

南方靈芝 *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. 種內純培養菌絲體之生長特性及生理性狀之測試

江怡嫻 童武夫 葉增勇*

國立臺灣師範大學生物學系

摘要

本報告以南方靈芝 (*Ganoderma australe*) 種內具遺傳變異之三個代表菌株：TAI-12、TAI-08 和 FL-01 為研究對象，探討純培養菌絲體生長特性和生理性狀之異同。結果顯示三個菌株之純培養菌絲體均呈白色或淺色，生殖菌絲 (generative hyphae) 具有扣子體 (clamp connection)，且有特化的角質化細胞 (cuticular cell)。在細胞外氧化酵素 (extracellular oxidase) 的測試中，均含有漆氧化酵素 (laccase) 及過氧化酵素 (peroxidase)，但缺少酪胺酸酵素 (tyrosinase)，屬於木材白色腐朽菌 (white rotting fungus)。

純培養菌絲體的生理性狀測試結果，三個供試菌株在馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 之最適生長溫度均為 28°C；在麥芽抽出物培養基 (MEA) 之最適生長溫度，則具明顯差異。最適生長之酸鹼度均偏酸性，但最適生長酸鹼度則有差異。最適生長的葡萄糖濃度介於 80~120g/L 範圍之間。無機氮源 (NH_4NO_3) 濃度的測試結果，TAI-08、TAI-12 在 0.02N，而 FL-01 在 0.04N 時生長最佳。有機氮源 (L-Asparagine) 之生理測試，其生長趨勢隨著濃度增加而漸佳。由實驗結果發現三個具有遺傳變異的供試菌株 (在分類地位上雖屬於同一物種)，顯然在純培養菌絲體生長特性或生理性狀上已呈現出差異性。

關鍵詞：南方靈芝、純培養菌絲體、生長特性、生理性狀、測試

緒言

靈芝 *Ganoderma* 是普遍分佈於全世界的一群硬質真菌，除了兩極地區以外，五大洲皆有發現，但主要產於亞熱帶及熱帶地區，目前被命名、記述的種類超過 200 種。台灣的靈芝至今的調查研究，靈芝屬有十餘種，分佈從平地到海拔三千公尺均有 (Yeh and Chen, 1990; 杜和彭, 1989; 張, 1983; 許, 1990)。靈芝的寄主相當廣泛，一般的闊葉樹、針葉樹、竹類及棕櫚科等植物，都會受其侵害而引起木材的白腐朽或根腐 (張, 1983)。

在中國，靈芝被視為吉祥之物，依據古

書記載，可以治百病，長久食用可以防止老化、延年益壽。許多科學研究報導也指出，靈芝中的成分有抗腫瘤 (Hyun *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997)、增強免疫力 (Haak *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1997)，及抗高血壓 (Shiao *et al.*, 1986) 等功能。

近三十年來，靈芝分類研究，除了以子實體的形態特徵為分類依據以外，菌類學者並發展出菌絲體純培養性狀研究法 (cultural study)，來輔助形態分類之不足。其中最有名的是 Nobles (1965) 所建立的菌絲體純培養鑑定法 (culture identification)，至今仍被廣泛使用。

* 通信作者 (corresponding author): 葉增勇 (Zeng-Yung Yeh); FAX: 886-2-29312904; E-mail: biozy@sc.ntnu.edu.tw

南方靈芝 *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., 依據近代真菌學家 Steyaert (1980), Corner (1983) 及趙繼鼎 (1988) 之觀點, 在分類上屬於:

擔子菌亞門 (Basidiomycotina)

帽菌綱 (Hymenomycetes)

無褶菌目 (Aphylophorales)

靈芝科 (Ganodermataceae)

靈芝屬 (*Ganoderma*)

樹舌亞屬 (subgen. *Elfvigia*)

之一員, 分佈於熱帶和亞熱帶地區。南方靈芝子實體的皮殼 (crust) 不具假漆狀物質 (laccate substance), 表皮粗糙, 沒有菌柄 (stipe); 擔孢子 (basidiospore) 呈卵形, 具兩層細胞壁, 內壁黃褐色較厚、有棘狀突起 (interwall pillar), 外壁透明無色、較薄。

Yeh and Chen (1990) 曾於台灣低海拔地區 (500 公尺以下), 及中高海拔地區 (1600 公尺以上), 採獲十餘份南方靈芝 *G. australe* (Fr.) Pat. 標本, 並自菌體組織獲得純培養 (pure culture); 純培養菌絲體經單一雙核交配親和性試驗 (compatibility of di-mon tests), 可區分為台灣產南方靈芝為兩個「雜交不孕性群」(intersterility group) (Korhonen, 1978)。葉等 (1995) 利用分子生物技術來探討上述這兩群的遺傳變異, 同時加入美國佛羅里達州採得之南方靈芝作為比較研究, 結果兩群已呈現遺傳分化, 並且美國南方靈芝 DNA 重覆單位 (rDNA repeat unit) 表現出微小的序列異質性 (minor sequence heterogeneity), 但與台灣南方靈芝第一群極為接近。Chang, et al (1996) 進一步利用 DNA 定序法 (DNA sequencing) 來探討三者的親緣關係, 亦得到與上述相同的結果。

Wang and Hua (1991) 亦曾報導樹舌靈

芝 *G. applanatum* (Pers.) Pat. 種內十個菌株之生長特性及三種同功酵素電泳圖型 (isozyme electrophoretical pattern), 顯示種內十個菌株均具差異性。因此, 本研究以台灣南方靈芝第一群和第二群各一菌株, 以及美國佛羅里達州採得之南方靈芝 FL-01 作為材料, 探討南方靈芝種內的遺傳變異是否在純培養菌絲體之生長特性及生理性狀測試上出現差異性, 以做為日後有關樹舌亞屬菌絲體純培養鑑定法之參考依據。

材料與方法

菌種來源

本研究所使用之南方靈芝三個供試菌株來源及其號碼為: 台灣產南方靈芝 TAI-12 (台東縣太麻里, 海拔 550 公尺, 代表台灣南方靈芝第一群); TAI-08 (桃園縣達觀山, 海拔 1650 公尺, 代表台灣南方靈芝第二群); 美國南方靈芝 FL-01 (佛羅里達州邁亞密, 平地)。

純培養菌絲體之生長特性的觀察

1. 依據 Nobles (1965) 的方法, 進行純培養菌絲體之生長特性的觀察:

首先以鑽孔器鑽取 0.3 cm 菌絲塊, 接種至 1.25 % 麥芽抽取物平面培養基 (MEA) 的邊緣, 置於 24°C 恆溫箱培養, 一週後以肉眼及顯微鏡觀察純培養菌絲體的形態、種類, 及菌落顏色變化等性狀, 需連續觀察六週。

2. 測定細胞外氧化酵素 (extracellular oxidase) 之有無:

以鑽孔器取下直徑 0.3 cm 菌絲塊, 接種於含 0.5 % 單寧酸 (tannic acid) 之 MEA

培養基，置 24°C 恆溫箱保養，觀察七天，成深褐色者為正反應。

3. 細胞外氧化酵素測定的方法：

將純培養菌絲體接種於平面培養基，在 28°C 無光培養 7 天。將各種反應試劑滴於菌落邊緣新生帶，並於 3 小時、24 小時、72 小時後觀察反應結果。

- a) 漆氧化酵素 (laccase)：以 0.1 M 的 2-naphthol 溶液，或 0.1 M 的 guaiacol 溶液處理，若呈紫色者為正反應。
- b) 過氧化酵素 (peroxidase)：以等量 0.4% 過氧化氫和 1% pyrogallol 水溶液處理，若呈黃色者為正反應。
- c) 酪胺酸酵素 (tyrosinase)：以 0.1 M p-Cresol 溶液處理，若呈橘褐色 (orange-brown) 者為正反應。

菌絲體生理試驗

1. 溫度生長試驗

依據 Adaskaveg and Gilbertson (1986) 之方法，接種 0.3 cm 的菌絲塊於直徑 9 cm 的 2% MEA 或馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 邊緣，在六種不同溫度：16、20、24、28、32、36°C 條件下分別培養，連續培養 12 天後，測量菌絲生長範圍之半徑，並求最適溫度範圍及每日平均生長速率。

2. 酸鹼度試驗

使用的基本培養基的配法 (張, 1983) 如下：

KH ₂ PO ₄	0.8 g
Ca(NO ₃)·12H ₂ O	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Glucose	30 g
Malt extract (Difco)	2 g
Distilled water	1000 ml

以 1N 的 NaOH 和 0.1 N 的 HCl 調系列 pH

3、4、5、6、7、8。配好的各酸鹼值的液體培養基，以高壓蒸氣滅菌。每種酸鹼值有三瓶，每瓶為 20 ml。以鑽孔器取下直徑 0.3 cm 菌絲塊於每一錐形瓶中，培養 12 天。12 天後將每一錐形瓶中的內含物，過濾在事先秤好重的濾紙上，將濾紙烘乾六小時，再秤重計算乾重量。

3. 葡萄糖濃度試驗

以下之生理試驗，基本培養液皆利用 Johansen's medium (Tuite, 1969) 的配方，外加 1 ppm 的 Thiamine-HCl。基本培養液的配方如下：

KH ₂ PO ₄	0.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NH ₄ NO ₃	1.5 g
Thiamine	1 ppm

Double glasses distilled water 1000 ml

選擇葡萄糖 (glucose) 為碳素源，供試的葡萄糖濃度分別為 0 g、40 g、80 g、120 g、160 g、200 g，每 1000 ml 的培養液。液體培養基配好滅菌後分裝在錐形瓶中，每瓶為 20 ml，其餘步驟方法均與 (2) 相同。

4. 不同碳源試驗

選用澱粉 (starch)、蔗糖 (sucrose)、葡萄糖 (glucose) 作為不同的供試碳源，三者的濃度均為 80 g/L，液體培養基配法除了碳源分別以澱粉、蔗糖、葡萄糖取代外，其餘配方均與 (3) 相同。液體培養基配好滅菌後分裝在錐形瓶中，每瓶為 20 ml，其餘步驟方法均與 (2) 相同。

5. 無機氮濃度試驗

選用硝酸銨 (NH₄NO₃) 供應無機氮源，葡萄糖濃度為 30 g/L，其他配方與上述的基本培養液相同，硝酸銨的當量濃度分別為 0、0.02、0.04、0.08、0.16 和 0.4 N。液體培養基配好滅菌後分裝在錐形瓶中，

每瓶為 20 ml，其餘步驟方法均與 (2) 相同。

6. 有機氮源濃度試驗

選用 L-Asparagine 當成有機氮源，葡萄糖濃度為 30 g/L，其他配方與 (3) 的基本培養液相同，L-Asparagine 的當量濃度分別為 0、0.02、0.04、0.08 N 和 0.4 N。液體培養基配好滅菌後分裝在錐形瓶中，每瓶為 20 ml，其餘步驟方法均與 (2) 相同。

結 果

菌絲純培養性狀之觀察

南方靈芝三個供試菌株 TAI-08、TAI-12 和 FL-01 的純培養性狀，依據 Nobles (1965) 之培養基鑑定法，菌褥 (mycelium mat) 呈白色，其中以 FL-01 的菌褥顏色較淺；其生殖菌絲 (generative hyphae) 具有扣子體 (clamp connection)，均於 1.25% MEA 培養基出現角質化細胞 (cuticular cell)。

細胞外氧化酵素之測試結果，接種於 0.5% 單寧酸 (tannic acid) 之 MEA 培養基，皆成深褐色者反應，顯示三個供試菌株均能分泌細胞外氧化酵素。其中 TAI-08、TAI-12 和 FL-01 的漆氧化酵素、過氧化酵素為正反應，酪胺酸酵素則沒有反應 (表一)，顯示三者均屬於木材白色腐朽菌 (white rotting fungus)。

菌絲體生理試驗

1. 溫度生長試驗

TAI-08 在 MEA 培養基的最適生長溫度範圍為 24~28°C，而 28°C 生長較佳，平均生長速率為 4.13 mm/day；TAI-12 於 32

°C 生長最佳，平均生長速率為 5.39 mm/day；而 FL-01 最適生長溫度為 24°C，平均生長速率為 3.06 mm/day (圖一)。此結果顯示 TAI-12 在 MEA 培養基的平均生長速率比 TAI-08 和 FL-01 快，而 FL-01 是三個供試菌株中生長速率最緩慢的菌株。

TAI-08、TAI-12 和 FL-01 三個供試菌株在 PDA 培養基的最適生長溫度均為 28°C，平均生長速率為 5.8 mm/day，三個供試菌株在 PDA 培養基中的生長速率曲線均很類似，並且三個供試菌株於 PDA 中的生長速率在 28°C 下都比 MEA 培養基為佳 (圖二)。

2. 酸鹼度試驗

TAI-08、TAI-12 和 FL-01 最適生長之酸鹼度均偏酸性，其中 FL-01 在 pH 4.7 時生長較佳；TAI-12 在 pH 5.6 時較佳；TAI-08 則無明顯的生長最佳酸鹼值，介於 pH 4~5.6 範圍內的生長均無明顯的差異 (圖三)。三個供試菌株在太偏酸的環境 (例如 pH 3)，生長情況都較差；當 pH 值上升至 6.3 時，所測得的菌絲乾重量減少，顯示 pH 值太高亦不適合菌絲生長。

3. 葡萄糖濃度試驗

三個供試菌株的葡萄糖最適生長濃度均在 80~120 g/L 之間，而在濃度 0~80 g/L 之間，碳源濃度愈高則菌絲生長也愈好；濃度在 120 g/L 以上便呈飽和，供給的碳源濃度即使增加，所測得的菌絲乾重量也無多大變化。其中 FL-01 菌株對葡萄糖的利用能力似乎較佳 (圖四)。

4. 不同碳源試驗

TAI-08、TAI-12 和 FL-01 在三種不同碳源生長的結果，顯然菌絲在澱粉中生長的趨勢遠優於蔗糖和葡萄糖，三個供試菌株中又以 TAI-12 對澱粉的利用最佳 (圖

五)。而三個供試菌株對蔗糖和葡萄糖的利用，則並無顯著的差異，其中唯 FL-01 對蔗糖的利用較優於葡萄糖。

5. 無機氮源濃度試驗

無機氮素源 (NH₄NO₃) 濃度對菌絲生

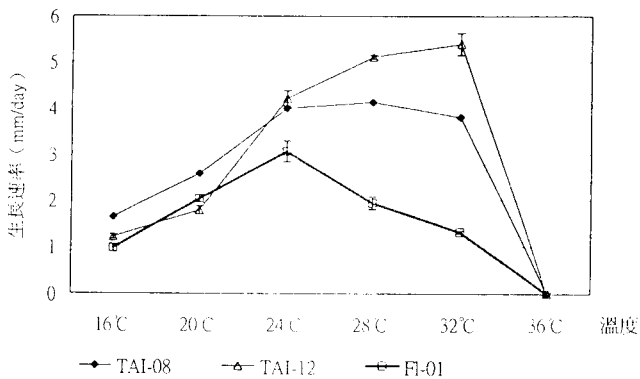
長的試驗中，TAI-08、TAI-12 於濃度 0.02N 時生長最好，FL-01 則於濃度 0.04 N 生長最好 (圖六)。當無機氮素源濃度大於 0.04 N 時，三個供試菌株的生長有下降趨勢，顯示過多的無機氮會抑制菌絲生長。

表一、細胞外氧化酵素測定。

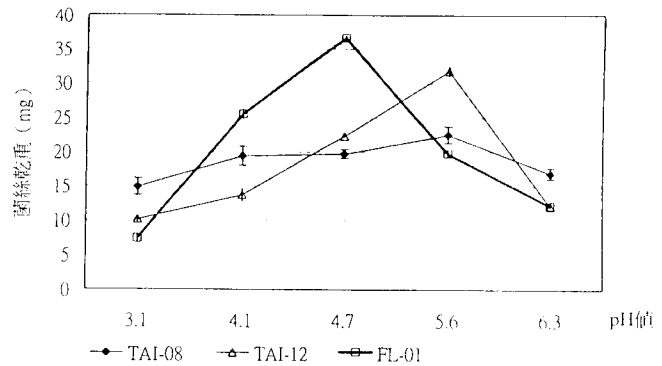
Table 1. Test of extracellular oxidases in *Ganoderma australe* isolates.

Enzymes	TAI-08			TAI-12			FL-01		
	3 hrs	24 hrs	72 hrs	3 hrs	24 hrs	72 hrs	3 hrs	24 hrs	72 hrs
Laccase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Peroxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

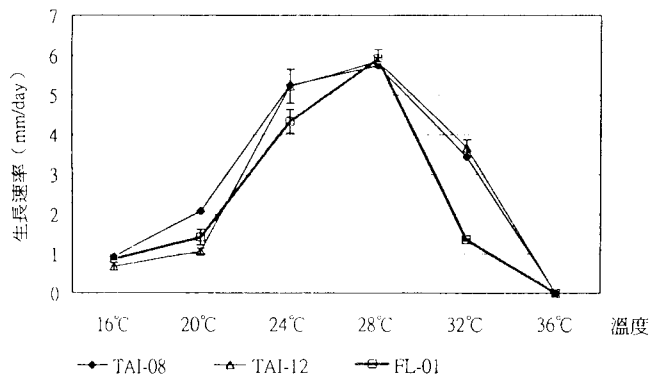
+ : positive reaction, - : negative reaction



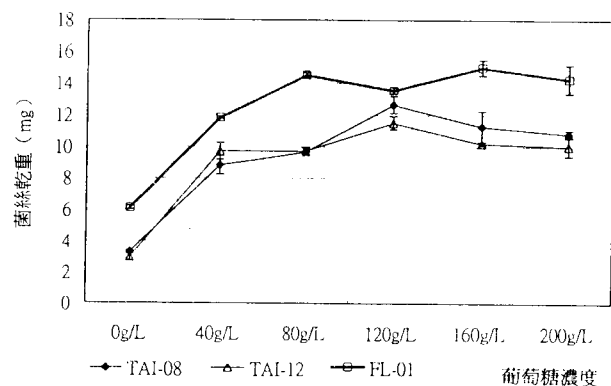
圖一、溫度對菌絲生長速率之影響 (MEA 培養基)。
Figure 1. Temperature effect on the growth rates of *G. australe* isolates on MEA medium.



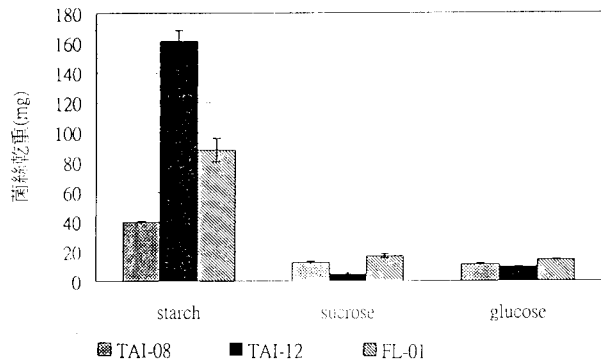
圖三、酸鹼度對菌絲生長之影響。
Figure 3. Effect of pH on the growth of *G. australe* isolates.



圖二、溫度對菌絲生長速率之影響 (PDA 培養基)。
Figure 2. Temperature effect on the growth rates of *G. australe* isolates on PDA medium.

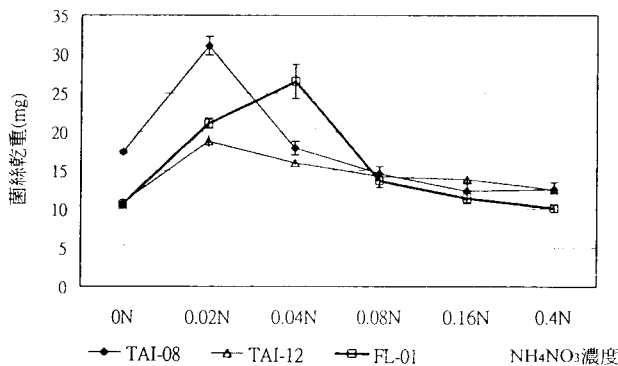


圖四、葡萄糖濃度對菌絲生長之影響。
Figure 4. Effect of glucose concentration on the growth of *G. australe* isolates.



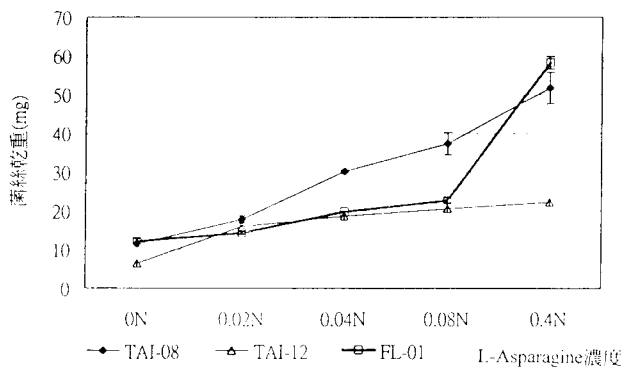
圖五、不同碳源對菌絲生長之影響。

Figure 5. Effect of carbon source on the growth of *G. australe* isolates.



圖六、無機氮濃度對菌絲生長之影響。

Figure 6. Effect of ammonium nitrate concentration on the growth of *G. australe* isolates.



圖七、有機氮源濃度對菌絲生長之影響。

Figure 7. Effect of L-Asparagine concentration on the growth of *G. australe* isolates.

6. 有機氮源濃度試驗

有機氮素源 (L-Asparagine) 濃度對菌絲生長的試驗中，TAI-08 與 FL-01 當有機氮源濃度愈高，則生長之趨勢愈好，其中 FL-01 在有機氮源濃度 0.4 N 時，所測得的菌絲乾重量最多 (圖七)；有機氮源對 TAI-12 的生長促進作用較不明顯，但隨著有機氮源濃度增加，菌絲乾重量亦稍有增加。

討 論

溫度對純培養菌絲之生長試驗中，從 MEA 培養基的培養結果發現，最適生長之溫度範圍及平均生長速率依序是 TAI-12 高於 TAI-08，TAI-08 高於 FL-01。TAI-12 產於台灣海拔 550 公尺地區 (屬於台灣南方靈芝第一群)；TAI-08 產於台灣海拔 1650 公尺地區 (屬於台灣南方靈芝第二群)；而美國南方靈芝 FL-01 產於佛羅里達州邁亞密平地，因此可能生長環境、氣候的不同，而有不同生理上的適應及最適生長溫度範圍。野島友雄 (1930) 研究發現靈芝的最適生長溫度範圍為 24~36°C，低於 10°C 或高於 40°C 均極不適合生長。蔡阿輝 (1981) 研究台灣數種靈芝菌株，指出最適生長溫度為 28°C，低於 16°C 或高於 37°C 均不適合生長，故本研究結果與前人之研究大致符合。

Venkataraman (1936) 曾自靈芝中測得澱粉分解酵素 (amylase)、蛋白質分解酵素 (protease)、觸媒酵素 (catalase) 及漆氧化酵素 (laccase) 等酵素的活性。由於靈芝具有分解木材的能力，通常能分解纖維素 (cellulose)、木質素 (lignin)、及果膠質 (pectin) 等大分子的物質。在測定細胞外酵

素種類，發現 TAI-08、TAI-12 和 FL-01 均可分泌漆氧化酵素 (laccase) 和過氧化酵素 (peroxidase)，而不分泌酪胺酸酵素 (tyrosinase)，顯示南方靈芝屬於木材白色腐朽菌 (white rotting fungus)，可利用木質素與纖維素，使腐朽的木材呈白色 (Steyaert, 1972; 張, 1983)。

木材腐朽菌普遍具好酸的情形，一般於 pH 值 3.5~5.5 之間最適合生長 (Highley and Kirk, 1979)，此好酸的情形可能與酵素的活性有密切的關係，例如：*Phaenerochaete chrysosporium* 在 pH 低於 3 或高於 5 時不能分解木質素 (Kirk *et al.*, 1978)；木材腐朽菌的纖維分解酵素及半纖維分解酵素，於酸性時活性較強 (Highley and Kirk, 1979)。TAI-08、TAI-12 和 FL-01 三個供試菌株的酸鹼度試驗結果顯示，其偏好酸性的特性與一般的木材腐朽菌有類似的情形，但在不同酸鹼值的菌絲生長情況卻有差異，可見菌絲生長受酸鹼度的影響。

在葡萄糖濃度試驗中，TAI-08、TAI-12 和 FL-01 的生長趨勢均頗為相似，菌絲乾重並非隨葡萄糖濃度上升而一直增加，顯然它們對葡萄糖營養源的需求有一定的上限，即使供給多餘的營養並非對其生長有促進的效果。在大自然的生態環境中，木材白色腐朽菌的主要碳源為木質素和纖維素，但若單項碳源則並不容易分解利用，必須有其他的碳源參與代謝 (Highley and Kirk, 1979)。故進一步比較三個供試菌株對其他雙醣和多醣類的利用情形，發現三個供試菌株對多醣類 (starch) 的利用均比雙醣類 (sucrose)、單醣類 (glucose) 還要好。張東柱 (1983) 對 *G. lucidum*、*G. multipilea*、*G. tropicum* 和 *G. applanatum* 四種不同菌株，試驗其對不同醣類的利用，結果為多醣類優於雙醣或單醣。

單醣類雖能被利用但效果較差，其原因可能為多醣類 (starch) 可誘導靈芝屬之純培養菌絲產生、釋出澱粉分解酵素以分解利用。而直接供應較高濃度的單醣，可能影響到生長環境的滲透壓而不利於菌絲生長。

在無機氮源濃度試驗中，TAI-08、TAI-12 和 FL-01 有類似的生長趨勢，唯最適生長的濃度不同；而在有機氮源濃度試驗中，FL-01、TAI-08 的生長趨勢較類似。進一步比較上述兩項試驗結果，發現差異頗大，呈現相反之情形。亦即三個供試菌株在有機氮源濃度愈高的條件下，菌絲生長愈好；然而在無機氮源濃度愈高的條件下，菌絲生長反而受抑制。一般木材腐朽菌對氮源的利用率很高，也能利用自身老化死亡的菌絲分解後之氮源 (Levi *et al.*, 1968)。由於木材腐朽菌對氮源的利用率高，因此供給足夠的氮源時菌絲皆生長良好，尤其是有機氮源 (Highley and Kirk, 1979)。有機氮源濃度愈高，菌絲生長愈好；而無機氮源濃度太高，對菌絲生長反而有抑制的現象。無機氮在生物體內以含氮分子的形式存在 (例如 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^-)，若在細胞內含量過多易造成毒害。通常無機氮中的 NO_3^- 或 NO_2^- 得經過 nitrate reductase 及 nitrite reductase 之催化而還原成 NH_4^+ ，接著將 NH_4^+ 同化成有機氮則需要 glutamine synthetase 及 glutamate synthase 之作用以同化成胺基酸，或藉 carbamoyl phosphate synthetase 之催化使 NH_4^+ 及 CO_2 組成 carbamoyl phosphate 用以合成 Arginine。這些還原及合成過程都需耗費大量能量。由於靈芝菌行腐生，在自然界中以有機氮為主要氮源。有可能經演化上的長期適應導致無機氮的同化系統弱化，不但不能利用無機氮源，反而因菌絲內無機氮的堆積造成生長停滯。因此無機氮源濃度太高反而對菌絲生長不

利，而有機氮源不但無毒害情況，也是最適當的氮源。

綜合上述各項試驗結果，三個供試菌株在分類地位上雖屬於同一物種，但台灣南方靈芝第一群與第二群已呈現顯著的遺傳分化，美國南方靈芝在 DNA 重覆單位 (rDNA repeat units) 表現出微小的序列異質性 (minor sequence heterogeneity)，但與台灣南方靈芝第一群極為接近 (葉等, 1995; Chang *et al.*, 1996)。在無機氮源濃度試驗的結果中，TAI-08 (第二群) 與 TAI-12 (第一群) 的生長趨勢較相近；而在不同碳源的試驗中，TAI-08 與 FL-01 在三種碳源中的生長情況均較為相似，而與 TAI-12 較為不同。故雖然三個供試菌株在遺傳變異的分析上，FL-01 與 TAI-12 較為接近，但在生理試驗上卻無一致的相關，可能三個供試菌株在遺傳上還未累積出相當程度的變異，但為了適應不同的生長環境而使得生理性狀產生差異，顯示生理性狀會受到環境因素的影響。故菌株之間遺傳上的親緣關係，並不能明顯表現於菌株的生理性狀。

致 謝

本文承行政院國家科學委員會大專學生參與專題研究計畫 (NSC-88-2815-C003-049B) 資助經費，謹此致謝。

參 考 文 獻

- Adaskaveg, J. E. and R. L. Gilbertson. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of the *G. lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 78: 700-711.
- Chang, C. Y., Z. Y. Yeh, and G. J. Lee-Chen. 1996. Analysis of genetic diversity of two intersterility groups of *Ganoderma australe* by DNA sequencing. *Biol. Bull. Natn. Taiwan Normal Univ.* 31(1): 117-124.
- Chen, W. C., D. M. Hau, C. C. Wang, I. H. Lin, and S. S. Lee. 1995. Effects of *Ganoderma lucidum* and Krestin on subset T-cell in spleen of gamma-irradiated mice. *Amer. J. of Chinese Medicine* 23(3-4): 289-298.
- Chung, K. S., S. B. Kim, and S. H. Chung. 1997. Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* 41(1): 105-110.
- Corner, E. J. H. 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Nova Hedwigia Beih* 75: 1-182.
- Haak, F. M. K., T. Sone, and P. Jardieu. 1993. Ling Zhi-8: A novel T cell nitrogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. *Cell Imm.* 150: 101-113.
- Highley, T. L. and T. K. Kirk. 1979. Mechanisms of woody decay and the unique features of heart rots. *Phytopathology* 69: 1151-1157.
- Hyun, J. W., C. E. Choi, and K. B. Kim. 1990. Studies on constituents of higher fungi of Korea LxVII antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Korean J. Mycol.* 18(2): 58-69.
- Kirk, T. K., E. Schultz, W. J. Oonnors, L. F. Lorenz, and J. G. Zeikus. 1978. Influence

- of cultural parameters on lignin metabolism by *Phaenerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol.* 117: 277-285.
- Korhonen K. 1978. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Comm. Inst. Fenniae* 94(6): 1-25
- Levi, M. P., W. Merrill, and E. B. Cowling. 1968. Role of nitrogen in wood deterioration VI. Mycelial fractions and model nitrogen compounds as substances for growth of *Polyporus versicolor* and other wood-destroying and wood-inhabiting fungi. *Phytopathology* 58: 626-634.
- Nobles, M. K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43: 1097-1139.
- Shiao, M. S., T. C. Tseng, Y. Y. Hao, and Y. S. Shieh. 1986. Studies on *Ganoderma lucidum* II. The effects of *G. lucidum* on lipid metabolism in rats. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 27: 139-146.
- Steyaert, R. L. 1980. Species of some *Ganoderma* species. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 50: 135-186.
- Steyaert, R. L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera of the Bogor and Leiden Herbaria. *Persoonia* 7: 55-118.
- Tuite, J. 1969. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Lafayette, Indiana.
- Venkataraman, S. V. 1936. The biology of *Ganoderma lucidum* on *Areca* and coconut plants. *Phytopathology* 26: 153-175.
- Wang, B. C., and J. Hua. 1991. A culture atlas of some *Ganoderma* cultures. Food Industry Research and Development Institute, Taiwan. VII+130 pp.
- Wang, G., J. Zhuang, T. Mizuno, C. Zhuang, H. Ito, H. Mayuzumi, H. Okamoto, and J. Li. 1993. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan Lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. *Biotech. Biochem.* 57: 891-900.
- Wang, S. Y., M. L. Hsu, H. C. Hsu, C. H. Tzeng, S. S. Lee, M. S. Shiao, and C. K. Ho. 1997. The anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macro-phages and T lymphocytes. *International J. Cancer* 70(6): 699-705.
- Yeh, Z. Y. and Z. C. Chen. 1990. Preliminary investigations of *Ganoderma australe* (subgen. *Elfvigia*) in Taiwan. *Taiwania* 35(2): 127-141.
- 杜金池和彭金騰 1989. 台灣靈芝之採集鑑定與研究資料之搜集整理計畫總報告：第一部份，台灣天然野生與人工栽培靈芝之採集鑑定保存。台灣省農業試驗所。200 頁。
- 許瑞祥 1990. 靈芝屬植株鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。
- 張東柱 1983. 台灣數種靈芝生物學上之研究。國立台灣大學植物病蟲害學研究所植物病理組碩士論文。
- 葉增勇, 張君玉和李桂楨 1995. 利用 PCR 與 RFLP 技術分析台灣產南方靈芝兩不孕性群之遺傳變異。師大生物學報 30(2): 117-124。
- 野島友雄 1931. 靈芝 (*Polyporus japonicum* Fries) 的研究。植物病蟲害研究 1: 175-191。
- 趙繼鼎 1988. 中國靈芝科的分類研究：8 個

訂正種和 3 個新種。 真菌學報 6: 初步研究。中興大學學士論文。22 頁。
199-210。

蔡阿輝 1981. 靈芝菌 (*Ganoderma* spp.) 之

(接受日期: 2000.6.18)

Cultural and Physiological Studies of Three Isolates of *Ganoderma australe* (Fr.) Pat.

Yi-Sheng Chiang , Wu-Fu Tong, and Zeng-Yung Yeh*

Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Three genetically differentiated pure cultures of *Ganoderma australe* (Fr.) Pat.: TAI-12, TAI-08 and FL-01 were used for cultural and physiological studies. Morphological characters were observed as the white to light color of mycelial mats, clamped generative hyphae and the appearance of cuticular cells in culture. The positive reaction in extracellular oxidases which included laccase and peroxidase but negative in tyrosinase, indicated that they belong white rotting fungi. The results of physiological tests showed as following:

1. Optimum temperature for the mycelial growth of the three cultures were all the same at 28°C on PDA media but different on MEA media.
2. Optimum pH for growth of the three cultures was in acidic condition but with a little differences among them.
3. Glucose concentration at 80-120 g/L was the optimum concentration for the mycelial growth.
4. Optimum nitrogen concentration of ammonium nitrate (NH_4NO_3) was at 0.02 N for TAI-12 and TAI-08, but at 0.04 N for FL-01. Whereas the growth of mycelia was in proportion to the concentration of L-Asparagine (organic nitrogen form) in the range of 0-0.04 N of nitrogen.

Although the three cultures belong the same taxonomic species, however, the growth of mycelia had shown some variations in cultural and physiological studies.

Keywords: *Ganoderma australe*, Pure culture, Cultural studies, Physiological studies