

矮壮素对银杏叶片光合代谢与萜内酯生物合成的影响

许 锋¹, 张威威¹, 孙楠楠¹, 李琳玲², 程水源^{2,*}, 王 燕³

(¹长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025; ²黄冈师范学院经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北黄冈 438000; ³黄冈市林业局, 湖北黄冈 438000)

摘 要: 为探讨矮壮素 (CCC) 调控银杏叶萜内酯生物合成的机理, 以 3 年生银杏实生苗为试材, 研究了 0、0.5、1.0 和 2.0 g·L⁻¹ CCC 处理对银杏叶光合作用、光合色素、可溶性糖和萜内酯含量的影响, 并采用实时定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 检测了对银杏萜内酯合成途径中 5 个关键基因表达水平的影响。结果表明, 0.5、1.0 和 2.0 g·L⁻¹ CCC 处理均可显著提高银杏叶光合作用速率, 气孔导度, 细胞间 CO₂ 浓度, 蒸腾速率, 以及叶绿素、类胡萝卜素和可溶性糖的含量。在 1.0 和 2.0 g·L⁻¹ CCC 处理下, 银杏内酯 A、银杏内酯 B、白果内酯和总萜内酯含量显著高于对照。qRT-PCR 分析结果显示 CCC 处理能显著上调银杏内酯合成途径中 4 个关键基因 (*DXS*、*DXR*、*GGPPS*、*LPS*) 的表达, 表明 CCC 在分子水平上可能是通过诱导内酯合成关键基因表达来促进内酯的生物合成。

关键词: 银杏; 矮壮素; 光合作用; 可溶性糖; 萜内酯; 关键基因

中图分类号: S 664.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 12-2253-08

Effects of Chlorocholine Chloride on Photosynthesis Metabolism and Terpene Trilactones Biosynthesis in The Leaf of *Ginkgo biloba*

XU Feng¹, ZHANG Wei-wei¹, SUN Nan-nan¹, LI Lin-ling², CHENG Shui-yuan^{2,*}, and WANG Yan³

(¹College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; ²Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000, China; ³Department of Forestry of Huanggang, Huanggang, Hubei 438000, China)

Abstract: In order to study the regulation mechanism of chlorocholine chloride (CCC) on the biosynthesis of terpene trilactones, effects of CCC on photosynthesis, the contents of photosynthetic pigment, soluble sugar and terpene trilactones, and the expression level of key genes involved in ginkgolide biosynthesis in *Ginkgo biloba* leaves were investigated. The three-year-old ginkgo seedlings were foliar sprayed with 0 (control), 0.5, 1.0 and 2.0 g·L⁻¹ CCC. The results showed that 0.5, 1.0, and 2.0 g·L⁻¹ CCC treatments significantly enhanced the net photosynthetic rate, stomatal conductance, intercellular CO₂ concentration, transpiration rate, and the contents of chlorophyll, carotenoids and soluble sugar in ginkgo leaves. The contents of ginkgolide A, B and bilobalide in ginkgo leaves treated

收稿日期: 2011-05-24; **修回日期:** 2011-11-23

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2006ABA005); 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2011CDA117); 湖北省教育厅高校产学研合作项目 (CXKY2009B009); 湖北省科技攻关重大项目 (2004AA204B03); 荆州市科技发展计划项目 (20041PB06)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: s_y_cheng@sina.com)

with 1.0 and 2.0 g · L⁻¹ CCC were significantly higher than those of control. The results of qRT-PCR analysis indicated that the expression levels of four key genes involved in terpene trilactones biosynthesis, namely *DXS*, *DXR*, *GGPPS* and *LPS*, were all markedly up-regulated by CCC treatment, indicating that CCC promoted terpene trilactones accumulation by inducing the expression of key genes related with ginkgolide biosynthesis.

Key words: *Ginkgo biloba*; chlorocholine chloride; photosynthesis; soluble sugar; terpene trilactone; key gene

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 萜内酯是银杏中独有的成分, 具有重要的药用价值 (Strmøgaard & Nakanishi, 2004)。目前研究较多的是银杏内酯 A (ginkgolide A, GA)、银杏内酯 B (GB)、银杏内酯 C (GC) 和白果内酯两类 (bilobalide, BB) (van Beek & Montoro, 2009)。由于银杏含萜内酯含量很低, 探索适宜提高银杏萜内酯含量的方法极有必要。

矮壮素 (chlorocholine chloride, CCC) 是赤霉素拮抗剂, 是常用的植物生长抑制剂, 能使植物矮化, 提高作物产量。亦有研究表明 CCC 也能促进植物次生代谢产物的积累, 最早由 Grebinskii 和 Khmil (1980) 发现外源施用 CCC 能增加卷心菜和紫鸭拓草中花青苷的含量。程水源等 (2004) 的研究结果表明叶面喷施 CCC 能显著提高银杏叶黄酮含量。尽管冷平生等 (2004) 也报道了叶面喷施 CCC 能增加银杏萜内酯含量, 但有关 CCC 调节银杏萜内酯含量的生理与分子机制尚未见报道。

作者研究了 CCC 处理对银杏光合作用、碳水化合物代谢、萜内酯含量以及萜内酯合成途径中关键基因表达水平的影响, 旨在探讨外源 CCC 调控萜内酯生物合成的生理与分子机制, 为 CCC 在银杏萜内酯的生产应用上提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与 CCC 处理

供试材料为银杏种子繁殖的 3 年生实生苗, 用于繁殖银杏的种子采自品种为 ‘家佛手’ 的 15 年生嫁接苗, 从 2006 年 3 月播种后一直生长于装满砂土 (河沙: 腐殖土为 1:2) 的陶瓷花盆中 (直径 25 cm, 高 40 cm, 每盆一株), 每盆用 100 mL 的液态化肥 (含有 0.36 g N、0.12 g P、0.14 g K) 浇灌, 每隔 5 d 灌溉 1 次。

试验于 2009 年 3—7 月在长江大学园艺园林学院玻璃温室内进行, 选取 36 株生长健壮且整齐一致的银杏苗作为试材。

将 CCC 溶液处理设置为 4 个浓度, 即 0 (对照)、0.5、1.0 和 2.0 g · L⁻¹ (含有 0.01% Tween 20, pH 5.8) (冷平生 等, 2004)。结合 Wang 等 (2009, 2010) 以及本研究组前期 CCC 处理提高银杏叶片类黄酮的试验方案 (程水源 等, 2004), 本试验将处理时间设置为以下方式: 待银杏苗有 4 片新叶完全展开后开始进行 CCC 处理, 对银杏苗全株叶片喷施, 包括叶片正反面, 使全部叶片表面湿润, 每 2 周喷洒 1 次, 25 mL, 处理时间为 8 周。每个处理设 3 个小区, 每个小区设 3 株重复, 4 个处理共计 36 株银杏苗。CCC 处理结束 2 周后于 2009 年 7 月 8 日上午 8 点至 11 点进行光合作用测定, 测定完毕后分别采收所有处理植株的叶片, 每个处理各采收 9 株银杏苗, 每株采收 20 片生长良好的叶片, 从叶柄基部剪去叶片立即以液氮速冻, 并迅速带回实验室保存于 -80 °C 冰箱中用于其它指标的测定。

1.2 检测方法

光合作用参数使用 Li6400 便携式光合作用系统测定, 在每株银杏苗自上而下的第 5 片叶上进行。

叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量的测定参照 Wellburn (1994) 的方法进行, 以 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜样 (FW) 表示。

可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法, 以 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜样 (FW) 表示。

银杏内酯 GA、GB、GC 和白果内酯 BB 含量的分析采用大口径毛细管气相色谱法完成 (廖咏玲 等, 2008)。总萜内酯含量以 GA、GB、GC 和 BB 含量的总和来表示。标准品购自于 Sigma-Aldrich (USA) 公司。萜内酯浓度以 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干样 (DW) 表示。

银杏萜内酯合成途径中关键基因表达量的检测采用实时定量 PCR 分析 (quantitative real-time RT-PCR, qRT-PCR)。5 个萜内酯关键基因分别为 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合成酶基因 (1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, *DXS*), 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, *DXR*), 2-C-甲基-D-赤藻醇-4-磷酸胞苷酰转移酶基因 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase, *MECT*), 香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因 (geranylgeranyl diphosphate synthase, *GGPPS*) 和左旋海松二烯合成酶基因 (levopimaradiene synthase, *LPS*)。利用改良的 CTAB 法提取各银杏叶样品的 RNA (蔡荣 等, 2007)。使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒进行 cDNA 第 1 条链的合成。选用看家基因 *18S rRNA* 为内参基因。分别根据内参基因和目的基因的序列来设计荧光定量引物, 引物序列与基因序列的 GenBank 登录号见表 1。qRT-PCR 使用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒。定量检测使用 TaKaRa 公司的 SYBR Green 荧光定量技术, 并使用相对定量法中的 Ct 值比较法计算结果。qRT-PCR 反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM II (2x) 12.5 μL , Forward primer 1 μL , Reverse primer 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 8.5 μL , 共 25 μL 。qRT-PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 40 个循环。

所有样品均重复测定 3 次, 所有测定的数据用 DPS 数据处理系统进行处理, 差异显著采用 Duncan's 新复极差法测验分析 ($P < 0.05$)。

表 1 银杏萜内酯合成关键基因表达分析引物

Table 1 The primers for expression analysis of the key genes involved in terpene trilactones biosynthesis

基因名称 (登录号)	正义引物 (5'-3')	反义引物 (5'-3')
Gene (Accession No.)	Forward primer	Reverse primer
<i>DXS</i> (AY494185)	GCGAGAGTGGAAGTGGGTG	ACCGCTACAACATGGTTTCTTT
<i>DXR</i> (AY494186)	CAGCAATAGAAGCAGGGAAGG	AGTTGAGCTAGAACCAGGA
<i>MECT</i> (DQ102360)	AACACCGTTCCAGTTCATT	TTCACCTCAGACATGCGAGA
<i>GGPPS</i> (AY371321)	TGTAGGAGGAACGGAGGATC	ATCGGGCATACTTCTTGTT
<i>LPS</i> (AF331704)	CACGCGACATCGAAATCAAG	GGGAGATGAAAGGGAGGTGA
<i>18S</i> (D16448)	ATAACAATACTGGGCTCATCG	TTCGCAGTGGTTCGTCTTTC

2 结果与分析

2.1 CCC 处理对银杏叶片光合作用的影响

如表 2 所示, 0.5、1.0 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCC 的处理均能显著提高银杏叶片中净光合速率 (P_n), 气孔导度 (G_s), 胞间 CO_2 浓度 (C_i) 和蒸腾速率 (T_r), 并且 CCC 对上述光合参数的增效随着处理浓度的增加而增加, 表明 CCC 处理能显著提高银杏叶片的光合作用。

表 2 CCC 对银杏叶片中光合作用参数的影响
Table 2 Effects of CCC on the photosynthetic parameters in ginkgo leaves

CCC/ (g · L ⁻¹)	<i>P_n</i> / (μmol · m ⁻² · s ⁻¹)	<i>G_s</i> / (mol · m ⁻² · s ⁻¹)	<i>C_i</i> / (μL · L ⁻¹)	<i>T_r</i> / (mmol · m ⁻² · s ⁻¹)
0(对照 Control)	10.26 ± 0.38 c	0.218 ± 0.012 c	296.61 ± 21.59 c	1.27 ± 0.06 d
0.5	12.51 ± 1.07 b	0.251 ± 0.016 b	318.37 ± 18.62 b	1.39 ± 0.12 c
1.0	15.16 ± 0.72 a	0.247 ± 0.021 b	327.84 ± 9.73 a	1.46 ± 0.12 b
2.0	15.85 ± 0.19 a	0.294 ± 0.020 a	331.52 ± 17.11 a	1.65 ± 0.08 a

注：同列中不同字母表示在 5%水平上差异显著。下同。
Note: Values in each column followed by different letters mean significant difference at *P* < 0.05 level. The same below.

2.2 CCC 处理对银杏叶片光合色素及可溶性糖含量的影响

如表 3 所示，0.5、1.0 和 2.0 g · L⁻¹ CCC 处理的叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素浓度均显著高于对照。其中 1.0 g · L⁻¹CCC 处理下的叶绿素 a 含量最高，2.0 g · L⁻¹CCC 处理下的叶绿素 b 和类胡萝卜素含量最高。

可溶性糖测定结果表明，0.5、1.0 和 2.0 g · L⁻¹CCC 处理的可溶性糖含量均显著高于对照（表 3），比对照分别高 21.4%、8.6%和 28.7%，表明 CCC 对银杏叶碳水化合物的积累可能具有促进作用。

表 3 CCC 对银杏叶片中光合色素参数的影响
Table 3 Effects of CCC on the contents of photosynthetic pigments in ginkgo leaves / (mg · g⁻¹ FW)

CCC/ (g · L ⁻¹)	叶绿素 a Chlorophyll a	叶绿素 b Chlorophyll b	类胡萝卜素 Carotenoids	可溶性糖 Soluble sugar
0(对照 Control)	0.99 ± 0.05 c	0.43 ± 0.03 b	0.124 ± 0.008 c	11.85 ± 0.33 c
0.5	1.25 ± 0.09 b	0.48 ± 0.04 b	0.173 ± 0.013 b	14.39 ± 0.43 ab
1.0	1.49 ± 0.10 a	0.63 ± 0.03 a	0.155 ± 0.004 b	12.87 ± 0.26 b
2.0	1.24 ± 0.02 b	0.67 ± 0.05 a	0.249 ± 0.011 a	15.25 ± 0.17 a

2.3 CCC 处理对银杏叶片萜内酯含量的影响

从表 4 可以看出，除银杏内酯 C 含量不受 CCC 处理的影响外，浓度为 1.0 和 2.0 g · L⁻¹ CCC 处理的银杏内酯 A、银杏内酯 B、白果内酯及总萜内酯含量均显著高于对照，且以 2.0 g · L⁻¹ 的含量最高，相对于对照分别提高了 18.6%、12.5%、17.5%和 14.8%，表明 CCC 能促进银杏叶萜内酯的积累。

表 4 CCC 对银杏叶 GA、GB、GC、BB 和总萜内酯含量的影响
Table 4 Effects of CCC on the contents of GA, GB, GC, BB and total terpene trilactones of ginkgo leaves / (μg · g⁻¹ DW)

CCC/ (g · L ⁻¹)	银杏内酯 A Ginkgolide A	银杏内酯 B Ginkgolide B	银杏内酯 C Ginkgolide C	白果内酯 Bilobalide	总萜内酯 Total terpene trilactones
0(对照 Control)	48.72 ± 2.10 c	32.65 ± 1.54 b	31.42 ± 0.99 a	146.84 ± 2.88 c	259.63 ± 7.34 c
0.5	53.81 ± 3.45 ab	30.41 ± 0.88 c	30.88 ± 1.08 a	148.61 ± 4.36 c	263.71 ± 3.60 c
1.0	52.09 ± 1.29 b	35.83 ± 2.31 a	31.17 ± 1.24 a	160.25 ± 4.38 b	281.34 ± 11.46 b
2.0	57.76 ± 2.80 a	36.72 ± 1.75 a	31.89 ± 1.17 a	172.59 ± 5.62 a	297.96 ± 8.21 a

2.4 CCC 处理对银杏萜内酯合成途径中关键基因表达的影响

为检测 RNA 反转录成 cDNA 的质量是否符合后续 qRT-PCR 分析，选用表 1 中银杏萜内酯合成关键基因的特异引物进行了 qRT-PCR 检测，qRT-PCR 图谱见图 1。如图 1 所示，PCR 产物荧光定量显示 *GGPPS*、*DXR*、*DXS*、*LPS* 与 *MECT* 基因特异引物扩增产物的荧光曲线均成 S 型，而且在 23

至 40 个循环之间, 除负对照扩增产物的荧光定量无明显变化以外, 所有 qRT-PCR 扩增产物的荧光定量均呈对数增长, 表明在 qRT-PCR 体系中成功扩增出 *GGPPS*、*DXR*、*DXS*、*LPS* 与 *MECT* 基因片段, 说明 cDNA 质量、特异引物匹配以及 PCR 程序均达到下一步目的基因表达量的定量分析的要求。

为研究 CCC 处理对银杏萜内酯生物合成途径中相关基因转录水平的影响, 检测了有关银杏萜内酯合成的 5 个关键基因的表达水平。结果如图 2 所示, *DXS* 与 *DXR* 的表达水平在 1.0 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCC 处理下均显著高于对照, *GGPPS* 的表达水平在 0.5 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下均显著高于对照, *LPS* 的表达水平在 0.5、1.0 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCC 处理下均显著高于对照, 而 *MECT* 的表达水平在 0.5、1.0 和 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCC 处理下与对照均无显著差异。基因表达分析结果表明 CCC 能诱导银杏萜内酯合成途径中部分关键基因的表达。

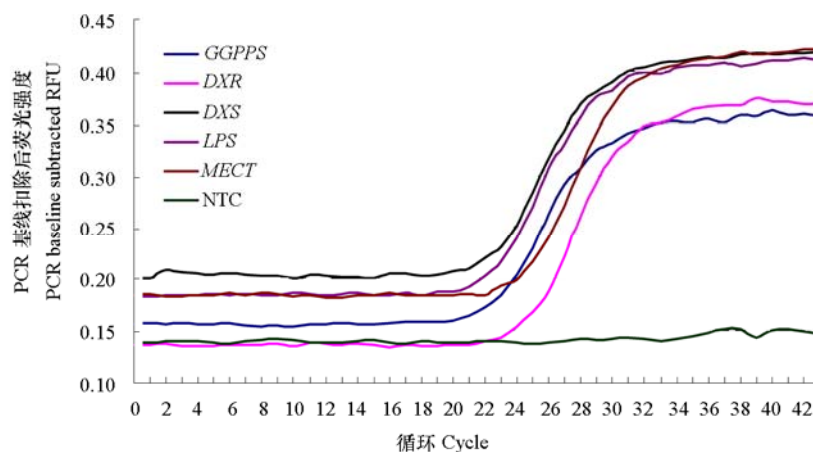


图 1 以银杏 cDNA 为模板 qRT-PCR 扩增萜内酯关键基因产物获得的荧光定量曲线

银杏萜内酯生物合成途径中关键基因: *GGPPS*、*DXR*、*DXS*、*LPS* 和 *MECT*;

NTC: 无模板的负对照。

Fig. 1 Fluorescence quantitative curves of key genes products involved in terpene trillactone biosynthesis amplified by qRT-PCR as ginkgo cDNA template

The key genes involved in ginkgolide biosynthesis in *Ginkgo biloba*: *GGPPS*, *DXR*, *DXS*, *LPS* and *MECT*;

NTC: Negative template control.

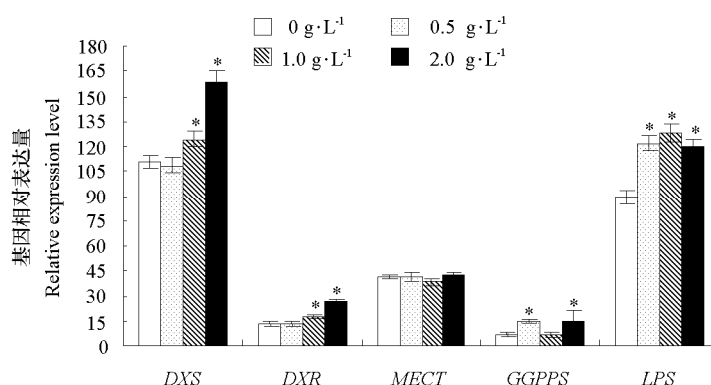


图 2 不同浓度 CCC 处理下银杏萜内酯合成途径中 5 个关键基因的表达分析

* 表示基因表达水平显著高于对照 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Gene expression analysis of 5 key genes involved in ginkgolide under different CCC treatments

* Means that the level of gene expression is significantly higher than the control ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究显示 CCC 处理能显著提高银杏叶萜内酯含量, 这与冷平生等 (2004) 的研究结果相似。但有关于 CCC 对银杏叶萜内酯合成的调节机理国内外尚无研究报道。本研究结果表明 CCC 处理能显著提高银杏叶光合作用 (表 2), 这与前人用 CCC 处理马铃薯的结果 (Wang & Xiao, 2009) 一致, 其作用机制可能与 CCC 处理使叶片厚度、光合色素含量以及气孔活性的增加有关 (Tezuka et al., 1989; 蔡葛平等, 2008; Wang et al., 2009)。本试验结果显示 CCC 处理能显著提高银杏叶光合色素的含量也进一步证实了上述观点。本研究组前期研究结果显示银杏叶萜内酯含量与叶绿素含量高度正相关 (廖咏玲, 2007), 因此 CCC 处理促进银杏叶萜内酯积累的原因之一可能缘于 CCC 处理显著提高了银杏叶绿素含量 (表 3)。

许多假说解释了碳元素化合物在植物次生代谢产物分配中的表型与进化模式 (Heyworth et al., 1998; Mosaleeyanon et al., 2005)。例如, 根据“代谢溢流学说”, 当碳元素化合物超过植物生长所需求的量时, 过量的碳水化合物就会转向用于植物次生代谢产物的合成 (Matsuki, 1996)。基于此, CCC 处理使银杏叶萜内酯含量的增加可能归因于 CCC 提高银杏叶中碳水化合物含量, 如可溶性糖含量 (表 3)。也有研究认为 CCC 对植物次生代谢的促进作用可能是在底物水平上。Jain 和 Guruprasad (1989) 认为 CCC 提高萝卜的花青素含量是通过提高氨基酸含量, 尤其使花青素代谢的底物苯丙氨酸含量显著增加, 故提出 CCC 是在底物水平上调节花青素的合成。至于 CCC 是否也在底物水平上调控银杏萜内酯含量尚需进一步研究 CCC 对萜内酯合成底物的影响。

关于银杏内酯的生物合成途径目前已经比较清楚。银杏内酯的 MEP 合成途径主要以来源于三羧酸循环的丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-P) 为底物, 经过定位于质体的 MEP 途径合成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate) 和二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate), 二者再经过一系列羟化和酰化等酶促反应最终合成银杏内酯 (Schwarz & Arigoni, 1999; Eisenreich et al., 2001)。近年来国内外学者已从银杏中克隆到银杏内酯合成途径中部分酶基因, 并发现银杏内酯含量与其关键酶基因的表达水平密切相关, 如 *DXS* (Gong et al., 2006)、*IDS* (Kim et al., 2008)、*DXR* 与 *LPS* (Kim et al., 2006), 它们的基因表达水平与银杏内酯含量呈明显的正相关。本试验结果显示 CCC 能显著诱导银杏内酯 MEP 途径中的 4 个关键酶基因 (*DXS*、*DXR*、*GGPPS* 与 *LPS*) 的表达, 暗示了除在生理水平外, CCC 在分子水平上也能调控银杏内酯的合成, 通过上调关键酶基因的表达从而提高关键酶活性, 促进银杏内酯的积累。而且本研究组正在克隆上述关键基因的启动子序列, 以期通过分析启动子序列中是否存在响应 CCC 调控的顺式作用元件以及相关顺式作用元件的功能, 进一步阐明 CCC 调控萜内酯合成的分子机理。

前人的研究证明香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 是质体中所有萜类化合物的一个关键前体物质 (Schwarz & Arigoni, 1999), 银杏萜内酯和赤霉素的合成来源于以 GGPP 为起点的不同代谢分支。CCC 能抑制赤霉素合成途径中下游产物的合成, 尤其是抑制从 GGPP 到贝壳杉烯 (ent-kaurene) 的转化 (Rademacher, 2000), 而贝壳杉烯是赤霉素生物合成的直接前体。据此朱俊等 (2007) 提出假设: 通过施用外源赤霉素, 利用反馈抑制银杏体内赤霉素的合成, 可能使 GGPP 朝着银杏萜内酯的合成方向转化。因此, 笔者认为在本试验中 CCC 对萜内酯合成的促进作用有可能是通过阻断赤霉素生物合成的分支途径, 从而加速 GGPP 向萜内酯转化的合成途径。

银杏叶萜内酯含量是银杏叶商品质量的重要指标之一, 本研究结果显示外源 CCC 处理能显著提高银杏叶萜内酯含量, 表明叶面喷施 CCC 可作为提高银杏叶片经济价值的一个有效途径。在本试验中, 3 种 CCC 浓度对于提高银杏叶片光合作用、光合色素、可溶性糖以及萜内酯含量的效果各不相

同,其中以 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的效果最佳。冷平生等 (2004) 的研究结果显示 CCC 处理浓度在 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对萜内酯含量的提高效果优于 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 本试验结果与冷平生等 (2004) 的报道不一致,可能缘于不同树龄的银杏材料。本试验中所用的试材为 3 年生银杏实生苗,而冷平生等 (2004) 所用试材为 2 年生银杏苗。CCC 是水溶性的生长调节剂,进入叶片蜡质层的速度依赖于 CCC 的浓度与蜡质层的厚度,这就造成了不同浓度对不同树龄银杏苗上述生理指标的影响效果也不同,而且本试验中所使用的最大处理浓度为 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,因此在后续的研究中应增加 CCC 的处理浓度并设置处理时间梯度,以便筛选出提高银杏叶萜内酯含量最佳处理浓度与处理时间。此外,CCC 的残留问题也受到了越来越多的关注,尽管 CCC 在银杏叶片加工成药用产品或茶叶过程中会逐渐消除,然而作为银杏制药加工原料生产的采叶园仍需要严格实施 GAP (Good Agricultural Practices, 良好管理规范) 管理,因此在银杏叶片的生产过程中对 CCC 残留量的检测亦需引起足够重视,在增加体外 CCC 处理浓度的同时要严格控制银杏体内 CCC 浓度的残留限量。

References

- Cai Ge-ping, Guo Yan-hong, Yao Hui, Chen Shi-lin, Zhou Tong-shui. 2008. Impacts of cycocel and gibberellin on the biomass and flavonoid production in *Scutellaria baicalensis* Georgi. Chinese Agricultural Science Bulletin, 24 (7): 213 - 217. (in Chinese)
- 蔡葛平, 郭燕红, 姚 辉, 陈士林, 周铜水. 2008. 矮壮素和赤霉素对黄芪生物量及根中黄酮类成分产量的影响. 中国农学通报, 24 (7): 213 - 217.
- Cai Rong, Xu Feng, Chen Liu-ji, Cheng Shui-yuan. 2007. Modification of total RNA isolation method from different *Ginkgo biloba* organs. Biotechnology, 17 (4): 38 - 41. (in Chinese)
- 蔡 荣, 许 锋, 陈柳吉, 程水源. 2007. 银杏不同组织的总 RNA 提取方法的改进. 生物技术, 17 (4): 38 - 41.
- Cheng Shui-yuan, Wang Yan, Fei Yong-jun, Zhu Gui-cai. 2004. Studies on the effects of different treatments on flavonoids contents in *Ginkgo biloba* leaves and their regulating mechanism. Journal of Fruit Science, 21 (2): 116 - 119. (in Chinese)
- 程水源, 王 燕, 费永俊, 朱桂才. 2004. 提高银杏叶黄酮含量的措施及其调控机理的研究. 果树学报, 21 (2): 116 - 119.
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends in Plant Science, 6: 78 - 84.
- Gong Y F, Liao Z H, Guo B H, Sun X F, Tang K X. 2006. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Planta Medica, 72: 329 - 335.
- Grebinskii S O, Khmil M V. 1980. Effect of CCC on biosynthesis of anthocyanin in leaves of red cabbage and spiderwort. Fiziologiyal Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii, 12: 409 - 412.
- Heyworth C J, Iason G R, Temperton V, Jarvis P G, Duncan A J. 1998. The effect of elevated CO_2 concentration and nutrient supply on carbon based plant secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. Oecologia, 115, 344 - 350.
- Jain V K, Guruprasad K N. 1989. Effect of chlorocholine chloride and gibberellic acid on the anthocyanin synthesis in radish seedlings. Physiologia Plantarum, 75 (2): 233 - 236.
- Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, Song K S, Kim S U. 2006. Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis. Planta Medica, 72: 234 - 240.
- Kim S M, Kuzuyama T, Kobayashi A, Sando T, Chang Y J, Kim S U. 2008. 1-Hydroxy-2-methyl-2- (E) -butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. Planta, 227: 287 - 298.
- Leng Ping-sheng, Su Shu-chai, Jiang Xiang-ning, Wang Tian-hua, Wang Sha-sheng. 2004. Distribution of terpene lactones in *Ginkgo biloba* and the regulation effect of chlorocholine chloride on their biosynthesis. Journal of Plant Resources and Environment, 13 (2): 54 - 55. (in Chinese)
- 冷平生, 苏淑钗, 蒋湘宁, 王天华, 王沙生. 2004. 银杏萜内酯的分布与矮壮素对其生物合成的调节. 植物资源与环境学报, 13 (2): 54 - 55.

- Liao Yong-ling. 2007. Studies on change and distribution of terpene trilactone and its regulation in *Ginkgo biloba* leaves[M. D. Dissertation]. Jingzhou: Yangtze University. (in Chinese)
- 廖咏玲. 2007. 银杏叶萜内酯含量分布、变化规律及调控措施的研究[硕士论文]. 荆州: 长江大学.
- Liao Yong-ling, Xu Feng, Zhu Jun, Wang Yan, Cheng Shui-yuan. 2008. Separation and determination of terpene trilactones by gas chromatography with wide bore capillary column. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 17 (1): 146 - 149. (in Chinese)
- 廖咏玲, 许 锋, 朱 俊, 王 燕, 程水源. 2008. 大口径毛细管气相色谱分离和测定银杏叶萜内酯的方法建立. *西北农业学报*, 17 (1): 146 - 149.
- Matsuki M. 1996. Regulation of plant phenolic synthesis: From biochemistry to ecology and evolution. *Australian Journal of Botany*, 44 (6): 613 - 634.
- Mosaleeyanon K, Zobayed S M A, Afreen F, Kozai T. 2005. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in *St. John's wort*. *Plant Science*, 169: 523 - 531.
- Rademacher W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 501 - 503.
- Schwarz M, Arigoni D. 1999. Ginkgolide biosynthesis // Cane D. *Comprehensive natural products chemistry* (vol. 2). Oxford: Pergamon Press: 367 - 400.
- Strmøgaard K, Nakanishi K. 2004. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. *Angewandte Chemie International Edition*, 43: 1640 - 1658.
- Tezuka T, Takahara C, Yamamoto Y. 1989. Aspects regarding the action of CCC in hollyhock plants. *Journal of Experimental Botany*, 40: 689 - 692.
- van Beek T, Montoro P. 2009. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2): 2002 - 2032.
- Wang H, Li H, Liu F, Xiao L. 2009. Chlorocholine chloride application effects on photosynthetic capacity and photoassimilates partitioning in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 119: 113 - 116.
- Wang H, Xiao L. 2009. Effects of chlorocholine chloride on phytohormones and photosynthetic characteristic in potato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 21 - 27.
- Wang H, Xiao L, Tong J, Liu F. 2010. Foliar application of chlorocholine chloride improves leaf mineral nutrition, antioxidant enzyme activity, and tuber yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 125: 521 - 523.
- Wellburn A R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307 - 313.
- Zhu Jun, Xu Feng, Liao Yong-ling, Wang Yan, Cheng Shui-yuan. 2007. Progress in studies of ginkgolides contents regulating. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (7): 301 - 305. (in Chinese)
- 朱 俊, 许 锋, 廖咏玲, 王 燕, 程水源. 2007. 银杏萜内酯调控研究进展. *中国农学通报*, 23 (7): 301 - 305.

征 订

《新编拉汉英植物名称》

本书收集具有经济价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称 55 800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照,按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用,也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价:185 元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。