

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

最佳(鄉土)教材獎

040711

五節芒裡的發光小精靈

學校名稱：國立竹南高級中學

作者： 高二 黃 奕	指導老師： 李淑萍
---------------	--------------

關鍵詞：螢光黴菌、尖石山區、螢光誘導生殖配對

摘要

新竹縣尖石鄉山區，發現一種能於黑暗中發出可見之淡綠色螢光的五節芒，且皆必定是遮蔭處潮濕傾倒斷裂腐敗的五節芒片斷，其餘六個樣區經日夜實地採樣勘察，皆未發現發光樣品。經密集且大量之多株五節芒切片顯微鏡觀察，打光與暗房攝影比對，確定發光生物是一種文獻尚未記載之陸生黴菌，該黴菌與五節芒之間可能呈專一共生性。由實驗觀察此螢光黴菌生活史可分為三期：細絲期、藻狀期、珊瑚狀期，其菌絲有分枝且多核無橫隔，絕大部分皆分布於細胞內，細絲期可藉由菌絲穿過細胞壁上較薄之壁孔以散布其族群。該黴菌之螢光經實驗結果証實能誘導菌絲朝向營養源生長，以利菌絲進行聚集配對，並進行有性生殖。分類先暫定為無鞭毛黴菌門、接合菌亞門、接合菌綱之新種。

壹、 研究動機

從小到大，我超熱愛生物學，在高一基礎生物學習到第三章的分類系統，對自然界物種存在與角色讓我想一探究竟。在此時，偶然間聽聞新竹縣尖石鄉的某處山上農地，發現竟然有能在暗野下發出淡綠色螢光的芒草殘莖，且不論日夜，皆能於潮濕陰暗環境下持續數月甚至數年地穩定發光，這實在太神奇了！這激起我想一睹其廬山真面目，並弄清楚它是何物？是生物嗎？有什麼樣外觀？如何發光？如何繁殖？它的生態分布如何？

貳、 研究目的

- 一、由於未曾在任何正式文獻上查閱到此螢光黴菌，於是令我想了解這種會發出淡綠色螢光黴菌的分類，這也是我想研究的主要目的。
- 二、因調查其生態環境時，發現此生物之分布與行蹤十分撲朔神秘，這激起我想弄懂其生活史與其生態特性，因為在研究過程中，發現該黴菌被局限於細胞腔室中，它究竟如何與外頭聯繫？又如何能在營養貧瘠的環境中，能迅速與它的另一半相遇？並能有效率地繁衍下一代？這讓我好奇它們如何藉著穿透細胞壁之螢光來傳遞訊息，並誘導其生長方向，甚至主導其生殖配對。
- 三、經實驗結果發現該黴菌於較低之溫度下(15°C左右)具有之白光對螢光發射的抑制性，因此設計出一系列實驗以證明螢光誘導之現象，也想了解螢光對該生物之效能與意義。

參、 研究設備及器材

一、 螢光黴菌採樣暨生態調查之器材：

手電筒 (三枝)	沸水 (一 500ml)	電池 (十餘個)	塑膠袋 (一個)	玻璃杯 (一個)
汽車 (一輛)	棉手套 (數雙)	大圓鏟 (一個)	鋤頭 (一個)	大形塑膠袋 (五個以上，100 x70cm)
溫度計 (一個)	鋒利美工刀 (數枝)	暗房 (一間)	類單眼數位相機 (一台)Canon EOS 650D	植物圖鑑 林信輝(2003)、鄭春元(1984)
剪刀 (數個)	冰箱 (一台)	保鮮膜 (一盒)	玻璃杯 (十五個)	

二、 螢光黴菌之微棲所(microhabitat)生態調查：

複式顯微鏡 (1 台)	不鏽鋼殺菌盒 (1 個)	鑷子 (1 枝)	美工刀 (數個)	滴管 (數枝)
類單眼數位相機 (1 台) Canon EOS 650D	蒸餾水 (1 杯 100ml)	蓋玻片 (數盒、100 片裝)	殺菌釜 (1 台 Tomin-320 121°C 1.21 Kgw/cm ²)	載玻片 (1 盒)
柏木油 (1 瓶)	暗房 (1 間)	丙酮 (1 瓶)	拭鏡紙 (1 包)	

三、 以數種黴菌專用培養基【解惟棠和夏滄琪(2004)】繁殖螢光黴菌之器材：

一升圓底燒 (1 L)	鋁薄紙 (1 盒)	拋棄式平面培養皿 (60 片、已殺菌)	不鏽鋼 殺菌盒	
試管 (60 枝)	試管蓋 (60 個)	果汁機 (1 台)	蒸餾水 (1L)	
美工刀 (1 枝)	自製之抽風櫥 (1 台) (如圖一，家裡用的 吸油煙機以保鮮 膜包附)	廣用試紙 (1 盒)	馬鈴薯 (2 個)	
過濾用手帕 (1 張)	麥芽萃取物 (1 瓶 Difco)	酵母萃取物 (1 瓶 Difco)	葡萄糖 (1 瓶)	
				圖一

(一)麥芽抽出物瓊脂培養基(Malt Extract Agar) 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】	(二)不加瓊脂之液態麥芽抽出物培養基 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】
1、麥芽萃取物 10g 2、葡萄糖 4g 3、瓊脂 20g 4、蒸餾水 1L 5、pH7.0	1、麥芽萃取物 10g 2、葡萄糖 4g 3、瓊脂 0g 4、蒸餾水 1L 5、pH7.0

(三)酵母、麥芽瓊脂培養基(Yeast Malt Agar) 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】	(四)不加瓊脂之液態酵母、麥芽培養基 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】
1、酵母萃取物 10g 2、麥芽萃取物 10g 3、葡萄糖 4g 4、瓊脂 20g 5、蒸餾水 1L 6、pH7.0	1、酵母萃取物 10g 2、麥芽萃取物 10g 3、葡萄糖 4g 4、瓊脂 0g 5、蒸餾水 1L 6、pH7.0

(五)馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar) 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】	(六)不加瓊脂之液態馬鈴薯葡萄糖培養基 【張東柱(1983)；夏滄琪和張豐吉(2002)】
1、馬鈴薯汁 1L 2、葡萄糖 20G 3、瓊脂 20G 4、蒸餾水 1L 5、pH7.0	1、馬鈴薯汁 1L 2、葡萄糖 20g 3、瓊脂 0g 4、蒸餾水 1L 5、pH7.0

四、 螢光黴菌生理特性測定之器材：

日光燈(1 台 LED 燈為光源)(博視燈 MT6000 6W)	手錶 (1 個)	電池 (4 個)	發光腐莖 (15 枝)	大水桶中 (20L)	溫度計 (1 個)
暗房 (1 間)	暗房 (1 間)	冰塊 (5Kg)	熱水 (5L)	自來水 (20L)	手電筒 (1 枝)
試管 (3 枝)	吹風機 (1 台)	烘箱 (1 台)	蒸餾水 (20ml)	電子秤 (1 台)	暗房 (1 間)
大廣口玻離瓶(一個、6L、口內徑 9.5cm)	雙氧水 (35%、3 瓶)	燒杯 (5 個 100ml)	薊頭漏斗 (1 個)	打孔橡膠塞 (1 個)	有側枝耐熱集氣瓶 (2 個)
橡膠軟管 (2 條，50cm)	夾鍊塑膠袋 (一個，20×20cm)	大白色塑膠置物箱(當作水槽、85×40×40cm)	自來水 (約 50L)	亞硝酸鈉 (1 瓶)	氯化銨 (1 瓶)
未打孔橡膠塞(1 個)	棉布手套 (1 雙)	酒精燈 (1 瓶)	類單眼數位相機 (1 台) Canon EOS 650D	/	

五、 螢光黴菌之螢光誘導生殖配對實驗：

細棉繩 (20cm 長，6 條)	五節芒非發光短腐莖 (6 枝)	殺菌釜 (1 台 Tomin-320 121°C 1.21 Kgw/cm ²)	不鏽鋼殺菌盒 (1 個)
新購鋒利美工刀 (數枝)	類單眼數位相機 (1 台) (Canon EOS 650D)	暗房 (1 間)	燒杯 (1 個 500ml)
小塑膠袋 (2 個)	鑷子 (1 枝)	比對用之明暗野下放大照片	複式顯微鏡 (1 台) (Hamlet XSZ-107E 目鏡 10×、物鏡：5×、10×、40×、100×)

肆、 研究過程或方法

一、 螢光黴菌採樣暨生態調查與閱讀文獻初步了解五節芒生態：

(一)我與家人攜手電筒前往該農地行夜間採樣，採取發光樣品十餘枝，經由圖鑑判定【鄭春元(1984)，林信輝(2003)】，確定是五節芒(*Miscanthus floridulus warb*)殘莖樣品才能發光(即俗稱菅芒花、巴茅)；而另一類植物為白茅(*Imperata cylindrica beauv*)，已確定它的殘莖不能發光。

(二)五節芒生態文獻之查閱與了解【鄭春元(1984)，林信輝(2003)】

(三)五節芒的發光成因是否是生物之確定：

將農場採集到的發光五節芒殘莖(6 枝)置入沸水中，發現其螢光立刻熄滅，表示其為生物性發光。

(四)螢光黴與五節芒之生態調查與採樣：

1.採樣的地點於北台灣之台三線道路附近，一共有七大樣區，分別為(新竹尖石、新竹北埔、新竹峨眉、新竹香山、新竹寶山、苗栗三灣、苗栗大湖馬拉邦山)，於 2012 年內分數次於不同月份進行採樣與觀察(表一)。

2.採樣與觀察時間由下午至夜間進行，每次採樣僅一個地點，採樣時皆進行人與物之攝影存證；為了明瞭每一個採樣地點的氣候，故每樣區於不同季節共進行四至五次觀察。

3.樣品的種類以五節芒為主，採樣時若發現有其它種類的植物根、莖、葉、或殘骸若能發光者皆一併帶回且拍照存證。

4.採樣地點之特質記錄，例如海拔高度、濕氣、當日溫度、樹木是否成蔭、附近是否有小溪或水源。

5.採樣時須戴棉手套以防割手，且攜帶大圓鏟或鋤頭與手電筒。

6.五節芒樣品分成四大類：

(1)發光五節芒殘骸。

(2)非發光五節芒殘骸。

(3)新鮮五節芒之直立樣品。

(4)枯死五節芒之直立樣品。

7.新鮮直立之五節芒叢(每叢內含十餘株)，其往往攙混著幾株枯死的五節芒植株，兩者皆以大圓鏟或鋤頭連根挖起，每樣區採該樣品三大叢，先抖去過多的土壤，再個別置入大形塑膠袋帶回。

8.傾倒的五節芒殘骸，不發光者，於採樣時，儘量拾取六枝，置入大型塑膠袋並加入 5ml 的蒸餾水於袋內帶回，並充滿空氣密封保濕。

9.發光的樣品(傾倒發光的五節芒殘骸為主)於採樣當下立即置入大型塑膠袋內，加入 5ml 的蒸餾水於袋內帶回，並充滿空氣密封保濕。

(五)採回之五大類樣品製作成根莖葉等次樣品之前處理：

- 1.採回之樣品，有些十分巨大(數米高)，需在當日立即以美工刀與剪刀進行初步樣品篩選切割與分類，五大樣品群不論發光與否，皆分成根、莖、葉(約 10cm)長之次樣品，並註明採樣地點、日期；處理所有樣品時皆以打燈和不打燈交替觀察，以鑑定其是否發光，凡含有發光之部位者一定被選取為次樣品，次樣品置入玻璃杯後，再以塑膠袋包起保濕，並置入冰箱冷藏室。
- 2.凡是次樣品能發光者，皆以固定好腳架之類單眼數位相機(Canon EOS 650D)於暗房(曝光 30 秒)與打光下(曝光一秒)各拍數張照片，以證明其確實能發光。拍攝完畢之後再置入冰箱冷藏。

(表一) 所有樣區採樣日期與計劃欲採取之五大樣品群：

採樣地點 日期 ↓	樣品種類→	發光五節芒殘骸	非發光五節芒殘骸	新鮮五節芒直立植株 (不論發光與否)	枯死五節芒直立植株 (不論發光與否)	其它種植物根、莖、葉、或殘骸能發光者
	欲採取樣品數量↘					
新竹尖石 2012 / 08 / 05		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
新竹香山 2012 / 09 / 02		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
新竹寶山 2012 / 09 / 16		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
苗栗三灣 2012 / 10 / 14		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
苗栗大湖 馬拉邦山 2012 / 10 / 28		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
新竹峨眉 2012 / 11 / 18		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回
新竹北埔 2012 / 12 / 23		6 枝	6 枝	3 叢	已含於 3 叢內	盡量拾取帶回

二、 螢光黴菌之微棲所(microhabitat)生態調查與發光生物為何之確定：五節芒組織和螢光菌絲顯微攝影、一般暗野攝影與暗野顯微攝影。

- (一)採集回來的五大樣品群皆分成根莖葉次樣品，並於一週內切片顯微鏡觀察，發光樣品之切取，不論發光部位與非發光部位皆必須取樣，且各佔一半，並製成檢體玻片，彼此互相比對，以判定發光生物為何。而非發光樣品，每一次樣品(根、莖、葉)則以隨機方式採取檢體。
- (二)發光檢體之切取，先於暗房中，使眼睛適應黑暗數分鐘後，再以肉眼仔細觀察樣品發光位置並牢記之，開燈後，立即以鑷子與美工刀切取發光部位之薄切片(厚約 10 ~ 5

- μm)，然後再迅速關燈確定精薄切片是否能發光，此步驟必須快速進行，因薄切片易失去水分而不亮，避免造成取樣誤判。
- (三)切取之檢體薄片，一定要夠薄且足以透光，先以滴管加一滴蒸餾水，蓋上蓋玻片製成檢體玻片，再置於複式顯微鏡下觀察。
- (四)以顯微鏡(目鏡 10x、物鏡： 5x、10x、40x、100x)分別仔細鏡檢，盡量搜尋切片上所有生物種類，並拍照與記錄優勢生物(表二)。
- (五)將上述發光檢體置暗房中，切掉顯微鏡電燈開關，於一片漆黑中以較高倍率物鏡頭觀察(目鏡 10x、物鏡：40x、100x)，皆無法於暗視野下觀察到螢光，只有一片漆黑，即使利用類單眼數位相機長時間曝光亦無法捕任何捉影相。但發光腐莖整段放置於顯微鏡下觀察，並切掉顯微鏡電燈開關，以目鏡 10x與物鏡(5x、10x)於暗視野中進行觀察，卻能以肉眼透過鏡頭粗略模糊觀察樣品表面之發光區域，此時將手電筒直射該發光腐莖，以肉眼透過鏡頭觀看腐莖反射之畫面，發現能看腐莖淺層細胞內之微生物相，在暗房中於明暗交替下進行觀察，以比對所觀察之生物是否有螢光；以此法能排除非發光生物種類(請詳看照片與討論)，並能初步鑑定發光生物為莖桿細胞內之細絲藻狀黴菌(螢光黴菌)。使用類單眼數位相機於此倍率下長時間暗視野曝光(曝光三十秒)，將上述之畫面攝影。
- (六)確定發光生物是藻狀之螢光黴菌後，有系統的將植物各部位切成薄片觀察組織切片與螢光菌絲分布情形，以類單眼數位相機(Canon EOS 650D)之鏡頭，貼著顯微鏡之目鏡(曝光一秒)，拍下諸樣品放大之視野畫面，並將螢光黴菌所居住之細胞種類與細胞特質記錄(表二)。
- (七)使用複式顯微鏡 100x之高倍接物鏡頭時，必須滴加柏木油，以獲得良好視野品質。
- (八)由於使用了很多種培養基皆無法培育該發光生物，因此使本研究難度大增；為了再次確定何者為發光生物，故將經過高熱殺菌過(殺菌釜)的非發光五節芒枯枝，加入含發光莖桿的保濕塑膠袋中，希望透過高熱殺菌過的非發光五節芒枯枝，能被發光生物感染而發光，並比對感染前、後，微生物種類之差異。經實驗結果發現，經高溫殺菌過的非發光五節芒枯枝因感染螢光黴菌而發光，而且其發光部位之組織細胞空腔內增加了大量細絲藻狀黴菌。
- (九)為了要審慎再次確定發光生物究竟為何種生物，我將上述(八)之感染枯枝，仔細用肉眼觀察莖桿，發現感染枯枝表面竟然留有斑點狀的白色菌絲塊(1~3mm)，完全不同於往常菌絲隱藏於樣品細胞內。且置於暗房中，該白斑狀菌絲團能發出螢光，於是以鑷子採樣，並製成檢體於顯微鏡下觀察，發現有大量之透明細絲藻狀黴菌與珊瑚狀黴菌。

(表二)計劃欲採集的五大樣品群之次樣品檢體玻片種類與數量

採樣地點 日期 ↓	樣品種類 →	發光五節 芒殘骸	非發光五節 芒殘骸	新鮮五節芒 直立植株 (不論發光與否)	枯死五節芒直 立植株 (不論發光與否)	其它種植物 根、莖、葉、或 殘骸能發光者
	欲切取檢 體數量 (片)↘	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉
新竹尖石 2012 / 08 / 05		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
新竹香山 2012 / 09 / 02		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
新竹寶山 2012 / 09 / 16		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
苗栗三灣 2012 / 10 / 14		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
苗栗大湖 馬拉邦山 2012 / 10 / 28		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
新竹峨眉 2012 / 11 / 18		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18
新竹北埔 2012 / 12 / 23		30 30 30	18 18 18	18 18 18	18 18 18	18 18 18

三、以數種黴菌專用培養基繁殖螢光黴菌：

各種瓊脂培養基(Malt Extract Agar、Yeast Malt Agar、Potato Dextrose Agar)按其規定配方分次置於一公升圓底燒瓶內，並包妥鋁箔紙，而各種不含瓊脂之液體培養基(Malt Extract Broth、Yeast Malt Broth、Potato Dextrose Broth)，按其規定配方分次滴入試管架上之二十枝試管內，再將燒瓶與試管架共置於不鏽鋼殺菌盒中，另加入 500ml 蒸餾水於釜內，不鏽鋼殺菌盒加蓋置入殺菌釜中加熱三十分鐘滅菌。待排氣結束後，殺菌完畢，打開殺菌釜取出圓底燒瓶與試管架，倒除釜內剩水，切斷電源置妥；於自製之抽風廚(如圖一，家裡用的吸油煙機以保鮮膜包裹)內傾倒含瓊脂之培養液於已經殺菌過之平板培養皿中(每次 20 個，共 3 次)，加培養皿蓋後待其冷卻硬化成形。

將發光芒草腐莖之發光處切製為小段切片(長 1cm、共 60 片)，分別置於 1 片於三種液體試管培養基內培育(Malt Extract Broth、Yeast Malt Broth、Potato Dextrose Broth)(共 60 枝)；另取發光芒草腐莖 10g，加入蒸餾水打成汁液(1L)製為接種來源，以消毒過之銀耳(接種環)，沾取微量液體輕塗抹接種於各種平板培養基上，置於室溫下培養三日至十餘日，並每日觀察樣品能否於暗野下發光。

四、 螢光黴菌生理特性之測定：

(一)不同溫度下，螢光發射之白光抑制性研究：

分別於 15°C(2013 年一月)、20°C(2013 年三月)、25°C(2012 年十一月)、30°C(2012 年九月)四種溫度下做此實驗，預先將三個發光腐莖樣品置於暗房數日，再一同置於檯燈下照射白光(LED 燈為光源)(博視燈 MT6000 6W)(樣品離光源 20cm)十分鐘、一小時、二小時，一受試者已先於暗房內適應黑暗十分鐘，再請家人將此三發光腐莖由暗房外遞給暗房內之實驗者，暗房內之實驗者記錄開始復光的時間。

(二)螢光發射強度與溫度相關之實驗：

一人與放置發光腐莖之三試管先於暗房裡適應十分鐘，以利瞳孔放大而能於微弱紅光下操作實驗，再請家人分次將不同水溫(5、10、15、20、25、30、35、45°C)之大水桶中(20L)，由外遞入暗房，水桶內置一溫度計，並以加入冰塊或熱水之方式調溫。暗房內之觀察者將含發光腐莖之試管隔水浸泡於水中五分鐘後，再以燒杯盛取 3/5 杯之水並連同放置發光腐莖之三試管，置於桌上固定位置，迅速以類單眼數位相機曝光三十秒照相，以拍攝同一腐莖樣品之於不同溫度下之亮度。找到不再發出螢光之溫度之後，再細做此實驗，求出不再發出螢光之最高與最低溫度，製成相對亮度與溫度之曲線圖。

(三)螢光發射強度與樣品含水量之實驗：

將三枝發光腐莖事先秤重，並計錄其克數，於暗房中以吹風機吹微弱暖風，保持 30cm 距離，直至腐莖成乾燥不發光為止，再秤其重量。完畢後，將這些樣品加少許蒸餾水，再重置入保濕袋中使之恢復發光活性，數日後取出發光腐莖，逐漸滴加水於此樣品，並求出其不再發光之克數，秤重並記錄克數。完畢後，將此些樣品置入烘箱中，設定 100°C，兩小時後，待冷卻測其乾重，然後推算各樣品能發光之最高、最低含水百分比。另外，以不同之三段發光腐莖樣品，浸入淺水杯中，使該螢光黴菌仍有充分的氧氣而能於水中存活，觀察其光度之變化。24 小時後，取出並以衛生紙拭乾至正常濕度，置於暗房觀察其是否有螢光，並以類單眼數位相機曝光三十秒，拍攝三個腐莖照片。

(四)螢光發射強度與 O₂ 濃度之實驗(製備氮氧混合氣體，含氧莫耳分率各別是 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1)：

以雙氧水、二氧化錳、與薊頭漏斗進行排水集氣法收集純氧，剛產生者不收集，等排放一段時間後，將倒置且充滿水的大廣口玻璃瓶(6 L)分次以導管充入其玻璃瓶體積 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1 之純 O₂；再以適量亞硝酸鈉與氯化銨置於另一有側支集氣瓶內，封塞後以酒精燈進行加熱約十餘分鐘，直至混合物呈現黃褐色並緩緩排出氮氣與水蒸氣，以排水集氣

法收集 N₂，剛產生者亦不收集，等排放一段時間後，再以前述已置入氧氣之大廣口瓶收集氮氣至滿瓶止，分次製備出總壓一大氣壓，含氧莫耳分率分別是 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1 之混合氣體。以夾鍊塑膠袋包住三個發光腐莖樣品，再將大廣口瓶壓入水槽深處，以橡膠軟管將混合氣體充分導入夾鍊袋中，完畢後密封夾鍊，並關燈等待三十分鐘後，以類單眼數位相機拍照三個發光腐莖。相同三個發光腐莖樣品一共於數小時內完成不同氧氣莫耳分率下之發光強度實驗。

五、 螢光黴菌之螢光誘導生殖配對實驗：

加入 500ml 蒸餾水於殺菌釜中，另置入六小段(各長約 6cm)不發光之芒草腐莖於 500ml 燒杯內，經鋁箔密封後，再將其置入不鏽鋼殺菌盒內，蓋妥後放入殺菌釜中加熱三十分鐘殺菌。完畢冷卻後，倒除釜內剩水，切斷電源置妥。再將此殺菌過之芒草腐莖與發光腐莖以細線平行綁在一起，加 1ml 蒸餾水於保濕塑膠袋內，培養過程分成暗房組與照光組(各含 3 枝殺菌過之芒草腐莖與 3 枝發光腐莖)；照光組用 LED 燈為光源(博視燈 MT6000 6W)，該燈無紫外線，樣品離光源 20cm。於 2013 年一月底，15°C 左右，光照組之螢光被光照抑制，分兩袋培養一週後，解袋取出，並將細線剪斷，發現僅有暗房中之三組平行綁在一起的兩根莖條，彼此因黴菌生長貫穿而緊密相連，而光照組之菌絲相連現象則不明顯。待輕輕撕開緊密相連之暗房組莖條後，發現殺菌過之芒草腐莖表面皆附著較多的白色菌絲塊，而照光組則幾乎無菌絲塊出現；將樣品與相機雙方位置固定後，於暗野下以曝光三十秒攝影菌絲塊較多之殺菌過五節芒腐莖，並於打光下再攝影其一次，且曝光一秒；仔細比對同一樣品之菌絲塊於暗房與打光攝影之差別，洗出之照片經過放大，仔細比對菌絲塊與螢光分布情形，將照片附於實驗結果中。

伍、研究結果

一、 螢光黴菌採樣暨生態調查之結果：

(表三) 所有樣區之觀測日期與生態環境調查：

採樣地點 觀測日期	(採樣當下) 當日該地度	總評該地 潮濕與乾燥	海拔高度	樹木成蔭	附近有溪 流水源
新竹尖石 2012 / 08 / 05 2012 / 10 / 21 2013 / 01 / 26 2012 / 03 / 10	32°C 28°C 10°C 17°C	易起霧、表層泥土 濕、葉片常有水珠	約 700 米	樹木密集成蔭 猶如雨林	有
新竹香山 2012 / 09 / 02 2012 / 10 / 21 2013 / 01 / 26 2012 / 03 / 10	35°C 32°C 15°C 22°C	不易起霧、表層泥 土濕、葉片無水珠	約 150 米	樹木稀疏	有
新竹寶山 2012 / 08 / 12 2012 / 09 / 16 2012 / 10 / 21 2013 / 01 / 26 2012 / 03 / 10	34°C 30°C 32°C 13°C 22°C	不易起霧、表層泥 土乾、葉片無水珠	約 250 米	樹木稀疏	無
苗栗三灣 2012 / 08 / 12 2012 / 10 / 14 2013 / 01 / 26 2012 / 03 / 10	33°C 28°C 13°C 25°C	不易起霧、表層泥 土乾、葉片無水珠	約 250 米	樹木稀疏	無
苗栗大湖馬拉邦山 2012 / 08 / 12 2012 / 10 / 28 2013 / 01 / 26 2013 / 03 / 10	30°C 28°C 8°C 16°C	偶爾起霧、表層泥 土乾、葉片無水珠	約 700 米	樹木密集成蔭	無
新竹峨眉 2012 / 08 / 12 2012 / 10 / 21 2012 / 11 / 18 2013 / 01 / 26 2013 / 03 / 10	34°C 32°C 24°C 11°C 21°C	不易起霧、表層泥 土濕葉片無水珠	約 100 米	樹木密集成蔭	有
新竹北埔 2012 / 08 / 12 2012 / 10 / 21 2012 / 12 / 23 2013 / 01 / 26 2013 / 03 / 10	32°C 32°C 18°C 12°C 21°C	不易起霧、表層泥 土乾、葉片無水珠	約 100 米	樹木稀疏	有

海拔高度之來源： Google Earth 之世界地圖記載海拔高度

二、 螢光黴菌之微棲所 (microhabitat) 生態調查與發光生物為何之實驗結果：

(表四)所有樣區採樣日期與實際採取之樣品群：

採樣地點日期 ↓	樣品種類→	發光五節芒殘骸	芒非發光五節芒殘骸	新鮮五節芒直立植株 (不論發光否)	枯死直立五節芒植株 (不論發光否)	其它種植物根、莖、葉、或殘骸能發光者
	欲採樣品數量↘					
新竹尖石 2012 / 08 / 05		6 枝	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
新竹香山 2012 / 09 / 02		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
新竹寶山 2012 / 09 / 16		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
苗栗三灣 2012 / 10 / 14		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
苗栗大湖 馬拉邦山 2012 / 10 / 28		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
新竹峨眉 2012 / 11 / 18		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-
新竹北埔 2012 / 12 / 23		-	6 枝	3 叢 (共取出 6 枝)	同左 3 叢 (共取出 6 枝)	-

(圖二)七大樣區位置



(表五)五大樣品群之次樣品含螢光黴菌者的個數

採樣地點 日期 ↓	樣品種類→	發光五節芒殘骸	非發光五節芒殘骸	新鮮五節芒直立植株 (不論發光與否)	枯死直立五節芒植株 (不論發光與否)	它種植物葉片、莖桿、根、或殘骸能發光者
	含螢光黴菌之次樣品數量↘					
新竹尖石 2012 / 08 / 05		- *6/6 -	- ※3/6 -	※6/6 ※1/6 0/6	※6/6 ※3/6 0/6	- - -
新竹香山 2012 / 09 / 02		- - -	- 0/6 0/3	※6/6 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	- - -
新竹寶山 2012 / 09 / 16		- - -	- 0/6 0/6	※5/6 0/6 0/6	※3/6 0/6 0/6	- - -
苗栗三灣 2012 / 10 / 14		- - -	- 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	- - -
苗栗大湖 馬拉邦山 2012 / 10 / 28		- - -	- 0/6 0/1	※6/6 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	- - -
新竹峨眉 2012 / 11 / 18		- - -	- 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	※6/6 0/6 0/6	- - -
新竹北埔 2012 / 12 / 23		- - -	- 0/6 0/6	※4/6 0/6 0/6	※2/6 0/6 0/6	- - -
總計		- *6/6 -	- ※3/42 0/28	※39/42 ※1/42 0/42	※35/42 ※3/42 0/42	- - -

- : 表示未採到樣品

0 : 表示完全未觀察到

* : 表示數量多，易觀察到

※ : 表示數量零星出現，族群密度低

△ : 表示出現時之密度介於*與※之間

分數 : 分子表示含有螢光黴菌的樣品數; 分母表示總樣品數

(表六) 五大樣品之根莖葉次樣品，未經培育，直接以顯微鏡觀察到之優勢微生物種類總表

優勢微生物種類	樣品種類→	發光五節芒殘骸 (皆為尖石鄉)	非發光五節芒殘骸	新鮮五節芒直立植株 (不論發光否)	枯死直立五節芒植株 (不論發光否)	其它種植物根、莖、葉、或殘骸能發光者
	次樣品種類↘	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉	根、莖、葉
黴菌(圖三)菌絲黃褐色有橫隔，有分枝厚壁孢子，長於細胞內之黴菌		- *6/6 -	- *42/42 *28/28	0/42 0/42 0/42	0/42 *42/42 *42/42	- - -
黴菌(圖四)菌絲深咖啡色有隔，有分枝與孢子，長於外表之黴菌		- ※6/6 -	- ※3/42 ※20/28	0/42 0/42 0/42	0/42 ※3/42 *42/42	- - -
黴菌(圖五)透明無橫隔，無分枝，水黴狀菌絲、長於細胞內，能引起莖部，根部紅斑		- 1/6 -	- △8/42 0/28	△15/42 △10/42 0/42	△16/42 △11/42 0/42	- - -
線蟲(圖六)長約 1 mm，粗約 0.1 mm，寄生於組之內，透明可見其內臟器官		- ※6/6 -	- ※42/42 ※20/28	0/42 ※1/42 0/42	0/42 ※3/42 0/42	- - -
螢光黴菌(圖七)透明無橫隔，有分枝，呈細絲狀或海藻狀與珊瑚狀，長於細胞內		- *6/6 -	- ※3/42 0/28	※39/42 ※1/42 0/42	※35/42 ※3/42 0/42	- - -
黴菌(圖八)菌絲深色，有橫隔，孤立一枝孢柄，有孢子，著生於葉表之黴菌		- 0/6 -	- 0/42 0/28	0/42 0/42 △20/42	0/42 0/42 5/42	- - -

- : 表示未採到樣品

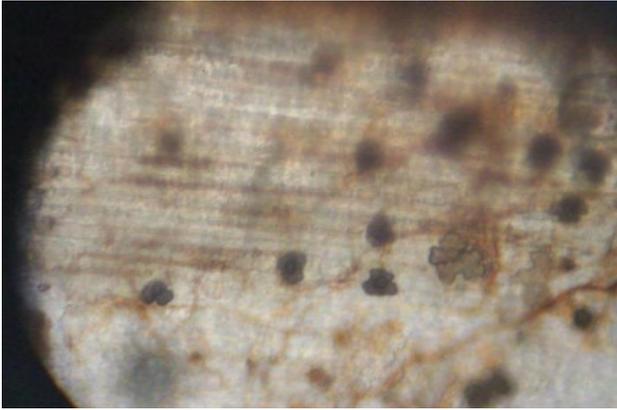
0 : 表示未觀察到

* : 表示數量多，易觀察到

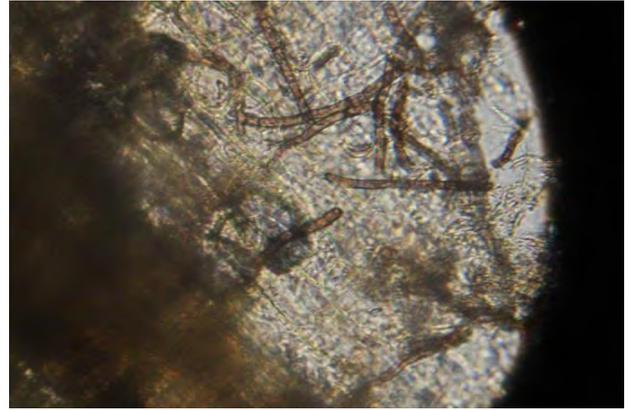
※ : 表示數量零星出現、族群密度低

△ : 表示出現時之密度介於 * 與 ※ 之間

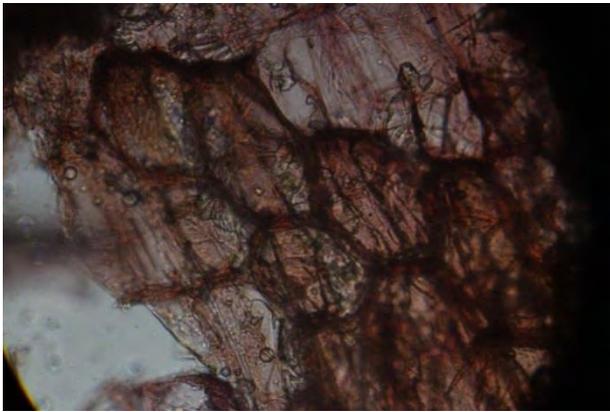
分數 : 分子表示含有螢光黴菌的樣品數; 分母表示總樣品數



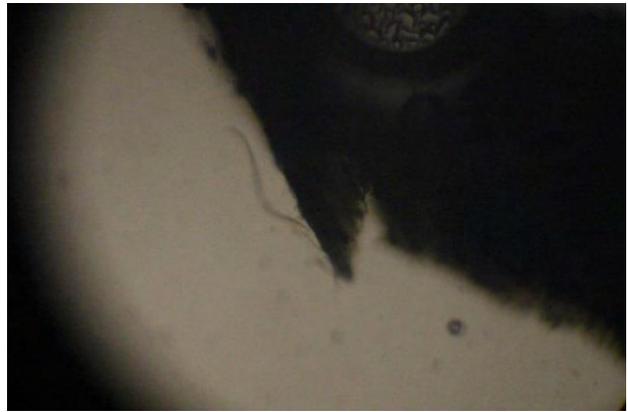
(圖三)(400 ×)



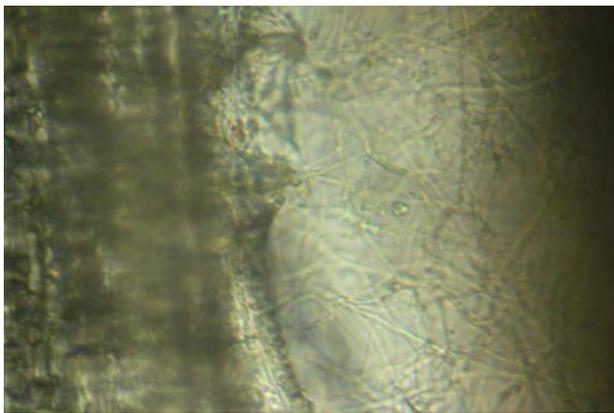
(圖四)(400 ×)



(圖五)(400 ×)



(圖六)(50 ×)



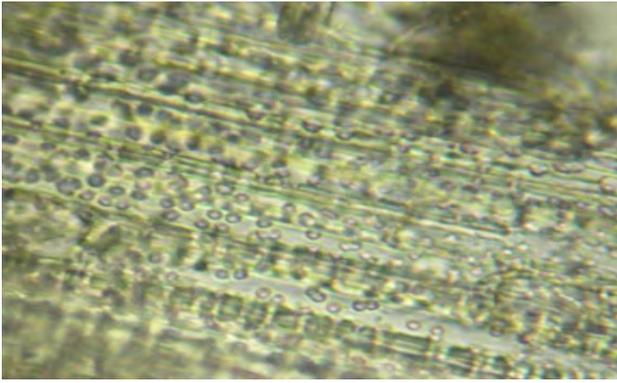
(圖七)
(螢光黴菌絲狀期) (400 ×)



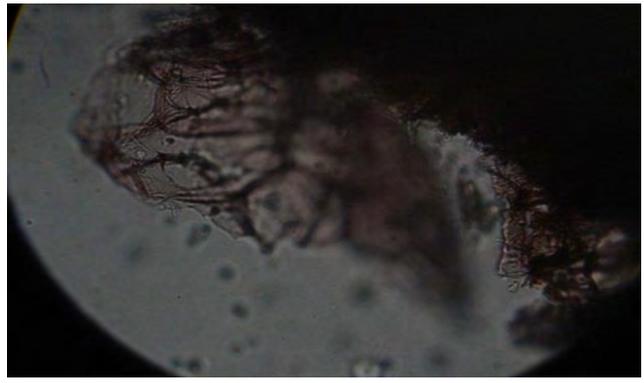
(圖八)(400 ×)

(表七) 螢光黴菌居住之細胞種類、特質與壁孔數量、壁孔厚薄：

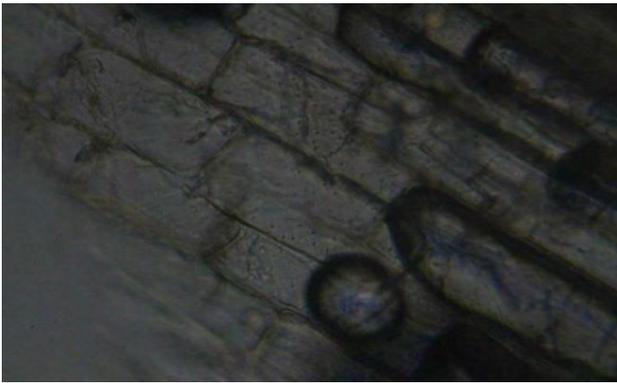
黴菌之樣品 出現螢光五節 芒之細胞類型與位置		發光腐莖亮區檢體 (相對比較用於縱行)	根 (相對比較用於縱行)
表皮細胞： 最外層	細胞外形： 細胞大小： 壁孔數量： 壁孔厚度： 壁孔大小： 細胞壁： 螢光黴菌：	較小、狹長(圖九) 約 100×30 μm 100~300 個/細胞 薄~厚皆有(<細胞壁厚度) 直徑 1~12 μm 較厚(0.5~1 μm) 常出現於壁孔較小較薄之細胞內(海藻狀與珊瑚狀)	多角形(圖十) 50×30 μm 20~0 個/細胞 較厚(<細胞壁厚度) 直徑 1~2 μm 較厚(0.5~0.8 μm) 常見其零星微量出現(細絲狀)
皮層細胞： 中層	細胞外形： 細胞大小： 壁孔數量： 壁孔厚度： 壁孔大小： 細胞壁： 螢光黴菌：	較大、長方形(圖十一) 約 150×50 μm 500~300 個/細胞 較薄(<細胞壁厚度) 直徑 1~5 μm 較薄(0.3~0.8 μm) 最常見其出現(細絲狀)	圓形(圖十二) 直徑約 100 μm 20~0 個/細胞 較薄(<細胞壁厚度) 直徑 1 μm 較薄(0.3~0.8 μm) 常見其零星微量出現(細絲狀)
髓心細胞： 最內層 (對破裂縱剖 的莖桿而言 亦為最外層)	細胞外形： 細胞大小： 壁孔數量： 壁孔厚度： 壁孔大小： 細胞壁： 螢光黴菌：	最大、正方形(圖十三) 約 100×100 μm 100~0 個/細胞 最薄(<細胞壁厚度) 直徑約 1 μm 最薄(0.5~0.3 μm) 常見其出現(海藻狀與珊瑚狀)	圓形(圖十四) 100×20 μm 10~0 個/細胞 最薄(<細胞壁厚度) 直徑約 1 μm 最薄(0.5~0.3 μm) 偶見其出現(細絲狀)
韌皮部： 中層	細胞外形： 細胞大小： 壁孔數量： 壁孔厚度： 壁孔大小： 細胞壁： 螢光黴菌：	細長成束(圖十五) 約 100×10 μm 0 個/細胞 無 無 較厚(0.5~1 μm) 未曾見其出現	細長成束(圖十六) 約 100×10 μm 0 個/細胞 無 無 較厚(0.5~1 μm) 未曾見其出現
木質部： 中層	細胞外形： 細胞大小： 壁孔數量： 壁孔厚度： 壁孔大小： 細胞壁： 螢光黴菌：	最長呈圓管狀，有圈環狀物體 約 1000 以上×50 μm(圖十七) 0 個/細胞 無 無 最厚(2~1 μm) 未曾見其出現	最長呈圓管狀，有圈環狀物體 約 1000 以上×50 μm(圖十八) 0 個/細胞 無 無 最厚(2~1 μm) 未曾見其出現



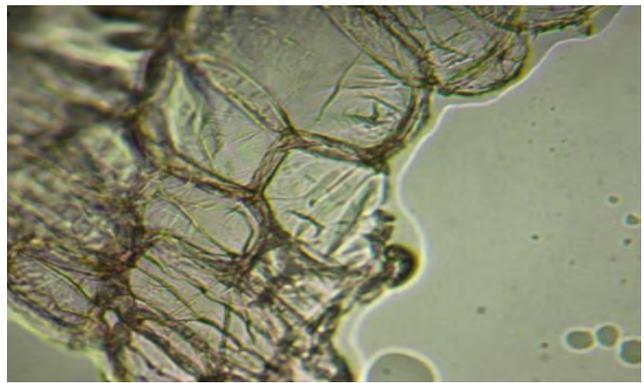
(圖九)(400 ×)



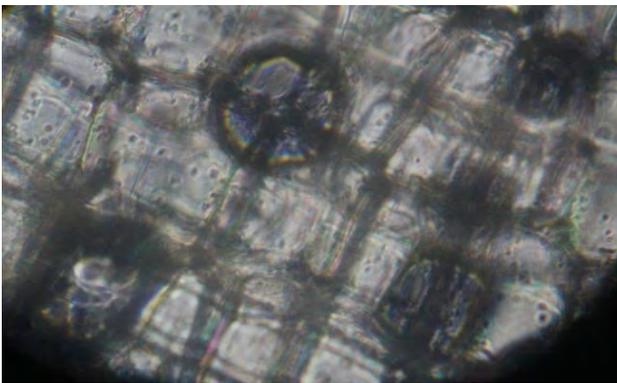
(圖十)(400 ×)



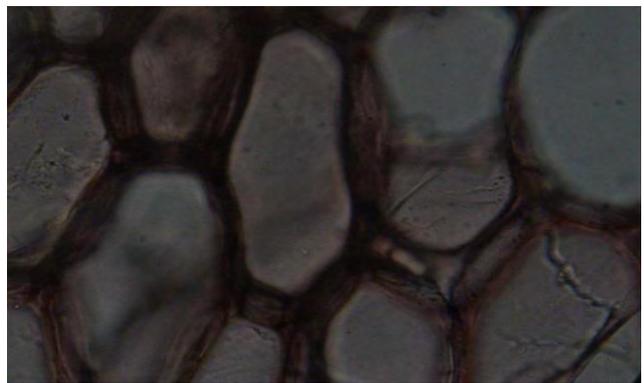
(圖十一)(400 ×)



(圖十二)(1000 ×)



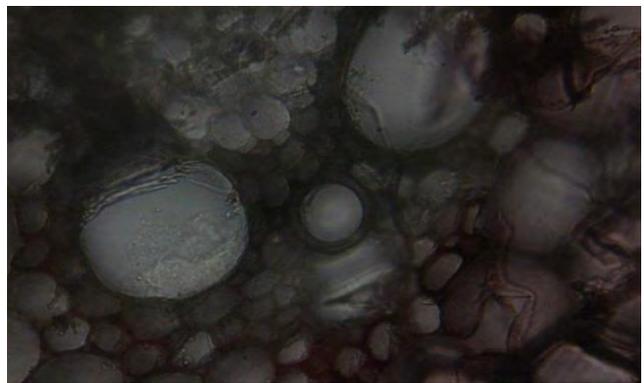
(圖十三)(400 ×)



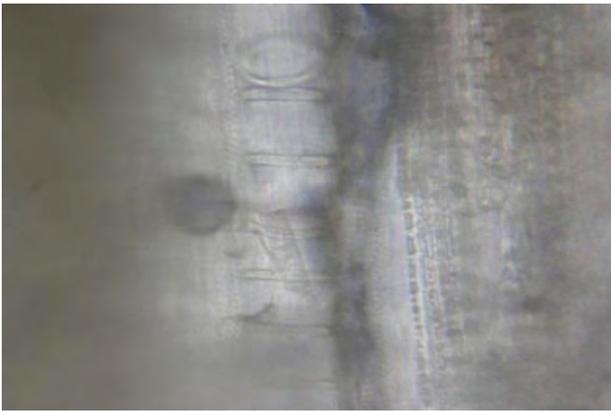
(圖十四)(400 ×)



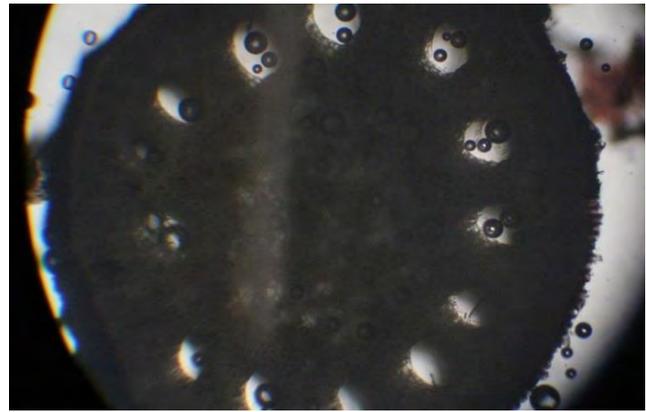
(圖十五)(1000 ×)



(圖十六)(400 ×)



(圖十七)(1000 ×)



(圖十八)(100 ×)

三、以數種黴菌專用培養基繁殖螢光黴菌結果：(表八)

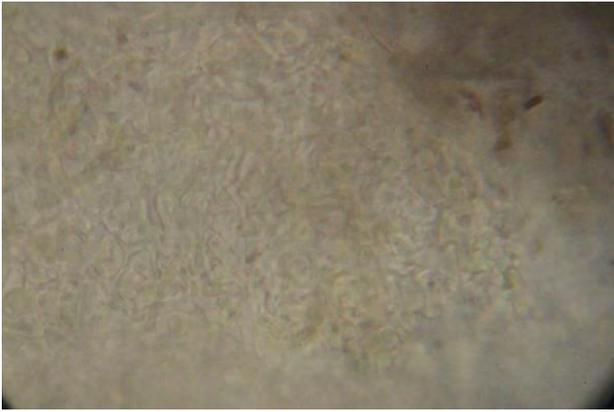
培養基 種類	Agar Plate 瓊脂平板			Broth Tube 湯汁試管		
	Malt Extract Agar (20 片)	Yeast Malt Agar (20 片)	Potato Dextrose Agar (20 片)	Malt Extract Broth (20 枝)	Yeast Malt Broth (20 枝)	Potato Dextrose Broth (20 枝)
螢光黴菌 (圖十九)	-	-	-	-	-	-
黴菌 (圖二十) (圖二十一)	+	+	+	-	-	-
	(8/20)	(5/20)	(3/20)			
黴菌 (圖二十一)	+	+	+	-	-	-
	(5/20)	(3/20)	(9/20)			
桿菌 (圖二十二)	+	+	+	+	+	+
	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)
球菌 (圖二十二)	+	+	+	+	+	+
	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)
原生動物 (無圖)	-	-	-	-	-	-

培養基培育出的優勢種細菌：一種為球菌，另一種為桿菌，所有培養基均可培育出兩種相同的優勢種細菌。

培養基培育出的優勢種黴菌：僅平板培養基能培育出，且均為兩種相同的優勢種黴菌。

+：表示該生物有於培養基中出現 -：表示該生物未於培養基中出現

分數：分子表示含有黴菌的樣品數;分母表示總樣品數



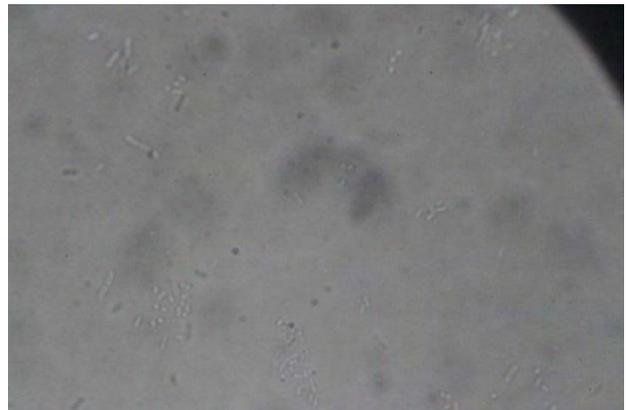
(圖十九)
(螢光黴菌珊瑚狀期) (1000 ×)



(圖二十)(100 ×)



(圖二十一)

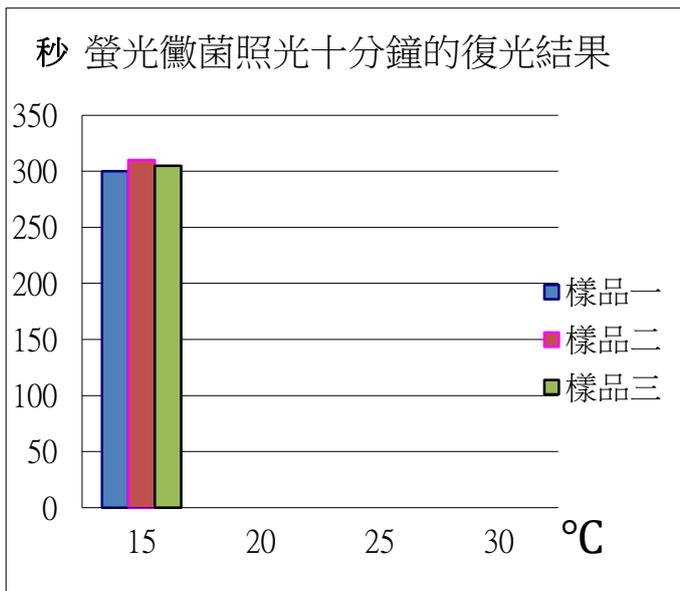


(圖二十二)(1000 ×)

四、 螢光黴菌生理特性之測定結果：

(一)照光十分鐘之復光實驗結果:(圖二十三)

表九

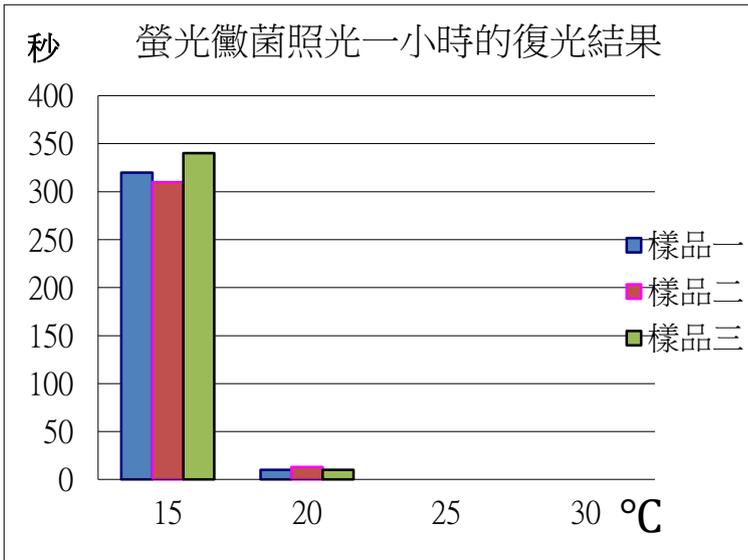


樣品 \ 秒	°C			
	15	20	25	30
樣品一	300	0	0	0
樣品二	310	0	0	0
樣品三	305	0	0	0

由圖二十三結果顯示出在十分鐘光照下，三個樣品在 15°C 都能在 300 秒左右復光，若超過 15°C 以上則能持續發光，無復光現象。

0: 表示能持續發光，無復光現象。

(二)照光一小時之復光實驗結果: (圖二十四)



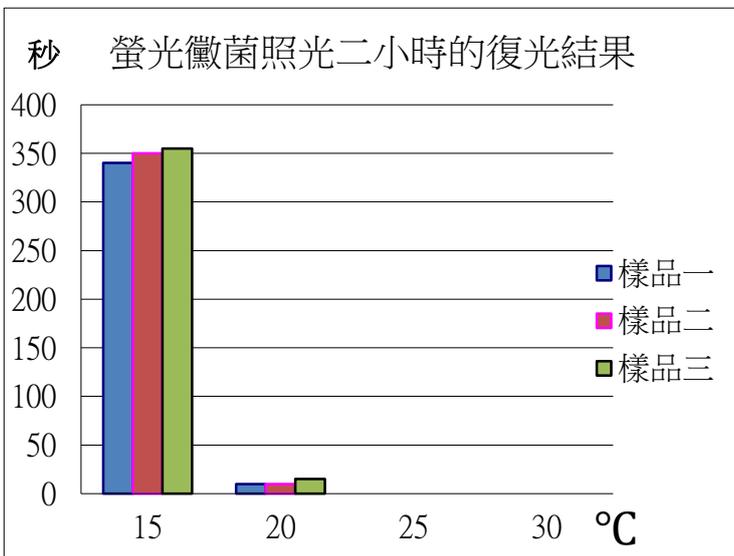
表十

樣品 \ 秒	°C			
	15	20	25	30
樣品一	320	10	0	0
樣品二	310	13	0	0
樣品三	340	10	0	0

由圖二十四結果顯示出在一小時光照下，三個樣品在 15°C 都能在 320 秒左右復光，則能持續發光，無復光現象。

0: 表示能持續發光，無復光現象。

(三)照光一小時之復光實驗結果: (圖二十五)



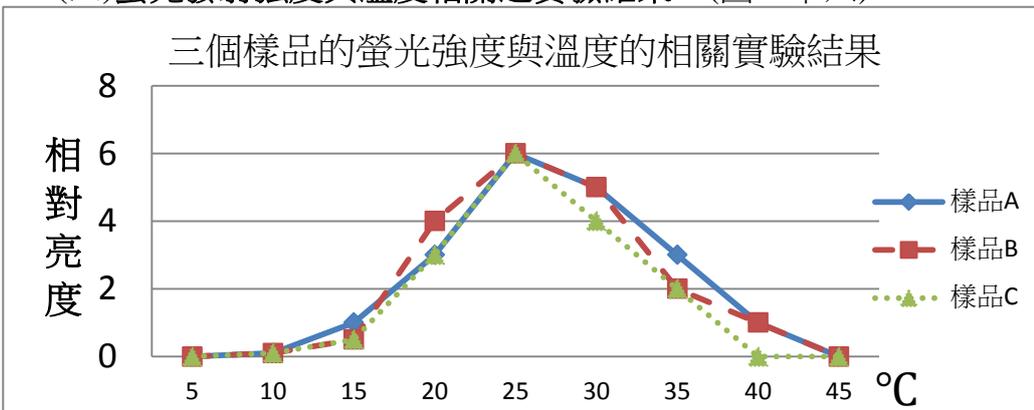
表十一

樣品 \ 秒	°C			
	15	20	25	30
樣品一	320	10	0	0
樣品二	310	13	0	0
樣品三	340	10	0	0

由圖二十五結果顯示出在二小時光照下，三個樣品在 15°C 都能在 350 秒左右復光，若 20°C 則為十秒左右復光，超過 20°C 則持續發光，無復光現象。

0: 表示能持續發光，無復光現象。

(四)螢光發射強度與溫度相關之實驗結果: (圖二十六)



總結: 由圖二十六的結果顯示 3 個樣品在溫度 10 ~ 35°C 內皆可發出螢光，且於 25°C 時相對亮度最強，其次是 30°C。

樣品 \ 相對亮度	°C									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
樣品 A	0	0.1	1	3	6	5	3	1	0	
樣品 B	0	0.1	0.5	4	6	5	2	1	0	
樣品 C	0	0.1	0.5	3	6	4	2	0	0	

表十二

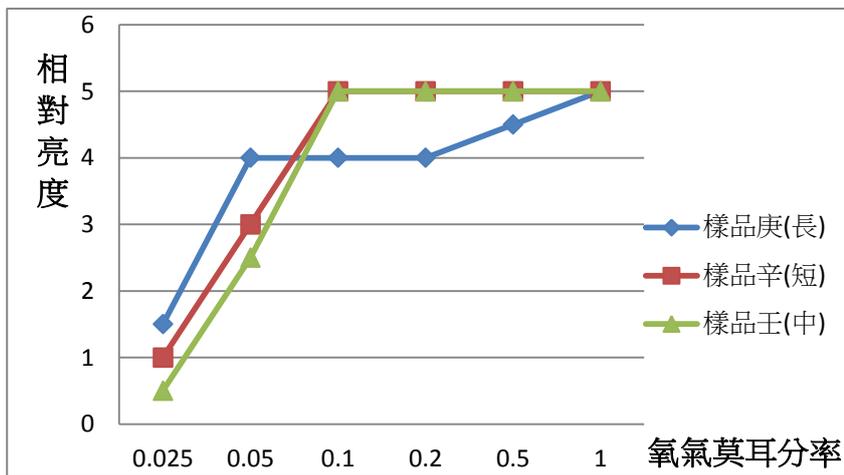
(五)發光腐莖之發光現象與樣品最低、最高含水量之關係(表十三)

樣品	樣品乾重	具發光現象之最低含水量與重量百分比	具發光現象之最高含水量與重量百分比
樣品甲	0.45g	0.56g 19.6%	1.50g 70.0% 完全吸濕至極限
樣品乙	0.25g	0.35g 28.0%	0.76g 67.2% 完全吸濕至極限
樣品丙	0.23g	0.23g 26.0%	0.64g 64.3% 完全吸濕至極限
平均%		24.5%	67.5%

(六)發光腐莖置於淺水杯之光度變化(表十四)

樣品	發光腐莖置入淺水杯一小時內之發光情形	發光腐莖置入淺水杯24小時後之發光情形	浸水24小時後腐莖恢復正常濕度，是否能再發光
樣品丁	浸泡於水中起初10餘分鐘內更發亮，但隨後漸黯淡，50分鐘後不再發光	完全不亮	完全不亮
樣品戊	浸泡於水中起初10餘分鐘內更發亮，但隨後漸黯淡，45分鐘後不再發光	完全不亮	完全不亮
樣品己	浸泡於水中起初10餘分鐘內更發亮，但隨後漸黯淡，1小時後不再發光	完全不亮	完全不亮

(七)發光腐莖之發光強度與 O₂ 濃度之實驗結果(系統總壓 1atm)：(圖二十七)

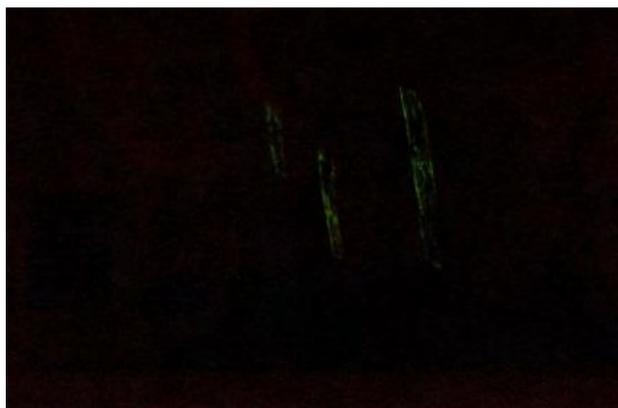


總結:由圖二十七的結果顯示出氧氣莫耳分率在0.2以上其相對亮度可達4~5;但若氧氣莫耳分率降至0.05,其相對亮度則為2~4之間;若氧氣莫耳分率至0.05以下則亮度呈顯著下降。也就是氧濃度越高則相對亮度越亮。

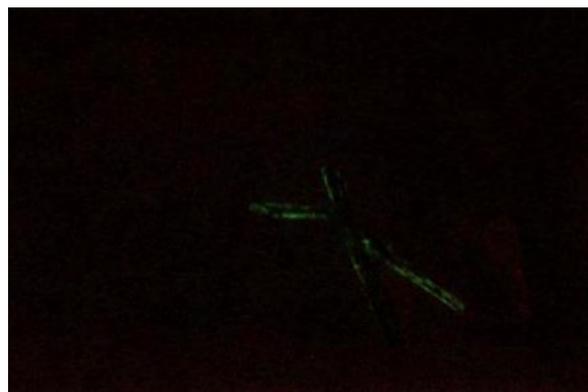
表十五

樣品 \ 相對亮度	0.025	0.05	0.1	0.2	0.5	1
樣品庚(長)	1.5	4	4	4	4.5	5
樣品辛(短)	1	3	5	5	5	5
樣品壬(中)	0.5	2.5	5	5	5	5

圖二十八~圖三十三為三個樣品於各個氧氣濃度中的發光情形



(圖二十八) ($X_{O_2} = 0.025$)



(圖二十九) ($X_{O_2} = 0.05$)



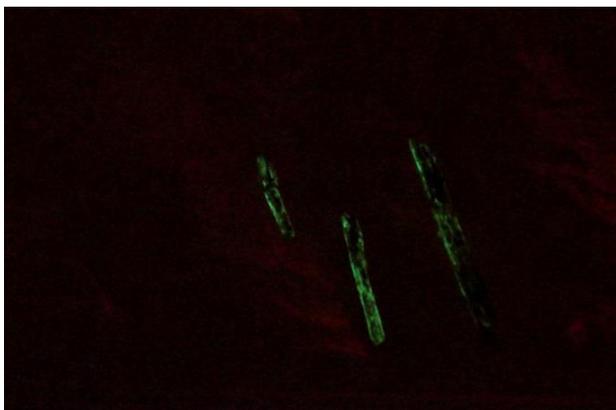
(圖三十) ($X_{O_2} = 0.1$)



(圖三十一) ($X_{O_2} = 0.2$)



(圖三十二) ($X_{O_2} = 0.5$)



(圖三十三) ($X_{O_2} = 1$)

五、 螢光黴菌發光腐莖之螢光誘導生殖配對實驗：(表十六)

	暗房組	照光組
培養於保濕袋之日數、日期	七日 2013年一月底	七日 2013年一月底
培養之溫度	15°C左右	15°C左右
螢光黴菌之菌絲塊的特質與顏色及位置	斑點狀，數量稠密，易以肉眼觀測、潔白有光潤感。(圖三十四,圖三十五)	幾乎無菌絲塊，僅有稀微菌絲出現。(圖三十六,圖三十七)
殺菌與未殺菌腐莖相連接情形	必須以手才能撕開。	幾乎不相連接，能輕易分開。
菌絲塊發光情形	殺菌過發光腐莖(α)，被螢光黴感染發光，螢光黴菌絲塊卻不發光(圖三十八)。靠近殺菌腐莖(β)側，菌絲塊發光顯著，靠近未殺菌腐莖側，菌絲塊幾乎不發光(圖三十九)。	無任何菌絲塊
螢光黴菌之菌絲塊或菌絲內容物於顯微鏡下觀察菌絲中攙雜其餘它種生物	含大量微小孢子(圖四十)、大量藻狀菌絲(圖四十一)、大量細絲狀菌絲(圖四十二) 攙雜些許透明淡褐色絲狀有橫隔菌絲(圖四十四)	含少量細絲狀菌絲，無珊瑚狀菌絲，無微小孢子(圖四十三) 攙雜較多透明淡褐色絲狀有橫隔菌絲(圖四十五)



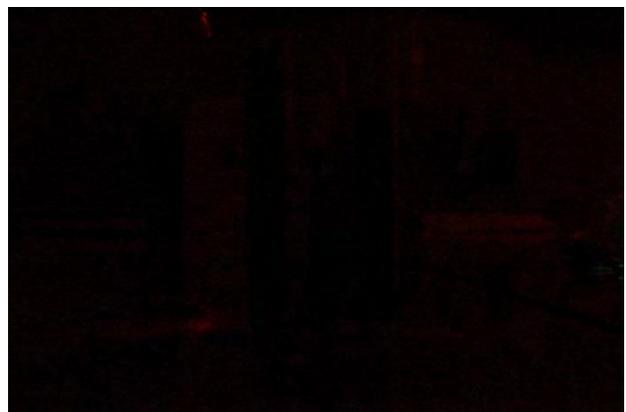
(圖三十四)
(螢光黴菌絲塊附著在殺菌腐莖上)



(圖三十五)
(螢光黴菌絲塊附著在殺菌腐莖上)



(圖三十六)
(圖上的白色物體是芒草纖維)
(右為殺菌腐莖，左為非殺菌腐莖)



(圖三十七)
【(圖三十六)的樣品於黑暗中呈非發光狀態】

暗野下



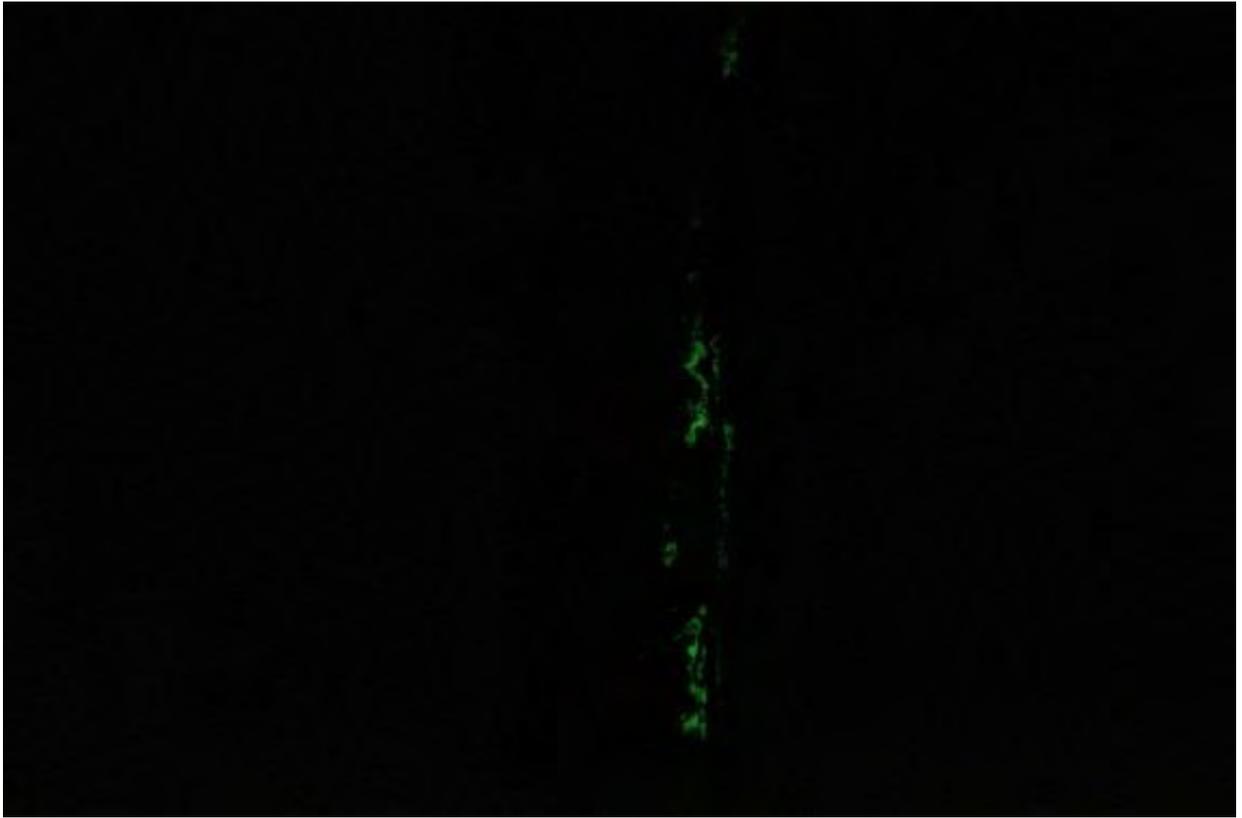
打光下



(圖三十八)

(此兩圖為暗房組中培養的同一個殺菌腐莖(α)，經螢光黴感染後，於暗野下與打光下之比較)

暗野下

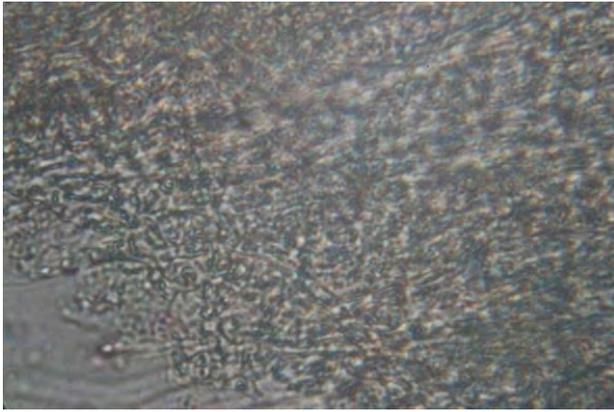


打光下



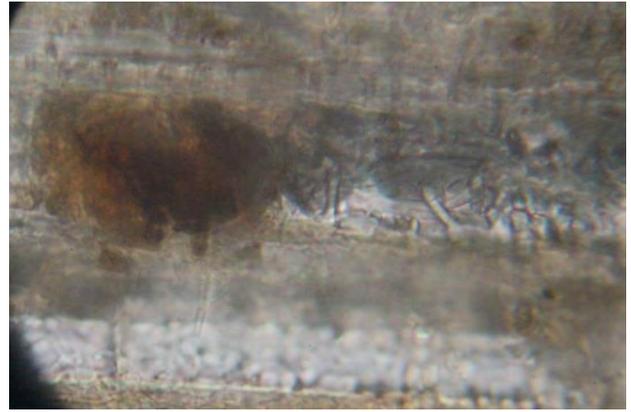
(圖三十九)

(此兩圖為暗房組中培養的同一個殺菌腐莖(β)，經螢光黴感染後，於暗野下與打光下之比較)



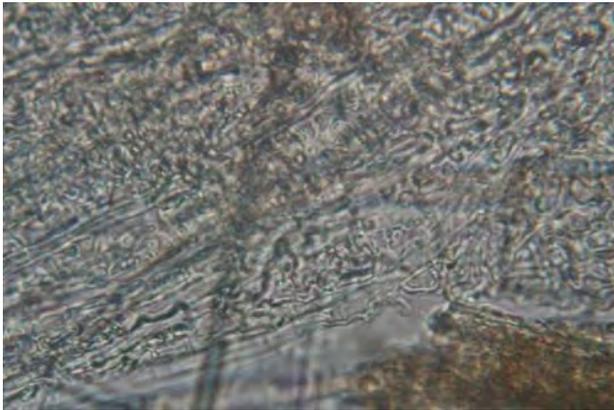
(圖四十)

【螢光黴菌珊瑚狀期(含大量孢子)】1000 ×



(圖四十一)

【螢光黴菌藻狀期(含配偶器官)】1000 ×



(圖四十二) 1000 ×



(圖四十三) 400 ×



(圖四十四) 1000 ×



(圖四十五) 400 ×

陸、 討論

由實驗結果，提出下列幾個問題討論：

一、 探討為何螢光生物能發光？大致可分為幾種類型？

螢光生物發光的化學原理幾乎都一樣，但可區分為兩類，一者是螢光生物自身細胞發光，另一者則是藉由共生生物發光(Atlas and Bartha, 1993)。生物的發光皆是因為還原態螢光素(reduced luciferin)、螢光酵素(luciferase)、三磷酸腺苷與氧分子一起作用，產生高能氧化態的螢光素(oxidized luciferin)，此高能氧化態之螢光素分子隨即(半衰期小於 10^{-6} 秒)回到基態而放出光子【Atlas and Bartha, (1993)】。

二、探討為何只有在尖石山區才能採集到發出螢光的五節芒腐莖，但其他樣區的根部樣品皆有螢光黴菌出現，卻未見其發光？

可能原因為：各樣區都比較乾燥，僅有尖石鄉的濕氣最大且常雨有霧，能使尖石鄉山區的落葉枯枝常保濕潤之狀態，恰有利於喜好重濕氣的螢光黴菌生活，且本實驗已證實螢光黴所居住的腐莖含水量至少需達到 24.5%(表十三)以上才能發出螢光，故相對較乾旱的各樣區，其枯枝腐莖欲達此含水量誠所不易；再者，所有樣區之根部皆僅有零星之螢光黴菌分布，數量太低，故無法用肉眼看見螢光。

三、探討為何各樣區根部之螢光黴菌呈現出零星的分布，而無法像尖石山區之發光腐莖有大量螢光黴菌居住？

可能原因為：

- (一)五節芒根部直接接觸土壤，其溼度會比地表上的組織器官潮濕，而且各種微生物的來源較為豐富，故根部普遍有螢光黴菌出現並不令人感到意外。
- (二)由實驗切片觀察得知螢光黴菌必須在芒草組織中藉細胞壁之上之壁孔拓展其領域，五節芒之組織構造中，所有的壁孔幾乎皆集中於莖部（壁孔數量：莖表皮細胞 100~300 個/細胞、皮層細胞：500~300 個/細胞、髓心細胞：100~0 個/細胞、維管束組織：0 個/細胞），故其它的部位與根部組織（根部之壁孔數量：根表皮細胞 20~0 個/細胞、皮層細胞：20~0 個/細胞、髓心細胞 10~0 個/細胞、維管束組織：0 個/細胞）難以散播其菌絲，故根部數量零星稀少。這造就了莖有大量螢光黴居住。

四、探討為何活的莖組織中幾乎無螢光黴菌居住，而它卻常出現在腐朽的五節芒莖內？

此問題由兩方面解釋：

- (一)螢光黴菌應該不是腐莖中第一個來報到的住民，因為莖死亡後，可能要經過其它生物分解過，才能轉變成為適合其食用與居住之成分，故螢光黴菌一般僅偶爾出現於活莖桿中佔(1/42)。(Atlas and Bartha, 1993)
- (二)因植物本身有免疫能力，可防禦外來生物寄生或侵擾，故螢光黴菌不易於活組織中大量繁殖。

五、探討螢光黴菌在五節芒體內扮演的角色是共生或寄生？

依實驗的觀察結果發現，五節芒的根部普遍皆有螢光黴菌居住，而且並未看見五節芒因此受到傷害或不健康的情形，故推測此螢光黴菌與五節芒應為共生伙伴；而此螢光黴菌對五節芒之遺骸而言則應為腐生。

六、探討螢光黴菌是屬於水黴菌或是黴菌？

此問題由五方面回答：

- (一)所有樣區所採集到的樣品，沒有一個是由水中獲得的。
- (二)螢光黴菌極可能對五節芒有專一共生性，因為在樣區之暗野觀察，並未採集到任何其它種類之發光殘枝片段。
- (三)五節芒為陸生植物，無法存活於水中。【鄭春元（1984）林信輝（2003）】
- (四)螢光黴菌發光腐莖浸於淺水中，一小時內即不見其螢光，24 小時後即使取出恢

復正常濕度亦無法再發光，極有可能已經死亡。

(五) Atlas 和 Bartha, (1993) 認定所有之水黴菌門，其菌絲皆無分枝，但本螢光黴菌卻有顯著數量之分枝易見。故不屬水黴菌門。

基於上述理由，螢光黴菌應該被歸真菌界之陸生黴菌；而非歸屬原生生物界之原生菌類水黴菌門。

七、 探討螢光黴菌的生活史為何？

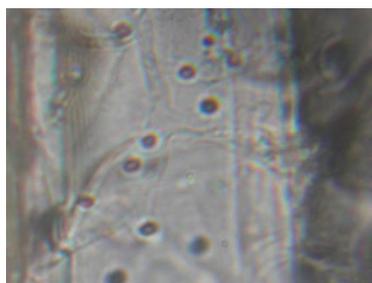
(一) 土壤中的螢光黴菌絲先侵入活的五節芒之根部組織，以零星之數量共生於根部組織或更稀少的存活於莖組織中。

(二) 待植物枯死倒塌斷裂後，由斷口處獲得環境提供充分的水氣與濕度，及各種微生物之入侵，經特定微生物分解與變質作用後，產生適合螢光黴菌之微棲所，此時螢光黴菌才開始大量繁殖。

(三) 透明多核無橫隔之細絲狀菌絲(1N)居住於細胞空腔中(圖四十六)→藉由穿透壁孔散布其族群(圖四十七)→於養分充分之細胞腔室→轉變為海藻狀菌絲(1N) (圖四十八)→海藻狀菌絲漸成熟，產生具有接合生殖之配偶器官→進行接合生殖，染色體配對組合，產生接合孢子(2N)(圖四十九)→接合孢子萌芽→產生大量聚集成團，且形成粗短厚壁含膠狀物質之珊瑚狀菌絲(2N)(圖五十)→珊瑚狀菌絲經減數分裂，產生大量微小孢子(1N) (圖五十一)→再回復透明多核無橫隔之細絲狀菌絲(1N) (圖四十六)



(圖四十六)



(圖四十七)



(圖四十八)



(圖四十九)



(圖五十)



(圖五十一)

八、 探討螢光黴菌在生物學上的分類為何？

依據分類的條件：

- (一) 該黴菌為陸生性
- (二) 具有接合生殖之配偶器官
- (三) 孢子或配子不具鞭毛
- (四) 菌絲為無橫隔且多核
- (五) 組織內寄生或組織內腐生

(六)非寄生於昆蟲與動物體內，而為腐生或寄生於植物體內

故先暫定為無鞭毛黴菌門(Amastigomycota)，接合菌亞門(Zygomycotina)

，接合菌綱(Zygomycetes)，毛黴目(Mucorales)之新種。【曾道一(2009)，劉雨田(2007)，Atlas and Bartha (1993)】。

九、 探討螢光黴菌如何能利用螢光來找尋配偶，並進行生殖配對？

這真是一個很令人高興的發現：將熱殺菌過之芒草腐莖與含螢光黴菌之腐莖綁在一起，置於保濕袋內，分成暗房組與打光組於 15°C 左右(2013 年 1 月)各培養一週，發現僅暗房組之螢光黴菌絲能跨越至新殺菌腐莖，並於新腐莖表面留下足量菌絲體；將此新腐莖於黑暗與打光下攝影，比對該二張照片(圖三十九 β 樣品)，能清楚辨識出靠近殺菌過之新腐莖菌絲體會發出螢光，而另一側靠近舊腐莖之菌絲體則未發出螢光；且於 15°C 左右時，打光組之螢光被白光抑制而不能發光，幾乎無螢光菌絲體被誘導至殺菌腐莖；暗房組跨越區之菌絲體經顯微攝影，如預期發現大量珊瑚狀菌絲、配偶器官及微小孢子，證實該黴菌之螢光確實能誘導其菌絲的生長方向，使之獲得充分營養來源，以利菌絲聚集配對，並進行有性生殖。

柒、 結論

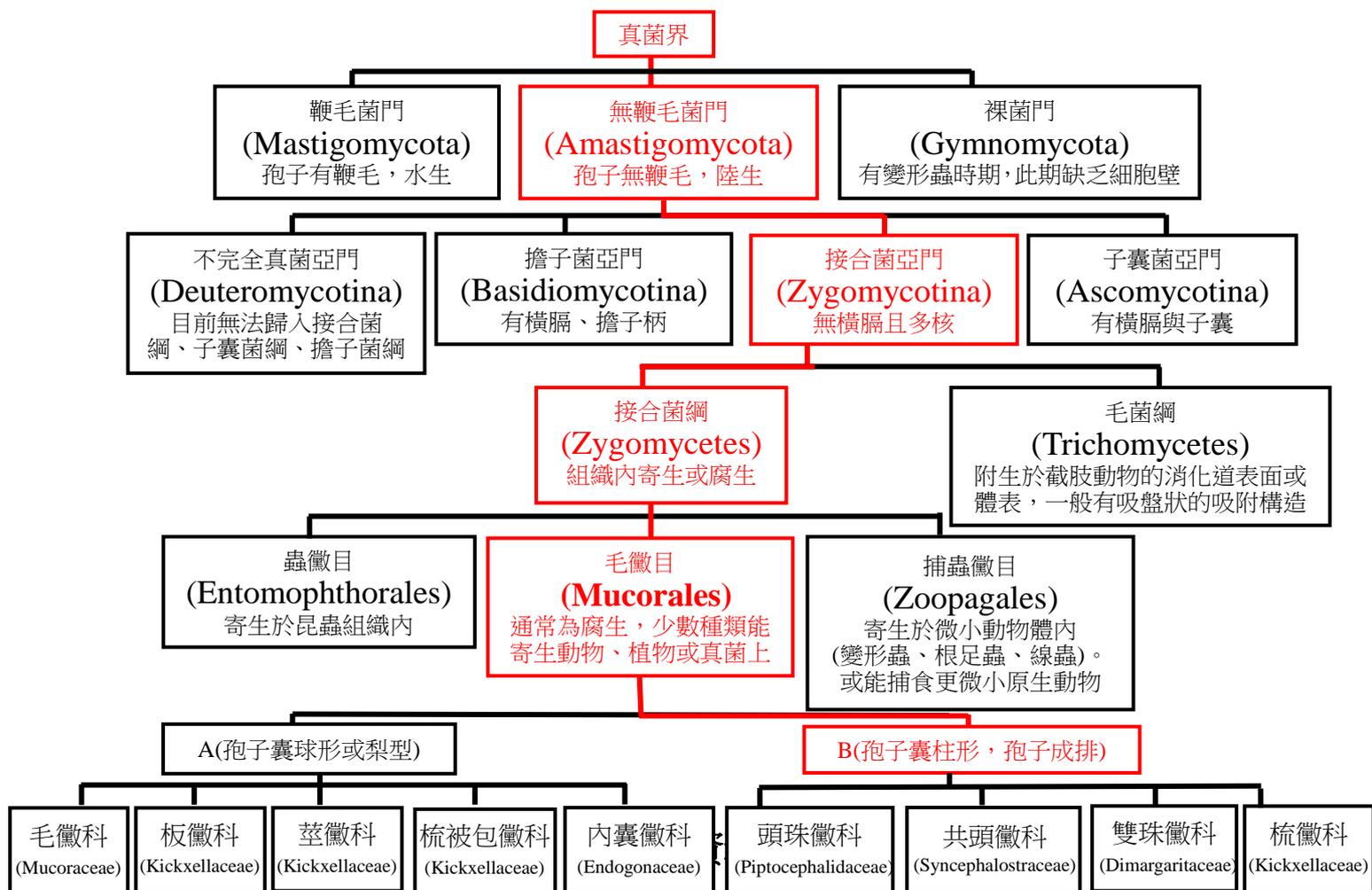
- 一、由本實驗結果並未觀察到此螢光黴菌生活史中有子實體與鞭毛孢子的構造，且它終其一生皆為有分枝且為多核無隔壁之匍匐菌絲。菌絲絕大部分皆分布於細胞腔內，藉由菌絲穿過細胞壁上較薄之初期壁孔(直徑 1~2 μm)以散布族群，故菌絲密集處，初期壁孔密度必較高；而壁較厚之細胞腔與維管束，因菌絲不能穿過厚壁壁孔與細胞壁(直徑 5~12 μm)，因此一般無菌絲分布。由不少切片觀察到，此菌絲(hyphae)之外形與顏色會隨著生活史各階段呈現出不同的差異性，(一)初期為無色薄壁且透明細長絲狀(粗：1~2 μm、長：數百 μm)；(二)中期階段，菌絲為透明粗短藻狀(粗：5~10 μm、長：數十 μm)，並產生許多呈短側支之配偶器官(gametangia)(粗：5~10 μm、長：約 30 μm)，且有配對發生；(三)後期階段菌絲為黃褐色粗短厚壁之珊瑚狀(粗 5~10 μm、長：10~20 μm)，不再穿透壁孔，並侵蝕細胞壁產生空腔(範圍約 100 μm)，腔內菌絲聚集成團，充滿大量黃褐粗短珊瑚狀菌絲，此可能是為了能抵抗惡劣環境之菌絲塊(sclerotia)，成熟後能放出大量極細小的孢子(microspores)(直徑 1 μm)。該黴菌之類別歸屬，經實驗結果初步將此螢光黴菌分類為無鞭毛黴菌門(Amastigomycota)、接合菌亞門(Zygomycotina)、接合菌綱(Zygomycetes)、毛黴目(Mucorales)之新種，其 DNA 序列之鑑定，有待將來做進一步研究。
- 二、由組織微棲所之調查發現，螢光黴菌的菌絲絕大部分皆分布於細胞腔內，發光莖部殘骸之皮層中，往往摻雜數量顯著之特定一~二種黴菌菌絲，且一定含螢光黴菌(6/6)(表示 6 個樣品中 6 個含有螢光黴菌)；且不同樣區之挺立活植株(39/42)(表示 42 個樣品中 39 個含有螢光黴菌)與挺立乾枯植株(35/42)(表示 42 個樣品中 35 個含有螢光黴菌)根部樣品之表皮層與皮層內，大多皆有微量零星螢光黴菌絲出現，但這些根部樣品於暗房下卻未見其發光。
- 三、根據本實驗結果顯示此黴菌之發光是屬於好氧性。在缺氧、過乾、過濕、過冷、過熱條件下皆阻礙發光。
- 四、另外，在正常空氣組成下，溫度於 25~30°C 發光最為顯著，而在 10~15°C 以下，40~45°C 以上 不發光；樣品含水量約低於 24.5% 不發光，但太濕時或浸入淺水中，亮光僅

維持十分鐘，第二天取出腐莖並恢復原濕度時，其完全無法再亮，可能已死亡，故研判其不是水黴菌門；樣品於純氧條件下之發光強度與在空氣中幾乎一樣，一大氣壓下，O₂ 莫耳分率於 0.025 仍能發出微弱之光，這表示其螢光酵素對氧氣的利用效率很高；於較低溫下(15°C)，發光腐莖照白光約十分鐘後，螢光之發射被抑制，且菌絲於暗房中無法隨即恢復發光(約延遲 300~350 秒)；較高溫(>25°C)下照光，則完全不抑制發光，且本實驗結果顯示照光時間長短對復光之速率影響不大。

五、將熱殺菌過之芒草朽莖與含螢光黴菌之朽莖綁在一起，置於保濕袋內，分成暗房組與打光組於 15°C 左右(2013 年 1 月)各培養一週，發現僅暗房組之螢光黴菌絲能跨越至殺菌朽莖，並於朽莖表面留下足量菌絲體；跨越區之菌絲體經顯微攝影，如預期發現大量螢光黴之菌絲、配偶器官及微小孢子，故本實驗證實該黴菌之螢光確實能誘導其菌絲的生長方向。

六、本研究的學術價值，除了將此新種螢光黴菌的分類做初步定位與形態、生活史及生態釐清之外，亦弄清楚螢光真菌家族發出螢光的生理意義——螢光真菌利用螢光來辨識品系及身分且傳遞訊息，使之誘導鄰近的互補交配型菌絲能彼此配對，進行細胞融合產生有性生殖，並且利用螢光的開啟與關閉，來控制族群的走向與分布，以利獲得充分的營養來源。

本研究是採用舊的真菌界分類系統，以 Alexopoulos and Mims(1979)分類為架構【此圖改寫於 Atlas and Bartha(1993)】



捌、參考資料及其他

- 1.王進琦(1985)。基礎微生物學。藝軒圖書出版社
- 2.林信輝(2003)。泥岩地區應用植物。行政院農委會水土保持局
- 3.夏滄琪和張豐吉(2002)。紙質文物著生褐斑真菌之分離與鑑別。林業研究季刊 24(4): 29~44
- 4.張東柱(1983)。台北空中真菌相。國立台灣大學植物病蟲害學刊。第十期
- 5.解惟棠和夏滄琪(2004)。國史館典藏庫房空中真菌相之調查。國史館館訊 03 期
- 6.曾道一(2009)。基礎微生物學精華。新文京開發出版股份有限公司
- 7.鄭春元(1984)。台灣常見野花。渡假出版社有限公司
- 8.劉雨田(2007)。新編微生物學。永大書局有限公司
9. Atlas R. M and R Bartha 1993. *Microbial Ecology* Benjamin and cummings Publishing Company Inc , p521~523.

玖、未來展望

- 一、於本實驗中 O₂ 製備過程，無意中發現，螢光黴菌對環境中的微量亞硝酸鹽及一些重金屬離子 (Cu⁺², Cr⁺³) 十分敏感，受到該些物質毒害後，其螢光亮度即於數分鐘之內顯著降低發光程度，此性質可用來鑑定水質的好壞或食物及藥品之安全性，具有商業價值。
- 二、螢光黴菌腐莖的螢光很微弱，但在暗房中，肉眼卻能十分清晰看見螢光，可利用此性質將其運用於一些理化微光實驗室、攝影暗房內或礦坑內指標，以降低光線對感光藥品與易爆炸氣體或感光儀器的干擾。
- 三、螢光黴菌腐莖只要於潮濕含 O₂ 透明容器中，於 14°C 或 15°C 以上，即有優良穩定的發光性 (一年以上)，且於 25°C 以最佳光度，利用此性質，可將螢光黴菌用於須長期穩定微弱光源的裝置，如地下室指示燈，和下水道指示燈與藝術作品。
- 四、利用調節溫度的方式，當作光閘門，以控制光線的開關及相對發光程度，可用於一些理化或生物實驗室。
- 五、光誘導菌絲生長現象的應用：由於螢光黴菌之菌絲極細，約 10 μm，若先以適當培養基培養，以及矽質基板，再以光譜分析儀先了解螢光波長，將人工方式仿製其波長，製成弱光雷射 (直進性約束性佳)，可誘導菌絲生長方向，控制其菌絲於矽質基板上之生長及分佈，再將化學藥劑時菌絲壁之己性質、蛋白質處理，使之能鍍上一層金或銀，成為極細的黃金絲或銀絲，這可能可成為分子電腦內的電線或記憶體間的聯繫路線。
- 六、光誘導菌絲生長現象，也可能可用於人體組織修護工程，如心肌瓣膜、神經受損或腦部受損。但首要條件，是將接受光誘導之基因找出，利用重組 DNA 的方式將其 Colone 後，使用載體將此基因引入幹細胞之核內，將此幹細胞注射至受損的神經組織或腦部中，再以微細光纖侵入受損組織，引入該螢光波段，誘導幹細胞生長。

【評語】 040711

本研究的範圍包括新竹山區多處地方，以“個人”參賽而言，卻是十分難得。惟因時間及器材不足，目前仍停在“觀察階段”，未能有更深入的研究(如發光機制)，殊為可惜。