植物营养与肥料学报 2015,21(2): 439 -448 doi: 10.11674/zwyf.2015.0219
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer http://www.plantnutrifert.org

曼地亚红豆杉(*Taxus media cv* "Hicksii")栽培基质中适宜的锰、锌、铜浓度及采收时期研究

刘柿良, 杨秀利, 马明东*, 但 方, 杨 君, 胡 菊, 邬梦希
(四川农业大学风景园林学院, 四川成都 611130)

摘要:【目的】紫杉醇具有独特的抗癌机理和广谱强效的抗癌活性,被认证为目前最有效的天然抗癌药物之一。曼地亚红豆杉作为提取紫杉醇重要地天然源料, 而备受重视。本试验旨在分析锰(Mn)、锌(Zn)和铜(Cu)三种微量元素对两种树龄曼地亚红豆杉植株生长及紫杉醇含量的影响,为曼地亚红豆杉药用原料林定向培育及通过合理施用微肥确定适宜采收期提供科学借鉴。**【方法】**以3年和5年生曼地亚红豆杉"Hicksii"幼苗为材料,采用砂基培养方式,使用高效液相色谱检测了施用不同浓度锰(0、4.50、9.00、13.50和18.00 μmol/L)、锌(0、0.15、0.30、0.45和0.60 μmol/L)和铜(0、0.40、0.80、1.20和1.60 μmol/L)对3年和5年生曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗生长及紫杉醇含量的影响。**【结果】**1)3种微量元素对两种不同年龄树苗的生长和枝叶紫杉醇含量影响显著。最适宜3年和5年生树苗生长(株高、地径、新梢长度)和生物量(枝叶与根系鲜/干重)积累的Mn浓度为9.00 μmol/L, Zn浓度为0.40 μmol/L; 3年生树苗的最适宜Cu浓度为0.30 μmol/L, 5年生为0.15 μmol/L。3年生树苗的Mn浓度为9.00 μmol/L, 5年生树苗为4.50 μmol/L以及两种树龄树苗的Zn浓度为0.40 μmol/L和Cu浓度为0.30 μmol/L时,微量元素有利于两种不同年龄树苗枝叶的紫杉醇积累。高于该适宜浓度则抑制树苗枝叶的紫杉醇积累,且浓度越高抑制作用越强。2)3种微量元素处理下,5年生树苗紫杉醇含量显著高于3年生树苗,对两种树苗紫杉醇含量影响效果顺序为Mn > Zn > Cu。3)在生长期3～10月,不同浓度Mn、Zn、Cu处理下的两种树苗均表现出相同规律: 3～6月树苗紫杉醇积累量逐渐降低, 6月降到最低,7月开始逐渐升高,9～10月含量趋于稳定。**【结论】**施用微量元素Mn 9.00 μmol/L、Zn 0.40 μmol/L和Cu 0.15～0.30 μmol/L, 5年龄"Hicksii"树苗,在9～10月份进行采收是紫杉醇含量高的关键点。

关键词: 曼地亚红豆杉; 紫杉醇; 锰; 锌; 铜; 生长发育; 采收季节; 采收年龄
中图分类号: S791.49; S725.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2015)02-0439-10

Suitable Mn, Zn and Cu concentrations in the culture media and proper harvest time for *Taxus media cv* "Hicksii"

LIU Shi-liang, YANG Xiu-li, MA Ming-dong*, DAN Fang, YANG Jun, HU Jü, WU Meng-xi
(*College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, P. R. China*)

Abstract:【Objectives】 Paclitaxel (Taxol®) shows excellent antitumor activity against breast cancer, ovarian cancer and non-small cell lung cancer, is one of the best chemotherapeutic agents developed from plant sources. Taxus production has received attention as an important natural material for extracting taxol. The purpose of this study was to study the effects of mircoalements (Mn, Zn and Cu) on the growth and paclitaxel accumulation in seedlings of Taxus, providing a basis for the optimum harvest period and the rational application of micronutrient fertilizer.**【Methods】** A sand culture experiment was conducted and the seedlings of 3-year-old and 5-year-old *Taxus media cv* "Hicksii" were growen. Five concentration of Mn 0, 4.50, 9.00, 13.50 and 18.00 μmol/L, Zn 0, 0.15, 0.30, 0.45 and 0.60 μmol/L, and Cu: 0, 0.40, 0.80, 1.20 and 1.60 μmol/L were designed, each treatment replicated three times. Branches and leaves of plants were collected monthly from March 15, 2012 to

收稿日期: 2014-01-06 **接受日期:** 2014-02-25
基金项目: 四川省教育厅重点攻关项目"曼地亚红豆杉快繁技术研究"(2003A023)资助。
作者简介: 刘柿良(1986—),男,四川南充人,博士研究生,主要从事植物营养及生理生态等方面研究。E-mail: liushiliang9@163.com
* 通信作者 E-mail: mmingdong1958@gmail.com

October 15, 2012. The paclitaxel accumulation contents was determined with high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the seedling growth were observed in November 15, 2012, the biomass were weighed at the same time. 【**Result**】1) Mn, Zn and Cu treatment levels significantly affect the growth and paclitaxel contents, increase the plants heights, crossing diameters and shoot length, increase the weights of branches, leaves and roots of the saplings. For the growth of seedlings, the optimum treatment is Cu 0.15 μmol/L for 5-year-old seedlings and 0.30 μmol/L for 3-year-old seedlings, Mn 9.00 μmol/L and Zn 0.40 μmol/L for the two ages of seedlings. For paclitaxel accumulation, the optimum level is Zn 0.40 μmol/L and Cu 0.30 μmol/L for the both ages, and Mn 9.00 μmol/L for the 3-year-old and 4.50 μmol/L for 5-year-old saplings. When the micronutrient treatment levels exceeded the optimum one, the paclitaxel accumulation will be inhibited and the higher the treatment levels, the stronge the inhibition. 2) The paclitaxel content in 5-year-old plants are significantly higher than in 3-year-old ones under all the treatments, and the differences are significant at harvest. 3) The paclitaxel content start to decrease from March to June, and is lowest in June, then increase and keep relatively stabile in September and October. The effects of Mn on the paclitaxel accumulation is higher than Zn and higher than Cu, no matter their treatment concentrations. 【**Conclusions**】The paclitaxel content in 5-year-old saplings is significantly higher than the 3-year-old ones, the proper harvest time for obtaining high paclitaxel content of saplings is September and October. The optimum treatment level is Mn 9.00 μmol/L, Zn 0.40 μmol/L and Cu 0.15 – 0.30 μmol/L.

Key words: *Taxus media* cv "Hicksii"; paclitaxel; Mn; Zn; Cu; ontogenetic development; gathering season; gathering year

紫杉醇(Paclitaxel, Taxol®)是1971年由Wani等[1]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)中分离而得的一种高效、低毒抗癌萜类化合物,因其独特的抗癌机理和广谱强效的抗癌活性,且对治疗乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌等都具显著疗效[2],而被美国食品和药物管理局(FDA)认证为目前最有效的天然抗癌药物之一。曼地亚红豆杉(*T. Media*)是东北红豆杉(*T. cuspidate*)与欧洲红豆杉(*T. baccata*)的杂交种,生长迅速,且全株均含有高含量的紫杉醇[3]。曼地亚红豆杉枝叶中紫杉醇含量一般为0.017%～0.051%,高的可达0.069%[4]。经大量筛选[5],以*T. media cv* "Hicksii" 品系的含量最高[6],枝叶中紫杉醇含量为0.023%～0.032%[7],显著高于其他物种或品种[8]。Castora 和 Tylera 等[9]对2～8年生曼地亚红豆杉根系中的紫杉醇含量研究发现,小于或等于8年生树苗根系紫杉醇含量随树龄增加而增加,8年后降低,故认为人工栽培8年生树苗为最佳采收树龄。史小娟等[10]调查发现,5年生曼地亚红豆杉枝条中紫杉醇含量在5月份高达0.56 mg/g,显著高于3年生树苗(0.34 mg/g)[10]。然而,关于不同树龄的曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗在不同时期的枝叶紫杉醇含量比较研究却鲜见报道,至今尚无系统取样分析资料出现[11]。

本课题组已采用"Hicksii"带芽茎段外植体进行腋芽增殖再生,成功实现其高效快速繁殖[12-13]。然而,对获得组培苗最佳移植生长环境,以产生更高含量紫杉醇的研究还未开展。药用植物的生长环境所含微量元素不仅对其生长有着直接的影响[14],还与其疗效密切相关[15]。因此,本研究选用3年和5年生"Hicksii"树苗为对象,研究锰、锌和铜对两种树龄植株的生长及紫杉醇含量的影响,为曼地亚红豆杉药用原料林培育、采收以及合理施用微肥确定提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 研究材料与试验地概况

供试植物为3年和5年生曼地亚红豆杉(*T. media cv* "Hicksii")幼苗,从原产地加拿大引种栽培于四川农业大学都江堰校区灵岩山实验基地(31° 01′N, 103°35′E),海拔400～1600 m。基地位于青藏高原向成都平原的过渡地带—都江堰市,属四川盆地西缘山地。年平均气温15.2℃,≥10℃的年积温4677.1℃,年降水量1300～1800 mm。于2011年12月下旬选取生长良好且基本一致(株高约28 cm,地径约5 cm)的3年和5年生树苗以供盆栽试验。

1.2 试验方法

盆栽基质为河砂和蛭石。河砂消毒后洗净、晾

干;蛭石用稀盐酸(HCl)溶液浸泡 72 h 后用水反复冲洗(6 次以上)后晾干。将河砂和蛭石各 15 kg 均匀装入盆中,盆底垫铺尼龙纱。将树苗根系洗净,于 2012 年 2 月上旬移植到内径 45 cm、高 35 cm 的花盆中(带托盘),每盆栽植树苗 2 株,幼苗间互不遮荫。试验大棚透光率为 80%;大棚内外温度接近,为 20 ± 3℃;相对湿度为 70%。所有处理均用去离子水。

营养液为改进 Hoagland (霍格兰氏)完全营养液[16]: KNO_3 5 mmol/L、$Ca(NO_3)_2$ 5 mmol/L、KH_2PO_4 1 mmol/L、$MgSO_4$ 2 mmol/L、NaFeEDTA 0.1 mmol/L、HBO_3 46 μmol/L、$NaMoO_4$ 0.1 μmol/L、$MnSO_4$ 9 μmol/L、$ZnSO_4$ 0.8 μmol/L、$CuSO_4$ 0.3 μmol/L。铁(Fe)、硼(B)、钼(Mo)盐浓缩到原标准的 1000 倍混合放置,Mn、Zn、Cu 盐浓缩 1000 倍单独放置;其余的大量元素浓缩到 100 倍低温保存。施用时,当添加 1 种不同浓度的微量元素时,其他 2 种微量元素以改进的营养液为基础浓度作为基础溶液[10],其他按配制的浓缩液量取、稀释。2012 年 2 月 13 日起,每盆植株浇施营养液 500 mL,每周更换 1 次营养液。

每个微量元素试验均采用 5 水平,每个处理重复 10 次。Mn 施用量(Mn0 ～ Mn4)依次为 0、4.50、9.00、13.50 和 18.00 μmol/L;Zn 施用量(Zn0 ～ Zn4)依次为 0、0.40、0.80、1.20 和 1.60 μmol/L;Cu 施用量(Cu0 ～ Cu4)依次为 0、0.15、0.30、0.45 和 0.60 μmol/L。两个年龄树苗共 30 个处理。

1.3　HPLC 测定条件和参数

1.3.1 流动相选择　HPLC 为岛津 LC-20AB 高效液相色谱仪(LC-20AB, Shimadzu Inc., Japan)。色谱柱为 phenomenex Luna C 18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈∶水∶异丙醇 = 45∶55∶1 (v∶v∶v),检测波长为 227 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 30℃,进样量为 10 μL 时,保留时间 30 min。

1.3.2 标准液制备　准确称取紫杉醇标准品 10.0000 mg,置于 25 mL 容量瓶中加甲醇溶解至刻度,得到 0.4 mg/mL 标准品储备液。

1.3.3 测定可靠性检验　准确吸取标准品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇定容,即得质量浓度为 0.02、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32 mg/mL 的系列标准溶液,吸取 10 μL,进样检测得出峰面积测定结果。以紫杉醇标准品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,考察进样浓度(x)与峰面积(y)的线性关系。线性回归方程为: $y = 2.5 \times 10^7 x + 11679$, $R^2 = 0.9998$,表明紫杉醇进样量在 0.02 ～ 0.40 mg/mL 内线性关系良好。

取标准品制备测定液,峰面积测定值相对标准偏差(*RSD*)值为 0.57%,表明试验仪器精密度良好。将标准品溶液于 4℃保存,于 0、1、2、4、8、16 h 取样测定,峰面积 *RSD* 为 0.56%,表明标准品溶液在 16 h 内稳定性良好。

精确称取 3 年生曼地亚红豆杉样品粉末 5 份,各 1.000 g,按样品溶液的制备方法制备待测溶液进行测定,5 份样品峰面积相对标准偏差为 0.84%,表明试验重复性良好。

1.3.4 加样回收考察　取已施加 Hoagland 标准溶液的 3 年生曼地亚红豆杉样品粉末 9 份,各 1.0 g,每 3 份为一组,各加入紫杉醇标准品粉末,按样品溶液的配制方法制取待测液 10 μL,进样分析并计算回收率。高、中、低三种水平的加样回收率平均值分别为 99.69%、99.02% 和 99.00%, *RSD* 分别为 1.22%、0.24% 和 0.52% ($n = 3$),均在允许范围内,说明该法测定曼地亚红豆杉枝叶紫杉醇含量结果可靠。

1.4　植株采样与测定

2012 年 2 ～ 10 月期间,每月 15 日左右进行采样。以 2 月样品测定值为植株的基础,每个处理破坏性选取红豆杉树苗各 2 株,去离子水洗净,置于 85℃烘箱中杀青 1 h,再在 60℃ 条件下烘干至恒重,用粉碎机粉碎,以枝叶烘干质量作为单株紫杉醇含量计算[7-8]。称取样品 1.0 g,置于带塞试管中各加甲醇溶液 25 mL,用超声清洗器超声提取 1 h,摇匀、冷却、抽滤,再用 25 mL 甲醇溶解滤渣超声提取 1 h,重复 3 次,合并滤液,用 0.45 μm 水溶性滤膜过滤,存于 EP 管[17]。测定结果与标准品对照,计算出粗提样品中紫杉醇含量和百分含量:

$$紫杉醇(\%) = (S_{样} \times m_{标} \times V_{样} \times 标准品纯度) / (S_{样} \times m_{标} \times V_{样}) \times 100$$

式中: S 指色谱图峰面积; m 指样品或标准品质量; V 指溶液体积。

1.5　生长指标测定

2012 年 2 月 10 日,随机选取移栽后健康的 3 年和 5 年生曼地亚红豆杉植株,使用卷尺和游标卡尺准确测量幼苗株高、地径、新梢长,并测定单株枝叶和根系的鲜重和干重。2012 年 11 月 15 ～ 18 日,每个处理选取 3 株树苗测定生长指标。

1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, USA)软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),并用最小显著差数法(LSD)检验差异性。采用生长综合指标法(Overall Desirability, OD)对生长进行综合评定,OD 即为同处理各生长指标测定值与参照测定值(本试验为 Mn0、Zn0、Cu0 处理)的比值之和[18]。

2 结果与分析

2.1 微量元素对曼地亚红豆杉“Hicksii”树苗生长的影响

移栽后未经处理的健康 3 年和 5 年生曼地亚红豆杉“Hicksii”树苗的基础生长值为:3 年生植株株高 28.13 cm,地径 5.02 cm,新梢长度 1.38 cm,枝叶鲜重 24.67 g/plant,根系鲜重 10.28 g/plant,枝叶干重 2.36 g/plant,根系干重 1.24 g/plant;5 年生植株株高 31.08 cm,地径 6.11 cm,新梢长度 0.74 cm,枝叶鲜重 31.27 g/plant,根系鲜重 22.32 g/plant,枝叶干重 3.15 g/plant,根系干重 2.28 g/plant。

2.1.1 锰 当施 Mn 为 0 ~ 9.00 μmol/L 范围内,3 年和 5 年生树苗各项生长指标均随着锰浓度的增加而增大;Mn 处理为 9.00 μmol/L 时,3 年生树苗除根系鲜重外,株高、地径、新梢长度、枝叶鲜重(干重)和根系干重均达到最大值,且生长综合指标(OD)最大为 8.78;5 年生树苗除株高外其他指标也达到最大值,OD 值为 8.14。Mn 浓度超过 9.00 μmol/L 后,出现负增长(表 1)。两个年龄树苗性比,5 年生树苗的株高、地径、枝叶鲜重(干重)和根系鲜重(干重)均显著高于 3 年生树苗($P<0.05$),新梢长度却较低;3 年和 5 年生树苗的根系鲜重和干重在 Mn 浓度为 13.50 和 18.00 μmol/L 时无显著性差异。

表 1 不同施锰量对曼地亚红豆杉“Hicksii”树苗生长的影响

Table 1 Effect of Mn application amounts on growth of *T. media cv* “Hicksii” seedlings

树龄 Age	Mn (μmol/L)	株高 Height (cm)	地径 Diameter (mm)	新梢长度 Shoot length (cm)	枝叶重 (g/plant) Shoot weight		根系重(g/plant) Root weight		OD (a. u.)
					鲜 Fresh	干 Dry	鲜 Fresh	干 Dry	
3 年	0	38.59 Bd	7.09 Bc	2.68 Aa	33.58 Bd	4.29 Bc	16.06 Bd	3.16 Bd	—
Three years	4.50	42.84 Bbc	7.51 Bbc	2.67 Aa	38.13 Bc	4.33 Bc	18.98 Bc	3.43 Bc	7.58
	9.00	45.17 Ba	8.27 Ba	2.90 Aa	46.66 Ba	4.87 Ba	24.72 Ba	4.10 Aa	8.78
	13.50	43.67 Bab	7.79 Bb	2.18 Ab	42.18 Bb	4.58 Bb	25.28 Aa	4.06 Aa	8.23
	18.00	40.80 Bc	7.13 Bc	2.18 Ab	34.04 Bd	4.10 Bd	22.39 Ab	3.77 Ab	7.43
5 年	0	54.18 Ac	8.79 Ad	1.50 Bb	49.34 Ac	5.30 Ad	23.28 Ad	3.50 Ad	—
Five years	4.50	57.78 Ab	9.45 Ab	2.00 Ba	52.31 Ab	5.72 Ab	28.68 Ab	3.92 Ab	7.97
	9.00	60.85 Aa	9.97 Aa	1.39 Bb	58.25 Aa	6.32 Aa	32.53 Aa	4.14 Aa	8.14
	13.50	61.04 Aa	9.25 Abc	1.30 Bb	55.94 Aa	5.87 Ab	25.63 Ac	3.73 Bc	7.45
	18.00	55.29 Ac	8.86 Acd	0.89 Bc	52.17 Ab	5.49 Ac	21.02 Ae	3.13 Be	6.51

注(Note):OD—综合指标 Overall desirability. 数值后不同大写字母表示相同处理下 3 年和 5 年生树苗间差异显著($P<0.05$);不同小写字母表示 3 年和 5 年生树苗在不同处理间差异显著($P<0.05$) Values followed by different capital letters are significant in three-year and five-year old seedlings under the same treatments ($P<0.05$); Values followed by different small letters are significant among different treatments in three-year and five-year old seedlings ($P<0.05$).

2.1.2 锌 随着 Zn 施加量的增大,两种树苗的生长指标值均呈先升高后降低的趋势。3 年生“Hicksii”树苗的株高和地径在 Zn 0.8 μmol/L 最大,而新梢长度、枝叶鲜重(干重)和根系鲜重(干重)在 Zn 0.4 μmol/L 最大,且 OD 值为 8.93 (表 2)。5 年生树苗的株高、新梢长度、根系鲜重(干重)在 Zn 0.4 μmol/L 处理时最大,OD 值达到最高(8.71)。比较 3 年和 5 年生树苗可知,5 年生树苗的株高、地径及鲜重(干重)均显著高于 3 年生树苗($P<0.05$),而新梢长度却相反。

表 2　不同施锌量对曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗生长的影响

Table 2　Effect of Zn application amounts on growth of *T. media cv* "Hicksii" seedlings

树龄 Age	Zn (μmol/L)	株高 Height (cm)	地径 Diameter (mm)	新梢长度 Shoot length (cm)	枝叶重 (g/plant) Shoot weight		根系重(g/plant) Root weight		OD (a. u.)
					鲜 Fresh	干 Dry	鲜 Fresh	干 Dry	
3 年 Three years	0	37.25 Bc	7.13 Bd	3.15 Ab	43.03 Bd	4.56 Bd	14.95 Bd	2.80 Bc	—
	0.40	39.77 Bb	7.85 Bb	3.84 Aa	56.43 Ba	5.45 Ba	27.06 Ba	3.44 Ba	8.93
	0.80	45.95 Ba	8.11 Ba	2.90 Ac	54.09 Ba	5.04 Bb	25.53 Bb	3.51 Ba	8.62
	1.20	40.15 Bb	7.53 Bc	2.43 Ad	49.86 Bb	4.86 Bc	20.50 Bc	3.03 Bb	7.58
	1.60	34.36 Bd	7.38 Bc	2.40 Ad	46.20 Bc	4.32 Be	19.82 Bc	2.65 Bc	7.01
5 年 Five years	0	52.16 Ac	7.84 Ac	1.32 Bb	58.55 Ac	5.74 Ac	25.62 Ac	3.43 Ad	—
	0.40	63.17 Aa	8.70 Ab	1.95 Ba	65.44 Aa	6.60 Aa	35.50 Aa	4.32 Aa	8.71
	0.80	61.83 Aa	9.50 Aa	1.29 Bb	67.26 Aa	6.73 Aa	30.25 Ab	4.11 Ab	8.07
	1.20	57.78 Ab	8.26 Abc	0.91 Bc	61.14 Ab	6.11 Ab	29.43 Ab	3.85 Ac	7.23
	1.60	53.75 Ac	7.93 Ac	1.15 Bbc	57.24 Ac	5.83 Ac	26.64 Ac	3.21 Ae	6.88

注(Note): OD—综合指标 Overall desirability. 数值后不同大写字母表示相同处理下 3 年和 5 年生树苗间差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示 3 年和 5 年生树苗在不同处理间差异显著($P<0.05$) Values followed by different capital letters are significant in three-year and five-year old seedlings under the same treatments ($P<0.05$); Values followed by different small letters are significant among different treatments in three-year and five-year old seedlings ($P<0.05$).

2.1.3 铜　随着施 Cu 量的逐渐增加,树苗的新梢长度和枝叶鲜重呈现先降低后升高的趋势,而其他生长指标均呈明显的"先升后降"的趋势(表 3)。除枝叶鲜重外, 3 年生树苗其他生长指标均在 Cu 0.30 μmol/L 达到最大值, 且 OD 值也高达 9.11,而 5 年生树苗的地径、根系鲜重(干重)和枝叶干重在 Cu 0.15 μmol/L 时最大。比较两种树龄幼苗可知,不同施 Cu 量处理下 5 年生树苗的新梢长度均显著低于 3 年生树苗($P<0.05$), 而两种树龄幼苗的地径和根系干重在 Cu 0.15 ～0.60 μmol/L 范围内无显著性差异。

2.2　微量元素对曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗紫杉醇含量的影响

移栽后未经处理的健康 3 年和 5 年生曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗的紫杉醇基础值为: 3 年生植株枝叶紫杉醇含量为 2.16%, 5 年生植株枝叶紫杉醇含量为 3.02%。

2.2.1 锰　图 1 为锰处理中 3 年(图 1a)和 5 年(图 1b)生曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗在不同月份的枝叶紫杉醇积累量,不同施锰量间各月份累积量差异显著($P<0.05$)。3 年生树苗枝叶紫杉醇含量在 Mn2 处理积累量最高,为不施锰的 1.44 ～1.86 倍; 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量均在 Mn1 处理时最高, 比不施锰升高了 5.83%～21.88%。施 Mn 对 3 年生幼树枝叶紫杉醇积累量的影响大于 5 年生幼树。

试验从 3 月到 10 月, 树苗枝叶紫杉醇积累量先降低后升高,以 6 月最低,此时 3 年生树苗枝叶紫杉醇含量为 0.82%～1.43%, 5 年生为 1.68%～2.48%; 而后紫杉醇积累量逐渐增大到 10 月份趋于稳定。相同月份, 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量显著高于 3 年生树苗($P<0.05$)。

2.2.2 锌　同锰处理相同, 两树龄幼树枝叶紫杉醇含量从 3 月到 10 月均先降后升, 6 月份达到最低,之后逐渐增加至 10 月份趋于稳定。与 3 月相比, 6 月份 3 年和 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量分别下降 38.10%～55.29% 和 32.79%～48.99%,10 月分别维持在 2.06‰～3.43‰ 和 1.77‰～3.68‰。

不同施锌量显著影响 3 年(图 2a)和 5 年 (图 2b)生幼树枝叶紫杉醇积累量($P<0.05$)。3—10 月,幼树枝叶紫杉醇积累量均在 Zn2 处理达到最大值,3 年生幼树积累量为 Zn0 处理的 0.50 ～0.89 倍,5 年生为 0.27 ～1.08 倍。相同月份不同施 Zn 量处理的 5 年生幼树枝叶紫杉醇积累量显著均高于 3 年生($P<0.05$), 仅 10 月份 Zn0 处理的 3 年生幼树积累量(1.84‰)略高于 5 年生树苗(1.77‰)。

表 3 不同施 Cu 量对曼地亚红豆杉“Hicksii”树苗生长的影响

Table 3 Effect of Cu application amounts on growth of *T. media cv* “Hicksii” seedlings

树龄 Age	Cu (μmol/L)	株高 Height (cm)	地径 Diameter (mm)	新梢长度 Shoot length (cm)	枝叶重 (g/plant) Shoot weight		根系重(g/plant) Root weight		OD (a. u.)
					鲜 Fresh	干 Dry	鲜 Fresh	干 Dry	
3 年生 Three years	0	33.79 Bc	8.43 Bd	2.24 Ab	43.09 Bc	16.35 Bd	5.35 Bd	2.36 Bd	—
	0.15	39.16 Bb	9.37 Bb	2.12 Ab	42.74 Bc	19.41 Bbc	5.85 Bc	2.68 Bc	7.62
	0.30	47.31 Ba	9.78 Aa	2.90 Aa	52.32 Ba	24.38 Ba	6.52 Ba	3.13 Aa	9.11
	0.45	40.88 Bb	9.32 Ab	2.85 Aa	53.18 Ba	20.42 Bb	6.11 Bb	2.87 Ab	8.43
	0.60	36.28 Bc	8.97 Ac	2.26 Ab	45.94 Bb	18.28 Bc	5.25 Bd	2.46 Ad	7.35
5 年生 Five years	0	44.35 Ab	9.06 Ac	1.26 Ba	56.61 Ac	29.68 Ac	6.52 Ad	2.87 Abc	—
	0.15	43.73 Ab	9.94 Aa	1.21 Ba	59.78 Ab	38.31 Aa	7.68 Aa	3.93 Aa	7.94
	0.30	51.47 Aa	9.86 Aa	1.29 Ba	67.54 Aa	34.53 Ab	7.15 Ab	3.07 Ab	7.80
	0.45	46.25 Ab	9.43 Ab	1.12 Ba	65.49 Aa	31.41 Ac	6.64 Acd	2.84 Ac	7.20
	0.60	40.60 Ac	8.89 Ac	0.89 Bb	57.65 Abc	31.36 Ac	6.77 Ac	2.58 Ad	6.62

注(Note)：OD—综合指标 Overall desirability. 数值后不同大写字母表示相同处理下 3 年和 5 年生树苗间差异显著($P<0.05$)；不同小写字母表示 3 年和 5 年生树苗在不同处理间差异显著($P<0.05$) Values followed by different capital letters are significant in three-year and five-year old seedlings under the same treatments ($P<0.05$)；Values followed by different small letters are significant among different treatments in three-year and five-year old seedlings ($P<0.05$).

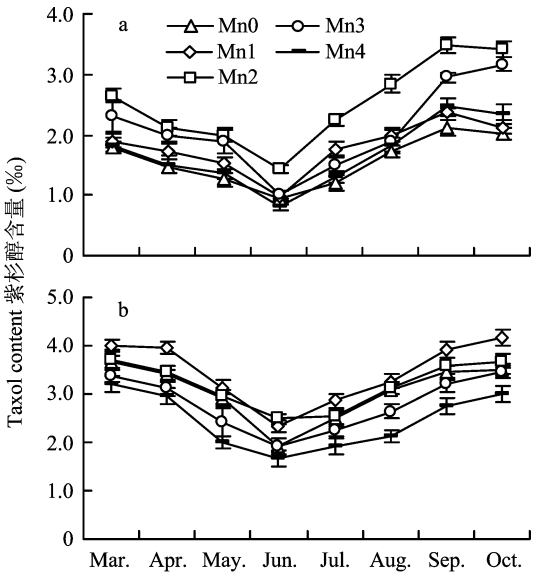

图 1 不同施锰量曼地亚红豆杉“Hicksii” 3 年(a)和 5 年(b)生树苗紫杉醇含量

Fig. 1 Taxol content in 3-year (a) and 5-year (b) “Hicksii” scalps dependent on Mn application rates

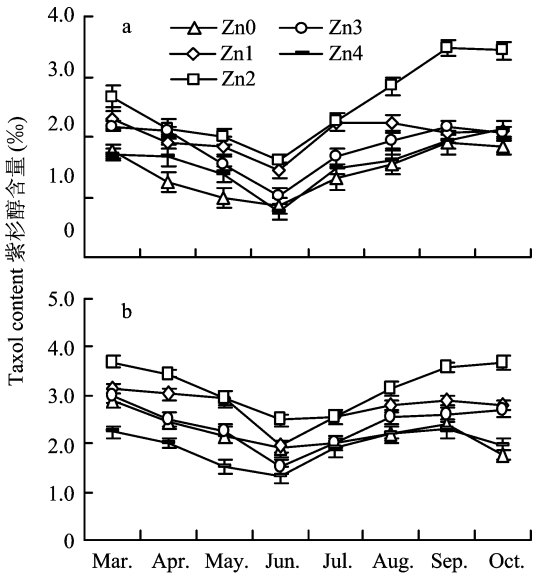

图 2 不同施锌量曼地亚红豆杉“Hicksii” 3 年(a)和 5 年(b)生树苗紫杉醇含量

Fig. 2 Taxol content in three-year (a) and five-year old (b) Hicksii scalpels dependent on Zn application rates

2.2.3 铜 铜处理紫杉醇积累量 6 月最低值 3 年生幼树为 1.95‰～3.43‰，5 年生为 2.46‰～3.68‰。3 年和 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量 6 月份比 3 月份显著下降 39.02%～68.69% 和 32.79%～44.97% ($P<0.05$)。

不同施铜量处理 3 到 10 月紫杉醇积累量与施锰和锌的变化趋势相同(图 3)。相同月份不同施铜量处理 5 年生幼树紫杉醇积累量均显著高于 3 年生

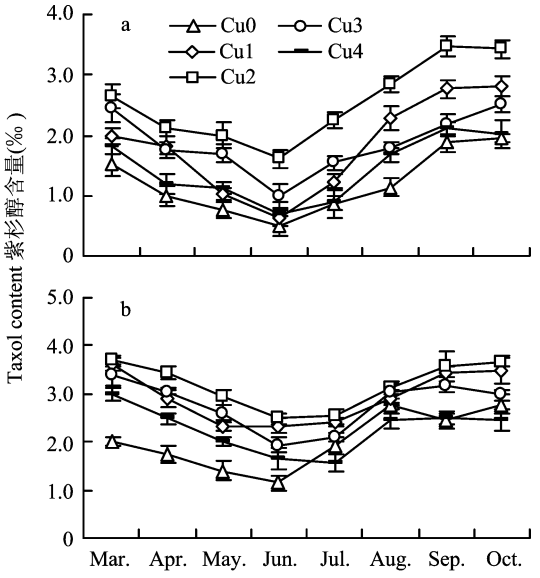

图 3　不同施铜量对曼地亚红豆杉"Hicksii" 3 年(a) 和 5 年(b)生树苗紫杉醇含量

Fig. 3　Taxol content in three-year (a) and five-year old (b) scaples of *T. media cv* "Hicksii" dependent on Cu application rate

树苗($P<0.05$)。3 年生和 5 年生幼树紫杉醇含量均在 Cu2 处理达到最高, 分别为 Cu0 处理的 1.75～3.29 倍和 1.13～2.16 倍。

3　讨论与结论

3.1　适量微量元素能显著提高曼地亚红豆杉"Hicksii"树苗的生长

微量元素在植株体内作为酶或辅酶组成成分具有较强的专一性[19], 适宜浓度 Mn 被吸收后能直接参与光合作用氧发生过程, 从而刺激植株生长[20], 增加枝叶和根系生物量。Mn 量过高, 激活硝酸还原酶(NR)能力降低, 硝酸盐(NO_3^-/NO_2^-)积累使植株中毒, 从而阻碍输导组织, 降低粗蛋白合成与光合作用效率[21]。Zn 作为多种酶的组分或活化剂, 参与叶绿素、蛋白质和生长素的合成和参与碳水化合物转化,适宜的锌可提高植株产量[14-15],缺 Zn 时, 植株体内氮代谢紊乱, 氮大量积累, 抑制蛋白质合成[19]。Cu 形成稳定络合物的能力很强, 能与氨基酸、肽、蛋白质等络合[15],Cu 作为重金属却普遍存在着双相剂量-效应现象, 低浓度 Cu 可促进酶与底物结合, 增强活性, 过量则与酶络合, 使酶类蛋白质变性或活性降低, 导致活性氧(ROS)积累[22]。本研究中, 施不同浓度的 Mn、Zn、Cu 对 3 年和 5 年生树苗的生长指标均产生了显著影响,在一定施用范围内,两种树龄树苗的株高、地径、新梢长度及生物量均显著增加,过量时则抑制幼树的生长和紫杉醇的积累。以生长综合指标值(OD)评价,3 年和 5 年生幼树均在锰 9.00 μmol/L 达到最高。不施锌时, 幼树生物量低, 新梢较短, 生长受到抑制, 施锌 0.40 μmol/L 后, 树苗枝叶和根系鲜重和干重显著增加($P<0.05$),超过此用量后,幼树的生长显著受到抑制。3 年生树苗在 Cu 0.3 μmol/L 与 5 年生树苗在 Cu 0.15 μmol/L 下, 各项生长指标较不施 Cu 显著升高($P<0.05$)。随着 Cu^{2+} 浓度增大, 两种树苗均产生明显抑制效应。不同浓度 Mn、Zn、Cu 处理的 5 年生树苗各项生长指标均高于 3 年生树苗(表 1～表 3), 表明不同树龄对微量元素需求量的差异。李凤等[19]研究也表明, 微肥(含 Zn、Mn 等)对 2 年生黄芩(*Scutellaria baicalensi*)生长的影响比 1 年生更显著。

3.2　适量微量元素能显著提高树苗紫杉醇的积累

紫杉醇是红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物次生代谢的抗癌萜类化合物, 受其防御性基因的调控,紫杉醇的合成量与外界诱导子(生物和非生物)刺激密切有关[23-24]。诱导子可诱导细胞产生抗逆反应, 启动次生代谢途径, 从而导致紫杉醇大量合成[24]。微量元素不仅对植物新陈代谢不可或缺, 同时也与药用植物药理活性紧密相关[15]。大量研究表明, 适量的微量元素能显著影响药用植物产生次生代谢产物, 但其含量过高则会产生毒害[23, 25-26]。本研究表明, 3 月～10 月期间, 施不同浓度 Mn、Zn 和 Cu 微量元素的 3 年和 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量均呈低浓度促进积累,高浓度抑制紫杉醇积累的趋势(图 1～图 3)。李家儒等[27]在中国红豆杉(*T. chinensis*)悬浮培养中添加 Cu^{2+} 促进了紫杉醇形成, 以浓度为 30 μmol/L 的诱导效果最佳。汤璐等[23]研究表明, 适量 Zn 能提高菊花(*Chrysanthemum morifolium*)总黄酮和绿原酸含量, 而高剂量 Cu 却严重抑制其有效成分生成。同时, 在不同浓度 Cu 和 Mn 影响化橘红(*Citrus grandis*)黄酮类成分合成的研究中也证实了该观点[28]。紫杉醇的合成主要是通过 MVA(Mevalonate, 存在细胞质)途径和 DXP (1-deoxy-D-xylulose5-phosphate, 存在于质体)途径完成, 多种限速酶控制紫杉醇的有效合成[11]。Koepp 等[29]认为牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸环化成为紫杉 4(5),11(12)二烯烃 taxa-4(5),11(12)-diene 的环化酶为紫杉醇合成代谢途径中的限速酶, 稀土元素可取代此

酶的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 从而激活酶活性。然而，Mn、Zn、Cu 是如何调控次生代谢过程的酶系统还有待进一步研究。

不同浓度 Mn、Zn、Cu 处理下，3 年和 5 年生树苗在试验期间(3 月～10 月)表现出相同的规律：3 月～6 月树苗枝叶紫杉醇含量逐渐减少，6 月减少到最低，7 月开始增加，到 9 月时含量趋于稳定(图 1～图 3)。与王朝晖等[30]的结论相悖，研究发现南方红豆杉(*T. chinensis*)从 3 月至 6 月紫杉醇含量逐渐增加，6 月含量最高，7 月开始含量却逐渐减少。究其原因，这可能与环境条件以及植物代谢及枝叶的生长发育特性有关[8,10]。6 月是试验地(都江堰地区)气温最高的时期，不利于紫杉醇的积累，且生长需消耗部分，故造成该月积累最低。紫杉醇属于二萜类生物碱，是植物在长期的生态环境适应过程中为抵御动物、微生物、病毒及其他植物的攻击而形成的次生代谢产物[4,10]。与其他次生代谢产物相同，总以最高浓度分布在植物组织中最容易受到环境侵害的部位[8,23]。本试验地都江堰 9 月开始气温显著降低，寒冷潮湿的天气可能有利于次级代谢合成紫杉醇。进一步研究发现，3 月～10 月间 5 年生树苗枝叶紫杉醇积累量显著高于 3 年生(图 1～图 3)，表明紫杉醇含量随树龄的增加而增加。同时，对 2 年～8 年生曼地亚红豆杉紫杉醇研究发现，小于或等于 8 年生树苗的紫杉醇含量随树龄增加而增加，生长到 8 年后反而降低[9]。这也显示人工栽培曼地亚红豆杉具有周期短、紫杉醇含量高的优势。

红豆杉细胞合成紫杉醇的能力除了受遗传特性影响之外，外界逆境信号激活细胞的防御反应是改变细胞合成紫杉醇速率和积累的重要途径[24]。本试验中，3 种微量元素对树苗紫杉醇含量影响效果的顺序为 Mn > Zn > Cu，与王建安等[31]的研究结论相似，盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)薯蓣皂苷元对施 Mn 肥的敏感性高于 Zn。可能原因是 Mn 对代谢合成酶具有高度专一性，促进植物吸收土壤中氮和磷，高 Mn 可抑制吲哚乙酸(IAA)氧化酶活性，从而促进产量增加[32]。Zn 通过参与叶绿素合成，改变光能利用率，影响有机物合成[14,17]。Liu[20]指出，Zn^{2+} 可能首先与细胞膜上受体的结合，改变膜离子通道，促使诱导过程迅速完成。Zn^{2+} 与其受体高度亲合，引起位于原生质膜上的离子通道改变，引起 Ca^{2+} 内流并迅速发生 H_2O_2，胞内依赖 Ca^{2+} 的蛋白质磷酸化作用，激活核内防御基因(如 *TCH* 基因)，引起防御反应，诱导合成植保素酶合成植保素而完成信号传递作用。当氧迸发(OXB)达到最大时，胞内苯丙氨酸鲜氨酶(PAL)活性、Taxol 和酚的合成开始激活[20-21,23]。因此，防御应答的强弱可能与 Taxol 的合成有密切的正相关性。而 Cu 影响紫杉醇积累主要是通过与过氧化氢酶(Catalase，CAT)活性中心结合，影响酶与底物的结合能力[33]。同时，高浓度的 Cu^{2+} 可能会导致细胞活性氧(ROS)的积累。ROS 积累和次生代谢产物都是植物在响应外界刺激过程中强有力的化学武器，Cu^{2+} 诱导次生代谢产物的合成而抗氧化剂的加入则阻止次生代谢物的生成[15,23]。ROS 可能作为第二信使调控防卫基因的表达和启动与植保素合成基因相关的基因转录，因此推断 ROS 对植保素的调控作用可能发生在转录水平上，也可能使 mRNA 稳定性有所提高[14]。

综上所述，微量元素 Mn、Zn 和 Cu 对 3 年和 5 年生“Hicksii”树苗生长和枝叶紫杉醇含量影响显著。适宜微量元素施加浓度下，3 年和 5 年生幼树的株高、地径、新梢长度、枝叶鲜重/干重和根系鲜重/干重以及紫杉醇积累量均显著增加。两种树龄幼树的适宜 Zn 浓度为 0.40 μmol/L，适宜 Cu 浓度为 0.30 μmol/L，3 年生幼树的适宜 Mn 浓度为 9.00 μmol/L，5 年生幼树为 4.50 μmol/L。5 年生树苗紫杉醇含量显著高于 3 年生树苗；一年之中，幼树紫杉醇积累量 3 月～6 月逐渐降低，7 月后开始升高，9 月～10 月含量趋于稳定，因此，适宜采收时期为 9 月～10 月份。

参考文献：

[1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E *et al*. Plant antitumor agents. VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukcmic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93: 2325-2327.

[2] Kohler J, Goldspiel B R. Evaluation of new drug paclitaxel (taxol)[J]. Pharmacotherapy, 1994, 14: 3-34.

[3] Onrubia M, Cusido R M, Ramirez K *et al*. Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives[J]. Current Medicinal Chemistry, 2013, 20: 880-891.

[4] Parc G, Canaguier A, LandreØ P *et al*. Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus genotypes*[J]. Phyto-chemistry, 2002, 59: 725-730.

[5] van Rozendaal E L M, Lelyveld G P, van Beek T A. Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxane[J]. Phytochemistry, 2000, 53: 383-389.

[6] Hansen R C, Cochran K D, Keener H M *et al*. *Taxus* populations and clippings yields at commercial nurseries[J]. Hort

Technology, 1994, 4: 372-377.

[7] Wang X, Huang Y, Mort A J. Variation of *Taxane* content in needles of *Taxus* × *media* cultivars with different growth characteristics[J]. Zeitschrift fur Naturforschung, 2006, 61: 619-624.

[8] 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[J]. 林业科学研究, 2005, 18(4): 369-374.
Su J R, Zhang Z J, Deng J. Stuay on the taxol content in *Taxus* yunnanensis of diferent age and diferent provenance[J]. Forest Research, 2005, 18(4): 369-374.

[9] Castora T P, Tylera T A. Determination of Taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering components[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1993, 16: 723-731.

[10] 史小娟, 徐志明, 付顺华. 采收季节与树龄对曼地亚红豆杉主要活性成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2538-2540.
Shi X J, Xu Z M, Fu SH *et al*. Effects of gathering season and three age affect on main active components of *Taxus madia*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(19): 2538-2540.

[11] Lia L Q, Lia X L, Fu C H *et al*. Sustainable use of *Taxus media* cell cultures through minimal growth conservation and manipulation of genome methylation[J]. Process Biochemistry, 2013, 48: 525-531.

[12] 马均, 马明东, 周宇爝. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导试验[J]. 林业科技, 2006, 31(1): 12-15.
Ma J, Ma M D, Zhou J. Callus induction of *Taxus media*[J]. Forestry Science & Technology, 2006, 34(1): 12-14.

[13] 马均, 马明东. 曼地亚红豆杉的组织培养快繁技术[J]. 林业科学, 2007, 43(7): 30-34.
Ma J, Ma M D. Tissue culture technique of *Taxus media* "Hecksii"[J]. Scientia Silvae Sincae, 2007, 43(7): 30-34.

[14] 韩建萍, 梁宗锁, 张文生. 微量元素对丹参生长发育及有效成分的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(4): 560-563.
Han J P, Liang Z S, Zhang W S. Effect of microelement on growth and active ingredient of *Salvia miltiorrhize* Bge.[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2005, 11(4): 560-563.

[15] 陈暄, 张雪媛, 张荣荣, 等. 锰、铁、锌、铜4种微量元素对芍药生长和芍药苷含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 961-964.
Chen X, Zhang X Y, Zhang R R *et al*. Effects of Mn, Fe, Zn and Cu on growth and paeoniflorin content of *Paeonia lactiflora*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(8): 961-964.

[16] Furmanowa M, Syklowska-Baranek K. Hairy root cultures of *Taxus* × *media var*. Hicksii Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 683-686.

[17] 满瑞林, 乔亮杰, 倪网东. 曼地亚红豆杉枝条中紫杉醇的超声提取研究[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(12): 1637-1640.
Man R L, Qiao L J, Ni W D. The research of extracting taxol from the branches of *Taxus media* with the method of ultrasonic[J]. Chemical Research and Application, 2008, 20(12): 1637-1640.

[18] Jiang Y, Li P, Li S P. Optimization of pressurized liquid extraction of five major flavanoids from *Lysimachiaclethroide*[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43: 341-345.

[19] 李凤, 李佳佳, 王文全,等. 微量元素养分平衡剂对黄芩的生长及次生代谢产物积累的影响[J]. 中国现代中药, 2011,13(12): 22-25.
Li F, Li J J, Wang W Q *et al*. The effects of trace element nutrient balance on growth and accumulation of secondary metabolites of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Modern Chinese Medicine, 2011, 13(12): 22-25.

[20] 刘铮. 微量元素的土壤化学[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 45-49.
Liu Z. Agricultural chemistry of microelements[M]. Beijing: Science Press, 1991. 45-49.

[21] 唐小付, 龙明华, 梁勇生, 等. 锰对厚皮甜瓜生长发育和产量品质的影响[J]. 中国蔬菜, 2005, (8): 7-9.
Tang X F, Long M H, Liang Y S *et al*. The effect of manganese on growth, development, yield and quality of *Melon*[J]. China Vegetables, 2005, (8): 7-9.

[22] 刘柿良, 杨容孑, 潘远智, 等. 镉胁迫对长春花质膜过氧化、ATP 酶及 5′-核苷酸酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(5): 916-914.
Liu S L, Yang R J, Pan Y Z *et al*. Effects of cadmium on lipid peroxidation, ATPase and 5′- AMPase activity of plasma membrane in *Catharanthus roseus* tissues[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(5): 916-914.

[23] 汤璐, 林江辉, 闫广轩, 等. 铜、锌、硒对药用菊花主要有效成分和花中硒含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(6): 1475-1480.
Tang L, Lin J H, Yan GX *et al*. Effects of Cu, Zn and Se on contents of total flavonlid, chlorogenic acid and Se in the flower of *Chrysanthemum morifolium* Ramat.[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(6): 1475-1480.

[24] Wu J Y, Wang G G, Mei X G. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxol* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 85: 67-73.

[25] 马闯, 介晓磊, 刘世亮, 等. 喷施硫酸锰对紫花苜蓿草产量和品质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2011, (1): 44-48.
Ma C, Jie X L, Liu S L *et al*. Effect of manganese sulfate spurt application on the yield and quality of alfalfa[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2011, (1): 44-48.

[26] 吴明才, 陈吾新, 肖昌珍. 大豆锰素营养研究[J]. 中国油料作物学报, 1991, (4): 39-42.
Wu M C, Chen W X, Xiao C Z *et al*. A study of manganese nutrition in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1991, (4): 39-42.

[27] 李家儒, 管志勇, 刘曼西, 等. Cu^{2+} 对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 117-120.
Li J R, Guan Z Y, Liu M X *et al*. Effects of Cu^{2+} on taxol formation in cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1999, 18(2): 117-120.

[28] 林兰稳, 钟继洪, 骆伯胜, 等. 化橘红产地土壤中量微量元素分布及其与化橘红药用有效成份的相关关系[J]. 生态环境, 2008, 17(3): 1179-1183.
Lin L W, Zhong J H, Luo B S *et al*. The distribution of mid-and micro-elements in soils in *Citrus grandis* growing area and its relationship with active officinal principles [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(3): 1179-1183.

[29] Koepp A E, Hezari M, Zajieeks J *et al*. Cyelization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5), 11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in *Paeifie yew*[J]. Journal of Biological Chemistry, 270, 15: 8686-8690

[30] 王朝晖, 周日宝, 刘湘丹, 等. 湘产南方红豆杉中紫杉醇含量动态变化的研究[J]. 中南药学, 2010, 8(1): 15-17.
Wang C H, Zhou R B, Liu X D *et al*. Dynamic change of taxol content in *Taxis chinensis* var. mairei in Hunan [J]. Central South Pharmacy, 2010, 8(1): 15-17.

[31] 王建安, 林菲, 李艳芝, 等. 铁、锰、锌肥对盾叶薯蓣根茎产量及薯蓣皂苷元的影响[J]. 中草药, 2011, 42(3): 589-591.
Wang J L, Lin F, Li Y Z *et al*. Effects of Fe, Mn, and Zn on rhizome yields and disogenin contents of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(3): 589-591.

[32] 魏孝荣, 郝明德, 邱莉萍. 土壤干旱条件下锰肥对夏玉米光合特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(3): 255-258.
Wei X R, Hao M D, Qiu L P *et al*. Effect of manganese fertilizer on maize photosynthetic performance under soil drought condition [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2004, 10(3): 255-258.

[33] Sunda W G, Huntsman S A. Interactions among Cu^{2+}, Zn^{2+}, and Mn^{2+} in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas* [J]. Limnol Oceangr, 1998, 43: 1055-1064.