

# 山楂属(*Crataegus* spp.)种质资源叶片总黄酮遗传多样性分析

赵玉辉, 王 岗, 苏 凯, 郭印山, 董文轩

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:**以国家果树种质沈阳山楂资源圃收集的 8 个种 135 份山楂种质资源为试材, 采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法, 研究山楂属资源总黄酮含量及遗传多样性水平。结果表明: 山楂属资源黄酮含量具丰富的变异, 变异系数为 57.07%, 其变幅为 0.25%~11.65%, 通过山楂属植物叶黄酮类成分比较研究, 发现了一些有利用价值的叶用资源。

**关键词:**山楂叶片; 总黄酮; 遗传多样性

**中图分类号:**S 661.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0088-05

山楂是我国特有的药食两用果树种类, 黄酮是山楂的一大类化合物, 是山楂药用质量的重要评价指标, 对人类具有多种保健与药用功能, 包括消积健胃、消炎止咳、降血压、降血脂、清除自由基、抗氧化、抗癌、抗病毒、保护心血管系统和肝脏、防止骨质疏松等疗效, 具有极大的开发研究价值<sup>[1,3,5-11]</sup>。目前我国山楂黄酮资源药用、加工多集中在少数品种及野生类型上, 限制了山楂黄酮资源的深度开发及利用, 因此, 在更多种质资源、组织(如叶、花、根、茎)上开展黄酮性状系统研究是当前山楂研究中的一个重要课题。早期我国山楂黄酮的研究以山楂(*C. pinnatifida* Bge.)和山里红(*C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br)开展较多, 并且研究材料以果实为主<sup>[2]</sup>, 随着对黄酮类物质研究的深入, 众多学者发现山楂各器官中(叶片、茎、根、花)均含有黄酮成分<sup>[4-5,8-9]</sup>, 并且叶片中总黄酮含量高于果实及其它组织, 因此, 2008 年课题组就初步开展了山楂资源叶片黄酮含量的研究工作<sup>[4]</sup>, 在此基础上, 现以国家果树种质沈阳山楂圃收集的 135 份山楂属资源为试材, 系统的测定其总黄酮含量, 并进行遗传多样性分析, 以期对山楂资源的挖掘利用及评价提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 8 个种山楂资源共 135 份, 由国家果树种质沈阳山楂圃提供, 山楂种分类及品种见中国果树志·山楂卷<sup>[1]</sup>, 分别为山楂(*C. pinnatifida* Bge.)、伏山楂(*C. bretschneideri* Schneid.)、甘肃山楂(*C. kansuensis* Wils.)、阿尔泰山楂(*C. altaica* (Loud.) Lange)、准噶尔山楂(*C. songarica* C. Koch)、光叶山楂(*C. dahurica* Koe-hne)、绿肉山楂(*C. chlorosarca* Maxim.)和湖北山楂(*C. hupehensis* Sarg.)。其中山楂品种 119 份, 伏山楂地方品种 8 份, 黑果绿肉资源 3 份, 另外 5 个种资源各 1 份, 具体见表 1。供试芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所, 95%乙醇等其它试剂均为市售分析纯。

### 1.2 试验方法

于 2012 年 10 月采山楂成熟叶片, 每份山楂资源分别取 3 株, 每株为 1 次重复, 试验设 3 次重复。取其树冠外围大小均一且无病虫害的叶片, 洗净后 50℃干燥至恒重, 混合粉碎后过 20 目筛得山楂叶粗粉备用。按鲁巍巍<sup>[4]</sup>的方法提取和测定山楂叶片中的总黄酮含量。配制 0.2 g/L 的芦丁(70%乙醇溶液)标准液, 分别取 0、1、2、3、4、5 mL 标准液制成浓度梯度待测液, 500 nm 下测定 OD 值, 建立标准曲线方程。称取干燥的山楂叶片粗粉 0.3 g 分别置于容量瓶中, 加入 70%乙醇 15 mL, 加盖密封; 40℃下以 225 W 的超声功率超声提取 30 min; 减压抽滤后, 转移至 25 mL 容量瓶中, 用 70%乙醇定容至刻度, 摇匀, 制备成供试品溶液。量取 1 mL 供试品溶液放置于 10 mL 试管中, 并加 4 mL 70%乙醇, 分别加入  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{NaOH}$  后, 500 nm 下测定 OD 值, 取 3 次重复的平均值。再按下列公式计算测试样品中的总黄酮含量。总黄酮含量(%) =  $[(C \times V/a)/(W \times 10^3)] \times$

**第一作者简介:**赵玉辉(1976-), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事果树种质资源鉴定与评价等研究工作。E-mail: zhaoyuhui76@126.com.

**责任作者:**郭印山(1977-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树育种与生物技术等研究工作。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31101515); 沈阳农业大学青年教师基金资助项目(20101017)。

**收稿日期:**2014-09-09

100,式中: $C$ 为通过标准曲线方程求得的总黄酮量(mg); $a$ 为吸取样品溶液体积(mL); $V$ 为样品溶液总体积(mL); $W$ 为样品干重(g)。

### 1.3 数据分析

试验所得数据结果采用 SPSS 统计软件计算标准差,并计算变异系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 山楂属植物叶黄酮含量比较

通过山楂属植物叶黄酮含量比较研究,发现了一些有利用价值的叶用资源。在 135 份资源中,总黄酮含量

最高的是‘海棠山楂’为 11.65%,其次是‘豫 8003’为 11.45%,‘卧龙岗 2 号’10.92%,‘吉林叶赫’10.70%,‘彰武山里红’10.47%,‘益都敞口’10.40%,‘寒丰’10.20%,‘聂家裕 2 号’10.07%,‘林县上口’9.27%,‘北京灯笼红’7.92%,‘劈破石’7.75%,‘铜台白野生’7.47%,‘紫丰’7.42%,‘黄宝裕 1 号’7.22%,‘黄果’7.02%。这些山楂资源体现出较高优势,可作为山楂叶黄酮提取的新材料。在所测定 8 个种的资源中,阿尔泰山楂和伏山楂 2 个种总黄酮含量较低,阿尔泰山楂为 1.45%,伏山楂为 1.49%。

表 1 山楂属资源总黄酮含量测定结果

Table 1 Quantitative analysis results of flavonoids in samples

分类 Species	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%
山楂 ( <i>C. pinnatifida</i> Bge.)	‘本溪 4 号’ ‘Benxi NO. 4’	5.07±0.74	‘益都小黄面楂’ ‘Yidu Xiaohuangmianzha’	2.40±0.08	‘秋金星’ ‘Qiujiuxing’	3.37±0.34
	‘二乙子’ ‘Eryizi’	5.12±0.09	‘秋丰’ ‘Qiufeng’	4.95±0.22	‘京短 1 号’ ‘Jingduan NO. 1’	2.37±0.06
	‘大王庙山楂’ ‘Dawangmiao Shanzha’	1.32±0.06	‘新宾软籽’ ‘Xinbinruanzi’	2.55±0.27	‘豫北红’ ‘Yubeihong’	4.65±0.14
	‘沈 2-4’ ‘Shen2-4’	6.37±0.25	‘豫 8002’ ‘Yu8002’	3.60±0.28	‘燕瓢青’ ‘Yanrangqing’	4.95±0.27
	‘清源磨盘’ ‘Qingyuanmopan’	5.47±0.29	‘晚秋山里红’ ‘Wanqiu Shanlihong’	3.17±0.07	‘寒丰’ ‘Hanfeng’	10.20±0.22
	‘铜台白野生’ ‘Tongtai Baiyesheng’	7.47±0.03	‘蒙阴半野小金星’ ‘Mengyinbanyexiaojinxing’	1.65±0.07	‘建昌山楂’ ‘Jianchang Shanzha’	4.65±0.33
	‘面楂’ ‘Mianzha’	2.85±0.16	‘聂家裕 2 号’ ‘Niejiayu NO. 2’	10.07±0.35	‘滦红’ ‘Luanhong’	1.95±0.15
	‘华北小山楂’ ‘Huabei Xiaoshanzha’	2.80±0.13	‘临汾 1 号’ ‘Linfen NO. 1’	3.30±0.17	‘马家粉肉’ ‘Majiafenrou’	3.50±0.22
	‘百泉 7801’ ‘Baiquan7801’	0.25±0.04	‘卧龙岗 2 号’ ‘Wolonggang NO. 2’	10.92±0.84	‘本溪 7 号’ ‘Benxi NO. 7’	1.55±0.26
	‘紫丰’ ‘Zifeng’	7.42±0.41	‘蟹子石 3 号’ ‘Xiezishi NO. 3’	3.37±0.63	‘平邑山楂’ ‘Pingyi Shanzha’	5.67±0.19
	‘79723’	3.80±0.04	‘豫 8001’ ‘Yu8001’	2.35±0.17	‘马家大队’ ‘Majiadadui’	2.55±0.20
	‘沈 78213’ ‘Shen78213’	4.15±0.11	‘田生山楂’ ‘Tiansheng Shanzha’	5.35±0.11	‘兴隆实生’ ‘Xinglongshisheng’	3.02±0.12
	‘益都红口’ ‘Yiduhongkou’	1.97±0.14	‘平邑早红子’ ‘Pingyizao hongzi’	2.30±0.13	‘紫珍珠’ ‘Zizhenzhu’	3.02±0.26
	‘林县上口’ ‘Linxiangshangkou’	9.27±0.38	‘抚顺上砖白楂’ ‘Fushunshangzhuabai’	6.02±0.34	‘霞金星’ ‘Xiajinxing’	3.15±0.09
	‘晋县小野山楂’ ‘Jinxian Xiaoye Shanzha’	4.89±0.21	‘银野岭 9 号’ ‘Yinyeling NO. 9’	3.10±0.09	‘秋艳’ ‘Qiuyan’	5.95±0.32
	‘西坡 1 号’ ‘Xifen NO. 1’	3.00±0.19	‘沈 78214’ ‘Shen78214’	1.95±0.09	‘沈 78201’ ‘Shen78201’	2.32±0.12
	‘垂枝山里红’ ‘Chuzhi Shanlihong’	2.25±0.08	‘临汾白野生’ ‘Linfen Baiyesheng’	2.27±0.07	‘挂甲峪 1 号’ ‘Guajiayu NO. 1’	4.92±0.16
	‘西坡 4 号’ ‘Xifen NO. 1’	2.25±0.22	‘益都敞口’ ‘Yiduchangkou’	10.40±0.45	‘795507’	4.37±0.06
	‘劈破石’ ‘Piposhi’	7.75±0.12	‘西丰红’ ‘Xifenghong’	3.37±0.28	‘黄果’ ‘Huangguo’	7.02±0.26
	‘兴红 2 号’ ‘Xinghong NO. 2’	3.05±0.06	‘百泉 7901’ ‘Baiquan7901’	3.47±0.22	‘牛心台 1 号’ ‘Niuxintai NO. 1’	4.35±0.25
	‘子母红’ ‘Zimuhong’	1.75±0.17	‘胜利紫肉’ ‘Shenglizirou’	3.35±0.04	‘绛县 798203’ ‘Jiangxian798203’	5.75±0.29
	‘红瓢绵’ ‘Hongrangmian’	6.12±0.10	‘大金星’ ‘Dajinxing’	2.47±0.10	‘亮山红’ ‘Liangshanhong’	5.80±0.22
	‘溪红’ ‘Xihong’	4.25±0.14	‘徐州大货’ ‘Xuzhoudahuo’	5.80±0.16	‘赣榆 2 号’ ‘Ganyu NO. 2’	4.35±0.09

续表 1

Continue table 1

分类 Species	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%	资源名称 Name of resources	总黄酮含量 Flavonoids content/%
	‘山东红面楂’ ‘Shandonghongmianzha’	4.59±0.33	‘抚顺山楂’ ‘Fushun Shanzha’	2.17±0.13	‘冯水山楂’ ‘Fengshui Shanzha’	3.25±0.19
	‘吉林叶赫’ ‘Jilinyehe’	10.70±0.08	‘白里’ ‘Baili’	2.67±0.06	‘北京灯笼红’ ‘Beijingdenglonghong’	7.92±0.25
	‘黄宝裕 1 号’ ‘Huangbaoyu NO. 1’	7.22±0.10	‘辽红’ ‘Liaohong’	3.52±0.10	‘通化山楂’ ‘Tonghua Shanzha’	2.75±0.13
	‘本溪 2 号’ ‘Benxi NO. 2’	6.55±0.36	‘山城子 2 号’ ‘Shanchengzi NO. 2’	5.15±0.07	‘银野岭 7 号’ ‘Yinyeling NO. 7’	4.52±0.12
	‘银野岭 2 号’ ‘Yinyeling NO. 2’	2.29±0.03	‘海棠山楂’ ‘Haitang Shanzha’	11.65±0.45	‘山城子 1 号’ ‘Shanchengzi NO. 1’	3.02±0.31
	‘甜水’ ‘Tianshui’	3.15±0.18	‘彰武山里红’ ‘Zhangwu Shanlihong’	10.47±0.51	‘吉林大旺’ ‘Jilindawang’	2.32±0.16
	‘蟹子石 4 号’ ‘Xiezishi NO. 4’	5.42±0.04	‘辉县大红’ ‘Huixiandahong’	3.37±0.07	‘豫 8003’ ‘Yu8003’	11.45±0.27
	‘东陵青口’ ‘Donglingqingkou’	3.07±0.04	‘平邑银红子’ ‘Pingyi Yin hongzi’	4.27±0.14	‘马钢早红’ ‘Magang Zaohong’	2.35±0.25
	‘81-2’	2.69±0.22	‘集安紫肉’ ‘Jianzi rou’	2.15±0.19	‘绛县 795507’ ‘Jiangxian795507’	6.17±0.05
	‘涧沟 2 号’ ‘Jiangu NO. 2’	2.12±0.06	‘鞍山紫肉’ ‘Anshanzirou’	3.67±0.17	‘辽阳紫肉’ ‘Liaoyangzirou’	2.92±0.19
	‘聂家裕 1 号’ ‘Niejiayu NO. 1’	4.99±0.41	‘益都特大黄面楂’ ‘Yidutedahuangmianzha’	3.52±0.19	‘福山铁球’ ‘Fushantieqiu’	2.47±0.10
	‘秋丽’ ‘Qiuli’	2.99±0.31	‘北京对照’ ‘Beijingduizhao’	2.42±0.33	‘银野岭 1 号’ ‘Yinyeling NO. 1’	3.05±0.16
	‘思山岭’ ‘Sishanling’	4.02±0.11	‘菏泽山楂’ ‘Heze Shanzha’	3.95±0.36	‘土谷子 1 号’ ‘Tuguzi NO. 1’	5.02±0.13
	‘朝新红’ ‘Chaoxinhong’	6.02±0.13	‘百泉 7903’ ‘Baiquan7903’	1.92±0.26	‘双红’ ‘Shuanghong’	5.05±0.04
	‘绛县 798202’ ‘Jiangxian798202’	3.60±0.06	‘绛县山楂’ ‘Jiangxian Shanzha’	2.27±0.08	‘绛县 798201’ ‘Jiangxian798201’	2.82±0.07
	‘福山 79721’ ‘Fushan79721’	4.15±0.06	‘蒙阴大金星’ ‘Mengyindajinxing’	4.75±0.17	‘通辽红’ ‘Tongliaohong’	2.37±0.12
	‘平邑甜红子’ ‘Pingyitianhongzi’	2.75±0.08	‘晋县大红山楂’ ‘Jinxian Dahongshanzha’	4.90±0.28		
	伏山楂 ( <i>C. brettshneideri</i> Schneid.)		‘古红’ ‘Guhong’	2.40±0.08	‘粉色’ ‘Fense’	0.85±0.10
	‘左伏 1’ ‘Zuofu NO. 1’	1.75±0.21	‘左伏 3’ ‘Zuofu NO. 3’	1.05±0.19	‘吉伏 4’ ‘Jifu NO. 4’	1.65±0.10
	‘伏里红’ ‘Fulihong’	1.75±0.12	‘红肉山里红’ ‘Hongrou Shanlihong’	1.30±0.25		
	‘555’	1.20±0.10				
	光叶山楂 ( <i>C. dahurica</i> Koehne)	‘光叶山楂’ ‘( <i>C. dahurica</i> Koehne)’				
	黑果绿肉 ( <i>C. chlorosarca</i> Maxim.)	‘黑果绿肉-2’ ‘( <i>C. chlorosarca</i> Maxim.)-2’	‘黑果绿肉-12’ ‘( <i>C. chlorosarca</i> Maxim.)-12’	2.02±0.09	黑果绿肉-7 ‘( <i>C. chlorosarca</i> Maxim.)-7’	3.17±0.12
	甘肃山楂 ( <i>C. kansuensis</i> Wils.)	‘甘肃山楂’ ‘( <i>C. kansuensis</i> Wils.)’				
	准噶尔山楂 ( <i>C. songarica</i> C. Koch)	‘准噶尔山楂’ ‘( <i>C. songarica</i> C. Koch)’				
	湖北山楂 ( <i>C. hupehensis</i> Sarg.)	‘佳甜’ ‘Jiatian’				
	阿尔泰山楂 ( <i>C. altaica</i> (Loud.)Lange)	‘阿尔泰山楂’ ‘( <i>C. altaica</i> (Loud.)Lange)’				

## 2.2 黄酮性状的遗传多样性分析

性状的变异频率是性状遗传多样性的数量化体现,变异系数越大,说明这些性状在不同品种之间具有丰富的遗传多样性,在优异资源的选择方面的余地越大。从表 1 和表 2 可以看出,8 种山楂属植物叶片总黄酮含量

差异较大,含量在 0.25%~11.65%之间,遗传系数为 57.07%,具丰富的遗传多样性;该试验测定了 119 份山楂种内资源,其中栽培品种 116 份,野生资源 3 份,其变异系数为 54.76%,显示了丰富的遗传多样性,《中国药典》2005 版中规定山楂叶中的总黄酮含量不少于干重的

7%,在 119 份资源中,有 16 份资源达到并超出了这一标准。而 3 份野生资源中,‘彰武山里红’较高为 10.47%,另外 2 份含量较低,‘晚秋山里红’总黄酮含量为 3.17%,‘垂枝山里红’总黄酮含量为 2.25%。

表 2 山楂种质资源总黄酮含量的遗传多样性分析

Table 2 Genetic analysis of flavone content in hawthorn resources

种类 Species	份数 No. of cultivars	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
山楂 <i>Crataegus</i> spp.	119	0.25	11.65	4.31	2.36	54.76
山楂 <i>C. pinnatifida</i> Bge.	135	0.25	11.65	4.1	2.34	57.07

从图 1 可以看出,总黄酮含量小于 2%的资源占 12.59%;2%~3%资源占 23.70%;3%~4%资源占 14.07%;4%~5%资源占 11.11%;6%~7%资源占 4.44%;高于 7%的资源占 11.85%。总黄酮含量在 2%~3%分布频率最高。该试验涉及山楂属 8 个种的资源,山楂种内较多的品种资源,其结果为今后山楂资源总黄酮分级及资源的利用奠定基础。

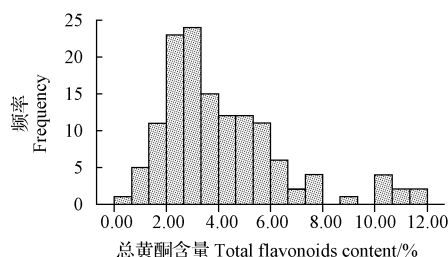


图 1 山楂总黄酮含量频率分布图

Fig. 1 Frequency distribution of flavone content

### 3 讨论与结论

黄酮是一种重要的药用成分,在多种药用植物上都开展了相关的研究<sup>[14-17]</sup>,山楂因黄酮含量较高,一直被作为提取黄酮类成分的重要原材料,近些年有关山楂各器官(根、幼茎、木质茎、叶片、花)黄酮含量的测定已有较多的开展<sup>[4,8-9]</sup>,研究表明山楂各器官均含有黄酮化合物,其中以叶片所含总黄酮量最丰富,该试验所测定的 135 份资源叶片平均含量达 4.11%,也证明了山楂叶片在黄酮提取上具较高的利用价值。

该试验首次系统测定了山楂资源总黄酮含量,结果显示山楂资源间总黄酮的含量差别很大,为今后生产、育种及药用资源的有效利用提供新的材料。通过山楂属植物叶黄酮类成分比较研究,发现了一些有利用价值的叶用资源。总黄酮含量最高的是山楂种内资源‘海棠山楂’为 11.65%,其次是‘豫 8003’为 11.45%,‘卧龙岗 2 号’10.92%,‘吉林叶赫’10.70%,‘彰武山里红’10.47%,‘益都敞口’10.40%,‘寒丰’10.20%,‘聂家裕 2 号’10.07%,‘林县上口’9.27%,‘北京灯笼红’7.92%,‘劈破石’7.75%,‘铜台白野生’7.47%,‘紫丰’7.42%,‘黄宝裕 1 号’7.22%,‘黄果’7.02%。其中‘黄果’为黄色果皮资源,这些山楂资源体现出较高优势,可作为新的材料进行

山楂叶黄酮的提取。除山楂(*C. pinnatifida* Bge.)外,其它 7 个种的资源,总黄酮含量均低于中国药典所规定的标准 7%,当然该试验所测定的 7 个种的资源份数较少,结果还不能完全代表这 7 个种内的资源含量水平。

该试验中有个别资源黄酮含量和前人测定结果不一致,如‘大金星’、‘益都敞口’这 2 份资源含量与王光全等<sup>[9]</sup>报道有所差异,分析主要原因是提取和测定方法不同造成,同时山楂的栽植地区也会影响到其含量<sup>[12]</sup>,也有报道株龄不同黄酮含量也会有差异<sup>[13]</sup>。目前国内外研究者对山楂叶片总黄酮含量的测定,大多是关于测定方法的建立,所用资源数量较少且没有确定资源名称<sup>[5,8]</sup>,限制了黄酮资源的有效利用。该研究以国家果树种质沈阳山楂圃收集的 135 份山楂属资源为试材,系统的测定其总黄酮含量,以期今后开展山楂黄酮资源的挖掘利用及评价提供依据。

### 参考文献

- [1] 赵焕淳,丰宝田.中国果树志·山楂卷[M].北京:中国林业出版社,1996:14-26.
- [2] 谢如玉,戴伦凯,郭梦如,等.山里红的成分分析及国产山楂属植物果实的比较[J].植物学报,1981,23(5):283-287.
- [3] 沈燕琳,董文轩,李鲜,等.山楂酚类物质及其生物活性研究进展[J].园艺学报,2013,40(9):1691-1700.
- [4] 鲁巍巍.中国山楂属(*Crataegus* spp.)植物叶黄酮多样性及其代谢生理研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2008.
- [5] 王敏,万丽,周立,等.北山楂叶与云南山楂叶中总黄酮与金丝桃苷含量的比较[J].现代生物医学进展,2008(8):694-695.
- [6] 孙立立,谢鸿霞,孙敬勇,等.比色法测定山楂中总黄酮的含量[J].中成药,2001(23):748-750.
- [7] 肖志红,刘红彦,韩松,等.不同山楂品种总黄酮含量的检测[J].河南农业科学,2006(6):101-102.
- [8] 石瑞平,周庆英,陈兴菊.不同生长期山楂叶中黄酮类有效成分的含量测定[J].药品检测,2002(11):55.
- [9] 王光全,孟庆杰,扈学立,等.山楂种质器官总黄酮含量的测定分析及其资源利用研究[J].食品科学,2005(26):307-309.
- [10] 孟庆杰,王光全.山楂种质果实营养成分分析及其资源利用研究[J].河北农业大学学报,2005,28(1):21-23.
- [11] 李化,杨滨. RP-HPLC 法测定山楂中黄酮类成分的含量[J].药物分析杂志,2006,26(7):881-884.
- [12] 马燕斌,曾建勋,张俊鹏,等.紫外-可见分光光度法测定不同产地山楂果实中总黄酮含量[J].中国药物经济学,2013(6):24-26.
- [13] 许正斌,佟婉筠,孟庆生,等.山楂叶总黄酮含量变化[J].自然资源研究,1987(3):55-58.
- [14] Cheng S Y, Wang Y, Fei Y J, et al. Studies on the effects of different treatments on flavonoids contents in *Ginkgo biloba* leaves and their regulating mechanism[J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(2):116-119.
- [15] Sabina H, Aliya R. Seaweed as a new source of flavone, scutellarein 4'-methyl ether[J]. Pak J Bot, 2009, 41(4):1927-1930.
- [16] Kaya B, Menemen Y, Saltan F Z. Flavonoids in the endemic species of *Alchemilla* L., (section *Alchemilla* L. subsection *calycanthum* rothm. ser. *elatae* rothm.) from north-east black sea region in turkey[J]. Pak J Bot, 2012, 44(2):595-597.
- [17] Jahan N, Rahman K U, Ali S, et al. Phenolic acid and flavonoid contents of gemmo-modified and native extracts of some indigenous medicinal plants [J]. Pak J Bot, 2013, 45(5):1515-1519.



# 板栗 *MADS-box* 基因的分离及 RNAi 表达载体构建

李琳玲<sup>1,2</sup>, 廖志琴<sup>1,2</sup>, 陈小玲<sup>1,2</sup>, 程水源<sup>1,3</sup>, 程 华<sup>1,2</sup>

(1. 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; 2. 黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000;

3. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘 要:**以中国罗田板栗品种“玫瑰红”的幼叶和花为试材, 采用 EST 数据库分析, 结合 RACE 技术从板栗中分离到 *MADS* 基因的 cDNA 全长序列并构建了其 RNA 干扰载体, 研究开花关键基因对板栗花芽分化的影响。结果表明: *CmMADS* 基因全长为 922 bp 的 *CmMADS* 的 cDNA 序列, 该序列含有 1 个 681 bp 的可读框, 编码 227 个氨基酸序列。生物信息学预测 *CmMADS* 蛋白的分子质量为 25.87 kDa, 理论等电点为 6.27, N 端具有 M 盒保守序列, 其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲组成。蛋白质同源分析表明, *CmMADS* 含有 M 盒和 K 盒 2 个特征性序列区域。同源建模分析显示 *CmMADS* 序列与苹果 *MADS* 蛋白的三维结构及活性位点高度相似。系统进化分析表明, 板栗 *MADS* 蛋白归属植物进化分支, 且与太行花的 *MADS* 蛋白归为一支。将 *CmMADS* 基因 2 段相同长度(283 bp)的反向互补片段 *RMADS* 和 *FMADS* 连入载体 pBluescript SK plus, 构成中间载体 pBluescript SK plus-FR。用 *Ban*HI 和 *Kpn*I 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-FR 和植物表达载体 pC1301-ubi, 回收 pBluescript SK plus-FR 的酶切小片段, 连入 pC1301-ubi 大片段中, 构成植物表达载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi。下一步拟用构建好的 RNA 干扰载体转化农杆菌并由其介导将重组质粒转入烟草, 为深入研究该干扰载体的功能及 *CmMADS* 基因的功能提供参考。

**关键词:**板栗; *MADS-box* 基因; 开花; 成熟期

**中图分类号:**S 664.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0092-07

板栗(*Castanea mollissima*)属壳斗科栗属, 是我国传统的特产干果之一, 分布于北半球的亚洲、欧洲、非洲和

**第一作者简介:**李琳玲(1981-), 女, 湖北十堰人, 博士, 讲师, 现主要从事板栗种质资源评价与改良等研究工作。E-mail: lilinling1437@126.com.

**责任作者:**程水源(1965-), 男, 湖北天门人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事经济林木种质资源评价与利用等研究工作。E-mail: s\_y\_cheng@sina.com.

**基金项目:**湖北省自然科学基金重点资助项目(2010CBB03901); 湖北省教育厅高校产学研合作重点资助项目(C2010060); 2011 中央财政林业科技推广示范资助项目(2011BH0032)。

**收稿日期:**2014-09-09

美洲大陆<sup>[1-2]</sup>。中国板栗营养价值丰富, 口感良好, 囊皮易于脱落, 在国际市场上具有较强竞争力。发展板栗生产不仅具有较高的经济效益, 而且具有良好的生态效益<sup>[3]</sup>。虽然我国是板栗生产的传统大国, 在板栗栽培技术方面积累了较为丰富的经验, 但对板栗生产中长期存在的雄花量过大、雌花量不足(雌雄花比例通常为 1:2 000~1:3 000)的问题一直未能得到很好地解决, 导致单产低、效益差, 严重制约了板栗产业的健康发展<sup>[4]</sup>。

开花是高等植物从营养生长转向生殖生长的一个重要的生理过程, 开花既受外界环境因素的影响, 又受内在基因的调控, 研究表明, 在植物成花转变过程中, 植物的 *MADS-box* 基因网络起着非常关键的作用, 植物依

## Genetic Diversity of Total Flavonoids in Leaves of Hawthorn (*Crataegus* spp.)

ZHAO Yu-hui, WANG Gang, SU Kai, GUO Yin-shan, DONG Wen-xuan  
(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** Taking 135 germplasm resources which belong to 8 kinds species come from National Hawthorn Germplasm Nursery of Shenyang as materials, using  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaOH}$  colorimetry to research the total flavonoids and the genetic diversity of hawthorn. The results showed that the flavonoid content of hawthorn possesses abundant variation, and the variable coefficient was 57.07%, the variatble amplitude was 0.25%—11.65%. It was found that some valuable leaf resources through comparative study for the flavonoids in hawthorn.

**Keywords:** hawthorn leaves; total flavonoid content; genetic diversity