

海南蛇足石杉株龄及年生长量研究

王德立^{1,2}, 齐耀东^{1,2*}, 魏建和^{1,2}, 冯锦东^{1,2}

(1. 中国医学科学院、协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南 万宁 571533;

2. 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 万宁 571533)

摘要: 蛇足石杉因含有丰富的石杉碱甲而引起广泛关注, 需求巨增, 但该植物生长缓慢, 野生资源濒临灭绝, 且人工培植相关技术尚未成熟。为保护野生资源及今后开展繁育研究工作, 需进一步了解蛇足石杉的生物学特性。据此开展了对海南蛇足石杉天然群体的调查, 调查内容主要涵盖芽胞层数、层间距、株高及环境条件等。结果表明, 芽胞逐年产生, 集中分布于分枝顶端, 其层数可作为判定株龄的重要指标; 生长半年的幼苗平均高度为 1.42 cm, 幼株 3 年生长高度平均为 7.94 cm; 而成株生长相对稳定, 平均年生长量在 2.0~2.5 cm 之间。根据株高及芽胞(或芽托)层数可判定成株株龄为芽托层数+3。

关键词: 蛇足石杉; 芽胞; 芽托; 芽胞幼苗

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)01-0087-05

Studies on the ages and annual growth of *Huperzia serrata* from Hainan

WANG De-Li^{1,2}, QI Yao-Dong^{1,2*}, WEI Jian-He^{1,2}, FENG Jin-Dong^{1,2}

(1. Hainan-branch Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy

of Medical Sciences, Wanning 571533, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources

Conservation and Development of Southern Medicine, Wanning 571533, China)

Abstract: *Huperzia serrata* is well known worldwide because of its Hup A. The requirement of this plant is increasing rapidly. It grows slowly in habitat and its wild resource storage is limited to meet a need. Now the cultivation process has not been established successfully. So it is necessary to study further the biological characters of *H. serrata* in order to protect the wild resource and cultivate in plantation. Then the authors investigated the natural populations in Bawangling Nature Reserve of Hainan Province. The investigation items included mainly gemma layers, distance between two adjacent layers, plant height and environments. The results showed gemma layer was an important factor to make sure the age of plant because it presented on top of shoot annually. The average height of gemmlings for half a year was 1.42 cm, and the young plant grew for 3 years to 7.94 cm high on average. But the adult plants grew annually from 2.0 cm to 2.5 cm longitudinally. Therefore, the age of adult *H. serrata* plant from gemma was leaf layers +3 according to the plant height and gemma or gemmiphore layers.

Key words: *Huperzia serrata*; gemma; gemmiphore; gemmling

蛇足石杉(*Huperzia serrata*), 又名千层塔, 隶属石杉科(Huperiaceae), 为一种低矮草本拟蕨类植

物。20世纪80年代从蛇足石杉中成功分离得到一种生物碱—石杉碱甲(Hup A), 该成分可抑制乙酰

收稿日期: 2010-03-21 修回日期: 2010-08-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAI27B01); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(2007HNB003); 海南省自然科学基金(309132) [Supported by the National Science & Technology Pillar Program of China; Basic Research Project of State Level Research Institute(2007HNB003); the Natural Science Foundation of Hainan Province(309132)]

作者简介: 王德立(1979-), 男, 山东单县人, 硕士, 主要从事药用植物栽培, (E-mail) wdl101@sina.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: ydqi@implad.ac.cn)

胆碱酯酶活性,成为治疗早老性痴呆(AD)的潜在药物之一(Ma等,2006)。随着对石杉碱甲研发的深入及药物生产的增加,它的生产原料——蛇足石杉的市场需求也随之增加。然而由于该植物野生居群分布星散,资源匮乏,加之人口增长与社会的发展引起栖息地遭到破坏等原因,依赖于野生资源提取石杉碱甲来满足需求必然遭遇供应量不足的瓶颈。若不加以保护,该野生资源将遭到毁灭性破坏,甚至灭绝。由于资源限制,已开展了对石杉碱甲的人工合成研究,但合成物质活性低,毒副作用大,且合成步骤繁琐,成本较高,难以满足社会需求(余红英等,2002)。

早在20世纪70年代就开始了蛇足石杉分类的研究工作,报道了蛇足石杉物种的分类问题及在全世界的分布,明确了该种属于石杉科石杉属,主要分布于亚洲、大洋洲及中美洲等(秦仁昌,1981;Zhang等,2000;杨纯瑜,1982)。在中国,蛇足石杉主要分布于长江以南各省,其它地区有零星分布,其天然群体具有分布广泛、呈簇生长的特点,其群体的生长环境千差万别(吴荭等,2005)。生长环境影响植物的药用价值,源自不同分布群体的植株,其主要成分含量存在差异。对来自中国不同省份的蛇足石杉进行分析发现,石杉碱甲含量在地区间差异明显,即使同地区材料,根、茎、叶等不同器官中石杉碱甲含量也存在明显差异(Ma等,2005;汉元等,2009;郭水良等,2006),但引起这种差异的原因尚待研究。石杉碱甲在蛇足石杉中的含量较低,通常约万分之几至万分之十几,若实现药品的大量生产,则需要巨大的原材料储量。再者,通过对蛇足石杉生物碱深入研究,石杉碱类物质逐步被发现和分离(Tan等,2003),从而增加了对蛇足石杉的需求。在中国,对该植物认识逐渐深入,宣传力度也在加大,但掠夺式采挖仍较严重,野生资源急剧减少,对原本并不丰富的资源造成严重破坏,开展资源保护与繁育研究已势在必行。

近几年,对蛇足石杉人工培植技术的研究也逐步开展,如利用组织培养进行快速繁殖(沈晓霞等,2002),利用孢子或扦插进行人工培植等(李娜等,2007),以芽胞为繁殖材料培养出幼苗(曾汉元等,2008),但目前相关的培植研究工作尚处于试验阶段。Ma等(2006)指出试管培养可能是解决资源短缺问题的重要方式,但该方法仍处于研究中。截止目前,规模化生产的诸多技术难题尚待解决,人工培

植一直难以成功,其中一个重要原因在于缺乏对天然群体中蛇足石杉的繁育、生长特性的了解及对生态环境的掌握。仅就生长特性而言,其中的植物生长年限的确定,目前尚无明确的研究报道,大多局限于对植株粗略估计,缺乏科学性,从而导致资源浪费。尽管对蛇足石杉近缘物种有过一些研究,如对同属植物长柄石杉(*Huperzia javanica*)年生长量的研究(王小理等,2007)和石松科(Lycopodiaceae)植物形态和生长速率的研究(Primack,1973)等,但结果表明植物年生长量在物种间存在差异。

开展蛇足石杉株龄确定方法的研究对深入了解该植物生物学特性,确定采收时期及繁育研究有重要意义。因此作者对海南霸王岭自然保护区的蛇足石杉天然群体进行了详细的样方调查,以明确自然条件下蛇足石杉株龄与年生长量,亦为今后开展蛇足石杉的资源保护和野生抚育工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 研究地点

海南省昌江县霸王岭自然保护区位于 $18^{\circ}50' \sim 19^{\circ}11' N$, $109^{\circ}03' \sim 109^{\circ}17' E$ 。全年受海洋性热带季风气候影响,通常有干湿季之分,雨季从每年5~10月,干季从10月至次年4月,年均气温 $21.3^{\circ}C$ 左右,年均降雨量1750mm左右。调查样地位于海拔1300m处的热带山地常绿矮林内,样地坡度为 $10^{\circ} \sim 15^{\circ}$,其母质为花岗岩,土壤为砖红壤。伴生植物在乔木层和灌木层主要有栎属(*Quercus* sp.)、厚皮香(*Ternstroemia gymnanthera*)、毛棉杜鹃(*Rhododendron klossii*)、海南五针松(*Pinus fenze-liana*)等植物,在草本层主要为一些真蕨类和苔藓植物。

1.2 方法

1.2.1 株龄估计 蛇足石杉为多年生拟蕨类植物,二歧分枝,叶片螺旋状排列,芽胞生长于分枝顶端为重要的繁殖器官。源自芽胞的植株生长阶段主要包括幼苗(即生长1年以内的芽胞幼苗)、幼株(生长阶段处于幼苗和成株之间的植株)和成株(产生孢子囊的植株)。蛇足石杉芽胞产生晚于孢子,芽胞通常在每年的3~4月产生于分枝顶部,每个分枝通常均同时产生,可能数量不同。芽胞与芽托一起于生长植株上,二者具数量对应关系,芽胞脱落后,芽托残留于植株上多年不脱落,因此芽胞或芽托是判断株龄

的较好依据。此外,本研究将来自芽胞的幼苗称为芽胞幼苗(gemmling)。

2008年12月至2009年4月对海南蛇足石杉野生群体中来自芽胞的幼苗生长过程进行了6个月的观测,并测定62株幼苗高度 h_n ,并计算其加权平均值 $\bar{h} = (\sum_{i=1}^n f_i h_i) / (\sum_{i=1}^n f_i)$,其中 h_i 为幼株高度, f_i 为 h_i 的频度。结合幼株高度进而推算出该类植株的生长年限 n_0 , $n_0 = Hn / (2\bar{h})$ 。由于植株每年产生芽托一层,因此其株龄 N 为在幼株株龄的基础上加上芽托层数 n ,即 $N = n_0 + n$ 。

1.2.2 海南蛇足石杉群体调查 在约100 m²蛇足石杉天然群体中随机设立0.5 m×0.5 m的样方36个,调查指标包括幼株和成株高度 H_n 、芽托(芽胞)

层数 n 、芽托(芽胞)层间距 L_n 。对调查株高数据用SPSS13.0和Excel 2007联合处理。根据1.2.1中公式计算成株生长高度加权平均值 H_n ,其中 n 为芽托层数,并进行方差分析和多重比较。同时对调查群体中的蛇足石杉植株用尼康相机450D进行拍照。

2 结果与分析

2.1 蛇足石杉幼株株龄的确定

根据表1可知,62株生长半年的幼苗高度加权平均值为1.42 cm,标准差为0.43 cm。根据样方调查结果得出幼株平均高度为7.94 cm(图2),据此计算幼株的平均生长时间约为3年。

表1 生长半年的幼苗高度与频度
Table 1 The height and frequency of half year old plants

项目 Item	值 Value																	
高度 Height	0.5	0.6	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	2.1	2.3	2.5	2.6	
频度 Frequency	1	1	1	1	7	8	7	4	5	7	3	6	4	3	2	1	1	

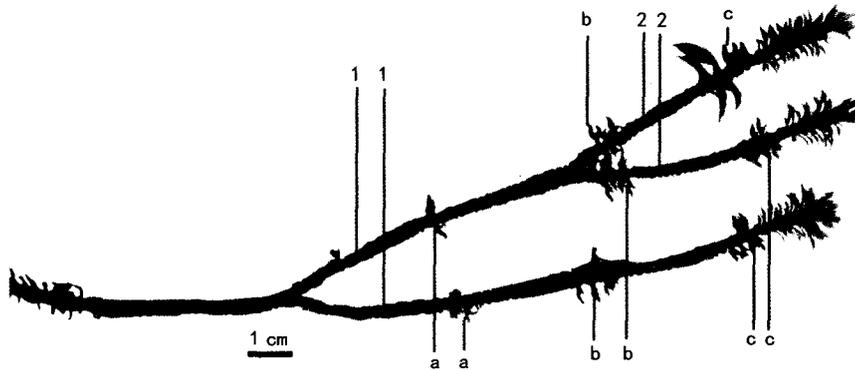


图1 蛇足石杉孢子体形态
Fig. 1 Morphology of *Huperzia serrata*

1. 一次分枝; 2. 二次分枝; a, b, c. 芽托(标有相同字母的芽托产生时期相同即同层芽托,同分枝上相邻两级芽托间的距离为芽托(芽胞)间距)。
1. first branch; 2. second branch; a, b, c. gemmiphore (gemmiphore with the same letter bring in same period (the same layer gemmiphore), gemmiphore distance is the space of two adjacent gemmiphore layers).

2.2 植株生长式样和年生长量

2.2.1 植株生长式样 蛇足石杉为二歧分枝植物(图1:1,2),芽胞产生于分枝顶部,芽胞脱落后芽托(图1:a,b,c)可残留于植株上数年,可作为判断株龄的依据。多年生植株一般于每年2~4月于植株顶部产生嫩绿色相对较大的叶片,长、宽分别约1.5 cm和0.5 cm,随后产生芽胞及芽托,接着产生小叶(长、宽分别约为1.0 cm和0.3 cm)。叶片生成的

同时在叶腋处有绿色孢子囊产生。通常于每年9~12月,孢子囊由绿色逐渐变为黄色,12月至翌年1月孢子囊开裂,孢子散落。而芽胞通常于8~10月份脱落,多分布于植株周围,不久萌发成新植株。芽胞脱落后芽托残留于植株上。

2.2.2 植株年生长量 多数植株每年产生芽胞一次,靠近茎基部的芽胞或芽托产生较早,将芽托(芽胞)按植株从下至上的顺序分为不同的层数。对调

查的 552 组芽托层间距结果进行方差分析和多重比较,结果见表 2。

调查发现天然群体中蛇足石杉芽托层数均未超过 7。植株由幼苗生长值至幼株平均年生长高度为 2.84 cm,由样方调查的幼株高度计算约 3 年的平均生长高度为 7.94 cm。生长至成株出现芽胞后,其增长幅度有所降低,根据统计 1~6 层芽胞的年增长幅度分别为:2.41、2.39、2.21、2.06、2.46、2.42 cm (图 2 中横坐标 1~6)。从芽胞第一层至第七层,每年株高增长的幅度整体变化趋势为:3 层和 4 层增长幅度较小,分别为 2.21、2.06 cm,其它层数明显高于此,但其它层数之间没有显著差异(表 2,图 2)。这表明蛇足石杉年生长量基本一致,尽管有些年份出现生长缓慢的情况,这可能缘于环境因素所致。在孢子体整个生长过程中,植株幼苗至幼株阶段生长速率较快,而产生芽胞后即成株的生长速度相对稳定。其中第 4 层芽胞时期植株生长相对较慢,是孢子体时期生长最慢的阶段,此后成熟植株又恢复通常的生长速度。出现的生长极为缓慢的情况可能由于当年恶劣的自然环境,而这种大多年份基本一致的年生长量可能源自该物种的遗传特性。

表 2 不同层间距方差分析及多重比较

Table 2 Variance analysis and multiple comparison of distances between different gemmiphore(gemma)layers

芽胞层数 Gemmae layers	显著性概率(Sig.)				
	1	2	3	4	5
2	0.688				
3	0.006*	0.022*			
4	0.000*	0.000*	0.116		
5	0.728	0.603	0.090	0.010*	
6	0.442	0.900	0.370	0.126	0.460*

注: * 显著性概率($P < 0.05$); 1. 第 1、2 层芽托间距; 2. 第 2、3 层芽托间距; 3. 第 3、4 层芽托间距; 4. 第 4、5 层芽托间距; 5. 第 5、6 层芽托间距; 6. 第 6、7 层芽托间距。

3 讨论

3.1 蛇足石杉株龄的确定

由于无法形成年轮,长期以来一直没有广泛普遍适用的方法准确测定多年生草本植物的生长年龄,而往往只能根据不同的种类选择不同的处理方法。石杉类植物株龄的估算与测定已有简单报道,王小理等(2007)研究长柄石杉芽胞时曾提及芽胞或

芽托可能是判断株龄的依据,并对其株龄进行了推测。根据这个提示,作者对海南省霸王岭分布的蛇足石杉种群做了深入调查,发现了蛇足石杉的芽胞层数与株高及株龄的相关关系。

来自芽胞的幼苗具较快的生长速率,与孢子繁殖不同,无需经历孢子的萌发和配子体的形成,因此来源不同的幼苗可能会有不同的生长速率。海南霸王岭属热带雨林地区,温度较高,雨量充沛,其它地区环境与海南差异较大,这可能导致其它群体植株并非每年均产生芽胞或 1 年产生多次,以至于造成以此判定株龄存在偏差,或者其它地区植株来自不同的繁殖方式,其生长速度差异较大,应根据当地环境条件和主要繁殖方式等综合考虑。本研究通过对海南霸王岭野生蛇足石杉株高、芽托(芽胞)层数、分枝数等调查及分析发现,对于成熟孢子体,可据此推断其植株株龄为芽托层数+3。近年来,对蛇足石杉中石杉碱甲含量研究逐渐深入和全面,特别是测定不同地区材料中石杉碱甲含量的研究较多(Ma 等, 2005;郭水良等,2006),但均未明确蛇足石杉株龄,在今后研究中若能在明确材料生长年限的基础上测定石杉碱甲含量或者进一步明确石杉碱甲含量随株龄的积累动态,方可减小误差,有利于提高研究结果的准确性和真实性,也利于适时采收。

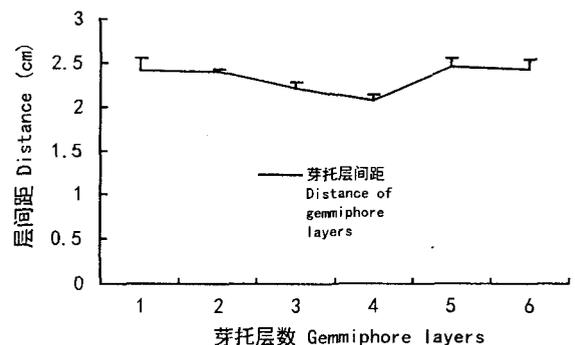


图 2 株高随芽胞层数的年生长量
Fig. 2 The annual growth height with the layers of gemma

3.2 植株生长模式及生长量

蛇足石杉为多年生草本植物,野生环境中可生长 10 年以上,生长速度较为缓慢。产生孢子前的早期阶段生长相对较快,产生孢子后植株生长相对稳定,年生长量在 2.0~2.5 cm 之间,不同年份之间略有差异。但对植株多年平均生长量调查发现第 4、5 层芽胞植株生长显著低于其它阶段(表 2,图 1),该

现象的产生可能不是源于植物的遗传特性,源自当年生长环境可能性较大。海南产蛇足石杉除个别年份外,大部分年份生长量基本一致,这表明了该物种在海南的生长特性,但蛇足石杉在中国的分布极为广泛,北自黑龙江,南至海南,这种巨大环境差异是否对其生物学特性产生明显影响以及产生怎样的影响则需要进一步的研究。深入研究环境对蛇足石杉年生长量研究可为将来实现该物种的野生抚育,扩大其产量提供重要的方法学理论基础。

王小理等(2007)研究了长柄石杉植株的年生长情况,并对其年生长量进行了调查,指出其纵向年生长量在 1.5~2.5 cm 之间,蛇足石杉成株年纵向生长量在 2.0~2.5 cm 之间,两者虽为同属近缘种,前者幼株生长情况未见文献报道,而后者幼株生长高度为 7.94 cm。前者年生长幅度范围较后者大,这可能因为环境因子的差异造成,亦可能是两者遗传差异,或者二者的协同作用,对此有待深入研究。本文研究了蛇足石杉的年生长量,通过测定芽托层数和株高,可推算出成株株龄,该结论将会对合理取样以及对今后规模化生产中合理采收有指导意义。在蛇足石杉野生资源相对匮乏而规模化生产尚未实现的今天,进一步了解其植株的生长特性有利于野生抚育和可持续发展。

参考文献:

- 李娜,陈均,承曦,等. 2007. 真菌对蛇足石杉扦插生根的影响及其机理研究[J]. 江苏农业科学, (5): 181-184
- 沈晓霞,俞旭平,盛束均. 2002. 千层塔茎尖组织培养灭菌方法的研究[J]. 中国中药杂志, 27(6): 458-459
- 杨纯瑜. 1982. 国产石杉科,石松科药用植物的分类、分布和药用价值[J]. 植物分类学报, 20(4): 445-451
- Ching RC(秦仁昌). 1981. The taxonomy of Chinese Lycopodiaceae II(中国石松科的分类II)[J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 3(1): 291-305
- Guo SL(郭水良), Li PL(李沛玲), Li SJ(李似姣) et al. 2006. On determination of Hup A content in *Huperzia serrata* and comparison with populations from different areas(石杉碱甲的含量测定方法及在蛇足石杉不同产地居群中的含量比较)[J]. J Zhejiang Normal Univ: Nat Sci Edi(浙江大学学报·自然科学版), 29(2): 177-180
- Ma XQ, Tan CH, Zhu DY, et al. 2005. Is there a better source of Huperzine A than *Huperzia serrata* Huperzine A content of Huperziaceae species in China [J]. J Agric Food Chem, 53: 1 393-1 398
- Ma XQ, Tan CH, Zhu DY, et al. 2006. A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae[J]. J Ethnopharmacol, 104: 54-67
- Primack RB. 1973. Growth patterns of five species of *Lycopodium* [J]. Amer Fern J, 63(1): 3-7
- Tan CH, Ma XQ, Zhou H, Jiang SH, et al. 2003. The novel hydroperoxylated *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia serrata*[J]. Acta Bot Sin, 45: 118-121
- Wang XL(王小理), Li WK(黎万奎), Zhou JY(周吉燕). 2007. Morphological study on gemmae and gemmalings of *Huperzia javanica* (Huperziaceae)(长柄石杉芽胞及芽胞植株形态研究)[J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 29(5): 521-526
- Wu H(吴荭), Zhuang P(庄平), Feng ZB(冯正波), et al. 2005. Resource investigation and assessment of *Huperzia serrata* (中国蛇足石杉资源调查与评估)[J]. J Nat Res(自然资源学报), 20(1): 59-67
- Yang CY(杨纯瑜). 1990. The classification system of *Lycopodiales* from China(中国石松目植物的分类系统)[J]. Bull Academy Military Med Sci(军事医学科学院院刊), 14(4): 269-275
- Yu HY(余红英), Sun YM(孙远明), Yang YS(杨跃生). 2002. Studies on alkaloids from *Huperzia serrata* (蛇足石杉生物碱的研究)[J]. Shizhen Trad Chin Drugs Med(时珍国医国药), 3(3): 176-179
- Zhang LB, Kung HS. 2002. Taxonomy of the genus *Huperzia* Bernh. (sen. str.) sect. *Serratae* (Rothm) Holub in China[J]. Acta Phytotax Sin, 38(1): 13-22
- Zeng HY(曾汉元), Zhang WB(张伍佰). 2008. Studies on the propagation of medicinal fern *Huperzia serrata* (药用植物蛇足石杉的应用繁殖)[J]. J Huaihua Univ(怀化学院学报), 27(8): 4-6
- Zeng HY(曾汉元), Zhang XC(张学春). 2009. Determination of the content of Huperzine A in *Huperzia serrata* from three different population of Huaihua region, Hunan Province(怀化地区蛇足石杉三个居群的石杉碱甲含量的测定)[J]. J Huaihua Univ(怀化学院学报), 28(11): 26-28