

## 中国境内东北红豆杉天然群体紫杉醇含量变异规律

程广有<sup>1</sup> 高峰<sup>2</sup> 葛春华<sup>2</sup> 唐晓杰<sup>1</sup>

(1 北华大学林学院 2 吉林省永吉县林业局)

**摘要:**利用高效液相色谱仪(HPLC)检测了中国境内东北红豆杉天然群体和同一群体内不同单株的紫杉醇含量,以及不同树龄或不同季节的紫杉醇含量变化.结果表明,不同群体之间紫杉醇含量存在显著差异,群体间差异高达2.7倍;群体内个体间紫杉醇含量的变异与群体间相当,同一群体(汪清)内不同单株之间紫杉醇含量差异高达4.3倍.说明紫杉醇含量变异来自于群体间和群体内,其变异组成是群体间为84.6%,个体间为15.0%,并且东北红豆杉紫杉醇含量的广义遗传力( $H^2$ )为82%.因此,群体选择或单株选择可望获得较大的遗传增益.同时,紫杉醇含量随着树龄的增大而升高;在生长旺季植株内紫杉醇含量较低,进入休眠期含量较高.紫杉醇含量与生长量、积温、无霜期、降雨呈负相关(-0.646 8、-0.479 6、-0.240 5、-0.119 2),与针叶长度显著正相关(0.717 7),与经度和纬度正相关(0.277 8和0.332 1).随着纬度升高,生长量降低,紫杉醇含量呈现增加的趋势.

**关键词:**东北红豆杉,天然群体,紫杉醇变异

**中图分类号:**S791.229 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2005)04-0007-05

CHENG Guang-you<sup>1</sup>; GAO Feng<sup>2</sup>; GE Chun-hua<sup>2</sup>; TANG Xiao-jie<sup>1</sup>. **Variation regularity of taxol content in natural populations of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. in China.** *Journal of Beijing Forestry University* (2005)27(4)7-11[Ch, 19 ref.]

<sup>1</sup> Forestry College, Beihua University, Jilin, 132013, P.R.China;

<sup>2</sup> Forestry Bureau of Yongji County of Jilin Province, 132200, P.R.China.

Taxol contents in plants among different natural populations and single-plants within the same population of *Taxus cuspidata* in northeast China were examined by means of HPLC. The results are as follows: there is a significant difference in taxol content in plants among different populations, single plants within the same population, and trees at different ages and in different seasons. Taxol content in Daxinggou population is 40.97  $\mu\text{g/g}$  which is 2.7 fold as high as that of Helong population. There also exists significant difference in taxol content among plants in a population. The highest taxol content in a plant of Wangqing population is 47.9  $\mu\text{g/g}$ , which is 4.3 times that of the lowest one, indicating that the variance of taxol content results from inside or among populations. The variance of taxol content among populations is 84.6%, and that of among individuals is 15.0%. The broad heritability ( $H^2$ ) of taxol content is 82%. It is possible to get higher genetic gain of taxol if selecting stand or single-plant. The older the tree, the more taxol in plant. Taxol content in a plant is lower in growing seasons and higher in dormant seasons. There is a negative correlation between taxol content in plants and the growth, accumulated temperature, frostless period and amount of rainfall (-0.646 8, -0.479 6, -0.240 5 and -0.119 2), and a positive one between taxol content in plants and needle length of branches, longitude and latitude (0.717 7, 0.277 8 and 0.332 1). The higher the latitude, the higher taxol content and the slower growth.

**Key words** *Taxus cuspidata*, natural population, variation of taxol

收稿日期:2004-05-24

<http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目:国家自然科学基金项目(3027110).

第一作者:程广有,博士,教授.主要研究方向:林木遗传育种.电话:0432-4676839 Email:cgy6868@sina.com 地址:132013 吉林省吉林市北华大学林学院林学系.

东北红豆杉(*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.)为红豆杉科红豆杉属常绿乔木。在我国境内,东北红豆杉天然群体分布于东北三省,主要分布于吉林省境内的长白山脉。从植株中提取的紫杉醇(taxol)具有广谱的抗肿瘤活性,被誉为抗癌药物的今日之星<sup>[1,2]</sup>。据不完全统计,全世界每年需要250 kg紫杉醇用于癌症治疗。尽管紫杉醇的合成<sup>[3-5]</sup>取得了重大进展,细胞培养<sup>[6-13]</sup>与真菌发酵<sup>[14-16]</sup>可以生产紫杉醇,但是,由于紫杉醇合成步骤复杂,细胞培养与真菌发酵产量低,都未能商业化生产。因此,增加紫杉醇产量、缓解目前供不应求矛盾的最有效的途径,仍然是选育和繁殖高紫杉醇含量的红豆杉植株。东北红豆杉植株中,紫杉醇及其前体物质含量较高<sup>[17]</sup>。东北红豆杉天然群体处于自然生长状态,蕴藏着丰富的遗传变异,具有很大的改良潜力。为了有效地进行东北红豆杉遗传改良,首先要掌握紫杉醇含量的变异规律。本论文就中国境内东北红豆杉天然群体紫杉醇含量变异规律,及其与生长量、生态因子之间的关系进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源与取样方法

材料来源:在全分布区范围内取样,试验材料分别取自吉林省敦化林业局、汪清林业局、大兴沟林业局、安图林业局、和龙林业局、三岔子林业局,辽宁省本溪县林业局,黑龙江省穆稜林业局和吉林省吉林市(北华大学院内)。取样地点的自然状况见表1。

表1 取样地点的自然状况  
TABLE 1 Natural status of sampling site

地点	东经	北纬	海拔/m	积温/℃	无霜期/d	降雨/mm
敦化	127°35'	43°09'	800	2 565.1	95	621.4
汪清	129°40'	43°21'	800	2 835.5	118	547.2
三岔子	126°45'	42°06'	970	3 090.3	115	856.5
安图	128°51'	43°08'	1 154	2 482.1	112	669.7
和龙	128°42'	42°23'	800	2 904.8	120	517.5
大兴沟	129°31'	43°34'	750	2 764.3	114	553.1
本溪	124°05'	41°17'	1 000	3 205.6	145	798.0
穆稜	130°17'	44°12'	963	2 743.7	111	546.0
吉林市	126°36'	43°53'	284	3 141.5	135	674.2

注:积温是指日平均温度 $\geq 5^{\circ}\text{C}$ , 20 a 平均值。

取样方法:①群体间:每个群体选取树龄相近(20~30 a)的东北红豆杉10株,剥取韧皮部,在40℃条件下烘干、粉碎(下同),待测。②群体内个体间:在汪清林业局东北红豆杉林分内确定树龄相近(20~30 a)的10个单株,分别剥取韧皮部。③树龄间:在汪清群体内选定胸径不同的6个单株,分别剥取韧皮部,采伐后计数年轮。④季节间:在北华大学林学院内(吉林市)选定1株树龄约30 a东北红豆

杉植株,分别于2、4、6、8、10月份中旬,从树干上剥取韧皮部2~5 g。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 紫杉醇含量检测方法

紫杉醇检测方法参照高山林<sup>[17]</sup>和Xu<sup>[18,19]</sup>文中方法。

仪器:岛津高效液相色谱仪,Shimadzu SCL-6A系统控制器,SPD-6AV紫外检测器,C-R4A数据处理机,LC-6A高压泵,SIL-6A自动进样器和自动资料记录仪。

标准品:紫杉醇标准品由北京生物制品有限公司提供。

色谱条件:采用C<sub>18</sub> 5 μm柱,流动相:V(甲醇):V(水)=65:35,流速0.6 mL/min,检测器波长254 nm。

标准曲线:称紫杉醇标准品1 mg,溶解在1 mL乙氰中,配成1 mg/mL标准溶液。吸取该标准液0.3 mL,加入乙氰0.7 mL配成0.3 mg/mL标准液。吸取浓度为1 mg/mL标准液0.1 mL,加入乙氰0.9 mL配成0.1 mg/mL标准液。按此方法逐级稀释,依次配成0.3、0.1、0.03、0.01、0.003 mg/mL等浓度标准溶液,各种浓度的标准液分别进样10 μL,测定峰面积,求得紫杉醇浓度(X)与峰面积(Y)的直线回归方程为 $Y = 0.0034 + 0.8056 \times 10^{-6} X$ ,  $R = 0.9994$  ( $n = 6$ )。

样品制备:各样品干燥、粉碎成细粉(100目)后分别称0.5 g,置于研钵中,加入等体积的甲醇和二氯甲烷混合溶剂研磨5~10 min,然后倒入100 mL三角瓶中浸泡24 h,溶剂量50~80 mL。次日超声波震荡提取30 min,提取液经中华1号滤纸过滤,残渣用甲醇冲洗3次,合并滤液,30℃下减压浓缩至干,提取物用水和二氯甲烷溶解,剧烈震荡2 min,静止分层,取二氯甲烷层用活性炭1~2 g脱色,滤液于25℃下减压干燥,用乙氰1 mL溶解,0.45 μm微孔滤膜过滤,供HPLC测定。

样品测定:各样品制备液在上述色谱条件下进行测定,3次重复,经数据处理机计算出各样品中紫杉醇含量。

#### 1.2.2 生长量调查

在上述群体内对检测紫杉醇的植株进行生长量调查,调查内容有主枝、侧枝1~3年的生长量,针叶长度和宽度。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫杉醇含量变异

#### 2.1.1 紫杉醇含量与树龄的关系

不同树龄的东北红豆杉中,紫杉醇含量不同,变

异趋势是随着树龄的增大紫杉醇含量升高. 8年生时可以检测到紫杉醇含量,但是含量很低,在干燥的树皮中仅含紫杉醇 6.8  $\mu\text{g/g}$ (图 1),而 56 年生的东北红豆杉树皮内紫杉醇含量为 46.5  $\mu\text{g/g}$ . 树龄在 23 年生以前,植株内紫杉醇含量较低,虽然增长缓慢,却近似直线上升,平均每年紫杉醇含量约增加 0.7  $\mu\text{g/g}$ ;树龄在 23~34 年期间,紫杉醇含量增加缓慢;34 年生以后,紫杉醇含量与树龄的曲线斜率加大,紫杉醇含量增长迅速,平均每年紫杉醇含量约增加 1.3  $\mu\text{g/g}$ .

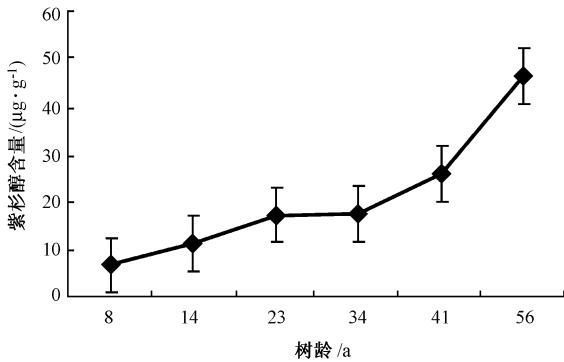


图 1 紫杉醇含量与树龄的关系

FIGURE 1 Relationship between taxol content and age of tree

### 2.1.2 紫杉醇含量与季节的关系

同一东北红豆杉植株在不同生长季节,紫杉醇含量不同,如图 2 所示. 经测定,在植株生长旺季,紫杉醇含量较低,而在东北红豆杉进入休眠期,紫杉醇含量显著增高. 4—8 月份是东北红豆杉的生长季节,6 月份温度较高、降雨偏多,生长较快,紫杉醇含量最低,只有 12.1  $\mu\text{g/g}$ ;接近停止生长的 8 月份,紫杉醇含量有所增加,达到 21.0  $\mu\text{g/g}$ ;10 月份停止生长时,紫杉醇含量较高,为 25.5  $\mu\text{g/g}$ ;在休眠期的 2 月份,紫杉醇含量达最高,为 47.9  $\mu\text{g/g}$ ;3 月下旬树液开始流动,4 月份新梢开始伸长生长,紫杉醇含量随之降低,4 月份紫杉醇含量为 28.6  $\mu\text{g/g}$ . 说明植株生长停止时,体内次生代谢活动并未停止,物质转化过程仍在进行.

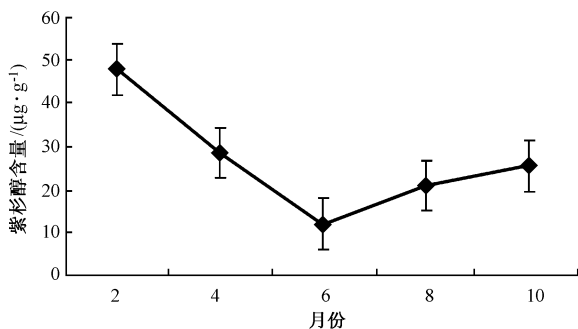


图 2 紫杉醇含量的季节变化

FIGURE 2 Variation of taxol content in different seasons

### 2.1.3 紫杉醇含量的群体间变异

在分析东北红豆杉不同群体之间紫杉醇含量变异时,为了克服紫杉醇含量的年龄效应,取样时选取胸径和树高相同的单株,取样季节和部位相同. 测定结果表明,不同群体之间紫杉醇含量存在极显著差异,紫杉醇含量群体间变异幅度为 2.7 倍,其中大兴沟群体的紫杉醇含量最高,达 40.97  $\mu\text{g/g}$ (表 2). 8 个群体紫杉醇含量由高到低的顺序依次是:大兴沟 > 安图 > 敦化 > 汪清 > 本溪 > 三岔子 > 穆棱 > 和龙. 本溪和三岔子两地积温较高,无霜期较长,这 2 个群体的紫杉醇含量却很低;大兴沟纬度和海拔较高,有效积温低,无霜期短,该群体的紫杉醇含量却高出本溪的 1.9 倍.

表 2 各群体紫杉醇含量的变异参数  
TABLE 2 Parameter of variation of taxol content in *T. cuspidata* populations

群体	紫杉醇平均含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	显著性	s	$\sigma$	CV/%
大兴沟	40.97	a	11.24	11.05	27.40
安图	34.28	b	11.75	11.55	34.30
敦化	24.92	c	12.00	11.80	48.15
汪清	24.16	c	11.86	12.07	49.11
本溪	21.29	d	9.52	9.36	44.72
三岔子	20.56	d	9.05	8.90	44.02
穆棱	18.30	e	4.81	4.73	26.29
和龙	15.44	f	5.86	5.76	37.95

### 2.1.4 紫杉醇含量的个体间变异

同一群体内,不同个体之间紫杉醇含量存在较大变异. 测定汪清群体的 10 个单株,结果是单株最高含量为 47.9  $\mu\text{g/g}$ ,最低含量为 11.1  $\mu\text{g/g}$ ,最高含量是最低含量的 4.3 倍,如图 3 所示. 个体之间紫杉醇含量差异很大,表明通过选择可以获得高紫杉醇含量的优良单株.

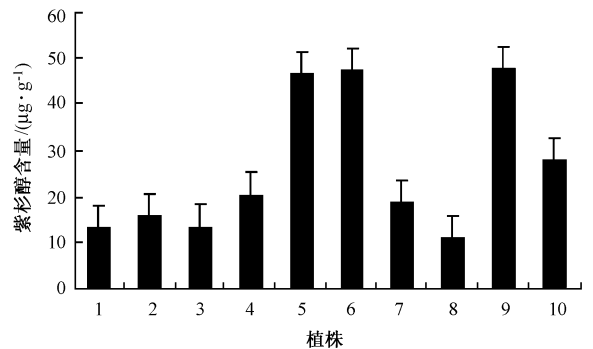


图 3 群体内紫杉醇含量的个体变异

FIGURE 3 Variation of taxol content among different plants in a population

### 2.1.5 紫杉醇含量的变异组成

东北红豆杉天然群体紫杉醇含量变异来源于群体间与群体内个体间,在总变异中群体间变异为

84.6%, 个体间变异为 15.0%(表 3). 进一步分析获得东北红豆杉紫杉醇含量的广义遗传力( $H^2$ )为 82%, 遗传力较高. 由于遗传力与遗传增益呈正相关的关系, 说明在群体间进行选择可以获得较大的遗传增益.

表 3 东北红豆杉紫杉醇含量变异组成

变异来源	平方和	变异组成/%
群体间	590.200 0	84.6
群体内个体	104.300 0	15.0
误差	2.404 0	0.4
总计	696.904 0	

## 2.2 紫杉醇含量与生长量的关系

相关分析表明, 紫杉醇含量与生长量之间呈负相关. 紫杉醇含量与主枝长度的相关系数为  $-0.646 8$ , 与侧枝长度的相关系数为  $-0.598 0$ , 虽未达到 0.05 显著水平, 却分别达到了 0.08 和 0.1 显著水平, 表明紫杉醇含量与生长量之间, 存在较显著的负相关. 在选择高紫杉醇含量的个体时, 其生长量可能会降低. 因此, 在选择高紫杉醇含量个体的同时, 要兼顾生物量大小, 以便达到单株或单位面积紫杉醇产量较高的最终目的. 安图、敦化、汪清、穆稜、和龙等群体, 主枝年生长量基本相同, 紫杉醇含量却差异很大(图 4). 安图群体紫杉醇含量为  $34.28 \mu\text{g/g}$ , 是和龙群体( $15.44 \mu\text{g/g}$ )的 2.2 倍, 而两个群体生长量接近. 这些现象说明, 紫杉醇含量与生长量存在一定程度的负相关, 但不同群体间植株生长量变异幅度较小, 紫杉醇含量变异幅度却很大. 这为选育紫杉醇含量高并且生长较快的优树提供了可能性. 紫杉醇含量与针叶形态的相关性表现不一, 与主枝叶长正相关, 相关系数为  $0.590 9$ ; 与侧枝叶长显著的正相关, 相关系数为  $0.717 7$ , 这种相关性为间接选择提供了依据.

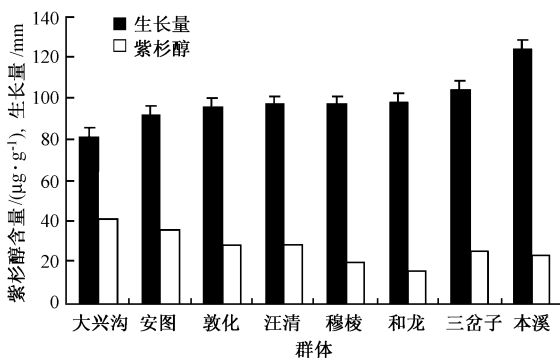


图 4 紫杉醇含量与枝条生长量的关系

FIGURE 4 Control relationship between taxol content and branch growth

## 2.3 紫杉醇含量与生态因子的关系

紫杉醇含量与经度和纬度呈正相关, 但未达到显著水平, 相关系数分别为  $0.277 8$  和  $0.332 1$ ; 与有

效积温、无霜期、降雨负相关, 相关系数分别为  $-0.479 6$ 、 $-0.240 5$ 、 $-0.119 2$ (表 4). 表明随着纬度的升高, 有效积温降低, 紫杉醇含量有增加的趋势, 这一变异趋势与生长量相反. 紫杉醇含量与海拔高度呈弱相关( $R=-0.028 7$ ).

表 4 紫杉醇含量与生态因子的相关性

	经度	纬度	海拔	积温	无霜期	降雨
紫杉醇含量	0.277 8	0.332 1	-0.028 7	-0.479 6	-0.240 5	-0.119 2
显著性	0.505 2	0.421 6	0.946 2	0.229 1	0.566 1	0.778 6

## 3 结 论

1) 随着东北红豆杉树龄的增大, 紫杉醇含量升高. 在选择优树时应该注意树龄对紫杉醇含量的影响, 在同龄林或树龄相近的群体内选择优树, 才能获得预期的结果. 紫杉醇含量因生长季节不同而异, 在休眠期的 2 月份, 紫杉醇含量达最高( $47.9 \mu\text{g/g}$ ). 种源选择或优树选择时, 不同群体之间或不同单株之间紫杉醇含量的检测时期应该一致. 东北红豆杉群体之间紫杉醇含量存在显著差异, 变异幅度为 2.7 倍. 群体内单株间紫杉醇含量的变异幅度与群体间相当, 在同一群体内单株最高含量是最低的 4.3 倍. 说明紫杉醇含量变异来自于群体间和群体内, 其变异组成群体间为 84.6%, 个体间为 15.0%. 并且东北红豆杉紫杉醇含量的广义遗传力( $H^2$ )为 82%. 因此, 群体选择或单株选择可望获得较大遗传增益.

2) 紫杉醇含量与东北红豆杉生长量之间, 存在较显著的负相关(相关系数为  $-0.646 8$ ). 在选择高紫杉醇含量的群体或个体时, 可能会降低植株的生物量. 为了实现紫杉醇产量的增加, 在进行优树选择时要兼顾紫杉醇含量与生长量二者的最佳组合, 即二者的乘积(或乘积和)最大时, 才能获得单株或单位面积紫杉醇的最高产量. 与侧枝叶长显著正相关( $0.717 7$ ), 这一相关性为间接选择提供了理论依据.

3) 东北红豆杉紫杉醇含量与积温、无霜期、降雨呈负相关( $-0.479 6$ 、 $-0.240 5$ 、 $-0.119 2$ ), 与经度和纬度正相关( $0.277 8$  和  $0.332 1$ ). 随着纬度升高, 生长量降低, 紫杉醇含量呈增加的趋势. 这主要是积温和降雨较高时促进了植株生长, 却降低了紫杉醇含量的缘故.

## 参 考 文 献

- [1] WANG F, CAO Y, LIU H Y, et al. Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2003, 5(2): 121-129.

- [2] STRELKOVA M A, KIRILLOVA N V. Anti-tumour activity of extracts from biomass of *Taxus baccata* L. cell culture[J]. *Rastitel'nye Resursy*, 2002, 38(3): 70-77.
- [3] NICOLAOU K C, YANG Z, LIU J J, et al. Total synthesis of taxol[J]. *Nature*, 1994, 367: 630-634.
- [4] WALKER K, CROTEAU R. Taxol biosynthetic genes [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(1): 1-7.
- [5] EWALD D, STAUBER T, ZOCHER R. Evaluation and selection of *Taxus baccata* L. clones according to their root growth capacity as a potential source of enzymes for taxol biosynthesis [J]. *Silvae Genetica*, 2002, 51(4): 133-136.
- [6] KETCHUM R E B, RITHNER C D, QIU D Y, et al. Taxus metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus media* cell cultures [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 901-909.
- [7] ZHONG J J. Plant cell culture for production of paclitaxel and other toxins[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94(6): 591-599.
- [8] ZHANG C H, WU J Y, HE G Y. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(4): 396-402.
- [9] URASBAKHTINA N A, MARDAMSHIN A G. Taxol contents in callus tissue from annual needles and shoots of *Taxus baccata* L. [J]. *Rastitel'nye Resursy*, 2001, 37(2): 96-100.
- [10] YU L J, LAN W Z, QIN W M, et al. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(2): 207-210.
- [11] YUAN Y J, MA Z Y, WU J C, et al. Taxol-induced apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(8): 615-618.
- [12] NAVIA O A, GARDEN H, CUSIDO R M, et al. Taxol(R) and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(1): 97-102.
- [13] FORNALE S, DEGLI E D, NAVIA O A, et al. Taxol transport in *Taxus baccata* cell suspension cultures [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40(1): 81-88, 79.
- [14] STIERLE A, STRODLE G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [15] YUAN Y J, LI C, HU Z D, et al. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(2): 193-198.
- [16] WAN B, LI A M, WANG X L, et al. Separation of a fungus producing taxol [J]. *Science in China Series C Life Sciences*, 2001, 44(2): 156.
- [17] 高山林, 朱丹妮, 周荣汉, 等. 东亚和北美产红豆杉属七种植物中紫杉醇及短叶醇的含量 [J]. 中国药科大学学报, 1995, 26(1): 8-10.  
GAO S L, ZHU D N, ZHOU R H, et al. Content of the taxol and brevifoliol in 7 species of *Taxus* L. from east Asia and north America [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 1995, 26(1): 8-10.
- [18] XU L X, LIU A R. Determination of taxol in the extract of *Taxus chinensis* by reversed phase HPLC [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1989, 24(7): 552.
- [19] XU L X, LIU A R. Determination of taxol in the extract of *Taxus chinensis* by reversed phase HPLC method [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1991, 26(7): 537.

(责任编辑 董晓燕)