中華民國第54屆中小學科學展覽會作品說明書

國中組 生物科

第三名

030316

「絲」相授「綬」—探討綬草與絲核菌共生的秘密

學校名稱:桃園縣立經國國民中學

作者: 指導老師:

國二 胡若谷 張佳鈴

國二 林筱慈 范揚錦

國二 蔡婕依

關鍵詞:綬草、絲核菌、共生

作品名稱:「絲」相授「綬」-探討綬草與絲核菌共生的祕密

摘要:

在校園中採集綬草(Spiranthes sinensis),發現綬草喜生長在陽光充足且潮濕的土壤上,密度達 66 株/平方公尺。綬草在每年 4-5 月開粉色花,花序逆時針旋轉、順時針旋轉、無旋轉各占 51%、31%、18%。綬草種子在沒有絲核菌(Rhizoctonia sp.)的糖水中無法萌芽,且植株的根、葉會呈現生長停滯狀態;含有絲核菌的土質則對綬草的根、葉皆有促進生長的效果,40 天的平均變化量分別為 0.42cm 及 2.06cm。真菌菌絲可穿過綬草根部表皮、皮層,在皮層細胞質內形成黃褐色菌絲團並有菌絲互相連結。經實驗培養綬草根部發現真菌種類有:絲核菌屬、鏈格孢菌屬、彎孢菌屬、鐮孢菌屬、麴黴屬。並由根部組織進行 DNA 萃取,進行 PCR複製並比對基因序列,證實在根部組織的共生真菌為絲核菌。綬草可利用根、莖進行無性生殖,且以莖為最佳,葉子無法進行無性生殖。

壹、 前言與研究動機

在校園草地中,四、五月清明時節時可發現有種會螺旋向上生長的粉紅色花,經查文獻得知這種植物為<u>綬草</u>(Spiranthes sinensis),由於花序旋轉向上生長又名<u>盤龍蔘</u>,花朵兩側對稱具有白色波浪狀唇瓣,為多年生蘭科植物。這種植物全株具有藥效,經濟價值頗高,常遭人大量採集而消失殆盡。但因我們學校校園環境較單純,且它的開花期僅有一至兩個月,平時不開花的外觀就像一般雜草,所以不易被人發現。

因為綬草在中國被列為珍稀植物,也是台灣地區最小的蘭科植物,因為具有多種藥效也 引起我們對該植物的興趣。我們想先從觀察綬草生活史、絲核菌構造著手,接著發掘兩者共 生的秘密,再更進一步地將絲核菌配合綬草營養器官進行無性繁殖,希望能使綬草在我們校 園中順利繁殖生長,成為我們校園的特色明星植物;未來我們也想運用絲核菌幫助種子發芽, 使綬草進行有性生殖,能擁有多樣化基因,讓綬草能夠在各種環境真正、長久地復育,重返 大自然,讓綬草抗癌、糖尿病等藥效更遠播,使飽受病痛之苦人們有更多管道能舒緩,也讓 更多人認識這蘭科植物中的小明星。

貳、研究目的

一、探究校園內綬草的生長與分布

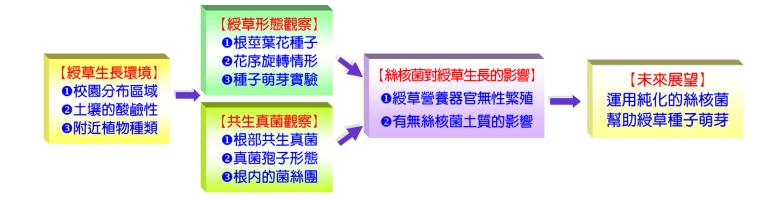
- (一)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域
- (二)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域土壤酸鹼性
- (三)研究觀察並記錄綬草生長區域植株種類

二、探究綬草的外部型態

- (一)研究觀察並記錄綬草型態
- (二)研究觀察並記錄綬草花序的旋轉生長情形
- (三)研究觀察並記錄綬草種子在不同濃度糖水中萌芽情形

三、探究綬草與絲核菌的共生關係

- (一)研究與綬草共生根部的真菌種類
 - 1. 運用檢索表分析觀察到的真菌種類
 - 2. 研究觀察並記錄真菌孢子
 - 3. 研究觀察菌絲團中的真菌種類鑑定
- (二)比較真菌在綬草根部的共生關係
- (三)研究觀察並記錄綬草的營養器官繁殖
- (四)探究絲核菌對綬草幼苗根葉生長的影響
 - 1. 研究觀察並記錄高溫滅菌十質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響
 - 2. 研究觀察並記錄綬草生長區土質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響



参、研究設備及器材

一、工具:

解剖刀、解剖針、尺、筆、記錄紙、電子天平、溫度計、培養皿、酒精燈、燒杯、 棉繩玻璃棒、量筒、研缽、微量滴管、微量離心管

二、設備:

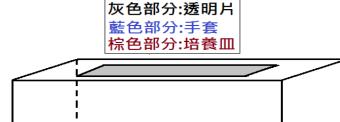
Dino-Lite 立體解剖顯微鏡、複式顯微鏡、解剖顯微鏡、數位相機、pH 計、高速離心機、高溫高壓滅菌鍋、自製無菌操作台

三、軟體:

Motic 軟體 (測量孢子及菌絲長度用)、PhotoImpact 軟體

四、藥品:

尿液檢驗試紙、亞甲藍液、酸性品紅、洋菜、漂白水、展著劑、萃取 DNA 的藥品、肥皂水、75%酒精





自製無菌操作台

肆、

肆、研究方法及過程

一、探究校園內綬草的生長與分布

- (一)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域
 - 1.觀察校園中有綬草生長分布的位置。
- 2.將各位置分析各種物理因素情形,並標記為 A、B、C 三區。



學校校園 A、B、C 三區分區示意圖



圖 1:將校園生長綬草的區域,依不同土壤環境分為 A、B、C 三個樣區

(二)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域土壤酸鹼性

- 1. 挖取 A、B、C 三區域土壤各三份。
- 2.以 200g 水加入 5g 土壤置於燒杯中。
- 3.以 pH 指示計測量燒杯內泥水的 pH 值。



(三)研究觀察並記錄綬草生長區域植株種類

- 1.分別至 A、B、C 三區綬草附近觀察期他植物種類。
- 2.利用圖鑑等資料辨識植物種類並記錄。

二、探究綬草的外部型態

(一)研究觀察並記錄綬草型態

- 1.利用鐵尺當作比例尺。
- 2.將尺與綬草植株的各部位,置於黑布上一起拍攝並記錄。

(二)研究觀察並記錄綬草花序的旋轉生長情形

- 1.在各個樣區(1平方公尺)內生長綬草的草地進行觀察。
- 2.數出樣區內綬草的花序的旋轉情形及數量。
- 3.統計樣區內綬草花序以順時針旋轉、逆時針旋轉及無旋轉所占的百分比。



❶順時針旋轉



2逆時針旋轉



3無旋轉

圖 3: 比較花序順時針旋轉、逆時針旋轉及無旋轉花形

(三)研究觀察並記錄綬草種子在不同濃度糖水中萌芽情形

- 1.將 0%、1%、2%、3%、4%、5%糖水分別置於鋪有衛生紙的培養皿中。
- 2. 觀察並記錄不同糖水濃度,對綬草種子的萌芽率影響。



(濃度: <u>糖</u>×100%)

0%→水 300g/糖 0g

1%→水 297g / 糖 3g

2%→水 147g/糖 3g

3%→水 194g / 糖 6g

4%→水 144g/糖 6g

5%→水 114g/糖 6g

圖 4:不同濃度糖水對種子萌芽率的影響實驗

糖水濃度調配比例

三、探究綬草與絲核菌的共生關係

(一)研究與綬草共生根部的真菌種類

- 1.運用檢索表分析觀察到的真菌種類
 - (1) 洋菜粉 1g:水 160g 調配出洋菜膠並煮至沸騰。
 - (2) 將洋菜膠放入高壓高溫滅菌鍋以 130°C、1.5atm、30 分鐘、進行滅菌。
 - (3) 將根以清水清洗乾淨接著以肥皂水二度清洗,再把根放入無菌水反覆沖洗。
 - (4) 於自製無菌操作台內,把根置於無菌水中橫切去表皮。
 - (5) 將滅菌後的洋菜膠分裝至無菌的培養皿冷卻後放入根切片及根整根。
 - (6) 利用菌核類真菌之鑑定檢索表及圖鑑。
 - (7) 觀察在培養皿綬草的根所產生的真菌種類記錄觀察結果並拍照。

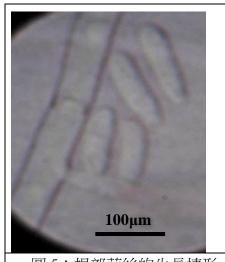


圖 5:根部菌絲的生長情形



圖 6: 根部菌絲及孢子的生長情形

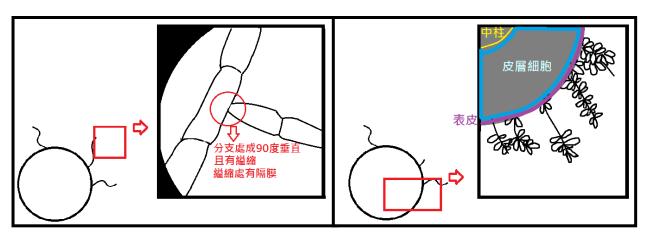


圖 7: 根部菌絲的生長情形示意圖

圖 8:根部菌絲及孢子的生長

2.研究觀察並記錄真菌孢子

- (1) 洋菜粉 1g:水 160g 調配出洋菜膠並煮至沸騰。
- (2) 將洋菜膠放入高壓高溫滅菌鍋以 130°C、1.5atm、30 分鐘進行滅菌。
- (3) 將根以清水清洗乾淨接著以肥皂水二度清洗,再把根放入無菌水反覆沖洗。
- (4) 於自製無菌操作台內,把根置於無菌水中橫切去表皮。
- (5) 將滅菌後的洋菜膠分裝至無菌的培養皿冷卻後放入根切片及根整根。



圖 9:洋菜粉溶於高溫 100℃水中



圖 10: 根切片分別放入者好的培養皿中

3.研究觀察菌絲團中的真菌種類鑑定菌絲種類

- (1) 取綬草的老根以清水洗淨,取約4cm 共6個。
- (2) 將根浸泡在 100ml 的 1%NaClO+Tween20(展著劑)2 分鐘。
- (3) 清水沖洗 10 分鐘,放入研磨,再放入液化氮冷卻成固體,磨成粉狀。
- (4) 將紛狀根部組織放入 1.5c.c.微量離心管。
- (5) 用微量吸管吸取 0.4c.c.AP1,解離細胞讓 DNA 釋出。
- (6) 使用 5μ L 的 RNase A 的分解酵素將 RNA 去除,放入 65℃水浴加熱 10 分鐘。
- (7) 加入 130μL 的 Buffer P3 混合均匀並放入冰塊 5 分鐘再高速離心 3 分鐘。
- (8) 吸取 600μL 的過濾 1 次的液體再加入 900μL 的 Buffer AW1。
- (9) 加到 Dneasy Mini column,離心 1 分鐘使 DNA 留在膜上再倒掉廢液,重複 3 次。
- (10) 加入 300 µL 的 Buffer AW2(洗掉 Buffer), 離心 3 分鐘。
- (11) 將上層 DNA 換到新的 1.5c.c.微量離心管,加入 100μL 的 Buffer AE, 溶出 DNA。

- (12) 以 F-primerc 和 R-primer 當作引子, 進入 PCR 大量複製 DNA(100min), 重複 30 次。
- (13) 以 NCBI(美國農業部)基因庫,進行線上比對 DNA 序列並鑑定種類。



(1)由六株綬草取六個老根



(2)用清水將土清除



(3)浸泡在 100ml 的漂白水及 滴入 1-2 滴展著劑



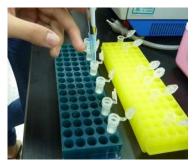
(4)清水沖洗 10 分鐘



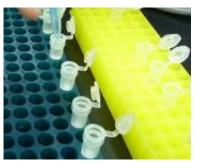
(5)放入研缽研磨



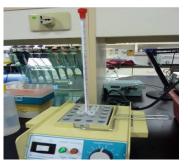
(6)以液化氮將根冷卻磨成粉狀



(7)解離細胞讓 DNA 釋出



(8)用 RNase A 去除 RNA



(9)放入 65℃ 水浴加熱 10 分鐘



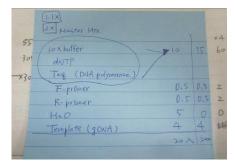
(10)加入 130 μL 的 Buffer P3 混合並放入冰塊 5 分鐘 再高速離心 3 分鐘



(11)取 600 μ L 過濾液體再 加入 900 μ L Buffer AW1



(12)加入 100 μ L 的 BufferAE 溶出 DNA



(13)加入 PCR 藥品



(14) PCR 重複 30 次(100min)



(15)製作電泳膠



(16)將 DNA 放入電泳膠凹槽



(17)六個樣本電泳後的結果 (約 700base pairs)



(18)於 NCBI 比對 DNA 序列

圖 11. 綬草根部的菌絲團 DNA 萃取步驟及鑑定流程(1~18)

(二)比較真菌在綬草根部的共生關係

- 1. 研究觀察並記錄真菌在綬草根的分布位置
 - (1)洋菜粉 1g:水 160g 調配出洋菜膠並煮至沸騰。
 - (2)將洋菜膠放入高壓高溫滅菌鍋以 30 分鐘、130°C、1.5atm 進行滅菌。
 - (3)將根以清水清洗乾淨接著以肥皂水二度清洗,再把根放入無菌水反覆沖洗。
 - (4)於自製無菌操作台內,把根置於無菌水中橫切去表皮。
 - (5)將滅菌後的洋菜膠分裝至無菌的培養皿冷卻後放入根切片。
 - (6)設計實驗,將削好的1公分筆蓋放置培養皿中央。
 - (7)將綬草的切片放入筆蓋中(筆蓋裡有洋菜膠),使中間的組織被筆蓋隔開。
 - (8)培養皿中筆蓋內部與外部同等高。
 - (9)記錄並用顯微鏡觀察菌類染色後生長的部位。
 - (10)記錄真菌分布位置。





❶以 1:160 調配出洋菜膠

❷以酒精燈煮至沸騰

3高溫高壓滅菌 30 分鐘



● 將根以清水及肥皂水清洗 把根放入無菌水反覆沖洗



❺於無菌水中横切去表皮



●洋菜膠分裝至無菌的培養皿, 待冷卻後再放入根切片

圖 12. 比較真菌在綬草根部的共生實驗流程(●~6)

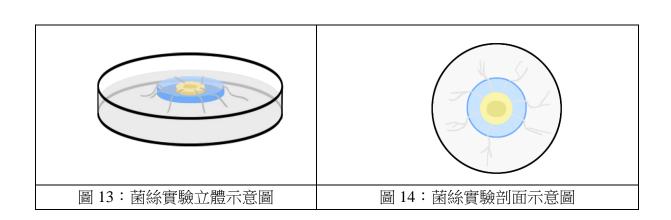




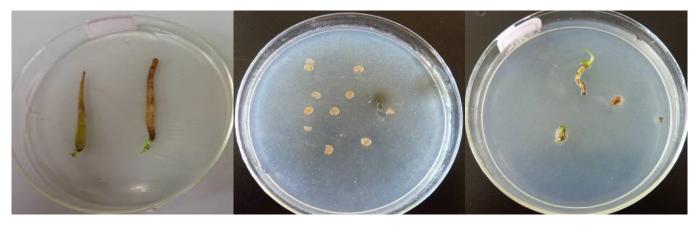
圖 15: 菌絲實驗實圖 (酸性品紅染色)



圖 16:菌絲實驗放大圖 (酸性品紅染筆蓋周圍)

(三)研究觀察並記錄綬草的營養器官繁殖

- (1) 洋菜粉 1g:水 160g 調配出洋菜膠並煮至沸騰。
- (2) 將洋菜膠放入高壓高溫滅菌鍋以 30 分鐘、130℃、1.5atm 進行滅菌。
- (3) 將營養器官以清水清洗乾淨接著以肥皂水二度清洗,再把根放入無菌水反覆沖洗。
- (4) 於自製無菌操作台內,把營養器官置於無菌水中橫切去表皮。
- (5) 將滅菌後的洋菜膠分裝至無菌的培養皿冷卻。
- (6) 將相同的營養器官切片及其整株根分別放入已冷卻的培養皿中。
- (7) 觀察並記錄營養器官生殖情形。



●根部整株放入冷卻的培養皿 ❷根切片放入冷卻的培養皿

3 莖部整株放入培養Ⅲ



◆莖切片放入冷卻的培養皿

●葉切片放入冷卻的培養皿

⑥葉部整株放入培養Ⅲ

圖 17. 綬草營養器官繁殖實驗(❶~⑥)

(四)探究絲核菌對綬草根葉生長的影響

- 1.研究觀察並記錄高溫高壓滅菌土質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響
- (1) 將 1500 公克土壤高溫高壓滅菌後(130°C, 1.5atm)冷卻後置於盆中。
- (2) 將綬草幼苗四株移植於盆中觀察生長情形,每隔20天記錄一次,共觀察3次。
- 2.研究觀察並記錄綬草生長區土質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響
- (1) 將 1500 公克綬草生長區土壤置於盆中。
- (2) 將綬草幼苗四株移植於盆中觀察生長情形,每隔20天觀察記錄一次,共觀察3次。

伍、研究結果

一、探究校園內綬草的生長與分布

(一)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域

	環境描述	綬草密度(棵/平方公尺)	綬草平均高度(cm)
A區	潮濕、多日照、大量蚯蚓	66	6.0
B區	潮濕、少日照、少量蚯蚓	3	5.2
C區	乾燥、多日照、無蚯蚓	7	5.2

乾燥、日照充足及潮濕、少日照處,綬草較稀疏、密度較低、高度較低; 土壤潮濕、日照充足處,綬草較密集、密度較高、高度較高。

(二)研究觀察並記錄校園中綬草分布區域土壤酸鹼性

以 pH 指示計測量後發現其 pH 值為 7.1~7.4 之間,因此判斷綬草周遭土壤為弱鹼性。

200g 水加 5g 土壤	A 區	B 區	C 區	
第1次	7.4	7.7	7.4	
第2次	7.2	7.2	7.3	
第3次	7.5	7.3	7.7	
平均值	7.36±0.15	7.4±0.26	7.46±0.21	

(三)研究觀察並記錄綬草生長區域植株種類

綬草附近植株有大花咸豐草、空心蓮子草、含羞草、葉下珠、山萵苣、紫背草等。





圖 18. 綬草生長區域其他植株種類 (●~⑥)

二、探究綬草的外部型態

(一)研究觀察並記錄綬草型態

(1)綬草根:根部平均長度為 4.76cm;平均寬度為 0.48cm;一株平均有 5 個根。



圖 19: 綬草根

(2)綬草莖:平均長度為 1cm;平均寬度為 0.45cm。

(3) 綬草葉:平均長度為 8.78cm;平均寬度為 0.9cm;一株平均有 5 片葉子。



圖 20: 綬草莖和葉

(4)綬草花:

a:平均長度為 0.6cm;平均寬度為 0.3cm;一株平均有 35 朵花;長花段平均為 9.43cm。

b:一朵花有六片花瓣,其中一片是白色波浪狀唇瓣,花瓣呈現左右對稱。



圖 21: 綬草的花

c: 雄蕊與雌蕊形成蕊柱偏一邊生長,其中一片花瓣特化成唇瓣,開花時會轉位,花粉成塊狀。

(5)種子:

綬草種子無胚乳僅有胚,故養分不足以使種子生長,僅發育至球型胚階段,所以需要與真 菌共生。

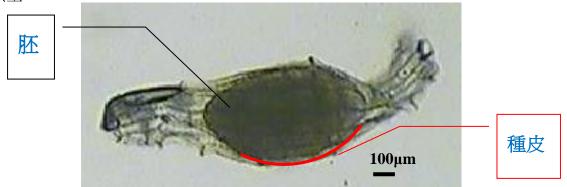


圖 22: 綬草種子,無胚乳僅有胚

(二)研究觀察並記錄綬草花序的旋轉生長情形

(1)將觀察結果統計發現綬草花序逆時針旋轉占 51%,順時針旋轉占 31%,無旋轉占 18%。 (2)可見綬草花序逆時針旋轉為最多數。

棵數

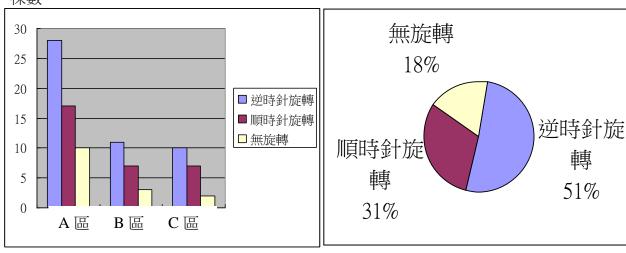


圖 23: 綬草花序旋轉比例

圖 24: 綬草花序旋轉百分比

(三)研究觀察並記錄綬草種子在不同濃度糖水中萌芽情形

(1)我們經過約一個月的觀察後發現,無共生菌狀態下,加入糖水的綬草種子並無萌芽。

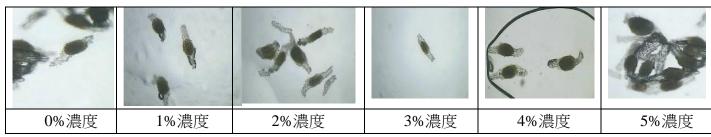


圖 25:0%~1%濃度的糖水,皆無法使種子萌芽

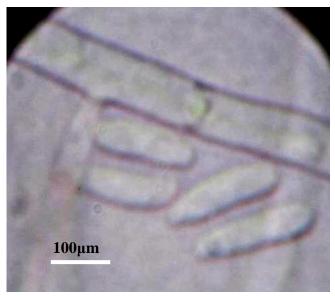
三、探究綬草與絲核菌的共生關係

(一) 研究與綬草根部共生的真菌種類

- 1.利用顯微鏡觀察及記錄,並運用檢索表分析真菌種類
 - (1)我們利用檢索表可知這些菌有:絲核菌屬、鏈格孢菌屬、彎孢菌屬、鐮孢菌屬、麴黴屬

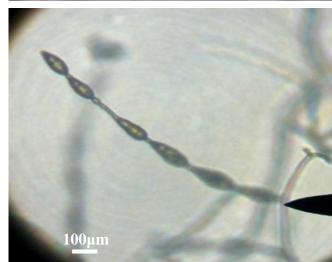
❶絲核菌屬(Rhizoctonia sp.)

Kingdom Fungi 真菌界
PHylum Basidiomycota 擔子菌門
Class Basidiomycetes 擔子菌綱
Order Polyporales 多孔菌目
Family Corticiaceae 皮殼菌科
Genus Rhizoctonia 絲核菌屬



❷鏈格孢菌屬(Alternaria sp.)

Kingdom Fungi 真菌界
PHylum Ascomycota 子囊菌門
Class Dothideomycetes 座囊菌綱
Order Capnodiales 煤炱目
Family Capnodiaceae 煤炱科
Genus Antennella 鏈格孢菌屬



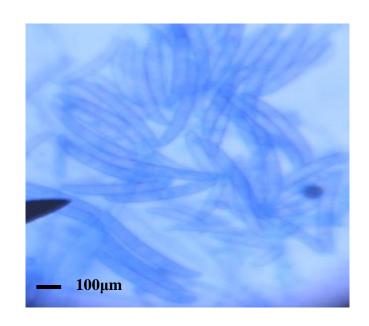
❸彎孢菌屬(Curvularia sp.)

Kingdom Fungi 真菌界
PHylum Ascomycota 子囊菌門
Class Dothideomycetes 座囊菌綱
Order Pleosporales 格孢菌目
Family Pleosporaceae 格孢菌科
Genus Curvularia 彎孢菌屬



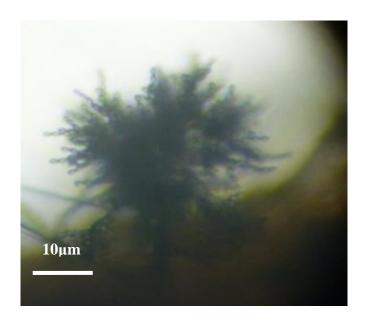
◆鐮孢菌屬(Fusarium sp.)

Kingdom Fungi 真菌界
PHylum Ascomycota 子囊菌門
Class Sordariomycetes 糞殼菌綱
Order Hypocreales 肉座菌目
Family Nectriaceae 叢赤殼科
Genus Fusarium 鐮孢菌屬



❺麴黴屬(Aspergillus sp.)

Kingdom Fungi 真菌界
PHylum Ascomycota 子囊菌門
Class Eurotiomycetes 散囊菌綱
Order Eurotiales 散囊菌目
Family Trichocomaceae 髮菌科
Genus Aspergillus 麴黴屬



2.研究觀察並記錄真菌孢子

分類	照片記錄	孢子 形態	形態描述		
絲核菌屬		無孢子結構	線核菌屬(Rhizoctonia sp.) 菌絲外型長條形且亂無雜序的排列,菌絲有 2 個菌 核,菌核半徑平均為 0.83μm,菌絲和其分支大致成 90 度,菌絲的長度與寬度平均各為 4.14μm、 3.23 μm, 分支長與寬各平均為 7.62 μm、 2.45μm。		
遊格 孢菌屬		手榴彈形	鍵格孢菌屬(Alternaria sp.) 孢子手榴彈形,橢圓形、卵圓形、倒棍棒形,散狀热列,孢子大小 15.70~28.50μm×5.00~6.60μm,長度平均為 19.55μm,寬度平均為 5.90μm,有 2~5 條隔膜,隔膜大小平均為 5.59 μm,細胞為隔膜數加 1,孢子長超長,隔膜數越多,少數孢子會在隔膜與隔膜間分類 2 個細胞。		
		水滴形	 鍵格孢菌屬(Alternaria sp.) 孢子水滴形,孢子外形與手榴彈形的孢子相同,但排列方式是由頭對尾的方式串聯,孢子大小 23.60~29.30μm×9.40~10.10μm,長度平均為 26.28μm, 寬度平均為 9.70μm,有 2~3 條隔膜,隔膜大小平均為 7.61μm,細胞為隔膜數加 1,一串孢子的長度平均為 29.2μm。 		
灣孢菌屬		花花形	彎孢菌屬 (<i>Curvularia</i> sp.) 孢子花花形,孢子外形呈橢圓形或曲膝狀彎曲,由4 到5個孢子為一個花花形或是由4到5個孢子為一層並 交錯往上疊,孢子大小為 19.14~22.91μm×6.09~8.70μm,長度平均為20.88 μm, 寬度平均為7.63 μm,有3~5條隔膜,隔膜大小平均為 5.80μm,細胞為隔膜數加1。		
		牛角麵包形	 彎孢菌屬(Curvularia sp.) 孢子牛角麵包形,孢子外形與花花形的孢子相同,由菌絲節長出孢子成散狀排列,孢子大小9.70~10.8μmx 4.60~4.80μm,長度平均為10.26μm,寬度平均為 4.68μm,通常4隔膜,隔膜大小平均為2.85μm,細胞為隔膜數加1,菌絲節的寬平均為1.83μm,單一菌絲細胞長度平均為3.11μm。 		

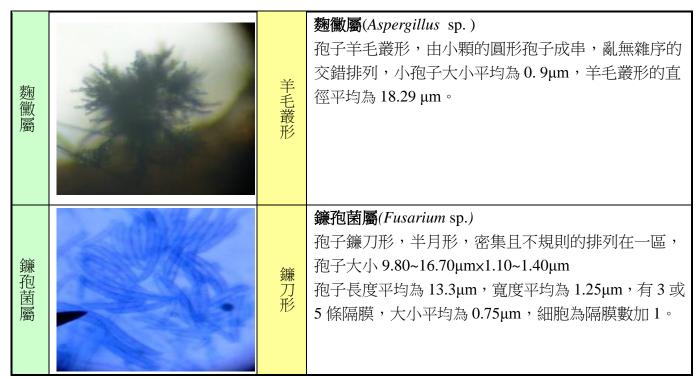


圖 27: 與綬草根部共生的真菌孢子形態描述與記錄

3.研究觀察菌絲團中的真菌種類鑑定

經比對 DNA 序列得知在綬草根部菌絲團中的真菌為**絲核菌類群**,Ceratobasidiaceae 科的擔子菌。

(二)比較真菌在綬草根部的共生關係

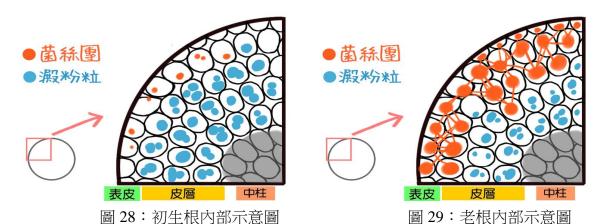
- 1.在綬草的根莖葉之培養皿中發現有許多不同孢子的真菌種類,包括鐮刀形、手榴彈形、水 滴形,我們將這些真菌依孢子的形狀分為四大家族:彎孢菌屬分為牛角麵包形和花花形, 鏈格孢菌屬分為手榴彈形和水滴形,鐮孢菌屬為鐮刀形,麴黴屬為羊毛叢形。
- 2.在綬草的根培養出真菌孢子形態有:花花形、牛角麵包形、手榴彈形、水滴形、羊毛叢形、 鐮刀形,我們將其整理及分類如下表。

真菌種類	孢子外形		
鏈格孢菌屬(Alternaria sp.)	手榴彈形、水滴形		
彎孢菌屬 (Curvularia sp.)	花花形、牛角麵包形		
麴黴屬 (Aspergillus sp.)	羊毛叢形		
鐮孢菌屬 (Fusarium sp.)	鐮刀形		
絲核菌屬 (Rhizoctonia sp.)	無孢子結構		

3. 綬草根:

- (1)24 小時, 横切片綬草根長的菌絲平均長度為 2.0mm, 整支根的綬草根長的菌絲平均長度僅為 0.2mm。
- (2)41 小時後, 横切片菌絲長度平均為 12.0mm, 整支根長出菌絲平均長度僅為 7.0mm。

4. 綬草根部菌絲生長範圍為表皮到皮層,在皮層細胞中可形成菌絲團,菌絲又穿梭在細胞壁間,兩兩菌絲團可利用菌絲穿梭於細胞質與細胞壁間互相連接;綬草老根根部皮層細胞靠近中柱位置含有大量澱粉粒,但初生根則是在皮層細胞內均匀分布澱粉粒,平均每個細胞中約有40顆澱粉粒,1顆澱粉粒大小約15.5μm×15.5μm。



5.有黃褐色成熟的菌絲團的皮層細胞面積較沒有成熟菌絲團的細胞大,有成熟菌絲團的細胞 大小 121.05μm ~144.74μm×100μm ~134.21μm,平均長為 134.2μm,平均寬為 121.1μm,

平均面積約 $16251.62 \mu m^2$,菌絲團大小 $42.11 \mu m$ ~ $63.16 \mu m$ × $26.34 \mu m$ ~ $31.58 \mu m$,平均長為 $50.5 \mu m$,平均寬為 $28.4 \mu m$;沒有成熟菌絲團的細胞大小 $118.42 \mu m$ ~ $150.00 \mu m$ × $102.63 \mu m$

~144.74 μm ,平均長為 130.3 μm ,平均寬為 124.5 μm ,平均面積為 16222.35 μm^2 。

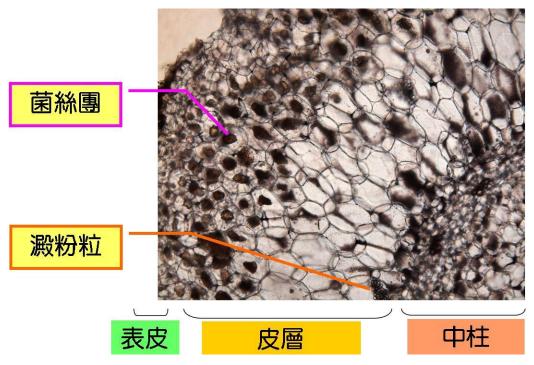


圖 30: 綬草根部由外至內分為表皮、皮層細胞、中柱。皮層細胞靠近中柱部位無菌絲團結構, 菌絲團僅分布在皮層細胞靠近表皮位置,且呈現不均勻分布;含有澱粉粒的皮層細胞 則靠近中柱位置,有些皮層細胞的澱粉粒已融於水中。

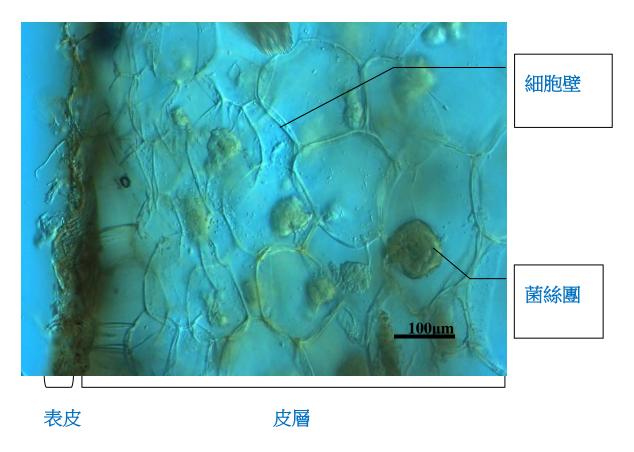


圖 31: 真菌菌絲經由表皮滲入直達皮層,在皮層細胞質中形成形狀不規則的黃褐色菌絲團,並且有菌絲穿透細胞壁在菌絲團間彼此連結。

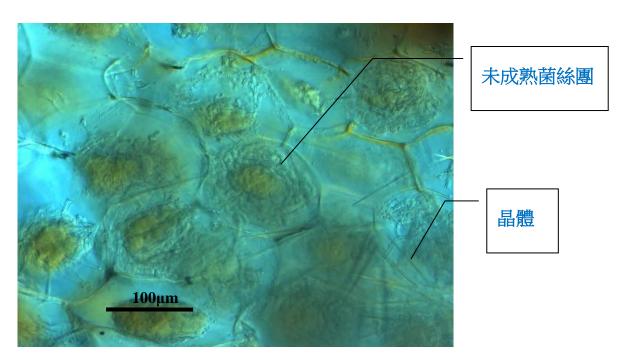


圖 32: 真菌菌絲剛滲入表皮直達皮層時,在皮層細胞質中大量菌絲群集,可看到未成熟捲曲 狀的菌絲團,綬草根部細胞具有蘭花植物特有的針狀結晶。

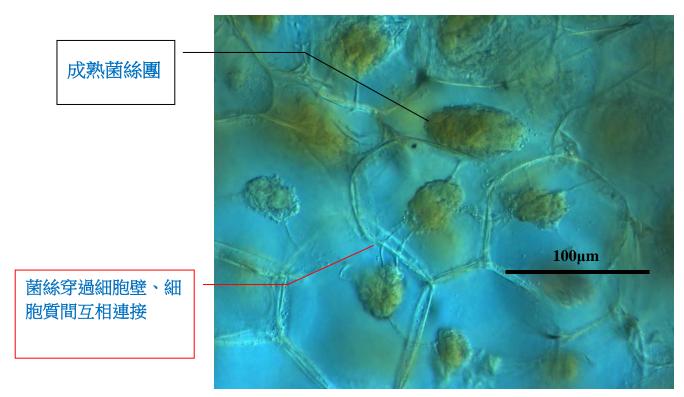


圖 33: 成熟的黃褐色菌絲團有菌絲穿透細胞壁在菌絲團間彼此連結。(橫切處理)

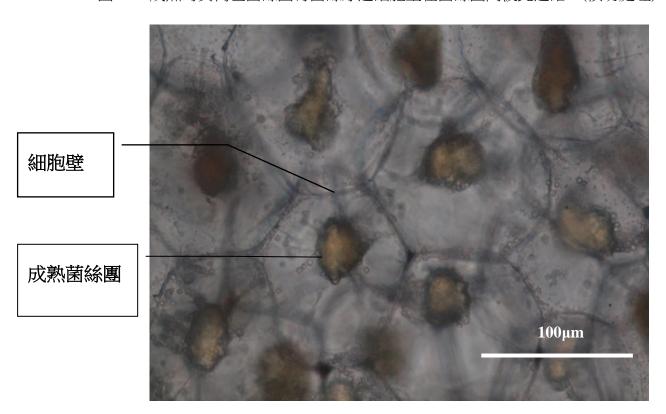


圖 34: 成熟的黃褐色菌絲團有菌絲穿透細胞壁在菌絲團間彼此連結。(縱切處理)

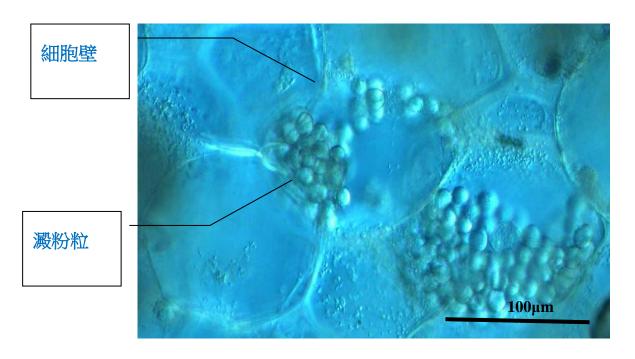


圖 35: 綬草的老根:靠近中柱的皮層細胞具有大量澱粉粒。

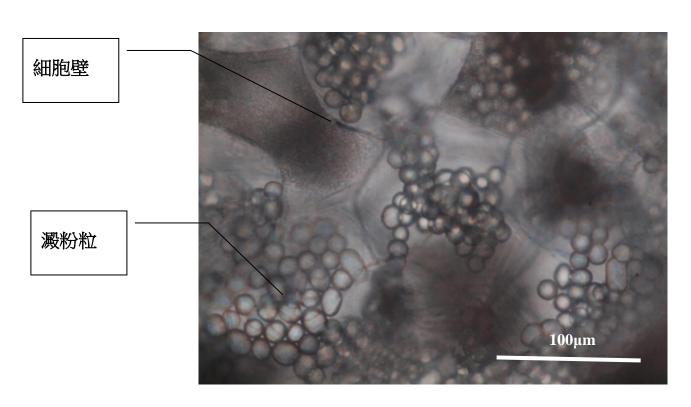


圖 36:初生根皮層細胞內沒有發現菌絲團,但具有大量澱粉粒,一個細胞內約有 40 顆澱粉粒。

(三)研究觀察並記錄綬草的營養器官繁殖

1. 綬草的根:

- (1)整株真菌菌絲分布在24hr後,尖端約0.1-0.2mm,鈍端約0.1-0.3mm,經洋菜培養基培養約30天後,只會在鈍端長出一株,經過38天幼芽葉長至平均 0.45cm,用複式顯微鏡觀察發現鈍端的菌絲數量大於尖端,所以鈍端才會成功長出葉子。
- (2)切片真菌菌絲分布在24hr後,長度約2mm,經洋菜培養基培養約30天後,依舊無法培養出葉子。

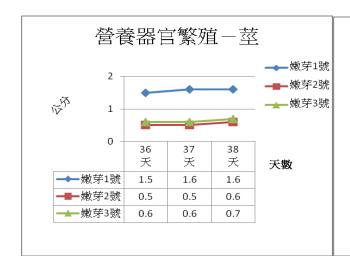
2. 綬草的莖:

真菌菌絲分布在41hr後,長度約4-6mm,經洋菜培養基培養約30天後,發現整株或切片皆可培養成功,且整株會在節上長出多株多葉,而切片的切割處僅長出一株多葉,經過38天幼芽的葉長至平均0.97cm。

3. 綬草的葉:

真菌菌絲分布在41hr後,長度約2-4mm,經洋菜培養基培養約30天後葉無論有無切 片都不能培養幼芽。

綬 <mark>草營養</mark> 器官繁殖情形						
處理方式	根切片	根整株	莖切片	莖整株	葉切片	葉整株
能否營養器官繁殖	_	+	+	+	_	_



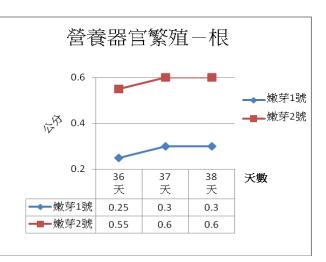


圖 37: 比較綬草的營養器官(莖和根)長出幼芽情形

(四)探究絲核菌對綬草根葉生長的影響

- 1.研究觀察並記錄高溫滅菌土質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響
- (1) 高溫滅菌土質會使植株水分不足導致部分根漸漸萎縮或停滯生長;生長平均值為第一天 3.62cm;第 20 天為 3.55cm;第 40 天為 3.09cm;前後平均變化量-0.53cm。

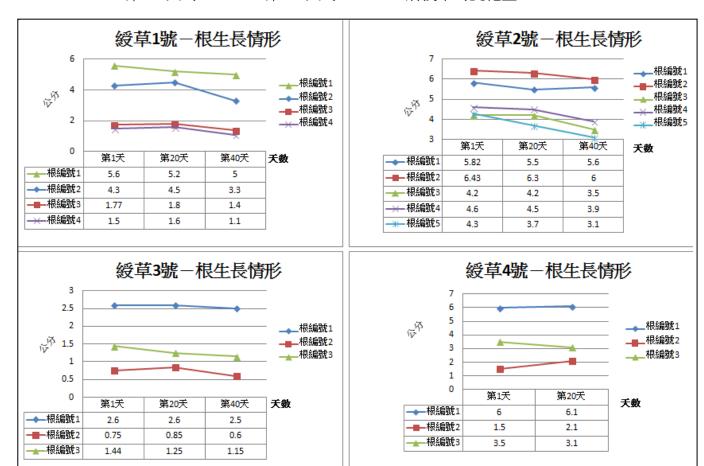


圖 38:無絲核菌的十質,對綬草根牛長的影響

(2) 高溫滅菌土質會使植株水分不足導致部分葉漸漸萎縮或停滯生長;生長平均值為第一天 4.42cm;第 20 天為 5.85cm;第 40 天為 5.73cm;前後平均變化量 1.31cm。

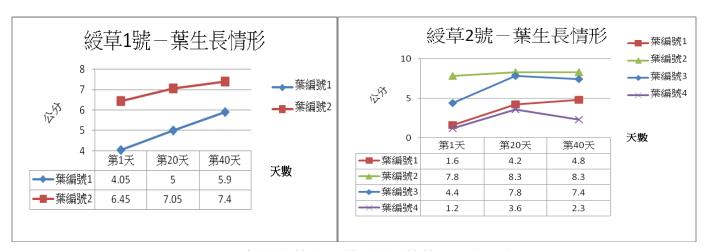


圖 39:無絲核菌的土質,對綬草葉生長的影響

- 2.研究觀察並記錄綬草生長區土質對綬草幼苗根葉生長曲線的影響
- (1)有真菌的土質會使植株水分充足,幫助根生長;生長平均值為第一天 4.36cm;第 20 天 為 4.40cm;第 40 天為 4.78cm;前後平均變化量 0.42 cm。

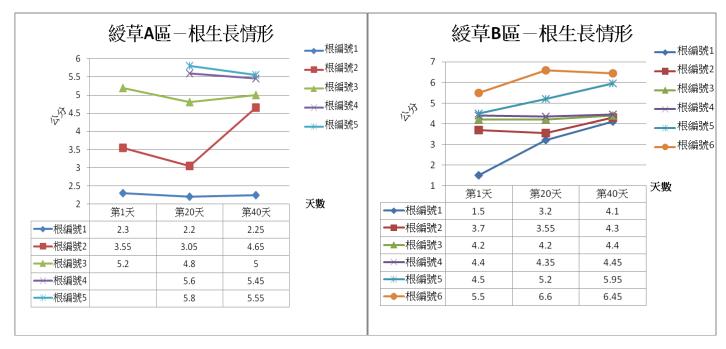


圖 40: 有絲核菌的十質,對綬草根牛長的影響

(2)有真菌的土質會使植株水分充足,幫助葉生長;生長平均值為第一天 3.84cm;第 20 天 為 5.02cm;第 40 天為 5.90cm;前後平均變化量 2.06 cm。

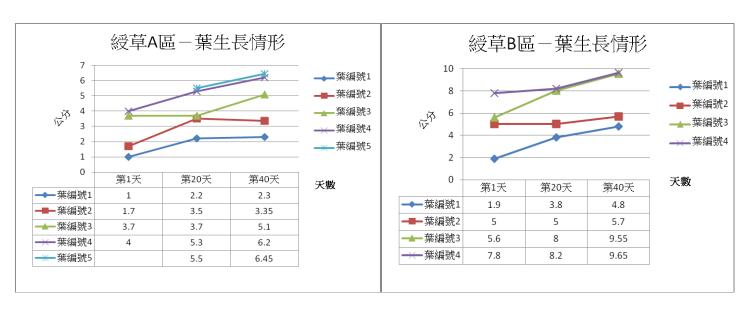


圖 41: 有絲核菌的土質,對綬草葉生長的影響

陸、討論

一、探究校園內綬草的生長與分布

我們在校園中綬草生長最茂密區域分區觀測後發現潮濕、日照充足處綬草每平方公尺 66 棵,平均高度 6cm;潮濕、少日照處綬草每平方公尺 3 棵,平均高度 5.2cm;乾燥、日照充足處綬草每平方公尺 7 棵,平均高度 5.2cm;以 pH 指示計多次測量土壤並加以平均後發現其 pH 值為 7.1~7.4 之間;由以上條件推測綬草喜歡潮濕、日照充足且周遭土壤為中性偏弱鹼的生長環境。

綬草對生活環境的要求較高,需要濕潤肥沃的土壤、共生菌根菌以及其他生物的共同作用才能生長得好(維基百科-綬草,無日期);與我們研究資料推測綬草喜歡潮濕生長環境,及缺乏絲核菌導致生長停滯結果相符。綬草菌根菌在偏酸性(pH 4.0~5.0)環境下較有利(王平平等人,2012),但我們的測量結果發現弱鹼的生長環境也能順利生長菌根菌。

二、探究綬草的外部型態

我們將校園中綬草生長最茂密區域分區觀測綬草花序旋轉情形,發現花序逆時針旋轉占 51%,順時針旋轉占 31%,無旋轉占 18%;因此推斷綬草花序旋轉情形以逆時針旋轉為最多數。

我們以糖水培養綬草種子約一個月後,發現糖水無法使綬草種子萌芽,推斷糖水無 法影響綬草生長,所以我們改以洋菜培養其組織。

綬草繁殖可採用分株或播種的方法,但播種法需共生真菌促進種子萌發;我們一開始僅以糖水培養其種子,並無添加任何共生菌,以致綬草種子無任何生長變化,與維基百科相符。使綬草種子萌芽的方式為一開始蘭菌刺激綬草種子發芽的速度與機率,但並不會與種子共生,直到綬草長出根後才會與根真正發生共生關係 (Hanne N. Rasmussen and Finn N.Rasmussen, 2009)。

三、探究綬草與絲核菌的共生關係

(一)研究與綬草共生根部的真菌種類

1. 運用檢索表分析觀察到的真菌種類

原先我們將觀察到的真菌依外形命名為7種孢子,並將它分成3大家族:

- (1)花花形家族:花花形、水滴形、牛角麵包形
- (2)蘑菇形家族:蘑菇形、念珠形
- (3)其他家族:羊毛叢形、鐮刀形

後來運用我們找到的資料進行對照,才知道:

花花形和牛角麵包形是彎孢菌屬(*Curvularia* sp.)(張猛、張天宇,2004),水滴形和 手榴彈形是鏈格孢屬(*Alternaria* sp.)(王修含,無日期),鐮刀形是鐮孢菌屬(*Fusarium* sp.)(黃振文,無日期),羊毛叢形是麴黴屬(*Aspergillus* sp.),蘑菇形家族只是菌絲 要長孢子的一個過程,原先也誤認為和綬草共生的真菌都是對綬草有益的,但鐮刀形 卻對植物有害(黃振文,無日期),發現的數量不多,推測是因為夏天的溫度約 30°

最適合其生長,但冬天約15℃,較不易生長。麴黴屬也對植物有害,發現的數量多,推測因其適合溫度15℃~20℃加上濕度高,才使麴黴屬大量繁衍。鏈格孢菌屬雖對人體皮膚有害(王修含,無日期),卻對植物有益。彎孢菌屬對植物有益(張猛、張天宇,2004)。

2.研究觀察並記錄直菌孢子

發現我們培養的鏈格孢屬依孢子排列不同而分為水滴形和手榴彈形,手榴彈形是散狀排列,水滴形是由頭對尾的方式串聯,花花形、牛角麵包形和黃茅生彎孢相同,皆屬彎孢菌屬(張猛、張天宇,2004),但我們依孢子排列不同而分為花花形和牛角麵包形,牛角麵包形是散狀排列,花花形是由4到5個孢子為一個花花形或是由4到5個孢子為一層並交錯往上疊,鐮刀形的隔膜有3或5條和Martiella群和Discolor群相同(黃振文,無日期),絲核菌屬、麴黴屬則和在植物病理學網絡課程的資料相符。

3.研究觀察菌絲團中的真菌種類鑑定

絲核菌其實是無性世代的攏統名稱,與綬草根部內共生的真菌是 Ceratobasidiaceae 科的擔子菌。

(二)比較真菌在綬草根部的共生關係

蘭花菌根屬於內生菌根,主要特徵是菌絲會進入細胞壁內間以菌絲捲或叢枝體,菌 絲進入根內皮層細胞後所形成的樹枝狀構造,與植物細胞較緊密接觸,根內菌絲有隔板(林 素禎等,2000),我們看到的則是絲核菌的菌絲以纏繞成捲曲狀方式形成菌絲團;而外生 菌根可形成菌鞘,但真菌菌絲不侵入根部細胞內,我們所看到的絲核菌菌絲並未形成菌 鞘,可是卻和外共生的模式一樣無根毛的構造。

纏繞成捲曲狀的菌絲與綬草根部皮層細胞質接觸面積增大,菌絲細胞內含有粒線體 與核糖體(Victor Satler Pylro et al.,2013),菌絲能利用皮層細胞的澱粉粒當作養分來源, 而皮層細胞亦能由菌絲獲取大量水分與礦物質,接觸面積增大能有效提高擴散作用速率。

在我們設計筆蓋實驗,想查看菌絲到根的哪個部位時,使用亞甲藍液染色,觀察到的絲核菌菌絲團分布在皮層細胞靠近表皮細胞。綬草根菌絲從表皮細胞延伸到皮層細胞,有些細胞裡會形成菌絲團,菌絲可穿梭在細胞壁間,也可連接到根外部,吸收外界土壤的礦物質與水分,所以如果有菌絲團存在的細胞會比一般細胞還要來的大。

我們觀察到兩個菌絲團的菌絲可穿過細胞質與細胞壁間相互連接,在初生根時,有 大量的澱粉粒,且均勻分布於根部,但沒有菌絲團;在老根,則看到黃褐色菌絲團分布在 皮層細胞,沒有菌絲團的部份有澱粉粒,存在接近中柱部分。澱粉粒主要功用是儲存養分, 當秋天葉子開始腐爛時,綬草便能依靠澱粉粒繼續供給養分存活。

綬草根部與絲核菌共生,絲核菌的菌絲與分支成 90 度角垂直,分支處有縊縮,縊縮處有隔膜,若無絲核菌共生,綬草便難以生長。綬草菌根菌於 5~30℃時均能生長,但最適合溫度是 25℃。我們在培養的時候,也因溫度太冷而使絲核菌生長緩慢。

在自然的關係下,真菌只會與根進行共生,與根共生的菌根菌靠菌絲延伸入土壤中, 能增加植物吸收水分與礦物質營養表面積約 60 倍,吸收的礦物質以磷肥最為顯著,由於 綬草無根毛,所以菌根菌對綬草來說是得到養分不可或缺的來源;菌根菌也能增強植物耐 旱能力、耐病力、增加植物對鹽分逆境適應力、減輕重金屬毒害作用等對作物有生長之效 益(王均琍,2007);在經濟方面,菌根菌則能提升種苗品質、幼苗移植存活率、也使植物 能提早開花結果、減少肥料用量,更能節省培養時所需花費的成本(黃瑞彰等,2011)。

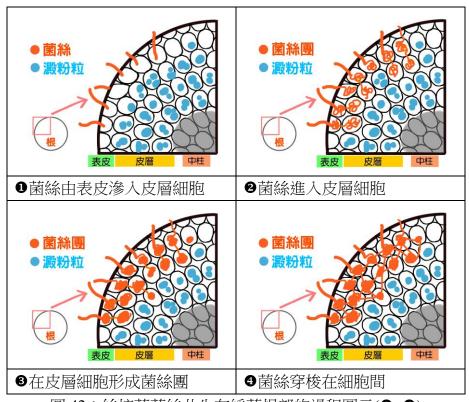


圖 42: 絲核菌菌絲共生在綬草根部的過程圖示(●~●)

(三)研究觀察並記錄綬草的營養器官繁殖

我們發現綬草根部整株鈍端有大量的菌絲團,但尖端較少,所以鈍端有菌絲團可吸 收大量的水分和礦物質,營養也較高,長出幼芽的機率也相對的較大。根部切片因為不 具有生長點,且細胞分裂的速率比莖還慢,導致無法長出幼芽。

綬草的莖部不論是橫切、縱切或整株都可以長出幼芽,且具有多片葉子,因為它的 細胞分裂速率是營養器官中最快的,且每個節上含有生長點,綬草的莖部長出菌絲的密 度也較平均。

綬草的葉部不論有無切片都無法長出幼芽,可是在葉切片的菌絲少且短,卻急著長 出孢子,繁衍下一代;葉整株的菌絲也是少且短,連孢子也較少,所以我們推測葉子本 身的養分不足且因為不具有生長點,細胞分裂的速率比莖還慢,導致無法長出幼芽。

(四)探究絲核菌對綬草根葉生長的影響

我們將校園內綬草幼苗移植至高溫高壓滅菌盆栽中栽培,並觀測其根與葉生長情形; 根生長平均值為第 1 天 3.62cm;第 20 天 3.55cm;第 40 天 3.09cm;前後平均變化量-0.53cm; 葉生長平均值為第 1 天 4.42cm;第 20 天 5.85cm;第 40 天 5.73cm;前後平均變化量+1.31cm, 因此我們認為缺乏絲核菌的土質會使植株水分不足導致部分根漸漸萎縮或停滯生長。

我們將觀測校園內綬草幼苗其根與葉生長情形;有真菌的土質會使植株水分充足,幫助根生長;生長平均值為第一天 4.36cm;第 20 天為 4.40cm;第 40 天為 4.78cm;前後平均變化量 0.42 cm;有真菌的土質會使植株水分充足,幫助葉生長;生長平均值為第一天 3.84cm;第 20 天為 5.02cm;第 40 天為 5.90cm;前後平均變化量 2.06 cm,因此我們認為有絲核菌的土質會協助植株水分充足幫助綬草生長。

柒、結論

一、探究校園內綬草的生長與分布

- 1. 綬草喜歡潮濕、日照且土壤有蚯蚓、中性偏弱鹼的生長環境。
- 2. 附近生長大花咸豐草、空心蓮子草、含羞草、葉下珠、山萵苣、紫背草等植株。

二、探究綬草的外部型態

- 1. 綬草花序旋轉情形以逆時針旋轉占 51%為最多數。
- 2. 糖水無法使綬草種子萌芽。

三、探究綬草與絲核菌的共生關係

(一)研究與綬草共生根部的真菌種類

1. 在綬草外圍生長的真菌種類繁多,共發現有5屬,且孢子形態不一樣:

鏈格孢屬:手榴彈形、水滴形;

彎孢菌屬:花花形、牛角麵包形;

麴黴屬:羊毛叢形; 鐮孢菌屬:鐮刀形;

絲核菌屬:未發現孢子。

2. 經由 DNA 序列鑑定,真正與綬草根部皮層細胞共生的菌絲團為絲核菌類群 Ceratobasidiaceae 科的擔子菌。

(二)比較真菌在綬草根部的共生關係

- 1. 綬草初生根根部皮層細胞含有大量澱粉粒,且均匀分布於皮層細胞,用以儲存養分, 但未發現菌絲團結構。
- 2. 綬草老根根部皮層細胞含有澱粉粒,且分布於接近中柱位置,用以儲存養分,而靠 近表皮細胞有菌絲團則含有較少的澱粉粒。
- 3. 菌絲生長範圍由表皮滲入皮層細胞,穿梭於皮層細胞壁及細胞質間,再藉由皮層細胞的養分大量生長出菌絲,可以與皮層細胞的細胞質融合,形成黃褐色菌絲團。

(三)研究觀察並記錄綬草的營養器官繁殖

- 1. 營養器官繁殖中只有根整株、莖切片或莖整株能培養成功,葉不論有無切片皆無法 培養出幼芽。
- 2. 莖整株所長出的幼芽生長速度快於根整株所長出的幼芽。

(四)探究絲核菌對綬草根莖葉生長的影響

- 1. 缺乏絲核菌的土質會使植株水分不足導致部分根漸漸萎縮或停滯生長。
- 2. 有絲核菌的土質會使植株水分充足幫助植株生長。

捌、參考資料及其他

- 1. 張猛、張天宇(2004)。彎孢屬兩個中國新記錄種。自然科學版。35(3):368-370。
- 莊育瑞。(2008)。蘭菌培養及運用對嘉德麗亞蘭種子及幼苗生育之促進。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。台灣:台中。
- 3. 黄振文 (無日期)。鐮孢菌的分類系統概論。國立中興大學病理系。
- 4. 王修含 (無日期)。鏈格孢菌。http://skin168.pixnet.net/blog/post/102301408
- 5. 植物病理學網絡課程(無日期)。http://jpkc.jluhp.edu.cn/zwkx/zwbl/show.asp?id=956
- 6. 王平平等人(2012)。不同培養條件對綬草菌根真菌生長。北方園藝 19 期。
- 7. 維基百科—綬草(無日期)。http://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%B6%AC%E8%8D%89
- 8. 林素禎、洪崑煌、吳繼光(2000)。囊叢枝內生菌根菌在臺灣代表性土壤中之分布。 中華農業研究 49(4):65-80。
- 9. 黄瑞彰等人(2011)。菌根菌的特性及田間應用技術。臺南區農業專訊。75:14-19。
- 10. 王均琍(2007)。微生物肥料--菌根菌應用於經濟果樹之栽培。農業生技產業季刊。 12:42-48。
- 11. Victor Satler Pylro (2013) Anatomical Characterisation of Mycorrhizal Fungi in Neotropical Orchids *Advanced Studies in Biology*, Vol.5, no.5, 215-221.
- 12. Hanne N. Rasmussen and Finn N.Rasmussen (2009) Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style, *Oikos*118:334-345.

【評語】030316

- 1. 實驗對象具鄉土性,主題具創意性。
- 2. 研究內容多樣,可進一步聚焦於研究主題上。
- 建議增加實驗樣本數與實驗設計的變因控制,以驗證實驗結果 是否具有再現性。