

不同银杏无性系叶片萜内酯含量的差异性研究

何佳林, 李潇雨, 李秀红, 季志平

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 叶片萜内酯含量是药用银杏 *Ginkgo biloba* 的关键品质属性及重要指标。于 2016 年 9 月, 对陕西宝鸡银杏种质资源圃引进和筛选的 20 个银杏优良无性系叶片进行了萜内酯含量的差异性研究。结果表明, 银杏叶质量、叶面积、叶长、株叶数、树高和叶含水率是影响其叶片萜内酯含量的主要因子; 筛选出生长性状、叶萜内酯总量具有优势的 3 个优系: C94-16, C95-09 和 C94-56。

关键词: 银杏; 无性系; 萜内酯; 差异性

中图分类号: S664.3; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2020)02-0030-06

Experiment on Difference of Terpene Lactones Content in Leaves of 20 *Ginkgo biloba* Clones

HE Jia-lin, LI Xiao-yu, LI Xiu-hong, JI Zhi-ping

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Experiment were conducted in September 2016 on difference of terpene lactones content in leaves of 20 introduced and selected clones of *Ginkgo biloba*, which were 7-years grafted on 15-18 year rootstocks in Baoji Ginkgo Germplasm Resources Garden, Shaanxi province. The results showed that leaf weight, leaf area, leaf length, leaf number on one tree, tree height and leaf water content were the main factors affecting terpene lactones content. Three clones were selected with better growth traits and total terpene lactones content.

Key words: *Ginkgo biloba*; clones; terpene lactones; difference

银杏 *Ginkgo biloba* 是古老的孑遗植物, 素有“活化石”之称, 现已在全国广泛栽培, 具有极高的研究和开发利用价值。我国拥有世界银杏资源的 70% 以上^[1-6], 开发利用潜力巨大。银杏的叶、果、树皮均可入药, 尤其是叶, 药用价值很高。银杏叶主要含萜内酯 (terpene lactones) 类化合物^[7-9], 对心脑血管疾病具有较好的疗效。

银杏萜内酯被认为是银杏叶中关键的药用活性成分, 银杏叶片萜内酯含量是衡量叶片质量优劣的一个极其重要的指标, 也是选育优良品种的指标之一^[1,4]。本文对陕西宝鸡银杏资源圃引进和筛选的 20 个银杏优良无性系叶片萜内酯的含量进行了差异性分析研究, 旨在为药用银杏品种的选育和开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为陕西宝鸡银杏资源圃引进和筛选的 20 个银杏优良无性系, 见表 1。

收稿日期: 2019-08-30; 修回日期: 2020-01-28

基金项目: 陕西省科技攻关项目 (2012K01-14)

作者简介: 何佳林, 从事经济植物栽培与品种培育研究; E-mail: hejialinhjl@126.com。通信作者: 季志平, 硕士, 从事经济植物栽培与生理研究; E-mail: zhipingji@126.com。

表 1 20 个银杏无性系来源
Table 1 Origin of 20 *G. biloba* clones

序号	无性系	来源	序号	无性系	来源	序号	无性系	来源
1	C94-16	陕西	8	C95-17	陕西	15	陕引 16 号	广西
2	C94-56	陕西	9	马铃 3 号	安徽	16	陕引 17 号	广西
3	C94-68	陕西	10	陕引 6 号	山东	17	陕引 19 号	江苏
4	C95-07	陕西	11	陕引 9 号	日本	18	陕引 21 号	江苏
5	C95-08	陕西	12	陕引 10 号	日本	19	陕引 23 号	浙江
6	C95-09	陕西	13	陕引 11 号	日本	20	陕引 26 号	浙江
7	C95-11	陕西	14	陕引 12 号	江苏			

1.2 试验方法

1.2.1 生长指标测定 2016 年 9 月中旬, 在资源圃对供试银杏进行了生长指标测定。

(1) 用 DQW-2 望远测树仪测定标准树树高, 用围尺测量地径, 并统计树干主要侧枝数及单株产叶数;

(2) 每个无性系随机选取 3 株样株, 在每株样株上、中、下部位的不同方位随机摘取 30 张完全功能叶片带回实验室进行试验测定(以下每项均测定全部叶片, 取平均值): 用游标卡尺测量单叶长、叶宽、叶柄长; 用 EPSON4990 扫描仪(上海迎盛办公设备有限公司)测量单叶叶面积; 用 Olympus 显微镜(上海卓康生物科技有限公司)测量叶厚; 用 BS210S 电子自动天平测定单叶鲜质量及单叶干质量, 并计算叶片含水率:

叶片含水率=(单叶鲜质量-单叶干质量)/单叶鲜质量×100%

(3) 株叶鲜质量采用标准枝调查方法: 清点出标准枝上的总叶片数, 随机摘取上、中、下部位不同方位的叶片 50 片, 带回实验室称量, 计算叶片平均质量, 获得株叶鲜质量。每株样株只选择一枝标准枝, 不重复。

1.2.2 银杏萆内酯含量测定 采用高效液相色谱法^[10-12]。试验所用仪器包括高效液相色谱仪(Waters 公司)、510 泵、Lambda-Max 481 蒸散光检测器、740 数据处理机、色谱柱为 Water Nova-Pak C18 柱(4.6 mm×20 cm)。检测的萆内酯主要包括: 白果内酯(110865-200404)、银杏内酯 A(110862-200305)、银杏内酯 B(110863-200507)和银杏内酯 C(110864-200304)。对照品均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

首先将鲜样叶在 80~90℃鼓风烘箱中烘干 15~30 min, 然后降温至 60~70℃, 烘干至恒重, 用研钵或带刀片的磨样机粉碎, 过 60 目筛装瓶备用。每个测试材料取干燥粉碎叶片 500 mg, 用 5 mL 10% 甲醇水溶液提取 15 min, 过滤, 将滤液按每秒 1 滴的速度过聚酰胺柱, 然后蒸发滤液, 残渣用甲醇溶解, 加入少量苯甲醇和水。色谱流动相为水-甲醇-二氢呋喃(7:2:1), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 219 nm, C18 柱。

银杏干叶萆内酯含量 (mg·kg⁻¹) = $G \cdot LS \times 106R \times 1.045M$

式中, G 为峰面积; LS 为内标(苯甲醇)峰面积; M 为银杏叶质量; R 为分离度, 是相邻色谱峰保留时间之差与两色谱峰峰宽均值之比。

1.2.3 数据处理及分析方法 采用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据处理。对试验数据进行方差分析、相关性分析、逐步回归分析后找出影响银杏萆内酯含量的相关规律并建立回归模型。从各生长指标间单因素相关性分析结果中剔除 5 个相关性较弱的因子(侧枝数、叶基角、株叶数、叶柄长、地径), 对 20 个品种的 10 个指标进行主成分分析(Principal Components)。分别采用不旋转法(None)、方差最大法(Varimax)、四次方最大法(Quartimax)、等量最大法(Equamax)和斜交旋转法(Promax), 计算出相关系数矩阵及其特征值、各主成分的贡献率和累积贡献率, 以累积贡献率大于 85%的原则选择主成分。在主成分分析的基础上, 通过聚类分析法选择具有优良品性的叶用银杏无性系。

采用主成分分析方法, 将累计贡献率>85%的各个主成份的权重系数分别乘以各指标原始数据后求其与萆内酯含量之间相关性。

2 结果与分析

2.1 银杏叶总萆内酯含量与生长指标相关性分析

对 20 个银杏无性系的生长指标和叶总萜内酯含量进行了测定, 将主要性状测定结果的平均值列于表 2, 并统计分析各性状指标的标准偏差。

表 2 20 个银杏无性系的平均生长指标和叶总萜内酯含量
Table 2 Average growth traits and total terpene lactones of 20 tested clones

无性系	叶长 /cm	叶宽 /cm	叶柄长 /cm	叶厚 /mm	叶面积 /cm ²	叶鲜质 量/g	叶干 质量/g	含水率 /%	株叶数 /片	树高 /m	地径 /cm	总萜内酯 /(mg·kg ⁻¹)
C94-16	7.33	9.98	7.65	0.4	42.91	1.42	0.72	49.30	9 475	5.40	4.75	2 712
C94-56	6.78	9.34	5.80	0.4	36.97	1.11	0.58	47.75	8 768	5.93	3.36	4 235
C94-68	6.06	8.97	5.75	0.3	34.81	0.86	0.32	62.79	7 038	4.37	2.63	3 298
C95-07	4.95	7.86	5.35	0.4	28.24	0.75	0.44	41.33	13 092	4.73	3.17	1 985
C95-08	7.23	9.57	9.25	0.4	47.37	1.64	0.83	49.39	4 964	4.63	2.53	2 297
C95-09	7.06	10.03	6.61	0.4	49.34	1.75	1.02	41.71	6 909	3.20	2.85	2 738
C95-11	5.79	8.69	4.77	0.3	31.68	0.88	0.52	40.91	8 323	2.23	3.50	3 386
C95-17	5.77	9.16	5.52	0.4	36.46	1.08	0.64	40.74	2 395	2.80	4.37	2 923
马铃 3 号	6.30	8.56	6.27	0.4	34.19	0.86	0.39	54.65	2 294	2.33	2.47	4 597
陕引 6 号	5.93	11.59	5.53	0.4	34.79	1.02	0.37	63.73	1 690	3.63	4.37	4 986
陕引 9 号	5.30	8.43	6.55	0.4	29.35	0.83	0.47	43.37	2 385	3.00	4.47	2 702
陕引 10 号	4.91	8.30	6.10	0.3	27.26	0.75	0.28	62.67	4 462	2.60	5.37	2 911
陕引 11 号	5.62	9.16	6.00	0.3	35.00	0.97	0.44	54.64	1 802	2.33	4.00	3 432
陕引 12 号	5.59	8.05	5.87	0.3	29.58	1.01	0.35	65.35	2 280	2.43	3.70	2 095
陕引 16 号	5.88	9.12	5.46	0.4	36.05	1.16	0.44	62.07	4 112	2.43	5.67	2 126
陕引 17 号	5.01	7.70	5.06	0.4	25.94	0.73	0.34	53.42	6 867	4.57	6.67	1 932
陕引 19 号	6.58	8.72	6.09	0.4	36.44	1.22	0.78	36.07	6 847	3.20	2.27	2 879
陕引 21 号	6.34	8.57	6.38	0.5	34.22	1.00	0.65	35.00	4 090	3.30	2.80	1 975
陕引 23 号	9.91	9.50	5.24	0.4	39.54	1.33	0.50	62.41	4 151	3.00	2.10	2 793
陕引 26 号	6.03	8.70	6.31	0.4	36.17	0.94	0.44	53.19	4 408	3.70	2.80	3 128
标准差	1.126	0.884	0.985	0.052	6.121	0.286	0.194	9.929	3 043	1.098	1.248	859.41

从表 2 可以看出, 仅按叶总萜内酯的含量比较, 以陕引 6 号、马铃 3 号的叶总萜内酯含量最高。进一步方差分析(表 3)表明, 银杏叶总萜内酯含量与叶宽、叶柄长和叶厚呈弱线性正相关关系; 与树高、叶长、叶面积、叶鲜质量、叶干质量呈强线性正相关关系, 其中与树高、叶长、叶干质量之间达到极显著相关($P<0.01$), 其相关系数分别为 0.695, 0.565, 0.640; 与地径呈弱线性负相关关系; 与叶含水率呈强线性负相关关系, 其相关系数为-0.480。根据以上结果, 说明树高、叶长、叶面积、叶鲜质量、叶干质量越大且叶含水率越低的银杏无性系, 其叶总萜内酯含量越大。

表 3 叶总萜内酯含量与银杏各生长指标间相关性分析
Table 3 Correlation analysis on total terpene lactone with growth traits

项目	树高	地径	叶长	叶宽	叶柄长	叶面积	叶厚	叶鲜质量	叶干质量	叶含水率
总萜内酯 相关系数	0.695	-0.286	0.565	0.214	0.178	0.483	0.404	0.476	0.640	-0.480
<i>P</i> 值	0.001	0.222	0.009	0.364	0.454	0.031	0.077	0.034	0.002	0.032

由表 3 可以看出, 银杏叶总萜内酯含量分别与树体指标中的树高, 叶形指标中的叶长、叶面积, 叶质量指标中的叶鲜质量、叶干质量、叶含水率存在显著或极显著相关关系, 但与叶形指标中的叶宽、叶柄长和叶厚相关性较弱。根据以上结果, 说明树体指标和叶形指标中各指标对银杏叶总萜内酯含量的影响并不一致, 所以, 只能确定叶片质量指标对银杏总萜内酯含量有显著影响。

2.2 主成分分析

叶萜内酯含量高的无性系, 其株叶萜内酯总量不一定高, 因为影响银杏株叶萜内酯总量的指标很多, 它们间相互关联而且所反映的侧重点各不相同, 因此, 需要从诸多性状指标中筛选几个新的综合变量, 而又不丢失原来多个性状指标所提供的主要信息, 从而简化数据结构, 降低分析难度。主成分分析无疑提供了极佳的手段。

2.2.1 特征值和特征向量 主成分的特征值和贡献率是选择主成分的依据。表 4 把原有 10 个原性状指标转化为 10 个主成分的详细信息。从表 4 中可以看出, 第 1 个主成分的特征值为 5.6, 方差贡献率为 55.6%, 代表了全部

性状 55.6%的信息, 是最主要的主成分。

表 4 主成分的特征值、贡献率和累积贡献
Table 4 Eigenvalue and contribution rate and cumulative contribution rate of principal components

成分	特征值	贡献率/%	累计百分数/%	成分	特征值	贡献率/%	累计百分数/%
1	5.6	55.6	55.6	6	0.1	1.1	99.1
2	2.4	23.6	79.3	7	0.1	0.6	99.7
3	1.1	10.6	89.9	8	0	0.2	99.9
4	0.6	5.8	95.7	9	0	0.1	100
5	0.2	2.3	98.0	10	0	0.0	100

第 2 个主成分的特征值为 2.4, 方差贡献率为 23.6%。第 3 个主成分的特征值为 1.1, 方差贡献率为 10.6%。其他主成分的贡献率依次明显减少。前 3 个主成分的累计贡献率达到 89.9% (>85%), 表明前 3 个主成分已经代表了全部因子 89.9%的综合信息, 其余成分所起的作用很小。从图 1 可看出, 3 个主成分在空间分布范围内呈现明显的差异。因此, 选取前 3 个主成分作为影响株叶内酯总量的重要主成分, 分别用 F_1 , F_2 , F_3 表示。

2.2.2 各主成分与株叶萜内酯总量的相关性分析

根据主成分各载荷因子所占权重命名各主成分 (表 5): 第一主成分为叶综合因子; 第二主成分为叶产量因子; 第三主成分为叶质量因子。上述 3 个主成份累计方差贡献率达到 89.886%, 可以很好地反映原指标所包含的绝大部分信息, 这说明该 3 个主成分是表征萜内酯总量的关键因子, 具有较强的综合代表性、分析的可靠性和稳定性。

将 3 个主成分的各权重系数分别乘以各指标原始数据后求其与株叶萜内酯总量间的相关性。从计算结果可以看出, 3 个主成分均与株叶萜内酯总量相关性较高 (表 6)。说明第一主成分中占较大载荷因子的是叶鲜质量、叶面积、叶长和叶干质量, 第二主成分中占较大载荷因子的是株叶数、株叶鲜质量、株叶干质量和树高, 第三主成分中占较大载荷因子的是叶含水率和叶厚。进一步证实上述 10 个生长指标就是影响银杏萜内酯的主要指标。

2.3 聚类分析

应用统计分析软件 DPS 软件包中提供的聚类分析应用程序, 采用欧氏连接距离法对这 20 个供试材料进行 Q 型聚类分析。为了消除指标间数量级差异对聚类分析结果的影响, 对原始数据采用极大值标准化法处理再进行聚类分析, 计算欧氏距离使用的统计量取用主成分分析中的转换数据。聚类结果如图 2 所示。由图 2 可知, 在欧氏连接距离 $\lambda = 431.25$ 时, 根据生长指标和株叶萜内酯总量把 20 个银杏无性系分为性状差异明显的 5 个大类, 第 I 类: C94-16, C95-09 和 C94-56; 第

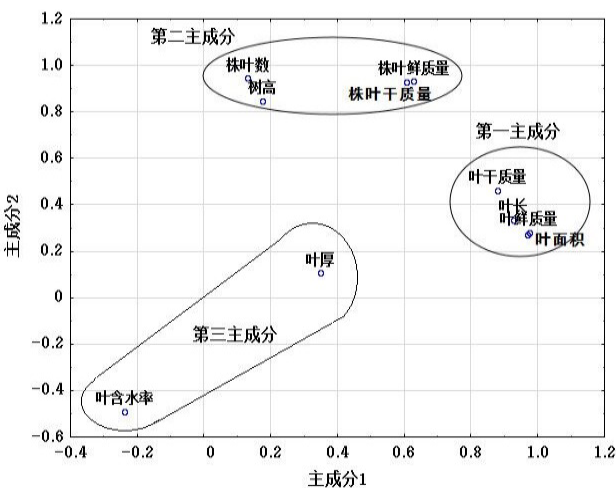


图 1 3 个主成分空间分布图

Figure 1 Spatial distribution of 3 principal components

表 5 因子载荷矩阵
Table 5 Factor loading matrix

因子	主成分		
	1	2	3
叶鲜质量	0.975	0.230	0.466
叶面积	0.973	0.235	0.437
叶长	0.917	0.332	0.315
叶干质量	0.868	0.391	0.829
株叶数	0.120	0.944	0.398
株叶鲜质量	0.624	0.907	0.572
株叶干质量	0.599	0.888	0.711
树高	0.157	0.891	0.182
叶含水率	-0.206	-0.438	-0.862
叶厚	0.646	0.137	0.750

表 6 主成分与株叶萜内酯总量相关性分析
Table 6 Correlation analysis on principal components and total terpene lactones

项目		F_1	F_2	F_3
株叶萜内酯总量	相关系数	0.925**	0.889**	0.913**
	Sig.	0	0	0

Ⅱ类：C95-07, C95-11 和陕引 19；第Ⅲ类：C94-68, C95-08；第Ⅳ类：C95-17, 陕引 17 号, 马岭 3 号, 陕引 10 号, 陕引 16 号, 陕引 21 号, 陕引 23 号和陕引 26 号；第Ⅴ类：陕引 6 号, 陕引 9 号, 陕引 11 号和陕引 12 号。

对聚类分析所得的 5 类银杏无性系主要生长指标及株叶萜内酯总量进行比较分析, 结果见表 7。从表 7 中可以看出, 第Ⅰ、第Ⅱ类无性系的叶含水率、株叶数、株叶鲜质量和株叶干质量较第Ⅲ、第Ⅳ、第Ⅴ类有明显的优势, 而这些指标恰恰是影响株叶萜内酯总量最主要的因素。单从叶萜内酯的含量看, 陕引 6 号、马岭 3 号的叶萜内酯含量最高, 但产量都极低, 株叶萜内酯总量小, 所以未能归入第Ⅰ类和第Ⅱ类。虽然第Ⅲ类的叶长、叶面积、叶鲜质量、叶干质量均大于第Ⅱ类, 但影响株叶萜内酯总量的指标株叶数、株叶鲜质量、株叶干质量却低于第Ⅱ类, 因此, 若以药用成分银杏萜内酯总产量为目的选择栽培无性系, 则适宜在第Ⅰ、第Ⅱ类中选择优势材料。综合以上分析结果得出, C94-16, C95-09 和 C94-56 可以作为药用银杏的优选材料。

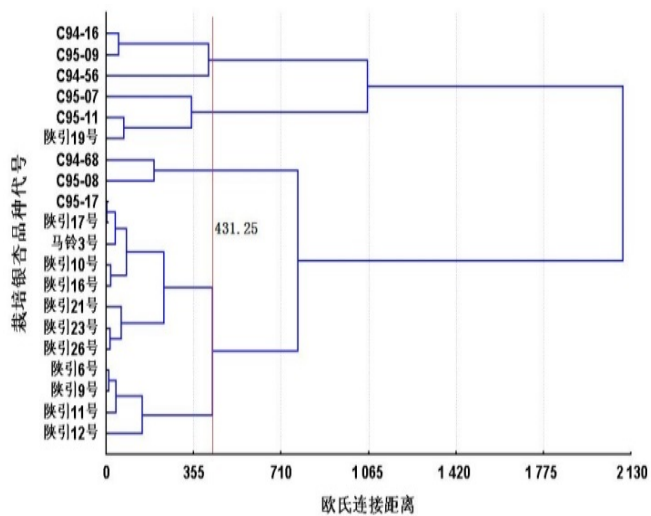


图 2 银杏无性系萜内酯总量聚类分析
Figure 2 Cluster analysis on total terpene lactones in 20 clones

表 7 聚类分析结果主要性状对比
Table 7 Cluster analysis on main traits

项目	第Ⅰ类	第Ⅱ类	第Ⅲ类	第Ⅳ类	第Ⅴ类
树高	4.84	4.98	4.50	3.10	2.85
叶长	7.06	5.37	6.65	5.97	5.61
叶面积	43.07	29.96	41.09	34.04	32.18
叶鲜质量	1.43	0.82	1.25	1.01	0.96
叶干质量	0.77	0.48	0.58	0.50	0.41
叶含水率	0.46	0.41	0.57	0.52	0.57
株叶数	8 384	10 708	6 001	4 403	2 039
株叶鲜质量	12 019	8 541	7 083	4 417	1 941
株叶干质量	6 422	5 039	3 183	2 204	832
叶总萜内酯含量	3 228	2 750	2 797	2 798	3 303
株叶萜内酯总量	20 730	13 857	8 903	6 167	2 748

3 结论与讨论

(1) 银杏叶萜内酯含量与其生长指标间存在一定的相关性, 银杏叶萜内酯含量与叶宽、叶柄长和叶厚呈弱线性正相关关系; 与树高、叶长、叶面积、叶鲜质量、叶干质量呈强线性正相关关系, 其中与树高、叶长、叶干质量达到极显著相关关系, 而与叶含水率呈强线性负相关关系。但是, 银杏叶萜内酯的含量不是受单一因素的调控, 而是受到包括光照、温度、土壤湿度等综合条件影响, 光照等环境因素又与植物自身的生理调节存在着密切的联系^[13]。也就是说, 银杏叶萜内酯受多个环境因素的综合调控, 外部环境不仅影响银杏的生长发育, 而且通过对银杏的生理调节作用来影响银杏叶萜内酯含量。

(2) 主成分分析表明, 占较大载荷因子的叶质量、叶面积、叶长、树高和叶含水率是影响银杏萜内酯含量的主要因子。

(3) 聚类分析结果表明, C94-16, C95-09 和 C94-56 三个银杏无性系的生长性状、叶总萜内酯含量及株叶萜内酯总量方面比其他无性系具有综合优势, 因此, 可以从这三个优系中选育最适合以药用成分银杏萜内酯为目标的银杏栽培优良无性系。

(4) 本研究只针对 20 个银杏无性系叶萜内酯含量的差异性进行了研究, 而对引起这些差异的内在机理尚不明确, 有待于今后进一步深化研究。

参考文献:

- [1] 邢世岩. 银杏种质资源评价与良种选育(上)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 231-262.
- [2] 李新明. 我国银杏产销态势与发展策略[J]. 林业科技开发, 2000, 14(1): 3-14.
- [3] 辜夕容, 江亚男, 倪亚兰, 等. 叶用银杏的良种选育与定向培育研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(15): 3218-3226.
- [4] 郁万文, 刘新亮, 曹福亮, 等. 不同银杏无性系叶药用成分差异及聚类分析[J]. 植物学报, 2014, 49(3): 292-305.
- [5] 康志雄, 吕爱华, 杨在娟, 等. 银杏叶用栽培研究进展[J]. 浙江林业科技, 2002(4): 22-26.
- [6] 王莉, 陈鹏, 程英, 丁峰, 等. 银杏种核贮藏保鲜技术的研究及应用进展[J]. 浙江林业科技, 2002(6): 33-38.
- [7] 管玉民, 王健. 气候、季节、树龄对银杏叶中总黄酮含量的影响[J]. 中成药, 2000, 22(5): 368.
- [8] 曾献, 龚玉子, 王焕皎. 银杏叶的药理作用[J]. 湖南林业科技, 2008, 35(1): 6-8.
- [9] 王金凤, 陈卓梅, 韩素芳, 等. 四种彩叶树种挥发性有机化合物成分分析[J]. 浙江林业科技, 2015(4): 35-40.
- [10] 钱大玮, 鞠建明, 朱玲英, 等. 不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总萜内酯的含量变化[J]. 中草药, 2002, 33(11): 1025-1027.
- [11] 陈香爱, 袁志芳, 张兰桐. HPLC 法测定银杏叶粉针中总黄酮醇苷和萜类萜内酯[J]. 中草药, 2007(9): 1333-1335.
- [12] 王国霞, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 不同地区银杏花粉黄酮和萜内酯含量的差异性[J]. 南京林业大学学报, 2007(3): 34-38.
- [13] 朱俊, 许锋, 廖咏玲, 等. 银杏萜内酯调控研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 301-305.