與 Richard（1971）以濕地松（*Pinus elliottii*）接種菌根後，發現有接種的苗木，其根系乾重較無接種者增加 28~50%，氮、磷、鉀等養分元素的吸收量，也都增加約 5~17 倍。Marx 等（1977）則是以接種菌根之德達松，種植在經土壤薰蒸過的苗圃中，結果與未接種的苗木比較，生長量增加了約 125%。

顏江河（1981）以台灣二葉松接種 *Boletus luridus* 後，檢視菌根菌對松屬苗木生長之效益；苗木在生長六個月後，接種菌根菌，並於四種不同磷肥下與對照組（未接種菌根）比較。在生長控制室下生長七個月後，取出苗木統計各處理對苗木生長及磷吸收之影響，結果顯示有菌根之苗木，不論於何種磷肥處理下其高生長、莖徑、地上與地下部乾重、枝葉磷含量，皆較未接種者呈極顯著差異。未接

種菌根苗木不論於何種磷肥處理下，皆呈遲滯生長，顯示臺灣二葉松幼苗需仰賴菌根得以維持正常生長。

胡弘道等（1999）以美味牛肝菌（*Boletus edulis*）及彩色豆馬勃接種青剛櫟苗木後，將苗木種植於屬極強酸性土之崩塌地中。結果顯示，生長於該土壤兩年之苗木，未接種者呈現葉部黃化及生長遲滯的現象，而接種彩色豆馬勃的苗木，根系明顯有金黃色菌根，因此養分吸收與生長均獲得顯著改善，接種美味牛肝菌的苗木則更能改善苗木養分與生長，為接種的最佳選擇。

林瑞進（2000）以彩色豆馬勃、大環柄菇（*Macrolepiota procera*）及龜紋硬皮馬勃（*Scleroderma areolatum*）等不同種類之菌根菌，分別接種至青剛櫟苗，成功形成外生菌根後，出栽至貧瘠土壤中。結果顯示，將有接種菌根菌之苗木與未接種之苗木，比較兩者間的生長量，有接種者比未接種者的生長量大，且兩者間呈顯著差距，未接種的苗木，其養分的吸收嚴重受阻，葉部的氮、磷、鉀等元素缺乏，且呈現黃化病徵與生長遲滯等現象。此外，接種苗之生長量及葉部養分濃度，皆與對照組呈顯著差異，接種苗之生長量，平均值為對照組的 1.5 至 3 倍；這三種外生菌根菌接種處理中，就高生長及根徑生長言，以接種彩色豆馬勃者最佳，龜紋硬皮馬勃次佳，再次者為接種大環柄菇；就根系重量而言，則是以接種龜紋硬皮馬勃者最佳。

廖志倉（2002）以尾葉桉（*Eucalyptus urophylla*）接種外生菌根—龜紋硬皮馬勃、內生菌根—刺繡球菌（*Glomus spinosum*）雙重接種，比較外生與內生，或雙重接種對苗木之生長效益。尾葉桉幼苗經菌根菌接種後，對其生長皆具顯著的促進效應，其中苗木高生長、地上部乾重、根系乾重、苗幹總體積等，有接種外生、內生或雙重接種者，均較未接種者生長量顯著增加。陳應龍（2002）以黑孢塊菌接種紅椎（*Castanopsis hystrix*）幼苗，結果成功形成外生菌根菌後，開始觀察幼苗期的生長狀態。結果發現菌根對於苗木在生長與養分狀態等，都有顯著的促進作用，在接種後第 8、16、20 週間，接種苗和未接種苗間的生長呈顯著差異，兩者

間分別相差 20.37%、11.58%、8.26%，最後收穫時，地上部的生物量增加 69.2%，總側根數也比未接種者增加 158.3%。

Giovanetti 與 Fontana (1982) 將黑孢塊菌以半無菌合成的方式，接種至五種十字花屬 (*Cistus incanus*、*C. albidus*、*C. laurifolius*、*C. salvifolius*、*C. monspeliensis*) 的植物，結果發現，五種十字花屬的植物，均能與黑孢塊菌形成良好的菌根，但是形成時間不一，而依據苗高、根頸等數據顯示，有接種黑孢塊菌的苗木，其生長狀態均較未接種者良好。

Sharpe 與 Marx (1986) 以彩色豆馬勃接種美洲胡桃樹 (*Carya illinoensis*)，研究菌根菌對美洲胡桃樹幼苗在生長與養分吸收上之影響。結果顯示，接種彩色豆馬勃後，幼苗整體在乾重、氮、磷、鉀、鈣、鎂等養分含量上，與未接種的幼苗比較，均有顯著的增加。接種後的美洲胡桃樹莖部與根部，礦質養分含量也都明顯比未接種的幼苗增加許多，只有在根部的氮、錳、鋅等養分，與未接種的苗木未有顯著差異。因此，接種菌根對幼苗在養分含量上，位於不同部位則亦有不同的影響，但是整體而言，菌根的接種對於植物體養分含量，以及養份吸收上，均是有正面效益的。

Bâ 等 (1999) 研究 *Afzelia africana* 苗木在接種四種外生菌根菌 (3 種硬皮馬勃屬與 1 種未鑑定菌種) 後，與未接種苗木在生長量與葉部養分間之差異。結果發現苗木在培養四個月後收穫時，接種與未接種的幼苗在葉部養分，如氮、磷、鎂與鈣上，具有顯著差異，這顯示接種菌根菌後確實可以提升幼苗葉部養分，但葉部養分之差異，卻與幼苗之生物量間並無關聯性，因此 Bâ 等人認為，接種菌根菌對幼苗生長上的效益，在植物體較缺乏養分時，會有較顯著之效果。

Leake 與 Read (1989) 曾經就石楠 (*Calluna vulgaris*) 在感染菌根後，於鈣質養分吸收上的功能作研究，首先將菌根與非菌根植物種植在砂地上生長，並在培養期間，添加不同濃度的鈣肥料，後續再觀察菌根的感染情形，是否增加苗木生長量及最後的鈣含量。結果顯示，接種菌根菌對於石楠在鈣的吸收上，比未接種

的呈現顯著增加，無論整株植物體或是單就莖部與根部分析，在鈣的含量上，皆比未接種的良好，尤其在莖部之鈣含量上效果最顯著。菌根在不同鈣量添加的條件下，對於石楠的生長效益，於低濃度時最為明顯，這顯示在低濃度的鈣質添加下，接種菌根對石楠生長量之效益最為顯著。因此，他們推論影響菌根感染最主要是在低濃度鈣的環境下，可以增加石楠對鈣吸收之效率。

Domisch 等 (2002) 於不同的土壤溫度下 (5、9、13 與 17°C)，針對有接種或無接種菌根的歐洲赤松苗，在苗木生長與養分元素效益作分析。試驗結果發現，有受到菌根感染的苗木，養分濃度狀態如氮、磷、鈣等，均較未受到菌根感染的苗木高，鐵、鋁兩種元素間則呈差異不顯著。但各養分元素與溫度間的關係，卻顯的較為複雜，氮、磷兩種元素在苗木的新芽部份濃度高於老枝條部份，鈣的濃度則與氮、磷兩種元素相反，鐵及鋁的濃度則是在地下部最高。所有養分元素在地上部的部份，對於溫度呈現出高度的依賴作用，尤其在培育後第 6 週及第 9 週，此即表示土壤溫度越高，苗木的養分濃度也越高；這樣的現象在 Marschner 等 (1986) 的報告也有相同論述，Marschner 等指出，這是因為在高溫度狀態下，養分元素一般發生、流動速度較快的緣故，並且提高溫度也會增加植物根系長度，且加速土壤中養分元素礦質化的進行。

Duñabeitia 等 (2004) 以放射松幼苗接種三種外生菌根菌 (*Rhizopogon luteolus*、*R. roseolus*、*Scleroderma citrinum*)，研究菌根菌種間對於幼苗之生長效益。結果發現，只有 *R. roseolus* 對於放射松苗木在生長上，與未接種的苗木有顯著差異，其餘兩個菌種則是與未接種間的呈差異不顯著，三種菌種則是在地下部乾重上，有顯著增加。摒除菌根菌落化降低的影響，菌根的形成也促使放射松幼苗之生理狀態獲得改善，此等生理狀態則包括如：增加根內之酵素活性、葉綠素含量、莖部養分含量、淨光合作用效率以及水分的有效利用率等。而 Duñabeitia 等也推測，*R. roseolus* 是放射松於野外出栽時，最適合接種的菌根菌種。

二、材料與方法

(一) 苗木培養

採集自台北縣三芝鄉之青剛櫟種子，以 29% 的 H_2O_2 滅菌 45 分鐘後，旋以高溫滅菌冷卻之無菌水清洗後，即播種至經殺菌釜 (SAKURA NEOCLAVE ASV-3022) 以高溫及高壓 (溫度 $121^\circ C$; 壓力 1.3 kg/cm^2) 殺菌 45 分鐘、內含蛭石與泥炭土 (比例 1:1; v/v) 之盆鉢中。

(二) 生長栽培介質之處理與苗木移植

待苗木發芽後之一個月時，隨即將苗木移植至栽培介質中，介質是將泥炭土與蛭石，經過自然風乾後，藉由控制體積、重量比例 ($v:v=1:1$; $w:w=15:17$) 以固定介質的 pH 值 ($pH=5.9$)，並將兩者混合；介質之 pH 值測定，是利用 pH 7 與 pH 4 之標準緩衝液先校正 pH meter，再以玻璃棒充分攪拌混合介質，放置 1 小時後，利用玻璃電極測定 pH 值 (陳怡君, 2004)。之後，再將生長介質以高溫、高壓殺菌 60 分鐘後，放冷即可供栽培用。將所有培養的青剛櫟苗木，移植至穴植管內 (內徑 4 公分，深 18 公分)，並以塑膠透明片包裹前述業經高溫、高壓殺菌過後的介質，每一穴植管一株苗木，隨即供作接種塊菌使用，每日並視土壤溼度狀態，施予澆水處理。

(三) 塊菌之接種源

本試驗使用之塊菌為台灣塊菌與夏塊菌，台灣塊菌是採集自台灣大學實驗林和社營林區 27 林班地內，夏塊菌則委託東遠國際有限公司，購自義大利 Molise 地區。先以自來水洗淨果皮後，即以 70% 的酒精擦拭塊菌子實體的表皮，接著再以無菌水澆洗，後使用無菌解剖刀片，將其切成大約 0.5 公分之小片後，放入無菌之燒杯中，加入約 1000 ml 的無菌蒸餾水，製成孢子懸浮液；利用立體顯微鏡計算每毫升之孢子數量，1 ml 的孢子懸浮液約含 1000~1500 顆孢子，以此作為接種源。

(四) 青剛櫟與兩種塊菌之半無菌合成

青剛櫟苗木置於自然光照下之人工氣候室培養，待苗木 4 個月大，根系已佈

滿介質外圍時，選取形態大小類似之苗木 60 株，利用無菌之定量吸管吸取 10 ml 的孢子懸浮液接種源，每株苗木分別均勻的接種在根系上，此外，再選取 30 株苗木作為對照組使用。經接種完成後，連同對照組，將苗木移至不同溫度組合的人工氣候室中，溫度組合為 5 種不同日夜溫度 (35/30°C、30/25°C、25/20°C、20/15°C、15/12°C)，每一種溫度組合 6 重複。培養期間，每一星期將苗木每次施以 20 ml 的 MMN 營養液，每一苗木總共施用 100 ml 的營養液，以促進菌根形成與苗木之生長，營養液原配方中之碳水化合物並不添加，每公升營養液之組成為 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g、 NaCl : 0.025 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 0.5 g、 KH_2PO_4 : 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.15 g 與 FeCl_3 (1% 溶液) : 1.2 ml/L (Marx, 1973)；苗木培養期間並以無菌水澆潤。

(五) 立體顯微鏡之觀察

接種一個月後即以立體顯微鏡檢查菌根之形成。將所形成之菌根以立體顯微鏡，觀察其菌根表面構造、菌根之排列形狀、根形變化、根周圍有無菌絲網包圍、菌根顏色變化及菌絲體顏色等特徵，每隔一個月固定利用立體顯微鏡檢查根系感染情況，並將所觀察之菌根利用裝置在顯微鏡上方的 Nikon 數位像機拍照紀錄。

(六) 掃描電子顯微鏡之觀察

1. SEM 藥品配置 (許桂蓮, 2007)

(1) 緩衝溶液：0.1M Phosphate buffer (Sorensen's phosphate buffer)

Stock A : 0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (31.2 g/l)

Stock B : 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (28.4 g/l)

39 ml Stock A + 61 ml Stock B pH=7.0

(2) 前固定液：2.5% Glutaraldehyde / 0.1M Phosphate buffer

25% Glutaraldehyde (in dist. H_2O) 10ml

0.2M Phosphate buffer 50ml

distilled H_2O 40ml

(3) 後固定液：1% OsO_4 / 0.1M Phosphate buffer

4% OsO ₄ (in dist. H ₂ O)	5ml
0.2M Phosphate buffer	10ml
distilled H ₂ O	5ml

2.前固定及沖洗

將菌根取其片段浸置於內含前固定液 2.5% 戊二醛 (0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液) 的瓶中至少 12 小時，並適度搖晃之，以利所有材料之固定，然後吸出前固定液，旋以 pH 7.0 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液沖洗 3 次，每次間隔 15 分鐘。

3.後固定及沖洗

將上述步驟處理完畢之菌根，於室溫下以 1% 的銻酸 (OsO₄, Osmium tetraoxide) 溶液進行 1 至 2 小時的後固定，待菌根表面呈現黑色後，再用 pH 7.0 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液沖洗 4 次，每次間隔 15 分鐘。

4.解剖

菌根沖洗完畢後，置於立體顯微鏡下，將菌根置於石蠟板上，用已浸潤過 30% 丙酮之銳利刀片作橫切或縱切。

5.酒精-丙酮系列脫水 (陳家全等, 2004)

切好之菌根片段置於瓶子內，以酒精-丙酮系列脫水。將固定好之菌根片段依序浸置於不同濃度之酒精溶液中，濃度分別為 30%、50%、70%、85%、95%、100%、100%。先將菌根片段浸置 30% 至 70% 酒精中進行脫水，每一階段 15 分鐘，於系列脫水至 70% 酒精後，即放入冰箱內冰存。待要進行臨界點乾燥時取出回溫，再由 70% 酒精進行後續的酒精-丙酮系列脫水，由 85% 酒精開始脫水，每一階段時間延長為 30 分鐘，最後，以 100% 的丙酮脫水 2 次，每次 30 分鐘，以加強脫水效果。

6.臨界點乾燥與黃金覆膜

脫水結束後，旋以吸管將菌根片段吸出，並放入網籠內，再將網籠放入 Ladd Research Industries 臨界點乾燥器 (Critical Point Dryer; CPD) 內，以液態 CO₂ 浸

洗 3~5 次後，進行臨界點乾燥，後將菌根片段黏置於雙面膠鋁台上，再利用 JEOL FC-1100 Eion Sputtering Device 進行黃金覆膜 3 分鐘，電流 DC10 mA，覆膜厚度約 225Å。

7. 掃描電子顯微鏡下觀察

將黃金覆膜完成之鋁台樣品，置於掃描電子顯微鏡 Hitachi S-2400 Scanning Microscope 中，以 10~20 KV 之加速電壓進行掃描觀察並照相。

(七) 塊菌菌根之鑑定

塊菌菌根的鑑定，乃利用菌根合成後的特徵形態鑑定，將上述以光學、電子顯微鏡所觀察與記錄到的形態特徵，比較過去針對台灣塊菌與夏塊菌所觀察整理之特徵 (Agerer, 1995; Zambonelli *et al.*, 2000; 許桂蓮, 2007)，進行形態比對。

(八) 菌根感染率之計算

苗木於接種一個月後，即開始觀察菌根，並於第二個月開始紀錄 60 株青剛櫟苗木，其每個月之感染情形與計算感染根數。將苗木放置於立體顯微鏡下，利用固定大小的觀察倍率 (25 倍) 檢查苗木之感染情形，每株苗木逢機選取 10 個根系觀察點，計算每個觀察點的菌根感染根尖數與全部之短根尖數加以總合，並計算該苗木之菌根感染率，總共觀察六個月之菌根感染率。

菌根感染率% = 菌根感染之根尖數 / 全部短根尖數 × 100%

(九) 苗木養分分析

將每一種處理的苗木進行葉部養分分析，葉片選取部位因苗木葉片少，所以採取苗木全部葉片進行分析，只保留其頂芽的部份。收集後以蒸餾水快速的沖洗乾淨，之後即將其分別裝入信封紙袋中，置入烘箱中，以 70°C 烘乾 72 小時以上，烘乾之後先秤重量，再將樣品以磨粉機磨碎呈粉末狀後，裝入紙袋中，再放入 70°C 烘箱中烘乾 24 小時；隨後採用濕消化法，以硫酸—過氧化氫分解法 (Moore and Chapman, 1986) 分解，將濾液以感應耦合電漿光譜分析儀 (Inductively-Coupled Plasma Emission Spectrophotometer, ICP-AES) 測定其鉀、鈉、鈣、鎂、磷含量。此

外，測定全氮則是利用電子微量天秤，將樣品粉末放置於錫囊內，連同此重量精秤至 2~3 mg，放置於元素分析儀中進行葉片總碳、氮量的分析。

(十) 試驗設計與統計分析

本試驗使用塊菌與溫度處理之完全逢機複因子試驗設計，溫度處理分為 35/30°C、30/25°C、25/20°C、20/15°C、15/12°C 等五種，在各溫度處理內進行台灣塊菌、夏塊菌與未接種三種處理間之比較，利用 SAS 統計軟體，對菌根感染率、苗高、根頸與 ICP 分析數據等資料統計分析，經 General Linear Model (GLM) 變方分析作顯著性 ($P \leq 0.05$) 比較後，當主效應之 F 值在變異數分析達顯著時，以鄧肯氏新多變域法 (Duncan's multiple range test) 進行均數間比較。此外，再利用皮爾森相關係數 (Pearson correlation coefficients) 進行各變數間的相關分析，並找出自變數與應變數之直線迴歸關係。最後，以 Excel 製作相關之分析圖表。



三、結果

(一) 青剛櫟苗木與兩種塊菌半無菌合成菌根試驗

青剛櫟苗木在接種台灣塊菌及夏塊菌後，隨即移往五種不同日夜溫度（35/30°C、30/25°C、25/20°C、20/15°C、15/12°C）的人工氣候室培養，在半無菌狀態下，經人為接種第 2 個月後，能成功合成並形成典型之塊菌菌根。未接種之對照組則無菌根形成，或是其他污染菌根之感染情形。合成後之菌根，隨即以顯微鏡觀察其形態，並比較菌根形態在不同溫度間的差異。

(1) 菌根在立體顯微鏡下之形態特徵

1. 青剛櫟與台灣塊菌之菌根組合

台灣塊菌菌根與其他未感染之根系比較後，菌根短根直徑較無菌根之短根明顯增加，菌根呈單根或不規則羽狀（圖 9），菌根長度在 550~2800 μm ，主軸直徑則在 170~250 μm ，初期菌根呈現淺黃色或淡黃色；之後進入成熟期時，菌根尖端膨大更為明顯，菌根表面之菌毯結構清晰明顯，菌根並具有明顯之剛毛（圖 10），且顏色亦較深，呈現黃褐、褐或咖啡色；最後，當菌根進入老化時期時，顏色較成熟期更深，呈現深褐色或灰黑色，老化期之台灣塊菌菌根，最大特徵即為成熟期十分明顯之剛毛逐漸變為稀疏、變薄、消失（圖 11）。

2. 青剛櫟與夏塊菌之菌根組合

夏塊菌與青剛櫟形成之菌根，主要是呈現單根狀，菌根形成初期呈淡黃色（圖 12），有時發現有延伸菌絲，菌根長度在 600~2700 μm ，主軸直徑則在 90~300 μm ；成熟期之菌根，尖端膨大更為明顯，有非常明顯之剛毛，或呈羊毛狀（圖 13），分佈於菌根頂端或前半部，菌根顏色呈現黃褐或咖啡色；老化期的夏塊菌菌根，剛毛變稀疏，甚至消失，顏色為深褐色、琥珀色或暗褐黑（圖 14）。



圖 9. 台灣塊菌之規則羽狀菌根



圖 10. 台灣塊菌菌根表面之典型剛毛

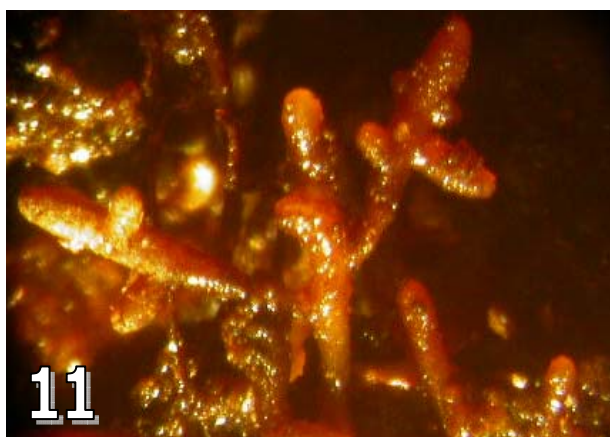


圖 11. 台灣塊菌之老化期菌根，呈暗褐色



圖 12. 夏塊菌初期菌根，菌根呈現淡黃色



圖 13. 夏塊菌菌根表面之典型羊毛狀剛毛

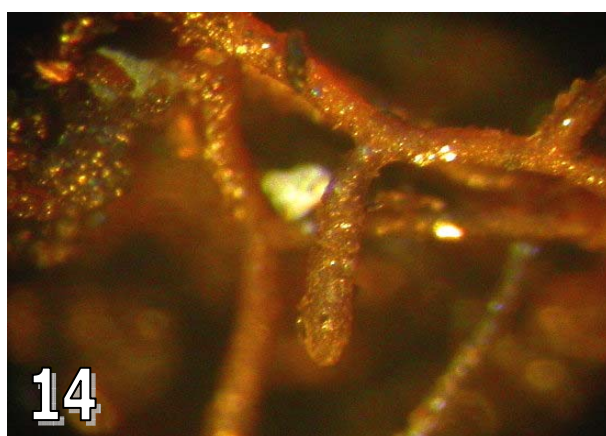


圖 14. 夏塊菌之老化期菌根，剛毛消失

(2) 不同溫度中之菌根生長形態

1. 青剛櫟與台灣塊菌之菌根組合

利用立體顯微鏡觀察在 5 種不同溫度下培養的青剛櫟接種台灣塊菌苗木，所形成的菌根形態是否有所差異，且立即拍照紀錄之。由觀察所得到的照片結果顯示，於不同溫度下生長的菌根，其外部形態並無明顯之差異；每一種溫度處理下的菌根，皆具有典型之台灣塊菌菌根特徵（圖 15~19）。

2. 青剛櫟與夏塊菌之菌根組合

接種夏塊菌的青剛櫟苗木，同樣於 5 種不同溫度下培養並觀察，結果同樣顯示，不同溫度的菌根，其形態並無明顯之差異，也都具有典型之夏塊菌菌根特徵（圖 20~24）。

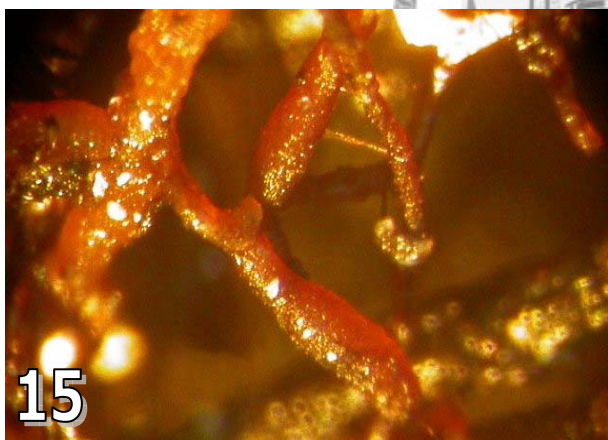


圖 15. 在 35/30°C 溫度下，台灣塊菌菌根形態



圖 16. 在 30/25°C 溫度下，典型成熟期台灣塊菌菌根，表面呈金黃色有延伸菌絲

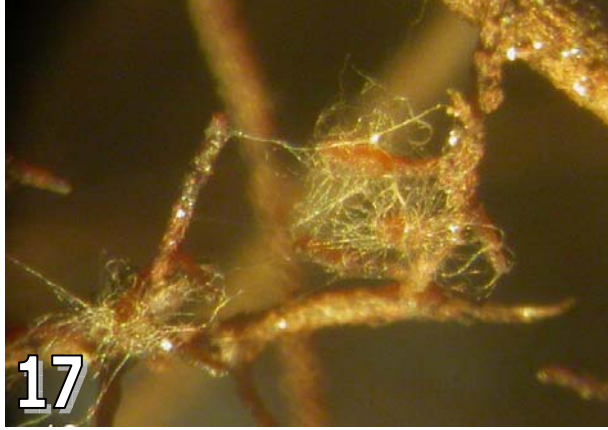


圖 17. 在 25/20°C 溫度下，台灣塊菌菌根表面延伸菌絲相當明顯



圖 18. 在 20/15°C 溫度下，成熟期之台灣塊菌菌根呈褐色且有剛毛及延伸菌絲



圖 19. 在 15/12°C 溫度下，初期之台灣塊菌菌根表面有明顯剛毛及延伸菌絲且呈金黃色



圖 20. 在 35/30°C 溫度下，夏塊菌菌根形態，菌根表面平坦



圖 21. 在 30/25°C 溫度下，典型成熟期夏塊菌菌根

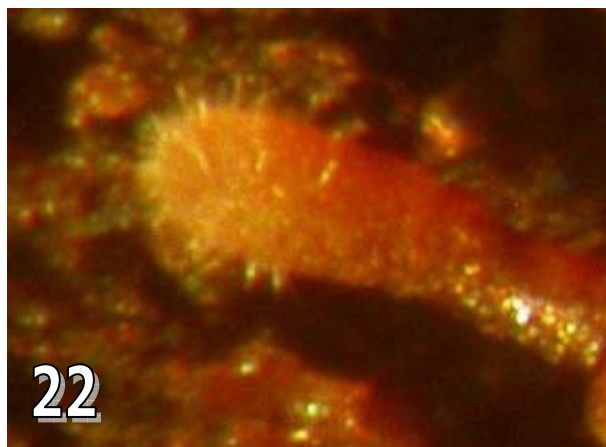


圖 22. 在 25/20°C 溫度下，成熟期之夏塊菌菌根，單根狀且表面有剛毛

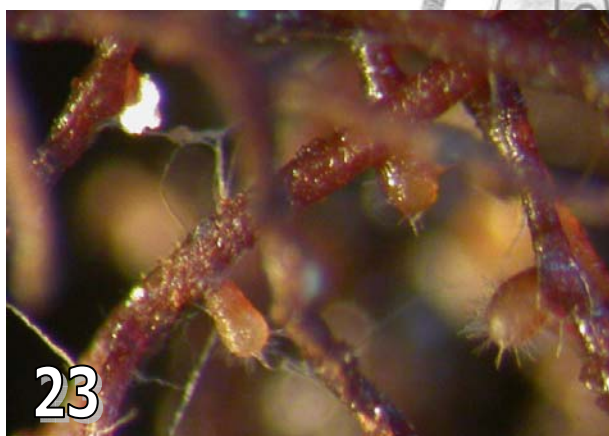


圖 23. 在 20/15°C 溫度下，初期之夏菌菌根表面有明顯剛毛且呈金黃色



圖 24. 在 15/12°C 溫度下，初期夏塊菌菌根形態，呈現短棒狀且有剛毛

(3) 菌根在掃描電子顯微鏡下之形態特徵

1. 青剛櫟與台灣塊菌之菌根組合

以掃描電子顯微鏡觀察台灣塊菌與青剛櫟所形成菌根之超微細結構可發現，菌根外部有剛毛的存在（圖 25 a），而由菌毯表面的菌絲微細構造發現，剛毛表面是呈現平坦狀（圖 25 b），菌絲直徑在 1.8~3.0 μm ，菌毯表面結構，在不同溫度下，形態並未有顯著之差異。由橫切面觀察之，菌毯厚度在 15~25 μm ，哈替氏網延伸菌絲約侵入至第二層皮層細胞間，皮層細胞內有澱粉粒累積（圖 25 c）；以縱切面觀察後發現，菌毯厚度約與橫切面相同，且哈替氏網菌絲亦侵入至第二層皮層細胞間（圖 25 d）。此外，仔細觀察不同溫度間，菌根微細結構不同處後發現，35/30 $^{\circ}\text{C}$ 與 30/25 $^{\circ}\text{C}$ 溫度下生長之菌根，菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，其皮層細胞內，均有較明顯的胞內菌絲，澱粉粒累積出現的頻率亦較高（圖 25 e、f），而 25/20 $^{\circ}\text{C}$ 以下的溫度所觀察結果，較無胞內菌絲及澱粉粒等特徵（圖 25 c、d）。

2. 青剛櫟與夏塊菌之菌根組合

觀察夏塊菌與青剛櫟所形成菌根之超微細結構特徵，發現菌根外部亦有延伸菌絲（圖 26 a），菌毯表面的菌絲有小突起（圖 26 b），且有菌絲囊與菌絲融合的情形存在（圖 26 c），菌絲直徑在 1.5~2.8 μm ，菌毯表面結構，在不同溫度下，形態並未有顯著之差異。由橫切面觀察之，菌毯厚度在 18~30 μm ，哈替氏網延伸菌絲約侵入至第二層皮層細胞間，皮層細胞內有澱粉粒累積（圖 26 d）；以縱切面觀察後發現，菌毯厚度約與橫切面相同，哈替氏網菌絲亦侵入至第二層皮層細胞間（圖 26 e）。比較不同溫度之夏塊菌菌根後，同樣可以發現，在較高溫度組合下生長的菌根，菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，而其皮層細胞內，均有較明顯的澱粉粒及胞內菌絲（圖 26 f）。

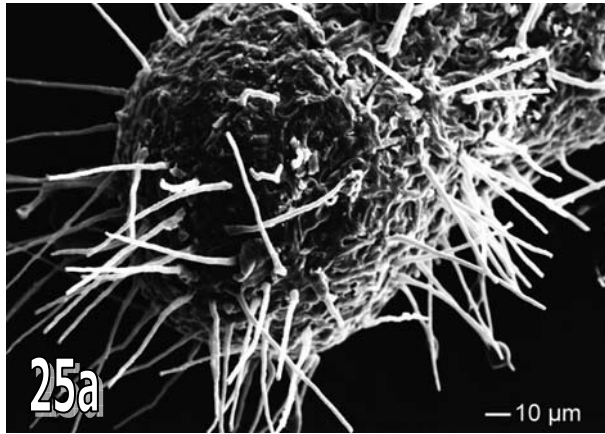


圖 25 a. 台灣塊菌之菌根超微細結構

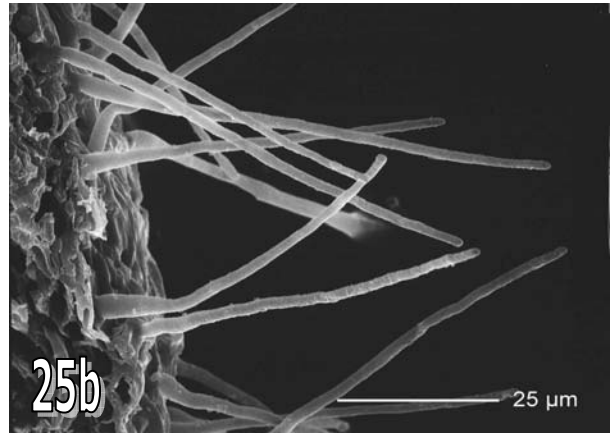


圖 25 b. 台灣塊菌之菌毯表面菌絲超微細結構

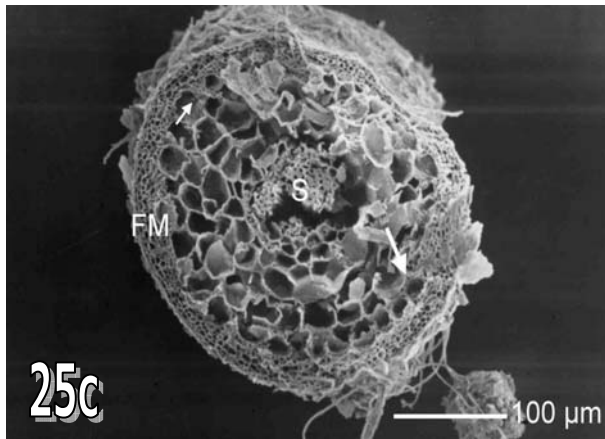


圖 25 c. 台灣塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；箭頭處為哈替氏網

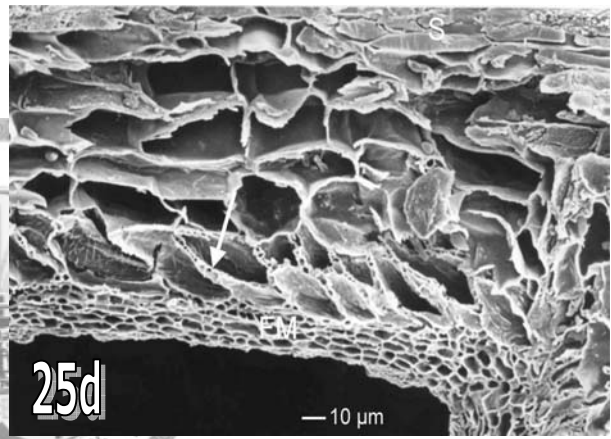


圖 25 d. 台灣塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；箭頭處為哈替氏網

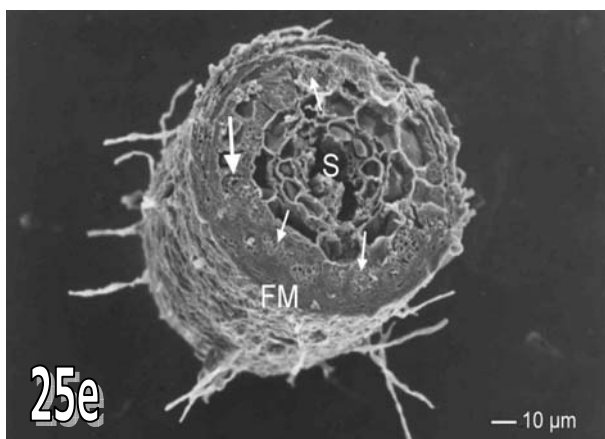


圖 25 e. 台灣塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；粗箭頭處為哈替氏網，細箭頭處為澱粉粒

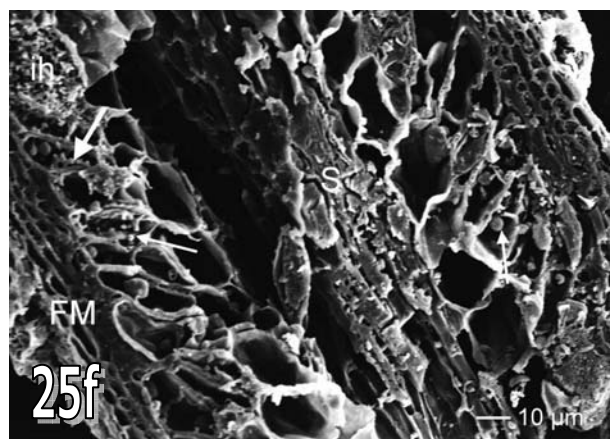


圖 25 f. 台灣塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；粗箭頭處為哈替氏網，細箭頭處為澱粉粒

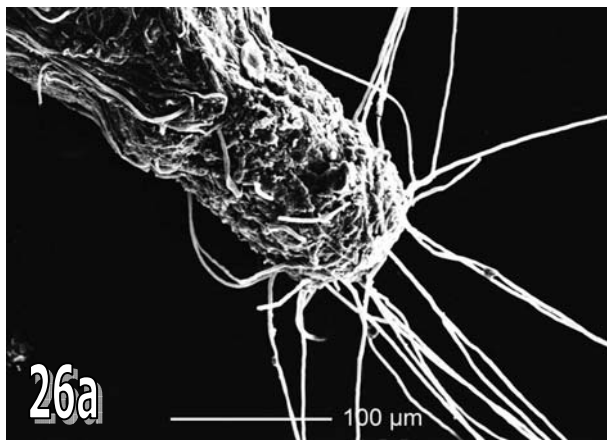


圖 26 a. 夏塊菌之菌根超微細結構

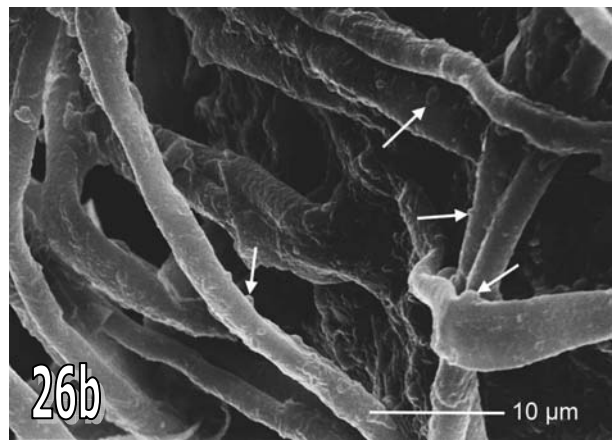


圖 26 b. 夏塊菌之菌毯表面菌絲超微細結構，箭頭處為菌絲表面小突起

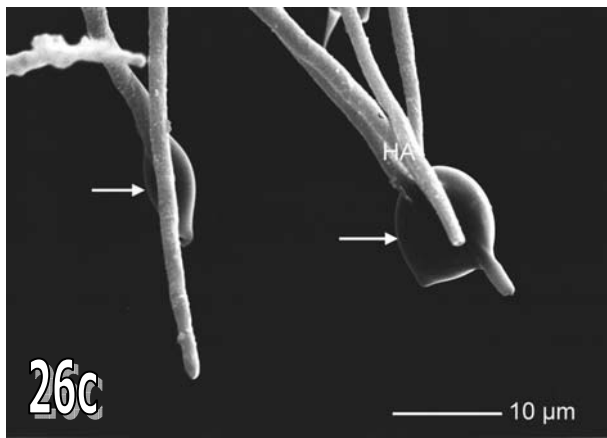


圖 26 c. 夏塊菌之超微細結構，箭頭處為菌絲囊與菌絲融合

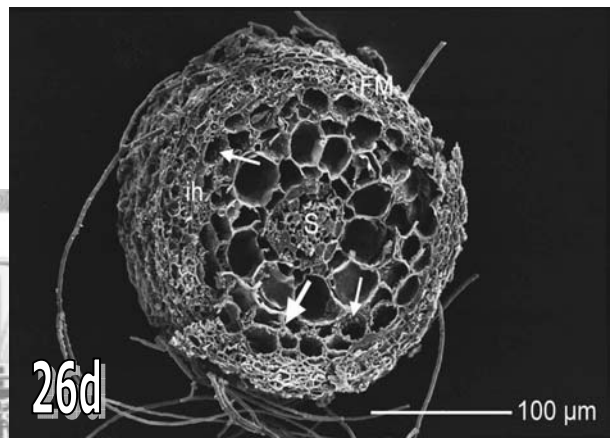


圖 26 d. 夏塊菌之超微細結構，ih 為胞內菌絲，粗箭頭處為哈替氏網，細箭頭處為澱粉粒

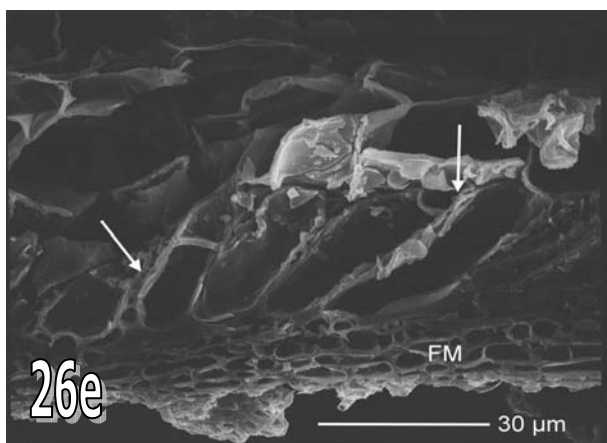


圖 26 e. 夏塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；細箭頭處為哈替氏網，粗箭頭處為澱粉粒，ih 為胞內菌絲

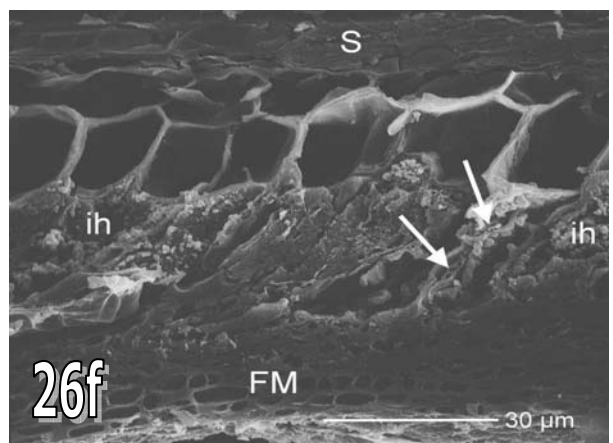


圖 26 f. 夏塊菌之超微細結構，S：中柱；FM：菌毯；細箭頭處為哈替氏網，粗箭頭處為澱粉粒，ih 為胞內菌絲

(二) 溫度對苗木菌根形成、苗木生長與葉部大量養分元素之影響

(1) 各連續月份中菌根感染率與菌根感染動態

觀察青剛櫟苗於接種後，第 3~8 個月的兩種塊菌菌根感染情形，發現在不同溫度下，所有苗木均能形成典型之塊菌菌根，苗木被感染的比例為 100%。

從表 7 得知，35/30°C 及 30/25°C 溫度組合下生長之夏塊菌菌根感染率，第 3~5 個月呈現顯著的持續性增加，第 6~8 個月則逐漸呈緩慢生長，但在第 8 個月是感染率的最高峰。此外，在所有溫度組合下培養的台灣塊菌，以及 25/20°C、20/15°C、15/12°C 溫度下培養的夏塊菌，於第 3~5 個月間，也是呈現顯著的持續性增加，第 6~7 個月則逐漸呈緩慢生長，在第 7 個月時為感染率的最高峰，但在第 8 個月的感染率則開始略為下降。

(2) 溫度對兩種塊菌菌根感染率之影響

表 7 中觀察菌根感染率後發現，經比較同一溫度下，兩種菌種間之差異後，可以發現兩種菌種之菌根感染率，在 35/30°C 及 15/12°C 之溫度組下，兩菌種間均呈現差異不顯著 ($P > 0.05$)；30/25°C 溫度組則在第 5、8 月份，兩菌種間呈現顯著差異 ($P < 0.05$)，其餘月份均呈差異不顯著 ($P > 0.05$)；25/20°C 則在第 3 個月份時呈差異不顯著 ($P > 0.05$)，而第 4~8 月份時，則兩菌種互呈顯著差異 ($P < 0.05$)；20/15°C 則在第 8 個月份時，兩菌種互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，其餘月份均呈差異不顯著 ($P > 0.05$)。

進一步比較同一菌種下，五種溫度間之差異後，發現在第 3 個月時，台灣塊菌與夏塊菌相同，都以 25/20°C 最高，其次是 30/25°C 及 20/15°C，三者之間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，而 35/30°C 及 15/12°C 之感染率最低，且兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)；第 4 個月時，台灣塊菌與夏塊菌相同，都是以 25/20°C 最高，與其他溫度組合之菌根感染率互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C、30/25°C 次之，兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C、35/30°C 之菌根感染率最低，兩者間亦呈差異不顯著 ($P > 0.05$)；第 5 個月之菌根感染率，台灣塊菌與夏塊菌相同，最高為 25/20°C，

與其他溫度組合均互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C、30/25°C 者次之，兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 者再次之，35/30°C 最低，15/12°C 與 35/30°C 間呈顯著差異 ($P < 0.05$)；第 6 個月時，台灣塊菌與夏塊菌相同，以 25/20°C 者最高，與其他溫度組合間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C、30/25°C 者次之，兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 者再次之，35/30°C 者最低，15/12°C 與 35/30°C 間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)；第 7 個月時，台灣塊菌與夏塊菌相同，以 25/20°C 者最高，與其他溫度組合互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C 及 30/25°C 次之，此兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 者再次之，35/30°C 者最低，15/12°C 與 35/30°C 間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)；在第 8 個月時，台灣塊菌與夏塊菌仍相同，以 25/20°C 者最高，與其他溫度組合互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C 及 30/25°C 次之，此兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 者再次之，35/30°C 者最低，15/12°C 與 35/30°C 間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

為了瞭解不同溫度與兩種菌種處理對菌根感染率之生長趨勢，將兩塊菌種之平均值，計算出五種溫度組的菌根感染率數值如圖 27；並將五種溫度組的平均值，計算出兩塊菌種的菌根感染率數值如圖 28。由圖 27 可發現，各連續月份之菌根感染率，都是呈現拋物線趨勢，以 25/20°C 最高，30/25°C 及 20/15°C 次之，35/30°C 及 15/12°C 之感染率最低。圖 28 中則可以發現，各連續月份之菌根感染率，在兩菌種間是呈現差異不顯著 ($P > 0.05$)。

根據各連續月份以不同溫度下之菌根感染率 (圖 27)，所繪製成的生長趨勢圖 (圖 29 a)，各溫度間之感染率趨勢為 $25/20^{\circ}\text{C} > 20/15^{\circ}\text{C} \geq 30/25^{\circ}\text{C} > 15/12^{\circ}\text{C} > 35/30^{\circ}\text{C}$ ；若進一步將菌根感染率，在不同溫度組合下，以多項式迴歸分析後，可以得知在各溫度間，呈現有共同斜率，但各自有其截距。在 35/30°C 溫度組下，菌根感染率與時間之間，其直線迴歸式之相關方程式為 $y = -0.8837 x^2 + 12.922 x - 16.491$ ， $r^2 = 0.97$ ，經變方分析結果差異顯著 (F 值為 48.57，P 值則為 0.0052)，兩者呈二次曲線迴歸關係 (圖 29 b)；在 30/25°C 溫度組下，直線迴歸式之相關方程

式為 $y = -0.8811x^2 + 14.948x - 17.237$, $r^2 = 0.9825$, 經變方分析結果差異顯著 (F 值為 84.07, P 值則為 0.0023), 兩者呈二次曲線迴歸關係 (圖 29 c); 在 25/20°C 溫度組下, 直線迴歸式之相關方程式為 $y = -1.428x^2 + 21.316x - 28.922$, $r^2 = 0.972$, 變方分析結果差異顯著 (F 值為 52.14, P 值則為 0.0047), 兩者呈二次曲線迴歸關係 (圖 29 d); 在 20/15°C 溫度組下, 直線迴歸式之相關方程式為 $y = -1.3881x^2 + 20.642x - 32.349$, $r^2 = 0.9872$, 變方分析結果差異顯著 (F 值為 81.13, P 值則為 0.0024), 兩者呈二次曲線迴歸關係 (圖 29 e); 在 15/12°C 溫度組下, 直線迴歸式之相關方程式為 $y = -1.3375x^2 + 18.577x - 30.244$, $r^2 = 0.9467$, 變方分析結果差異顯著 (F 值為 26.66, P 值則為 0.0123), 兩者呈二次曲線迴歸關係 (圖 29 f); 以上直線迴歸式之 $y =$ 菌根感染率 (%), $x =$ 時間 (月份), $r^2 =$ 相關係數。以各連續月份之兩菌種間菌根感染率 (圖 28), 所繪製成的生長趨勢圖 (圖 30), 可以發現台灣塊菌與夏塊菌間的趨勢為夏塊菌 \geq 台灣塊菌, 但兩者間差異不顯著 ($P > 0.05$)。

表 7. 不同溫度處理與不同菌種對菌根感染率在接種後各月份的顯著性分析 ($P < 0.05$)

接種 後月份	處理 菌種	35/30°C	30/25°C	25/20°C	20/15°C	15/12°C
3	T.f	6.34Da	12.01Ba	15.53Aa	9.15Ca	6.68Da
	T.a	7.56Da	13.54Ba	16.57Aa	10.04Ca	6.07Da
4	T.f	9.95Ca	18.87Ba	22.67Ab	18.52Ba	10.33Ca
	T.a	11.54Ca	20.55Ba	28.35Aa	18.86Ba	11.87Ca
5	T.f	18.77Da	31.54Bb	46.45Ab	34.98Ba	26.54Ca
	T.a	20.54Da	34.76Ba	49.05Aa	33.10Ba	28.48Ca
6	T.f	24.57Da	43.05Ba	51.61Ab	44.77Ba	30.51Ca
	T.a	26.89Da	45.56Ba	55.58Aa	43.89Ba	29.97Ca
7	T.f	25.12Da	49.89Ba	59.81Ab	52.55Ba	31.13Ca
	T.a	25.77Da	51.20Ba	63.15Aa	50.61Ba	29.45Ca
8	T.f	24.33Da	48.67Bb	55.48Ab	47.90Ba	30.08Ca
	T.a	26.13Ca	51.44Ba	59.78Aa	44.66Bb	29.12Ca

*小寫英文字母不同代表同一溫度下, 兩種菌種間之顯著差異 ($P < 0.05$), 大寫英文字母不同代表同一菌種下, 五種溫度間之顯著差異 ($P < 0.05$)。

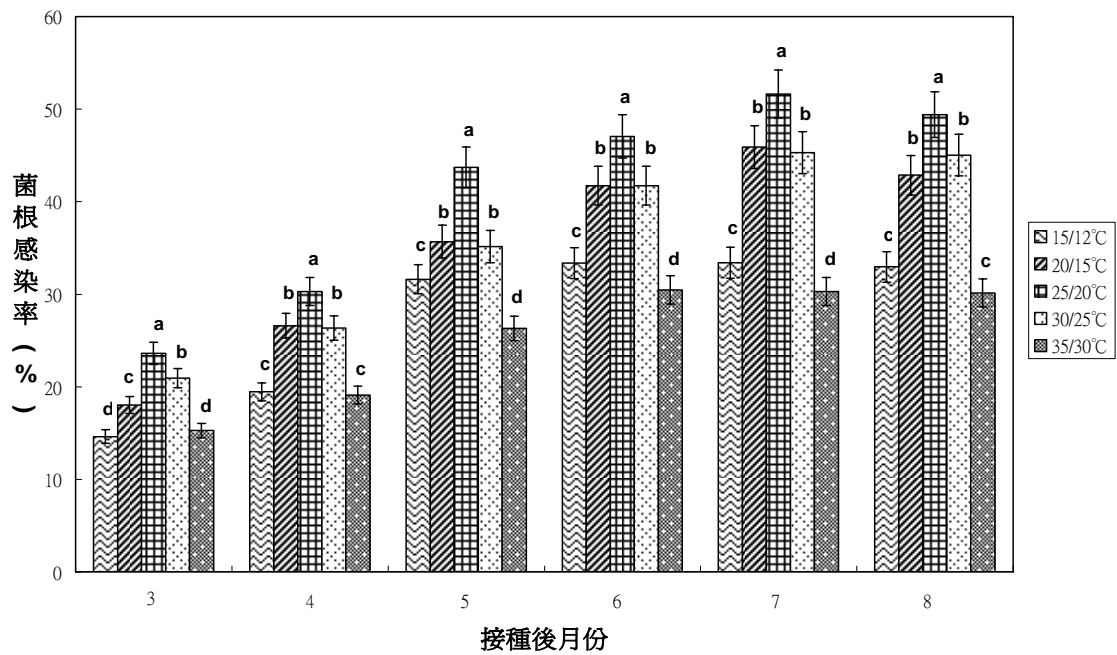


圖 27. 各連續月份之菌根感染率在不同溫度處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異 ($P < 0.05$)，五種溫度組之菌根感染率數值，為兩塊菌種之平均值

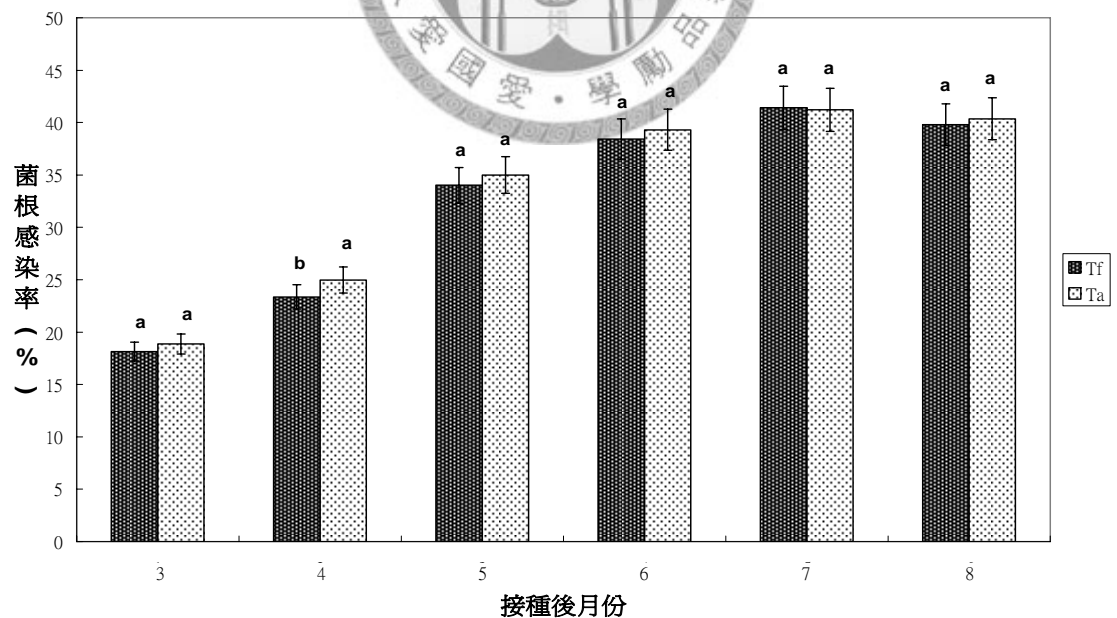


圖 28. 各連續月份之菌根感染率在不同菌種處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異 ($P < 0.05$)，兩塊菌種的菌根感染率數值，為五種溫度組的平均值

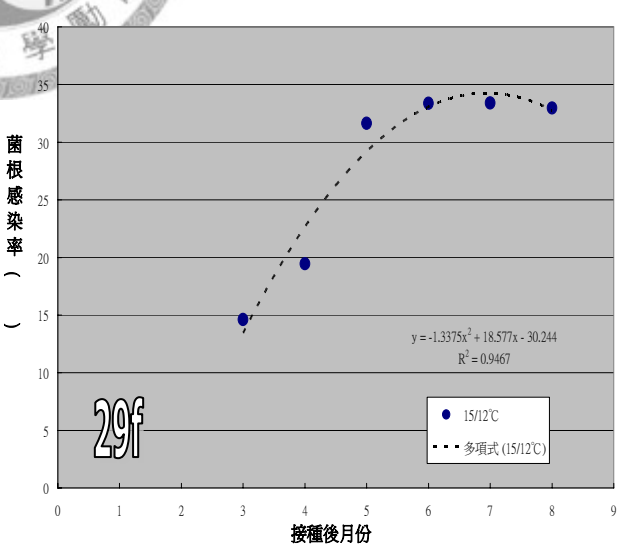
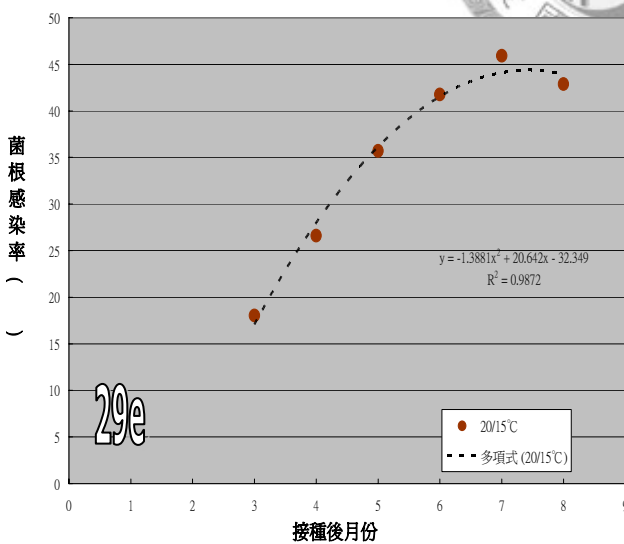
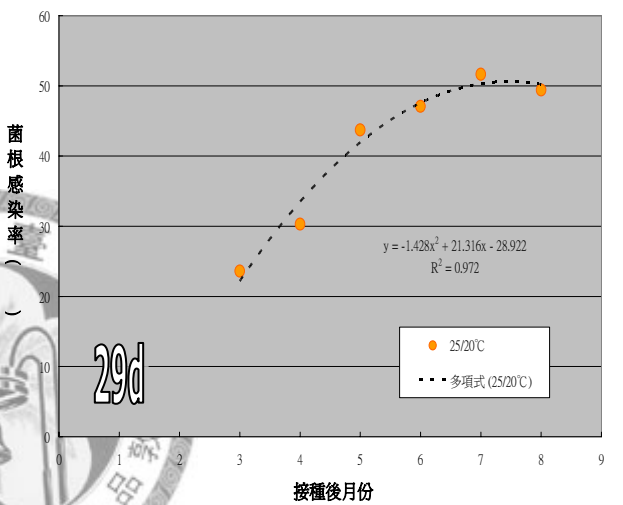
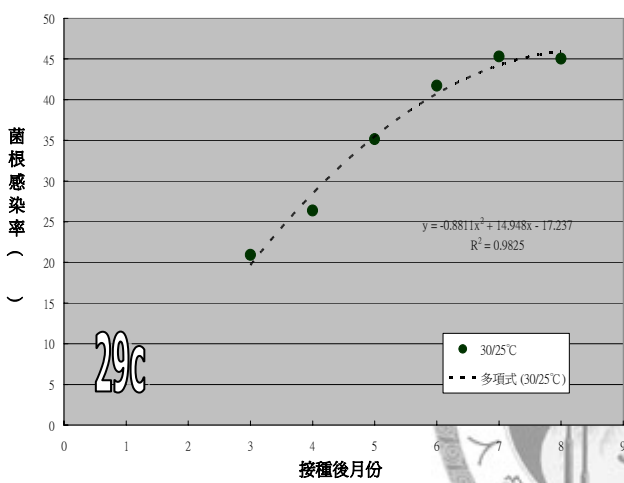
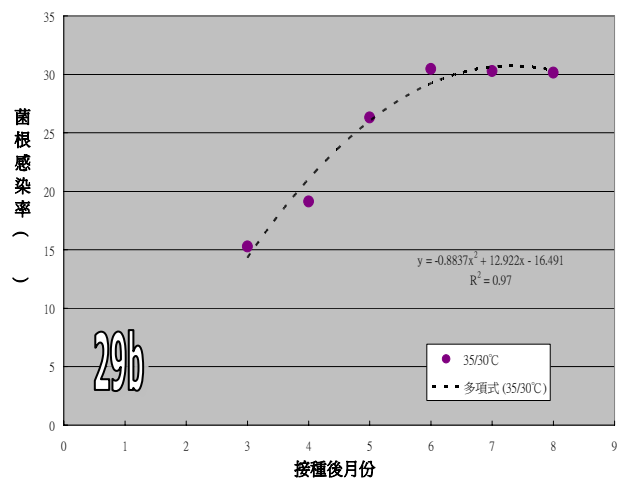
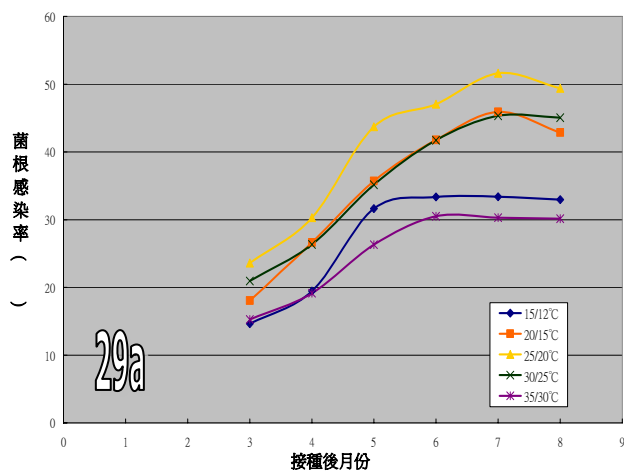


圖 29 a-f. 不同溫度下之菌根感染率生長趨勢 (a) 及其直線迴歸關係 (b-f)

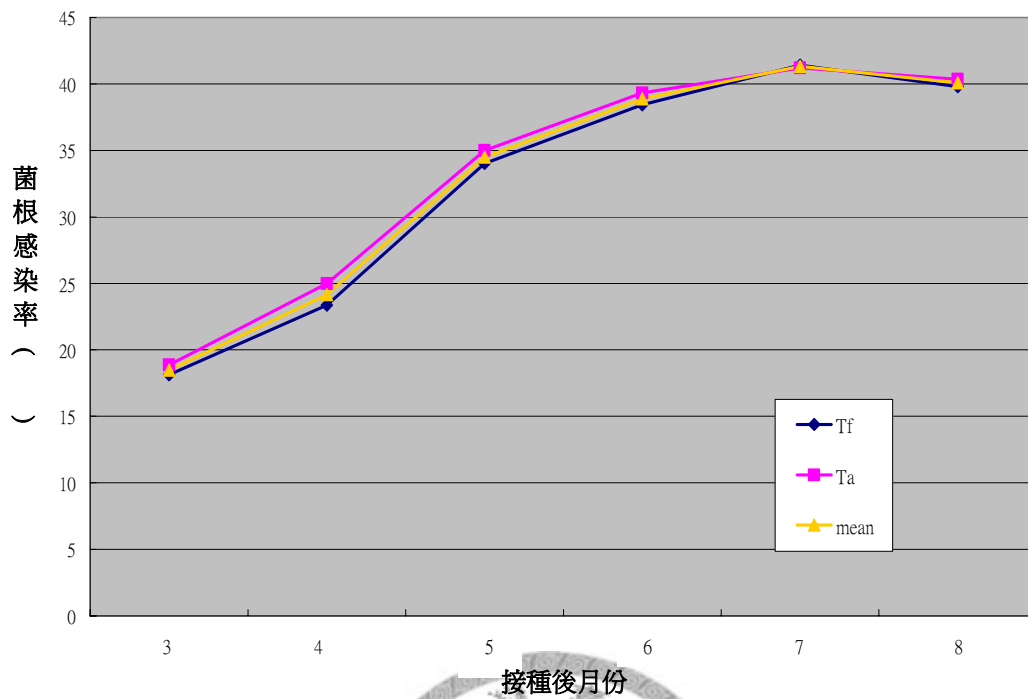


圖 30. 不同菌種之菌根感染率與接種月份間之變化趨勢



(3) 溫度與兩種塊菌接種對苗木高生長之影響

青剛櫟苗木接種塊菌後，經過六個月不同溫度組合的狀態下培養，於第 8 個月收穫進行破壞試驗前，將每一溫度組合中之接種台灣塊菌、夏塊菌與未接種苗木，作一拍照紀錄（圖 31 a-e），比較有接種、未接種與各溫度組合間之苗木生長狀況。初步以照片結果觀察後發現，有接種兩種塊菌之青剛櫟苗木，苗高生長狀況均明顯比未接種之苗木良好。

經觀察表 8 之苗高數據後發現，比較同一溫度下，兩種菌種、未接種間之差異後，可以發現在第 3~4 個月時，各處理間之苗高，都是呈現差異不顯著，故表格中未將資料列出。在第 5 個月時，35/30°C、30/25°C 與 25/20°C 溫度下，兩種菌種處理間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，但與未接種間則呈顯著差異 ($P < 0.05$)，20/15°C 與 15/12°C 則是以夏塊菌最佳，台灣塊菌次之，未接種處理者最差，三者間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)；第 6 個月時，35/30°C、20/15°C 與 15/12°C 溫度下，是以夏塊菌最佳，台灣塊菌次之，未接種處理最差，三者間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，而 30/25°C 與 25/20°C 則為兩種菌種處理間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，但與未接種間則互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，第 7 個月時，在 35/30°C、25/20°C、20/15°C 與 15/12°C 溫度組下，是以夏塊菌最佳，台灣塊菌次之，未接種處理最差，三者間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，30/25°C 則為兩種菌種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)；第 8 個月，35/30°C、20/15°C 與 15/12°C 溫度下，是以夏塊菌最佳，台灣塊菌次之，未接種處理最差，三者間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，30/25°C 與 25/20°C 則為兩種菌種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)。

再比較同一菌種處理下，五種溫度間之差異後，發現在第 3~4 個月時，各處理間之苗高，同樣都是呈現差異不顯著，因此表格內未將資料列出。第 5 個月時，就台灣塊菌而言，最高苗高的溫度組合為 35/30°C，15/12°C、25/20°C 與 30/25°C 三者次之，且此三者間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，20/15°C 者最低，與其他溫度組合間呈顯著差異 ($P < 0.05$)，接種夏塊菌之苗高方面，以 35/30°C 為最高，25/20°C

與 15/12°C 次之，兩者間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，30/25°C 與 20/15°C 兩者最差，兩者間差異亦呈不顯著 ($P > 0.05$)，未接種之苗高，以 35/30°C 為最高，15/12°C 與 25/20°C 三者次之，此三者間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，30/25°C 為最低，與其他溫度組合間呈顯著差異 ($P < 0.05$)；第 6 個月時，接種台灣塊菌之苗高，以 35/30°C 與 30/25°C 為最高，兩者間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，25/20°C、20/15°C 與 15/12°C 三者次之，三者間差異亦呈不顯著 ($P > 0.05$)，接種夏塊菌之苗高，35/30°C 為最高，與其他溫度組間呈顯著差異 ($P < 0.05$)，未接種之苗高，以 35/30°C 者最高，15/12°C、25/20°C、20/15°C 三者次之，惟三者間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，30/25°C 者最低，與其他溫度組呈顯著差異 ($P < 0.05$)；第 7、8 個月時，兩種接種、未接種處理方面，都是以 35/30°C 為最高，且與其他溫度組間呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

為了瞭解不同溫度與兩種接種、未接種處理對苗高之生長趨勢，將兩種接種、未接種之平均值，計算出五種溫度組的苗高值如圖 32；並將五種溫度組之平均值，計算出兩種接種、未接種的苗高值如圖 33。由圖 32 可發現，各連續月份之苗高，都是以 35/30°C 最高，其餘各溫度組次之。而圖 33 則可以發現，各連續月份之苗高，都是以夏塊菌最高，台灣塊菌次之，未接種處理者最低，三者間呈現顯著差異 ($P < 0.05$)。

根據各連續月份（第 5~8 個月）以不同溫度下之苗高（圖 32），所繪製成的生長趨勢圖（圖 34 a），發現不同溫度下之苗高，各溫度間之趨勢為 35/30°C > 15/12°C \geq 25/20°C \geq 30/25°C \geq 20/15°C；進一步將苗高值，在不同溫度組合下，以多項式迴歸分析後，可以得知在各溫度間，無法合併，亦即有各自的迴歸線。在 35/30°C 溫度組下，苗高值與時間之間，直線迴歸式之相關方程式為 $y = 2.1916x + 19.823$ ， $r^2 = 0.97$ ，經變方分析結果差異顯著（F 值為 221.88，P 值則為 0.0001），兩者呈一次曲線迴歸關係（圖 34 b）；在 30/25°C 溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y = -0.1960x^2 + 1.8218x + 17.336$ ， $r^2 = 0.9913$ ，經變方分析結果差異顯著（F 值為 232.87，P 值則為 0.0005），兩者呈二次曲線迴歸關係（圖 34 c）；在 25/20°C

溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y=0.5884x+18.881$ ， $r^2=0.9939$ ，變方分析結果差異顯著（F 值為 426.56，P 值則為 0.0001），兩者呈一次曲線迴歸關係（圖 34 d）；在 20/15℃溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y=0.5724x+18.036$ ， $r^2=0.9976$ ，變方分析結果差異顯著（F 值為 249.46，P 值則為 0.0001），兩者呈一次曲線迴歸關係（圖 34 e）；在 15/12℃溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y=0.2297x+19.861$ ， $r^2=0.9995$ ，變方分析結果差異顯著（F 值為 56.45，P 值則為 0.0017），兩者呈一次曲線迴歸關係（圖 34 f）；以上直線迴歸式之 $y=$ 苗高（%）， $x=$ 時間（月份）， $r^2=$ 相關係數。再以各連續月份之兩菌種間苗高值（圖 33），所繪製成的生長趨勢圖（圖 35），可以發現趨勢為接種夏塊菌之苗高 > 接種台灣塊菌之苗高 > 未接種之苗高。

表 8. 不同溫度處理與不同菌種對苗高在接種後各月份的顯著性分析（ $P<0.05$ ）

接種 後月份	處理 菌種	35/30℃	30/25℃	25/20℃	20/15℃	15/12℃
5	T.f	22.450Aa	20.833ABa	20.183ABa	18.500Bb	20.450ABb
	T.a	25.033Aa	20.850Ba	22.333ABa	21.633Ba	23.667ABa
	Ck	17.700Ab	15.083Bb	15.767ABb	15.650ABc	16.167ABc
6	T.f	25.983Ab	22.150Aa	21.000Ba	18.883Bb	20.600Bb
	T.a	30.117Aa	23.050Ba	23.183Ba	22.433Ba	23.933Ba
	Ck	18.500Ac	15.750Bb	16.067ABb	16.25ABc	16.400ABc
7	T.f	26.700Ab	22.600Ba	21.750Bb	19.583Bb	20.883Bb
	T.a	31.417Aa	24.117Ba	24.083Ba	22.933Ba	24.150Ba
	Ck	19.683Ac	16.033Bb	16.317Bc	16.617Bc	16.633Bc
8	T.f	29.333Ab	23.233Ba	22.217Ba	20.25Bb	21.233Bb
	T.a	35.883Aa	24.850Ba	24.617Ba	23.917Ba	24.383Ba
	Ck	20.817Ac	16.500Bb	16.700Bb	16.850Bc	16.717Bc

*小寫英文字母不同代表同一溫度下，兩種菌種、未接種間之顯著差異（ $P<0.05$ ），大寫英文字母不同代表同一菌種及未接種下，五種溫度間之顯著差異（ $P<0.05$ ）。

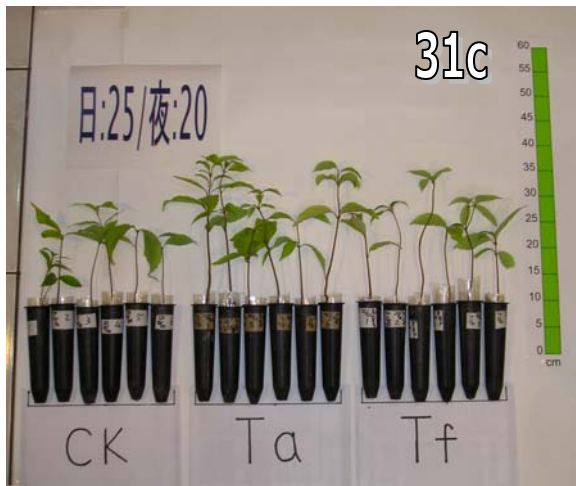


圖 31 a-e. 不同溫度處理與兩種菌種組合之青剛櫟苗木生長情形

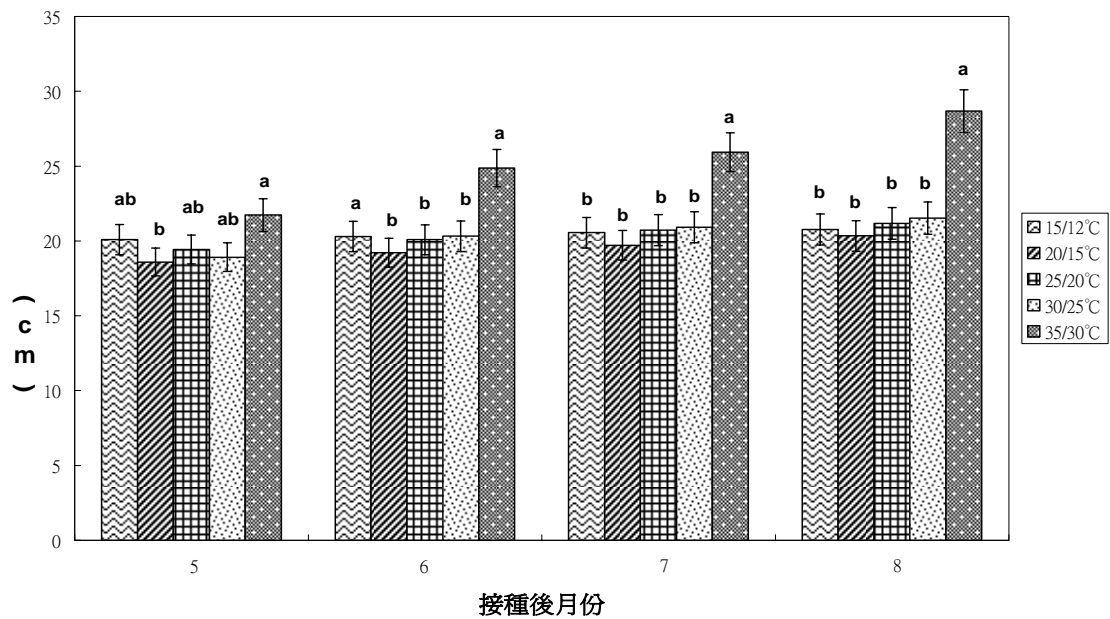


圖 32. 各連續月份（第 5~8 個月）之苗高在不同溫度處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異（ $P < 0.05$ ），五種溫度組之苗高數值，為兩種接種與未接種之平均值

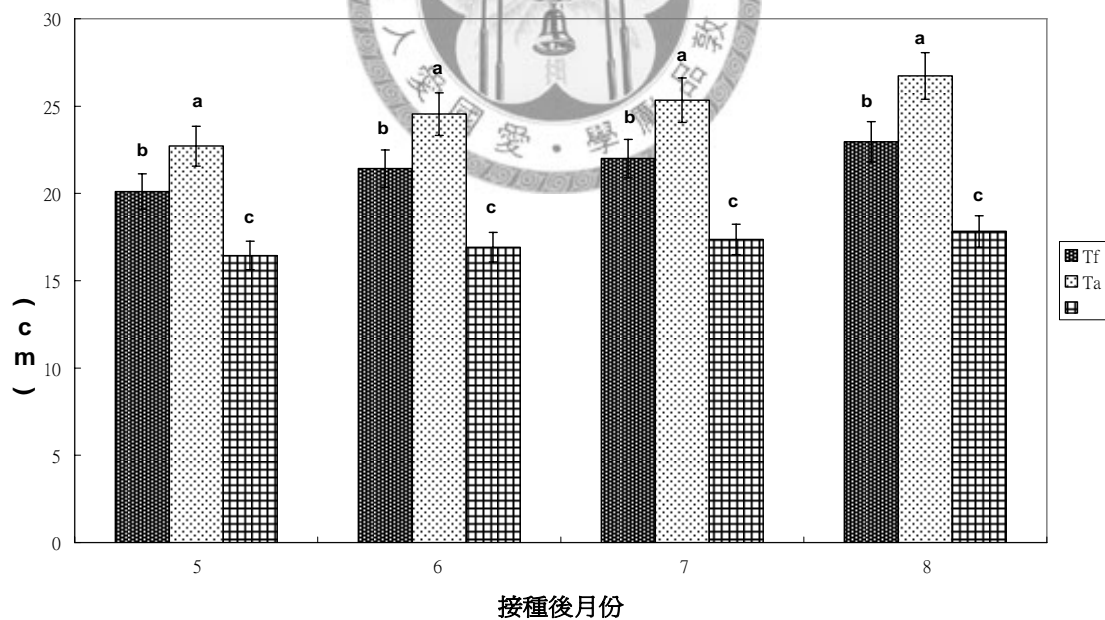


圖 33. 各連續月份（第 5~8 個月）之苗高在不同菌種處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異（ $P < 0.05$ ），兩塊接種與未接種的苗高數值，為五種溫度組的平均值

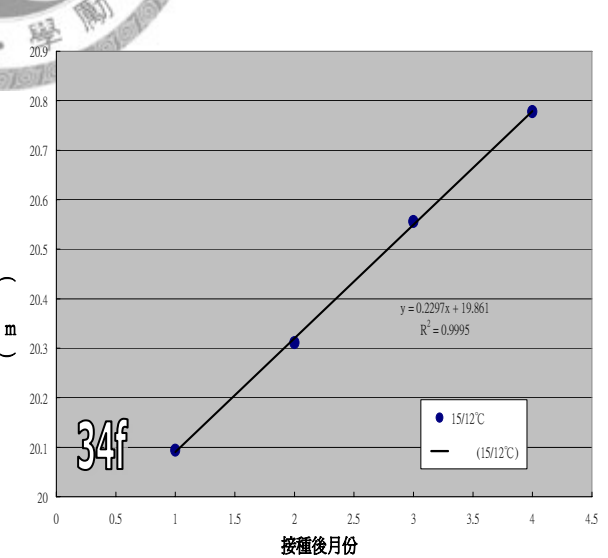
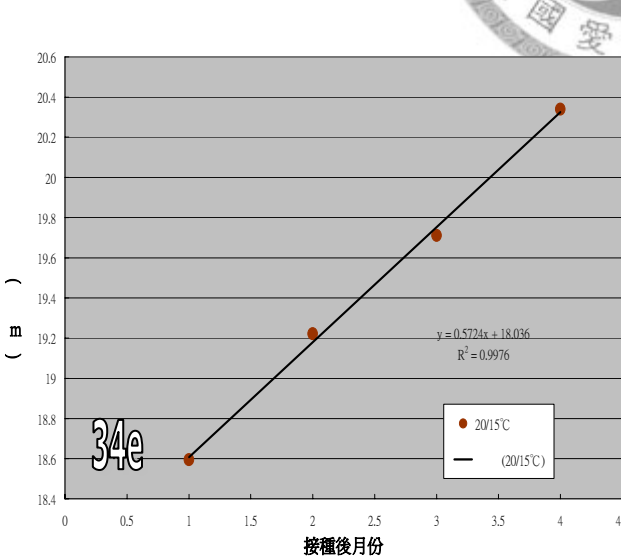
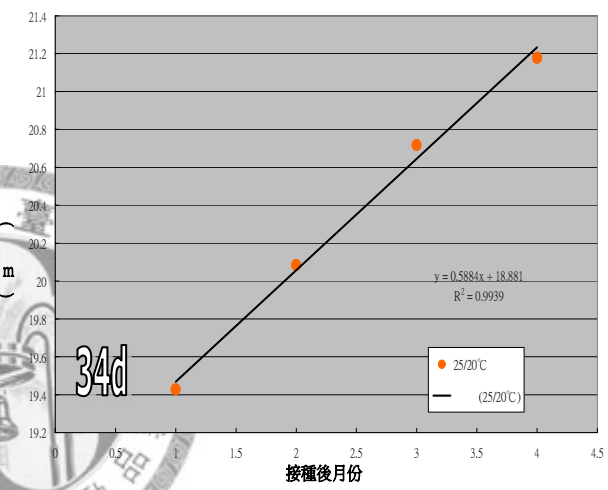
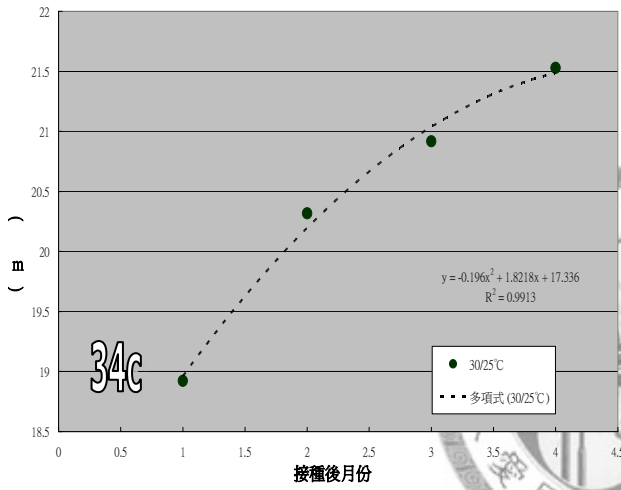
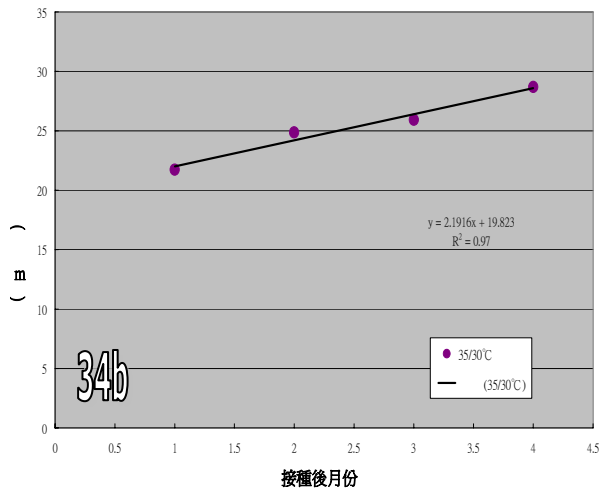
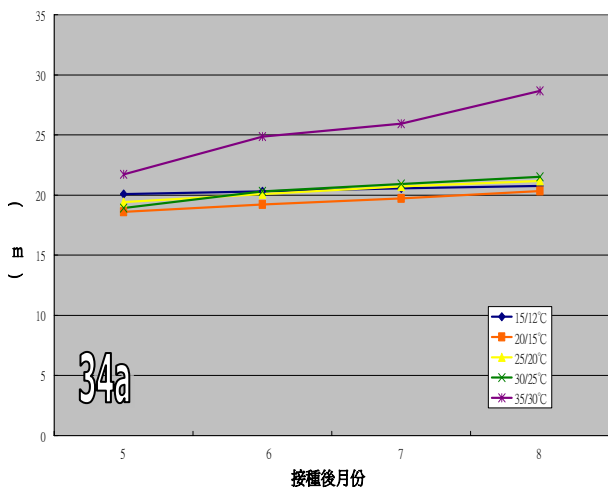


圖 34 a-f. 不同溫度下之苗高生長趨勢 (a) 及其直線迴歸關係 (b-f)

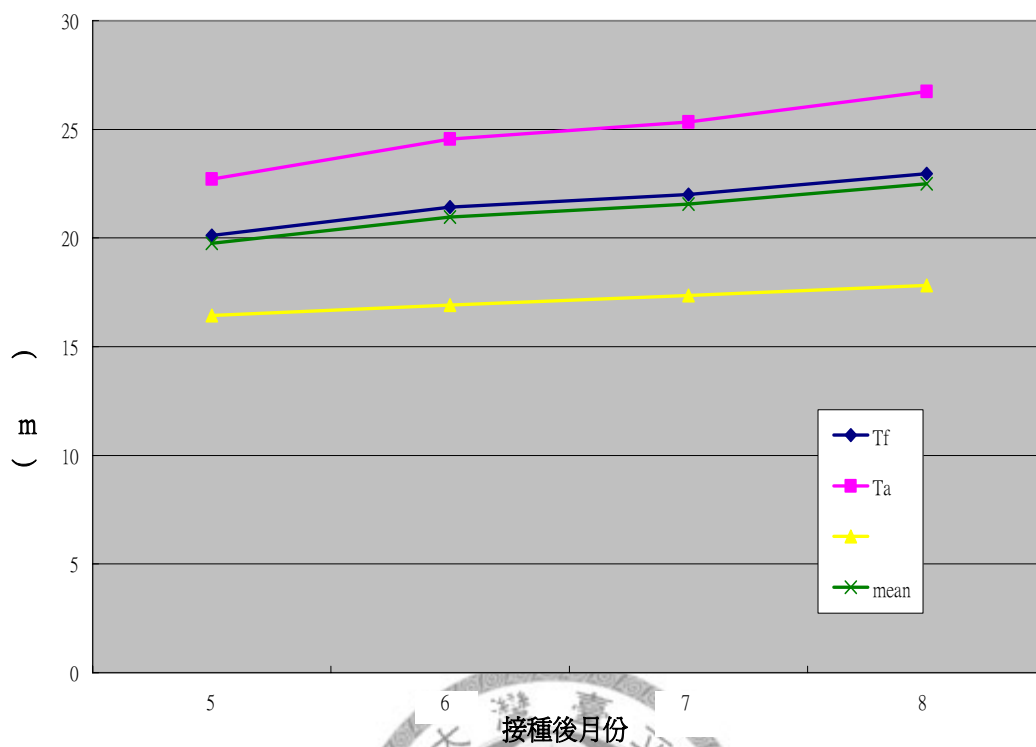


圖 35. 接種台灣塊菌、夏塊菌與未接種者苗高，在第 5~8 月份之生長趨勢

(4) 溫度與兩種塊菌接種對苗木根頸之影響

從表 9 中比較同一溫度下，兩種菌種、未接種間之差異，可發現自第 3~8 個月間，兩種接種間之差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，但有接種塊菌者與未接種間則互呈顯著差異 ($P < 0.05$)。再比較同一菌種處理下，五種溫度間之差異後，發現各連續月份之苗木根頸值，在第 3~8 個月間，都是以 15/12°C 為最差，且與其他四種溫度組合間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

為了瞭解不同溫度與兩種接種、未接種處理對苗木根頸之生長趨勢，將兩種接種、未接種之平均值，計算出五種溫度組之苗木根頸值如圖 36；並將五種溫度組的平均值，計算出兩種接種、未接種之苗木根頸值如圖 37。由圖 36 可發現，各連續月份之苗木根頸，是以 25/20°C 最佳，35/30°C、30/25°C 與 20/15°C 等次之，但四者之間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 則最差。由圖 37 則可知，各連續月份之苗木根頸，都是以台灣塊菌最佳，夏塊菌次之，兩種接種間之差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，未接種處理者最差，與有接種處理者互呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

根據各連續月份以不同溫度下之苗木根頸(圖 36)，所繪製成的生長趨勢圖(圖 38 a)，發現不同溫度下之苗木根頸，於各溫度間之大小趨勢為 $25/20^\circ\text{C} \geq 35/30^\circ\text{C} \geq 20/15^\circ\text{C} \geq 30/25^\circ\text{C} > 15/12^\circ\text{C}$ ；再將苗木根頸值，於不同溫度組合下，以多項式迴歸分析後，可以得知在各溫度間，有其各自的迴歸線。在 35/30°C 溫度組下，苗木根頸與時間之間，直線迴歸式之相關方程式為 $y = 0.0828x + 3.0137$ ， $r^2 = 0.9851$ ，經變方分析結果差異顯著 (F 值為 265.23，P 值則為 0.0001)，兩者呈一次曲線迴歸關係 (圖 38 b)；在 30/25°C 溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y = 0.0667x + 2.8556$ ， $r^2 = 0.9921$ ，經變方分析結果差異顯著 (F 值為 504.00，P 值則為 0.0001)，兩者呈一次曲線迴歸關係 (圖 38 c)；在 25/20°C 溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y = 0.0324x + 3.2571$ ， $r^2 = 0.963$ ，變方分析結果差異顯著 (F 值為 569.18，P 值則為 0.0001)，兩者呈一次曲線迴歸關係 (圖 38 d)；在 20/15°C 溫度組下，直線迴歸式之相關方程式為 $y = 0.0375x + 3.0393$ ， $r^2 = 0.9904$ ，變方分

析結果差異顯著 (F 值為 414.61, P 值則為 0.0001), 兩者呈一次曲線迴歸關係 (圖 38 e); 在 15/12°C 溫度組下, 直線迴歸式之相關方程式為 $y=0.0384x+1.5156$, $r^2=0.9936$, 變方分析結果差異顯著 (F 值為 623.02, P 值則為 0.0001), 兩者呈一次曲線迴歸關係 (圖 38 f); 以上直線迴歸式之 y =苗木根頸(%), x =時間(月份), r^2 =相關係數。以各連續月份之兩菌種間苗木根頸值 (圖 37), 所繪製成的生長趨勢圖 (圖 39), 則發現趨勢為接種台灣塊菌之苗木根頸 \geq 接種夏塊菌之苗木根頸 $>$ 未接種之苗木根頸。

表 9. 不同溫度處理與不同菌種對苗木根頸在接種後各月份的顯著性分析(P<0.05)

接種 後月份	處理 菌種	35/30°C	30/25°C	25/20°C	20/15°C	15/12°C
3	T.f	3.500Aa	3.650Aa	3.717Aa	3.150Aa	1.800Ba
	T.a	2.983Aa	2.983Aa	3.733Aa	3.233Aa	1.850Ba
	Ck	2.783Ab	2.117Ab	2.467Ab	2.850Ab	1.017Bb
4	T.f	3.550Aa	3.750Aa	3.717Aa	3.217Aa	1.850Ba
	T.a	3.150Aa	3.083Aa	3.750Aa	3.300Aa	1.883Ba
	Ck	2.867Ab	2.183Ab	2.483Ab	2.850Ab	1.033Bb
5	T.f	3.633Aa	3.767Aa	3.750Aa	3.233Aa	1.883Ba
	T.a	3.233Aa	3.150Aa	3.783Aa	3.317Aa	1.933Ba
	Ck	2.950Ab	2.200Ab	2.484Ab	2.867Ab	1.067Bb
6	T.f	3.720Aa	3.817Aa	3.783Aa	3.300Aa	1.933Ba
	T.a	3.367Aa	3.317Aa	3.850Aa	3.367Aa	1.983Ba
	Ck	2.980Ab	2.250Ab	2.500Ab	2.900Ab	1.100Bb
7	T.f	3.833Aa	3.933Aa	3.833Aa	3.350Aa	1.983Ba
	T.a	3.400Aa	3.367Aa	3.917Aa	3.417Aa	2.033Ba
	Ck	3.000Ab	2.267Ab	2.617Ab	2.917Ab	1.133Bb
8	T.f	3.967Aa	4.000Aa	3.867Aa	3.383Aa	2.017Ba
	T.a	3.483Aa	3.417Aa	3.967Aa	3.483Aa	2.067Ba
	Ck	3.117Ab	2.350Ab	2.550Ab	2.933Ab	1.133Bb

*小寫英文字母不同代表同一溫度下, 兩種菌種、未接種間之顯著差異 (P<0.05), 大寫英文字母不同代表同一菌種及未接種下, 五種溫度間之顯著差異 (P<0.05)。

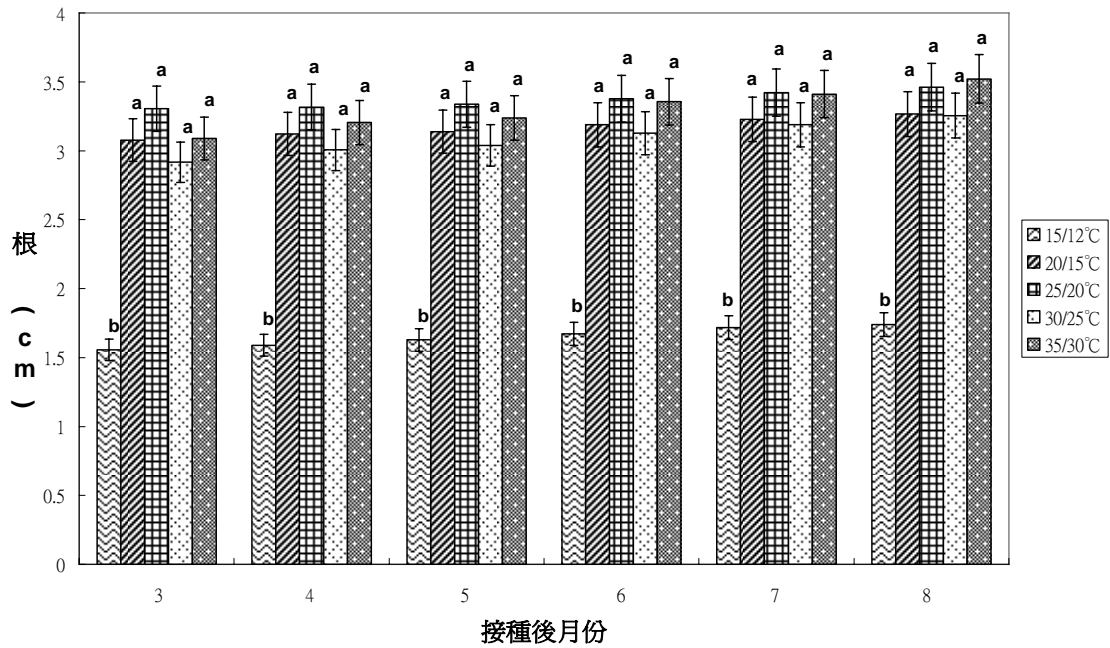


圖 36. 各連續月份之苗木根頸在不同溫度處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異 ($P < 0.05$)，五種溫度組之苗木根頸數值，為兩種接種與未接種之平均值

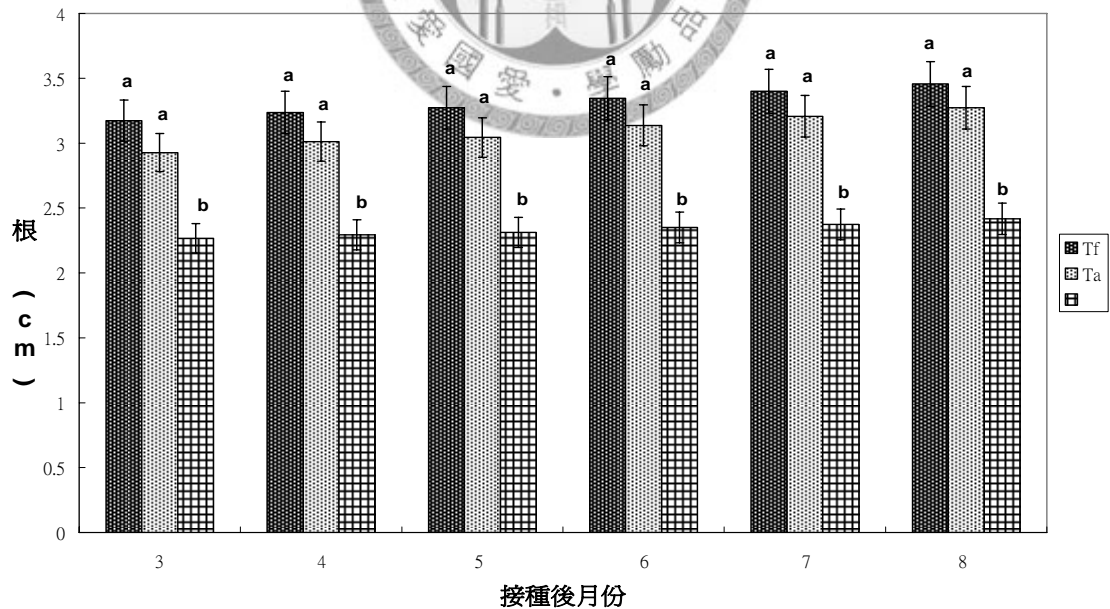


圖 37. 各連續月份之苗木根頸在不同菌種處理下之柱狀圖，I 為標準誤差，小寫英文字母不同為顯著差異 ($P < 0.05$)，兩塊接種與未接種的苗木根頸數值，為五種溫度組的平均值

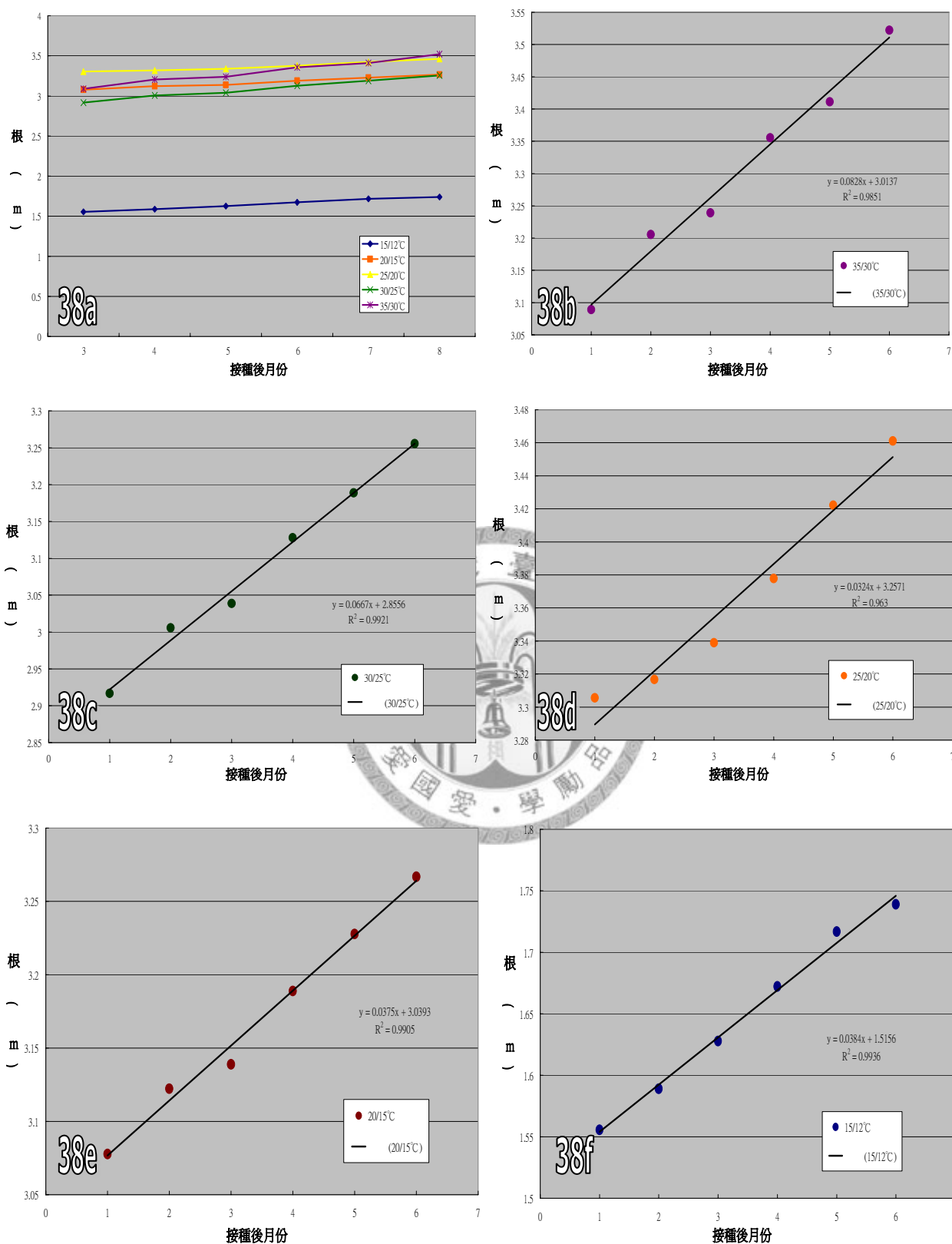


圖 38 a-f. 不同溫度下之苗木根頸生長趨勢 (a) 及其直線迴歸關係 (b-f)

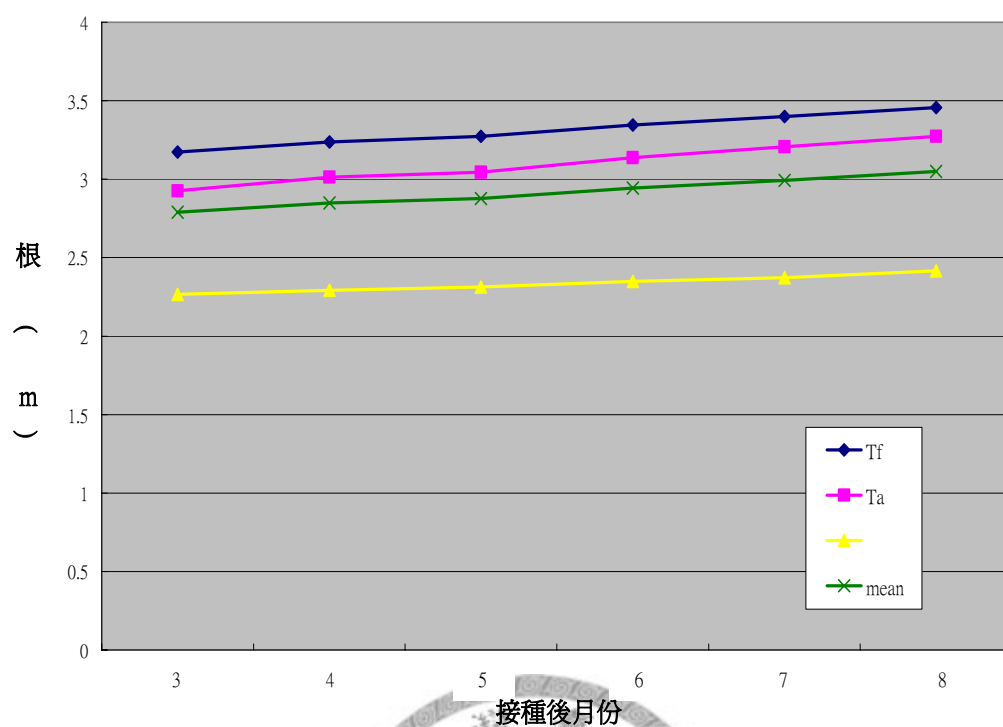


圖 39. 不同菌種對苗木根頭與接種月份間之變化趨勢



(5) 溫度與兩種塊菌接種對苗木葉片養分濃度之影響

從表 10 觀察可知，比較同一溫度下，兩種菌種、未接種間之差異後，可以發現在全碳 (C) 濃度方面，除了 20/15°C 者外，為兩種接種與未接種間呈現顯著差異 ($P < 0.05$) 外，其餘溫度組均呈現差異不顯著 ($P > 0.05$)；全氮 (N) 濃度中，所有溫度組中，均為三種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)；鉀濃度方面，所有溫度組中，均呈現兩種有接種處理間之差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，但與未接種者則呈顯著差異 ($P < 0.05$)；鈣濃度方面，則在 35/30°C 與 30/25°C 中，三種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，但在 25/20°C、20/15°C 與 15/12°C 中，為兩種有接種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，但與未接種者則呈顯著差異 ($P < 0.05$)；鎂濃度方面，則為 35/30°C、25/20°C 與 20/15°C 中，三種處理間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，但在 30/25°C 與 15/12°C 中，為兩種有接種處理者差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，與未接種者則呈顯著差異 ($P < 0.05$)；鈉濃度方面，則是兩種接種與未接種處理，三者間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)；就磷濃度言，在 35/30°C 與 30/25°C 中，以接種台灣塊菌者最高，接種夏塊菌者次之，未接種者最低，三者間互呈顯著差異 ($P < 0.05$)，在 25/20°C、20/15°C 與 15/12°C 中，則為兩種有接種處理間之差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，但與未接種間則呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

再比較同一菌種處理下，五種溫度間之差異後，發現收穫時之苗木葉片養分濃度值，在全碳濃度方面，台灣塊菌接種中，五種溫度組間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，夏塊菌之中，以 35/30°C 最高，30/25°C 與 25/20°C 次之，但三者間差異互呈不顯著 ($P > 0.05$)，20/15°C 與 15/12°C 則最低，兩者間差異亦呈不顯著 ($P > 0.05$)，未接種方面，以 35/30°C 最高，30/25°C、20/15°C 與 15/12°C 次之，三者間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，25/20°C 為最低；全氮濃度方面，台灣塊菌與未接種處理者，都是 35/30°C 最高，與其他溫度組間呈顯著差異 ($P < 0.05$)，夏塊菌處理者，以 35/30°C 與 30/25°C 最高，兩者間差異呈不顯著 ($P > 0.05$)，25/20°C、20/15°C 與 15/12°C 最低，三者間之差異呈不顯著 ($P > 0.05$)；鉀濃度方面，三種處理均以 35/30°C 者為

最高，30/25°C者次之，兩者間互呈顯著差異($P < 0.05$)，25/20°C、20/15°C與15/12°C最低，三者間差異互呈不顯著($P > 0.05$)；鈣濃度方面，接種台灣塊菌者，以15/12°C為最低，且與其他溫度組間呈顯著差異($P < 0.05$)，夏塊菌與未接種者，35/30°C與30/25°C最高，兩者間差異呈不顯著($P > 0.05$)，25/20°C次之，20/15°C與15/12°C最低，此二者差異亦互呈不顯著($P > 0.05$)；鎂濃度方面，台灣塊菌與夏塊菌處理中，都是以35/30°C與30/25°C最高，兩溫度組合間差異不顯著($P > 0.05$)，25/20°C、20/15°C與15/12°C較低，此三種溫度組合間之差異亦呈不顯著($P > 0.05$)，未接種處理者，亦以35/30°C者最高，30/25°C、25/20°C與20/15°C次之，然此三種溫度組合間差異呈不顯著($P > 0.05$)，15/12°C溫度組則最低；鈉濃度方面，接種台灣塊菌者，以在35/30°C與30/25°C時最高，惟兩溫度組合間差異不顯著($P > 0.05$)，25/20°C、20/15°C與15/12°C較低，此三種溫度組合間之差異呈不顯著($P > 0.05$)，接種夏塊菌者，以在35/30°C時最高，30/25°C與15/12°C次之，兩溫度組合間差異不顯著($P > 0.05$)，25/20°C與20/15°C最低，兩溫度組合間之差異亦呈不顯著($P > 0.05$)，未接種者以在35/30°C時最高，30/25°C次之，兩者間互呈顯著差異($P < 0.05$)，25/20°C、20/15°C與15/12°C最低，三者間之差異互呈不顯著($P > 0.05$)；磷濃度方面，在台灣塊菌與未接種處理者，都是在35/30°C與30/25°C時最高，兩者間差異呈不顯著($P > 0.05$)，15/12°C次之，但35/30°C、30/25°C與15/12°C間之差異呈不顯著($P > 0.05$)，25/20°C與20/15°C最低，兩者間差異呈不顯著($P > 0.05$)，在夏塊菌方面，也是以35/30°C時最高，15/12°C次之，但兩者間之差異呈不顯著($P > 0.05$)，30/25°C、25/20°C與20/15°C較低，然此三者間差異亦呈不顯著($P > 0.05$)。

表 10. 不同溫度處理與不同菌種對苗木葉片養分濃度在接種 8 個月後的顯著性分析 (P<0.05)

接種 後月份	處理 菌種	35/30°C	30/25°C	25/20°C	20/15°C	15/12°C
C	T.f	45.995Aa	45.653Aa	45.196Aa	45.186Aa	45.056Aa
	T.a	46.851Aa	46.000Aa	45.200Aa	44.605Ba	44.901Ba
	Ck	46.258Aa	44.705Bb	43.828Cb	44.010Ba	44.543Ba
N	T.f	1.101Aa	0.943Ba	0.863Ba	0.891Ba	0.899Ba
	T.a	1.269Aa	1.011Aa	0.880Ba	0.903Ba	0.890Ba
	Ck	1.221Aa	0.872Ba	0.853Ba	0.728Bb	0.797Ba
K	T.f	0.862Aa	0.677Ba	0.489Ca	0.440Ca	0.441Ca
	T.a	0.793Aa	0.610Ba	0.524Ca	0.436Ca	0.456Ca
	Ck	0.718Ab	0.527Bb	0.414Cb	0.333Cb	0.393Cb
Ca	T.f	0.555Aa	0.535Aa	0.524Aa	0.524Aa	0.426Ba
	T.a	0.611Aa	0.648Aa	0.514Ba	0.419Ca	0.413Ca
	Ck	0.636Aa	0.594Aa	0.412Bb	0.351Cb	0.378Cb
Mg	T.f	0.381Aa	0.374Aa	0.313Ba	0.318Ba	0.327Ba
	T.a	0.394Aa	0.370Aa	0.312Ba	0.312Ba	0.315Ba
	Ck	0.370Aa	0.336Bb	0.310Ba	0.303Ba	0.291Cb
Na	T.f	0.041Aa	0.041Aa	0.035Ba	0.037Ba	0.036Ba
	T.a	0.043Aa	0.037Ba	0.034Ca	0.032Ca	0.035Ba
	Ck	0.044Aa	0.036Ba	0.033Ca	0.031Ca	0.030Ca
P	T.f	0.353Aa	0.300Aa	0.242Ba	0.242Ba	0.282ABa
	T.a	0.281Ab	0.238Bb	0.226Ba	0.232Ba	0.264ABa
	Ck	0.128Ac	0.127Ac	0.115Bb	0.117Bb	0.163ABb

*小寫英文字母不同代表同一溫度下，兩種菌種、未接種間之顯著差異 (P<0.05)，

大寫英文字母不同代表同一菌種及未接種下，五種溫度間之顯著差異 (P<0.05)。

(6) 不同溫度處理、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分間之相關性與變異分析

將溫度、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分之間進行皮爾森相關分析後結果如表 11。表中之相關係數為達到顯著水準之結果 ($P < 0.05$)，呈負相關，未達顯著關係水準者則無數值之顯示。結果顯示在不同溫度處理下，溫度越高則菌根感染率越低 ($r = -0.57$)，二者間呈負相關。溫度與苗高 ($r = 0.52$)、根頸 ($r = 0.54$)、碳 ($r = 0.69$)、氮 ($r = 0.43$)、鉀 ($r = 0.51$)、鈣 ($r = 0.47$) 與鈉 ($r = 0.55$) 等，均呈顯著正相關 ($P < 0.05$)，這顯示較高的溫度會使苗高與根頸生長較佳，且葉部之碳、氮、鉀、鈣、鈉等養分濃度亦較高。菌根感染率方面，與苗高 ($r = 0.49$)、根頸 ($r = 0.47$)、葉部之鉀 ($r = 0.42$) 與磷 ($r = 0.67$) 濃度，呈現顯著正相關 ($P < 0.05$)，這顯示菌根感染率越高，苗高與根頸之生長狀況越佳，葉部之鉀與磷濃度亦越高。此外，苗木苗高與根頸間 ($r = 0.51$)，亦呈現顯著正相關 ($P < 0.05$)。苗高與葉部之氮 ($r = 0.71$)、鉀 ($r = 0.46$)、磷 ($r = 0.42$) 濃度等，呈現顯著正相關 ($P < 0.05$)，惟與鈣則呈負相關 ($r = -0.50$)。根頸與葉部之氮 ($r = 0.62$)、鉀 ($r = 0.47$)、磷 ($r = 0.47$) 濃度等，呈現顯著正相關 ($P < 0.05$)，與鈣 ($r = -0.52$)、鎂 ($r = -0.49$) 則為負相關。葉部各養分之間，則有氮與鉀 ($r = 0.65$)，氮與鎂 ($r = 0.40$)，氮與磷 ($r = 0.67$) 等呈顯著正相關 ($P < 0.05$)，在氮與鈣 ($r = -0.48$)，鉀與鈣 ($r = -0.54$)，鉀與鎂 ($r = -0.43$) 之間，則是呈顯著負相關。

觀察變異數分析結果發現，表 12 為青剛櫟苗木接種塊菌後第 3~8 個月間，菌種、溫度對菌根感染率、苗高、根頸之變異數分析與交感作用，在觀察期間青剛櫟之菌根感染率，於菌種處理間呈顯著差異，惟溫度處理間，除第 4 個月為顯著差異外，其餘月份均為無差異，交感作用間則呈現顯著差異。苗高方面，於菌種處理間皆呈極顯著差異，溫度處理於接種後第 5 個月時無差異，但第 6~8 個月間則呈極顯著差異，交感作用則於觀察期間皆呈不顯著。根頸方面，在菌種處理間與溫度處理間，於觀察期間皆呈極顯著差異，交感作用間則呈顯著差異。

表 11. 不同溫度處理、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分間之相關性

	溫度	感染率	苗高	根頸	C	N	K	Ca	Mg	Na	P
溫度	1.00										
感染率	-0.57*	1.00									
苗高	0.52*	0.49*	1.00								
根頸	0.54*	0.47*	0.51*	1.00							
C	0.69*	—	—	—	1.00						
N	0.43*	—	0.71*	0.62*	—	1.00					
K	0.51*	0.42*	0.46*	0.44*	—	0.65*	1.00				
Ca	0.47*	—	-0.50*	-0.52*	—	-0.48*	-0.54*	1.00			
Mg	—	—	—	-0.49*	—	0.40*	-0.43*	—	1.00		
Na	0.55*	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	
P	—	0.67*	0.42*	0.47*	—	0.67*	—	—	—	—	1.00

*表示 0.05 顯著水準

表 12. 菌種、溫度對菌根感染率、苗高、根頸之變異數分析與交感效應

月 份	3		4		5		6		7		8	
變異來源	F	Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr
感 菌種	80.14	0.0005	55.77	0.0009	110.15	0.0002	120.56	0.0002	195.58	<0.0001	86.37	0.0004
染 溫度	3.67	0.1277	7.88	0.0484	3.19	0.1488	2.53	0.1868	0.12	0.7496	0.50	0.5168
率 交感效應	3.68	0.0240	2.76	0.0346	3.31	0.0251	3.22	0.0269	2.99	0.0281	2.87	0.0331
苗 菌種	—	—	—	—	23.05	<0.0001	34.86	<0.0001	34.73	<0.0001	37.90	<0.0001
高 溫度	—	—	—	—	2.15	0.0828	7.07	<0.0001	7.99	<0.0001	13.77	<0.0001
交感效應	—	—	—	—	0.92	0.5057	1.45	0.1889	1.17	0.3299	1.66	0.1214
根 菌種	23.79	<0.0001	28.18	<0.0001	30.16	<0.0001	34.46	<0.0001	37.77	<0.0001	40.03	<0.0001
頸 溫度	32.12	<0.0001	35.36	<0.0001	36.01	<0.0001	38.74	<0.0001	39.62	<0.0001	42.87	<0.0001
交感效應	2.39	0.0235	2.12	0.0440	2.38	0.0244	2.34	0.0265	2.39	0.0237	2.33	0.0270

四、討論

(一) 青剛櫟苗木與兩種塊菌之半無菌合成

本研究主要是探討溫度對於塊菌在形成菌根、苗木生長與養分濃度等之影響。在前一章節的試驗中，是分析台灣兩種固有塊菌與世界其他地區塊菌之親緣關係，因台灣目前僅有發現兩種塊菌，故以台灣塊菌及屑塊菌為材料作分析；然而在溫度試驗方面，是使用夏塊菌為接種源，未選擇屑塊菌之原因有二，第一為屑塊菌所採集到的樣本數量，不足以製作出孢子數量夠的孢子懸浮液，且該菌種目前未成功分離出菌絲體；第二則為選用兩種不同生產季節（夏季—夏塊菌、冬季—台灣塊菌）之塊菌為接種源，除希能觀察出較高的溫度是否適宜夏塊菌，反之較低溫度則是否適宜台灣塊菌外，還期望找出最適宜菌根菌生長、感染與化育的溫度組合，作為日後大量栽培菌根苗之依據。

試驗首先以夏塊菌與台灣塊菌之新鮮子實體，製成孢子懸浮液後，接種至青剛櫟苗木，並將苗木分別置於 35/30°C、30/25°C、25/20°C、20/15°C、15/12°C 等，五種不同日、夜溫度組合之人工氣候室內培養，結果發現兩種塊菌在五種溫度組合下，均能形成典型之塊菌菌根。此外，雖然夏塊菌與台灣塊菌已成功分離出菌絲體培養，但是因為孢子接種源具有（1）製作方法簡單且省時；（2）不受限於無菌狀態，即半無菌（semi-aseptic）狀態即可進行試驗（胡弘道，1990；陳珈后，2003）；（3）具有一定數量之孢子供接種，即可大量且成功的接種形成菌根；（4）具有儲藏性質，但需保有 13~15% 以上的含水率（Pera *et al.*, 1996）等多項優點，因此為了能夠快速且大量接種苗木，並使菌根感染率達一定程度，本試驗選擇以孢子懸浮液作為接種源。

過去有相當多塊菌的接種研究（Comandini and Pacioni, 1997；Fontana and Palenzona, 1979；Giovannetti and Fontana, 1982；Pinkas *et al.*, 2000；胡炳福等，2006；陳波濤，2003；陳應龍，2001），都是使用孢子懸浮液為接種源，結果都具有相當高的接種率並成功合成塊菌菌根，陳波濤（2003）即指出，他們的試驗中以台灣

塊菌及印度塊菌子實體所作成的孢子懸浮液接種源，接種槲櫟 (*Quercus aliena*)、青剛櫟、小葉青剛 (*Cyclobalanopsis myrsinalefolia*)、雲山青剛 (*Cyclobalanopsis nubium*) 以及雲南松 (*Pinus yunnanensis*)，結果顯示，殼斗科的樹種，接種成功率都在 90% 以上，有些樹種如青剛櫟、槲櫟等，更可以高達 95% 以上，而松科如雲南松的接種成功率，也可以達到 80% 以上的水準，這樣的接種成功率，與本試驗中使用台灣塊菌及夏塊菌之孢子懸浮液為接種源，所得到的接種成功率相同。但是，孢子懸浮液接種源也有若干缺點，例如：須購買或採集塊菌子實體，因此成本較大，並有消耗天然塊菌來源之虞，而子實體內有時會有其他非目標菌種污染，因而有不易控制的情形；此外，目的塊菌菌種，需配合生產季節才能獲得來源等因素，故仍有培養塊菌菌絲體為接種源之必要。

有些學者為了克服孢子懸浮液接種源所衍生之缺失，因此利用已有塊菌分布的林地土壤，作為培養苗木之天然接種源及介質，這是利用土壤中已含有塊菌孢子、菌絲等，在苗木根系發育時，孢子發芽或菌絲侵染根系，以達到接種菌根菌之效果，但因試驗數據及結果仍未充分，故尚待更進一步試驗驗證 (胡炳福等，2006)；其他，則有利用孢子懸浮液為接種源成功合成菌根後，將感染良好的菌根苗木作為母植物 (mother plant)，與其他未接種的苗木栽植在一起，使未接種的苗木受到感染，惟此一方式在需要大面積栽種或是有大量菌根苗木之需求時，會受到相當程度的限制 (Zuccherelli *et al.*, 1994)。

夏塊菌與青剛櫟之菌根合成試驗方面，胡弘道 (1987) 以夏塊菌之孢子懸浮液接種狹葉櫟 (*Quercus stenophylloides* Hay.) 後，成功的形成金黃色之單根狀、表面有剛毛的塊菌菌根。許桂蓮 (2007) 以夏塊菌之孢子懸浮液接種青剛櫟，結果發現菌根尖端或表面，具有稀疏纖毛或羊毛狀之菌絲，更進一步觀察菌根的顏色變化，由幼至老呈淡黃色轉變為黃褐色至深褐色。這樣的菌根外部形態，與本試驗所觀察到的形態結果一致。

在台灣塊菌與青剛櫟之菌根合成試驗方面，Hu (1992) 使用台灣塊菌孢子懸

浮液接種青剛櫟，結果形成了表面具有明顯金黃色剛毛之塊菌菌根。黃鏡諺(2002)以採集自台灣大學實驗林和社營林區青剛櫟造林地內之台灣塊菌子實體，在製成孢子懸浮液後，接種至青剛櫟苗木之側根系，觀察所形成的菌根發現，菌根多數為單根狀，菌根表面平坦或具有豐富剛毛，菌根顏色在幼期為淺黃色或淡黃色，成熟期為金黃色，老化期為黃褐色至深褐色。而上述兩篇研究之外部形態特徵結果，皆與本試驗所觀察的結果相同。

以立體顯微鏡觀察在五種組合的溫度下，兩種塊菌所形成之菌根外部形態，可以發現無論是台灣塊菌或夏塊菌，均無法以菌根的顏色、菌毯表面結構或是剛毛等特徵，來區分不同溫度間的差異。本試驗所觀察到的台灣塊菌菌根形態特徵，在各溫度組合下，主要都是呈單根狀或不規則羽狀，菌根長度約 550~2800 μm ，主軸直徑則約 170~250 μm ，初期菌根呈現淺黃色或淡黃色，成熟期時菌根表面具有明顯之剛毛，顏色為黃褐、褐或咖啡色，老化時期顏色為深褐色或灰黑色，而在成熟期十分明顯之剛毛逐漸變為稀疏、變薄、消失。此外，在夏塊菌之形態特徵方面，各溫度組合下生長的菌根，主要是呈現單根狀，菌根形成初期呈淡黃色，菌根長度約 600~2700 μm ，主軸直徑則約 90~300 μm ；成熟期有非常明顯之剛毛，或呈羊毛狀之菌絲，分佈於菌根頂端或前半部，菌根顏色呈現黃褐或咖啡色，老化期的菌根，剛毛變稀疏，甚至消失，顏色為深褐色、琥珀色或黑色。因此，吾人推斷，若單純以立體顯微鏡之角度，來觀察菌根表面形態特徵，僅能提供鑑定是否形成典型塊菌菌根，無法詳細比較溫度或其他環境因子等，對於菌根形態特徵與生長結構差異之影響，故必須進一步的使用掃瞄電子顯微鏡或穿透電子顯微鏡等，進行外生菌根內部組織等超微細結構之觀察，才能將不同環境因子所造成的差異，詳加描述並供作比較之依據。

過去有許多研究，將塊菌的生長時期分成三個時期，分別為幼年期、成熟期以及老化期，菌種則有台灣塊菌、印度塊菌(黃鏡諺, 2002)、偽孔塊菌(陳珈后, 2003)、義大利白塊菌(陳怡君, 2004)、中果塊菌(高嘉鴻, 2005)與夏塊菌(許

桂蓮，2007) 等。綜合比較上述五種塊菌菌種後，可以發現菌根在三個時期的區別，主要是以菌根的顏色來判斷，多數菌根在幼年期為淡黃或淺黃色，到成熟期則呈典型金黃色或黃褐色菌根，老化期則為深褐色或黑褐色；其次是以剛毛的有無作為區分的特徵，一般在菌根形成初期多已有剛毛的形成，在進入成熟期時，剛毛數量及密度達最高峰，之後進入老化期則變稀疏，甚至消失；此外，菌根表面也會從幼年、成熟期時的平坦，轉變到老化期呈現皺縮、乾枯狀。本試驗在不同溫度下形成的台灣塊菌、夏塊菌菌根，也與前述幾篇研究相同，可以分成三個時期，且在菌根顏色，以及菌根表面剛毛等形態特徵上，也與上述幾篇研究結果一致。

以掃描電子顯微鏡觀察台灣塊菌菌根結果發現，菌根外部有延伸菌絲的存在，菌毯表面菌絲呈現平坦狀，菌毯的表面結構，在不同溫度下，形態並未有顯著之差異；哈替氏網延伸菌絲侵入至第二層皮層細胞間，皮層細胞內有澱粉粒及胞內菌絲的發現，這些超微細特徵與黃鏡諺（2002）的研究結果一致。在夏塊菌方面，則發現菌根外部亦有延伸菌絲，菌毯表面的菌絲有小突起；哈替氏網延伸菌絲侵入至第二層皮層細胞間，皮層細胞內有澱粉粒及胞內菌絲的發現，這樣的微細結構觀察結果，則是與陳娟等（2005）及許桂蓮（2007）等的觀察結果一致。此外，夏塊菌的菌毯表面菌絲，具有菌絲囊與菌絲融合等現象，在陳應龍（2002）觀察黑孢塊菌、陳怡君（2004）觀察義大利白塊菌、高嘉鴻（2005）觀察中果塊菌與許桂蓮（2007）觀察夏塊菌等研究中，也都有發現囊狀體或蔥形菌絲等特徵，只是形狀上與菌絲膨大的位置略有不同，多數位於菌絲頂端，但也有觀察到膨大位置在菌絲中央者；惟僅有在許桂蓮（2007）的研究，同樣是觀察夏塊菌的菌根特徵，才有發現菌絲融合之現象。

若再進一步比較於五種不同溫度中生長的台灣塊菌菌根，則可以發現，35/30°C 以及 30/25°C 溫度下生長之菌根，菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，其皮層細胞內，均有較明顯的胞內菌絲構造，澱粉粒累積的現象亦較常發現，但是 25/20°C

以下的溫度所觀察結果，雖仍有胞內菌絲及澱粉粒的發現，惟發現頻率較高溫組合低，在夏塊菌的菌根觀察中，也有相同的情況。胞內菌絲出現之多寡，推測與逆境有關，通常菌絲侵入植物根系細胞，主要通道有兩種，一種是根系本身天然裂縫，另一種則是真菌本身會產生分解酵素 (digestive enzyme)，會使根系產生孔道，以利真菌侵入 (Warrington *et al.*, 1981)，而菌絲穿入的意義類似於外內生菌根，且具有某些寄生或病害的關係，Plattner 與 Hall (1995) 的研究中，即指出黑孢塊菌在非宿主植物中，會有寄生的情形。許多研究 (Duddridge and Read, 1984; Tam, 1994; Wang *et al.*, 1997) 並指出，菌絲穿入或聚集在皮層細胞中，主要是因為宿主植物受到逆境 (如太高的溫度、葡萄糖濃度、極端 pH 值與植物根系老化等因素) 的影響，而此部份之論述，或許可以解釋在本試驗中，高溫度下培養的菌根，會有較多的胞內菌絲聚集之現象。此外，先前有研究 (黃鏡諺, 2002) 指出，胞內菌絲的存在，是因為半無菌合成試驗中，根系會有其他非目標菌種侵入之可能，故除了進一步針對胞內菌絲之特徵，與菌根外部之菌絲特徵作詳細比對外，亦可使用 PCR 分子生物技術，檢測胞內菌絲之 DNA 序列是否符合目標菌種之序列，方可確認胞內菌絲是塊菌菌根之特徵。惟如何避免在抽取胞內菌絲之 DNA 時，同時抽取到菌根之 DNA，使 PCR 反應產生錯誤訊息，仍有待進一步之試驗來克服。澱粉粒在不同溫度中，也是呈現高溫度比低溫度處理多的情形，胡弘道 (1996) 指出，澱粉粒的分布與頻度，可以得知此類菌根型在宿主上之活力，若在哈替氏網周圍或鄰近的皮層細胞中，所發現的澱粉粒較少，顯示其有較高的代謝活動與活性，而在較低溫度中所觀察到的澱粉粒較少，即表示塊菌在較低溫下有著較佳的代謝活動與活性，俾可供應宿主較多的碳水化合物或其他養分元素。

(二) 溫度對青剛櫟苗木菌根形成、生長與葉片養分之影響

至目前為止，針對溫度對菌根菌影響之研究，多僅於研究溫度對於已分離成功的菌絲體，在純培養狀態下之直徑、乾重等生長之影響，尚未有進行溫度對接種後形成菌根與苗木生長之影響作評估的相關報告。因此，本研究即觀察溫度對

菌根感染率、形態、苗木生長與葉部養分元素之影響。本試驗為控制影響菌根感染及苗木生長之因素，首先針對培養介質作調配，胡弘道與翁倩玉（1997）的研究指出，利用台灣二葉松接種松茸形成菌根後，將其培養在泥炭土與蛭石混合介質與高山土壤兩種介質中，結果顯示人工介質較適合菌根發育與形成；此外，陳怡君（2004）表示，在不同 pH 值的介質中培養已接種義大利白塊菌之青剛櫟苗木，結果整體平均菌根感染率以 pH 6.5 為最佳，由此可知控制培養介質因素，對於本試驗具有相當大之影響。因此本試驗中 90 株苗木之培養介質，都是以泥炭土與蛭石，經過自然風乾後，控制體積、重量比例（v：v=1：1；w：w=15：17），藉以固定介質的 pH 值（pH=5.9）後，再進行後續的苗木培養與菌根菌接種試驗。

除了介質種類、pH 值外，苗木的生長狀態及遺傳特性等因素，也都是影響菌根形成的因子，因此本試驗在最初種子採集時，至台北縣三芝鄉採集青剛櫟種子，使苗木種源皆出自於同一地區，俟苗木生長約 3 個月大小時，再選取外觀形態大小一致之幼苗 90 株，供作塊菌之宿主，惟 Mamoun 與 Olivier（1996）的研究指出，接種苗木若使用種子苗，則苗木本身的生理遺傳特性會較難以掌控，因此建議使用無性繁殖所培育之苗木較為適宜。

在接種後經過六個月的觀察，可以發現苗木在接種兩種塊菌後的 3~5 個月間，菌根感染率都呈顯著且持續性的增加，大約在 6~8 個月間則逐漸呈緩慢生長，其中有幾個溫度組合的菌根感染率，甚至在接種的第 8 個月時略呈下降；這樣的結果與陳怡君（2004）在觀察青剛櫟接種義大利白塊菌時，觀察其菌根感染率所得到的結果相同，該研究指出，在接種後的第 8 個月起，有些苗木的菌根感染率開始下降，而在第 9 個月下降更加明顯，有些處理感染率下降達 26.36%，惟研究中並未探討感染率下降之原因。Miranda 與 Harris（1994）的研究指出，菌根感染率的下降原因，主要為宿主植物體內磷含量增加，因而造成菌根感染率的下降。因此，吾人推測本試驗中，塊菌在快速菌落化並感染苗木根系後，因塊菌大量形成菌根並且提供宿主磷養份，致使感染率趨於平緩並下降。但菌根感染率的下降，

亦會受其他因子如菌根菌之遺傳特性、宿主植物本身之遺傳特性與其他養分元素交互影響等所影響，因此該觀點仍有待相關試驗作進一步的確認。

從各月份之不同溫度菌根感染動態圖（圖 29 a）中，可發現自接種後的第 3 個月到第 8 個月間，都是以 25/20°C 溫度組的菌根感染率最高，20/15°C 與 30/25°C 次之，15/12°C 再次之，35/30°C 的溫度組則最低。由此可知，菌根菌在與宿主形成共生關係後，適合於菌根菌形成菌根的溫度，與被分離出來的菌絲體之適合生長溫度大致相同。這是因為塊菌在和宿主植物的根系形成共生菌根時，會有許多延伸菌絲與放射狀菌絲生成，並會在宿主根系之間，進行繼續侵染與擴大生長的情形，之前有許多的研究（高嘉鴻，2005；許桂蓮，2007）即指出，溫度的高低會對菌絲之生長量上產生差異性，其中許桂蓮（2007）在觀察五種塊菌的菌絲體於不同溫度下培養之生長情形，指出所有塊菌在 25°C 時培養，菌絲生長量最大，在 20°C 時次之；此外，胡弘道等（2008a、2008b）的研究中，亦指出台灣塊菌、印度塊菌、法國塊菌、義大利白塊菌與擬凹孔塊菌等之菌絲體，最佳生長溫度均為 25°C 與 20°C。依據上述相關研究結果，對照本試驗菌根感染率的結果來看，台灣塊菌與夏塊菌之整體平均菌根感染率，都是以 25/20°C 的溫度組合下培養為最佳，由此可知溫度的高低，確實會影響宿主植物的菌根生成與菌根之感染率。此外，除了上述原因外，溫度會影響宿主植物根系分泌物的含量及成分，進而影響到根系與菌根菌間之新陳代謝與相互間的生長情形（Theodorou and Bowen, 1970）；而溫度高低會造成根系內碳水化合物產生變化，使根的延伸、根尖的形成受到影響（Anderson *et al.*, 1986），這些均是菌根菌之感染產生變化的原因。另一方面，亦有學者（Bowen, 1970；McInnes and Chilvers, 1994）主張，溫度對於植物根系的側根生長有著顯著之影響效益，側根較多自然有利於菌根菌之感染，反之則降低。這些研究結果都論證著溫度的高低，確實與菌根的感染、化育等關係密不可分。

許桂蓮（2007）的研究另外進行五種塊菌菌絲體的最高致死溫度試驗，結果指出，33°C 時擬凹孔塊菌、台灣塊菌、義大利白塊菌、印度塊菌都已停止生長，

僅有黑孢塊菌及冬塊菌有繼續生長之情形，當溫度升高至 35°C 時，則僅剩冬塊菌有生長情形，到 36°C 時則全部塊菌都停止生長；該研究後續並進行恢復生長試驗，結果發現多數菌種在 35°C 處理後，放回 20°C 培養 2 天後即有恢復生長之情形。以此結果對照本試驗 35/30°C 溫度組的菌根感染率，可以發現在這樣高溫狀態下，台灣塊菌及夏塊菌仍能與宿主形成菌根，且感染率亦持續增加，惟感染率水準較其他溫度處理低上許多。因此可知，35°C 的高溫仍非台灣塊菌與夏塊菌之致死溫度，但為何菌絲體在 35°C 下無法繼續生長，與宿主形成共生關係後，卻能在 35°C 下繼續保有其侵染、形成菌根之能力，這部份或許有待後續研究，使用分子生物檢測技術，比較菌根真菌在高溫與低溫下的分子狀態有何不同，方能作進一步之確認。此外，比較兩種塊菌菌種間的菌根感染率後發現，台灣塊菌平均感染率較夏塊菌略高，但兩者間差異呈不顯著，這應是因為宿主為同一樹種，且接種源間又為關係親近之同一屬菌種，因此會有感染水準相同的結果產生。

菌根菌的接種對於苗木生長之影響，大致上可以分成對於苗木之苗高、根頸、地上部乾重及地下部乾重等，接種菌根後對於不同部位的影響、效益等也都不盡相同。有些菌種對於苗木接種後的生長，其效益可能是整體性，即全部都有顯著增加，但也有些僅在苗高或根頸上與未接種者有顯著的差異（胡弘道等，1999；陳應龍，2002；Bà *et al.*, 1999；Giovannetti and Fontana, 1982；Sharpe and Marx, 1986）。在影響程度上，也不一定隨著菌根感染情形增加，進而使各部位之乾重或高度增加，即使是同屬的菌種，對幼苗的生長效益也不盡相同，但是多數而言，菌根的接種對於苗木生長仍是屬於有絕對助益的（Duñabeitia *et al.*, 2004）。

從本研究的苗高、根頸結果可以發現，三種處理對於青剛櫟苗木的高生長效益，大致上以接種夏塊菌者最高，接種台灣塊菌者次之，未接種處理者最低，且三者之間互呈顯著差異（ $P < 0.05$ ）；在苗木根頸生長效益方面，則以接種台灣塊菌者最高，接種夏塊菌者則次之，惟兩者間之差異呈不顯著（ $P > 0.05$ ），未接種者最低，與兩種接種處理間均呈顯著差異（ $P < 0.05$ ）。由此可知，有接種塊菌的青剛櫟

苗木，在苗木之兩種部位生長情形上，均明顯高於未接種之對照組。這樣的結果與胡炳福等(2006)使用榲欖、馬尾松(*Pinus massoniana*)與華山松(*Pinus armandii*)等三種苗木，在接種印度塊菌後，其苗高、根頸生長，均顯著高於對照組的結果相同。

在不同溫度處理對於苗高生長影響方面，可得知結果以 35/30°C 最高，且與其他溫度組呈顯著差異 ($P < 0.05$)，其他溫度組之間，則多呈差異不顯著 ($P > 0.05$) 的情形；其中 35/30°C 的溫度組，在高生長方面明顯高於其它溫度組，因此溫度的提高對於苗木在高生長方面，是有顯著助益的，這結果和許博行與張安璫 (2001) 的研究中，以不同溫度對樟樹生長效益之結果相同，該研究指出，在高溫度狀態下 (33°C) 與低溫度狀態下 (23°C)，比較苗木之苗高、地際直徑等生長，都是高溫度狀態下較佳，這顯示較高的溫度對苗木生長有促進作用。根頸生長方面，以 25/20°C、35/30°C、20/15°C 與 30/25°C 為最高，四者間近乎相同，互呈差異不顯著 ($P > 0.05$)，15/12°C 溫度下最低，與其他溫度組間呈顯著差異 ($P < 0.05$)。根據此結果發現，15/12°C 的低溫處理使苗木根頸生長呈停滯，這與 Domisch 等 (2002) 的研究中，使用歐洲赤松苗接種菌根的結果一致，該研究指出土壤溫度越高，苗木生長較佳，惟 Domisch 等 (2002) 的低溫控制在 5~9°C 之較低狀態，較本試驗之低溫低上許多。綜上所論，有限的提高溫度，對於苗木之生長似乎是有著較為正面的效益，有些學者 (Baker *et al.*, 1989; Sheu and Lin, 1999) 指出，高溫狀態下，苗木會有較高且較有效率的光合作用，進而促進苗木之苗高、根頸生長。但是植物仍有其適溫範圍，每一樹種之最適溫多少都有些不同，而且即使是同一樹種，也會因為其生育地環境不同而有所差異，此現象即為光合作用之最適溫度，與苗木生長之適合溫度息息相關 (Taiz and Zeiger, 1998)。

以 ICP 測得 90 株苗木之大量養分元素後，可以發現葉部每一養分元素含量，都是以 35/30°C 的溫度組合為最高，綜合各養分含量來看，呈現當溫度遞減時，養分含量亦有降低的趨勢。許多研究指出，當植物生長在較高的溫度條件時，植物

體內的養分濃度會比低溫狀態下高，在 Wanner (1948) 的研究中指出，大麥在 25°C 下生長時，其葉部養分濃度比 15°C 者高出許多；Shoulder 與 Ralston (1975) 則發現溼地松 (*Pinus elliottii*) 幼苗，在 22°C 下生長之葉部氮、磷、鈣等元素，比 16°C 時生長的幼苗，平均都增加大約 67~115% 的含量；Domisch 等 (2002) 的研究則指出，較高溫度下生長之歐洲赤松苗，其氮、磷、鈣等元素濃度，比低溫下生長的苗木高，尤其是在針葉部分最為明顯。因此，本試驗中高溫度組合之葉部養分元素，較低溫組合高的結果，可以得到論證。

在高溫度狀態下會有較高的養分濃度，影響因子有很多，其中主要與光合作用有關。Baker *et al.* (1989) 及 Sheu 與 Lin (1999) 等研究中都指出，高溫狀態下，苗木會有較高且較有效的光合作用，因此所產生之養分濃度較低溫狀態者高。此外，Domisch *et al.* (2001) 的研究則指出，高土壤溫度會使植物之根系生物量、根長度增加，因此可以促進養分元素吸收。另一方面，有研究指出，土壤溫度升高，會使土壤中礦物質的礦質化作用 (mineralization) 增加，因此也提高了土壤中可吸取之礦質化養分供植物吸收、利用 (Stottlemeyer *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1999)。Ölander 與 Due (1986) 表示，溫度會影響植物之新陳代謝過程，與植物水分吸收能力，進而使植物養分吸收能力受到影響。

觀察兩種塊菌接種與未接種者，各種葉部養分濃度之結果可發現，在全碳、鎂、鈉與磷四種養分方面，有接種塊菌之處理比未接種處理高；全氮、鉀、鈣三種元素方面，在各處理間之差異互呈不顯著。以全碳元素來看，本試驗結果顯示，有接種菌根菌者比未接種者高，此與 Björkman (1942) 的研究結果相同，該研究指出，菌根的感染與宿主碳水化合物有相當的關係，因此菌根感染良好，宿主之碳濃度會隨之增加。而菌根菌的接種，對於苗木養分之吸收，最明顯之效益莫過於對磷的吸收，這是因為無論外生菌根或內生菌根，其根部表面均有許多根外延伸菌絲，這些都是菌根的主要吸收器官，可以穿越根際範圍的「貧磷區」，深達貧磷區以外的土壤中吸收磷等養分，提供給植物利用 (弓明欽等, 1997)。Bougher

等 (1990) 以及 Thomson 等 (1994) 指出，外生菌根之延伸菌絲能穿越貧磷區，進而從土壤中吸收磷養分，以改善植物中磷濃度。胡弘道 (1991) 之研究中指出，在高山草生地土壤，使用菌根苗栽植時，可增加二葉松苗磷的吸收。針對上述研究與本試驗之結果，都可確認菌根菌的接種對於植物之磷吸收，有著相當正面的效益。但整體而言，接種菌根菌對於苗木之全氮、磷、鉀、鈣、鎂等養分含量上，皆比未接種菌根菌之苗木良好，惟有部分養分元素的效果呈現不顯著的情形，吾人推測其可能的原因，應是在試驗過程中，每一供試苗木都有添加 MMN 營養液，因此產生塊菌的接種，對養分濃度之影響效益並不顯著。

在進行溫度、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分之間的相關分析後，結果顯示在不同溫度處理下，溫度越高則菌根感染率越低，此二者間呈負相關，溫度升高不利於菌根之感染，先前文章中即有討論，較高的溫度組如 35/30°C，為不利於菌根感染之溫度，感染率水準亦較其他溫度組低，因此二者間呈負相關性，為吾人所預期。在溫度與苗高、根頸、碳、氮、鉀、鈣與鈉等方面，都呈顯著正相關 ($P < 0.05$)，於先前討論與許多前人研究 (Baker *et al.*, 1989; Sheu and Lin, 1999; 許博行與張安璫, 2001) 中，即指出較高溫狀態有利於光合作用與苗木之生長，適度的提高溫度會使苗高、根頸與部分養份濃度狀態較佳之結果，在相關分析中獲得進一步之論證。菌根感染率方面，與苗高、根頸、鉀與磷呈顯著正相關 ($P < 0.05$)，前文有討論較高的菌根感染率，有助於苗木磷之吸收，這表示菌根感染率提高，苗木亦越健壯，此結果與陳怡君 (2004)，針對義大利白塊菌接種青剛櫟苗木後，在菌根感染率與苗高、根頸間的正相關結果一致。此外，苗高以及根頸方面，與氮、鉀、磷三種濃度間，都是呈顯著正相關 ($P < 0.05$)，這顯示苗木生長越健壯，葉部之氮、鉀、磷等含量越高，此情形與林瑞進 (2000) 以青剛櫟接種彩色豆馬勃後所觀察到的結果相同。各養份之間，則是鉀、鈣與鎂三者間，互呈負相關，推測此現象為三種離子間，具有相互拮抗之作用。

五、結論

本試驗首先以青剛櫟苗木接種台灣塊菌與夏塊菌後，隨即移往五種不同日夜溫度（35/30°C、30/25°C、25/20°C、20/15°C、15/12°C）的人工氣候室培養，結果接種台灣塊菌之青剛櫟苗木，形成單根或不規則羽狀之菌根，菌根呈淡黃色至深褐色，有明顯之剛毛。接種夏塊菌之苗木，主要是呈現單根狀，菌根呈淡黃色至深褐色，有非常明顯之剛毛，或呈羊毛狀，分佈於菌根頂端或前半部。進一步以立體顯微鏡觀察不同溫度下菌根形態，發現於不同溫度下生長的台灣塊菌、夏塊菌菌根，外部形態並無明顯之差異，每一種溫度處理下的菌根，皆具有典型的台灣塊菌、夏塊菌之菌根特徵。

在掃描電子顯微鏡下，觀察台灣塊菌菌根之超微細結構可發現，菌絲表面是呈平坦狀，菌毯表面結構，在不同溫度下，形態未有顯著之差異；由橫切面觀察之，哈替氏網延伸菌絲侵入至第二層皮層細胞間；以縱切面觀察後發現，菌毯厚度約與橫切面相同，哈替氏網延伸菌絲亦侵入至第二層皮層細胞間；此外，在35/30°C以及30/25°C溫度下形成之菌根，菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，而皮層細胞內，均有較明顯的胞內菌絲構造，澱粉粒累積出現的頻率亦較高。

夏塊菌菌根在掃描電子顯微鏡下，可見菌毯表面的菌絲有小突起，有菌絲囊與菌絲融合的情形存在，菌毯表面結構，在不同溫度下，形態未有顯著之差異；由橫切面觀察之，哈替氏網延伸菌絲可侵入至第二層皮層細胞間；以縱切面觀察後發現，菌毯厚度約與橫切面相同，哈替氏網延伸菌絲亦侵入至第二層皮層細胞間；在不同溫度之夏塊菌菌根形態方面，也是在較高溫度組合下生長的菌根，菌毯厚度較薄，結構較為鬆散，其皮層細胞內，均有較明顯的澱粉粒與胞內菌絲構造。

接種台灣塊菌與夏塊菌之菌根感染率，以25/20°C者最高，與其他溫度組呈顯著差異（ $P < 0.05$ ），在20/15°C與30/25°C者次之，此兩者呈差異不顯著（ $P > 0.05$ ），15/12°C者再次之，35/30°C者最低，且兩者間呈顯著差異（ $P < 0.05$ ）；菌根感染率

在兩種接種處理間，以接種台灣塊菌者較接種夏塊菌者高，惟兩者之間差異不顯著 ($P>0.05$)。就苗木高生長言，各處理皆以 $35/30^{\circ}\text{C}$ 者最高，與其他溫度組呈顯著差異 ($P<0.05$)，而其他溫度組之間，則多呈現差異不顯著 ($P>0.05$)；苗高在兩種接種、未接種處理間，以接種夏塊菌者最高，接種台灣塊菌者次之，未接種者最差，三者間互呈顯著差異 ($P<0.05$)。此外，苗木根頸生長方面，以 $25/20^{\circ}\text{C}$ 者最佳， $35/30^{\circ}\text{C}$ 、 $30/25^{\circ}\text{C}$ 與 $20/15^{\circ}\text{C}$ 三者次之，但此四者之間差異不顯著 ($P>0.05$)， $15/12^{\circ}\text{C}$ 者最差，與其他溫度組呈顯著差異 ($P<0.05$)；根頸在兩種接種、未接種接種處理間，以接種台灣塊菌者最佳，接種夏塊菌者次之，但兩者間差異不顯著 ($P>0.05$)，未接種者最差，與有接種者互呈顯著差異 ($P<0.05$)。

本試驗以 ICP 分析苗木葉部養分元素濃度，結果顯示碳、氮、磷、鉀、鈣、鎂、鈉等七種元素中，都是以 $35/30^{\circ}\text{C}$ 溫度組之濃度為最高， $30/25^{\circ}\text{C}$ 者次之，此結果顯示在高溫度狀態下，可促進這些養分元素的吸收。兩種接種及未接種處理者，葉部養分元素濃度顯示，在碳、鎂、鈉與磷四種養分方面，有接種塊菌之處理比未接種處理者高，氮、鉀、鈣三種元素方面，則為各處理間都呈差異不顯著 ($P>0.05$)。

進行溫度、菌根感染率、苗高、根頸與葉片養分之間進行皮爾森相關分析後，結果為溫度與菌根感染率間呈負相關 ($r=-0.57$)，溫度與苗高、根頸、葉部之碳、氮、鉀、鈣與鈉濃度 ($r=0.52$ 、 0.54 、 0.69 、 0.43 、 0.51 、 0.47 、 0.55)，呈顯著正相關 ($P<0.05$)；菌根感染率方面，與苗高、根頸、葉部之鉀、磷濃度等 ($r=0.49$ 、 0.47 、 0.42 、 0.67)，呈顯著正相關 ($P<0.05$)；苗高方面，與根頸、葉部之氮、鉀、磷濃度 ($r=0.51$ 、 0.71 、 0.46 、 0.42)，呈顯著正相關 ($P<0.05$)；根頸方面，與葉部之氮、鉀、磷濃度 ($r=0.62$ 、 0.44 、 0.47)，呈顯著正相關 ($P<0.05$)；葉部之鉀、鈣與鎂濃度三者間，則互呈負相關 ($r=-0.48$ 、 -0.54 、 -0.43)。

第五章、塊菌研究之未來展望

塊菌是世界上最珍貴的食用菌根菌之一，但分布卻不廣泛，又隨著人為恣意的採收與破壞，以及全球氣候變遷等因素，造成產量逐年下降。因此，要作到塊菌資源的永續利用，除了要作好塊菌之分類與森林資源的保護外，在塊菌的收穫上，也要發展更有效率、且更科學之採收方法。到目前為止，研究人員雖致力尋找塊菌的生物環境與分子遺傳生態等特性，所投入的時間與人力亦十分龐大，困難度相當高，惟只要不斷努力，累積相關研究資料與經驗，方可為塊菌的研究奠定良好之基礎。

目前塊菌的分類，是分為傳統形態與分子生物技術檢測兩大方向，然而多數研究仍未將兩者結合。就中國大陸分布十分廣泛的印度塊菌言，在親緣關係上，雖已分成 A、B 兩大群，但進行詳細比對、描述形態特徵的報告則付之闕如，其他塊菌如夏塊菌與勃良第塊菌間的差異也有相同困擾。因此，完整的形態描述與分子親緣關係分析報告，將是相當值得探討的研究題材。

台灣地區目前只發現兩種固有塊菌，但因為塊菌宿主為殼斗科樹種，該科樹種在中央山脈分布廣泛，雖然第二章討論中有提及，台灣地區塊菌分布僅限於南投東埔、和社兩區域之原因，與台灣山區多數森林土壤偏酸性有關，惟應有其他適合塊菌生長之偏中性石灰質土壤區域，存在於中央山脈中。因此，無論是尋找兩種固有塊菌的其他生育地，或是發現其他塊菌新種的存在，都是未來值得投入的研究課題。

此外，商業化栽培與塊菌生產方面，因為塊菌的經濟價值相當可觀，在歐洲或中國大陸，都有積極發展塊菌之人工培育。因此台灣地區，如有適當地點，可以提供發展塊菌苗之造林培育，後續林地管理方面，並以集約化的經營措施，如林木撫育、除草、灌溉等，相信達到商業化的生產量，應是指日可待的。

參考文獻

- 弓明欽、陳應龍、仲崇祿 (1997) 菌根研究與應用。中國林業出版社。pp.223。
- 王曉娥、姚方杰、李玉 (2005) 食用塊菌的研究進展。中國食用菌。24 (5): 6-9。
- 王曉娥、姚方杰 (2006) 塊菌 rDNA 的 ITS 序列分析試驗條件的初步研究。中國食用菌。25 (5): 37-39。
- 林瑞進 (2000) 青剛櫟外生菌根苗在貧瘠造林之研究。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.66。
- 胡弘道 (1987) 塊菇與林木共生關係之研究 (II) 4 號塊菇之特徵及其與夏塊菇之菌根合成。國立台灣大學實驗林研究報告。1 (3): 17-26。
- 胡弘道 (1990) 林木菌根。國立編譯館主編。台北。pp.666。
- 胡弘道 (1991) 高山草生地土壤對松科菌根生成之影響。台大實驗林研究報告。54 11-35
- 胡弘道 (1996) 青剛櫟與美味牛肝菌之菌根純合成及共生後對苗木生長之影響。國立台灣大學農學院研究報告。36(4): 329-341。
- 胡弘道、翁倩玉 (1997) 台灣二葉松與松茸共生關係之研究 (三) 不同介質對台灣二葉松松茸菌根發育影響之比較。國立台灣大學實驗林研究報告。11 (1): 73-80。
- 胡弘道、許碧如、胡寶元 (1999) 外生菌根接種青剛櫟幼苗在貧瘠土壤之生長效應。中華林學季刊 32 (4): 451-456。
- 胡弘道、黃鏡諺 (2004) 印度塊菌及台灣塊菌與青剛櫟形成菌根形態之比較。中華林學季刊 37 (3): 1-9。
- 胡弘道、王亞男、劉啟福 (2008a) 溫度及 pH 對台灣塊菌與印度塊菌菌落在洋菜培養基上生長之效應。中華林學季刊 41 (1): 43-58。
- 胡弘道、王亞男、劉啟福 (2008b) 溫度及 pH 對法國黑孢塊菌、義大利白塊菌與擬外孔塊菌菌落在洋菜培養基上生長之效應。中華林學季刊 41(2): 181-198。

- 胡炳福、尹曉陽、朱忠榮、遠香美、楊安敏、金天喜、胡剛、廖萬兵、楊萍 (2006) 印度塊菌苗木菌根化接種技術研究。貴州林業科技。34 (2): 15-26。
- 洪玲玲 (1977) 兩種外生菌根菌之生理及其對台灣二葉松之菌根誘導。東海大學生物學研究所碩士論文。pp.44。
- 徐阿生 (1999) 西藏塊菌屬的分類研究。菌物系統。18: 361-365。
- 徐希世 (2006) 台灣產小皮傘屬在形態分類與內轉錄間隔區親緣分析之探討。國立中興大學生命科學系博士論文。pp.140。
- 高嘉鴻 (2005) 中果塊菌之分離、菌落生長及半無菌菌根合成。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.74。
- 許碧如 (1987) 溫度、pH 值及葡萄糖濃度對夏塊菌生長之效應。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.55。
- 許桂蓮 (2007) 溫度對塊菌菌落生長之效應及夏塊菌之外生菌根合成。國立台灣大學森林環境暨資源學系碩士論文。pp.78。
- 陳怡君 (2004) 義大利白塊菌之半無菌菌根合成與不同 pH 介質對其菌根形成與青剛櫟葉部大量養分元素之效應。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.71。
- 陳炳宏 (2000) 淡水長臂大蝦 β -微管蛋白基因的選殖與應用。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。pp.46。
- 陳波濤 (2003) 塊菌的感染接種與塊菌林營建技術初報。貴州林業科技。31 (4): 10-14。
- 陳娟、劉培貴、王雲 (2005) 國產夏塊菌 (塊菌科、子囊菌門) 的比較研究。雲南植物研究。27 (4): 385-389。
- 陳家全、李家維、楊瑞森 (2004) 生物電子顯微鏡學。行政院國家科學委員會精密儀器發展中心。pp.266。
- 陳珈后 (2003) 砂粒大小對刺繡球菌孢子繁殖之影響及偽孔塊菌之半無菌合成試驗。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.88。

陳應龍、弓明欽 (2000) 塊菌資源多樣性及其地理分布。中國食用菌。19 (5): 6-7。

陳應龍 (2000) 塊菌生態生理學研究。中國食用菌。20 (5) 28-30。

陳應龍 (2001) 歐洲塊菌人工栽培技術研究。中國食用菌。21 (1): 7-9。

陳應龍 (2002) 黑孢塊菌的菌根合成及其超微結構研究。中國食用菌。21 (5): 15-17。

許博行、張安璫 (2001) 二氧化碳濃度與溫度對樟樹苗木生長及光合作用之影響。台灣林業科學。16 (1): 11-23。

黃增泉 (1993) 植物分類學。台灣維管束植物科誌。國立編譯館。pp.661。

黃鏡諺 (2002) 印度塊菌及台灣塊菌與青剛櫟形成菌根形態之比較及光黑腹菌與鱗蓋紅菇之菌根純合成。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.104。

黃麗君 (2003) 台灣重要疫病菌快速檢測技術之研發與應用。國立台灣大學植物病理學研究所碩士論文。pp.69。

廖志倉 (2002) 外生與內生菌根接種對尾葉桉幼苗生長之影響。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.70。

劉崇瑞 (1960) 台灣木本植物圖誌上卷。國立台灣大學農學院。pp.702。

顏江河 (1981) 外生與外內生菌根之純合成及外生菌根接種對台灣二葉松幼苗生長之效應。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。pp.76。

譚著明、傅紹春 (2002) 我國塊菌採收和貿易問題淺談。中國食用菌。22 (4): 3-5。

Agerer, R. (1995) Anatomical Characteristics of Identified Ectomycorrhizas An Attempt Towards a Natural Classification. In A. Varma and B. Hock Eds. , Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. pp. 685-734.

Anderson, C. P., E. I. Sucoff and R. K. Dixon (1986) Effects of root zone temperature on root initiation and elongation in red pine seedlings. Can. J. For. Res. 16:

696-700.

Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reed and N. C. Saunders (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systemics. *Ann. Re. Ecol. and Sys.* 18: 489-522.

Avise, J. C. (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* 7: 371-379.

Az'con-Aguilar (1981) Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytol.* 87: 677-685.

Bâ, A. M., K. B. Sanon, R. Duponnois and J. D. Exheimer (1999) Growth response of *Afzelia Africana* Sm. Seedlings to ectomycorrhizal inoculation in a nutrient-deficient soil. *Mycorrhiza* 9: 91-95.

Baciarelli-Falini, L., A. Rubini, C. Riccioni and F. Paolocci (2006) Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza* 16: 475-484.

Bailey, A. M., D. J. Mitchell, K. L. Manjunath, G. Nolasco and C. L. Niblett (2002) Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using unique sequences of the ITS1 region of the ribosomal DNA as capture probes for PCR ELISA. *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 153-158.

Baker, J. T., L. H. Allen, K. J. Boote, P. Jones and J. W. Jones (1989) Response of soybean to air temperature and CO₂ concentration. *Crop Sci.* 29: 98-105.

Bardet, M. C., L. Pages and V. Serra (1996) Truffles. Influence of pruning on the development of roots and mycorrhizas of downy oaks. *Infos (Paris)* pp.123.

Barry, D., S. Staunton and G. Callot (1994) Mode of the absorption of water and nutrients by ascocarp of *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum* : a radioactive tracer technique. *Can. J. Bot.* 72: 317-322.

- Bertault, G., M. Raymond, A. Berthomieu, G. Callot and D. Fernandez (1998) Trifling variation in truffles. *Nature* 394: 734.
- Björkman, E. (1942) Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. *Symb. Bot. Uppsal.* 6: 1-191.
- Blaxter, M. L., P. De Ley, J. R. Garey, L. X. Liu, P. Scheldeman, A. Vierstraete, J. R. Vanfleteran, L. Y. Mackey, M. Dorris, L. M. Frisse, J. T. Vida and W. K. Thomas (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392 (6671): 71-75.
- Bougher, N. L., T. S. Groves and N. Malajczuk (1990) Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F Muell) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytol.* 114: 77-85.
- Bougher, N. L. and T. Lebel (2001) Sequestrate (truffle-like) fungi of Australia and New Zealand. *Aust. Syst. Bot.* 14:439-484.
- Bowen, G. D. (1970) Effect of soil temperature on root growth and on phosphate uptake along *Pinus radiata* roots. *Aust. J. Soil Res.* 8: 31-38.
- Bowen, G. D. (1973) Mineral nutrient relations of ectomycorriza. In : *Ectomycorrhiza: their ecology and physiology* (Marks G. C. and T. T. Kozlowski eds.) pp. 151-205. Academic Press, New York.
- Bowen, G. D. and C. Theodorou (1967) Studies on phosphate uptake by mycorrhizas. *Proc. 14th Congr. int. Um. For. Res. Orgs, Munich, 1967, vol. 5: 116-138.*
- Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang and A. C. Wilson (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Carter, P. J., M. B. Wilkins, H. G. Nimmo and C. A. Fewson (1995) Effects of temperature on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and on the CO₂ fixation in *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Planta* 196: 375-380.
- Ceruti, A., A. Fontana and C. Nosenzo (2003) Le specie europee del genere *Tuber*, una

- revisione storica, Museo Regionale di Scienze Naturali, monografie XXX.VII.
- Chen, J. and P. G. Liu (2007) *Tuber latissporum* sp. Nov. and related taxa, based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia* 99: 475-481.
- Chilvers, G. A., P. A. Douglass and F. F. Lapeyrie (1986) A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizae. *New Phytol.* 103: 397-402.
- Chu-Chou, M. and L. J. Grace (1981) *Tuber* sp. as a mycorrhizal fungus of Douglas fir in New Zealand. *Tran. of British Mycol. Soc.* 77: 652-654.
- Claus, R., H. O. Hoppen and H. Karg (1981) The secret of truffles : A steroidal pheromone? *Cel. and Mol. Life Sci.* 37: 1178-1179.
- Cleveland, D. W. and K. F. Sullivan (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 331-365.
- Cline, M. L., R. C. France and C. P. P. Reid (1986) Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Can. J. Bot.* 65: 869-875.
- Comandini, O. and G. Pacioni (1997) Mycorrhizae of Asian black truffles, *Tuber himalayense* and *T. indicum*. *Mycotaxon* 63: 77-86.
- Cooke, R. C. (1970) Physiological aspects of sclerotium growth in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53: 77-86.
- Dams, E., L. Hendriks, Y. Van de Peer, J. M. Neefs, G. Smits, I. Vandenbempt and R. De Wachter (1988) Compilation of small ribosomal subunits RNA sequences. *Nucleic. Acids. Res.* 16: 87-173.
- Danell, E. and D. Eaker (1992) Amino Acid and Total Protein Content of the edible Mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries) *J. Sci. Food Agric.* 60: 333-337.
- Debaud, J. C. and G. Gay (1987) In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol.* 105: 429-435.

- Delams, J. (1983) La truffe et sa culture. Institut National de Recherche Agronomique
149. rue de Grenelle-75341 Paris Cedex 7: 7-14.
- Domisch, T., L. Finer and T. Lehto (2001) Effects of soil temperature on biomass and
carbohydrate allocation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings at the
beginning of the growing season. *Tree Physiol.* 21: 465-472.
- Domisch, T., L. Finer, T. Lehto and A. Smolander (2002) Effect of soil temperature on
nutrient allocation and mycorrhizas in Scots pine seedlings. *Plant Soil* 239:
173-185.
- Duddridge, J. A. and D. J. Read (1984) The development and ultrastructure of
ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine in vitro. *New Phytol.*
96: 575-582.
- Duñabeitia, M. K., J. I. Garcia-Plazaola, U. Arteché, S. Hormilla and K. Txarterrina
(2004) Differential responses of three fungal species to environmental factors and
their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14: 11-18.
- Dupre, C., G. Chevalier and J. Morizet (1982) Effect of nitrogen and phosphorus on
mycorrhizal association between *Quercus pubescens* Willd. And *Tuber
melanosporum* Vitt. under controlled conditions. *Colloques-de-1' INRA* 13:
147-153.
- El-Giahmi, A. A., T. H. Nicolson and M. J. Daft (1976) Endomycorrhizal fungi from
Libyan soils. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 164-169.
- Fanelli, L. (1998) The Alba white, black French and summer varieties. *Informatore
Agrario* 44: 71-73.
- Felsenstein, J. (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA,
USA.
- Fontana, A. and M. Palenzona (1979) Synthèse des mycorrhizes de *Tuber magnatum*
Pico avec semis de *Quercus pubescens* Willd. *Mushroom Sci.* 10: 1007-1012.

- Fontana, A., A. Ceruti and F. Meotto (1990) Criteri isologici per il riconoscimento delle micorrize di *Tuber magnatum* Pico. In: Bencivenga M, Granetti B eds Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo, Spoleto, Italy, 24-27 November 1988 pp.141-154.
- Francis, M., M. A. Selosse, C. D. Battista, H. Gherbi, C. Delaruelle, D. Vairelles, D. Bouchard and F. L. Tacon (1998) Molecular markers in ecology of ectomycorrhizal fungi. *Genet. Sel. Evol.* 30: 333-355.
- Frank, J. L., D. Southworth and J. M. Trappe (2006) NATS truffle and truffle-like fungi 13 *Tuber quercicola* and *T. whetstonense*, new species from Oregon, and *T. candidum* redescribed. *Mycotaxon* 95: 229-240.
- Gandeboeuf, D., C. Dupré and G. Chevalier (1994) Use of isoenzyme analysis to differentiate truffles from Europe. *Acta. Bot. Gallica.* 141: 455-463.
- Gandeboeuf, D., C. Dupré, P. Roeckel-Drevet, P. Nicolas and G. Chevalier (1997) Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can. J. Bot.* 75: 36-45.
- Gardes, M., J. A. Fortin, G. M. Mueller and B. R. Kropp (1990) Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp. *Phytopathology* 80: 1312-1317.
- Ginkley, H. M. (1954) North American Flora. Series II, Part 1. Published by the New York Botanical Garden. 36p.
- Giomaro, G., A. Zambonelli, D. Sisti, M. Cecchini, V. Evangelista and V. Stocchi (2000) Anatomical and morphological characterization of mycorrhizas of five strains of *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* 10: 107-114.
- Giovannetti, G. and A. Fontana (1982) Mycorrhizal synthesis between *Cistaceae* and *Tuberaceae*. *New Phytol.* 92:533-537.
- Glass, N. L. and G. C. Donaldson (1995) Development of primers sets designed for use

- with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- Godbout C. and J. A. Fortin (1990) Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-growth white pine seedlings. *Mycol. Res.* 94: 1051-1058.
- Halász, K., Z. Bratek, D. Szegő, S. Rudnóy, I. Rácz, D. Lásztity and J. M. Trappe (2005) Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. Based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycol. Prog.* : 281-290.
- Harley, J. L. (1969) *The biology of mycorrhiza*. 2nd Ed. Leonard Hill London.
- Hawksworth, D. I., P. N. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler (1995) *Ainsworth Bisby's Dictionary of the fungi*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Henrion, B., G. Chevalier and F. Martin (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98: 37-43.
- Hibbert, D. S., Y. Fukumasa-Nakai, A. Tsuneda and M. J. Donoghue (1995) Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 618-638.
- Hu, H. T. (1992) *Tuber formosanum* sp. nov. and its mycorrhizal associations. *J. Exp. Forest Nat. Taiwan Univ.* 6: 79-86.
- Hu, H. T. and C. F. Liou (1995) Study on the relationship between *Pinus taiwanensis* Hay. And *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. (II) Effects of pH and temperature on colony growth of *Tricholoma matsutake*. *J. Exp. Forest Nat. Taiwan Univ.* 9: 21-27.
- Hu, H. T., Y. Wang and B. Y. Hu (2005) Cultivation of *Tuber formosanum* on limed soil in Taiwan. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 33: 363-366.
- Hu, H. T. and Y. Wang (2005) *Tuber furfuraceum* sp. nov. from Taiwan. *Mycotaxon* 93: 155-157.

- Huang, S. S. F., S. Y. Hwang and T. P. Lin (2002) Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and East Asia. *Mol. Ecol.* 11: 2349-2358.
- Inderbitzin, P., J. Kohlmeyer and M. L. Berbee (2002) *Decorospora*, a new genus for the marine ascomycete *Pleospora gaudefroyi*. *Mycologia* 94: 651-659.
- Iotti, M., A. Amicucci, V. Stocchi and A. Zambonelli (2002) Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytol.* 155: 499-505.
- Iotti, M. and A. Zambonelli (2006) A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycol. Res.* 110: 60-65.
- Jasalavich, C. A., V. M. Morales, L. E. Pelcher and G. Seguin-Swartz (1995) Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* 99: 604-614.
- Jeandroz, S., C. Murat, Y. Wang, P. Bonfante and F. L. Tacon (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the “true truffles”. *J. Biogeogr.* 35: 815-829.
- Jyan, M. H., L. C. Huang, P. J. Ann and R. F. Liou (2002) Rapid detection of *Phytophthora infestans* by PCR. *Plant Pathol. Bull.* 11: 25-32.
- Kizaki, K. and I. Oshiro (1977) Paleogeography of the Ryukyu Islands. *Mar. Sci. Mon.* 9: 542-549.
- Kovács, G. M. and E. Jakucs (2006) Morphological and molecular comparison of white truffle ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 16: 567-574.
- Kristiansen, A. K., V. F. John, N. R. Finn and N. R. Hanne (2004) Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 33: 251-258.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei (2004) MEGA 3: integrated software for molecular

- evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- Laiho, O. (1970) *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest tree. *Acta. For. Fenn.* 106: 1-65.
- Liao, J. C. (1996) Fagaceae. In: *Flora of Taiwan* (eds. Editorial Committee of the Flora of Taiwan), 2nd edn, vol. 2, pp. 51-123. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei, Taiwan.
- Lamb, R. J. and B. N. Richard (1971) Effect of mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of slash and radiate pine seedlings. *Aust. For.* 3: 1-7.
- Leake, J. R. and D. J. Read (1989) The biology of mycorrhiza in the Ericaceae X V. The effect of mycorrhizal infection on calcium uptake by *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *New Phytol.* 113: 535-544.
- Lee, S. B., T. J. White and J. W. Taylor (1993) Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology* 83: 77-81.
- Luo, Y. and Z. K. Zhou (2001) Phylogeography of *Quercus* subg. *Cyclobalanopsis*. *Acta. Bot. Yun.* 23: 1-16.
- Mabru, D., C. Dupré, J. P. Douet, P. Leroy, C. Ravel, J. M. Richard, B. Médina, M. Castroviejo and G. Chevalier (2001) Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11: 89-94.
- Mabru, D., J. P. Douet, A. Mouton, C. Dupré, J. M. Richard, B. Medina, M. Castroviejo and G. Chevalier (2004) PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and other truffle species in cans. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 33-42.
- Mamoun, M. and J. M. Olivier (1996) Receptivity of cloned hazels to artificial

- ectomycorrhizal infection by *Tuber melanosporum* and symbiotic competitors. *Mycorrhiza* 6: 15-19.
- Marlatt, M. L., J. C. Correll, P. Kaufmann and P. E. Cooper (1996) Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis.* 80: 1336-1342.
- Marschner, H. (1986) Mineral nutrient of higher plants. Academic Press. London. 647 p.
- Martin, F., J. Diez, B. Dell and C. Delaruelle (2002) Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* 153: 345-357.
- Marx, D. H. (1973) Mycorrhizae and feeder root disease. In Marx, G. C., Kozlowski, T. T. (eds) *Ectomycorrhizae their ecology and physiology*. Academic, New York, pp.351-382.
- Marx, D. H., W. C. Bryan and C. E. Cordell (1977) Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in North Carolina and Florida. *Forest Sci.* 23: 363-373.
- Marx, D. H., C. E. cordell, S. B. Maul and J. L. Ruehie (1989) Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. I Efficacy of various vegetative inoculum formulations. *New Forest.* 3: 45-56.
- Massicotte, H. B., R. L. Peterson and A. E. Ashford (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae, I. Light microscopy and Scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.* 65: 1827-1939.
- McInnes, A. and G. A. Chilvers (1994) Influence of environment factors on ectomycorrhizal infection in axenically cultured Eucalypt seedlings. *Aust. J. Bot.* 42: 595-604.
- Melin, E. and H. Nilsson (1955) Ca_{54} used as an indicator of transport of cations to pine

- seedlings by means of mycorrhizal mycelia. Sv. Bot. Tidskr. 49. p.119
- Mello, A., L. Garnero and P. Bonfante (1999) Specific PCR- primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. New Phytol. 141: 511-516.
- Mello, A., A. Vizzini, S. Longato, F. Rollo, P. Bonfante and J. M. Trappe (2000) *Tuber borchii* versus *Tuber maculatum* neotype studies and DNA analyses. Mycologia 92: 326-331.
- Mello, A., A. Cantisani, A. Vizzini and P. Bonfante (2002) Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. Environ. Microbiol. 4: 584-594.
- Mello, A., A. Cantisani, A. Vizzini and P. Bonfante (2005) *Tuber magnatum* Pico, a species of limited geographical distribution its genetic diversity inside and outside a truffle ground. Environ. Microbiol. 7:55-65.
- Mello, A., C. Murat and P. Bonfante (2006) Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. FEMS Microbiol. Lett. 260: 1-8.
- Meotto, F., C. Nosenzo and A. Fontana (1995) Mycorrhiza of valued species of *Tuber*. Informatore Agrario 51: 41-45.
- Miranda, J. C. and P. J. Harris (1994) The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. Plant soil 166: 271-280.
- Moore, P. D. and S. B. Chapman (1986) Methods in plant ecology. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh.
- Moore, A. E. P. and R. L. Peterson (1992) Effect of temperature on sclerotium introduction in *Paxillus involutus*. Can. J. Microbiol. 38: 1197-1201.
- Morales, V. M., L. E. Pelcher and J. L. Taylor (1993) Comparison of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. Curr. Genet. 23: 490-495.

- Moreno, G., J. L. Manjon, J. Diez, L. G. Garcia-Montero and G. D. Massimo (1997) *Tuber pseudohimalayense* sp. nov. an Asiatic species commercialized in Spain, similar to the “Perigord” truffle. *Mycotaxon* 63: 217-224.
- Moser, M. (1958) Der Einflub tiefer Temperaturen auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit höherer Pilze mit spezieller Berücksichtigung von Mykorrhizapilzen. *Sydowia* 12: 386-399.
- Mosse, B. (1979) Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labeled with P^{32} . *New Phytol.* 72: 809-815.
- Murat, C., J. Díez, P. Luis, C. Delaruelle, C. Dupré, G. Chevalier, P. Bonfante and F. Martin (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytol.* 164: 401-411.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik, N. S. Weber and J. M. Trappe (1997) Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* 89: 48-65.
- Oliver, J. M. (2002) Pers. comm. Jean-Marc. Unité de Recherches sur les Champignons, INRA, Bordeaux, France
- Ölander, G. and K. Due (1986) Water relations of seedlings of Scots pine growth in peat as a function of soil water potential and soil temperature. *Stud. For. Suec.* 175. 13 p.
- Paavanen-Huhtala, S., J. Hyvonen, S. A. Bulat and T. Yli-Mattila (1999) RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analysis in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycol. Res.* 103: 625-634.
- Paolocci, F., A. Rubini, B. Granetti and S. Arcioni (1997) Typing *Tuber melanosporum* and Chinese black truffle species by molecular markers. *FEMS Microbiol. Lett.*

153 255-260.

Paolocci, F., A. Rubini, C. Riccioni, F. Topini and S. Arcioni (2004) *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* two morphotypes or two species? FEMS Microbiol. Lett. 235: 109-115.

Parke, J. L., R. G. Lindermann and J. M. Trappe (1983) Effect of root zone temperature on ectomycorrhiza and vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in disturbed and undisturbed forest soils of southwest Oregon. Can. J. For. Res. 13: 657-665.

Pendall, E., S. Bridgham, P. J. Hanson, B. Hungate, D.W. Kicklighter, D. W. Johnson, B. E. Law, Y. Luo, J. P. Megonigal, M. Olsrud, M. G. Ryan and S. Wan (2004) Below-ground process responses to elevated CO₂ and temperature: a discussion of observations, measurement method and models. New Phytol. 162: 311-322.

Pera, J., J. Parlade and I. F. Alvarez (1996) Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 6: 237-245.

Percudani, R., A. Trevisi, A. Zambonelli and S. Ottonello (1999) Molecular phylogeny of truffles (Pezizales Terfeziaceae, Tuberaceae) derived from Nuclear rDNA sequence analysis. Mol. Phylogenet. Evol. 13: 169-180.

Pinkas, Y., M. Maimon, E. Shabi, S. Elisha, Y. Shumulewich and S. Freeman (2000) Inoculation, isolation and identification of *Tuber melanosporum* from old and new oak hosts in Israel. Mycol. Res. 104: 472-477.

Plattner, I. and I. R. Hall (1995) Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum* Vitt. Mycol. Res. 99: 1367-1370.

RiOUSset, G., L. RiOUSset, G. Chevalier and M-C Bardet (2001) *Truffe d'Europe et de Chine*, INRA, Paris.

Ross, D. J., F. M. Kelliher and K. R. Tate (1999) Microbial processes in relation to carbon, nitrogen and temperature regimes in litter and a sandy mineral soil from a

- central Siberian *Pinus sylvestris* L. forest. *Soil Biol. Biochem.* 31: 757-767.
- Roux, C., N. Séjalon-Delmas, M. Martins, A. Parguey-Leduc, R. Dargent and G. Bécard (1999) Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 180: 147-155.
- Rubini, A., F. Paolocci, B. Granetti and S. Arcioni (1998) Single step molecular characterization of morphologically similar black truffle species. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 7-12.
- Rubini, A., F. Topini, C. Riccioni, F. Paolocci and S. Arcioni (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle. *Mol. Ecol. Notes.* 4: 116-118.
- Rudawska, M. (1986) Sugar metabolism of ectomycorrhizal Scots pine seedlings as influenced by different nitrogen forms and levels. *In* Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985. Edited by V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. INRA, Paris. pp. 389-394.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanchez, F., M. Honrubia and P. Torres (2001) Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycol.* 22: 243-259.
- Schubert, R., G. Bahnweg, J. Nechwatal, T. Jung and D. E. L. Cooke (1999) Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot disease in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Pathol.* 29: 169-188.
- Segal, G., M. Sarfatti, M. A. Schaffer, N. Ori, D. Zamir and R. Fluhr (1992) Correlation

- of genetic and physical structure in the region surrounding the I2 *Fusarium oxysporum* resistance locus in tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 265-274.
- Sharpe, R. R. and D. H. Marx (1986) Influence of soil pH and *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on growth and nutrient uptake of pecan seedlings. *Hortscience* 21: 1388-1390.
- Sheu, B. H. and H. Y. Lin (1999) Photosynthetic response of seedlings of the sub-tropical tree *Schima superba* with exposure to elevated carbon dioxide and temperature. *Environ. Exp. Bot.* 41: 57-65.
- Shoulder, E. and C. W. Ralston (1975) Temperature, root aeration, and light influence Slash pine nutrient uptake rates. *For. Sci.* 21: 401-410.
- Sibuet, J. C. and S. K. Hsu (2004) How was Taiwan created? *Tectonophysics* 379: 159-181.
- Silflow, C. D., D. G. Oppenheimer, S. D. Kopczak, S. E. Ploense and D. P. Snustad (1987) Plant Tubulin Genes: Structures and differential expression during development. *Develop. Genet.* 8: 435-460.
- Song, Y. C., K. S. Hsu, W. L. Chen, X. H. Wang, L. J. Da and T. C. Chen (2003) Evergreen broad-leaved forest in Taiwan and its relationship with counterparts in mainland China. *Acta. Phytoecol. Sin.* 27: 719-732.
- Smith, S. E. and D. J. Read (1997) *Mycorrhiza symbiosis*, 2nd edition. Academic Press Ltd, London, England
- Stottlemeyer, R., B. Travis and D. Toczydlowski (1995) Nitrogen mineralization in boreal forest stands of Isle Royale, northern Michigan. *Water Air Soil Pollut.* 82: 191-202.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Version 4.0 Beta 10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- Taiz, L. and E. Zeiger (1998) *Plant physiology*. MA, USA: the Benjamin / Cummings

Publishing. p. 245-246.

Tajima, F. (1993) *Mechanisms of molecular evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

Tam, P. C. F. (1994) Mycorrhizal associations in *Pinus massoniana* Lamb. And *Pinus elliottii* Engel. Inoculated with *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 4: 255-263.

Theodorou, C. and G. D. Bowen (1970) Mycorrhizal responses of radiate pine in experiments with different fungi. Aust. Forest. 34: 179-183.

Theodorou, C. and G. D. Bowen (1971) Influence of temperature on mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. Aust. J. Bot. 19: 13-20.

Thomson, B. D., T. S. Grove, N. Malajczuk and G. E. S. T. J. Hardy (1994) The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globules* Labill. In relation to root colonization and hyphal development in soil. New Phytol. 126: 517-524.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic. Acids Res. 24: 4876-4882.

Trappe, J. M. (1979) The order, families, and genera of hypogeous Ascomycotina. Mycotaxon 9: 297-340.

Urbanelli, S., P. Sallicandro, E. De Vito, L. Bullini and E. Biocca (1998) Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. Mycologia 90: 537-546.

Wang, Y., I. R. Hall and L. A. Evans (1997) Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies. 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. Econ. Bot. 51: 311-327.

Wang, Y., G. Moreno, L. J. Riouset, J. L. Manjon, G. Riouset, G. Fourre, G. DiMassimo, L. G. Garcia-Montero and J. Diez (1998) *Tuber pseudoexcavatum* sp. nov. A new species from China commercialized in Spain, France and Italy with additional comments on Chinese truffles. Cryptogamie Mycol. 19: 113-120.

- Wang, Y. and X. Y. He (2002) *Tuber huidongense* sp. nov. from China. Mycotaxon 83: 191-194.
- Wang, Y., Z. M. Tan, D. C. Zhang, C. Murat, S. Jeandroz and F. L. Tacon (2006a) Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle, and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. FEMS Microbiol. Lett. 259: 269-281.
- Wang, Y., Z. M. Tan, D. C. Zhang, C. Murat, S. Jeandroz and F. Le Tacon (2006b) Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. Mycol. Res. 110: 1034-1045.
- Wanner, H. (1948) Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit der Salzaufnahme durch Pflanzenwurzeln I. Die relative Größe der Temperaturkoeffizienten (Q10) von Kationen- und Anionenaufnahme. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 58: 123-130.
- Warburton, M. L., V. L. Becerra-Velasquez, J. C. Goffreda and F. A. Bliss (1996) Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. Theor. Appl. Genet. 93: 920-925.
- Warrington, S. J., H. D. Black and L. B. Coons (1981) Entry of *Pisolithus tinctorius* hyphae into *Pinus taeda* roots. Can. J. Bot. 59: 2135-2139.
- Weller, S. A., J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham and D. E. Stead (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2853-2858.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In Innis M. A., Gelfand, D. H. Sinisky, J. J., and White, T. J. (ed.), PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press.
- Wilcoxson, R. D. and S. Subbarayudu (1968) Translocation to and accumulation of

- phosphorous-32 in sclerotia of *Sclerotium rolfii*. Can. J. Bot. 46: 85-88.
- Woese, C. R. and G. J. Olsen (1996) Archaeobacterial phylogeny : perspectives on the eukaryotic kingdoms. Syst. Appl. Microbiol. 7: 161-177.
- Young, B. W., H. B. Massicotte, L. E. Tackaberry, Q. F. Baldwin and K. N. Egger (2002) *Monotropa uniflora* : morphological and molecular assessment of mycorrhizae retrieved from sites in the Sub-Boreal Spruce biogeoclimatic zone in central British Columbia. Mycorrhiza 12: 75-82.
- Zambonelli, A., S. Salomoni and A. Pisi (1993) Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. Su *Quercus pubescens* Willd. Micol. Ital. 3: 73-90.
- Zambonelli, A., C. Rivetti, R. Percudani and S. Ottonello (2000) TuberKe: A DELTA-BASED tool for the description and interactive identification of truffles. Mycotaxon 74: 57-76.
- Zhang, B. C. and D. W. Minter (1988) *Tuber himalayense* sp. nov. with notes on Himalayan truffles. Trans. Br. Mycol. Soc. 91: 593-597.
- Zhang, L. F., Z. L. Yang and D. S. Song (2005) A phylogenetic study of commercial Chinese truffles and their allies: Taxonomic implications. FEMS Microbiol. Lett. 245: 85-92.
- Zuccherelli, G., S. Zuccherelli and V. Capaccio (1994) Production “in vitro” of two Hazelnut varieties and results about inoculum of *Tuber magnatum* Pico on mass scale. Acta Horticult. 351: 371-380.
- Zuckerandl, E. and L. Pauling (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Evolving Genes and Proteins. Bryson V, Vogel HJ (eds.) pp.97-166.