

青钱柳种源间生长及黄酮积累的变异分析

邓波, 韩业鑫, 李媛媛, 赵卓群

(安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

摘要: 为了对中国特有的木本药用植物青钱柳进行优良种源和家系筛选和研究, 分析了12个种源33个家系青钱柳的生长和黄酮积累。结果表明: 种源间和种源内家系间均对树高和胸径生长的变异产生了显著的影响, 但种源的影响更大; 而总黄酮和黄酮单体(槲皮素、异槲皮苷、山奈酚)的含量仅在种源内家系间产生了显著的变异, 家系的影响平均占到总变异的86%, 而且生长和黄酮积累均表现出明显的地理变异规律。聚类分析结果表明, 33个青钱柳家系可以划分为4类。

关键词: 青钱柳; 地理变异; 生长; 黄酮; 种源家系

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)06-1024-08

Variations in growth and flavonoid accumulation among different *Cyclocarya paliurus* provenances

DENG Bo, HAN Yexin, LI Yuanyuan, ZHAO Zhuoqun

(School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: *Cyclocarya paliurus* is a sole medicinal tree species in China. However, limited information is available on its genotype selection for improving growth and flavonoid production. In this study, we analyzed the growth and flavonoid accumulation in 33 families of *Cyclocarya paliurus* from 12 provenances. Results indicated that tree height and diameter at breast height growth were significantly influenced by provenance and family, while provenance had more important impact. The contents of total and individual flavonoids (quercetin, isoquercitrin, and kaempferol) were significantly influenced only by family, which accounted for 86% of total variation. The growth and flavonoid accumulation of *C. paliurus* showed a distinct geographic variation pattern. The hierarchical cluster analysis based on the growth and flavonoid contents in leaves indicated that 33 families of *C. paliurus* can be classified into 4 distinct groups.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; geographic variation; growth; flavonoid; provenance and family

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) 是中国特有的单种属植物, 也是国家重点保护的濒危植物之一^[1-2]。现代研究表明, 其叶中含有大量的生理活性成分, 对人体具有极大的保健价值。目前, 已经分离并鉴定了几十种具有生理活性的次生代谢产物, 其中主要包括黄酮类、酚酸类、三萜类和甾醇类等^[3-4]。但青钱柳自然资源稀少, 多分布于深山或自然保护区中, 自然种群较小, 加之自然环境的破坏以及人为的砍伐等, 使青钱柳居群规模逐步缩小, 种内的遗传多样化也可能正在丧失。而遗传的多样性是一个物种可持续生存、发展的基础^[5]。进行遗传多样性

的研究, 可以了解种质资源的多样性情况及品种间的亲缘关系, 为育种材料的选择、资源的开发利用等提供基础信息, 还可以为种质资源的区划、引种提供参考^[6]。

物种的遗传多样性是在其长期的进化过程中的遗传变异对环境适应的产物^[5]。了解物种分布区主要生态因子的变异规律是研究其表型性状地理变异规律的基础^[7-8]。而树种的地理变异主要受气候因子的影响, 如温度、降水和无霜期等, 而且气候因子与经纬度呈双向变化^[6]。而在育种工作中, 为了从这纷繁的变异中, 选出优良的种源, 实现良种化,

收稿日期: 2017-04-21

基金项目: 安徽农业大学稳定和引进人才项目 (yj2016-03) 资助。

作者简介: 邓波, 博士, 讲师。E-mail: bdeng2008@sohu.com

最终达到高产、优质和高效的目的, 种源试验是基础性的工作^[9]。这项工作可以帮助了解树木种内的地理变异规律, 为造林地提供生产力高、适应力强的种源, 并对选育优良的繁殖材料等方面具有重大意义。目前, 世界上主要的造林树种基本都已经开展过种源试验。大量的研究也表明, 树种的地理变异不仅是环境影响的结果, 这种变异还是可以遗传的^[10]。总之, 林木种源试验已经被认为是一个成功有效的育种手段, 对世界林业的高效和良种化都有巨大的推动作用。因此, 本试验以镇江资源库中的 12 个种源 33 个家系的青钱柳为试材, 通过分析它们的树高和胸径生长、黄酮类的变异情况, 以期探索青钱柳的次生代谢与生长的地理变异规律, 为进行药用青钱柳优良种源或家系的选择提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于江苏镇江扬子江苗圃基地, 其地理坐标为 32°16'40"N、119°32' 52"E, 海拔 20 m。该地属北亚热带湿润季风区, 雨热同季, 光照和热量充足。年均温度为 14.1℃, 年降水量为 1 000~1 100 mm, 且主要集中在 6—9 月, 占全年降雨量的 60% 左右, 无霜期为 220 d; 土壤类型为砂壤土, 有机质含量为 1.77%, 水解氮、有效磷和速效钾含量分别为 77、14.9 和 132.6 mg·kg⁻¹。

1.2 植物材料与试验设计

2006 年 10 月在青钱柳的自然分布区按单株采集青钱柳种子, 种子经自然风干去翅后保存。本试验将其中 9 个省份采集的 12 个种源(福建漳浦:FZP;

湖南江华:HJH; 云南昆明:YKM; 广西资源:GZY; 贵州黎平:GLP; 贵州剑河:GJH; 江西修水:JXS; 江西庐山:JLS; 湖北鹤峰:HHF; 安徽歙县:ASX; 浙江安吉:ZAJ; 安徽舒城:ASC) 33 个家系的青钱柳作为试材, 主要的种源区地理位置及气候因子见表 1。这些种子经自然风干、脱种翅等处理后, 首先进行酸蚀, 然后分别用赤霉素(GA3)浸泡、低温层积以打破其休眠^[11]。层积大约 3 个月后, 将萌芽的幼苗移栽到塑料杯中。待幼苗高约 6 cm 时再次移栽到位于镇江苗圃的苗床上, 株行距为 40 cm×40 cm。

种源试验于 2008 年初开始实施, 试验点也位于镇江苗圃。将苗床上 1 年生的青钱柳苗移栽到种源试验地中, 株行距为 100 cm×200 cm, 每个家系的青钱柳 24 株, 重复 3 次。经过 1 年生长后, 于 2009 年 3 月将每个家系的青钱柳的一半移栽于苗圃的另外的一块试验地, 种源试验地青钱柳的株行距变为 200 cm×200 cm。

1.3 研究方法

(1) 树高和胸径生长的测定。青钱柳的树高和胸径(第 1 年测定地径)生长于每年的 10 月进行测定, 种源试验地中每株青钱柳的树高和胸径均进行测定。

(2) 样品的采集和处理。于 2011 年 10 月中旬按照重复采集每个家系青钱柳的成熟叶片, 重复内的家系按混合方式采样, 即均匀采集每个重复内每个家系的 12 株青钱柳的叶片组成一个样品。采集后的叶样品立即带回实验室去除叶柄只留小叶, 烘干后的样品用植物粉碎机粉碎过 60 目筛, 装袋密封保存在 0~4℃冷库。

表 1 不同的青钱柳地理种源的经纬度及主要气候因子

Table 1 Coordinates and the key climatic factors of different *Cyclocarya paliurus* provenances

种源 Provenance	家系数 Family No.	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔/m Elevation	年均温/℃ Annual mean temperature	无霜期 Frost-free days
FZP	4	24°07'	117°37'	750	18.0	350
HJH	1	24°54'	111°42'	650	17.8	308
YKM	4	25°02'	102°44'	1 913	14.5	230
GZY	1	26°02'	110°40'	800	16.4	300
GLP	1	26°13'	109°18'	750	14.6	277
GJH	3	26°31'	108°42'	920	14.5	300
JXS	1	29°01'	114°30'	500	16.7	247
JLS	5	29°33'	116°30'	1 000	11.4	260
HHF	6	29°48'	110°11'	747	15.8	210
ASX	2	30°07'	118°51'	1 100	8.9	234
ZAJ	4	30°41'	119°41'	400	14.5	255
ASC	1	31°02'	116°32'	704	14.2	224

续表 1

极端高温/°C Extreme high-temperature	极端低温/°C Extreme low-temperature	年均降雨量/mm Annual rainfall	年日照时数/h Annual sunlight
33.0	-4.7	1 750	2 119
39.0	-5.0	1 510	1 758
31.2	-7.8	1 035	2 200
38.3	-8.4	1 768	1 308
36.0	-4.5	1 326	1 320
39.1	-8.1	1 400	1 236
41.2	-11.0	1 634	1 600
32.0	-16.8	1 917	1 520
35.0	-10.5	1 400	1 342
40.8	-12.7	1 480	1 928
38.7	-8.5	1 476	1 849
40.5	-17.0	1 028	1 969

(3) 黄酮的提取和测定。称取约 2 g 的植物样品, 用滤纸包好后放入 250 mL 索氏提取器并用石油醚在 80°C 水浴锅中回流提取 4 h, 以去除叶样品中极性较小的脂溶性成分。丢弃提取液将药渣在室温下自然晾干, 挥干后的药渣作为黄酮提取的样品。本试验采用超声波辅助提取法^[12], 用 75% 乙醇水溶液在 65°C 条件下超声提取 45 min, 在同样条件下提取 2 次, 并将 2 次提取液合并。合并后的提取液挥至近干, 再以甲醇反复清洗残渣并定容至 10 mL, 作为黄酮含量测定的样品。

总黄酮的测定参照 Bao 等^[13]所描述的方法进行测定。精密吸取 1 mL 提取液置于 10 mL 容量瓶, 加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 在室温下放置 5 min 后加入 0.3 mL 1% AlCl₃ 甲醇溶液, 而后加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液混匀并在室温下显色 15 min, 最后在 410 nm 处测定吸光度。提取液中总黄酮含量以芦丁标准品为对照品进行计算, 最后以每克青钱柳叶干样品中含有相当于芦丁当量的毫克数表示。

黄酮单体采用 HPLC-DAD 法测定, 共测定 3 个单体: 槲皮素、异槲皮苷和山奈酚。在进入高效液相分析前, 所有待测样品过 0.45 μm 有机滤膜。其中异槲皮苷是将提取液过滤后直接进样分析, 检测的条件为 (A-色谱纯甲醇, B-0.5% 磷酸): 0~25 min, 15% A; 15~26 min, 15%~90% A; 26~36 min, 90% A; 36~37 min, 15%~90% A; 37~45 min, 15% A。检测波长为 350 nm, 柱温和流动相流速分别为 30°C, 1.0 mL·min⁻¹。而槲皮素和山奈酚则参照《中华人民共和国药典 (2010 年版)》^[14]有关银杏黄酮水解的方法, 将提取液用酸水解为苷元后测定。取 1 mL 提取液于广口瓶中, 挥干溶剂, 残渣中加入 25 mL 体积比为 4:1 的甲醇-25% HCL, 加热

回流 30 min, 冷却后定容至 25 mL。槲皮素和山奈酚检测的流动相为 A-色谱纯甲醇, B-0.3% 磷酸, 采用 V_A:V_B = 55:45 等度洗脱。检测波长为 365 nm, 柱温和流动相流速与异槲皮苷检测条件相同。试验中用于获得外标校准曲线的异槲皮苷购自中国药品生物制品检定所 (北京), 槲皮素和山奈酚购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。

1.4 数据分析

本试验以双因素方差分析结果来比较基因、环境以及二者的交互作用对青钱柳生长和黄酮含量的影响; 以 Duncan's 多重比较来分析处理之间的差异; 所有统计数据均由 SPSS 进行分析 (version 16.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA), 分析结果表示在 95% 的置信水平上的显著水平。

2 结果与分析

2.1 青钱柳树高和胸径生长的变异

12 个种源 33 个家系 6 年生青钱柳的树高和胸径生长情况见表 2。树高和胸径生长在种源和家系间的变异范围分别为 2.45~7.51 m 和 1.52~7.47 cm, 而树高和胸径的平均值分别为 6.10 m 和 5.49 cm。其中, 江西修水 4#、湖南江华 1# 和安徽舒城 4# 的生长较差, 它们的平均树高和胸径生长仅为总平均值的 57.7% 和 44.5%。而浙江安吉 1#、7# 和湖北鹤峰 3#、10# 的生长较好, 它们的平均树高和胸径生长是总平均值的 1.2 和 1.4 倍。由此可知, 不同种源和家系的青钱柳在生长上存在巨大的变异。在种源水平上, 树高生长云南昆明 > 贵州剑河 > 浙江安吉 > 广西资源 > 江西庐山 > 湖北鹤峰 > 安徽歙县 > 福建漳浦 > 贵州黎平 > 安徽舒城 > 江西修水 > 湖南江华, 而胸径生长在种源间的排列顺序与树高基

本一致。

进一步分析表明, 种源间及种源内家系间均对树高和胸径生长的变异有显著的影响 ($P < 0.01$, 表 3)。但种源间的影响作用更为明显, 树高和胸径生长的变异分别有 64.18% 和 77.78% 来源于种源 (表 4)。因此, 在以生长和木材为主要目标的选育过程中, 地理种源的选择具有重要的意义。另外, 分别以各地理种源青钱柳的经纬度为自变量, 树高和胸径生长为因变量, 采用局部函数内插, 将整个区域分成若干独立且连续的区块, 模拟树高和胸径在给

定分布区的地理变异规律 (图 1)。在纬度和经度 2 个方向, 树高和胸径生长的变化趋势相类似。沿经度方向, 以 113°E 左右为中心大致可以将青钱柳种源的划分为 2 个不同的区段。从 102.5° E~112°E 左右, 青钱柳的树高和胸径生长呈下降趋势, 而从 112° E~119.5°E 左右树高和胸径生长呈上升趋势, 整体上表现为以 113°E 左右为中心的“V”型变异规律。纬度方向上, 青钱柳种源的树高和胸径生长变异幅度较小。

表 2 不同种源和家系青钱柳的生长和黄酮积累的变异

Table 2 Variation in growth and flavonoid accumulation for different *C. paliurus* provenances and families

家系 Family	树高/m Tree height	胸径/cm Diameter at breast height	总黄酮/mg.g ⁻¹ Total flavonoid	槲皮素/mg.g ⁻¹ Quercetin	异槲皮苷/mg.g ⁻¹ Isoquercitrin	山奈酚/mg.g ⁻¹ Kaempferol
GZY1	6.34 ± 0.38 ^{f-l}	5.44 ± 1.18 ^{c-h}	21.5 ± 0.8 ^{a-e}	0.45 ± 0.02 ^{c-e}	0.57 ± 0.02 ^{a-c}	0.41 ± 0.02 ^{b-e}
JXS4	3.13 ± 0.18 ^a	1.52 ± 0.03 ^a	19.2 ± 2.1 ^a	0.47 ± 0.02 ^{c-e}	0.73 ± 0.03 ^{a-g}	0.39 ± 0.01 ^{a-e}
HJH1	2.45 ± 0.78 ^a	2.08 ± 0.70 ^{ab}	23.3 ± 2.6 ^{a-i}	0.55 ± 0.01 ^{fg}	0.95 ± 0.03 ^{g-j}	0.56 ± 0.03 ^{f-h}
ASC4	4.97 ± 0.94 ^{bc}	3.73 ± 1.05 ^{bc}	28.0 ± 1.7 ^{b-j}	0.77 ± 0.11 ⁱ	1.27 ± 0.16 ^{kl}	0.89 ± 0.11 ^{lm}
GLP2	5.81 ± 0.83 ^{c-h}	5.01 ± 2.17 ^{c-f}	25.4 ± 2.4 ^{c-j}	0.54 ± 0.03 ^{fg}	0.87 ± 0.04 ^{d-j}	0.77 ± 0.04 ^k
ASX2	5.67 ± 0.57 ^{c-g}	4.73 ± 1.27 ^{c-e}	26.9 ± 4.9 ^{e-j}	0.50 ± 0.01 ^{ef}	6.45 ± 0.35 ^o	0.59 ± 0.03 ^{g-i}
ASX4	6.30 ± 0.49 ^{f-l}	5.50 ± 1.11 ^{c-i}	23.3 ± 1.1 ^{a-i}	0.41 ± 0.05 ^c	0.51 ± 0.02 ^{ab}	0.38 ± 0.03 ^{a-e}
GJH1	6.65 ± 0.38 ^{g-m}	5.66 ± 0.97 ^{c-i}	27.9 ± 0.9 ^{b-j}	0.42 ± 0.04 ^{cd}	1.06 ± 0.11 ^{i-k}	0.92 ± 0.04 ^{lm}
GJH2	6.68 ± 0.55 ^{h-m}	6.41 ± 1.44 ^{e-i}	20.9 ± 1.7 ^{a-d}	0.47 ± 0.01 ^{c-e}	1.01 ± 0.09 ^{h-j}	0.42 ± 0.02 ^{b-e}
GJH3	6.16 ± 1.01 ^{f-j}	5.40 ± 1.97 ^{c-g}	27.7 ± 1.3 ^{g-j}	0.44 ± 0.01 ^{c-e}	0.77 ± 0.03 ^{b-h}	0.45 ± 0.02 ^{c-f}
YKM1	6.77 ± 0.41 ^{h-m}	6.25 ± 0.99 ^{d-i}	26.0 ± 1.4 ^{d-j}	0.22 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.03 ^{a-e}	0.42 ± 0.03 ^{b-e}
YKM2	6.55 ± 0.40 ^{f-m}	6.20 ± 1.11 ^{d-i}	25.0 ± 3.0 ^{b-j}	0.45 ± 0.04 ^{c-e}	1.34 ± 0.16 ^l	0.36 ± 0.01 ^{a-e}
YKM4	6.97 ± 0.5 ^{li-m}	6.05 ± 1.21 ^{d-i}	20.5 ± 0.9 ^{a-d}	0.44 ± 0.01 ^{c-e}	0.54 ± 0.01 ^{a-c}	0.34 ± 0.03 ^{a-e}
YKM5	6.91 ± 0.4 ^{li-m}	5.84 ± 0.77 ^{d-i}	21.9 ± 1.5 ^{a-f}	0.44 ± 0.02 ^{c-e}	0.60 ± 0.10 ^{a-d}	0.34 ± 0.01 ^{a-d}
ZAJ1	7.51 ± 0.38 ^m	7.43 ± 2.20 ^{hi}	19.9 ± 3.4 ^{a-c}	0.44 ± 0.03 ^{c-e}	0.47 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.01 ^{a-d}
ZAJ5	5.18 ± 1.02 ^{b-e}	4.35 ± 1.52 ^{cd}	29.0 ± 3.5 ^j	0.32 ± 0.05 ^b	1.08 ± 0.28 ^{jk}	0.93 ± 0.11 ^m
ZAJ6	6.15 ± 0.89 ^{f-i}	5.34 ± 1.81 ^{c-g}	20.1 ± 2.5 ^{a-c}	0.45 ± 0.01 ^{c-e}	0.50 ± 0.01 ^{ab}	0.39 ± 0.01 ^{a-e}
ZAJ7	7.28 ± 0.24 ^{lm}	7.42 ± 0.91 ^{hi}	18.0 ± 2.1 ^a	0.43 ± 0.01 ^{c-e}	0.45 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.01 ^{a-e}
FZP2	6.17 ± 1.06 ^{f-j}	5.24 ± 2.40 ^{c-f}	27.2 ± 1.1 ^{f-j}	0.48 ± 0.01 ^{de}	0.80 ± 0.01 ^{c-i}	0.61 ± 0.03 ^{h-j}
FZP3	5.62 ± 0.79 ^{c-f}	4.92 ± 1.35 ^{c-e}	22.1 ± 2.0 ^{a-g}	0.43 ± 0.01 ^{cd}	0.56 ± 0.03 ^{a-c}	0.36 ± 0.01 ^{a-e}
FZP4	6.42 ± 1.01 ^{f-l}	5.93 ± 1.85 ^{d-i}	23.0 ± 1.6 ^{a-h}	0.44 ± 0.01 ^{c-e}	0.48 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.07 ^{e-g}
FZP5	5.14 ± 1.88 ^{b-d}	4.55 ± 2.04 ^{c-e}	22.8 ± 5.4 ^{a-h}	0.32 ± 0.07 ^b	0.94 ± 0.36 ^{f-j}	0.72 ± 0.16 ^{jk}
JLS1	6.43 ± 0.59 ^{f-l}	5.33 ± 1.30 ^{c-g}	21.4 ± 2.8 ^{a-e}	0.18 ± 0.03 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.06 ^a
JLS2	7.16 ± 1.04 ^{l-m}	6.08 ± 2.18 ^{d-i}	23.5 ± 4.8 ^{a-j}	0.46 ± 0.01 ^{c-e}	0.55 ± 0.05 ^{a-c}	0.46 ± 0.04 ^{d-f}
JLS3	6.64 ± 0.65 ^{g-m}	6.98 ± 1.66 ^{f-i}	21.5 ± 2.3 ^{a-e}	0.44 ± 0.01 ^{c-e}	0.70 ± 0.04 ^{a-g}	0.30 ± 0.08 ^{ab}
JLS6	6.64 ± 0.43 ^{g-m}	6.36 ± 1.37 ^{d-i}	19.4 ± 2.2 ^{ab}	0.42 ± 0.03 ^{cd}	0.56 ± 0.12 ^{a-c}	0.29 ± 0.08 ^{ab}
JLS9	6.12 ± 0.92 ^{e-i}	5.63 ± 1.59 ^{c-i}	20.8 ± 1.5 ^{a-d}	0.44 ± 0.01 ^{c-e}	0.60 ± 0.02 ^{a-d}	0.36 ± 0.01 ^{a-e}
HHF2	4.37 ± 1.34 ^b	3.77 ± 1.59 ^{bc}	21.7 ± 2.3 ^{a-f}	0.57 ± 0.02 ^{gh}	1.76 ± 0.11 ^m	0.70 ± 0.06 ^{i-k}
HHF3	7.42 ± 0.61 ^m	7.25 ± 1.92 ^{g-i}	21.4 ± 2.4 ^{a-e}	0.42 ± 0.03 ^{cd}	0.67 ± 0.05 ^{a-f}	0.29 ± 0.08 ^{ab}
HHF5	5.90 ± 0.41 ^{c-h}	6.28 ± 1.81 ^{d-i}	22.5 ± 2.2 ^{a-h}	0.44 ± 0.02 ^{c-e}	0.85 ± 0.27 ^{d-j}	0.37 ± 0.15 ^{a-e}
HHF8	6.28 ± 0.49 ^{f-k}	6.30 ± 1.42 ^{d-i}	25.2 ± 1.3 ^{c-j}	0.44 ± 0.03 ^{c-e}	0.86 ± 0.01 ^{d-j}	0.32 ± 0.11 ^{a-c}
HHF10	6.91 ± 0.44 ^{i-m}	7.47 ± 2.10 ⁱ	28.7 ± 3.4 ^{ij}	0.45 ± 0.01 ^{c-e}	0.90 ± 0.09 ^{e-j}	0.42 ± 0.02 ^{b-e}
HHF11	6.03 ± 0.54 ^{d-i}	4.97 ± 1.07 ^{c-e}	25.9 ± 5.4 ^{d-j}	0.61 ± 0.02 ^h	2.40 ± 0.17 ⁿ	0.80 ± 0.04 ^{kl}

注: 同一系列上的不同字母表示不同的青钱柳家系间在生长和黄酮积累上差异显著。

Note: Different letters indicate significant differences among families of *C. paliurus* in the growth and flavonoid accumulation.

表 3 不同种源和家系青钱柳的生长和黄酮积累变异来源方差分析

Table 3 Variance analysis of different *C. paliurus* provenances and families in growth and flavonoid accumulation

指标 Index	均方 MS		F 值 F value	
	种源间 Inter-provenance	种源内 Intra-provenance	种源间 Inter-provenance	种源内 Intra-provenance
树高 Tree height	8.02	1.53	5.24**	6.22**
胸径 Diameter at breast height	14.22	1.55	9.14**	5.68**
总黄酮 Total flavonoid	27.93	28.25	0.99	4.46**
槲皮素 Quercetin	0.05	0.02	2.18	22.31**
异槲皮 Isoquercitrin	4.10	2.99	1.37	210.55**
山奈酚 Kaempferol	0.13	0.11	1.22	27.80**

注：“*”和“**”分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著。Note: “*”and“**” indicate significance at $P < 0.05$ and 0.01, respectively.

表 4 青钱柳种源间和种源内生长和黄酮积累的方差分量和表型分化系数分析

Table 4 Variance portion and differentiation coefficient of flavonoid content of inter- and intra-provenances

指标 Index	方差分量 Variance portion			表型分化系数/% Differentiation coefficient
	种源间 Inter-provenance	种源内 Intra-provenance	误差 Error	
树高 Tree height	0.767	0.428	0.246	64.18
胸径 Diameter at breast height	1.486	0.424	0.272	77.78
总黄酮 Total flavonoid	0.390	7.303	6.339	5.07
槲皮素 Quercetin	0.003	0.007	0.001	31.84
异槲皮 Isoquercitrin	0.139	0.993	0.014	12.30
山奈酚 Kaempferol	0.003	0.035	0.004	7.81

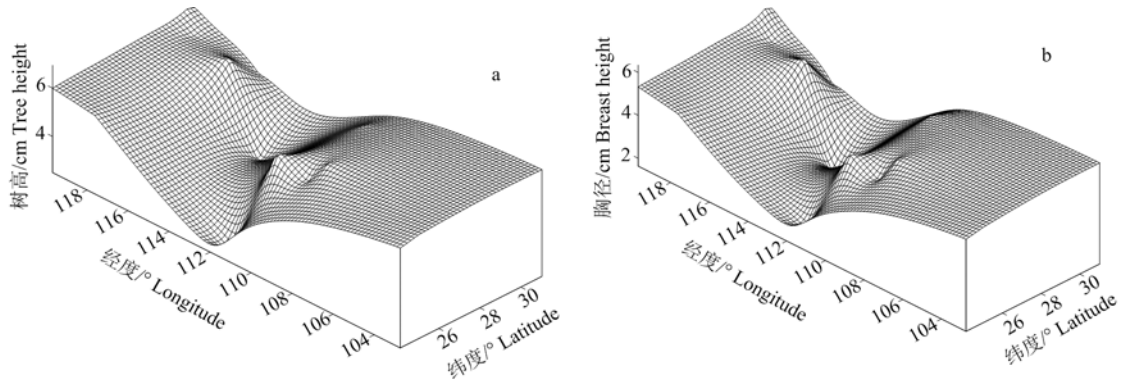


图 1 5 年生青钱柳的树高 (a) 和胸径 (b) 生长的地理变异模式

Figure 1 Geographic variation patterns of tree height (a) and diameter at breast height (b) for *Cyclocarya paliurus*

2.2 青钱柳黄酮类化合物积累的变异

12 个种源 33 个家系青钱柳的黄酮含量见表 2。其中，总黄酮的变异范围为 18.0~29.0 mg·g⁻¹，黄酮单体中最主要的单体为异槲皮苷，变异范围为 0.45~6.45 mg·g⁻¹，其后依次山奈酚 (0.26~0.93 mg·g⁻¹) 和槲皮素 (0.18~0.77 mg·g⁻¹)，它们的最大与最小值间相差达到 1.7、14.3、3.6 和 4.3 倍。而这种变异在种源内家系间尤为的明显，如总黄酮最大的家系为浙江安吉 5# (29.0 mg·g⁻¹)，最小的为浙江安吉 7# (18.0 mg·g⁻¹)。另外，黄酮在种源水平上变异幅度较小，总黄酮、槲皮素、异槲皮苷和山奈

酚在种源水平上的变异范围分别为 19.2~28.0、0.38~0.77、0.57~3.48 和 0.33~0.89 mg·g⁻¹。但总体上，安徽舒城含量较高，而江西修水的含量较低。进一步分析也证实了上述结果，总黄酮和黄酮单体含量的变异主要来源于种源内 (表 3 和表 4)。种源内家系间对黄酮含量的变异产生了显著影响 ($P < 0.01$)，而种源间却无显著影响。总黄酮、槲皮素、异槲皮苷和山奈酚的含量变异分别有 94.93、68.16、87.70 和 92.19% 来源于种源内家系间的影响。

以青钱柳树高和胸径生长相同的处理方法，得到各地地理种源青钱柳黄酮含量在经纬度 2 个方向上

的地理变异趋势图(图2)。总黄酮和黄酮单体的地理变异规律基本一致。其中,总黄酮、槲皮素和山奈酚的含量在 117°E 和 31°N 左右的交汇处出现一个“顶点”,而异槲皮苷含量的“顶点”大约出现在 119°E 和 30.5°N 左右的交汇处。黄酮含量总体上表

现出,以“顶点”为中心,向周围区域逐渐减小的变化趋势。本试验中,黄酮单体含量最小的种源来自于低纬度与低经度交汇的地区。而总黄酮含量在 113°E~116°E 的区间范围内同样出现了一个含量较低的区域。

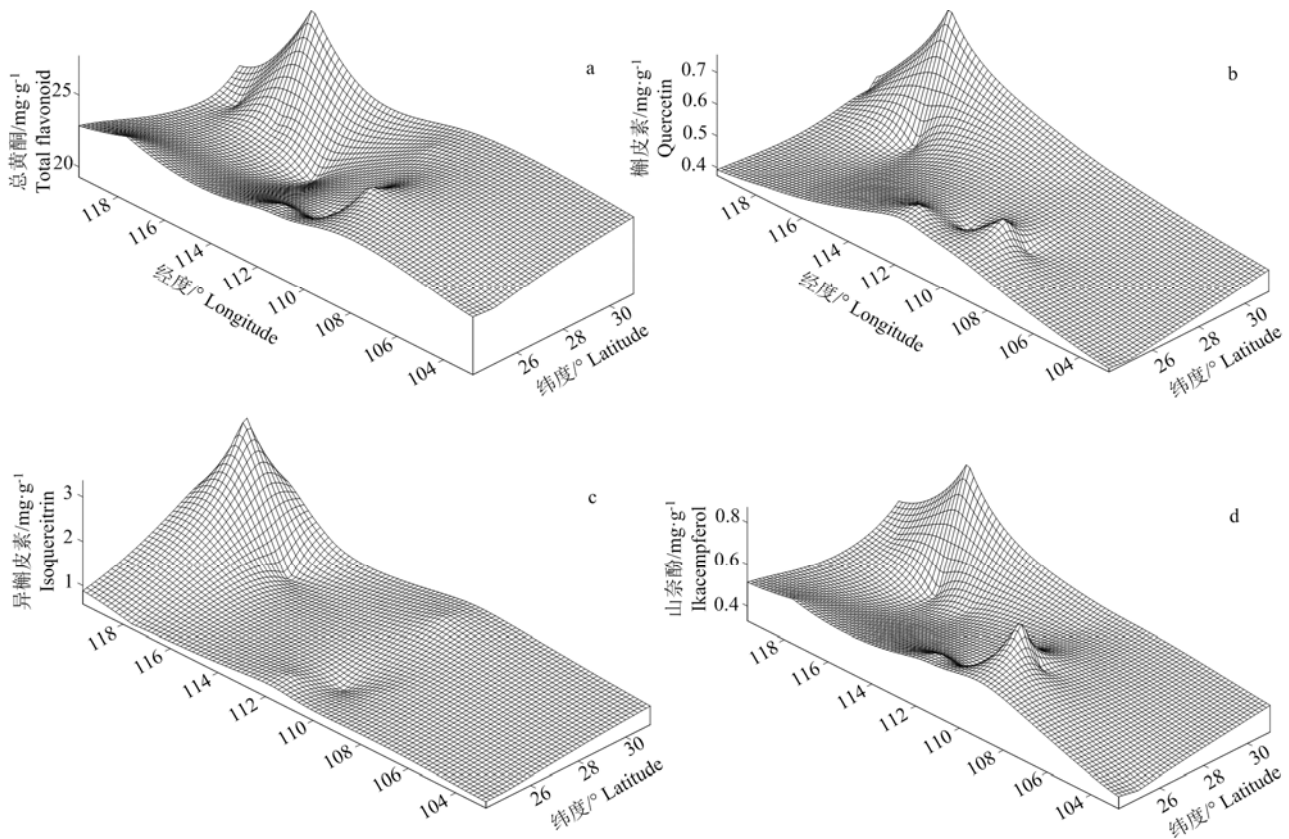


图 2 5 年生青钱柳的黄酮含量的地理变异模式

Figure 2 Geographic variation patterns of leaf flavonoid content for *Cyclocarya paliurus* measured at age 5

2.3 青钱柳黄酮生产的遗传变异评价

为深入理解不同青钱柳种源和家系在生长和黄酮积累上的变异,将 2 个生长指标和 4 个黄酮积累指标作为变量,进一步进行聚类分析。结果显示,33 个青钱柳家系共被聚为 4 类(图 3)。其中,第 4 类(ASX2)在生长和黄酮积累上表现俱佳,可能可以作为黄酮生产的优良家系。第 2 类(7 个家系)中,黄酮含量较高,但生长表现较差。相反,第 1 类(23 个家系)和第 3 类(JXS4、HJH1)在生长上表现较好,但黄酮积累较低。由于存在遗传与环境的交互效益,在今后的栽培或引种工作中,还需要对第 1~3 类青钱柳家系进行更大范围的种源试验。

3 讨论

来自于不同地理种源的同一种植物往往在其种群内部保持着不同水平的遗传变异,这种变异能为选

择育种中改善生长或其他性状提供基础^[15]。如在最近的研究中,孙戴妍等^[16]发现,来自于 22 个不同地区的青钱柳天然种群的胸径生长存在明显变异,该研究是第一次对青钱柳自然种群表型变异进行了分析。而对于不同种源在同一环境下变异情况,必须开展种源试验,以进行林木改良。在之前的研究中,发现 7 年生青钱柳的生长和木材特性在种源间发生了显著的变异^[17]。余诚棋等^[15]也发现 1 年生青钱柳的树高和地径生长在家系间发生了明显变异,且家系是变异的主要来源。然而,这些研究所包含的种源和家系数较少,只能在一定程度上反映青钱柳生长或次生代谢物积累的变异状况。本研究中较为全面的包括了青钱柳自然分布区的种源和家系,对野生资源保护、良种选育和制定种子区划等具有重要意义。另外,对于药用青钱柳人工林经营,获得较高的生物产量至关重要。但目前研究没有对各

种源家系的生物量积累进行测定。一般情况下,生长与生物量积累存在显著正相关性^[18],即通过生长测定对生物产量进行间接选择。

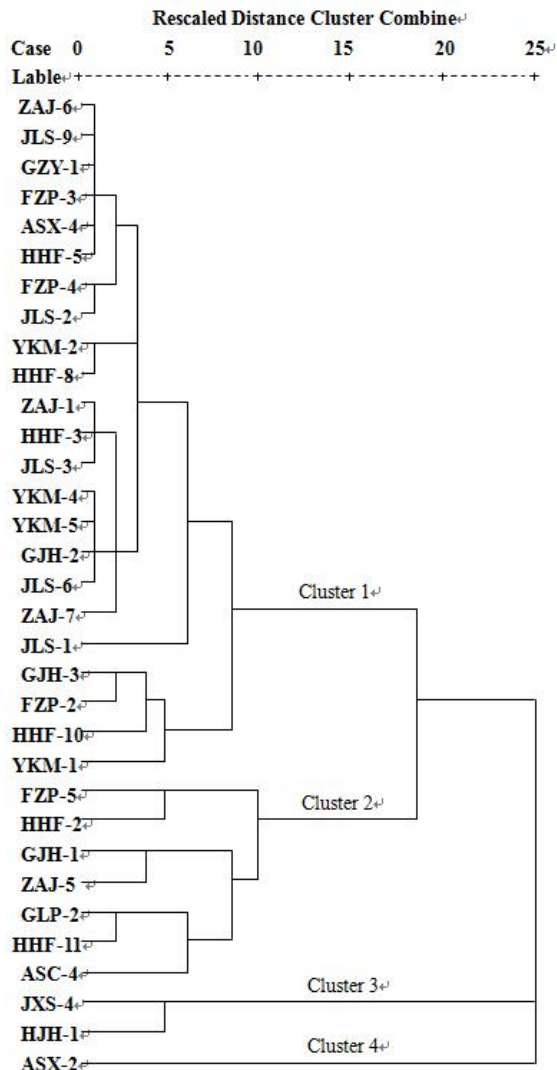


图 3 33 个青钱柳家系聚类分析

Figure 3 Cluster analysis dendrogram of the performance of the 33 families of *Cyclocarya paliurus* based on a comparison of Euclidean distance

作为一个木本药用植物,黄酮类物质是青钱柳中主要的次生代谢产物之一^[19]。关于黄酮类化合物积累的遗传变异,之前有少量报道。如 Fang 等^[20]发现,12 个种源 1 年生青钱柳叶中的总黄酮类物质含量差异显著(5.61~13.2 mg·g⁻¹),但比目前测得的含量更低。杨万霞等^[21]也发现青钱柳叶中黄酮类物质存在明显地理变异,其中纬度变异大于经度变异,这与本研究的结果基本一致。另外,谢明勇和李磊^[22]发现青钱柳叶中的黄酮比传统饮品茶叶中的黄酮含量更高。而且,与常见的蔬菜和其他植物相比,除山奈酚含量低于辣木外,其他指标均更高^[23]。因此,

青钱柳在药用或保健食品工业方面具有巨大的应用前景,但优良种源或家系和选择势在必行。通过适当的选择可以获得在目标特征上具有较高遗传力的品系,获得较高的遗传增益。如兴安落叶松 37 个不同家系间的树高和胸径生长存在明显变异,通过优良家系选择并进行有性繁殖后代,树高获得 0.5% 的遗传增益,胸径获得 2.5% 的遗传增益^[24]。本试验中,树高和胸径生长同时受到种源和家系的显著影响,而黄酮的含量主要受家系遗传差异的影响,平均有 86% 的变异来源于家系。因此,在以获取青钱柳次生代谢产物为目标的栽培中,家系的选择可以获得较好的效果。

在特定环境条件下,希望得到具有较高生长速率和较高黄酮积累量的种源或家系。根据不同环境条件下植物次生代谢和资源分配模式的差异,Herms 和 Mattson^[24]将植物划分为 3 个表现型:(1)具有较高生长速率但积累的次生代谢物低;(2)具有较低生长速率但次生代谢物含量较高;(3)生长速率和次生代谢物积累均较低,这个划分也在某种程度上与本研究的结果相同。在生态学角度上,生长和次生代谢的这种可塑性变化也有利于植物适应特定的环境条件或适应环境因子的时空变异^[24-25]。另外,在进行种源地理变异分析的过程中,由于地理环境的复杂性,往往很难用简单的直线方程模拟一些形态和生理指标。而以高次多项式对测定结果进行拟合,可以达到更好的效果,也更符合实际的需要。通过三维图形的表达,可以更准确的进行种源区的划分和更有针对性的对引种区域做出准确判断。但为了增加结果的准确性,需要增加测试的种源数量,而且树种的遗传表达和环境间存在交互作用。因此,为了获取大量的特定次生代谢产物,今后还需要进一步进行多环境条件下的种源试验。

4 结论

本试验所测试的 12 个种源 33 个家系的青钱柳在树高和胸径生长、黄酮的含量上存在显著的差异。方差分析结果表明,种源间和种源内家系间均对生长的变异产生了显著的影响($P < 0.01$),但种源的影响更大,其对树高和胸径生长的变异分别占 64.18% 和 77.78%;而黄酮的含量仅在种源内家系间产生了显著的变异($P < 0.01$),家系的影响平均占到总变异的 86%。另外,青钱柳的生长和次生代谢产物积累呈现出明显的地理变异规律。聚类分析结果表明,33 个青钱柳家系划分为 4 类。其中 8 个家系(第 2 和第 4 类)具有相对较高的黄酮积累和较

低的生长速率,可以在与试验地具有相似环境条件的造林地进行栽培;而另外 23 个家系(第 1 和第 3 类)具有较好的生长表现但黄酮含量较低,还需进行多环境条件下的种源试验。

参考文献:

- [1] 谢寅峰, 王莹, 尚旭岚, 等. 青钱柳组培快繁体系的初步研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(11): 2331-2338.
- [2] 谢明勇, 谢建华. 青钱柳研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 113-121.
- [3] 陈金华, 黄建安, 刘仲华. 青钱柳叶的化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 159-161.
- [4] 泐香香, 方升佐. 青钱柳次生代谢产物及其生理功能[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13612-13614.
- [5] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [6] 王玉山. 侧柏种源遗传多样性与地理变异规律研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [7] 刘军, 陈益泰, 姜景明, 等. 香椿种源苗期性状变异与原产地生态因子典型相关分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(11): 27-29.
- [8] 何贵平, 陈益泰, 唐雪元, 等. 枫香地理种源幼林生长性状在编译研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(4): 585-589.
- [9] 杨传平. 长白落叶松种群遗传变异与利用[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2001.
- [10] 谷俊涛. 中国刺槐次生种源遗传结构及遗传多样性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [11] FANG S Z, WANG J Y, WEI Z Y, et al. Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja [J]. Sci Hort, 2006, 110: 305-309.
- [12] HUANG W, XUE A, NIU H, et al. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro [J]. Food Chem, 2009, 114: 1147-1154.
- [13] BAO J S, CAI Y, SUN M, et al. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability [J]. J Agricul Food Chem, 2005, 52: 2327-2332.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [15] 余诚棋, 杨万霞, 方升佐, 等. 青钱柳种源间苗期性状变异分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(1): 34-38.
- [16] 孙戴妍, 尚旭岚, 泐香香, 等. 青钱柳胸径生长和木材密度的地理变异研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 1-5.
- [17] DENG B, FANG S Z, YANG W X, et al. Provenance variation in growth and wood properties of juvenile *Cyclocarya paliurus* [J]. New For, 2014, 45: 625-639.
- [18] CAI Z Q, WANG W H, YANG J, et al. Growth, photosynthesis and root reserpine concentrations of two *Rauvolfia* species in response to a light gradient [J]. Ind Crop Prod, 2009, 30: 220-226.
- [19] 方升佐, 泐香香. 青钱柳资源培育与开发利用的研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007, 31(1): 95-100.
- [20] FANG S Z, YANG W X, CHU X L, et al. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Chem, 2011, 124: 1382-1386.
- [21] 杨万霞, 余诚棋, 方升佐. 青钱柳叶中黄酮类化合物的地理变异[J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(4): 522-527.
- [22] 谢明勇, 李磊. 青钱柳化学成分和生物活性研究概况[J]. 中草药, 2001, 32(4): 365-366.
- [23] 商永亮, 张淑华, 陈志成, 等. 兴安落叶松优良家系选择及遗传增益[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(7): 123-125.
- [24] HERMS D A, MATTSON W J. The dilemma of plants: to grow or defend [J]. Q Rev Biol, 1992, 67: 283-335.
- [25] DEWALT S J, HAMRICK J L. Genetic variation of introduced Hawaiian and native Costa Rican populations of an invasive tropical shrub, *Clidemia hirta* (Melastomataceae) [J]. Am J Bot, 2004, 91(8): 1155-1162.