



图3 不同混交林中阿丁枫、火力楠、杉木冠径分布图

从图3可以看出,不同混交林中的细柄阿丁枫及其伴生树种的冠径随胸径的变化趋势基本一致,均随胸径的增大而增大,增长的幅度存在着明显的差异。火力楠作为细柄阿丁枫的伴生树种以及细柄阿丁枫作为杉木的伴生树种均是适宜的,它们都形成了较合理的树冠,为目的树种提供了较大的生长空间。

#### 4 结果与讨论

不同立地条件、保留密度对阿丁枫的胸径生长有着显著的影响,径阶分布基本上呈中间大、两头小的规律,细柄阿丁枫各径阶分布特点是中径木 > 小径木,大径木基本上缺失。当细柄阿丁枫混交林密度较小且立地条件较好时,阿丁枫直径生长良好,有利于培育大径材,提高乔木层生物量。

不同混交林中的细柄阿丁枫及其伴生树种的冠径随胸径的变化趋势基本一致,均随胸径的增大而增大,只是增长的幅度存在着明显的差异。火力楠作为细柄阿丁枫的伴生树种以及细柄阿丁枫作为杉木的伴生树种均是适宜的。

#### 参考文献

- [1] 俞新妥. 混交林营造原理及技术[M]. 北京:中国林业出版社,1989
- [2] 沈国舫,翟明普主编. 混交林研究[M]. 北京:中国林业出版社,1997
- [3] 陈存及,陈伙法主编. 阔叶树种栽培[M]. 北京:中国林业出版社,2000
- [4] 李振问,王国熙等. 细柄阿丁枫混交林的燃烧性研究[J]. 林业科技通讯,1997,23~25
- [5] 阮传成. 细柄阿丁枫栽培技术及应用研究[J]. 福建林学院学报,1996,16(2):151~155
- [6] 杨玉盛,林德喜,李振问等. 杉木细柄阿丁枫混交林根际土壤的研究[J]. 福建林学院学报,1997,17(1):11~15

## 三尖杉次生代谢物质组织培养研究进展

郭永俊

(福建明溪国有林场,365200)

**摘要** 三尖杉是我国特有的树种之一,其枝叶、树皮等提取的多种生物碱被临床证明是一种新型的抗癌药物,然而,三尖杉植物生长缓慢,自然资源有限,有效生物碱含量低,无法满足临床上日益增长的需要。通过植物组织细胞培养技术,以提高三尖杉次生代谢物质的含量,为进一步扩大培养生产抗癌药物提供理论依据。

**关键词** 三尖杉 植物组织培养技术 次生代谢物质 三尖杉酯碱

### 1 三尖杉及其次生代谢物质的药用价值和经济价值

三尖杉属(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f.)隶属于三尖杉科(*Cephalotaxaceae*),常绿乔木或灌木。三尖杉木材黄褐色,材质优良,心材与边材区别明显,纹理结构细密,坚韧富有弹性,是制作家具和雕刻艺术的

高级用材;树姿优美,为优良的庭园观赏树种;三尖杉除其木材可以供桥梁、建筑、舟船、家具等使用外,种子榨油可供制皂及油漆,果实入药有润肺、止咳,消积之效。

三尖杉也是我国特有的重要药原植物。研究发现,从三尖杉根、叶、枝、种子可以提取多种生物碱,对于癌症具有一定的疗效,已引起国内外化学界、药理学界和医学界等各类学科学者的关注。三尖杉所含的化学成分中的酯类生物碱具有抗肿瘤活性。广泛研究的是三尖杉酯碱(harringtonine)、异三尖杉酯碱(isoharringtonine)、脱氧三尖杉酯碱(deoxyharringtonine)和高三尖杉酯碱(homoharringtonine)。它们对动物转移性白血病 P-388、L-1210 有抑制作用。临床上三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱配合其它中药治疗各种类型白血病均有较好疗效,对白血病治疗缓解率达 82%。目前对非淋巴性白血病主要采取以三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱为主的联合化疗治疗方案,经多年临床证明,疗效显著;同时,三尖杉酯碱还可用于治疗黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、脑肿瘤等。因此,三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱被列入全世界 36 种抗癌药物之列,在国际市场上每公斤售价达 24 万美元。为开发三尖杉产业,现已有外商开始在中国投资。

三尖杉具如此高的经济价值,令世人瞩目。然而,三尖杉在全世界范围内自然资源贫乏,且三尖杉酯类碱含量极低,提取 1g 三尖杉酯类碱需 100~150kg 三尖杉干枝叶。因此,要提供临床需要的三尖杉酯类碱必须大量砍伐三尖杉。伐树生产三尖杉酯类碱的方法不仅会使三尖杉植物资源濒临灭绝,也根本无法满足人们对三尖杉酯类碱的需求。为解决三尖杉酯类碱的稳定供应问题,近十多年来,国内外学者围绕三尖杉的生物工程技术、三尖杉酯类碱的化学合成技术及生物合成技术等进行了许多研究工作,力图寻找各种可能的途径以增加三尖杉酯类碱来源,并取得了一定的进展。

## 2 植物次生代谢的组织(细胞)培养技术

植物组织和细胞培养以细胞全能性(Totipotency)为理论基础,它包括植物细胞的“形态全能性”(Morphological totipotency)和“化学全能性”(Chemical totipotency)两方面的概念,即植物体的任何一个细胞都包含有整株植物全部的遗传信息,在一定条件下具有发育成一个完整植株的能力。植物组织(细胞)培养,就是利用从植物体取下的部分组织或细胞(亦称之为外植体),在无菌条件下置于人工培养液,在一定的培养条件下(适当的温度、光照等)使其生长,以达到大量繁殖或者生产某些次生代谢物质的目的。

植物体内所含有的诸如药物、香料、色素等天然产物,并非是植物本身生长和存活所必不可少的代谢产物,而是一些被称之为旁路代谢物(byway metabolite),亦被称为剩余代谢物(excessive metabolite)的物质,直至 20 世纪 50 年代才被统一称之为次生代谢产物(secondary metabolite),这些次生代谢产物通常是一些化学结构复杂、由特殊遗传形式控制的物质,它们的合成与细胞分化有关。

### 2.1 影响植物组织(细胞)培养中次生代谢的因素

#### 2.1.1 培养中植物细胞特点对次生代谢的影响

植物细胞的培养特点是生长缓慢,合成次生代谢产物的能力低且不稳定。植物细胞大量培养的研究表明,次生代谢物的积累与培养细胞的分化程度之间存在正相关,愈伤组织的培养具有初步分化或部分分化的结构,可以积累较多的产物,但是它在形成连续生产方面却极为不利。而在生长迅速、高度分散的细胞悬浮培养系统中,细胞所处的环境既无极性也无梯度,虽然可以获得迅速增长的生物量,但只有在细胞生长的相对静止期才能积累较多产物。这些现象说明,慢速生长、分化或部分分化的组织或组织团块,才能积累较多的次生产物。

#### 2.1.2 细胞组系选择

要实现植物细胞次生代谢的大规模工业化生产,首要条件是提高次生代谢物质在细胞中的含量,可以通过细胞诱变和放射免疫测定法结合单细胞克隆技术,筛选次生代谢物合成能力稳定的高产细胞系加以解决。培养细胞种群的结构大小、核型、代谢行为不同,可能与培养的外植体有关,不过大部分变化是由培养行为产生的。通过将外植体放置到相对恶劣的理化环境中,可刺激细胞分裂和生长,结果在未损伤的植物中有胞间交流的移动。组织的不稳定引起培养细胞生长的不稳定,可在细胞悬浮培养中观察到这一变化。这种变化对培养的稳定性不利,但可能是基因多样化的来源。

#### 2.1.3 培养条件的优化

植物离体培养中,影响植物分化和再分化的因子,应从外因和内因两方面来考虑。外因即指植物细胞的营养条件和环境条件,内因即指植物的遗传性和生理状态。培养条件的优化包括培养基组成和培养条件,如温度、光照、通气等的优化。张俊莲等<sup>[18]</sup>在研究不同培养条件下椴子愈伤组织生长和椴子黄色素产生时发现,B5、MG-5 基本培养基有利于愈伤组织生长,M-9 基本培养基有利于黄色素的生物合成,在培养基中添加  $0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 和  $0 \sim 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  KT 对愈伤组织生长和黄色素产生都有促进作用,而 IBA、BA、ZT 的加入对两者都产生抑制作用。水杨酸(SA)、乙烯和茉莉酸类化合物(Jas)能够在高等植物的抗病反应中诱导植物抗病素(主要是萜类和异黄酮类化合物)的产生,在细胞工程中常作为诱导子促进植物细胞次生代谢物的产生。适当浓度的 SA 和 MJ(茉莉酸甲酯)能促进野葛(*pueraria lobata*)幼叶悬浮细胞葛根素的积累,如  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  SA 和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MJ 处理 8d,可使培养物的葛根素产量分别提高 12.61% 和 22.15%。尽管如此,各种浓度的 SA 和 MJ 对野葛细胞生物量作用不大,且易引起细胞褐化。遗传性状和生理状态等是影响细胞培养发生次生代谢的内在因素。90 余年来,科学工作者对许多植物种属进行了器官发生的研究,发现由于基因型的不同,形态建成能力差异很大。这种差异表现在种与种之间,同一个种的不同品种之间,纯种和杂种之间。影响植物器官发生的生理状态包括培养材料的生理年龄,培养材料的保存时间,继代培养次数等。

## 2.2 提高植物次生代谢方法

提高植物次生代谢的技术方法主要有以下几种。一是筛选优质细胞系:由于植物细胞合成次生代谢产物的能力是由细胞系决定的。因此,选择目标次生代谢产物含量高的植株为母本诱导建立细胞培养体系是提高次生代谢产物的前提。利用单细胞克隆或小聚集块克隆可以从中选择出天然产物含量高的细胞株。此外,利用物理化学因素对所培养的植物细胞进行诱变处理也可筛选出高产细胞株的变异体或突变体。二是调节、优化培养液和培养条件:培养液中包括碳源、氮源、大量元素、微量元素、维生素、pH 值、所添加的植物生长调节剂,培养条件包括温度、光照、生长时间等,这些均对目标次生代谢产物的生产起着重要作用。三是前体饲喂:在植物愈伤组织培养中,添加某些目标次生代谢产物生物合成的前体可以显著提高次生代谢产物的产量。四是添加诱导子:当植物细胞受到外界环境因素刺激时,都会产生防御性应答反应。通常把一切能够刺激植物代谢的影响因素均可称之为诱导子。通过添加诱导子能够快速、高度专一和选择性诱导植物细胞中的特定基因的表达,进而积累特定的次生代谢产物。五是基因工程与分子生物学手段的应用:利用基因工程和遗传工程技术进行体细胞杂交、外源基因的人工介导以及 DNA 重组技术修饰目的基因或相应的酶系统,可以创造出高产次生代谢产物细胞系。

## 3 三尖杉属植物研究现状

### 3.1 三尖杉属植物的形态特征和野生资源分布情况

三尖杉属隶属于三尖杉科。叶条形或条状披针形,交互对生或近对生,在侧枝上基部扭转而成两列,叶上面中脉凸起,下面有白色气孔带两条;其横切面在维管束与下表皮之间有一树脂道。球花单性异株,稀同株。雄球花有雄花 6~11 朵,聚生成头状,腋生,基部有少数螺旋状排列的苞片,雄蕊 4~16 枚,各具 2~4(通常为 3)个药室,花粉粒球形,无气囊;雌球花有长柄,生于小枝基部的苞片腋部,有数对交互对生的苞片,每苞片基部生 2 枚胚珠,仅 1 枚发育。种子核果球,全部包被于由珠托发育成的肉质假种皮中,基部有宿存苞片,外种皮质硬,内种皮薄膜质,有胚乳,子叶 2 片。染色体:  $X = 12$ 。三尖杉属共有 9 种,我国产 8 种 1 变种,另有 1 引种栽培变种。分布于东亚南部及中南半岛北部,即从印度东部、经缅甸北部、泰国北部、老挝北部、越南北部、中国至朝鲜半岛南端及日本,约东经  $92^{\circ}1' \sim 144^{\circ}$ ,北纬  $16^{\circ} \sim 44^{\circ}$ ,垂直分布在海拔 200m~3 700m,由东到西逐渐升高。

三尖杉属在我国分布于横断山脉以东,星散分布于亚热带至热带中低高度的山林地带。秦岭至大别山及长江以南的广阔地区,是该属植物地理分布中心。除日本粗榧外其它 8 种中国皆有分布,其中云南分布 7 种,四川 6 种,贵州、广西、江西各 5 种,广东、湖北各 4 种,甘肃、湖南、福建各 3 种,河南、浙江、安徽各 2 种,西藏、江苏、台湾、海南各 1 种。

三尖杉属植物自然繁殖更新十分困难,主要原因有两个:即植物本身的生物特性和人为破坏。在



度、pH 值、培养基(激素、C 源、N 源、诱导子)、悬浮培养的接种量、摇床转速等优化培养条件方面做了大量的研究工作,得到了含有 4 种具有药理活性的酯类生物碱的细胞系。所培养的悬浮细胞合成有效生物碱的能力比固体培养细胞高出 1 倍以上。在三尖杉悬浮细胞培养过程中,添加了前体物质酪氨酸和苯丙氨酸也不同程度的提高了有效酯类碱的含量。杜道林、符木均等研究海南粗榧的细胞培养,顺利诱导出愈伤组织并找到愈伤组织增殖的最佳培养基。

近年来,三尖杉酯类碱的研究取得了新的进展。一是毛根状培养:利用发根农杆菌进行三尖杉的基因转移,并通过生化分析等证明其在细胞中得以表达,对提高三尖杉酯碱含量开辟了新途径。二是微囊化植物细胞培养:将细胞、蛋白质等大分子物质截留在微囊中,而培养基的营养成分以及代谢产物等小分子物质可以通过微囊膜进行物质传递,现在微囊化技术已用于三尖杉悬浮细胞的表面固定。三是采用两步培养法:白雪芳等在三尖杉细胞培养过程中,发现三尖杉培养细胞在 MS 培养基中加入  $KT1.0mg \cdot L^{-1}$ 、 $NAA3.0mg \cdot L^{-1}$  时有利于细胞的生长,而在 6,7-V 基本培养基中加入同量的激素则有利于三尖杉酯碱的产生。

#### 4 小结

综上所述,通过运用植物组织细胞培养技术对三尖杉愈伤组织的诱导,建立一套愈伤组织培养体系和悬浮细胞体系。通过该体系的建立以达到对三尖杉酯碱次生代谢的调控,从而为工厂化生产三尖杉酯碱次生代谢物质提供理论基础和技术支持,无疑将推动医学进步和带来巨大的经济价值,同时也必将造福于整个人类社会。

#### 参考文献

- [1] 汪忠健. 黄山地区红豆杉三尖杉树种的调查[J]. 安徽林业科技, 2004, 1: 3 ~ 5.
- [2] 郭文杰, 鲁华, 林勇. 三尖杉的资源利用与开发[J]. 亚热带植物通讯, 1998, 27(1): 22 ~ 26.
- [3] 卢大用, 曹静懿. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的生物活性及临床应用[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(5): 70 ~ 73.
- [4] 孙震晓, 马清温. 抗癌植物药及其植物组织培养研究进展[J]. 生物学通报, 2000, 35(8): 11 ~ 12.
- [5] Westgate PJ, Curtis WR, Emery AH, et al. Approrimation of conunuous growth of *Cephalotaxus haringtonia* plant cell cultures using fed batch operation. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 38(3): 241 ~ 246.
- [6] Yeomen MM, Mirdzybrodzka MB, Lindsey K, et al. Fortuntine, Ahomoerythrina Alkaloid from *Cephalotaxua fortunel* Hook. f. *Plant cell cultures*. New York: Springer, 1980: 327 ~ 343.
- [7] 白雪芳, 杜昱光. 抗肿瘤药物——三尖杉酯类碱的开发研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1998, (1): 26 ~ 28.
- [8] 吴承卫, 郭济贤. 三尖杉及其生物碱类成分的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 1993, 20(6): 321 ~ 325.
- [9] 惠月明, 胡月红. 三尖杉组织培养的初步研究[J]. 中草药, 1989, 20(1): 3135.
- [10] 周俊, 谭宁华. 中国植物化学的回顾与展望[J]. 化学通报, 1999, (12): 21 ~ 24.
- [11] 傅经国, 吴鸣建. 植物组织(细胞)培养在中药有效成分合成中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2004, 3(2): 1056 ~ 1061.
- [12] 任志华, 李玲. 植物细胞培养技术提高次生代谢物产量的方法(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 64 ~ 67.
- [13] Liu H L, et al. Cell cultures of *Poeraria lobata* (Willd.): growth and production of isoflavones and puerarin [J]. *South Africa Journal of Botany*, 2002, 68: 1 ~ 3.
- [14] Yeoman M M, et al. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cell [J]. *New Phytol*, 1996, (134): 553 ~ 563.
- [15] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 37 ~ 72.
- [16] 张春荣. 水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利对野葛细胞悬浮培养生产葛根素的影响[J]. 植物资源与环

- 境学报,2003,12(1):56~57.
- [17] 崔堂兵,郭勇,林炜铁.提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法[J].植物生理学通讯,2001,37(3):479~482.
- [18] 郑万钧,傅立国.中国植物志(第七卷)[M].科学出版社,北京:1978:426~440.
- [19] 周秀佳,胡之璧,黄炼栋,等.中国三尖杉属植物资源研究[J].湖北农学院学报,1997,17(2):100~103.
- [20] 吴承卫,郭济贤.三尖杉及其生物碱类成分的研究进展[J].国外医学药学分册,1993,20(6):321~325.
- [21] 梅文莉,吴娇,戴好富,等.三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展[J].中草药,2006,37(3):452~458.
- [22] Delefel NE, *Phytochemistry*, 1980, 19(3):403~408.
- [23] 胡之璧,周秀佳,郭济贤.三尖杉细胞中抗癌活性成分的研究[J].植物学报,1995,37(9):417~929.
- [24] 白雪芳,卜宗式,王靖媚.三尖杉愈伤组织的培养及三尖杉醋类碱的产生.第六届生化工程会议论文集,1995.
- [25] 胡之璧,周吉燕.不同培养方式对三尖杉培养细胞中生物碱组成和含量的影响[J].上海中医药大学学报.1999,13(1):60~61.
- [26] 杜道林,符木均.海南粗榧愈伤组织的诱导和培养[J].植物生理学通讯.2004,40(1):34~36.
- [27] Mc Ganana G. Mugnier J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Arhizogenes*. *Plant Cell Reports*. 1988, (7):9~12.
- [28] 虞星炬,解玉冰,马小军.生物微胶囊技术的研究进展[C].第七届生化工程会议论文集,1996:11~15.
- [29] 白雪芳,卜宗式,王靖拥.三尖杉愈伤组织的培养及三尖杉酯类碱的产生[J].第六届生化工程会议论文集,1995.

## 森林土壤有机质与氮素供应研究

李文宣

(福建省三明市三元区城东林业站,365001)

**摘要** 对森林土壤有机质与氮素供应状况进行分析,旨在为提高土壤有机质含量与增强氮素供应能力,提高林分的生产力提供科学理论依据。试验结果表明,提高土壤肥力,应从提高土壤有机质含量、调节有机质的积累与分解入手。人工杉木林连栽引起土壤地力衰退,建议营造阔叶树种,特别是落叶阔叶树种及豆科或非豆科固氮树种,其枯枝落叶等凋落物回归地表有利于土壤有机质的富集,是提高土壤有机质的最有效途径。

**关键词** 森林土壤 有机质 氮素供应

氮素是蛋白质的基本成分,高等植物组织平均含氮素 2%~4%。植物从土壤吸收的养分中以氮素最多。当土壤缺氮时,植物碳素同化能力降低,生长受抑,并提前衰老。充足的氮素还可提高植物对磷、钾、钙的吸收,但过多的氮素会降低植物的抗逆性。因此,土壤的氮素供应状况,对于林木生长至关重要。研究土壤氮素供应,对林业生产具有重要意义。众所周知,土壤的氮素供应,决定于土壤有机质的积累与分