

# 不同施磷水平对喜树幼苗生长及喜树碱积累的影响

杨朗生, 蒲擎宇, 蹇凯

(四川农业大学, 四川 温江 611130)

**摘要:** 采用盆栽施肥的方法, 研究了不同施磷水平(对照  $0 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、低磷  $42 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、中磷  $84 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、高磷  $168 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ) 对喜树当年实生幼苗生长及次生代谢物喜树碱积累的影响。结果表明: 随着施磷水平的增加, 喜树幼苗的苗高及叶、茎、根的干物质量均增加, 且各施磷水平幼苗叶、茎、根的干物质量差异显著 ( $p < 0.05$ )。在不同磷素水平下, 幼苗叶、根、茎中的喜树碱含量均在低磷水平时出现最大值, 并且低磷水平与对照间喜树碱含量差异显著 ( $p < 0.05$ )。随着磷用量的增加, 喜树全株及叶、茎的喜树碱总量持续增加, 但喜树全株和叶在高磷与中磷水平间差异不显著。根中喜树碱总量在不同磷素水平差异显著, 在中磷水平最高。由结果可知: 磷可以促进喜树幼苗中喜树碱的合成, 适当的低磷胁迫可以增加喜树幼苗中喜树碱含量。培育喜树碱原料林时, 适宜的施磷水平应为中磷水平, 幼苗喜树碱总量主要取决于喜树生物量的积累。

**关键词:** 施磷; 喜树; 喜树碱; 含量; 积累

中图分类号: Q946.88

文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2015)02-0098-04

## Effects of Different Phosphorus-applying Levels on Seedling Growth and Camptothecin Accumulation in *Camptotheca acuminata* Seedlings

YANG Lang-sheng PU Qing-yu JIAN Kai

(Sichuan Agriculture University, Wenjiang 611130, China)

**Abstract:** A potted experiment with controlled fertilization supply was conducted to study the effects of different phosphorus-applying levels ( $P_0$ ,  $0 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ;  $P_L$ ,  $42 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ;  $P_M$ ,  $84 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ;  $P_H$ ,  $168 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ) on the growth of seedlings and camptothecin (CPT) accumulation in *C. acuminata* seedlings. The experiment results showed that the height and dry weight of *C. acuminata* seedlings would increase when phosphorus-applying level increased. Under different levels of applying phosphorus, the dry weight of leaf, shoot and root of *C. acuminata* seedlings was significantly different ( $p < 0.05$ ). The CPT content in leaf, shoot and root reached the highest level when phosphorus-applying level was  $P_L$ . Compared with  $P_0$ , the CPT content in  $P_L$  increased significantly. The CPT amount in the whole seedling, leaf and shoot of *C. acuminata* increased gradually with the increase of phosphorus. But when phosphorus-applying level was higher than  $P_M$ , the increase of CPT amount was insignificant. The CPT amount in root reached the highest level when phosphorus-applying level was  $P_M$ . According to the results studied, proper deficient phosphorus stress could significantly enhance CPT content in *C. acuminata* seedlings. With a main objective to establish a *C. acuminata* seedling plantation for producing CPT, proper phosphorus level was  $P_M$ . CPT amount in seedlings was mainly decided by the accumulation of biomass of *C. acuminata*.

**Key words:** Phosphorus fertilization, *Camptotheca acuminata*, Camptothecin, Content, Accumulation

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 四川农业大学 2009 年双支计划项目(34270002) 资助。

作者简介: 杨朗生(1960-), 男, 实验师, 主要从事植物培育研究。E-mail: 425926870@qq.com

喜树(*Camptotheca acuminata* Decaisne)为珙桐科(Nyssaceae)多年生落叶阔叶树,是我国特有树种。喜树的用途很广泛(王玲丽,2008),但最大的价值在于全株含有抗肿瘤作用的喜树碱。由于喜树碱抑制DNA拓扑异构酶I独特的抗癌机理(Hsiang Y H et al.,1989),它已逐渐成为一个抗癌药研究的重要领域。目前已有4种以喜树碱为前体合成的喜树碱衍生物CPT-11、TPT-9-AC及9-NC获得美国食品和药品管理局(FDA)批准用于临床治疗结肠癌、直肠癌和复发性卵巢癌(Greemers G J et al.,1996; Lorence A et al.,2004),同时还有其它衍生物正在进行临床试验。有研究(Liu Z et al.,1998)表明喜树幼嫩组织(如幼叶、幼枝)喜树碱含量较高,因此以收获幼嫩组织为目的的高密度集约化栽培,可作为喜树碱原料基地建设的一种模式。关于喜树幼苗中的喜树碱,国内有研究者测定了不同种源(王玲丽等,2005)喜树以及喜树各器官(王玲丽等,2005;谢国恩等,2009)中喜树碱的含量,刘文哲等(2004)研究了喜树碱在喜树幼枝各组织中的分布情况,光照(戴绍军等,2004;王洋等,2004)、水分(冯建灿等,2002)、土壤类型(马伟等,2007)等环境因素对喜树中喜树碱含量影响的研究也有报道。然而关于外源营养元素对喜树幼苗中喜树碱的积累研究尚未见报道。为此,本研究采用盆栽施肥的方法,研究外源营养元素(磷)对喜树幼苗生长及喜树碱积累的影响,旨在为喜树碱原料林建设和提高喜树碱产量提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试喜树种子于2009年秋季采自都江堰灵岩山天然野生喜树。以盆栽方式培育幼苗,具体方法如下:选用上口径为20 cm、下口径为15 cm、高17 cm的瓦盆,每盆装入等量的灭过菌的供试土壤(3 kg)。供试土壤为四川农业大学都江堰校区实验实习苗圃附近黄壤,其有机质含量为 $2.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,全氮、全磷和全钾含量分别为 $0.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,水解氮、有效磷和有效钾含量分别为 $30.43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $3.26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $46.26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,pH 5.74,田间持水量为26%。播种前用0.25%  $\text{KMnO}_4$ 溶液对种子消毒3 h,冲洗干净后在

室温下浸种24 h。2010年3月每盆播种3粒,待苗齐后间苗,每盆留健苗1株,育苗期间进行常规水分管理。

### 1.2 试验设计

试验于2010年3月~10月在四川农业大学都江堰校区塑料大棚中进行。采用施磷的单因素随机试验设计。

施磷处理共设对照( $P_0$ :  $0 \text{ g} \cdot \text{pot}^{-1}$ )、低磷( $P_L$ :  $0.14 \text{ g} \cdot \text{pot}^{-1}$ )、中磷( $P_M$ :  $0.28 \text{ g} \cdot \text{pot}^{-1}$ )和高磷( $P_H$ :  $0.56 \text{ g} \cdot \text{pot}^{-1}$ )4个水平,分别相当于 $0 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、 $42 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、 $84 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和 $168 \text{ kg P} \cdot \text{hm}^{-2}$ ,每个磷处理重复10盆。各处理的磷肥( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )分15次施入,施肥从5月初开始,持续到10月份,每月施肥3次,每次将相应的肥料溶解于150 ml水中,对照则浇水150 ml。施肥结束后(10月中旬)测定各处理喜树幼苗的生物量和喜树碱含量。

### 1.3 测定项目与方法

1.3.1 生长指标测定 生长指标测定项目包括苗高及各器官干重。10月中旬,用卷尺测定各处理的喜树苗高。然后从整株收获法采集各处理的喜树根、茎、叶,将根、茎、叶分别在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 下杀青15 min后于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干24 h,即得喜树各器官的样品,并立即称重。

1.3.2 喜树碱含量测定 将称重后各处理的样品粉碎,过40目筛,即得用于喜树碱含量测定的样品,喜树碱含量按照蒲尚饶等(2010)的方法测定。根据各器官的干重和喜树碱含量计算各器官的喜树碱的总量:各器官喜树碱总量(mg) = 器官干重(g) × 器官喜树碱含量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。根据各器官喜树碱总量计算整株幼苗喜树碱总量:整株幼苗喜树碱总量(mg) = 叶喜树碱总量(mg) + 茎喜树碱总量(mg) + 根喜树碱总量(mg)。

### 1.4 数据处理

采用SPSS 13.0软件对各施磷处理数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),选择LSD法进行差异显著性多重比较。采用Microsoft Excel 2003软件进行统计分析并绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 喜树中喜树碱的HPLC分析

喜树碱标准品及喜树叶、茎、根样品的HPLC色谱图见图1。

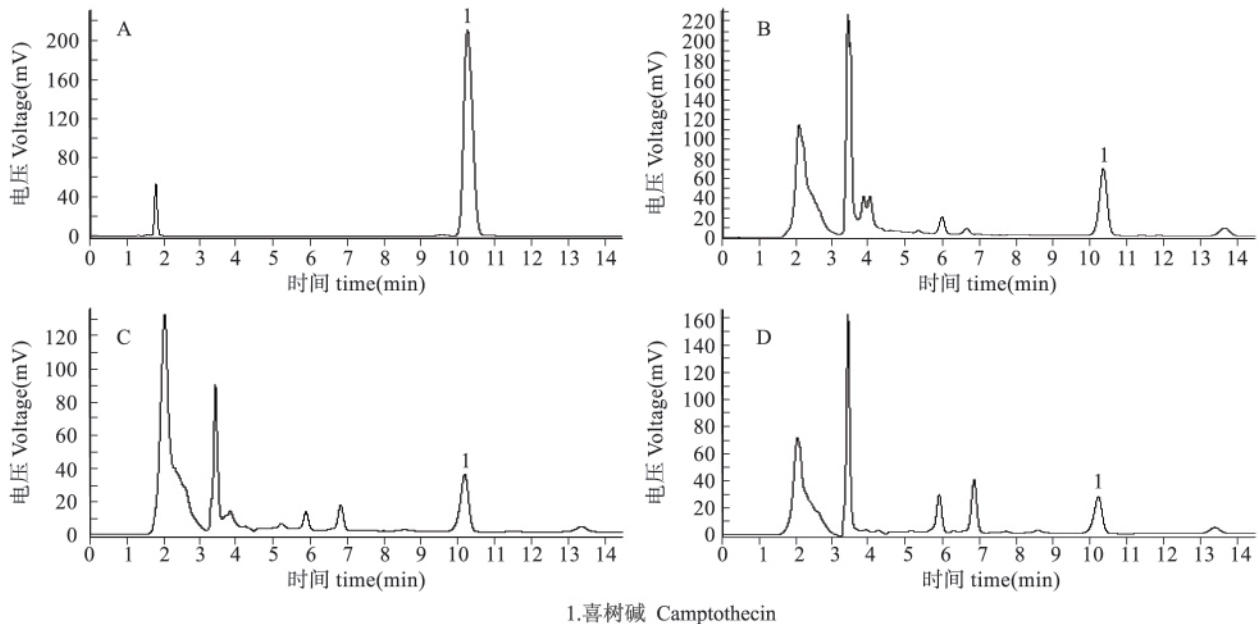


图1 喜树碱标准品(A)及喜树叶(B)、茎(C)、根(D)的HPLC图

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and leaf (B), shoot (C), root (D)

2.2 不同施磷水平对喜树幼苗生长的影响

由表1可以看出,随着施磷水平的增加,喜树幼苗的苗高及叶、茎、根的干物质质量均增加。在不同施磷水平,喜树幼苗叶、茎、根的干物质质量差异显著( $p < 0.05$ )。当施磷量由对照增加到中磷水平时,喜树苗高及各器官干物质质量增幅较大,低磷水平下喜

树苗高及叶、茎、根的干物质质量较对照高出9.3%~118.5%,中磷水平下喜树苗高及叶、茎、根的干物质质量较低磷水平高出11.1%~76.9%。当施磷量由中磷增加到高磷水平时,喜树苗高及各器官干物质质量增幅变小,高磷水平下喜树苗高及叶、茎、根的干物质质量较中磷水平高4.3%~30.9%。

表1 不同磷素水平下喜树幼苗的苗高及各器官干重

Tab.1 Height and dry weight of seedlings under different phosphorus levels (mean ± SD)

磷素水平 Phosphorus level	苗高 Height (cm)	叶生物量 Leaf biomass (g · plant <sup>-1</sup> )	茎生物量 Shoot biomass (g · plant <sup>-1</sup> )	根生物量 Root biomass (g · plant <sup>-1</sup> )
P <sub>0</sub>	31.5 ± 0.8 c	3.25 ± 0.10 d	2.96 ± 0.10 d	2.35 ± 0.10 d
P <sub>L</sub>	68.5 ± 2.1 b	5.36 ± 0.19 c	4.99 ± 0.18 c	2.54 ± 0.09 c
P <sub>M</sub>	76.0 ± 2.6 a	9.47 ± 0.38 b	7.54 ± 0.30 b	4.06 ± 0.16 b
P <sub>H</sub>	77.5 ± 3.1 a	12.21 ± 0.61 a	9.89 ± 0.49 a	5.10 ± 0.26 a

不同小写字母表示各处理间差异显著( $p < 0.05$ ) Significant difference at 0.05 level between treatments was shown by different small letters

2.3 不同施磷水平对喜树幼苗各器官喜树碱含量的影响

由表2可以看出,在不同磷素水平下,喜树叶中喜树碱含量差异显著( $p < 0.05$ ),且施磷处理的叶中喜树碱含量均高于对照;喜树根中喜树碱含量在低磷及中磷水平高于对照,在高磷水平低于对照,喜树碱含量在低磷水平与对照间差异显著;茎中喜树碱含量在低磷水平显著高于对照,在中磷及高磷水平低于对照。在各磷素水平下,喜树各器官中喜树碱含量由高到低的顺序为:叶 > 根 > 茎。幼苗叶、根、茎中的喜树碱含量均在低磷水平时出现最大值,分别为0.92%、0.62%、0.53%,当磷用量大于低磷

水平时,随着磷肥用量的增加,喜树各器官中喜树碱含量均下降。

表2 不同磷素水平下喜树幼苗各器官喜树碱含量

Tab.2 CPT content in different organs of *C. acuminata* under different phosphorus levels (mean ± SD)

磷素水平 Phosphorus level	喜树碱含量 CPT content (mg · g <sup>-1</sup> )		
	叶 Leaf	根 Root	茎 Shoot
P <sub>0</sub>	0.55 ± 0.039 d	0.43 ± 0.032 b	0.42 ± 0.025 b
P <sub>L</sub>	0.92 ± 0.047 a	0.62 ± 0.043 a	0.53 ± 0.037 a
P <sub>M</sub>	0.81 ± 0.049 b	0.56 ± 0.034 ab	0.38 ± 0.024 bc
P <sub>H</sub>	0.70 ± 0.043 c	0.38 ± 0.023 c	0.36 ± 0.025 c

不同小写字母表示各处理间差异显著( $p < 0.05$ ) Significant difference at 0.05 level between treatments was shown by different small letters

## 2.4 不同施磷水平对喜树幼苗各器官及全株的喜树碱总量影响

由表 3 可以看出,在各磷素水平下,喜树碱总量由高到低的顺序为:全株 > 叶 > 茎 > 根。随着磷用量的增加,喜树全株及叶、茎的喜树碱总量持续增加。喜树整株幼苗和叶在高磷水平下喜树碱总量最

高,但高磷水平与中磷水平间差异不显著,中磷、低磷水平及对照间喜树碱总量差异显著( $p < 0.05$ )。茎中喜树碱总量在高磷水平最高,各施磷处理均显著高于对照水平。根中喜树碱总量在不同磷素水平差异显著,在中磷水平最高。

表 3 不同磷素水平下喜树幼苗各器官及整株的喜树碱总量

Table 3 CPT amount in different organs and seedlings under different phosphorus levels (mean  $\pm$  SD)

磷素水平 Phosphorus level	喜树碱总量 CPT amount (mg)			
	叶 Leaf	茎 Shoot	根 Root	整株 Plant
P <sub>0</sub>	1.79 $\pm$ 0.13 c	1.24 $\pm$ 0.08 c	1.01 $\pm$ 0.08 d	4.04 $\pm$ 0.28 c
P <sub>L</sub>	4.93 $\pm$ 0.32 b	2.64 $\pm$ 0.18 b	1.57 $\pm$ 0.10 c	9.15 $\pm$ 0.73 b
P <sub>M</sub>	7.67 $\pm$ 0.58 a	2.87 $\pm$ 0.19 b	2.27 $\pm$ 0.17 a	12.81 $\pm$ 0.97 a
P <sub>H</sub>	8.55 $\pm$ 0.56 a	3.56 $\pm$ 0.27 a	1.94 $\pm$ 0.16 b	14.05 $\pm$ 0.98 a

不同小写字母表示各处理间差异显著( $p < 0.05$ ) Significant difference at 0.05 level between treatments was shown by different small letters

## 3 讨论

### 3.1 提取制备喜树碱的原料

喜树果实是喜树碱的传统提取部位,但由于产量低和采收困难,近年来许多喜树碱生产厂家以野生马比木(*Nothapodytes pittosporoides* (Oliv.) Sleum.) 根为原料提取制备喜树碱(蒲尚饶等,2010)。但是随着喜树碱的需求量增加,马比木野生资源储量必定急剧减少,喜树果实因产量和喜树碱含量限制(谢峻等,2007)将不能满足临床需求。喜树幼嫩组织喜树碱含量高,因此很有必要对喜树幼苗进行较为详尽的研究,保护野生资源和支持产业化发展。四川是喜树的适生地,有研究(张玉红,2000)表明四川生长的喜树果实中喜树碱含量高于其它省区,都江堰生长的喜树果实中喜树碱含量高达 0.12%,也有研究(王玲丽等,2005)比较了不同种源地喜树幼枝中喜树碱含量,发现来自成都的种源含量最高。因此,四川生长的喜树幼苗中喜树碱值得研究。我们的研究表明,在贫瘠的生境中,施加磷肥喜树幼苗叶片喜树碱含量可提高至 0.092%,而在营养丰富的生境中,叶片喜树碱含量可达到 0.122%,远高于果实中平均含量(约 0.065%),与马比木根中喜树碱含量(0.122%~0.126%)相当。可见,喜树幼苗是提取制备喜树碱的较好原料。

### 3.2 不同磷素水平对喜树幼苗喜树碱含量影响

营养元素是影响植物次生代谢物合成和积累的重要环境因子之一。对于营养元素与植物次生代谢物合成和积累的关系,已有的报道多研究组培植物。

有研究(Lanoué A et al.,2004; Dunlop D S et al.,1991)表明适当的增加磷的用量可以促进组培毛状根的生长及生物碱的积累。氮、磷、钾协同作用可以促进益母草生长及水苏碱和总生物碱的积累(张燕等,2007)。在本研究中,低磷处理的喜树幼苗中喜树碱含量显著高于对照组的幼苗,说明磷可以促进喜树幼苗中喜树碱的合成。但当磷用量高于低磷水平时,幼苗喜树碱含量与磷用量成负相关,说明适当的低磷水平可以增加喜树幼苗中喜树碱含量。这与我们研究氮素水平对喜树幼苗喜树碱含量影响的结果相似,孙世芹等(2008)的研究也表明适宜的供氮水平对于喜树幼苗叶片中喜树碱含量影响极为重要,适当的低氮胁迫能够显著地增加幼叶的喜树碱含量。

### 3.3 不同磷素水平对喜树幼苗喜树碱积累影响

目前普遍认为次生代谢物在植物体中主要功能是防御作用,防御就需要成本,需与其他功能如生长存在平衡关系。植物只有在其次生代谢物质所获得的防御收益大于其生长所获得的收益时才产生次生代谢物质(Rhoades D F,1979)。这也能解释喜树幼苗喜树碱积累与不同磷素水平处理的关系,当缺乏磷素时,幼苗生长受到抑制,喜树碱合成速度慢,幼苗中喜树碱总量低;当处于适当低磷胁迫(低磷水平)时,幼苗生长速度变快的同时需要合成一定喜树碱抵御病虫害等灾难,喜树碱合成速度快,幼苗中喜树碱含量变高,喜树碱总量增大;当处于营养丰富(高磷水平)时,合成的喜树碱只要能在一定程度上抵御灾害,喜树碱的合成速度便下降,喜树碱含量下

(下转第 14 页)

2 700 m 的坡底连绵成片分布到海拔3 800 m 的林线,在四川盆地西缘山地同座高山跨越海拔1 200 m 成片分布的岷江冷杉林,在世界山地森林中实属罕见。

研究区岷江冷杉相同径级的树高随着海拔的升高却逐渐变矮,各个海拔梯度的岷江冷杉树高与胸径的关系符合多项式回归方程;在海拔2 700 m、2 900 m、海拔3 100 m 和3 300 m 的岷江冷杉种群属于增长型的年龄结构,海拔3 600 m 岷江冷杉种群属于稳定型的年龄结构;岷江冷杉林剧烈的种间竞争发生在森林底层或下层,海拔2 700 m ~ 3 200 m 间岷江冷杉种群的主要竞争对象是华西箭竹,海拔3 200 m ~ 3 600 m 的范围的主要竞争对象是大叶金顶杜鹃和无柄杜鹃,影响岷江冷杉种群繁殖与更新;岷江冷杉种群常遭受病虫害和风灾与雪灾,影响

岷江冷杉种群生长发育和数量减小。

#### 参考文献:

- [1] 蒋有绪. 川西亚高山暗针叶林的群落特点及其分类原则[J]. 植物生态学与地植物学丛刊, 1963, 1(1): 42 ~ 50.
- [2] 管中天. 四川松杉植物地理[M]. 四川人民出版社, 1982.
- [3] 秦自生. 卧龙植被及资源植物[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1987.
- [4] 陈守常, 肖育贵. 冷杉林木腐朽程度探讨[J]. 四川林业科技, 1991, 12(2): 15 ~ 19.
- [5] 杨玉坡. 四川森林[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [6] 杨钦周. 四川树木分布[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1997.
- [7] 方精云. 探索中国山地植物多样性的分布规律[J]. 生物多样性, 2004, 12(1): 1 ~ 4.
- [8] 郑绍伟, 黎燕琼, 何飞, 等. 卧龙森林生态站林内外主要气象因子对比分析研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2006, 25(3): 210 ~ 214.
- [9] 戴绍军, 王洋, 阎秀峰, 等. 滤光膜对喜树幼苗叶片生长和喜树碱含量的影响[J]. 生态学报, 24(5): 869 ~ 875.
- [10] 王洋, 戴绍军, 阎秀峰. 光强对喜树幼苗叶片次生代谢产物喜树碱的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(6): 1118 ~ 1122.
- [11] 冯建灿, 张玉洁, 张秋娟, 等. 干旱胁迫与抗蒸腾剂对喜树几项生理指标及喜树碱含量的影响[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(2): 138 ~ 142.
- [12] 马伟, 戴绍军, 赵昕, 等. 不同土质对喜树幼苗生长和喜树碱质量分数及产量的影响[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(8): 19 ~ 22.
- [13] 蒲尚饶, 杨朗生, 蹇凯, 等. 马比木根中喜树碱含量的 HPLC 测定方法[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2934 ~ 2935.
- [14] 谢峻, 谈锋. 植物来源抗肿瘤药物研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(2): 285 ~ 289.
- [15] 张玉红. 喜树果实中喜树碱含量的产地差异及季节变化[J]. 东北林业大学学报, 2000, 30(6): 44 ~ 46.
- [16] Lanoue A, Michele B C, Dechaux C, et al. Comparison of growth properties, alkaloid production and water uptake of tow selected *Datura hairy root lines* [J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2004, 46: 185 ~ 192.
- [17] Dunlop D S, Curtis W R. 1991. Synergistic response of plant hairy-root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation [J]. Biotechnology Progress, 7(5): 434 ~ 438.
- [18] 张燕, 王文全, 杜世雄, 等. 氮、磷、钾对益母草生长及水苏碱和总生物碱影响的研究[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1881 ~ 1884.
- [19] 孙世芹, 阎秀峰. 氮素水平对喜树幼苗喜树碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 356 ~ 359.
- [20] Rhoades D F. Evolution of Plant Chemical Defense against Herbivory [J]. New York Press, 1979: 4 ~ 53.
- (上接第 101 页)
- 降,喜树碱总量增长缓慢。因此培育喜树碱原料林时,适宜的施磷水平应为中磷水平,即施磷量为 84 kg P·hm<sup>-2</sup>。在本研究中,低磷水平下喜树碱含量最高,但是喜树碱总量却随施磷水平的增加而升高,这说明喜树碱总量主要取决于喜树生物量的积累。