

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣地區壺菌群多樣性及根生壺菌屬親緣關係研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2621-B-041 -001-

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：陳淑芬

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國 93 年 10 月 18 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

計畫名稱：台灣地區壺菌群多樣性及根生壺菌屬親緣關係研究 (The diversity of Chytridiomycota and phylogeny of *Rhizophyidium* in Taiwan)

計畫編號：NSC 92-2621-B-041-001

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：陳淑芬

執行機關：嘉南藥理科技大學保健營養系

一、中文摘要

壺菌為鞭毛真菌中種類及數量相當龐大的一群，腐生或寄生生活，生態上包括：水生與土棲兩大類。本研究進行台灣地區的單鞭毛真菌之多樣性調查，自 2003 年 8 月至 2004 年 7 月在高、屏、嘉、南地區採集各種水樣、底泥及土壤，經由誘鈎、分離共純培養了 114 個菌株，並鑑定其中的 80 株為：*Catenochytridium*, *Chytriomycetes*, *Cladochytrium*, *Diplochytridium*, *Phlyctochytrium*, *Powellomyces*, *Rhizidium*, *Rhizoclosmatium*, *Rhizophlyctis* 及 *Rhizophyidium* 等 2 目 10 屬共約 23 種壺菌，其中 *Powellomyces* 為台灣新紀錄屬，而 *Catenochytridium hemicysti*, *Rhizidium elongatum*, *Rhizoclosmatium hyalinus*, *R. aurantiacum* 及 *Powellomyces variabilis* 五種為台灣新紀錄種。此外，將種類最多的根生壺菌屬 (*Rhizophyidium*) 42 個菌株抽取、純化 DNA，選用細胞核核糖體基因之內轉錄區間隔區 (ITS) 作為分子標誌，進行聚合酵素連鎖反應 (PCR) 核酸序列自動定序 (DNA sequencing)，經由分析軟體處理 DNA 分子序列，探討根生壺菌屬菌株種間以及種內的親緣關係，初步發現分為三個分群，與型態特徵中游孢子釋放構造及釋放方式相符，其中三種游孢子成群釋出的種類則分開在三個分群之外，顯示根

生壺菌屬為多源性，本屬內之再分類及與其他相關屬的親類關係有待進一步釐清。

關鍵詞：壺菌群、多樣性、根生壺菌屬、親緣關係、台灣

Abstract

The members of chytrids are a large group of Mastigomycota (zoosporic fungi). They are capable of living either as saprophytes or parasites, which play the decomposer in food chain. We still know little about the biodiversity and phylogeny of these fungi in Taiwan. This project is investigate the chytrids in southern area of Taiwan from Aug. 2003 to July 2004. The samples of water, sediment and soil were collected periodically. The isolates of this study have 10 genus 23 species of Chytridiomycota. The *Powellomyces* is newly genus in Taiwan. The *Catenochytridium hemicysti*, *Rhizidium elongatum*, *Rhizoclosmatium hyalinus*, *R. aurantiacum* and *Powellomyces variabilis* are newly records from Taiwan. The phylogeny of *Rhizophyidium* was studied by biochemical methods. The analysis of rDNA ITS sequences present that there are above three subclades within *Rhizophyidium*. Specific morphological features tend to correlate with

these subclades. In order to more fully understand this diverse assemblage of organisms, we need to examine multiple substrates.

Keywords : Chytridiomycota, Diversity, *Rhizophydium*, Phylogeny, Taiwan

二、計畫緣由與目的

單鞭毛真菌的種類很多、形態歧異，分離、鑑定方法各不相同，而其中種數最多的壺菌體積極微小、構造簡單、鑑定困難，臺灣地區從事這群真菌的分類研究者相當少，截至目前仍然缺乏完整的多樣性 (biodiversity) 調查，過去的研究多僅限於種類的分離及形態描述，其中以 Chytridiales 與 Spizellomycetales 的記錄約 58 種為最多，包括：寄生性 (Sawada, 1919, 1922, 1943)、海水生 (Volz et al., 1976; 陳, 1999)、土壤及爛葉分離 (Konno, 1984; 陳, 1996)、溪流、池塘、湖泊的水中或藻類上棲息的種類 (許, 1992; 王, 1994; 陳, 1996; Chen & Chien, 1995; 1998; Chen et al., 2000; Chen, 2002)。根據 Waterhouse 調查英國河川的水生真菌指出：腐生的藻狀菌具有季節性的周期變化，而池塘比溪流具有較豐富的菌類相 (Sparrow, 1960)，我們過去幾年對於破囊壺菌的調查研究也得到相同結論 (陳, 2000, 2002)；台南地區池塘、湖、埤、水庫居全省之冠，本人曾隨機調查官田的菱角田、白河的荷花池等特殊水域的單鞭毛真菌，結果分離鑑定出 8 屬 12 種，是壺菌類群分佈相當多樣化的地區之一；台灣地區擁有亞熱帶特殊的生態景觀與環境資源，氣候、水質及土壤造成植物相多樣的分布現象，據以推測台灣地區也應存在豐富的土棲與水生的單鞭毛菌類相，加上隨著季節更替，土壤與水中的種類應該更豐富且多樣，

此為本計畫的研究動機之一。

Timothy 等人 (2000) 嘗試以分子生物學的方法探討壺菌目與其他類群真菌間的親緣關係，結果仍支持 Barr (1980) 提出的電子顯微鏡超微構造特徵所建立的分類架構；但同時也發現，早期被視為 genus 及 family 的分類特徵，例如：囊蓋 (operculum) 有無、菌體的發育類型...等卻不再適合。其實，目前僅根據形態界定某些 genus 時仍然有困難，因此在定義 genus 及 family 之前增加類群的代表性是必需的，而尋找演化上穩定的特徵重新定義 family 成為壺菌系統分類的首要之務。本人曾經針對五屬十四種純培養的壺菌菌株進行同功酵素探討 (尚未發表)，初步找出 ALD、SOD、IDH、PGD 及 PGI 等酵素呈現有分類意義的電泳型；如今分離的菌株種類漸增，若能分析種內以及種間的 DNA 分子序列，應可提供更多穩定的輔助壺菌分類特徵，此為本計畫的研究動機之二。

本研究的目的是(一)：由南向北、由西向東逐年以二至三個縣市分區進行全面性的單鞭毛真菌之多樣性調查，預計採集沼澤、溪流、池塘及湖泊水樣及土壤、底泥，經由特定之誘釣、分離技術、純培養、鑑定更多種類，並綜合彙整各相關類群，以充實台灣地區壺菌群的記錄與多樣性。目的(二)：在擴大篩選並比較根生壺菌屬的所有菌株，選擇在 genus 及 species 的階層有分類意義的細胞核糖體基因之內轉錄區間隔區 (ITS) 作為分子標誌，進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)、核酸序列自動定序 (DNA sequencing)，經由分析軟體處理 DNA 分子序列，探討根生壺菌屬菌株種間以及種內的親緣關係，並協助鑑定形態分類上有疑問的菌株，經由遺傳相似性的比較，在形態特徵之外增加有力的生理、生化佐證，期能為壺菌群的親緣關係研究增加另一項方便且有

助益的方法。

三、研究結果：

(1) 壺菌群多樣性調查

在高、屏、嘉、南地區共進行 25 次採集，將各種水樣、底泥及土壤經由特定之誘鈎、分離技術、共純培養了 114 個菌株，其中 80 菌株已經完成鑑定，分屬於壺菌目及小壺菌目 2 目，包括：*Catenochytridium*, *Chytriomycetes*, *Cladochytrium*, *Diplochytridium*, *Phlyctochytrium*, *Powellomyces*, *Rhizidium*, *Rhizoclostridium*, *Rhizophlyctis* 及 *Rhizophyidium* 等 10 屬約 23 種壺菌 (表一)，其中 *Powellomyces* 為台灣新紀錄屬，而 *Catenochytridium hemicysti*, *Rhizidium elongatum*, *Rhizoclostridium hyalinus*, *R. aurantiacum* 及 *Powellomyces variabilis* 五種為台灣新紀錄種。

(2) 根生壺菌屬親緣關係研究

選擇歷年來分離次數及種類最多的根生壺菌屬 (*Rhizophyidium*) 中 42 個菌株純培養後，抽取、純化 DNA，選用細胞核核糖體基因 (rDNA) 之內轉錄區間隔區 (ITS) 作為分子標誌，進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 及核酸序列自動定序 (DNA sequencing)，將 DNA 分子序列比對、排序後，以 MEGA2.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 2.0) 比較並計算序列變化，並利用聚類分析法 (Neighbor-joining, NJ) 得一關係樹型圖，以重複 1000 次 Bootstrapping 分析計算可信度 (圖一)。經由分析軟體處理，探討根生壺菌屬菌株種間以及種內的親緣關係，初步發現：根生壺菌屬可被區分為三個以上分群，與型態特徵中游孢子釋放構造及釋放方式大致相符，顯示根生壺菌屬是一個多源性

(polyphyletic) 的分類群；此外，有三個其游孢子為成群釋出的種類被分開在三個分群之外，推測根生壺菌屬應可重新歸類為數個亞屬甚或數個不同的屬；未來將選用其他的 DNA 片段作為分子標誌加以驗證，同時，根生壺菌屬與其他相關屬的親類關係也有待進一步的釐清。

四、參考文獻

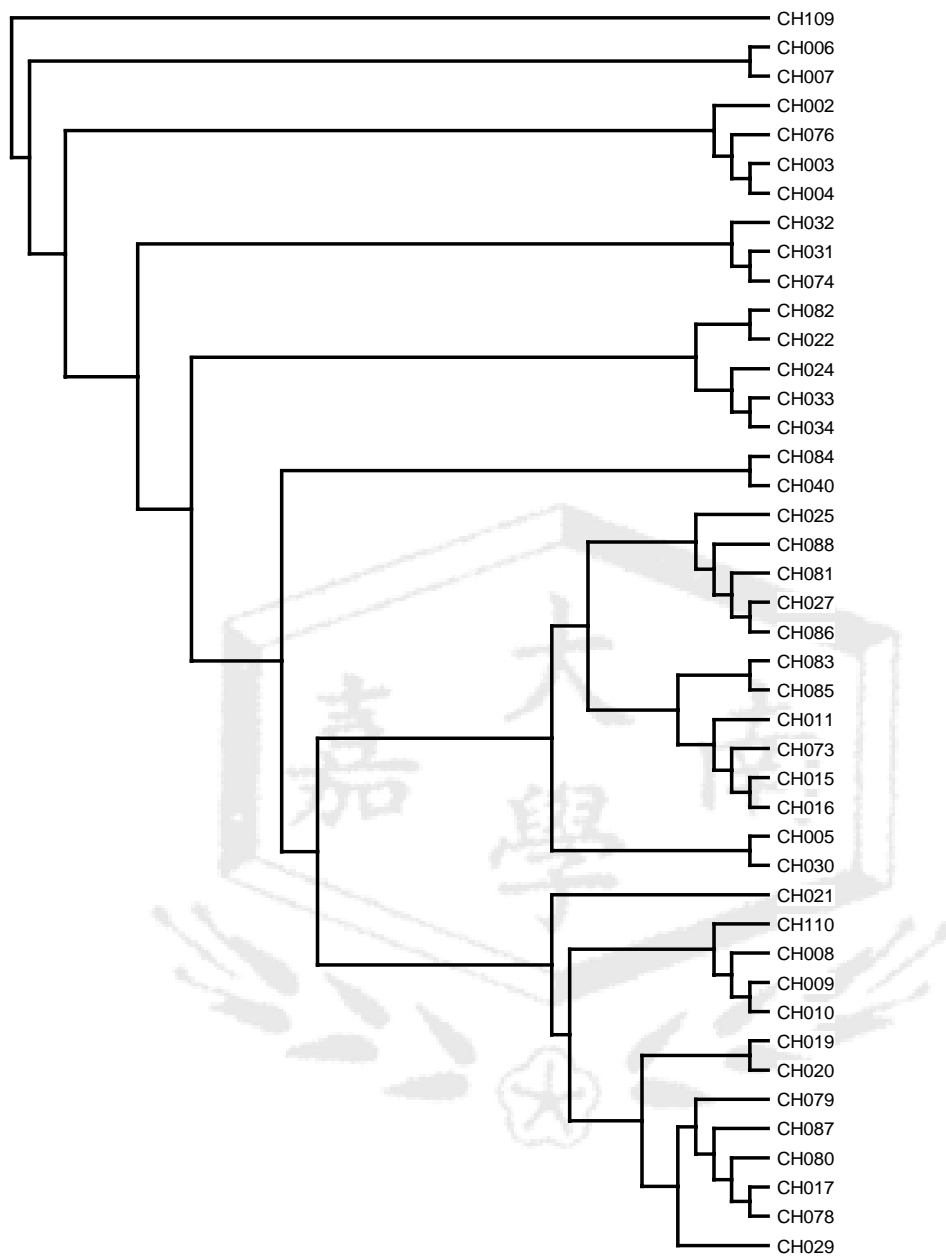
- 許美蓮，1992。陽明山國家公園壺菌目形態、分類學之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。pp.95。
- 王美玲，1994。壺菌之形態分類及不同基質上菌體變異之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。pp.114。
- 陳淑芬，1996。台灣產壺菌目形態、分類之研究。國立台灣師範大學生物研究所博士論文。pp.133。
- 陳淑芬，2000。曾文溪感潮河段海生鞭毛真菌 - 破囊壺菌種類及消長關係研究。國科會專題研究計畫期末報告。計畫編號 NSC 89-2313-B-041-004。
- 陳淑芬，2002。四草生態保護區海生鞭毛真菌相調查及消長關係研究(2/2)。國科會專題研究計畫期末報告。計畫編號 NSC 90-2313-B-041-015。
- Barr, D. J. S. 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Can. J. Bot.* 59:2380-2394.
- Chen, S. F. and C. Y. Chien 1995. Some chytrids of Taiwan (I). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36:235-241.
- Chen, S. F. and C. Y. Chien 1998. Some chytrids of Taiwan (II). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:47-56.
- Chen, S. F., M. L. Hsu and C. Y. Chien 2000.

- Some chytrids of Taiwan (III). Bot. Bull. Acad. Sin. 41:73-80.
- Chen, S. F. and C. Y. Chien 2002. Six proliferous species of *Thraustochytrium* from Taiwan. *Taiwania* 47:106-114.
- Chen, S. F. 2002a. The fluctuation of marine Mastigomycota in estuary tidewater of Tsengwen River. The 7th International Mycological Congress, Oslo, Norway.
- Chen, S. F. 2002b. New records of chytrids from Taiwan. *Fung. Sci.* 17:77-82.
- Karling, J. S. 1977. *Chytridiomycetorum Iconographia*. Lubrecht and Cramer, New York. pp.414.
- Konno, K. 1984. Water moulds from Taiwan. *Bull. Natn. Sci. Mus.* 10(2):87-99.
- Longcore, J. E., D. J. S. Barr, and N. Desaulniers. 1995. *Powellomyces*, a new genus in the Spizellomycetales. *Can. J. Bot.* 73:1385-1390.
- Lozupone, C. A. and D. A. Klein. 2002. Molecular and cultural assessment of chytrids and *Spizellomyces* populations in grassland soils. *Mycologia* 94:411-420.
- Sawada, K. 1919. Descriptive Catalogue of the Formosan Fungi I. *Taiwan Agric. Exp. St. Spec. Bull.*, 695pp.
- Sawada, K. 1922. Descriptive Catalogue of Taiwan (Formosan) Fungi. Pt. II. *Spec. Publ. Coll. Agric., Natl. Taiwan Unvi.*, 173pp.
- Sawada, K. 1943. Descriptive Catalogue of Taiwan (Formosan) Fungi. Pt. IX. *Spec. Publ. Coll. Agric., Natl. Taiwan Unvi.*,
- Sparrow, F. K. 1960. *Aquatic Phycomycetes*. 2nd ed. pp.1187. Univ. of Michigan Press, Ann Arbor.
- Timothy Y. J., D. Porter, C. A. Leander, R. Vilgalys, and J. E. Longcore. 2000. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Can. J. Bot.* 78:336-350.
- Volz, P. A., Y. C. Hsu and C. H. Liu. 1976. The Thraustochytriaceae and other intertidal fungi of Taiwan. *Taiwania* 21(1):1-5.

(表一) 壺菌群多樣性調查記錄結果

序號	目名	屬名	種名	種下命名	分離次數
1	Chytridiales	<i>Rhizophyidium</i>	<i>capillaceum</i>		3
2			<i>chaetiferum</i>		11
3			<i>chlorogonii</i>		1
4			<i>condylosum</i>		3
5			<i>globosum</i>		2
6			<i>haynaldii</i>		3
7			<i>laterale</i>		6
8			<i>macroporosum</i>		2
9			<i>rostellatum</i>		3
10			<i>sphaerocarpum</i>	var. <i>sphaerocarpum</i>	4
11			<i>sphaerotheca</i>		4
12			<i>sp.</i>		22
13		<i>Rhizophlyctis</i>	<i>sp. 1</i>		3
14			<i>sp. 2</i>		1
15		<i>Rhizidium</i>	<i>elongatum*</i>		2
16		<i>Phlyctochytrium</i>	<i>chaetiferum</i>		8
17			<i>planicorne</i>		1
18			<i>sp.</i>		2
19		<i>Rhizoclosmatium</i>	<i>globosum</i>		4
20			<i>hyaliua*</i>		4
21			<i>aurantiacum*</i>		2
22		<i>Chytriomyces</i>	<i>hyalinus</i>		3
23		<i>Diplochytridium</i>	<i>lagenaria</i>		1
24		<i>Cladochytrium</i>	<i>replicatum</i>		8
25			<i>hyalinus</i>		2
26			<i>sp. 1</i>		6
27		<i>Catenochytrium</i>	<i>hemicysti*</i>		1
28	Spizellomycetes	<i>Powellomyces**</i>	<i>variabilis*</i>		2
	2 目	10 屬	23 + (5)種		80+34 株

(註)** 表示新紀錄屬；* 表示新紀錄種



(圖一) 壺菌目的根生壺菌屬 42 個菌株之親緣關係，以小壺菌目的 *Powellomyces variabilis* (CH109) 為外群，PAUP 分析結果顯示此屬可區分為多個分群。