

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 植物學科

佳作

052108

探討地衣內酵母菌的存在及與內生真菌的互動
關係

學校名稱：國立宜蘭高級中學

作者： 高二 張謙 高二 林東亮 高二 林詳捷	指導老師： 黃國修
--	------------------

關鍵詞：地衣、酵母菌、對峙培養

摘要

本研究旨在探討地衣內酵母菌的存在及與內生真菌的互動關係。首先將採集地衣樣本分類並進行酵母菌培養，從柵欄石蕊(*Cladonia parasitica*)培養出酵母菌並以其進行研究。我們發現酵母菌在 *Cladonia parasitica* 中分布於其主要葉狀體(Primary thallus)，並由鑑種得知其為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。我們亦培養柵欄石蕊等地衣的內生真菌(endolichenic fungi)並鑑種得知柵欄石蕊有 *Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*、*Trichoderma simmonsii*、*Trichoderma reesei* 等木黴屬內生真菌。亦透過對峙實驗得知釀酒酵母在攝氏 10~30 度間，無論有無其他菌源下，均能促進 *Trichoderma simmonsii* 成長並抑制 *Trichoderma afroharzianum* 及 *Trichoderma pubescens*，推測地衣中的酵母菌具有平衡內生真菌，並具有發展為生物農藥的潛力。

壹、前言

一、研究動機

地衣在高中生物課本提到是由真菌與單細胞綠藻或藍綠菌組成的共生體生物，一般認知的地衣中真菌為具有菌絲的真菌，會協助地衣吸收水與礦物質。而國外最新的研究指出地衣中還有不具有菌絲的酵母菌存在，然而國內幾無對地衣中是否有酵母菌存在的研究紀錄，且對於地衣中酵母菌種類、功能、分佈部位皆無相關研究。而在閱讀文獻的過程中我們發現國外發現酵母菌的地衣物種可能也分布於台灣中高海拔山區，因此決定動身前往山上採集並進行相關研究。

二、研究目的

- (一) 將採集的各種地衣樣本分類並嘗試從中找出內含酵母菌的地衣物種
- (二) 探究酵母菌於地衣中的分布位置
- (三) 地衣中存在的酵母菌之種類鑑定
- (四) 地衣中內生真菌之種類鑑定
- (五) 探討在有/無酵母菌環境下 *Cladonia parasitica* 內生真菌的生長情形
- (六) 比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌相對於同種地衣內生真菌的生長情形
- (七) 比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌相對於他種地衣內生真菌的生長情形
- (八) 探討在不同溫度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌的生長情形

貳、研究設備及器材

一、器材表

血清瓶	培養皿(直徑：8cm)	微量滴管	保溫箱
PDA 粉末	YPD 粉末	無菌操作台	高溫高壓滅菌釜
熱風循環烘箱	試管震動混和器	滅菌指示膠帶	離心機
PCR 管	QE 試劑	聚合酶套組	PCR 機

二、地衣介紹

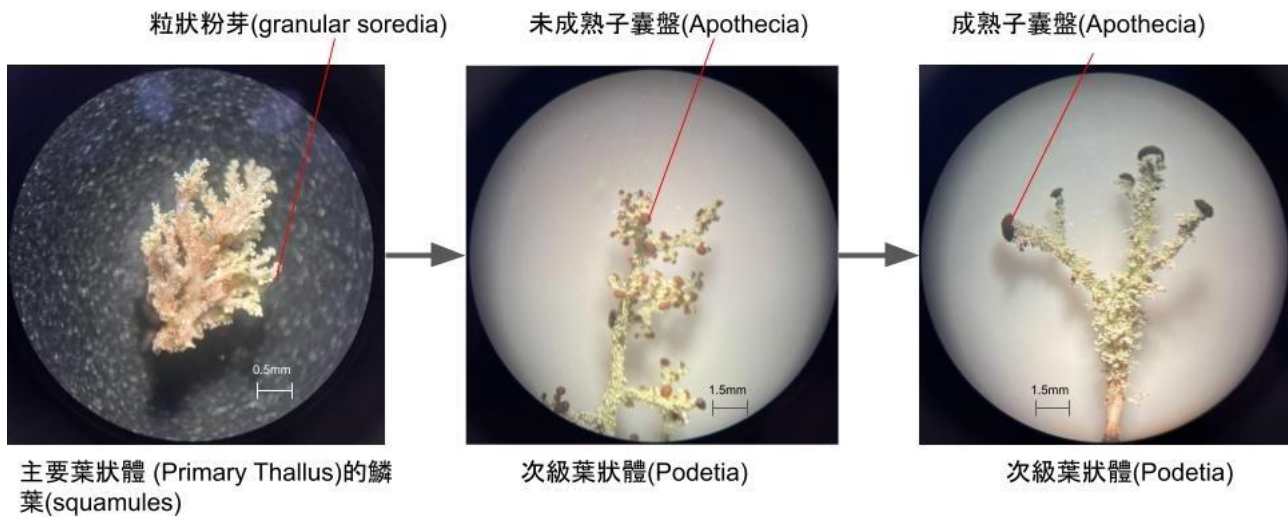
地衣是真菌和綠藻門或藍綠菌的共生體，其中光合作用的綠藻(或藍綠菌)提供營養物質，真菌(通常屬於子囊菌門，少數屬於擔子菌門)提供水和礦物質、保護，並防止水分過度蒸發。地衣外表多變，呈灰白、暗綠、淡黃、鮮紅等多種顏色，長在乾燥的岩石或樹皮上，可依形態分成莖狀地衣、葉狀地衣與殼狀地衣。近年有許多研究指出，地衣內還存有第三個共生夥伴：酵母菌，關於其在地衣內的具體角色尚未確定，目前推測有調節地衣生理機能與抑制外來菌種等功能。

三、石蕊屬(*Genus Cladonia*)介紹

為自然界常見的地衣屬，結構上分為主要葉狀體(Primary thallus)與次級葉狀體(Secondary thallus/Podetia)，其中主要葉狀體通常為平貼於地面的鱗狀結構，內有提供地衣營養的綠藻(或藍綠菌)。次級葉狀體通常為垂直地面的莖狀結構，頂端長有子囊盤(Apothecia)，內有地衣真菌繁殖用的子囊孢子(Ascospore)。

四、柵欄石蕊 (*Cladonia parasitica*) 介紹

- (一) 分布：亞洲、歐洲、北美(東部為主)、西印度群島；在台灣分布於中高海拔山區
- (二) 喜好環境：潮濕枯木上
- (三) 外觀與主要構造：如下圖一



圖一、*Cladonia parasitica* 生長週期與構造名稱

1. 葉狀體：可分為主要葉狀體 (Primary Thallus)與次級葉狀體(Podetia)。主要葉狀體以鱗狀(squamulose)結構為主，上具鱗葉(squamules)：最高可長至 2.5mm，最寬至 1mm，其上多粒狀粉芽(granular soredia)，有時呈珊瑚狀分支(coralloid-lobulate)；次級葉狀體可長至 3~15mm 高，暗棕色或灰色，通常不分支。表面多粒狀粉芽，外表呈鱗狀、皺褶狀(rugose)、樹皮狀(corticated)。

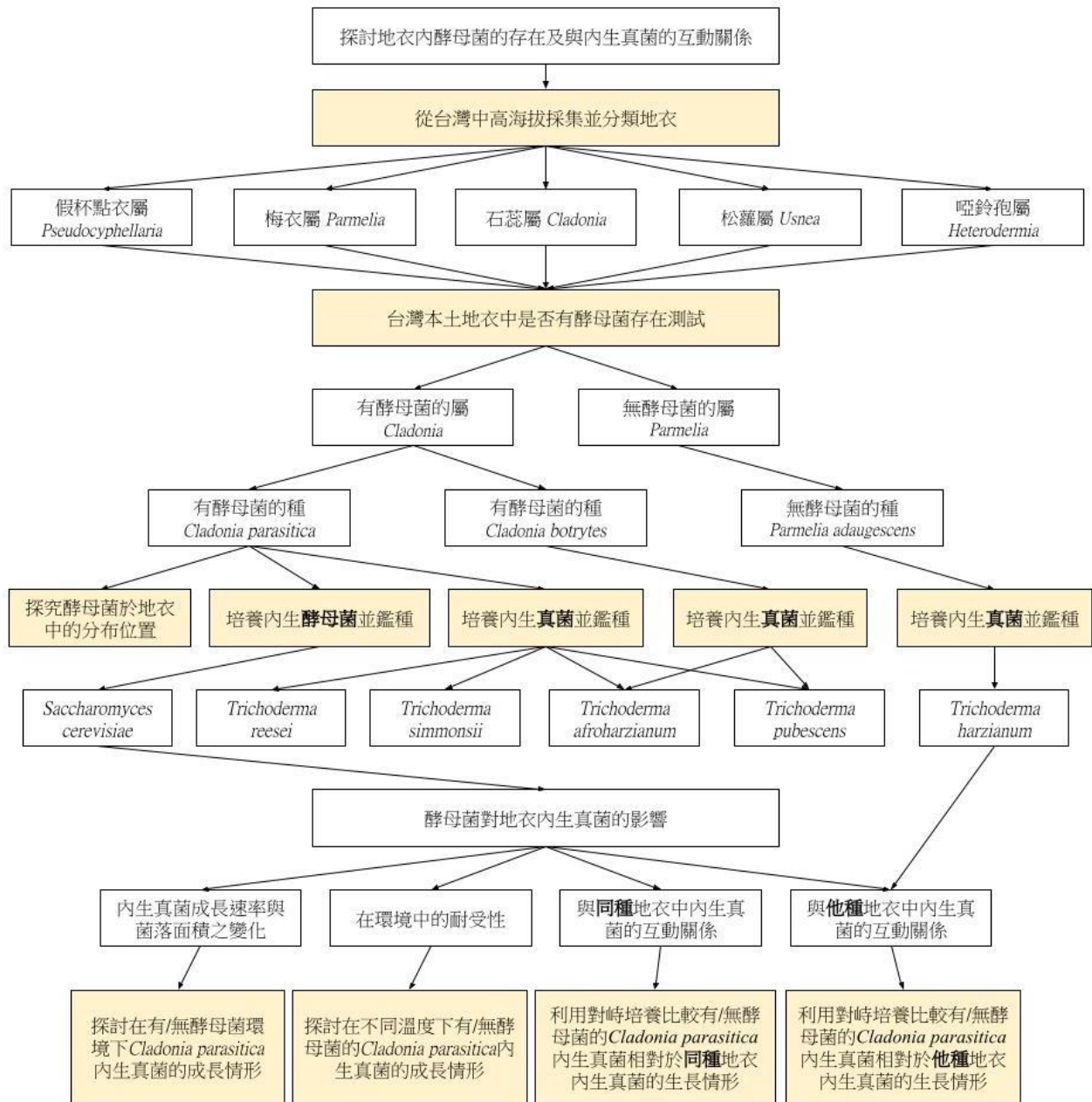
2. 子囊盤(Apothecia)：常見於次級葉狀體末端，少數長於主要葉狀體上。外表為暗棕色或黑色球狀體，最大可至 1.5mm 寬。

五、地衣內生真菌(Endolichenic fungi)介紹

地衣內除了構成其主要結構之地衣真菌外，其葉狀體(Thallus)內還存在著多種地衣內生真菌。這些內生真菌被發現會穩定存在於同一物種的地衣內，並構成其內生真菌菌相。許多內生真菌在地衣內的詳細角色尚未完全被了解，但許多種類會分泌具抗細菌、抗真菌、分解物質能力的代謝物。(資料來源：參考資料十)

參、研究過程或方法

一、實驗架構流程圖



圖二、實驗架構圖

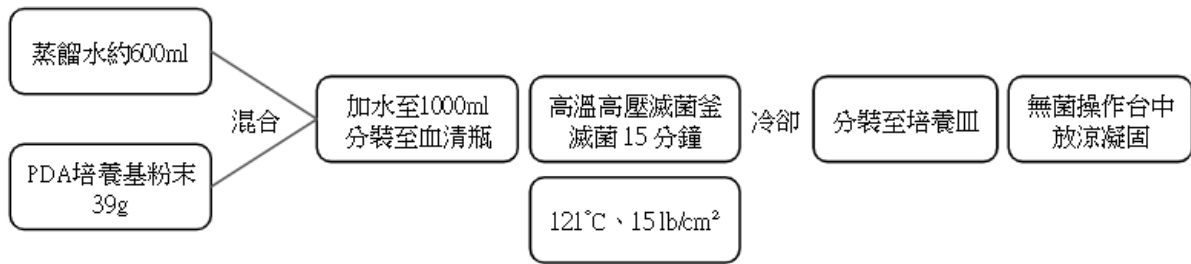
二、PDA 培養基製作

PDA，馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato Dextrose Agar, PDA)，常用於培養真菌，馬鈴薯及葡萄糖提取物提供營養豐富的基質，促進黴菌孢子形成。

PDA 培養基粉末成分：	Potatoes, infusion from	200.00 Gms/litre
	Dextrose(Glucose)	20.00 Gms/litre

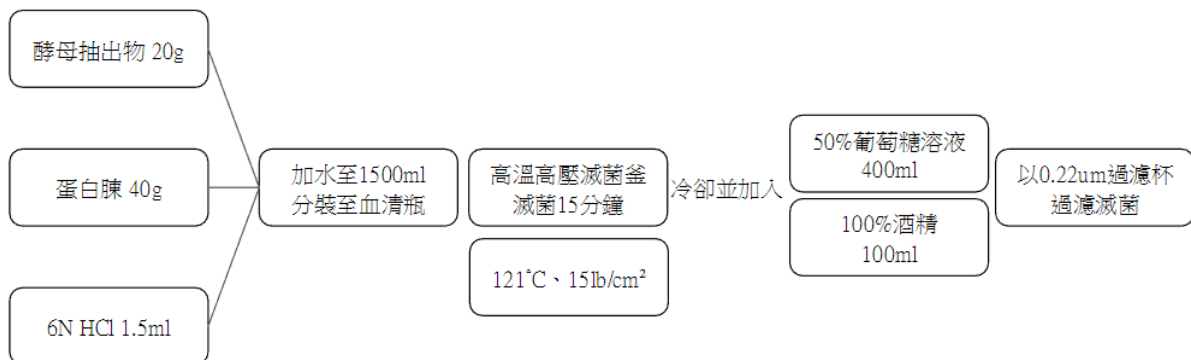
Agar

15.00 Gms/litre



三、高葡萄糖培養液製作-用於將地衣中的酵母菌培養並純化

高葡萄糖培養液成分：	酵母抽出物 Yeast Extract	20g
	蛋白朊 Peptone	40g
	50%葡萄糖溶液	400mL
	100%酒精	100mL

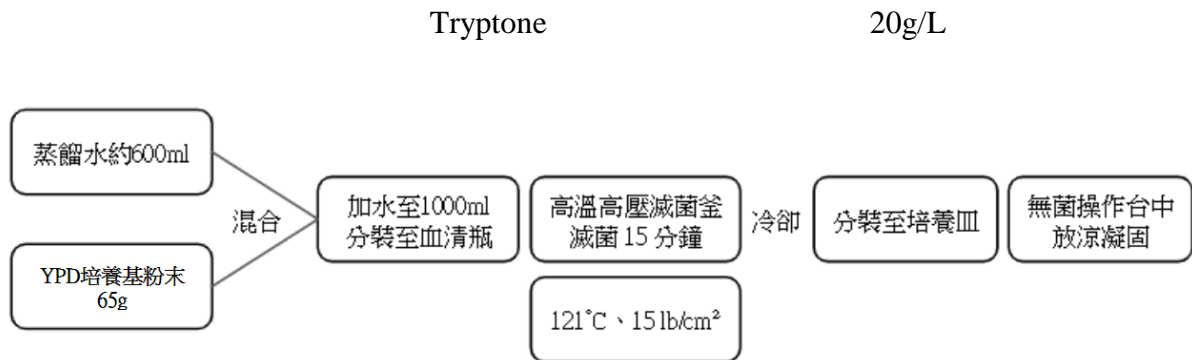


※50%葡萄糖溶液不可高溫高壓滅菌，因此配置完後以 0.22 μ m 過濾杯過濾後再使用。

四、YPD 培養基製作

YPD，酵母膏朊葡萄糖瓊脂培養基(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)，用於酵母菌的培養。

YPD 培養基粉末成分：	Yeast extract	10g/L
	Dextrose	20g/L
	Agar	15lg/L



五、地衣樣本採集

(一) 樣本採集步驟：

1. 紀錄採集日期、樣本編號、GPS 點位
2. 拍攝樣本照片，紀錄照片編號
3. 用鑷子採集樣本，將樣本置於夾鏈袋內，並保存在冰箱中
4. 消毒採集工具

樣本採集 GPS 位點：太平山區見晴步道~太平山莊周遭

表一、樣本採集 GPS 位點

1	121.52615833°E	24.50515833°N
2	121.52641333°E	24.50435000°N
3	121.52847667°E	24.50274500°N
4	121.53201833°E	24.50375833°N
5	121.53210167°E	24.50302500°N
6	121.53285167°E	24.50001667°N
7	121.53266500°E	24.49886500°N

六、地衣樣本之種類鑑定

(一) 觀察樣本並標註其外觀特徵(例：顏色、主要葉狀體形狀、次級葉狀體之有無與形狀、子囊盤形狀及顏色等)

(二) 利用網路上各大資料庫(例：Lichenportal.org)並使用檢索表以找出樣本種類

七、地衣中的真菌培養與純化(均在無菌操作台中進行)

(一) 用鑷子將採集的地衣樣本置於 PDA 培養基中央並以石蠟封膜封住蓋子

(二) 將 PDA 培養基置入 30°C 恆溫箱中培養 2-5 天

(三) 以牙籤取成長出的不同菌落再度點於新的 PDA 培養基上並重新置入 30°C 恆溫箱中培養 2-5 天

(四) 重複上述步驟直到將真菌菌落純化

八、探究酵母菌於地衣中的分布位置與酵母菌培養(均在無菌操作台中進行)

(一) 將欲培養酵母菌之地衣樣本使用平口刀片依主要葉狀體(Primary Thallus)、次級葉狀體(Podetia)、成熟子囊盤(Apothecia)(黑色)以及未成熟子囊盤(Apothecia)(咖啡色)等部位切開分離，並分別將不同的地衣部位均勻剪碎

(二) 將高葡萄糖培養液量取 30mL 倒入粗離心管中

(三) 將取自地衣不同部位切碎的樣本置入離心管中培養

(四) 將離心管蓋上蓋子並使用石蠟封膜封住蓋子

(五) 以震動混合機將試管中的液體及樣本混合均勻

(六) 將整組離心管置入 30°C 恆溫箱中培養 1-2 周

(七) 使用微量滴管吸取 50 μ L 沉澱於離心管底下的白色菌塊並滴於 YPD 培養基上

(八) 使用接種環將 YPD 培養基上的菌液進行分區劃線法分離菌落

(九) 將 YPD 培養基置入 30°C 恆溫箱中培養 1-3 天即可得到單一菌株酵母菌以利鑑種

九、菌種鑑種流程

(一) 委請專門研究真菌與酵母菌的實驗室協助進行鑑種，實驗步驟如下

(二) 萃取 DNA

1. 標註 PCR 管，每個純化出來的菌落使用一個 PCR 管
2. 每個 PCR 管加入 10 μ L QE 試劑
3. 以牙籤挑起單個菌落，並加進對應的 PCR 管中
4. 以震盪機震盪後快速離心，放入 PCR 機中並使溶液經歷 65°C、95°C、室溫
5. 此混合溶液含有 gDNA，待用於聚合酶反應

(三) 聚合酶連鎖反應

1. 配置聚合酶連鎖反應樣本，每個 DNA 配置一個 PCR 樣本。
2. 將樣本放入 PCR 機中，依下方表格設定溫度、時間與循環次數。
3. PCR 結束後，以 1% 洋菜膠進行 DNA 電泳，確認 PCR 成功。
4. 用 ITS1ngs 引子定序並以 NCBI Blast 確認菌落的物種名稱，完成物種鑑定

十、探討在有/無酵母菌環境下 *Cladonia parasitica* 內生真菌的生長情形

(一) 無添加酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌

1. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 內生真菌(見表三)種於培養基中心

(二) 添加酵母菌菌液之 *Cladonia parasitica* 內生真菌

1. 用微量滴管吸取 50 μ L 高葡萄糖溶液培養的酵母菌菌液並以三角玻棒均勻塗抹於培養基上
2. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 內生真菌(見表三)種於培養基中心

(三) 種菌完畢後使用石蠟封膜密封培養皿並放置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫箱中

(四) 每 12 小時將培養基取出拍照紀錄並利用 ImageJ 軟體計算真菌的菌落面積

十一、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌相對於同種地衣內生真菌的生長情形

(一) 如圖三，在培養皿下方標示出中心點，並標記距離中心點 1.5cm 的 2 個點位

(二) 無添加酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌

1. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 內生真菌(見表三)種於培養基對應點位

(三) 添加酵母菌菌液之 *Cladonia parasitica* 內生真菌

1. 用微量滴管吸取 100 μ L 高葡萄糖溶液培養出的酵母菌菌液並以三角玻棒均勻塗抹於欲加酵母菌的側邊
2. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 內生真菌菌絲種於培養基對應的點位

(四) 取欲對峙 *Cladonia parasitica* 內生真菌種菌絲於對應的點位上

(五) 種菌完畢後使用石蠟封膜密封培養皿並放置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫箱中

(六) 每 12 小時將培養基取出拍照紀錄並利用 ImageJ 軟體計算兩真菌的菌落面積

十二、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌相對於他種地衣內生真菌的生長情形

(一) 前置實驗：取同地區採集到的其他經實驗確認無酵母菌之地衣 *Parmelia adaugescens* 之內生真菌純菌絲，如圖九，種於 PDA 培養基上並觀察其生長速率；並取 *Cladonia parasitica* 內生真菌 *Trichoderma simmonsii*、*Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*，如圖八，種於 PDA 培養基上並觀察其生長速率。

(二) 如圖三，在培養皿下方標示出中心點，並標記距離中心點 1.5cm 的 2 個點位

(三) 無添加酵母菌的 *Cladonia parasitica* 內生真菌

1. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 內生真菌(見表三)種於培養基左邊的點位

(四) 添加酵母菌菌液之 *Cladonia parasitica* 内生真菌

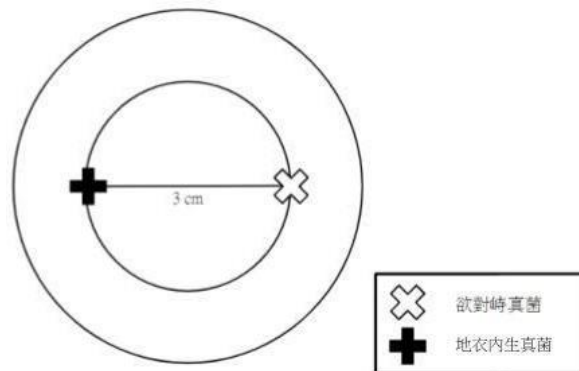
1. 用微量滴管吸取 100 μ L 高葡萄糖溶液培養出的酵母菌菌液並以三角玻棒均勻塗抹於欲加酵母菌的側邊

2. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 内生真菌(見表三)種於培養基左邊的點位

(五) 取欲對峙真菌種於右邊的點位上

(六) 種菌完畢後使用石蠟封膜密封培養皿並放置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫箱中

(七) 每 12 小時將培養基取出拍照記錄並利用 ImageJ 軟體計算兩真菌的菌落面積



圖三、對峙實驗示意圖

十三、探討在不同溫度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌的生長情形

(一) 無添加酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌

1. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 内生真菌菌絲(見表三)種於培養基中心

(二) 添加酵母菌菌液之 *Cladonia parasitica* 内生真菌

1. 用微量滴管吸取 50 μ L 高葡萄糖溶液培養的酵母菌菌液並以三角玻棒均勻塗抹於培養基上

2. 取由(七)培養出之 *Cladonia parasitica* 内生真菌菌絲(見表三)種於培養基中心

(三) 種菌完畢後使用石蠟封膜密封並放置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫箱、20 $^{\circ}$ C 恆溫箱和 10 $^{\circ}$ C 冰箱

(四) 每 12 小時將培養基取出拍照記錄並利用 ImageJ 軟體計算真菌的菌落面積



肆、研究結果

一、將採集各種地衣樣本分類並嘗試從中找出內含酵母菌的地衣

(一) 由樣本中辨認出五個屬(石蕊屬、梅衣屬、松蘿屬、假杯點衣屬、啞鈴孢屬)共十一種地衣。

表二、地衣詳細資訊

照片	屬名	學名/俗稱	圖片來源	有無培養
----	----	-------	------	------

				出酵母菌
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia parasitica</i> 柵欄石蕊	自攝	v
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia botrytes</i>	Mycology Collections data Portal: https://www.mycportal.org/portal/taxa/index.php?tid=140096	v
	<i>Parmelia</i> 梅衣屬	<i>Parmelia adaugescens</i> 成長梅衣	Pictures of tropical lichens: https://www.tropicallichens.net/2902.html	x
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia rangiferina</i>	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cladonia_rangiferina_1.jpg	x
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia portentosa</i> 馴鹿地衣	Lorn Natural History group: http://www.lnhg.org.uk/species-of-mar-2018.htm	x
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia macilenta</i> 瘦柄紅石蕊	自攝	x
	<i>Cladonia</i> 石蕊屬	<i>Cladonia squamosa</i> 龍杯地衣 <i>Cladonia ramulosa</i> 麩皮石蕊	Flechten und Moose: https://www.lichenes.de/cladonia-squamosa/	x

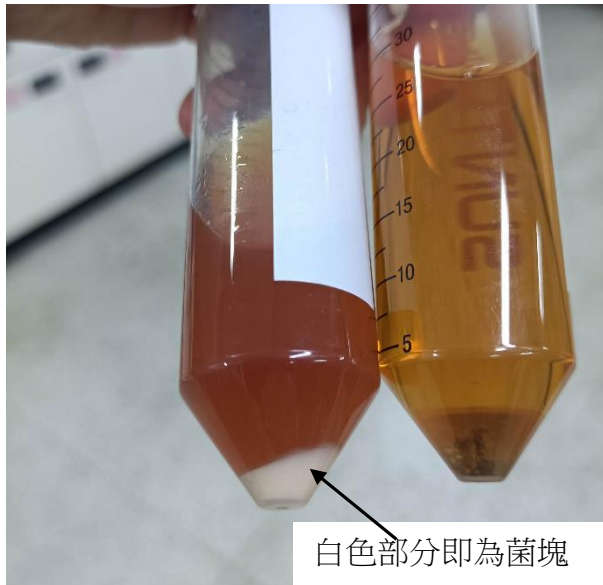
			Irish lichens: http://www.irishlichens.ie/pages-lichen/1-144.html	
	<i>Pseudocyphellaria</i> 假杯點衣屬	<i>Pseudocyphellaria aurata</i> 黃假杯點衣	Pictures of tropical lichens: https://www.tropicallichens.net/3563.html	x
	<i>Heterodermia</i> 啞鈴孢屬	<i>Heterodermia</i> 啞鈴孢屬	Pictures of tropical lichens: https://www.tropicallichens.net/2105.html	x
	<i>Usnea</i> 松蘿屬	<i>Usnea arizonica</i> 亞歷山大松蘿	CalPhotos Photo Database: https://calphotos.berkeley.edu/cgi/image_query?enlarge=0000+0000+0109+0289	x
	<i>Usnea</i> 松蘿屬	<i>Usnea barbata</i> 鬚松蘿	PuPe_so_Sweet https://pupesweet.com/new-bk-acne-face-powder-preview/usnea-barbata/	x

註：圖中有著色欄位為實驗用之地衣

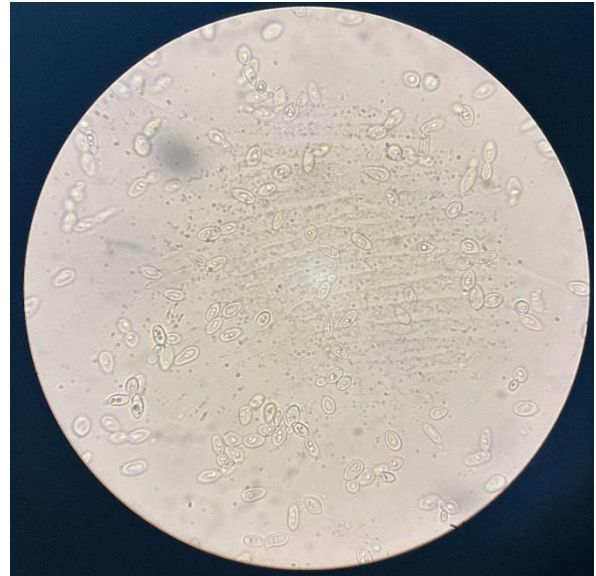
二、探究酵母菌於 *Cladonia parasitica* 地衣中的分布位置

(一) 高葡萄糖培養液純化：

僅於地衣的主要葉狀體樣本中多次培養出酵母菌塊(如下圖四)，其餘部位則無培養出酵母菌塊，並取酵母菌塊於顯微鏡下鏡檢確認(如下圖五)，並進行後續鑑種結果如實驗三。



圖四、高葡萄糖培養液中的酵母菌塊



圖五、菌塊顯微觀察圖(600X)

三、地衣中存在的酵母菌之種類鑑定



圖六、主要葉狀體 (Primary Thallus)中培養出的酵母菌 DNA 定序結果

CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTACTCCTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTTAAGAACATT
 GTTTCGCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGCA
 GTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCAGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAA
 AAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAGAGATATCACTACTACCAACAG
 AATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGT
 TCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCG
 ATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCCT
 GTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAGATAAAATTTGTTGTGTTTGTACCTCTGGGCCCCCGATTGCTCGA
 ATGCCCAAAGAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACCTCACAGTGTGTTGATTGAAACGGTTTTAATTGT
 CCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTTGAAT

由圖六，可看出前 35 和 700 個核苷酸以後訊號偏亂，故擷取上述序列(35~700bp)進行 BLAST

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Fungi	fungi		102	
• Saccharomyces	budding yeasts		49	
• • Saccharomyces cerevisiae	budding yeasts	1212	42	Saccharomyces cerevisiae hits
• • Saccharomyces boulardii (nom. inval.)	budding yeasts	1212	4	Saccharomyces boulardii (nom. inval.) hits
• • Saccharomyces sp.	budding yeasts	1212	1	Saccharomyces sp. hits
• • Saccharomyces cerevisiae PE-2	budding yeasts	1212	2	Saccharomyces cerevisiae PE-2 hits
• uncultured fungus	fungi	1212	53	uncultured fungus hits

圖七、酵母菌序列 BLAST 比對結果

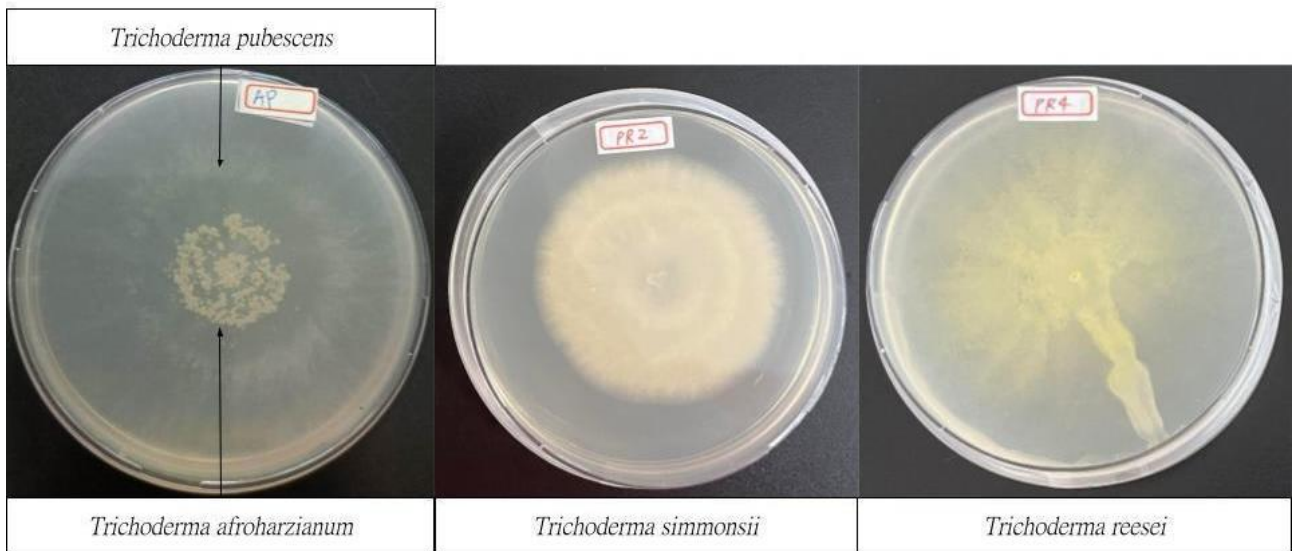
由圖七紅框處可知鑑種結果為釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。

四、地衣中內生真菌之種類鑑定

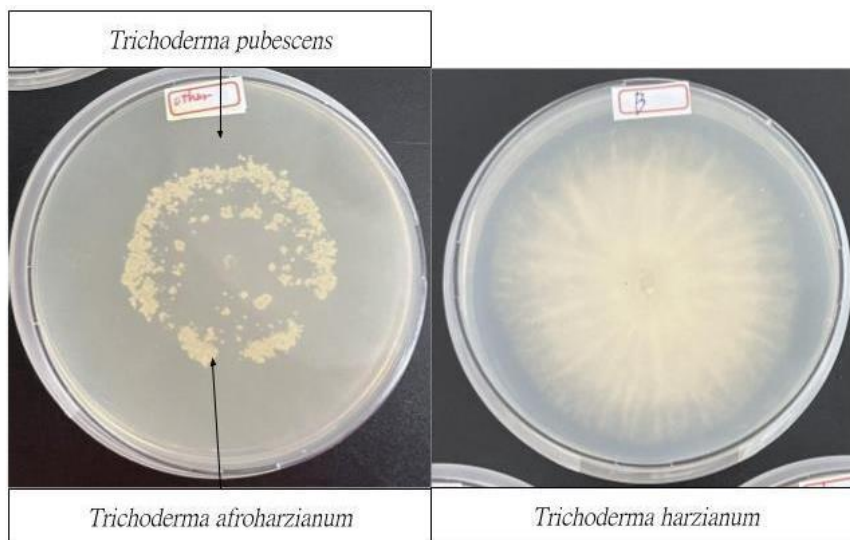
我們想了解培養出酵母菌的 *Cladonia parasitica* 與 *Cladonia botrytes*，其內含有哪些內生真菌，故將其中分離培養出的真菌進行鑑種；另外亦將不含有酵母菌的地衣 (*Pseudocyphellaria aurata*) 中培養出的內生真菌進行鑑種，以了解酵母菌與這些真菌間的互動關係。

表三、各地衣與其內生真菌種類對照表(可與圖八、九參照)

地衣學名	內生真菌學名
<i>Cladonia parasitica</i>	<i>Trichoderma afroharzianum</i> (圖八左)
	<i>Trichoderma pubescens</i> (圖八左)
	<i>Trichoderma simmonsii</i> (圖八中)
	<i>Trichoderma reesei</i> (圖八右)
<i>Cladonia botrytes</i>	<i>Trichoderma afroharzianum</i> (圖九左)
	<i>Trichoderma pubescens</i> (圖九左)
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> (圖九右)



圖八、由 *Cladonia parasitica* 地衣中培養出的內生真菌菌盤



圖九、由 *Cladonia botrytes* 與 *Pseudocyphellaria aurata* 地衣中培養出的內生真菌菌盤

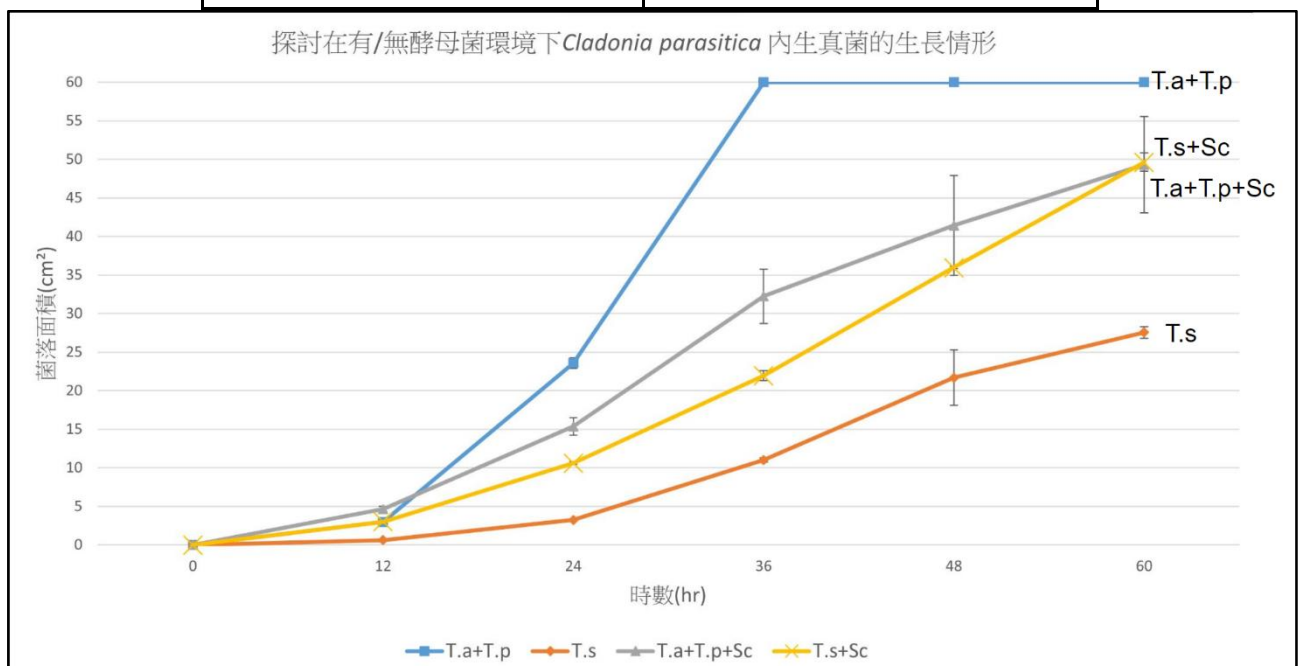
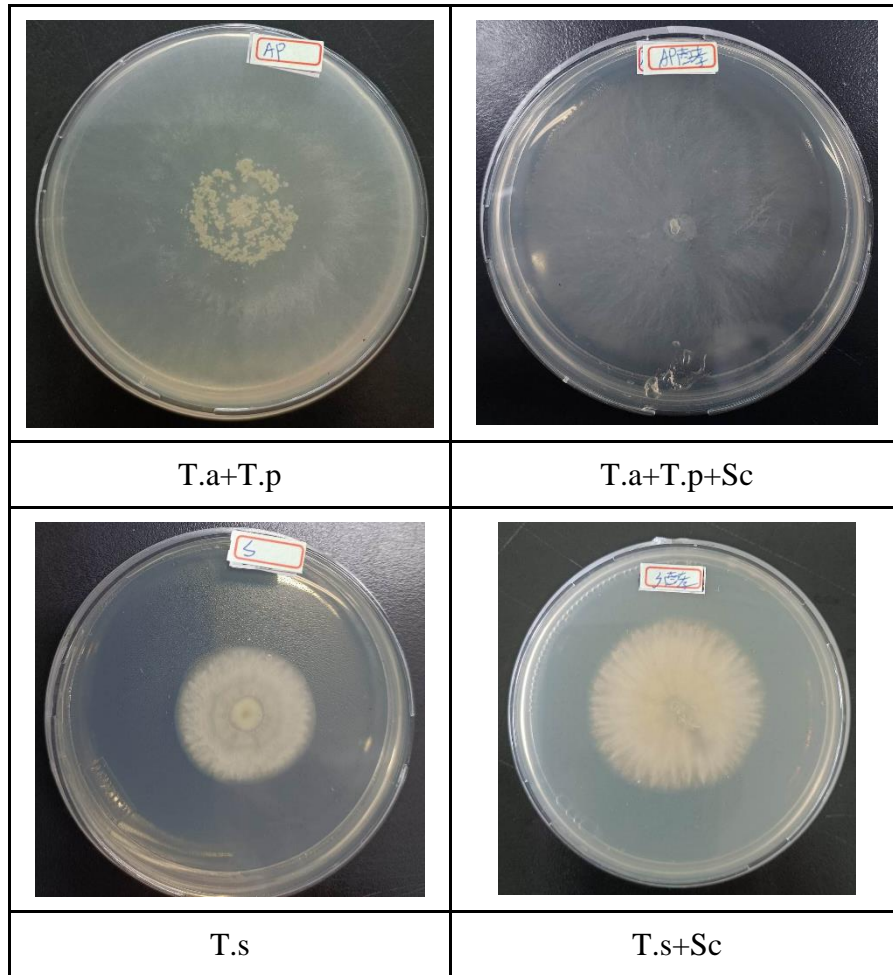
表四、用於做後續實驗的內生真菌及酵母菌與其實驗代號

代號	意義
T.a+T.p	<i>Trichoderma afroharzianum</i> & <i>Trichoderma pubescens</i>
T.s	<i>Trichoderma simmonsii</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T.a+T.p+Sc	添加酵母菌菌液之 <i>Trichoderma afroharzianum</i> & <i>Trichoderma pubescens</i>
T.s+Sc	添加酵母菌菌液之 <i>Trichoderma simmonsii</i>
T. h	由他種不含酵母菌的地衣中培養而得的 <i>Trichoderma harzianum</i>

註：由於實驗過程中 *Trichoderma afroharzianum* 和 *Trichoderma pubescens* 總是共同被培養出來，無法被分離，故以兩者共同長出之菌落進行實驗。

五、探討在有/無酵母菌環境下 *Cladonia parasitica* 内生真菌的生長情形

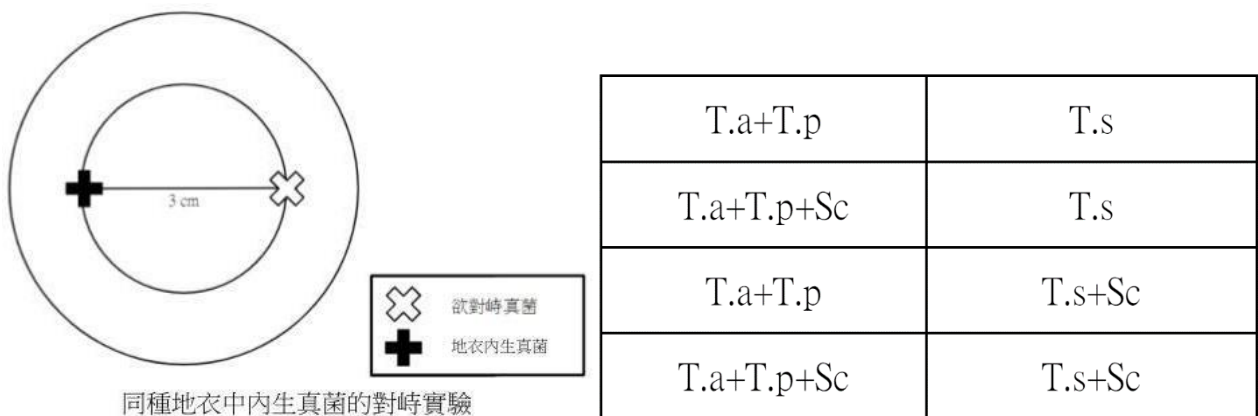
表五、在有/無酵母菌環境下 *Cladonia parasitica* 内生真菌第 60 小時培養基照片



圖十、有/無酵母菌環境下 *Cladonia parasitica* 内生真菌的生長情形

由圖十可見 T.a+T.p 真菌從第 12 小時到第 36 小時，其菌落面積一直維持四組中最大，並在第 36 小時長滿了培養基(面積達 60cm²)；T.s 真菌成長最為緩慢，且在第 60 小時菌落面積僅達到培養基面積的 45.941%(27.5635cm²)，不及培養基的一半；T.a+T.p+Sc 真菌生長速率被抑制，T. s+Sc 真菌生長速率被促進，菌落面積在第 60 小時分別達到了培養基面積的 79.11%(47.469cm²)與 82.735%(49.641cm²)，且添加酵母菌後，T.a+T.p 與 T.s 真菌的生長曲線較一致。

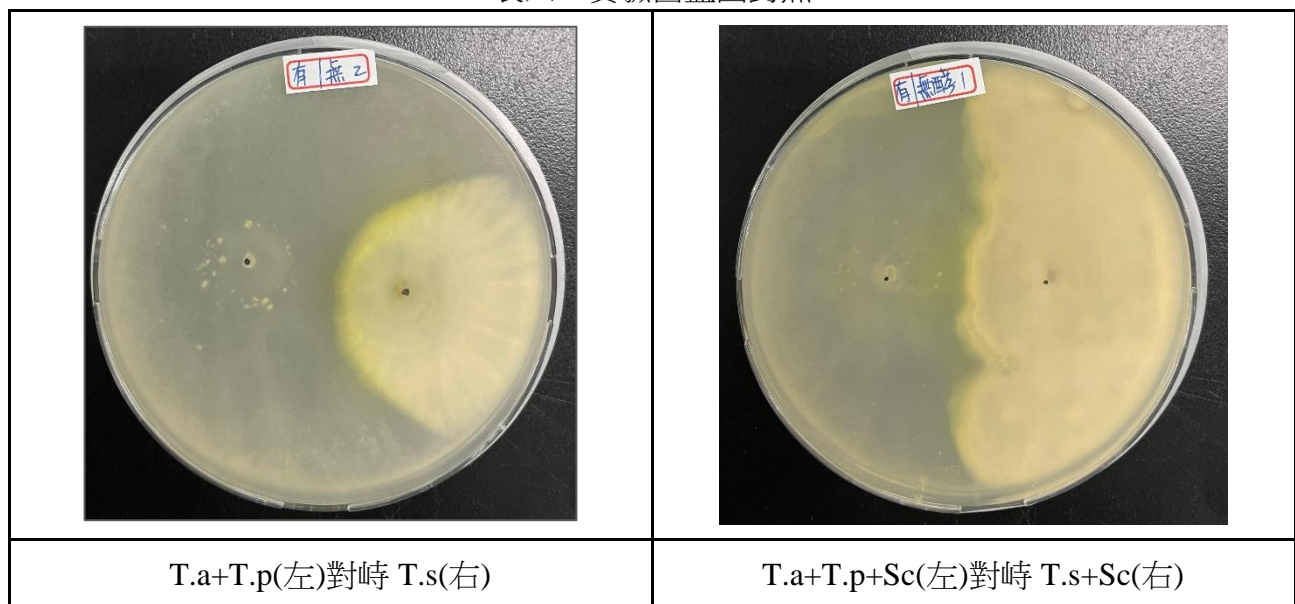
六、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌相對於同種地衣内生真菌的生長情形

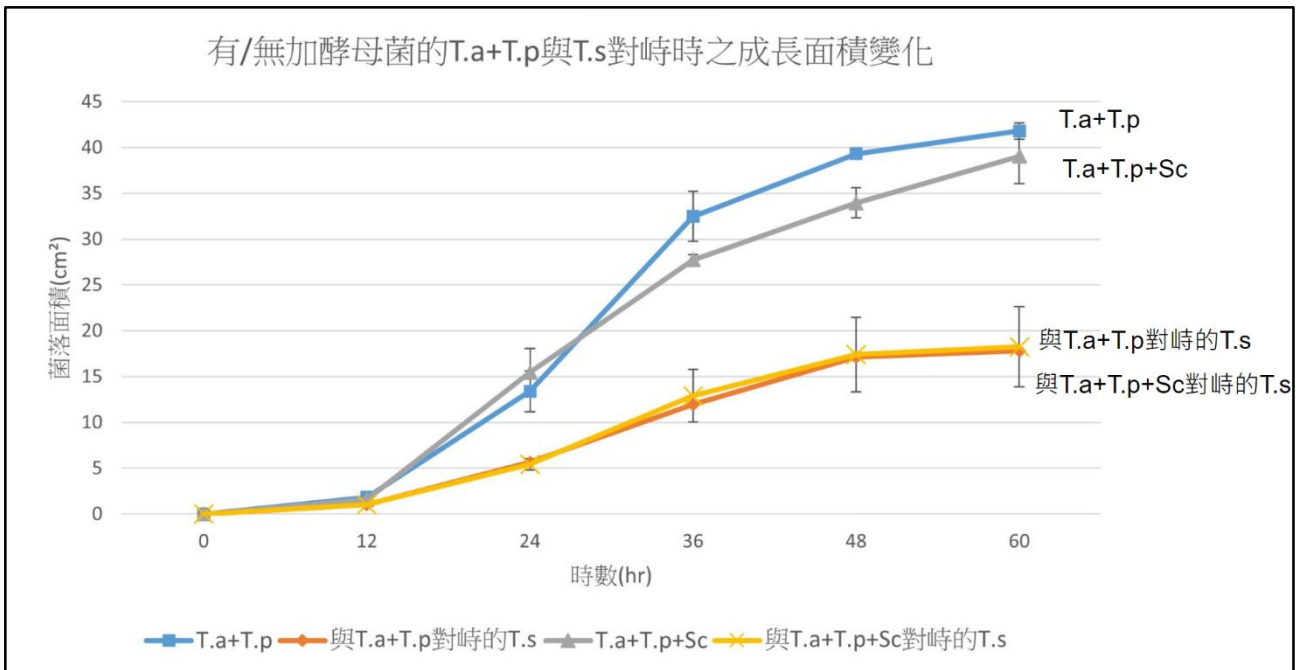


同種地衣中内生真菌的對峙實驗

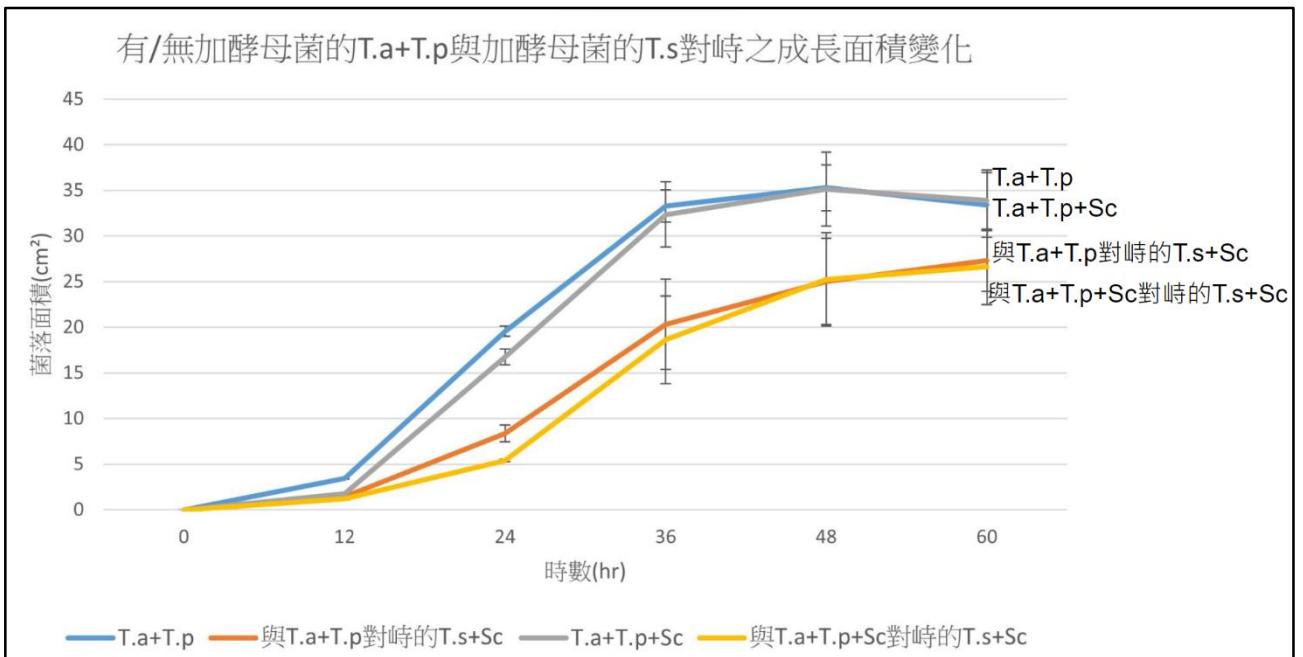
圖十一、同種地衣之內生真菌對峙實驗點位圖

表六、實驗菌盤圖對照





圖十二、有/無加酵母菌的 T. a+T. p 真菌與 T. s 真菌對峙時之成長面積變化

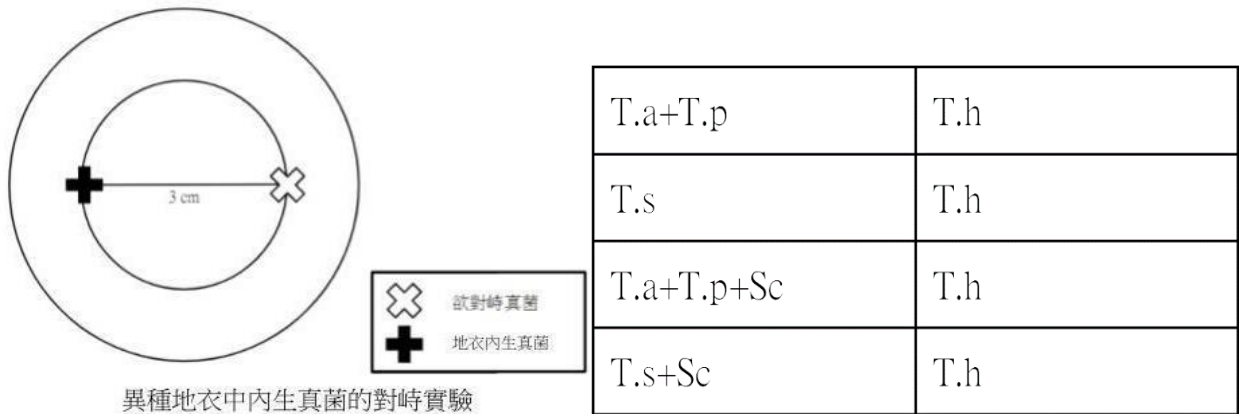


圖十三、有/無加酵母菌的 T. a+T. p 真菌與加酵母菌的 T. s 真菌對峙時之成長面積變化

由圖十二可見 T.a+T.p+Sc 的菌落面積及成長速率均小於 T.a+T.p 組，但與其對峙的兩組 T.s 真菌則差異不大。由圖十三可見相對於圖十二，T.a+T.p 和 T.a+T.p+Sc 兩者在成長曲線及菌落面積上均有減少，且與 T.a+T.p 對峙的 T.s+Sc、與 T.a+T.p+Sc 對峙的 T.s+Sc 亦有著高度相似的成長曲線，且相較於沒加酵母菌的 T.s 組別有較高的菌落面積。

※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙(見圖十一)，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。

七、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌相對於他種地衣内生真菌的生長情形

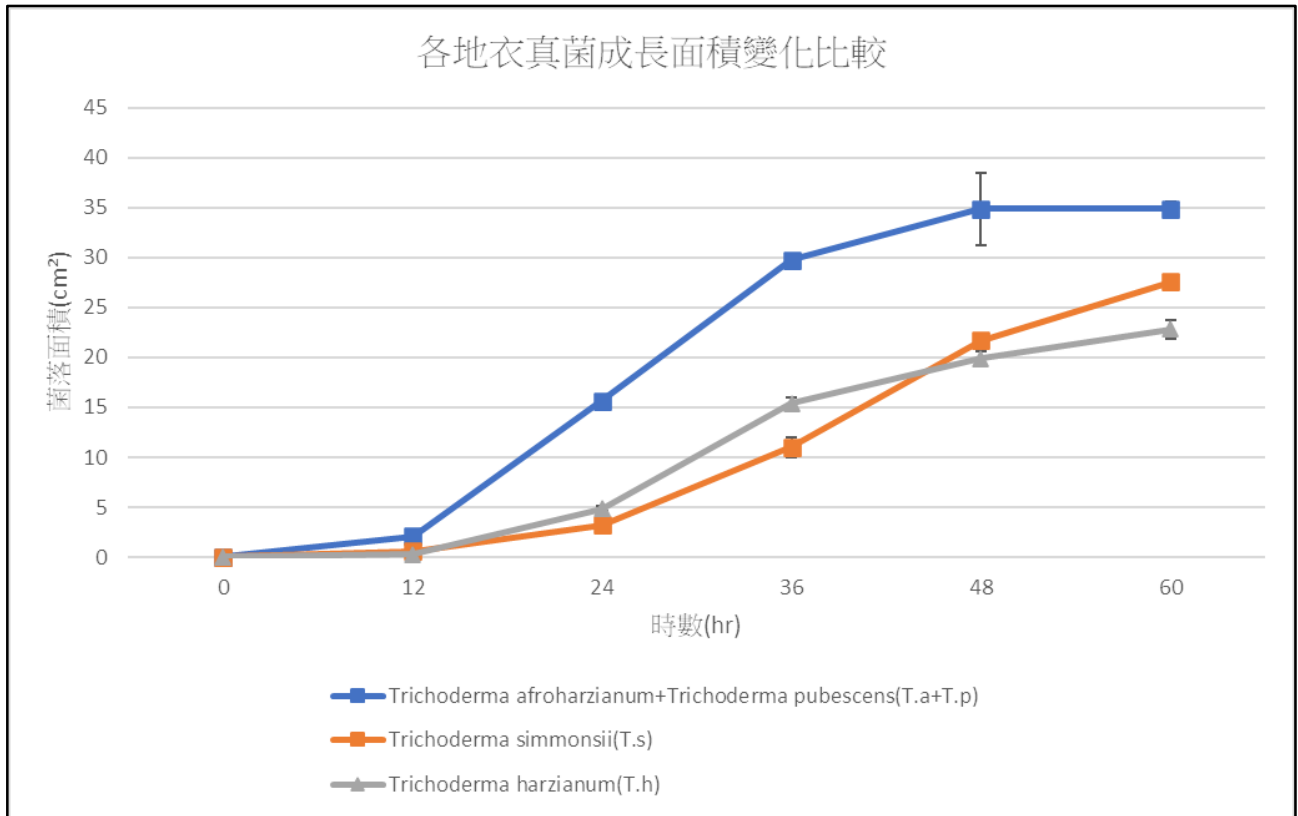


圖十四、異種地衣之內生真菌對峙實驗點位圖

表七、實驗菌盤圖對照

<p>T.a+T.p(左)對峙 T. h(右)</p>	<p>T.s(左)對峙 T. h(右)</p>
<p>T.a+T.p+Sc(左)對峙 T. h(右)</p>	<p>T.s+Sc(左)對峙 T. h(右)</p>

(一) 前置實驗

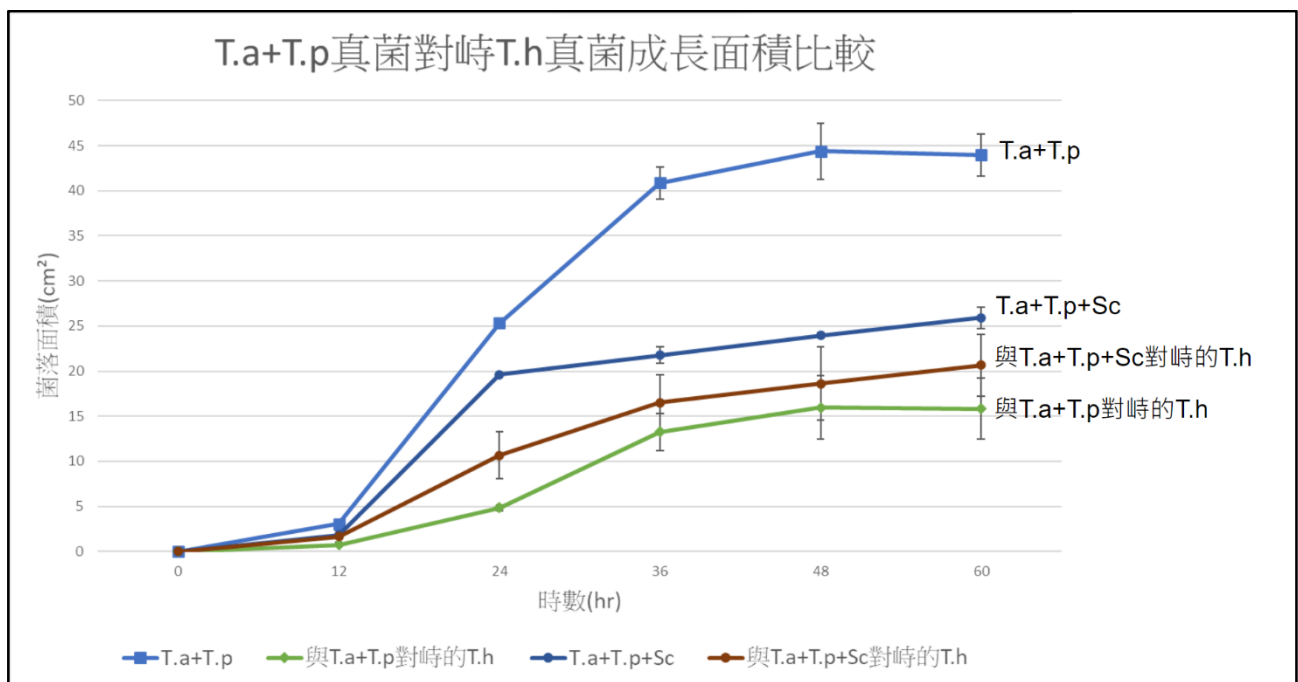


圖十五、各地衣內生真菌成長面積變化比較

由圖十五可見 *T. a+T. p* 真菌在成長速率與菌落面積上皆為三組中最高，在第 48 小時菌落便達培養基面積的一半以上。*T. h* 真菌與 *T. s* 真菌在成長速率與面積變化上相似，第 60 小時平均單邊菌落均長至約 25cm^2 。

※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙(見圖十四)，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。

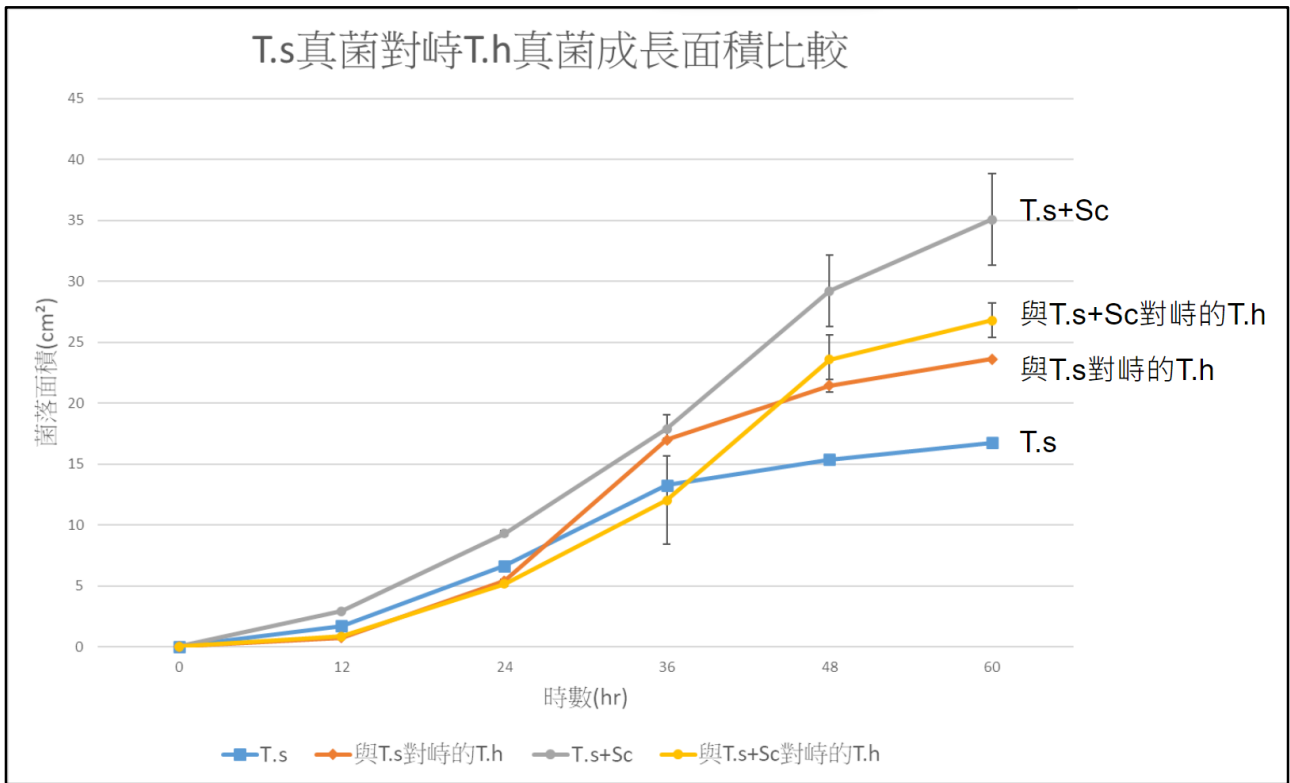
(二) *Cladonia parasitica* 內生真菌(T. a+T. p&T. s)對 *Parmelia adaugescens* 內生真菌(T. h)



圖十六、T. a+T. p 真菌對峙 T. h 真菌之成長面積變化

由圖十六可見 T. a+T. p+Sc 在成長速率與菌落面積上皆顯著小於 T. a+T. p。與 T. a+T. p+Sc 對峙的 T. h 菌落面積略為大於與 T. a+T. p 對峙的 T. h，且兩者成長曲線相似。而 T. a+T. p 與 T. a+T. p+Sc 菌落面積均高於與其對峙的 T. h 真菌，但第 60 小時 T. a+T. p+Sc 與和 T. a+T. p+Sc 對峙的 T. h 的差距僅約為 T. a+T. p 與和 T. a+T. p 對峙的 T. h 間差距的 1/6 倍。

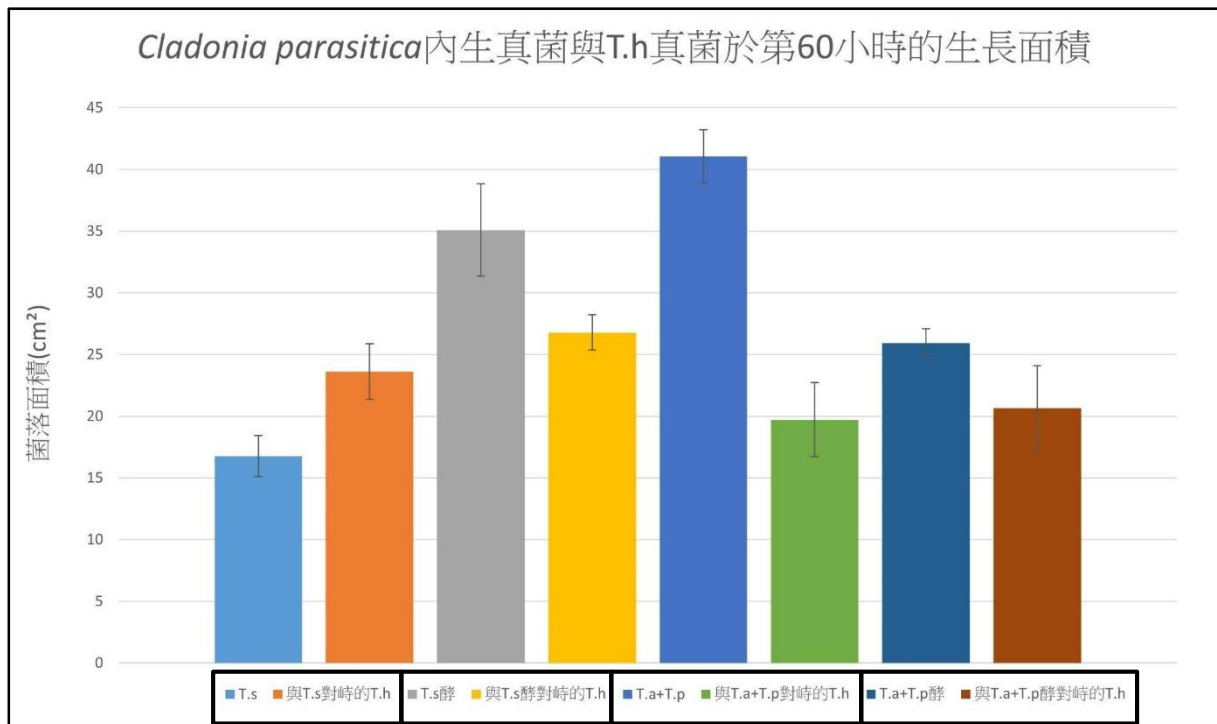
※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙(見圖十四)，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。



圖十七、T. s 真菌對峙 T.h 真菌之成長面積變化

由圖十七可見 T. s 在成長速率與菌落面積上均小於與其對峙之 T. h 真菌。而 T. s+Sc 在成長速率與菌落面積上皆大於與其對峙之 T. h 真菌。與 T. s 及 T. s+Sc 對峙的 T. h 真菌成長曲線相似，第 60 小時菌落面積僅差約 3 平方公分。

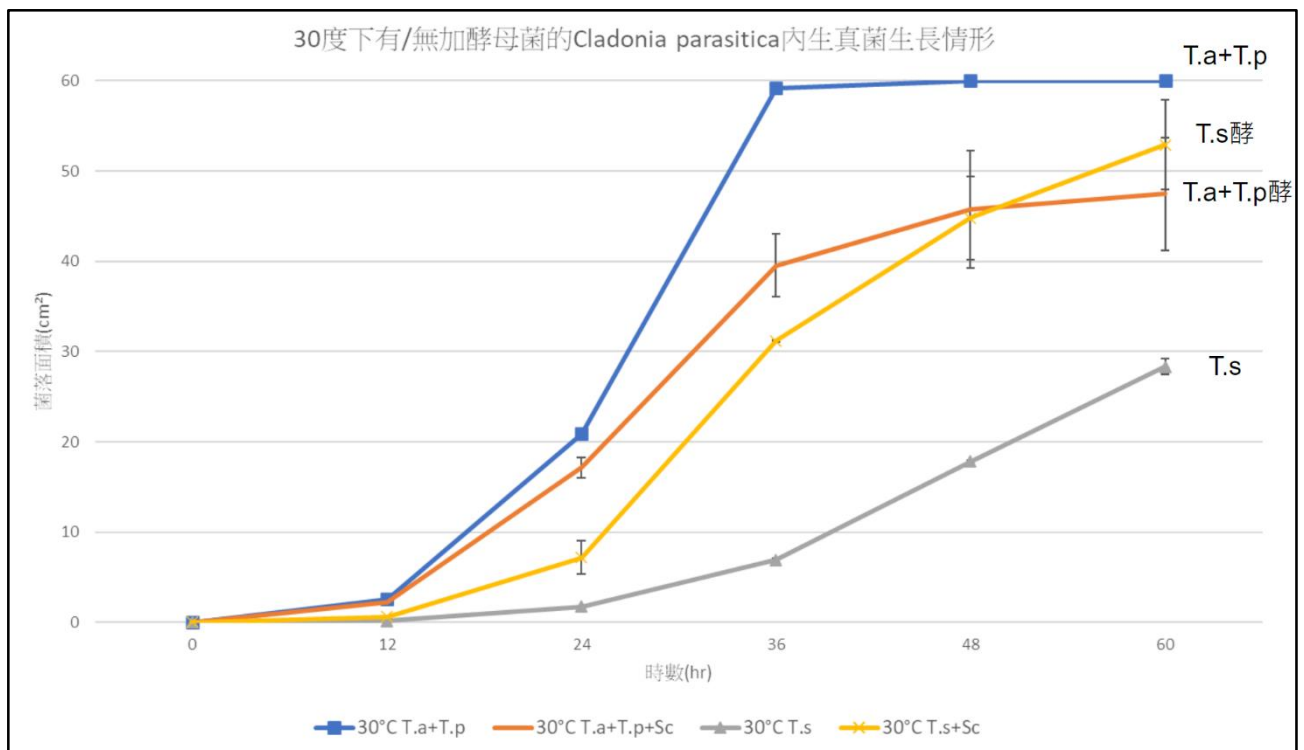
※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙(見圖十四)，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。



圖十八、*Cladonia parasitica* 内生真菌與 T. h 真菌於第 60 小時的生長面積

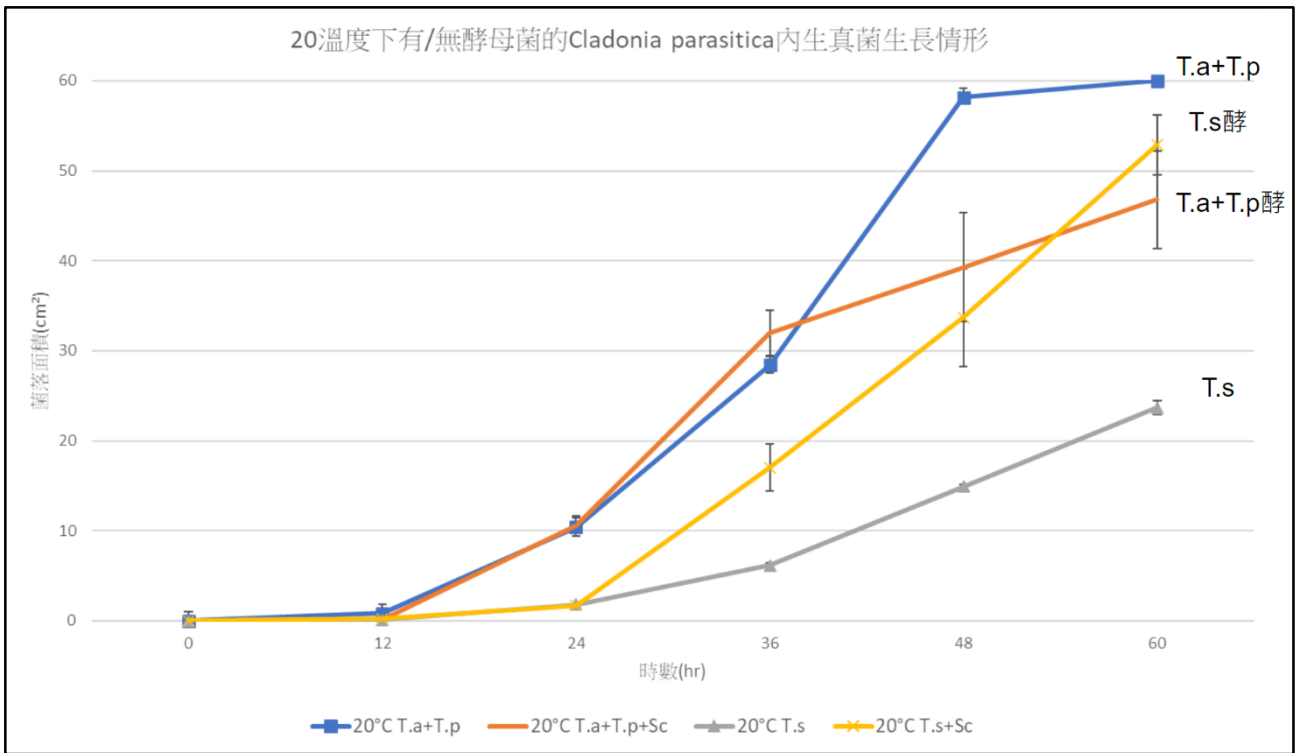
1. T. s 真菌：其菌落為與其對峙的 T. h 菌落面積的 70.99%。
2. T. a+T. p 真菌：其菌落為與其對峙的 T. h 菌落面積的 208.13%。
3. T. s+Sc 真菌：其菌落為與其對峙的 T. h 菌落面積的 95.26%。
4. T. a+T. p+Sc 真菌：其菌落為與其對峙的 T. h 菌落面積的 125.48%。
5. *Cladonia parasitica* 内生真菌比較：T. a+T. p 真菌菌落面積最大，在加入酵母後其菌落面積縮小；T. s 真菌菌落面積較小，但加入酵母菌後其菌落面積變大。
6. T. h 真菌在不同環境下的比較：T. a+T. p 在未加入酵母菌時，生長菌落面積明顯大於 T. h，但 T. a+T. p 加入酵母菌後，與 T. h 的生長面積差異縮小；T. s 在未加入酵母菌時，生長菌落面積小於 T. h，但加入酵母菌後，其生長菌落面積即大於 T. h。
7. 根據原始數據計算得出 T. s 和與 T. s 對峙的 T. h、T. a+T. p 和與 T. a+T. p 對峙的 T. h 兩組間的 p 值均小於 0.05

八、探討在不同溫度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌的生長情形



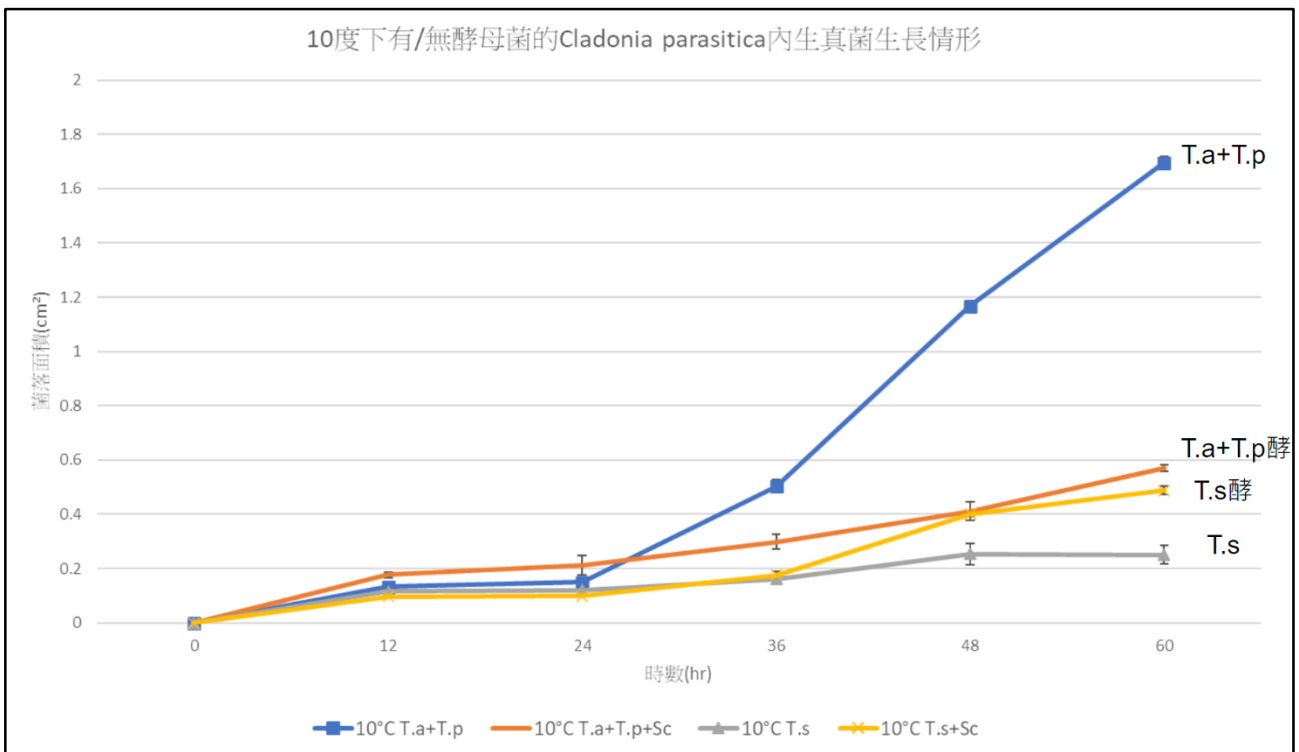
圖十九、30度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌生長情形

由圖十九可見，在 30 度的環境成長速率及面積最快的組別為 T. a+T. p 組，在 24 小時即長滿培養基。而加酵母菌的 T. s 組位居第二，第三為加酵母菌的 T. a+T. p 組，最後為 T. s 組。



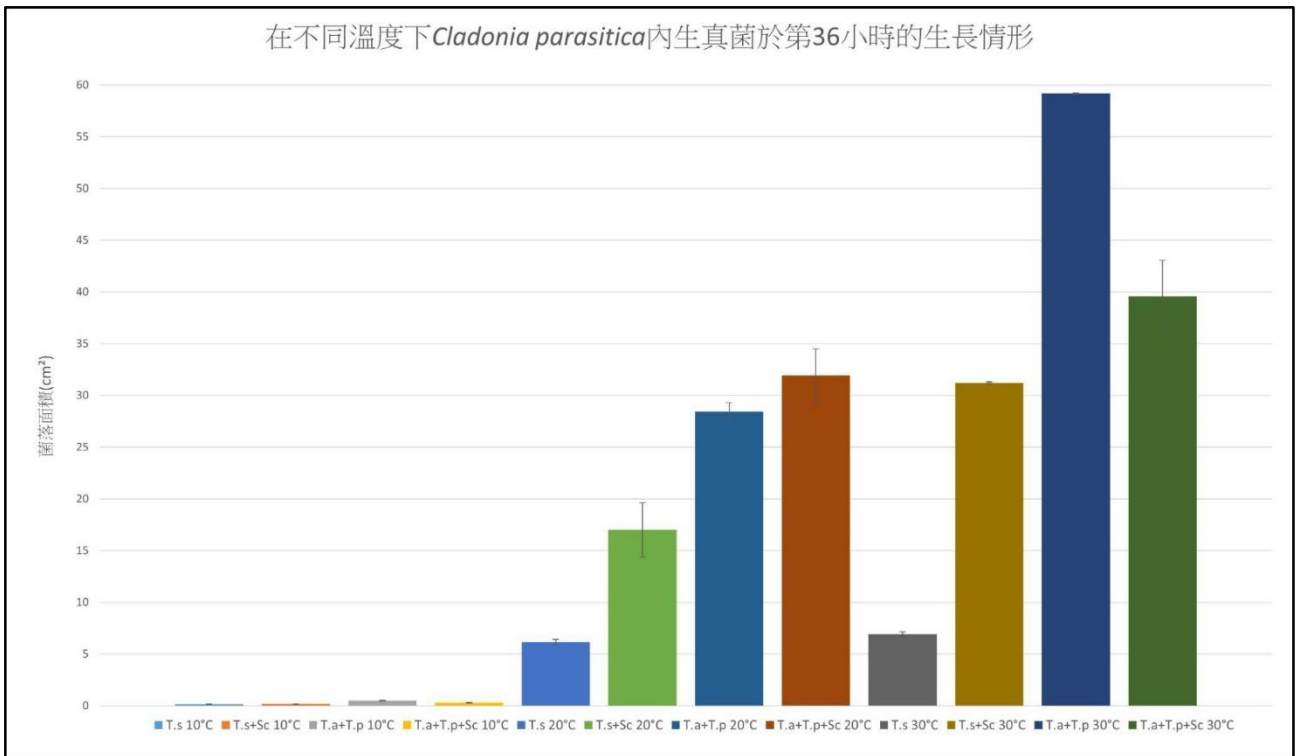
圖二十、20 度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌生長情形

由圖二十可見，在 30 度的環境成長速率及面積最快的組別為 T. a+T. p 組，在 24 小時即長滿培養基。而加酵母菌的 T. s 組位居第二，第三為加酵母菌的 T. a+T. 組，最後為 T. s 組。



圖二十一、10 度下有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌生長情形

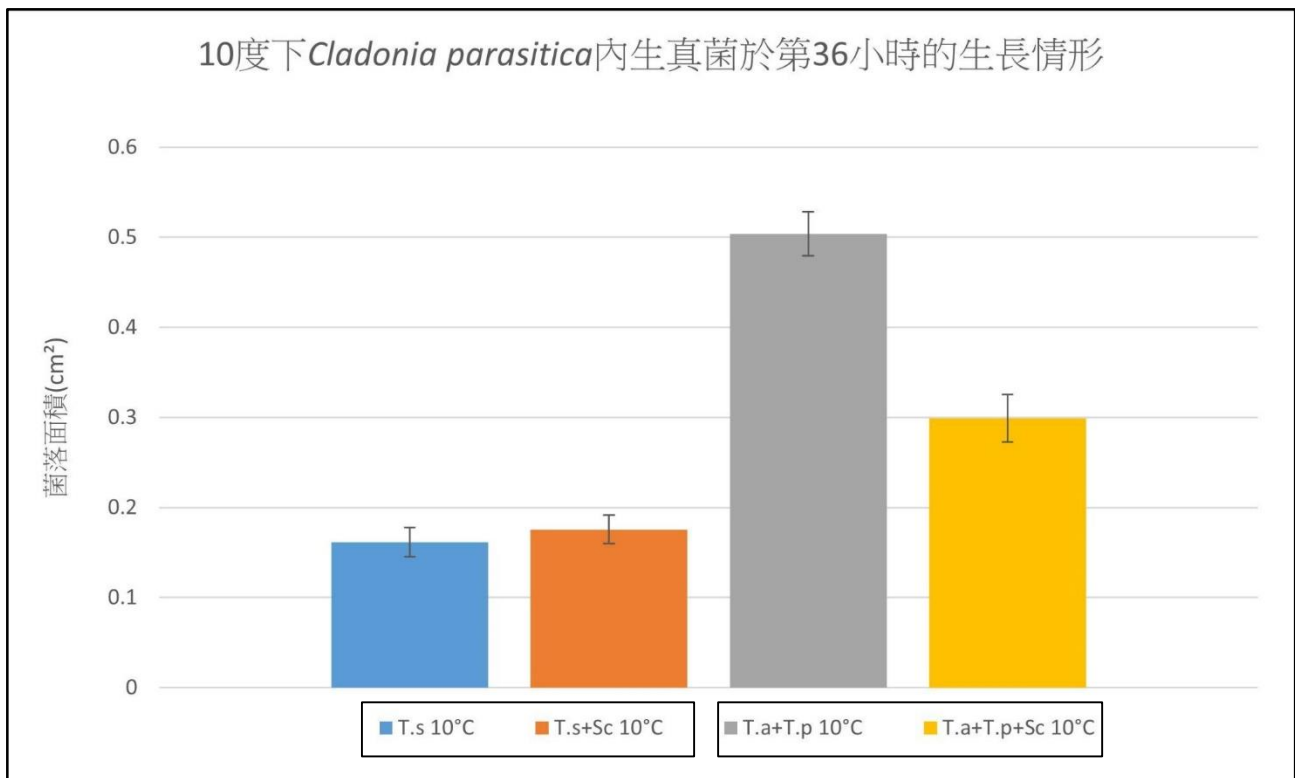
由圖二十一可見，在 10 度環境下 T. a+T. p 生長速率最快，在 36 小時後 T. a+T. p+Sc 生長面積明顯小於 T. a+T. p 組別，而 T. s+Sc 組、T. s 組、T. a+T. p+Sc 組的生長速率及菌落面積彼此差異不大。



圖二十二、不同溫度下 *Cladonia parasitica* 內生真菌於第 36 小時的生長面積

1. 20 度：T.s+Sc 菌落為 T.s 菌落面積的 276%、T.a+T.p+Sc 菌落為 T.a+T.p 菌落的 112.31%。
2. 30 度：T.s+Sc 菌落為 T.s 菌落面積的 306.6%、T.a+T.p+Sc 菌落為 T.a+T.p 菌落的 66.84%。
3. 30 度下 T.s 與 T.s+Sc、T.a+T.p 與 T.a+T.p+Sc 兩組的 p 值均 < 0.05，達顯著差異。

※註：因到了實驗後期有些組別已長滿培養基以致於無法比較其差異，故選定第 36 小時來呈現各組生長差異。



圖二十三、10度下 *Cladonia parasitica* 内生真菌於第 36 小時的生長面積

1. 10度：T. s 加酵菌落為 S 菌落面積的 108.66%、T. a+T. p 加酵菌落為 AP 菌落的 41.68%。

伍、討論

一、台灣的石蕊屬地衣中部分種類亦具有酵母菌共同生存於其中

採集中高海拔五屬十一種地衣，由實驗結果可發現石蕊屬地衣中有酵母菌的存在，如研究結果一列表，此發現與 Černajová I&et al 於 2019 年的研究結果相呼應，亦為台灣地衣研究的重要發現。

二、確認酵母菌於地衣中的分布位置-位於主要葉狀體

因多次從泡在高葡萄糖液內的主要葉狀體樣本中培養出酵母菌菌塊，且其他部位均無出現酵母菌菌塊，可知酵母菌在 *Cladonia parasitica* 內的分布區域為其主要葉狀體(Primary thallus)。石蕊屬地衣的主要葉狀體中亦為大部分内生真菌(endolichenic fungus)的所在處(Grimm&et al, 2021)，而由後續實驗可知酵母菌在地衣內角色應為平衡地衣内生真菌的生長，與地衣真菌的繁殖無關，因此酵母菌主要生長於主要葉狀體內。

三、地衣中存在的酵母菌為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

我們曾在培養出的菌盤中聞到濃濃酒味，由鑑種結果確認 *Cladonia parasitica* 內含有的酵母菌種類為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。此結果與 Lee TJ et al 於 2022 年的研究中從地衣樣本內培養出釀酒酵母的結果相符合。

四、*Cladonia parasitica* 的內生真菌鑑定均為木黴菌屬(*Trichoderma*)真菌，並了解其內的內生菌相

由鑑種結果可知本實驗培養出的內生真菌均屬於木黴菌屬 *Trichoderma*，此與 Li&et al 及 Nguyen&et al 均由地衣中培養出木黴屬內生真菌的結果相符合。其中由表五可知 *Trichoderma afroharzianum* 與 *Trichoderma pubescens* 共同混和生長，且型態穩定。有鑑於此情況在 *Cladonia parasitica* 與 *Cladonia botrytes* 所培養出的真菌樣本皆出現，推測 *Trichoderma afroharzianum* 與 *Trichoderma pubescens* 間存有共生關係，且能形成同時存有兩種真菌的菌落，由鑑種結果建立出 *Cladonia parasitica* 的內生菌相，亦為地衣研究的重要進展。

五、酵母菌與 *Cladonia parasitica* 內生真菌間的交互作用

(一)酵母菌的存在會抑制 *Trichoderma afroharzianum* 和 *Trichoderma pubescens* (T.a+T.p)真菌的成長並幫助 *Trichoderma simmonsii* (T.s)真菌的成長

由圖十可見 T.a+T.p 真菌在加了酵母菌後其成長速率及菌落面積皆有下降，而 T.s 真菌在加了酵母菌後在成長速率與菌落面積上皆有成長。由此可見酵母菌的存在會抑制 *Trichoderma afroharzianum* 和 *Trichoderma pubescens* (T.a+T.p)真菌的成長並幫助 *Trichoderma simmonsii* (T.s)真菌的成長，並且由圖表可見加酵母菌的 T.a+T.p 與 T.s 真菌有著相似的成長曲線。

(二)分離自 *Cladonia parasitica* 的酵母菌株有發展為生物農藥，協助對抗植物疾病病原體的潛力

根據 Annette Pfordt 和 Y. Ben M'henni 分別針對 *Trichoderma afroharzianum* 和 *Trichoderma simmonsii* 的研究文獻，*Trichoderma afroharzianum* 為 *Trichoderma Afroharzianum Ear Rot* (非洲木黴穗腐病)的主要病原菌；*Trichoderma simmonsii* 已知可與 *Aspergillus westerdijkiae* 聯合防治 Apple Tree Dieback Disease(蘋果樹枯死病)，而在我們的實驗中發現酵母菌可減緩 *Trichoderma afroharzianum* 的生長並加速 *Trichoderma simmonsii* 的生長，所以我們推測此地衣中存在的酵母菌可能有助於抑制

植物性疾病病原菌的生長並促進抗病原菌的有益真菌生長，有發展生物農藥的潛力。

六、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌相對於同種地衣内生真菌的生長情形

(一) T.a+T.p 與 S 真菌皆存在時酵母菌仍維持促進 S 真菌並抑制 AP 真菌成長

比較圖十二與十三可見，對峙中的 T.a+T.p 真菌在加了酵母菌後菌落面積均有減少，且在生長速率上亦有減緩。而 T.s 真菌加了酵母菌後有較高的成長速率及菌落面積。以上結果符合實驗五所得到之結果，可見酵母菌對 *Cladonia parasitica* 内生真菌的影響在 T.a+T.p 與 T.s 真菌皆存在的狀況下仍維持促進 T.s 真菌並抑制 T.a+T.p 真菌成長的規律。

(二) 酵母菌有助於平衡 T.a+T.p 及 T.s 真菌在 *Cladonia parasitica* 地衣中的數量

如圖十二可見，在 T.s 真菌沒有加酵母菌的狀態下，T.a+T.p 組別的菌落面積均為 T.s 組別的兩倍以上。而由圖十三可見加了酵母菌後的 T.s 組別的菌落面積均約為與其對峙的 T.a+T.p 組別的 75% 左右。比較圖十二與圖十三可見 T.s 真菌加了酵母菌後與 T.a+T.p 組別的菌落面積差異有顯著的減少。綜上所述，可知酵母菌有助於維持 T.a+T.p 及 T.s 真菌間的比例並減少兩者間的面積差異，因此推測酵母菌在 *Cladonia parasitica* 地衣內有平衡其内生真菌的角色。

七、比較有/無酵母菌的 *Cladonia parasitica* 内生真菌相對於他種地衣内生真菌的生長情形

(一) 酵母菌在外界菌源存在時，仍維持促進 T.s 真菌並抑制 T.a+T.p 真菌成長

由圖十六與十七可見，在與他種地衣内生真菌對峙下，加了酵母菌的 T.a+T.p 真菌生長面積仍小於 T.a+T.p 真菌，且加了酵母菌的 T.s 真菌生長面積仍大於 T.s 真菌，此結果與討論五、六中觀察到的現象相似，可知酵母菌對 *Cladonia parasitica* 内生真菌的影響不易受外界菌源的干擾。

(二) 酵母菌能提升 T.s 真菌在對上他種地衣之內生真菌時的競爭力

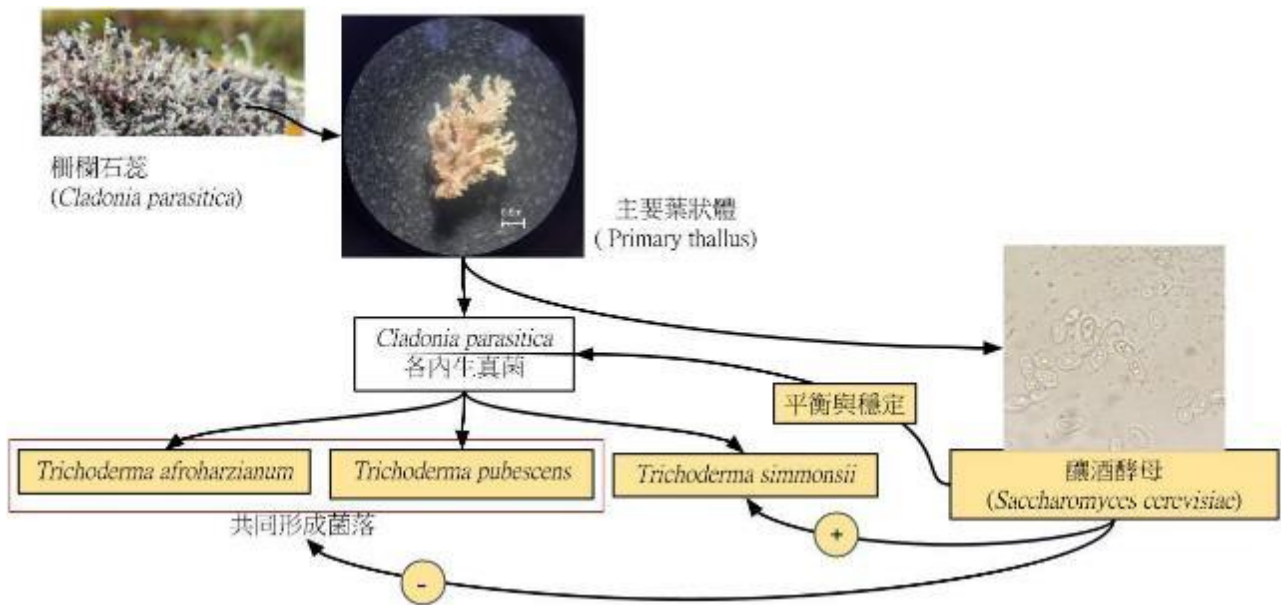
由圖十六可見，在與 T.h 真菌對峙時，T.a+T.p 真菌的成長速率與面積均大於 T.h 真菌許多，而加入酵母菌後雖在成長速率與菌落面積上均減少，但仍高於與其對峙之 T.h 真菌；由圖十七可見，T.s 真菌原先的成長速率與菌落面積均較 T.h 真菌弱勢，而加入酵母菌後 T.s 真菌的成長速率與面積均較 T.h 真菌高，顯示酵母菌能提升 T.s 真菌在對上他種地衣之內生真菌時的競爭力，對有酵母菌存在的地衣可能具生存上的競爭優勢。

八、酵母菌在 10~30 度溫度區間對 *Cladonia parasitica* 内生真菌所產生的影響維持一致，可類比其於原生環境中酵母菌在地衣中的角色與功能

由圖十九、二十、二十一可分別看見加了酵母菌的 T.a+T.p、T.s 真菌在不同溫度下彼此間均保持一定的規律：T.a+T.p 真菌加了酵母菌後菌落面積減少、T.s 真菌加了酵母菌後菌落面積增加，此結果可與上述討論相互映照，支持酵母菌會使生長較快速的 T.a+T.p 真菌生長減緩、使生長較緩慢的 T.s 真菌生長加快的推論，並且可知**酵母菌在不同溫度下對 *Cladonia parasitica* 内生真菌所產生的影響維持一致。**另外由於實驗地衣樣本採集地太平山的年均溫為 11、12°C，夏季均溫可達 20°C 以上，皆包含在本實驗所選定的溫度範圍內，因此可知**本研究結果可類比於其原生環境中，酵母菌在地衣中可能扮演的角色。**

陸、結論

- 一、台灣的石蕊屬(*Cladonia*)地衣中有酵母菌的存在。
- 二、酵母菌分布於 *Cladonia parasitica* 地衣中的主要葉狀體 (Primary Thallus)，且在各個生長階段的主要葉狀體內均可發現。
- 三、*Cladonia parasitica* 地衣含有的酵母菌菌種為釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。
- 四、*Cladonia parasitica* 地衣中的内生真菌有 *Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*、*Trichoderma simmonsii*、*Trichoderma reesei*，其中 *Trichoderma afroharzianum* 和 *Trichoderma pubescens* 表現出共生關係並可在其他石蕊屬地衣中發現。
- 五、酵母菌會幫助 *Trichoderma simmonsii* 成長，並減緩 *Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens* 成長。
- 六、酵母菌有抑制植物性疾病病原菌成長及促進有益真菌種成長的可能性。
- 七、酵母菌有助於平衡及穩定 *Cladonia parasitica* 地衣中各内生真菌的成長與比例。
- 八、酵母菌有助於提升 *Trichoderma simmonsii* 對上他種地衣内生真菌時的競爭力。
- 九、酵母菌對 *Cladonia parasitica* 内生真菌的影響在不同環境溫度下能維持一定規律，且不易受外界菌源的干擾。



圖二十四、柵欄石蕊地衣中酵母菌與内生真菌互動關係圖

※圖中有著色處為本研究之成果

柒、參考資料及其他

- 一、Černajová I, Škaloud P. (2019) The first survey of Cystobasidiomycete yeasts in the lichen genus *Cladonia*; with the description of *Lichenzozyma pisutiana* gen. nov., sp. nov. *Fungal Biol.* 2019 Sep;123(9):625-637. doi: 10.1016/j.funbio.2019.05.006. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31416582.
- 二、Lee TJ, Liu YC, Liu WA, Lin YF, Lee HH, Ke HM, Huang JP, Lu MJ, Hsieh CL, Chung KF, Liti G, Tsai IJ. (2022) Extensive sampling of *Saccharomyces cerevisiae* in Taiwan reveals ecology and evolution of predomesticated lineages. *Genome Res.* 2022 May;32(5):864-877. doi: 10.1101/gr.276286.121. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361625; PMCID: PMC9104698.
- 三、Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD. 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Divers.* 25:69–80.
- 四、Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform
- 五、Nguyen&et al. 2022. Biological Activity of the Endolichenic *Trichoderma* spp. Isolated from Lichens *Cryptothecia* spp. and *Dirinaria* spp.

六、 Gheza G, Di Nuzzo L, Vallese C, Barcella M, Benesperi R, Giordani P, Nascimbene J, Assini S. Morphological and Chemical Traits of *Cladonia* Respond to Multiple Environmental Factors in Acidic Dry Grasslands. *Microorganisms*. 2021 Feb 22;9(2):453. doi: 10.3390/microorganisms9020453. PMID: 33671558; PMCID: PMC7926809.

七、 Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*. 2016 Jul 29;353(6298):488-92. doi: 10.1126/science.aaf8287. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27445309; PMCID: PMC5793994.

八、 Y. Ben M'henni(2022).Biocontrol and Growth Promotion Potential of Combined Application of *Trichoderma simmonsii* and *Aspergillus westerdijkiae* Against Apple Tree Dieback Disease

九、 Annette Pfordt.(2020).*Trichoderma Afroharzianum* Ear Rot-A New Disease on Maize in Europe.

十、 Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N. (2017) Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens

【評語】 052108

1. 本研究主要在分析地衣柵欄石蕊(*Cladonia parasitica*)中的真菌及酵母菌種類，及其彼此間的相互作用關係。
2. 本研究探討地衣內酵母菌的存在及與內生真菌的互動關係，從野外採樣，利用定序分類，到各類菌之間交互的對峙實驗，是個完整度很好的作品。
3. 本研究對結果的討論可再加強與其他科學文獻之比較。

作品海報



探討地衣內酵母菌的存在及
與內生真菌的互動關係

.....

摘要 & 動機

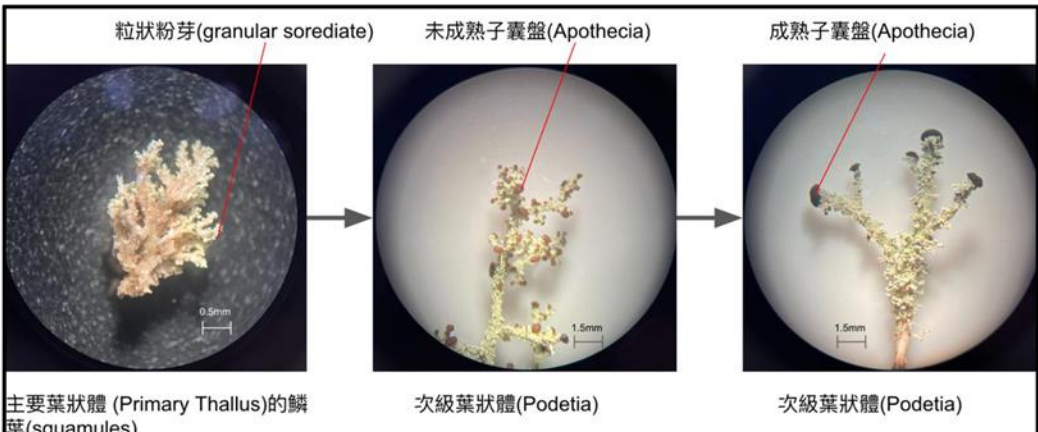
本研究旨在探討地衣內酵母菌的存在及與內生真菌的互動關係。首先將採集地衣樣本分類並進行酵母菌培養，從柵欄石蕊(*Cladonia parasitica*)培養出酵母菌並以其進行研究。我們鎖定酵母菌在*Cladonia parasitica*中分布於其主要葉狀體(Primary thallus)，並由鑒種得知其為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。我們亦培養柵欄石蕊等地衣的內生真菌並鑒種得知柵欄石蕊有*Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*、*Trichoderma simmonsii*、*Trichoderma reesei*等木黴屬內生真菌。亦透過對峙實驗得知釀酒酵母在攝氏10~30度間，無論有無其他菌源下，均能促進*Trichoderma simmonsii*成長並抑制*Trichoderma afroharzianum*及*Trichoderma pubescens*，推測地衣中的酵母菌具有平衡內生真菌，並具有發展為生物農藥的潛力。

- (一) 將採集各種地衣樣本分類並嘗試從中找出內含酵母菌的地衣
- (二) 探究酵母菌於地衣中的分布位置
- (三) 地衣中存在的酵母菌之種類鑒定
- (四) 地衣中內生真菌之種類鑒定
- (五) 探討在有/無酵母菌環境下*Cladonia parasitica*內生真菌的生長情形
- (六) 比較有/無酵母菌的*Cladonia parasitica*內生真菌相對於同種地衣內生真菌的生長情形
- (七) 比較有/無酵母菌的*Cladonia parasitica*內生真菌相對於他種地衣內生真菌的生長情形
- (八) 模擬原生環境(不同溫度與培養基)下酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響

柵欄石蕊與地衣內生真菌介紹

一、柵欄石蕊 (*Cladonia parasitica*) 介紹

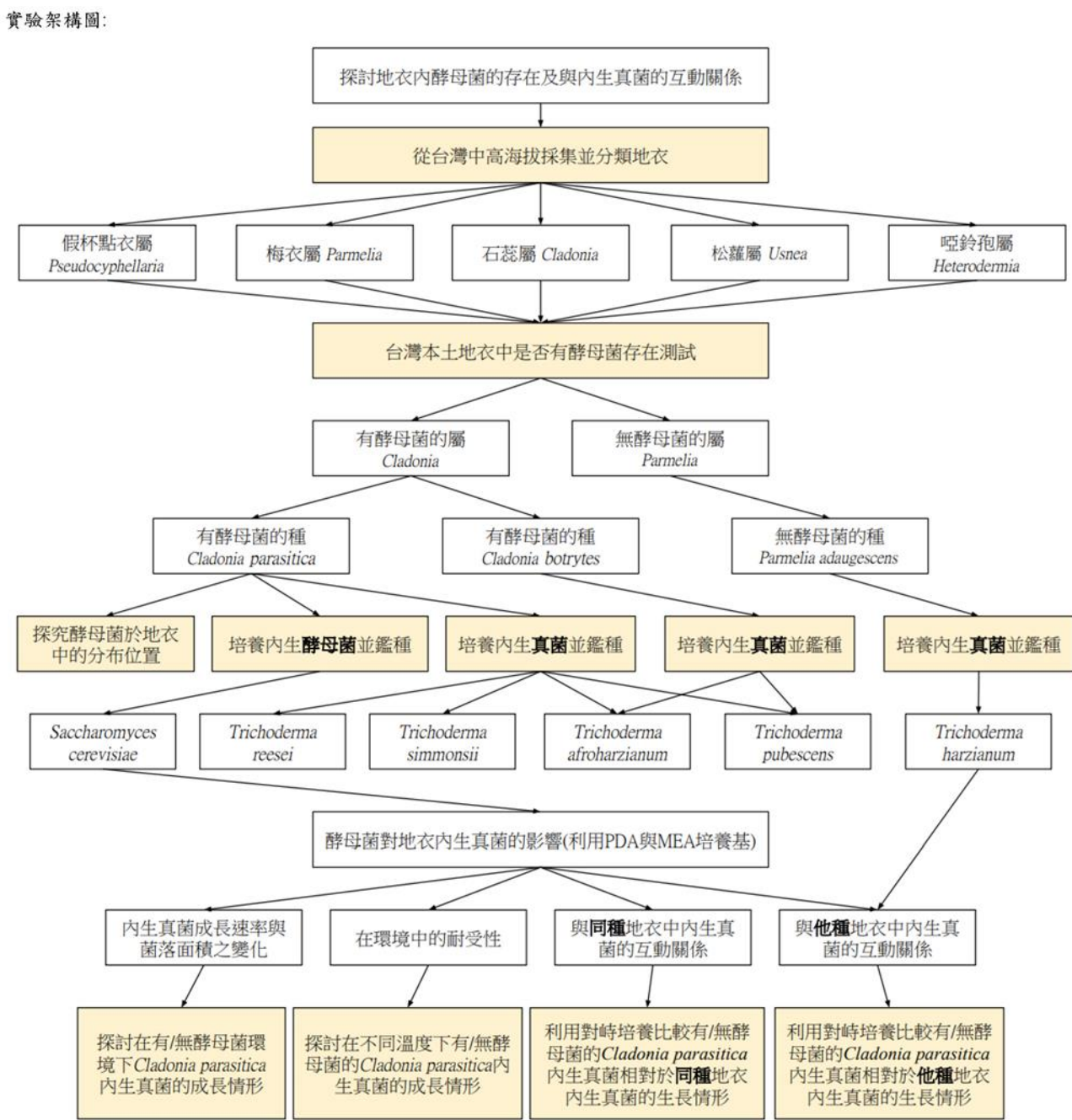
- (一) 分布：亞洲、歐洲、北美(東部為主)、西印度群島；在台灣分布於中高海拔山區
- (二) 喜好環境：潮濕枯木上
- (三) 外觀與主要構造：如右圖
 1. 葉狀體：可分為主要葉狀體 (Primary Thallus) 與次級葉狀體 (Podetia)。主要葉狀體以鱗狀 (squamulose) 結構為主，上具鱗葉 (squamules)：最高可長至2.5mm，最寬至1mm，其上多粒狀粉芽 (granular sorediate)，有時呈珊瑚狀分支 (coralloid-lobulate)；次級葉狀體可長至3~15mm高，暗棕色或灰色，通常不分支。表面多粒狀粉芽，外表呈鱗狀、皺褶狀 (rugose)、樹皮狀 (corticated)。
 2. 子囊盤 (Apothecia)：常見於次級葉狀體末端，少數長於主要葉狀體上。外表為暗棕色或黑色球狀體，最大可至1.5mm寬。



二、地衣內生真菌 (Endolithic fungi) 介紹

地衣內除了構成其主要結構之地衣真菌外，其葉狀體 (Thallus) 內還存在著多種地衣內生真菌。這些內生真菌被發現會穩定存在於同一物種的地衣內，並構成其內生真菌菌相。許多內生真菌在地衣內的詳細角色尚未完全被了解，但許多種類會分泌具抗細菌、抗真菌、分解物質能力的代謝物。

架構圖



地衣分類表格

一、將採集各種地衣樣本分類並嘗試從中找出內含酵母菌的地衣

(一) 由樣本中辨認出五個屬(石蕊屬、梅衣屬、松蘿屬、假杯點衣屬、啞鈴孢屬)共十一種地衣。

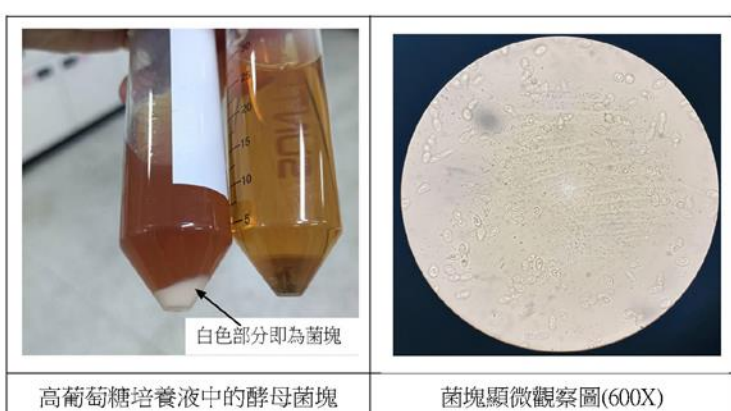
照片	屬名	學名/俗稱	有無培養出酵母菌
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia parasitica</i> 柵欄石蕊	v
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia botrytes</i>	v
	Parmelia 梅衣屬	<i>Parmelia adaugescens</i> 成長梅衣	x
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia rangiferina</i>	x
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia portentosa</i> 馴鹿地衣	x
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia macilenta</i> 瘦柄紅石蕊	x
	Cladonia 石蕊屬	<i>Cladonia squamosa</i> 龍杯地衣 <i>Cladonia ramulosa</i> 麋皮石蕊	x
	Pseudocyphellaria 假杯點衣屬	<i>Pseudocyphellaria aurata</i> 黃假杯點衣	x
	Heterodermia 啞鈴孢屬	<i>Heterodermia heterodermia</i>	x
	Usnea 松蘿屬	<i>Usnea arizonica</i> 亞歷山大松蘿	x
	Usnea 松蘿屬	<i>Usnea barbata</i> 鬚松蘿	x

註：圖中有著色欄位為實驗用之地衣

研究結果與討論

二、觀察酵母菌於 *Cladonia parasitica* 地衣中的分布位置

(一) 高葡萄糖培養液純化：
由主要葉狀體的樣本中多次培養出菌塊，其鑒種結果如實驗三。



討論：

● 酵母菌在 *Cladonia parasitica* 內的分布區域為其主要葉狀體
因多次從泡在高葡萄糖液內的主要葉狀體樣本中培養出酵母菌菌塊，且其他部位均無出現酵母菌菌塊，可知酵母菌在 *Cladonia parasitica* 內的分布區域為其主要葉狀體 (Primary thallus)。推測其原因為石蕊屬地衣的主要葉狀體中亦為大部分內生真菌 (endolithic fungus) 的所在處 (Grimm et al, 2021)，而由後續實驗可知酵母菌在地衣內角色應為平衡地衣內生真菌的生長，與地衣真菌的繁殖無關，因此酵母菌主要生長於主要葉狀體內。

三、地衣中存在的酵母菌之種類鑒定

鑒種藥品及流程表

藥品	ul	程序		
For ITS PCR				
正向引子(ITS1Fngs)5um	1	95°C	3min	1 cycle
反向引子(ITS4)5um	1	95°C	30sec	
KAPA Taq Ready mix	12.5	52°C	30sec	30 cycle
DNA	1	72°C	1min	
2d Water	9.5	72°C	5min	1 cycle
總體積	25	16°C	Infinity	

- 引子對
 - 正向引子：ITS1Fngs
序列：GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
 - 反向引子：ITS4
序列：TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC



酵母菌序列BLAST比對結果

● 柵欄石蕊內含有的酵母菌為釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*
由鑒種結果確認結果確認 *Cladonia parasitica* 內含有的酵母菌種類為釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。此結果與 Lee TJ et al 於 2022 年的研究中從地衣內培養出釀酒酵母的結果相符合。

結論：

- 台灣的石蕊屬 (*Cladonia*) 地衣中有酵母菌的存在
- 酵母菌分布於 *Cladonia parasitica* 地衣中的主要葉狀體 (Primary Thallus)，且在各個生長階段的主要葉狀體內均可發現。
- *Cladonia parasitica* 地衣含有的酵母菌菌種為釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。

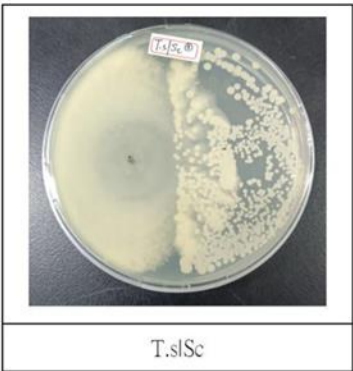
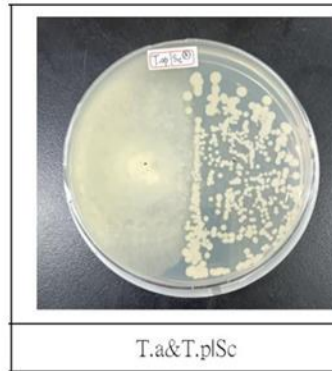
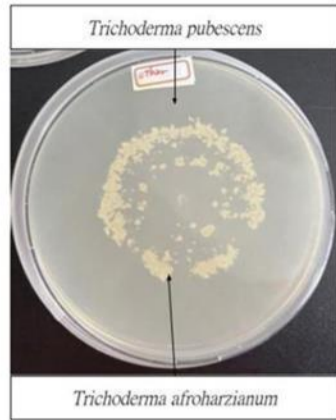
四、地衣中內生真菌之種類鑑定

我們想了解培養出酵母菌的*Cladonia parasitica*與*Cladonia botrytes*，其內含有哪些內生真菌，故將其分離培養出的真菌進行鑑種；另外亦將不含有酵母菌的地衣(*Pseudocyphellaria aurata*)中培養出的內生真菌進行鑑種，以了解酵母菌與這些真菌間的互動關係。

- 引子對
 - 正向引子: ITS1Fngs
序列: CCT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
 - 反向引子: ITS4
序列: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

各地衣與其內生真菌種類對照表(可與下面菌盤圖參照)

地衣學名	內生真菌學名
<i>Cladonia parasitica</i>	<i>Trichoderma afroharzianum</i>
	<i>Trichoderma pubescens</i>
	<i>Trichoderma simmonsii</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Cladonia botrytes</i>	<i>Trichoderma afroharzianum</i>
	<i>Trichoderma pubescens</i>
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>



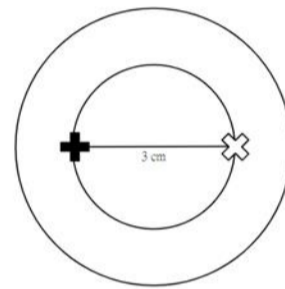
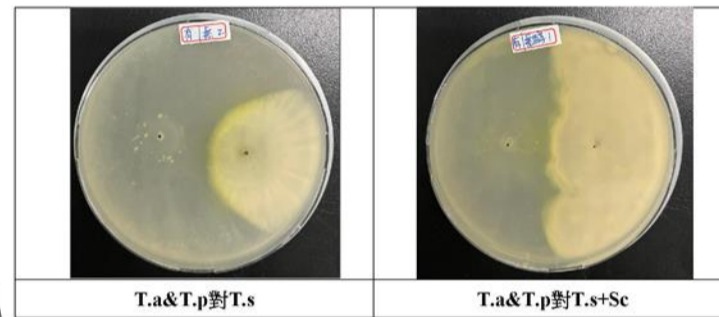
討論:

- 由單點實驗可見T.a&T.p真菌在加了酵母菌後其成長速率及菌落面積皆有下降，而T.s真菌在加了酵母菌後在成長速率與菌落面積上皆有成長。由此可見酵母菌的存在會抑制*Trichoderma afroharzianum*和*Trichoderma pubescens* (T.a&T.p)真菌的成長並幫助*Trichoderma simmonsii* (T.s)真菌的成長，並且由圖表可見加酵母菌的T.a+T.p與T.s真菌有著相似的成長曲線。
- 根據Annette Pfordt的研究，*Trichoderma afroharzianum*為*Trichoderma Afroharzianum Ear Rot* (非洲木黴腐病)的主要病原菌。根據Y. Ben M'henni的研究，*Trichoderma simmonsii*已知可與*Aspergillus westerdijkiae*聯合防治Apple Tree Dieback Disease(蘋果樹枯死病)，而我們實驗中發現酵母菌可減緩*Trichoderma afroharzianum*的生長並加速*Trichoderma simmonsii*的生長，所以我們推測此地衣中存在的酵母菌可能有助於抑制植物性病原菌的生長並促進抗病原菌的有益真菌生長，有發展生物農藥的潛力。
- 由酵母菌對峙實驗可看出T.a&T.p在碰到酵母菌後成長速率有顯著的減緩，而T.s則未受到明顯抑制。

結論:

- 酵母菌會幫助*Trichoderma simmonsii*成長，並減緩*Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*成長。
- 酵母菌有抑制植物性病原菌成長及促進有益真菌成長的情形，有發展生物農藥的潛力。

六、比較有/無酵母菌的*Cladonia parasitica*內生真菌相對於同種地衣內生真菌的生長情形

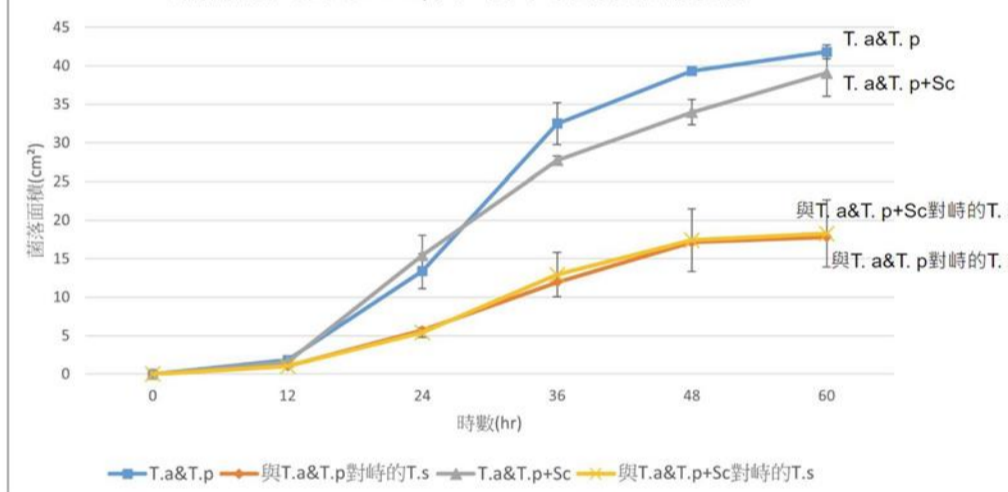


地衣內生真菌A	地衣內生真菌B
T.a&T.p	T.s
T.a&T.p+Sc	T.s
T.a&T.p	T.s+Sc
T.a&T.p+Sc	T.s+Sc

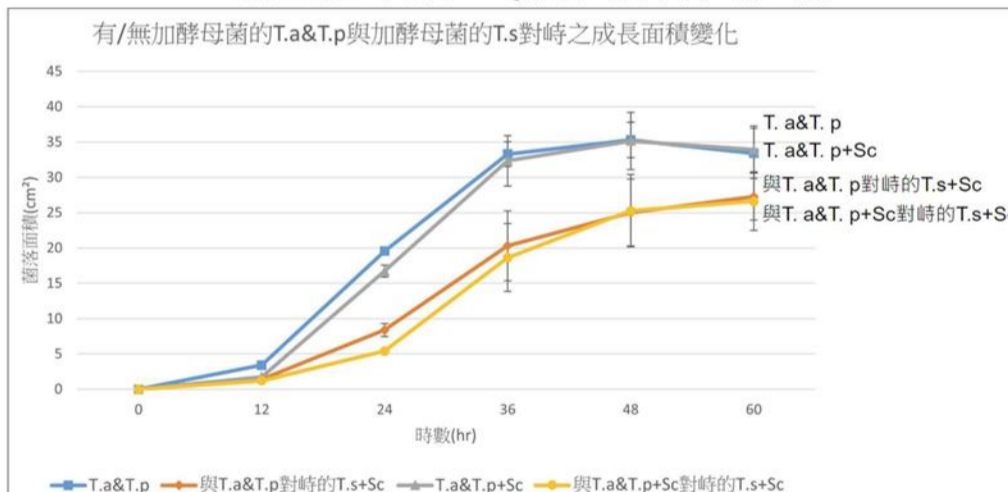
同種地衣中內生真菌的對峙實驗

對峙實驗示意圖

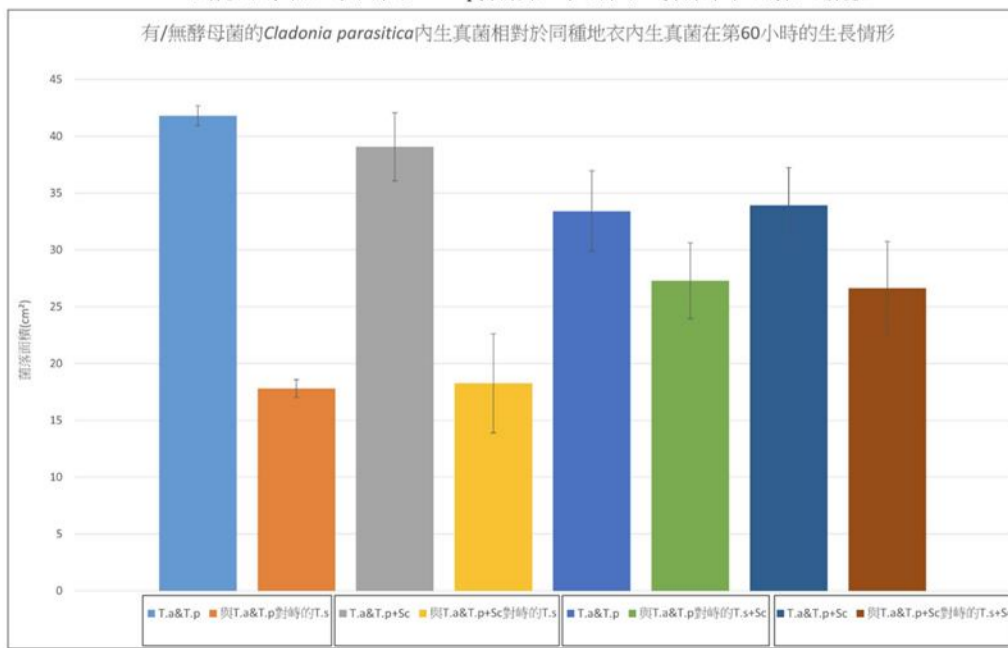
有/無加酵母菌的T.a&T.p與T.s對峙時之成長面積變化



PDA培養基中有/無加酵母菌的T.a&T.p真菌與T.s真菌對峙時之成長面積變化

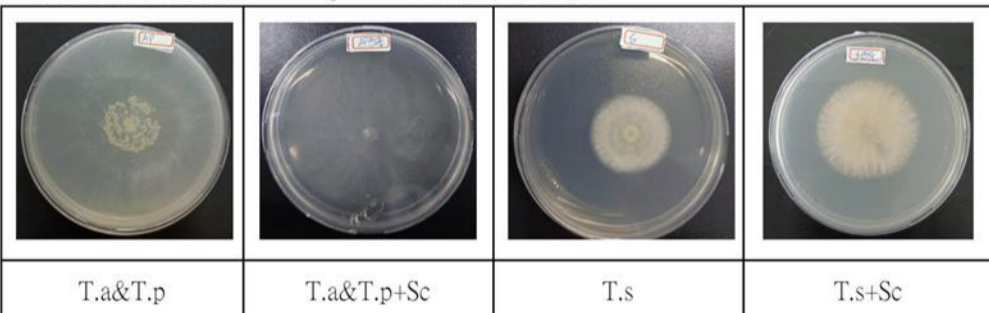


PDA培養基中有/無加酵母菌的T.a&T.p真菌與加酵母菌的T.s真菌對峙時之成長面積變化

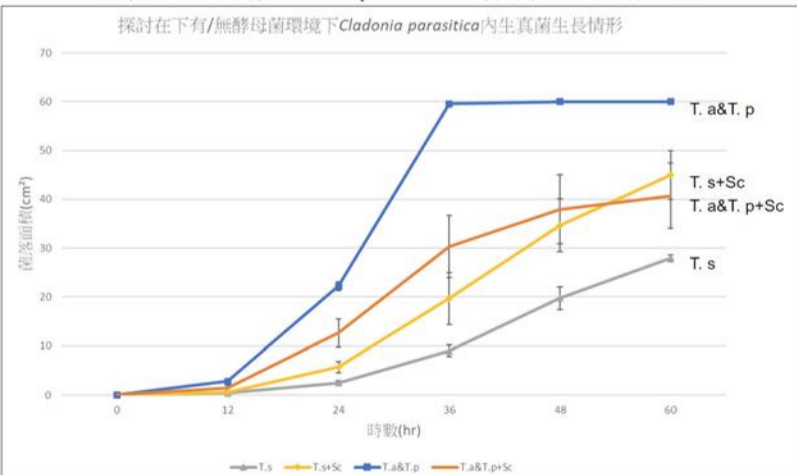


PDA培養基中有/無加酵母菌的Cladonia parasitica內生真菌相對於同種地衣內生真菌在第60小時的生長情形

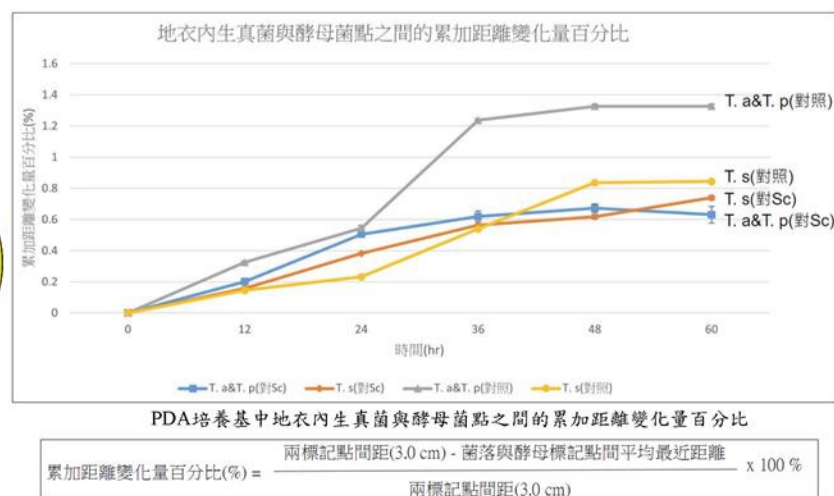
五、探討在有/無酵母菌環境下*Cladonia parasitica*內生真菌的生長情形



在有/無酵母菌環境下Cladonia parasitica內生真菌第60小時培養基照片



PDA培養基中有/無加酵母菌環境下Cladonia parasitica內生真菌的生長情形



地衣內生真菌

酵母菌

PDA培養基中地衣內生真菌與酵母菌點之間的累加距離變化百分比

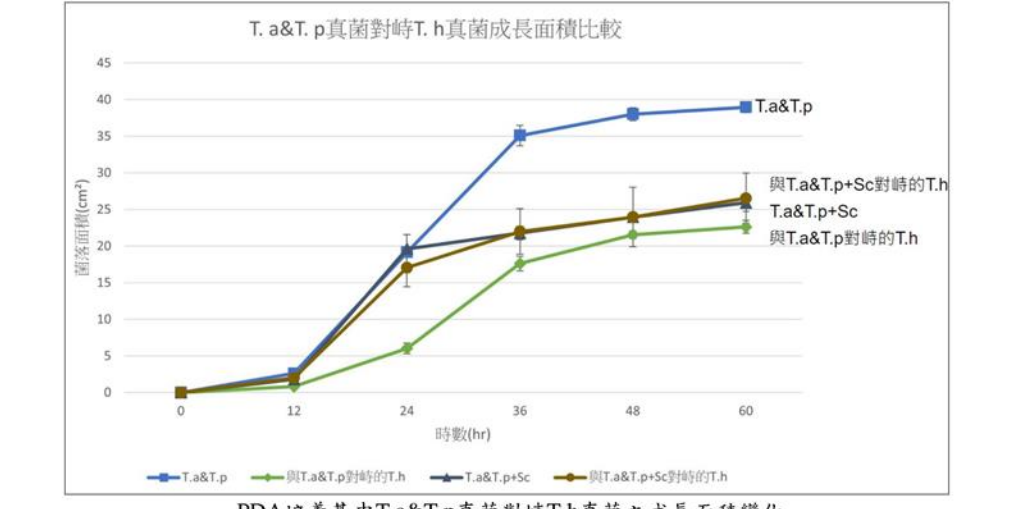
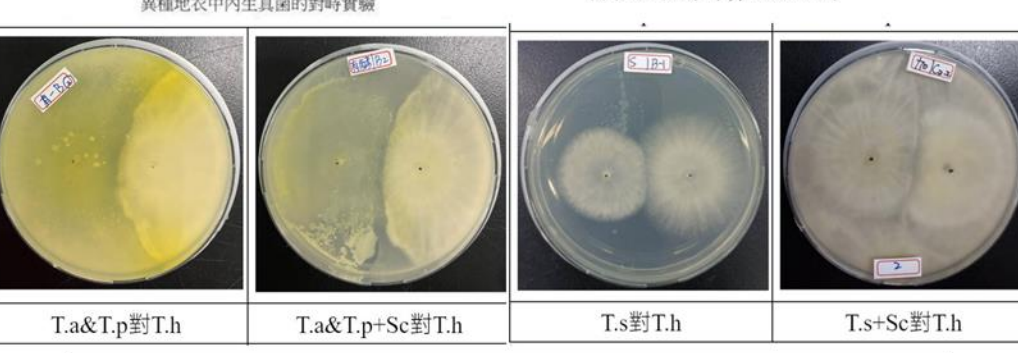
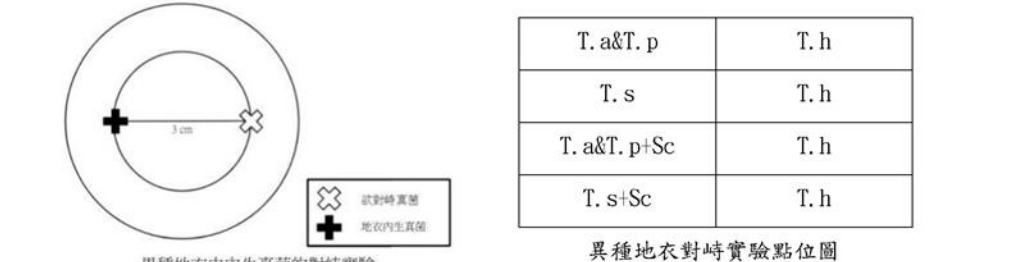
$$\text{累加距離變化百分比}(\%) = \frac{\text{兩標記點間距}(3.0\text{cm}) - \text{菌落與酵母標記點間平均最近距離}}{\text{兩標記點間距}(3.0\text{cm})} \times 100\%$$

- 討論：
- 比較上面兩圖可見，對峙中的T.a&T.p真菌在加了酵母菌後菌落面積均有減少，且生長速率亦有減緩。而T.s真菌加了酵母菌後有較高的成長速率及菌落面積。以上結果符合實驗五所得之結果，可見酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響在T.a+T.p與T.s真菌皆存在的狀況下仍維持促進T.s真菌並抑制T.a+T.p真菌成長的規律。
 - 如上圖可見，T.s真菌沒有加酵母菌時，T.a&T.p組別的菌落面積均為T.s組別的两倍以上。而加酵母菌後的T.s組別的菌落面積均約為與其對峙的T.a+T.p組別的75%左右。比較上面兩圖可見T.s真菌加了酵母菌後與T.a&T.p組別的菌落面積差異具有顯著的減少。綜上所述，可知酵母菌有助於維持T.a+T.p及T.s真菌間的比例並減少兩者間的面積差異，因此推測酵母菌在*Cladonia parasitica*地衣內有平衡其內生真菌的角色。

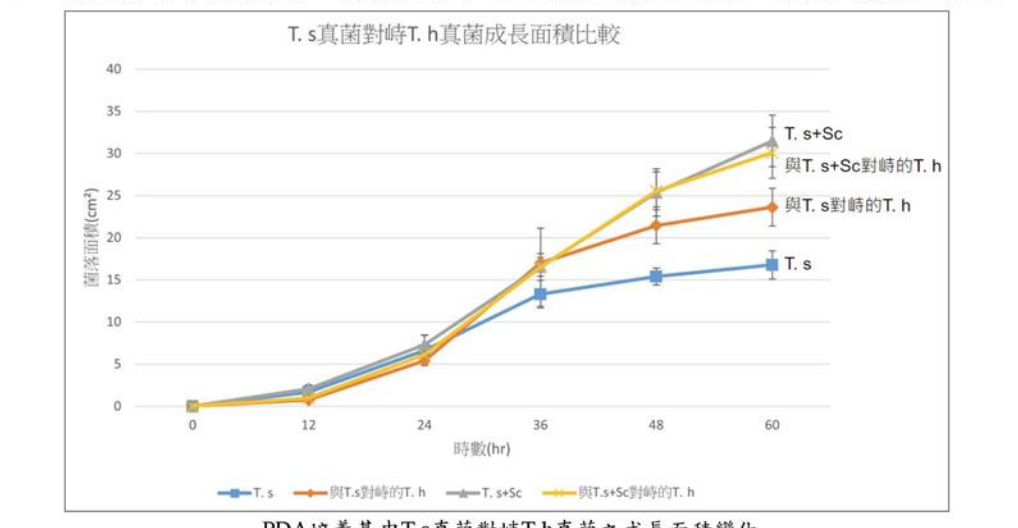
結論：

- 酵母菌能透過增加T.s成長與減緩T.a&T.p成長來減少菌種間的菌落差距。
- 酵母菌有助於平衡及穩定*Cladonia parasitica*地衣中各內生真菌的成長與比例。

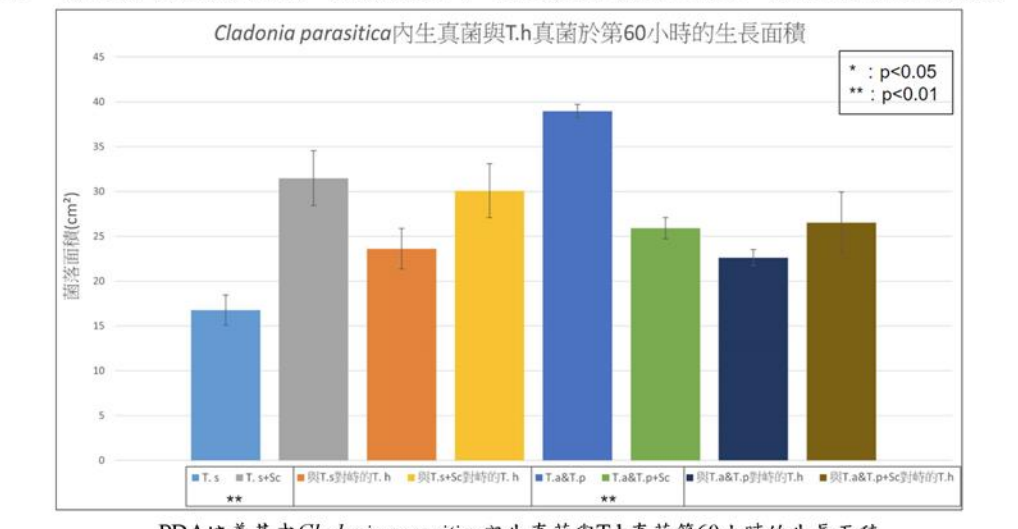
七、比較有/無酵母菌的*Cladonia parasitica*內生真菌相對於他種地衣內生真菌的生長情形



※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。



※註：由於此實驗為兩菌種在同一培養基上對峙，因此菌落面積會小於僅種一菌種於培養基上的狀況。

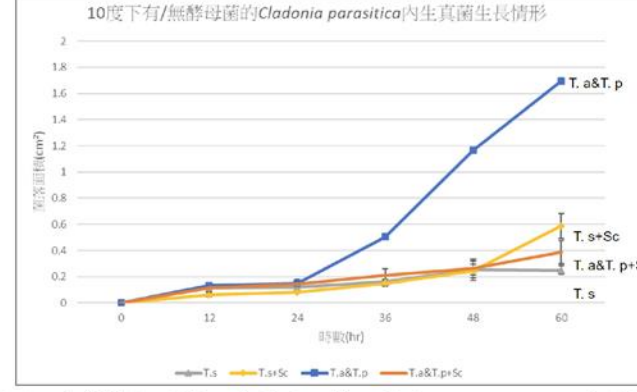
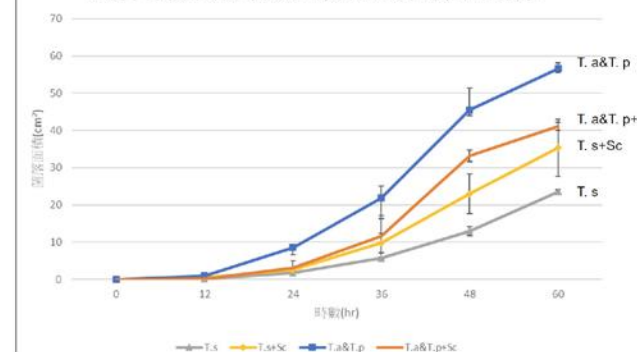
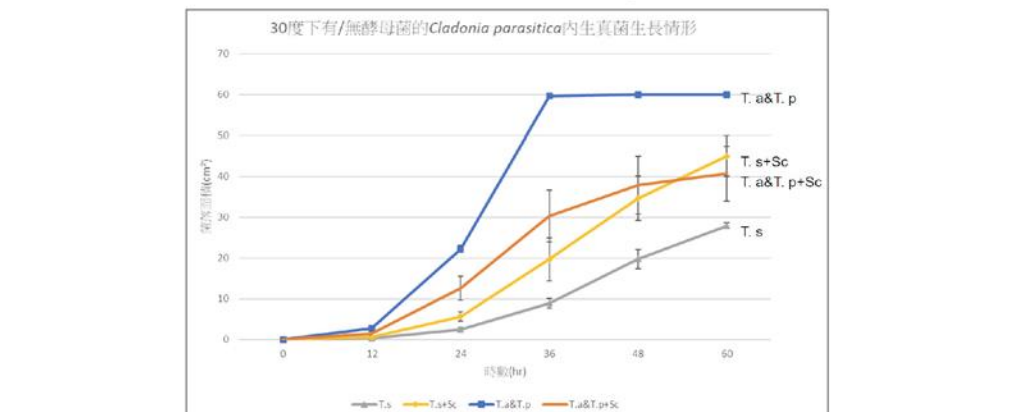


- 討論：
- 由上面兩圖可見，在與他種地衣內生真菌對峙下，加了酵母菌的T.a&T.p真菌生長面積仍有減少，加了酵母菌的T.s真菌生長面積依然增加，此結果與實驗五、六中觀察到的現象相似，可知酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響不易受外界菌源的干擾。
 - 由上圖可見，T.s真菌原先的成長速率與菌落面積均較T.h真菌弱勢，而加入酵母菌後T.s真菌的成長速率與面積均較T.h真菌高，顯示酵母菌能提升T.s真菌在對上他種地衣之內生真菌時的競爭力，對有酵母菌存在的地衣可能具生存上的競爭優勢。

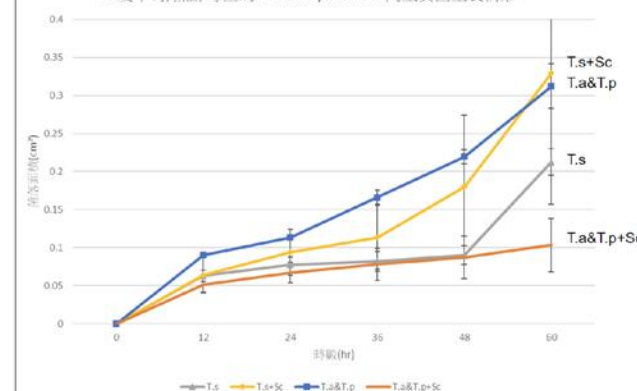
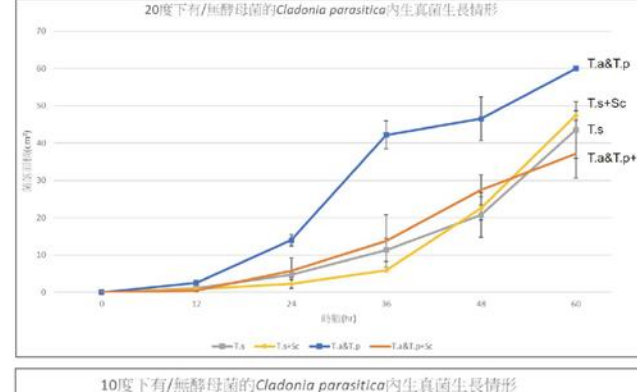
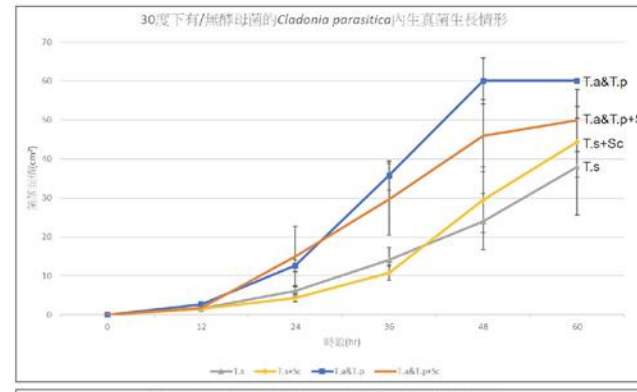
結論：

- 在有他種地衣內生真菌存在的狀態下，酵母菌仍幫助*Trichoderma simmonsii*成長，並減緩*Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma pubescens*成長。
- 酵母菌有助於提升*Trichoderma simmonsii*對上他種地衣內生真菌時的競爭力。

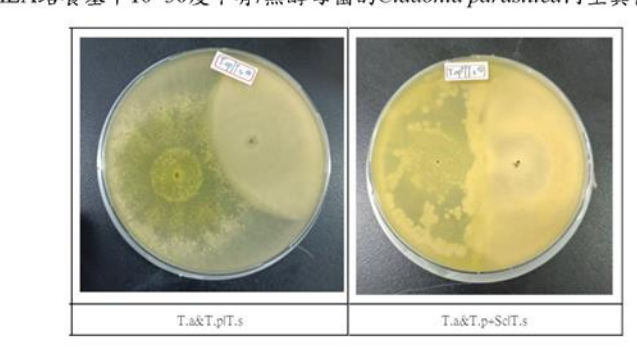
八、模擬原生環境(不同溫度與培養基)下酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響



PDA培養基中10~30度下有/無酵母菌的Cladonia parasitica內生真菌生長情形



MEA培養基中10~30度下有/無酵母菌的Cladonia parasitica內生真菌生長情形

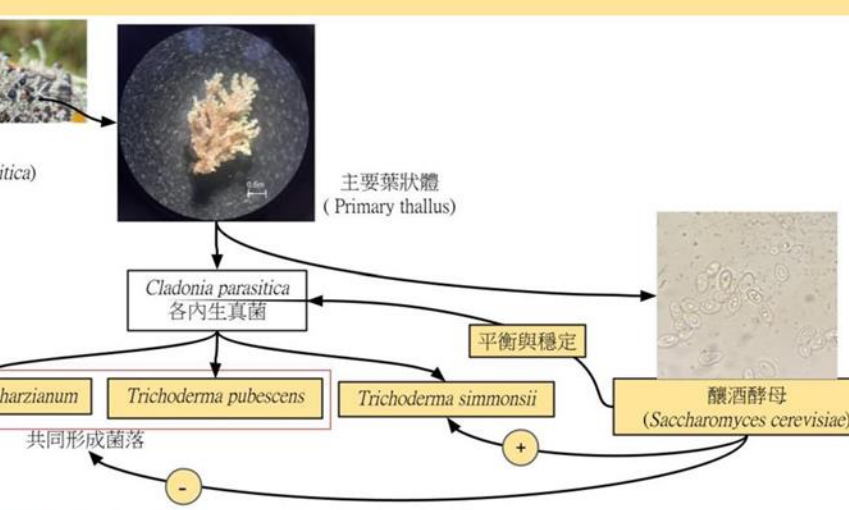


- 討論：
- 由各溫度下的*Cladonia parasitica*內生真菌成長圖可見加了酵母菌的T.a&T.p、T.s真菌在不同溫度下均保持一定的規律：T.a&T.p真菌加了酵母菌後菌落面積減少、T.s真菌加了酵母菌後菌落面積增加，此結果可與前面各實驗印證，可見酵母菌在10~30度溫度區間對*Cladonia parasitica*內生真菌所產生的影響維持一致
 - 實驗地衣樣本採集地太平山的年均溫為11、12°C，夏季均溫可達20°C以上，皆包含在本實驗所選定的溫度範圍內，因此可知本研究結果可類比於其原生環境溫度下，酵母菌在地衣中可能扮演的角色。
 - 在養分較為貧瘠的MEA培養基上進行的實驗顯示酵母菌與*Cladonia parasitica*內生真菌在MEA培養基上的生長狀態相似於PDA培養基上的狀態，同樣觀察到T.a&T.p真菌加了酵母菌後菌落面積減少、T.s真菌加了酵母菌後菌落面積增加的趨勢。因此可知本研究結果可以類比在養分較為貧瘠的狀態下酵母菌所扮演的角色。

結論：

- 酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響在不同環境溫度下能維持一定規律，且不易受外界菌源的干擾。
- 溫度實驗顯示本研究能反映酵母菌在樣本採集地太平山的溫度下對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響。
- 酵母菌對*Cladonia parasitica*內生真菌的影響在養分較為貧乏的狀態下能維持一定規律。

柵欄石蕊地衣中酵母菌與內生真菌互動關係圖



※圖中有著色處為本研究之成果