



漫談

菇類菌種保存

園藝作物

農試所植病組 陳美杏 呂昀陞 李瑋崧

一、前言

菇類菌種如同植物的種子一般，是菇類栽培的源頭，菌種活力如同種子活力，對於菇類栽培的產量和品質影響極大。然菇類的栽培方式和作物的栽培有很大不同，光是擁有菇類的菌種，還需要其他的設備和技術配合才能生產菇體販售到市場上，況且台灣的菇農大部分缺乏自行製作菌種之技術，所以透過專業分工，向太空包製作業者購買接好菌種之太空包，並將之放入菇舍培養及出菇，由於毋需投注資金在木屑堆積場、太空包製作機器、殺菌及菌種製作等方面，因此一開始投入的金額較低，但是太空包的價格和品質都不是自己可以掌握，所以當排除掉設備投入的固定成本，太空包購買成本當然比起自行製作太空包之菇農較高，一旦栽培管理過程稍有疏忽或產品市場價格崩跌，往往導致成本無法回收。一般栽培業者常將菇類的產量與栽培介質及栽培管理的環境畫上等號，然卻忽視菌種之影響，不知其中各點是環環相扣，因此，一旦產

量不如預期，栽培業者與太空包製作業者間所需負擔之責任很難釐清，常會造成許多紛爭，所以為求永續經營，菇農往往會萌生自己製作太空包和菌種的念頭，而追本溯源最主要的關鍵就在於「菌種」的製作。

菌種製作是整個菇類生產過程中非常專業且關鍵的領域，必須透過一定的訓練，經由良好的無菌操作技術，方能確保菌種的生產過程不受任何雜菌的污染。此外，一個良好的菌株，如何永久保存其生理及遺傳特性，則是許多菌種商所面臨的挑戰，筆者走訪菇農時，常發現他們會向不同的菌種商購買菌種，這種菌種來源與品質不穩定的狀況，連帶造成菇農生產時非常大的困擾。

菇類隸屬於真菌界，其營養生殖的構造稱為菌絲，繁殖的過程主要是透過細胞進行有絲分裂而形成新的菌絲，然有絲分裂之過程偶而會有基因重組和突變之發生，故有絲分裂的次數越多，造成基因變異的機率也越大。為避免優良菌種產生變異（如圖一），良好的保存方法是非常重要的，而平時使用中之菌種則建議減少菌種移植的次數，藉以減少有絲分裂的次數而降低變異的風險。菌種保存的原則是讓菇類菌絲保有活性卻減緩其代謝活性，進而暫時停滯或延

作者：陳美杏助理研究員
連絡電話：04-23317528

緩生長，在自然之情況下通常是在低溫或低氧氣濃度的環境下可以達到這樣的效果，因此許多保存方法均是根據此一原則進行開發，包括繼代培養法、礦物油覆蓋法、無菌水懸浮保存法、低溫冷凍保存法以及超低溫冷凍法，其中以超低溫冷凍法對於菇類菌種活性及各種遺傳性狀維持之效果最好，但保存成本也最昂貴，此外在諸多的冷凍劑中，以液態氮被認為是最安全且最符合經濟效益，但使用此一保存法，除了需液態氮保存桶、程式降溫儀等設備外，由於液態氮容易汽化，因此每個月尚須支付補充液態氮之費用，所以除了菌種中心及大型菇廠外，一般小型菇廠皆無法負擔此一費用。

二、菇類菌種保存方法

本文介紹幾種簡單的菇類菌種保存方法，希望能提供給菌種生產業者或是有意自行生產菌種之菇農作為參考。

(一)、繼代培養法

本法是一般菇農最常使用的方法，即在菌種製作時，將菌絲塊移植至數根試管裝有馬鈴薯葡萄糖洋菜(Potato dextrose agar, PDA)培養基上，待菌絲長滿後放置於4℃冰箱，每半年更新一次，中間需要重新製作菌種時，每次只取出一管擴大培養，其他的仍繼續保存在4℃，如此可以降低移植的次數，進而降低菌種產生變異的機率。這種方法雖然費時，但操作簡單且方便，且所須費用相當低。另外，在菌種保存過程中為避免產生脫水現象，在製作菌種保存用的試管斜面培養基時可以增加培養基的量，由原本的10ml增加至12ml在滅菌處排成斜面時，讓底部多留2~3公分的高度(如圖二)，雖然會縮小斜面的長度，但是可以避免菌種在保存的過程中，培養基因水份蒸發過快而乾掉，導致菌絲死亡的現象。

(二)、礦物油覆蓋法

礦物油覆蓋法是藉由防止脫水及降低氧氣消耗而達到延緩菌絲生長與代謝活性的原理來保存菌種，作法是將滅菌的礦物油直接倒在生長於PDA試管斜面上的菇類菌絲上面，適用於不產生孢子的真菌菌絲之保存。在礦物油下面1公分以下生長的真菌菌絲在覆蓋後數小時之內，因為氧氣降至正常值的1/10，代謝作用也會隨之降低。礦物油覆蓋的厚度如果超過1公分，會影響氧氣的穿透，反而不利於菌種的保存，同時，如果在無氧狀態下，礦物油對真菌的菌絲具有毒害性(註1)。使用礦物油最好為醫藥級的礦物油，放



圖一、經過多次移植之後，左邊的秀珍菇菌種和右邊比較起來出現退化的現象，生長速度明顯減緩。

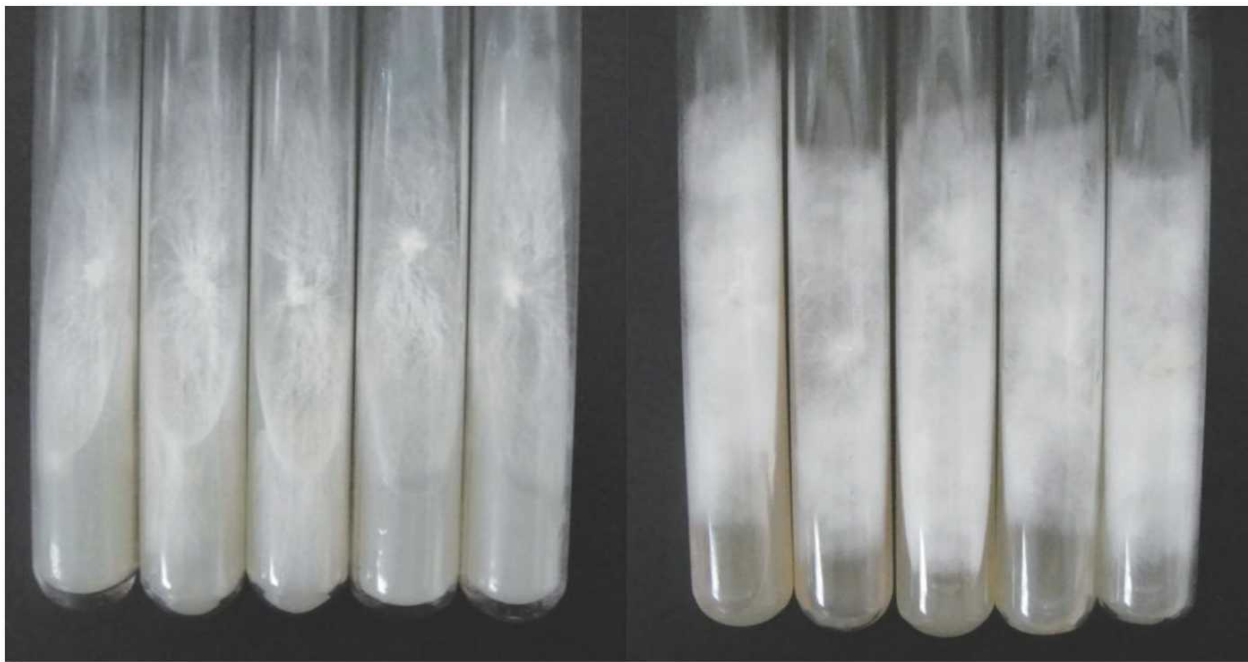
入玻璃瓶或血清瓶中以高溫高壓滅菌1小時，然後在烘箱中乾燥至表面水氣完全蒸散，待冷卻後，加入適當的量至試管中至完全覆蓋斜面培養基為止。此法可將菌種保存於室溫，一般菇農使用較為便宜的棉花塞封住試管瓶口，久而久之容易吸引紅蜘蛛，建議可以在表面加上一層玻璃紙，一方面減少礦物油之蒸發，同時可以避免紅蜘蛛的感染。

(三)、無菌水懸浮保存法

利用無菌水保存菌種的原理也是透過減少氧氣以降低菌絲代謝生長活性，有效降低移植次數，操作簡單，菌種亦可保存長達數月之久。首先將菌種培養於含有PDA之試管或培養皿中，待菌絲長滿，以移植針切取生長於菌落邊緣之菌絲塊（直徑0.3~0.5cm），移植於消毒過的蒸餾水中，封好瓶口（如圖三），放入4°C冰箱中保存或置於室溫下即可。移植時直接以移植針取出菌絲塊放置於新的培養基讓其生長。

(四)、低溫冷凍保存法

在低溫冷凍時，細胞內的水會結成冰晶，在解凍的過程中，冰晶會刺傷細胞膜，導致細胞破裂而死亡，因此提高保存菌絲細胞的存活率，除了控制降溫的速度之外，同時得加入適當的抗凍劑保護細胞減少冰晶的形成。一般常使用的抗凍劑分成兩型，一種具穿透性，可以穿透細胞膜，在細胞內和細胞外都具有良好的保護效果，例如二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)和甘油，二甲基亞砜因為對人體有毒性，一般較常使用甘油。另一種則為非穿透性，較少被使用，如不同種類的醣類，如蔗糖、糖醇及糊精等，藉由改變細胞內溶質的濃度以減少細胞脫水的程度(註2)。2001年日本Hirasawa等學者(註3)利用海藻醣處理酵母菌的細胞後，發現可提高細胞內的海藻糖濃度有助於增加酵母菌保存於-20°C下的存活能力。2008年陳勁初博士(註4)也發表利用海藻醣保存樟芝之菌



圖二、菇類菌絲生長在試管底部留下2-3公分高度的馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(如左圖)，置於4°C的冰箱中，可以保存半年以上，若將所有培養基均成斜面(如右圖)，則易使培養基慢慢乾掉，導致菌絲死亡。

種，發現1年之後，菌絲的存活率依然很好。此一方法是將菇類菌種培養於PDA培養皿中，然後置於24°C之定溫箱中培養7~10天，以消毒過之移植針切取菌落邊緣之菌絲塊（直徑0.3~0.5cm），移植於可耐低溫的冷凍保存管中（如圖四），再加入1 ml消毒過的10%甘油或1M海藻糖溶液，封好瓶口，經室溫靜置過夜後，讓甘油或海藻糖可滲入細胞內，然後置於-80°C下保存。一般菇農不大可能購買-80°C的冰櫃，建議可購買小型-20°C的冷凍櫃中（不會自動除霜溫度



圖三、將菇菌絲塊放入消毒過的蒸餾水中，可以保持菌種活性長達數月之久。



圖四、將菌絲塊放入可耐低溫的冷凍保存管中，再加入抗凍劑如海藻糖或甘油，可以在-20°C或-80°C作中長期之保存。

才會穩定，不像家裡冰箱的冷凍櫃，重複除霜及解凍的過程，造成溫度變化很大，影響菌種保存活性）。另外，在放置於-20°C之前，可以先於4°C冰箱中放置半天至1天的時間，以減少溫度驟降對於菌種之負面影響。

三、結語

有句諺語說「不要把所有的雞蛋放在同一個籃子裡」，由於沒有一種方式能夠百分之百保證菇類菌種的活力不會退化，而不同的菇種或不同的菌株對於不同的保存的方法也有其不同的適應性，因此為了分散風險，建議同一個菌種至少使用兩種以上的保存方式，以防因跳電或其他不明原因造成無法取得活力較佳之菌種作為接種源，此外，在大量擴大繁殖前，最好先進行少量的出菇試種確定產量及菇體品質，之後再大量製作菌種作為商業生產之用。所謂「工欲善其事，必先利其器」，優良的菌種就是用以栽培菇類的利器，而良善的菌種保存方式就是這把利器的磨刀石。

註1：彭金騰。2008。杏鮑菇菌種製作技術要點。菇類專業栽培進階班講義第19頁至25頁。農業委員會農業試驗所編印。

註2：王伯徹。2003。菇類的基礎研究與保健食品之應用開發。食用菇草栽培訓練班講義。農業委員會農業試驗所編印。

註3：Hirasawa, R., K. Yokoigawa, Y. Isobe, and H. Kawai. 2001. Improving the freeze tolerance of baker's yeast by loading with trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 522-526.

註4：陳勁初。2008。牛樟芝及其他菇類產品之生產與加工。食品工業40(5)：43-49。