

2023 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

普高組 成果報告表單

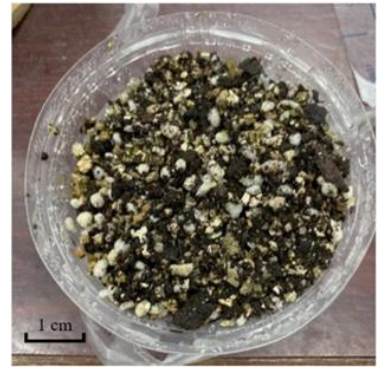
題目名稱：「蕨」醒時刻 - 低溫喚醒睡眠的孢子

一、摘要

水蕨是台灣常見的本土水生蕨類，因為具有生長週期短且容易培養的特性，常被作為研究蕨類生長及生活史的題材。在培養水蕨時，我們發現從學校採集的水蕨孢子幾乎不發芽，查詢資料後發現此現象可能與孢子在秋冬季的休眠狀態相關，而孢子的休眠除了受到溫度影響，也和孢子成熟度密切相關。為了打破孢子休眠狀態，我們嘗試使用家用冰箱模擬冬季低溫環境培養不同成熟度的水蕨孢子，發現低溫處理能夠有效提升孢子發芽率，且不同成熟度孢子所需的低溫處理時間也不相同。此結果驗證了孢子的成熟度將影響孢子發芽率，且能透過低溫有效打破孢子休眠。

二、探究題目與動機

臺灣位於亞熱帶氣候區，蕨類種類繁多，其中隸屬於鳳尾蕨科的水蕨更是台灣重要的本土蕨類物種。去年十月下旬的一堂生物課中，老師帶我們至學校的植物園並介紹了本土水蕨，也讓我們自行採集孢子並進行培養。我們使用自製的培養土培養孢子數天後，發現水蕨孢子幾乎沒有發芽。此現象勾起了我們的好奇心，並提出疑問，水蕨孢子的發芽是受到什麼因素影響，導致發芽率低落？又是否能夠透過人工處理方式，提升水蕨孢子的發芽率？針對這些疑惑，我們設計實驗，並著手進行研究。



圖一 水蕨孢子簡易培養裝置

三、探究目的與假設

在發現水蕨孢子不發芽後，我們開始思考其中可能的原因，並列出兩項猜測：

1. 可能是因為孢子死亡或者老化的現象，進而導致孢子發芽不具有發芽能力
2. 我們想到高中生物課曾經學過的「孢子休眠現象」，孢子在特定環境下將進入休眠狀態，並減少發芽及生長，以抵抗外界不利於生長的條件。

由於我們採收的孢子來自於新鮮的褐黃色成熟孢子羽葉，因此我們推測與孢子老化或死亡現象較無直接關聯性，而針對水蕨孢子的休眠現象，我們也蒐集了相關資料。

水蕨在進入秋冬季時會產生休眠現象。與此同時，孢子內部的化學組成將產生變化，以減緩代謝程度並抑制發芽。休眠現象的主要目的是延後孢子的發芽，等到適當的還境再結束休眠並開始發芽 (Raghavan,1989)。此外，在查詢文獻資料時，我們發現成熟度亦為影響休眠及孢子發芽率的重要因素之一 (黃等，2014)。

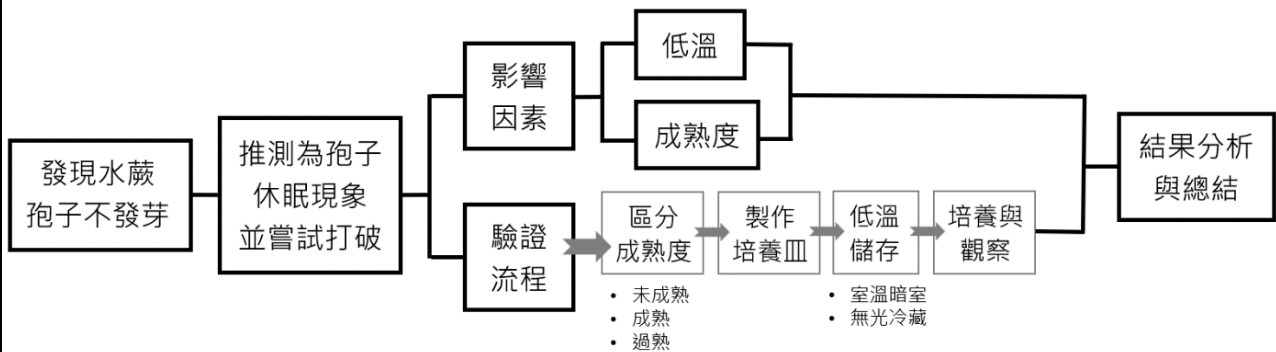
為了提升孢子發芽率，我們思考如何能夠打破孢子休眠的狀態，並提出假設：如果我們能夠模擬冬季低溫環境，是否能幫助孢子加速度過休眠時期並有效促進孢子發芽？

統整以上內容，以下為本研究的實驗目的及假設：

1. 探討成熟度影響孢子發芽與休眠現象之關係
2. 探討低溫處理是否能有效打破孢子休眠狀態

四、探究方法與驗證步驟

(一) 探究流程圖



圖二 本研究探究流程圖

(二) 探究過程及實驗方法

1. 取得材料與區分孢子成熟度

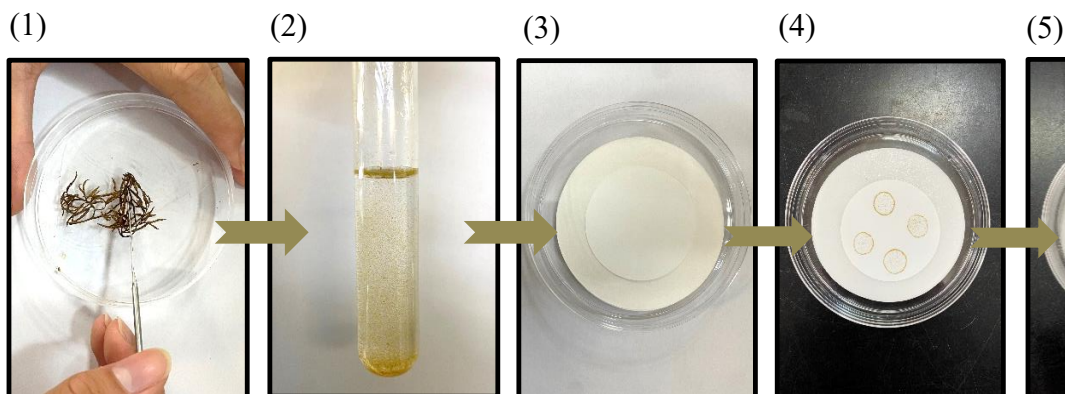
為了探討孢子成熟度對發芽率的影響，我們將採收到的新鮮孢子葉依據外觀區分為三個不同的成熟階段：

- (1) 未成熟：孢子葉呈青綠色，反捲處無黑色條痕
- (2) 成熟：孢子葉呈褐綠色，反捲處有淺黑色條痕
- (3) 過熟：孢子葉呈深褐色，反捲處有明顯黑色條痕



圖三 不同成熟度水蕨孢子羽葉
由左至右分別為未成熟、成熟及過熟階段的孢子羽葉

2. 孢子培養基製作 (圖四)



圖四 孢子培養基製作過程

- (1) 使用鑷子將反捲的孢子羽葉挑開並取出孢子囊。
- (2) 將孢子囊壓碎，收集孢子並加入少量飲用水搖晃均勻製作孢子懸浮液。
- (3) 取一個培養皿，於中央疊置一片過濾膜及六張濾紙。
- (4) 使用滴管吸取孢子懸浮液，均勻滴播四滴於過濾膜上。
- (5) 將培養皿蓋上，並以石蠟膜將其密封。

3. 低溫處理

說明：為了探討低溫處理對於不同成熟階段孢子的影響，我們製作三種不同成熟階段的孢子培養基，分別將其置於家用冰箱冷藏（約 3~4 度）儲存。

變因設計：未成熟、成熟及過熟階段孢子培養基各五組，分別進行 0 週、2 週、4 週、6 週、8 週低溫儲存。此外，對於每一組低溫處理的孢子培養基，同時製作一組孢子培養基儲存於常溫暗室中作為對照組（圖五）。



圖五 低溫儲存環境（左）
常溫儲存環境（右）

4. 光照培養及觀察

(1) 光照培養（圖六）

取出經過特定時長儲存的孢子培養基，放置在室溫下以 LED 白光培養。為了模擬野外環境，採取半日照的光照模式。



圖六 孢子培養環境

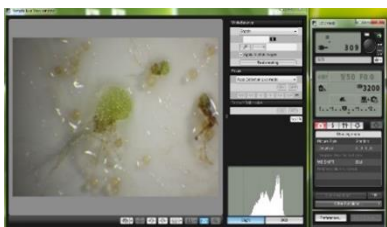
(2) 取樣與觀察

我們每週將培養中的孢子培養基置於解剖顯微鏡下拍照記錄，並計算當週的孢子發芽率，總共持續六週。拍照時由各培養基的四個孢子播撒點分別隨機選取一個區域拍攝。各孢子培養基的總發芽率為四組取樣範圍的孢子發芽率之平均。

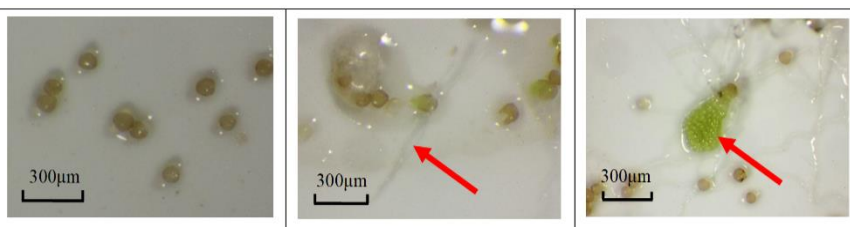
$$\text{孢子發芽率計算方法：發芽率(\%)} = \frac{\text{發芽孢子}}{\text{觀察孢子總數}} \times 100\%$$

* 判斷孢子的發芽與否，我們主要依據兩個配子體的特徵判斷（圖八）：

- 假根：孢子發芽時，會先長出透明的假根，以吸收水分及養分。
- 配子體：配子體生長時，綠色的原葉體為其最容易辨識的特徵。



圖七 使用軟體拍攝孢子



圖八 孢子未發芽（左）假根（中）配子體（右）

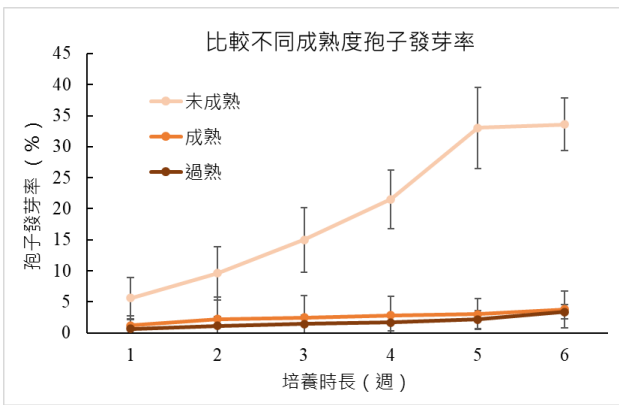
（三）結果分析

1. 孢子成熟度影響發芽及休眠現象

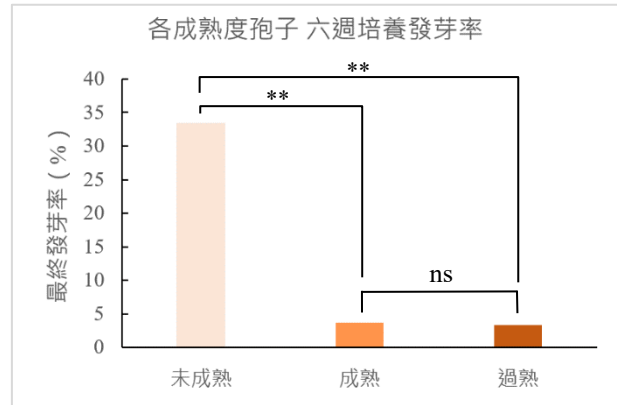
我們比較三個不同成熟度的孢子在未經處理下的孢子發芽情形，並且將連續六週的發芽率整理為表一，並繪製發芽率隨時間變化的折線圖（圖九）

表一 不同成熟度孢子培養過程發芽率

	培養時間 - 孢子發芽率 (%)						
	第 1 週	第 2 週	第 3 週	第 4 週	第 5 週	第 6 週	最終發芽率
未成熟孢子	5.6±3.3	9.6±4.3	15.0±5.2	21.5±4.8	33.3±6.6	33.6±4.3	33.6
成熟孢子	1.2±1.4	2.2±3.5	2.5±3.5	2.8±3.1	3.0±2.5	3.8±3.0	3.8
過熟孢子	0.7±1.5	1.2±1.6	1.4±1.5	1.7±1.3	2.1±1.5	3.4±1.2	3.4



圖九 不同成熟度孢子隨時間變化之發芽



圖十 不同成熟度孢子經六週培養發芽率比較

結果分析：根據圖九，我們發現在未經任何處理的情況下，未成熟孢子發芽率從第一週開始即明顯高於成熟及過熟孢子，並且在培養期間具有大幅度的成長，最終在經過六週培養後，發芽率已達到將近 35%。相比之下，成熟及過熟孢子的發芽率只有不到 5%，與未成熟孢子相比具顯著差異 (p-value<0.01)。

結果討論：前人研究表明，在進入冬季時，成熟孢子將進入休眠階段，進而降低孢子發芽率 (Baskin & Baskin, 2003)。此結果亦與本研究結果相符，成熟及過熟孢子因為受到休眠現象程度較高，發芽率明顯較低；而未成熟孢子則因較不受休眠現象影響而發芽率較高。此結果除了證明孢子成熟度將顯著影響孢子發芽，同時也驗證了孢子成熟度與休眠現象密切相關。

2. 不同時長之低溫處理對於孢子發芽率的影響

經過六週培養後，針對不同成熟度的孢子，我們分別比較其對照組（常溫處理）及實驗組（低溫處理）的孢子培養基之孢子發芽率，並整理為以下三表：

表二 不同低溫處理時間對於未成熟孢子發芽率影響

	0 週	2 週	4 週	6 週	8 週
實驗組孢子發芽率 (%)	33.6±4.3	46.9±5.6	61.8±12.1	65.1±3.6	41.4±14.2
對照組孢子發芽率 (%)		34.6±4.0	43.2±6.0	54.5±3.8	29.0±9.0
發芽率差值		12.3%	18.6%	10.6%	12.4%

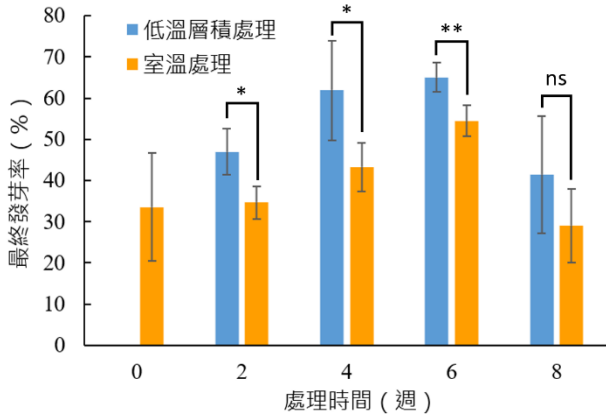
表三 不同低溫處理時間對於成熟孢子發芽率影響

	0 週	2 週	4 週	6 週	8 週
實驗組孢子發芽率 (%)	3.8±3.0	36.6±3.9	55.8±6.1	39.6±3.0	28.5±7.8
對照組孢子發芽率 (%)		16.0±5.9	17.0±0.70	21.0±7.9	40.0±10.0
發芽率差值		20.6%	38.8%	18.6%	-11.5%

表四 不同低溫處理時間對於過熟孢子發芽率影響

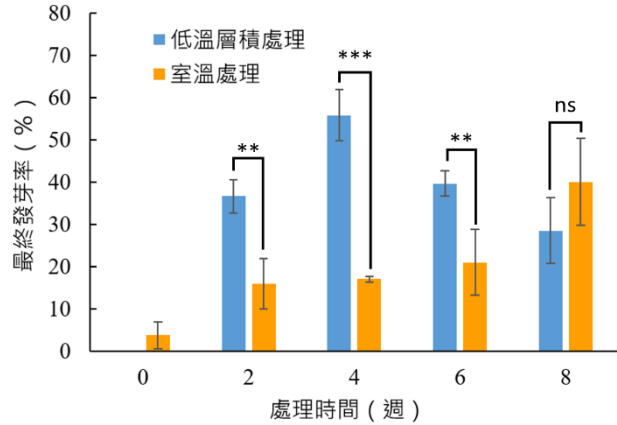
	0 週	2 週	4 週	6 週	8 週
實驗組孢子發芽率 (%)	3.4±1.2	57.4±6.7	75.5±2.6	61.4±1.9	32.1±5.6
對照組孢子發芽率 (%)		19.1±7.8	26.2±9.0	25.3±3.9	65.9±8.0
發芽率差值		38.3%	49.3%	36.1%	-33.8%

不同時長低溫處理之未成熟孢子發芽率 - 培養六週



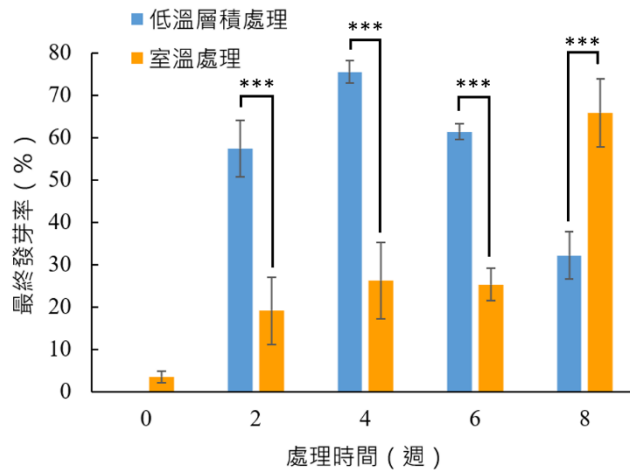
圖十一 未成熟孢子低溫處理結果

不同時長低溫處理之成熟孢子發芽率 - 培養六週



圖十二 成熟孢子低溫處理結果

不同時長低溫處理之過熟孢子發芽率 - 培養六週



圖十三 過熟孢子低溫處理結果

結果分析：

(1) 未成熟孢子

根據圖十一，未成熟的水蘚孢子在經過低溫處理後，發芽率相較於室溫處理皆有所提升。其中，在經過 4 週低溫處理後的孢子發芽率提升最為明顯，達到約 18.6%。而整體孢子發芽率則在經過 6 週低溫處理後達到最高值（65.1%）。

(2) 成熟孢子

根據圖十二，成熟水蘚孢子在 2、4 及 6 週低溫處理下，實驗組的孢子發芽率相較對照組的提升達到顯著水準。其中，孢子在經過 4 週低溫處理後發芽率提升程度最為明顯（約 39%），同時孢子發芽率亦達到最高值（55.8%）。此外，我們發現在經過 8 週低溫處理後，孢子發芽率並未提升，反而降低且低於對照組，約為 29%。

(3) 過熟孢子

根據圖十三，過熟的水蘚孢子結果與成熟孢子十分相似。在經過 4 週低溫處理後孢子發芽率提升最多（約 49%）且發芽率最高，達到約 75.5%。然而，在 8 週低溫處理後，實驗組發芽率大幅下降，遠低於未經低溫處理的對照組。

結果討論：

- (1) 低溫處理：綜觀未成熟、成熟及過熟孢子的實驗結果，我們發現在大部分情況下，水蕨孢子在經過低溫處理後，發芽率相較於未經處理者具有不同程度的提升，其中又以成熟及過熟孢子的效果尤為顯著，推測可能為該兩種成熟度孢子受到較多的休眠現象影響所導致。本實驗驗證了低溫處理能有效打破水蕨孢子的休眠狀態，並提升孢子的發芽率。
- (2) 低溫處理時長：我們發現不同成熟階段的孢子達到最佳發芽率所需的低溫處理時長不同。對於未成熟孢子而言，6 週的低溫處理可達到最佳發芽率；而對於成熟及過熟孢子，僅需 4 週即可達到發芽率的最高值。此外，在成熟及過熟孢子的實驗結果中，我們發現 8 週的低溫處理反而降低孢子發芽率，甚至低於對照組。此結果說明低溫處理並非是越久越好，過長時間的低溫處理反而會使效果變差。

五、結論與生活應用

(一) 結論

1. 水蕨孢子的成熟階段將影響孢子的發芽及休眠情形，成熟及過熟孢子受到休眠現象的影響較明顯，因此發芽率較低。孢子發芽率比較：未成熟>成熟>過熟。
2. 低溫處理能夠有效打破水蕨孢子休眠情形，並且提升孢子發芽率。整體而言，4 至 6 週的低溫處理對於提升水蕨孢子發芽率效果最佳。
3. 低溫處理對於孢子發芽率的提升效果以成熟及過熟孢子效果較佳，未成熟則相對不顯著。主要原因為成熟及過熟孢子受到休眠現象的影響較明顯，因此在打破休眠後，孢子發芽率的提升相對較為顯著。
4. 低溫處理時間過長無法繼續提升孢子發芽率，反而將導致發芽率降低。

(二) 相關應用

1. 水蕨為研究蕨類生活史及發育的重要材料，可以作為蕨類教育之絕佳教材。
2. 此實驗方法亦可以運用於其他具有休眠現象的植物，除了水蕨以外，也有機會應用於台灣水韭等珍稀蕨類的植生復育。
3. 水蕨為優良的綠肥植物，能運用於農業栽種。與水稻等作物一起種植，能夠有效地提高土壤肥力並保持水分，對於發展永續農業具有重要意義。

參考資料

1. 黃曜謀、李沛軒、傅春旭、張藝翰 (2014)。樹蕨類孢子成熟度與活力之關係。國立臺灣博物館學刊，67(2)，45-58。
2. Raghavan, V. (1989). Physiology of spore germination. Development and Cell Biology Series. University Press. Cambridge, UK, 27-52.
3. Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2003). Classification, biogeography, and phylogenetic relationships of seed dormancy. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linnington, S.H., Pritchard, H.W., & Probert, R.J. (Eds). Seed conservation: turning science into practice. Kew, Royal Botanic Gardens. p. 517-544.