

螢光顯微鏡及染色技術觀察 製漿木片初期劣化之研究

王益真 蘇裕昌 劉憲國

摘 要

製漿木片一般採戶外堆存，易受微生物感染而生劣化，影響紙漿之收率及強度性質，木片品質之檢測乃有其必要。檢測木片劣化以顯微鏡觀察為主，惟手續繁瑣，不易經常施行。本研究探討以染色技術配合表面螢光顯微鏡觀察木片，以徒手刀片切割平面偵測菌質之可行性。試驗木片包括省蓮生荷種玫瑰桉(*Eucalyptus grandis*)、直幹相思樹(*Acacia mangium*)、臺灣赤楊(*Alnus formosana*)及進口紅木(mangrove spp.)。木片在接種特定之白腐(*Coriolus versicolor*)及褐腐菌(*Postia placenta*)後，於不同時間取出，經固定、洗滌、徒手切削後以螢光染色劑及調整染色劑處理即可直接觀察，菌質與木材之差異清楚易辨。觀察者仍須對木材組織有相當了解，蓋有些菌種細胞之內容物之螢光反應與菌質相似，偶而會生混淆。以此法檢測木片受菌類感染可在劣化初期簡便、迅速的發現問題，及時用之製漿，減少損失以提高紙質。

關鍵詞：木片劣化菌絲螢光顯微鏡染色技術

王益真、蘇裕昌、劉憲國 1990。螢光顯微鏡及染色技術觀察製漿木片初期劣化之研究。林業試驗所研究報告季刊, 5(3):137-151.

Detection of Incipient Decay in Wood Chips By Fluorescence

Microscopy and Staining Techniques

I-Chen Wang, Yu-Chang Su, and Hwei-Kuo Liu,

[summary]

Wood chips for pulping are stored in outdoor piles for an indefinite period of time before use. Under the hot and humid local weather, they are susceptible to microbial degradation, affecting pulp yield and strength. Screening wood chips is important in ensuring good pulp quality. Microscopic observation of chips for signs of degradation is, however, handicapped by procedure difficulties and rarely employed in routine work. In this study, fluorescence microscopy and staining technique are investigated as means of detecting wood destroying fungal hyphae. Chips of *Alnus formosana*, *Acacia mangium*, *Eucalyptus grandis* plantation wood and mangrove were inoculated with *Coriolus versicolor* and *Postia placenta* fungi *in vitro* and removed after 7, 14 and 30 days, fixed, microtomed or free-hand razor trimmed, stained and observed under both bright-field and fluorescence micro-

78年12月送審

79年 2月通過

scopes. Wood chips stained with acridine orange generally fluoresced a yellow-green color while fungal tissue fluoresced reddish-brown. A contaminant fungus suspected to be *Trichoderma* sp., on the other hand, can be stained effectively with calcofluor stain. Fluorescence microscopy showed good distinction between the wood substrate and the invading fungal hyphae. Some wood cell contents tended to show similar fluorescence to that of the fungi, but knowledge of cell morphology should easily prevent confusion in diagnosis. Incipient fungal infection thus can be readily observed with this technique.

Key words: Wood degradation Fungal hyphae Fluorescence microscopy Staining techniques.

I-Chen Wang, Yu-Chang Su, and Hwei-Kuo Liu, 1990. Detection of Incipient Decay in Wood Chip By Fluorescence. Bull., Taiwan For. Res. Inst. New Series, 5(3):137-151.

一、緒 言

本省地處亞熱帶，氣候高溫多濕，適合各種微生物之繁衍，而本省製廠生產紙漿所需之原料大部由國外進口。進口原料有頗多是在輸出國即已打成木片，其含水率一般在30%以上，且轉運堆儲時間頗久。邱俊雄(1988)曾調查本省製漿木片堆儲期間可能感染之菌類，發現除霉菌外，木材腐朽菌類，特別是白腐菌亦會在木片上大量滋生。腐朽菌之菌絲(hyphae)分泌各種分解酵素，使纖維之細胞壁由腔壁逐漸向外溶蝕，細胞壁產生穿孔、裂隙，甚至整個消失。木片在感染初期即有失重情形，同時因組成分子受菌絲之分解酵素破壞，蒸餾時大量溶出，使紙漿之得率快速下降，所製成之紙，紙力亦常大幅減弱。在市場日益國際化，競爭漸趨激烈之時，紙廠必須力求提升產品收率及品質，如何在木片運輸及堆存期間防止或減少微生物感染，乃為製廠管理之一大課題，值得重視。

檢驗儲存之木片是否受菌類侵襲，作為木片品質及驗貨之依據，對提升品質實有助益，惟技術上則有相當難，蓋僅憑目視檢查，除了使木片變色之徵象較清晰可見外，大多甚難在感染初期，木片組織受破壞程度尚低時迅速檢出。即使用一般實體顯微鏡或具高倍率之顯微鏡作木片微生物之檢測，前者無法有效顯現菌絲之存在，後者則須經過相當繁瑣的處理程序：製作切片；多重染色及準備玻片，才能進行觀察，技術上也相當困難，不易在工廠實驗室中進行。至於掃描式電子顯微鏡雖能確切觀察到菌絲，但設備昂貴，試樣準備不易，不可能用於經常性之篩檢。木材中纖維素之排列有相當規則，部份呈微結晶狀(cry-

stallite)，並能使偏光(polarized light)產生雙折光(birefringence)現象。隨著細胞壁被真菌分解破壞，此一特性亦逐漸消失，因此偏光顯微鏡可用於檢測菌類感染(Kuo et al., 1988)，唯僅適用於已相當腐朽之試材。

螢光顯微鏡(fluorescence microscope)之發展較遲，其成像原理乃是以入射光源先經一激發濾鏡(excitation filter)，只讓特定波長之激發光穿透，復經過一與光軸成45度角，具干擾濾鏡功能，可反射大部份激發光而讓較長波之螢光穿透之雙色鏡(dichroic mirror)反射而照射試樣，試樣中所含之螢光物質或染色劑吸收光能後，表層受激發之電子在回到較低能階軌道時，會發出較激發光波長的次級光(secondary emission)，復通過顯微鏡光軸上雙色鏡後經阻隔濾鏡(barrier filter)截阻直接反射之入射短波，存留較長波之螢光而成像。表面螢光(epi-fluorescence)裝置是在與顯微鏡光軸垂直方向之支臂上裝設高亮度之水銀或氫氣燈光源，入射光經光軸上之雙色鏡界面反射，逆軸向由接物鏡透出，照射在試樣表面，試樣受激發光照射所生之螢光效應則沿正常光軸成像。試樣只需表面平整，即可於較低放大倍率得到類似掃描電子顯微鏡，而景深(depth of focus)較差之影像品質。準備試樣之手續因此大為簡化，僅需將欲觀察之表面以刀片徒手修整，以螢光染色劑溶液染色後洗淨表面即可觀察，省去了切製薄片及製備玻片的手續。同時螢光顯微鏡配備可於組合式(modular)顯微鏡機體上直接添加光源、濾鏡組合及特殊螢光物鏡等整套組件即成，無需單獨購置顯微鏡之機體。由於螢光顯微鏡所用之激發光源常用紫外光，而一般光學玻璃透鏡對於紫外光之吸收頗強，會產生自發螢光干擾且較易劣化

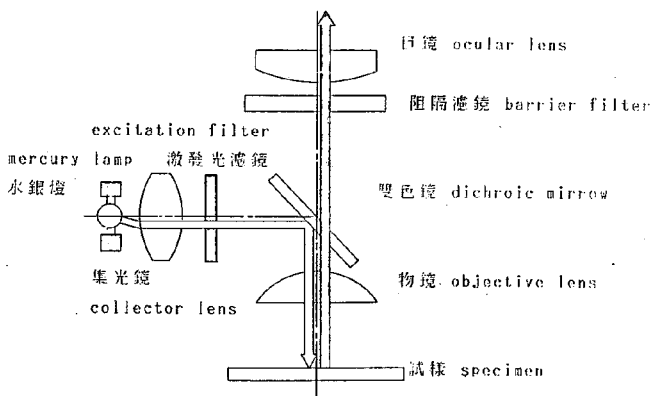


圖1 螢光顯微鏡結構圖(Nikon Inc., 1986)。

Fig. 1. Structure and principle of epi-fluorescence microscope.

，因此顯微鏡之物鏡以採用螢光專用透鏡為宜。普通物鏡亦可使用，唯透光效果較差。螢光顯微鏡之結構可由圖1表示：

有些木材本身含螢光物質，在紫外光照射下會在暗箱中呈黃、綠甚或藍紫色之光澤(Panshin and DeZeeuw, 1970)。由於螢光反應所見為次生光(secondary emission)，其亮度常甚弱，可添加螢光染色劑(optical brighteners)於基質以增加螢光亮度。復由於試材基質與真菌組織對螢光染色劑吸收程度不同，為免基質之背景螢光過強以致掩蓋欲觀察之細微特徵，一些深色之非螢光染色劑，如孔雀綠(malachite green)、甲基藍(methyl blue)等被用來作調整劑，使整體觀察效果適切良好。

二、前人研究

Krahmer(1983)即曾用acridine orange，處理木材表面，以觀察南方松因褐腐菌侵襲引起初期腐朽所導致之螢光反應變化。健康材之表面螢光經染色後呈綠色，褐腐木材材重減損1至3%時為橙綠色，超過3%時則呈黃褐色，螢光顏色之變化相當明顯，可作腐朽偵測之用。Mills *et al.* (1985)利用螢光顯微技術觀察油茶子受真菌感染

情形。發現經由acridine orange染色，並以孔雀綠等染色劑染色，調節螢光強度，即可觀察到試材與真菌組織所呈現之不同螢光色澤。Tiburzy與Reisener(1985)以螢光顯微鏡觀察小麥銹菌並討論不同螢光染色劑及試樣處理方法對顯示受損組織及菌體之效果。其他使用螢光顯微技術觀察真菌的尚有Rohringer *et al.* (1977), Kuck *et al.* (1981)以及Kellock *et al.* (1980)等氏。比較一般光學顯微鏡與螢光顯微鏡觀察菌類侵襲植物組織情形，後者無論就試材準備及觀察效果來說，均較為快捷方便、效果良好。螢光顯微鏡在其他植物病理研究上亦應用頗廣，例如王維洋等(1989)用以檢測泡桐炭葉病的擬菌質病原體。用於植物病理檢查及研究應用尚有多篇報告。

三、試驗材料與方法

(一)試驗材料

原則上試材之選取以配合本省紙漿廠所用原料，同時參酌省產選生樹種有製漿利用可能性者，並具備可供蒸煮之標準木片尺寸，唯為顯微鏡觀察需較大之表面，乃選擇較厚之木片進行試驗。所用之樹種有：

1. 紅木(mangrove sp.)

2. 玫瑰桉(*Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden)
3. 臺灣赤楊(*Ainus formosana* Makino), 及
4. 直幹相思樹(*Acacia mangium* Willd.) 四種。

其中除紅木木片由台紙新營廠木堆採集，原產地似為印尼加里曼丹，其伐採、切片、運輸及堆存時間之資料皆從缺。其餘木片均為速生樹種製造紙研究計畫，由本所六龜分所試驗地採集之樹幹經以人工手切製成木片，並經曝曬乾燥後裝袋保存，尺寸約為2×4×0.5cm。為減少木片所含抽出物成分之螢光反應對觀察產生干擾，木片均經靜萃及熱水萃取。

(二) 試驗方法

1. 木片性質分析

各樹種部份木片門經研細後篩選通過孔徑0.38mm(40 mesh)而存留於孔徑0.25mm(60 mesh)篩網之木粉，依照一般例行木材化學分析方法分別測定：

- (1) 木材靜萃抽出物測定：依TAPPI standard T204 os-76測定。
- (2) 木材之1% NaOH抽出物測定：依CNS 4717測定。
- (3) 木材之熱水抽出物測定：依CNS 4715測定。
- (4) 酸不溶木質素定量法：依TAPPI standard T222 om-74定量。
- (5) 木材全纖維素定量法：依Wise法定量。

表1 木片劣化顯微觀察使用之染色劑、使用濃度及條如表1：

Table 1. Stains, staining methods and staining effects used in microscopic observation of fungal infection of wood chips.

種	類	濃度 %	處理時間 (分)	處理方式	染色效果*	應用
-Bright field	亮視野					
	Safranino O	1.0	10	直接	洋紅色	木質素
	Picroaniline blue 1:4	1.0	5	加熱(60℃)	深藍色	菌質
-Fluorescence	螢光					
	Acridine orange	0.01	20	孔雀綠或甲基綠預染	黃綠色	木材及菌質
	Auramine O	0.5	2	直接	黃綠色	木質素
	Calcofluor	0.1	2	直接	淡藍色	菌質
	DAPI	0.1	2	直接	淡藍色	核殼
	Malachite green	0.5	1	螢光調整劑	藍綠色	木材
	Methylene green	0.5	1	螢光調整劑	綠色	木材
	Rhodamine 6-G	0.02	2	直接	紅色	木材

*. 指在實際觀察條件下顯微鏡所見之色調。

(6) 木材之五碳醣定量法：依JIS P8011比色法測定(JIS, 1988)。

木粉受真菌侵襲早期之變化通常為1% NaOH及熱水抽出物有增加趨勢。各樹種之定量木粉置於接種下述腐朽菌之洋菜培養基上，在28℃之培養箱中經3及7日後取出，測其失重情形及(2)、(3)兩項變化。各項試驗均以兩個試樣平均值表示。

2. 接種菌類

木片放置在堆儲場發生劣化之狀況不易掌握，為求試驗方便，特別選出木材腐朽菌，於洋菜培養基上接種，並放置於28℃之培養箱中，待菌絲發展後於培養皿上分別置入木片，使菌絲能迅速感染木片。所用菌種原為白腐及褐腐各一：

白腐菌為 *Coriolus versicolor* (L. ex. Fr.) Quel., 褐腐菌為 *Postia (Poria) placenta* (Fr.) M. Lars. et Lomb.

木片於接種後分別歷經7日、14日及30日，取出以FAA (formalin : acetic acid : 50% alcohol = 10 : 5 : 85) 固定處理二日，以蒸餾水換洗數次。供一般亮視野顯微鏡觀察之部份木片以滑動式切片機(sliding microtome)切製厚度約15um之橫切面薄片；縱向則因木片難以固定於刀台而以刀片徒手切成透明薄片備用。螢光顯微鏡觀察部份，依照製糊掃式電子顯微鏡木材試樣之法(Exley et al. 1974)，木片先經刀片切成長寬高各約3mm之小粒，再以新刀片修整各面備用。

3. 染色處理

本試驗中顯微觀察所用之染色劑、使用濃度條件如表1：

表中各種染色劑除苦味酸苯胺藍(picro-aniline blue)外, 均為單一染色劑直接溶於蒸餾水即可使用。Acridine orange染液中並宜加入硼酸-硼酸鈉緩衝液調整pH值至8.6, 以使其穩定(Mills *et al.* (1985)。至於用於亮視野觀察真菌菌質之picro-aniline blue染色法配方是將1%苯胺藍水溶液與飽和苦味酸水溶液以4:1之比例混合而成, 使用時將經番紅精染色之木材薄片移至載玻片上, 滴上該染色劑, 然後置玻片於60°C之加熱板上, 換蒸氣罩起即將玻片移走, 用蒸餾水退染至表面不顯藍色(Wilcox 1964)。供螢光顯微觀察之木材試樣, 部份先經malachite green或methylene green預染, 取出以蒸餾水洗滌後再以螢光染色劑染著。染好之試樣則分別置蒸餾水中保存以備觀察。

顯微鏡觀察

作亮視野顯微鏡觀察用之木材薄片經番紅精及苦味酸苯胺藍染色後, 置於載玻片上, 加甘油一滴, 覆以蓋玻片即可進行觀察。使用之顯微鏡為Nikon Optiphot配備Nikon Microflex HFX-II

自動測光攝影系統。使用Kodak Ektachrome ISO 400幻燈片攝影。

作螢光顯微觀察用之已染色木材小粒由蒸餾水中取出, 以無脂拭拍乾表面, 欲觀察之表面朝上放平, 底端以化學黏土或雙面膠帶固定於一載玻片上, 調整使表面保持水平, 再進行觀察。使用Nikon Optiphot顯微鏡加裝Epi-fluorescence配備, 高壓水銀燈光源, 攝影配備與亮視野觀察同。顯微鏡螢光裝置採用之濾鏡組合主要為紫色V-2A(激發濾鏡380-425nm, 雙色鏡430nm, 阻隔濾鏡450nm)及藍色B-2A(激發濾鏡450-490nm, 雙色鏡510nm, 阻隔濾鏡520nm)兩組。攝影配備及使用之軟片與亮視野觀察同。

四、結果與討論

試驗結果就木片材質分析及顯微鏡觀察結果分別討論。

(一)木片材質分析

表2 試材木片之化學成分分析
Table 2. Chemical composition of the wood chips.

樹種	比重	醇萃抽出物%	熱水抽出物%	1%NaOH抽出物%	全纖維素%	木質素%	五碳糖%
玫瑰桉	0.421	3.1	2.90	11.94	78.36	19.04	16.15
直幹相思樹	0.424	2.9	3.40	12.17	79.71	19.53	13.63
台灣赤楊	0.402	3.6	4.00	8.47	72.23	18.83	19.50
紅木	0.753	2.8	5.16	10.08	77.82	20.96	12.50

本試驗所用之木片化學分析之結果如表2所示

表中顯示, 四種木片之化學成分均屬典型之

闊葉樹材, 除紅木外均為速生造林木, 其比重接近藥廠使用闊葉木片之下限。試材木片接種菌類後之成分變化則以木片量少, 難以直接測定, 乃

表3 試材木粉接種*C. versicolor*及*P. placenta*後之失重率、1%NaOH及熱水溶解物量。

Table 3. The weight loss, 1% NaOH and hot water extractive content of wood meals after inoculation with wood decay fungi.

樹種	經過時間(日)	<i>Citriolusversicolor</i>			<i>Postiaplacenta</i>		
		失重(%)	1% NaOH	熱水	失重(%)	1% NaOH	熱水
玫瑰桉	3	1.94	19.85	4.7	1.52	17.50	3.59
	7	3.55	21.00	6.1	3.30	19.61	4.70
直幹相思樹	3	1.56	31.20	5.1	1.12	11.50	4.02
	7	3.73	16.59	5.2	3.38	13.02	4.90
台灣赤楊	3	1.62	12.00	4.4	1.32	11.20	4.59
	7	3.94	14.66	4.6	3.25	12.95	4.80
紅木	3	1.56	14.88	4.2	1.13	12.05	4.20
	7	3.68	16.09	4.9	2.93	14.74	4.50

以木粉作平行試驗，測定接種菌類後一定時間之失重率，及易受菌類代謝影響之1%NaOH溶解物量與熱水溶解物量，其結果如表3。

由於試材木片與木粉之比表面積(specific surface)相差甚鉅，於時間系列被腐朽菌分解之速率亦不相同，表列結果僅作為不同菌類初期分解木材之參考資料，無法顯示各階斷木片受影響之程度。同時本試驗之主要目的並非研究木材受菌類侵襲之影響，而在偵測木片之早期感染。上表中失重率顯示，白腐菌*C. versicolor* 分解木材之速率較褐腐菌*P. placenta* 為快。

Cowling (1961)曾比較白腐與褐腐菌之生理，認為褐腐菌主要分解纖維素及半纖維素，而不能有效的分解木質素，白腐菌則能分解所有木材主要成分。褐腐菌代謝產生草酸使木材pH降低，白腐菌亦產生草酸但不降低木材之pH值。褐腐菌之主要寄主為針葉樹而白腐菌主要侵襲闊葉樹。在褐腐菌腐朽初期纖維素即受菌體分泌之過氧化氫及被草酸還原之亞鐵離子降解，使木材及所製成之紙漿強度受損，初期白腐則無明顯的材力或紙力損失。Jurgensen *et al.* (1989)比較兩類菌分解廢棄木(wood litter)時之固氮速率，白腐約為褐腐的7倍，因此白腐菌分解闊葉廢材較褐腐菌分解針葉廢材快。

形態上，郭夢麟等(Kuo *et al.* 1988)觀察褐腐菌 *Gloeophyllum trabeum* 侵襲楊木 *Populus deltoides* 之情形。菌絲通常由導管侵入，首先分解木質線細胞，再由穿孔透入細胞壁之S2層，造成空洞及裂隙，甚至洶蝕整個S2層，使S3層與細

胞壁其他層次分離，最後S3層及S1層亦會被去除，而僅存中膠層。白腐菌則是由細胞內壁向外逐漸洶蝕細胞壁。

雖然白腐菌*C. versicolor* 較褐腐菌*P. placenta* 適應闊葉材寄主，且生長較快速，兩種菌在接種7日甚至14日之培養皿上木片表面均已密佈菌絲，形成膜狀，但實際菌絲侵入木片僅集中於木片表面凹陷處及導管內。往往在以刀片修整木片表面，製作供觀察之木粒時即將菌絲入侵部位清除，以致其後亮視野或螢光顯微鏡檢測時不易發現菌絲存在。紅木木片則似乎有既存菌類感染，有時可見呈黑色之菌絲於導管中，與接種菌類之染色反應及形態有別。

(二)顯微鏡觀察腐朽菌初期感染

1. 亮視野觀察

傳統亮視野顯微鏡在日常使用較為普遍，唯應用於木材觀察須先製備以切片機細心切成的薄片，薄片厚度應在20um以下，且須均勻清爽，再經染色、階段溶劑脫水、二甲苯(xylene)透明化(clearing)處理、樹脂(Canada balsam)接著固定(mounting)及乾燥、清理等步驟，始完成永久性試樣玻片製備，過程相當麻煩，需時則在一週左右。並且操作者亦需長時間之訓練，待技術純熟才可勝任。較簡便而效果稍差之過程則先將欲觀察之木片表面以銳利刀片修整後，徒手切製薄片。由於厚度控制差，常需於切成之衆多薄片中篩選少數較佳者供觀察。薄片僅經染色、修整及洗滌等過程，以甘油固定，製作暫時性玻片即供觀察。本試驗採簡易試驗法，以爭時效。蓋本試驗

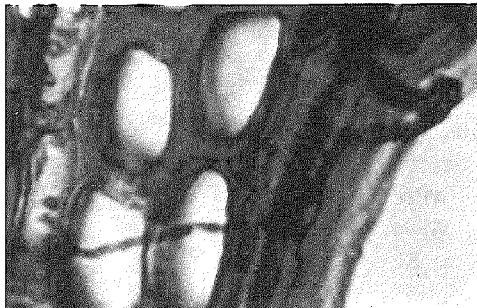


圖2 玫瑰桉木片接種*C. versicolor* 14日後橫切面薄片以safranin O及picro-aniline blue染色，菌絲穿透細胞壁之亮視野顯微照片(ca.4,000x)

Fig. 2. Micrograph of cross-section of *Eucalyptus grandis* inoculated with *C. versicolor* for 14 days, showing hyphae penetration of cell walls (brightfield, safranin O-picro aniline blue, ca. 4,000x).

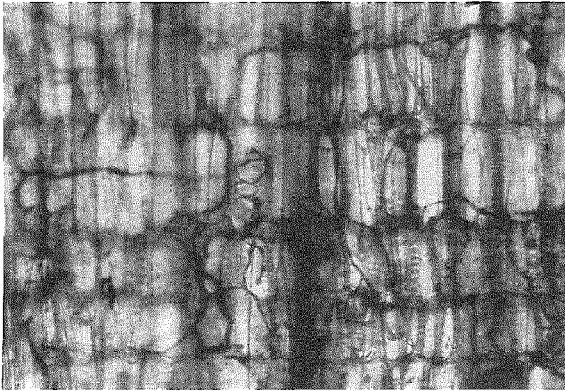


圖3 楓香喬木材接種後9個月之徑向面薄片以safranin O及picro-aniline blue染色之亮視野顯微照片(ca. 1,000x)。

Fig. 3. Micrograph of radial-section of *Liquidambar formosana* log inoculated with *Lentinus edodes*, a white-rot fungus for 9 month (bright-field, free-hand section, safranin O-picro-aniline blue, ca. 1,000x).

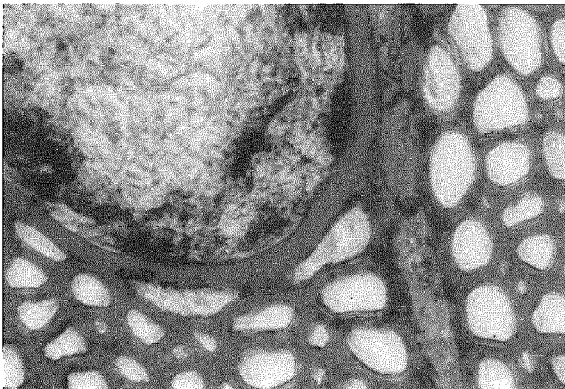


圖4 玫瑰桉木片接種P. placenta 14日後橫切面薄片以safranin O及picro-aniline blue染色，菌絲集中於導管內之情形(ca. 1,000x)。

Fig. 4. Micrograph of cross-section of *Eucalyptus grandis* inoculated with *P. placenta* for 14 days, showing aggregates of fungal hyphae in the vessel (brightfield, safranin O--picro aniline blue, ca. 1,000x).

既以偵察篩檢腐朽初期感染為目的，其時菌絲於木片內尚未發展良好，取樣須廣泛，試樣數頗高，貴時費事之試驗程序自然無法應需要。圖2至4為接種腐朽木片之亮視野顯微觀察，乃由相當多數之玻片中經篩檢偶爾得見菌體者選出。

由於菌絲在木材內常順著細胞軸向發展，由木材橫切面觀察常僅能見到菌絲之斷面，復由上列照片可見菌質雖被染為較深之藍色，但與基質之色調並非很清楚，因此較難由橫切面採見菌類感染。此一現象也適用於螢光顯微鏡觀察。亮視野觀察真菌尚有用Schiff's stain及tripan blue等法(Kiraly *et al.*, 1974)，本試驗重點在螢光顯微技術，故未予探討。

2. 螢光顯微鏡觀察

由於試材是以實體，而非薄片，進行螢光顯微鏡觀察，保持觀察面水平乃有必要，否則除了影像中央對焦部份，其餘視野範圍均一片模糊。試樣放置在載玻片上以化學黏土固定較以雙面膠帶易於調整水平。化學黏土偶而會沾附於試材底面導管縫中，而接觸雙面膠帶之試材底面亦會沾污，宜避免觀察之。闊葉樹試材之導管直徑常在50 μ m以上，使需觀察之表面深度頗大，放大倍率超過100x時，即使是修整良好之觀察表面亦難保

待全視野對準確。此一倍率對偵檢菌絲已綽綽有餘，但對菌類之細胞形態觀察或鑑定則尚有未逮。

四種未染色健康材試樣，不論其原來材色，當置於螢光顯微鏡下以藍色或紫色激發光源照射，其自發螢光之色澤均頗類似，分別呈橙黃色及微帶綠之黃色。薄壁細胞之內含物及導管內之填充體(tylosis)則為無色或棕色。以不同螢光染色劑染色後，試材之螢光反應常加強，且因不同之細胞組織或表面吸著、吸附染色劑之程度與相互作用等特性有不同而使觀察到的試材呈不同色澤。各種螢光染色劑之激發光波亦有差別，特定染色效果與所用之激發與阻滯濾鏡有密切關係。

此次試驗選擇之四種樹種，除紅木為目前漿廠大量進口使用外，其餘或有少許混雜於省產雜木用於製漿，一般而言尚未成為重要紙漿材。四種試材均屬闊葉材，且化學性質相差不大，於人工接種腐朽菌後，進行顯微鏡觀察之效果可謂大同小異，結果與適用性於不同樹種間幾可互相轉換。本試驗所接種之腐朽菌；白腐菌*C. versicolor*及褐腐菌*P. placenta*均屬高等真菌之擔子菌亞門(*basidiomycotina*)，雖然兩者之主要寄主、木材分解能力及生長勢(*vigor*)等均有相當差



圖5 台灣赤楊木片接種*C. versicolor* 經14日後以malachite green預染及acridine orange染色之弦切面螢光顯微照片(B-2A濾鏡組，約300x)。

Fig. 5. Fourteen days after inoculated with *C. versicolor*, fluorescence micrograph showing tangential section of *Alnus formosana* stained sequentially with malachite green and acridine orange (B-2A filter set, ca. 300x).

異，其與不同螢光染色劑之染色效果以及於低倍(<100x)觀察時菌絲之形態上則甚難區分，亦即試驗結果於此兩種特定菌類均屬適用。

試驗期間部份接種腐朽菌後培養時間較長(30天)之培養皿，發生雜菌感染。而另有少數業經FAA固定處理，洗滌後保存於蒸餾水中之試材亦發生二次感染。雜菌出現對試驗而言，一則為干擾，一則也是機會。研究目的既為木片菌類感染之早期偵檢，未知菌類亦屬觀察對象。此未知菌類，非經鑑定，難以確定其品種，唯其彼此形態及染色反應相似，疑為相當普遍之木黴菌類(*Trichoderma* sp.)，屬子囊菌亞門(ascmycotina)，具有寄生於木材腐朽菌及自行分解木材纖維素之能力(Murmanis *et al.*, 1988)。此一菌類之螢光染色反應與接種之擔子菌完全不同，試驗初期使用之染色法無法使其清楚顯現，其後試用calcofluor及DAPI，發現分別能顯現其菌絲及厚壁孢子(chlamydo-spore)。以下就各染色劑染色後觀察結果分別討論：

(1) Acridine orange

Acridine orange為常用之顯微鏡螢光染色劑(Botha, 1982; Kraemer *et al.*, 1982; Miller *et al.*

, 1985; Nikon Inc., 1986; Tiburzy and Reisener, 1985)，較高濃度時，迅即染著木材基質，以藍色激發光(B-2A濾鏡組合)觀察時，使木材發強烈之黃綠色螢光，但菌質對此染色劑之吸著較弱，即使以Malachite green調整光度，仍無法觀察到菌絲。將acridine orange濃度調低為0.01%，溶液呈淡褐色，染色時間加長至15-20分鐘，部份觀察結果如圖5至7。

可見腐朽菌之菌絲呈紅棕色，與木材基質之黃綠色(部份經malachite green預染)有明顯對比，偵測頗易。圖中菌絲除分佈在木材表面者，以導管內之菌絲較易檢出。此一檢測法對於所接種之擔子菌類均屬方便有效。可能引起誤判之情形為：木質線之內含物與導管中之填充體在染色條件下與菌質呈相似之顏色，復因試樣實體觀察適用之放大倍率不高，木質線內存在之菌絲甚難察見，使結果存疑。因為菌體與木材組織結構之形態有差異，審慎觀察可避免此種誤判。

(2) 羰基芥黃 Auramine O

Auramine用作抗酸菌(Nikon Inc., 1986)及木材細胞組成(Botha, 1985)螢光染色劑。水溶液黃褐色，本試驗中試材以0.5%auramine染色後，以



圖6 玫瑰披接種*P. placenta* 7日後弦切面經malachite green及acridine orange染色之螢光顯微照片(ca. 75x)。

Fig. 6. Seven days after inoculated with *P. placenta*, fluorescence micrograph showing tangential section of *Eucalyptus grandis* stained sequentially with malachite green and acridine orange (B-2A filter set, ca. 75x).

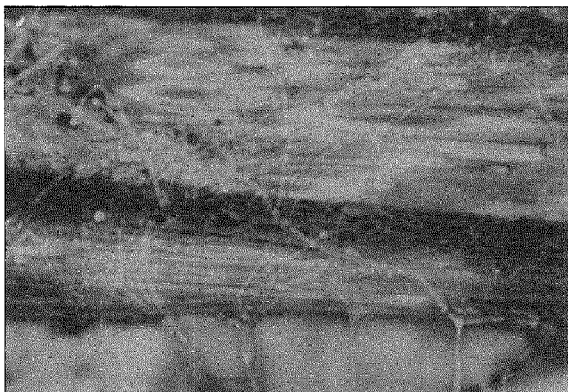


圖 7 紅木接種 *P. placenta* 30日後試材表面感染疑似 *Trichoderma* 菌，以acridine orange染色無法使 *Trichoderma* 菌絲與基質之對比清楚顯現(B-2A濾鏡組，ca. 300x)。

Fig. 7. Mangrove chip contaminated with suspected *Trichoderma* fungus, stained with acridine orange does not show clear distinction between fungal hyphae and the substrate (B-2A filter set, ca. 300x).

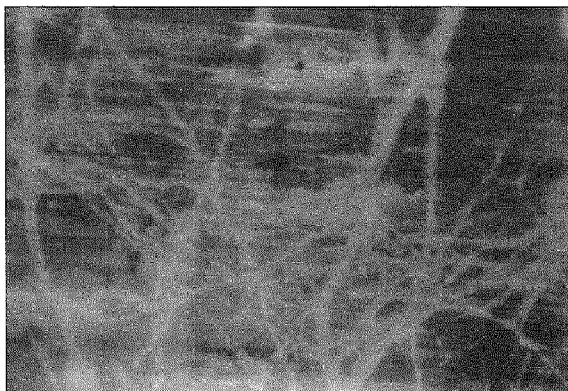


圖 8 直幹相思樹接種 *C. versicolor* 14日後感染疑似 *Trichoderma* 菌，以malachite green及calcofluor順序染色後，其感染部份菌絲可清晰分辨(V-2A濾鏡組，ca. 300x)。

Fig. 8. *Acacia mangium* wood chip contaminated with suspected *Trichoderma* fungus, stained with malachite green and calcofluor, the fungal hyphae stand out clearly against the substrate (V-2A filter set, ca. 300x).

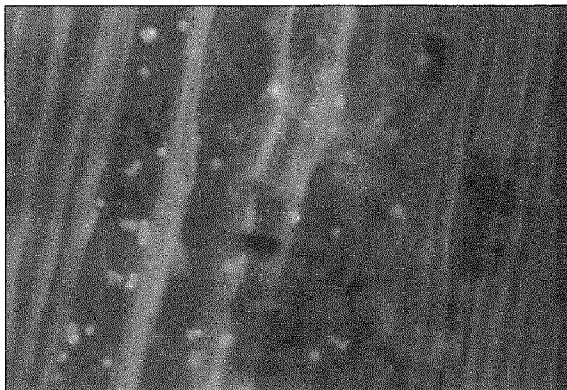


圖9 台灣赤楊接種*C. versicolor* 30日，有疑似*Trichoderma* 菌感染，以DAPI染色後其分生孢子具核酸染色反應(UV-2A濾鏡組，ca. 300x)。

Fig. 9. *Alnus formosana* wood chip contaminated with suspected *Trichoderma* fungus, stained with DAPI showed fluorescence of nucleic acid rich chlamydo spores/conidia (UV-2A filter set, ca. 300x).

B(藍)及V(紫)色激發光觀察，木材基質呈黃綠色，真菌則未能察見。由於使用效果欠佳，未進行廣泛的染色及觀察試驗，如調整染色條件或配合其他染色劑，或仍有研究餘地。

(3) Calcofluor White M2R

Calcofluor 為螢光增白劑，水溶液無色。Rohringer *et al.* (1977) 及 Tiburzy 與 Reisener (1985) 曾用以觀察植物之寄生真菌。對疑似木黴菌(*Trichoderma* sp.)之染著良好。圖8顯示直幹相思樹導管內菌絲分佈情形，觀察時須使用紫色V-2A濾鏡組合，菌絲顯現為明亮之藍白色。Calcofluor 亦易與具有 β -pyranose結構之六碳糖聚合物如纖維素等結合(Tiburzy與Reisener, 1985)，因此當試材表面有切割不良而粗糙起毛時，木材基質之突起部份面積較大，易附着較多之染料，亦呈明亮白或藍白螢光反應。此現象除使觀察稍有不便外，並不影響偵檢效果。先經 acridine orange 或 rhodamine 6-G 染色之接種播

子菌並不吸收 calcofluor，因此採複式染色，並以V-2A濾鏡組觀察時可見兩種染色效果壁壘分明之菌類存在，對於研究*Trichoderma*等寄生木材腐朽菌之觀察或有幫助。

(4) DAPI (4, 6-Diamino-2-phenolindole dihydrochloride)

DAPI 主要作為核酸、染色體之螢光染色劑(王維洋、王涼纘1989; Nikon Inc., 1986)，水溶液無色，本試驗染色後以UV(400nm)激發光觀察，對木材及腐朽菌未見染色效果，而感染雜菌之類似分生孢子(conidia)之構造則有清楚的螢光反應。圖9即為臺灣赤楊感染疑似*Trichoderma* sp. 菌後經DAPI染色觀察之照片，與Murmanis *et al.* (1988) 觀察到之*T. polysporum* 厚壁孢子電顯照片頗類似。

(5) Rhodamine 6-G

Rhodamine 6-G 之水溶液呈紅色，Botha (1982) 用以染植物細胞，發現在適當的激發(V)與

阻隔濾鏡(500nm)配合下可使富含果膠質(pectate)之薄壁細胞及中膠層顯現紅色；木質素顯現

綠色而纖維素則呈黃色，因此可用以分辨不同之細胞壁組成成分。本試驗中，初期使用此劑濃度



圖10 紅木木片接種 *P. placenta* 30日，經 rhodamine 6-G 染色之螢光顯微照片(V-2A濾鏡組，ca. 300x)。

Fig. 10. Mangrove wood chip inoculated with *P. placenta* for 30 days and observed with a fluorescence microscope after staining with rhodamine 6-G (V-2A filter set, ca. 300x).



圖11 直幹相思樹木片接種 *C. versicolor* 30日，並感染疑似 *Trichoderma* 菌，經 malachite green, acridine orange 及 calcofluor 複式染色後之螢光顯微照片，兩種菌絲分別呈紅棕色及藍白色(V-2A濾鏡組，ca. 300x)。

Fig. 11. Fluorescence micrograph showing wood chip of *Acacia mangium* inoculated with *C. versicolor* for 30 days and contaminated with suspected *Trichoderma* fungus after staining with malachite green -acridine orange and calcofluor (V-2A filter set, ca. 300x).

過高(ca. 1%)，且使用綠色(G)濾鏡組合，所有組織均呈紅色，無辨識效果。後以濃度0.02%之rhodamine 6-G染色2分鐘，並以V-2A濾鏡觀察，發現對接種之擔子菌菌絲有染為暗紅色之效果，而同時木質線及縱向荷壁細胞亦因果膠質含量

高顯現成團狀之紅色，其他組織主要為黃色。疑似Trichoderma菌質則無顯色反應。Rhodamine 6-G染色劑因此可能有檢測木材初期劣化之適用性。圖10為紅木以rhodamine 6-G染色之照片。

(6)複式染色試驗

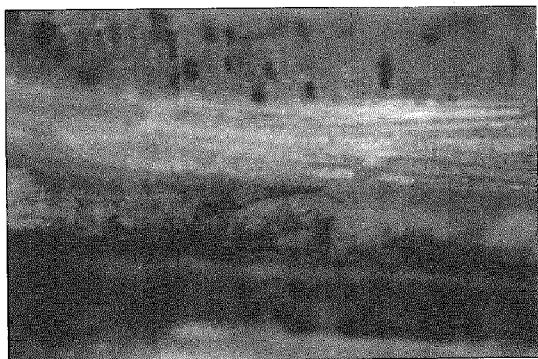


圖12A 紅木木片接種*P. placenta* 14日，並感染不明菌類，經rhodamine 6-G與calcofluor複式染色後之螢光顯微照片(A, B由同一試材擷取，V-2A濾鏡組，300x)。

fig. 12A+B. Mangrove wood chip inoculated with *P. placenta* for 14 days and contaminated with an unknown fungus, after staining with rhodamine 6-G and calcofluor (V-2A filter set, 300x).



圖12B 紅木木片接種*P. placenta* 14日，並感染不明菌類，經rhodamine 6-G與calcofluor複式染色後之螢光顯微照片(A, B由同一試材擷取，V-2A濾鏡組，300x)。

fig. 12B A+B. Mangrove wood chip inoculated with *P. placenta* for 14 days and contaminated with an unknown fungus, after staining with rhodamine 6-G and calcofluor (V-2A filter set, 300x).

有鑑於上述各種染色劑有不同之染著性，結合兩種以上之染色劑依法逐次染色或有加成之效果。乃試以 malachite green—acridine orange—calcofluor 及 acridine orange—rhodamine 6-G—calcofluor 染色順序處理部分接種14及30日之木片試材，採用V-2A濾鏡組合觀察，效果頗佳。圖11及12分別為直幹相思樹及紅木以上述染色順序後觀察結果。複式染色較單一染色所需時間固然較多，但分辨效果也相對改善，複式染色之變數很多如選用之染色劑種類及染色順序等；例如兩種染色劑均對某基質有染色效果，先使用的一種是否排除其後一種之染色效果，或後者取代前，或兩者產生混合效果？尚須有探討餘地。

本試驗顯現螢光顯微鏡之多樣性及適用性，對於木材性質及林產利用上之形態觀察尚有許多值得繼續研究開發之應用。

五、結 論

本試驗以表面螢光顯微鏡配合染色技術作製漿木片真菌類初期感染或劣化檢測，並比較一般亮視野光學顯微鏡方法與螢光顯微鏡法檢驗真菌之難易、優劣。歸納結果如下：

(一)製漿木片感染腐朽菌可於初期以螢光顯微鏡及染色技術進行偵檢觀察。

(二)表面螢光顯微鏡可進行試樣實體觀察，因此試樣製備較傳統顯微技術簡單、方便、省時且效果良好。

(三)螢光顯微鏡觀察結果視感染之菌類、使用之染色劑及顯微鏡之濾鏡配備等不同而顯現不同效果，與開葉樹木材基質變化之關係較不顯著。

(四)試驗結果顯示數種螢光染色劑以 acridine orange, calcofluor 及 rhodamine 6-G 等對感染之真菌及木材基質顯現較佳之對比。

(五)木材基質組織中以薄壁細胞及導管中之填充體偶有類似菌體之染色反應，但因彼此形態及分布上之差異，應不易致於造成誤判。

(六)螢光染色劑採複式重覆染色有加成之效果，值得作進一步的探討。

致 謝

本試驗為本所78年度公務計畫，進行期間曾獲前助理彭宏源先生協助試驗工作，特此致謝。

引用文獻

- 王維洋、王涼綢 1989 三種光學顯微鏡技術診斷泡桐簇葉病之比較 林業試驗所研究報告季刊 4(1):23-30
- 邱俊雄 1988 戶外貯存製漿木片感染微生物之研究 林業試驗所研究報告季刊 3(1):345-352
- Botha, C.E.J. 1982. Transmitted fluorescence microscopy as an aid to identification of plant cell wall components. *Zeiss Info.* 26 No. 92: 18-21.
- Cowling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum by white-and brown-rot fungi. *USDA Tech. Bull.* No. 1258. 75pp.
- Exley, R.R., B.G. Butterfield, and B.A. Meylan. 1974. Preparation of wood specimens for the scanning electron microscopy. *J. Microscopy* 101(1):21-30.
- Japan Standard Association. 1988. Testing method for pentosan in pulpwood. *In* JIS Handbook Vol. 38 Paper and Pulp. pp. 124-125.
- Jurgensen, M.F., M.J. Larsen, M. Wolosiewicz, and A.E. Garvey. 1989. A comparison of dinitrogen fixation rates in wood litter decayed by white-rot and brown-rot fungi. *Plant and Soil* 115:117-122.
- Kellog, A.W., L.L. Stubbs, and D.G. Parberry. 1980. Infection of subterranean clover and allied species by species of *Fusarium* Aust. *J. Agric. Res.* 31:297-306.
- Kiraly, Z., Z. Klement, F. Solymosy, and J. Voros. 1974. *In* Methods in Plant Pathology. Z. Kiraly ed. Budapest. pp.276-280.
- Krahmer, R.L., R.C. Degroot, and E.C. Lowell. 1982. Detection of incipient brown rot with fluorescent microscopy. *Wood Sci.* 15(2):78-80.
- Kuck, K.-H., R. Tiburzy, G. Haenssler, and H.J. Reisener. 1981. Visualization of rust haustoria in wheat leaves by using fluorochromes. *Physiological Plant Path.* 19:439-441.
- Kuo M.-L., D.D. Stokke, and H.S. McNabb Jr. 1988. Microscopy of progressive decay of cottonwood by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Wood Fiber Sci.*

- 20(4):405-414.
- Miller, J.T., J. Schans, and L. van Caesele. 1985. A fluorescence microscopy staining technique for use in seed pathology. *Zeiss Inform.* 28 No.96:6-8.
- Murmanis, L.L., T.L. Highley, and J. Ricard. 1988. Hyphal interaction of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma polysporum* with wood decay fungi. *Material und Organismen* 23(4):271-279.
- Nikon Inc. 1986. Fluorescence microscopes. 23 pp.
- Panshin, A.J., and C. deZeeuw. 1970. In *Text book of Wood Technology*. Vol. I, 3rd Ed. McGraw-Hill Inc., New York, NY. p. 402.
- Rohringer, R., W.K. Kim, D.J. Samborski, and H.K. Howes. 1977. Calcofluor: An optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67: 808-810.
- Tiburzy, R. and H.J. Reisener. 1985. Fluorescence microscopy studies of wheat rust. *Zeiss Info.* 27 No. 95:54-58.
- Wilcox, W.W. 1964. Preparation of decayed wood for microscopical examination. U.S. For. Ser., For. Prod. Lab. Res. Note FPL-056.