

银杏叶超临界流体提取物对杉木种子的发芽效应

林思祖¹, 郑燕萍¹, 曹光球¹, 杜 玲², 王爱萍¹

(1. 福建农林大学林学院,福建 南平 353001;2. 内蒙古师范大学生物系,内蒙古 呼和浩特 010020)

摘要:采用正交试验设计 L₈(2⁷)及超临界萃取技术,乙醇作夹带剂,就银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶提取物对杉木 [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.]种子的发芽效应进行了生物检测。结果表明:不同萃取条件下,纯CO₂及夹带剂和CO₂混合萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽的影响不同;就 RI 值(敏感指数)而言,在纯 CO₂萃取的浓度为 200 mg/kg 银杏叶提取物中,杉木种子绝对发芽率为 0.23,绝对发芽势为 0.15,胚根长为 0.01,胚轴长为 -0.02;夹带剂和CO₂混合萃取的浓度为 200 mg/kg 银杏叶提取物除了对杉木种子绝对发芽率和绝对发芽势表现为促进作用外(RI 值分别为 0.03 和 0.34),对胚根长及胚轴长则表现为轻微的抑制作用(RI 值分别为 -0.09 和 -0.03)。

关键词:银杏叶提取物;杉木;种子发芽试验;药用植物

中图分类号: Q946.91; Q948.12⁺ 2.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)03-0020-05

**Effects of the extract from *Ginkgo biloba* leaves extracted by supercritical fluid extraction on seed germination of Chinese fir LIN Si-zu¹, ZHENG Yan-ping¹, CAO Guang-qiu¹, DU Ling², WANG Ai-ping¹
(1. Forestry College of Fujian Agriculture and Forestry University, Nanping 353001, China; 2. Biology Department of Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010020, China.), J. Plant Resour. & Environ. 2003, 12(3): 20-24**

Abstract: The extract of *Ginkgo biloba* L. leaves extracted by supercritical CO₂ fluid extraction under orthogonal experimental design L₈(2⁷) was used to analysis allelopathic activity to Chinese fir [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.] through bioassay of seed germination of Chinese fir. The results showed the extract of *G. biloba* leaves extracted by different extraction conditions had different effects on seed germination. As far as RI value was concerned, the extract (200 mg/kg) of *G. biloba* leaves extracted by pure CO₂ had a positive effect on absolute germination rate, absolute germination power and plumular root length (The RI values were 0.23, 0.15 and 0.01, respectively), but had the weakly inhibitory effect on plumular axis length (RI value was -0.02). The extract (200 mg/kg) of *G. biloba* leaves extracted by entrainer mixed with CO₂ had a positive effect on absolute germination rate and absolute germination power of Chinese fir (the RI values were 0.03 and 0.34, respectively), but had a weakly inhibitory effect on plumular root length and plumular axis length (the RI values were -0.09 and -0.03, respectively).

Key words: extract of *Ginkgo biloba* L.; Chinese fir; seed germination experiment; medicinal plant

杉木 [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.] 是我国南方重要的用材树种,广泛栽培于南方各省区。杉木栽培模式大都以纯林连栽为主,这种栽培方式会造成地力衰退、自毒物质积累及铝毒害等弊端^[1,2]。林下非木质利用不仅能防治林地的地力衰退,而且也可提高单位面积的经济效益,近来这种栽培模式越来越受到重视。

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是我国特有的集药用、食用、林用、防护和观赏为一体的重要经济树种,其体内所含的多种天然活性成分具有化痰、止咳、通经、利尿以及预防和治疗心脑血管疾病等功效。林下套种药用植物,不仅可以提高林地的利用率及经

济效益,而且生产的药用植物具有高效、无污染等特点。俞新妥等在研究混交造林与人工林持续速生丰产关系时提到,杉木林早期与油桐和山苍子等经济作物混栽,经营后期在林下套种砂仁、黄连和绞股蓝等,可以更有效地发挥杉木人工林生态系统的生产能力和生态功能^[3]。以往,人们对杉木与混交树种生化关系的研究,主要是集中于用材树种上,而与药

收稿日期: 2003-03-12

基金项目: 福建省科学技术委员会重大课题资助项目(2002S003)

作者简介: 林思祖(1953-),男,福建福清人,博士,教授,博士生导师,主要从事森林培育、化学生态及药用植物开发与利用等领域的研究。

用植物如银杏等种类的种间生化关系却未见报道^[4~7]。因此,本研究通过正交试验和超临界流体萃取技术提取银杏叶提取物,采用杉木种子发芽试验检测银杏叶提取物对杉木种子的发芽效应,预期从生化角度研究银杏与杉木种间生物化学关系,为今后提高杉木林的经济效益、防治杉木人工林地力衰退及合理种植与开发银杏种质资源提供新的途径和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源与处理

银杏叶由建瓯市富健银杏保健品有限公司的银杏叶用园提供。试验前,所采集的银杏鲜叶先放入烘箱内40℃烘干,之后用微型植物粉碎机粉碎,过18目筛,备用。乙醇为分析纯;CO₂(纯度≥99%)由三明液化汽厂提供;萃取仪器为江苏南通华安超临界萃取有限公司生产的HA221-50-06型超临界CO₂萃取装置。

1.2 银杏叶提取物的萃取及浓缩

银杏叶提取物采用超临界流体萃取技术萃取,试验采用正交试验设计L₈(2⁷),因素及水平设置见表1,夹带剂为无水乙醇。在每一萃取参数条件下,利用超临界萃取及分离的特点,先用CO₂萃取完全后,再加入夹带剂萃取剩余部分,共4次重复。萃取所得的提取物分别用不同锥形瓶封装,真空浓缩后置于冰箱内低温保存备用。

表1 银杏叶提取物超临界萃取正交试验表[L₈(2⁷)]

Table 1 Orthogonal experiment design [L₈(2⁷)] of supercritical fluid extraction of *Ginkgo biloba* L. leaves

实验号 Number	因素 Factor			
	CO ₂ 流量 CO ₂ flux (kg/h)	温度 Temperature (℃)	压力 Pressure (mPa)	时间 Time (h)
1	35	35	20	2
2	45	35	30	2
3	35	45	30	2
4	45	45	20	2
5	35	35	30	1
6	45	35	20	1
7	35	45	20	1
8	45	45	30	1

1.3 实验添加液的配制

从浓缩所得的每一组分中分别称取0.04 g提

取物,用2 mL的无水乙醇溶解后,加入198 mL的蒸馏水配制成浓度为200 mg/kg的待用母液,然后分别稀释成浓度为100和50 mg/kg的试验添加液(各试验添加液的乙醇含量均为1×10⁴ mg/kg)。对照为1×10⁴ mg/kg的乙醇溶液。

1.4 生物检测

生物检测方法为杉木种子发芽试验,整个发芽试验在人工气候箱中进行,温度为(25±2)℃,湿度为60%±2%,芽床由直径为9 cm的定量滤纸和培养皿构成。实验前,将培养皿置于烘箱内120℃消毒2 h;人工气候箱用1%的福尔马林溶液擦洗后,闷2~3 d使用;实验前杉木种子先用清水漂洗除去空粒,再用0.15%的福尔马林溶液浸泡30 min,绞干后闷0.5 h灭菌,最后将消毒过的种子置于45℃的蒸馏水中自然冷却浸种24 h。每个培养皿放置100粒均匀一致的种子,重复3次。对照为1×10⁴ mg/kg的乙醇溶液。安置发芽的当天为第1天,每天加入1 mL的试验添加液,第3天后开始观察、统计发芽粒数。第12天结束实验,并于结束试验当天测量胚根长及胚轴长。

1.5 数据处理

发芽率和发芽势均为反映林木种子品质的重要指标。前者反映种子发芽能力,后者反映种子发芽速度快慢。由于杉木种子涩粒较多,采用绝对发芽率和绝对发芽势进行生物检测。采用Williamson提出的敏感指数RI作为衡量化感作用的指标:RI=1-C/T(当T≥C);RI=T/C-1(当T<C),其中C为对照值,T为实测值,RI为化感效应,RI>0时表示促进作用,RI<0为抑制作用,RI的绝对值代表作用强度的大小^[8]。用t检验对数据进行差异显著性检验。

$$\text{绝对发芽率} = [\text{总发芽数}/(100 - \text{涩粒数})] \times 100\%$$

$$\text{绝对发芽势} = [\text{发芽最多那一天发芽的总粒数}/(100 - \text{涩粒数})] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 纯CO₂萃取的银杏叶提取物对杉木种子的发芽效应

不同萃取条件下纯CO₂萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽的影响见表2,表2的生物检测结果

表明,各处理组杉木种子的发芽效应不同,其中萃取条件1、3和7萃取的银杏叶提取物对杉木种子的发芽效应表现为100 mg/kg 处理组的促进作用强度大于50及200 mg/kg 处理组;萃取参数4表现为50 mg/kg 处理组对杉木种子发芽的促进效应大于100及200 mg/kg 处理组;萃取条件5提取的银杏叶提取物200 mg/kg 处理组的促进作用强度大于50及100 mg/kg 处理组;萃取条件6提取的银杏叶提取物100 mg/kg 处理组对杉木种子发芽的促进作用强度大于200及50 mg/kg 处理组。不同检测指标对同一萃取条件不同浓度银杏叶提取物及同一浓度不同萃取条件的银杏叶提取物的反应不一,如萃取条件3提取的银杏叶提取物50、100及200 mg/kg 处理组对杉木

种子绝对发芽率表现为不同程度的促进作用,与乙醇对照相比,其RI值分别为0.23、0.21和0.01;就绝对发芽势而言,50和100 mg/kg 处理组显示了促进作用,其促进作用强度分别为0.34和0.39,而200 mg/kg 处理组表现为抑制作用,其抑制作用强度为0.49;而对胚轴及胚根这些检验指标而言,各浓度均表现为抑制作用。但就总体而言,纯CO₂萃取的不同浓度银杏叶提取物对杉木种子发芽各指标表现为一定程度的促进作用。

2.2 夹带剂和CO₂混合萃取的银杏叶提取物对杉木种子的发芽效应

夹带剂和CO₂混合萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽效应见表3。由表3可知,不同萃取条件

表2 纯CO₂萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽的效应¹⁾

Table 2 Effect of the extract of *Ginkgo biloba* L. leaves extracted by pure CO₂ on seed germination of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.¹⁾

萃取条件 Extraction condition	提取物浓度 Concentration (mg/kg)	绝对发芽率(%) Absolute germination rate		绝对发芽势(%) Absolute germination power		胚根长(cm) Plumular root length		胚轴长(cm) Plumular axis length	
		RI 值 RI value	±	RI 值 RI value	±	RI 值 RI value	±	RI 值 RI value	±
1	50	0.21	1.73	0.37	4.19**	-0.01	0.18	0.05	1.08
	100	0.42	1.52	0.40	0.08	0.13	0.77	0.25	0.88
	200	0.29	1.98	0.23	1.31	-0.08	0.79	0.03	0.82
2	50	0.28	1.97	0.45	1.20	-0.13	3.08*	-0.07	5.56**
	100	0.24	1.99	0.27	3.43*	0.20	3.45*	0.08	0.48
	200	0.43	2.00	0.43	0.31	0.09	2.86	0.06	4.93***
3	50	0.23	1.63	0.34	1.37	-0.13	2.38	-0.08	2.75*
	100	0.21	1.94	0.39	0.47	-0.12	0.45	-0.07	0.96
	200	0.01	1.70	-0.49	21.10**	-0.11	1.07	-0.13	2.30
4	50	0.32	1.04	0.44	6.28**	0.02	1.04	-0.04	1.33
	100	0.12	1.54	0.42	0.88	-0.21	1.88	-0.38	5.00**
	200	-0.18	1.75	-0.35	9.17**	-0.21	0.37	-0.22	1.80
5	50	0.21	1.11	0.34	4.89**	0.10	5.92**	0.04	1.41
	100	0.13	1.96	-0.07	3.24*	0.24	2.83	-0.03	0.71
	200	0.33	0.01	0.44	2.18	0.21	0.66	0.13	4.35**
6	50	0.07	1.12	-0.19	5.30**	-0.17	5.66**	-0.13	2.54
	100	0.32	1.06	0.49	2.38	0.23	7.35**	0.27	25.37**
	200	0.31	1.14	0.17	0.37	0.22	26.33**	0.24	1.22
7	50	0.43	1.41	0.57	2.44	-0.03	1.57	-0.07	2.94*
	100	0.37	0.17	0.37	8.78**	0.17	0.33	0.21	0.06
	200	0.34	0.23	0.38	0.11	0.10	1.73	0.09	1.22
8	50	0.39	1.70	0.38	0.33	0.21	0.09	0.26	1.14
	100	0.21	0.72	0.16	0.81	0.17	0.15	0.12	0.70
	200	0.31	1.07	0.37	0.78	-0.18	7.12**	-0.38	10.94**
平均效应 Average effect	50	0.27		0.34		0.04		-0.01	
	100	0.25		0.30		0.12		0.06	
	200	0.23		0.15		0.01		-0.02	
CK(EtOH) CK(EtOH)	1×10 ⁴	26.85		15.71		0.90		0.67	

¹⁾ 1. CO₂ 35 kg/h, 35℃, 20 mPa, 2 h; 2. CO₂ 45 kg/h, 35℃, 30 mPa, 2 h; 3. CO₂ 35 kg/h, 45℃, 30 mPa, 2 h; 4. CO₂ 45 kg/h, 45℃, 20 mPa, 2 h; 5. CO₂ 35 kg/h, 35℃, 30 mPa, 1 h; 6. CO₂ 45 kg/h, 35℃, 20 mPa, 1 h; 7. CO₂ 35 kg/h, 45℃, 20 mPa, 1 h; 8. CO₂ 45 kg/h, 45℃, 30 mPa, 1 h。表中数据为3个重复的平均值 The data in the table were the average of three replications. * P<0.05, ** P<0.01。

下夹带剂和 CO₂混合萃取的不同浓度银杏叶提取物对杉木种子发芽的效果不同。总体上,用萃取条件 2、7 和 8 萃取的不同浓度的银杏叶提取物处理杉木种子,其效应表现为 200 mg/kg 处理组大于 50 及 100 mg/kg 处理组;萃取条件 1 和 4 萃取的银杏叶提取物 100 mg/kg 处理组的效应大于 50 及 200 mg/kg 处理组;萃取条件 5 表现为 200 mg/kg 处理组大于 100 及 50 mg/kg 处理组;不同的检测指标对同一萃取条件不同浓度银杏叶提取物及同一浓度不同萃取条件的银杏叶提取物的反应不一,如萃取条件 1 萃取的银杏叶提取物 50、100 及 200 mg/kg 处理组对杉木种子绝对发芽势表现为不同程度的促进作用,与乙醇对

照相比,其 RI 值分别为 0.28、0.14 和 0.32,对绝对发芽率、胚根长和胚轴长等指标则表现为不同程度的抑制作用。从平均效应上看,夹带剂和 CO₂混合萃取的银杏叶提取物除了对杉木种子绝对发芽势有促进作用外,对其余的指标则表现为略微的抑制作用。

3 结论与讨论

评价一种植物对另一种植物化感效应的生物检测方法很多,其中种子发芽试验是较常采用的 1 种方法^[9]。从本文可看出,不同萃取条件下萃取的银

表 3 夹带剂和 CO₂混合萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽的效应¹⁾

Table 3 Effect of the extract of *Ginkgo biloba* L. leaves extracted by CO₂ and entrainer on seed germination of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.¹⁾

萃取条件 Extraction condition	提取物浓度 Concentration (mg/kg)	绝对发芽率(%) Absolute germination rate		绝对发芽势(%) Absolute germination power		胚根长(cm) Plumular root length		胚轴长(cm) Plumular axis length	
		RI 值 RI value	t	RI 值 RI value	t	RI 值 RI value	t	RI 值 RI value	t
1	50	-0.14	3.46*	0.28	2.58	-0.21	2.43	-0.07	0.66
	100	-0.02	2.33	0.14	1.55	-0.13	2.19	0.01	1.46
	200	-0.04	1.46	0.32	0.93	-0.22	2.50	-0.11	0.15
2	50	-0.01	0.18	0.24	1.78	-0.12	1.43	-0.32	2.38
	100	-0.09	0.65	0.03	0.22	-0.12	0.70	-0.20	1.71
	200	-0.02	0.24	0.14	0.67	-0.08	0.73	-0.05	10.83**
3	50	-0.08	0.23	0.28	1.17	-0.15	18.23**	0.06	9.92**
	100	0.04	1.17	0.09	3.09*	-0.04	3.46*	-0.04	1.06
	200	-0.05	0.61	0.41	2.24	-0.27	3.45*	0.03	4.69**
4	50	0.03	3.14*	0.30	1.61	-0.26	0.26	-0.26	1.46
	100	0.08	2.77	0.22	0.00	-0.08	7.25**	-0.01	12.30**
	200	0.07	1.00	0.20	3.15*	-0.22	2.86	-0.16	0.66
5	50	0.00	0.21	0.25	0.35	0.00	3.86*	-0.03	3.24*
	100	0.09	0.67	0.39	1.95	0.09	0.73	0.08	1.39
	200	0.20	1.32	0.55	2.12	0.09	3.53*	0.16	7.88**
6	50	0.03	2.36	0.23	4.78**	0.02	7.91**	0.13	0.86
	100	-0.14	0.78	0.20	1.61	-0.07	0.69	-0.19	1.78
	200	0.05	5.44**	0.23	3.45*	0.02	2.70	0.00	0.78
7	50	0.12	0.81	0.20	1.39	-0.08	4.62**	-0.10	2.18
	100	-0.03	5.22**	0.33	2.14	-0.26	5.73**	-0.20	6.05**
	200	0.03	0.30	0.33	2.68	0.04	8.43**	0.15	3.47*
8	50	0.03	2.00	0.10	1.93	-0.28	4.03*	-0.08	1.34
	100	-0.07	0.55	0.32	3.36*	-0.28	2.05	-0.25	0.65
	200	0.00	0.92	0.52	5.10**	-0.09	0.92	-0.26	2.07
平均效应 Average effect	50	-0.02		0.21		-0.14		-0.02	
	100	-0.02		0.19		-0.11		-0.01	
	200	0.03		0.34		-0.09		-0.03	
CK(EtOH)	1×10^4	45.70		18.94		1.18		0.84	

¹⁾ 1. CO₂ 35 kg/h, 35℃, 20 mPa, 2 h; 2. CO₂ 45 kg/h, 35℃, 30 mPa, 2 h; 3. CO₂ 35 kg/h, 45℃, 30 mPa, 2 h; 4. CO₂ 45 kg/h, 45℃, 20 mPa, 2 h; 5. CO₂ 35 kg/h, 35℃, 30 mPa, 1 h; 6. CO₂ 45 kg/h, 35℃, 20 mPa, 1 h; 7. CO₂ 35 kg/h, 45℃, 20 mPa, 1 h; 8. CO₂ 45 kg/h, 45℃, 30 mPa, 1 h. 表中数据为 3 个重复的平均值 The data in the table were the average of three replications. * P < 0.05, ** P < 0.01.

杏叶提取物对杉木种子的发芽效应表现不一,这主要是由于在不同萃取参数条件下萃取出的银杏叶提取物成分不同所致;杉木种子发芽的不同检测指标对银杏叶提取物的敏感性反应不一,这主要是因为银杏叶提取物中成分繁多,有些成分对杉木种子某些检测指标会产生正面效应,如纯 CO₂萃取的浓度为 200 mg/kg 银杏叶提取物对绝对发芽率和绝对发芽势表现为促进作用,其 RI 值分别为 0.23 和 0.15;有些成分对杉木种子某些检测指标产生负面的效应,如夹带剂和 CO₂混合萃取的浓度为 200 mg/kg 银杏叶提取物对胚根长及胚轴长则表现为轻微的抑制作用,其 RI 值分别为 -0.09 和 -0.03,这与曹光球、黄志群的研究结果类似^[4,7]。

提取物可以通过各种途径分离与纯化^[10~12]。在超临界萃取过程中,通过添加夹带剂,不仅可以增强萃取效果,而且也可达到初步分离的目的,因此,银杏叶提取物先经纯 CO₂萃取完全后,再应用夹带剂萃取剩余部分可达到初步分离的目的。本试验结果显示,纯 CO₂萃取的银杏叶提取物与夹带剂和 CO₂混合萃取的银杏叶提取物对杉木种子发芽具有不同的效应,但总体而言,纯 CO₂萃取的银杏叶提取物更能促进杉木种子的发芽及芽的生长,对杉木生长具有良好的促进作用。至于各萃取参数条件下萃取的银杏叶提取物中的成分,有待于今后的进一步鉴定。

植株主要通过雨雾等水淋溶、枯落叶分解、根系分泌等途径向环境中释放次生代谢物质,从而对植物产生有利或不利的影响,因此,研究银杏叶提取物对杉木种子的发芽效应对营造杉木与银杏混交林具有重要的理论意义和现实意义。但本文只从化感作用的角度论证了杉木与银杏混交的可行性,若将杉木与银杏这种混交经营模式付诸于林业生产实践,

还必须考虑二者的生物学和生态学特性,综合考虑杉木与银杏之间的种间物理关系、种间生物化学关系及种间生态关系;特别是在经营时,还应考虑进行轮作,以避免部分对杉木生长和更新不利的银杏叶分泌物或降解物在杉木林地积累到一定程度后,对杉木起毒害作用。

参考文献:

- [1] 林思祖,黄世国,曹光球,等. 杉木自毒作用的研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(6): 661~664.
- [2] 罗承德,张健,刘继龙. 四川盆周山地杉木人工林衰退与铝毒害阈值的探讨[J]. 林业科学, 2000, 36(1): 9~14.
- [3] 俞新妥,叶功富. 混交造林与人工林的持续速生丰产[J]. 福建林学院学报, 1992, 12(3): 322~326.
- [4] 曹光球,林思祖,刘雁,等. 几个树种化感物质的初步分离与生物测定[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(2): 22~25.
- [5] 尤华明,林思祖,黄志群,等. 几个常见植物种水浸液对杉木叶绿体的影响[J]. 福建林学院学报, 1998, 18(4): 310~314.
- [6] 曹光球,林思祖,黄世国,等. 几个树种枝叶水浸液处理杉木 6 年后其生物量及分配[J]. 西北植物学报, 2002, 22(4): 894~899.
- [7] 黄志群,林思祖,曹光球. 毛竹、苦楠水浸液对杉木种子发芽的效应[J]. 福建林学院学报, 1999, 19(3): 249~252.
- [8] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. J Chem Ecol, 14(1): 181~187.
- [9] Gerald R L, Frank A E. Bioassays in the study of allelopathy [J]. Amer J Bot, 1984, 75(12): 133~149.
- [10] Tang C H, Tong C C. Collection and Identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalta limpopress (*Hemarthria altissima*) [J]. Plant Physiol, 1982, 69: 458~459.
- [11] Thomas S C Wang, Dodson C H. Soil phenolic acids as plant inhibitors [J]. Soil Sci, 1967, 103(4): 239~246.
- [12] Lawongsa P, Thompson G K. Identification of organic acids by HPLC in soil [J]. Soil Sci Plant Nutr, 1987, 33(2): 299~302.