

學術論述

## 蕨類植物孢子的收集與保存

黃曜謀<sup>1)</sup> 翁韶良<sup>2)</sup> 邱文良<sup>1,3)</sup>

## 摘 要

孢子的收集需先瞭解孢子的成熟季節，不同種類、生長區域與孢子體植株年齡都與孢子的發育有關。孢子成熟度可先由顏色做初步判定，細胞核位置及液胞大小亦是孢子成熟度的指標。一般蕨類孢子的收集，係將野外採回長有孢子之葉片經清洗後，平展於白紙上，在乾燥之室溫下置放約3d，大部份孢子會被釋出於白紙上。於清除雜質後，將孢子收集於秤量紙內或玻璃瓶中。觀音座蓮科等孢子囊之環帶缺乏或不發達者，孢子不易被釋出，在收集此類孢子時，可將孢子囊刮下置放於茶包袋中，輕輕搗碎孢子囊，再以蒸餾水加壓沖洗，可使孢子從茶包袋孔隙中流出。將含有孢子的水洗液倒入裝有濾紙之玻璃過濾器組，過濾後將留存於濾紙上的孢子進行後續保存。溫度和溼度會影響到孢子的活力，低溫有利於維持孢子的活力；蕨類孢子活力的保存一般在乾燥及低溫的條件下最為有利，然而，某些蕨類物種，溼儲存方式已被證實較乾燥儲存可維持較久之孢子活力及縮短孢子發芽時間。

關鍵詞：收集、蕨類植物、孢子、保存。

黃曜謀、翁韶良、邱文良。2003。蕨類植物孢子的收集與保存。台灣林業科學 18(1):75-9。

Review article

## The Collection and Storage of Pteridophyte Spores

Yao-Moan Huang<sup>1)</sup> Shau-Lian Wong<sup>2)</sup> Wen-Liang Chiou<sup>1,3)</sup>

## 【Summary】

To collect spores for each species, it is crucial to know the season in which spores typically mature. In addition, the location, microhabitat, and sporophyte age affect the timing of spore maturation. The degree of spore maturation can be estimated by spore color, nucleus position, and vacuole size. After harvesting the blade which bears the spores, wash it lightly with cool, fresh water. Lay that blade, spore side down, on a sheet of white paper and leave it in a dry place for 3d at room temperature. Most spores will be released from the sporangia and will rest on the paper. After separating the chaff from the spores, the spores are ready for storage. The sporangia of some ferns, e.g., Marattiaceae, lack or have underdeveloped annulus which will not easily

<sup>1)</sup> 行政院農業委員會林業試驗所福山研究中心，260 宜蘭郵政 132 信箱 Fushan Station, Taiwan Forestry Research Institute. P. O. Box 132, Ilan 260, Taiwan.

<sup>2)</sup> 行政院農業委員會特有生物研究保育中心解說教育組，552 南投縣集集鎮民生東路 1 號 Division of Interpretation and Education, Taiwan Endemic Species Research Institute. 1 Ming-Shen East Road, Chichi 552, Nantou County, Taiwan.

<sup>3)</sup> 通訊作者 Corresponding author, e-mail:chiou@serv.tfri.gov.tw

2002 年 3 月送審 2002 年 10 月通過 Received March 2002, Accepted October 2002.

rupture. For these ferns, the sporangia must be scraped into an empty tea bag and broken first. Then force the spores out of the bag with water under air pressure. Filter the spores from the water, and then dry the spores for storage. Temperature and humidity affect spore life. A lower temperature is favorable for maintaining spore viability. Most fern spores are stored under dry conditions, but the spores of some species remain viable longer and germinate more quickly when they are stored in wet conditions.

**Key words:** collection, Pteridophyte, spore, storage.

**Huang YM, Wong SL, Chiou WL. 2003.** The collection and storage of Pteridophyte spores. *Taiwan J For Sci* 18(1):75-9.

臺灣氣候溫暖潮溼，地形的多樣性，加上平地至高山地區溫度的垂直變化很大，致使蕨類物種豐富(Kuo 1998, Tsai 1999)。長期以來，由於自然或人為因素，使得許多具有學術或經濟價值的植物遭到嚴重的破壞，族群數量急遽減少，資料顯示，台灣至少有627種蕨類，其中178種(28%)被歸納IUCN受威脅物種名單中(Kuo 1998)，有鑑於此，蕨類的保育工作益顯重要。蕨類植物的主要繁殖體是孢子，其體積小、數量多，是蕨類基因保存及繁殖復育的主要來源，但其收集與保存方法與開花植物的種子不盡相同，本篇報告僅就野外採集蕨類植物孢子的要點、室內收集孢子的方法及保存孢子注意事項逐一說明。

#### 野外採集蕨類植物孢子的要點

收集蕨類植物之孢子首先應對孢子出現的季節及成熟月份有初步的認識，避免徒勞無功或非達到最理想的收集狀態，例如：孢子尚未成熟或孢子囊已開裂並完全釋出孢子都非理想的孢子收集狀況。溫帶地區或乾溼變化明顯之熱帶地區，孢子成熟期多集中在生長季末期，潮溼熱帶地區則不明顯(Page 1979)。在台灣地區有關蕨類物候學研究報告並不多，Chiou et al. (2001)觀察北部台灣金狗毛蕨(*Cibotium taiwanense*)的物候現象，結果顯示其孢子成熟期多集中溫暖之季節(7~10月)，孢子則多延至次年5~10月發散。蘇澳地區筆筒樹(*Sphaeropteris lepifera*=*Cyathea lepifera*)孢子成熟月份為6~9月，並在成熟後1 mo內開始釋放孢子(Ying and Huang 1995)。中部地區台灣原始觀音座蓮

(*Archangiopteris somai*)的孢子囊在冬季成熟，冬末孢子囊開始開裂至翌年春初(作者，未發表)。許多蕨類物候學之研究多集中於某一地區或特定年份(Farrar and Gooch 1975)，但同一種類在不同的棲息地可能會有不同的物候現象(Simabukuro et al. 2000, Arens 2001)，因此，在採集孢子時還要注意不同地理區域的成熟期差異。野外蒐集蕨類孢子除了須考量物候因素，如孕性葉出現季節、孢子成熟月份及釋放月份，還需要注意植株發育階段，如筆筒樹需樹高超過1.75m以上，方具產生孢子的能力(Ying and Huang 1995)。

當收集孢子時，首先需辨別孢子是否已成熟或發散，未成熟的孢子往往無法被釋出；相反地，成熟過久則大部分孢子已自孢子囊中釋出，對孢子採收量大打折扣。孢子成熟度可用放大鏡先行檢視，未成熟時包藏孢子的孢子囊小，外觀通常是淡綠色；成熟時孢子囊飽滿，外觀則轉成淡褐色或深褐色，甚至是深黑色，但某些物種，例如：水龍骨屬(*Polypodium*)孢子成熟時孢子囊為黃色，台灣原始觀音座蓮、觀音座蓮則為橘色(作者，未發表)。孢子釋放後孢子囊呈灰白色且有破損(Hoshizaki and Moran 2001)。

未成熟的孢子色淡，成熟時顏色轉深，通常為褐色、黃色或是黑色，但也有些是綠色(如：木賊科、紫萁科、禾葉蕨科、膜蕨科、球子蕨科)，依物種而有所差異(Hoshizaki and Moran 2001)。若在光學顯微鏡下檢視，成熟孢子之細胞核位於中央位置，未成熟孢子的細胞核則偏離中央且具有一大而明顯液泡(Marengo

1949)。成熟孢子活力較高，發芽所需時間較短，而未成熟的孢子活力低，發芽所需時間較長，甚至無法發芽，或發芽後無法正常生長。

#### 室內收集孢子方法

為獲得某一物種高純度的孢子，避免由野外採回長有孢子的葉面有外來孢子污染，可先以緩速流水沖洗，去除沾附在葉片上之雜質及非目標孢子，輕輕抖掉殘留在葉片上的水分，將著生孢子囊葉面朝下置於平展白紙上，再將葉片連同承收孢子之白紙完全置入一摺疊之報紙中，以避免孢子在收集過程中隨風飄散或是受到其它孢子之污染(Lee 1999, Hoshizaki and Moran 2001)。用信封或紙袋收集孢子也是可行的方法，但袋子一定要密封，否則孢子極易由細縫漏失；此外，孢子也常堆集在袋子的封口折疊處，並導致不易收集或甚至漏失(Perl 1977, Jones 1987)。

溫暖乾燥之環境下，成熟的孢子通常在收集的數分鐘內就開始自孢子囊中被釋放出來，葉片置於紙上如有3d時間，可有較足夠的時間使孢子完全釋出，未成熟孢子需時較久甚至難以被釋出。收集孢子的過程不宜在潮溼的環境(特別避免在塑膠袋中進行，因為在高溼環境下孢子囊的環帶不易收縮並導致孢子囊不張開，孢子無法被釋出，而且高溼也助長菌類的快速生長，並造成所收集的蕨類孢子受損，影響其發芽(Jones 1987)。

成熟的孢子會因孢子囊上環帶的收縮而彈出並掉落於紙上，孢子如細沙狀散布於紙張上，然所有細沙物非全是孢子，還包括其它脫落物(如孢子囊碎片、孢膜、鱗片、毛等)。由於孢子與這些雜質的體積及重量不同，其被紙纖維吸附之程度亦有所差異，因此將白紙傾斜並輕敲，可將兩者分離。再用毛筆將其收集於秤量紙上或玻璃瓶中，放入小封口袋中，袋上註明種名、採集者、編號、蒐集時間、地點等，依據孢子特性加以適當保存(Stokey and Atkinson 1958, Lane 1980, Jones 1987)。

觀音座蓮科等環帶缺乏或不發達的物種，當孢子囊成熟開裂時，孢子往往無法被完全釋

放出來，而殘留在孢子囊中，造成收集之困擾。在收集此類孢子時，可先將孢子囊以藥勺刮下置放於一端有開口的茶包袋中，以藥勺背面輕輕搗碎孢子囊，使孢子不再被孢子囊所包被，再將茶包袋口打開，以蒸餾水加壓沖洗，此時孢子便會從茶包袋孔隙中流出，而體積較大的孢子囊殼則留在袋中。以燒杯承收含有孢子的水洗液，將水洗液倒入裝有孔徑5~10  $\mu\text{m}$  濾紙之玻璃過濾器組上方，過濾器下方接抽氣瓶，抽氣後因水分子小於濾紙孔徑而流到抽氣瓶中，孢子直徑大於濾紙孔徑則沈積在濾紙表面，可連同濾紙置於玻璃瓶中進行後續保存。

#### 保存孢子注意事項

孢子發芽率隨著儲存時間的延長而減低直至完全無法發芽為止，越新鮮的孢子，發芽比例越多且速度越快(Windham et al. 1986)。孢子活力維持的長短則視物種而定，同型孢子的蕨類中，大多數種類的孢子活力可維持數月或數年之久，但紫萁科(*Osmundaceae*)、裏白科(*Gleicheniaceae*)、禾葉蕨科(*Grammitidaceae*)及膜蕨科(*Hymenophyllaceae*)的孢子在採收後活力僅能維持數週或數月(Stokey and Atkinson 1956, Lloyd and Klekowski 1970, Page 1979)。Lloyd and Klekowski(1970)比較綠色孢子與非綠色孢子，結果顯示在一般乾燥室溫下，綠色孢子維持活力期間平均僅48d，非綠色孢子達2.8yr。高含水率、高呼吸率(Okada 1929)、孢子壁薄、低貯存養分(Dyer 1979)及無休眠現象(Raghavan 1989)等現象，是綠色孢子短壽的緣由。

溫度和溼度會影響到孢子活力(Okada 1929)，溫度超過55  $^{\circ}\text{C}$ 時，孢子活力將嚴重受損害(Page 1979)。Windham et al. (1986)以標本館的標本檢測 *Pellaea* 孢子活力，證實由經過24hr 60  $^{\circ}\text{C}$  熱處理後標本所取下之孢子已完全喪失活力無法發芽。反之，低溫則有助於延長孢子活力。低溫對大多數孢子活力保存最為有利(Dyer 1979, Scheuerlein et al. 1989)，例如：*Osmunda regalis* 及 *O. claytoniana* 的孢子儲存於4~6  $^{\circ}\text{C}$  中9 mo後，發芽率仍高達70~75%(Stokey 1951)；Aderkas and Cutter(1983)證實儲存溫度越低對維

持*Todea barbara*孢子的活力越有利，在-20 條件下儲存之孢子，即使經過 18 mo 仍未減低其發芽率；而室溫儲存 4 mo 後，孢子已不具發芽能力。

孢子一般在乾燥環境下進行儲存，但Lindsay et al. (1992)將五種蕨類(*Todea barbara*, *Athyrium filix-femina*, *Blechnum spicant*, *Polystichum setiferum*, *Phyllitis scolopendrium*)之孢子在室溫下分別進行乾儲存及溼儲存，結果發現這些物種的乾儲存孢子，隨著儲存時間的延長而逐漸喪失其活力，同時孢子發芽所需時間也延長；而溼儲存方式則大幅減緩綠色孢子喪失活力之速度；即使非綠色孢子經過兩年的溼儲存，其發芽能力及發芽速度幾乎和新鮮孢子一樣。瓶蕨(*Vandenboschia auriculata*)綠色孢子浸泡在蒸餾水中並予以 4 低溫儲存 10 wk 後，孢子發芽率達 85%，而同一來源之孢子 4 乾儲存經 10 wk 後，孢子發芽率僅 24%(作者，未發表資料)；雖然研究結果初步顯示，溼儲存方式可維持蕨類孢子活力及縮短發芽時間，然而這是否適用於所有蕨類物種，還需要有更多的研究報告來證實。

## 引用文獻

- Aderkas PV, Cutter EG. 1983.** The role of the meristem in gametophyte development of the Osmundaceous fern *Todea barbara* (L.) Morre. *Bot Gaz* 144(4):519-24.
- Arens NC. 2001.** Variation in performance of the tree fern *Cyathea cracasana* (Cyatheaceae) across a successional mosaic in Andean cloud forest. *Am J Bot* 88:545-51.
- Chiou WL, Lin JC, Wang JY. 2001.** Phenology of *Cibotium taiwanense* (Dicksoniaceae). *Taiwan J For Sci* 16(4):209-15.
- Dyer AF. 1979.** The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: Dyer AF, editor. *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press. p 253-305.
- Farrar DR, Gooch RD. 1975.** Fern reproduction at Woodman Hollow, Central Iowa: preliminary observation and a consideration of the feasibility of studying fern reproductive biology in nature. *Proc Iowa Acad Sci* 82:119-22.
- Hoshizaki BJ, Moran RC. 2001.** *Fern grower's manual* (revised and expanded edition). Portland, OR: Timber Press. p 72-4.
- Jones DL. 1987.** *Encyclopaedia of ferns*. Portland, OR: Timber Press. 433 p.
- Kuo CM. 1998.** The rare and threatened pteridophytes of Taiwan. In: Peng CI, Lowry II PP, editors. *Rare, threatened, and endangered floras of Asia and the Pacific rim*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 16, p 65-88.
- Lane BC. 1980.** A procedure for propagating ferns from spore using a nutrient-agar solution. *The International Plant Propagators Society Combined Proceedings*. 30: 90-7.
- Lee KY. 1999.** A study on the morphogenesis of gametophytes of *Bolbitis* Schott and *Egenolfia* Schott (Lomaripteridaceae) in Taiwan [Master's thesis]. Kaoshiung: Sun Yat-sen Univ. [in Chinese].
- Lindsay S, Willims N, Dyer AF. 1992.** Wet storage of fern spores: unconventional but far more effective! In: *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Andover, MN: Intercept. p 285-94.
- Lloyd RM, Klekowski EJ Jr. 1970.** Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica* 2:129-37.
- Marengo NP. 1949.** A study of the cytoplasmic inclusions during sporogenesis in *Onoclea sensibilis*. *Am J Bot* 36:603-13.
- Okada Y. 1929.** Notes on the germination of the spores of some pteridophytes with special regard to their viability. *Sci Rep Tôhoku Imp Univ Ser 4, Biol* 4:127-82.
- Page CN. 1979.** Experimental aspects of fern ecology. In: Dyer AF, editor. *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press. p 551-89.

**Perl P. 1977.** The tricky art of propagating seedless plants. In: Fens. Alexandria, VA: Time-life Books. 75-80 p.

**Scheuerlein R, Wayne R, Roux SJ. 1989.** Calcium requirement of phytochrome-mediated fern spore germination: no direct phytochrome-calcium interaction in the phytochrome-initiated transduction chain. *Planta* 178:25-30.

**Simabukuro EA, Esteves LM, Felipe GM. 2000.** Fern spore rain collected at two different heights at Moji Guacu (Sao Paulo, Brazil). *Fern Gaz* 16:147-66.

**Stokey AG. 1951.** Duration of viability of spores of the Osmundaceae. *Am Fern J* 41:111-5.

**Stokey AG, Atkinson LR. 1956.** The gametophyte of the Osmundaceae. *Phytomorphology* 6:9-40.

**Stokey AG, Atkinson LR. 1958.** The gametophyte of the Grammitidaceae. *Phytomorphology* 8:391-403.

**Tsai JL. 1999.** The resource and distribution of Pteridophytes in Taiwan. In: Chen GF, editor. Proceedings of the collection and application of Pteridophytes progenies. Taitung, Taiwan: Taitung District Agricultural Improvement Station. p 5-33. [in Chinese].

**Windham MD, Wolf PG, Ranker TA. 1986.** Factors affecting prolonged spore viability in herbarium collections of three species of *Pellaea*. *Am Fern J* 76:141-8.

**Ying SS, Huang YM. 1995.** Phenological study on *Sphaeropteris lepifera* at Su-Au area. *Mem Coll Agric NTU* 35:451-64. [in Chinese with English abstract].

