

# 新日本靈芝和環紋靈芝純培養菌絲體之生長特性及生理狀之研究

謝富貴 葉增勇\*

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期: 2003.5.28, 接受日期: 2003.12.15)

## 摘要

新日本靈芝 (*Ganoderma neo-japonicum*) 分佈於台灣、中國大陸及日本, 寄主為闊葉樹及竹類等, 環紋靈芝 (*G. zonatum*) 產於美國佛羅里達州和喬治亞洲, 其寄主侷限於棕櫚科類(palms)之樹木。本研究以台灣產新日本靈芝及美國環紋靈芝純培養菌絲體為材料, 探討兩種靈芝的生長特性和生理性狀。結果顯示兩者之純培養菌絲體均呈現白色, 培養基反面則呈現褐色。生殖菌絲 (generative hyphae) 均具有扣子體 (clamp connection) 及腫大細胞 (swelling cell), 皆能分泌細胞外氧化酵素, 包括漆氧化酵素 (laccase) 及過氧化酵素 (peroxidase)。缺乏酪胺酸酵素 (tyrosinase), 能利用木材之木質素 (lignin)、亞纖維素 (hemicellulose) 與纖維素 (cellulose), 屬於木材白腐菌 (white rotting fungus)。

上述供試之兩個菌株, 新日本靈芝在麥芽抽出物培養基 (MEA) 及馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 的最適生長溫度範圍皆為 24~28°C, 而環紋靈芝在 MEA 及 PDA 培養基的最適生長溫度範圍為 32°C, 兩者在溫度 16°C、36°C 時, 生長速率皆明顯較差。新日本靈芝菌絲體適宜生長的酸鹼度範圍在 pH 2.4~6.1; 而環紋靈芝在 pH 4.6 時生長狀況最佳。新日本靈芝對葡萄糖濃度的基本需求約 40 g/L, 但濃度超過 80 g/L 時, 其菌絲乾重並不隨供給的碳源增加; 環紋靈芝在葡萄糖濃度 40~80 g/L 生長最佳。兩者的菌絲體以澱粉培養的生長表現優於以葡萄糖或蔗糖。新日本靈芝對無機氮源濃度的濃度需求不高, 低無機氮源濃度 (0.02 N) 時生長狀況較佳, 對有機氮源的濃度需求為 0.04~0.08 N, 有機氮源濃度超過 0.4 N 時, 則抑制菌絲的生長。環紋靈芝在低無機氮源濃度 (0.04 N) 時菌絲生長最佳, 無機氮源濃度超過 0.08 N 時, 對菌絲的生長趨勢則漸漸下降, 而對有機氮源反應則為濃度增加, 生長趨勢漸佳。

**關鍵詞:** 新日本靈芝, 環紋靈芝, 生長特性, 生理性狀

## 緒言

靈芝屬於真菌界 (Myceteae)、擔子菌亞門 (Basidiomycotina)、帽菌綱 (Hymenomycetes)、無褶菌目 (Aphyllorphales)、靈芝科 (Ganodermataceae) 中的靈芝屬 (*Ganoderma*) (Steyaert, 1980; Corner, 1983; Zhao, 1987)。廣泛分佈於溫帶、亞熱帶及熱帶地區。全世界被命名、記錄的靈芝超過 200 種 (Hseu, 1990; Moncalvo *et al.*, 1995)。目前在中國地區發現的種類近 76 種 (Zhang, 2000), 而台灣約有 17 種 (Hseu, 1990; Wang *et al.*, 1999), 分布於全島平地至高海拔地區。

靈芝屬的菌絲系統 (hyphal system) 呈三

系型 (trimitic), 包括生殖菌絲 (generative hyphae)、骨骼菌絲 (skeletal hyphae) 及纏繞菌絲 (binding hyphae)。其中生殖菌絲能分泌多種酵素, 尤其細胞外氧化酵素 (extracellular oxidase), 能利用木材之木質素 (lignin)、果膠 (pectin)、亞纖維素 (hemicellulose) 與纖維素 (cellulose)。木質素為黃褐色之化合物, 被分解後, 木材會褪色或轉成白色, 而引起木材白腐朽 (white rot) 或根腐 (root rot)。靈芝屬的子實體形態特徵, 常受環境因子影響而有變異, 易造成鑑定上的困擾。因此, Davidson *et al.* (1942), Nobles (1965), Stalpers (1978) 及 Nakasone (1990) 根據靈芝菌絲體生長速率、生長最適溫度、菌絲體顏色、細胞外氧化酵素和

\*通信作者: 葉增勇 (Zeng-Yung Yeh); Fax: 886-2-29312904; E-mail: biozyy@sc.ntnu.edu.tw

厚膜孢子等特性，發展出菌絲體純培養性狀研究法 (culture study)，以輔助外部形態特徵之不足。

新日本靈芝 (*G. neo-japonicum*) 分佈於台灣、中國大陸及日本 (Zhang, 2000)，寄主為闊葉樹及竹類 (Lee, 1989)。環紋靈芝 (*G. zonatum*) 則產在美國佛羅里達州和喬治亞洲，其寄主侷限於棕櫚科類 (palms) 之樹木，並且擔孢子相當的狹長，大小為  $11\sim13 \times 5\sim6 \mu\text{m}$  (Gilbertson and Ryvardeen, 1986)，而有別於其他呈橢圓形的靈芝種類。本文以上述二種靈芝純培養菌絲體為研究材料，擬將菌種之培養條件，作為日後有關新日本靈芝及美國環紋靈芝菌絲體純培養鑑定法之參考。

## 材料與方法

### 菌種來源

新日本靈芝 (*G. neo-japonicum*)，購自新竹食品工業研究所，菌種編號：CCRC36049，來源：西湖，苗栗縣，台灣省。

環紋靈芝 (*G. zonatum*)，採集號碼：Yeh FL-05，採集日期：1991/08/05，採集地：美國佛羅里達州邁阿密市，基質：大王椰子 (*Phoenix* spp.)，菌絲體來自子實體，採集者：葉增勇。

### 純培養菌絲體之生長特性測試

#### 純培養菌絲體之生長特性觀察

根據 Nobles (1965) 之方法類推。以直徑 0.3cm 的鑽孔器鑽孔取下菌絲塊，並將菌絲塊接種至 1.25% 麥芽抽取物平面培養基 (malt extract agar, 簡稱 MEA) 的邊緣，無光培養於 24°C 的恆溫箱中。一星期後以肉眼及顯微鏡觀察純培養菌絲體之生長情形、形態、種類，及菌落顏色變化等性狀，並持續連續六週的觀察。

#### 測定細胞外氧化酵素 (extracellular oxidase)

以鑽孔器鑽取直徑 0.3 cm 之菌絲塊，接種至含 0.5 % 單寧酸 (tanic acid) 之 2% MEA 培養基上，無光培養於 24°C 恆溫箱中，觀察一週，若培養基出現深褐色者為正反應。

#### 測定細胞外氧化酵素之種類

根據 Käärrik (1965)、Stalpers (1978) 及 Taylor (1974) 等之方法，將純培養菌絲體接種於 2% MEA 的培養基上，在恆溫 28°C 下無光培養。一週後將各種細胞外氧化酵素滴於菌落邊緣新生帶，並於 3 小時、24 小時、72 小時觀察反應情形。

漆氧化酵素 (laccase)：以 0.1M 的 2-naphthol 溶於 95% 的酒精處理，若培養基出現紫色者為正反應。

過氧化酵素 (peroxidase)：以等量 4% 過氧化氫和 1% pyrogallol 水溶液處理，若培養基出現黃色者為正反應。

酪胺酸酵素 (tyrosinase)：以 0.1 M 的 p-Cresol 溶於 95% 的酒精處理，若培養基出現橘褐色者為正反應。

### 菌絲體對不同環境條件反應試驗

#### 溫度生長試驗

根據 Adaskaveg and Gilbertson (1986) 之方法類推，將直徑 0.3cm 之菌絲塊接種於直徑 9 cm 的 2% MEA 及馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar, 簡稱 PDA) 之邊緣，以六種不同溫度條件：16、20、24、28、32 和 36°C 恆溫無光培養 12 天後測量菌絲生長範圍之半徑，並計算出最適生長溫度範圍及每日平均生長速率。

#### 酸鹼度試驗

以 1 N 的 NaOH 和 0.1 N 的 HCl 調配出不同 pH 值之基本液體培養基。所使用之基本培養基液的配方 (Chang, 1983) 如下：KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 4 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, Glucose 30 g, Malt extract (Difco) 2 g, Distilled water 1000 ml。

配製 pH 2、3、4、5、6 的液體培養基各三瓶，每瓶 20 mL。各 pH 值的液體培養基，以高壓蒸汽滅菌後再測其 pH 值備用。以鑽孔器鑽取直徑 0.3 cm 之菌絲塊，接種至液體培養基瓶中，以溫度 28°C 連續無光培養 12 天。12 天後將每一瓶中的內含物過濾在事先秤好重量的濾紙上，將濾紙在 55°C 烘乾至少 4 小時，然後秤重計算乾重量。

### 菌絲體的生理試驗

根據 Johensen's medium (Tuite, 1969) 的方法，外加 1 ppm 的 Thiamine-HCl 配置。基本培養基液之配置如下：KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.5 g, Thiamine-HCl 1 ppm, Distilled water 1000 ml。

#### 葡萄糖濃度試驗

以葡萄糖 (glucose) 作為碳素的來源，每 1000 ml 的基本培養液分別以 0 g, 40 g, 80 g, 120 g, 160 g, 200 g 的葡萄糖調配葡萄糖濃度。每種液體培養基三瓶，每瓶 20 ml。配好之液體培養基，以高壓蒸汽滅菌備用，以鑽孔器鑽取直徑 0.3 cm 之菌絲塊，接種至每一製備好的液體培養基瓶中，以溫度 28°C 連續無光培養 12 天。12 天後秤乾重量，方法同前。

#### 不同碳源試驗

以澱粉 (starch)，蔗糖 (sucrose) 和葡萄糖 (glucose) 作為不同碳素的來源，濃度皆為 80 g/L，液體培養基配法除了碳源分別以澱粉、蔗糖，葡萄糖取代以外，其餘配方與生理試驗之基本培養基液同。配好之液體培養基，以高壓蒸汽滅菌，其餘步驟方法同前。

#### 無機氮源濃度試驗

以硝酸銨 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) 作為無機氮源，葡萄糖濃度為 30 g/L，其餘配方與生理試驗之基本培養基液同。硝酸銨的當量濃度分別為 0 N, 0.02 N (0.8 g/L), 0.04 N (1.6 g/L), 0.08 N (3.2 g/L), 0.16 N (6.4 g/L), 0.4 N (16 g/L)。液體培養基配好之後，以高壓蒸汽滅菌，其餘步驟方法同前。

表一、新日本靈芝與環紋靈芝細胞外氧化酵素之測定結果。

Table 1. Test for extracellular oxidases on *G. neo-japonicum* and *G. zonatum* mycelia.

	新日本靈芝 <i>G. neo-japonicum</i> (hr)			環紋靈芝 <i>G. zonatum</i> (hr)		
	3	24	72	3	24	72
漆氧化酵素 (laccase)	+	+	+	+	+	+
過氧化酵素 (peroxidase)	+	+	+	+	+	+
酪胺酸酵素 (tyrosinase)	-	-	-	-	-	-

#### 有機氮源濃度試驗

以 L-Asparagine 作為有機氮源，葡萄糖濃度為 30 g/L，其餘配方與生理試驗之基本培養基液同。L-Asparagine 的當量濃度分別為 0 N, 0.02 N (1.32 g/L), 0.04 N (2.642 g/L), 0.08 N (5.28 g/L), 0.4 N (26.42 g/L)。液體培養基配好之後，以高壓蒸汽滅菌，其餘操作步驟方法同前。

### 結果

#### 純培養菌絲體之生長特性測試

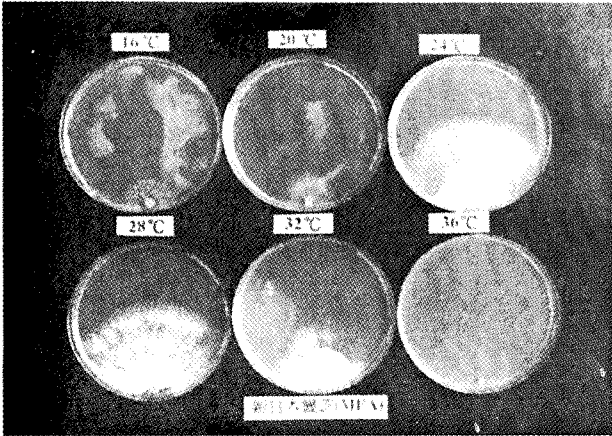
新日本靈芝及環紋靈芝的純培養菌絲體性狀，依據 Nobles (1965) 的培養基鑑定法，菌褥 (mycelium mat) 正面皆為白色，背面呈現褐色。生殖菌絲 (generative hyphae) 皆具有扣子體 (clamp connection) 及出現腫大的細胞 (swelling cell)。

細胞外氧化酵素 (extracellular oxidase) 之測試結果中，新日本靈芝及環紋靈芝接種於 0.5% 單寧酸 (tannic acid) 之 MEA 培養基，成深褐色反應，顯示它們均能分泌細胞外氧化酵素。在漆氧化酵素、過氧化酵素測試三小時後，皆成正反應，對酪胺酸酵素則無正反應 (表一)。

#### 菌絲體對不同環境條件反應試驗

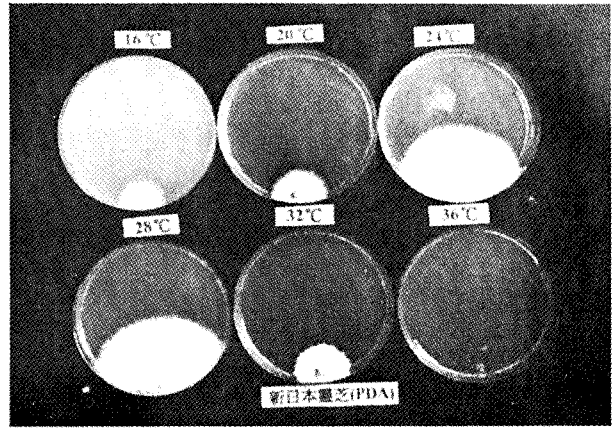
##### 溫度生長試驗

新日本靈芝在 MEA 培養基的最適生長溫度範圍為 24~28°C，以 28°C 較佳 (圖一)，平均生長速率為 4.2 mm/day (圖三)，在 PDA 培養基的最適生長溫度範圍亦為 24~28°C (圖二)，平均生



圖一、新日本靈芝菌絲體溫度生長試驗結果(培養於 MEA 12 天)。

Figure 1. Linear growth of *G. neo-japonicum* mycelia on MEA after 12 days at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C.



圖二、新日本靈芝菌絲體溫度生長試驗結果(培養於 PDA 12 天)。

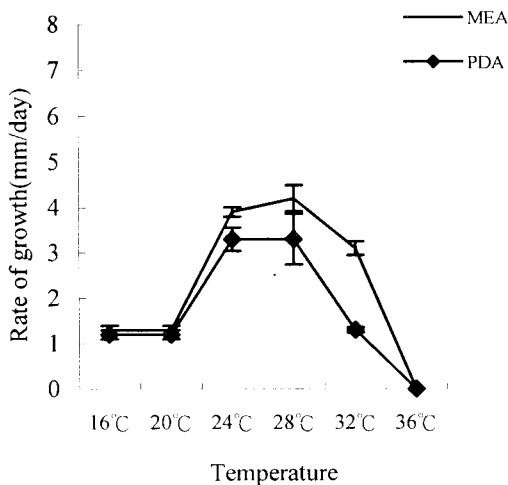
Figure 2. Linear growth of *G. neo-japonicum* mycelia on PDA after 12 days at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C.

長速率為 3.3 mm/day(圖三),此結果顯示新日本靈芝以 MEA 培養基,或 PDA 培養基培養最適生長溫度範圍皆為 24~28°C,其中以 MEA 培養基培養較 PDA 培養基培養為佳。環紋靈芝在 MEA 培養基的最適生長溫度範圍為 24~32°C(圖五),但以 32°C 較佳,平均生長速率為 5.5 mm/day(圖四),在 PDA 培養基的最適生長溫度範圍為 32°C(圖六),平均生長速率為 6.1 mm/day(圖四),此結果顯示環紋靈芝以 MEA 培養基或 PDA 培養基培養最適生長溫度範圍皆為

32°C,其中以 PDA 培養基培養較 MEA 培養基培養為佳。

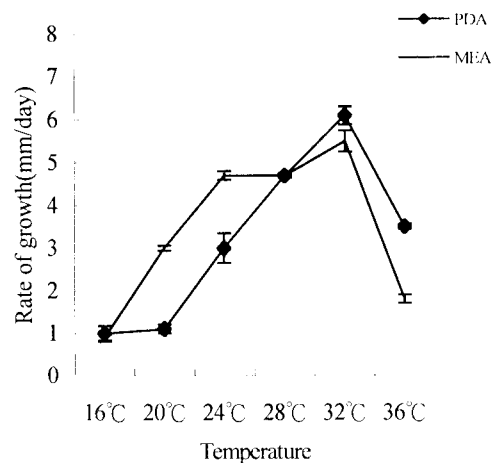
#### 酸鹼度試驗

新日本靈芝於 pH 2.4~6.1 範圍的生長無顯著差異(圖七),顯示 pH 2.4~6.1 範圍內無明顯的最適生長酸鹼度。環紋靈芝最適生長之酸鹼度為 pH 4.6(圖七)。



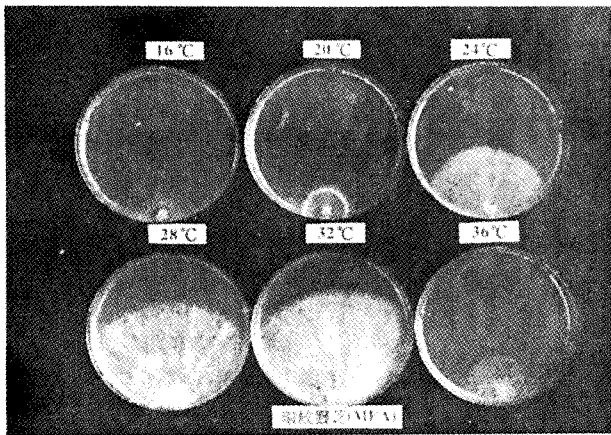
圖三、新日本靈芝菌絲在不同溫度下的生長速率。

Figure 3. Growth rates of *G. neo-japonicum* mycelia at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C on MEA and PDA media.



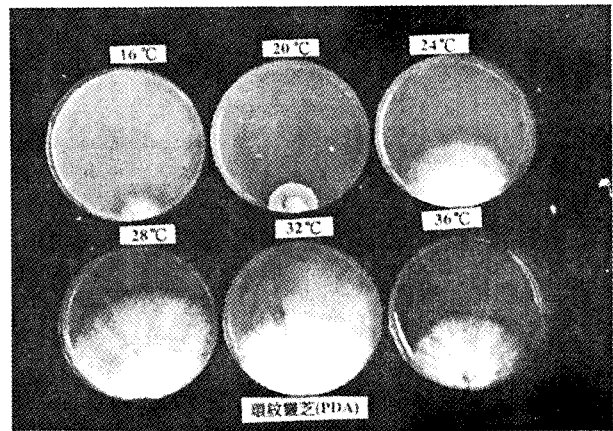
圖四、環紋靈芝菌絲在不同溫度下的生長速率。

Figure 4. Growth rates of *G. zonatum* mycelia at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C on MEA and PDA media.



圖五、環紋靈芝菌絲體溫度生長試驗結果(培養於 MEA 12 天)。

Figure 5. Linear growth of *G. zonatum* mycelia on MEA after 12 days at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C.



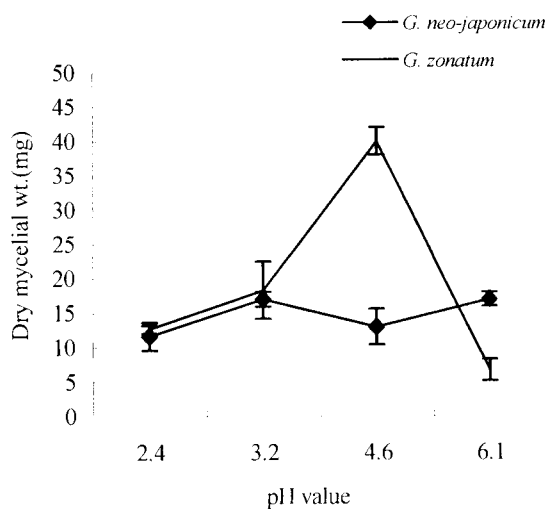
圖六、環紋靈芝菌絲體溫度生長試驗結果(培養於 PDA 12 天)。

Figure 6. Linear growth of *G. zonatum* mycelia on PDA after 12 days at temperatures of 16, 20, 24, 28, 32, and 36°C.

### 菌絲體生理反應試驗

#### 葡萄糖濃度試驗

新日本靈芝在葡萄糖濃度 40 g/L 的生長趨勢增強，葡萄糖濃度超過 80 g/L 時，供給的碳源增加，菌絲的乾重也無明顯增加，顯示新日本靈芝生長之葡萄糖濃度以 40 g/L 為佳(圖八)。環紋靈芝在葡萄糖濃度 40~80 g/L 的菌絲乾重明顯增加，葡萄糖濃度超過 120 g/L 時菌絲乾重明顯減少，顯示環紋靈芝最適生長葡萄糖濃度在 40~80 g/L (圖八)。



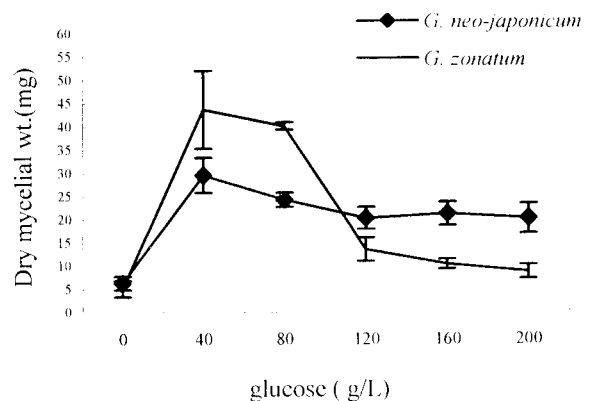
圖七、酸鹼度對新日本靈芝及環紋靈芝菌絲生長之影響。  
Figure 7. Effect of pH value on the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*.

#### 不同碳源試驗

新日本靈芝及環紋靈芝以不同碳源試驗的結果，菌絲在澱粉的生長表現優於葡萄糖及蔗糖，顯示兩者均以澱粉利用為佳(圖九)。

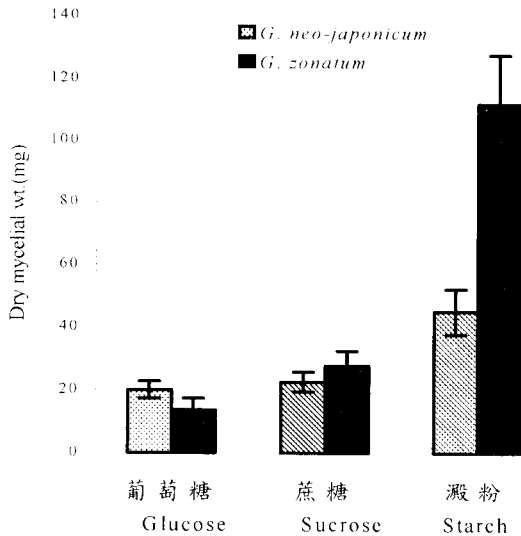
#### 無機氮源濃度試驗

新日本靈芝在無機氮源濃度 0.02 N 的生長狀況良好，但以無機氮源 0.04 N 培養的菌絲乾重較多，無機氮源濃度超過 0.08 N 時，供給的



圖八、葡萄糖濃度對新日本靈芝及環紋靈芝菌絲生長之影響。

Figure 8. Effect of glucose concentration on the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*.



圖九、不同碳源對新日本靈芝及環紋靈芝菌絲生長之影響。

Figure 9. Effect of carbon source on the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*.

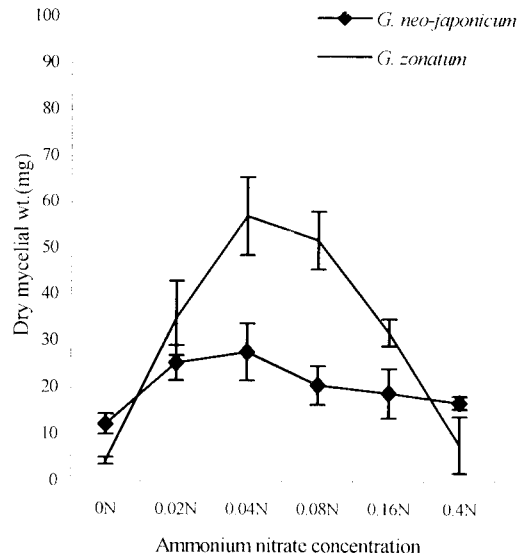
無機氮源增加，菌絲的乾重並無明顯增加（圖十）。環紋靈芝以無機氮源 0.04 N 培養的菌絲乾重較多，無機氮源濃度超過 0.08 N 時，雖供給的無機氮源濃度增加，菌絲的乾重則漸漸減少（圖十）。

#### 有機氮源濃度試驗

新日本靈芝以有機氮源 0.08 N 培養的菌絲乾重最多，濃度超過 0.4 N 時，供給的有機氮源增加，菌絲的乾重則明顯減少，顯示新日本靈芝的最適生長有機氮源濃度為 0.04~0.08 N（圖十一）。環紋靈芝的菌絲體乾重，隨有機氮源濃度增加而增加，顯示有機氮源濃度越高，越能促進環紋靈芝的生長趨勢（圖十一）。

#### 討論

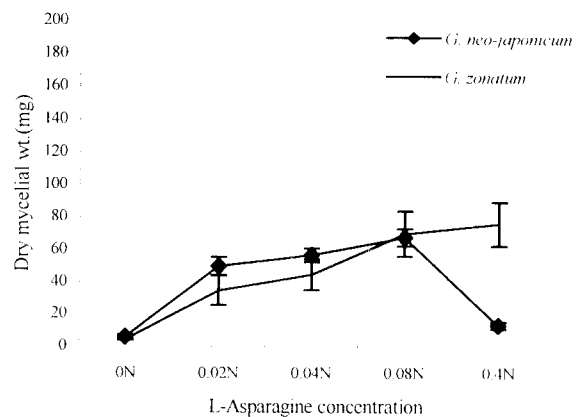
菌絲一般的細胞壁較厚會限制菌絲的養分吸收，而菌絲分支的頂端部分細胞壁較薄，細胞質多，代謝活動旺盛，是生長最集中的地方，所以檢測細胞外氧化酵素的試驗，需將試劑滴於菌落邊緣新生帶。大分子的木質素需要被靈芝分解為較小分子的單糖或雙糖，例如葡萄糖、果糖、半乳糖等才能被菌絲利用。Venkatarayan (1936)曾報導靈芝能分泌漆氧化



圖十、無機氮源濃度對新日本靈芝及環紋靈芝菌絲生長之影響。

Figure 10. Effect of ammonium nitrate concentration on the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*

酵素 (laccase)、蛋白質分解酵素 (protease)、觸媒酵素 (catalase) 及澱粉分解酵素 (amylase)。新日本靈芝與環紋靈芝皆能分泌細胞外氧化酵素，包括漆氧化酵素及過氧化酵素 (peroxidase)，而不能分泌酪胺酸酵素 (tyrosinase)。漆氧化酵素為木質素被分解時的重要酵素 (Molitoris, 1978)，為含銅的一種糖蛋白，好氧性，能催化 monophenols；o-, p-diphenols；aminophenol 等進行氧化反應 (Mayer and Harel, 1979)。Falck (1926) 將木材利



圖十一、有機氮源濃度對新日本靈芝及環紋靈芝菌絲生長之影響。

Figure 11. Effect of L-Asparagine concentration on the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*.

用菌分為兩大類：白腐菌 (white rots)，利用木材後木材呈白色，具有漆氧化酵素與過氧化酵素，能利用纖維素及木質素，約佔所有多孔菌種類的 75%；褐腐菌 (brown rots)，利用木材後木材呈棕色至褐色，缺少上述酵素，只能利用纖維素，約佔所有多孔種類的 25%。研究結果顯示新日本靈芝與環紋靈芝皆屬於木材白腐菌 (white rotting fungus)，能利用木材之木質素 (lignin)、果膠質 (pectin) 與纖維素 (cellulose) 而引起木材白腐朽或根腐 (Steyaert, 1972; Chang, 1983)。

從溫度對菌絲體生長試驗中的結果發現，新日本靈芝在 MEA 及 PDA 培養基的最適生長溫度範圍皆為 24~28°C。環紋靈芝在 MEA 及 PDA 培養基的最適生長溫度範圍為 32°C。新日本靈芝及環紋靈芝在溫度 16°C、36°C 時，生長速率皆明顯較差，可能是 16°C 低溫時菌絲體代謝活動降低，使靈芝的菌絲體生長減緩；高溫 36°C 時，菌絲的呼吸作用大於同化作用，菌絲體內營養的消耗大於合成，造成代謝活動異常，而影響菌絲生長。吳聲華等 (Wu *et al.*, 2000) 曾研究赤芝 (*G. lucidum*) 及熱帶靈芝 (*G. tropicum*) 菌絲體純培養性狀，發現兩者的最適生長溫度為 30°C；而南方靈芝 (*G. australe*) 則為 28°C (Chiang *et al.*, 2000)。溫度對生長試驗中，新日本靈芝或環紋靈芝無論是以 MEA 或 PDA 培養基培養的結果呈現並無顯著差異，顯示所使用的培養基不同對菌絲體的生長溫度反應並無太大影響，這與王伯徹等人 (Wang and Hua, 1991) 研究靈芝數種菌株除了 *G. colossus* CCRC 36157 以外的結果相似。

酸鹼度的不同一般會影響酵素的活性，Kirk 等人 (Kirk *et al.*, 1978) 曾研究 *Phaenerochaete chrysosporium*，發現在 pH 值小於 3 或大於 5 時木質素不能被分解。在偏酸性時，木材腐朽菌的纖維分解酵素和半纖維分解酵素的活性較強 (Highley and Kirk, 1979)。新日本靈芝在 pH 2.4~6.1 範圍的生長反應無顯著差異，顯示酸鹼度在 pH 2.4~6.1 範圍內對新日本靈芝的生長無太大影響。環紋靈芝在酸鹼度為 pH 4.6 時生長狀況最好，而於 pH 2.4、3.2、6.1 時生長狀況則明顯較差，顯示環紋靈芝菌絲體生長喜好特定酸性範圍。

葡萄糖濃度試驗中，新日本靈芝對葡萄糖

濃度的基本需求約 40 g/L，但葡萄糖濃度超過 80 g/L 時，新日本靈芝的菌絲乾重並不隨供給的碳源增加，顯示新日本靈芝生長所需之葡萄糖濃度有一定範圍，供給太多的葡萄糖對其生長並無益處。而環紋靈芝的基本需求約 40 g/L，在葡萄糖濃度 40~80 g/L 時，呈現良好的生長狀態，但當葡萄糖濃度超過 120 g/L 時，菌絲乾重不增加反而明顯減少，顯示葡萄糖濃度在 40~80 g/L 時對環紋靈芝的生長最好，而葡萄糖的濃度太高可能影響到培養基的滲透壓，進而影響到環紋靈芝的生長。游英欽 (Yu, 1996) 認為低葡萄糖濃度下，靈芝的生理情況較佳並可培養出較多的菌絲體。自然界中，靈芝主要以分泌細胞外氧化酵素，來分解木材之木質素與纖維素，以取得碳源，而造成木材白腐朽。但若單一碳源則不容易被分解利用，需有其他碳源參與代謝 (Highley and Kirk, 1979)。進一步分析新日本靈芝及環紋靈芝與其他碳源的利用情形，兩者的菌絲體以澱粉培養的生長狀況優於葡萄糖或蔗糖，此與張東柱 (Chang, 1983) 曾報導 *G. lucidum*、*G. multipilea*、*G. tropicum* 及 *G. applanatum* 等靈芝菌種對糖類的利用，以多糖類優於單糖類或雙糖類的結果相似，澱粉可能可誘導菌絲體分泌較多的澱粉分解酵素以利用澱粉做為養分來源。

氮源是靈芝合成蛋白質，核酸等含氮化合物不可缺少的重要物質。新日本靈芝對無機氮的濃度需求不高，低無機氮源濃度 (0.02 N) 時生長狀況較佳，高濃度的無機氮源對新日本靈芝菌絲的生長無太大影響；新日本靈芝對有機氮源的濃度需求為 0.04~0.08 N，有機氮源濃度超過 0.4 N 時，則會抑制菌絲的生長。環紋靈芝在低無機氮源濃度 (0.04 N) 時菌絲生長最佳，無機氮源濃度超過 0.08 N 時，菌絲的生長趨勢則漸漸下降。環紋靈芝隨有機氮源濃度增加，而生長情況趨勢漸佳。有機氮比無機氮作為氮源更適合新日本靈芝及環紋靈芝菌絲體的生長。靈芝對氮源的利用率頗高，自身老化的菌絲體也能分解出氮源 (Levi *et al.*, 1968)。適當足夠的氮源時，對靈芝菌絲體生長有良好的影響，尤其是有機氮源 (Highley and Kirk, 1979)。無機氮在生物體體內以含氮的分子形式存在 (例如： $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ )，細胞內若含量太多則易造成傷害。無機氮在轉變成有機氮還原及合成的

過程中，需要消耗大量能量，因此可能在長期演化適應下靈芝對無機氮的需求減少，過多的無機氮不但不能被菌絲體利用反而會抑制菌絲體的生長。

綜合上述各項研究結果，台灣產新日本靈芝及美國產環紋靈芝菌絲體的培養條件，可作為日後有關新日本靈芝及美國環紋靈芝菌絲體純培養鑑定法之參考。

## 參考文獻

- Adaskaveg J E and Gilbertson R L. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of the *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* **78**:700-711.
- Chang TT. 1983. Studies on biology of several species of *Ganoderma* in Taiwan. Master's Thesis, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Chiang YS, Tong WF and Yeh ZY. 2000. Cultural and physiological studies of three isolates of *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. *Biol. Bull. Natl. Taiwan Normal Univ.* **35**:25-34.
- Corner EJH. 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Nova Hedwigia Beih* **75**:1-182.
- Davidson RW, Campbell WA and Vaughn DB. 1942. Fungi causing decay of living oaks in the eastern United States and their cultural identification. *Tech. Bull. Dep. Agric. Washington*, 63 pp.
- Falck R. 1926. Über korrosive und destructive Holzersetzung und ihre biologische Bedeutung. *Ber. Dt. Bot. Ges.* **44**: 652-664.
- Gilbertson RL and Ryvarden L. 1986. North American Polypores Vol. 1. *Fungiflora*, Oslo, Norway. 433 pp.
- Highley TL and Kirk TK. 1979. Mechanism of woody decay and the unique features of heart rots. *Phytopathology* **69**:1151-1157.
- Hseu RS. 1990. An identification system for cultures of *Ganoderma* species. Ph. D. Dissertation, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Käärrik A. 1965. The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Studia forest. Succ.* **31**:1-38.
- Kirk TK, Schultz E, Connors WJ, Lorenz LF and Zeikus JG. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phaenerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol.* **117**:277-285.
- Lee MJ. 1989. Root rots of *Acacia confusa*, *Delonix regia* and *Bambusa oldhamii* caused by *Ganoderma lucidum* and *G. neo-japonicum*. *J. Chia-Yi Ins. Agr.* **19**:36-45.
- Levi MP, Merrill W and Cowling EB. 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.
- Mayer AM and Harel E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* **18**: 193-215.
- Molitoris HP. 1978. Wood degradation, phenoloxidase and chemotaxonomy of higher fungi. *Mushroom Science* **10**: 243-263.
- Moncalvo JM, Wang HF and Hseu RS. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238.
- Nakasone KK. 1990. Culture studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. *Mycol. Mem.* **15**:1-412.
- Nobles MK. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canad. J. Bot.* **43**:1097-1139.
- Stalpers JA. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllorphorales in pure culture. *Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn. Studies in Mycology* **16**: 1-248.
- Steyaert RL. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera of the Bogor and Leiden Herbaria. *Persoonia* **7**:55-118.
- Steyaert RL. 1980. Study of some *Ganoderma* species. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **50**:135-186.
- Taylor, JR. 1974. Biochemical test for identification of mycelial culture of Basidiomycetes. *Ann. Aspl. Biol.* **78**:113-123.



- Tuite J. 1969. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Lafayette, Indiana.
- Venkatarayan SV. 1936. The biology of *Ganoderma lucidum* on *Areca* and coconut palms. *Phytopathology* **26**: 153-175.
- Wang BC and Hua J. 1991. A cultural atlas of some *Ganoderma* cultures. Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan.
- Wang YZ, Wu SH, Chou YN, Chang TT, Chen KY, Chen SF, Chen JL, Tzean SS, Liu CH, Hsieh WH, Hsieh HJ, Chung CH, and Chien CY. 1999. List of the fungi in Taiwan. The Council of Agriculture of the Executive Yuan of the R.O.C. 289pp.
- Wu SH, Chou WN, Wang YZ and Wang BC. 2000. The cultural atlas of potentially edible and medicinal fungi in Taiwan. Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan. 139pp.
- Yu YC. 1996. The effect of medium composition and operating condition on the production of extracellular polysaccharide by *Ganoderma lucidum* RZ and its morphological change in shake-flask and batchwise fermentation. Master's Thesis, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan.
- Zhang X. 2000. Flora Fungorum Sinicorum Vol. 18: Ganodermataceae. Science Press, Beijing. 204pp.
- Zhao JD. 1987. Studies on the taxonomy of Ganodermataceae in China V. Additional report of eight revised species and three new species. *Acta. Mycol. Sinica* **6**: 199-210.

# Cultural and Physiological Studies of *Ganoderma neo-japonicum* and *G. zonatum*

Fu-Guey Hsieh, Zeng-Yung Yeh\*

Department of Life Science, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

(Received: 28 May 2003, accepted: 15 December 2003)

## ABSTRACT

*Ganoderma neo-japonicum* is found in Mainland China, Japan and Taiwan and grows saprotrophically on dead hardwoods or bamboos. *G. zonatum* is distributed only in the States of Georgia and Florida of the United States and its substrate is known only on palms. Pure cultures of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum* were used for cultural and physiological studies. The mycelial growth characteristics of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum* were observed as the white color on the mycelial mat's surface, brown color on the reverse side, clamped generative hyphae and the appearance of swelling cells in culture.

The positive reaction for extracellular oxidases which included laccase and peroxidase, but negative for tyrosinase, indicated both *G. neo-japonicum* and *G. zonatum* belong to white rotting fungi, and showed that they can utilize lignin, cellulose and hemicellulose of wood. The results of physiological tests were shown as follows:

1. Optimum temperature for the mycelial growth of *G. neo-japonicum* was at 24~28°C on both MEA and PDA, while *G. zonatum* was at 32°C both on MEA and PDA.
2. Optimum pH was 4.6 for the mycelial growth of *G. zonatum*.
3. Glucose concentration at 40~80 g/L was the optimal condition for the mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*. Increasing glucose concentration neither increased nor decreased the mycelial growth rate of *G. neo-japonicum*, but decreased the mycelial growth rate of *G. zonatum*.
4. Starch was the best carbon source for both mycelial growth of *G. neo-japonicum* and *G. zonatum*.
5. Optimal nitrogen concentration of ammonium nitrate (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) was at 0.02 N for the mycelial growth of *G. neo-japonicum*, and 0.04 N for *G. zonatum*. The mycelial growth of *G. zonatum* was in proportion to the concentration of L-Asparagine (organic nitrogen form), but was not for *G. neo-japonicum*.

**Keywords:** *Ganoderma*, Ganodermataceae, cultural and physiological studies