

国家二级保护药用与观赏植物金毛狗的孢子繁殖技术初探

张祖荣^{1,2}, 张绍彬^{1,3}

(1. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 永川 402168; 2. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400715; 3. 重庆高校园林花卉工程研究中心 重庆 永川 402160)

摘 要: 从野外采集的金毛狗孢子经过消毒处理后, 分别播种于未经消毒和经过消毒处理的 3 种培养土上, 在保证水分条件的情况下, 分别在自然环境和无菌的人工环境条件下进行分组繁殖试验。结果表明: 培养土以原生境土为最好, 培养条件以人工无菌环境的白天光照和自然变温为最好; 从配子体的受精到孢子体的形成是整个孢子繁殖过程的关键。

关键词: 金毛狗; 孢子繁殖; 培养条件; 分组实验

中图分类号: S 682.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0203-04

金毛狗(*Cibotium barometz*)为蚌壳蕨科(Dicksoniaceae)金毛狗属(*Cibotium*)的蕨类植物^[1], 又名金毛狗脊。该种植物不仅是我国典型的单科种植物^[2], 更是历史悠久的药用植物, 其根状茎可长年采收入药, 具有通血脉、利关节、强腰背、壮筋骨、治顽痒等多种功效^[3]。由于其赖以生存的森林环境被严重破坏, 再加上人们对野生植株进行私挖乱采, 导致其野生资源已经处于濒危状态, 因此被列入了国家二级保护植物和限制出口物种名录^[2]。

尽管有关金毛狗的研究报道较多, 但多集中在化学成分分析、遗传多样性、配子体发育和产品开发方面^[4-7]。为了进一步做好该物种的资源保护和合理利用工作, 如何利用人工手段来迅速增大其个体数量是当务之急。根据前人经验^[8], 对蕨类植物的孢子进行人工繁殖, 具有繁殖系数大、繁殖成本低、变异性小等特点, 是人工快速繁殖育苗的有效途径, 因此, 通过对金毛狗的孢子进行了人工繁殖试验, 已取得了相应的研究成果, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 孢子的采集 金毛狗的孢子采自重庆缙云山, 采

集孢子时将背面有成熟孢子囊的羽片剪下装入干净的白色纸袋, 放置于室内的通风干燥处, 以便使孢子自然脱落。经过 1 周左右, 在装有孢子囊羽片的白色纸袋外面轻轻拍打, 以便使已经开裂的孢子囊内的孢子充分脱落出来, 取出羽片后把纸袋内的孢子倒在孔径 0.2 mm 的金属筛上过筛, 以便去除其它杂质, 过筛后的孢子用棕色广口瓶保存备用。

1.1.2 孢子的消毒处理 孢子在播种前最好进行消毒处理, 以避免有害微生物的污染。处理方法为: 用滤纸将称量好的每份为 2 mg 的孢子包成一小包, 并用细线扎紧; 将孢子小包先在 70% 的酒精中浸泡 30 s 左右, 此时还要用镊子将滤纸包中的气泡赶净, 以使孢子表面完全被酒精浸润; 然后将滤纸包放入 5% 的 NaClO 溶液中浸泡 5~10 min, 捞出后用无菌水冲洗 4~5 次; 在无菌培养皿中小心打开纸包, 用 10 mL 的无菌水将滤纸上的孢子全部冲入培养皿中形成无菌孢子悬浮液; 将培养皿中的孢子悬浮液倒入无菌三角烧瓶中, 并用少量无菌水把培养皿冲洗干净后全部倒入三角瓶中。

1.1.3 播种器皿 为了便于管理和降低成本, 播种器皿为具有良好排水性能、口径 12 cm 的白色塑料花盆。播种前清洗干净, 并用沸水浸煮 5 min 左右进行消毒处理。

1.1.4 培养土 据前人经验^[8], 试验选用腐叶土、混合土(腐叶土、田园土和河沙以体积比为 1:1:1 均匀混合)以及从金毛狗原生境地采来的表层土(以下简称原生境土)等 3 种培养土。把这 3 种培养土晾干后用较细的土壤筛过筛, 为了进行对比, 过筛后的每种播种基质平均分为二部分, 其中一部分不作消毒处理, 另一部分放入干燥箱中, 在 120℃高温下干燥 6 h 进行消毒处理。

第一作者简介: 张祖荣(1966), 男, 重庆江津人, 副教授, 硕士, 长期从事药用植物的教学与研究, 现为西南大学访问学者。

基金项目: 三峡库区生态环境教育部重点实验室开放科研基金资助项目(KF200608); 重庆市教委自然科学基金资助项目(kj071204)。

收稿日期: 2010-03-22

1.2 方法

1.2.1 播种 把干燥的播种基质装入花盆并平整表面后,用盆浸法^[9]对其进行充分湿润,然后用经过灭菌处理的胶头滴管将三角瓶中的孢子悬浮液均匀地喷洒到培养土表面。为了保证每份孢子悬浮液都能全部彻底地播种到相应的一盆培养土中,三角瓶中的孢子悬浮液被播种完后,还要用无菌水冲洗 3 遍。每次冲洗下来的无菌水和原来的孢子悬浮液一样,仍用原来的滴管把它们均匀地喷洒到培养土表面,最后,所用滴管也要用无菌水清洗 3 遍,清洗下来的无菌水也要均匀地喷洒到培养土表面。

1.2.2 培养条件 从已有的研究成果来看^[8],蕨类植物在进行孢子繁殖时,对水分条件的要求是十分一致的,但在土壤、温度和光照方面,因不同的种类而差异较大。因此,该试验在保证水分条件的基础上,先把培养条件分为自然培养环境和人工无菌环境(以下分别简称自然环境和人工环境)2 组,又把这 2 组分别分为自然变温、昼夜变温和昼夜恒温 3 组,具体分组如图 1 所示。图中的 A、B、C 分别代表 3 种培养土,数字代表盆数。该试验的自然环境是指从当地自然环境中选择出来的、与其原生境的光照和温度条件差别不大的培养环境;昼夜变温白天 25℃、夜间 15℃,恒温为 25℃,温度误差为±1.5℃;人工光源为日光灯,光照强度为 4 000 lx 左右。

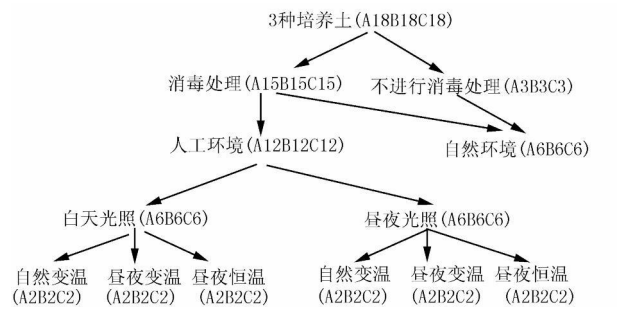


图1 2种黑桫欏孢子繁殖试验的分组示意

1.2.3 播种后的管理 培养土播种后立即按试验分组放入相应的培养条件里进行培养和观察,对萌发的苔藓和杂草要及时除去,出现霉菌时也要尽量清除,严格保持培养室的无菌环境。

1.2.4 幼苗移栽 当孢子体幼苗长出 3~4 片真叶时即可进行移栽,为了保险起见,移栽基质全部采用原生境土。幼苗移栽后要经常检查培养土的含水量和近地面的空气湿度,尽量使其保持在 60%~85%之间。移栽 30 d 后平均成活率可达 82.2%。

1.2.5 数据处理 对可以进行量化统计的数据采用

SAS 9.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养土的繁殖效果

根据试验结果的观察记录,不同培养土的繁殖效果如表 1 所示。

表 1 不同培养土的繁殖效果			
培养土	配子体数量	孢子体数量	转化率/%
腐叶土	22.2	9.4	42.3
混合土	10.8	2.6	24.1
原生境土	36.4	19.6	53.8

注:表中数据为每盆培养土的平均值,转化率是指从配子体到孢子体的转化率,转化率=(孢子体数量/配子体数量)×100%;下同。

从表 1 结果来看,金毛狗在 3 种培养土上都有一定的繁殖效果,但它们之间又存在明显差异。多重比较(LSD 法,下同)结果表明,3 种培养土之间的配子体数量、孢子体数量和配子体到孢子体的转化率都存在极显著差异(均值差>LSD_{0.01},下同),其中又以原生境土最好,腐叶土次之,混合土最差。说明金毛狗的孢子繁殖对其原生境土具有较强的依赖性,而且对土壤条件的要求比较严格。这也可能是导致其自然种群难以扩大的因素之一。这 3 种培养土从配子体到孢子体的转化率都较低,最高也只有 53.8%,说明在金毛狗的孢子繁殖过程中,从配子体到孢子体的转化是一个非常重要的关键环节。

2.2 自然环境的繁殖效果

金毛狗孢子在自然环境条件下的繁殖效果如表 2 所示。表 2 结果显示,在自然环境条件下,对同一培养土而言,经过消毒处理和未经消毒处理之间的繁殖效果也存在明显差异。*t* 检验结果表明二者之间的配子体数量、孢子体数量和配子体到孢子体的转化率都存在极显著差异(|*t*|>*t*_{0.01(2)},下同),未消毒的培养土明显好于经过消毒处理的培养土。这一结果和有些观点^[10]存在矛盾,但也和有些研究者^[11]的试验结果相吻合。出现这一结果的主要原因应该是:尽管土壤消毒杀灭了所有菌类,但在温暖潮湿而又不是无菌环境的自然培养条件下,各种霉菌的出现在所难免,而霉菌的出现势必会严重影响孢子繁殖的整个过程。与之相反的是,在未消毒的培养土内,由于长时间的相互适应,土壤内的各种微生物之间已经处于相对平衡的状态,从而避免了霉菌的出现,因此反而比经过消毒处理的培养土更有利于孢子的繁殖。

表 2 金毛狗孢子在自然环境条件下的繁殖效果			
培养土	配子体数量	孢子体数量	转化率/%
消毒	17.1	4.2	24.6
未消毒	29.8	12.2	40.9

2.3 人工环境的繁殖效果

人工环境的繁殖效果如表 3 所示。从表 3 结果来看, 3 种温度条件下的繁殖效果明显不同, 多重比较结果表明, 它们在配子体数量、孢子体数量和配子体到孢子体的转化率三个方面都存在极显著差异, 其中又以自然温度的繁殖效果最好, 昼夜变温次之, 昼夜恒温最差。这一结果说明, 作为古老的野生蕨类植物, 金毛狗已经有规律变化的自然温度形成了一定的依赖性, 反而对没有变化的恒温适应起来比较困难。同时, 对表 3 中不同光照条件下繁殖效果的 t 检验结果表明, 金毛狗在白天光照和昼夜光照 2 种光照条件下的配子体数量差异不显著($|t| < t_{0.05(17)}$), 但孢子体数量和转化率却存在极显著差异。说明金毛狗在由孢子萌发形成配子体的过程中, 并不要求光照条件的昼夜变化, 但光照条件的昼夜变化对孢子体的形成却是非常重要的环境条件之一。这也体现出了它们在孢子繁殖过程中对原生境昼夜光照变化的适应性和依赖性。

表 3 人工环境条件下的繁殖效果

光温条件	温度条件			光照条件	
	自然变温	昼夜变温	昼夜恒温	白天光照	昼夜光照
配子体数量	32.7	22.8	9.9	23.5	21.9
孢子体数量	20.4	10.1	2.4	14.9	6.1
转化率/%	62.4	44.3	24.2	63.4	27.9

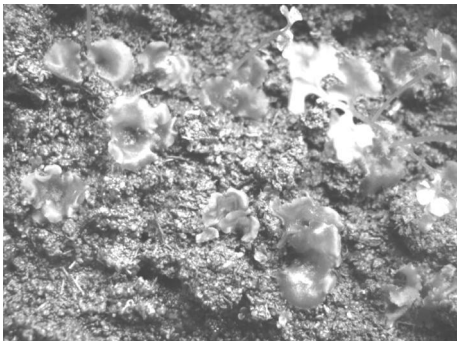


图 1 金毛狗配子体(原叶体)和孢子体幼苗

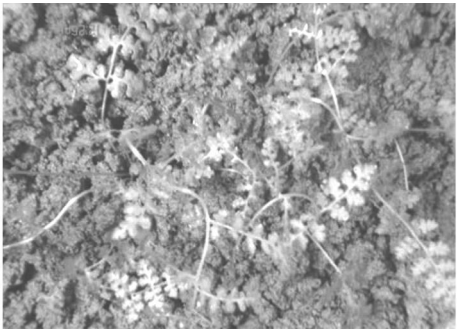


图 2 移栽成活的金毛狗小苗

3 讨论

3.1 金毛狗孢子自然繁殖的主要限制因素应该是土壤和水分条件

该试验结果说明, 金毛狗的孢子繁殖在土壤、温度和光照 3 个方面都对原生境的自然条件产生了较强的依赖性。因此, 可以据此推测, 金毛狗的孢子繁殖在自然状态下非常困难的主要原因应该是以下二方面: 一是孢子太轻太小, 被风吹散后不易落到条件适宜的土壤上; 二是随着全球的气候变暖和森林植被的破坏, 孢子繁殖所要求的水分条件很难得到满足。这样的发现也给探索金毛狗的濒危机制提供了一条重要的信息。

3.2 为了方便管理和提高繁殖率, 有条件时最好在无菌条件下进行蕨类植物的孢子繁殖

从该试验结果可以看出, 尽管在自然培养环境中未消毒培养土的繁殖效果好于消毒培养土, 但和无菌条件下的人工光温优化培养环境相比, 繁殖效果明显较差。这是由于采用消毒培养土在无菌条件下进行孢子繁殖不仅可以避免霉菌的危害, 还能消除其它植物孢子或种子萌发的不利影响。这样既方便管理 又能在一定程度上提高孢子的繁殖率, 所以是一个更为理想的繁殖途径。

3.3 金毛狗从配子体到孢子体的转化率都很低, 说明受精作用很关键

该试验结果表明 金毛狗从配子体到孢子体的转化率都很低, 最高也只有 63.4%, 这样的结果说明从配子体的受精到孢子体的形成是整个孢子繁殖的关键, 也给研究其配子体的受精机制提出了新的要求。

参考文献

[1] 马洪菊 何 平 陈建民, 等. 重庆市珍稀濒危植物的现状与保护对策[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2002 27(6): 933-939.

[2] 易思荣 黄 娅 肖 波, 等. 重庆市珍稀濒危药用植物保护战略研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(4): 61-66.

[3] 孙启时. 药用植物学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 157.

[4] 吴琦, 杨秀伟. 金毛狗脊的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发 2007, 19(2): 240-244.

[5] 伍莲, 邓洪平. 金毛狗居群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1468-1469.

[6] 邓洪平, 刘光华. 重点保护药用植物金毛狗配子体发育过程的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1850-1853.

[7] 王玉香 黄红英. 金毛狗脊口服液制备工艺初探[J]. 时珍国药研究 1995, 6(2): 35-38.

[8] 韩 敬 赵 莉. 蕨类植物繁殖研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005 533 (7): 1261-1263.

[9] 张祖荣. 园林树木栽培与 养护技术[M]. 北京: 化学工业出版社 2009: 115.

[10] 赵秀芳. 蕨类植物的孢子繁殖技术[J]. 中国种业 2005(2): 42-43.

[11] 何圣米 杨悦俭, 徐明飞, 等. 紫萁孢子繁殖快速成苗技术研究[J]. 中国农学通报 2006, 22(2): 233-235.

五味子不同采光结构光照强度及利用率的研究

孟祥才, 杨国辉, 孙 晖, 王喜军

(黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 通过测定五味子各种采光结构表面的光照强度和单位土地面积光利用率的日变化和月变化, 以确定五味子生产的合理采光结构, 提高产量。结果表明: 不同采光结构平均光照强度顺序为: 30° 斜架 (64.2 klx) $>$ 45° 斜架 (53.8 klx) $>$ 南北架 (49.5 klx) $>$ 东西架 (38.8 klx), 30° 斜架的光照强度分别比南北架高 29.7%, 比东西架高 65.5%; 光利用率的顺序为: 斜架 (100%) $>$ 南北架 (39.3%) $>$ 东西架 (24.3%), 斜架的光利用率分别是南北架的 2.5 倍, 东西架的 4.0 倍。栽培五味子宜采用斜架。

关键词: 五味子; 光照强度; 光利用率

中图分类号: S 567.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0206-03

北五味子 (*Schisandra chinensis* Baill.) 是天然分布于我国东北广大山区的木质藤本植物, 果实既可入药又可加工果酒和果汁饮料。自 20 世纪 70 年代以来, 由于清林抚育和掠夺式采摘等人因因素的破坏, 野生资源不

断减少。目前野生资源年产干品为 500~700 t, 而国内外中药材市场、制药企业和酿酒加工企业的年需求量 8 000 t 以上^[1]。为解决原料短缺, 在加大资源保护力度的同时, 现已进行大面积人工栽培, 东北三省种植面积达 1 万 m^2 以上。目前, 五味子栽培采用的立架方式多为单立架或双立架^[2], 行距通常 2 m 左右, 立架朝向多样, 光的利用率各异。从生物量考虑, 植物有机体干物质的 90%~95% 来自于光合作用, 5%~10% 是从土壤中吸收而来, 其中也有主次之分, 光是积极的、主动的, 而肥料是被动的, 也就是说, 只有在一定强度的光照条件下才能按一定比例吸收土壤中的养分; 从五味子生物特性考虑, 强光照可提高雌花的比例, 从而提高结果数量^[3-4], 因此光是决定药材产量的重要因素。现对各种架式的采光强度和效率进行了研究, 以期五味子高产

第一作者简介: 孟祥才 (1968-), 男, 博士, 教授, 现主要从事药用植物生物学栽培及质量评价研究工作。E-mail: mengxiangcai000@163.com.

通讯作者: 王喜军 (1961-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事生药学及中药血清药物化学研究工作。E-mail: wxj@hljucm.net.

基金项目: 国家科技部“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BA106A05-7); 黑龙江省科技攻关资助项目 (GB07C322)。

收稿日期: 2010-03-31

Exploring on Spore Breeding Techniques of National Secondary Protected and Medicine Used Ornamental Named *Cibotium barometz*

ZHANG Zhi-rong^{1,2}, ZHANG Shao-bin^{1,3}

(1. Department of Life Sciences, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan, Chongqing 402168; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715; 3. Chongqing College Garden and Flower Engineering Research Center, Yongchuan, Chongqing 402168)

Abstract: We collected the spores of *Cibotium barometz* from fields. After having been dissected, we planted the spores in three kinds of cultivating soil which had been dissected or not. Under the condition that there had been enough water, we did grouping propagating experiments under the natural environment or germfree man-controlled condition. The results showed that the original surrounding soil was the best cultivating soil. The day light and natural changing temperature under man-controlled germfree environment was the best for cultivating the two. The whole spore breeding process from the impregnation of the gametophytes to the birth of the sporophytes were the key.

Key words: *Cibotium barometz*; spore breeding; cultivating condition; grouping experiments