

台灣產南方靈芝(*Ganoderma australe*) 交配

系統之研究

葉增勇 (1) 陳瑞青 (2)

(1) 國立台灣師範大學生物學系

(2) 國立台灣大學植物學系

摘 要

自台灣不同地區闊葉樹採獲南方靈芝 *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. 新鮮標本並自菌體組織獲得純培養。經雜木屑人工子實體之栽培，成功分離出菌株 TAI-02, TAI-03, TAI-04 之單孢系菌株。經與南方靈芝 TAI-01 四種檢定交配型之單核體菌株進行交配試驗，結果顯示本種之交配系統屬於四極性多因子型。

關鍵詞：南方靈芝，四極性多因子型，交配系統。

緒 言

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) 之觀念，在分類學上隸屬於擔子菌亞群 (Basidiomycotina)，帽菌綱 (Hymenomycetes)，無褶菌目 (Aphyllphorales)，靈芝科 (Ganodermataceae)，靈芝屬 (*Ganoderma*)，樹舌亞屬 (subgen. *Elfvigia*) 之一員，分佈於亞熱帶及熱帶地區。南方靈芝子實體之皮殼 (crust) 缺乏假漆狀物質 (laccate substance)，表面粗糙；靈芝亞屬 (subgen. *Ganoderma*) 的種類則具有假漆狀物，表面光亮，可與樹舌亞屬的種類區分。唯兩個亞屬

是靈芝屬的主要成員，具備下列共同特徵：擔孢子 (basidiospore) 呈卵形，具有兩層細胞壁，內壁黃褐色較厚有棘狀突起 (inter-wall pillar)，外壁較薄透明。

自 1935 年 Dodge 發現子囊菌中 *Neurospora crassa* 之性別遺傳型式為二極性 (bipolar) 後，在擔子菌中香菇 (*Lentinus edodes*) (Nishikado, 1935)，裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) (Raper, 1958)，木耳 (*Auricularia auricula*) (Su and Wang, 1976) 等之性別均被證明為四極性多因子型 (tetrapolar multi-allelic)。在靈芝屬菌株中 *Ganoderma lucidum* (Banerjee and Sarkar, 1958), *G. tsuga*, *G. resinaceum* (Adaskaveg

and Gilbertson, 1986), *G. formosana* (張東柱, 1986), *Elfvigia applanata* (Aoshima, 1953) 亦屬於四極性多因子型。四極性是由兩對基因控制之性別遺傳型式, 分別以 A、B 表示, A、B 則分別由多數之對位基因 (allele) 組成, 在同核體菌株 (homokaryon) 中兩對位基因都不同時, 才會交配產生異核體 (heterokaryon)。

台灣產的南方靈芝, 首次成功分離出 TAI-01 單核體菌株 (monokaryotic culture), 並經自行交配後, 已初步證明為異絲型 (heterothallic) 四極性 (Yeh and Chen, 1990)。本實驗繼續以台灣不同地區採獲之南方靈芝培養菌絲為材料, 行人工培養基栽培, 所獲得的單核體將與 TAI-01 四種檢定交配型 (mating type) 之單核體菌株, 進行交配試驗 (mating test), 以探討南方靈芝的交配系統 (mating system)。

材料與方法

1. 檢定用之單核體菌株：

本實驗使用 Yeh and chen (1990) 所已確定四種交配型之南方靈芝 TAI-01-M1 (A₁ B₁ 型), TAI-01-M7 (A₁B₂型), TAI-01-M11 (A₂ B₁ 型) 及 TAI-01-M6 (A₂ B₂ 型) 單核體菌株做為檢定材料。

2. 子實體之人工栽培

自野生南方靈芝 TAI-02, TAI-03 (圖 1), TAI-04 菌體組織獲得純培養 (圖 2, 3, 4), 保存於 2% 麥芽抽出物 (malt extract medium, 簡記 MEA) 斜面培養基備用, 其

來源如表一所示。

行人工栽培子實體時, 預先將純培養製成雜木屑菌絲, 每瓶三角玻璃瓶含木屑 200 公克, 經二週長滿後再接種至太空包。每包太空包含量組成如下: 880 公克雜木屑, 100 公克米糠, 20 公克碳酸鈣, 加水約 60%, 再經高溫 (121 °C) 高壓 (1.2 kg/cm²) 滅菌 1 小時。

接種後之太空包置 28 °C 恆溫箱培養, 待菌絲長滿後, 拔除太空包口之棉花塞, 移至陽台菌種架。

3. 單核體菌株之分離

經 60 天左右子實體原基自太空包環頸長出並形成孔口面後, 以 5 公分無菌培養皿蓋套於子實體孔口下方 (圖 5), 並封以無菌塑膠袋。待收集擔孢子後 (圖 6, 7, 8, 9), 利用單孢分離 (single spore isolation) 方法, 將單一孢子挑至 2% MEA 斜面培養基內置 24 °C 或 28 °C 恆溫箱培養。經 30 天不等, 將萌發的單孢菌株, 首先鏡檢有否扣子體 (clamp connection) 形成, 再以玻片吉氏染色法 (HCl-Giemsa's stain) 染色 (Hou and Wu, 1972) 並置光學顯微鏡 (Olympus, BH-2) 觀察, 確定為單核體系 (圖 10), 方供為實驗用。

共獲得單核體菌株計有 TAI-02, 11 株; TAI-03, 6 株; TAI-04, 2 株。

4. 單核體菌株性別的判定

TAI-02, TAI-03, TAI-04 之單核體菌株各自進行自交試驗, 在 2% MEA 平面培養基中分別對峙接種直徑 3 mm 的菌塊, 置 28 °C 培養 12 天後, 自對峙區兩邊的菌落切取菌絲塊, 進行玻片培養和細胞核吉氏染色, 並觀察記錄菌落交配帶的形態變化, 各單核體菌株的性別由交配結果判定 (Raper, 1966) (圖 11)。

5. 單核體菌株單——單核之交配試驗

選取各單核體菌株之代表交配型 $A_1 B_1$ 及 $A_2 B_2$ 性別, 例如 TAI-02-M1 ($A'_1 B'_1$), TAI-02-M10 ($A'_2 B'_2$); TAI-03-M1 ($A''_1 B''_1$), TAI-03-M5 ($A''_2 B''_2$); 以及 TAI-04-M1 ($A'''_1 B'''_1$), TAI-04-M2 ($A'''_2 B'''_2$), 共 6 株先行分別與 TAI-01 檢定用單核體菌株進行交配試驗。

TAI-02 二株單核體菌絲的交配型重新訂定後, 再依次 TAI-03 × TAI-02, TAI-04 × TAI-03 互相交配, 最後可初步決定交配系統之不親和對位基因數 (multiple alleles of incompatibility)。

結果與討論

台灣產南方靈芝的四個分離菌株 (包括 TAI-01, TAI-02, TAI-03, TAI-04), 其單核體菌絲均可互相交配, 所得結果如表二所示, 顯示均為同一種。由交配試驗可檢定種內交配因子, 例如 TAI-02 之二株單核體菌絲可以和 TAI-01 之四種檢定交配型產生

親和性 (圖 12), 因此 TAI-02-M1 之交配型定為 $A_3 B_3$, 同理, TAI-02-M10 交配型則定為 $A_4 B_4$ 。TAI-03-M1 能與 TAI-02-M1 ($A_3 B_3$) 及 TAI-02-M10 ($A_4 B_4$) 產生親和性, 其交配型理論上可定為 $A_5 B_5$, 但是 TAI-03-M1 與檢定用 TAI-01-M11 ($A_2 B_1$) 及 TAI-01-M6 ($A_2 B_2$) 無法親和, 不能產生扣子體, 顯然含有共同 A 因子 (即 A_2), 因此 TAI-03-M1 之交配型應定為 $A_2 B_5$ (如表二所列), TAI-03-M5 之交配型為 $A_6 B_7$, TAI-04-M2 之交配型為 $A_7 B_1$ 。

在擔子菌的性別遺傳中, 如果同種的單核體菌株, 兩交配的對位基因 (allele) 都不同時, 則可形成穩定的雙核體菌株 (dikaryon), 進而產生子實體完成有性世代。同一種內許多單核體的配對是可親和的, 因為交配型的基因是多因子型, 而且在擔子菌同一族群中是任意分佈的 (random distribution) (Raper, 1966; Ullrich, 1977)。

靈芝屬菌株的擔孢子發芽率極低 (Adaskaveg and Gilbertson; 許瑞祥和王西華, 1987), 尤其樹舌靈芝 (*Ganoderma applanatum*) 要經過休眠才能發芽 (Aoshima, 1954), 因此單核體菌株的獲得較為困難, 如何提高靈芝屬擔孢子的發芽率, 仍企待研究。本實驗中 TAI-04 之單孢系雖祇分離得到二株, 但經自交試驗後可產生扣子體, 並且此二菌株與 TAI-01, 及 TAI-03 單核體菌株進行交配, 均有親和反應發生, 顯然是具備兩對位基因的四極性。

表一：本試驗行人工栽培子實體所使用之南方靈芝純培養菌株

Isolate	locality	Source
<i>Ganoderma australe</i> TAI-02	Taipei	Yeh, Z-Y
TAI-03	Tainan	Yeh, Z-Y
TAI-04	Nantou	Chien, C-Y

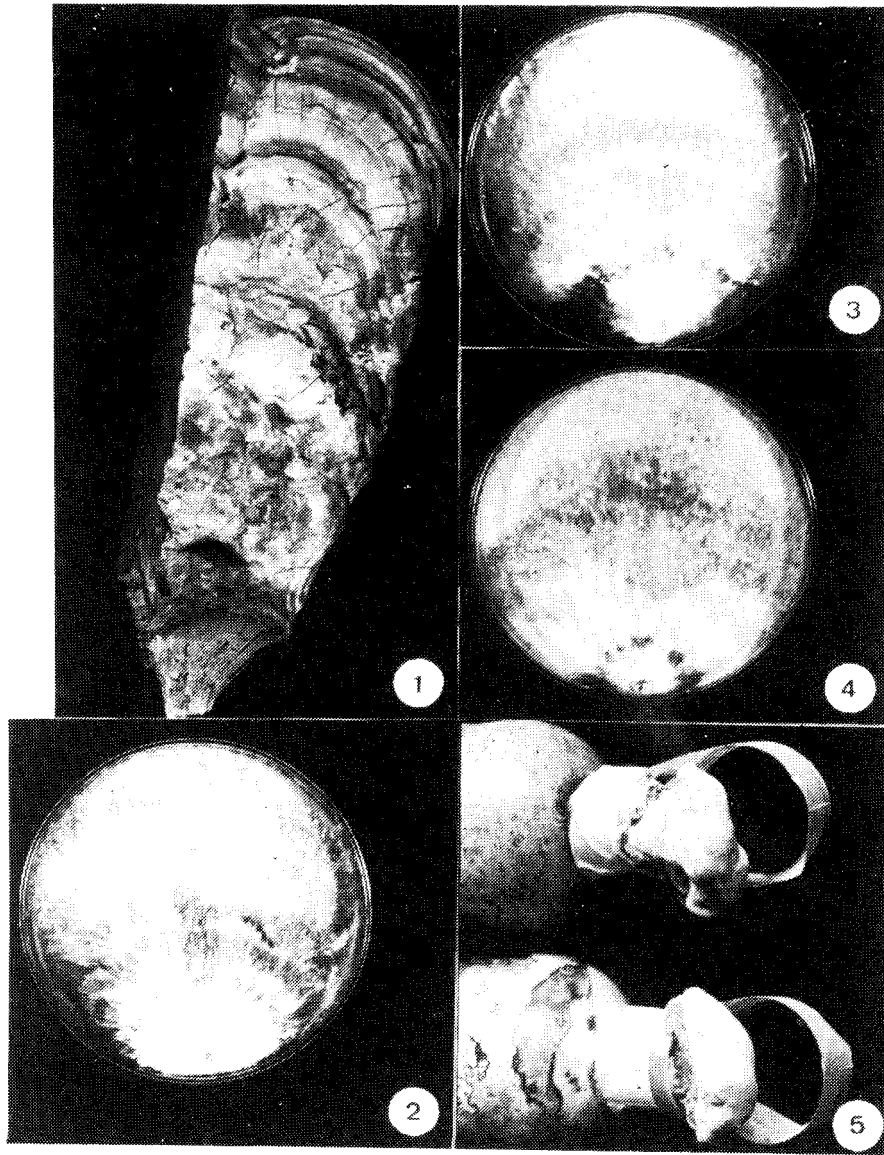
表二 南方靈芝種內各單核體菌株——單核
互相交配反應結果（交配型之決定）

(1) Isolate and original mating type	TAI-01-M1 A ₁ B ₁	TAI-01-M7 A ₁ B ₂	TAI-01-M11 A ₂ B ₁	TAI-01-M6 A ₂ B ₂	New mating type
TAI-02-M1 (A' ₁ B' ₁)	+	+	+	+	A ₃ B ₃
TAI-02-M10 (A' ₂ B' ₂)	+	+	+	+	A ₄ B ₄
TAI-03-M1 (A'' ₁ B'' ₁)	+	+	-	-	
TAI-03-M5 (A'' ₂ B'' ₂)	+	+	+	+	
TAI-04-M1 (A''' ₁ B''' ₁)	+	+	+	+	
TAI-04-M2 (A''' ₂ B''' ₂)	(+)	+	(+)	+	

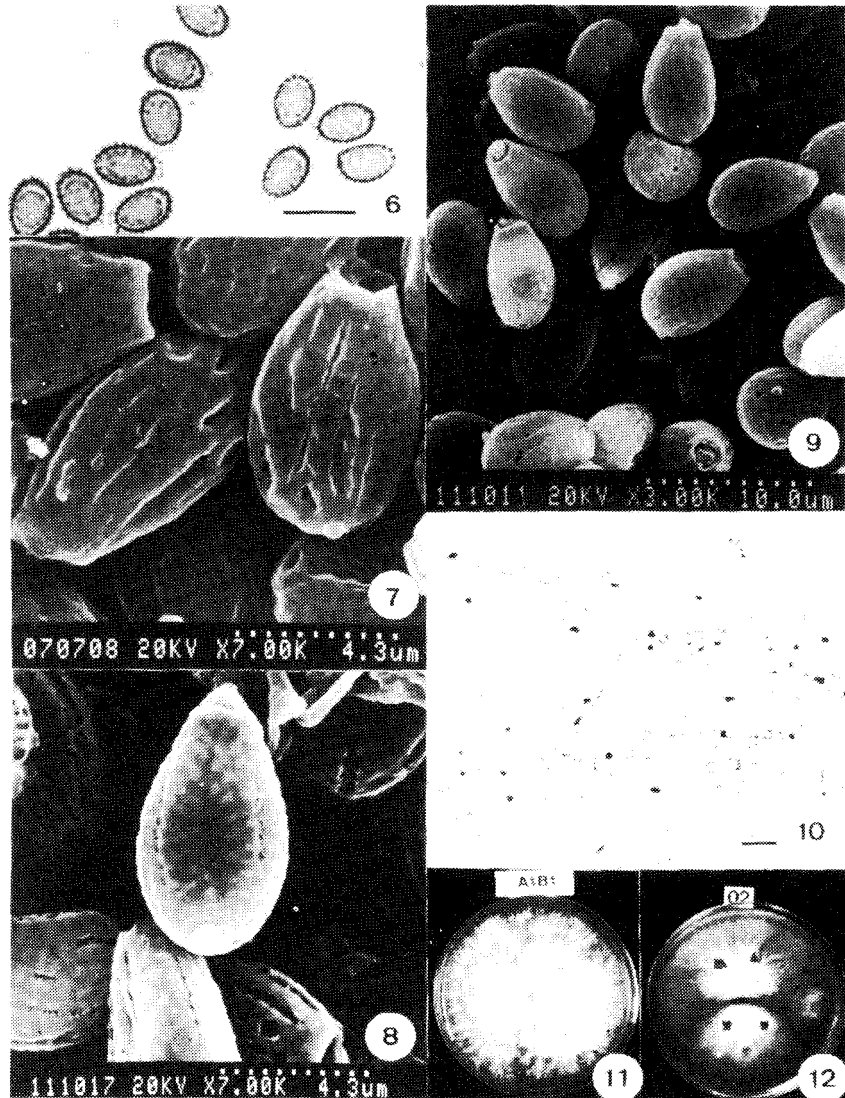
(2) Isolate and original mating type	TAI-02-M1 A ₃ B ₃	TAI-02-M10 A ₄ B ₄	New mating type
TAI-03-M1 (A'' ₁ B'' ₁)	+	+	A ₂ B ₅
TAI-03-M5 (A'' ₂ B'' ₂)	+	+	A ₅ B ₆

(3) Isolate and original mating type	TAI-03-M1 A ₂ B ₅	TAI-03-M5 A ₅ B ₆	New mating type
TAI-04-M1 (A''' ₁ B''' ₁)	+	+	A ₆ B [^]
TAI-04-M2 (A''' ₂ B''' ₂)	+	+	A ₇ B ₁

+ : compatible, clamp formation, (+) : pseudoclamp formation
 - : incompatible, absence of clamp.



圖一：南方靈芝TAI-03之子實體（正面）。
圖二：南方靈芝TAI-02之雙核體純培養菌絲。
圖三：南方靈芝TAI-03之雙核體純培養菌絲。
圖四：南方靈芝TAI-04之雙核體純培養菌絲。
圖五：收集人工栽培南方靈芝擔孢子之裝置。



圖六：人工栽培南方靈芝TAI-02之擔孢子在光學顯微鏡下的形態，表尺 = $10 \mu m$ 。

圖七：人工栽培南方靈芝TAI-02之擔孢子在掃描式電子顯微鏡下的形態。

圖八：人工栽培南方靈芝TAI-03之擔孢子在掃描式電子顯微鏡下的形態。

圖九：人工栽培南方靈芝TAI-04之擔孢子在掃描式電子顯微鏡下的形態。

圖十：南方靈芝TAI-02之單核體菌絲，表尺 = $10 \mu m$ 。

圖十一：南方靈芝TAI-02具不同A, B因子成功交配型之菌落形態。

圖十二：南方靈芝 TAI-02-M1單核體菌株（上），與TAI-01-M1之單核體菌株（下）親和性交配反應。

由實驗結果顯示，台灣的南方靈芝的性別為四極性多因子型，符合擔子菌中性別遺傳的法則。由於本實驗所供試的樣品祇有四個分離菌株，往後有待繼續採集並分離其他地區的單核體菌株，俾便建立台灣南方靈芝性別遺傳型式的基本資料，並可望將來能與其他亞熱帶，熱帶地區的南方靈芝進行交配試驗，以明瞭南方靈芝的交配系統。

誌 謝

本研究承簡教授秋源提供試驗菌株，朱宇敏先生協助採集，徐義雄先生指導靈芝栽培，使本文得以順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

- 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。
- 許瑞祥、王西華，1987。利用單一雙核菌株之交配反應進行靈芝屬菌株類緣關係之研究，中華農業化學會誌 25(1):118-124。
- 趙繼鼎，1988。中國靈芝科的分類研究，VIII，8個訂正種和3個新種，真菌學報 6(4):199-210。
- Adaskaveg J. E., and R. L. Gilbertson. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia* 78: 700-711.
- Aoshima, K. 1953. Sexuality of *Elfvingia applanata* (*Fomes applanatus*) Nagaoa 3:1-11
- Aoshima, K. 1954. Germination of the basidiospores of *Elfvingia applanata* (Pers.) Karsten (*Fomes applanatus*). *Bull. Gvt. For. Exp. Sta. Tokyo* 67:5-18.
- Banerjee, S., and A. Sarkar. 1958. Studies on heterothallism-IV. *Ganoderma lucidum* (Leyss.) Karst. *Sci. & Cult.* 24: 193-195.
- Corner, E. J. H. 1983. Ad Polyporaceas I. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Nova Hedwigia Beih* 75: 1-182.
- Dodge, B. O. 1935. The nature of giant spore and the segregation of sex factors in *Neurospora*. *Mycologia* 21: 222.
- Hou, H. H., and L. G. Wu. 1972. Nuclear behavior of cultivated mushroom. *Bot. Bull. Academia Sinica* 14: 82-91.
- Nishikado, N., and K. Yamauti. 1935. Studies on the heterothallism of *Cortinellus berkeleyana* Ito., an economically important edible mushroom in Japan. *Ber. Ohara Inst. Landw. Forsch.* 7: 115-128.
- Raper, J. R., G. S. Krongelb, and M. C. Baxter. 1958. The number and distribution of incompatibili-

- ty factors in *Schizophyllum*. Amer. Naturalist 91: 221-232.
- Raper, J. R. 1966. Genetics of sexuality in higher fungi. Ronald Press Co. New York. 283pp.
- Steyaert, R. L. 1980. Study of some *Ganoderma* species. Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 50: 135-186.
- Su, C. H., and H. H. Wang 1976. Approaches to sexuality of some edible Hymenomycetes cultivated in Taiwan. Proc. 5th Symposium on Mushroom Research and Improvement of Production. p.489-499.
- Ullrich, R. C. 1977. Natural distribution of incompatibility factors in natural populations in basidiomycetous fungi. Mycologia 69: 714-719.
- Yeh, Z. Y., and Z. C. Chen. 1990. Preliminary investigations of *Ganoderma australe* (subgen. *Elfvigia*) in Taiwan. Taiwania 35 (2): 127-141.

The Mating System of *Ganoderma australe* in Taiwan

Zeng-Yung Yeh (1) and Zuei-Ching Chen (2)

(1) Department of Biology, National Taiwan Normal University.

(2) Department of Botany, National Taiwan University.

ABSTRACT

Fresh basidiocarps of *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. were collected from hardwoods at different sites in Taiwan, and pure cultures were isolated. Monokaryotic cultures of this species were obtained from basidiospores of artificially cultivated fruit-bodies of isolates TAI-02, TAI-03, and TAI-04. Using mating tests with four representing mating types of monokaryotic isolates of *Ganoderma australe* TAI-01 from Taiwan, the mating system of this species proved to be tetrapolar multiallelic.

Key words: *Ganoderma australe*, tetrapolar multiallelic, mating system