

珍稀濒危黑桫欏的孢子繁殖技术初探

张祖荣<sup>1</sup>, 张绍彬<sup>1,3</sup>

(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:**从重庆缙云山采集的华南黑桫欏和齿叶黑桫欏孢子, 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, 对温度和光照条件进行单因素、三水平的分组试验。结果表明:2 种黑桫欏的孢子繁殖对培养土和培养条件的要求非常一致, 培养土以未经消毒的原生境土为最好, 光照条件以自然散射光照为最好, 温度条件则以当地的自然变温为最好; 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:** 华南黑桫欏; 齿叶黑桫欏; 孢子繁殖  
**中图分类号:** S 567.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)07—0187—04

华南黑桫欏(*Gymnosphaera metteniana*)和齿叶黑桫欏(*Gymnosphaera denticulata*)为桫欏科(*Gyaetheaceae*)黑桫欏属(*Gymnosphaera*)的 2 种蕨类植物, 主要分布于我国的西南和华南山区。作为第四纪冰川的子遗植物, 它们同桫欏一样被称为植物界的活化石<sup>[1]</sup>。它们不仅在研究植物进化以及古代自然地理环境方面有着极其重要的地位, 而且还具有祛风除湿、活血化瘀、清热止咳等药用价值<sup>[2]</sup>, 同时也是 2 种极具观赏价值的大型珍稀树

状蕨类<sup>[3]</sup>。由于人们对其赖以生存的森林环境的严重破坏, 使其本来就不多的植株数量更是逐渐减少, 再加上人们为了取其药用和引种观赏而对野生植株进行私挖乱采, 从而导致本来就十分稀少的野生资源已经处于濒危状态<sup>[4]</sup>, 因此, 这 2 种黑桫欏都被列入了国家二级保护植物和限制出口物种名录<sup>[5]</sup>。

目前, 有关这 2 种黑桫欏的研究较少, 且主要集中在资源现状与保护对策方面<sup>[6]</sup>。为了进一步做好这 2 种黑桫欏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。根据报道<sup>[7]</sup>, 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, 课题组对这 2 种黑桫欏的孢子进行了人工繁殖试验, 并取得了初步成果。

1 材料与方法

**第一作者简介:** 张祖荣(1966-), 男, 硕士, 重庆江津人, 副教授, 主要从事植物种植类基础学科的教学与研究工作。E-mail: yuxixueyuan12@163.com.  
**基金项目:** 重庆市教委自然科学基金资助项目(kj071204); 三峡库区生态环。  
**收稿日期:** 2009—11—20

Study on the Isozyme Changes of Peroxidase of *Fritillaria ussuriensis* During Morphogenesis

SUN Dan<sup>1</sup>, PIAO Xuan-chun<sup>2</sup>, DIAO Yan-ling<sup>1</sup>, GAO Ri<sup>2</sup>, YU Yang<sup>3</sup>, LIAN Mei-lan<sup>2</sup>  
(1. Grop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji, Jilin 133002; 3. Grop Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** The current study taking *Fritillaria ussuriensis* Maxim. as experiment material, and the research objective were measuring peroxidase isozyme changes in cultures of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. during different stage of tissue culture. The results showed that POD isozyme bands were stable and got highest of 8 bars and callus presented light colour and thin band at Rf=0.275 after forming small buldlet, while other period cultures did not have the band in cultures during different stage of tissue culture. POD activity maximized at forming small buldlet.  
**Key words:** *Fritillaria ussuriensis* Maxim. ; cultures; POD

## 1.1 试验材料

**1.1.1 孢子的采集** 华南黑桫欏和齿叶黑桫欏的孢子采自重庆缙云山。孢子的采集要在孢子囊充分成熟(此时孢子囊的颜色为黑褐色)而又没有开裂时进行,最好采集羽状叶中下部的孢子,因为这一部位的孢子发育最为成熟<sup>[8]</sup>。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7 d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为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,并用沸水煮沸3 min左右进行消毒处理。

**1.1.4 培养土** 根据相关报道<sup>[7]</sup>,试验选用了腐叶土、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2种黑桫欏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2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左右进行消毒处理。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 播种** 把干燥的播种基质装入花盆并平整表面,用盆浸法<sup>[9]</sup>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,所用滴管要用无菌水清洗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<sup>[7]</sup>,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,

但在温度和光照方面,因种类的不同而差异较大。为了重点探讨温度和光照条件对华南黑桫欏和齿叶黑桫欏孢子繁殖的影响,试验在保证水分条件的基础上,对温度和光照条件采用了单因素、三水平的分组试验方法,具体分组如图1所示。图中的A代表经过消毒处理的培养土,B代表未经消毒的培养土,数字代表培养土盆数。由于2种黑桫欏原生境的光照条件是林下荫蔽环境的散射光照,所以试验的自然光照是指模拟它们原生境光照条件的自然散射光照,而不是真正意义上的自然光照;自然变温也是指与原生境温度条件差别不大的当地自然温度条件。

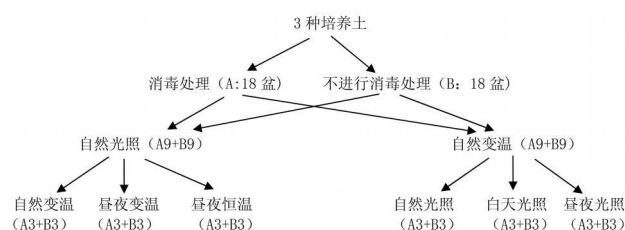


图1 2种黑桫欏孢子繁殖试验的分组示意

**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。

**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,移栽基质的种类与培养土相同,但不进行干燥消毒。为了便于土壤水分和空气湿度的调控,移栽容器为口径45 cm、净高30 cm的塑料花盆,盆内土厚15 cm。幼苗移栽后用透明塑料薄膜把盆口覆盖,并定时检查盆土和盆内空气湿度,尽量使其保持在60%~85%之间。移栽30 d后统计成活率,并观察生长状况。

**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

从表1结果看出,不管是华南黑桫欏还是齿叶黑桫欏,3种培养土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<sub>0.01</sub>,下同),其中又以原生境土最好,混合土次之,腐叶土最差。

这说明2种黑桫欏的孢子繁殖对它们的原生境土具有较强依赖性,而且对土壤条件的要求也比较严格,这也可能是导致它们的自然种群难以扩大的因素之一。2种黑桫欏在3种培养土上的繁殖差异基本一致,不仅因为它们亲缘关系很近的同科属植物,而且它们在原生境中也经常是相伴而生,所以生境条件基本一致。另

外, 在 3 种培养土上, 华南黑桫欏的繁殖效果明显好于 齿叶黑桫欏, 这也和二者自然繁殖能力的差异相吻合。

表 1 不同培养土的繁殖效果

培养土	腐叶土			混合土			原生境土		
	未消毒	消毒	合计	未消毒	消毒	合计	未消毒	消毒	合计
华南黑桫欏配子体数量	66. 7	51. 4	118. 1	86. 7	61. 5	148. 2	112. 8	83. 6	196. 4
华南黑桫欏孢子体数量	5. 6	3. 1	8. 7	7. 9	4. 2	12. 1	12. 8	5. 9	18. 7
华南黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	8. 4	6. 1	7. 4	9. 1	6. 9	8. 2	11. 3	7. 1	9. 5
齿叶黑桫欏配子体数量	42. 7	32. 5	75. 2	52. 8	45. 6	98. 4	66. 7	49. 2	115. 9
齿叶黑桫欏孢子体数量	3. 4	2. 0	5. 4	4. 9	3. 0	7. 9	7. 3	3. 5	10. 8
齿叶黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	7. 9	6. 2	7. 2	9. 3	6. 6	8. 0	10. 9	7. 2	9. 3

注: 表中数据为每盆培养土的平均值, 下同。

对同一培养土而言, 经过消毒处理的和未消毒的二者之间的繁殖效果也存在明显差异。检验结果证明, 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( $|t| > t_{0.01}(18)$ ), 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<sup>[10]</sup>之间存在矛盾, 但也和有些研究者<sup>[11]</sup>的试验结果相吻合。出现这一结果的主要原因可能是以下两个方面: 一是土壤消毒在杀灭有害微生物的同时也破坏了培养土壤里的酶类系统, 从而降低了土壤养分的有效性, 这就严重影响了没有根系而只有假根的配子体对土壤养分的吸收和利用; 二是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培养条件下, 各种霉菌的出现再所难免, 而霉菌的出现势必会严重影响黑桫欏孢子的整个繁殖过程, 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黑桫欏孢子的繁殖。

2.2 不同温度条件下的繁殖效果

从表 2 结果看出, 2 种黑桫欏孢子对温度变化的反应是一致的, 这与它们的亲缘关系及生境的一致性密切相关。3 种温度条件的繁殖效果存在明显差异, 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 3 个方面都存在极显著差异, 其中又以自然温度最好, 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, 2 种黑桫欏在孢子繁殖的温度条件方面, 已经对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, 这种影响在孢子体的形成和成活方面尤其明显, 表现为从配子体到孢子体的转化率非常的低下。

表 2 不同温度条件下的繁殖效果

温度条件	自然温度	昼夜变温	昼夜恒温
华南黑桫欏配子体数量	90. 8	75. 8	57. 5
华南黑桫欏孢子体数量	10. 4	6. 7	2. 4
华南黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	11. 5	8. 9	4. 2
齿叶黑桫欏配子体数量	62. 4	56. 5	29. 5
齿叶黑桫欏孢子体数量	6. 6	4. 9	1. 3
齿叶黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	10. 6	8. 6	4. 4

2.3 不同光照条件下的繁殖效果

表 3 结果说明, 3 种光照条件的繁殖效果也有差异, 但多重比较结果表明, 在配子体数量、孢子体数量和配子体到孢子体的转化率 3 个方面, 都是除了自然光照和昼夜光照之间差异显著(均值差  $> LSD_{0.05}$ ) 外, 其余均表现为差异不显著(均值差  $< LSD_{0.05}$ )。这一结果说明, 在 3 种光照条件中, 也是以自然光照最好, 但只要能满足光照强度和光照时间的要求, 2 种黑桫欏的孢子繁殖对光照的节律变化并无严格要求。

表 3 不同光照条件下的繁殖效果

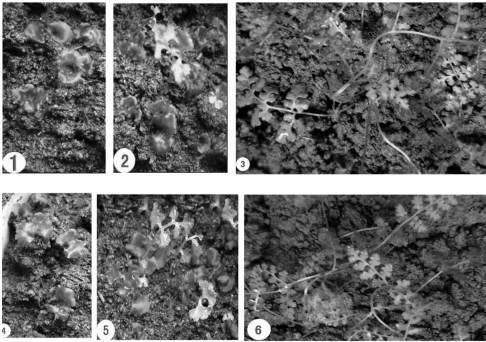
光照条件	自然光照	白天光照	昼夜光照
华南黑桫欏配子体数量	80. 5	78. 5	74. 6
华南黑桫欏孢子体数量	7. 0	6. 5	5. 8
华南黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	8. 7	8. 3	7. 8
齿叶黑桫欏配子体数量	52. 5	48. 3	45. 2
齿叶黑桫欏孢子体数量	4. 5	4. 0	3. 6
齿叶黑桫欏配子体到孢子体的转化率/ %	8. 6	8. 3	7. 9

2.4 不同移栽基质的幼苗移栽成活状况

表 4 结果说明, 2 种黑桫欏幼苗对土壤的反应和孢子繁殖一样, 也表现为对原生境土较强的依赖性和对土壤条件的严格要求, 但只要其它管理能满足要求, 腐叶土和混合土作为移栽基质也能获得较高的成活率。

表 4 不同移栽基质的幼苗移栽成活状况

移栽基质	腐叶土	混合土	原生境土
成活率(%)	67	75	92
生长状况	一般	良好	很好



图版

注: 1、4 分别为华南黑桫欏和齿叶黑桫欏的配子体; 2、5 分别为华南黑桫欏和齿叶黑桫欏的配子体和孢子体幼苗; 3、6 分别为华南黑桫欏和齿叶黑桫欏的移栽成活小苗。

### 3 讨论

#### 3.1 条件适宜时, 2 种黑桫欏的孢子繁殖率较高

从试验结果来看, 只要繁殖条件适当, 2 种黑桫欏的孢子繁殖率还是较高的。因为一株成熟黑桫欏个体是能够产生不计其数的大量孢子的, 试验所用孢子数量只相当于 1 株成熟植株所产孢子数量的 1/4 左右, 在有些繁殖条件很不理想的情况下, 仍然繁殖出了 756 株孢子体幼苗。所以, 只要繁殖条件适当, 2 种黑桫欏的孢子繁殖率较高, 完全可以达到经济适用的规模生产要求。

#### 3.2 满足土壤条件和水分要求, 自然繁殖可以成功

试验结果说明, 除水分条件外, 2 种黑桫欏的孢子繁殖条件都以自然条件为最好。因此, 只要满足土壤条件和水分要求, 这 2 种黑桫欏孢子的自然繁殖可以成功。据此推测, 这 2 种黑桫欏孢子在自然状态下繁殖率非常低下的主要原因应该是以下两个方面: 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, 黑桫欏孢子繁殖所要求的严格的水分条件很难得到满足。这样的发现也给探索黑桫欏的濒危机制提供了重要的信息。

#### 3.3 无菌条件下进行蕨类植物孢子繁殖可提高繁殖率

在试验中, 尽管未消毒培养土的繁殖效果好于消毒培养土, 但在未消毒培养土的孢子繁殖过程中, 不可避免地出现了不少的其它植物幼苗, 从而大大降低了培养土应有的孢子繁殖率。如果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, 同时也能消除其它植物孢子或种子萌发的影响, 既方便了管理, 又能在一定程度上提高孢子的繁殖率, 是一个更为理想的繁殖途径。

#### 3.4 2 种黑桫欏的转化率低, 说明受精作用很关键

从试验结果可以明显看出, 2 种黑桫欏从配子体到孢子体的转化率都很低下, 最高也只有 12.8%, 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。

#### 3.5 2 种黑桫欏的配子体和孢子体幼苗十分相似, 说明它们的亲缘关系非常亲近

2 种黑桫欏的配子体和孢子体幼苗十分相似(如图版所示), 在常规放大镜下根本看不出二者之间的差别, 并且它们的孢子繁殖条件也非常一致, 这些现象都进一步证明了二者之间有着非常亲近的亲缘关系。

#### 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, 2007, 9(4): 61-66.
- [3] 曾汉元. 我国的观赏蕨类资源及其开发利用[J]. 生物学通报, 2008, 43(5): 9-11.
- [4] 张宪春. 中国特有的和珍稀濒危蕨类植物[J]. 植物杂志, 2001(4): 1-2.
- [5] 刘玉成. 重庆国家重点保护野生植物区系地理[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2000, 25(4): 439-447.
- [6] 曾汉元. 中国重点保护蕨类植物研究进展[J]. 生物学通报, 2002, 37(7): 14-17.
- [7] 韩敬, 赵莉. 蕨类植物繁殖研究进展[J]. 安徽农业科学, 2000, 33(7): 1261-1263.
- [8] 张百誉, 钟运芳. 蕨类植物的繁殖[J]. 植物杂志, 1991, 18(2): 12-13.
- [9] 张祖荣. 园林树木栽培与养护技术[M]. 北京: 化工出版社, 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.

## Exploring on Spore Breeding Techniques of Rare Medicining Using and Decorative *Gymnosphaeras* in Severe Danger

ZHANG Zhi-rong<sup>1,2</sup>, ZHANG Shao-bin<sup>1,3</sup>

(1. Department of Life Science, 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 402160)

**Abstract:** The collected spores of *Gymnosphaera metteniana* and *Gymnosphaera denticulata* from Jinyun Mountain. After having been disinfected, we planted the spores in three kinds of cultivating soil which had been disinfected or not. Under the condition that there had been enough water, the did single-factor and three-levels grouping experiments about the temperature and illumination. The result showed that the cultivating soil and condition for the spores of the two *Gymnosphaeras* were just the same. The non-disinfected original surrounding soil was the best cultivating soil. The natural scattering ray was the best illumination. The local natural changing temperature was the best temperature. The whole spore breeding process from the impregnation of the gametophytes to the birth of the sporophytes were the key.

**Key words:** *Gymnosphaera metteniana*; spore breeding; *Gymnosphaera denticulata*