

叶面施肥对南方红豆杉针叶中紫杉醇 和 10-DAB 含量的影响

全 川¹, 王玉震¹, 王昌伟², 柯春婷¹, 倪进治¹, 杨红玉¹

(1. 湿润亚热带生态地理过程省部共建教育部重点实验室, 福建省亚热带资源与环境省重点实验室, 福建师范大学地理科学学院, 福建 福州 350007; 2. 福建三三药业有限公司, 福建 南平 353000)

摘要: 人工栽培红豆杉已成为目前解决紫杉醇市场需求的主要途径, 如何提高人工栽培的红豆杉中紫杉醇及其化学半合成前体 10-脱乙酰基巴卡丁 III (10-DAB) 的含量是一个十分关键的问题。对人工栽培南方红豆杉叶面喷施不同浓度的 N、K、Ca、Mg 肥和自行配置的稀土混合肥(含 La、Ce、Sm), 连续 4 次跟踪采样, 超高效液相色谱(UPLC)测定样品中紫杉醇和 10-DAB 的含量。结果表明, 叶面喷施不同浓度的 N 元素均引起红豆杉针叶中紫杉醇和 10-DAB 含量的降低; 喷施 K 元素, 前期引起 10-DAB 含量的增加但随之降低, 紫杉醇的含量则持续降低; 喷施不同浓度的 Ca、Mg 提高了红豆杉中紫杉醇和 10-DAB 的含量, 其作用可持续一段时间; 自行配置的稀土混合肥明显地提高了紫杉醇和 10-DAB 的含量且其持续作用时间较长, 紫杉醇和 10-DAB 的含量分别最高可达 0.261mg g^{-1} 和 0.641mg g^{-1} 。

关键词: 营养元素; 金属元素; 稀土元素; 叶面喷洒; 紫杉醇; 10-DAB; 栽培南方红豆杉

文章编号: 1000-0933(2009)02-0553-10 中图分类号: Q142, Q946.88, Q948, S718.5 文献标识码: A

Impacts of leaf fertilizer application on taxol and 10-DAB contents in the needles of cultivated *Taxus chinensis* var. *mairii*

TONG Chuan¹, WANG Yu-Zheng¹, WANG Chang-Wei², KE Chun-Ting¹, NI Jin-Zhi¹, YANG Hong-Yu¹

1 Key Laboratory of Humid Subtropical Eco-geographical Process of Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Subtropical Resources and Environment, School of Geography, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 Fujian Sansan Pharmaceutical LTD., Nanping 353000, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(2): 0553 ~ 0562.

Abstract: Extraction of taxol from needles and branches of cultivated *Taxus chinensis* var. *mairii* is currently a major approach to meet the market demand for taxol, but the key concern is how to increase taxol and its precursor (10-deacetyl-baccatin III) (10-DAB) contents in cultivated *T. chinensis*. Nutrient solutions of N, K, Ca and Mg, and self-developed rare-earth fertilizer mixture containing La, Ce and Sm were used to treat the needle of 3-year-old *T. chinensis* at different concentrations, the needle samples were collected sequentially by the following three months, and the samples were measured for taxol and 10-DAB with UPLC. Results showed that the taxol and 10-DAB contents declined following the application of N fertilizer at all concentrations; spraying of K fertilizer resulted in the increase in the 10-DAB content in the first two samplings followed by reduction in the later two samplings, while the taxol contents were decreased across all samplings. Spraying of Ca and Mg increased the taxol and 10-DAB contents with a prolonged effect, while the effect of self-developed fertilizer mixture was stronger with the highest taxol and 10-DAB contents reaching 0.261mg g^{-1} and 0.641mg g^{-1} .

基金项目: 福建省“十一五”科技重大专项前期研究资助项目(2005YZ100)

收稿日期: 2008-09-25; 修订日期: 2008-12-12

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tongch@fjnu.edu.cn

Key Words: nutrient element; metal element; rare earth; leaf spraying; taxol; 10-DAB; cultivated *Taxus chinensis* var. *mairei*

红豆杉属裸子植物,为常绿乔木或灌木,全世界红豆杉属共 11 种,分布于北半球寒温带、温带和亚热带地区^[1]。我国有 4 个种和 1 个变种,包括中国红豆杉(*Taxus chinensis*)、云南红豆杉(*T. yunnanensis* Chang et L. K. Fu)、西藏(喜马拉雅)红豆杉(*T. wallichiana*)、东北红豆杉(*T. cuspidata*)和南方红豆杉(*T. chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.))^[2]。自美国食品与药物管理局 1992 年正式批准紫杉醇可用于治疗晚期卵巢癌后,国内外对于红豆杉植株中紫杉醇含量的研究持续升温,包括不同红豆杉品种及不同组织部位中的紫杉醇含量^[3-8];植株中紫杉醇合成和积累部位的探讨^[9];遮光对南方红豆杉生长和紫杉醇含量的影响^[10]等。

紫杉醇化学全合成及细胞组织培养的产业化目前还不成功,人工种植红豆杉已成为目前解决紫杉醇供求矛盾的主要途径,使得近年来国内外涌现出多家人工红豆杉种植基地。据报道,目前国内已有红豆杉种植基地 145 家,总面积近 100 km²,超过 3.3 km²的有 8 家^[11]。南方红豆杉中紫杉烷类化合物含量极低,是制约红豆杉产业发展的瓶颈因素之一。如何通过代谢调控研究提高栽培红豆杉中紫杉醇和 10-DAB 的含量与产量,是一个具有重要理论和应用价值的研究方向,也是红豆杉产业可持续发展亟待解决的问题。

目前,关于诱导因子提高紫杉醇含量的研究均集中在红豆杉细胞组织培养方面。细胞组织培养实验证明多种紫杉醇前体化合物和诱导因子的添加对细胞生长和紫杉醇的积累产生影响,如适当浓度的茉莉酸甲酯、水杨酸等生物诱导因子以及稀土元素、金属元素对提高紫杉醇合成速度、增加紫杉醇的积累量均具有较明显的效果^[13-16]。此外,一些常见的营养元素的添加对细胞组织培养的红豆杉中紫杉醇含量也有一定影响,例如氮源作为次生代谢生物合成的主要调节因子,总浓度对细胞的生长率和紫杉醇合成的影响明显,培养基中氮源浓度过高或过低都会抑制紫杉醇的合成和细胞生长^[17]。但是,目前对于诱导因子是否可以提高栽培红豆杉植株中紫杉醇和 10-DAB 的含量,包括施加不同的营养元素、金属元素和稀土元素对栽培红豆杉中紫杉醇及其合成前体含量是否存在影响?影响的程度和持续时间如何?还未见任何文献报道,这正是众多红豆杉种植基地和加工企业所关注的关键问题。本研究通过叶面喷洒的方式,对栽培红豆杉施加不同浓度的 N、K、Ca、Mg 肥和自行配置的稀土混合肥(含有镧、铈和钇 3 种稀土元素),定期跟踪采集样品,并测定样品中紫杉醇和 10-DAB 含量,分析其变化,以期探讨不同元素、不同浓度处理对红豆杉中紫杉醇和 10-DAB 含量的影响和影响持续时间,从而对通过经营措施提高红豆杉中紫杉醇含量提供科学依据。

1 研究样地与试验设计

1.1 研究样地

试验地点选在福建三三药业有限公司在南平市延平区茫荡山茂地南方红豆杉人工种植基地(118°06'N, 36°50'E),种植地为经过人工改造后的“梯田式”坡地,面积达几十公顷。2007 年,基地南方红豆杉幼株龄级为 3a(为种子苗,从山下专门育苗基地培育并运到山上),平均株高 90.5 cm。整个试验样地面积约 2 hm²,地势均一,环境条件一致。研究区域属于中亚热带季风气候,年平均温度 19.3 °C,年均降水量 1604 mm,年日照时数 1709.9 h。

1.2 研究样地土壤环境本底值调查

采用 S 形取样法,在研究试验样地随机取 4 个样点,各样地距离约 10 m,在每个样点取 4 钻土样,分 2 层取样(0~10,10~30 cm),每一个样点同层样品混合,回实验室过 5 mm 筛,去除石砾和根系,风干,进行土壤环境背景值测定。测定的指标包括:土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、钙、镁、铁、锌。pH 用酸度计(MODEL 868)测定、碱解氮用碱解扩散法测定,速效 P 用盐酸-氟化铵法测定,速效钾用乙酸铵提取法测定,钙、镁、铁和锌消煮后用原子吸收仪(岛津 AA-6300)测定。

1.3 试验设计

2007 年 5 月 4 日~5 月 5 日,用喷壶叶面喷洒施加 N、K、Ca、Mg 肥及混合稀土肥(含有镧、铈和钇)5 种肥

料。每一种肥料的每一个处理(包括对照)各喷施一行南方红豆杉幼株(一行至少喷洒 100 株南方红豆杉幼株),以后每隔 20 d 跟踪采集红豆杉针叶 1 次,跟踪 3 个月左右。参照农业中 N、K、Ca、Mg 的施肥量,各元素设计了 3 个浓度较大的叶面喷洒浓度(表 1,表 2),此外,每一种肥料处理均包括一个未喷施的对照组。

每次跟踪对于每一个处理,至少采集该处理下的 50 株以上的南方红豆杉的针叶(采集 1 年生针叶为主,少量 2a 和 3a 生枝条上的针叶)样品 500 克,混合,带回实验室分析测定。

表 1 以单元素计叶面喷洒浓度
Table 1 Spraying concentration calculated by single element

元素 Elements	浓度梯度 Concentration gradient					
	处理 1 Treatment 1		处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3	
	(mol·L ⁻¹)	(%)	(mol·L ⁻¹)	(%)	(mol·L ⁻¹)	(%)
N	0.10	0.14	0.4	0.56	0.80	1.12
K	0.05	0.20	0.10	0.39	0.20	0.78
Ca	0.02	0.08	0.05	0.20	0.10	0.40
Mg	0.02	0.05	0.05	0.12	0.10	0.24
混合稀土 Mixed rare earth	0.30	1.50	0.6	3.00	1.20	4.50

表 2 以肥料计叶面喷洒浓度
Table 2 Spraying concentration calculated by fertilizer

肥料 Fertilizers	浓度梯度 Concentration gradient					
	处理 1 Treatment 1		处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3	
	(mol·L ⁻¹)	(%)	(mol·L ⁻¹)	(%)	(mol·L ⁻¹)	(%)
尿素 Urea	0.10	0.30	0.40	1.21	0.80	2.42
KCl	0.05	0.40	0.10	0.74	0.20	1.48
CaCl ₂	0.02	0.22	0.05	0.55	0.10	1.11
MgSO ₄	0.02	0.25	0.05	0.60	0.10	1.20
混合稀土 Mixed rare earth	0.30	2.70	0.6	5.40	1.20	8.10

尿素含 N 量为 46% The content of N of urea is 46%

2 紫杉醇和 10-DAB 含量的测定

2.1 药品与仪器设备

紫杉醇、10-DAB 标准品(云南汉德公司,纯度大于 99.9%);甲醇(禹王试剂,色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司);乙腈(色谱纯,西格玛-奥德里奇(上海)贸易有限公司),水(超纯水)。

Waters ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱分析系统和 ACQUITY UPLC TUV 检测器;旋转蒸发器(BUCHI),TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);固相萃取柱(Waters C₁₈小柱,200 mg);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Waters 20 孔真空固相萃取装置。

2.2 紫杉醇含量分析

2.2.1 色谱条件

色谱柱 ACQUITY UPLC BEH Shield RP 18 (1.7 μm, 2.1 × 50 mm);柱温 40℃;流速:0.4 ml min⁻¹;进样量 1 μl;紫外检测波长:228 nm。流动相梯度见表 3。该色谱条件下紫杉醇和 10-DAB 都能达到基线分离,样品分析时间为 8 min。

2.2.2 样品提取

将室温阴干的南方红豆杉针叶粉碎。称取 3 g 粉末样品于 50 ml 玻璃离心瓶中,加入 25 ml 70% 甲醇水溶液,摇匀,超声波处理 60 min,1500 r·min⁻¹ 的速度离心 5 min,倒出上清液于圆底烧瓶中,滤渣继续用 25 ml 70% 甲醇浸提 2 次,超声 30 min,离心,弃去滤渣,合并 3 次所得滤液于 60℃ 下减压浓缩,残渣用 5 ml 甲醇溶解并定容至 25 ml,过滤,待用。

2.2.3 固相萃取纯化

将 C18 固相萃取柱用 100% 甲醇浸泡 30 min, 然后依次用 100% 甲醇和超纯水淋洗 10 ml, 进样前在萃取柱上部需保留约 1~2 ml 水。吸取 2 ml 提取液加入固相萃取柱中, 然后分别用 10 ml 超纯水和 20% 甲醇淋洗, 弃去洗脱液。最后用 5 ml 80% 甲醇进行洗脱, 收集洗脱液即为待测液。

2.2.4 紫杉醇和 10-DAB 的含量检测

取待测液 1 ml 注入超高效液相色谱仪, 梯度洗脱 (表 3), 标准曲线外标法定量, 计算紫杉醇和 10-DAB 含量。

测得紫杉醇标准曲线为: $y = 2 \times 10^6 x - 213.92$ (y : 色谱峰面积, x : 紫杉醇浓度), 相关系数 $r = 0.9999$, $0.000161 \sim 0.1004 \text{ mg ml}^{-1}$ 范围内线形关系良好; 10-DAB 标准曲线为: $y = 2 \times 10^6 x + 330.89$ (y : 色谱峰面积, x : 10-DAB 浓度), 相关系数 $r = 1$, $0.00016 \sim 0.10019 \text{ mg ml}^{-1}$ 范围内线形关系良好。

2.2.5 平行性实验和数据分析

对于每一个处理的样品进行 3 个平行样分析, 并对 3 个平行样分析结果取平均值并计算标准误差为最终结果。

3 结果

3.1 土壤环境背景值

研究样地土壤环境背景值见表 4, 土壤呈酸性, 4 个样点表层 (0~10 cm) pH 平均值为 4.85 ± 0.15 , 10~30 cm 土层 pH 值稍有下降 (4.64 ± 0.05), 表层 (0~10 cm) 碱解氮、速效磷、速效钾含量分别为 (74.72 ± 10.05)、(49.12 ± 11.25) 和 (313.87 ± 95.33) mg g^{-1} , 10~30 cm 土层下降为 (72.92 ± 9.05)、(33.27 ± 15.94) 和 (155.37 ± 83.71) mg g^{-1} 。表层 4 种金属元素 (钙、铁、镁、锌) 含量为分别 (2.91 ± 1.84)、(158.15 ± 48.25)、(0.43 ± 0.08) 和 (0.006 ± 0.003) mg g^{-1} , 10~30 cm 土层分别为 (0.863 ± 0.302)、(209.17 ± 67.76)、(0.423 ± 0.13) 和 (0.047 ± 0.003) mg g^{-1} , 钙含量在不同取样点和两土层间差异较大, 镁含量在不同取样点和两土层间差异较小。

表 4 研究样地土壤环境背景值

Table 4 Soil environmental background values in the study site

样点和分层* Spots and layers	pH	碱性氮 Hydrolyzable N (mg g^{-1})	速效钾 Available K (mg g^{-1})	有效磷 Available P (mg g^{-1})	钙 Ca (mg g^{-1})	铁 Fe (mg g^{-1})	镁 Mg (mg g^{-1})	锌 Zn (mg g^{-1})
1-1	4.99	86.71	401.0	57.93	0.71	223.96	0.53	0.0099
1-2	4.67	72.40	147.5	29.265	1.155	235.06	0.52	0.0069
2-1	4.95	64.70	261	55.98	4.055	137.90	0.27	0.0020
2-2	4.68	85.87	110	28.29	0.85	166.36	0.26	0.0020
3-1	4.66	68.40	206.5	49.42	2.14	159.92	0.45	0.0061
3-2	4.56	66.06	88.5	56.23	0.45	143.03	0.38	0.0020
4-1	4.79	79.07	387	33.15	4.75	110.83	0.48	0.0067
4-2	4.64	67.37	275.5	19.31	0.995	292.22	0.53	0.0079

* 1-1 表示第一个样点第一层, 以下类推 1-1 represent the first layer in the first spot, and so on

3.2 营养元素 N 和 K 对紫杉醇和 10-DAB 含量的影响

对红豆杉叶面喷施 N 和 K 后, 红豆杉针叶中紫杉醇和 10-DAB 的含量均发生变化, 且随着喷施浓度的不同表现出影响程度的差异, 同时, 发现对于不同时间 4 次跟踪取样的对照组, 2 种化合物的含量具有明显的季节变化特征, 对于紫杉醇, 5 月份的含量最高, 对于 10-DAB, 5、8 月份的含量相对较高, 6、7 月份含量较低 (图 1, 图 2)。

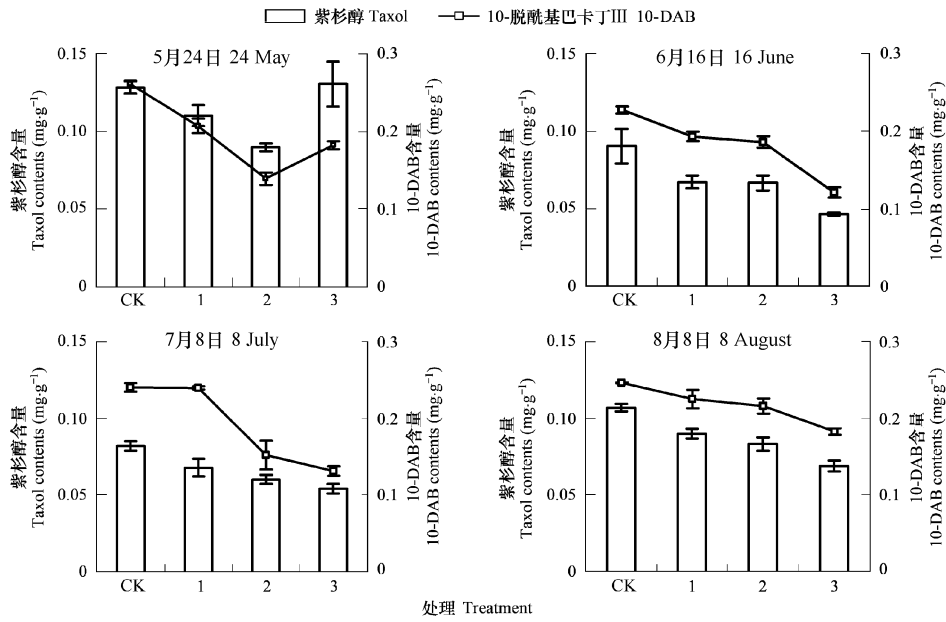


图1 喷施 N 对紫杉醇和 10-DAB 含量的影响
Fig. 1 Effects of spraying N on the taxol and 10-DAB contents

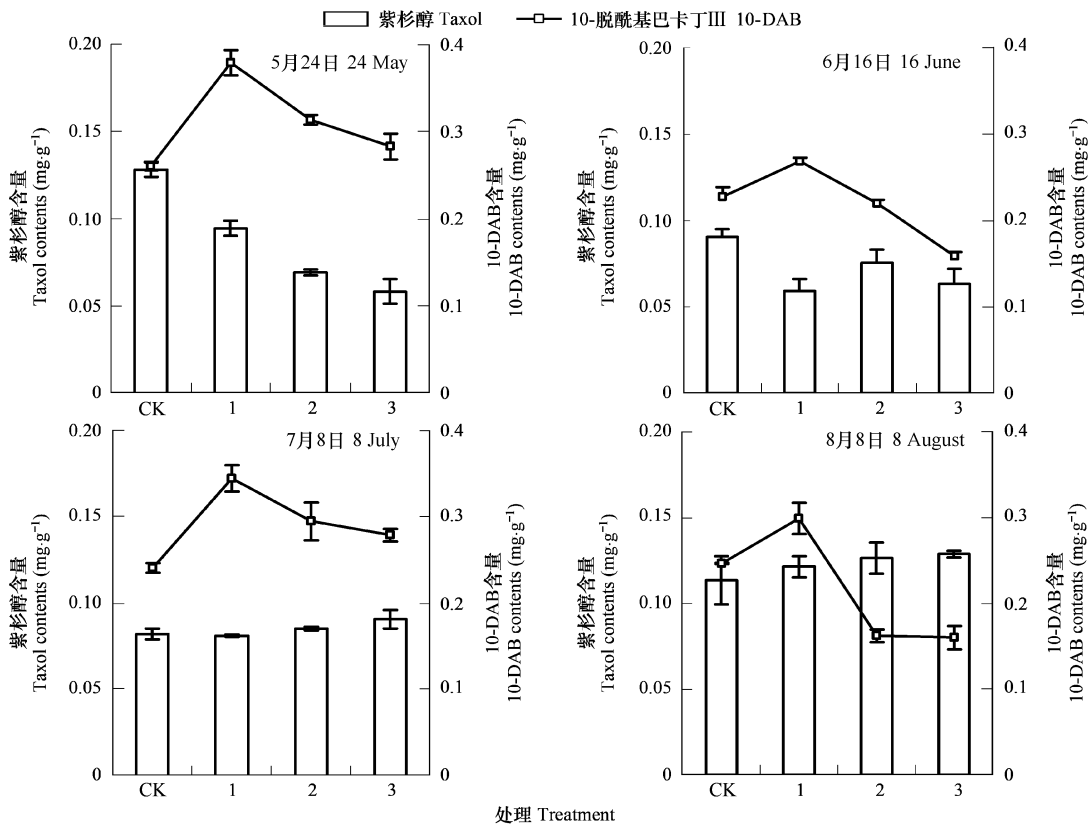


图2 喷施 K 对紫杉醇和 10-DAB 含量的影响
Fig. 2 Effects of spraying K on the taxol and 10-DAB contents

施加不同浓度的 N 肥后,紫杉醇含量在喷施后的第 1 次取样就出现了不同程度的下降,处理 1 紫杉醇含量下降 14%,处理 2 中紫杉醇含量下降达 30%,但对于喷施高浓度 N 肥的处理 3,紫杉醇含量下降不明显。第 2 次取样(喷施后的约 40d),喷施高浓度 N 肥的处理 3,紫杉醇含量比对照下降了 48%,其余的 2 种处理紫

杉醇含量也有一定程度的下降,7、8月份的第3、4次取样,紫杉醇含量也呈下降过程,总体分析认为,喷施N素会引起紫杉醇的降低且持续的时间较长,在所试验的浓度范围内,N浓度越高,紫杉醇含量降低的越明显。施加不同浓度的N肥后,10-DAB与紫杉醇含量的变化具有一致的规律。

施加不同浓度的K肥后,紫杉醇含量在第1次取样时明显下降,并随喷施浓度的增加下降的幅度也在增加,其中,喷施高浓度的处理3使紫杉醇含量下降达55%,但是在随后的第2次取样时,相对对照组,下降的幅度明显降低,在最后第3、4次取样,紫杉醇含量较对照组出现了很小幅度的增加,并随喷施浓度的提高,增加的幅度也稍有增加,其中第4次取样后检测的结果显示高浓度处理后紫杉醇比对照提高了13%。K肥对10-DAB含量的影响非常明显,低浓度K肥可以显著提高10-DAB的含量,最高可提高45%,高浓度会导致紫杉醇含量的下降。

3.3 金属元素Ca和Mg对紫杉醇和10-DAB含量的影响

对红豆杉叶面喷施Ca和Mg2种金属元素后,针叶中紫杉醇和10-DAB含量均发生变化,总的影 响是增加了紫杉醇和10-DAB含量,且影响时间较长(图3和图4)。

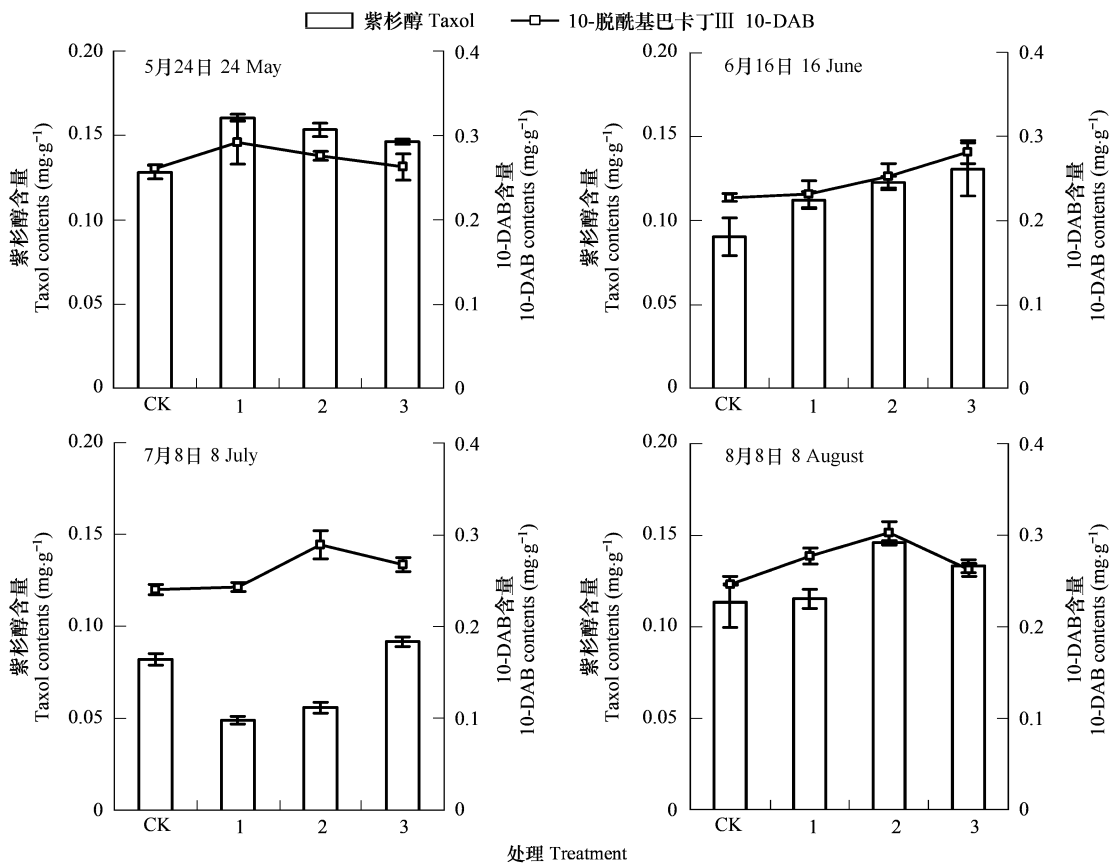


图3 喷施Ca元素对紫杉醇和10-DAB含量的影响

Fig. 3 Effects of spraying Ca on the taxol and 10-DAB contents

喷施Ca元素,除第3次取样中的处理1和处理2使得紫杉醇含量出现下降外,其它次取样和处理,都表现为紫杉醇含量增加,影响最为显著的是第1次取样的处理1和第4次取样的处理2,使紫杉醇含量分别比对照样提高了25%和28%。对于10-DAB,在连续4次的跟踪中,其含量与对照组相比,同样明显地增加,第2次取样的处理3和第4次取样中的处理2的影响最为显著,其中后者是所有处理出现的最大值 0.303 mg g^{-1} 。从4次跟踪的结果可以看出Ca元素的影响程度持续时间很长,有效影响时间在4个月以上。

喷施Mg元素,各处理均明显地增加了紫杉醇的合成和积累,表现为紫杉醇含量的增加,其中,影响最大

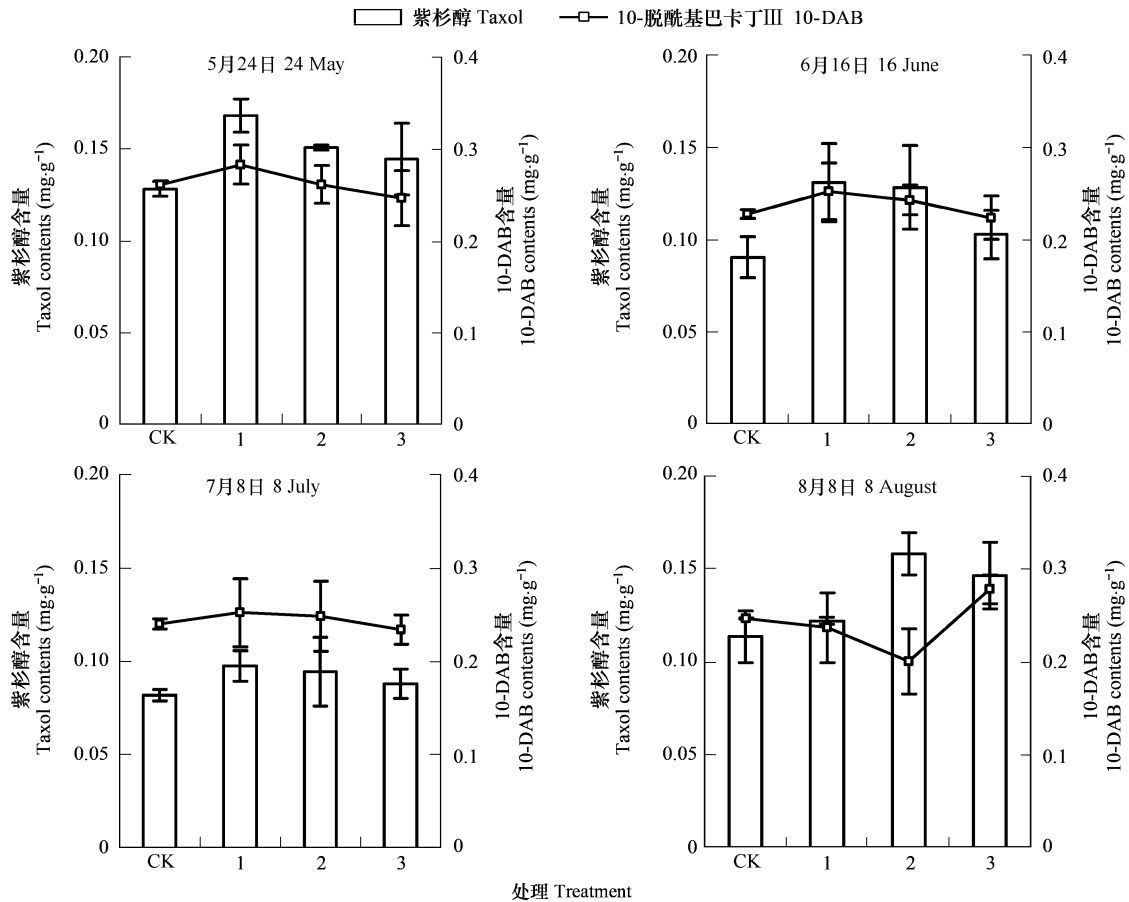


图4 喷施 Mg 元素对紫杉醇和 10-DAB 含量的影响

Fig. 4 Effects of spraying Mg on the taxol and 10-DAB contents

的出现在喷施后的第 1 次跟踪取样,处理 1 使得紫杉醇含量增加了 31%,达到 0.168 mg g^{-1} 。随着时间延续,紫杉醇含量增加的幅度也在随之减弱,但是,一直到 8 月份的第 4 次取样,各种处理得紫杉醇含量的增加幅度仍然非常明显,其中,喷施高浓度 Mg 肥的处理 2 和 3 使紫杉醇含量的升高更明显,可见 Mg 元素对紫杉醇合成和积累有较大的影响且影响的持续时间较长。所有处理均使 10-DAB 的含量不同程度地增加,影响最为明显的阶段出现在第 1 次的处理 1 和最后 1 次取样的处理 3,10-DAB 的含量较对照组分别增加了 8% 和 12%,含量分别达到 0.283 mg g^{-1} 和 0.278 mg g^{-1} 。

3.4 混合稀土肥对紫杉醇和 10-DAB 含量的影响

喷施自配的混合稀土肥后,各处理均显著增加了紫杉醇和 10-DAB 的合成和累积,其中,影响最大的出现在喷施后的第 4 次跟踪取样,处理 3 使得紫杉醇和 10-DAB 的含量分别增加了 130% 和 160%,达到 0.261 和 0.641 mg g^{-1} 。相对于对照组,在检测的时间和处理的浓度范围内,紫杉醇和 10-DAB 的含量随着时间的延长和处理浓度的增加而增加(图 5)。

4 结论与讨论

紫杉醇是红豆杉属植物对病原性侵袭而产生的一种植物抗毒素,是受植物防御性基因调控的次生代谢产物,因此,红豆杉细胞紫杉醇的合成量与外界刺激直接相关^[15]。大量组织和细胞培养实验均证明采用多种诱导因子(包括金属元素、稀土元素、激素等)可以有效地促进细胞和组织的生长,提高紫杉醇及 10-DAB 的含量^[12-18]。本研究结果表明,N 元素的喷施总体会导致紫杉醇和 10-DAB 含量持续降低,而且随 N 肥浓度的增加持续时间延长,可达 4 个月以上。喷施 K 肥对 10-DAB 含量的影响较为显著,低浓度的 K 肥能显著提高 10-DAB 的含量,而高浓度会导致 10-DAB 的降解,对紫杉醇的影响表现为先降后升,但升高的幅度不明显。

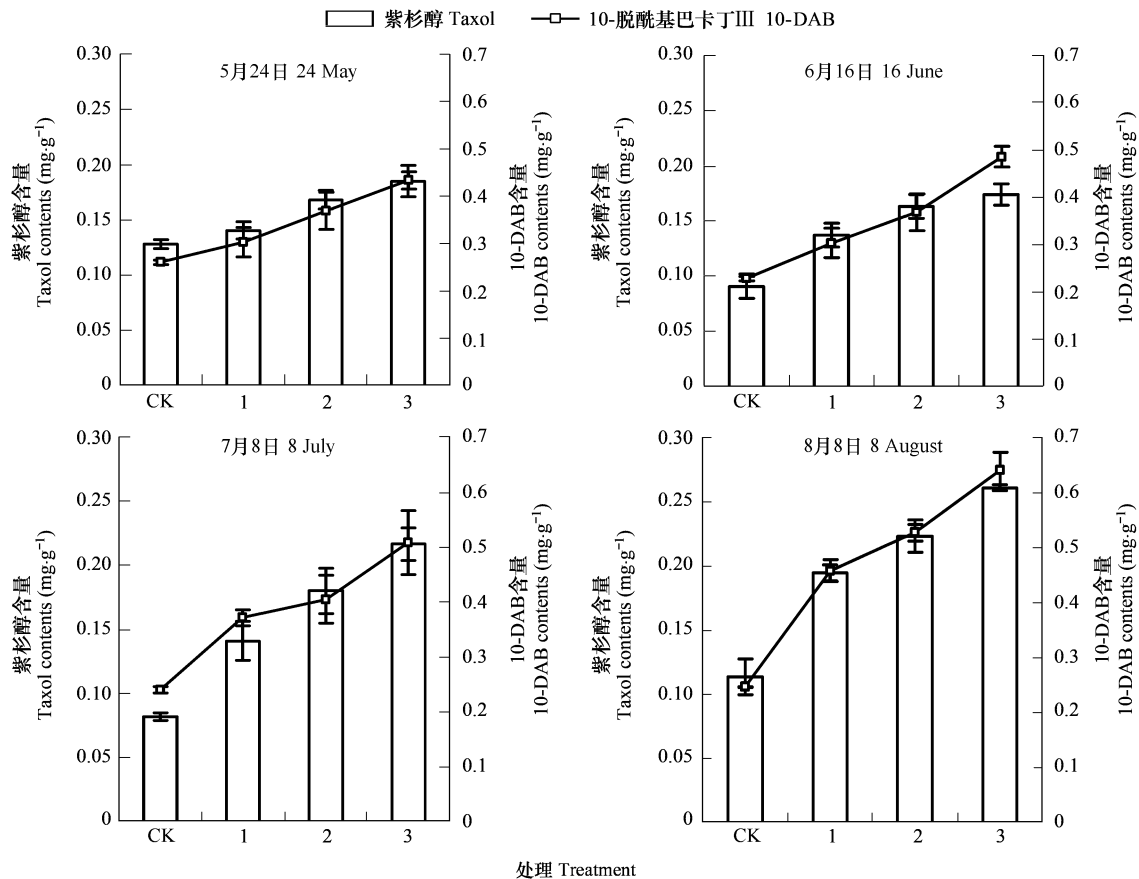


图5 喷施混合稀土对紫杉醇和10-DAB含量影响

Fig. 5 Effects of spraying mixed rare earth fertilizer on the taxol and 10-DAB contents

关于施加营养元素对红豆杉中紫杉醇和10-DAB含量的影响的机理目前还不清楚,对于它的科学解释还需要更深入的生物化学研究。

Ca、Mg元素的喷施收到一定的效果,除个别处理使目标物含量出现降低外,其它处理均不同程度地出现了紫杉醇和10-DAB含量升高的效果。在植物中,钙是细胞壁和辅酶因子的成分,参与细胞膜的通透性。Koept等^[19]对太平洋红豆杉紫杉醇生物合成代谢途径的研究发现焦磷酸牻牛儿基牻牛儿酯(gernylgernyl diphosphate)可环化成为紫杉二烯炔(taxa-4(5), 11(12)-diene)酶是紫杉醇合成代谢途径中的限速酶,其活性直接影响紫杉醇的合成量,此酶具有二价阳离子依赖性,特别是镁离子对它的影响最大,同时,稀土可取代某些酶的钙离子,从而激活这些酶的活性。在紫杉醇合成途径中,所参与反应的磷酸激酶、脱羧酶、IPP异构酶、异戊二烯合成酶、戊烯转移酶等都需要 Mg^{2+} 的参加,加入适量的 Mg^{2+} ,可利于紫杉醇的合成^[20]。以上研究可被用来解释本研究中叶面喷施Ca、Mg两种元素提高了紫杉醇和10-DAB含量的试验结果。

组织和细胞培养实验均证明采用稀土元素诱导因子可以有效地促进细胞和组织的生长,提高紫杉醇及10-DAB的含量,元英进等^[15]通过选用不同稀土化合物对红豆杉细胞施加刺激,发现以二价铈对紫杉醇合成的提高最显著,苏湘鄂等^[16]研究发现用稀土处理后,细胞胞内和胞外紫杉醇含量都较对照有大幅度提高,且处理浓度越大,作用时间越长。在本研究中,叶面喷施自行配置的混合稀土肥同样可以明显地提高栽培南方红豆杉中紫杉醇和10-DAB的含量。紫杉醇的释放量受到细胞简单扩散与主动运输的双重影响,其中,细胞膜起到决定性作用,细胞膜的通透性直接影响到紫杉醇的释放量,而稀土可改变细胞膜的通透性^[15]。稀土元素可以作用于多种组织成分和活化酶,并进一步促进细胞和植物生长,正面效应是促进叶绿素的合成和养分的摄取,对紫杉烷类化合物合成的刺激作用源于对于一些跨膜离子的影响,特别是对 Ca^{2+} 吸收和流出的影

响, 由于 Ca^{2+} 在基因表达和调控上具有十分重要的作用, 因此, 稀土元素对于包括紫杉醇等次生代谢物积聚的影响可通过影响 Ca^{2+} 实现。

作为紫杉醇合成的前体物质, 杨逢建等^[21] 研究发现南方红豆杉枝叶中紫杉醇含量与 10-DAB 的含量呈负相关关系, 但不显著 ($P > 0.05$)。刘智等^[9] 研究也发现, 紫杉醇及其前体物质在红豆杉中的合成存在区域化现象, 代谢产物的合成部位和积累部位存在差异。也就是说, 对于红豆杉某一组织器官, 紫杉醇的含量与 10-DAB 的含量并不一定同步变化。本研究的结果也显示南方红豆杉枝叶中的紫杉醇含量与 10-DAB 含量的变化并不完全同步。

本研究仅开展了单独喷施 N、K、Ca、Mg 肥和混合稀土肥对于提高或抑制紫杉醇和 10-DAB 含量的试验, 将来可继续开展施加其它金属元素 (Fe、Cu、Zn 等)、激素或抑制剂, 甚至不同元素和抑制剂的组合配方等的一系列的试验。通过不同影响因子的配伍可以提高紫杉醇及其衍生物的含量, 关键在于如何搭配并应用于生产实践^[22]。可以相信, 将来通过更加系统科学的试验, 必将会为红豆杉种植基地和加工企业提供一套提高紫杉醇和 10-DAB 含量的基础数据以及切实可行的技术支撑。此外, 更需要开展生理生化机理性研究, 探讨红豆杉生长和紫杉烷类化合物合成与积累与各种诱导和环境因子的关系, 研究紫杉醇合成的代谢途径和关键酶, 揭示外界各种条件强化 (如施加各种元素) 对于紫杉醇合成代谢途径和关键酶的影响机理, 更好地为提高紫杉醇含量的各种细胞培养实验和田间试验提供理论支持。

References:

- [1] Institute of Botany, Chinese Academic of Sciences. Flora of China(7). Beijing: Science Press, 1978. 438 — 443.
- [2] Bao W K, Chen Q H. Present status, problems, and future development strategies on natural taxus resources and their exploitation in China. Journal of Natural Resources, 1998, 13(4):375 — 380.
- [3] Elsohly H N, Croom E M, Kopyckitn W J, et al. Concentrations of Taxol and Related Taxanes in the Needles of Different *Taxus* Cultivars. Phytochemical Analysis, 1995, 6:149 — 156.
- [4] Su Y J, Wang T, Li X Y, et al. Analysis on the amounts of taxol in different location of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Product Research and Development, 2000, 13(2):19 — 21.
- [5] Nadeem M, Rikhari HC, Kumar A, et al. Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. Phytochemistry, 2002, 60: 627 — 631.
- [6] Su J R, Zhang Z J, Deng J. Study on the Taxol content in *Taxus yunnanensis* of different age and different provenance. Forest Research, 2005, 18(4):369 — 374.
- [7] Vidensek N, Lira P, Campbell A, et al. Taxol content in bark, wood, root and seeding from several *Taxus* species. Journal of Natural Products, 1990, 53: 1609 — 1612.
- [8] Kwak S S, Choi M S, Park Y G, et al. Taxol content in the seed of *Taxus* spp. Phytochemistry, 1995, 40(1):29 — 32.
- [9] Liu Z, Yu L J, Li M T, et al. Sites of Taxol and Its precursor biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis*. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(3):313 — 317.
- [10] Wang C W, Tong C, Li W J, et al. Effect of shading on *Taxus chinensis* var. *mairei* growth and its taxol contents. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(8):1269 — 1273.
- [11] Wang W B, Jiang Y B. *Taxus*' Medicinal value and utilization of Taxol raw materials sources. Technology, 2006, 10:42 — 45.
- [12] Zang X, Lu X H, Yang D Z, et al. The study on enhancing Taxol Yield cell culture of *Taxus chinensis*. Jour of Fujian Forestry Sci and Tech, 2006, 33(2):154 — 158.
- [13] Yu L J, Zhu M, Zhou Y, et al. The induction effect of Methyl-jasmonate on Taxol biosynthesis. Natural Product Research and Development, 1998, 11(5):1 — 7.
- [14] Hu G W, Yuan Y J, Wang C G. The effects of rare earth element compounds on taxol release of *Taxus cuspidate* cell culture. Tianjin Agricultural Sciences, 1998, 4(1):23 — 26.
- [15] Yuan Y J, Hu G W, Wang C G, et al. Effect of rare earth compounds on the growths, taxol biosynthesis and release of *Taxus cuspidate* cell culture. Journal of the Chinese Rare Earth Society, 1998, 16(1):56 — 60.
- [16] Su X E, Mei X G, Yu Y T. Effects of rare earth elements on *Taxus* cell suspension culture and taxol synthesis. Biotechnology, 2001, 11(4):28 — 30.

- [17] Zhou J Y, Yang L X. Effect of earth elements and nitrogen sources on cell growth and taxol accumulation in suspension cultures of *Taxus Chinese* var. *mairei*. *Journal of Central China Normal University (Nat Sci)*, 2001, 35(3): 331—333.
- [18] Qiu Y, Jia N, Wang L, *et al.* Progress of studies on elicitor's application in taxol production in *Taxus* cell cultures. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(2): 184—189.
- [19] Koepp A E, Hezari M, Zajicek J, *et al.* Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5), 11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(15): 8686—8090.
- [20] Guo Z G, Feng Y, Liiu R Z. Regulation of taxol and taxanes biosynthesis by mineral elements. *Natural Product Research and Development*, 2000, 12(5): 23—27.
- [21] Yang F J, Peng H H, Zhang Y K, *et al.* Quantitative changes of anti-cancer active components in *Taxus chinensis* var. *mairei* branches and leaves. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(4): 911—914.
- [22] Wang C W, Peng S L, Li M G, *et al.* Review of factors affecting the taxoids content of *Taxus* spp. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1583—1590.

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物所编辑委员会. 中国植物志(第七卷). 北京: 科学出版社, 1978. 438~443.
- [2] 包维楷, 陈庆恒. 中国的红豆杉资源及其开发研究现状与发展对策. *自然资源学报*, 1998, 13(4): 375~380.
- [4] 苏应娟, 王艇, 李雪雁, 等. 南方红豆杉不同部位紫杉醇含量的分析. *天然产物研究与开发*, 2000, 19(2): 19~21.
- [6] 苏建荣, 张志钧, 邓疆. 不同树龄、不同地理种源云南红豆杉紫杉醇含量变化的研究. *林业科学研究*, 2005, 18(4): 369~374.
- [9] 刘智, 余龙江, 栗茂腾, 等. 紫杉醇及其前体在中国红豆杉植株中合成和积累部位探讨. *华中农业大学学报*, 2006, 25(3): 313~317.
- [10] 王昌伟, 全川, 李文建, 等. 遮光对南方红豆杉生长及紫杉醇含量的影响. *生态学杂志*, 2008, 27(7): 1269~1273.
- [11] 王卫斌, 姜远标. 红豆杉的药用价值与紫杉醇药源的开发利用. *技术*, 2006, 10: 42~45.
- [12] 臧新, 吕晓辉, 杨冬之, 等. 红豆杉细胞培养中提高紫杉醇产量的研究综述. *福建林业科技*, 2006, 33(2): 154~158.
- [13] 余龙江, 朱敏, 周樱, 等. 茉莉酸甲酯对紫杉醇生物合成的诱导作用. *天然产物研究与开发*, 1998, 11(5): 1~7.
- [14] 胡国武, 元英进, 王传贵. 稀土化合物影响红豆杉细胞紫杉醇释放行为的研究. *天津农业科学*, 1998, 4(1): 23~26.
- [15] 元英进, 胡国武, 王传贵, 等. 镧、铈对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响. *中国稀土学报*, 1998, 16(1): 56~60.
- [16] 苏湘鄂, 梅兴国, 余倚亭. 稀土元素对红豆杉细胞悬浮培养及紫杉醇合成的影响. *生物技术*, 2001, 11(4): 28~30.
- [17] 周吉源, 杨礼香. 稀土和氮源对南方红豆杉细胞及紫杉醇积累的影响. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 35(3): 331~333.
- [18] 仇燕, 贾宁, 王丽, 等. 诱导子在红豆杉培养细胞紫杉醇的应用研究进展. *生物学通报*, 2003, 20(2): 184~189.
- [20] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞之. 无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调控作用. *天然药物研究与开发*, 2000, 12(5): 23~27.
- [21] 杨逢建, 庞海河, 张学科, 等. 南方红豆杉枝叶中药用抗癌活性物质含量. *应用生态学报*, 2008, 19(4): 911~914.
- [22] 王昌伟, 彭少麟, 李鸣光, 等. 红豆杉中紫杉醇及其衍生物含量影响因子研究进展. *生态学报*, 2006, 26(5): 1583~1590.