

曼地亚红豆杉春梢生长过程生理生化变化研究

黄夕洋^{1*}, 李翠兰^{2,3}, 李 锋¹, 蒋水元¹, 李 虹¹, 王满莲¹, 覃喜军⁴

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 桂林亦元现代生物技术有限公司, 广西 中国科学院

桂林 541004; 3. 广西中医学院, 南宁 530001; 4. 广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

摘 要: 测定自然生长状态下曼地亚红豆杉春梢的生理生化指标(过氧化物酶、蛋白质、硝态氮), 以了解和研究它们的变化趋势。结果表明, 过氧化物酶活性、蛋白质含量和硝态氮含量的变化都呈现出先升后降的过程; 在春梢生长的第4~8天都为积累上升过程, 到第8天达到了最大值; 8~12 d 过氧化物酶活性和蛋白质含量急剧下降, 硝态氮含量也在8~28 d 间下降幅度较大; 12 d 或 28 d 之后过氧化物酶活性、蛋白质含量和硝态氮含量都维持较低的水平, 但变化幅度不大。因此, 在自然状态下, 应及时给予土壤更多的肥料, 才能为植物供给营养并为其生长提供充足的条件。

关键词: 曼地亚红豆杉; 春梢; 生长过程; 过氧化物酶; 蛋白质; 硝态氮

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0842-04

Research on physiological and biochemical changes of growing spring shoots of *Taxus media*

HUANG Xi-Yang^{1*}, LI Cui-Lan^{2,3}, LI Feng¹, JIANG Shui-Yuan¹,
LI Hong¹, WANG Man-Lian¹, QIN Xi-Jun⁴

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. Guilin Sunnlylife Modern Bio-Tech INC., Guilin 541004, China; 3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 4. Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The physiological and biochemical characteristics(POD, protein and NO_3^- -N) of the spring shoots of *Taxus media* under natural condition were investigated. The results showed: the POD activity, protein content and NO_3^- -N content increased firstly and then decreased, they showed an accumulation and increase process between the 4th and 8th day in the growth of spring shoot, and reached to max. in the 8th day; the POD activity and protein content decreased rapidly between the 8th and 12th day, the NO_3^- -N content also decreased between the 8th and 28th day. After the 12th or 28th day, POD activity, protein content and NO_3^- -N content maintained at a low level, but varied in a little range. So under the natural condition, more fertilizers must be given to the soil so as to supply enough nutrition and suitable condition for plant growing.

Key words: *Taxus media*; spring shoot; process of growth; POD; protein; NO_3^- -N

红豆杉属植物为常绿乔木或灌木, 该属植物含有的紫杉醇活性化合物作为十分畅销的抗癌药物之一对卵巢癌、乳腺癌效果显著, 产品一直保持着30%的增长率, 资源需求量剧增, 紫杉醇的原料保障已经成为红豆杉产业化开发的关键(康用权等, 2006)。由于红豆杉植物多属珍惜物种, 现存的资源

数量极为有限, 加上紫杉醇主要来源于红豆杉树皮, 含量极低; 而且红豆杉属植物对环境要求较严, 自然更新能力弱, 生长十分缓慢, 30年生的红豆杉才有开采价值; 因此在红豆杉资源开发利用中存在着资源供不应求, 资源破坏严重等问题(康用权等, 2006; 阎家麒等, 1996; 谈锋等, 2000)。为了弥补有限的天

收稿日期: 2009-06-30 修回日期: 2009-10-28

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0537017-11)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0537017-11)]

作者简介: 黄夕洋(1981-), 女, 广西南宁人, 硕士, 主要从事药用植物学和分子生物学研究, (E-mail)xiyang0687@163.com。

然红豆杉资源,人工栽植培育已成为当务之急,1995年始曼地亚红豆杉就以其紫杉醇含量高、无性繁殖快、对环境适应性强,具有其它品种不可比拟的优势被大规模地引种到我国各地进行栽培种植(张照喜等,2005;毛锁云,2002)。

曼地亚红豆杉(*Taxus media*)是从北美加拿大引种的一种杂交红豆杉,树皮及全株均含紫杉醇,针叶中紫杉醇含量高,栽培 3~5 a 后的植株即可采叶提取紫杉醇,此原料成为可再生的资源,具明显的经济和生态效益,极具开发利用价值(谈锋等,2000;张照喜等,2005;毛锁云,2002;Cragg 等,1993;Castor 等,1993)。张照喜等(2005)的研究发现增加曼地亚红豆杉枝干的产量可培育大径级苗木,也可提高枝干的收获量,所以提高枝干的产量成为增加资源利用率和经济效益的关键,促进幼树发枝、培育壮苗也是建立资源基地的目标。

由于曼地亚红豆杉枝干、叶的生长主要是在抽梢期,而且目前生理生化方面的研究主要集中在不同光照条件下对抗寒力、光合特性、膜代谢、保护系统的影响,以及水分胁迫下对生理、光合特性的影响,还未有春梢生长过程的生理生化研究。植物的生长过程与酶、蛋白质等生理生化指标密切相关,过氧化物酶(POD)、蛋白质(Protein)、硝态氮(NO_3^- -N)等生理生化指标与枝叶的生长过程、施肥有关,如利用这三种指标在健藕(李良俊等,1999)、菜豆种子(王明祖,2003)、新铁炮百合(周厚高等,2003)、洋葱(胡巍等,2003)、黄瓜(张鹏等,2007)等生长发育方面的研究;因此本文在曼地亚红豆杉春梢生长过程期间,取其春梢测定这三种生理生化指标,探讨不同生长时间的变化与趋势规律,为今后了解和促进曼地亚红豆杉枝叶的生长、再生利用、人工种植、科学栽培管理以及曼地亚红豆杉资源基地的建设服务等方面提供科学理论依据和奠定基础,并为指导曼地亚红豆杉在春梢期的施肥和护理打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

为引种与种植于广西植物研究所内的曼地亚红豆杉。在自然生长状态下,以曼地亚红豆杉春梢开始萌动时挂牌,并记录日期时间,共观察了 40 d 春梢的生长,每间隔 4 d 摘取春梢作为实验研究材料。

1.2 实验方法

过氧化物酶活性的测定采用愈创木酚法(李合生等,2000);蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法(李合生等,2000);硝态氮含量的测定采用分光光度计法测定(李合生等,2000)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线和三种生理生化指标的测定值

2.1.1 标准曲线 蛋白质与硝态氮标准曲线:根据李合生等(2000)的实验步骤,分别绘制出蛋白质与硝态氮的回归方程 $y = 0.0047x + 0.5872$ ($R^2 = 0.9992$)、 $y = 0.0702x + 0.0564$ ($R^2 = 0.9994$),可使用该回归方程计算样品中的蛋白质与硝态氮浓度。

2.1.2 三种生理生化指标的测定值 表 1 为曼地亚红豆杉春梢生长 40 d 期间,每隔 4 d 所摘取下的春梢所测得的过氧化物酶、蛋白质、硝态氮的具体数值。

表 1 曼地亚红豆杉春梢生长过程生理生化指标的测定
Table 1 Physiological and biochemical indexes of growing spring shoots of *Taxus media*

生长天数(d) Growth days	过氧化物酶含量 (U/g·min) Content of POD	蛋白质含量 (mg/g) Content of protein	硝态氮含量 (μg/g) Content of NO_3^- -N
4	8.928	18.882	300.000
8	19.231	19.562	392.000
12	6.667	3.288	281.000
16	8.928	1.732	239.000
20	5.000	1.013	210.000
24	7.246	3.269	202.000
28	7.317	3.443	158.000
32	9.295	1.984	228.000
36	4.310	1.655	219.000
40	7.936	1.766	106.000

2.2 春梢生长过程中过氧化物酶含量的变化

测量过氧化物酶可以反映某一时间植物体内代谢的变化。曼地亚红豆杉春梢生长期间 POD 的变化过程为:从第 4 天至第 8 天过氧化物酶活性急剧增大,并在第 8 天达到最高值 19.231 U/g·min;之后 4d 酶活性迅速下降至 6.667 U/g·min;第 12~40 天酶活性则维持较低水平,有弱峰,但变化不大,在 4.310~9.295 U/g·min 之间(图 1)。

因此,大体上曼地亚红豆杉春梢在 40 d 的生长发育中,POD 呈现先升后降的变化趋势。在春梢生长 12 天后,酶活性水平较低且变化不大,有弱峰,可见在曼地亚红豆杉春梢叶片生长后期,虽然过氧化

物酶活性有时升高但远不如初期的强。这也说明了在曼地亚红豆杉春梢生长的初期随着叶片的快速生长和过氧化物酶活性的增强,叶片的代谢逐渐加强,至第8天酶活性达到最大,代谢最旺盛;然后伴随着叶片的自然生长与衰老,第8~12天酶活性急剧下降,代谢能力降低;随后酶活性较一致,虽有峰值,但都为弱峰,总体趋势是下降的且变化不大,代谢不如前8天的旺盛。过氧化物酶的变化是否还与生长素有关,还有待进一步的研究。

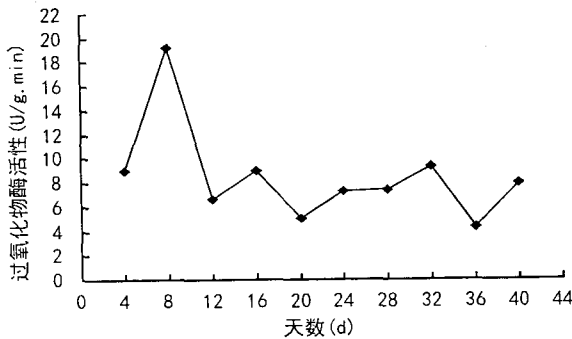


图 1 过氧化物酶活性变化趋势

Fig. 1 The change of peroxidase(POD)activity

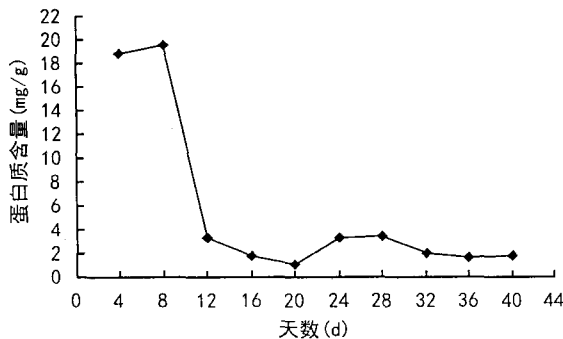


图 2 蛋白质含量变化趋势

Fig. 2 The change of protein content

2.3 春梢生长过程中蛋白质含量的变化

蛋白质含量在春梢生长的前8d均较高,虽然也是在第8天达到最高值,但第4天(18.882 mg/g)与第8天(19.562 mg/g)的蛋白质含量相差不大;之后到第12天蛋白质十分明显地急剧下降至3.288 mg/g;第12~20天蛋白质也在下降,但较为平缓;20d后蛋白质含量有一升降的小起伏图2。

因此,蛋白质含量整体上也是呈现先升后降的过程。说明了曼地亚红豆杉在春梢开始生长时,蛋白质已有所积累并逐渐增加,含量较高(1~8d),此时期春梢的叶片和叶柄都处在增大生长期,需要较

多的蛋白质用以形体扩大,因此蛋白质合成代谢活跃,其含量高,并在第8天达到最大值;第8天后蛋白质迅速被分解用于叶片的生长;第12天后则维持了一较低水平,变化程度也不大;春梢中蛋白质含量降低的原因可能有:随着春梢的伸长增粗生长,一方面细胞内的液泡体积不断扩大,细胞内的水分含量不断增加,致使可溶性蛋白质含量相对变小,而且大量的蛋白质参与枝叶的生长、形态的建成,引起了含量的变化;另一方面细胞内的非蛋白质可溶性有机物的含量增加,同时叶片的衰老也出现蛋白质的降解,以致蛋白质的含量降低。

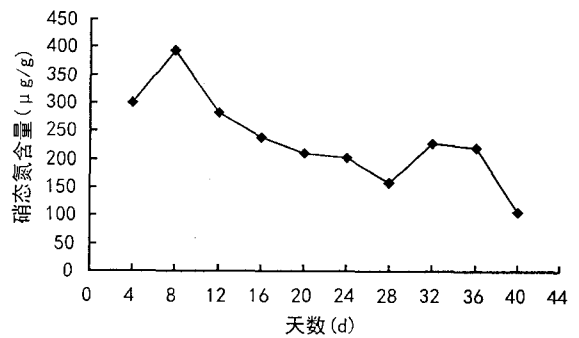


图 3 硝态氮含量变化趋势

Fig. 3 The change of Nitrate-N(NO₃--N)content

2.4 春梢生长过程中硝态氮含量的变化

在春梢生长的前8d叶片中的硝态氮逐渐积累,同样在第8天达到了最高值,有一峰值392.000 μg/g;之后至第28天下降幅度较大,硝态氮的含量最低为158.000 μg/g;从第28天起到第40天,又一个上升一下降的变化,变化幅度也同样相对不很大(图3)。可见,硝态氮含量也是呈现先升后降的过程。在曼地亚红豆杉春梢生长发育最初是硝态氮积累的过程(1~8d);然后硝态氮含量不断减少以促进叶片生长(8~28d);随后有一个升降的变化(28~40d),这可能是由于随着叶片的不断增长变大,硝态氮供应明显下降时,叶柄及根系中的硝态氮可被运往叶片,以及液泡中的硝态氮进入细胞质,以维持其中硝态氮同化作用的进行,所以在28~40d间硝态氮含量先呈上升趋势,之后又被用于叶片生长,呈下降状态。总之,第12天后硝态氮含量也是变化相差不大,都维持在较低水平。

3 讨论

过氧化物酶是植物体内普遍存在、活性较高的

一种酶,植物体内许多生理代谢过程常与它的活性有关(田国忠,2001;梁艳荣等,2003)。在植物生长发育过程中,过氧化物酶的活性不断发生变化,酶活性的强弱直接反映了代谢能力的大小(李合生等,2000)。蛋白质是构成一切细胞和组织结构必不可少的成分,参与物质代谢及生理功能的调控,主要作为催化各种生理活动的酶、细胞的结构物质等,在春季随着新梢的萌发,蛋白质被降解成氨基酸满足枝条生长的养分需求(彭方仁等,2001)。氮是植物需求量最大的矿质元素,可促进叶片不断生长,同时也是土壤中普遍缺乏的元素,其中硝酸根(NO_3^-)是植物的重要氮源,在通气良好的土壤中, NO_3^- 对于植物的氮素营养尤为重要(黄彩变等,2006);叶片硝态氮含量直接反应植物体内硝态氮累积与代谢情况,是植物的氮素营养、氮素同化利用于再用状况的重要指标;因此植物体内硝态氮含量可以反映土壤氮素供应情况,常用作施肥指标。一般来说,植物生长前期,土壤中的养分及水分比较丰富,植物吸收大量的硝态氮,生长后期由于养分耗竭活干旱等原因土壤氮的有效性降低,测定出的硝态氮的含量就比较低,在硝态氮含量低的时期应给与植物补充养分或水分,使其土壤的氮的有效性能提高(李合生等,2000)。因此通过这三种生理生化指标的变化可反映出植株的生长和土壤状况。

在自然状态下曼地亚红豆杉春梢生长的 40 d 中,过氧化物酶、蛋白质、硝态氮的变化与其他学者的研究结果相似(李良俊等,1999;王明祖,2003;周厚高等,2003;胡巍等,2003;张鹏等,2007);这三种生理生化指标的变化都呈现出先升后降的过程:过氧化物酶活性、蛋白质含量、硝态氮含量都在春梢生长的最初 8 d 为积累上升过程,过氧化物酶活性逐渐增高、代谢也逐渐增强,而且蛋白质和硝态氮的含量也是逐渐增多的,到第 8 天都达到最高值;接着过氧化物酶活性、蛋白质含量、硝态氮含量都急剧的较大幅度的下降,过氧化物酶、蛋白质是在 8~12 d 间,硝态氮是在 8~28 d 间;12 d 或 28 d 之后过氧化物酶活性、蛋白质含量和硝态氮含量都维持较低的水平,其中过氧化物酶有弱峰的起伏,蛋白质含量、硝态氮含量都有一升降的起伏,但变化幅度不大。该变化过程说明在春梢最初萌发生长的前 8 d,过氧化物酶活性高、代谢强,并有足够的蛋白质和硝态氮含量用于春梢枝叶的生长,随着叶片的生长发育,在第 8 天都达到最大值,这是因为在叶片生长初

期过氧化物酶活性的增高与光合代谢、呼吸代谢、生长素等有关,以推动春梢枝叶的萌动生长,而蛋白质、硝态氮含量的积累,可能是蛋白质、硝态氮虽有消耗,但更多的是合成与吸收,可为之后叶片的长大、长多提供足够的条件,而且在春梢萌动前蛋白质和硝态氮还可在植物体内积累;之后都急剧下降并维持一较低水平,特别是较后的时间里各指标都变化不大,可见第 8 天是一个重要的转折,其后春梢的生长表现在代谢的急剧降低、蛋白质和硝态氮大量的用于枝叶的生长。最后阶段三种生理生化指标都维持较低的水平,不如 4~8 d 间的高,其中过氧化物酶有弱峰的起伏,蛋白质含量、硝态氮含量都有一升降的起伏,这时生长势是否与代谢能力、生长素、蛋白质和硝态氮的合成消耗程度等有关还有待进一步的深入研究和重复。另外,三种生理生化指标后期的变化,还可以进一步的深入研究与探讨。

总之,自然生长状态下曼地亚红豆杉春梢的生长在前期(前 8 d)过氧化物酶活性高、代谢强,并有足够的蛋白质含量和硝态氮含量用于春梢枝叶的生长发育;之后都急剧下降并维持一较低水平,特别是较后的时间里各指标都变化不大;因此在曼地亚红豆杉春梢萌动前或在生长前期应及时供给营养,并施给土壤足够量的肥料,才能保证被植物吸收、为植物的生长提供充足的养分,达到高产、稳产的效应。

参考文献:

- 康用权,李轩,陈迎辉,等. 2006. 红豆杉资源现状及可持续利用对策探讨[J]. 湖南林业科技,33(3):90-92
- 李合生等. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,7
- 毛锁云,王海珍. 2002. 曼地亚红豆杉的栽培利用前景[J]. 江苏林业科技,29(1):50-51
- 阎家麒,窦樱艳,尹嘉庆,等. 1996. 我国红豆杉植物资源考察及紫杉醇研究开发的现状[J]. 中草药,27(增刊):198-202
- Castor, Trevor P, Thodore A. 1993. Determination of taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering components [J]. *J Liq Chromatogr*, 16(3):723-731
- Cragg GM, Saul A S, Matthew S, et al. 1993. The taxol-supply crisis; New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV[J]. *Jat Prod*, 56(10):1 657-1 668
- Hu W(胡巍), Hou XL(侯喜林), Wang JJ(王建军), et al. 2003. Changes of soluble protein content and POD activity in different organs during onion bulb expansion(洋葱鳞茎形成过程中不同器官可溶性蛋白质含量及 POD 活性的变化)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 23(9):1 601-1 604
- Huang CB(黄彩变), Wang CH(王朝辉), Li SX(李生秀). 2006. (下转第 805 页 Continue on page 805)

速分裂繁殖,同时皮层细胞因根瘤侵入的刺激,进行细胞分裂,使这一区域的皮层细胞数目增加,体积增大,从而形成瘤状突起。本研究发现除了在皮层的某一处形成体积较大的根瘤侵染区域外,在外皮层中也发现数个面积较小的根瘤菌侵染区域。据此推测,根瘤菌侵染皮细胞形成根瘤,发育到一定程度时,开始衰老,但同时会再侵染,在同一个根瘤内形成多个新的侵染区域,大大增加了根瘤的体积,这对提高根瘤菌的固氮能力,促进植物的生长极为有利。但其具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- 汪桦,解焱. 2004. 中国物种红色名录[M]. 北京:高等教育出版社,343
- Cai YW(蔡岳文),Zeng QQ(曾庆钱),Yan Z(严振),et al. 2007. Standardized cultivation techniques of *Dalbergia odorifera*(降香黄檀规范化栽培技术)[J]. *Res Practice Chin med*(现代中药研究与实践),21(1):14
- Huang BL(黄宝灵),Lu CQ(吕成群),YU XN(于新宁),et al. 2005. The form and structure of the nodules of several species of *Podocarpus*(几种罗汉松属植物根瘤的形态与结构)[J]. *Guihaia*(广西植物),25(3):226—228
- Jiang AL(姜爱莉),Sun LQ(孙利芹). 2004. Antioxidation activities of natural components from *Dalbergia odorifera*(降香抗氧化成分的提取及活性研究)[J]. *Fine Chem*(精细化工),21(7):525—528
- Li ZY(李泽禹). 1998. Nodule and mycorrhiza(根瘤与菌根)[J]. *Bull Biol*(生物学通报),33(1):11—12
- Niu YQ(牛玉秋). 2009. Determination of flavonoids in rosewood by HPLC(HPLC 法对降香中黄酮类成分的含量测定)[J]. *J Liaoning Univ Trad Chin Med*(辽宁中医药大学学报),11(3):171—174
- Tan XM(谭小明),Guo SX(郭顺星),Zhou YQ(周雅琴),et al. 2006. Microstructure and endophytic fungus distribution of the root of *Maytenus conferti florus*(美登木根的显微构造及其内生真菌的分布)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),23(4):368—373
- Wang C(王超),Zhang SJ(张胜俊),Xie YF(谢宜芬). 2008. Artificial cultivation techniques of *Dalbergia odorifera*(降香黄檀人工栽培技术)[J]. *Anhui Agric Sci Bull*(安徽农学通报),14(23):221—276
- Yang XQ(杨新全),Feng JD(冯锦东),Wei JH(魏建和). 2007. Genetic diversity of china endangered medicinal plant *Dalbergia odorifera*(我国特有濒危药用植物降香黄檀遗传多样性研究)[J]. *World Sci Tech-Modernization Trad Chin Med Mat Med*(世界科学技术:中医药现代化),9(2):73—76
- Zhang L(张磊),Liu GZ(刘干中). 1987. Effects of *Dalbergia odorifera* on central nervous system(降香的中枢抑制作用)[J]. *Shanghai J Trad Chin Med*(上海中医药杂志),12:39—40
- Nutritional and physiological significance of nitrate accumulation in plant vacuolar(植物液泡硝态氮累积的营养和生理学意义)[J]. *Soils*(土壤),38(6):820—824
- Li LJ(李良俊),Li SJ(李式军),Cao PS(曹碯生),et al. 1999. Changes of some enzymes activity in leaves during the growing of stiff lotus(僵藕生长过程中几种酶活性的变化)[J]. *J Yanzhou Univ (Nat Sci Edi)*(扬州大学学报·自然科学版),2(4):51—54
- Liang YR(梁艳荣),Hu XH(胡晓红),Zhang YL(张颖力),et al. 2003. Progress on physiological function research of plant peroxidase(植物过氧化物酶生理功能研究进展)[J]. *J Inner Mongolia Agric Univ*(内蒙古农业大学学报),24(2):110—113
- Peng FN(彭方仁),Gu J(郭娟),Xu PS(徐柏森). 2001. Progresses of research on vegetative storage proteins in woody plants(木本植物营养贮藏蛋白研究进展)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),18(4):445—450
- Tan F(谈锋),Pang YZ(庞永珍),Xiong NX(熊能湘),et al. 2000. Introduction, propagation and taxol's accumulation in leaves of *Taxus media*(北美红豆杉的引种繁殖和叶片中紫杉醇的积累)[J]. *J Southwest China Normal Univ(Nat Sci Edi)*(西南师范大学学报(自然科学版)),25(4):448—451
- Tian GZ(田国忠),Li HF(李怀方),Qiu WP(裘维蕃). 2001. Advances on research of plant peroxidases(植物过氧化物酶研究进展)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),19(4):332—344
- Wang ZM(王明祖),He SG(何生根),Yan X(杨暹). 2003. Change of polyamine oxidase activity during seed germination and growth of Kidney bean(菜豆种子萌发生长过程中多胺氧化酶和过氧化物酶的活性变化)[J]. *Agric Tech*(农业与技术),23(4):62—66
- Zhang P(张鹏),Wang F(王飞),Zhang LF(张列峰),et al. 2007. Study on endopeptidase isoenzymes and their characters in cucumber leaf development period(黄瓜叶片生长期间内肽酶活性和同工酶变化及其生化特性)[J]. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报),30(2):49—54
- Zhang ZX(张照喜),Yu H(喻泓),Du HT(杜化堂),et al. 2005. A Study on the relationship between stend iameter and the growth factors of branch of *Taxus media*(曼地亚红豆杉径枝生长关系研究)[J]. *Wuyi Sci J*(武夷科学),21:47—51
- Zhou HG(周厚高),Ning YF(宁云芬),Zhang SJ(张施君),et al. 2003. The physiological and biochemical changes in bulb development of *Lilium formolongi*(新铁炮百合生长发育过程的一些生理生化变化)[J]. *Guihaia*(广西植物),23(4):357—361

(上接第 845 页 Continue from page 845)