

台灣茶樹菇之鑑定¹

陳錦桐² 彭金騰² 林玫珠^{2,3}

摘 要

陳錦桐、彭金騰、林玫珠。2006。臺灣茶樹菇之鑑定。臺灣農業研究 55:25-38。

茶樹菇 (Southern poplar mushroom) 菇體具有特殊香味及脆嫩的口感，為一種新興食用菇類。由菇體外觀、菌絲與孢子形態發現與市售之柳松菇 (LUB菌株)，二者極為相似，只有在菇傘表面，茶樹菇為皺縮與菇柄褐色多纖毛，基部下緣暗灰白色與柳松菇不同。觀察茶樹菇TM01菌株、市售的柳松菇LUB與LUW二個菌株，和荷蘭柳松菇H911菌株等四個菇體形態特性，並蒐集它們的擔孢子，進行單孢菌株自交與雜交試驗，結果發現TM01單孢菌株四個交配型和LUB與LUW單孢菌株的所有交配型皆可雜交產生孢子體；而LUB與LUW菌株的交配型完全相同；TM01與H911品系單孢菌株交配只有部分交配型，可交配成功，此外，LUB、LUW與H911三品系的單孢菌株也部分交配型可雜交成功。彼等不能交配成功乃因不親和性因子A或B具有相同對偶基因之緣故，顯示茶樹菇與市售的柳松菇LUB、LUW及H911等四個品系極可能為同一物種。進一步，利用核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 之分子生物技術研析，將茶樹菇的核酸序列與美國生物訊息中心 (NCBI) 資料庫比對，發現其與 *Agrocybe chaxingu* 相似度達98.6-99.1%；而與柳松菇 *Agrocybe cylindracea* 相似度達87.8-88.3%，因此，將台灣茶樹菇學名鑑定為 *A. chaxingu* Huang。

關鍵詞：茶樹菇、鑑定、核糖體轉錄外區間 (ITS)。

前 言

台灣市售的柳松菇 (willow-pine mushroom) 有三種，即菇傘褐色，稱曰柳松菇；菇傘黃金色稱做白楊菇 (poplar mushroom)；而菇傘白色則稱為雪菇 (snow mushroom)；其中雪菇為褐色種柳松菇的突變種 (Mau & Tseng 1998)。三者均係台中縣隆谷菌種場在1986年由日本引進。茶樹菇 (southern poplar mushroom) 又稱茶薪菇、茶菇、油茶菇，屬於傘菌目、田磨屬 (方等 2003)。由外觀觀察茶樹菇與市售的柳松菇 (隆谷褐色種LUB菌株) 頗為相似。柳松菇學名 *Agrocybe cylindracea* (DC: Fr.) Maire. 「syn. *Agrocybe aegerita* (Briganti) Singer」(Mau & Tseng 1998)，為一種可食真菌，生長在溫帶地區，主要於白楊木與柳樹上，於春秋季節產生子實體；另外在培養基上亦極易產生子實體 (Esser *et al.* 1974)。不同菌株之菌絲生長最適溫度各有差異，一般均在25-30℃間；並以銨態氮充作氮源最為合適 (Zadrazil 1989)。人工栽培時，可採用木屑 (橡樹或橡樹混合落葉松木) 添加30%麥麩，或米糠，並有65%含水量，其最適形成菇原基 (primordium) 之溫度為17±2℃ (Park & Lee 1990)。柳松菇不產生有機酸，故對pH值不敏感，不若蠔菇於產生子實體時，需維持在pH 5.0以上，至於柳松菇菇體形成的pH範圍介於3.5-7.0間 (Zadrazil & Brunne 1979a)。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2250號。接受日期：95年2月10日
2. 本所植病組助理研究員、前研究員、聘用助理。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：Jiayi@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23338162

菇菌類之鑑定方法很多，如靈芝以子實體形態特徵、培養性狀與單孢菌株雜交可孕性作為鑑定之依據 (Adaskaveg & Gilbertson 1986)。在傘菌科 (Agaricaceae) 的鑑定，學者採用形態特性及分子生物方法，如核糖體轉錄外區間 internal transcribed spacer, ITS 與核糖體的 Large SubUnit (LSU)，作為分類鑑定依據 (Vellinga *et al.* 2003; Grades & Bruns 1993)。Johnson 氏 (1999) 利用 ITS 序列比對方法將 *Lepiota sensu lato* 間的種系關係加以證實，且這些分子生物資料的結果與真菌分類專家 Singer (1986) 對這傘菌科形態的觀點相吻合 (Vellinga *et al.* 2003)。傘菌科之形態分類特性主要以傘蓋的構造、表皮、孢子形狀、顏色與頂點發芽孔有無、扣子體 (clamp-connections) 和擔孢子為雙孢或四孢等特徵作為物種鑑定區分。由於茶樹菇在外觀形態與目前市面所販售之柳松菇極為相似，兩者是否為同一種，目前在台灣將二者混用，本研究主要目的在於利用形態特性及分子生物技術釐清台灣柳松菇與茶樹菇間的關連性，祈能辨別茶樹菇與柳松菇的正確身份，協助菇類產業的發展。

材料與方法

供試菌株

本研究所用之茶樹菇菌株 TM01 係由台灣苗栗縣苑裡所蒐集分離得到，柳松菇 H911 與 JP5-119 菌株由本所前研究員彭金騰博士所提供，LUB 與 LUW 兩菌株由隆谷菌種場在市面銷售的柳松菇與雪菇所分離得到，定期以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA; Difco) 培養基更新培養。

菌種的製備

雜木木屑混合 15% 米糠與 35% 大麥粉 (體積比) 加水調至以手可捏出小水滴，裝填至四角瓶內且塞好棉塞，然後於高溫高壓蒸氣殺菌 (121°C , 1.2 kg/cm^2 , 1 hr)，隔夜冷卻後再將上述供試之菌絲塊接種至四角瓶中，置於 24°C 生長 30 天，此即為木屑原種。然後將此木屑原種以人工接種木屑 50%，大麥粉 35% 與米糠 15% (乾重比) 之木屑塑膠瓶 (1100 mL 聚丙烯塑膠瓶)，經 35 天培養後即為木屑瓶原種。將此木屑瓶原種在接種室，利用自動化接種機 (NIPPON SEIKI N-7000，精機株式會社，日本) 接種至經高溫滅菌後冷卻之木屑瓶內；接種後之木屑瓶以輸送帶送至培養室，定溫 ($19-21^{\circ}\text{C}$) 培養 35 天，即得到栽培用之菌種。

茶樹菇與柳松菇之栽培、出菇特性與孢子形態調查

將長滿菌絲之茶樹菇菌株 TM01、市面銷售的柳松菇 LUB 與 LUW 菌株及荷蘭柳松菇菌株 H911 木屑瓶，移至出菇室，降溫至 20°C ，且控制溼度為 90-93%，待子實體長出後，調查出菇及菇體特性，包括產量與菇體形態。採集未開傘的成熟菇體，在大型玻璃皿蒐集孢子，置於光學顯微鏡下比較各菌株之孢子形態與大小等。

溫度對茶樹菇與柳松菇菌絲生長之影響

將茶樹菇菌株 TM01 與柳松菇 LUB、LUW 及 H911 等四個菌株培養在 PDA 平板上，培養 14 天後，以三號打孔器切取直徑 0.7 cm 的菌絲塊後，移植在 PDA 培養基平板中央，隨後分別置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 等不同溫度的定溫箱中，生長七天後，量取不同溫度中各菌株的菌落大小，每一溫度處理有四重複。試驗重複二次。另將各菌株移植於 PDA 斜面試管上，在 24°C 培養 10 天後，取 TM01 與 H911 菌株之菌絲塊，置於光學顯微鏡下，觀察菌絲之形態。

單孢菌株分離與雜交

將茶樹菇 TM01 與柳松菇 LUB、LUW 與 H911 等四菌株之擔孢子，作單孢分離，並培養在 PDA 培養基上，挖取單孢菌絲塊，在 PDA 培養基試管中進行自交；單孢菌株必須在兩個菌株不親合性

因子A與B之對偶基因均不同時，兩個單孢菌絲才會產生融合且形成扣子體，如A1B1交配型可與A2B2交配型菌株交配成功產生扣子體，A1B1交配型與A1B1交配型也可交配成功，但是A1B1交配型與A2B1交配型的雜交，則在兩個不同單孢菌株交界處之菌絲，可發現有假扣子體的情形，由上述方法決定單孢菌株之交配型。此外，選取各菌株4個交配型之代表性單孢菌株進行雜交，在24°C培養14天後觀察試管內交配區菌絲之形態與有無產生扣子體。

茶樹菇與柳松菇之去氧核糖核酸 (DNA) 的萃取

將茶樹菇菌株TM01與柳松菇菌株H911、JP5-119、LUB與LUW等五個菌株自PDA斜面試管上，以移植針挖取菌絲塊，分別置入裝有250 mL的馬鈴薯葡萄糖煎汁培養基 (potato dextrose broth, PDB; Difco) 的500 mL三角瓶中，於25°C定溫箱，以轉速125 rpm振盪培養10天後，經抽氣漏斗過濾，刮取菌絲團塊，並以無菌水洗去殘留的培養基，再採用DNeasy Plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 的方法，秤取約50 mg菌絲，置於滅菌過的研鉢 (直徑9 cm) 中，加入適量液態氮充分研磨菌絲塊成粉狀後，再加入400 μ L萃取緩衝液AP1及4 μ L 100 mg/mL RNase A混合均勻，於65°C中作用10 min，再加入130 μ L緩衝液AP2混合後置於冰上5 min，使不需要之蛋白、多醣體等析出，經15 krpm轉速離心5 min沉澱去除；而含DNA之上層液加入QIAshredder spin column離心過濾細胞殘渣，剩下之濾液加入675 μ L緩衝液AP3/E混合，分二次各取650 μ L於DNeasy mini spin column以10 krpm離心1 min，使DNA附著於column上，以500 μ L AW緩衝液清洗column二次，最後加入100 μ L 65°C預熱之緩衝液AE，靜置5 min，以10 krpm離心收集DNA，以分光比色計測定濃度 ($A_{260nm} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{稀釋倍數}$)，保存於-20°C備用。

聚合酵素連鎖反應

將前一步驟所純化五個菇菌之核酸，調整濃度為100 ng/ μ L，每一反應瓶取10 ng之菇菌基因組DNA，作為PCR反應所需之模板 (template)。PCR反應所需之引子對為Collopy等氏 (2001)，用於增幅核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 的二個核酸引子 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ALRO (5'-CATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3')。PCR反應混合液包含10 ng基因組DNA、5 μ L 10x PCR buffer、4 μ L 2.5 mM dNTP、25 pmol的引子及0.5 U ExTaq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)，總反應體積為50 μ L。於溫度循環反應儀 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Co., Norwalk, CT) 中進行35個PCR循環反應。ITS核酸增幅之反應條件為94°C變性 (denature) 2 min後，以94°C變性15 sec、57°C粘合 (annealing) 30 sec、72°C延伸 (extension) 45 sec，共35 cycles，之後以72°C再延伸4 min。

菇菌的ITS之DNA電泳分析與回收

將上述菇菌經PCR之產物取10 μ L，加入2 μ L blue dye (0.01% xylene cyanol, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol) 混合後，以1.2%洋菜膠片 (Seakem LE agarose, FMC) 於0.5x TAE [20 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA (pH8.0)] 緩衝液下，以100 V電壓進行電泳分析，待blue dye跑至膠片3/4處，以溴化乙啶 (ethidium bromide, EtBr, 0.5 μ g/mL) 染色10 min，以去離子水清洗，在UV照相系統 (IS-2000, Alpha Innotech Co.) 紀錄結果。並將菇菌PCR產物經PCR純化試劑組 (QIAGEN, Hilden, Germany) 進行純化，取200 μ L之PCR反應物，加入1000 μ L的PB buffer混合均勻，將混合之液體移至QIA quick spin column，以13 krpm (HITACHI, himac CF15DZ; RT15A3)轉速離心1 min收集濾液至2 mL離心管，除去濾液，再加入750 μ L的PE buffer至QIA quick spin column，以13 krpm離心1 min清洗column，最後於column中加入30 μ L的無菌水後靜置1 min，離心1 min以收集DNA，保存於-20°C供轉形 (transformation) 用。

菇菌ITS之核酸片段選殖、純化及篩選

將上述菇菌ITS核酸片段純化的PCR產物各取1 μ L加入1 μ L含連接酶 (ligase) 之pCRII-TOPO TA載體 (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA), 定量至5 μ L, 於室溫下靜置5 min進行連接反應 (ligation) 後, 再與大腸桿菌之勝任細胞 (competent cell) 放在冰上共同培養20 min, 接著以42 $^{\circ}$ C熱處理1 min, 讓已連接之載體轉移至大腸桿菌細胞中, 於37 $^{\circ}$ C培養1 hr後, 同時將100 μ L菌液、50 μ L 100 mM IPTG及50 μ L 2% X-gal於篩選性培養基 (50 ppm kanamycin) 表面塗勻, 於37 $^{\circ}$ C培養16 hrs時進行藍白菌落篩選。挑選白色菌落, 培養於含有50 ppm kanamycin之液體培養基 (LB), 以微量質體純化試劑組 (GeneMark, Technology Co., Ltd., Taiwan) 抽取質體, 將1 mL培養隔夜之菌液以13 krpm離心1 min收集細菌, 隨後依序加入200 μ L之Solution I混合均勻以打破細胞, 200 μ L Solution II及200 μ L Solution III 將細菌基因組DNA析出, 以最大轉速 (15 krpm) 離心5 min將細菌殘渣去除, 僅取上清液至miniprep spin column同樣於13 krpm離心1 min, 再以700 μ L Washing solution清洗column二次, 倒棄濾液, 然後以最大轉速離心3 min並於60 $^{\circ}$ C定溫箱放置5 min, 目的在去除Washing solution中殘餘之酒精, 最後加入50 μ L無菌水, 靜置1 min, 以13 krpm離心收集質體DNA。取3 μ L質體DNA、2 μ L 10x buffer及1 U EcoRI限制酵素於37 $^{\circ}$ C進行切割反應2 hr, 篩選具有PCR產物之轉殖株。

DNA序列解序與序列比對分析

將具有PCR產物之轉殖株送交明欣生物技術公司, 以ABI PRISM 377-96 DNA序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA)進行定序, 將所得序列以DNASTAR (DNASTAR, USA) 分析軟體和美國生物訊息中心 (NCBI) 資料庫 (GenBank) 登錄之核酸序列進行序列相似度之比對。

結 果

茶樹菇之出菇特性與柳松菇之形態比較

調查菌株出菇特性, 發現TM01菌株由去皮至出菇只要8.5天, 一週期的平均產量與生物效率分別為每瓶67.3 g與30.1%; LUB菌株, 由去皮至出菇則需13.5天, 平均產量與生物效率分別為每瓶68.7 g與32.7%; LUW產量最差, 每瓶只有34.8 g及17.7%的生物效率; 而柳松菇H911菌株, 由去皮至出菇要11.5天, 一週期的平均產量與生物效率分別為每瓶102.2 g與51.1% (表1)。另外, 在菇體形態上, 茶樹菇與柳松菇 (LUB菌株) 之外觀形態, 二者在菇形與外觀顏色極為相似, 菇傘大小也都為3-5 cm, 只有在菇傘上茶樹菇具有皺縮狀, 而柳松菇較平滑, 在菇柄基部, 茶樹菇為灰褐色而柳松菇為灰白色 (圖1)。茶樹菇與柳松菇 (H911菌株) 則明顯不同, H911菇體較短且白, 菇傘顏色為淡褐色, 茶樹菇傘較深褐色, 雪菇 (LUW菌株) 菇體全為白色, 與以上3菌株明顯不同。

溫度對茶樹菇與柳松菇菌絲生長之影響與其菌絲、孢子形態之觀察

茶樹菇TM01菌株和柳松菇H911、LUB與LUW等四種菌株, 在8-36 $^{\circ}$ C等不同溫度培養7天, 發現TM01、LUB與LUW菌株在8 $^{\circ}$ C時菌絲停止生長, H911菌株仍可生長, 在12至28 $^{\circ}$ C間, 隨溫度升高, 四菌株菌絲生長愈快。TM01菌株在32 $^{\circ}$ C以上菌絲無法生長, LUB與LUW菌株也嚴重受抑制, 而H911菌株菌絲生長也下降, 到36 $^{\circ}$ C則全部四菌株菌絲皆無法生長。8 $^{\circ}$ C以下與32 $^{\circ}$ C以上不

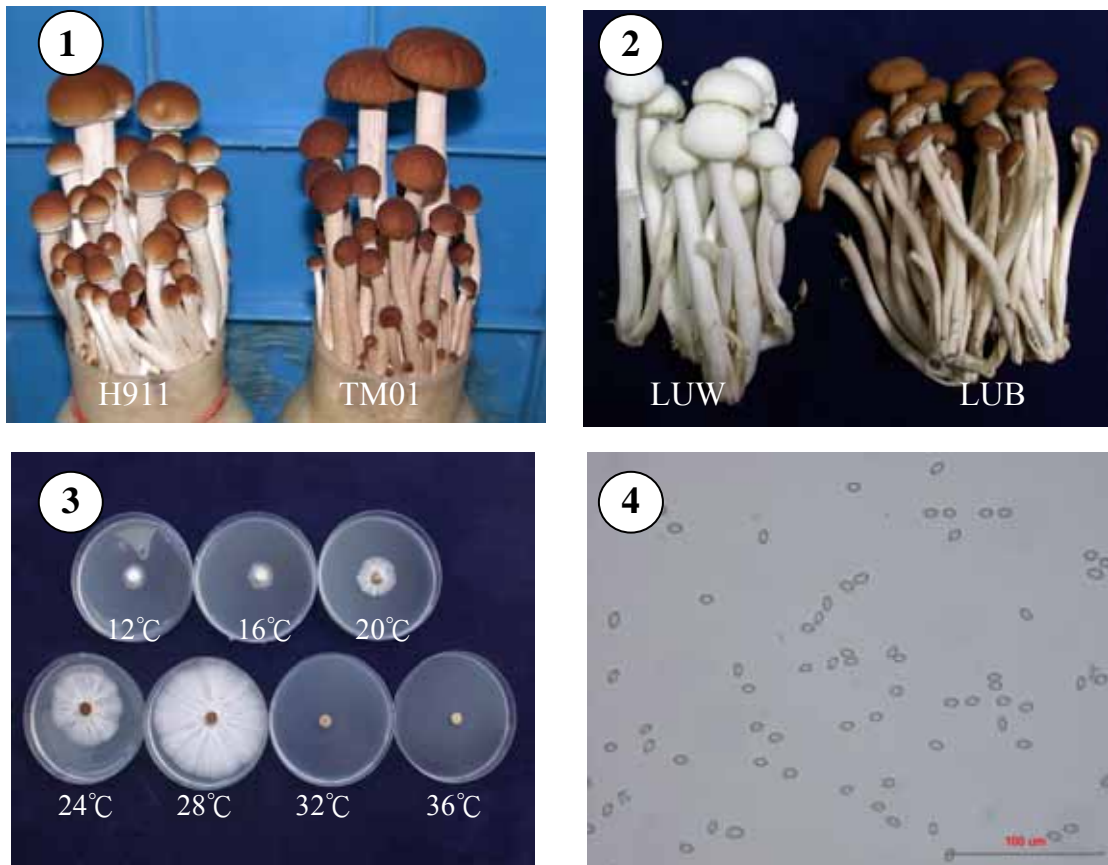


圖1. (1) 柳松菇H911菌株菇體與茶樹菇TM01菌株菇體形態；(2) 柳松菇LUW與LUB菌株菇體形態；(3) 茶樹菇菌株TM01培養在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上不同溫度菌落生長情況 (10天之結果) 與 (4) 茶樹菇的擔孢子形態。

Fig. 1. (1) Fruit bodies of the *Agrocybe cylindracea* strain H911 and the southern poplar mushroom strain TM01, (2) Fruit bodies of the willow-pine mushroom strains LUW and LUB, (3) Effect of temperature on the mycelial growth of southern poplar mushroom isolate TM01 on potato dextrose agar plates for 10 days and (4) Basidiospores of southern poplar mushroom. Bar = 100 µm.

表1. 茶樹菇與三種柳松菇出菇特性比較

Table 1. Comparisons of fruiting characteristics of southern poplar mushroom TM01, willow-pine mushroom isolates LUB and LUW and *Agrocybe cylindracea* isolate H911 cultured on a sawdust medium supplemented with 35% of barley flour and 15% of rice bran^z

Strain ^y	Days from scraping to fruiting	Average yield (g/bottle)	Biological efficiency (%)	Length of stem (cm)
TM01	8.5c ^x	67.3b	30.1b	8.0a
LUB	13.5a	68.7b	32.7b	8.5a
LUW	8.5c	34.8c	17.7c	6.0b
H911	11.5b	102.2a	51.1a	5.5b

^z Substrates were inoculated with an automatic inoculator and incubated at 19-21°C for 35 days.

^y Six replicates and 24 bottles of substrate per replicate were used for each strain.

^x Values followed by the same letters in each column were not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 2. 茶樹菇菌株TM01和柳松菇菌株H911、LUB與LUW等四種菇菌之單孢菌株交配型
 Table 2. Mating types of the monokaryons derived from the southern polar mushroom strain TM01, *Agrocybe cylindracea* strain H911 and the willow-pine mushroom strains LUB and LUW

Strain	Mating type	Monokaryon/isolate no.
TM01	A1B1	3, 5, 7, 13, 15
	A1B2	6
	A2B1	1
	A2B2	10, 16, 17, 18, 19, 20
LUB	A3B3	2
	A3B4	4, 6
	A4B3	1
	A4B4	5, 7
LUW	A3B3	5, 8, 9
	A3B4	1, 2
	A4B3	3, 6
	A4B4	4, 7
H911	A1B3	17, 10
	A1B2	14
	A2B3	3
	A2B2	2, 4, 5, 8, 9, 15

適於茶樹菇TM01菌株菌絲之生長（圖2）。顯示柳松菇H911菌株菌絲生長範圍高於茶樹菇TM01。四菌株在菌絲形態上，均為白色絲狀真菌，同時皆具有扣子體 (clamp connection) 雙核構造。TM01菌株擔孢子橢圓形或腎形，平滑，9-11 × 6-7 μm，孢子印為暗褐色，LUB菌株擔孢子橢圓形，平滑，9-10 × 6-7 μm，孢子印為暗褐色，而H911菌株擔孢子橢圓形，8-10.5 × 5-6.5 μm，孢子印也是暗褐色，LUW菌株的孢子印為白色，擔孢子橢圓形，平滑，8.5-10 × 6-7 μm。

單孢菌株自交與雜交之觀察

將13個TM01單孢菌株、9個LUW單孢菌株、6個LUB單孢菌株與10個H911單孢菌株進行自交，結果發現所有供試菇菌單孢菌株交配型皆可分成四群，四個菌株之單孢菌株之交配型如表2。四種菇菌單孢菌株間的雜交，各取其四個交配型的代表性單孢菌株1支進行兩兩交配結果發現，TM01四個交配型單孢菌株和LUB與LUW所有交配型的單孢菌株皆可交配產生扣子體，而LUB與LUW四個交配型的單孢菌株雜交結果與自交時完全相同；TM01與H911品系單孢菌株交配只有部分交配型，可交配成功，同時LUB、LUW與H911三品系的單孢菌株也部分交配型可雜交成功（表3）。

茶樹菇之分子鑑定

依據Collopy等氏 (2001) 的方法以ITS1與ALRO二個核酸引子進行茶樹菇的核糖體轉錄區間的DNA片段聚合連鎖反應，本試驗電泳分析後發現各菌株，均只產生一個相同大小約700 bp的條帶（圖3），顯示DNA的萃取與專一性引子對的專一性高，PCR增幅結果良好。利用PCR純化試劑組回收DNA後，再將核酸片段以pCRII-TOPO TA載體選殖至大腸桿菌，藍白篩選後，挑取白色的

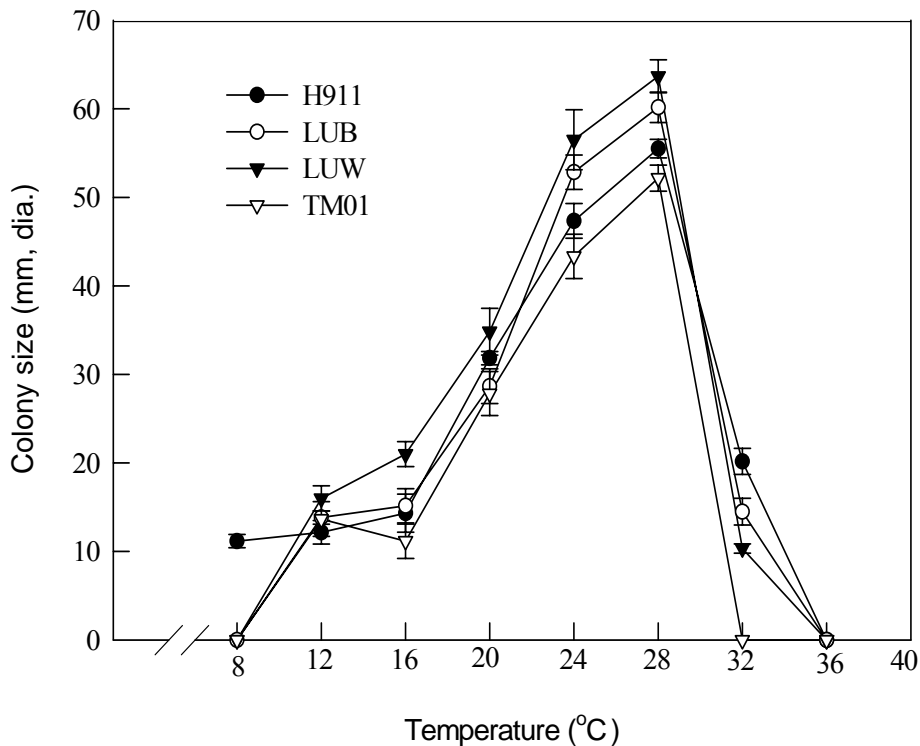


圖2. 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板培養基上溫度對茶樹菇 (TM01)、柳松菇LUB、LUW與H911等四個菌株菌絲生長之影響 (生長七天之結果)。

Fig. 2. Effect of temperature on mycelial growth of the southern poplar mushroom isolate TM01, willow-pine mushroom isolates LUB, LUW and *Agrocybe cylindracea* isolate H911 on potato dextrose agar plates for 7 days. Bar = Standard error.

轉形成功之菌株 (經限制酵素切割具有插入DNA片段者)，委託明欣生物科技公司，進行核酸解序，同時整個ITS DNA序列大小為708 bp (圖4) [已登錄至美國生物技術信息中心資料庫 (NCBI), Acc. No. AY904341]。將ITS核酸序列利用DNASTAR軟體，與NCBI的核酸基因庫序列群組分析，結果發現與二個 *A. chaxingu* (Acc. No. AY168832與AY168833) 相似度達98.6-99.1%，而與柳松菇 *A. cylindracea* 相似度也高達87.8-88.3%。依此相似度完成遺傳距離之樹狀圖 (圖5)，將茶樹菇鑑定為 *Agrocybe chaxingu* Huang。

討 論

於春秋兩季，在自然條件下所生的茶樹菇，傘肥柄脆；是在油茶樹乾枯或枯死部位發現的菇類，原產於台、閩、雲南一帶的在地野生菇種，但因分布在深山區，很少被採來食用。其含多種特殊胺基酸，是一種藥用價值很高的新興菇類 (方等 2003)。茶樹菇具有圓形菇傘，深褐色，柄

表 3. 茶樹菇菌株TM01和柳松菇菌株H911、LUB與LUW等四種菇之單孢菌株之雜交反應結果

Table 3. Pairing compatibility of four mating types of monospore isolates of strain TM01 of southern polar mushroom with strain H911 of *Agrocybe cylindrcea* and strains LUB and LUW of willow-pine mushroom

Strain	Mating type (isolate)	TM01				LUB				LUW				H911			
		A1B1 (3)	A1B2 (6)	A2B1 (1)	A2B2 (10)	A3B3 (2)	A3B4 (4)	A4B3 (1)	A4B4 (5)	A3B3 (5)	A3B4 (1)	A4B3 (6)	A4B4 (4)	A1B3 (17)	A1B2 (14)	A2B3 (3)	A2B2 (4)
TM01	A1B1 (3)	- ^z	-	⊕	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	A1B2 (6)	-	-	+	⊕	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	⊕
	A2B1 (1)	⊕	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	A2B2 (10)	+	⊕	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊕	-	-
LUB	A3B3 (2)					-	-	⊕	+	-	-	⊕	+	⊕	+	⊕	+
	A3B4 (4)					-	-	+	⊕	-	-	+	⊕	+	+	+	+
	A4B3 (1)					⊕	+	-	-	⊕	+	-	-	⊕	+	⊕	+
	A4B4 (5)					+	⊕	-	-	+	⊕	-	-	+	+	+	+
LUW	A3B3 (5)									-	-	⊕	+	⊕	+	⊕	+
	A3B4 (1)									-	-	+	⊕	+	+	+	+
	A4B3 (6)									⊕	+	-	-	⊕	+	⊕	+
	A4B4 (4)									+	⊕	-	-	+	+	+	+
H911	A1B3 (17)													-	-	⊕	+
	A1B2 (14)													-	-	+	⊕
	A2B3 (3)													⊕	+	-	-
	A2B2 (4)													+	⊕	-	-

^z - = no clamp connections; + = clamp connections; ⊕ = pseudo-clamp connections

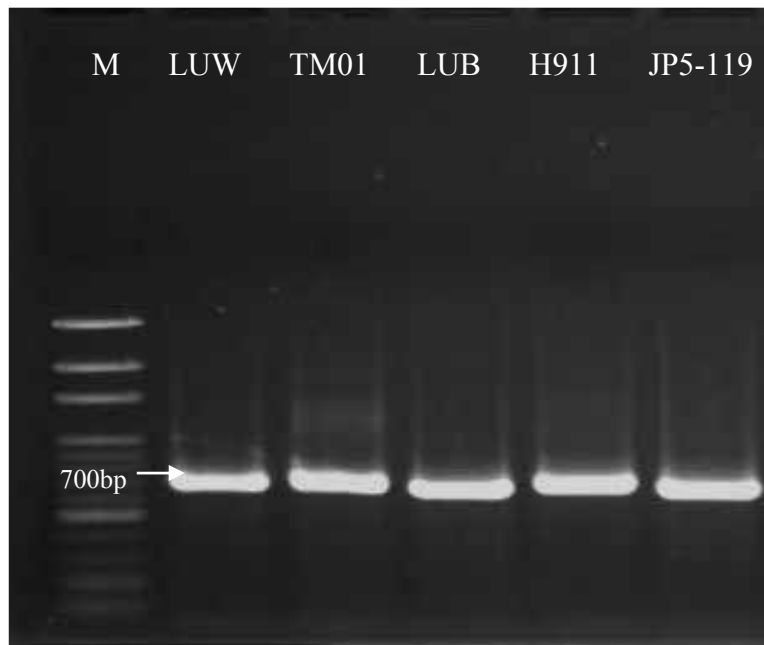


圖3. 聚合酵素連鎖反應增幅茶樹菇TM01菌株與柳松菇LUB、LUW、JP5-119 和H911等四個菌株之ITS1、ITS2區域與5.8S rDNA。

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis showing amplification product of PCR in the ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA of the southern poplar mushroom isolate TM01 and willow-pine mushroom isolates LUB, LUW and JP5-119 and *Agrocybe cylindracea* isolate H911. Lane M: 100 bp marker.

長很像柳松菇（LUB菌株），本地菇農以太空包栽植，發現可在室溫下生長出菇。由於菇體外觀形態上均與柳松菇（LUB菌株）相近，只有在菇傘上茶樹菇具有皺縮狀，而柳松菇較平滑，茶樹菇柄的纖毛較多，為褐色狀，柳松菇（LUB菌株）則纖毛較少，菇柄灰白色，且TM01菌株與LUB菌株的孢子大小相近，孢子顏色皆為暗褐色，二者菌絲皆具有扣子體。不詳加細分很容易認為是同一種。Cruz & Jacques氏（1999）以不同來源的茶樹菇（*Agrocybe chaxingu* Huang）基因組DNA與柳松菇DNA雜合，在菇體原基控制基因 *Aa-Pri2*，發現二者具有高度的同源性。此結果與Gonzalez & Labarere氏（1998）認為茶樹菇 *A. chaxingu* 與柳松菇 *A. cylindracea* 有緊密的種系關係，二者相吻合。另外本研究發現在菇開傘度上，在相同的溫度栽培時柳松菇（H911菌株）菇體較易開傘，茶樹菇（TM01菌株）和柳松菇（LUB與LUW菌株）則較不易開傘。

高等擔子菌，一般認為雙核菌絲的形成為產生子實體的先決條件，由二個不親和性的因子A和B所控制；然而 *Agrocybe* 屬的菇菌如 *A. cylindracea* 上發現有單核子實體（monokaryotic fruiting）產生（Esser & Meinhardt 1977）。*Agrocybe* 屬的菇菌如 *A. cylindracea* 可在有性世代或無性世代中產生子實體；這二種菇體之差異，是有性世代經菌絲交配融合所產生的雙核（dikaryotic）菌絲，所產生之子實體較大，且其擔子（basidium）上具有四個擔孢子；而無性世代，其菇體較小，擔子上只有二個擔孢子（Esser & Meinhardt 1977）。一般菇菌在鑑定上均以菇體外觀形態與擔孢子顏色、大小、菌絲形態、細胞核的數目與單孢菌株間可否雜交，作為鑑別依



圖4. 茶樹菇菌株TM01核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 之核酸序列。

Fig. 4. Nucleotide sequence of internal transcribed spacer regions (ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA) of the southern poplar mushroom isolate TM01.

據。由表3結果顯示柳松菇LUB與LUW菌株之四個交配型代表性單孢菌株間之雜交結果與該兩菌株之自交反應完全相同，顯示該兩菌株之不親和性因子A與B均具有完全相同的對偶基因，白色種柳松菇原本就是由褐色種柳松菇突變產生 (Mau & Tseng 1998)。再由茶樹菇TM01菌株與柳松菇LUB與LUW兩菌株之四個交配型代表性單孢菌株間可以完全雜交成功之結果，顯示前者與後兩者之A與B兩個不親和性因子則有完全不同對偶基因，假設TM01菌株之四個交配型為A1B1、A2B2、A1B2及A2B1，則LUB與LUW菌株之四個交配型可設為A3B3、A4B4、A3B4及A4B3。由茶樹菇TM01菌株與柳松菇H911菌株間四個交配型代表性單孢菌株之雜交結果，顯示其間之不親和性因子A有完全相同之對偶基因，即A1與A2，而B因子則有一個對偶基因不同。再由柳松菇LUB與LUW菌株與柳松菇H911四個交配型代表性單孢菌株間之雜交結果，顯示兩者不親和性因子B，有一個相同的對偶基因，即B3。因此，H911菌株之四個交配型為A1B3、A1B2、A2B3及A2B2。以上結果顯示茶樹菇TM01菌株與柳松菇LUB、LUW及H911三菌株，雖然在子實體形態、

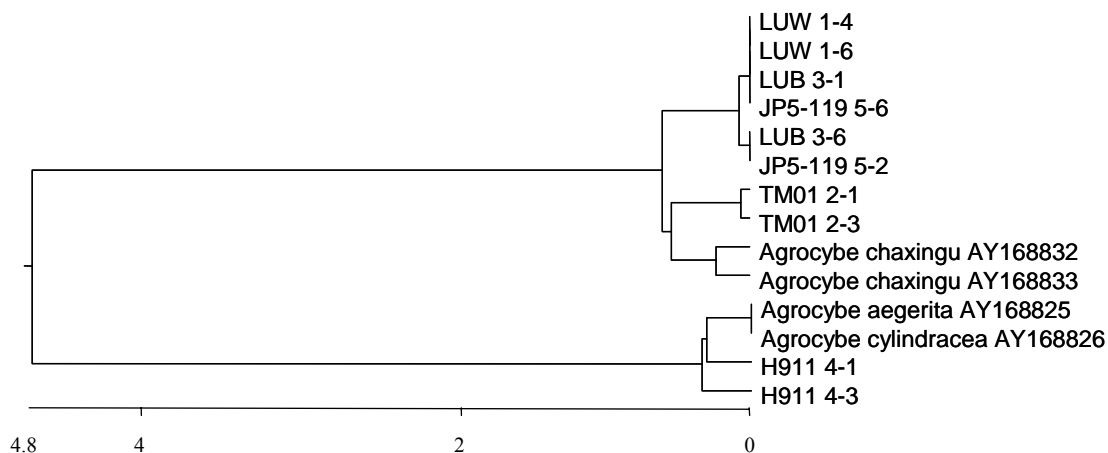


圖5. 茶樹菇TM01菌株與柳松菇等4個菌株核糖體轉錄外區間 (internal transcribed spacer, ITS) 之核酸序列與美國生物技術中心 (NCBI) 資料庫比對之親緣關係樹狀圖。

Fig. 5. Phylogenetic tree illustrating the pairwise genetic distance of the sequence of internal transcribed spacer regions (ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA) of TM01 and 4 isolates of the genus *Agrocyste* compared with sequences deposited in the GenBank database of National Center for Biotechnology Information (NCBI).

孢子大小方面及菌株生長溫度範圍略有差異，但各菌株之四個交配型代表性單孢菌株間之雜交結果，充分顯示為同一物種，其間不能雜交成功形成孢子體是因在不親和性因子A或B具有相同對偶基因之緣故，而非其他原因如生殖隔離。

除依上述鑑別外，也利用分子生物技術加以佐證，結果發現新興栽培的茶樹菇 (TM01菌株) 與二個 *A. chaxingu* (Acc. No. AY168832與AY168833) 核糖體轉錄外區間 (ITS) 相似度達98.6-99.1%，與柳松菇 *A. cylindracea* (Acc. No. AY168825與AY168826) 的ITS相似度也高達87.8-88.3%，而LUB與LUW二個菌株的序列與 *A. chaxingu* (Acc. No. AY168832與AY168833) 相似度也高達98.5-98.9%，而與 *A. cylindracea* (Acc. No. AY168825與AY168826) 的ITS相似度也達88.0%，H911菌株的序列與柳松菇 *A. cylindracea* (Acc. No. AY168825與AY168826) 的ITS相似度也高達99.1%；同時TM01菌株與目前商業栽培種LUB與LUW二個菌株的ITS序列相似度達99.1-99.5%。明確的得知台灣目前茶樹菇正確學名為 *Agrocyste chaxingu* Huang；也顯示市面販售的柳松菇LUW與LUB菌株也是茶樹菇 (*A. chaxingu* Huang)。此外，雪菇 (LUW) 為褐色種柳松菇 (LUB) 的突變種 (Mau & Tseng 1998)，而由LUB與LUW二個菌株的ITS序列相似度達100%，得到證實二者為同一種菇菌。由親源關係樹狀圖可以得知，四個菌株中，TM01、LUB與LUW三個菌株在親緣關係上同屬於 *Agrocyste chaxingu* 這一類，而柳松菇H911菌株則屬 *A. cylindracea* 這一類。

分子生物技術作為菇類病原菌鑑定之輔助，已被成功應用 (陳&黃 2004)；但是在應用於鑑別菇菌，目前尚有許多困難之處，並非全部的菇菌的DNA資料皆被建立完善；因此，鑑定上仍應該以外觀形態作為依據，搭配分子的方法作為輔助鑑定。目前台灣栽培茶樹菇的菇農尚少，以首次栽培茶樹菇發現產量偏低 (表1)，對於正確之栽培管理，仍需進一步加以研究，再利用自動化栽培生產模式 (彭 1996)，發展此一產業，將對於降低生產成本與企業化栽培，具有正面之意義，對於國內菇農也提供多一種選擇。

引用文獻 (Literature cited)

- Adaskaveg, J. E. and R. L. Gilbertson. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Gandermia lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 78:694-705.
- Chen, J. T. and Huang, J. W. 2004. Identification of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*. *J. Plant Pathol. Bull.* 13:17-26. (in Chinese with English abstract)
- Collopy, P. D., M. L. Largebeau-Mamoun, C. P. Romaine, and D. J. Royse. 2001. Molecular phylogenetic analysis of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Phytopathology* 91:905-912.
- Cruz, S. and L. Jacques. 1999. *Aa-Pri2*, single-copy from *Agrocybe aegerita*, specifically expressed during fruiting initiation, encodes a hydrophobin with a leucine-zipper domain. *Curr. Genet.* 35:564-570.
- Esser, K., M. Semerdžieva, and U. Stahl. 1974. Genetische Untersuchungen an dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita*. *Theor. Appl. Genet.* 45:77-85.
- Esser, K. and F. Meinhardt. 1977. A common genetic control of dikaryotic and monokaryotic fruiting in the Basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Mol. Gen. Genet.* 155:113-115.
- Fang, F., J. D. Song, and X. L. Jiang. 2003. The complete works of edible fungus produce. Science Tech. Pub. House of Jiangsu Press, Nanjing. 446 pp. (in Chinese)
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Gonzalez, P. and J. Labarere. 1998. Sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6, and V9 domains reveal highly species-specific variations within the genus *Agrocybe*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4149-4160.
- Johnson, J. 1999. Phylogenetic relationships within *Lepiota sensu lato* based on morphological and molecular data. *Mycologia* 91:443-458.
- Mau, J. L. and Y. H. Tseng. 1998. Non-volatile taste components of three strains of *Agrocybe cylindracea*. *J. Agric. Chem.* 46:2071-2074.
- Park, S. and J. S. Lee. 1990. Optimization of sawdust media composition and culture conditions for the mycelial growth and primordia of formation of *Agrocybe cylindracea*. *Korean J. Mycol.* 18:198-200.
- Peng, J. T. 1996. The research of king oyster mushroom automatize produce. p.135-137. in: the Research Results of the Agricultural Science and Technology of the Republic of China. Council of Agriculture Executive Yuan. Pub. Taipei. (in Chinese)
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4th ed. Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books. 981 pp.
- Vellinga, E. C., R. P. J. de Kok, and T. D. Bruns. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). *Mycologia* 95:442-456.

- Zadražil, F. and H. Brunnert. 1979a. Der Einfluss verschiedener Stickstoffquellen auf den Abbau von Stroch und dem Fruchtkörperertrag von *Agrocybe aegerita*. p.843-850. *in*: Mushroom Sci. X. Bordeaux press, Paris.
- Zadražil, F. 1989. Cultivation of *Agrocybe cylindracea* (Brig.) Sing. on lingo-cellulose containing wastes
1. Factors affecting saprophytic colonization and decomposition of substrate. p.357-368. *in*:
Mushroom Sci. XII (Part II). Braunschweig press, Germany.

Identification for Southern Poplar and Willow-Pine Mushrooms from Taiwan¹

Jin-Tong Chen² Jin-Torng Peng² and Mei-Ju Lin^{2,3}

Abstract

Chen. J. T., J. T. Peng, and M. J. Lin. 2006. Identification for southern poplar and willow-pine mushrooms from Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 55:25-38.

Southern poplar mushroom (strain TM01) is a newly explored edible mushroom in Taiwan. Due to its special fragrant and unique texture, the mushroom has become increasingly popular recently. Two strains of the willow-pine mushroom (strain LUB and LUW) are commercially available in Taiwan. Owing to the high similarity in morphological characteristics between the southern poplar mushroom and the willow-pine mushroom (strain LUB), these two mushrooms are considered the same in Taiwan. The morphological characteristics of fruit-bodies, spores size, spore print color of the three willow-pine mushroom strains (strain LUB, LUW and H911) and southern poplar mushroom (strain TM01) were compared in this study. Basidiospores of these mushrooms were collected for single spore isolation and also for intra-stock and inter-stock mating of their monokaryotic isolates. Results of the intra-stock mating demonstrated that all the four mushroom strains were tetrapolar heterothallic, and these of the inter-stock mating of the representative monokaryons of their 4 mating types showed that they were fully compatible. It strongly implicates that the four mushroom strains belong to the same species. The ITS (internal transcribed spacer regions) sequences of the four mushroom strains were compared with those deposited in the GenBank database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). The identity of ITS nucleotide sequences of TM01 (Acc. No. AY904341) is 98.6-99.1% with *A. chaxingu* (Acc. No. AY168832 and AY168833), but 87.8-88.3% with *A. cylindracea*. According to results of the inter-stock mating and molecular data, the newly cultivated edible mushroom southern poplar mushroom (strain TM01) in Taiwan was identified as *A. chaxingu* Huang. Besides, the two commercial strains (LUB and LUW) of willow-pine mushroom were also identified as *A. chaxingu* Huang.

Key words: *Agrocybe chaxingu*, Identification, ITS

-
1. Contribution No.2250 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: February 10, 2006.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Former Senior Plant Pathologist, and Assistant Researcher, Plant Pathology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: Jiayi@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23338162.