

Development of a Selective Medium for Detecting *Ganoderma lucidum* in Compost

研發偵測堆肥中靈芝菌的選擇性培養基

Hung-Ting Lin¹⁾ Tsung-Chun Lin²⁾ Jenn-Wen Huang³⁾

林宏廷

林宗俊

黃振文

Abstract

The purpose of this study was to develop a selective medium for detecting Ling-Chih, *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. in compost. In 2009, two isolates GL1 and GL3 of *G. lucidum* acquired from a Chiayi mushroom cultivation field were used to conduct the research. GLS (*Ganoderma lucidum* selective) medium was developed by amendment of 10% V-8 vegetable juice agar (1 L) with 2 g thiabendazole (40% ai), 200 mg metalaxyl (35% ai), 200 mg streptomycin sulfate, 200 mg chloramphenicol, 1 mg PCNB (75% ai), 1.25 g tannic acid, 10 ml ethanol (95% v/v), and 2 ml lactic acid (85% v/v). The GLS medium rapidly detected *G. lucidum* in the compost within 2-3 days. Amendment of the

medium with tannic acid induced *G. lucidum* to produce brown halo surrounding the colony as a selective feature. The multiple-pellet soil-sampler method was used to evaluate the sensitivity of GLS medium. The GLS medium was able to detect *G. lucidum* in the spent sawdust substrate which were 1000-fold diluted in disinfected sawdust substrate. This study concluded that the GLS medium could detect the survival of *G. lucidum* in the compost, and inhibit the growth of other fungi. Thus, GLS medium was recommended for manufacturers to determine if the compost is a suitable fertilizer.

Key words: *Ganoderma lucidum*, Ling-Chih, selective medium, detection, compost, sawdust waste

-
- 1) Research assistant, Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan, R. O. C. 國立中興大學植物病理學系研究助理。
 - 2) Assistant researcher, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, R. O. C. 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組助理研究員
 - 3) Professor, Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C., Corresponding author. E-mail: jwhuang@nchu.edu.tw 國立中興大學植物病理學系教授，通訊作者。

摘要

本研究主要目的在於研發靈芝菌的選擇性培養基，以便偵測廢棄的蕈菌生長基質調製成之堆肥或介質中是否仍有靈芝菌的存活。西元 2009 年，由嘉義取得的靈芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.] 太空包基質中分離 GL1 與 GL3 兩株靈芝菌菌株，進而評估七種真菌培養基、十種殺菌劑及兩種抗生素等對兩靈芝菌菌絲生長的影響，藉以研發靈芝菌的選擇性培養基。靈芝菌選擇性培養基 (GLS) 係利用 10% V-8 培養基作為基礎基質，並添加 2 g L⁻¹ 腐絕 (40% ai)、200 mg L⁻¹ 滅達樂 (35% ai)、200 mg L⁻¹ 鏈黴素、200 mg L⁻¹ 氯黴素、1 mg L⁻¹ 五氯硝基苯 (75% ai)、1.25 g L⁻¹ 單寧酸、10 ml L⁻¹ 酒精 (95% v/v) 及 2 ml L⁻¹ 乳酸 (85% v/v) 配製而成。靈芝菌在 GLS 培養基生長 2-3 天可看到白色菌落，且於菌落周圍出現褐色反應。利用多重土丸取樣法分析含有不同靈芝接種源濃度之太空包木屑基質，結果顯示由台中及嘉義取得之靈芝太空包基質以無菌之太空包基質稀釋 1000 倍後，GLS 培養基仍可偵測到 *G. lucidum* 的存活。本研究證明 GLS 培養基，除可自廢棄已久的太空包基質成功分離到靈芝菌外，尚可有效抑制其他雜菌的生長。

關鍵詞： *Ganoderma lucidum*、靈芝、選擇性培養基、偵測、堆肥、太空包

前言

靈芝 (Ling-Chih) 為一種木材腐朽菌⁽³⁾，廣泛地分佈在熱帶至溫帶地區⁽²³⁾，同屬

(*Ganoderma*) 之成員亦可對森林中之闊葉樹、人工栽植之果樹、行道樹以及一些經濟作物如棕櫚、椰子樹等造成危害^(2, 10, 20)。靈芝菌可感染苗木及成熟植株，初期外部病徵並不顯著，往往可潛伏數年^(24, 27)，並逐步分解細胞壁中之多酚類物質 (polyphenol)^(4, 21)，導致細胞壁壞死，樹幹組織被腐蝕⁽³⁾，進而使植株機械支撐力減弱，出現慢性萎凋後終至死亡^(5, 22)。當被感染植株之外部病徵顯現時，往往已是病害末期，且超過一半的樹幹組織已被腐蝕，此時已不易以農藥、生物製劑或其他物理、化學的方式加以治療^(10, 11, 28)。世界各地造成樹木腐朽的靈芝屬成員有 *Ganoderma australe* (Fr.:Fr.) Pat.、*G. boninense* Pat.、*G. lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst.、*G. tropicum* (Jungh.) Bres 以及 *G. weberianum* (Bres. & Henn.)^(1, 5) 等，其中在臺灣危害果樹的主要靈芝屬成員為南方靈芝 (*G. australe*)、熱帶靈芝 (*G. tropicum*) 及靈芝 (*G. lucidum*)，分別佔靈芝屬引起果樹死亡之 72.7%、18.2% 以及 9.1%⁽¹⁾。靈芝雖會對樹木造成危害，但同時也具有高度的藥用價值，自古以來，它於中國、日本及韓國等亞洲國家被採用作醫療用途⁽³¹⁾ 外，於美國、巴西等國家還作為食品添加物⁽¹⁶⁾，其具有抗癌、降血壓、降血糖及調節免疫功能等功效⁽¹⁴⁾。目前菇農以太空包栽培法廣泛地栽培靈芝⁽³⁰⁾，市面上的靈芝栽培種多以靈芝 (*G. lucidum*) 為主。然而，在菇農大量栽培並採收其所需的子實體後，往往將其太空包生長基質棄置於河道、窪地、道路旁、燒掉或直接施用於土壤中⁽²⁹⁾，因而有成為樹木病害之感染源的疑慮。有鑑於此，廢棄靈芝太空包的處理十分重要。一般用於栽培藥用菇類

的太空包內容物含有豐富的有機質及植物所需之營養成份，因此，可將廢棄菇類太空包基質調製成堆肥後，施用於農田以增進土壤肥力，並減少環境污染⁽¹³⁾。在廢棄靈芝太空包或靈芝太空包堆肥中，可能尚有大量靈芝殘體存活，為確認堆肥中是否仍有靈芝菌菌絲活體的存在，故亟需發展一套偵測靈芝活體之技術。本研究的主要目的在於發展靈芝菌之選擇性培養基，期望可有效地檢測廢棄太空包或堆肥內靈芝菌之族群是否依然存活。

材料與方法

一、供試靈芝菌株來源

西元 2009 年，由嘉義中埔等地取得廢棄靈芝太空包，以 75% (v/v) 酒精清洗太空包表面，利用紙巾將多餘水分吸乾後，以滅菌之解剖刀將太空包塑膠表面切開並以無菌之鑷子夾出帶有靈芝菌絲之木屑，移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA; Difco) 平板上，於室溫放置數天，直至靈芝菌落長出後，在解剖顯微鏡下以移殖針切取單一菌絲尖端，再移至新的 PDA 培養基平板培養，本研究主要選 GL1 及 GL3 兩個菌株作為供試菌源，並經由核糖體核酸內轉錄區間 (Internal transcribed spacer; ITS) 序列與 NCBI (National Center for biotechnology information, USA) 資料庫做比對，結果顯示 GL1 及 GL3 皆與 *G. lucidum* strain XZ-G-B (GenBank accession no. HQ235632.1) 相似度達 99%。

二、供試菌株之培養與保存

試驗期間，供試靈芝菌株之短期保存是以繼代培養之方式更新，首先以移殖針切取菌絲

尖端，將其移殖於 PDA 培養基平板上，然後置於不照光之恆溫箱 (30°C) 中培養，每隔 6 天更新一次，至於菌株之長期保存則以前述條件培養 6 天後，以打孔器切取菌落邊緣，並以移殖針將菌絲塊 (直徑 7 mm) 置於含有 30 ml 無菌水之螺旋試管中，旋上蓋子，移入 4°C 冰箱保存。

三、基礎培養基之篩選

選取常用於培養或分離真菌之培養基，即 10% V-8 培養基平板 (10% V-8 vegetable juice agar, V-8)⁽¹⁷⁾、馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA; Difco)、麥芽抽出物培養基 (malt extract agar, MEA; Difco)、完全酵母培養基 (complete yeast medium, CYM)⁽¹⁹⁾、查派克氏培養基 (Czapek's medium, CZ; Difco)、*Fomes annosus* 選擇性培養基 (*Fomes annosus* selective medium, Fomes)⁽¹²⁾ 及蛋白脲玫瑰紅培養基 (peptone rose bengal medium, PRBM)⁽¹⁵⁾ 等七種，依各自基礎組成配方並除去抑菌成份 (*Fomes annosus* 選擇性培養基除去 quitozene、streptomycin、lactic acid 與 ethanol; 蛋白脲玫瑰紅培養基除去 rose bengal，其餘培養基則維持原配方)，分別配製成培養基平板後，將靈芝 GL1 及 GL3 菌株移置於 PDA 平板上培養 5 天後，切取菌落邊緣之菌絲塊 (直徑 7 mm)，分別移殖於上述各基礎培養基平板上，於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 5 天後，測量靈芝菌之菌落大小，每處理四重複。

四、酸鹼值對靈芝菌絲生長之影響

在三角燒瓶中配製 150 ml 之 10% V-8 液態培養基，經高溫高壓 (121°C, 15 min, 15 lb) 滅菌後，以 1N HCl 或 1N NaOH 分別調整培養

基之 pH 值為 3、4、5、6、7、8、9 及 10。以打孔器切取 PDA 培養基平板上培養 5 天之靈芝 GL1 與 GL3 菌株菌落邊緣之菌絲塊 (直徑 7mm) 分別接種於 10% V-8 液態培養基中，隨後將三角燒瓶移置於 30°C、110 rpm、12 小時光照之環境中，震盪培養 14 天後，去除濾液，取其菌絲團置於烘箱 (50°C) 乾燥 1 天後，秤量菌絲乾重，每處理三重複。

五、供試藥劑種類與篩選

挑選殺菌劑 50% 免賴得 (Benomyl WP, 台灣杜邦股份有限公司)、50% 貝芬替 (Carbendazim WP, 台灣巴斯夫股份有限公司)、50% 大克爛 (Dicloran WP, 日農企業股份有限公司)、10% 保粒黴素甲 (Polyoxin B WP, 興農股份有限公司)、75% 五氯硝基苯 (pentachloronitrobenzene WP, Tocolo; PCNB)、66.5% 普拔克 (Propamocarb WP, 台灣巴斯夫股份有限公司)、50% 福多寧 (Flutolanil WP, 台灣巴斯夫股份有限公司)、35% 滅達樂 (Metalaxyl WP, 合林企業有限公司)、40% 腐絕 (Thiabendazole WP, 中國農業化工股份有限公司)、賽福寧 (Triforine EC, 台灣巴斯夫股份有限公司)、抗生素鏈黴素 (streptomycin sulfate, Sigma) 與氯黴素 (chloramphenicol, Sigma) 以及單寧酸 (Tannic acid, Riedel-De Haën) 等作為測試之藥劑。

配製 10% V-8 培養基平板，經高壓溫高壓滅菌後待溫度降至 50°C 時，分別加入各供試藥劑，並使藥劑之最終濃度分別為 1 mg L⁻¹、10 mg L⁻¹、100 mg L⁻¹ 及 200 mg L⁻¹，均勻混合後製成培養基平板 (直徑 50 mm)。以打孔器切取在 PDA 培養基平板中培養 5 天之靈芝 GL1 及

GL3 菌株菌落邊緣之菌絲塊 (直徑 4 mm)，分別移置到含有測試藥劑的 10% V-8 培養基平板上，並以不含任何藥劑之 10% V-8 培養基平板作為對照組，於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 5 天後，測量靈芝菌之菌落大小，每處理四重複。

六、酒精與乳酸對靈芝菌絲生長之影響

配製 10% V-8 培養基平板，經高壓溫高壓滅菌後，待溫度降至 50°C 時，分別加入 1、2、3、4 及 5% 之酒精 (95%, v/v) 或 0.1、0.2、0.3、0.4 與 0.5% 之乳酸 (85%, v/v)，均勻混合後製成培養基平板 (直徑 50 mm)。以打孔器切取培養在 PDA 培養基平板中 5 天之靈芝 GL1 與 GL3 菌株菌落邊緣之菌絲塊 (直徑 4 mm)，移置到含有酒精或乳酸的 10% V-8 培養基平板上，並以未處理之 10% V-8 培養基平板作為對照組，在無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 5 天後，測量靈芝菌之菌落大小，每處理四重複。

七、GLS 培養基分離靈芝菌之靈敏度評估

將由台中及嘉義取得採收後的廢棄靈芝太空包，以果汁機將其木屑基質打散後，分別與 100°C 蒸氣消毒八小時之新鮮木屑基質，按 1:0、1:2、1:10、1:20、1:100、1:1000 及 0:1 等七種不同的比例均勻混合。隨後利用多重土丸取樣器 (multiple-pellet soil-sampler)⁽⁸⁾ 逢機採取上述之樣品，隨後將樣品置於 GLS 培養基平板 [10% V-8 培養基作為基礎基質，並添加 2 g L⁻¹ 腐絕 (40% ai)、200 mg L⁻¹ 滅達樂 (35% ai)、200 mg L⁻¹ 鏈黴素、200 mg L⁻¹ 氯黴素、1 mg L⁻¹ 五氯硝基苯 (75% ai)、1.25 g L⁻¹ 單寧酸、10 ml L⁻¹ 酒精 (95% v/v) 及 2 ml L⁻¹ 乳酸 (85% v/v)] 上。每一 GLS 培養基平板 (直徑 90 mm)

上放置 15 個總重為 200-300 mg 之混合木屑丸，並將各平板置於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 3 天後，觀察木屑樣品丸長出靈芝菌絲的百分率，每處理四重複。

此外，將嘉義養菇場廢棄數月之靈芝太空包木屑基質，隨機取 1 公克木屑灑佈於 GLS 培養基平板上，並以 10% V-8 培養基平板作為對照組，在無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 3 天後，觀察有無靈芝菌絲長出，每處理四重複。

八、GLS 培養基抑菌族譜分析菌株來源

自台中市場中購得柳松菇 [*Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer]、洋菇 [*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilát]、金針菇 [*Flammulina velutipes* (Curtis) Singer]、猴頭菇 [*Hericiium erinaceus* (Bull. ex Fr.) Pers.]、香菇 [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]、滑菇 [

Pholiota nameko (T. Ito) S. Ito & Imai in Imai]、珊瑚菇 [*Pleurotus citrinopileatus* Singer]、杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii* (DC:ex Fr.) Quel.]、玫瑰菇 [*Pleurotus djamor* (Fries) Boedjin sensu lato] 及秀珍菇 [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.] 等子實體；又由嘉義、彰化等地的養菇場共取得四個靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 子實體後，分別以無菌水沖洗菇體表面，將多餘水分吸乾後以無菌刀片將子實體菌傘與菌柄交接處切開，接著剝除菌傘及菌柄，使其子實體組織露出後再利用無菌刀片切取子實體組織，並分別移置於 PDA 培養基平板上，於室溫培養，待其長出菌絲後，在解剖顯微鏡下以移殖針切取各菇類的單一菌絲尖端，再次移殖至新的 PDA 培養基平板上，逐一給予各菌株編號。此外亦由國內各研究機構取得巴西蘑菇 (*Agaricus blazei*

表 1. 本研究所使用的靈芝菌株

Table 1. Isolates of *Ganoderma* spp. used in this study

Designation	Scientific name	Supplier or collected location	Collected date
GL1	<i>Ganoderma lucidum</i>	Taichung	July 2009
GL2	<i>Ganoderma lucidum</i>	Jin-Tong Chen ¹	July 2009
GL3	<i>Ganoderma lucidum</i>	Chiayi	July 2009
GL4	<i>Ganoderma lucidum</i>	Chiayi	July 2009
GL5	<i>Ganoderma lucidum</i>	Yun-Seng Lue ¹	July 2009
GL6	<i>Ganoderma lucidum</i>	Taichung	July 2009
GL7	<i>Ganoderma lucidum</i>	Changhua	May 2010
Wu 0307-04	<i>Ganoderma weberianum</i>	Sheng-Hua Wu ²	March 2011

¹ Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 413, Taiwan.

² Department of Botany, National Museum of Natural Science, Taichung 404, Taiwan.

表 2. 本研究中所使用的真菌菌株

Table 2. Fungal isolates used in this study

Designation	Scientific name	Supplier or collected location
AB01	<i>Agaricus bisporus</i>	Taichung
ABM102	<i>Agaricus blazei</i>	Wen-Hsin Chung ¹
AA01	<i>Agrocybe aegerita</i>	Taichung
Asp01	<i>Aspergillus</i> sp.	Taichung
FV01	<i>Flammulina velutipes</i>	Taichung
FocJR01	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	Jenn-Wen Huang ²
HE01	<i>Hericium erinaceus</i>	Taichung
C051	<i>Hexagonia tenuis</i>	Chi-yu Chen ³
LE01	<i>Lentinula edodes</i>	Taichung
Pen01	<i>Penicillium</i> sp.	Taichung
PN01	<i>Pholiota nameko</i>	Taichung
PC01	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Taichung
PE01	<i>Pleurotus eryngii</i>	Taichung
PI01	<i>Pleurotus djamor</i>	Taichung
PO01	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Taichung
C030	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Chi-yu Chen
Pa01	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Jenn-Wen Huang
RST04	<i>Rhizoctonia solani</i>	Jenn-Wen Huang
Rhi01	<i>Rhizopus</i> sp.	Taichung
Tri01	<i>Trichoderma</i> sp.	Taichung

¹ Plant Parasitological Mycology and Molecular Diagnosis of Fungicides-Resistance Lab., Department of Plant Pathology, NCHU, Taichung 402, Taiwan.

² Plant Disease Management Lab., Department of Plant Pathology, NCHU, Taichung 402, Taiwan.

³ Mycology Lab., Department of Plant Pathology, NCHU, Taichung 402, Taiwan.

isolate ABM102) · 血紅栓菌 (*Pycnoporus sanguineus* isolate C030) · 薄邊蜂窩菌 (*Hexagonia tenuis* isolate C051) · 尖鏟孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* isolate FocJR01) · 腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*

isolate Pa01) · 立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani* isolate RST04) · 韋伯靈芝 (*G. weberianum* isolate Wu 0307-04) · 靈芝 (*G. lucidum* isolates GL2 及 GL5) 及由堆肥中分離常見的雜菌 · 包括麴菌 (*Aspergillus* sp.) · 木黴菌 (*Trichoderma*

sp.)、青黴菌 (*Penicillium* sp.)、根黴菌 (*Rhizopus* sp.) 等，共計 26 種不同真菌菌株，並以本研究的靈芝菌 GL1 及 GL3 菌株作為對照，各菌株之編號與來源詳列於表 1 與表 2。

九、GLS 培養基的抑菌測試

將上述真菌培養於 PDA 培養基平板上一星期後，以滅菌的打孔器切取菌落邊緣，並將菌絲塊 (直徑 7 mm)，分別放置於 10% V-8 培養基及 GLS 培養基平板中央，置於無光照之恆溫箱 (30°C) 中培養 7 天後，觀察各真菌菌絲是否生長，每處理四重複。

結果

表 3. 靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株培養在不同基礎培養基之生長情形

Table 3. The colony sizes of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured on different basal media

Medium ¹	Colony size (mm) ²	
	GL1	GL3
CYM	66.25 b ³	77.00 a
CZ	42.33 d	66.70 b
FOMES ⁴	46.75 d	45.87 c
MEA	69.50 b	77.00 a
PDA	70.62 b	77.00 a
PRBA ⁴	54.62 c	34.00 d
V-8	77.00 a	77.00 a

¹ CYM: complete yeast medium; CZ: Czapek's medium; FOMES: *Fomes annosus* selective medium; MEA: malt extract agar; PDA: potato dextrose agar; PRBA: peptone rose bengal agar; V-8: 10% V-8 vegetable juice agar.

² Mycelial growth of *G. lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured on different media at 30°C for 5 days.

³ Means (n = 4) in each column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05) according to Duncan's multiple range test.

⁴ The ingredients of FOMES were removal of quintozene, streptomycin, lactic acid and ethanol; The ingredients of PRBA were removal of contain rose bengal.

一、GLS 培養基的調製及酸鹼度與其組成成分對於靈芝菌生長的影響

經測試 7 種供試基礎培養基平板，靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株在 CZ、FOMES 與 PRBA 等培養基上，菌絲生長速度較慢，而其在 PDA、MEA、CYM 及 10% V-8 等培養基平板上，菌絲生長較為良好，其中此兩菌株培養於 10% V-8 培養基平板時，其菌絲生長最快速 (表 3·圖 1)，故選取 10% V-8 培養基平板做為基礎培養基。酸鹼度對靈芝菌絲生長之影響，靈芝菌 GL1 及 GL3 菌株於 10% V-8 液態培養基之 pH 值為 3-8 時皆可生長，其中又以 pH 值為 5-8 時，其菌絲生長較為良好，當 pH 值大於 9 時，其菌

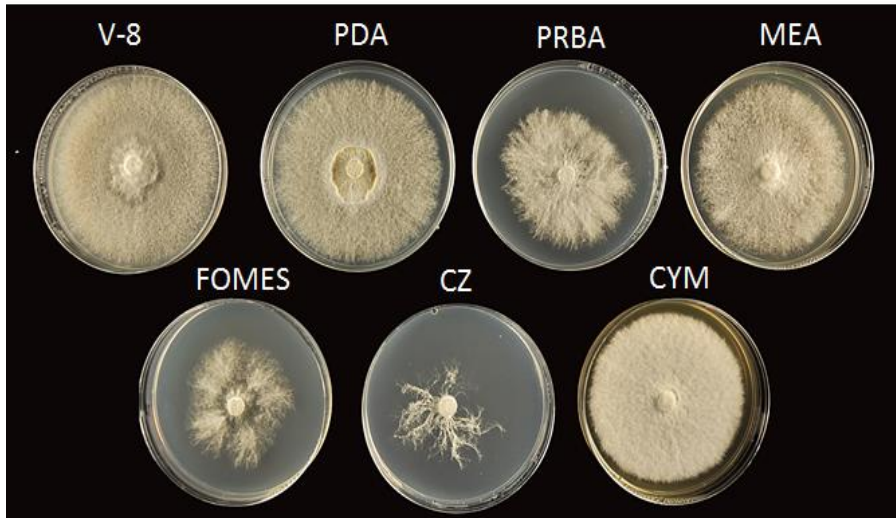


圖 1. 靈芝菌 GL1 菌株培養於不同培養基之菌落生長情形

Fig. 1. The growth of *Ganoderma lucidum* isolate GL1 cultured on different basal media at 30°C for 5 days. CYM: Complete yeast medium; CZ: Czapek's medium; FOMES: *Fomes annosus* selective medium; MEA: Malt extract agar; PDA: Potato dextrose agar; PRBA: Peptone rose bengal agar; V-8: 10% V-8 vegetable juice agar.

National Chung Hsing University

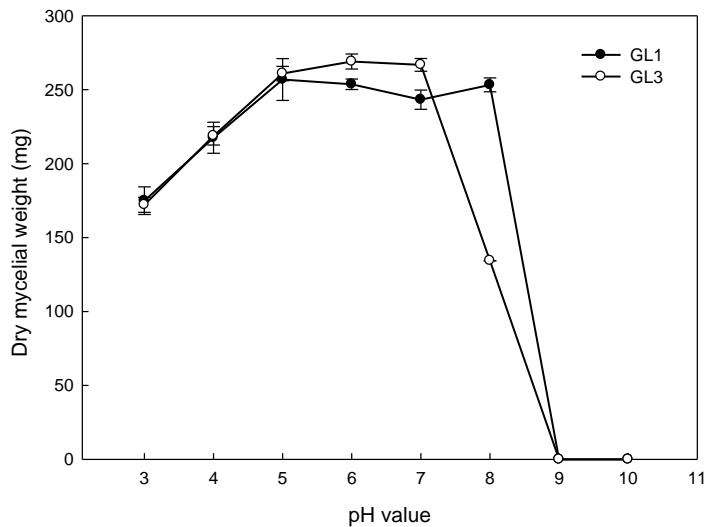


圖 2. 酸鹼值對靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 2. Effect of pH value on dry mycelial weight (mg) of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured in 150 ml liquid 10% V-8 vegetable juice medium at 30°C for 14 days.

絲即不生長 (圖 2)。在 10% V-8 培養基平板中，分別添加不同濃度之化學藥劑，結果顯示 66.5% 普拔克、35% 滅達樂及 40% 腐絕，於濃度為 200 mg L⁻¹ 時，對靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株之菌絲生長僅有 9-21% 之抑制率；75% PCNB 於濃度 200 mg L⁻¹ 時，對兩菌株之菌絲具有 48-55% 的抑制率；50% 免賴得、50% 貝芬替、50% 大克爛、10% 保粒黴素甲及 50% 福多寧，在濃

度 1 mg L⁻¹ 時對於兩菌株之菌絲生長，均具有 80% 以上的抑制率 (表 4、表 5)。兩種廣泛用來抑制細菌生長之抗生素藥劑，鏈黴素與氯黴素，在濃度 200 mg L⁻¹ 時，對於兩菌株之菌絲生長，則僅有些微的影響 (表 6)；在酒精 (95%) 與乳酸 (85%) 方面，於 10% V-8 培養基添加 1% 之酒精對 GL1 及 GL3 菌株之菌絲生長影響不大，但隨著濃度上升，其抑制率也隨之增加。

表 4. 殺真菌劑對於靈芝 GL1 菌株菌絲生長的影響

Table 4. Effect of chemical fungicides on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolate GL1¹

Pesticide	1 ²		10		100		200	
	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition ³ (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)
Benomyl	2.0	81.1	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Carbendazim	0.4	96.2	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Dicloran	9.6	10.2	4.5	58.1	0.0	100.0	0.0	100.0
Flutolanil	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Metalaxyl	9.5	10.7	9.8	8.2	10.0	6.1	8.4	20.7
PCNB	7.1	33.4	4.5	58.2	4.8	55.3	4.7	55.8
Polyoxin B	1.4	86.4	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Propamocarb	10.6	0.0	10.6	0.0	10.5	1.1	10.6	0.0
Thiabendazole	10.6	0.0	10.6	0.0	10.5	0.9	10.2	3.7
Triforine	0.5	96.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Control	10.6	0.0	10.6	0.0	10.6	0.0	10.6	0.0
LSD _{0.05} ⁴	0.2	1.8	0.5	5.1	0.4	3.8	0.4	3.6

¹ Mycelial disks were cultured on 10% V-8 vegetable juice agar amended with different concentrations of chemical fungicides at 30°C and growth rates of mycelia were measured.

² Chemical concentration (mg L⁻¹)

³ Inhibition (%) = (mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar without chemical fungicides - mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar amended with chemical fungicides) / mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar without chemical fungicides X 100

⁴ Least significant difference at $P=0.05$

表 5. 殺真菌劑對於靈芝 GL3 菌株菌絲生長的影響

Table 5. Effect of chemical fungicides on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolate GL3¹

Pesticide	1 ²		10		100		200	
	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition ³ (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm/day)	Inhibition (%)
Benomyl	1.4	86.9	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Carbendazim	0.1	99.4	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Dicloran	8.6	16.7	6.2	39.9	0.0	100.0	0.0	100.0
Flutolanil	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Metalaxyl	10.6	-3.0	10.4	-0.5	9.3	10.3	8.6	16.3
Polyoxin B	1.0	91.2	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
PCNB	6.9	33.5	3.2	68.5	4.8	53.3	5.3	48.9
Propamocarb	10.6	-3.0	8.8	15.0	9.5	7.9	9.4	9.0
Thiabendazole	9.9	4.0	9.9	4.0	9.3	10.0	8.8	15.2
Triforine	0.4	96.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Control	10.3	0.0	10.3	0.0	10.3	0.0	10.3	0.0
LSD _{0.05} ⁴	0.4	6.0	0.3	3.2	0.9	9.8	0.8	8.1

¹ Mycelial disks were cultured on 10% V-8 vegetable juice agar amended with different concentrations of chemical fungicides at 30°C and growth rates of mycelia were measured.

² Chemical concentration (mg L⁻¹)

³ Inhibition (%) = (mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar without chemical fungicides - mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar amended with chemical fungicides) / mycelial growth on 10% V-8 vegetable juice agar without chemical fungicides X 100

⁴ Least significant difference at $P = 0.05$

當濃度增加至 4% 時，兩菌株皆無法生長 (圖 3)；於 10% V-8 培養基平板添加 0.3% 乳酸時，即明顯抑制兩菌株之菌絲生長 (圖 4)；單寧酸濃度在 1000 mg L⁻¹ 以下時，對兩菌株之生長影響不大 (圖 5)，但於兩菌株菌落周圍之褐色沉澱則隨著添加單寧酸之濃度提高而變深。根據上述結果，靈芝菌選擇性培養基 (*Ganoderma lucidum* selective medium, GLS) 之組成及製作

方法如后，即以 10% V-8 培養基平板作為基礎培養基，經過高溫高壓 (autoclaved) 滅菌後，待溫度降至 40-50°C 時，逐一加入 200 mg L⁻¹ 滅達樂 (35% ai)、2 g L⁻¹ 腐絕 (40% ai)、1 mg L⁻¹ 五氯硝基苯 (75% ai)、200 mg L⁻¹ 鏈黴素、200 mg L⁻¹ 氯黴素；此外參考 Darus⁽¹⁹⁹¹⁾ 之研究，在配方中再添加 1.25 g L⁻¹ 單寧酸、10 ml L⁻¹ 酒精 (95% v/v) 及 2 ml L⁻¹ 乳酸 (85% v/v)

表 6. 氯黴素與鏈黴素對於靈芝菌 GL1 及 GL3 菌株菌絲生長之影響

Table 6. Effect of chloramphenicol and streptomycin sulfate on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3

Treatment	Conc. (mg L ⁻¹)	Mycelial growth (mm)	
		GL1	GL3
Chloramphenicol	0	48.8	51.0
	1	49.3	51.0
	5	48.9	51.0
	10	48.2	51.0
	50	48.5	51.0
	100	47.6	51.0
	200	46.1	51.0
	LSD _{0.05} ²	1.5	0.0
Streptomycin sulfate	0	48.5	51.0
	1	48.0	51.0
	5	47.9	51.0
	10	47.8	51.0
	50	45.6	51.0
	100	45.1	51.0
	200	43.6	51.0
	LSD _{0.05}	1.0	0.0

¹ Mycelial disks were cultured on 10% V-8 vegetable juice agar amended with different concentration (ai) of antibiotics at 30°C for 5 days.

² Least significant difference at $P = 0.05$

後，發現靈芝菌 GL1 及 GL3 菌株皆可在此 GLS 培養基平板上生長，並於菌落周圍產生褐色的沉澱 (圖 6 A, B)。

二、GLS 培養基分離靈芝菌之靈敏度測試

以 GLS 培養基偵測，發現各稀釋倍率處理之靈芝菌 GL1 及 GL3 菌株，皆可在 GLS 培養基平板上分離到菌落，其中以稀釋 0、1、2、10 與 20 倍之處理，兩菌株之分離率皆為 100%；

稀釋 100 倍時，兩菌株分離率亦尚有 50% 以上 (表 7)；至於 1000 倍稀釋倍率者，在 GLS 培養基平板上，其分離率則分別為 5% 及 8%，且在菌落周圍可觀察到褐色的沉澱物 (圖 6 C)。

運用 GLS 培養基平板分離台中與嘉義之廢棄數月的靈芝太空包木屑，並與對照組 10% V-8 培養基平板相比，結果兩地取得的廢棄靈芝太空包木屑基質，皆可利用 GLS 培養基平板

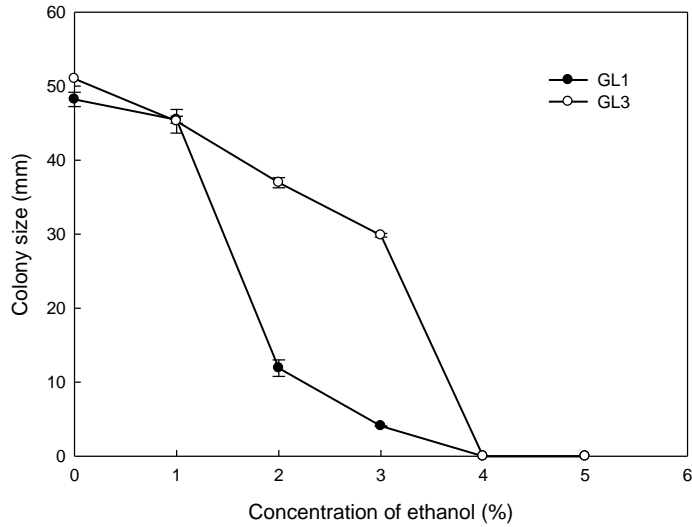


圖 3. 酒精對靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 3. Effect of ethanol on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured on 10% V-8 vegetable juice agar at 30°C for 5 days .

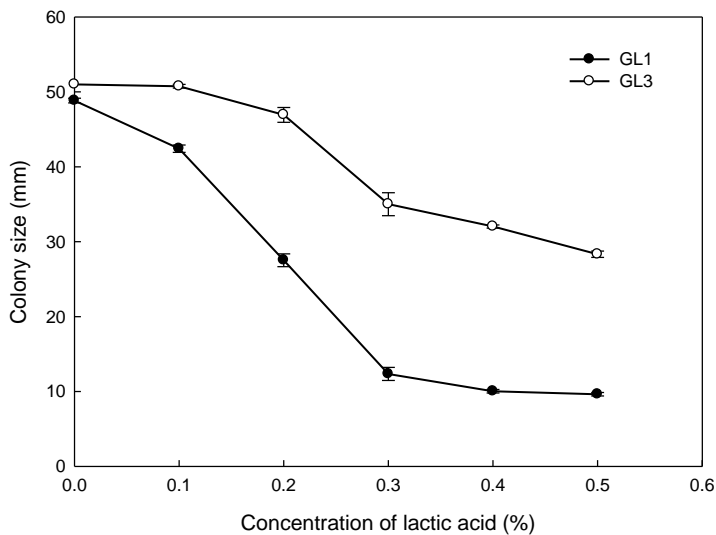


圖 4. 乳酸對靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 4. Effect of lactic acid on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured on 10% V-8 vegetable juice agar at 30°C for 5 days.

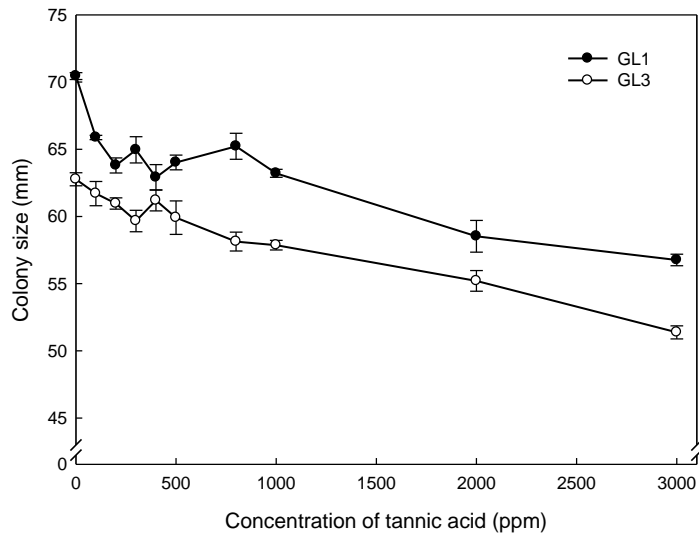


圖 5. 單寧酸對靈芝菌 GL1 與 GL3 菌株菌絲生長之影響。

Fig. 5. Effect of tannic acid on mycelial growth of *Ganoderma lucidum* isolates GL1 and GL3 cultured on 10% V-8 vegetable juice agar at 30°C for 5 days.

National Chung Hsing University

分離及辨識靈芝菌菌落，尚且對其他雜菌之生長具有良好的抑制效果，相較於 10% V-8 培養基平板對照組則佈滿雜菌，不易分辨靈芝菌之菌落（圖 6 D, E）。

三、GLS 培養基抑菌族譜分析

柳松菇 (*Agrocybe aegerita* isolate AA01)、洋菇 (*Agaricus bisporus* isolate AB01)、巴西蘑菇 (*Agaricus blazei* isolate ABM102)、金針菇 (*Flammulina velutipes* isolate FV01)、猴頭菇 (*Hericium erinaceus* isolate HE1)、香菇 (*Lentinula edodes* isolate LE01)、滑菇 (*Pholiota nameko* isolate PN01)、珊瑚菇 (*Pleurotus citrinopileatus* isolate PC01)、杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii* isolate PE01)、玫瑰菇 (*Pleurotus djamor* isolate PI01)、秀珍菇

(*Pleurotus ostreatus* isolate PO01)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani* isolate RST04)、腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum* isolate Pa01)、鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* isolate FocJR01)、木黴菌 (*Trichoderma* sp. isolate Tri01) 及麴菌 (*Aspergillus* sp. isolate Asp01) 等菌株皆可在 10% V-8 培養基上生長良好，惟無法在 GLS 培養基生長(表 8)。至於靈芝屬之靈芝 (*G. lucidum* isolate GL2、GL4、GL5、GL6 及 GL7) 以及韋伯靈芝 (*G. weberianum* isolate Wu 0307-04) 皆可在 GLS 培養基上生長。此外，同屬多孔菌之血紅栓菌 (*Pycnoporus sanguineus* isolate C030) 也同樣可在 GLS 培養基上生長，但菌落中心不像靈芝菌落平鋪於培養基上(圖 7)。堆肥及土壤中常

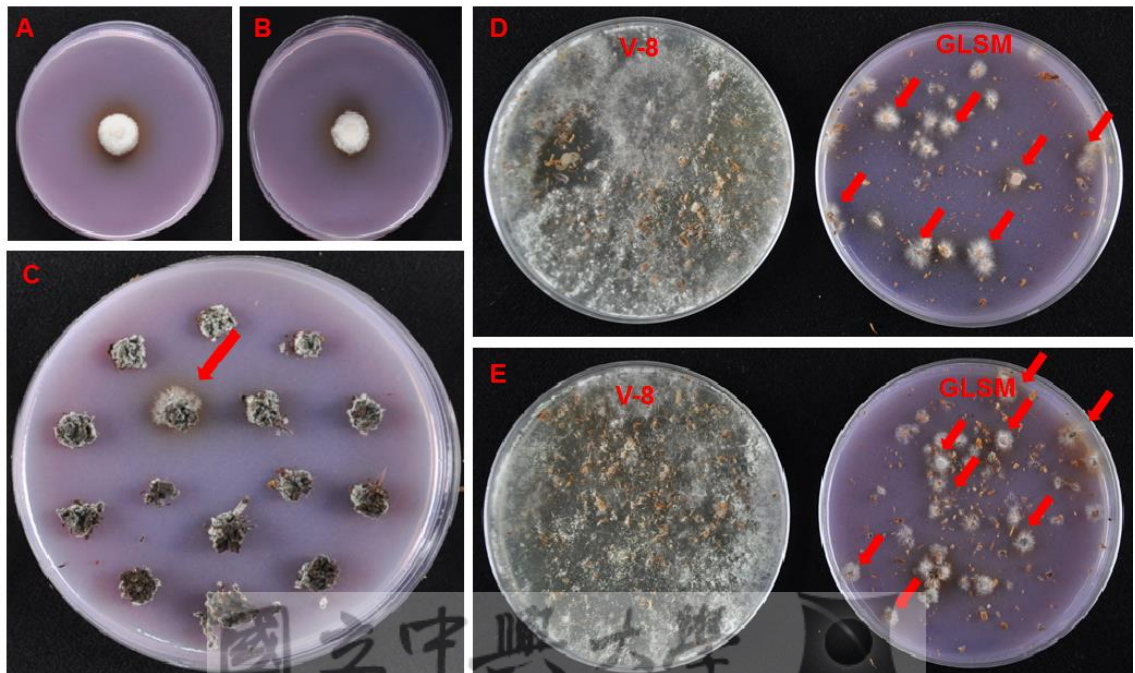


圖 6. 靈芝菌 (A) GL1 菌株與 (B) GL3 菌株於 GLS 培養基於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 4 天之菌落形態 ;(C) 利用多重土丸取樣器 (multiple-pellet soil-sampler) 取樣，發現 GLS 培養基在靈芝菌廢棄太空包基質以滅菌後之木屑稀釋 1000 倍後，尚可分離靈芝菌 (箭頭處) ; (D) 利用 GLS 培養基自廢棄靈芝太空包基質 (台中取得) 中分離獲得靈芝菌 (箭頭處)，10% V-8 培養基當作對照 ; (E) 利用 GLS 培養基自廢棄靈芝太空包基質 (嘉義取得) 中分得靈芝菌 (箭頭處)，10% V-8 培養基當作對照。

Fig. 6. (A&B) Colonies of *Ganoderma lucidum* isolate GL1 (A) and isolate GL3 (B) grown on GLS medium at 30°C for 4 days. (C) The colonies of *G. lucidum* were successively detected by GLS medium at 1000-fold dilution rate by using multiple-pellet soil-sampler method (arrowhead). (D) GLS medium was used to detect *G. lucidum* from Taichung spent Lin-Chih-cultured substrate while 10% V-8 vegetable juice agar as a control. (E) GLS medium was used to detect *G. lucidum* from Chiayi spent Lin-Chih-cultured substrate while 10% V-8 vegetable juice agar as a control.

見之雜菌，青黴菌 (*Penicillium* sp. isolate Pen 01) 與根黴菌 (*Rhizopus* sp. isolate Rhi01) 雖可在 GLS 培養基上生長，但由於受到培養基所含藥劑的影響，其菌絲生長緩慢，且其菌落周圍

無褐色沉澱現象 (圖 8)。此外同屬於多孔菌之薄邊蜂窩菌 (*Hexagonia tenuis* isolate C051) 則無法在 GLS 培養基上生長 (表 8)。

表 7. 利用多重土丸取樣器評估 GLS 培養基偵測靈芝菌的靈敏度

Table 7. Sensitivity of GLS medium for recovery of *Ganoderma lucidum* from spent Ling-Chih-cultured substrates using multiple-pellet soil-sampler method

Dilution ratio of spent substrate ¹	Recovery frequency (%)	
	Substrates from Taichung	Substrates from Chiayi
1:0	100 ²	100
1:2	100	100
1:10	100	100
1:20	100	100
1:100	55	50
1:1000	5	8
0:1	0	0

¹ Ratio of the spent Lin-Chih-cultured substrates to disinfected sawdust.

² Mean values were obtained from 60 samples.

討論

早期分離靈芝菌，大多利用 PDA 及 MEA 等培養基添加抗生素的方式進行⁽⁶⁾，或者嘗試採用 *Fomes annosus* 的選擇性培養基進行分離⁽⁷⁾。這類培養基無法有效地抑制其他真菌類雜菌如 *Trichoderma* spp. 與 *Penicillium* spp. 的污染干擾，故常造成分離鑑別的困擾。Darus and Seman⁽⁷⁾ 發展出 *G. boninense* 專用之選擇性培養基能有效分離標的菌外，亦不易被雜菌污染，頗具方便性，惟 *G. lucidum* 無法在該培養基上生長，故有必要針對 *G. lucidum* 研發有效的選擇性培養基。

研發真菌之選擇性培養基，主要是利用營養成分與抑菌物質，增強欲分離標的真菌的生長優勢，或促使標的真菌產生特殊菌落性狀或顏色，且尚可抑制其他雜菌的生長⁽²⁶⁾。本研究以高溫高壓滅菌之 10% V-8 培養基作為基礎

培養基，並參考 Kuhlman⁽¹²⁾ 及 Darus and Seman⁽⁷⁾ 所研發之選擇性培養基配方進行修正，製成 GLS 培養基，可有效分離出 *G. lucidum*。在 GLS 培養基所添加的藥劑中，滅達樂可抑制卵菌類如 *Pythium* spp.、*Phytophthora* spp.；五氯硝基苯可抑制不完全菌類真菌；乳酸及抗生素（鏈黴素與氯黴素）則可抑制大部分的細菌；酒精則可抑制某些不完全菌如 *Verticillium* spp. 之生長；腐絕除可抑制子囊菌與不完全菌類外，40% 腐絕 2000 mg L⁻¹ 尚可抑制杏鮑菇菌株 PE01 及香菇菌株 LE01 等擔子菌的生長（結果未顯示），故使用此濃度作為選擇性培養基的配方。本試驗所使用之靈芝菌株在添加 10 mg L⁻¹ 免賴得（50% ai）時即無法生長（表 4、表 5），惟 Darus and Seman⁽⁷⁾ 所使用之 *G. boninense* 菌株及 Tsai *et al.*⁽²⁵⁾ 所使用之 *G. australe* 菌株可分別忍受免賴得的濃度達 300 mg L⁻¹ 及 1000 mg L⁻¹，顯然不同菌種對於免賴

表 8. 不同真菌在 10% V-8 及 GLS 培養基上的生長情形

Table 8. Application of 10% V-8 vegetable juice agar and GLS medium for culturing different fungal species

Fungal species	Isolate designation	Chinese name	Growth	
			V-8 ¹	GLS
<i>Agaricus bisporus</i>	AB01	洋菇	+ ²	-
<i>Agaricus blazei</i>	ABM102	巴西蘑菇	+	-
<i>Agrocybe aegerita</i>	AA01	柳松菇	+	-
<i>Flammulina velutipes</i>	FV01	金針菇	+	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	GL1	靈芝	+	+
	GL2	靈芝	+	+
	GL3	靈芝	+	+
	GL4	靈芝	+	+
	GL5	靈芝	+	+
	GL6	靈芝	+	+
	GL7	靈芝	+	+
<i>Ganoderma weberianum</i>	Wu 0307-04	韋伯靈芝	+	+
<i>Hericium erinaceus</i>	HE01	猴頭菇	+	-
<i>Lentinula edodes</i>	LE01	香菇	+	-
<i>Pholiota nameko</i>	PN01	滑菇	+	-
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PC01	珊瑚菇	+	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	PE01	杏鮑菇	+	-
<i>Pleurotus djamor</i>	PI01	玫瑰菇	+	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PO01	秀珍菇	+	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	RST04	立枯絲核菌	+	-
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	C030	血紅栓菌	+	+
<i>Hexagonia tenuis</i>	C051	薄邊蜂窩菌	+	-
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Pa01	腐霉菌	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	FocJR01	鐮孢菌	+	-
<i>Aspergillus</i> sp.	Asp01	麴菌	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	Pen01	青黴菌	+	+
<i>Trichoderma</i> sp.	Tri01	木黴菌	+	-
<i>Rhizopus</i> sp.	Rhi01	根黴菌	+	+

¹ V-8: 10% V-8 vegetable juice agar; GLS: *Ganoderma lucidum* selective medium.² + = yes, - = no

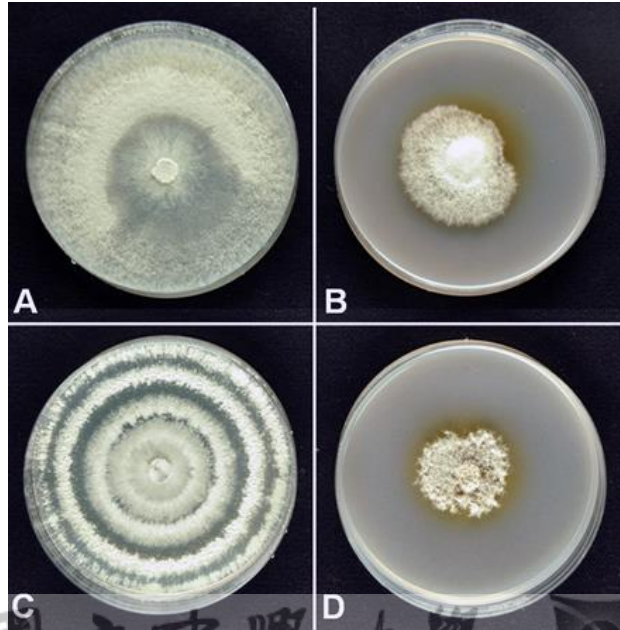


圖 7. 靈芝菌 GL1 菌株於 (A) 10% V-8 培養基平板及 (B) GLS 培養基於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 7 天之菌落形態。血紅栓菌 C030 菌株於 (C) 10% V-8 培養基平板及 (D) GLS 培養基於無光照恆溫箱 (30°C) 中培養 7 天之菌落形態。

Fig. 7. Colonies of *Ganoderma lucidum* isolate GL1 grown on (A) 10% V-8 vegetable juice agar, and (B) GLS medium at 30°C for 7 days. Colonies of *Pycnoporus sanguineus* isolate C030 grown on (C) 10% V-8 vegetable juice agar, and (D) GLS medium at 30°C for 7 days.

得的耐受濃度亦有顯著差異。

有些真菌如擔子菌中的木材腐朽菌，可分泌酚氧化酵素 (phenol oxidase)，將酚類化合物氧化。將此類真菌置於含有單寧酸的培養基培養一段時間後，即可在菌落周圍觀察到褐色色素之沉澱反應⁽¹⁸⁾。在土壤及栽培介質中常見之雜菌如 *Rhizopus* spp.、*Trichoderma* spp.、*Aspergillus* spp. 及 *Penicillium* spp. 等培養於含有單寧酸之培養基時，其菌落周圍並不會有褐色色素產生⁽⁹⁾。根據以上所敘述之特性，並參考 Darus and Seman⁽⁷⁾ 之研究報告，本試驗於 10%

V-8 培養基平板中，添加單寧酸 1.25 g L⁻¹，並在無光照恆溫箱 (30°C) 培養靈芝菌株數天後，即在其菌落周圍觀察到褐色色素之沉澱，此現象可作為判斷靈芝菌的依據。此外部份多孔菌如血紅栓菌 (*Pycnoporus sanguineus* isolate C030)，也可在 GLS 培養基上生長，但可由菌落形態加以區別 (圖 7)。顯然，本研究所研發成功的 GLS 培養基，可用於檢測廢棄菇類生長基質及其調製的堆肥是否仍有靈芝菌的存活，將可協助市售農用堆肥的安全性進行把關的工作。

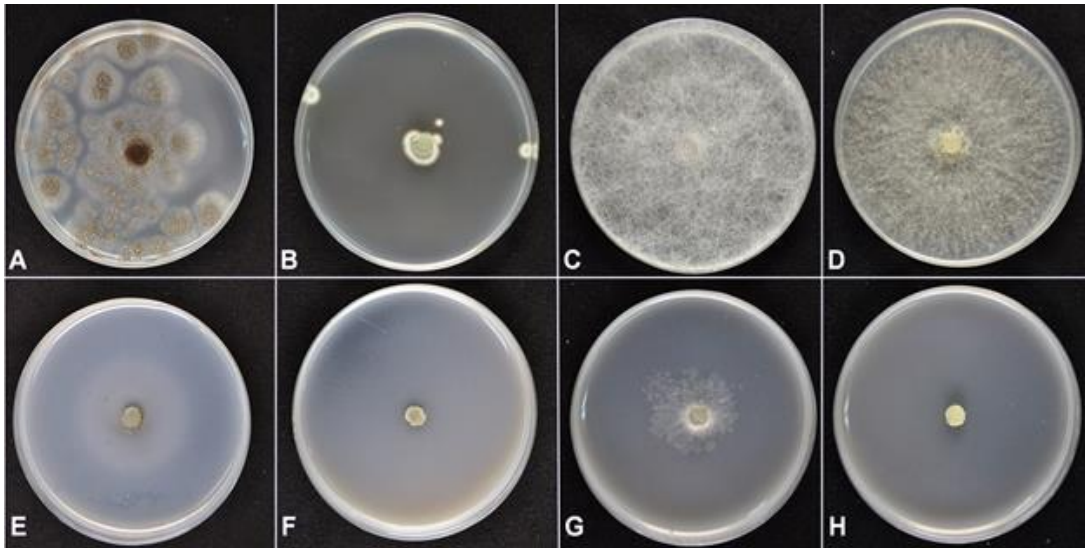


圖 8. 麴菌 Asp01 菌株、青黴菌 Pen01 菌株、根黴菌 Rhi01 菌株及木黴菌 Tri01 菌株於 10% V-8 或 GLS 培養基上之生長情形。

Fig. 8. Colonies of (A) *Aspergillus* sp. isolate Asp01, (B) *Penicillium* sp. isolate Pen01, (C) *Rhizopus* sp. isolate Rhi01, and (D) *Trichoderma* sp. isolate Tri01 grown on 10% V-8 vegetable juice agar. Colonies of (E) *Aspergillus* sp. isolate Asp01, (F) *Penicillium* sp. isolate Pen01, (G) *Rhizopus* sp. isolate Rhi01, and (H) *Trichoderma* sp. isolate Tri01 grown on GLS medium.

謝誌

本研究部分經費獲國科會 NSC-101-2911-I-005-301 及教育部 ATU 計畫補助，特誌謝忱。

參考文獻

1. Ann, P. J., T. C. Chang, J. N. Tsai and I. T. Wang. 2000. Decline of fruit trees associated with root rot caused by *Ganoderma* species in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 9:178. (in Chinese with English abstract)
2. Ann, P. J., J. N. Tsai, T. T. Chang and I. T. Wang. 2005. Distribution of decline of

fruit trees and ornamental woody plants in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 14: 203-210. (in Chinese with English abstract)

3. Blanchette, R. A. 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 381-398.
4. Chang, T. T. 1995. A selective medium for *Phellinus noxius*. *Eur. J. For. Pathol.* 25: 185-190.
5. Chang, T. T., H. J. Hsieh, R. J. Chang and C. S. Fu. 1999. Common tree diseases in Taiwan. Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan. Tech. Rep. 98. (in Chinese)

- with English abstract.)
6. Chang, T. T. 2003. Effect of soil moisture content on the survival of *Ganoderma* species and other wood-inhabiting fungi. *Plant Dis.* 87: 1201-1204.
 7. Darus, A. and A. I. Seman. 1991. A selective medium for the isolation of *Ganoderma* from diseased tissues. PORIM International Oil Palm Conference. PORIM, 1991: 517-519.
 8. Henis, Y., A. R. B. Ghaffar, S. L. Banker and S. L. Gillespie. 1977. A new pellet soil-sampler and its use for study population dynamics of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 68: 371-376.
 9. Hsieh, S. P. Y., R. Z. Huang and T. C. Wang. 1996. Application of tannic acid in qualitative and quantitative growth assay of *Rhizoctonia* spp. *Plant Pathol. Bull.* 5: 100-106. (in Chinese with English abstract.)
 10. Kandan, A., R. Bhaskaran and R. Samiyappan. 2010. *Ganoderma*- a basal stem rot disease of coconut palm in south asia and asia pacific regions. *Arch. Phytopath. Plant Prot.* 43: 1445-1449.
 11. Karthikeyan, M., R. Bhaskaran, K. Radhika, S. Mathiyazhagan, V. Jayakumar, R. Sandoskumar and R. Velazhahan. 2008. Development and comparison of ELISA and PCR methods for the early detection of *Ganoderma* disease of coconut. *Arch. Phytopath. Plant Prot.* 41: 396-406.
 12. Kuhlman, G. E. and F. F. Hendrix. 1962. A selective medium for the isolation of *Fomes annosus*. *Phytopathology* 52: 1310-1312.
 13. Lin, C. H. 1993. A study on preparation of composts from used mushroom culture medium. *Bulletin of Taichung District Agricultural Research and Extension Station* 39: 17-27.
 14. Lu, W. L., Z. P. Lin and Z. B. Lin. 1992. Scientific application of *Ganoderma lucidum*. The Vacation Press. Taipei, Taiwan. 112 pp. (in Chinese)
 15. Martin, J. P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-233.
 16. Mau, J., H. Lin and C. Chen. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res.* 34: 521-526.
 17. Miller, P. M. 1955. V8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45: 461-462.
 18. Phillips, L. E. and T. J. Leonard. 1976. Extracellular and intracellular phenoloxidase activity during growth and development in *Schizophyllum*. *Mycologia* 68: 268-276.
 19. Raper, C. A. and J. R. Raper. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64: 1088-1117.
 20. Sankaran, K.V., P. D. Bridge and C. Gokulapalan. 2005. *Ganoderma* diseases of perennial crops in India - an overview. *Mycopathologia* 159:143-152.

21. Schwarze, F. W. M. R. and S. Baum. 2000. Mechanisms of reaction zone penetration by decay fungi in beech wood. *New Phytol.* 146: 129-140.
22. Schwarze, F. W. M. R. and D. Ferner. 2003. *Ganoderma* on trees - differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboric. J.* 27: 59-77.
23. Sinclair, W. A., H. H. Lyon and W. T. Johnson. 1987. *Diseases of Trees and Shrubs*. Cornell University Press, Ithaca, NY., USA. 574 pp.
24. Soepena, H., R.Y. Purba and S. Pawirosukarto. 2000. A control strategy for basal stem rot (*Ganoderma*) on oil palm. pages 83-88 In: *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. J. Flood, *et. al.* (eds). CAB International, UK. 279 pp.
25. Tsai, J. N., P. J. Ann and W. H. Hsieh. 2005. Evaluation of fungicides for suppression of three major wood-decay fungi *Phellinus noxius*, *Rosellinia necatrix* and *Ganoderma australe* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 14: 115-124. (in Chinese with English abstract)
26. Tsao, P. H. 1970. Selective medium for isolation of pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytophthol.* 8: 157-168.
27. Turner, P. D. 1981. *Oil Palm Diseases and Disorders*. Oxford University Press, Kuala Lumpur, Malasia, 280 pp.
28. Utomo, C. and F. Niepold. 2000. Development of diagnostic methods for detecting *Ganoderma*-infected oil palms. *J. Phytopathol.* 148: 507-514.
29. Wang, P. C. and J. W. Huang. 2000. Characteristics for inhibition of cucumber damping-off by spent forest mushroom compost. *Plant Pathol. Bull.* 9:137-144. (in Chinese with English abstract)
30. Wu, K. J. 2009. Development of cultivation technology for medicinal mushroom. *Agric. Biotechn. Bull.* 18: 26-33.
31. Zhou, X. W., J. Lin, Y. Z. Yin, J. Y. Zhao, X. F. Sun and K. X. Tang. 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *Am. J. Chin. Med.* 35: 559-574.

Received: October 29, 2012.

Accepted: February 19, 2013.