

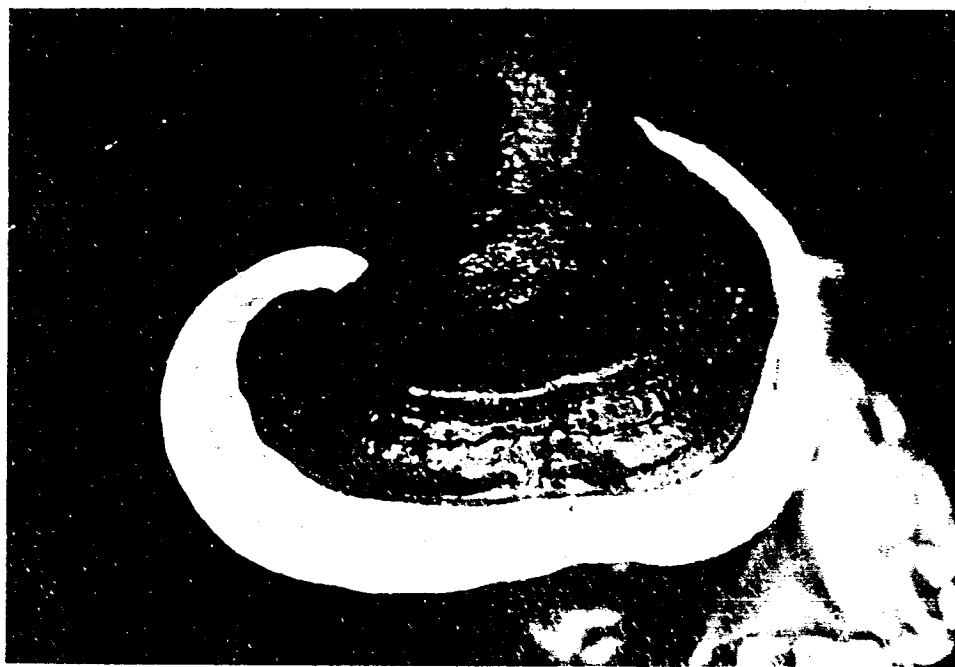
BỘ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG
SỞ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ MÔI TRƯỜNG TỈNH LÂM ĐỒNG

BÁO CÁO NGHIỆM THU ĐỀ TÀI

ỨNG DỤNG QUI TRÌNH NUÔI TRỒNG SẢN XUẤT NẤM
LINH CHI *GANODERMA LUCIDUM* PHỤC VỤ PHÁT TRIỂN
NGUỒN DƯỢC LIỆU QUÍ TỈNH LÂM ĐỒNG

(3/1999-12/1999)

Chủ nhiệm đề tài: Ts. LÊ XUÂN THẨM



Dalat - 1/1/2000

BÁO CÁO ĐỀ TÀI CẤP TỈNH

**Ứng dụng qui trình nuôi trồng sản xuất nấm
Linh chi *Ganoderma lucidum* phục vụ phát triển
nguồn dược liệu quý tỉnh Lâm đồng**

Thời gian thực hiện: 3/1999 - 12/1999

Kinh phí được cấp: 20 triệu VN đ.

Cơ quan chủ quản: Sở KH-CN-MT Tỉnh Lâm đồng

Cơ quan chủ trì: Viện Nghiên cứu hạt nhân Dalat

Chủ nhiệm Đề tài: Lê Xuân Thám

Học vị chuyên môn: Tiến sĩ Sinh học (Ph.D.)

Chức vụ: Trưởng Phòng Sinh học, Viện NCHN Dalat.

Cán bộ thực hiện chính:

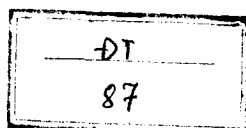
1. Lê Xuân Thám, Ph.D.

2. Trần Hữu Độ, M.Sc.

3. Lê Thị Đính, M.Sc.

4. Hoàng Nghĩa Dũng, B.Sc.

5. Phạm Thị Bạch Yến, M.Sc., Phó Giám đốc Bệnh viện Y học cổ truyền
Phạm Ngọc Thạch, Dalat.



MỞ ĐẦU

Hơn 4.000 năm trước đây (từ thời Hoàng đế 2550 - 2140 trước Công nguyên), giá trị dược liệu của nấm Linh Chi đã được ghi chép trong các thư tịch cổ (Zhao, J.D... 1994).

Linh Chi được xếp vào "Thuợng dược" trong sách "Thần nông bản thảo" cách nay khoảng 2000 năm thời nhà Châu và sau đó được nhà y dược nổi tiếng Trung Quốc Lý Thời Trân phân ra thành "Lục bảo Linh Chi" (khoảng 1590) thời nhà Minh với các khái quát công dụng dược lý khác nhau, ứng theo từng màu. Từ đó tới nay, trải qua bao thăng trầm của lịch sử, bao biến động của thời tiết, khí hậu, môi trường, Linh Chi vẫn trường tồn và thể hiện giá trị "siêu dược liệu" trên cả nhân sâm (*Panax ginseng*) (Đỗ Tất Lợi et al, 1994). Trong số các tên gọi: Bất lão thảo, Vạn niên nhung, Thần tiên thảo, Chi linh, Mộc Linh Chi, Hồ nữ Linh chi, Đoạn thảo, nấm Lim,... tên gọi Linh Chi có lẽ tiêu biểu và mang tính lịch sử cần thống nhất sử dụng hơn cả. Đó là bắt nguồn từ tên phiên âm tiếng Trung Quốc: Lingzhi, hay theo tiếng Nhật: Reishi hoặc Mannentake. Ở các nước Đông Á, nhất là Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan,... việc nghiên cứu, phát triển và sử dụng Linh Chi đang được công nghiệp hóa với quy mô rộng lớn, cả về phân loại học, thu hái tự nhiên, nuôi trồng chủ động, chế biến và bảo chế được phẩm, đồng thời nghiên cứu hóa dược các hoạt chất, tác dụng dược lý và phương cách điều trị lâm sàng. Tại thị trường Nhật Bản, giá bán có lẽ là cao nhất: 200 - 350USD/kg thể quả khô sơ chế. Trong khi đó ở Việt Nam giá bán biến động rất lớn: 20.000 - 200.000đ/kg thể quả khô, giá xuất khẩu tại Thành phố Hồ Chí Minh chỉ đạt 15 - 20USD/kg. Trung Quốc hiện đang trở thành trung tâm sản xuất Linh Chi lớn nhất thế giới với các sản phẩm bán khắp các nước, trong đó Lục bảo Linh Chi của Tử Xuyên được DOMESCO (Công ty Xuất nhập khẩu Y tế Đồng Tháp) đưa vào độc quyền thương mại trên toàn cõi Việt Nam. Thật đáng phải suy nghĩ khi mà các loài thuộc Lục bảo Linh Chi hoang dại, ở nước ta từ bao đời nay vẫn còn là hoang dại, và đang ngày càng bị xói mòn nguồn gen quý hiếm, trong tình trạng suy thoái môi trường hiện nay.

Hội nghị Năm học thế giới 7/1994 tại Vancouver (Canada) đã dành riêng một Hội thảo về Linh Chi, kết quả đã đi đến quyết định thành lập Viện Nghiên cứu Linh chi Quốc tế, đặt trụ sở tại New York (Hoa Kỳ). Do vậy, vào tháng 10 - 1994 Hội nghị Quốc tế đầu tiên về nấm Linh Chi đã được tổ chức tại Bắc Kinh, Trung Quốc. Sau đó, vào trung tuần tháng 8 - 1996, Hội nghị Quốc tế nghiên cứu Linh Chi được tổ chức tại Trung tâm Hội nghị Quốc tế Đài Bắc, Đài Loan. Nếu tính đến Hội nghị Quốc tế về nấm Linh chi tại Tokyo, 11/1997 và công trình tổng quan của Jong và Birmingham (1992), thì thống kê chưa đầy đủ cho con số trên 250 công trình khảo cứu hóa dược lý các loài nấm Linh Chi.

Họ Linh Chi *Ganodermataceae* Donk còn là một điển hình về tính đa dạng sinh học, hiện có đến 250 loài trên thế giới. Việt Nam với vị trí địa lý tự nhiên nằm trong vùng trung tâm phân bố của họ *Ganodermataceae* Donk, song kể từ những nghiên cứu của Patouillard, N. 100 năm về trước, việc nghiên cứu Hệ Nấm Việt Nam nói chung và Linh Chi nói riêng mới chỉ được tiến hành sơ bộ về hệ thống học, kỹ thuật nuôi trồng. Lâm đồng - Dalat đã được ghi nhận có tới hơn 20 loài nấm Linh chi (Lê Xuân Thám, 1996a, 1999) - có thể nói cho đến nay là phong phú hơn bất kỳ một địa phương nào khác ở Việt nam. Tuy nhiên những nghiên cứu về nấm Linh chi Dalat - Lâm đồng mới chỉ dừng ở mức vận dụng các kỹ thuật hạt nhân kết hợp trong sinh học nấm Linh chi (Lê Xuân Thám, 1998). So với quy mô và nhịp độ chung của thế giới cũng như khu vực, còn cần phải cố gắng rất nhiều.

Để góp một phần nhỏ trong những cố gắng đó, chúng tôi đã tiến hành Đề tài: "Ứng dụng qui trình nuôi trồng sản xuất nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* phục vụ phát triển nguồn dược liệu quý Tỉnh Lâm đồng".

Tiến hành Đề tài này chúng tôi đã nhận được sự hỗ trợ tận tình của Sở Khoa học Công nghệ Môi trường Tỉnh Lâm đồng, nhân dịp này chúng tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới các cán bộ của Quĩ Sở, đặc biệt tới PGs. Ts. Phạm Bá Phong về những chỉ dẫn hết sức chu đáo.

Các nước vùng Đông Nam Á gần đây cũng bắt đầu công nghệ Linh chi. Malaysia chú trọng cải tiến các quy trình trồng Linh chi ngắn ngày trên các phế thải giàu chất xơ, thậm chí cho thu hoạch thể quả sau 40 ngày (Teow et al., 1994), mới đây họ cũng thành công trong nuôi trồng loài *G. boninense* thường mọc trên cây cọ dầu (*Eleais guineensis*). Ở Thái Lan đã có một số trang trại cỡ vừa nuôi trồng *G. lucidum* và *G. capense* (Linh chi sò). Linh chi cũng được nghiên cứu nuôi trồng từ 1929 ở Ấn Độ (Bose, 1929) và phát triển ở qui mô nhỏ, vì rằng người ta vẫn có quan niệm cho là nấm Linh Chi chỉ là nấm phá gỗ mạnh (Bakshi et al., 1976).

Gần đây, do giá trị dược liệu cao của các nấm Linh chi đã được xác định trên các thực nghiệm khoa học, qui mô nuôi trồng công nghiệp bắt đầu xuất hiện ở Hoa Kỳ (Allice Chen et al, 1996), và việc thành lập Viện Nghiên cứu Linh chi Quốc tế ở New York là một bước tiến quan trọng. Đáng chú ý là Adaskaveg và Gilbertson (1986), Nobles ở Canada (1948) nghiên cứu nuôi trồng Linh Chi *G. lucidum* và nhiều loài khác và nhằm đánh giá đặc tính phá gỗ phân hủy cellulose và vận dụng vào định loại các nhóm loài, đặc biệt là nhóm (group, complex) *G. lucidum*.

Ở Việt Nam, Hải Thượng Lãn Ông Lê Hữu Trác đã nói về Linh chi từ lâu và Lê Quý Đôn đã chỉ rõ đó là "nguồn sản vật quý hiếm của đất rừng Đại nam". Song gần đây, loài chuẩn *G. lucidum* mới được nuôi trồng thành công trong phòng thí nghiệm (1978) và vào thập niên 90, Linh chi mới "bùng nổ" ở TP. Hồ Chí Minh (Đỗ Tất Lợi et al, 1994), sản lượng hàng năm mới đạt khoảng 10 tấn (Cổ Đức Trọng, 1991, 1993). Năm 1994 Phạm Quang Thu đã đưa nấm Lim - một chủng Linh Chi đỏ đặc sắc của các vùng rừng Lim Bắc Việt Nam vào nuôi trồng chủ động. Chúng tôi đã sưu tầm và nuôi trồng thành công 11 chủng loài Linh chi thuộc 3 chi: *Ganoderma*, *Amauroderma* và *Humphreya* (Lê Xuân Thám 1995, 1996). Các kết quả phân tích hoạt chất và tác dụng dược lý Linh Chi Việt Nam là rất có triển vọng.

1.2. Thành phần hóa dược cơ bản của nấm linh chi:

Số lượng các chủng loài nấm Linh Chi được sử dụng trong công nghệ dược liệu, dược phẩm ngày càng tăng và đó cũng là bí quyết của các quốc gia Á Đông. Khái niệm Lục bảo Linh từ thời Lý Thời Trân cách nay 400 năm (1595) có lẽ phải bao hàm hàng chục loài khác nhau. Cho nên, không phải ngẫu nhiên mà ở Trung Quốc có khá nhiều cơ sở tầm cỡ nghiên cứu và sản xuất Linh Chi (đặc biệt là ở Phúc Kiến và Tứ Xuyên).

Các nước Châu Á dẫn đầu về nghiên cứu hóa dược, nuôi trồng và bào chế các loại Linh Chi. Thực tế một số tác giả đã quan tâm phân tích thành phần cấu tạo lớp vỏ láng ở các loài *Ganoderma* và *Amauroderma* vào thập niên 20, phát hiện các ergosterol và các enzyme phenoloxydase, peroxydase,... ở *G. lucidum* (dẫn theo tài liệu Trung Quốc, 1976). Gần đây mới có lẽ tể các khảo cứu về tác dụng gây dị ứng và bệnh đường hô hấp bởi bào tử một số loài *Ganoderma* ở Auckland (New Zealand) (Hasnain, S.M., et al., 1985), đặc biệt bởi các thành tố chiết từ *G. applanatum*, *G. lucidum* và *G. meredithiae* ở New Orleans (Hoa Kỳ) (Homer, W.E., et al., 1993).

Vào thập niên 70 - 80, bắt đầu một trào lưu khảo cứu hóa dược học các nấm Linh Chi. Chủ yếu ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan và Việt Nam. Gần đây một số phòng thí nghiệm ở Hoa Kỳ và vùng Đông Nam Á cũng bắt đầu tham gia vào tiến trình này.

Với các phương pháp cổ điển trước đây người ta đã phân tích các thành phần hóa dược tổng quát của Linh Chi, cho thấy sơ bộ như sau:

Nước	:	12 - 13%
<i>(trong cao mềm của Việt Nam thì tới 22,32%)</i>		
Cellulose	:	54 - 56%
Lignin	:	13 - 14%
Hợp chất nitơ	:	1,6 - 2,1%
Chất béo (kể cả dạng xà phòng hóa)	:	1,9 - 2%

Bảng 1. Thành phần hoạt chất cơ bản ở nấm Linh Chi^(*)

Hoạt chất	Nhóm	Hoạt tính dược lý
Cyclooctasulfur		ức chế giải phóng histamine
Adenosine dẫn xuất	Nucleotide	ức chế kết dính tiểu cầu, thư giãn cơ, giảm đau
Lingzhi - 8	Proteine	Chống dị ứng phổ rộng, điều hòa miễn dịch
***	Alcaloide	Trợ tim
Ganodosterone	Steroid	Giải độc gan
Lanosporeric acid A	Steroid	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
Lanosterol	Steroid	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
II,III,IV,V	Steroid	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
Ganoderans A,B,C	Polysaccharide	Hạ đường huyết
Beta - D - Glucan	Polysacc.	Chống ung thư, tăng tính miễn dịch
BN - 3B: 1,2 ,3	Polysacc.	
D - 6	Polysacc.	Tăng tổng hợp protein, tăng chuyển hóa acid nucleic
***	Polysacc.	Trợ tim
Ganoderic acid R,S	Triterpenoide	ức chế giải phóng histamine
Ganoderic acid B,D,F,H,K,Y	Triterpen.	Hạ huyết áp, ức chế ACE
Ganoderic acid	Triterpen.	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
Ganodermediol	Triterpen.	Hạ huyết áp, ức chế ACE
Ganodermic acid M, F	Triterpen.	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
Ganodermic acid T, O	Triterpen.	ức chế sinh tổng hợp Cholesterol
Lucidone A	Triterpen.	Bảo vệ gan
Lucidenol	Triterpen.	Bảo vệ gan
Ganosporelacton A	Triterpen.	Chống khối u
Ganosporelacton B	Triterpen.	Chống khối u
Oleic acid dẫn xuất	Acid béo	ức chế giải phóng histamine

Riêng nhóm nucleoside, nổi bật trong *Ganoderma lucidum* và *G. capense* có các dẫn xuất của adenosine với tác dụng thư giãn cơ, giảm đau và ức chế sự dính kết tiểu cầu.

^(*) Xin xem thêm phụ lục cấu trúc các hoạt chất cơ bản của nấm Linh chi

ganoine:

N - isopentyl - 5 hydroxymethyl - pyrrol aldehyde

ganodine:

N - phenylethyl - 5 - hydroxymethyl - pyrrol aldehyde

ganoderpurine:

N9 - (alpha, alpha dimethyl - gamma - oxybutyl) adenine.

Từ đó đã tổng hợp các alcaloid tương tự các mẫu tự nhiên có hiệu quả chống viêm (1A và 1B):

1A: 1 - isopentyl 1 - 2 - formyl 5 - hydroxymethylpyrrole

1B: 1 - phenylethyl 1 - 2 formyl - 5 - hydroxymethylpyrrole

Có lẽ đa dạng nhất và tác dụng được lý mạnh là nhóm saponine - triterpenoids - các acid ganoderic. Lần đầu tiên Nishitoba et al (1984 - 1987) chứng minh các ganoderic acid C là mới trong tự nhiên, sau đó Morigiwa et al. 1986, tìm ra thêm ganoderic acid B. Chúng thể hiện hoạt lực ức chế giải phóng histamine, ức chế Angiotensine Conversion enzyme (ACE), ức chế sinh tổng hợp Cholesterol và hạ huyết áp. Ngày nay nhóm ganoderic acids đã được phát hiện có tới hàng chục dẫn xuất khác nhau. Kết quả tách trên sắc ký lỏng cao áp (HPLC) loài Linh chi *G. tsugae* Murrill rất đặc sắc.

Rõ ràng có sự tương đồng lớn với *G. lucidum*. Ngoài lucideric acid (lucidone) do Kohda et al (1985) tìm ra, còn có dẫn xuất lucidenol được Su, C.H. et al (1993) chứng minh là mới hoàn toàn. Cấu trúc phân tử của 4 hoạt chất chính được các kỹ thuật quang phổ và cộng hưởng từ hạt nhân xác định (Su et al, 1993).

Các hoạt chất này đều có tác dụng bảo vệ gan, thực nghiệm đặc sắc thu được với gây tăng GOT và GPT bằng CCl₄ (tetrachlorurcarbon). Điều lý thú là từng triterpenoid tinh khiết riêng rẽ thể hiện hoạt lực thấp hơn khi dùng các phân đoạn tách chưa tinh chế, nghĩa là tổ hợp các đồng phân của chúng hiệu quả hơn. Do vậy dễ hiểu người ta thường dùng dịch chiết toàn bộ từ nấm Linh chi.

1.3. Tác dụng trị liệu cơ bản của các nấm Linh chi:

Linh chi được dùng như một thượng dược từ khoảng 4000 năm nay ở Trung Quốc. Chưa thấy có tư liệu về tác dụng xấu, độc tính của Linh chi (ngoại trừ các khảo cứu về khả năng tổn tại các dị ứng nguyên trên bề mặt bào tử một số loài *Ganoderma* - điều rất phổ biến trong nấm). Cách đây 400 năm, nhà y - dược nổi tiếng của Trung Quốc Lý Thời Trân đã phân ra các nhóm Linh chi chính và khái quát tác dụng trị liệu của chúng (Bảng 2).

Đến 1988, tại Nhật Bản đã có tới 300 bệnh nhân bị nhược cơ được điều trị thành công bằng Linh Chi, theo biện pháp điều trị bệnh sinh trên nguyên tắc điều hòa miễn dịch. Đáng chú ý là không nảy sinh một tác dụng phụ nào (side - effects).

Bệnh gan và tiết niệu cũng được điều trị khả quan bằng chế phẩm từ Linh Chi. Bệnh viện ở Sơn Đông - Trung Quốc dùng một loại "Xúp" Linh Chi để giải độc và bổ gan có kết quả tốt (> 90%) cho 70.000 ca, trong đó có 879 ca đang được điều trị liệu chuyên biệt (Lui Xing ja, 1994). Tác giả còn cho rằng các nấm Linh Chi bóng (Glossy *Ganoderma*) đều tác dụng tốt trên tiết niệu, điều hòa rối loạn tuần hoàn não, tránh các cơn kịch phát nghẽn mạch và làm dịu thần kinh. Với thành công trên 319 bệnh nhân và các kết quả nghiên cứu tác giả đã được tặng thưởng huân chương hạng hai.

Hiệu quả kim hãm quá trình kết tụ tiểu cầu bởi chất chiết của *G. lucidum* được chứng minh rõ ràng *InVivo* bởi nhiều công trình công phu, đến năm 1990 lại được Tao, J. và Feng K. khẳng định. Họ cũng chứng minh *InVivo* với 15 người tình nguyện khỏe mạnh và với 33 bệnh nhân bị xơ cứng động mạch, trong đó hiệu quả chống nghẽn mạch cũng tỏ ra khả quan.

gần 3.000 ppm, trong thể quả nuôi trồng trên gỗ khúc cũng đạt tới trên 100 ppm. Hiện nay, chỉ số Ge trong các dược phẩm từ Linh Chi được coi như một chỉ tiêu quan trọng, có giá trị trong điều trị bệnh tim mạch và giảm đau trong điều trị ung thư (Chen Ti Qian, 1994,....).

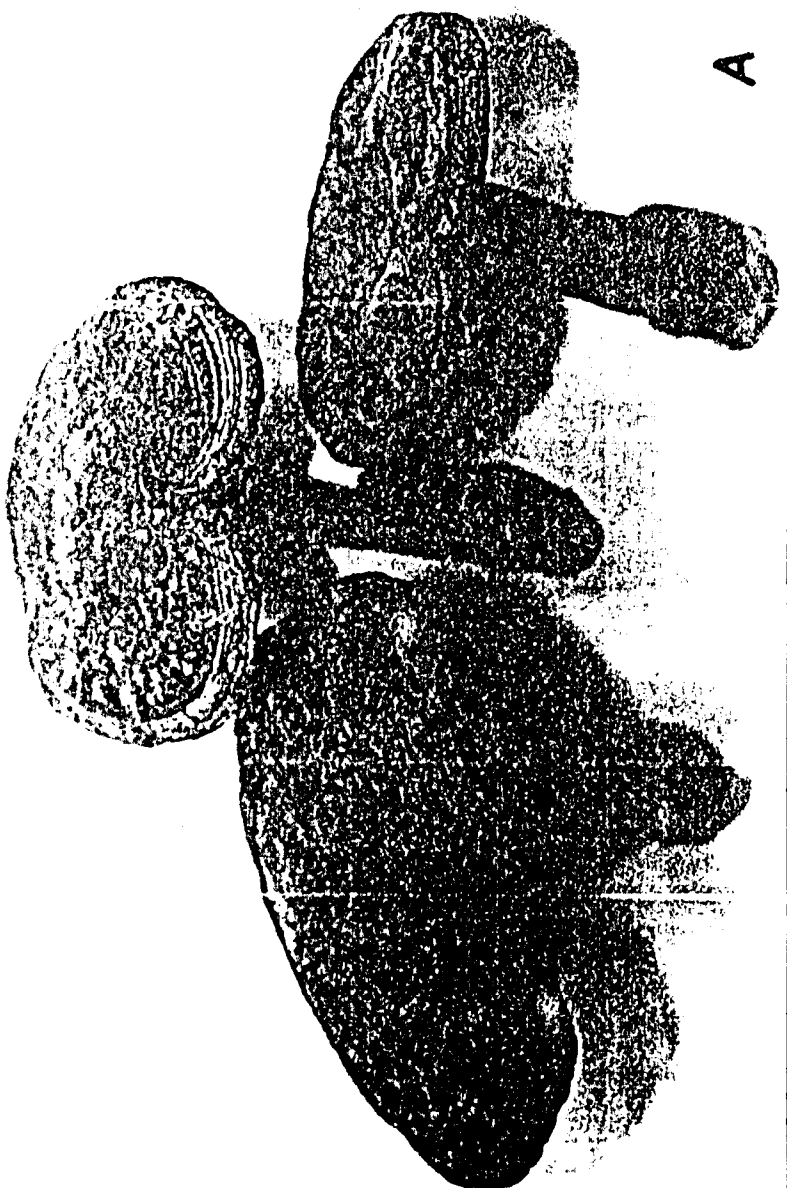
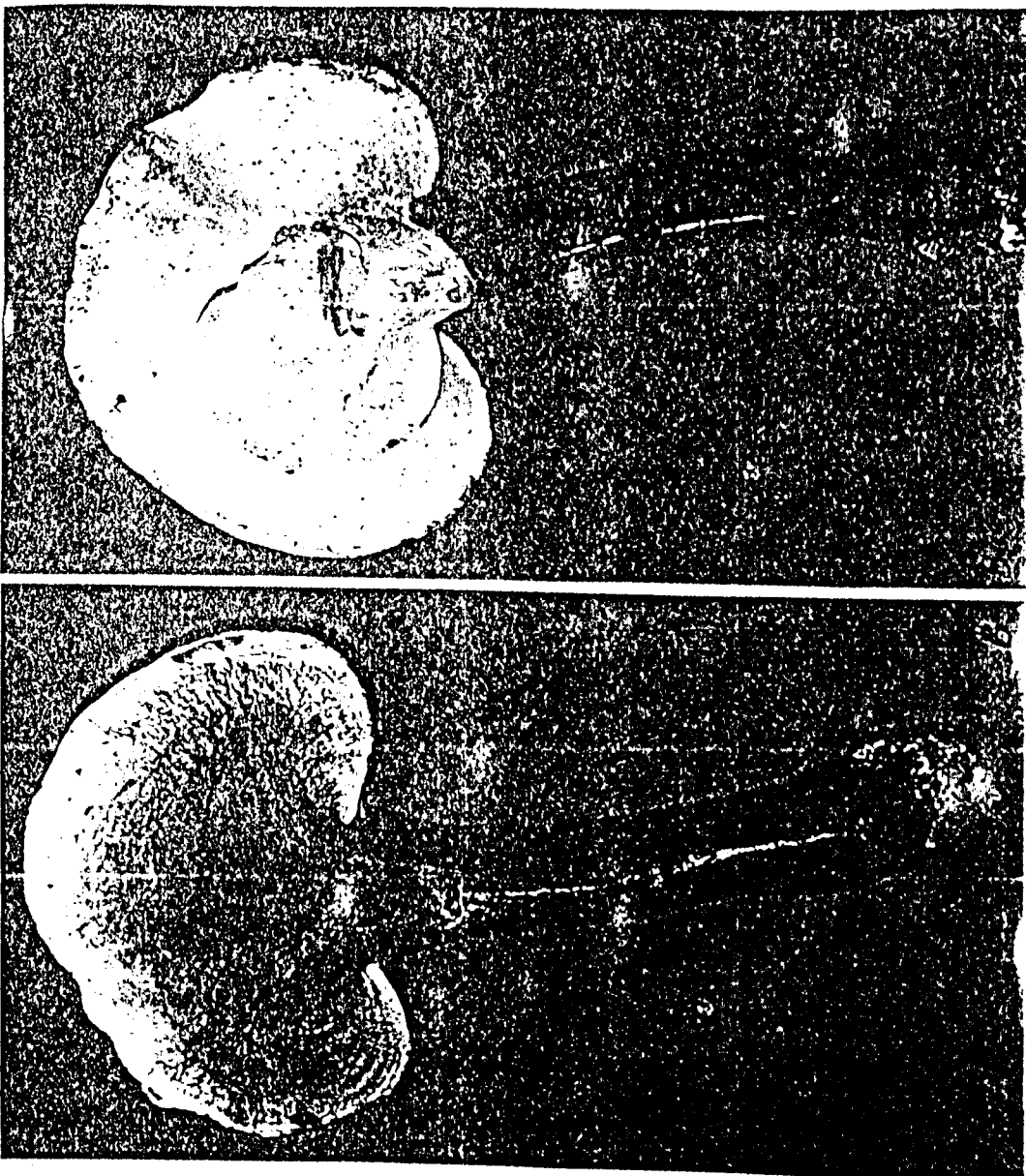
Hiệu quả chống ung thư của các nấm Linh chi đã được chứng minh từ lâu. Trên các bệnh nhân ung thư phổi, ung thư vú và ung thư dạ dày, các phương pháp xạ trị, hóa trị và giải phẫu được kết hợp với trị liệu nấm. Kết quả là thời gian sống được kéo dài, tỷ lệ người sống trên 5 năm cao hơn nhóm không dùng nấm. Tại Trung tâm điều trị ung thư ở Tokyo, phương pháp trị liệu Linh chi kết hợp xạ trị cho kết quả tốt với các bệnh nhân ung thư cổ tử cung. Đối với loại ung thư này, nhiều thông tin ở Đài Loan cho biết nếu dùng Linh chi trồng trên gỗ long não cho kết quả rất tốt - khối u tiêu biến hoàn toàn. Các tế bào Sarcome 180 bị ức chế mạnh khi xử lý bởi phức polysaccharide không tan trong nước. Hiệu lực cũng thể hiện rõ với các tế bào ung thư khoang miệng (Chen, TW., et al, 1991), và ung thư gan (Hau et al, 1996) đặc biệt khi kết hợp với taxol từ cây thông đỏ.

Công trình của Gs. Zhibin Lin et al. (1994) về tác dụng chống ung thư của các chế phẩm từ Linh chi chứng tỏ phổ tác dụng rộng. Nguyên lý hiệu dụng là tăng khôi phục hệ miễn dịch, nhờ đó các phác đồ trị liệu: xạ trị, giải phẫu, hóa trị đạt hiệu quả cao hơn. Không phải ngẫu nhiên mà doanh số hàng năm của các chế phẩm chống ung thư từ nấm dược liệu nói chung và Linh chi nói riêng đạt trên 350 triệu USD, cao hơn các biệt dược khác nhiều, kể cả so với Interferon, Tamoxifen, tại thị trường Nhật Bản (1991).

Về khả năng antioxydant (chống oxy hóa) của nấm Linh chi, nhiều thực nghiệm chỉ ra vai trò của các saponin - triterpenoids, mà trong đó Ganoderic acids được coi là hiệu quả cao nhất. Ngay từ thập niên 80, ở Trung Quốc đã chứng minh khả năng khử gốc tự do hydroxyl của *G. lucidum* (Wang, C.H., et al, 1985). Hiệu lực tương tự ở nấm Lim Việt Nam (*G. lucidum*) gần đây được chỉ ra khá cao. Hầu hết các nhà nghiên cứu đều liên hệ khả năng khử gốc tự do của các loài *Ganoderma* với tính đặc tính antioxydant và chống lão hóa. ở đây, Linh chi được xếp vào nhóm cây thuốc tăng tuổi thọ, trẻ hóa như: hà thủ ô, ngân nhĩ, phục linh, nhân sâm...(Chen, K. và Li, C., 1993, Xiao, P.G., et al., 1993,...). Và cũng trên cơ sở này, chúng tôi đã làm giàu Se - một nguyên tố khoáng có hoạt tính antioxydant rất mạnh - vào nấm Linh chi. Công nghệ này đang được hoàn tất, vấn đề còn lại là chứng minh sự tham gia của Se vào các phức hệ hoạt chất dược tính và khả năng trị liệu lâm sàng của nấm Linh chi giàu Se, nhất là khi dùng phối hợp với tocoferol (Vitamin E). Có thể chờ đợi một dược phẩm tăng tuổi thọ từ nấm Linh chi nói chung, và Linh chi Việt Nam nói riêng?

Đặc tính dược lý trị liệu của nấm Linh Chi gần đây được mở rộng thêm. Những thương tổn các hệ bạch cầu chuột chiếu xạ bởi $\gamma^{137}\text{Cs}$ liều 400rad được giảm thiểu khi cho uống chế phẩm Linh Chi ở Đài Loan (Chen et al, 1996). Chúng tôi đã thí nghiệm chiếu xạ chuột từ 600rad - 900rad trên nguồn $\gamma^{60}\text{Co}$, song không thấy có hiệu quả nào của Linh Chi, (Hợp đồng Nghiên cứu với Xí nghiệp dược TƯ 24, 1992). Tuy nhiên khi khảo sát vấn đề nhiễm xạ trong ở chuột với ^{134}Cs , chúng tôi chứng minh cao Nấm Linh Chi cho uống từ 30 phút đến 6 giờ sau nhiễm xạ có thể làm tăng quá trình thải xạ (Nguyễn Gia Chấn, Đàm Nhận, Lê Xuân Thám, 1993). Koval (1972), Stalther (1972), Ilyn (1978) cũng báo cáo các kết quả tương tự trên nhiều động vật khác với hàng trăm loại thuốc.

Trong tình hình nhiễm HIV ngày càng gia tăng ở nước ta (thống kê hiện nay tới trên 16.000 người), Linh chi có thể được đưa vào các phác đồ điều trị tạm thời, nhằm nâng đỡ thể trạng miễn dịch cho bệnh nhân, trong tình trạng AZT, DDI và DDC còn hiếm và rất đắt (chưa kể tác dụng phụ rất nặng). Không phải ngẫu nhiên mà cơ quan FDA (Hoa Kỳ) chấp thuận cho thử nghiệm lâm sàng phương pháp dùng trị liệu Linh chi trong điều trị AIDS, mà thực tế xuất phát từ các khảo cứu nghiêm túc ở Đài Loan (Gau, J.P., et al., 1990), Kim et al. (1996). Ở Trung Quốc đã kiểm tra hiệu quả đối kháng của chế phẩm từ Linh chi (chủ yếu Polysaccharide - protein) với morphine trên các đại thực bào, trên hoạt tính hệ Interleukine 1 và 2 các tế bào T,... Nhờ đó tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể nói chung (Lu



A

PHẦN THỨ HAI

MẪU VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ CHUYỂN GIAO CÔNG NGHỆ

1. Thu hái mẫu vật

Mẫu vật được thu thập từ vùng rừng hỗn loại cao nguyên Langbian, Lâm đồng, huyện Đức Trọng và trung tâm Tp. Dalat, nam Việt nam. Chúng của Nhật bản được tìm thấy ở vùng rừng thưa Gunma, tại Viện Nghiên cứu hóa phóng xạ Takasaki, Nhật bản.

2. Phương pháp

- Phân tích giám định mẫu theo Steyaert (1972), Zhao (1989) so sánh với nhiều tư liệu khác (Mims and Seabury, 1989). Chụp ảnh bào tử nấm trên kính hiển vi quang học với vật kính đầu (x100), kính hiển vi điện tử quét và kính hiển vi điện tử truyền qua tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Hà nội.

- Tách phân lập giống nguyên chủng và thử nghiệm tương hợp hệ sợi trên môi trường PGA. Thử nghiệm nuôi trồng trên các giá thể tổng hợp theo các qui trình do chúng tôi cải tiến từ các phương thức của các tác giả Nhật bản (Lê Xuân Thám, 1998).

- Chất lượng hoạt chất cơ bản nấm Linh chi Dalat được xác định nhờ sự giúp đỡ của các chuyên gia nước ngoài. Tiến hành xác định hoạt chất và tách triterpenoids trên hệ sắc ký lỏng cao áp HPLC, so sánh với kết quả ở loài Tử chi *Ganoderma tsugae* Murr. của Đài Loan với sự trợ giúp kỹ thuật của Dr. Chen Dang-Hai, Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu & Phát triển, thuộc Tập đoàn Yungkien sản xuất và chế biến Linh chi lớn nhất Đài loan.

3. Chuyển giao phổ biến kỹ thuật-công nghệ

Tiến hành lập Đề cương nghiên cứu chi tiết bao gồm các bước công việc sau:

- Xây dựng qui trình nuôi trồng qui mô trang trại.
- Kiểm tra chu trình sinh trưởng phát triển của nấm Linh chi tại phòng thí nghiệm.
- Chuyển giao và tập huấn qui trình nuôi trồng nấm cho người trồng nấm.
- Tiến hành xây dựng và củng cố các cơ sở trang trại thử nghiệm trồng nấm.
- Tiến hành nhân giống và sản xuất giống cung cấp đại trà.
- Tiến hành thử nghiệm giai đoạn đầu.
- Trồng thử ở trang trại chọn lọc.
- Theo dõi thu kết quả, đánh giá sản phẩm thu hoạch.
- So sánh đánh giá với các cơ sở nuôi trồng khác.
- Lập luận chứng Kinh tế - Kỹ thuật cho phép triển khai công nghệ nấm Linh chi ở Dalat - Lâm đồng với hiệu quả kinh tế đáng kể: dựa trên những cơ sở tư liệu triển khai và kiểm chứng trong phòng thí nghiệm.

Chuyển giao từng bước các kỹ thuật và qui trình công nghệ, giải thích và tập huấn từng khâu theo yêu cầu của người trồng nấm.

Công thức 5:

Mùn cưa cao su: 100 kg

Tổng cộng: 100 kg

1.2. Phân bón phối trộn:

- Supper lân khoảng 1%
- Vôi bột khoảng 1,5-2%
- Đạm Urea hoặc SA 0,3-0,5%
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: nếu có điều kiện bổ sung thêm khoảng 0.05%. Tuy nhiên thường là các hộ dân không lưu ý áp dụng.

Như vậy, theo những qui trình trồng nấm thông dụng, sẽ bón bổ sung cho 100 kg cơ chất đã trộn (gọi là cơ chất nền) theo tỷ lệ sau:

Super lân: 1.0 kg

Vôi bột: 1.5-2.0 kg

Đạm Urea: 0.3 kg hoặc SA: 0.5 kg

1.3. Dưỡng chất phối trộn

- Cám gạo khoảng 15%
- Bột bánh dầu khoảng 5%

Bón bổ sung cho 100 kg cơ chất đã trộn theo tỷ lệ sau:

Cám gạo: 10 kg

Bột bánh dầu: 5 kg

Trộn thật đều các nguyên liệu, thêm nước từ từ và đảo kỹ. Nên ủ 100 kg nguyên liệu nền với nước vôi trước 1 đêm thì tốt hơn.

Sau khi trộn thật đều, nắm một vốc hỗn hợp cơ chất bóp chặt trong lòng bàn tay rồi buông ra, nếu hỗn hợp cơ chất giữ nguyên khối cục không vỡ là đạt (hoặc khi bóp chặt có nước rịn ra theo các kẽ ngón tay). Như thế thường độ ẩm cơ chất sẽ đạt khoảng 60-65% - phù hợp cho tơ nấm phát triển trong thời gian ủ.

1.4. Xây dựng lò hấp nguyên liệu đơn giản

Hiện tại có nhiều loại lò hấp hơi nước thông dụng không áp lực, theo khuyến cáo của chúng tôi nên xét, học tập kiểu lò hấp trồng nấm mèo, đun than hoặc củi.

1.5. Xây dựng xưởng phối trộn nguyên liệu

Đây là kho chứa nguyên liệu và đóng bịch : diện tích chỉ cần 40 m² . Nếu có điều kiện thì nên để tách biệt. Nếu có phòng lớn, có thể ngăn ra thành kho và xưởng đóng bịch riêng.

1.6. Buồng cấy meo giống

Nếu đầu tư được tủ cấy vô trùng thì tốt nhất, song không nhất thiết. Chỉ cần làm một buồng nhỏ, cần sạch và khử trùng sơ bộ bằng formol, lau cồn trước khi cấy meo giống, dùng đèn tử ngoại (2-4 bộ), diện tích độ 10-20 m²

1.7. Làm nhà nấm

Tùy quy mô 50m²-200m², dùng bộ khung gỗ, tranh tre, lưới, hoặc tốt nhất là dùng nhà khung sắt... trung bình 100m². Hệ thống gió che tối, tăng sáng tuần tự (bọc lưới chống côn trùng, chuột,... che ánh sáng) và hệ thống tưới phun được thiết kế lắp đặt khá hợp lý ở trại nhà anh Thường, Phường 8 Tp. Dalat.

Lưu ý rằng nên để mái nylon trong (xanh), như vậy ánh sáng sẽ tỏa đều từ trên xuống, tại nấm sẽ ra tròn đều, cuống không bị kéo dài. Tường vách bao quanh nên bọc nylon tối màu và bên trong buồng cần bọc lưới chống côn trùng (ruồi muỗi, sâu bọ,... rất thích chích hút nấm non).

2. Kết quả nuôi trồng triển khai qui mô nhỏ ở Dalat - Lâm đồng

Sau khi đã chuyển giao công nghệ, giúp 03 hộ dân ở Dalat và Đức Trọng thiết lập 03 trại nuôi trồng Linh chi qui mô nhỏ: 40-120 m², chúng tôi đã cung cấp giống nấm, chỉ đạo kỹ thuật, tiến hành nuôi trồng từ 7/1999. Cho đến nay thu hoạch tổng cộng được > 50 kg nấm Linh chi gồm 2 dạng:

- dạng nấm sừng hươu: thường chỉ gồm các bó cộng nấm khá dài (22-38 cm), phân nhánh ít nhiều, láng bóng, rất giống kiểu Linh chi sừng hươu nuôi trồng ở Nhật bản.
- dạng thể quả hoàn chỉnh: thể hiện cấu trúc cuống điển hình, láng bóng và tán nấm xòe tròn khá đều, đường kính lớn tới > 10 cm. Hình thái kiểu chuẩn Dalat, tương đối khác biệt so với nấm Linh chi Sài gòn (Lê Duy Thắng, 1998; Cổ Đức Trọng, 1999). Đáng lưu ý là khá giống chủng nấm Linh chi Đài loan (Ruye Sheng Hseu, 1992).

Nhìn chung nấm thu hoạch đạt tiêu chuẩn cảm quan hình thái, chất lượng hoạt chất cơ bản vào loại khá, theo kết quả phân tích của Công ty Yungkien, Đài loan (Công ty nuôi trồng chế biến nấm Linh chi lớn nhất Đài loan).

2.1. Tạo giống nấm thuần chủng. Đánh giá đặc điểm sinh trưởng phát triển của hệ sợi nấm Linh chi nuôi trồng:

Thông thường với thể quả nấm tươi (mới thu hái giữ được tới 1 vài tuần, nếu bảo quản trong tủ lạnh có thể giữ được hàng tháng), dùng dao, lưỡi lam tách gọt phần mô bên ngoài (gọt độ 2-3 lần với việc thay lưỡi lam vô trùng mới), như vậy lộ ra lớp mô vô trùng bên trong, sẵn sàng cho tách giống. Có thể cắt thành các mảnh nhỏ 4-10mm². Cấy lên môi trường, ủ trong tối, khoảng 25°C (tốt nhất là 26°±2°C). Tùy theo độ non và sức sống của mô, mà hệ sợi mọc sau 15- 65 giờ ủ.

Các chủng thường có tốc độ phát triển hệ sợi khác nhau, tạo thành các khuẩn lạc hình tròn, màu trắng. Thường hệ sợi sinh trưởng nhanh trong khoảng 7-15 ngày. Kết quả chứng tỏ chủng Takasaki, Nhật bản mọc chậm hơn cả (80-90 μm/h), chủng Đức Trọng (DT) mọc nhanh nhất (160-190 μm/h), chủng Dalat (DL) mọc chậm hơn đôi chút (140-160 μm/h). Đáng lưu ý là ở chủng Takasaki (J) hệ sợi rất dày đặc (phân nhánh mạnh), cho nên tốc độ lan vào cơ chất chậm hơn ít nhiều (Ảnh1, Bảng 1). Nên cất giữ giống cỡ 9-12 ngày tuổi trong tủ lạnh (7°- 9°C) để làm giống gốc.



Ảnh 1. Hệ sợi các chủng nấm Linh chi phát triển trên cơ chất hỗn hợp

trại hầu hết các nguồn mùn cưa, bã mía, vỏ quả cà phê đều được tận thu sử dụng. Hầu hết bà con để áp dụng đúng các qui trình phối trộn cơ chất do chúng tôi hướng dẫn.

Vào giai đoạn sợi, trên giá thể tổng hợp, cả 2 chủng: DL, DT đều sinh trưởng mạnh, chưa thể hiện sai biệt nào đáng kể, sau khoảng 5-7 ngày chủng DT mọc mạnh hơn hẳn, tốc độ phát triển hệ sợi nhanh hơn 20-30%. Riêng chủng Takasaki mọc chậm hơn hẳn. Trong giai đoạn này, ủ trong buồng tối, nhiệt độ 22°-25°C. Hệ sợi nấm phát triển mạnh, sau 25-30 ngày, lan quá 2/3 khối giá thể, bắt đầu bện kết trên bề mặt vào ngày 21-25. Sau khi hệ sợi bện kết (25 ngày), chuyển các bịch nuôi sang nhà ẩm (bằng tưới phun sương sao cho độ ẩm đạt >80 % - 90%), thiết kế tùy theo điều kiện từng trang trại, trường hợp trại nhà anh Thường là một điển hình, khá đạt về kỹ thuật, bố trí giàn thép thoáng và hợp lý, tận dụng được không gian (Ảnh 2). Nhiệt độ hạ xuống, trung bình đạt 25± 2°C. Trong nhà ẩm có thể xếp các bịch tơ nấm lên giàn kệ gỗ, thép hoặc có thể treo theo kiểu quay ngược lượn tự (Ảnh 3).

Sau vài ngày, mở nút, các mầm nấm xuất hiện dạng các núp tròn, mập, màu trắng. Từ 35-40 ngày, mầm thể quả kéo dài thành các trụ tròn, mập, phần gốc bắt đầu hình thành lớp vỏ láng bóng đỏ - da cam, càng về phía đỉnh càng nhạt màu, phần đỉnh màu trắng, bắt đầu loe dẹt ra. Sau khoảng 45-50 ngày, chủng DL hầu như hoàn thành giai đoạn tạo tán nấm và bắt đầu hình thành bào tử. Lưu ý là trên bịch nuôi, thường chỉ hình thành 2-3 tai nấm cuống rất mập (tới 2,5-4cm đường kính), to tới >12cm, trong khi nuôi trên chai miệng rộng, lại thường tạo ra nhiều tán hơn (3-6 tán), trong đó có 1-2 tán lớn vượt hẳn (mặc dù lượng cơ chất trong chai chỉ đạt 1/2 so với trong bịch PP). Có lẽ bởi điều kiện nhiệt độ nuôi trồng ở Đà Lạt hơi thấp hơn, thích hợp hơn cho chủng Dalat.

Chủng DT ra thể quả chậm hơn sau DL khoảng 5-7 ngày, riêng chủng Takasaki chậm hơn đến 30-35 ngày, song thể quả to hơn. Đáng chú ý là nếu để ánh sáng khuyếch tán từ bên hông nhà nấm cao (che lưới đen không đủ), thể quả nấm thường kéo dài cuống hình thành các nhánh dạng sừng hươu, chiều dài đạt tới 25-35 cm (Ảnh 4). Trên thực tế ở các nước như Nhật bản, Đài loan người ta cũng ưa thích nuôi trồng nấm Linh chi dạng sừng hươu, tuy nhiên nhiên năng suất thường không cao.

Năng suất thể quả tươi thu hoạch ở cả 2 chủng DL và DT là xấp xỉ nhau, đạt từ 15-22% (thể quả tươi so với lượng cơ chất khô), so sánh các đợt dẫn ra trên Bảng 2 (trong các đợt thử nghiệm, chúng tôi chọn công thức cơ chất hỗn hợp 3 cho phù hợp với nguồn nguyên liệu tại chỗ). Sau khi thu hái, nấm được sấy khô (45°± 3°C) từ 36-48 giờ, tỏa mùi thơm đặc biệt. Hiệu suất thu hoạch thể quả tươi/khô đạt khoảng 5-7, tức là khoảng 5-7 kg nấm tươi sẽ cho 1 kg nấm khô.

Bảng 2. Sinh trưởng và khả năng năng suất thể quả chủng DL (Công thức 3)

Đợt	Số thể quả/bịch (mọc đợt đầu)	Tổng trọng lượng tươi thể quả (đợt thu hoạch 1: g)	Năng suất (thể quả khô: g)
1	2-5	106-162 (135)	20-36 (33)
2	2-4	118-183 (166)	35-39 (36)
3	2-4	112-201 (188)	33-42 (39)
Trung bình	3	163	36

nhân chủ yếu là do ở phòng thí nghiệm nhiệt độ khá thấp, hầu như thường xuyên ở mức 22-23°C.

Năng suất ở các trang trại cao hơn 17-22% so với ở phòng thí nghiệm (Bảng 3). Do đó chỉ 20-25 bịch đã cho thu hoạch khoảng 1 kg nấm khô (phơi 3-4 nắng). Tuy nhiên trường hợp trại nhà anh Huy nấm chịu ảnh hưởng ánh sáng khuyếch tán từ một phía nên kéo dài dạng cộng-sừng hươu nhiều, tai nấm nhỏ hơn cả nấm ở phòng thí nghiệm, tuy năng suất thể quả khô tổng cộng vẫn lớn hơn.

Bảng 3. So sánh một số đặc điểm nấm Linh chi (DL) nuôi trồng

Địa điểm	Độ dài cuống nấm (cm)	Đường kính tán (cm)	Năng suất (thể quả khô/bịch: g)
Phòng thí nghiệm	3.5-11.5 (7.3)	7-9 (8.5)	35.5
Trại anh Thường	3.5-7.5 (5.7)	7.5-14.5 (11.5)	56
Trại anh Huy	9.7-17.6 (13.8)	3.3-6.8 (5.2)	48

4. So sánh kết quả ở trang trại vùng Lâm đồng và ở Hà nội, Tp. HCM:

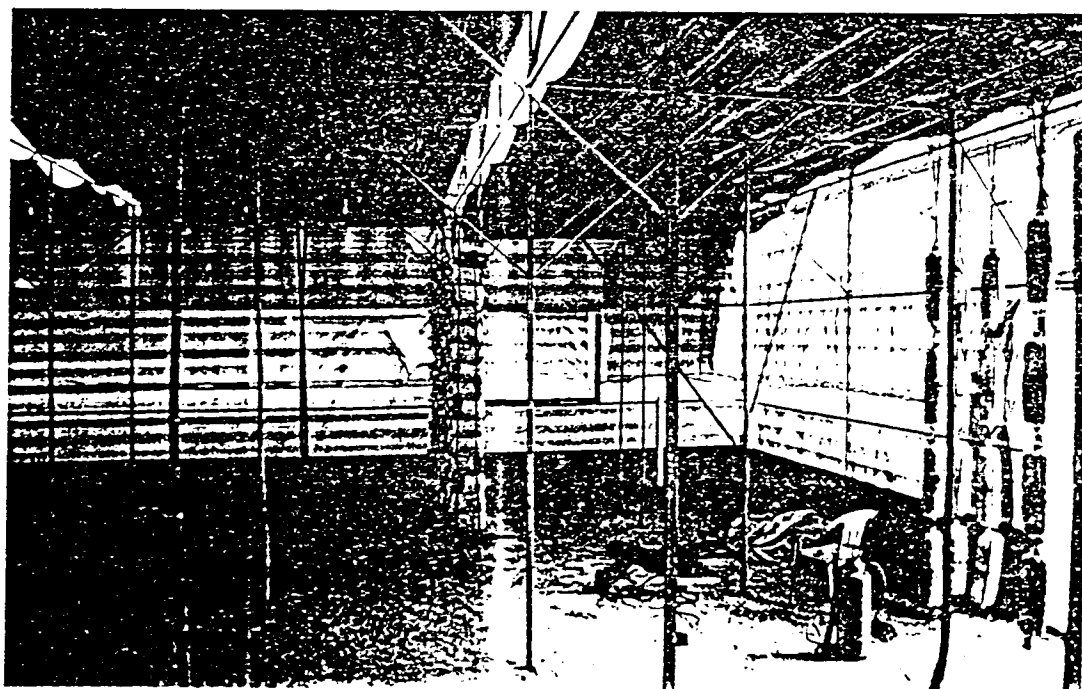
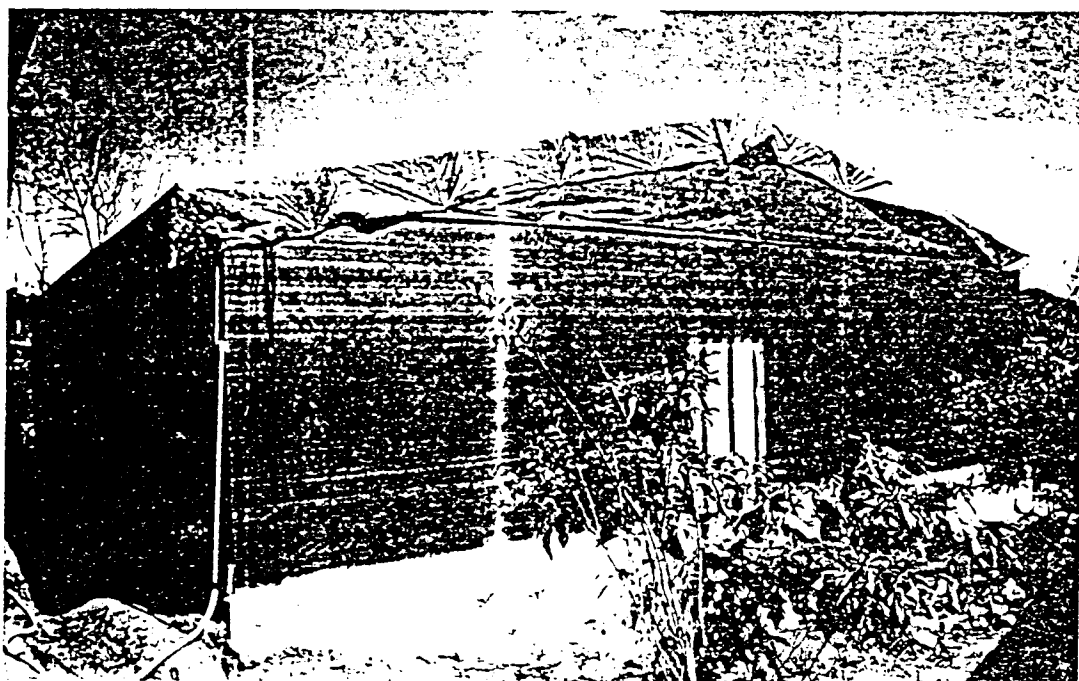
- Năng suất nấm Linh chi nuôi trồng ở Dalat - Lâm đồng cao hơn so với ở Hà nội (theo Nguyễn Thị Chính, 1999: năng suất nấm khô thu hoạch ở Hà nội chỉ vào khoảng 2-3%). Đặc biệt ở Hà nội chỉ nuôi trồng được nấm Lim - Linh chi vào mùa hè - thu, do đó hạn chế khả năng thâm canh tăng vụ. Hiện nay chất lượng nấm ở miền Bắc (Hà nội) chưa được xác định chính xác, do vậy cũng hạn chế thị trường.

- Năng suất nấm Linh chi ở Tp. HCM cao hơn cả, đạt tới 7-10% (thể quả khô/cơ chất khô, theo Lê Duy Thắng, 1998; Cổ Đức Trọng, 1999). Nhược điểm cơ bản của nấm Linh chi Sài gòn là chất thịt nấm thâm nâu, thời gian sinh trưởng khá dài (4-6 tháng/vụ). Chất lượng nấm Linh chi trồng ở Tp. HCM đạt yêu cầu tiêu dùng trong nước (Triterpenoids đạt cỡ 1%).

Hạn chế của nấm Linh chi ở Tp. HCM là do nhiệt độ quá cao về mùa khô, do đó khó nuôi trồng phổ biến cho năng suất cao được.

Như vậy có thể thừa nhận rằng nấm Linh chi Dalat (cả hai chủng DL và DT) có ưu thế đặc biệt, cho phép nuôi trồng trong một khoảng nhiệt độ rộng (20-30°C: Dalat và Đức Trọng) quanh năm. Thêm nữa thời gian sinh trưởng ngắn giúp cho khả năng tăng vụ, quay vòng sản xuất nhanh.

Năng suất tuy vào loại trung bình song chất lượng nấm khá cao cho phép triển khai rộng các chủng Linh chi DL và DT, đáp ứng yêu cầu của địa phương và cả nước trong thời gian tới.



*Ảnh 2: Trại trồng nấm Linh chi xây dựng bằng khung thép, diện tích 108 m²
(trại nhà anh Thuồng, Phường 8, Tp. Dalat)*



*Ảnh 4: Nấm Linh chi phát triển mạnh dạng thể quả sừng hươu trong nhà trống
(ảnh sáng khuếch tán bên hông nhà trống)*

PHẦN THỨ TƯ

Phác thảo luận chứng kinh tế - kỹ thuật Công nghệ nấm Linh chi *G. lucidum* tại Dalat

Từ những kết quả nuôi trồng thử nghiệm tương đối hoàn chỉnh trên đây, chúng tôi tiến hành phân tích, tính toán và phác họa những nét cơ bản cho Luận chứng kinh tế - kỹ thuật nhằm xác định tính khả thi của công nghệ nuôi trồng nấm Linh chi cho các cơ sở. Trước mắt là các trang trại qui mô hộ gia đình.

1. Những chi phí cơ bản về cơ sở vật chất kỹ thuật

1.1. Thiết lập qui mô trang trại nuôi trồng

- Diện tích mặt bằng:
 - + qui mô cỡ 6.000 bịch/tháng: cần trại 120-200 m²
 - + qui mô cỡ 20.000 bịch/tháng: cần trại 600 m²
- Phòng cấy giống cho bịch nuôi: buồng cấy vô trùng/ 12 m²
Nếu đặt sản lượng phải đạt 60-100 kg nấm/ tháng và tận dụng diện tích thì chỉ cần khoảng 500 m² nhà xưởng, trại nuôi là đủ cho 6.000 - 8000 bịch/ tháng.

1.2. Thiết lập xưởng chế biến và xử lý compost

- kho chứa nguyên vật liệu: 40 m²
- xưởng chế biến compost và đóng bịch: 18 m²

1.3. Nguyên vật liệu và nhiên liệu

- Nguyên vật liệu:
 - + sản xuất giống nấm: khoảng 100 VN đ/ bịch
 - + cơ chất hỗn hợp đóng bịch (650-700 g): khoảng 300 VN đ/ bịch
 - + khử trùng: 100 VN đ/ bịch (lò hơi nước bình thường, thiết kế dân dã).
 - + nước, hóa chất: 130 VN đ/ bịch
 - + bịch PP, bông gòn, giấy,...: 70 VN đ/ bịch
- Nhiên liệu: cồn đốt, khử trùng, điện
Chi phí khoảng 150 VN đ/ bịch
Như vậy tổng chi phí nguyên vật liệu, năng lượng cho sản xuất bịch đã cấy giống nấm là khoảng: 850 VN đ/bịch
- Nhân công: khoảng 850 VN đ/bịch

Giá thành cho đến bịch thành phẩm là: 1700 VN đ.

Trên thực tế các hộ dân sản xuất bịch đã cấy giống với giá thành biến động nhiều: 1100-1800 VN đ/bịch, tùy theo mức đầu tư nguyên liệu.

1.4. Giống nấm nguyên chủng và giống sản xuất

- giống nguyên chủng: cấy chuyển định kỳ và bảo quản lạnh (cần thiết phải dựa vào các phòng thí nghiệm có điều kiện, chẳng hạn Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu hạt nhân Dalat).
- giống sản xuất: cấp 1, 2, 3,... Có thể làm ở nhà dân song đòi hỏi phải có đầu tư kỹ thuật cao hơn. Tốt nhất vẫn là phương án mua giống sản xuất tại các phòng thí nghiệm.

+ nếu cần tính thời điểm hồi vốn thì cần phải xét khấu hao trang trại, trang thiết bị (nếu cho qui mô xây dựng cấp 3-4, cần khoảng $\geq 24.000.000$ VN đ cho 100-120 m²) mặt bằng: chỉ sau 14 tháng đã có thể hoàn vốn xây dựng cơ bản.

$$1.900.000 \text{ đ} \times 14 \text{ tháng} = 26.600.000 \text{ VN đ}$$

Đây là mức tính toán lý tưởng, tối ưu các qui trình nuôi trồng, đặc biệt là khâu ủ tơ riêng biệt trong buồng ủ ẩm. Song thường ở các trang trại hộ dân rất khó thực hiện.

Tất nhiên thời điểm hòa vốn có thể rút ngắn hơn nếu tính khấu hao cao hơn nữa. Tuy nhiên trên thực tế thời điểm hòa vốn có thể kéo dài hơn, lên đến 24 tháng vì nếu mức thâm canh chỉ đạt 2 tháng/vụ. Phương án thứ hai có thể giúp rút ngắn thời gian hòa vốn là phải thâm canh tăng vụ, chẳng hạn có thể gối đầu tăng tới gần 8-10 vụ/năm, nghĩa là phải đạt được 1.5 tháng/vụ.

Như vậy nếu đạt 2 tháng/vụ thì lợi nhuận thô sẽ còn là: khoảng 25%/tháng.

Cần tính thêm mức hư hao do tạp nhiễm, nguyên liệu kém chất lượng, thời tiết biến động,... thì tính bình quân tỷ lệ hao hụt sẽ là 20-30%. Nghĩa là tỷ lệ lợi nhuận cũng sẽ giảm tương ứng, thực tế sẽ chỉ còn khoảng 15-18%/tháng mà thôi.

Với mức lợi nhuận cao (**> 15%/tháng nếu sản xuất 2 tháng/vụ**), các trang trại dân ở Dalat, Lâm đồng có thể vay vốn ngân hàng hoặc quỹ xóa đói giảm nghèo để sản xuất. Tuy nhiên cần phải nhấn mạnh rằng thị trường chưa phải đã rộng mở, cho nên cần nắm chắc nhu cầu tiêu thụ để mở rộng từng bước qui mô và số lượng trang trại nuôi trồng nấm.

5. Khả năng thị trường

Hiện nay chúng tôi đã cố gắng mở rộng thị trường tiêu thụ sản phẩm nấm Linh chi Dalat:

- Hợp đồng tiêu thụ nấm Linh chi tại Bệnh viện Y học Phạm Ngọc Thạch: khoảng 50-100 kg/tháng, cho riêng năm 2000. Nếu có kế hoạch sản xuất lâu dài có thể bao tiêu về nguyên tắc không hạn chế sản lượng. Giá bán hiện tại chấp nhận ở mức 150.000 - 200.000 VN đ/kg nấm khô. Điều kiện là cần có sự giám định hình thái-chất lượng của các chuyên gia nấm Linh chi của Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu hạt nhân Dalat (chất lượng nấm tối thiểu phải đạt như trong phân tích ở Công ty Yungkien, Đài loan: Lê Xuân Thám, 1999).

- Thỏa thuận về nguyên tắc tiêu thụ nấm Linh chi tại Viện Nghiên cứu Công nghiệp Thực phẩm Hà nội: khoảng 50-80 kg/tháng, cho riêng năm 2000. Nếu có kế hoạch sản xuất lâu dài có thể bao tiêu không hạn chế sản lượng. Giá bán hiện tại chấp nhận ở mức 150.000 - 200.000 VN đ/kg nấm khô. Điều kiện là cần có sự giám định hình thái-chất lượng của các chuyên gia nấm Linh chi của Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu hạt nhân Dalat (chất lượng nấm tối thiểu phải đạt như trong phân tích ở Công ty Yungkien, Đài loan: Lê Xuân Thám, 1999).

- Nhu cầu tiêu thụ lẻ của dân chúng vùng Dalat-Lâm đồng cũng có chiều hướng tăng, nếu có tuyên truyền phổ biến và hướng cách sơ chế dùng nấm Linh chi rộng rãi thì dự kiến mức nhu cầu tại địa phương cũng đạt khoảng 50-80 kg/tháng.

Thực tế khả năng tiêu thụ hiện nay mới chỉ ở mức 80-150 kg/tháng, cho nên chỉ nên mở thêm 2-3 trại nhỏ (qui mô 3500-5000 bịch) là vừa cho năm 2000.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

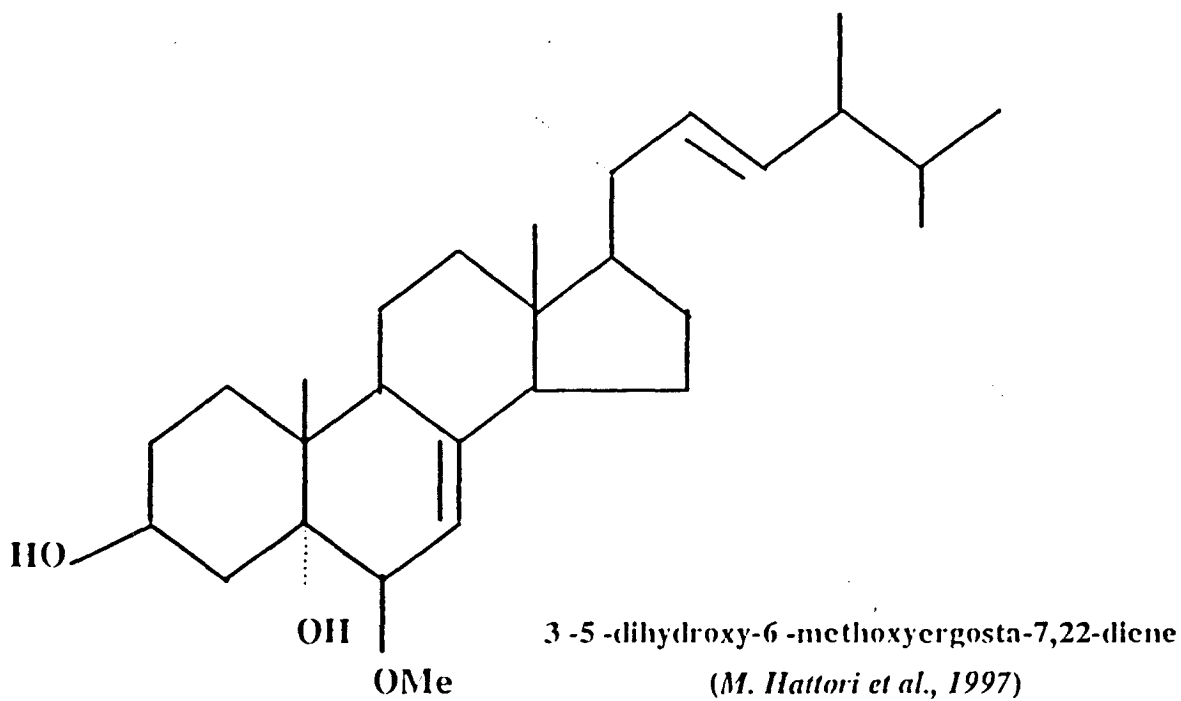
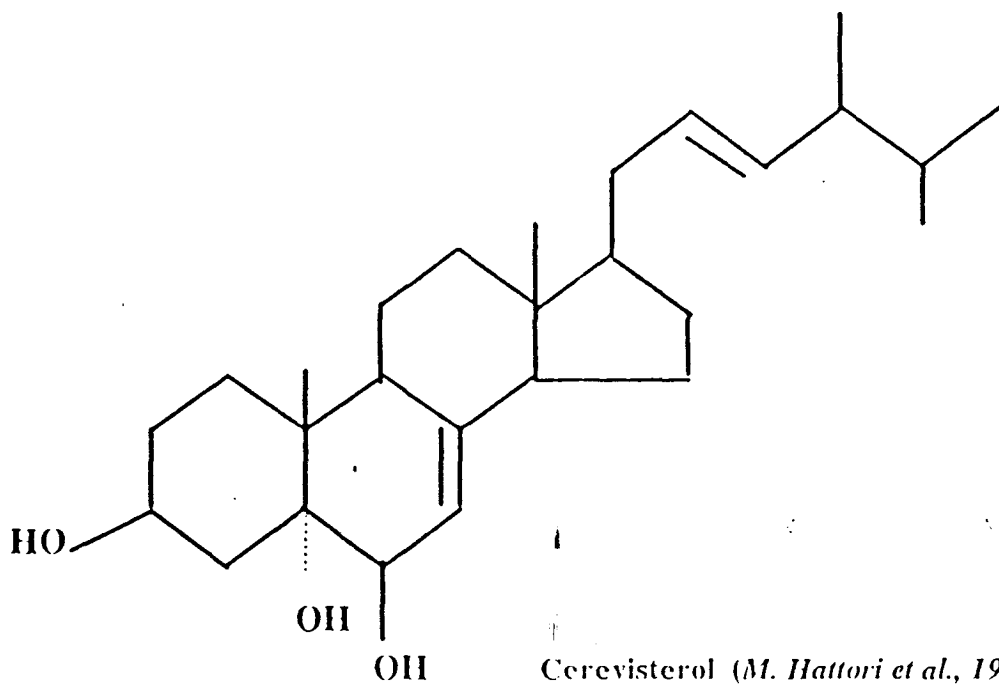
1. Lê Xuân Thám, 1996a:
Nấm Linh chi - Nguồn dược liệu quý ở Việt nam. NXB Mũi Cà mau. 192 tr.
2. Lê Xuân Thám, 1996b:
Nghiên cứu những đặc điểm sinh học và quá trình hấp thu khoáng ở nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst. bằng kỹ thuật hạt nhân.
Luận án Tiến sĩ Sinh học. Đại học Quốc gia Hà nội. 226 tr.
3. Lê Xuân Thám, 1998:
Nấm Linh chi - Lingzhi - Mannentake - Reishi - Ganoderma.
Những vấn đề sinh lý dinh dưỡng trong nuôi trồng chất lượng cao.
Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà nội.
4. Le Xuan Tham, 1998:
A phylogenetic hypothesis of the Ganodermataceae based on a possible mode of basidiospore evolution.
Mycotaxon, 69: 1-12. USA.
5. Lê Xuân Thám & Moncalvo Jean-Marc, 1999:
Hệ thống học tiến hóa của họ nấm Linh chi Ganodermataceae Donk trên cơ sở phân tích cấu trúc AND và bào tử đảm.
Tạp chí Sinh học, Số 4:1-9. Hà nội.
6. Lê Duy Thắng, 1998: Báo cáo nghiệm thu Đề tài cấp Thành phố
Ảnh hưởng của những điều kiện nuôi cấy lên chất lượng nấm Linh chi.
Sở KHCNMT Tp.HCM
7. Nguyễn Thị Chính et al., 1999:
Nấm Linh chi - giá trị y-dược và nuôi trồng.
Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, 9-10/12/1999. Hà nội.
8. Moncalvo, J.M. and L. Ryvarden, 1997:
Nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. Synopsis Fungorum 11.
Fungiflora. Oslo - Norway. 114 p.
9. Steyaert, R.L. 1972: Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden Herbaria. Persoonia 7: 55-118.
10. Zhao, J.D. 1989: The Ganodermataceae in China. Bibliotheca Mycologica 132, J. Cramer, Berlin/Stuttgart, 176 pp.
11. Mims, C.W. and Seabury, F. 1989: Ultrastructure of tube formation and basidiospore development in *Ganoderma lucidum*. Mycologia 81: 754-764.
12. Adaskaveg and Gilbertson, R.L. 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: 694-705.
13. Malek, M. A., Chowdhury, N. A., Matsushashi, S., Hashimoto, S. and Kume, T. 1994.
Radiation and fermentation treatment of cellulosic wastes. Mycoscience 35: 95 - 98.
14. Hseu R.S., Wang, H.H., Wang, H.F. and Moncalvo, J.M. 1996: Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 62: 1354-1363.

PHỤ LỤC

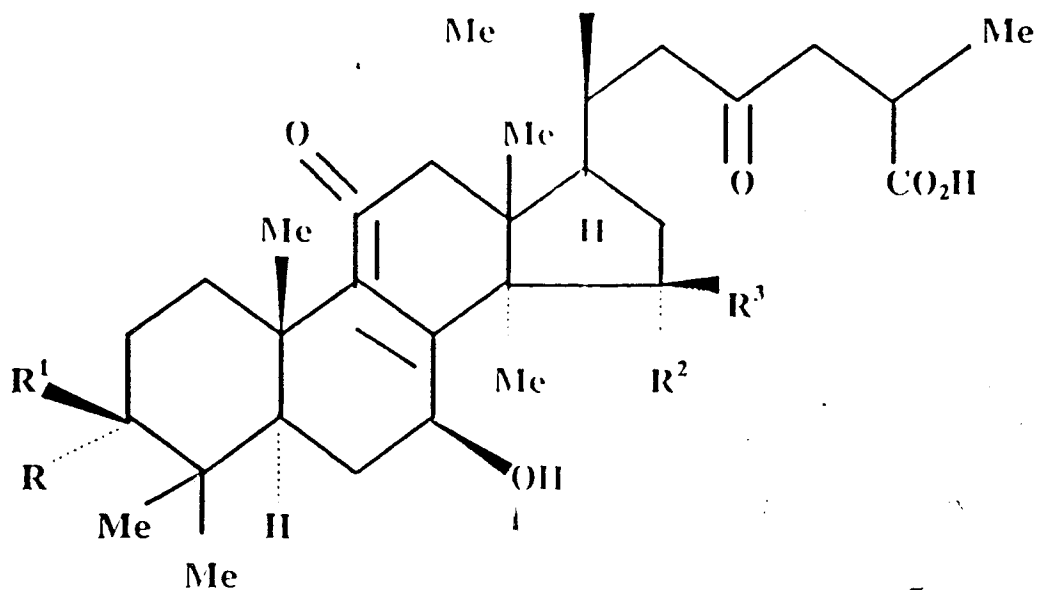
Cấu trúc hoạt chất cơ bản của nấm Linh chi
Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) Karst.

&

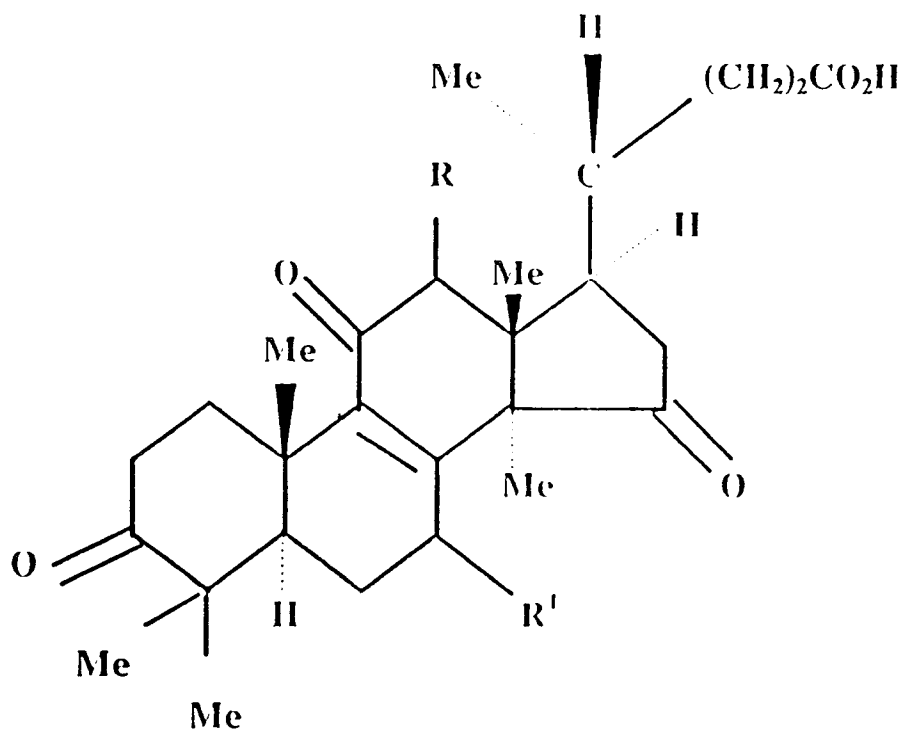
Một số công trình công bố về nấm Linh chi Dalat
(trong thời gian tiến hành Đề tài)



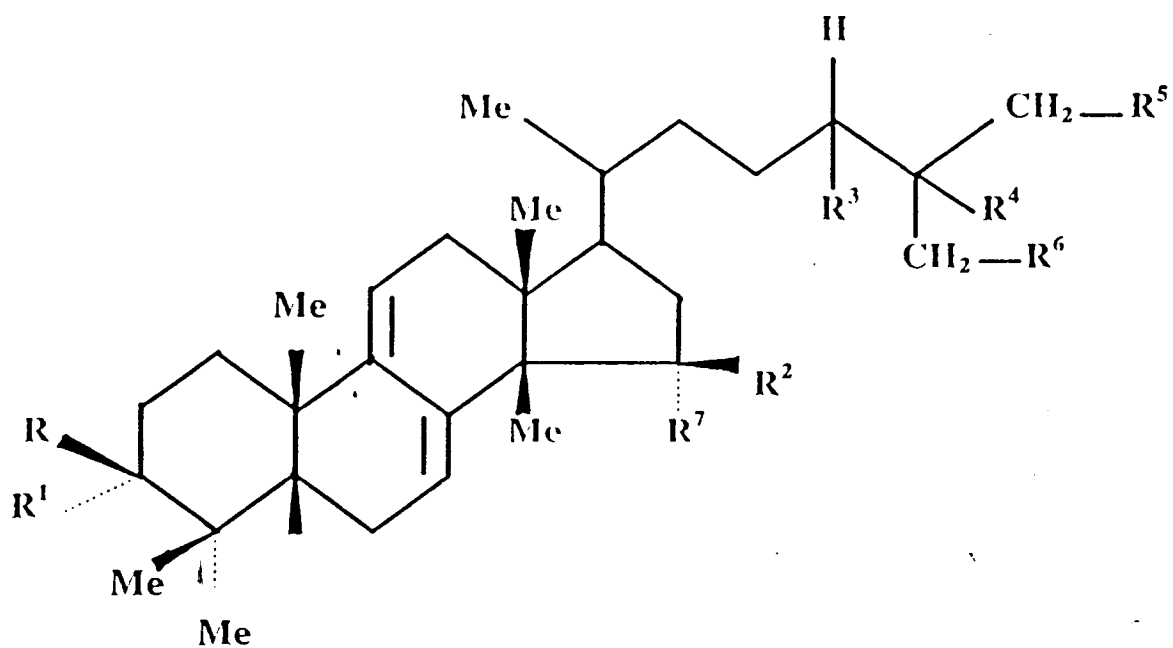
Một số hoạt chất Triterpenoid tách ly từ *Ganoderma lucidum* tương tự như ở *Agaricus blazei* Murr.



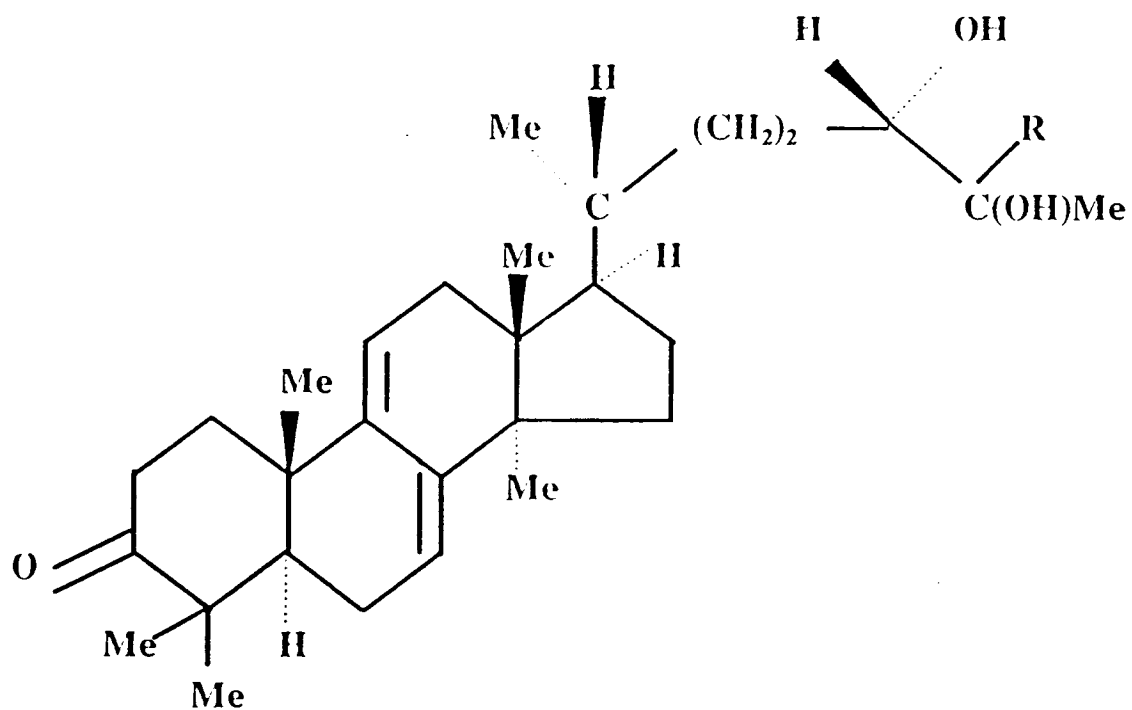
Ganoderic acids A (I) and B (II). I: R R¹ = O, R² = OH, R³ = H;
 II: R = OH, R¹ = H, R² R³ = O (Kubota *et al.*, 1982)



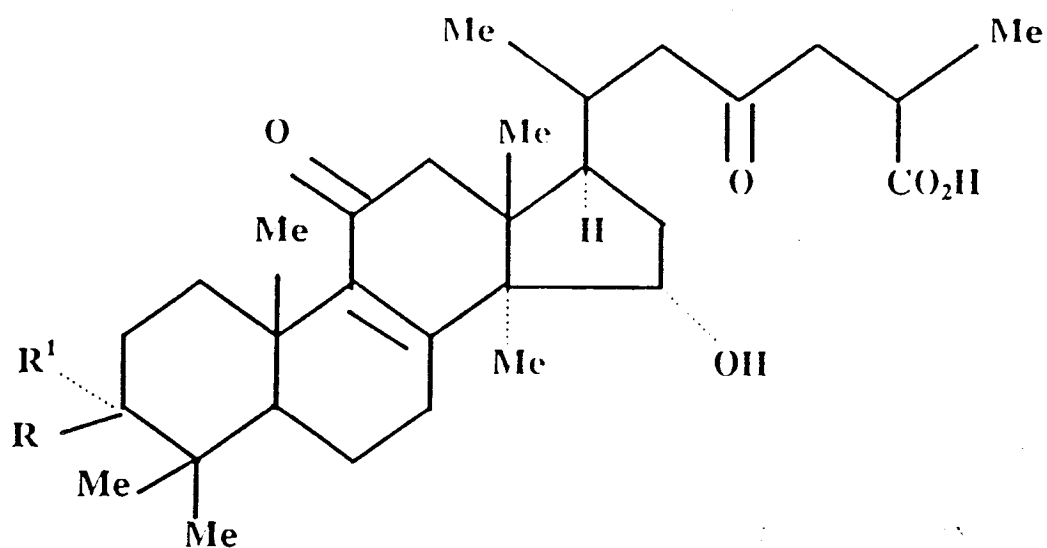
Lucidenic acids A (I) and D (II). I: R = H, R¹ = OH; II: R = O, R¹ = O
 (Nishitoba *et al.*, 1985*a,b*)



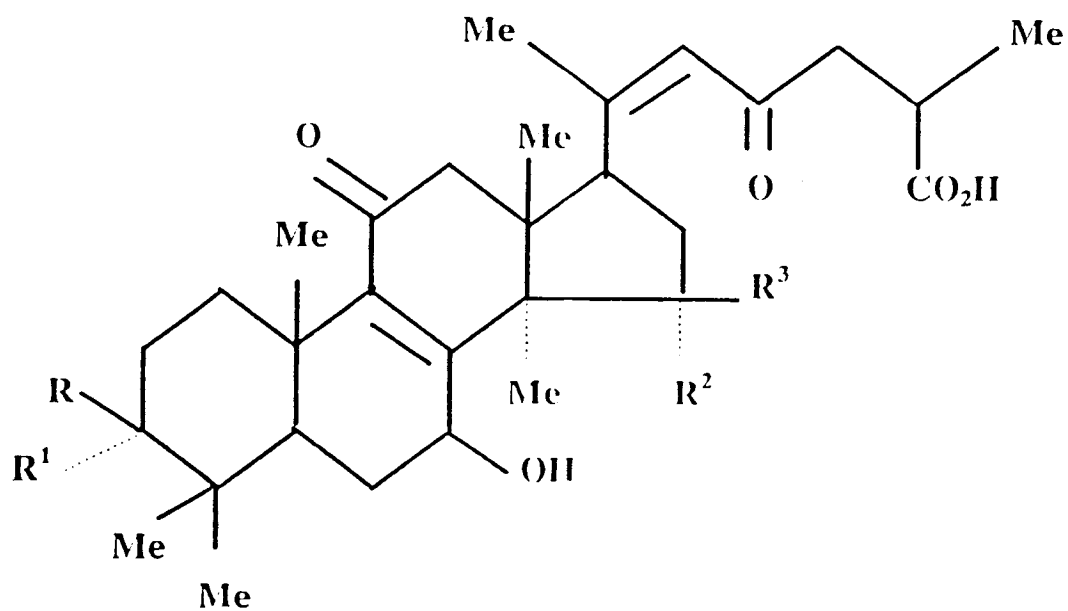
Ganoderiols A (I) and B (II). I: $R^1 = R^2 = R^6 = R^7 = H$, $R = R^3 = R^4 = R^5 = OH$;
 II: $RR^1 = O$, $R^2 = R^5 = R^6 = OH$, $R^3R^4 =$ liên kết chứa bão hòa, $R^7 = H$
 (Sato et al., 1986)



Ganoderadiol (I) and ganodermatriol (II). $R = Me$; II: $R = CH_2OH$
 (Fujita et al., 1986)



Ganolucidic acids A (I) and B (II). I: RR¹ = O; II: R = H, R¹ = OH
(Kikuchi et al., 1986c)



Ganoderenic acids A (I) and B (II). I: RR¹ = O, R² = H, R³ = OH;
II: R = OH, R¹ = H, R²R³ = O (Komoda et al., 1985)

PHÁT HIỆN MỘT CHỦNG NẤM LINH CHI ĐỎ CỦA ĐÀ LẠT THUỘC LOÀI CHUẨN *GANODERMA LUCIDUM*

LÊ XUÂN THẨM, PH.D.

Phòng công nghệ sinh học & kỹ thuật hạt nhân

Viện nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt

Nấm Linh chi chuẩn *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst. ở Đà Lạt được tìm ra từ khoảng 1990, tách phân lập giống nguyên chủng và nuôi trồng thành công từ 1993. Sau đó, hàng loạt các nghiên cứu cơ bản về sinh học với những ứng dụng rộng rãi các kỹ thuật hạt nhân đã đưa đến nhiều kết quả mới (Lê Xuân Thẩm, 1996a) [1]. Kể từ 1881 khi P.A. Karsten, nhà nấm học Phần Lan xác lập đây là loài chuẩn, trên cơ sở bản vẽ và mô tả gốc đầu tiên của nhà tự nhiên học người Anh William Curtis trước đó 100 năm với các mẫu vật sưu tập được ở vùng London (1781), cho đến nay, người ta cho rằng có đến trên 40 chủng (strain) thuộc *G. lucidum* khác nhau được đề nghị. Mới đây, Moncalvo và Ryvarden (1997) đã kiểm tra toàn bộ lịch sử danh pháp của loài chuẩn Linh chi này [2]. Các kết quả nghiên cứu hình thái, sinh học kinh điển và kể cả sinh học phân tử cho phép chúng tôi đi đến suy luận rằng nấm Linh chi phát hiện được ở Đà Lạt có thể là một thứ (variety) mới, có tính cách ly địa - sinh vật trong tổ hợp loài chuẩn, và cũng là một chủng (strain) mới trong giới hạn loài chuẩn hẹp: *G. lucidum* complex et *G. lucidum* s.str. Bài này giới thiệu các nghiên cứu hiện nay, tập trung vào khả năng công nghệ hóa nấm Linh chi tại địa phương, góp phần cung cấp được liệu quý từ nguồn tài nguyên gen nấm hoang dại của Lâm Đồng.

MẪU VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu hái mẫu vật

Mẫu vật được thu thập từ vùng rừng lim đa tạp Hà Bắc (Bắc Việt Nam); vùng rừng hỗn loại cao nguyên Langbian (Lâm Đồng) và thành phố Đà Lạt (Nam Việt Nam); vùng rừng thưa tại Viện nghiên cứu hóa phóng xạ Takasaki (Nhật Bản). Chủng nhập nội có nguồn gốc từ vùng rừng Tử Xuyên (Nam

Trung Hoa) nhận được từ Viện thực liệu Hà Nội.

2. Phương pháp

- Phân tích giám định mẫu theo Zhao (1989) [3] so sánh với nhiều tư liệu khác. Chụp ảnh bào tử nấm trên kính hiển vi quang học với vật kính dầu (x100), kính hiển vi điện tử quét và kính hiển vi điện tử truyền qua tại Viện vệ sinh dịch tễ Hà Nội.

- Tách phân lập giống nguyên chủng và thử nghiệm tương hợp hệ sợi theo, trên môi trường PGA. Thử nghiệm nuôi trồng trên các giá thể tổng hợp theo các qui trình do chúng tôi cải tiến từ các phương thức của các tác giả Nhật Bản.

Đặc biệt lần đầu tiên chúng tôi áp dụng kỹ thuật khử trùng giá thể cơ chất hỗn hợp bằng chiếu xạ tia gamma. Tiến hành xác định hoạt chất và tách triterpenoids trên hệ sắc ký lỏng cao áp HPLC, so sánh với kết quả ở loài Tử chi *Ganoderma tsugae* Murr. của Đài Loan với sự trợ giúp kỹ thuật của Dr. Chen Dang-Hai, Phó Giám đốc Trung tâm nghiên cứu và phát triển, thuộc tập đoàn Yungkien sản xuất và chế biến Linh chi lớn nhất Đài Loan.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Giám định danh pháp và mô tả

Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) Karst.

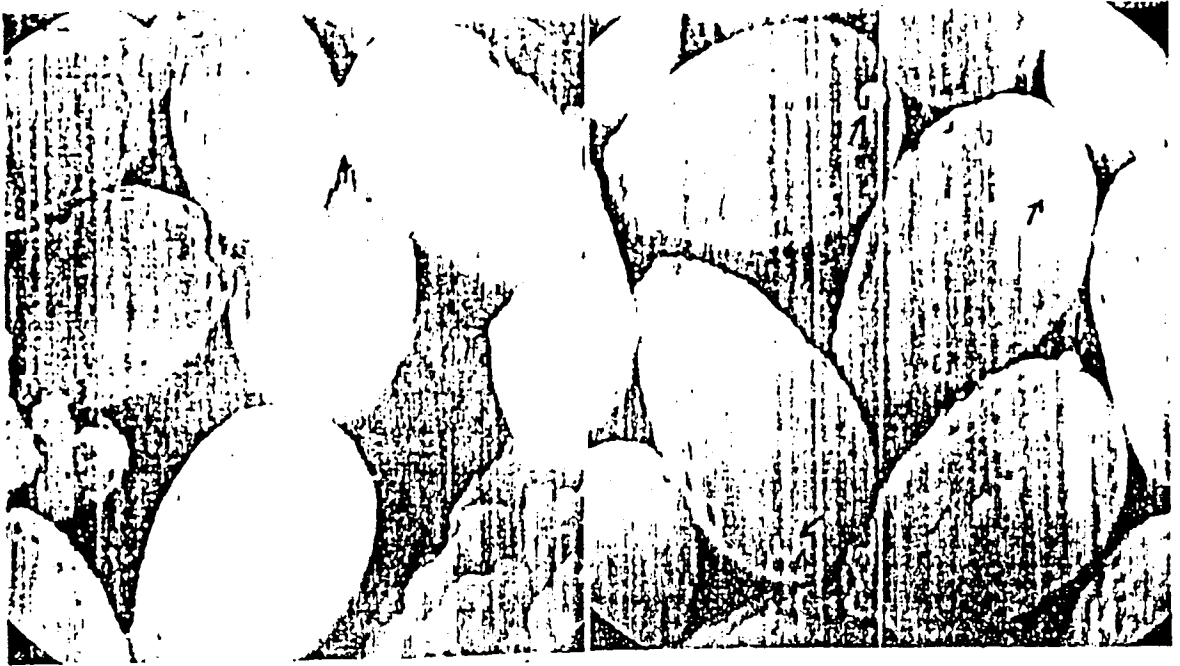
Ganoderma lucidum (Leyss.: Fr.) Karst; Rev. Myc. III, 9:17, 1881

Synonym:

Boletus lucidus W. Curt., Fl. London, 2: PL.224, 1781

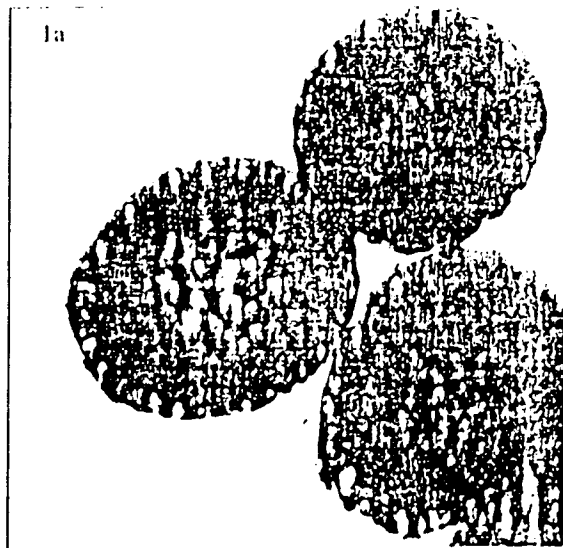
Boletus lucidum Leyss., Flora Halensis, 1783

Boletus laccatus Tinn., Fl. megalop Prodr. 269, 1788

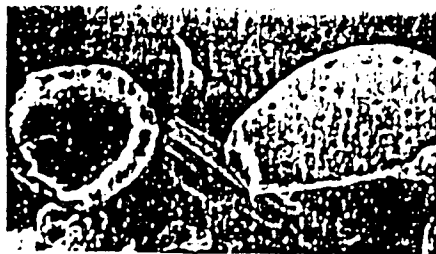


1

2



3b



1a



3a

Ảnh 2: Bao tử dầm của chúng tôi chế từ hạt gạo nếp (chế biến từ gạo nếp)
1: 1a, chúng tôi; 2: chế biến (thay, to màu đỏ, 1a, 1b)
3a, b: chế biến (thay, 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l, 1m, 1n, 1o, 1p)

Polyporus lucidum Leyss.: Fr., Syst. Myc. 1: 353, 1821

Polyporus laccatus (Timm): Pers., Mycol. europ. 2: 54, 1825

Fomes japonicus (Fr.) Sacc., Sylloge Fungorum 6, Reprint Ann. Arbor., 1888

Ganoderma sessile Murr., Torrey Bot. Club. Bull. 29: 604, 1920

Các tác giả hiện đại cho rằng tên gọi *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst. hợp luật danh pháp hơn (Moncalvo and Ryvarden, 1997).

Đã có nhiều mô tả, khảo cứu về nấm Linh chi chuẩn *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Karst. - một trong những loài toàn thế giới (cosmopolitan), do vậy, có những sai biệt hình thái ngoài và sự phân ly thành nhiều chủng. Vì vậy đã tồn tại khái niệm "nhóm *G. lucidum*" hay "tổ hợp *G. lucidum*" (group, complex). Hiện nay giới hạn của loài chuẩn này đang được xác định là các chủng địa lý, rất khó hòa bện hệ sợi với nhau, kể cả khi nuôi cấy đơn bào tử tạo hệ sợi đơn hạch. Nghĩa là chúng đã có đặc tính cách ly sinh học rõ rệt. Gần đây các dẫn liệu trắc nghiệm phân tử: phân tích chuỗi cấu trúc ADN (kỹ thuật PCR), phổ điện di các hệ enzyme, isozyme,... cũng chỉ ra quá trình phân hóa tính vi trong các loài *Ganoderma* và ngay trong loài *G. lucidum* (Hseu et al., 1996; Moncalvo, J.M. et al., 1995) [4, 5]. Trong thực nghiệm của chúng tôi, kết quả nuôi cấy ghép chéo thuần khiết giữa hai chủng: DL x TQ và DL x LI đã chứng tỏ có sự cách biệt lớn. Hệ sợi của chúng phát triển rất mạnh, song luôn tạo lần ranh nơi tiếp xúc với nhau và thường hình thành mầm thể quả (primordia) tại vùng ranh giới đó, đặc biệt có hiện tượng tiết dịch màu vàng nâu. Trong khi đó khi nuôi cấy ghép cặp: TQ x LI lại không thấy sự cách biệt đó: không quan sát thấy lần ranh phân cách và không thấy tiết dịch, thấy rõ trên Ảnh 1.

Về hình thái ngoài chúng cũng có ít nhiều sai khác. Thể quả có cuống dài hoặc ngắn, thường dính bên, đôi khi trở thành dính tâm do quá trình liền tán mà thành. Cuống nấm thường hình trụ, hoặc thanh mảnh (cỡ 0,3 - 0,8cm đường kính), hoặc mập khỏe (tới 2 - 3,5cm đường kính), ít khi phân nhánh, từ 2,7- 22cm, đôi khi có uốn khúc cong queo. Lớp vỏ cuống láng đỏ - nâu đỏ - nâu đen, bóng, không có

lông, phủ suốt lên mặt tán nấm.

Mũ nấm dạng thân - gần tròn, đôi khi xòe hình quạt hoặc ít nhiều dẹt. Tiên mặt mũ có vân gợn đồng tâm và có tia rãnh phóng xạ, màu sắc từ vàng chanh - vàng nghệ - vàng nâu - vàng cam - đỏ nâu - nâu tím - nâu đen, nhẵn bóng, láng như verni. Thường sẫm màu dần khi già, lớp vỏ láng phủ toàn kín mặt trên mũ, đôi khi có lớp phấn ánh xanh tím. Kích thước tán biến động lớn, từ 2 - 36cm, dày 0,8 - 3,3cm. Phần đỉnh cuống hoặc gồ lên, hoặc lõm như lõm rốn. Phần thịt nấm (context) dày từ 0,4 - 2,2cm - chất lie, màu vàng kem - nâu nhạt - trắng kem, phân chia kiểu lớp trên và lớp dưới. Thấy rõ ở các lớp trên, các tia sợi hướng lên. Tầng sinh sản (bào tử, thụ tử - hymenium) là một lớp ống dày từ 0,2 - 1,8cm - màu kem - nâu nhạt gồm các ống nhỏ thẳng, miệng gần tròn, màu trắng - vàng chanh nhạt, khoảng 3 - 5 ống/mm. Đám đơn bào (holobasidic) hình trứng - hình chùy, không màu, dài 16 - 22µm, mang 4 đám bào tử (basidiospores).

Bào tử đám thường được mô tả có dạng trứng cụt (truncate), đôi khi là dạng hình trứng có đầu chóp tròn - nhọn. Thực ra đó là do chụp phủ lỗ nảy mầm (tectum cap) hoặc phồng căng (convex cap - convex germ pore), hoặc lõm thụt (concave germ pore) vào mà thành. Bào tử đám có cấu trúc lớp vỏ kép (bitunicate), màu vàng mật ong sáng, chính giữa khối nội chất tụ lại dạng giọt dầu, kích thước bào tử dao động ít nhiều 8 - 11,5 x 6 - 7,7µm (Ảnh 2). Điều lý thú là mặc dù kích thước có biến động, song cấu tạo tính vi của bào tử đám có độ ổn định cao, dù là ở chủng Nhật Bản, Trung Quốc, chủng nấm Lâm Hà Bắc hay chủng Đà Lạt. Rõ ràng kiến tạo lỗ thông (porus, lacunae) trên bề mặt lớp vỏ ngoài (sexine) là phổ biến ở các chủng, và thậm chí thường quan sát thấy mẫu lỗ nhỏ (thường kính 0,5 - 1,5µm) ở đầu đối diện với lỗ nảy mầm (germ pore) - tức là ở đáy bào tử (có thể thấy rõ ở chủng Lâm). Chúng tôi cho rằng nên coi đó là lỗ nảy mầm giả (pseudoaperture), là dấu vết nơi dính của bào tử trên tiểu hình (sterigma) của đám (basidia).

2. Đặc điểm sinh thái và phân bố ở Việt Nam

Nấm Linh chi có thể mọc trên cây gỗ (thường là thuộc họ đậu Fabales) sống hay đã chết. Thể quả

BẢNG 2: HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT CỦA CÁC CHỦNG LINH CHI (% CHẤT KHÔ)

Hoạt chất (tổng số)	Hàm lượng trong thể quả khô (D.W)		
	Li hoang dại	DL hoang dại	DL nuôi trồng
Adenosine	0,004	0,010	0,024
Polysaccharide	4,610	2,640	2,950
Triterpenolide	0,680	0,740	0,820

lucidum Việt Nam phong phú hơn.

Như vậy các chủng Linh chi đỏ của Việt Nam có hàm lượng triterpenoid vào loại khá. Đặc biệt chủng Linh chi Đà Lạt khi nuôi trồng có hàm lượng hoạt chất tăng cao hơn so với hoang dại:

- Nhóm adenosine tăng gần 2,5 lần
- Nhóm polysaccharide tan trong nước tăng ~ 12%
- Nhóm triterpenoide tăng 11%

Nếu so với chủng Lim Hà Bắc hoang dại cũng có những lý thú:

- Nhóm adenosine cao hơn gấp 6 lần
- Nhóm triterpenoide cao hơn > 20%
- Riêng polysaccharide tan trong nước lại thấp hơn nhiều (64%).

Hàm lượng hoạt chất (nhất là triterpenoids) tăng cao khi nuôi trồng chủng DL cho phép xác lập quy trình nuôi trồng đại trà. Trong điều kiện nuôi trồng ở Đà Lạt, chủng DL có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn, cho thu hoạch sớm hơn. Chất lượng hoạt chất nấm Linh chi nuôi trồng cao hơn so với hoang dại và khả năng công nghệ hóa, tạo nguồn dược liệu quý là hiện thực ở Lâm Đồng, Đà Lạt.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Xuân Thám, 1996: Nấm Linh chi - Nguồn dược liệu quý ở Việt Nam. Nxb Môi Cà Mau. 192tr.
 2. Moncalvo, J.M. and L. Ryvarden, 1997: Nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. Synopsis Fungorum 11. Fungiflora. Oslo - Norway. 114p.
 3. Zhao, J.D. 1989: The Ganodermataceae in China. Bibliotheca Mycologica 132, J. Cramer, Berlin/Stuttgart, 176p.
 4. Hsueh R. S., Wang, H.H., Wang, H.F. and Moncalvo, J.M. 1996: Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 62: 1354 - 1363.
 5. Moncalvo, J.M., Wang, H.F. and Hsueh, R.S. 1995: Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. Mycological Res. 99: 1489 - 1499.
- * Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí một phần từ Dự án IFS, Thụy Điển (International Foundation for Science, Sweden) cho chương trình nghiên cứu về nấm Linh chi *Ganoderma*.

CÂY THÔNG ĐỒ...

(Tiếp theo trang 22)

Hom thông đỏ tương đối dễ ra rễ, tỷ lệ phụ thuộc vào tuổi cây và cách chọn hom. Cây càng trẻ và hom ở đầu đoạn cành mới mang đỉnh sinh trưởng sẽ ra rễ sớm và đạt tỷ lệ cao. Các loại chất kích thích sinh trưởng phù hợp là IBA và BT ở các nồng độ 1-1,5%. Việc nhân giống hữu tính chưa đạt kết

quả cao nên cần được tiếp tục nghiên cứu.

Việc khảo nghiệm cây trồng trên các lập địa khác nhau mới được 1 năm nên chưa đánh giá một cách chính xác về khả năng sinh trưởng, cần theo dõi và đánh giá trong thời gian tiếp theo.

was used as GeCl_4 at 10–1,120 $\mu\text{g/ml}$ Ge.

Substrates for *G. lucidum* cultivation were prepared with sawdust as basic substratum (100%), and added rice bran (15%), bean powder (5%), CaCO_3 (2%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5%), KH_2PO_4 (0.5%) and MgSO_4 (0.05%) to the basic substratum. The moisture content of substrate was adjusted to about 65%. Polypropylene (PP) bags containing substrate (0.5 kg of dry substrate/bag) were irradiated for sterilization at 32 kGy (8 kGy/h) with γ rays of ^{60}Co (Malek et al., 1994). V as VCl_3 solution was supplemented at 30 and 80 $\mu\text{g/g}$ into each of 5 bags. The bags were inoculated with seed and incubated at 26°C under 85% humidity in the dark for 23–26 d to allow full colonization of mycelia. All bags with young primordia were then transferred to the greenhouse for fruiting under daily irrigation and attenuation of illumination. The contents of V in harvested fruitbodies were analyzed by ICP techniques.

Fifty μCi ^{75}Se /5 mg Se as Na_2SeO_4 in 30 ml H_2O was injected into substrates in 5 bags 25 d after inoculation (primordia well formed). Translocation and accumulation of Se in fruitbodies were determined by γ measurements and calculations from specific activity of ^{75}Se in dry matter of stipe, pileus and basidiospores harvested from 5 random samples (L'Annunziata and Legg, 1984). For Ge analysis, 150 μCi ^{77}Ge /50 mg Ge as GeCl_4 was injected into 5 bags in the same way as ^{75}Se but 35 d after inoculation.

Results and Discussion

Effect of V, Se and Ge on mycelial growth of *G. lucidum* Mycelial growth of *G. lucidum* was measured as colony diam in pure cultures supplemented with VCl_3 and NH_4VO_3 . We found that *G. lucidum* is more sensitive to V both in cation and anion forms (V^{3+} , VO_3^-) compared with Se. Mycelia showed healthy growth at 50 $\mu\text{g/ml}$ V and slight inhibition at 100 $\mu\text{g/ml}$ V. At higher V concentrations, mycelial growth was inhibited critically (150–200 $\mu\text{g/ml}$ V). Inhibition of mycelial growth by 50% (LG50: limitation of growth by 50%) occurred at about 180 $\mu\text{g/ml}$ V. At 510 and 1,020 $\mu\text{g/ml}$ V, growth was interrupted and the mycelia died completely 5–7 d later (Table 1).

Table 1 also shows the clear effects of Se on the growth of mycelia. Se was considerably toxic to *G. lucidum* at 100 $\mu\text{g/ml}$ or more. The LG50 value was about 200 $\mu\text{g/ml}$ Se. The mycelia died after growth for 7–9 d in the presence of 500 or 1,000 $\mu\text{g/ml}$ Se, whereas they survived with very weak growth at 300 $\mu\text{g/ml}$ Se in the media.

Control and Ge-treated colonies both grew healthily. No toxic effect on *G. lucidum* mycelia at any concentration of Ge up to 1,120 $\mu\text{g/g}$. Our results agreed with the data of Chen et al. (1994a), who found similar effects of Ge both in cation and anion forms on *G. lucidum*. The responses of mycelia to V, Se and Ge are illustrated in Fig. 1.

Table 1. Mycelial growth of *G. lucidum* on PDA supplemented with V, Se and Ge.

Mineral supplement ($\mu\text{g/ml}$)	Colony diam 9 d after inoculation (mm)			
	V in VCl_3	V in $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$	Se in Na_2SeO_4	Ge in GeCl_4
Control (0)	84.2 $\pm$ 4.1	87.5 $\pm$ 4.4	87.4 $\pm$ 2.9	85.4 $\pm$ 3.8
10	—	—	77.8 $\pm$ 2.2	85.8 $\pm$ 2.2
50	77.2 $\pm$ 4.2	83.3 $\pm$ 4.1	68.9 $\pm$ 4.2	—
70	—	—	—	86.9 $\pm$ 4.0
100	72.7 $\pm$ 3.7	71.9 $\pm$ 2.6	53.7 $\pm$ 2.9	—
140	—	—	—	89.7 $\pm$ 3.6
150	69.9 $\pm$ 3.3	69.1 $\pm$ 3.2	51.4 $\pm$ 3.4	—
180	42.6 $\pm$ 2.5	43.9 $\pm$ 4.3	—	—
200	41.4 $\pm$ 3.6	40.9 $\pm$ 3.1	45.2 $\pm$ 2.4	—
280	—	—	—	88.4 $\pm$ 2.5
300	—	—	23.2 $\pm$ 1.4	—
500	—	—	7.7 $\pm$ 1.7	—
510	18.3 $\pm$ 2.1	22.1 $\pm$ 2.8	—	—
560	—	—	—	89.5 $\pm$ 2.6
1,000	—	—	7.1 $\pm$ 1.2	—
1,020	8.5 $\pm$ 1.3	10.2 $\pm$ 1.7	—	—
1,120	—	—	—	85.2 $\pm$ 2.9

Fig. 1. Growth of *G. lucidum* on media supplemented with V, Se and Ge at 7 d after inoculation.

- V supplement ($\mu\text{g/ml}$): 1, 0; 2, 50; 3, 100; 4, 200; 5, 510; 6, 1,020.
- Se supplement ($\mu\text{g/ml}$): 1, 0; 2, 50; 3, 100; 4, 300; 5, 1,000.
- Ge supplement ($\mu\text{g/ml}$): 1, 0; 2, 70; 3, 140; 4, 280; 5, 560; 6, 1,120.

Chen et al. (1994a) examined the responses of mycelia of *G. lucidum* to GeO_2 added to liquid media and showed increases in the contents of free amino acids and of Ge up to 3,000 $\mu\text{g/g}$ dry biomass. On yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), Se was shown to be quite toxic, and biomass in submerged fermentation being drastically decreased when 30–100 $\mu\text{g/ml}$ Se was added (Thuong et al., 1995). However, Se bioenrichment was successful up to 150–500 $\mu\text{g/g}$ dry matter, supporting the results obtained by Meng et al. (1990) suggesting the improvement of antioxidative activities. Recently, we obtained biomass of mycelia of a special Lingzhi fungus in Vietnam, *Humphreya* sp., with high concentrations of Se (150–1,000 $\mu\text{g/g}$) in pure cultures (Tham et al., 1997). Therefore, it seems possible to accumulate Se in *G. lucidum* by optimizing culture conditions.

Biological effects of V on microorganisms have been intensively studied: these include the adverse impacts on ATPase activity and ATP content in the fungus *Neurospora crassa* Shear et Dodge at 1.5–15 μM VO_4 (Bowman and Slayman, 1979), and the effect of stimulation on the oxidation of NADH in plasma membranes of *S. cerevisiae* (Minasi, 1990). Ulaszewski et al. (1987) showed similar effects of vanadate (0–20 μM) on wild and mutant strains of *Schizosaccharomyces pombe* Lindner. A low-molecular-weight compound $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{VO}_{11}$ was isolated from *A. muscaria* by Kneifeld and Bayer (1973) and Felcman and Da Silva (1984), which was called "amavadine." However, the physiological significance of V in higher fungi and other organisms is still not clear. Arnou and Wessel (1953) reported that V is an essential element for the growth of the green alga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kutzinger, which required 0.1 $\mu\text{g/ml}$ V in the nutrient medium. Beneman et al. (1972) found that V can substitute for Mo in N_2 -fixation in *Azotobacter*, and Robson et al. (1986) showed the alternative nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* Beijerinck is a V-enzyme. Meish and Becker (1981) found that V interferes with chlorophyll synthesis and photosynthetic electron transport in *Chlorella fusca* Shihira et Krauss and even in higher plants. However, Welch and Huffman (1973) concluded that if V were essential to higher plants, it is required at a level of 1/2,500 to less than 1/250 that required for the normal growth of *S. obliquus*, rat, or chicks. Further study is required to clarify the biological functions of V for the growth of fungi.

Cultivation of *G. lucidum* on substrates supplemented with V, Se and Ge On the substrates supplemented with 30 and 80 $\mu\text{g/g}$ V as VCl_3 , the mycelia grew normally and young primordia formed well at 20–25 d after inoculation. The fruitbodies of both strains isolated in Takasaki, Japan, and in Dalat, Vietnam, developed completely and discharged spores from 50–60 d after inoculation. There was no difference in morphology of fruitbodies grown on substrates with and without V supplements. However, the strain from Takasaki showed a delay in maturation of about 7–11 d (the glossy cortex on the upper surface of pilei formed and expanded later as shown in Fig. 2). The samples of the strain from Dalat

were harvested for analysis of V-bioaccumulation in at 75 d (Table 2). Without V addition, the fruitbodies of *G. lucidum* contained only a trace of V ($< 1 \mu\text{g/g}$), due to the low contents of V in the substrate. The addition of 30 $\mu\text{g/g}$ V to substrate produced the effective accumula-



Fig. 2. Fruitbody formation of *G. lucidum* on substrates supplemented with V.

a. Dalat strain, Vietnam; b. Takasaki strain, Japan. Two strains were inoculated at the same time. In Takasaki strain, the periphery surface of pileus is white, but turns brown later.

Table 2. Accumulation of V in fruitbodies of *G. lucidum*.

Fruitbodies	V content in fruitbodies ($\mu\text{g/g}$)		
	Levels of V applied to substrates		
	without V	30 ($\mu\text{g/g}$)	80 ($\mu\text{g/g}$)
Stipe	< 1	12.5	21.5
Pileus	< 1	2.5	7.0
Basidiospores	< 1		< 1

Literature cited

- Arnon, D. I. and Wessel, G. 1953. Vanadium as an essential element for green plants. *Nature* 172: 1039-1040.
- Balfour, W. E., Grantham, J. J. and Glynn, I. M. 1978. Vanadate-stimulated natriuresis. *Nature* 275: 768.
- Bao, D. T. and Thuy, D. H. 1983. Selenium in biology. Medicine Press, Hanoi.
- Beneman, J. R., McKenna, C. E., Lie, R. F., Traylor, T. G. and Kamen, M. D. 1972. The vanadium effect in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochim. Biophys. Acta* 264: 25-38.
- Bowman, B. J. and Slayman, C. W. 1979. The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 254: 2928-2934.
- Byrne, A. R. and Ravnik, V. 1976. Trace element concentrations in higher fungi. *J. Sci. Total Environ.* 6: 65-78.
- Cantley, L. C. Jr., Resh, M. D. and Guidotti, G. 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272: 552-554.
- Chen, M. T. and Fu, W. G. 1996. The establishment of analytical method for germanium compounds in *Ganoderma lucidum*. *Proc. 96 Inter. Conf. on Ganoderma Res.*, Taipei, Taiwan, pp. 15-16.
- Chen, T. Q., Li, K. B., Wen, Q. Y., Chen, Z. S. and Xu, J. 1994a. A primary report of the study on enrichment of germanium in fruitbodies of *Ganoderma lucidum*. *Proc. 94 Inter. Sym. on Ganoderma Res.*, Beijing, China, pp. 70-71.
- Chen, T. Q., Wen, Q. Y., Huan, D. B., Chen, Z. S. and Xu, J. 1994b. A primary report of the study on enrichment of germanium in mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Proc. 94 Inter. Sym. on Ganoderma Res.*, Beijing, China, pp. 68-69.
- Czaderna, M., Makowska, E. and Smolinski, S. 1994. Use of INAA to study the effect of selenium on uranium accumulation in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 177: 393-401.
- Czaderna, M., Turska, M. and Sitowska, B. 1996. Use of INAA to study the determination of Se, Th, Zn, Co, and Fe levels of yeast cells. *Appl. Radiat. Isotop.* 47: 105-110.
- Felcman, J. and Da Silva, J. J. R. F. 1984. Special characteristics of amavadin: an oxovanadium (IV) complex from *Amanita muscaria* fungus. *Abst. 16 Latin-Amer. Cong. Chem.*, Rio de Janeiro, Brasil.
- Ferretti, R. and Levander, O. A. 1976. Selenium content of soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 24: 54-56.
- Kneifeld, H. and Bayer, E. 1973. Strukturermittlung der Vanadiumverbindung des Fliegenpilzes, Amavadin. *Angew. Chem.* 85: 542-543.
- L'Annunziata, M. F. and Legg, J. O. 1984. Isotopes and radiation in agricultural sciences, vol. 1. Academic Press, London.
- Maiek, M. A., Chowdhury, N. A., Matsushashi, S., Hashimoto, S. and Kume, T. 1994. Radiation and fermentation treatment of cellulosic wastes. *Mycoscience* 35: 95-98.
- Meish, H. W. and Becker, L. J. 1981. Vanadium in photosynthesis of *Chlorella fusca* and higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 636: 119-125.
- Meng, M., Ma, C. L., Ding, W. J. and Zhu, X. L. 1990. Determination of the content of selenium in selenium yeast by NAA. *J. Nucl. Radiochem.* 12: 185-187.
- Minasi, L. E. 1990. Characterization of vanadate-dependent NADH oxidation activity and isolation of yeast DNA which complements a class I vanadate resistance mutation. State Univ. New York, Buffalo, NY.
- Mizuno, T. 1989. Development and utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushrooms. *Fungi* (2). *The Chemical Times* 3: 2-12.
- Mizuno, T., Ohtahara, S. and Li, J. X. 1988. Mineral composition and germanium content of several medicinal mushrooms. *Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ.* 38: 37-46.
- Robson, R., Eady, R. R., Richardson, T. H., Miller, R. W., Hawkins, M. and Postgate, J. R. 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* 322: 388-390.
- Sabbioni, E., Bonardi, M., Tanet, G., Li D.-K., Gallorini, M., Weckerman, and Castiglioni, B. M. 1989. Metallobiochemistry of current environmental levels of trace metals: a new method of cyclotron production of ⁴⁸V for toxicological studies. *J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles* 134: 199-208.
- Sabbioni, E., Clerici, L. and Brazzelli, A. 1983. Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J. Toxicol. Environ. Health* 12: 737.
- Sabbioni, E. and Marfante, E. 1978. Metabolic pattern of vanadium in the rat. *Bioinor. Chem.* 9: 389-407.
- Tham, L. X. 1996a. Lingzhi fungi-precious materia medica in Vietnam. Investigations by using nuclear and related methods. Press of "Camau Cap." HoChiMinh, Vietnam.
- Tham, L. X. 1996b. Study of biological characteristics and mineral nutrition in *Ganoderma lucidum* by using nuclear techniques. PhD thesis, National Univ. Hanoi, Vietnam.
- Tham, L. X., Linh, H. M. and Do, T. H. 1997. Study of growth and uptake of selenium in Lingzhi fungus *Humphreya* sp. by using ⁷⁵Se techniques. *Vietnam J. Sci. Technol.* 35: 7-9.
- Thuong, N. Q., Bao, D. T., Muravieva, D. A., Ogursob, I. U. A. and Strapuchuko, P. A. 1995. Etude d'une levure rich en selenium. *Rev. Pharmaceut.* 1: 21-26.
- Tong, C. C. and Khoong, S. L. 1994. Growth characteristics and germanium content of *Ganoderma lucidum* growing in different substrates. *Proc. 94 Inter. Sym. on Ganoderma Res.*, Beijing, China, pp. 66-67.
- Ulaszewski, S., Van Herck, J. C., Dufour, J. P., Kuipa, J., Nieuwenhuis, B. and Golfeau, A. 1987. A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H⁺-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 262: 223-228.
- Welch, R. M. and Hulffman, E. W., Jr. 1973. Vanadium and plant nutrition. *Plant Physiol.* 52: 163-185.

sawdusts of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* L.), the lim tree (*Erythrophloeum fordii* Oliv.), and mixtures of unidentified sawdust (S1) were dried at 65°C for 3 d, then ground to fine powders for analysis. Pb, Zn, Cu, Mn and Cd were determined by polarography techniques with a Metrom Model 646 VA; and Hg, Zn, Mn and Cu were determined by neutron activation analysis (Campbell and Bewick, 1978) in Dalat Nuclear Reactor IVV-9 with a neutron flux of $\sim 2 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ with a multi-channel gamma spectroanalyser (8,192 channels) with NIM standards and HP Ge detector. Fruitbodies of Takasaki strain and mixtures of unidentified sawdust collected in Japan (S2) were analyzed by ICP techniques.

Heavy metal supplements Seven to 9-d-old mycelial fragments of 7–9 mm in diam were inoculated onto PDA media supplemented with heavy metals and incubated at $26 \pm 0.3^\circ\text{C}$ in the dark as follows.

Hg supplements were prepared with HgCl_2 and Hg acetate at 50–3,000 $\mu\text{g/ml}$ Hg on PGA in Petri dishes with 5 replicates per treatment. Cd was used as CdCl_2 at 25–1,425 $\mu\text{g/ml}$ Cd, Cu as CuSO_4 at 128–2,048 $\mu\text{g/ml}$ Cu, U as uranyl acetate at 10–3,000 $\mu\text{g/ml}$ U, Pb as PbCl_2 and Pb acetate at 10–3,000 $\mu\text{g/ml}$ Pb, Zn as ZnSO_4 at 200–3,000 $\mu\text{g/ml}$ Zn, and Mn as MnCl_2 at 50–3,000 $\mu\text{g/ml}$ Mn. Diameters of colonies formed were determined 4–15 d after inoculation to assess the effects of heavy metals on the growth of mycelia.

The uptake and translocation of Zn were investigated by using ^{65}Zn with specific activity of about 5 $\mu\text{Ci/mg}$ Zn in each of five pots as previously described (Tham et al., 1999), based on the method of Brunnert and Zdražil (1983).

Results and Discussion

Heavy metals in *G. lucidum* cultivated on mixed substrates *Ganoderma lucidum* was cultivated on mixed sawdusts of various trees in Dalat City, Vietnam and Takasaki, Japan. Table 1 shows the levels of heavy metals in strains from Sichuan (Southwest China), Habac Province (North Vietnam), Dalat (South Vietnam) and Takasaki (Central Japan). Hg and Cd were extremely

Table 1. Contents of heavy metals in *Ganoderma lucidum*.

Metal	Contents of heavy metals in 75 d old fruitbodies ($\mu\text{g/g}$ dry weight, means of 4 samples)				error (%)
	Dalat strain	Lim strain	Sichuan strain	Takasaki strain ^a	
Cu	33	47	31	28	5
Mn	15	12	19	13	5
Zn	18	27	33	24	5
Cd ^b	<0.15	<0.15	<0.15	<1	
Hg	0.07	0.01	0.01	nd	15
Pb	3.4	3.8	5.7	<5	10
U	nd ^c	nd	nd	trace	

a) Determined only by ICP.

b) Determined only by NAA.

c) Not determined.

low in the former three strains and Cd was similarly low in the Takasaki strain (Hg was not determined). Pb was slightly higher, being highest in the China strain. Similar levels of Cu, Zn and Mn were found by both methods of analysis, and these accorded with earlier reports (Mizuno, 1992; Loi et al., 1993). U was found in Takasaki strain and Japanese sawdust at trace level (Table 2). Compared with many other mushrooms, this cultivated *G. lucidum* contains very low levels of heavy metals. High values were obtained for Cd in fungi, averaging 5 $\mu\text{g/g}$, as Byrne and Ravník (1976) showed with some extraordinary cases of *Hygrocybe punicea* (Pers.: Fr.) Fr. ($\sim 40 \mu\text{g/g}$) and others of about 10 $\mu\text{g/g}$. On the basis of the Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission's maximum recommended weekly intake of 6.7–8.3 μg Cd/kg body weight, or 500 μg for adult, only a modest consumption of such mushrooms would be acceptable. Woidich and Pfannhauser (1975) determined Hg in edible fresh, dried and canned mushrooms and found great variety, from 0.01–10 $\mu\text{g/g}$ dry weight. Stegnar et al. (1973), and Byrne and Ravník (1976) found an average more than 2 $\mu\text{g/g}$ Hg in 27 higher fungi in Slovenia, with the highest values in *Boletus* spp., *Agaricus* spp., *Lycoperdon perlatum* Pers., and particularly *Lactarius deliciosus* (L.) Fr. (up to $\sim 40 \mu\text{g/g}$). Therefore, it can be concluded that *G. lucidum* and the sawdusts commonly used in its cultivation are safe from Hg and Cd contamination. Muramatsu and Yoshida (1997) reported Pb levels in mushrooms in the Tokyo region of around 2 $\mu\text{g/g}$, 10 times lower than that in the soils where they were collected. They also found extremely low contents of U in mushrooms, about 200 times lower than that in the soils ($\sim 2 \mu\text{g/g}$ U). The accumulation factors of Zn, Cu and Mn were about 1, i.e., levels of approx. 1,000 $\mu\text{g/g}$ were found in both mushrooms and soils. Byrne and Ravník (1976) found some special cases such as *Scleroderma vulgare* Horn. with 434–600 $\mu\text{g/g}$ Zn, *L. perlatum* with

Table 2. Contents of heavy metals in sawdusts.

Metal	Contents of heavy metals in various sawdusts ($\mu\text{g/g}$ dry weight, means of 4 samples)				error (%)
	Rubber tree ^a	Lim tree ^b	S 1 ^c	S 2 ^d	
Cu	24	17	13	<1	5
Mn	31	32	41	20	5
Zn	31	21	29	17	5
Cd ^e	<0.05	<0.05	<0.05	<1	
Hg	0.01	0.01	0.01	nd ^f	
Pb	2.0	1.2	1.7	<5	10
U	nd	nd	nd	trace	

a) *Hevea brasiliensis* cultivated around Ho Chi Minh City, South Vietnam.

b) *Erythrophloeum fordii* cultivated in North Vietnam.

c) S 1: unidentified sawdust from Vietnam.

d) S 2: unidentified sawdust from Japan, determined only by ICP.

e) Determined only by NAA.

f) Not determined.

Table 4. Zn uptake and translocation in *Ganoderma lucidum* by using ^{65}Zn tracer.

Time after Inoculation (d)	Accumulation of Zn in ^a					
	stipe		pileus		basidiospores	
	a	b ^b	a	b ^b	a	b ^b
30	487	5.65 ± 1.4	838	7.55 ± 1.7	c	
35	496	5.90 ± 1.3	665	7.90 ± 1.3		
40	597	7.10 ± 1.7	723	8.55 ± 2.8		
45	633	7.50 ± 1.7	792	9.40 ± 3.1		
55	617	7.30 ± 2.0	864	10.25 ± 2.7	451	5.35 ± 1.3
65	611	7.25 ± 2.5	1,233	14.60 ± 2.5	569	6.75 ± 1.6
75	625	7.40 ± 1.8	1,194	14.15 ± 2.8	707	8.30 ± 1.7

a) a: cpm 100 mg⁻¹ dry weight; error of measurements < 5%.

b: amount of Zn derived from the total Zn supplement (5 mg/l) into substrates (μg 100 mg⁻¹ dry weight).

b) Mean value ± standard deviation.

c) Not determined.

metals such as Pb and U are limited to the report by Rothstein (1965) on the effects of U on yeasts. Although uranyl ions, UO_2^{2+} , can not penetrate into the yeast cells, the transport system for glucose is specially inhibited, and associated with binding to carboxyl groups, the enzyme invertase, located on the outer surface of the cells, is inhibited too. High toxicities of metals, particularly heavy metals, were determined in higher plants (Macnicol and Beckett, 1985). The high tolerance of *G. lucidum* to Cu, Mn and Zn might correlate with its wood-decaying ability, particularly with the functions of ligninocellulolytic enzymes (Adaskaveg et al., 1990), and this may be a general feature of wood-rotting fungi.

Zn uptake and translocation in *G. lucidum* Zn was selected as an example of heavy metals capable of incorporation into biomass of the Dalat strain of *G. lucidum*. When Zn labeled with ^{65}Zn was added to substrates at the level of 10 $\mu\text{g/g}$, it was effectively taken up and translocated into fruitbodies. Accumulation of Zn in pilei increased up to 75 d of cultivation and exceeded that in stipes throughout. Traces of ^{65}Zn were found in discharged basidiospores after 50 d of cultivation (Table 4). Harvested fruitbodies (~5% compared with dry weight of substrates) were analyzed for total Zn content (by polarography), and the amount of Zn derived from the Zn supplement was calculated from the specific activities of ^{65}Zn supplemented and in the fruitbody. The respective values obtained, approximately 136 and 120 $\mu\text{g/g}$, indicated that 90% of the Zn accumulated in biomass of fruitbodies was derived from that added artificially to substrates. In discharged basidiospores, the amount of Zn derived from fruitbodies was up to 80 $\mu\text{g/g}$, as calculated both from specific activities of ^{65}Zn and by NAA. Overall, supplemented Zn was used with efficiency of about 60%. Bano et al. (1981) indicated that *Pleurotus* mushrooms have a tendency to accumulate Zn in their fruitbodies. Brunnert and Zadrazil (1983) found very high translocation rates of externally applied Cd and Hg in *Pleurotus djamor* (Fr.: Fr.) Boedijn. and *P. ostreatus*

(Jacq.: Fr.) Kummer. Aichberger and Horak (1975) reported that the commercial champignon, *A. bisporus*, was capable of high Hg uptake up to 30 $\mu\text{g/g}$ from artificially contaminated substrates (10 $\mu\text{g/g}$ Hg supplemented). However, the application of radiotracers, e.g., ^{203}Hg and ^{109}Cd (Brunnert and Zadrazil, 1983), should lead more exact data for the transportation and accumulation of polluted Hg or heavy metals by mushrooms.

Acknowledgements L. X. Tham thanks the Science and Technology Agency of Japan, Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI) for financial support, and the International Foundation for Science (IFS), Sweden for Research Grant No.F/2556-1.

Literature cited

- Adaskaveg, J. E., Gilbertson, R. L. and Blanchette, R. A. 1990. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. Appl. Environ. Microbiol. 6: 1932-1943.
- Aichberger, K. and Horak, O. 1975. Quecksilberaufnahme von Champignons (*Agaricus bisporus*) aus kunstlich angereichertem Substrat. Bodenkultur (Wien) 26: 8-14.
- Anderson, A., Lykke, S. E., Lange, M. and Bech, K. 1982. Trace elements in edible mushrooms. Publ. Statens Levnedsmiddelinstit. 68: 29-37.
- Bano, Z., Nagaraja, K. V., Vihhakar, S. and Kapur, O. P. 1981. Mineral and heavy metal contents in the sporophores of *Pleurotus* species. Mushroom Newsl. Trop. 2: 3-6.
- Brunnert, H. and Zadrazil, F. 1980. Translocation of cadmium and mercury in straw columns colonized by the fungus *Pleurotus cornucopine* Paul: Fr. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10: 145-154.
- Brunnert, H. and Zadrazil, F. 1983. The translocation of mercury and cadmium into the fruiting bodies of six higher fungi. A comparative study on species specificity in five lignocellulolytic fungi and the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 358-366.
- Byrne, A. R. and Ravnik, V. 1976. Trace element concentrations in higher fungi. Sci. Tot. Envir. 6: 65-78.
- Campbell, J. A. and Bewick, M. W. M. 1978. Neutron activation analysis - a review of the method and its present and potential uses in agriculture and soil science. Special Publi-