台灣原始觀音座蓮孢子萌發關鍵因子的探討

楊世銘[1] 蔡佩宜[1] 何文旭[1] 翁韶良[2] 周雪美[1]*
[1]國立臺灣師範大學生命科學系
[2]台灣特有生物研究中心

(收稿日期：2004.4.20，接受日期：2004.5.1)

摘 要

台灣原始觀音座蓮 (*Archangiopteris somai* Hayata) 是台灣特有的瀕絕古老蕨類植物之一，目前僅在台灣北部烏來與南投蓮華池有小部份族群存留。由於其孢子萌發不易，至今仍無相關文獻報導。本研究利用不同的培養基質、光照條件、以及通氣情形培養孢子，於播撒後二週計算孢子萌發率，然後利用 ANOVA 與 *t*-test 統計分析比較各環境因子對其孢子萌發的影響情形。實驗結果顯示：(1) 除了原生地土壤與紅光之外，通氣也是決定其孢子萌發的重要因子。(2) 利用簡易組裝的長波紅光照射，對於其孢子的萌發具有顯著促進效果，是一種既簡單又有效的方法。(3) 紅光處理的有效時間有其臨界值，處理 2 天孢子仍不萌發，處理 4 天有 50 % 促進效果，萌發率約 40 %，處理 8 天以上則促進效果達飽和，孢子萌發率可高達約 80 %。

關鍵詞：台灣原始觀音座蓮，原生地土壤，孢子萌發，紅光，空氣

緒 言

台灣原始觀音座蓮 (*Archangiopteris somai* Hayata) 是台灣特有的一群古老蕨類植物，其分類地位屬於蕨門 (*Pteridophyta*)，厚囊蕨綱 (*Eusporangiopsida*)，觀音座蓮目 (*Marattiales*)，觀音座蓮舅科 (*Marattiaceae*)，原始觀音座蓮屬 (*Archangiopteris*) (Devol and Shieh, 1994)。原始觀音座蓮屬的蕨類，目前全世界僅存約十種左右，生長於熱帶地區常綠闊葉原始林中，主產於中國大陸雲南東南部與越南北部等地，向東分布至海南及臺灣 (Hsu *et al.*, 2000)。

近年來，由於台灣地區都市發展的腳步快速，耕地增加、山坡地及森林的開發、原始林相改變，使得許多不同生態系的的植物紛紛遭受嚴重地考驗，目前台灣原始觀音座蓮族群僅分布於南投蓮華池與台北縣烏來。根據國際自然與自然資源保育聯盟 (The International Union for Conservation of Nature and Nature Resources, ICUN) 發展出的保育等級 (Red List Categories)，台灣原始觀音座蓮已歸爲瀕臨絕滅級 (Peng, 1996)。在台灣植物紅皮書中已明確將台灣原始觀音座蓮列入台灣特稀有物種。因此，有關保育與研究的工作非常受到重視。目前有關台灣原始觀音座蓮之研究報導，主要有生態調查 (Peng *et al.*, 1995)，遺傳變異研究 (Shen, 2001) 等。至於孢子萌發方面之研究，則未見有文獻報導。

根據文獻記載，影響蕨類孢子萌發的因子主要有下列幾項：(1) 孢子的年齡；一般孢子萌發率隨儲存時間加長而降低，但 Camloh (1999) 曾報導經過消毒的蕨類孢子於存放 2~3 個月後的萌發率最高。(2) 光；以紅光處理可促進鐵線蕨孢子萌發，遠紅光則抵消此作用，顯示感光特性與光敏素 (phytochrome) 有關 (Furuya *et al.*, 1997)。此外，光可調節鐵線蕨的配子體及孢子體的發育，孢子的形態變化及分子發育過程均受光敏素誘導，並且其誘導會被藍光所抑制 (Christensen *et al.*, 1998)。(3) 溫度；適合孢子萌發的溫度隨著種類不同而異，約在 18~29°C 之間。高溫造成的水分損失及細胞膜性質改變，可能會使光敏素失去活性，導致萌發率下降 (Ranal, 1999)。播種前的低溫處理可能也有

*通信作者：周雪美 (Hsueh-Mei Chou); FAX: 886-2-29358077; E-mail: t43015@cc.ntnu.edu.tw

助於孢子的萌發，在 4°C 下的莎草蕨孢子比 22°C 下存放的孢子萌發率高 (Kiss and Kiss, 1998)。(4) 激素：在糖類及生長素 (auxins)、吉貝素 (gibberellic acids) 和細胞分裂素 (cytokinins) 等生長因子的處理下，以細胞分裂素對孢子萌發的促進效果最好 (Savita and Bhambie, 1991)。 (5) 無機氮源：硝酸鹽和亞硝酸鹽對孢子萌發有抑制的作用，濃度超過 $0.035 mol/m^3$ 完全抑制，但是銨鹽如 NH4Cl 則有顯著的促進作用，濃度超過 $0.035 mol/m^3$ 時可達到 90%的萌發率，同時銨鹽也會促進原葉體的生長。作者推測孢子萌發及原葉體發育初期需要還原性的氮源，可能和菌根的形成有密切關係 (Melan and Whitter, 1990)。

此外，超音波震盪 (ultrasonic vibration) 具有促進鏈絲菌 (*Streptomyces antibioticus*) 孢子萌發率增加的現象，且大部分孢子萌發的時間相同，產生的假根長度也非常相近 (Miguelez *et al*., 1993)。蘭花的種子在超音波震盪後，也有萌發率增加的現象 (Arditti and Ghani, 2000)，其種子在 4 分鐘的超音波處理後，種子的外皮幾乎都可被去除 (Miyoshi and Mii, 1988)。向日葵的種子在超音波及真空處理後，可促進多種殺菌劑滲透進入瘦果中，使種子的萌發率顯著增加 (Nagy *et al*., 1994)。超音波震盪是否也具有促進蕨類孢子萌發的效果？至今未有文獻報導。

臺灣原始觀音座蓮孢子萌發不易，有關其孢子萌發的報導至今闕如，然而孢子之萌發與培養技術非常重要，爲其未來保育及復育的基礎。本研究利用不同的環境條件培養孢子，以顯微鏡觀察記錄孢子的萌發率，最後並利用 ANOVA 與 *t*-值測驗 (*t*-test) 等統計方法，分析環境因子對孢子萌發的影響，進而討論其孢子萌發的關鍵因子。

材料與方法

實驗材料來源

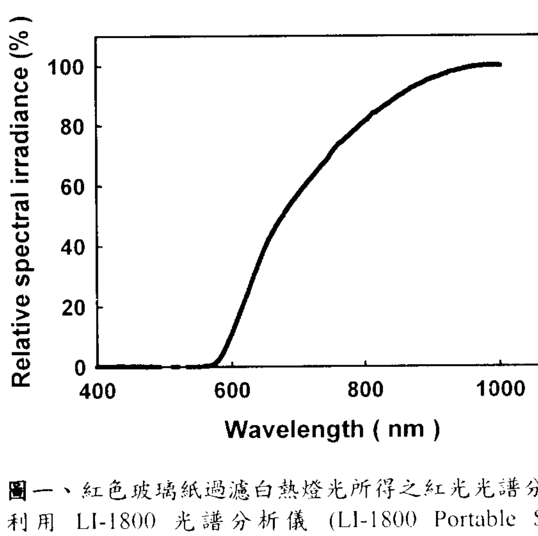
本實驗所用之臺灣原始觀音座蓮 (*Archangiopteris somai* Hayata) 孢子，取自其成熟孢子葉，採自於南投縣魚池鄉蓮花池附近的山區。新鮮的成熟孢子葉於室溫下風乾後，置於 4°C 下儲存備用。

樣本孢子的製備

以蒸餾水將孢子葉上的成熟孢子洗下，並利用孔徑爲 20μm 的濾網濾去雜質，以及 10μm 的微孔膜 (Millipore) 篩選出所要的孢子，作爲各實驗處理的材料。實驗所用之孢子的儲存時間，均不超過一年。

實驗處理

取定量孢子播撒在滅過菌或未滅菌的原生地土壤、蛭石、一般培養土或 Knop's 或 MS 洋菜培養基 (Jain and Babbar, 2002; Murashige and Skoog, 1962) 等培養基質，保持潮濕狀態，於不同的光源(實驗室窗邊的太陽光、一般日光燈、植物燈、長波紅光)之下、超音波震盪、以及開放或密閉處理之下培養孢子，培養 2 週後，以普通光學顯微鏡 (Carl Zeiss Jena Laboval 4) 觀察並統計孢子的萌發率。觀察紅光處理之有效時間的實驗，是利用紅色玻璃紙濾過白熱燈光獲得長波紅光 (其光譜如圖一所示)。於室溫下，將孢子置於光週期爲 12 小時紅光 12 小時黑暗之環境中培養 2、4、8、12 及 14 天後，分別改置入黑暗環境培養，最後再一起比較萌發率。超音波振盪所用的機器是超音波滌洗器 (Taily Instruments Co. Ltd)，處理時間爲 0、10、20、40 及 60 分鐘，每隔 10 分鐘更換一次水，



圖一、紅色玻璃紙過濾白熱燈光所得之紅光光譜分析圖。利用 LI-1800 光譜分析儀 (LI-1800 Portable Spectroradiometer, Licor, Lincoln, Nebraska, USA) 測量光譜。

Figure 1. The spectrum of bulb light filtered by red glassine. Using LI-1800 Portable Spectroradiometer (Licor, Lincoln, Nebraska, USA) to measure the light spectrum.

表一、光源與培養基質對台灣原始觀音座蓮孢子萌發的影響。

Table 1. The effect of light and media on the spore germination of *A. somai*.

培養條件 Culture conditions	自然光源 Natural light	黑暗 Dark
原生地土壤 Original habitat soil	+	−
蛭石 Vermiculite	−	−
一般培養土 General culture soil	−	−
MS/Knop's 培養基 MS/Knop's media	−	−

"+"：孢子會萌發， "−"：孢子不萌發。
"+" : spore germinated "−" : spore not germinated

以免水溫升高。通氣影響的實驗，密閉組的培養皿以石蠟膜封口，開放組則不封。

取樣設計與統計分析

每種處理進行至少二個梯次的實驗，每梯次實驗有 12 個重複樣本，每個樣本約有 200 個孢子。求取各組實驗數據之平均值 (mean)、標準差 (standard deviation) 與標準誤 (standard error) 之後，利用 ANOVA 與 *t*-值測驗 (*t*-test) 等統計方法，分析比較各處理的差異。

結 果

培養基質與光線對孢子萌發的影響

以原生地土壤、蛭石、一般培養土、MS 或 Knop's 洋菜培養基為培養基質，配合自然光源 (窗邊之太陽光) 或黑暗進行培養時，僅有原生地土壤配合自然光源的條件，才能使台灣原始觀音座蓮孢子順利萌發 (表一)。由此可知，光與原生地土壤對其萌發扮演非常重要的角色。

表二、光源對台灣原始觀音座蓮孢子萌發的影響。

Table 3. The effect of light source on the spore germination of *A. somai*.

培養條件 Culture conditions	自然光 Natural light	一般日光燈 Fluorescent light	紅光 Red light
原生地土壤 Original habitat soil	+	−	+

"+"：孢子會萌發， "−"：孢子不萌發。
"+" : spore germinated "−" : spore not germinated

紅光對孢子萌發的影響

以自然光、一般日光燈、以及利用簡易裝置所獲得之長波紅光 (其光譜如圖一所示)，配合原生地土壤進行孢子培養，結果發現自然光與長波紅光處理之孢子可以萌發，而一般日光燈處理者則否 (表二)。若將生長箱中的一般日光燈改為具有紅光波段的植物培養燈，則孢子也可以萌發。此顯示紅光對於台灣原始觀音座蓮孢子的萌發有關鍵性的影響。

紅光處理的有效時程

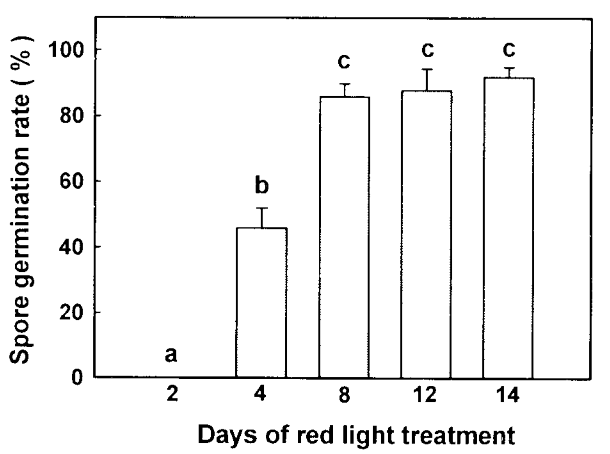
上述長波紅光處理多久才足以促使台灣原始觀音座蓮孢子萌發呢？ 實驗結果顯示，紅光處理 2 天之孢子仍不萌發，處理 4 天後之孢子萌發率顯著上升到約 40%，處理超過 8 天以後，則各組的萌發率沒有顯著差異，均達到約 80% (圖二)。由此可知，長波紅光處理促進孢子萌發的時間，有其最佳臨界點需求，大約是 8 天。

通氣與超音波處理對孢子萌發的影響

圖三顯示，經超音波震盪處理 10 分鐘的孢子，在紅光與原生地土壤環境下培養，其萌發率可高達 70 %以上，約是控制組 (未經超音波震盪處理) 的 3 ~ 4 倍。不過，震盪時間過長，超過 20 分鐘以上，對孢子的萌發反而有不利的影響。不論是否經超音波震盪處理，培養皿不封口的開放組別，其萌發率均顯著高於用石蠟膜封口的密閉組別。由此可知，通氣/空氣對於台灣原始觀音座蓮孢子的萌發也非常重要。

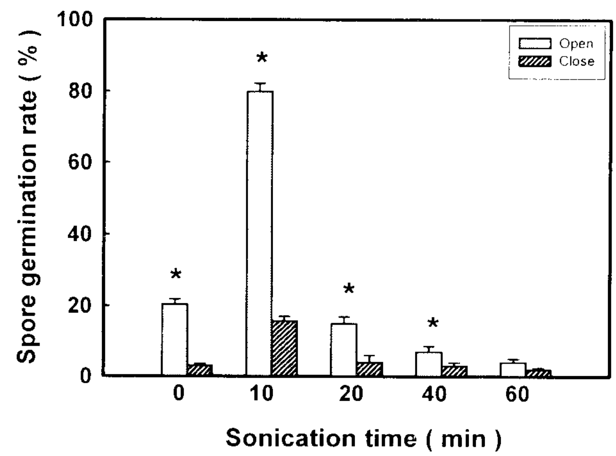
討 論

根據 Peng *et al.* (1995)的研究指出，利用臺灣原始觀音座蓮的孢子及幼葉等材料，以不同濃度的培養基進行組織培養試驗，均無法使其順利萌發生長，真正原因仍不清楚。本實驗結果也顯示，將孢子置於蕨類適用的 Knop's 和 MS 液體及洋菜培養基中，均未出現任何萌發的現象，只有在原生地土壤培養下才能使孢子順利萌發 (表一)。原生地土壤之中，決定孢子萌



圖二、紅光處理時間與台灣原始觀音座蓮孢子萌發率之關係。根據實驗的需求，孢子接種後，置於 12 小時紅光/12 小時黑暗之光週期中培養 2, 4, 8, 12 或 14 天後，改置於黑暗環境中培養，直到計算孢子萌發率爲止。孢子萌發率於接種後二週進行，結果以平均值 ± 標準誤表示，重複實驗樣本數 n = 12，每個樣本之孢子數爲 200。結果表示方式：平均值±標準誤，n=12。不同英文字母表示平均值之間具有顯著差異 (t-test, $p<0.05$)。

Figure 2. Relationship between the treatment time of red light and the germination rate of *A. somai* spores. Spores were cultured in 12 h red light / 12 h dark for 2, 4, 8, 12 or 14 days depending on the requirement of the experiment and then moved into continuous dark conditions until the germination rate of spores was counted. Percentage of spore germination was determined two weeks after inoculation. The results are represented by the means ± standard error, n=12. The total number of counted spores for each replicate was approximately 200 spores. Means with different letters are significantly different (t-test, $p < 0.05$).



圖三、超音波與通氣對台灣原始觀音座蓮孢子萌發率的影響。結果以平均值 ± 標準誤表示，重複實驗樣本數 n = 12，每個樣本之孢子數爲 200。*表示開放與封閉培養之孢子萌發率有顯著差異 (t-test, $p<0.05$)。

Figure 3. The effect of ultrasonic wave and aeration on the germination rate of *A. somai* spores. The results are represented by the means ± standard error, n=12. The total number of counted spores for each replicate was approximately 200 spores. * represents a significant difference of germination rates between open and closed cultured spores (t-test, $p<0.05$).

發與否的因子，究竟是生物因子 (如共生菌) 或非生物因子？由於原生地土壤經高溫高壓滅菌處理後，孢子仍可順利在其上萌發，顯示影響孢子萌發的因素並不是生物因子。從非生物性的因子來看，培養基的酸鹼度是否會影響萌發？由於原生地土壤 pH 值約爲 4.5，呈現弱酸性，實驗使用的培養基曾調整至此酸鹼度，但孢子仍無法萌發，顯示土壤的酸鹼度可能不是影響孢子萌發的主要因素。由此推測，原生地土壤中可能含有其他對孢子萌發非常重要的特殊成分，如微量元素、有機質、或特殊離子等。

表二的實驗結果顯示，台灣原始觀音座蓮孢子僅在含有紅光波段的光源—紅色玻璃紙濾過白熱燈光以及植物培養燈之下培養才能順利萌發，故推測紅光在促使孢子萌發的訊息傳遞過程中，扮演相當重要的角色。Furuya 等學者 (1997) 指出，紅光可誘導鐵線蕨孢子的第一次細胞分裂，此作用可被短暫遠紅光處理所抵消 (photoreversibility)；顯示孢子感光特性與光敏素 (phytochrome) 有極爲密切的關係。紅光誘導台灣原始觀音座蓮孢子萌發的現象，是否也是透過相同的機制？ 此有待未來進一步探討。

紅光刺激後產生反應的過程非常迅速，只要在遠紅光吸收形式的光敏素 (Pfr) 合成後的 36 小時內，就可以誘導鱗毛蕨的孢子合成葉綠體及進行細胞分裂產生假根 (Yatsuhashi *et al.*, 1996)。那麼究竟需要照射多久的紅光，才能有效誘導臺灣原始觀音座蓮孢子的萌發？實驗結果顯示，以長波紅光(光譜如圖一所示)處理 2 天者，孢子仍不萌發，處理 4 天有 50 % 促進效果，萌發率約 40 %，處理 8 天以上則促進效果達飽和，孢子萌發率可高達約 80 % (圖二)。由此推測，可能是紅光照射 4~8 天後，可以刺激孢子內部產生代謝變化，透過光敏素的合成，來調控孢子的萌發與生長。

被子植物的種子在萌發初期會進行旺盛的呼吸作用，分解貯存的有機物質產生能量，供生長所需的物質及酵素以驅動各種生理反應的

進行，因此，空氣/氧氣的供應對種子的萌發非常重要。蕨類微小的孢子在萌發的過程中，是否也會受到空氣/氧氣的影響？實驗結果顯示，密閉處理的孢子萌發率顯著低於開放培養的對照組 (圖三)，表示空氣/氧氣確實會影響其孢子的萌發，因此通氣與否對孢子的萌發亦非常重要。

誌 謝

本研究承國科會 (National Science Council, R.O.C) 大專學生參與專題研究計畫 編號 (NSC 90-2815-C-003-011-B) 補助部份經費，台灣師大生命科學系王震哲教授提供部分的文獻資源，以及張永達教授實驗室協助 LI-1800 光譜測定儀的操作，謹此致謝。

參考文獻

Arditti J and Ghani AKA. 2000. Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* **145**: 367-421.

Camloh M. 1999. Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platycerium bifurcatum*. *Amer. Fern J.* **89:**124-132.

Christensen S, Tokuoka Y, Silverthorne J and Wada M. 1998. Phytochrome regulation of expression of mRNA encoding the major light-harvesting chlorophyll alpha/beta-binding proteins of photosystem II in the haploid phase of *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell Physiol.* **39**: 647-654.

Devol CE and Shieh WC. 1994. *Marattiaceae*. *In* Flora of Taiwan 2nd ed. Vol. 1. Edited by Huang, T.C. pp.74-79. Editorial committee of Flora of Taiwan, Taipei.

Furuya M, Kanno M, Okamoto H, Fukuda S and Wada M. 1997. Control of mitosis by phytochrome and a blue-light receptor in fern spores. *Plant Physiol.* **113**: 677-683.

Hsu TW, Moore SJ, Chiang TY. 2000. Low RAPD polymorphism in *Archangiopteris itoi*, a rare and endemic fern in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**: 15-18.

Jain N and Babbar SB. 2002. Gum katira: A cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* **71**:223-229,

Kiss HG and Kiss JZ. 1998. Spore germination in population of *Schizaea pusilla* from New Jersey and Nova Scotia. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 848-852.

Melan MA and Whittier DP. 1990. Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in *Botrychium dissectum* forma obliquum. *Plant Cell Environ.* **13:**477-482.

Miguelez EM, Martin C, Hardisson C and Manzanal M. 1993. Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: Tool for the analysis of hyphal growth in liquid cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 123-130.

Miyoshi K and Mii M. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulture* **35**: 127-130.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.

Nagy J, Ratkos J and Toth O. 1994. Effects of ultrasonic irradiation and vacuum infiltration combined with fungicides on fungi-infected sunflower seeds. *Acta Agron. Hungar.* **43**:93-102.

Peng GD. 1996. The latest species conservation classification and application of IUCN. *Nature conserv. quart.* **13**: 6-18.

Peng JJ, Wen CL and Shen MT. 1995. The study of population ecology of *Archangiopteris somai* Hayata. Taiwan Endemic Species Research Institute.

Ranal MA. 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. *Amer. Fern J.* **89:**149-158.

Savita G and Bhambie S. 1991. Effects of cytokinins of spore germination in *Adiantum capillus-veneris* L. *Phytomorphol.* **41**:115-120.

Shen MY. 2001. Genetic variation of Archangiopteris somai based on ISSR. National ChungHsing University Master thesis, Taiwan.

Yatsuhashi H, Turnwald S and Scheuerlein R.

1996. Germination in spores of Dryopteris filix-mas: Regulation of rhizoid elongation as a second phytochrome-mediated response. Physiol. Plant. **98:**399-406

BioFormosa (2004) 39 (1): 33-39

Key factors for the spore germination of *Archangiopteris somai* Hayata, a rare and endemic fern in Taiwan

Shih-Min Yang[1], Pei-Yi Tasi[1], Wen-She Ho[1], Shau-Lian Wong[2], Hsueh-Mei Chou[1]*

[1] Department of Life Science, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

[2] Taiwan Endemic Species Research Institute
Nanto, Taiwan

(Received: 20 April 2004, accepted: 1 May 2004)

ABSTRACT

Archangiopteris somai Hayata is an endangered fern in Taiwan. Its population is small and appears only in Wulai, Taipei and Lienhuachih, Nantou. The germination of *A. somai* spores is very difficult and the method to induce its germination is unclear. In this study, the spores were cultivated in different media, light conditions, and aeration, and their germination rates were calculated two weeks after sowing. The effect of the above factors was evaluated by comparing the germination rates and analysis using ANOVA and *t*-test. The data from our experiments showed that (1) In addition to the original habitat soil and light, air was also very important for the germination of *A. somai* spores. (2) Using a simple artificial design, long wavelength red irradiation, could stimulate spore germination significantly which was a very convenient and efficient method for the induction of spore germination. (3) There was a critical time of red light treatment required to induce spore germination. A two-day treatment was not enough to stimulate germination, a four-day treatment could increase the efficiency of induction by about 50% giving a germination rate of about 40 %, and an eight-day treatment provided induction saturation with a spore germination rate of about 80 %.

Key Words: *Archangiopteris somai*, spore germination, original habitat soil, red light, air

*Corresponding author: Hsueh-Mei Chou; FAX: 886-2-29358077; E-mail: t43015@cc.ntnu.edu.tw