

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 94-00-5-14

人工林不同疏伐強度作業  
對真菌組成結構與多樣性之影響

The effects of thinning on fungal communities and diversity  
in the *Cryptomeria japonica* plantation



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：東海大學生命科學系

中華民國九十四年十二月

九十四年度行政院農業委員會林務局暨所屬機關委託研究計畫

林務局造林研究系列 94-00-5-14 號

研究報告

人工林不同疏伐強度作業  
對真菌組成結構與多樣性之影響

The effects of thinning on fungal communities and diversity  
in the *Cryptomeria japonica* plantation

東海大學生命科學系

汪碧涵

中華民國九十四年十二月

## 目 錄

表目次.....	i
圖目次.....	i
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
研究團隊說明.....	2
一、前言.....	2
國內外研究現況.....	3
二、研究目的.....	9
三、實施地點.....	11
四、重要工作項目及實施方法.....	11
五、本年度完成成果.....	14
六、檢討及建議.....	17
七、參考文獻.....	18
表目次	
表一、蕈菇類樣本 PCR 擴增結果.....	24
表二、植物根部樣本 PCR 擴增結果.....	25
圖目次	
圖一、人工林樣區內菌根真菌採集路線之參考.....	26
圖二、蕈菇子實體形態特徵記錄圖.....	27
圖三、初步測試兩種線截法與兩種小樣區定位區調查法，評估後採 行圓形小樣區定位調查結合小樣區間連結線之調查.....	28
圖四、樣區內定點調查的六個圓形小樣區的位置與連結線調查路線	29
圖五、以紅白斑馬膠帶在一公頃的各樣區內進行圓形小樣區的標示	30
圖六、人倫林道所有樣區位置圖。目前打樁完成 10 個樣區，除易 崩塌的 4、5 樣區外，其他樣區皆已完成調查真菌的圓形樣 區設置.....	31
圖七、研究工作架構圖.....	32

九十四年度行政院農業委員會林務局暨所屬機關委託研究計畫

林務局造林研究系列 94-00-5-14 號

研究報告

人工林不同疏伐強度作業對真菌組成結構與多樣性之影響

The effects of thinning on fungal communities and diversity  
in the *Cryptomeria japonica* plantation

東海大學生命科學系 汪碧涵

### 中文摘要

本研究調查巒大事業區人倫林道人工柳杉林疏伐前後真菌多樣性的變化。本年度主要工作為勘查試驗區，完成七個樣區中各六個小樣區的設置，以及建立調查方法。此外，9 月到 11 月的初步調查中，人工林採集 41 種蕈菇樣本、3 種盤菌樣本、3 種黏菌樣本、3 個土壤樣本、3 種植物樣本及 22 個植物根部樣本，在對照天然林共採集到 5 個蕈菇樣本、2 個土壤樣本、1 種植物樣本及 5 種植物根部樣本。真菌以形態特徵鑑定，攜回之樣本亦分離及萃取 DNA，共獲得 32 個真菌樣本 DNA、4 個植物樣本 DNA 及 27 個根部樣本 DNA，予以保存供判讀分析。

關鍵詞：柳杉人工林、疏伐、真菌

## Abstract

Propose of this study was to monitor fungal community dynamics after thinning in the *Cryptomeria japonica* plantations at Luan-Da working circle. In this year, 40 permanent plots and the investigation methods establishment were the major tasks. During September to December, we collected 41 mushroom species, 3 Discomycetes, 3 slime moulds, 3 soil samples, 3 plant samples and 22 root samples from planted forest; 5 mushroom species and other samples from nature forest. Fungi were identified by morphological characters. DNA of samples were extracted and preserved for analysis as well.

Key words: *Cryptomeria japonica* plantations, thinning, fungi

### 研究團隊說明

本研究計畫之主持人為東海大學生命科學系汪碧涵教授，負責計畫之規劃、工作項目之研擬、人員之分配及調度、計畫進度之控管及報告之撰寫。研究團隊的成員包括本系大學部學生陳文政、王藝婷、楊德芳、高明脩、馬豪聰、谷德予、林郁、田長欣、胡富涵等同學，負責樣區標定與設置、樣區真菌相調查、樣本 DNA 萃取、PCR 擴增與解序、序列比對、實驗資料整理與建檔等工作。

### 一、前言

由於過去造林偏重於造林木之木材利用，因此形成大面積單純林相之林分結構。然而為符合現今人工林永續發展－生態系經營之理念，實有必要對現存之杉木人工林實施疏伐作業，配合林下人工間植或天然更新方式形成混交或複層林，以增加杉木人工林結構之異質度和生物多樣性，達到生態系經營之目的。然而該如何疏伐，不同疏伐處理對生物多樣性及森林功能的影響為何，對原生樹種更新及復育的影響又為何，現今這方面的基本資料極度不足。研擬因應策略，需要精

確之實測資料來作分析依據，本計畫主要目的之一即為取得相關之資料，以做為研擬因應策略之依據。

菌根與 90% 以上的陸生植物形成穩定的、互惠互利的共生體系，對林木的健康與森林生態系統的穩定扮演著舉足輕重的角色。在林業和生態學方面，許多外生菌根在植物引種馴化、菌根化育苗和逆境造林等方面發揮著重要的作用，是發展林業和維持生態平衡不可或缺的生態因子（弓等 1997）。菌根真菌在森林中參與營養循環，與林木形成重要的互利共生關係，維繫林木與森林的活力與健康，不同的菌根在樹木生長的時候扮演不同的角色，而不同的菌根群聚結構也與不同年齡的森林相關，因此，要有效的管理森林裡真菌的多樣性，就必須鑑定森林裡的真菌種類，描述它們在時間和空間的族群結構，以及瞭解人為造成（human-induced）和自然干擾（natural disturbances）這二者對森林裡真菌的動態消長之衝擊（Molina *et al.* 2001）。

這些基礎資料可作為：一、稀有真菌種的保育；二、森林群聚結構變化指標；三、開發真菌的棲地模式等重要研究課題的依據。同時，在了解森林中菌根真菌的多樣性、功能、與群聚變化之生態學後，森林管理者才能將真菌多樣性與功能之考量納入經營管理策略中。

## 國內外研究現況

自然生態系中，大部分的植物養分的獲得受到菌根的強烈影響。菌根在樹木生長時扮演很重要的角色，它們能增進植物對基本養分（特別是磷和氮）以及水分的吸收（Boyd *et al.* 1986, Jones *et al.* 1991）；保護植物抵抗病原菌（Marx 1969, Perrin and Garbaye 1983）和重金屬（Jones and Hutchinson 1986）；結合土壤顆粒，製造有利的土壤組成（Borchers and Perry 1992）；促進地下養分的傳送到植物裡（Simard *et al.* 1997）；以及改變不同種類的植物間的競爭關係（Perry *et al.* 1989）等。在一些溫帶地區和較北方的森林，土壤非常貧瘠，很多養分的取得都是藉由菌根真菌包覆在植物根尖的外鞘，以及它們在土壤之間形成的菌絲網路獲得的（Marschner 1995），譬如松樹，菌根菌和松樹間的關係是絕對必要的，除非松樹的根部被某些菌根真菌拓殖，否則植物無法正常的生長（Read 1998）；但不同的菌根菌種對運輸土壤中的養分至植物，特別是有機氮源的能力則有極大的

差異 (Smith and Read 1997)。在自然環境中，單一樹種與多種的菌根真菌共生 (Molina *et al.* 1992, Bruns 1995)，不同的菌根真菌種類在生態生理能力 (ecophysiological capabilities) 上的差異和各菌根菌種拓殖林中植物的比例影響整個森林的養分循環和樹種結構 (Grogan *et al.* 2000)。對某些植物來說，菌根真菌是否拓殖將關係植物是否能順利生長，也因此，自然環境中的林木種類亦取決於菌根真菌。基於這些理由，在菌根真菌的群聚結構中，真菌種類的組成和分佈是需要被瞭解的。

菌根真菌的群聚結構差異很大，特別是和植物群聚相關 (Bruns 1995)，即使是在單一樹種的森林，也可以發現約有 20-35 個種的真菌 (Bruns 1995)，而有大約 50-60 或是更多的種是普遍常見的 (Danielson 1984, Bruns 1995, Visser 1995, Dahlberg *et al.* 1997)。目前已知存在約有 6,000 種菌根真菌，在地底下形成種類豐富、高度變化和複雜組成的群聚 (Taylor 2002)，這種高度的多樣性可能是由於棲地的分化 (niche differentiation) (Bruns 1995) 所致，而這與宿主專一性 (Monila *et al.* 1992)、樹齡 (Deacon *et al.* 1983, Last *et al.* 1983, Mason *et al.* 1983)、樹幹到根部的距離 (Ford *et al.* 1980, Mason *et al.* 1982, Last *et al.* 1983, Gibson and Deacon 1988) 或是與一些對森林的干擾 (disturbance) (Taylor and Bruns 1999) 相關，這些因子可以解釋何以不同林相內的菌根菌存在著如此不同的多樣性。但是即使是在相同樹齡、單一林相、具有相同干擾因子的森林裡，林地依然可能有土壤化學組成、濕度、腐植質、溫度等差異，所以菌根真菌仍可能存在極大的多樣性。由於菌根真菌的種類和分佈與林木的種類、樹齡和棲地條件 (如土壤類型、腐植質、海拔高度、坡向、坡度、受人為干擾狀況) 等因素有密切的關係，因此，林相演替與菌根真菌的群聚結構相互影響。

早期對於菌根的研究是以觀察靠近植物的根部地表產生的子實體為主，因此，有許多研究以根部子實體的分佈為基礎，描述了菌根種類的豐富度 (richness) 和基本組成 (Bills *et al.* 1986, Deacon and Fleming 1992, Baar and Kuyper 1998)。然而，植物地下根部所感染的菌根真菌群聚組成才是真正與植物營養的獲得直接相關，因此，許多研究轉而直接觀察真菌感染植物根部形成的菌根形態來瞭解其多樣性和群聚結構。

藉由觀察菌根形態，可以鑑定菌根真菌的種類，並計算其豐富度，這個方法

雖然為感染根部的菌根真菌提供了有力的鑑定資料 (Agerer 1987-1996, Goodman *et al.* 1996-1998, Ingleby *et al.* 1990)，但是大部分的菌種其實並沒有辦法只靠菌根形態來加以鑑定。

最近有許多研究顯示，出現在植物根部地表的真菌種類和感染植物根部的菌根真菌組成其實鮮有相關 (Gardes and Bruns 1996, Dahlberg *et al.* 1997, Pritsch *et al.* 1997, Gehring *et al.* 1998, Jonsson *et al.* 1999ab)。

直到分子生物技術的出現，否則我們對土壤中的真菌菌種其菌絲分佈的實際情況一直是不可能得知的。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 對瞭解菌根真菌的多樣性提供了很大的幫助，因為這些真菌不但能被直接的以營養構造鑑定，而且可以迅速處理大量的樣本；這個技術已經被廣泛應用於植物根尖樣本的菌根真菌鑑定 (Dahlberg *et al.* 1997, Eberhardt *et al.* 2000, Gardes *et al.* 1991, Gehring *et al.* 1998, Mahmood *et al.* 1999)。

由於菌根真菌並不是單一演化群 (monophyletic group)，所以菌根真菌的種專一性核酸引子並不存在，因此，在許多研究中，會依據觀察到的菌根形態，再輔以限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 來分析核糖體 rRNA 中的內部間隔轉錄區 (internal transcribed spacer, ITS) 的方法來進行鑑定，目前使用最多的是利用擔子菌的專一性核酸引子對 ITS1F-ITS4B 來擴增子實體 (Buscot *et al.* 2000, Chamber *et al.* 1999, Redecker *et al.* 2001)、菌絲 (Gardes and Bruns 1993, Salazar *et al.* 2000)、被感染植物 (Gardes and Bruns 1993)、含菌根真菌的根尖 (Buscot *et al.* 2000) 或是泥土 (Landeweert *et al.* 2003) 的 DNA。但是通常被篩選的菌根根尖總數中，只有 2-5% 可以分子方法進行鑑定 (Jonsson *et al.* 1999ab, Rosling *et al.* 2003)，菌根真菌的偵測取決於它的原始菌量及其 DNA 萃取和 PCR 擴增後的效率。

Horton and Bruns (2001) 評估分析菌根菌群聚結構的分子生物學方法後認為，雖然以 ITS 片段的 RFLP 類型來做為鑑定雖然有效，但有其限制性。例如，依據現有可獲得的菌根菌孢子體的基因資料庫，仍有許多 RFLP 類型無法找到對應的菌株，而且他們發現：一、產生許多子實體的菌根真菌，在菌根部分並沒有顯著出現，且其出現的相關性極低；二、分析菌根的根尖資料後發現，菌根真菌種類的豐富度遠大於直接分析子實體的資料 (Dahlberg *et al.* 1997, Gardes and

Bruns 1996, Gehring *et al.* 1998, Jonsson *et al.* 1999ab) ，這也可能是採樣方法不同造成的差異所致。

Dickie 等人 (2002) 以尾端修飾限制片段長度多形性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 來分析位於美國賓州單一同齡樹種 (紅松, red pine) 的森林裡垂直分佈的菌根真菌，他們分析四十個重複土壤柱中的四個土壤層，由上而下分別為移開新落葉後的土表植物碎屑層、發酵層、薄腐植質層以及礦物質土壤層，各層約為 1.8 公分。萃取全量土壤 DNA 後，PCR 擴增 ITS 片段，再以 *HinfI*、*HaeIII* 二種限制酵素進行 T-RFLP 分析，部分樣本則另以 *DpnII* 分析，結果發現，全部共有 36 種的 T-RFLP 類型，其中 26 種出現在三次以上，另有 10 種只出現在一或二個樣本中；且不同深度的土壤層中，不同真菌的出現頻率都有差異。根據相關性分析顯示，菌種和分層之間具有明顯相關性；群集分析 (Cluster Analysis) 後則發現，這些菌株在空間分佈上有六種不同的類型，目前已知的菌根真菌菌種也被分在這六群之中，這個研究成果支持了菌根真菌在林地中的棲地分佈是垂直分佈的這個概念。

Guidot 等人 (2002) 調查了法國西南部座落於波爾多 (Bordeaux) 西方 50 公里處的松樹林 (*Pinus pinaster*) 土壤中菌根菌 *Hebeloma cylindrosporum* 的分佈情形。他們將 25 平方公尺的區域劃分為 25 小格，每小格取一土樣；另在其中有 24 個子實體群存在的小區域內，於 1 平方公尺的面積內劃分為 16 小格，每小格再取一土樣，各收集 10 立方公分的土壤，去除長根和較大的有機碎屑後，萃取 DNA 進行偵測。結果發現，地下部的菌絲被偵測到與子實體出現的位置極近，超過 50 公分遠的土壤中即無法測得此菌的存在。

Landeweert 等人 (2003) 選取瑞士北部 Svartberget 森林研究站附近三個地點的土壤採取土樣，各採樣點彼此距離 6 公尺，每點各採集三個土柱。每個土柱垂直分成四層，分別為有機層 (O 層, 0-3 公分)、殘積層 (E 層, 3-18 公分)、肥沃層 (B 層, 18-35 公分) 以及底部的 C 層 (大於 40 公分)，由土柱的各層中心以小刀小心選取一小立方塊的土壤後過篩 (1 釐米網篩)。由過篩土樣中分離出植物根尖，O 層土壤並鏡檢確認根尖已移出後，再取各分層的土壤 5 克進行 DNA 萃取，然後以 PCR 擴增 ITS 片段後將產物進行選殖 (cloning) 並解序，由 12 個土壤樣本中，每個樣本選擇 30 個選殖株 (clone) 解序分析後，共獲得 318

個序列。結果發現，土壤中得到的許多序列比對後皆與菌根真菌的序列相似，所有獲得的序列最後統整成為 29 個 OTU。各層土壤由於深度不同，因此也具有不同的物理化學性質，氧氣與二氧化碳的濃度、pH、可溶性的鋁離子 ( $Al^{3+}$ )、濕度和有機質含量等都可能影響真菌菌種的分佈，所以可以看到菌種並非平均等量分佈於各層土壤中，例如菌根菌 *Hebeloma* 或 *Suillus* 菌種被發現在 B 礦物層，其碳含量很高；*Cortinarius*、*Dermocybe*、*Tylospora* 和 *Laccaria* 菌種則被發現在 E 層，其碳含量極低。在各層中，可獲得的有機和礦物的養分差異很大，因此存在的菌種與其利用有機與無機養分的能力相關。比較選殖的序列與根尖分析的序列卻發現，二者之間非常不同，例如由泥土 DNA 中得到的 *Dermocybe* 出現在泥土的 E1 和 E2 層，但卻在 O 層的菌根出現；*Lactarius* 在泥土的 E2 層出現，但卻在 B1 層的菌根出現。雖然二者取樣來自同一個地點的樣本，但是土層萃取的 DNA 與菌根的樣本並非同一個來源，所以造成這個結果。

Landeweert 等人 (2005) 另曾研究過存在於土壤的菌根真菌與存在植物根尖的菌根真菌之差異。他們選擇在荷蘭中部一個主要為蘇格蘭松 (scots pine) 的森林，此森林曾在 1994 年移除落葉層，並在 1998 年監測過菌根菌子實體的產生 (Schmidt, 1999)。在 15 平方公尺的區域內，選取 6 株 2 到 3 年生的蘇格蘭松幼苗，將整株植物及根部土柱 (直徑 6 公分，深度 10 公分) 取出，土壤先以 2 釐米網篩過篩移除植物根尖後，再取 50 克另以 1 釐米和 0.3 釐米的網篩過篩，根尖則置於磷酸鈉緩衝液中研磨。將 50  $\mu$ l 的根尖緩衝液以及 0.5 克土壤分別萃取 DNA 後，以 PCR 擴增 ITS 片段，再結合變性梯度凝膠電泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 進行分析，結果發現，所有樣本中共有 14 個 band，其中有 11 個 band 在植物根尖和土壤中都存在，其他 3 個 band 則只存在土壤中。解序之後得知，14 個 band 中有 8 個為已知的菌種序列，其中 7 個與已知的菌根真菌序列如 *Rhizopogon*、*Cortinarius*、*Clavulina*、*Cryptococcus* 和 *Lactarius* 等相符合。作者因此認為，由植物根尖和全量土壤 DNA 二種分析方法所獲得的菌根真菌種類多樣性，其實是高度相關的；而由土壤 DNA 分析所獲得的豐富度甚至高於以根尖分析的結果。

Valentine 等人 (2004) 在南奧勒岡 (southern Oregon) 的 Whetstone Savanna 保留區內，調查主要樹種奧勒岡白橡樹 (*Quercus garryana*, Oregon white oak)

的外生菌根 (ectomycorrhizas) 多樣性。他們由植物成株、幼苗和子實體附近採集 2 公分直徑，25 公分長的土壤，每棵樹由四個方向採集 8 個土樣，一共採了 20 棵樹 160 個土樣。他們萃取了 700 個外菌根的 DNA，PCR 擴增 ITS 片段後，以 *HinfI*、*TaqI* 和 *AluI* 三種限制酵素作用，最後依據菌根形態和限制酵素片段多型性分析描述了 39 種外菌根真菌。

一些森林管理的行為，例如大規模砍伐樹木 (clearcutting) 等會降低外生菌根真菌的多樣性以及影響森林再復育的消長，而且由於疏伐 (Thinning) 程度的不同，光照、溫度和濕度皆會改變，Luoma 等人 (2004) 因此推測，疏伐對根部接近地面 (epigeous) 生長的子實體產生的影響將大於在地下環境 (hypogeous) 生長的子實體；且由於外生菌根依賴樹木獲得碳的來源，因此子實體的產生將於疏伐相關。Amaranthus 等人於 2004 年首先研究了疏伐對外生菌根真菌子實體的產生的影響，以北美山區常見的針葉樹花旗松 (Douglas-fir) 為主，在華盛頓州和奧勒岡州二地選擇了 6 個植滿花旗松的區塊，分別調查了四種不同程度 (15%、40%、75% 及 100%) 的綠木留存 (green-tree retention) 方式，以及聚集 (aggregated) 和分散 (dispersed) 二種留存方式 (15% 和 40% 的疏伐區塊) 的外生菌根子實體產生情形；在每一個 1 公頃的區塊中，根據坡度的不同作者選擇 6 條線狀區域 (2 公尺 \* 50 公尺) 勘查外生菌根子實體，地下子實體松露 (truffles) 則調查 25 個 4 平方公尺的區域，並於春秋二季分別調查。結果發現，各區域疏伐前真菌總數範圍在 58 至 72 之間，松露則在 22 到 29 之間，100% 留存後真菌總數下降了 34%，松露總數則增加了 20%；75%A 的留存方式真菌總數下降了 54%，松露總數則下降了 16%；40%D 的留存方式真菌總數下降了 62%，松露總數則下降了 40%；40%A 的留存方式真菌總數下降了 72%，松露總數則下降了 48%；15%D 的留存方式真菌總數下降了 90%，松露總數則下降了 65%；15%A 的留存方式真菌總數下降了 78%，松露總數則下降了 55%。若以季節來看，與其他處理相較之下，春季的所有真菌產量以 15%D 衰退最多，且所有留存處理都使松露產量明顯降低；秋季則以 40%A、15%D 和 15%A 三個處理使真菌產量明顯下降，40%D 無影響，松露在 40%A、15%D 和 15%A 三個處理下產量亦明顯降低，但 40%D 對其亦無影響。一般說來，15%D 和 15%A 對所有真菌產量的影響最大，40%A 對春季真菌產量影響較大，40%D 的處理則只對春季松露

的產生有影響，75%A 則在春季松露產量和秋季所有真菌產量上有差異。作者認為，40%的綠木留存率將維持最高量的菌根真菌子實體產量，在以生態系為基礎的森林管理上，若要發展科學化的造林技術，仍須持續研究菌根與森林之間的關係。

國內對菌根真菌的研究多半偏重於特定菌根真菌在農業方面的應用，多樣性的調查較少。近年來，特有生物中心陳建名等人所做的調查於“省產外生菇菌”（1984）一書中描述台灣 14 屬 45 種外生菌根菌，民國 77 年度的林務局森林資源保育計畫中，胡（1988）曾調查淡水地區紅樹林生態之菌根真菌，記錄有 18 種菌根真菌，其中 8 種為新種，另有 6 種不確定學名，但並未有正式的文獻發表。國立自然科學博物館吳聲華等人於 1995 至 1996 年調查玉山國家公園濁水區真菌相，共獲得 147 種大型真菌，另外在“台灣高等真菌”（1996）一書中也詳述了 154 種真菌的構造和外形，陳昇明等人於關刀溪調查中海拔落葉林大型真菌，張東柱等人於福山樣區調查北部低海拔常綠闊葉林之大型真菌，記錄 47 種子囊菌和 228 種擔子菌，周文能則調查蓮華池樣區，為中部低海拔常綠闊葉林，採得 276 種擔子菌，內含共生菌根菌 58 種。由於菌根菌生長週期短暫，對環境較敏感，蓮華池與福山區的相似度為 29.3%，低於與南仁山區的 43.1%，在南仁山區與福山植物園的共生樹種組成較相似，氣候則蓮華池與南仁山區較相似。基於國內對菌根真菌多樣性的研究較少，疏林對菌根真菌的影響等相關研究更是付之闕如，因此在生態研究和森林經營上，了解疏林和菌根真菌間的關係就變得益形重要。本研究擬針對巒大事業區 74、75、76 林班地內的主要樹種柳杉的菌根真菌多樣性進行調查，並調查在不同程度的疏林砍伐後對真菌資源造成的影響。

## 二、研究目的

本研究自 94 年起分年研究巒大事業區人倫林道人工柳杉林的真菌相與菌根菌多樣性，藉著對真菌子實體的調查鑑定記錄和根尖菌根真菌的鑑定，先行了解疏伐前柳杉林的菌相及建立真菌調查方法，並比較不同樣區間的菌相差異，為後續研究之分析基礎，以了解台灣本土菌根真菌的資源及其多樣性。

巒大事業區林相整齊，主要樹種為柳杉，栽種面積在 78 公頃以上，是目前台灣造林最成功的區域之一。本研究在巒大事業區設立樣區，先調查真菌多樣性，另以較長時段研究林相自然更替下真菌群聚結構的自然演替，監測不疏伐、25%輕度疏伐以及 50%重度疏伐等三個不同疏伐程度的人工林棲地中真菌相的變化，期能瞭解不同疏伐結果對巒大事業區林相變化的影響，是否也影響到其中的真菌資源，研究方法包括林間蕈菇類子實體調查及菌根形態分群。

由於菌根真菌的子實體生長受控於溫度、水分及光照等因素，並不能真正反映植物根部的菌根真菌群落，因此本研究除調查子實體與以菌根形態分群外，另採核酸分析方法進行菌根真菌的鑑定與分類。

#### (一) 本年度目標

1. 勘查設置樣區
2. 建立調查方法

##### (1) 採樣方法的建立

(2) 蕈菇類鑑定：形態特徵和核酸分析方式並重，並分析真菌、菌根及土壤。

3. 撰寫報告

#### (二) 第二年目標

1. 全年調查樣區內真菌相，建立疏伐前基礎資料庫。
2. 撰寫報告。

#### (三) 第三年目標

1. 開始調查疏伐後的真菌相。
2. 分析不同疏伐度及其他因子對真菌相的影響。
3. 撰寫報告

### 三、實施地點

巒大事業區介於東經 120°48'至 121°09'，北緯 23°28'至 23°55'之間，行政轄區屬南投縣信義鄉、水里鄉和魚池鄉。東北與埔里及丹大事業區相鄰，東接秀姑巒事業區，南與台大實驗林及原住民山坡地保留地相接。全區地形以中央山脈為高點向西傾斜，西北向較平坦。山系由巒大山山系組成，由南而北綿延分歧於陳有蘭溪，郡大溪和巒大溪形成山勢崢嶸之形式，東向及東南側則為中央山脈之主脈，由台灣最高峰玉山山系北上綿延而來，經八通關而進入本事業區。

主要的溪流巒大溪、郡大溪和陳有蘭溪，以中央山脈為制高點，向北、向西延伸。郡大溪自秀姑巒山北向往北流，其間有巒大溪由東南方向西北匯入，與東而來的丹大溪向西流而與陳有蘭溪會合，注入濁水溪本溪。此外第 28、29、30 林班水系流入日月潭。本事業區林地覆蓋良好，涵養充足水源，巒大溪、郡大溪經年水流不斷，但因陳有蘭溪西側有山地保留地之開墾農作，造成林地裸露，以及開闢新中橫道路，再加上 921 地震後土壤結構改變，所以每遇豪大雨極易造成崩塌及土石流的情形。

本計畫實施地點於巒大事業區第 74、75、76 林班地之人造柳杉林保留區內，區域平均海拔約 1300 公尺，年平均降雨量約 2404 mm，平均氣溫 19.2°C（中央氣象局日月潭氣象站氣候資料）。永久樣區設於人倫林道 17.5 Km 後的柳杉造林地，卓棍溪上游分支處坡面。

### 四、重要工作項目及實施方法

#### （一）重要工作項目

1. 疏伐前真菌相調查計畫書編擬
2. 樣區勘查與設置
3. 建立真菌相調查方法
4. 資料整理與分析、報告撰寫

## (二) 實施方法與步驟

### 1. 樣區建立

於巒大事業區人倫林道選取特有植物柳杉作為研究對象。在人工林內挑選樹齡相近（約二十年左右）之杉木林，以一公頃面積為單位設立試驗樣區，建立之試驗樣區預備分別進行 25% 輕度疏伐及 50% 中度疏伐及不疏伐對照共三個處理，每個處理三重覆，共計十二個試驗樣區。勘查一公頃樣區，測試直線橫截樣區（穿越線 line transect，線截法）調查和定位調查的可行性評估。

### 2. 蕈菇子實體調查與採樣

定期調查記錄柳杉林產生的蕈菇種類，在野外進行子實體調查的時候，新鮮樣本需完整記錄顏色、氣味等資料，詳細記錄每個種的著生基質、分佈、頻率和數量等，再依調查狀況將分佈頻率與分佈數量區分等級。

除採集真菌子實體外，並挖取真菌周圍土樣約 50 公克，以及採集植物的根攜回實驗室後，子實體根據圖鑑進行初步分類至屬的階層，然後再根據各屬的顯微特徵鑑定至種。由於菌種鑑定不易，需請不同類群真菌之真菌學家指導與協助，待熟悉這些真菌子實體的特徵與種類，之後便毋須採樣而以紙筆記錄調查結果，以保護林中的真菌族群；若有不同於以往發現的蕈菇出現，再攜回實驗室鑑定。

### 3. 樣本處理

#### (1) 植物樣本

參考 Dolye 和 Doyle (1990) 的方法萃取採集之植物樣本 DNA。取植物葉片切小塊置於微量離心管 (eppendorf) 中，加入適量金剛砂，以研磨棒 (pestle) 研磨後，萃取 DNA。在微量離心管中加入已於 65°C 預熱的 500  $\mu$ l CTAB 萃取緩衝液 (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% PVP-40 [w/v], 20 mM cetyl trimethyl ammonium bromide [CTAB]) 後，於 65°C 加熱 10 分鐘，再加入等體積的 dichloromethane/isoamyl alcohol (24:1)，輕緩混合後，以桌上型超高速微量離心機 (centrifuge 5415c, Eppendorf, Germany) 14,000 rpm 離心二分鐘。取出上層液，加入 0.6 倍體積的異丙醇 (isopropanol) 沈澱 DNA，輕緩混合後，再以

14,000 rpm 離心二分鐘，倒掉上清液。沈澱物加入 500  $\mu$ l wash buffer (76% ethanol, 10 mM ammonium acetate) 清洗，靜置二分鐘後，再以 14,000 rpm 離心二分鐘，倒掉上清液以去除鹽類物質。將微量離心管內的 DNA 置於無菌操作台吹乾後，以 20  $\mu$ l 無菌水加以溶解，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### (2) 蕈菇類子實體

攜回之蕈菇類真菌樣本切取蕈柄部分，以 70% 酒精表面消毒後，切成小塊，同上述步驟進行 DNA 萃取，凍存於  $-20^{\circ}\text{C}$  備用。

#### (3) 菌根

土壤樣本先去除土壤大顆粒，將植物根部移出，以解剖顯微鏡進行細部觀察，有類似真菌感染植物形成的菌根構造時，記錄形態特徵如根尖平鈍、多重分支、有色菌毯或菌絲發散等等加以區分，再加以拍照記錄。

菌根表面消毒後，切取至微量離心管內，同上述步驟進行 DNA 萃取，再凍存於  $-20^{\circ}\text{C}$  備用。

#### (4) 土壤

移除植物根部組織及菌根的土壤樣本，置於室溫下陰乾，使用 UltraClean Soil DNA Kit (Mo Bio Labs, USA) 進行 DNA 萃取。取 0.5 克至 1.0 克的土壤加入 2 毫升的 glass bead solution tube 中 (若土壤含水量太高，可先將 tube 中的 beads 和 solution 取出，將土壤置入後離心數次，直到土量約為 1.0 克即可，然後再將 solution 等倒回)，震盪 5 秒後，加入 60  $\mu$ l SI solution 和 200  $\mu$ l IRS solution，全速震盪 10 分鐘，再以 10,000 rpm 離心 30 秒，取出 450  $\mu$ l 上清液，加入 250  $\mu$ l 的 S2 solution，再震盪 5 秒鐘後冰浴 5 分鐘，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，取出上清液 500  $\mu$ l，加入 900  $\mu$ l 的 S3 solution，震盪 5 秒後，取 700  $\mu$ l 溶液加至 spin filter，10,000 rpm 離心 1 分鐘後倒掉離心液，再取剩下的 650  $\mu$ l 溶液加至 spin filter，10,000 rpm 離心 1 分鐘後倒掉離心液，加入 300  $\mu$ l 的 S4 solution，10,000 rpm 離心 30 秒後倒掉離心液，以原速再離心一分鐘後，取出 spin filter 至新的離心管，加入 50  $\mu$ l 的 S5 solution，以 10,000 rpm 離心 30 秒後，所得的離心

液即為土壤全量 DNA。

#### 4. PCR 擴增及 RFLP 分析

增量複製植物根尖及土壤樣本中含有的菌根菌 rDNA 中的 ITS 區域，選用擔子菌根菌的廣效性引子對 ITS1F (5' -CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') 及 ITS4B (5' -CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG- 3') (Gardes and Bruns 1993) 並參考 Wang 等人 (2003) 的方法進行 PCR 增幅反應。每 100  $\mu$ l PCR 反應液中含引子各 100 nM，4 U *Taq* polymerase (MBI Fermentas, Lithuania)，50  $\mu$ M dNTPs (Roche, Germany) 及 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 及 50 ng DNA 模版。反應以溫度循環控制器進行 40 個循環，DNA 在 94°C 之下變性，第一個循環作用二分鐘，之後各循環各作用一分鐘，58°C 下引子煉合 20 秒，72°C 延展 10 秒。PCR 產物先取 5  $\mu$ l，以 0.5X 的 TBE 緩衝溶液，在 1.2% 電泳膠體 (Agarose, Amresco, USA) 上，以 100 V 電壓電泳 40 分鐘，與 50-bp 分子量標幟 (MBI Fermentas) 比對產物的分子量大小，經 ethidium bromide 染色後，在 UV 光下照相記錄。

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

#### 5. 菌種鑑定及菌根菌分析

將土樣、植物菌根及子實體經 PCR 分析後所獲得的主要亮帶 (band) 溶洗 (elute) 出來後直接解序，所得序列以 Blast 與 GenBank 中的所有序列資料比對後，獲得相關菌株資料，鑑別出主要的菌根菌種。包含植物、菌根和土壤獲得的所有序列資料交叉比對後，確認所發現的蕈菇子實體是否為菌根菌，以釐清菌根菌與植物間的共生關係，及了解台灣菌根真菌的多樣性。

## 五、本年度完成成果

### (一) 初步測試及建立樣區真菌多樣性之研究方法

參考 Mueller 等人 (2004) 的方法，初步建立採集菌根真菌多樣性時的採樣方法，以直線橫截樣區方式穿越已設立好的樣區（一公頃樣區，橫軸為 100 公尺，縱軸亦為 100 公尺）進行真菌採集（圖一）。採集到的樣本，再參考 Lodge 等人 (2004) 的記錄方法（圖二）先記錄外觀形態特徵資料，再保存於採樣袋中。

實際執行採樣工作後，發現由於樣區林下植被非常茂密，進行直線穿越樣區的方式採樣時，在某些無法打樁的特定點上，會因為樁點不在而難以辨認。參考文獻及與專家會商討論後，分析四種可行的採樣方法（圖三）：一、每一公頃樣區，以直線穿越方式 100 公尺進行觀察並採集樣本，每一樣區分別以三條路線進行穿越線採樣。二、每一公頃樣區，以直線穿越 50 公尺方式進行觀察並採集樣本，每一樣區分別以六條路線進行穿越線採樣。三、以現有樁點為軸，另行打樁，區劃出邊長為 10 公尺的正方形樣區，每一公頃樣區中分別設立六個正方形樣區。四、以現有樁點為圓心，區劃出直徑為 10 公尺的圓形小樣區，將位於圓周上的樹木以紅白斑馬膠帶進行標記，每一公頃設置六個圓形小樣區。經各方法的實地勘查試作，評估考慮樣區的代表性及實際執行的困難度，決定整合穿越線調查與圓形樣區定位調查的模式，於各樣區內分別設立直徑十公尺之圓形小樣區六個，座標軸分別為 A (1, 1)、B (2, 2)、C (3, 3)、D (4, 2)、E (4, 4)、F (1, 4)（圖四），圓形樣區內採定位調查，各圓形樣區間則採穿越線調查。目前已完成打樁的樣區，除了易崩塌的第四和第五樣區外，其餘皆已完成樣區的標示（圖五，圖六）。

## （二）蕈菇類真菌相之調查

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

不論是初期的直線穿越樣區方式，或是最後評估後決定的圓形樣區配合直線穿越方式，在發現有真菌子實體的地方，記錄座標軸橫軸與縱軸位置，並設立標記予以標定。第一次發現的蕈菇類真菌，採集子實體至少二個，攜回實驗室後一

個烘乾做為永久保存標本，可以觀察形態特徵及其孢子等顯微構造，另一個則萃取 DNA 做為分子分析用。所有發現的蕈菇類真菌均做成檔案記錄，日後採集若發現有重複出現的真菌，僅記錄出現的頻率及數目，不再採集，以保存自然環境之菌根真菌資源。另在發現可能為菌根真菌子實體的地方，採集土壤中的植物根部，攜回實驗室中以解剖顯微鏡觀察，拍照記錄其形態，並萃取其 DNA。所獲得的 DNA 樣本以 PCR 擴增後，進行 RFLP 分析，將不同 RFLP 類型的菌株挑選出來，進行核酸序列分析，以便與 GenBank 資料庫中的序列資料進行比對。

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

攜回之樣本經分離處理、表面消毒後，進行 DNA 萃取，共獲得 32 個真菌樣本 DNA、4 個植物樣本 DNA 及 27 個菌根樣本 DNA。所獲得的 DNA 樣本廣效性引子對 ITS5/ITS4 進行 PCR 擴增後，可以得到一條約 700 bp 的亮帶，部分菌株 DNA 則無法藉 PCR 擴增出產物。未能擴增產物的樣本 DNA，再另以擔子菌的廣效性引子對 ITS1F/ITS4B 進行 PCR 增幅後，幾乎都能增幅出產物（表一）。但由萃取得到的植物根部 DNA，不論是以廣效性引子 ITS5/ITS4 或是 ITS1F/ITS4B 進行 PCR 擴增時，都無法獲得產物；甚至以 ITS1F/ITS4B 進行 booster PCR 再一次擴增都無法獲得產物，表示目前採到的植物根部樣本中可能都未含菌根真菌，或是菌根真菌的量極低，無法以現在的 PCR 方式偵測到（表二）。目前根據我們的實地調查，在柳杉林中都沒有發現任何外生菌根菌，以 PCR 方式對根部 DNA 進行擴增也沒有得到真菌的產物，初步驗證了文獻中沒有柳杉外生菌根菌之記載。

將得到的 PCR 產物進行解序，共獲得 15 個真菌的核酸序列。將這些核酸序列上網至 NCBI 的 GenBank 資料庫中，以 Blastn 與其中的序列資料進行比對，序列的片段大小相近而可以完全比對的 DNA 序列資料共有 5 筆，其他則由於比對出來所得數值太低，完全無法以序列資料輔助鑑別，仍需進一步鑑定。真菌的

DNA 序列可協助進行真菌菌種的確認，另一方面則交叉比對植物、菌根和真菌的 DNA 資料，可以幫助釐清所採子實體是否為菌根菌，以了解台灣菌根真菌之多樣性。比對出來的菌根真菌，可建立 ITS-RFLP 圖譜，累積做為台灣菌根真菌的多樣性資料，方便日後比對分析，用以調查人倫林區：(1) 真菌的多樣性及確認其中的外生菌根真菌，調查分析它們的豐度 (species richness)、頻率 (frequency) 等多樣性因子；(2) 分析疏伐、微氣象、地形等環境因子對真菌多樣性的影響；(3) 預期將發現新紀錄種或新種真菌，進行真菌系統分類學研究 (圖七)。

## 六、檢討與建議

執行本年度計畫遭遇如下問題：

- (1) 交通運輸吃力。
- (2) 十二公頃樣區調查真菌需大量人力，尤其三到六月出菇期，調查耗時費力恐不易支應，可能需適度刪減調整樣區設計。
- (3) 真菌物種繁多，鑑定非專精之學者方能正確完成，目前缺乏鑑定能力與經驗，需有各真菌類群的分類專家參與或協助指導。
- (4) 目前在人倫林道柳杉林中尚未發現外生菌根菌，以 PCR 方式對根部 DNA 進行擴增也沒有得到真菌之產物，初步驗證文獻中沒有柳杉外生菌根菌之記載。但在疏伐後林相改變，預期將會使外生菌根菌的種類隨之增加。
- (5) 本研究已完成人倫林道真菌資源調查基本樣區的設置，期望自明年起能持續累積此地區的真菌菌相與生態資料，95 年獲得疏伐前全年的基礎資料，將可供疏伐後林相變化復育過程中，真菌之族群結構變遷研究比較。這些基礎資料可提供：一、森林群聚結構變化之指標真菌；二、人工林真菌多樣性與生態研究；三、稀有真菌種的保育；四、開發真菌棲地模式；五、人工林生態系經營及生物多樣性保育之參考。

## 七、參考文獻

- 于富強、劉培貴. 2005. 雲南松林野生食用菌物種多樣性及保護對策. 生物多樣性 13(1): 58-69.
- 弓明欽、陳應龍、仲崇祿. 1997. 菌根研究及應用. 中國林業出版社, 北京, 中國.
- 周文能. 2000. 蓮華池分所泛傘菌類的資源調查. 真菌學會會刊 15(1, 2): 27-30.
- 胡弘道. 1988. 紅樹林生態與菌根相關性之研究土壤性質、菌根菌種類與菌根形態. 林務局網頁資料([http://www.forest.gov.tw/web/case/case-main\\_02\\_01.htm](http://www.forest.gov.tw/web/case/case-main_02_01.htm).)
- Agerer R. 1987-1996. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch-Gmünd, Germany.
- Arnold E, Vries BD. 1993. Conservation of fungi in Europe. In: Pegler DN, Boddy I, Ing B, Kirk P M, editors. Fungi of Europe: Investigation, Recording and Conservation. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 211-230.
- Baar J, Kuyper TW. 1998. Restoration of aboveground ectomycorrhizal flora in stands of *Pinus sylvestris* (Scots pine) in The Netherlands by removal of litter and humus. Restoration Ecology 6(3): 227-237.
- Baum C, Stetter U, Makeschin F. 2002. Growth response of *Populus trichocarpa* to inoculation by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in a pot and a field experiment. Forest Ecology and Management 163(1-3): 1-8.
- Bills GF, Holtzman GI, Miller OK. 1986. Comparison of ectomycorrhizal-basidiomycete communities in red spruce versus northern hardwood forests of West Virginia. Canadian Journal of Botany 64: 760-768.
- Borchers JG, Perry DA. 1992. The influence of soil texture and aggregation on carbon and nitrogen dynamics in southwest Oregon forests and clearcuts. Canadian Journal of Forest Research 22: 298-305.
- Boyd R, Furbank RT, Read DJ. 1986. Ectomycorrhiza and the water relations of trees. In: Gianinazzi-Pearson Y, Gianinazzi, S, editors. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiology and Genetics, INRA, Paris, France. pp: 689-693.
- Bruns TD. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 170: 63-73.
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R. 2000. Recent

- advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24(5): 601-614.
- Chambers SM, Williams PG, Seppelt RD, Cairney JWG. 1999. Molecular identification of *Hymenoscyphus* sp. From rhizoids of the leafy liverwort *Cephaloziella exiliflora* in Australia and Antarctica. *Mycological Research* 103: 286-288.
- Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE. 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below-ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Canadian Journal of Botany* 75: 1323-1335.
- Danielson RM. 1984. Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in northeastern Alberta. *Canadian Journal of Botany* 62: 932-939.
- Deacon JW, Fleming LV. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Allen MF, editor. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, NY, USA. pp 249-300.
- Deacon JW, Donaldson SJ, Last FT. 1983. Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant and Soil* 71: 257-262
- Dickie IA, Xu B, Koide RT. 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* 156(3): 527-535.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Eberhardt U, Oberwinkler F, Verbeken A, Rinaldi AC, Pacioni G, Comandini O. 2000. *Lactarius* ectomycorrhizae on *Abies alba*: morphological description, molecular characterization, and taxonomic remarks. *Mycologia* 92(5): 860-873.
- Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genomic Sciences, University of Washington, Seattle, Washington, USA. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>
- Ford ED, Mason PA, Pelham JP. 1980. Spatial patterns of sporophore distribution around a young birch tree in three successive years. *Transactions of the British Mycological Society* 75: 287-296.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and species. *Molecular Ecology* 2 (2): 113-118.
- Gardes M, Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74: 1572-1583.

- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180-190
- Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79(5): 1562-1572.
- Gibson F, Deacon JW. 1988. Experimental study of establishment of ectomycorrhizas in different regions of birch root systems. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 239-251.
- Goodman DM, Durall DM, Trofymow JA, Berch SM. 1996-1998. A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae. Mycologue Publications and Canada-B.C. Forest Resource Development Agreement, Canadian Forest Service, Victoria, B.C., Canada.
- Goodman DM, Durall DM, Trofymow JA, Berch SM. 2002. British Columbia Ectomycorrhizal Research Network (BCERN): Concise descriptions of North American ectomycorrhizae (CDE). ([http://www.pfc.forestry.ca/biodiversity/bcern/cde/index\\_e.html](http://www.pfc.forestry.ca/biodiversity/bcern/cde/index_e.html))
- Grogan P, Baar J, Bruns TD. 2000. Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology* 88(6):1051-1062.
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. 2002. Spatial distribution of the below\_ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiology Ecology* 42(3): 477-486.
- Horton TR, Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV. 1990. Identification of ectomycorrhizas. HMSO, London, UK.
- Jones MD, Hutchinson TC. 1986. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytologist* 102: 429-442.
- Jones MD, Durall DM, Tinker PB. 1991. Fluxes of carbon and phosphorus between symbionts in willow ectomycorrhizas and their changes with time. *New Phytologist* 118: 99-106.

- Jonsson L, Dahlberg A, Nilsson MC, Zackrisson O, Karen O. 1999a. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Molecular Ecology* 8(2): 205-215.
- Jonsson, L, Dahlberg, A, Nilsson, MC, Karen, O, Zackrisson, O. 1999b. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist* 142(1): 151-162.
- Landeweert R, Leeflang P, Smit E, Kuyper TW. 2005. Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. *Mycorrhiza* 15: 1-6.
- Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 327-333.
- Last FT, Mason PA, Wilson JJ. 1983. Fine roots and sheathing mycorrhiza: their formation, function and dynamics. *Plant and Soil* 71: 9-21.
- Lodge DJ, Ammirati JF, O'Dell TE, Mueller GM. 2004. Collecting and describing macrofungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. (eds.) *Biodiversity of Fungi- Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, MA, USA. p. 146.
- Luoma DL, Eberhart JL, Molina R, Amaranthus MP. 2004. Response of ectomycorrhizal fungus sporocarp production to varying levels and patterns of green-tree retention. *Forest Ecology and Management* 202: 337-354.
- Mahmood S, Finlay RD, Erland S. 1999. Effects of repeated harvesting of forest residues on the ectomycorrhizal community in a Swedish spruce forest. *New Phytologist* 142: 577-585.
- Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants, Second Edition*. Academic Press, London,UK. p 889.
- Marx DH. 1969. The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Mason PA, Last FT, Pelham J, Ingleby K. 1982. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). *Forest Ecology and Management* 4: 19-39.
- Mason PA, Wilson J, Last FT, Walker C. 1983. The concept of succession in relation to

- the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil* 1: 247-256.
- Molina R, Massicote H, Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF, editor. *Mycorrhizal Functioning: an Integrative Plant-Fungal Process*. Routledge, Chapman and Hall, New York, USA. pp. 357-423.
- Molina P, Pilz D, Smith J, Dunham S, Dreisbach T, O'dell T, Castellano M. 2001. Conservation and management of forest fungi in the Pacific Northwestern United States: an integrated ecosystem approach. In: Moore D, Nauta MM, Evans SE, Rotheroe M, editors. *Fungal conservation, issues and solutions*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 19-63.
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS. 2004. *Biodiversity of Fungi-Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, MA,USA.
- Pera J, Alvarez IF, Rincon A, Parlade J. 1999. Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9(2): 77-84.
- Perrin R, Garbaye J. 1983. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infested soils and substrates. In: Atkinson D, editor. *Tree root systems and their mycorrhizas*. Nijhoff/Junk, The Hague, Boston, USA.
- Perry DA, Margolis H, Choquette C, Molina R, Trappe JM. 1989. Ectomycorrhizal mediation of competition between coniferous tree species. *New Phytologist* 112: 501-511.
- Pritsch K, Boyle H, Munch JC, Buscot F. 1997. Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytologist* 137(2): 357-369.
- Read DJ. 1998. The mycorrhizal status of *Pinus*. In: Richardson DM, editor. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 324-340.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD. 2001. Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* 10(4): 1025-1034.
- Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson KH, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungi in a podzol profile. *New Phytologist* 159: 775-783.

- Salazar O, Julian MC, Rubio V. 2000. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research* 104: 281-285.
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997. Net transfer of carbon between tree species with shared ectomycorrhizal fungi. *Nature* 388: 579-582.
- Smith SE, Read SJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, second edition. Academic Press, San Diego, USA.
- Swofford DL. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.1.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, USA.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8(11): 1837-1850.
- Valentine LL, Fiedler TL, Hart AN, Petersen CA, Berninghausen HK, Southworth D. 2004. Diversity of ectomycorrhizas associated with *Quercus garryana* in southern Oregon. *Canadian Journal of Botany* 82(1): 123-135.
- Visser S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* 129: 389-401.
- Wang PH, Wang YT, White JG. 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. *Letters in Applied Microbiology* 37(2): 127-132.

表一、蕈菇類樣本 PCR 擴增結果

樣本編號	ITS5/ITS4	ITS1F/ITS4B	GenBank 比對結果
蕈菇			
050913Nm1	—		
050913Nm2	—		
050913Nm3	—		
050913Nm4	—		
050913Nm5	—		
050913Pm1	—		
050913Pm2	—		
050913Pm3	—		
050913Pm4	—		
050913Pm5	—		
050913Pm6	—		
050913Pm7	—		
051001APm3	—	+	數值太低
051001APm4	—	+	數值太低
051001APm5	+		(624/626, 99%) AY450345 <i>Pleurotus ostreatus</i>
051001APm6	+		數值太低
051001APm7	—	—	
051001APm8	—	+	BSU65602 Basidiomycete from a bamboo
051001APm10	—	—	
051001APm11	+		LFU8533 <i>Lepiota flammeotincta</i>
051001APm12	—	+	數值太低
051001APm13	+		AF325667 <i>Callistosporium xanthophullum</i>
051001BPm1	—	+	數值太低
051001BPm3	+		數值太低
051001BPm8	—	+	AY176350 <i>Cystolepiota seminuda</i>
051001BPm10	+	+	數值太低
051001BPm13	—	+	數值太低
051001BPm14	—	+	數值太低
051001BPm15	—	+	數值太低
051001BPm16	—	—	
051001BPm18	—	—	
051001BPm19	—	+	數值太低

表二、植物根部樣本 PCR 擴增結果

樣本標號	ITS5/ITS4	ITS1F/ITS4B	Booster PCR
植物根			
050913NS1-1	—	—	
050913NS1-2	—	—	
050913NS1-3	—	—	
050913NS2-1	—	—	
050913NS2-2	—	—	
050913PS1-1	—	—	
050913PS1-2	—	—	
050913PS2-1	—	—	
050913PS2-2	—	—	
050913PS3-1	—	—	
050913PS3-2	—	—	
050913PS3-3	—	—	
0510281N	—	—	—
0510281M	—	—	—
0510282N	—	—	—
0510282M-1	—	—	—
0510282M-2	—	—	—
0510282M-3	—	—	—
0510283N	—	—	—
0510283M	—	—	—
0510284N	—	—	—
0510284M	—	—	—

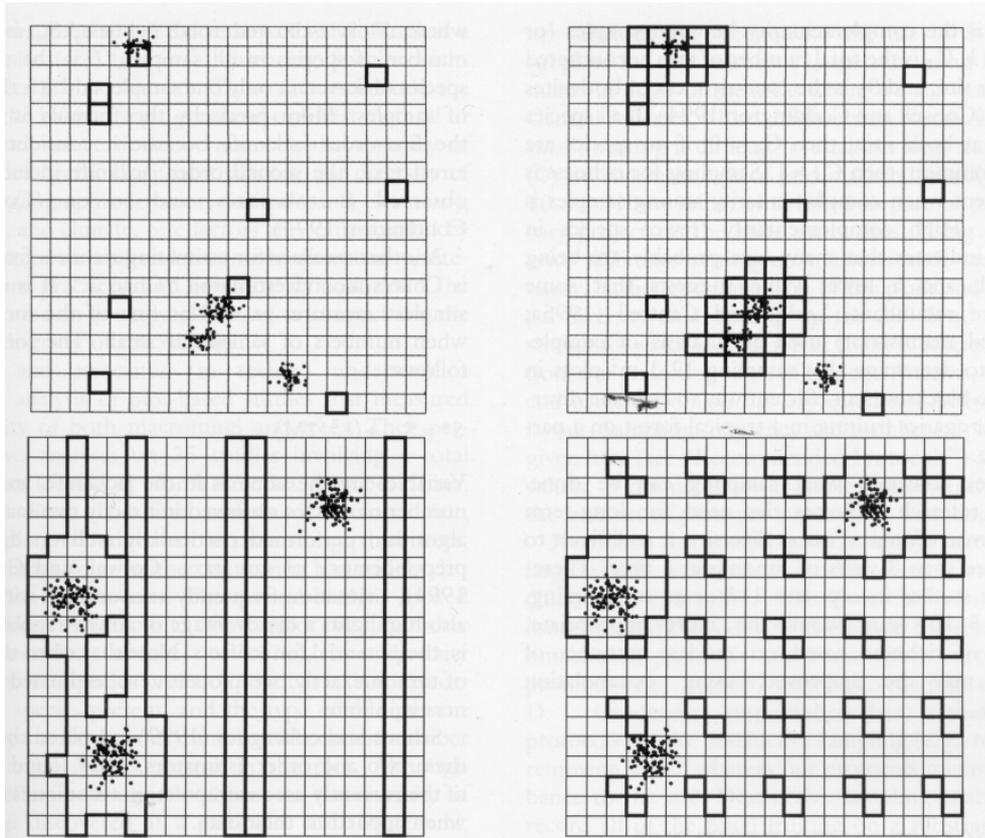


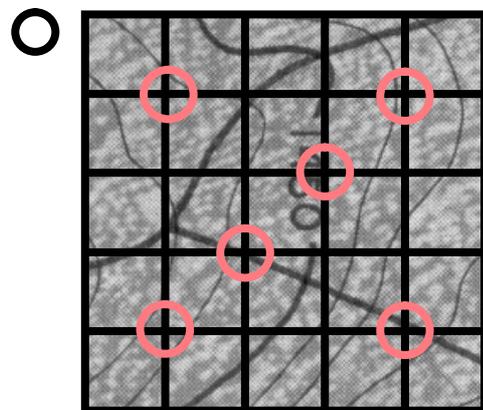
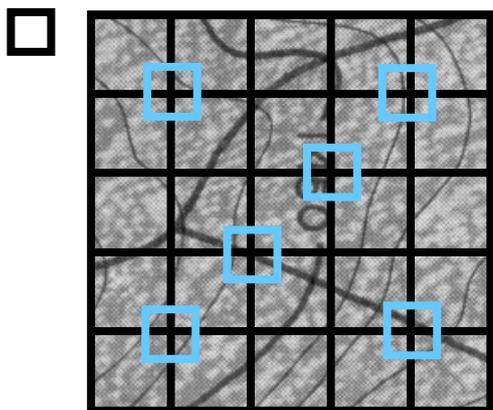
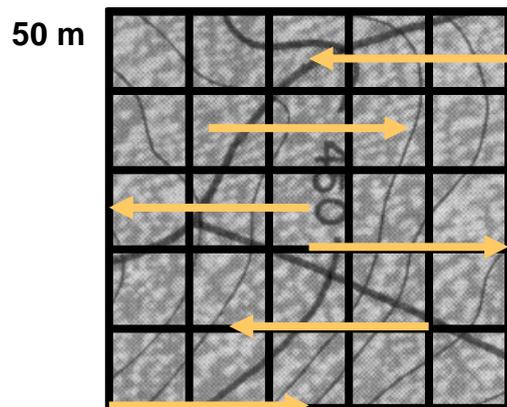
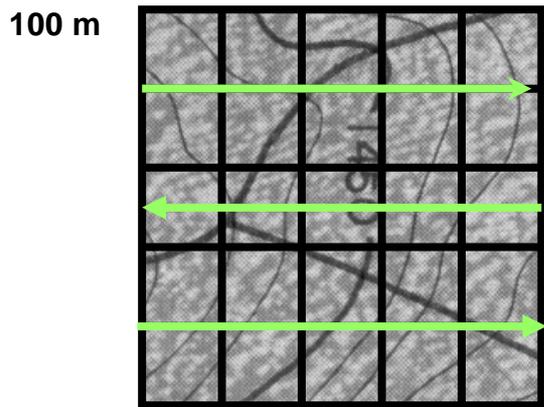
FIGURE 8.35 These figures show how an adaptive sampling is carried out. The upper panels illustrate adaptive cluster sampling to estimate the number of point objects in a study region of 400 units. An initial random sample of 10 units is shown on the left. Adjacent neighboring units are added to the sample whenever one or more of the objects of the population is observed in a selected unit. The resulting sample is shown on the right. (Both upper panels from S.K. Thompson, "Adaptive cluster sampling," 1990, *Journal of the American Statistical Association* 85: 1050-1059. With permission from the American Statistical Association.) The lower left panel illustrates adaptive cluster sampling with initial random selection of five strip plots. The final sample obtained is indicated with the heavy line. The lower right panel illustrates adaptive cluster sampling with initial random selection of two systematic samples. The final sample obtained is indicated with the heavy line. (Both lower panels from S.K. Thompson, "Adaptive cluster sampling: Designs with primary and secondary units," 1991, *Biometrics* 47: 1103-1115. With permission from the Biometric Society.)

圖一、人工林樣區內菌根真菌採集路線之參考。

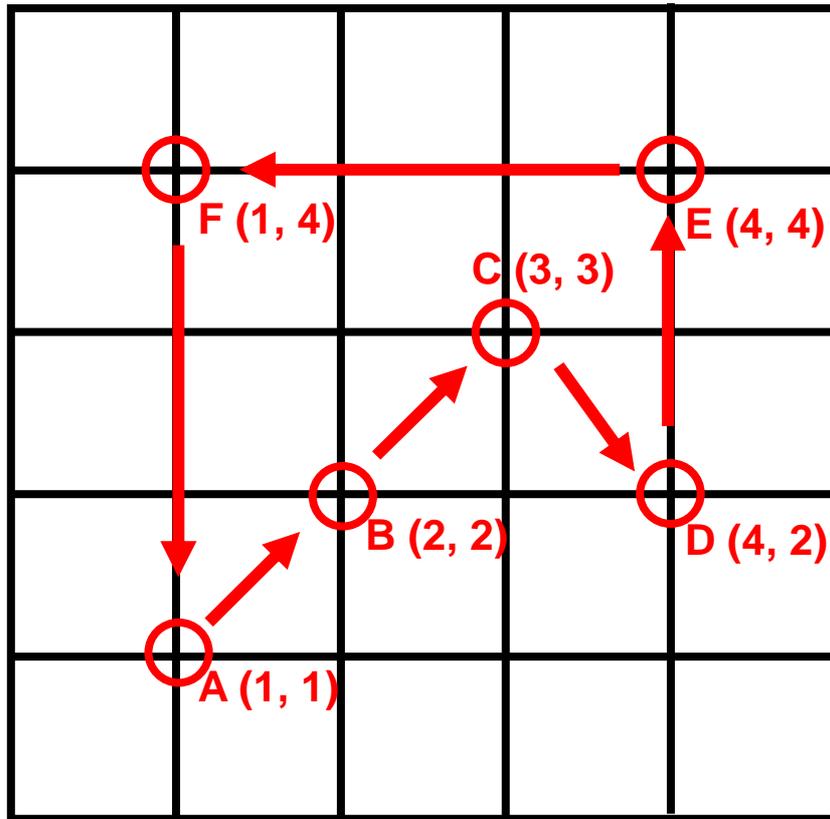


FIGURE 8.18 Agaric annotation sheet, in English. These are copied, and one is filled for each collection. (D. J. Lodge)

圖二、蕈菇子實體形態特徵記錄圖。



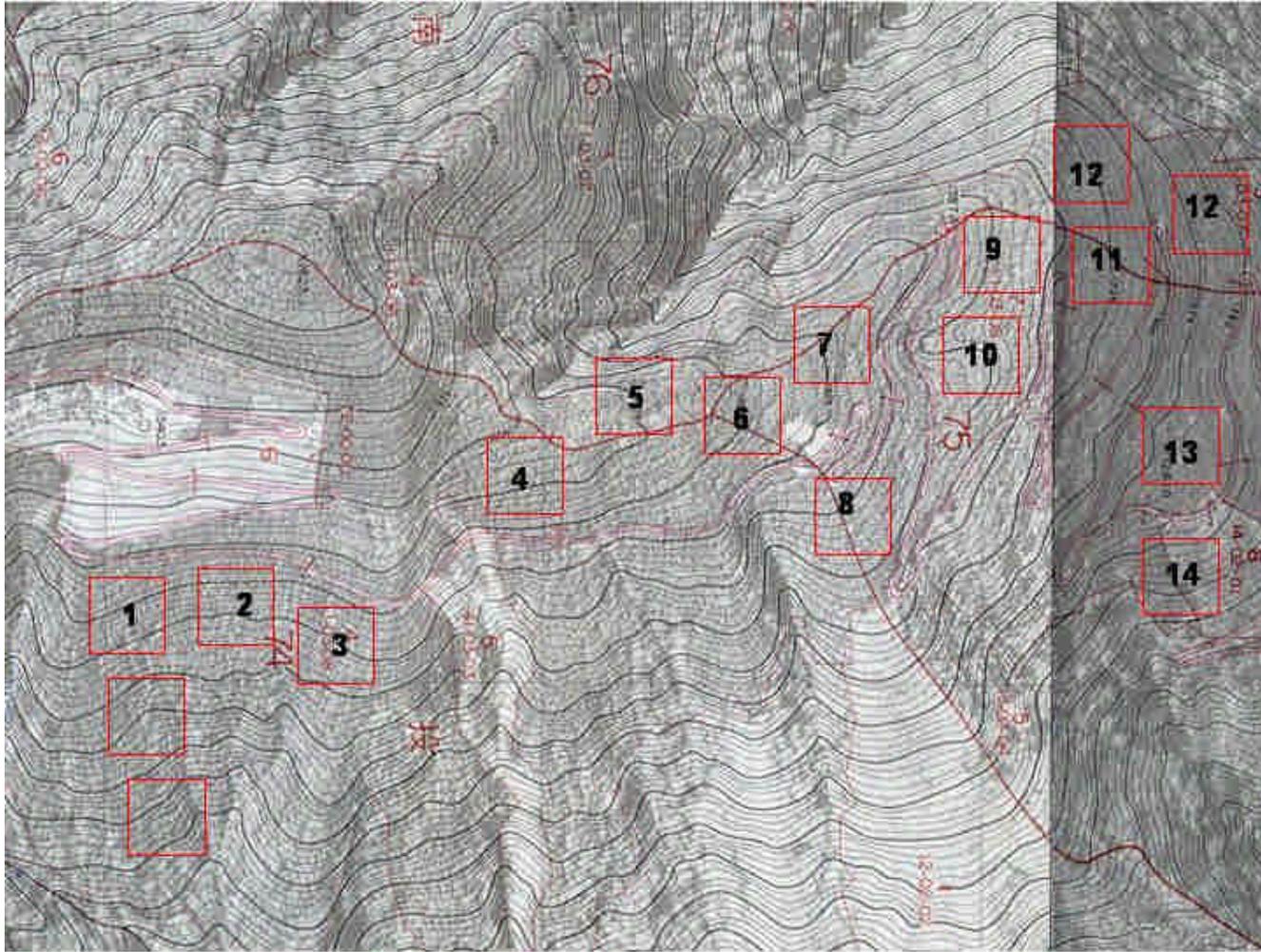
圖三、初步測試兩種線截法與兩種小樣區定位區調查法，評估後採行圓形小樣區定位調查結合小樣區間連結線之調查。



圖四、樣區內定點調查的六個圓形小樣區的位置與連結線調查路線。



圖五、以紅白斑馬膠帶在一公頃的各樣區內進行圓形小樣區的標示。



圖六、人倫林道所有樣區位置圖。目前打樁完成 10 個樣區，除易崩塌的 4、5 樣區外，其他樣區皆已完成調查真菌的圓形樣區設置。

