

叶用银杏的良种选育与定向培育研究进展

辜夕容, 江亚男, 倪亚兰, 贾 豪

西南大学资源环境学院, 重庆 400716

摘 要: 银杏叶主要含黄酮类和萜内酯类等药用成分, 其提取物制剂在临床上对心脑血管等疾病的治疗显示出良好效果。为获得优质高产的银杏叶原料, 我国确定了高黄酮、高萜内酯、高产量的叶用银杏良种选育标准, 并筛选出多个优良品种; 研究了品种、性别、树龄、产地、生态环境、采收时期、叶着生部位与枝条类型等对银杏叶有效成分量的影响, 以及施肥、整形修剪、密植等措施在增加银杏叶品质和产量方面的作用。今后仍需坚持对现有资源的搜集、保存、研究和良种选育工作, 并在叶用银杏林的经营管理中推广生产良种化、种植规范化和基地化。

关键词: 银杏; 黄酮; 萜内酯; 叶用林; 良种选育; 定向培育

中图分类号: R282.2; S727.34 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)15-3218-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.030

Research progress on breeding and cultivation of *Ginkgo biloba* for leaf use in China

GU Xi-rong, JIANG Ya-nan, NI Ya-lan, JIA Hao

College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: *Ginkgo biloba* mainly contains many kinds of special flavonoids and terpenolactones in its leaves. The preparation of *Ginkgo biloba* extract is very good for curing patients suffering from cardiovascular and cerebrovascular diseases. In order to get more *Ginkgo biloba* leaves rich in flavonoids and terpenolactones, the rules are set to seek fine varieties including higher contents of flavonoids and terpenolactones, higher leaves yield than ordinary ones. Many fine varieties were selected according to these standards and applied in *Ginkgo* cultivation for leaf use. Factors affecting the contents of active ingredients and the amount of leaves covered *Ginkgo* varieties, sex, age, origin, environment, and harvest time, location in tree's canopy and branches, branch types and so on. The suitable application of fertilizer, trimming, pruning, and planting density will improve the yields of leaves and medicinal components. Future works should focus on two aspects, one is the germplasm resources collection, conservation, studying, and selection, another is directionally cultivation of leaf-used *Ginkgo* using improved varieties and standardized cultivation.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; flavonoids; terpenolactones; leaf-used forest; elite selection breeding; directionally cultivation

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为银杏科银杏属落叶乔木, 第四纪冰川孑遗植物, 素有“活化石”之称, 原为我国特有, 是集果品、药材、饮料、木材等原料和环境美化、绿化于一身的经济林木。自 1965 年德国的 Schwabe 率先从银杏叶中提取出具有治疗心脑血管疾病的成分银杏黄酮和银杏萜内酯, 并首次将其引入医学实践以来, 全球各地掀起了开发银杏叶制剂和制品的热潮^[1], 如今包括美国、欧盟等在内至少有 130 多个国家在销售银杏叶提取物制剂。20 世纪 90 年代起, 银杏叶提取物制剂一直是

治疗心脑血管疾病的首选药物, 在心血管疾病和神经内科多种疾病的联合用药中占据重要地位, 是载入《国家基本药物目录》2012 年版和《低价药目录》的药物。

我国银杏现分布量占世界总量的 70% 以上, 银杏叶提取物加工企业有 300 多家, 行业产能占全球总产能的 50% 以上, 是全球第一大银杏叶提取物生产国^[2]。然而, 这些银杏加工企业普遍存在提取物有效成分含量低的问题, 与国际市场对银杏叶的要求 (黄酮 $\geq 2.4\%$ 、萜内酯 $\geq 0.6\%$) 相比, 我国产出的

收稿日期: 2017-01-15

基金项目: 重庆市林业重点科技攻关项目 (渝林科研 2016-7); 国家自然科学基金资助项目 (31570599)

作者简介: 辜夕容, 博士, 副教授, 主要从事经济林培育与林业生物技术教学科研工作。Tel: 13368361391 E-mail: gxr0956@163.com

银杏叶提取物, 以及银杏叶基地的单位面积产量等还有不少差距。要提升我国银杏叶制剂的品质和产量, 药材种植、采收、加工、贮藏、市场流通、植物提取、制药企业生产等每一个环节的生产质量都必须得到保证。弄清银杏叶有效成分含量变化规律、选育优良品种、配套高效栽培技术、健全药用银杏叶生产基地, 是获得优质、高产银杏叶原料的经济且有效的途径。我国自 20 世纪 90 年代以来, 即开展了上述研究, 并建立了采叶专用银杏园^[3], 在叶用银杏的良种标准、品种选优、高效培育技术等方面获得了一定的成果。

1 叶用银杏的良种选育

近年来, 以银杏叶加工为主的银杏产业在我国发展迅速。但与国际市场相比, 我国银杏叶提取物的产品普遍存在得率不高且其中的有效成分含量低、质量不稳定的问题, 质量差于日韩等国, 这也是目前我国银杏叶提取物符合出口级别的量不多、出口受阻、国际市场上议价能力低下的重要原因^[2]。中国是银杏的起源、进化及分布中心, 拥有大量的资源, 积极开展叶用银杏种质资源研究, 选育并推广有效成分高且稳定的品种, 是叶用银杏林种植中亟待解决的问题^[4], 也是提高我国银杏叶提取物质量和产量, 增加出口创汇的重要手段。

1.1 银杏叶的有效成分

据不完全统计, 到目前为止, 从银杏叶中分离并进行了结构鉴定的化合物已有 200 余种, 有效成分主要是黄酮类和萜内酯类^[5]。此外, 还有聚戊烯醇、多糖、烷基酚酸、甾类、氨基酸和微量元素等^[6]。

黄酮类化合物在银杏叶中量为 1.0%~5.9%^[7]。目前从银杏叶提取物中分离的黄酮类化合物有 40 余种^[8], 主要有 (1) 三羟基黄酮醇及其苷类, 其中槲皮素、山柰素、异鼠李素是银杏叶制剂质量控制的主要指标之一, 占黄酮类化合物的 95% 以上, 能扩张血管、清除自由基、抗动脉硬化等, 是治疗心脑血管系统疾病的主要有效成分^[9]; (2) 双黄酮类, 即二聚体黄酮, 是银杏科植物的特征性化学成分, 具有抗炎、抗组胺作用; (3) 儿茶素类化合物, 有儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素类和表没食子酸儿茶素。

银杏叶中的萜内酯类仅在银杏叶中发现, 具有特殊结构和显著的药理活性, 包括二萜内酯和倍半萜内酯, 为 C-20 萜类化合物。银杏叶中的萜内酯类

化合物有银杏内酯 A、B、C、M、J 和白果内酯等, 有抗血小板活化因子作用, 可以改善血液循环。银杏叶中部分黄酮类和 6 种萜内酯类化合物, 是全球生物唯银杏所特有的, 是数亿年前特殊自然环境下的产物。这些成分具有抗氧化、清除自由基的作用, 能提高人体自身免疫力, 减轻老年斑、护肤、美容、光泽皮肤, 在保护机体不受自由基损伤方面具有十分重要的作用^[10-11]。

此外, 银杏叶中还含有蛋白质、糖、维生素 C、维生素 E, 以及无机元素等营养成分。其中含蛋白质 10.9%~15.5%, 总糖 7.38%~8.05%, 维生素 C 0.668~1.292 mg/g。无机元素主要有 Fe、Zn、Cu、Mn、Cr、Co、Ni、Sr、B、Si、Ni 等人体必需微量元素, Ca、P、K、Na、Mg 等人体必需大量元素^[6]。

酸类成分也是银杏叶中的主要毒性成分, 具有致敏性、细胞毒性和免疫毒性等作用, 质量分数在 0.48%~2.80%^[12]。

1.2 叶用银杏的良种选育标准

选育叶用银杏良种时, 多数认为应首先考虑叶中黄酮和萜内酯的量, 其次才是产量^[13-14]。郁万文等^[4]认为黄酮和萜内酯的量对银杏叶提取物及其制剂的内在质量起着关键作用, 是叶用银杏良种选育的最重要指标; 并以此为标准, 在 54 个银杏无性系中联合复选出总黄酮和萜内酯量都较高的 7 个无性系。吴岐奎等^[15]研究发现, 叶用银杏种质资源在黄酮和萜内酯类成分水平上存在较高的遗传多样性, 68 份种质中银杏内酯 A、B、C、J 和白果内酯 B、银杏总内酯、黄酮的量存在较大差异, 基于黄酮和萜内酯类成分的聚类分析结果与基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析结果一致, 用两者相结合的方法筛选出高黄酮和高萜内酯的银杏叶特异种质 6 份。

产量是叶用银杏良种选育时必须考虑的性状^[14]。我国学者在高黄酮、高萜内酯良种选育的基础上, 筛选出产量较高的无性系, 其最大的特点就是叶片大、肥厚、叶产量高^[13,16-17]。根据银杏加工企业存在有效成分含量低的问题, 以及国际市场对银杏叶的要求 (黄酮 $\geq 2.4\%$, 萜内酯 $\geq 0.6\%$), 参照美国银杏叶丰产采叶园的质量标准, 曹福亮等^[13]确定了叶用银杏的品种选择标准: (1) 叶产量高, 如 3 年生时单株叶产量 ≥ 150 g, 单叶面积 ≥ 36 cm², 叶片厚度 ≥ 0.38 mm, 单叶鲜质量 ≥ 1.0 g; (2) 叶内有效成分高, 特别是黄酮及萜内酯类物质质量高。总黄酮 $\geq 1.5\%$, 萜内酯 $\geq 0.2\%$ 。而陈学森等^[16]在

对 3+3 嫁接苗的 50 个雌株和 6 个雄株的叶片性状进行研究后, 制定的良种选育标准与之类似, 略有不同: (1) 叶产量高, 单叶面积 $\geq 30\text{ cm}^2$, 叶片厚度 $\geq 0.40\text{ mm}$, 单叶鲜质量 $\geq 1.3\text{ g}$; (2) 叶内有效成分高, 总黄酮 $\geq 2.0\%$, 萜内酯 $\geq 0.25\%$ 。

银杏酸是银杏叶的毒性成分, 对人类健康存在潜在危害, 即使微量也能引起严重的不良反应^[18], 是评价银杏叶制剂质量的关键指标之一^[12]。因此姚鑫等^[19]、黄萍^[20]、鞠建明等^[12,21]都认为, 选育叶用银杏良种时, 还应将“总银杏酸量较低”作为标准。

1.3 叶用银杏的优良品种

按照叶内高有效成分、高叶产量, 特别是高黄酮、高萜内酯的良种选育标准, 我国选出了许多优良叶用银杏无性系。郁万文等^[4]在 54 个无性系中选出 7 个, 其总黄酮和总萜内酯量可分别达到 1.53% 和 0.57%;

陈学森等^[16]在 44 个银杏参试品种中, 选出泰山 1 号, 其叶中黄酮质量分数 2.15%、银杏内酯质量分数 0.25%、叶面积 32.19 cm^2 、叶片厚 0.529 mm , 平均单叶质量 1.32 g ; 邢世岩等^[22]采用 Wricke 等方法对基因稳定性进行评价, 在 87 个银杏无性系中选出 4 个高黄酮和高萜内酯的品系, 黄酮质量分数 2.09%~2.57%, 萜内酯质量分数 0.33%~0.41%; 吴岐奎等^[15]在 68 份银杏种质资源中选出 6 份特异性种质, 黄酮和萜内酯质量分数可分别达到 2.48% 和 0.28%。

目前国内各地选育出来的应用较广的叶用银杏优良品种有安陆 1 号等^[13-14](表 1)。其中安陆 1 号、黄酮 F-1 号、黄酮 F-2 号、黄酮 F-3 号为高黄酮叶用品种; 内酯 T-5、内酯 T-6、内酯 GB-5 号为高内酯叶用品种; 高优 Y-2 号、丰产 Y-8 号、丰产 Y-6 号、丰产 Y-3 号、丰产 Y-7 号为高产叶用品种。

表 1 国内各地优选出来的叶用银杏品种及其主要经济性状

Table 1 Fine varieties and principal economic characters of leaf-used *Ginkgo biloba* in China

品种名称	黄酮/%	萜内酯/%	单株叶质量/g	性别	产地	备注
安陆 1 号	2.52	0.21	173	雌	山东	4 年生嫁接苗
黄酮 F-1 号	2.96	0.13	42	雄	山东	1 年生嫁接苗
黄酮 F-2 号	2.61	0.28	124	雌	江苏	1 年生嫁接苗
黄酮 F-3 号	2.23	0.11	29	雄	山东	1 年生嫁接苗
内酯 T-5 号	2.58	0.41	112	雌	山东	1 年生嫁接苗
内酯 T-6 号	1.76	0.36	17	雌	山东	1 年生嫁接苗
内酯 GB-5 号	1.55	0.27	172	雌	山东	1 年生嫁接苗
高优 Y-2 号	1.96	0.21	590	雄	山东	3 年生嫁接苗
丰产 Y-8 号	2.65	0.11	35	雌	江苏	1 年生嫁接苗
丰产 Y-6 号	1.79	0.08	165	雄	广西	1 年生嫁接苗
丰产 Y-3 号	1.84	0.09	95	雄	山东	1 年生嫁接苗
丰产 Y-7 号	2.06	0.18	116	雄	福建	1 年生嫁接苗

2 影响银杏叶中黄酮和萜内酯量的因素

银杏叶在生长、采收和加工过程中, 叶中黄酮及萜内酯的量受到诸多因素的影响, 其中包括品种、性别、树龄、产地、生长环境、采收时期等。了解这些因素对银杏叶品质的影响, 并在生产过程中有针对性地采取适宜的技术措施, 有利于提高叶片的黄酮和萜内酯的量, 从而增加银杏叶提取物中有效成分的量, 达到降低成本、提升品质、增加产出的目的。

2.1 品种

银杏叶中有效成分的量在很大程度上受到遗传基因的控制, 品系不同是影响银杏叶中有效成分量的重要因素之一^[23], 萜内酯量高的品种可达 0.50%~

0.89%, 而低的却在 0.15% 以下^[24]。谢宝东等^[25]在对 20 个半同胞家系和 19 个无性系研究后也发现, 不同家系和无性系间的银杏叶黄酮和萜内酯量差异显著: 家系间叶片黄酮量的变异范围在 3.85%~5.52%, 萜内酯量在 0.13%~0.20%; 无性系间黄酮变异范围在 1.97%~3.86%, 萜内酯量在 0.20%~0.28%。戴余军等^[26]对湖北孝感 10 个银杏品种测定后也发现, 品种间叶黄酮的量 (1.37%~3.25%) 差异显著, 品种佛手 2 的黄酮量是品种金兵卫的 2.37 倍。

2.2 性别

银杏树性别是否影响叶中有效成分的量, 目前说法不一。有研究认为, 叶中黄酮和萜内酯的量与

银杏树的性别有明显关系。姚鑫^[6]测定采收于 10 月上旬雌雄银杏树叶中有效成分后发现, 叶黄酮量因性别不同差异显著, 雌树明显高于雄树; Teris^[27]也认为, 雌树的银杏叶萜内酯量高于雄树。但有的研究却认为, 银杏叶中黄酮和萜内酯的量与性别无关。陈学森等^[16]在对 6 棵雄株和 6 棵雌株进行对比研究后发现, 性别与银杏叶黄酮的量无关; 吴岐奎等^[15]对 68 份种质资源的对比研究后也发现, 雌雄株间银杏叶黄酮和萜内酯的量虽有不同但并无显著差异, 在叶用银杏品种选择时性别可不作为重点指标考虑。邢世岩等^[22]对 87 个银杏无性系研究后也认为性别与叶黄酮的量无明显相关。

2.3 树龄

树龄对银杏叶黄酮和萜内酯的量有明显影响。多数研究认为, 银杏叶黄酮和萜内酯的量随树龄增长而呈递减趋势^[6,28-32], 4~7 年的植株适于采叶^[12], 几年生的幼树比 10 年生以上银杏叶黄酮的量几乎高出 1 倍, 树龄过大的银杏叶有效成分量已很低, 而且 50 年生以上的果用银杏叶总银杏酸量偏高, 几乎不能作银杏叶提取物原料^[6,12,33]。但许锋等^[34]却发现, 5 年生和 9 年生银杏实生苗的萜内酯量都较高且无显著差异, 并且此时叶片产量较多, 均是萜内酯优质高产采叶树的适宜年龄。

虽然研究普遍认为, 10 年生以下银杏的叶黄酮和萜内酯的量明显高于 10 年生以上, 但对银杏叶的有效成分最高含量树龄却众说纷纭, 其中以 1~3 年生的居多。姚鑫^[6]对江苏邳州不同树龄(2、3、4、5、6 年)的银杏叶测定后发现, 2 年生银杏叶的黄酮量最高, 而 3 年生的银杏叶萜内酯量最高; 江德安等^[29]对比 1~3 年生、5~10 年生、15~20 年生银杏叶片后, 发现 1~3 年生的银杏叶黄酮量高出 15 年生以上的近 1 倍。丁银花等^[31]也发现, 2~3 年生的银杏叶品质最佳, 此时总黄酮和萜内酯的量均最高。但崔红芳等^[32]在对江苏徐州 1~10 年及 10 年生以上银杏叶测定后发现, 叶萜内酯量从 1 年左右的最高点逐步下滑, 4~5 年达到第 1 个低峰谷, 6~7 年又升到一个高点, 10 年以后又滑向低谷, 以 1 年生的银杏叶萜内酯量最高。结合高黄酮、高萜内酯、高产量的生产要求, 1 年生的树小叶少, 达不到产量要求, 6~7 年生的银杏更适合用于原材料的生产。

2.4 产地

银杏原为我国特产, 仅分布在极少数省市, 如

今已在经度 98°~124°、纬度 22°~42°, 海拔 30~2 500 m 的 20 多个省、直辖市和自治区的多种生态环境下有自然分布。地理生态环境条件的极大差异, 导致各产地银杏叶有效成分量的千差万别。王弘等^[35]以江苏等 17 个省市 35 个产地的银杏叶为样品, 测定出叶黄酮量范围在 0.35%~1.26%, 高低相差 3.6 倍, 以产量大的江苏邳州、广西兴安、贵州正安、湖北安陆等地的银杏叶黄酮量较高。姚鑫^[6]发现, 辽宁等 13 个省市的 19 个产地中, 黄酮量较高的产地也是江苏邳州、广西兴安、贵州正安、湖北安陆; 萜内酯量较高的是江苏邳州、贵州正安、安徽亳州。刘叔倩等^[36]对 6 个气候区 18 个产地的银杏叶进行研究, 结果表明, 6 个气候区的有效成分量差异显著, 贵州高原区黄酮和萜内酯的量明显高于其他地区。丁银花等^[31]、许春霞等^[37]、戚向阳等^[38]的研究中也均发现各产地的银杏叶黄酮和(或)萜内酯的量差别明显。但也有研究认为, 银杏叶萜内酯量与产区关系不明显^[24]。

此外, 银杏酸的量也随产地不同差异较大。姚鑫等^[19]发现, 在 12 个省区的 17 个产地的果用银杏叶中, 福建长汀的银杏酸量最高(2.80%), 江苏及其周边的山东、安徽、浙江等产地的均较低(0.51%~0.99%); 而黄萍^[20]对 10 个省的 11 个产地的 5 年生银杏叶的研究也发现, 银杏酸的量因产地而异, 山东郯城的最高(2.41%), 江苏邳州的最低(1.38%)。

2.5 生态环境

生态环境直接影响到银杏叶黄酮和萜内酯的形成、转化和积累。光、温度、水分、大气、土壤、地形等既可能单一起主导作用, 也可能综合作用于银杏的生理生化合成, 进而影响到叶内有效成分的积累。

2.5.1 光 光照强度、光谱特性和光照时间都会影响银杏叶黄酮和萜内酯的合成与积累。如强光和紫外光能够促进黄酮类化合物的生物合成, 遮阴显著降低银杏叶黄酮类化合物的量。在植物生长初期, 红光能显著促进黄酮的合成, 而在生长后期, 红光对黄酮的积累有抑制作用^[23]。

2.5.2 温度 汪贵斌等^[23]研究表明, 低温(5℃/15℃)有利于槲皮素、山柰酚和异鼠李素等黄酮类化合物在银杏叶中的积累。陈雷等^[39]也发现, 低温处理(5℃/15℃)有利于黄酮的积累, 叶黄酮的量明显高于正常(15℃/25℃)和较高温度(25℃/

35℃)处理。

2.5.3 土壤和水分 土壤种类、土壤水分等的不同,可能影响银杏叶黄酮和萜内酯的量。崔红芳等^[32]以红土和沙土栽培银杏,发现红土栽培的叶总萜内酯量高于沙土。朱灿灿等^[40]研究发现,适度干旱可以促进银杏叶黄酮类物质的合成;但冷平生等^[41]的研究却发现,干旱胁迫会降低银杏萜内酯的量,而对黄酮的量无影响。汪贵斌等^[23]也认为,土壤水分对银杏叶黄酮的量的影响并不显著。

2.5.4 海拔 高海拔区独特的生态条件有利于银杏叶黄酮的积累,叶内黄酮的量随海拔升高而增多^[6]。汪海峰等^[42]推测,海拔越高,银杏叶中黄酮的积累量越多,应是多种生态因子如氧分压、空气湿度、土壤温度和水分状况、太阳光及紫外线辐射强度、大气温度、昼夜温差等协同作用的结果。但也有研究发现^[36],黄酮和萜内酯的量并不完全随海拔升高而增多,海拔最低(100 m以下)的黄淮海平原区的银杏叶黄酮和萜内酯的量均不是最低。

2.5.5 生态因子综合作用 多数研究认为,对银杏这种适应生境非常广泛的植物来说,生态因子的综合作用强于某一因子的主导作用。刘叔倩等^[36]比较了6个气候区的海拔、降水量、>10℃积温、年平均温度及土质5个环境因子的作用后,发现银杏叶总黄酮和总萜内酯的量与单一环境因子间并无明显的相关性,应是多种环境因子共同作用的结果。在中亚热带、年均温13.5~16.0℃、年降水量900~1300 mm、黄壤和黄棕壤的综合生境条件有利于银杏的生长发育,拥有这些条件的贵州高原区的银杏的总黄酮和总萜内酯的量均为最高。孙视等^[43]研究也发现,纬度28°19'±2°34'N或38°6'±2°34'N,年降水量(762.3±114.5)mm,日照百分率(35.3±6.3)%,年平均温度(15.95±2.15)℃的综合生境条件最利于银杏叶黄酮的积累。

2.6 采收时期

从萌芽开始至落叶休眠的年生长发育周期中,各个时期的银杏叶黄酮和萜内酯量呈现有规律的变化,这也决定了不同采收期的银杏叶有效成分的量存在较大差异。但对于什么时候采收合适,却说法不一。从4月到11月,都有可作适采期的结论。

2.6.1 4~7月份 孙兴力等^[44]在测定4~12月份的湖南东安10余年生的银杏叶后发现,黄酮的量5月份最高,总萜内酯的量6月份最高,之后都有所下降,至12月份最低,4~7月份有利于银杏总黄

酮醇苷和总萜内酯的积累,是银杏叶的适宜采收期;周恩丽等^[45]也认为,5~7月份采收的银杏叶总萜内酯量较高。

2.6.2 7~9月份 姚鑫^[6]发现,银杏叶总黄酮在叶芽中就具有较高的量,且随时间迅速增加,在4月份达到全年最高点,随后逐月下降,11月份时达最低值;而萜内酯在初春开始富集,随后上升,至9月份最高,10、11月急剧下降。结合银杏叶黄酮和萜内酯的量及叶产量,认为7、8、9月份为适宜采收期。肖强等^[46]测得的银杏叶萜内酯量在5月最低,此后逐渐升高,8月份达到最高峰,之后快速下降,10月底最低,8月份应是银杏叶的适宜采收期。汪海峰等^[42]对4~11月份采收的3个海拔的银杏叶测定后发现,4月份时黄酮量最高,之后总体呈下降趋势,在6、7、8月份有一个回升期,认为应结合银杏正常生长的初级代谢要求、产叶量、药用品质以及采叶后对树势的影响等综合因素,确定略迟于产量回升期为最佳采叶期。陈再兴等^[47]研究发现,银杏叶的总黄酮在8月份、总黄酮醇苷在5月份、萜类内酯在6月份量最高,最佳采收期应在5~8月份。丁银花等^[31]也认为6~8月份采收银杏叶较为合适。樊卫国等^[48]发现,银杏叶在4月上旬至下旬的萌芽展叶期时黄酮量达最高,之后持续下降,7月初以后有所上升,到8月中旬至9月下旬时,量较高。而萜内酯的量则从4月份起到7月中旬一直增加,到8月下旬至9月上旬时达最高水平。结合8月下旬至9月下旬时的单叶干质量达最高水平的特征,认为在贵州中部地区或气候条件类似的地区,银杏叶的适采期是8月下旬至9月下旬。

2.6.3 9月底10月初 戴余军等^[26]在对6~10月份银杏叶片测定后发现,6月中上旬的幼叶期黄酮量较高,达到2.36%~2.85%,之后下降,8月回升,至9月时最高,可达3.25%,结合叶产量,认为银杏叶的最佳采收期应为9月下旬。也有研究^[29,30,33,37-38,49]认为9月底10月初为银杏叶的适宜采收期,而且此时银杏酸的量也处于最低值^[21]。张海红等^[50]测定了7~11月份采收的银杏叶黄酮的量,发现7~10月份总黄酮量逐渐升高,10月份时达最高值,11月份时略有下降,认为10月份是银杏叶的适宜采收期。

2.6.4 10月起至落叶前 张英等^[51]研究发现,银杏总黄酮从4月初抽芽至11月下旬,质量分数在1.48%~2.49%变化,在6~7月达最大值,随后逐渐回落,然而在11月下旬、临落叶前又出现1个高

峰,认为在浙江东部主产区的银杏叶适宜采收期应是10月起至落叶前。杨柳等^[52]也认为,湖北银杏主产区的适宜采收期应在10月中旬后。

2.6.5 二次采收 鉴于7月和9月都有叶黄酮和萜内酯量的较高点,邳州银杏采叶园采用了7月中下旬和9月中下旬二次采收的方式,比只采一次的产量高出20%,且第1次采收的产量占全年的70%^[4]。

2.7 着生部位与枝条类型

银杏的不同部位均含有黄酮类成分,营养器官中黄酮的量由多到少依次为芽>叶>叶柄>根>枝>树皮>树干,而且实生苗顶芽的黄酮量高于侧芽,而嫁接苗则与之相反。长枝、中短枝、短枝以及树冠的各个部位黄酮量均是上部>中部>下部,其中只有树冠的3个部位间差异不显著,即银杏叶的黄酮量与树冠部位无关,但与所在枝条的部位有关,越靠近上部量越高。各类型枝条上的叶黄酮的量也存在明显差异,变化规律是长枝>中短枝>短枝或叶丛枝^[6,29]。廖咏玲等^[53]对雌树长枝上不同叶位的测定结果表明,萜内酯的量也是顶部叶显著高于中部叶和基部叶。

2.8 其他

繁殖方式、培育目的、干燥方法等都会影响到银杏叶中黄酮和萜内酯的量。郁万文等^[4]发现,嫁接树比实生树的叶产量高、质量好、叶含水量低;但也有发现实生苗的叶总萜内酯^[32]和黄酮^[52]的量高于嫁接苗。鞠建明等^[12]认为,果用银杏叶的黄酮类与萜内酯量都不高,一般不适合作银杏叶提取物的原料。周恩丽等^[45]对比了烘干法(60℃,4h)和晒干法(28℃,8h)处理后银杏叶总萜内酯的量,发现晒干法明显优于烘干法,提倡在生产中采用晒干法干制银杏叶来减少银杏叶总萜内酯的损失,提高银杏叶原材料的品质。

3 栽培技术对银杏叶品质和产量的影响

3.1 施肥制度

3.1.1 氮、磷、钾肥 氮素是银杏需求量最大的营养元素之一,对银杏叶的生长和品质起着重要作用,且主导叶产量。如施用氮肥600 kg/hm²时,可使叶产量增加82.2%^[54];叶面喷施氮肥时,以0.5%尿素效果较好,银杏叶产量可比不施肥增加37.9%,萜类内酯增加9.64%,黄酮的量变化不明显^[41];对2年生银杏苗单施氮肥1.5 g/株时,可获得单位面积上最高的黄酮产量^[55]。在年生育后期,配比施氮可有效增加根系活力,保证根系具有较高的生理活性,

避免或减少地上部功能的早衰和品质的降低。铵态氮部分替代硝态氮可明显改善生育后期的银杏叶品质,且以硝态氮/铵态氮为75:25和50:50的配比较优^[56]。

磷肥对银杏叶的增产作用小于氮肥,但对萜内酯和黄酮苷的量的提升作用却高于氮肥,如6%过磷酸钙处理时萜内酯的量比对照高出15.71%,而氮肥的增量是9.64%;4%过磷酸钙可使黄酮苷的量比对照高出9.48%,而氮肥的增量只有3.68%^[42]。

根据收获目的不同,氮、磷、钾肥的配施量(kg/hm²)不一样^[57]:获得最高产量(43 686 kg/hm²)和最佳产投比(24.402%)的氮、磷、钾肥施用量是N 1 042.5 kg/hm²、P 189.0 kg/hm²、K 411.5 kg/hm²(N:P:K=1:0.18:0.39);以生产黄酮为目的的最佳配施量是N 829.5 kg/hm²、P 200.0 kg/hm²、K 450.0 kg/hm²,此时理论最佳产量为63.906 kg/hm²;以生产萜内酯为目的的最佳配施量是N 900.0 kg/hm²、P 200.0 kg/hm²、K 370.0 kg/hm²,此时理论最佳产量为60.749 kg/hm²。

3.1.2 中、微量元素肥 中、微量元素是植物生长不可或缺的营养成分,缺乏任何一种都会影响到产品的品质和产量。叶面喷施镁(Mg)、锌(Zn)、钼(Mo)肥的配比不同,可使银杏叶产量在4.27~13.97 g/株、叶总黄酮量4.74~15.85 mg/g、萜内酯量4.84~15.85 mg/g,高低之间相差达到3.3倍左右,较适宜银杏叶产量、单株总黄酮产量、单株萜内酯产量提高的组合是3% Mg+0.3% Zn+0.05% Mo^[58]。叶面喷施Zn、锰(Mn)、铜(Cu)、铁(Fe)肥(0.2% ZnSO₄+0.3% MnSO₄+0.4% CuSO₄+0.1% FeSO₄)不仅能明显提高银杏叶黄酮的量,还能延长银杏最佳采叶期,增加叶的树体储存时间,从而延长人工采叶时间^[59]。

3.1.3 有机肥 施入有机肥能显著提高银杏叶产量和有效成分的量。于丹丹等^[60]将生物有机肥与园林废弃腐熟物混合后施入废弃砂石坑土壤后,不仅改良了困难立地的土壤理化性质,还提高了银杏叶产量,降低造林成本2.8万元/hm²;俞飞飞等^[54]在土壤中施入鸡粪1.3×10³ kg/hm²并叶面喷施2次奥普尔叶肥时,使银杏叶产量增产25%左右。而樊卫国等^[61]研究发现,与普通施肥相比,施用奥普尔有机肥使银杏叶产量、总黄酮量和总萜内酯量显著提高了56.67%、157.89%、36.84%。

3.1.4 微生物肥 银杏是一种内生菌根植物,能与

多种内生菌根真菌共生形成泡囊丛枝菌根 (VA)。冷平生等^[41]将 2 种球囊霉 (*Glomus mosseae* 和 *G. versiforme*) 接种银杏后, 发现它们能促进银杏叶的产量、黄酮的量和萜类内酯的量, 两种菌分别比对照提高了 23.19%、2.98%、17.89% 和 3.61%、14.34%、12.23%, *G. mosseae* 对叶产量和萜类内酯的量的促进效果强于 *G. versiforme*。

3.2 整形修剪

整形修剪有利于银杏这一高大乔木的矮化、密植并充分利用光能, 实现在有限土地上降低种植成本和采收成本, 提高银杏叶有效成分的量 and 叶产量的目的, 并且修剪还有利于枝条的年轻化和长枝化, 提高叶中药用成分的量^[29]。休眠期内破除 1~2 年生顶芽, 能有效刺激侧芽萌发, 增加枝梢数量和叶产量, 3~4 年生时休眠期内破除顶芽或轻度短截, 加上生长季摘心, 能明显增加分枝数量, 控制株高过度增长, 增加单位面积叶产量, 并便于叶用银杏园的经营管理^[62]; 离地 30~50 cm 高截干萌芽可使叶黄酮和萜内酯的量分别提高 63.7% 和 13.6%^[63], 短截、回缩等控制树干、树枝的高度和长度等矮化修剪后, 银杏叶黄酮和萜内酯的量可分别比对照提高 28.2% 和 20.1%^[64]。

3.3 密植

叶用银杏林的密度不仅影响叶产量, 还影响叶中有效成分的量。合理密度能明显改善并充分利用林内光照条件, 增加单位面积叶和黄酮、萜内酯的产量。姜岳忠等^[63]发现, 10.0 万株/hm² 的密度时单位面积叶产量最高, 2.0 万株/hm² 时的叶萜内酯量最高, 5.0 万株/hm² 时叶黄酮量最高。曹福亮等^[65]认为, 要获得较高的叶产量和药用成分量, 生产中拟以 4 万~7 万株/hm² 的密度为宜。

4 组织培养与基因工程在叶用银杏定向培育中的应用

组织培养不仅是良种的快速繁殖方式, 也是研究银杏黄酮和萜内酯工厂化生产的有效途径。为提高银杏叶次生代谢物产量, 人们对外植体、培养基、激素、光照、诱导子等影响因素进行了研究。所用外植体有种子胚、叶片、茎段、根段、顶芽等, 基本培养基有 MS、DCR、White、B5 等, 激素有 2,4-D、NAA、BA、KT 等, 以研究筛选出有利于银杏悬浮细胞生长和黄酮、萜内酯量高的适宜培养条件。李春斌等^[66]认为, 组织来源是影响植物细胞培养物次生代谢产物积累的重要因素之一, 由次生代谢产物

量高的植物或器官诱导产生的悬浮培养细胞的次生代谢物质量也高, 光质对银杏悬浮培养细胞的生长和黄酮的形成也有较大影响, 蓝光下细胞生长较慢, 但黄酮量高。所得的悬浮培养细胞中银杏黄酮量可达细胞干质量的 2.82%。朱红威等^[67]发现, 由胚诱导出的愈伤组织生长和黄酮的量均最高的处理是 DCR 培养基+0.3 mg/L BA+2.0 mg/L 2,4-D, 活性炭抑制愈伤组织生长但能促进黄酮的积累。此外, 在培养基中添加诱导子也可能提高次生代谢产物的产量。郝岗平等^[68]以硝普钠(SNP)为一氧化氮(NO)供体加入银杏悬浮细胞培养液中, 发现 0.5 mmol/L 的 SNP 有利于悬浮细胞的生长, 此时细胞干质量可增加 34%, 而 10 mmol/L 的 SNP 可以促进黄酮类物质的合成, 黄酮类物质质量可增加 36%。

银杏黄酮和萜内酯合成过程受到基因的控制, 研究这些基因的结构和功能将有利于银杏黄酮和萜内酯的生物合成与调控, 目前这方面研究已有一些初步成果。张传丽等^[69]获得 876 bp 银杏类黄酮 O-甲基转移酶基因 cDNA 片段 GbFOMT-13, 其表达水平在银杏叶片的不同时期差异明显, 表现为春季幼叶>秋季老叶>夏季成熟叶, 与银杏黄酮总增长率变化趋势相似。张楠等^[70]对银杏细胞转录组进行高通量测序, 挖掘银杏内酯生物合成基因。通过分析 Unigene 的表达和功能注释等信息, 发现 66 个属于 CYP450 基因家庭, 726 个参与次生代谢物合成, 其中 59 个与萜类合成有关, 17 个与二萜类合成相关。张洪娟等^[71]利用 RACE 技术克隆并获得银杏牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (GbGGPS) 基因, 该基因的 cDNA 全长 1 641 bp, 含 1 个 1 176 bp 的完整阅读框, 编码 391 个氨基酸序列。GbGGPS 编码蛋白可能参与或调节了银杏内酯的生物合成, 该基因的发现有利于银杏萜类化合物的生物合成和调控。

5 叶用银杏种植基地现状

自 20 世纪 90 年代起, 我国对银杏的规范化种植进行了一系列的探索和实践, 2002 年国家科技部在江苏邳州召开了“银杏规范化种植研究”的验收会。2005 年, 邳州市 2 000 hm² 银杏叶 GAP 基地顺利通过国家中药材 GAP 认证, 成为国内第一家通过中药材 GAP 认证的银杏叶基地。之后, 江苏、山东、浙江、广西、贵州等大部分银杏产区都严格按照 GAP 要求种植和生产银杏叶, 总结出 GAP 基地的自然环境、气候、土壤、灌溉水质、大气环境等自然条件, 栽培与管护、银杏叶的采收与加工等

措施^[72]。贵州普定^[73]、山东郯城^[74]等地在建 GAP 基地时,都认为应先对环境质量进行检测和分析,以避免在以后的生产中引起环境污染。此外,在种植过程中,多用农家肥,减少化肥和农药施用。邳州市铁富镇在建立 GAP 基地时,要求种植向规模化、规范化方向发展,即连片种植小苗采叶圃不低于 66.67 hm²,高标准沟渠路配套,有充足洁净的水源,肥料以有机肥为主,严禁使用高毒农药。目前该镇银杏叶 GAP 采叶圃达到 1 333.33 hm²^[75]。

6 结语与建议

我国作为资源分布最广、数量最多的银杏起源中心,自 1992 年开始大规模发展银杏叶用林以来,积极开展了叶用银杏的种质资源研究,结合各地资源特色,制定出高黄酮、高萜内酯、高叶产量的良种选育标准,并在江苏、山东等银杏主产区筛选出多个优良品系;对影响银杏叶黄酮、萜内酯和叶产量的品种、性别、树龄、产地、生态环境、采收时期、叶着生部位与枝条类型等多个因素进行了深入研究,弄清了银杏叶有效成分的变化规律,并将其应用在生产实践过程中,采取针对性措施,通过施肥、整形修剪、矮化密植等技术来改善我国银杏叶原材料有效成分量和产量低的劣势,提升了我国银杏叶的原材料品质和产量。然而,我国银杏叶的品质和产量与国际要求相比,仍有很大差距,今后还需继续加强叶用银杏的良种选育和定向高效培育工作,以增加银杏叶有效成分量和叶产量,同时降低种植成本和采收成本。今后应从以下几方面继续开展对叶用银杏的研究工作。

6.1 坚持对现有资源搜集、保存、研究和良种选育

我国银杏资源分布在除黑龙江、内蒙古、青海、西藏外的各个省、市、自治区,分布区自然生态环境条件的复杂性,引发了多种层次的变异。目前我国对银杏种质资源的搜集研究工作主要集中在江苏、山东、浙江、广西等银杏主产区,对其他区域则涉及较少。今后还需扩大银杏种质资源的收集范围,研究它们的性状及相互关系,加强相关选择研究,在大量种质资源中建立快速初选技术;对有潜力的种质资源进行品比试验,筛选适应于不同立地类型的优良品种;并对特异性种质资源采取分子标记辅助选择育种、杂交育种、基因工程育种等方式培育出高黄酮、高萜内酯新品种。

6.2 推广生产良种化、种植规范化和基地化

随着药物开发“绿色浪潮”的到来,来源于天

然植物的银杏叶提取物制剂与保健食品是当今世界市场最热门的植物药产品之一。市场对银杏叶原材料的需求日益增加,引发叶用银杏种植市场的狂热。目前,多数地方对叶用银杏的发展还处于盲目阶段,种子不清,生产方式混乱、不规范,产出的银杏叶品质良莠不齐,多数属有效成分的量非常低的产品。因此,在银杏叶的生产过程中,还需良种化、规范化、产业化,采用叶用银杏优良品种,统一使用规范化的种植技术,建立叶用银杏种植基地,产出优质、高产的银杏叶原材料。

参考文献

- [1] 罗小芳,覃佐东,袁琦韵,等. 简析银杏研究的相关进展 [J]. 科技通报, 2016, 32(8): 36-40.
- [2] 杨 扬,周 斌,赵文杰. “银杏叶事件”的分析与思考 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2397-2407.
- [3] 战伟伟,闫明奎,王立东. 银杏叶的研究与开发应用 [J]. 山东轻工业学院学报, 2009, 23(4): 34-37.
- [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] 曹春艳. 响应面法优化银杏叶黄酮提取工艺 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 78-86.
- [6] 姚 鑫. 不同来源银杏叶资源化学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [7] 黄相中,尹 燕,杨晴来,等. 昆明产银杏叶总黄酮含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 19(5): 369-371.
- [8] 何 健. 银杏叶的研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(15): 1434-1436.
- [9] 吴海霞,吴彩娥,李婷婷,等. 大孔树脂纯化银杏叶黄酮的研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2964-2969.
- [10] 高华荣. 银杏叶提取物的药理作用 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(10): 168-169.
- [11] 田青亚,巩丽丽. 银杏内酯研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(8): 838-841.
- [12] 鞠建明,黄一平,钱士辉,等. 不同树龄银杏叶在不同季节中总银杏酸的动态变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 817-819.
- [13] 曹福亮,郁万文. 银杏丰产栽培实用技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [14] 邢世岩. 银杏种质资源评价与良种选育 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [15] 吴岐奎,邢世岩,王 萱,等. 叶用银杏种质资源黄酮和萜内酯类含量及 AFLP 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2014, 41(12): 2373-2382.

- [16] 陈学森, 张艳敏, 李健, 等. 叶用银杏资源评价及选优的研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 215-219.
- [17] 江德安, 李国元, 李顺文, 等. 叶用银杏品种、形态指标与产量相关性选择 [J]. 福建林学院学报, 2004, 24(2): 169-171.
- [18] 刘平平, 潘苏华. 银杏叶制剂中银杏酚酸研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 274-277.
- [19] 姚鑫, 周桂生, 唐于平, 等. 不同产地及株龄果用银杏叶中总银杏酸含量的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(4): 108-110.
- [20] 黄萍. 不同产地银杏叶中总银杏酸的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 129-131.
- [21] 鞠建明, 沈红, 钱士辉, 等. 不同生长季节银杏叶中总银杏酸的动态变化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 305-307.
- [22] 邢世岩, 吴德军, 邢黎峰, 等. 银杏叶药物成分的数量遗传分析及多性状选择 [J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 928-935.
- [23] 汪贵斌, 郭旭琴, 常丽, 等. 温度和土壤水分对银杏叶黄酮类化合物积累的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(11): 3077-3083.
- [24] 郁青, 沈兆邦, 陈祥, 等. 银杏叶内酯含量的变化规律研究 [J]. 林产化学与工业, 1998, 18(4): 1-6.
- [25] 谢宝东, 王华田. 银杏不同家系和无性系叶片黄酮与内酯含量变异 [J]. 林业科技开发, 2008, 22(2): 33-37.
- [26] 戴余军, 方华, 江德安. 不同品种银杏叶的黄酮含量变化规律研究 [J]. 林业实用技术, 2009(2): 4-6.
- [27] Teris A. Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year [J]. *Plant Med*, 1992, 58(5): 413-418.
- [28] 陈华圣, 任莉, 许爱华, 等. 不同龄期性别银杏叶多糖含量的比较研究 [J]. 中药材, 2006, 29(11): 1139-1141.
- [29] 江德安, 庾明枝. 不同营养部位、树龄银杏叶黄酮含量的比较 [J]. 孝感学院学报, 2006, 26(3): 9-12.
- [30] 管玉民, 王健, 尤慧莲, 等. 气候、季节、树龄对银杏叶总黄酮含量的影响 [J]. 中成药, 2000, 22(5): 368-370.
- [31] 丁银花, 孙永成, 王振中, 等. 银杏叶的指纹图谱建立及质量评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 901-905.
- [32] 崔红芳, 叶正良, 周大铮, 等. 银杏叶中四种银杏内酯的含量测定 [J]. 化学工业与工程, 2007, 24(6): 532-535.
- [33] 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内酯的含量变化 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1025-1027.
- [34] 许锋, 廖咏玲, 程水源, 等. 不同树龄银杏叶萜内酯含量的年周期变化规律 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40(6): 173-176.
- [35] 王弘, 赵国斌, 刘叔倩, 等. 不同产地栽培银杏叶中黄酮类成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 408-410.
- [36] 刘叔倩, 郑俊华, 王弘, 等. 不同气候区银杏叶中黄酮和萜内酯含量的变化 [J]. 中草药, 2000, 31(6): 424-426.
- [37] 许春霞, 李向民, 张一平, 等. 陕西银杏叶黄酮含量和热值的时空分布规律研究 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1522-1527.
- [38] 戚向阳, 陈维军, 谢笔钧. 银杏叶中萜内酯含量的动态变化的研究 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 445-447.
- [39] 陈雷, 常丽, 曹福亮, 等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 755-762.
- [40] 朱灿灿, 田亚玲, 曹福亮, 等. 干旱胁迫对银杏叶类黄酮年动态变化的影响 [J]. 林业科技开发, 2010, 24(4): 67-70.
- [41] 冷平生, 苏淑钗, 李月华, 等. 施肥与干旱胁迫对银杏生长及黄酮苷和萜类内酯含量的影响 [J]. 北京农学院学报, 2001, 16(1): 32-37.
- [42] 汪海峰, 鞠兴荣, 何广斌, 等. 不同海拔高度和生长季节对银杏叶中黄酮苷含量的影响 [J]. 林产化学与工业, 2002, 22(4): 47-50.
- [43] 孙视, 刘晚苟, 潘福生, 等. 生态条件对银杏叶黄酮积累的影响 [J]. 植物资源与环境, 1998, 7(3): 1-7.
- [44] 孙兴力, 周金彩, 龙红萍, 等. 不同生长季节银杏叶中总黄酮醇苷和总内酯的含量变化 [J]. 中南药学, 2009, 7(8): 564-567.
- [45] 周恩丽, 李雪峰, 王伟, 等. 采收期和干燥方法对银杏叶中总内酯的影响 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 380-382.
- [46] 肖强, 张峥, 周大寨. 银杏叶萜内酯含量的变化及其与叶绿素荧光特性的关系 [J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(6): 683-690.
- [47] 陈再兴, 朱旭, 王琳, 等. 不同季节银杏叶中总黄酮、总黄酮醇苷及萜类内酯的含量变化 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(12): 1067-1069.
- [48] 樊卫国, 刘进平, 文晓鹏, 等. 银杏叶黄酮、萜内酯含量的季节性变化及适采期研究 [J]. 山地农业生物学报, 2000, 19(2): 117-120.
- [49] 江德安, 郭秀英. 银杏营养生长与叶黄酮、内酯含量变化规律的研究 [J]. 孝感学院学报, 2007, 27(3): 15-18.
- [50] 张海红, 王树, 侯勇, 等. 不同采收期银杏叶总黄酮含量及对花生油的抗氧化作用 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(2): 44-46.

- [51] 张英, 吴晓琴, 俞卓裕. 竹叶和银杏叶总黄酮含量及其抗自由基活性的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 338-338.
- [52] 杨柳, 欧阳绍湘, 张仕斌, 等. 银杏叶黄酮含量变化规律及其干燥方法的研究 [J]. 林产化学与工业, 1999, 19(2): 31-34.
- [53] 廖咏玲, 程水源, 许锋, 等. 银杏雌树长枝不同叶位叶鞘内酯含量变化及分布规律 [J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(11): 47-52.
- [54] 俞飞飞, 丁增成, 程华平, 等. 施肥对银杏叶产量因子的影响 [J]. 安徽农业科学, 1998, (4): 358-359.
- [55] 吴家胜, 应叶青, 曹福亮, 等. 施氮对银杏叶产量及黄酮含量的影响 [J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(4): 372-375.
- [56] 郑军, 曹福亮, 郁万文. 不同氮素形态及配比对生育后期银杏叶品质的影响 [J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(5): 564-568.
- [57] 孙垒. 银杏叶用园营养诊断及施肥效应研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2014.
- [58] 郁万文, 曹福亮, 吴广亮. 镁、锌、钼配施对银杏苗叶生物量和药用品质的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(4): 981-989.
- [59] 王燕, 李琳玲, 许锋, 等. 金属离子对盆栽银杏叶PAL酶活及黄酮含量的影响 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(2): 68-72.
- [60] 于丹丹, 贾黎明, 李宇, 等. 土壤改良剂对废弃砂石坑造林地土壤性质和银杏生理特性的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(9): 56-61.
- [61] 樊卫国, 杨宏敏, 刘进平. 施用奥普尔肥对银杏叶产量及黄酮等含量的影响 [J]. 山地农业生物学报, 2001, 20(2): 114-116.
- [62] 王华田, 孙明高, 皇甫桂月, 等. 叶用银杏园银杏树整形修剪技术研究 [J]. 林业科技通讯, 1997(4): 11-13.
- [63] 姜岳忠, 王开芳, 刘元铅, 等. 叶用银杏园密度与定干高度效应分析 [J]. 浙江林学院学报, 2004, 21(3): 290-294.
- [64] 李诚勇. 修剪对叶用银杏黄酮和内酯类物质含量的影响 [J]. 山东林业科技, 2009(5): 71-72.
- [65] 曹福亮, 汪贵斌, 郁万文. 银杏叶用林定向培育技术体系的集成 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(6): 146-152.
- [66] 李春斌, 王关林, 岳玉莲, 等. 培养条件对银杏悬浮培养细胞黄酮合成影响研究 [J]. 大连理工大学学报, 2003, 43(3): 287-291.
- [67] 朱红威, 邵菊芳, 李庆, 等. 不同培养条件对银杏愈伤组织生长及黄酮含量的影响 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 102-105.
- [68] 郝岗平, 杜希华, 史仁玖. NO对银杏悬浮细胞生长及黄酮类物质合成的影响 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 272-277.
- [69] 张传丽, 陈鹏, 仲月明, 等. 银杏类黄酮O-甲基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 355-362.
- [70] 张楠, 孙桂玲, 戴均贵, 等. 银杏细胞转录组高通量测序及分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 112-119.
- [71] 张洪娟, 谭碧玥, 曹福亮. 银杏GbGGPS基因的克隆及序列分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(4): 8-12.
- [72] 赵惠忠, 曹清, 汤先锋, 等. 银杏GAP基地的栽培管护措施 [J]. 江苏林业科技, 2011, 38(4): 36-38.
- [73] 吴溪琴, 艾军, 孙荣, 等. 贵州普定银杏GAP试验示范基地环境质量评价 [J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(3): 220-223.
- [74] 孙艳涛. 拟认证叶用银杏GAP基地空气及灌溉水质量初评 [J]. 现代农业科技, 2010(18): 248-249.
- [75] 刘永云. 邳州市铁富镇银杏产业发展探讨 [J]. 现代农业科技, 2015(24): 177.