

研究真菌的方法

李寶珠

臺灣省立臺南師範專科學校

真菌學研究中，經常需要將材料的各部份做成暫時或永久切片，以便於顯微鏡觀察，茲將簡易的方法列出如下：

I. 封埋材料的製作 (Mounting)

許多真菌不須切成薄片即可封埋；如把菌絲體或生殖構造的部份從培養基或天然的基質上直接取下，放在載玻片上，加一滴封埋劑 (mounting medium) 即可。較大的菌體如子實體則以徒手切片來觀察其細微的構造。若子實體很小或者長在葉片上，則將材料夾在切開的植物髓部（如：軟木塞或通草）包住材料，再以銳利的剃刀片，連同髓部切成薄片，再將薄片放在封埋劑中即可。

II. 玻片的製作 (Slide)：

A. 新鮮材料的封埋：

若材料是新鮮的，則小的真菌構造，包括切片，可以直接放在加一滴蒸餾水或封埋劑中，

如乳酸酚 (lactophenol)。此外，也可用稀去污劑或肥皂水代替蒸餾水將有助於減少氣泡。如將蓋玻片小心地從一旁置放，這樣即可免去空泡之產生。當使用乳酸酚或含有甘油的封埋劑時，載玻片和蓋玻片可用指甲油或其他礦物臘來密封。在密封玻片之前，應避免封埋之過量，而超過蓋玻片時，必須將蓋玻片邊緣過多的封埋劑吸乾。

B. 乾燥材料的封埋：

取乾燥菌體的一小部份放在玻片上，加一滴 2 至 10% 氫氧化鉀溶液，使這些構造浸濕並膨脹為自然之大小。乾後此切片材料，如同上法封埋於氫氧化鉀溶液中，稍加熱玻片可加速材料膨脹及呈透晰，另法亦可將乾燥材料封埋於乳酸酚中，蓋上蓋玻片，將玻片在火焰上加熱到封埋劑沸騰。俟切片冷卻以後，即可觀察。

若材料是不透明的就像乾葉之情形，則可放在氫氧化鉀溶液中，煮沸數秒鐘，脫去部份褐色素，再如上述方法封埋。

C. 封埋劑 (Mounting media)

1. 乳酸酚混合劑——Amman's mounting medium (lactophenol)：適合大多數真菌之用者，其配方如下：

酚 (phenol)	20 克 (亦可以不用)
乳酸 (lactic acid)	20 克
甘油 (glycerine)	40 克
蒸餾水	20 毫升

如希望得到染色的原生質，加以 0.05% 至 0.1% 棉花藍 (cotton blue)、亮綠 (brilliant green)、伊紅 (eosin) 或 phloxin 或其他色素在乳酸酚中即可。

2. 甘油膠 (glycerine jelly)：這種配方溶液適合真菌者，其配方如下：

動物膠 (gelatin)	1.0 克
甘油 (glycerine)	7.0 克
水	6.0 毫升

再加 0.14 克酚到上述溶液中。

3. 荷雅氏封埋劑 (Hoyer's mounting medium): 這種配方常用來封埋昆蟲, 也可以用在粘菌和一些子囊菌却獲得很成功。其配方如下:

蒸餾水	50 毫升
阿拉伯膠塊 (Arabic gum lump)	30 克
水合氯化物 (chloral hydrate)	200 克
甘油	20 克

其中阿拉伯膠塊需要預先浸漬在水中 24 小時以後, 再加含水氯化物, 靜置之, 直到所有物質皆溶解 (須數天), 才加甘油, 便可以使用。

為封埋潮濕的粘菌和子囊菌標本, 要先以絕對酒精處理 1 分鐘, 再用 2% 氫氧化鉀處理 1 分鐘, 經過 70% 酒精浸洗以後, 加一滴上述封埋劑, 然後再蓋玻片。

D. 懸滴玻片的方法 (hanging drop slides):

取一枚凹槽載玻片, 可以做懸滴技術來研究孢子的萌芽; 加一滴孢子懸浮液到蓋玻片上, 然後反蓋在載玻片中央之凹面上, 形成一懸掛的水滴, 可在蓋玻片上觀察。在反蓋之前, 若在凹面周圍抹上凡士林, 粘住蓋玻片, 則可防止蒸發。亦可用 Van Tieghem 玻璃環和平面玻片來做較大的懸掛水滴; 將玻璃環 (有各種尺寸) 用凡士林粘在平面玻片上, 加少量蒸餾水到玻璃環中, 如此可以維持懸滴。

E. 製作玻片為鞭毛鏡檢之方法:

如欲決定低等真菌的鞭毛屬何種類型時, 可用下列方法觀察其鞭毛。

1. 鐵酸固定法 (osmic acid fixation):

將一滴含有游動孢子 (zoospore) 懸浮液滴在載玻片上, 再將此載玻片反蓋在一滴 1% 鐵酸上半分鐘, 加一小滴龍膽紫 (gentian violet) 以便染色, 再蓋上蓋玻片即可得。

2. 盧格氏碘劑 (Lugol's iodine): 加一

滴盧格氏碘劑於游動孢子懸浮液上, 可觀察鞭毛。

3. 波恩氏固定液 (Bouin's solution):

如綿黴菌屬 (*Achlya* sp.) 或水生菌屬 (*Saprolegnia* sp.) 的鞭毛, 加一滴波恩氏固定液在游動孢子懸浮液上, 蓋上蓋玻片, 便可觀察, 其配方如下:

飽和苦味酸 (picnic acid) 水溶液	300 毫升
福馬林 (40% commercial formalin)	100 毫升
冰醋酸 (glacial acetic acid)	20 毫升

4. 相位差顯微鏡 (phase contrast microscopy): 如上述綿黴菌或水生菌的游孢子懸浮液或其他屬游孢子, 在相位差顯微鏡下可以直接觀察游動孢子的活動及鞭毛。

F. 顯微鏡的校準:

測取視野下的物體大小的裝置稱為接目測微計 (ocular micrometer)。它是一圓盤玻璃片上刻有刻度, 經常分為 50 個分割, 每一分割並無標準值, 所以要以接物測微計 (stage micrometer) 來校準每一接目鏡和接物鏡的刻度。

其程序如下:

1. 將接目測微計使刻畫面朝上置於接目鏡內, 接物測微計置於載物臺上。

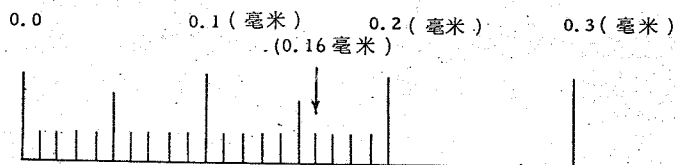
2. 調整接目測微計, 使其刻度與接物測微計之刻度一致, 移動接物測微計直到其最小的分割 (0.01 毫米) 鄰接著接目測微計。

3. 調整接目測微計的第一條線使其與接物測微計較大的分割線重合, 而另一端的刻度線將與較小的分刻重疊。

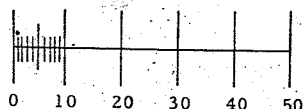
4. 例如: 使用 10 倍接目鏡和 44 倍接物鏡, 則接目測微計的 50 格分割線正好通過接物測微計的一大空格及六小空格。因此接目測微計之 50 格等於 0.16 毫米。

5. 因為 1 毫米等於 1,000 微米 (μm),

(接物測微計)



(接目測微計) (50 刻劃)



$$\frac{0.16 \text{ mm.}}{50 \text{ spaces}} = \frac{160\mu}{50} = 3.2\mu (\text{微米})$$

故 0.16 毫米 = 160 微米。因此，160 微米除以 50 則為 3.2 微米，即接目測微計每一刻度等於 3.2 微米。

註：如有更換高低倍接目鏡和接物鏡時，其校準必須依照上述相同之方法計算之。因為，接目測微計的刻畫在不同倍率之下即有不同的計值。

III. 研究真菌的特殊技術：

A. 真菌的培養

1. 培養器皿的清洗：玻璃器皿一定要用去污劑洗潔後以自來水沖洗，又自來水多含礦物質，故還要用蒸餾水潤濕。若器皿上有臘筆、松脂 (balsam)、石臘 (paraffin) 等類似物質的記號，可用二甲苯 (xylol) 洗去。

玻璃器皿很髒時，可用清潔液 (clearning solution) 浸泡數小時，用刷子徹底洗乾淨後，以自來水沖洗數次，再用蒸餾水沖洗之。〔清潔液的準備：重鉻酸鉀 (potassium bichromate) 100 克，濃硫酸 (sulfuric acid) 500 毫升，水 1,000 毫升；將重鉻酸鉀溶於熱水中，冷後，慢慢加硫酸，小心攪拌，注意清潔液會使衣服變成黑褐色並傷害皮膚〕。

2. 真菌生長的培養基種類

真菌可培養在各種液體和固體培養基，大多

數真菌在高含量碳水化合物，pH 值 5 至 6 之培養基生長最佳 (細菌則以蛋白質和 pH 值 7 時較好)。因各種真菌所需求的營養不同，因此沒有一種培養基可適合所有的真菌生長。依成份不同可分為兩種：甲、天然培養基：含天然基質及化學物質。乙、合成培養基：含已知的化學化合物。

一般比較常用的培養基如下：

甲、天然培養基 (natural media)：

① 玉蜀黍培養基 (corn meal agar)：

適合許多真菌生長，並可誘導孢子形成。代號：CMA。

玉蜀黍碎粒 (corn meal)	20 克	省略亦可
蛋白陳 (peptone)	20 克	
葡萄糖 (dextrose)	20 克	
洋菜	15 克	
蒸餾水	1,000 毫升	

將玉蜀黍碎粒放在水中，以水浴法熬 1 小時，再用四層紗布過濾。其濾液加洋菜和葡萄糖後，加以高溫高壓滅菌即得。

② 無菌玉蜀黍梗 (sterilized corn stalk)

：多數真菌在洋菜培養基上不形成子實體，但可在玉蜀黍梗上形成；將玉蜀黍梗切成長約 4 吋的細條，放在試管中，加 1 至 2 毫升蒸餾水並塞好棉花塞後加以滅菌。

③ 馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextr-

ose agar)：適合多種真菌生長。代號：PDA。

削皮馬鈴薯 (peeled, diced

potatoes) 200 克

葡萄糖 (dextrose) 20 克

洋菜 15 克

蒸餾水 1,000 毫升

可用蔗糖 (sucrose) 10 克取代葡萄糖。配法同 CMA。

④ 麥芽糖抽出物培養基 (malt extract agar)：適合於木材腐朽菌及其他真菌之生長。代號為 MA。

麥芽抽出物 (malt extract) 25 克

洋菜 15 克

蒸餾水 1,000 毫升

⑤ 水洋菜 (water agar)：即 2% 的洋菜培養基，只能維持真菌稀疏的生長。放一小塊動物糞於培養基上，可觀察糞物表面各種真菌的消長。

⑥ 華克曼氏培養基 (Waksman's medium)：適合於土壤菌的生長。

葡萄糖 10 克

蛋白胨 (peptone) 5 克

磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 1 克

硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 克

洋菜 20 克

蒸餾水 1,000 毫升

以硫酸或磷酸調整酸鹼值 (pH) 為 4。

⑦ 酵母澱粉培養基 (yeast starch agar)：特別適合厚膜囊水生菌 (*Allomyces*) 及其他真菌之生長。代號：YpSs。

酵母抽出物 (yeast extract) 4 克

可溶性澱粉 (soluble starch) 15 克

磷酸二氫鉀 (K_2HPO_4) 1 克

硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 克

洋菜 20 克

蒸餾水 1,000 毫升

⑧ 亞麻種子 (hemp seed)：某些水生菌如水生菌目 (Saprolegniales) 及節水生菌目 (Leptomitales) 適合培養在煮熟的切半亞麻種子上；放在取自池塘或溪流的水樣中。亦可用玉蜀黍、麥片、昆蟲屍體代替亞麻種子。

乙、合成培養基 (synthetic media)：

如查柏克氏液體培養基 (Czapek's solution agar)：特別適合黴菌 (*Aspergillus*)，青黴菌 (*Penicillium*) 和放射菌一種 (*Nocardia* spp.) 的生長。

硝酸鈉 (NaNO_3) 3.0 克

磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 1.0 克

氯化鉀 (KCl) 0.5 克

硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 克

硫酸鐵 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01 克

蔗糖 (sucrose) 30 克

洋菜 15 克

蒸餾水 1,000 毫升

3. 培養基的製備：所有培養基的準備工作都類似；將各成份適量稱好，放進清潔錐形瓶中，溶於適量蒸餾水，蓋好棉花塞，外包一層錫箔紙，準備滅菌。（注意：每一錐形瓶中只放其容積之一半的培養基）。

滅菌：將已製備好之培養基放在攝氏 120 度，15 磅壓力鍋或高溫高壓滅菌箱中滅菌 15 至 20 分鐘。培養皿亦需事先滅菌（將乾淨培養皿用包裝紙或報紙包妥，或是放在金屬容器中，以攝氏 150 至 160 度乾熱烘箱滅菌 3 至 4 小時）。

4. 倒入培養皿：培養皿和培養基滅菌完成後，準備倒入培養皿。首先將桌面以去污劑擦乾淨，關上門窗，減少桌面和空氣氣流所造成的污染，然後將培養皿放在桌上，點燃酒精燈，並如下列順序操作：

a. 右手拿盛有培養基（約攝氏 50 度左右）

之錐形瓶。

- b. 左手打開棉花塞。
- c. 錐形瓶口在火焰上加熱片刻。
- d. 左手掀開培養皿蓋，每個培養皿注入約 20 毫升培養基後覆蓋之。
- e. 慢慢水平旋轉培養皿，使培養基均勻佈滿皿底。
- f. 培養基冷卻凝固後即可用。

5. 斜面培養基：每一試管盛入 10 至 12 毫升培養基，滅菌後，將試管傾斜放置，待培養基凝固即得。（注意：先將洋菜養溶再與其他成分混合均勻，才可分裝到試管中。試管傾斜時，勿使培養基接觸到瓶塞，以免雜菌自外界侵入或污染。

B. 真菌的分離和生長

1. 分離：有些真菌在自然狀況下很難觀察，故需作純培養，以便於觀察和研究。

a. 蕈菌類 (mushrooms)：切除新鮮子實體的蕈柄，將蕈傘從中央撕開，以無菌攝子鉤取一小塊肉質組織，培養在 PDA 或 MA 培養基上，即得。

b. 腐生菌類 (saprobies)：如青黴菌、麴菌、水生菌等在標準培養基中生長很快。糞生菌 (coprophilous fungi) 則可在無菌糞或糞類培養基上培養。絕對寄生真菌 (obligate parasites) 則無法純培養。

c. 水生菌 (aquatics)：以亞麻種子來分離培養池塘水或雨水中水生菌，再取菌絲頂端培養在培養基上（麥芽糖 3 克，蛋白陳 1 克，洋菜 20 克，蒸餾水 1,000 毫升）。亦可用單孢培養：取一滴游動孢子懸浮液均勻塗佈在培養基表面，待長出菌絲，取菌絲頂端，以亞麻種子培養。

2. 將真菌轉移到斜面或平面培養基上：在無菌操作下，將孢子或菌絲片段轉移到新的無菌培養基內，萌發新菌落，可永久保存菌種。菌落生長過程中，培養皿須要倒放。

3. 玻片培養 (slide culture)：以此法製作永久切片的方法如下：

- a. 10 毫升無菌培養基注入培養皿中。
- b. 凝固後，以無菌針劃取一公分平方的洋菜方塊。
- c. 取一片無菌載玻片置於培養皿內。
- d. 將洋菜方塊放在載玻片上。
- e. 將孢子或菌絲段接種在洋菜方塊上。
- f. 蓋上無菌蓋玻片。
- g. 將上述玻片培養移到含有少量 20 % 甘油的潮濕容器中，可防止玻片上產生霧氣，在載玻片下放一個 V 字形玻棒，支持玻片，可防止玻片潮濕。一段時間後，蓋玻片上便有生長菌絲附著。
- h. 取下蓋玻片，加一滴 95 % 酒精，濕潤菌絲。

i. 酒精快乾時，加上一滴乳酸酚 - 棉花藍混合液，反蓋在乾淨載玻片上。

j. 以指甲油或類似物，將蓋玻片周圍密封起來。

4. 塞路芬膜 (Cellophane) 培養技術：以此法培養菌落，有利於照相及保存真菌，做為未來的參考。

- a. 取 7 公分直徑的圓盤塞路芬膜，夾在濾紙間，置於培養皿內。
- b. 施以高溫高壓滅菌。
- c. 以無菌鑷子取無菌塞路芬膜，浸泡於無菌水中，然後平放在培養基上。
- d. 若有氣泡產生，則將膜的一邊稍為提高，將氣泡趕出。
- e. 將小塊菌種接種在膜上，培養皿倒放。

IV. 真菌的採集及保存

甲、真菌的採集：採集方法和裝備依不同真菌

而有不同。如長在樹幹、木材、土壤或其他物體上的真菌，不易壓平，則所需裝備為植物採集箱、籃子或塑膠袋。大的標本，如蕈類則需個別包在臘紙內，再存放於籃子內。葉片或草本植物莖上的寄生菌，則最好平壓在報紙下，這種方法的好處是可把各標本分開，不致使各種孢子混合。

每次採集的標本要記下採集時間、地點、寄主及其他有關資料。下列為較完備的採集裝備：

1. 植物採集箱或其他容器。
2. 銳利的小刀、樹枝剪。
3. 小鋸子、小鑿子和小鎚子。
4. 一卷臘紙。
5. 鉛筆和記事本。
6. 紙袋，用以收集土壤樣品。
7. 採集水樣用大小罐子。
8. 標本夾及報紙。
9. 放大鏡。
10. 蚊蟲消腫藥。

乙、真菌的保存：

1. 一般保存法：有些季節性真菌，如蕈類或造成植物疾病之真菌，通常以 FAA 固定液〔含 40 % 福馬林 (formaldehyde) 50 毫升，冰醋酸 (glacial acetic acid) 50 毫升和 50 % 或 70 % 酒精 900 毫升固定之，即可無限期保存〕。

2. 有色真菌的保存：保存在下列溶液中。

a. 色素不溶於水：

醋酸汞 (mercuric acetate)	10 克
冰醋酸	5 毫升
水	1,000 毫升

b. 色素溶於水：

醋酸汞	1 克
中性醋酸鉛 (neutral lead acetate)	10 克
冰醋酸	10 克

酒精 90 % 1,000 毫升

c. 硫化鋅 (zinc sulphate) 保存法：

硫化鋅	25 克
福馬林 40 %	10 毫升
水	1,000 毫升

3. 帶有寄生真菌之綠色植物的保存法：將新鮮材料置於 5 % 硫酸銅水溶液中 6 小時以上（但勿超過 24 小時），再以流動水沖洗數小時，最後放入保存溶液（5 ~ 6 % 二氧化硫溶液 15 毫升，蒸餾水 1,000 毫升），密封起來。若為水果，則加 20 至 30 毫升甘油到保存溶液中。

C. 真菌菌種的保存：多數真菌的活性在洋菜培養基上可維持六個月至一年間。孢子培養冷凍在攝氏 -20 度中，則可保存相當長的時間。另一方法是將菌種完全浸漬在無菌礦物油 (mineral oil) 中，則可保存好幾年。真空冷凍乾燥法 (lyophil process) 是最好方法，至少可保存 20 年。

D. 乾燥保存法：在氣候熱時，將標本放在日光下 2 至 3 天，俟完全乾燥後，便可無限期保存。氣候潮濕時，則需每天換吸水紙，以防長霉。又如保存容器中放入殺蟲劑結晶可以防止昆蟲破壞標本。

本文譯自：

Alexopoulos, C. J., and Beneke, E. S., 1952. Laboratory manual for introductory mycology. Burgess Publ. Co., Michigan, 1-17 pp.