



中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊
首批林草科技重点期刊

ISSN 1000-3142
CN 45-1134/Q
CODEN GUZHEI

广西植物

GUIHAIA



第43卷 第6期 Vol. 43 No. 6
2023年6月 Jun. 2023

兰科植物研究 专栏



广西壮族自治区 广西植物研究所 广西植物学会 主办
中国科学院 广西植物研究所 广西植物学会 主办
Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region
and Chinese Academy of Sciences
Guangxi Society of Botany



科学出版社
Science Press

出版

6
2023

<http://www.guihaia-journal.com>

《广西植物》连续九次入选中国科学引文数据库（CSCD）

近日，中国科学院文献情报中心发布中国科学引文数据库（CSCD）2023—2024 年度来源期刊遴选结果，《广西植物》再次被收录为中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊，这是《广西植物》自 1996 年以来连续九次入选该数据库。

中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊 收录证书

广西植物

依据文献计量学的理论和方法，通过定量与定性相结合的综合评审，贵刊被收录为中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊，特颁发此证书。

证书编号: CSCD2023-519
有效期: 2023年-2024年
发证日期: 2023年6月
查询网址: www.sciencechina.cn



据悉，中国科学引文数据库（Chinese Science Citation Database,简称 CSCD）是我国第一个引文数据库，该数据库以其专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便的优势，成为广大科研工作者广泛使用的文献检索工具，被誉为中国的 SCI。中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊每两年遴选一次。依据文献计量学的理论和方法，通过定量遴选与定性评估相结合的综合评审，2023—2024 年度中国科学引文数据库（CSCD）确定收录来源期刊 1 339 种，其中中国出版的英文期刊 316 种、中文期刊 1 023 种。中国科学引文数据库（CSCD）与科睿唯安、爱思唯尔合作，成为我国唯一的与 Web of Science（SCI）、Scopus 合作的数据库，向世界推广中国期刊。

中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊检索网址：

http://sciencechina.cn/cscd_source.jsp

目次

兰科植物研究 专栏

- 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌多样性研究 张镇梁, 王美娜, 李 健, 李素珍, 段晓娟, 乔 琦(991)
- 广西植物名录补遗Ⅵ——兰科4新记录属和13新记录种 黄雪奎, 覃 营, 谢 高, 刘 演(1006)
- 蝴蝶兰新型杂交品种挥发性成分分析 童 妍, 张燕萍, 胡美娟, 曹映辉, 章杨婷, 仝恩慧, 王文君, 赵 凯, 彭东辉, 周育真(1016)
- 基于 MaxEnt 模型预测中国兰属植物的分布格局及主导气候因子 郑 芳, 黄智聪, 陈利君, 王 蒙, 严岳鸿, 陈建兵(1027)
- 铁皮石斛 SPL 膜结合(STM)转录因子的全基因组鉴定及表达分析 杨 乐, 聂 聪, 龙小琴, 何基泽, 颜超越, 朱乾坤, 王万军(1041)

生理与发育

- 滇水金凤花距发育相关基因 *ABP* 的克隆及表达分析 魏春梅, 孟丹晨, 李 凡, 向南星, 杨建国, 黄美娟, 黄海泉(1051)
- 缓释肥对杉木容器苗生长、光合生理和养分积累的影响 李玲燕, 唐 银, 钟明慧, 郑雪燕, 许珊珊, 曹光球, 叶义全(1059)
- 花生铝响应类受体蛋白激酶 *AhPRK4* 的原核表达分析 苏桂军, 李 霞, 陈芋西, 詹 洁, 王爱勤, 何龙飞, 肖 冬(1070)
- 土壤因子与华重楼生物量和药效成分含量相关性分析 夏 科, 赵志国, 吴巧芬, 李秀娟, 郑文俊, 仇 硕(1080)
- 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长特性的影响 王宇萧, 刘明庆, 李 妍, 黄思杰, 杨立飞(1088)
- OsIMA1* 增强水稻对镉逆境的适应性 彭 凤, 路承凯, 梁 岗(1097)
- 锰胁迫和性别竞争交互处理下沙棘雌雄幼苗生理响应特征 方 玲, 林玉虎, 何云晓, 陈 浩, 徐元洪, 孙旭东, 陈 娟(1105)

资源与植物化学

- 杏叶防风的化学成分及抗炎活性研究 李 丽, 雷 艳, 汪 洋, 马 雪, 陆 苑, 刘春花, 王永林(1114)
- 基于 HPLC-ECD 研究牡荆叶抗氧化的谱-效关系 吴其妹, 李 影, 李志荣, 刘明容, 马继敏, 余念念, 陈荣祥, 周亚平(1124)
- 全缘叶紫珠化学成分研究 马文杰, 苏志维, 马仲辉(1135)
- 不同品种毛茶水浸出物成分及抗氧化、降血糖活性研究 霍华珍, 蔡爱华, 郭春雨, 谢运昌, 李典鹏(1145)
- 北豆根化学成分及其抗炎活性研究 任文静, 马 艳, 蔡梅超, 王凤山, 李 莉, 刘玉红(1155)
- 苦橙不同部位挥发油成分及抗氧化与抗菌活性分析 刘亚男, 文雅丽, 陈霞蔚, 林家逊, 许有瑞(1163)

责任编辑 蒋巧媛 周翠鸣 李 莉 邓斯丽
责任校对 邓斯丽 周翠鸣 王登惠 蒋巧媛 李 莉
英文编辑/校对 周翠鸣 李 莉 王登惠 邓斯丽 蒋巧媛
封面/版式设计 李 莉 蒋巧媛 王登惠 邓斯丽 周翠鸣

期刊基本参数: CN 45-1134/Q * 1981 * m * A4 * 182 * zh+en * P * ¥45.00 * 1200 * 18 * 2023-6

封面说明: 指柱兰(*Stigmatodactylus sikokianus*)、拟泰国卷瓣兰(*Bulbophyllum nipondhii*)和深圳拟兰(*Apostasia shenzhenica*)均为兰科(Orchidaceae)草本植物,大多兰科植物极具科学价值、经济价值。指柱兰为地生小草本,主要分布在中国的台湾、福建北部(武夷山)、湖南以及日本,生于海拔1800m的密林下水沟边阴湿处;拟泰国卷瓣兰为小型附生植物,主要分布在中国云南和泰国;深圳拟兰主要分布在中国广东深圳,是典型陆生草本植物。所有野生兰科植物均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录I或附录II,兰科植物也是我国野生动植物和自然保护区保护工程中15种重点保护物种之一。照片示:部分兰科植物。1. 指柱兰;2. 拟泰国卷瓣兰;3. 深圳拟兰。封面照片由覃营提供。相关内容详见本期正文1006~1015页黄雪奎等的文章。

1 2
— 3

CONTENTS

Special Subject: Orchidaceae Plant Research

- Diversity study of endophytic communities in fresh and silica gel-dried root samples of *Holcoglossum kimballianum* (Orchidaceae) ZHANG Zhenliang, WANG Meina, LI Jian, LI Suzhen, DUAN Xiaojuan, QIAO Qi(991)
- Supplement to Guangxi Plant List VI: four new record genera and thirteen new record species of Orchidaceae HUANG Xuekui, QIN Ying, XIE Gao, LIU Yan(1006)
- Volatile component analysis of new hybrid varieties of *Phalaenopsis* TONG Yan, ZHANG Yanping, HU Meijuan, CAO Yinghui, ZHANG Yangting, TONG Enhui, WANG Wenjun, ZHAO Kai, PENG Donghui, ZHOU Yuzhen(1016)
- Prediction of distribution patterns and dominant climatic factors of *Cymbidium* in China using MaxEnt model ZHENG Fang, HUANG Zhicong, CHEN Lijun, WANG Meng, YAN Yuehong, CHEN Jianbing(1027)
- Genome-wide identification and expression analysis of SPL with transmembrane motif (STM) transcription factor in *Dendrobium officinale* YANG Le, NIE Cong, LONG Xiaoqin, HE Jize, YAN Chaoyue, ZHU Qiankun, WANG Wanjuan(1041)

Physiology and Development

- Cloning and expression analysis of *ABP* gene related to spur development in *Impatiens uliginosa* WEI Chunmei, MENG Danchen, LI Fan, XIANG Nanxing, YANG Jianyuan, HUANG Meijuan, HUANG Haiquan(1051)
- Effects of slow-release fertilizer on growth, photosynthetic physiology and nutrient accumulation of container seedlings of *Cunninghamia lanceolata* LI Lingyan, TANG Yin, ZHONG Minghui, ZHENG Xueyan, XU Shanshan, CAO Guangqiu, YE Yiquan(1059)
- Prokaryotic expression analysis of aluminum associated receptor-like protein kinase AhPRK4 in peanut (*Arachis hypogaea*) SU Guijun, LI Xia, CHEN Yuxi, ZHAN Jie, WANG Aiqin, HE Longfei, XIAO Dong(1070)
- Correlation analysis between soil factors with biomass and medicinal components of *Paris polyphylla* var. *chinensis* XIA Ke, ZHAO Zhiguo, WU Qiaofen, LI Xiujuan, ZHENG Wenjun, QIU Shuo(1080)
- Effects of cinnamaldehyde on growth characteristics of tomato seedlings under NaCl stress WANG Yuxiao, LIU Mingqing, LI Yan, HUANG Sijie, YANG Lifei(1088)
- OsIMA1* enhances tolerance to cadmium stress in rice PENG Feng, LU Chengkai, LIANG Gang(1097)
- Physiological response characteristics of *Hippophae rhamnoides* seedlings under interaction of Mn stress and sexual competition FANG Ling, LIN Yuhu, HE Yunxiao, CHEN Hao, XU Yuanhong, SUN Xudong, CHEN Juan(1105)

Resources and Phytochemistry

- Chemical constituents of *Pimpinella candolleana* and their anti-inflammatory activities LI Li, LEI Yan, WANG Yang, MA Xue, LU Yuan, LIU Chunhua, WANG Yonglin(1114)
- Spectrum-effect relationship of antioxidant activity in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves based on HPLC-ECD WU Qimei, LI Ying, LI Zhirong, LIU Mingrong, MA Jimin, YU Niannian, CHEN Rongxiang, ZHOU Yaping(1124)
- Chemical constituents of *Callicarpa integerrima* MA Wenjie, SU Zhiwei, MA Zhonghui(1135)
- Components, antioxidant and hypoglycemic activities of water extracts from different varieties of raw tea HUO Huazhen, CAI Aihua, GUO Chunyu, XIE Yunchang, LI Dianpeng(1145)
- Chemical constituents from the rhizome of *Menispermum dauricum* and their anti-inflammatory activities REN Wenjing, MA Yan, CAI Meichao, WANG Fengshan, LI Li, LIU Yuhong(1155)
- Essential oil components and their antioxidant and antibacterial activities in different parts of *Citrus aurantium* var. *amara* LIU Yanan, WEN Yali, CHEN Xiawei, LIN Jiaxun, XU Yourui(1163)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202206051

张镇梁, 王美娜, 李健, 等, 2023. 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌多样性研究 [J]. 广西植物, 43(6): 991–1005.
ZHANG ZL, WANG MN, LI J, et al., 2023. Diversity study of endophytic communities in fresh and silica gel-dried root samples of *Holcoglossum kimballianum* (Orchidaceae) [J]. *Guihaia*, 43(6): 991–1005.



管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌多样性研究

张镇梁^{1,2}, 王美娜², 李健², 李素珍², 段晓娟², 乔琦^{1*}

(1. 河南科技大学 农学院/牡丹学院, 河南 洛阳 471023; 2. 深圳市兰科植物保护研究中心/全国兰科植物种质资源保护中心, 深圳市濒危兰科植物保护与利用重点实验室, 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 广东 深圳 518114)

摘要: 管叶槽舌兰 (*Holcoglossum kimballianum*) 是一种珍稀濒危兰科植物, 其野生种群亟需保护。内生菌对兰科植物的生长发育至关重要, 为评估管叶槽舌兰内生菌的多样性、分析采样方式对其内生菌的影响, 该文采用高通量测序技术对迁地保育状态下新鲜与硅胶干燥的管叶槽舌兰根内生菌进行研究。结果表明: (1) 新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生菌物种组成明显不同, 管叶槽舌兰内生真菌注释到 6 门 46 科 51 属, 内生细菌注释到 15 门 105 科 178 属; 干燥后管叶槽舌兰根内生真菌注释到 6 门 88 科 116 属, 内生细菌注释到 21 门 154 科 336 属。(2) 迁地保育状态的管叶槽舌兰根样内生菌具有丰富的多样性, 并且内生细菌群落丰富度和多样性远比内生真菌群落高; 经硅胶干燥后, 内生真菌 α 多样性指数升高、 β 多样性指数降低, 而内生细菌的 α 多样性指数降低、 β 多样性指数则升高。(3) 差异显著性真菌黄盖小脆柄菇 (*Psathyrella candolleana*) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 的 *C. tofieldiae* 只存在于新鲜根样中, 新鲜管叶槽舌兰差异显著性细菌是马赛菌属 (*Massilia*), 干燥根样中差异显著性细菌类群包括拜叶林克氏菌科 (*Beijerinckiaceae*)、黄色杆菌科 (*Xanthobacteraceae*) 及慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)。(4) 共发生网络分析显示, 经干燥后管叶槽舌兰根样内生菌群落中占互作主导地位的优势物种和互作模式都发生了改变。综上所述, 不同采样处理会影响管叶槽舌兰根内生菌的群落结构, 在研究兰科植物根样内生菌时宜使用新鲜的根样。该研究结果为管叶槽舌兰野生种群保护及人工栽培提供了内生菌数据基础, 也为兰科植物内生微生物采样方法提供了参考。

关键词: 管叶槽舌兰, 内生真菌, 内生细菌, 新鲜, 硅胶干燥, 多样性

中图分类号: Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-0991-15

Diversity study of endophytic communities in fresh and silica gel-dried root samples of *Holcoglossum kimballianum* (Orchidaceae)

ZHANG Zhenliang^{1,2}, WANG Meina², LI Jian², LI Suzhen²,
DUAN Xiaojuan², QIAO Qi^{1*}

收稿日期: 2022-11-10

基金项目: 国家自然科学基金 (32001245); 深圳市可持续发展专项 (KCXFZ20211020164200001); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20210324123013037)。

第一作者: 张镇梁 (1997-), 硕士研究生, 研究方向为植物保护, (E-mail) 2399308611@qq.com。

*通信作者: 乔琦, 博士, 教授, 研究方向为植物保护生物学, (E-mail) nxyqiao@163.com。

(1. Agricultural College/Peony College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; 2. Orchid Conservation & Research Center of Shenzhen and the National Orchid Conservation Center of China, Shenzhen Key Laboratory for Orchid Conservation and Utilization, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, Shenzhen 518114, Guangdong, China)

Abstract: *Holocoglossum kimballianum* is a rare and endangered orchid, and its wild populations are in urgent need of conservation. Endophytic fungi and bacteria are important to the growth and development of orchids. In order to assess the diversity of *H. kimballianum* endophytes and the impact of sampling methods on the endophytes, high-throughput sequencing technology was used to study the diversity of endophytes in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum* in *ex-situ* conservation. The results were as follows: (1) The species compositions of endophytic fungi and endophytic bacteria were distinctly different in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*. There were total of 6 phyla 46 families 51 genera of endophytic fungi and 15 phyla 105 families 178 genera of endophytic bacteria annotated in the roots of the *H. kimballianum*. After silica gel-dried, the endophytic fungi of the *H. kimballianum* had total of 6 phyla, 88 families, 116 genera, and the endophytic bacteria had total of 21 phyla, 154 families, 336 genera. (2) Endophytes in the roots of *H. kimballianum* in *ex-situ* conservation were of richness and diversity of endophytic bacterial community was much higher than that of endophytic fungal community. After silica gel-dried, the α diversity indices of endophytic fungi increased and the β diversity indices decreased, while the α diversity indices of endophytic bacteria decreased and the β diversity indices increased. (3) Significantly different fungi *Psathyrella candolleana* and *Colletotrichum tofieldiae* only existed in the endophytic fungal communities of fresh roots. The significantly different bacteria in roots of fresh *Hocoglossum kimballianum* was *Marseilla*, and the significantly different bacteria in the silica gel-dried roots included Beijerinckiaceae, Xanthobacteraceae and *Bradyrhizobium*. (4) Co-occurrence network analysis revealed that the dominant species and interaction patterns in the endophytic communities of the roots of *Hocoglossum kimballianum* were changed after silica gel-dried. In summary, different sampling treatments can affect the community structure of the endophytes in the roots of *H. kimballianum*, and it is advisable to use fresh root samples when studying the endophytes of orchids. The results provide an endophytic data basis for wild populations conservation and artificial cultivation of *H. kimballianum*, and also provide a reference for sampling methods of endophytic microorganisms in orchids.

Key words: *Holocoglossum kimballianum*, endophytic fungi, endophytic bacteria, fresh, silica gel-dried, diversity

生态系统中,植物与大量微生物相互作用,这些微生物在地下和地上植物器官的内部和外表面都有定殖(Compant et al., 2019; Escudero et al., 2019),这些与植物相关的微生物群落统称为植物微生物群(Marchesi et al., 2015)。细菌和真菌是植物微生物群的主要组成部分,它们对植物生态系统的平衡起到重要作用。植物中的内生菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段,生活于健康植物中的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内的菌类。内生真菌对兰科植物非常重要,兰科菌根真菌属于内生真菌,它们是兰科植物生长发育各个阶段不可或缺的关键因素,能直接参与兰科植物根系甚至整个植株的生理代谢活动,从而保障兰科植物的生长、个体间竞争以及对病原体的防御(盖雪鸽等, 2014; Li et al., 2021)。高越等(2019)从手参(*Gymnadenia conopsea*)根系中分离出角担菌属

(*Ceratobasidium*),将该菌株与手参种子进行共培养,发现它能明显促进手参种子原球茎的形成且最终分化成幼苗。杨文科(2020)通过迁地共生萌发从白旗兜兰(*Paphiopedilum spicerianum*)原球茎中分离出胶膜菌属(*Tulasnella*),它能有效促进其种子萌发直到幼苗阶段。这都表明内生真菌在兰科植物的生长发育中具有极大的促进作用。据不完全统计,已报道的常见兰科植物菌根真菌有 69 属,分别隶属于担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota)及毛霉门(Mucoromycota)的 50 科(王美娜等,2021)。

此外,兰科植物的内生菌中还存在大量有益的内生细菌,这些有益的内生细菌对兰科植物的生长发育也发挥着积极的促进作用, Tsavkelove 等(2007)研究表明内生细菌能促进兰科植物种子萌发、光合形态建成、缓解非生物胁迫及生长发育等。

目前,关于兰科植物根部细菌结构和功能的认知还非常有限(Kaur et al., 2021)。从兰科植物中分离出的细菌通常属于变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes),不同的内生细菌类群对兰科植物具有不同程度的促进作用,Faria 等(2013)研究发现,类芽孢杆菌属(*Paemibacillus*)能促进 *Cattleya loddigesii* 幼苗的生长。从兰属(*Cymbidium* sp.)根中分离出的根瘤菌属(*Rhizobium*)能溶解磷酸钙。此外,Tarkka 等(2008)研究表明,兰科植物菌根中存在菌根辅助细菌(mycorrhiza helper bacteria),能与菌根真菌特异性结合,刺激菌根真菌的孢子萌发和菌丝生长,促进菌根真菌在宿主植物中定殖和生长,加强菌根化,从而促进植物生长及增强抗逆性(陈耀丽等, 2019; Wang et al., 2021)。因此,加强兰科植物内生细菌的研究,在兰科植物的相关微生物研究中显得非常重要。

管叶槽舌兰(*Holcoglossum kimballianum*)隶属于兰亚科(subfamily Orchidoideae)万代兰族(tribe Vandeae)槽舌兰属(*Holcoglossum*),分布在中国的云南以及缅甸、泰国,常附生在山地林中的树干上,海拔一般在 1 000 m 以上,具有较高的观赏价值,濒危等级为 EN(濒危),其野生种群亟需保护。目前,对管叶槽舌兰的研究主要集中在系统发育、生物地理学和细胞学等方面,对其根部内生菌的研究鲜有报道。另外,Harrison 等(2016)针对植物内生微生物的研究在采样时为方便野外作业经常采用硅胶干燥的方法,这有可能会引起根内微生物群落的极大变化。因此,本研究采用 ITS 和 16S 高通量测序技术的方法,对管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样中的内生真菌和内生细菌群落进行研究,拟探讨:(1)管叶槽舌兰根样内生菌类群的多样性;(2)管叶槽舌兰新鲜根样与干燥根样中内生菌群落的差异;(3)管叶槽舌兰根样内生细菌和真菌的比较。本研究为管叶槽舌兰的种植及种质资源保护提供了内生真菌和细菌方面的数据,同时为研究兰科植物根内微生物提供采样处理的依据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集和预处理

在深圳市兰科植物保护研究中心,采集迁地保护状态下的管叶槽舌兰生长健康的根,在不影

响管叶槽舌兰正常生长的情况下,每个样品取 3~5 条长 2~5 cm 的根段,尽量由 3 株以上的管叶槽舌兰根样组成,采集的同一组根样分别做新鲜及干燥根样的预处理。新鲜根样预处理在根段取材后即刻进行,步骤如下:用流水冲洗根表面后,用 5%次氯酸钠和 75%酒精依次消毒 2 min,加入无菌水,洗净弃废液,将预处理后得到的最后一次无菌水进行 DNA 提取和风险建库测试,未得到任何结果表明样品得到了很好的预处理。将新鲜根样置于-80℃冰箱以备提取微生物组 DNA。将干燥根样在预处理后放入硅胶中干燥 72 h,备用。每个处理重复 8 次。

1.2 根内微生物组 DNA 提取、PCR 扩增、文库构建及 HiSeq 测序

使用 QIAGEN PowerLyzer 试剂盒对根内微生物组 DNA 进行提取。内生真菌选择带 Barcode 的特异引物(ITS5-1737F: GGAAGTAAAAGTCGTAACAA GG 和 ITS2-2043R: GCTGCGTTCCTCATCGATGC),内生细菌选择带 Barcode 的特异引物(fM1: CCCGCTGNRBGAGGAAGGYYYT 和 rC5:TAATCCT GTTTGCTCCCCAC)进行 PCR 扩增(Bellemain et al., 2010; Yu et al., 2013)。反应程序:98℃预变性 1 min;进入 30 个扩增循环[98℃ 10 s, 50℃(真菌)、55℃(细菌)30 s, 72℃ 30 s];72℃延伸 5 min。反应体系(30 μL):2×Phusion Master Mix(New England Biolabs)15 μL, Primer(2 μmol·L⁻¹)3 μL, gDNA 10 ng, 补充 H₂O 至 30 μL。使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测,PCR 产物胶回收纯化后使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,利用 Illumina HiSeq 2500 PE 250 平台进行测序(北京诺禾致源生物科技有限公司)。

1.3 数据分析

测序数据截去 Barcode 和引物序列后,使用 FLASH(Version 1.2.7)进行拼接,得到 Raw Tags 后使用 fastp 软件对 Raw Tags 进行过滤得到高质量的 Clean Tags。参照 Qiime(V1.9.1)的 Tags 质量控制流程和去除嵌合体处理后得到有效数据 Effective Tags。利用 Uparse 软件(V 7.0.1001)以 97%的一致性对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类得到 OTUs,对出现频数最高的 OTUs 代表序列采用 Qiime 软件(V 1.9.1)中的 Blast 和 Mothur 方法与真菌数据库 Unite 和细菌数据库

Silva 进行物种注释分析,统计各样本的群落组成。以样本中数据量最少的为标准进行均一化处理,基于 Qiime 软件计算 α 多样性指数及 β 多样性指数,并进行 t -test 差异显著性检验。利用 R 软件的 VennDiagram 包和 Vegan 包进行维恩图及无度量多维标定法 (non-metric multi-dimensional scaling, NMDS) 分析。为进一步挖掘分组样本间的差异显著性真菌和细菌类群,选用 Metastat、LEfSe 统计分析方法对分组样本的物种组成和群落结构进行差异显著性检验。对所有样品的相关性指数 (斯皮尔曼相关系数 SCC) 进行计算后,用 cutoff = 0.6 对相关系数的绝对值进行过滤,结合物种丰度构建共发生网络 (Network) 图。

2 结果与分析

基于 Illumina HiSeq 测序技术,从 16 个管叶槽舌兰根部 ITS 共获得 2 834 046 条有效 Tags,有效 Tags 范围为 164 665 ~ 187 236。从管叶槽舌兰根部 16S 共获得 2 375 402 条有效 Tags,有效 Tags 范围为 122 886 ~ 161 516。

2.1 内生菌群落物种组成和采样处理对其影响

注释结果发现,新鲜管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 46 科 51 属,其中子囊菌门相对丰度为 52.20%,担子菌门相对丰度为 20.22%,球囊菌门 (Glomeromycota)、罗兹菌门 (Rozellomycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、毛霉门相对丰度在 1% 左右;而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 88 科 116 属,其中子囊菌门相对丰度为 57.84%,担子菌门相对丰度为 3.68%,球囊菌门、被孢霉门、毛霉门、罗兹菌门的相对丰度在 1% 以下。在 2 个分组中,子囊菌门都占绝对优势。相比较而言,干燥后管叶槽舌兰根样内生真菌类群数量变多;新鲜管叶槽舌兰根样内生真菌群落中子囊菌门、球囊菌门占比低于硅胶干燥根样中的内生真菌群落,而兰科菌根真菌最多的担子菌门明显高于硅胶干燥根样中的内生真菌群落 (图 1:a)。经硅胶干燥后,管叶槽舌兰根内生真菌在科水平 (图 1:b) 的相对丰度发生了改变,曲霉科 (Aspergillaceae) 在干燥后丰度明显降低,而枝孢霉科 (Cladosporiaceae) 在干燥后丰度明显升高,小丛壳科 (Glomerellaceae) 和胶膜菌科 (Tulasnellaceae) 的相对丰度在经硅胶干燥后的根样品中的丰度几乎为零。在属水平上 (表

1,图 1:c),管叶槽舌兰根内生真菌的相对丰度发生了改变,青霉属 (*Penicillium*)、*Aporospora*、瘤菌根菌属 (*Epulorhiza*) 经干燥后的丰度降低,而枝孢属 (*Cladosporium*)、镰刀菌属 (*Fusarium*) 和 *Mycoacia* 在干燥后丰度明显升高,小脆柄菇属 (*Psathyrella*) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 的相对丰度经硅胶干燥后的丰度为零。从排名前 15 的硅胶干燥处理前后管叶槽舌兰根部内生真菌属水平绝对丰度值变化可以看出,青霉属、瘤菌根菌属、*Keissleriella* 及亚隔孢壳属 (*Didymella*) 在干燥后丰度值降低,其余属如 *Aporospora*、枝孢属、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰刀菌属、假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*)、红菇属 (*Russula*) 和链格孢属 (*Alternaria*) 等在干燥后丰度值增加,而小脆柄菇属和刺盘孢属在经硅胶干燥后的根部样品的丰度值为零。这与管叶槽舌兰根内生真菌在属水平的相对丰度变化趋势总体相似。

根据 OTUs 聚类结果 (本文将未注释到的 OTU 包含在内一起计算,下同),绘制 OTUs 韦恩图 (图 1:g),结果显示新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌特有的 OTUs 有 56 个,主要是子囊菌门 (16 个 OTUs) 和担子菌门 (12 个 OTUs);而经硅胶干燥后根样中内生真菌有 123 个特有 OTUs,主要隶属于子囊菌门 (47 个 OTUs),担子菌门仅有 10 个 OTUs;2 个分组共有的 OTUs 仅有 61 个,其中有 21 个 OTUs 属于子囊菌门,8 个 OTUs 属于担子菌门。这表明干燥后的管叶槽舌兰根样中内生真菌群落在丧失掉新鲜根样中的一些真菌类群的同时,也产生了相当数量的新的真菌类群,这些新产生的真菌主要隶属于子囊菌门。

在内生细菌方面,新鲜管叶槽舌兰根内生细菌注释到 15 门 105 科 178 属,其中变形菌门相对丰度为 18.21%,蓝藻门 (Cyanobacteria) 相对丰度为 1.78%,厚壁菌门相对丰度为 1.41%,放线菌门 (Actinobacteria) 相对丰度为 1.14%,拟杆菌门 (Bacteroidetes)、螺旋体门 (Spirochaetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 的相对丰度低于 1%;而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生细菌有 21 门 154 科 336 属,其中变形菌门相对丰度为 48.71%,厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度为 8.31%,放线菌门相对丰度为 5.67%,拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度为 3.41%,蓝藻门相对丰度为 2.58%,螺旋体门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、绿弯菌门的相对丰度低于 1% (图 1:

d)。在 2 个分组中变形菌门丰度均占绝对优势。相比较而言,干燥后管叶槽舌兰根样内生细菌类群数量同样变多,经硅胶干燥后,占主要优势的变形菌门、厚壁菌门、放线菌门细菌相对丰度均有明显提高(图 1:d)。管叶槽舌兰根内生细菌经硅胶干燥后在科水平(图 1:e)的相对丰度发生了改变,鞘脂单胞菌科(*Sphingomonadaceae*)、拜叶林克氏菌科(*Beijerinckiaceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)、黄色杆菌科(*Xanthobacteraceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)等占比均明显升高,而伯克氏菌科(*Burkholderiaceae*)在干燥后明显降低。在属水平上(表 1,图 1:f),管叶槽舌兰根内生细菌的相对丰度发生了改变,鞘氨醇菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、副球菌属(*Paracoccus*)和泛菌属(*Pantoea*)在干燥后丰度明显升高,而马赛菌属(*Massilia*)在干燥后明显降低。从排名前 15 的硅胶干燥处理前后管叶槽舌兰根内生细菌属水平绝对丰度值变化表中可以看出马赛菌属和 *Rubrobacter* 在干燥后丰度值降低,其余属如鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属和分支杆菌属(*Mycobacterium*)等经干燥后丰度值都明显增加,这与管叶槽舌兰根内生细菌在属水平的相对丰度变化趋势相似。

根据 OTUs 聚类结果,绘制 OTUs 韦恩图(图 1:h),结果显示新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌特有的 OTUs 有 751 个,主要是蓝藻门(33 个 OTUs);而经硅胶干燥后根样中内生细菌有 579 个特有 OTUs,主要隶属于厚壁菌门(100 个 OTUs);2 个分组共有的 OTUs 有 532 个,其中有 127 个 OTUs 属于变形菌门,50 个 OTUs 属于蓝藻门,36 个 OTUs 属于厚壁菌门,13 个 OTUs 属于拟杆菌门,1 个 OTUs 属于酸杆菌门,1 个 OTUs 属于螺旋体门。通过结果分析表明,相对于真菌来说,管叶槽舌兰拥有更为丰富的内生细菌类群,同内生真菌一样,经硅胶干燥后,其内生细菌群落在丧失掉新鲜根样中的一些细菌类群的同时产生了相当数量的新的细菌类群,丧失的细菌主要隶属于蓝藻门,而新产生了大量的厚壁菌门。

2.2 内生菌群落多样性差异分析

为对比新鲜与干燥管叶槽舌兰根样中的内生

菌群落的丰富度和多样性,对 2 组样品内生菌群落的 α 多样性进行比较分析,包括 Chao 1、Shannon、Simpson 等指数,Chao 1 是计算群落中含 OTU 数目的指数,常用来指示群落物种丰富度,Shannon 和 Simpson 是综合考虑样本中物种的丰富度与均匀度指数,用来表示群落多样性。经分析发现,新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 Chao 1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数分别为 39.797、3.070、0.723;硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落的 Chao 1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数分别为 62.348、3.715、0.785。新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 Chao 1 指数明显低于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落,新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落 Shannon 指数、Simpson 指数略低于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落,水平相当。 t -test 检验表明,干燥前后 3 个 α 多样性指数均无显著性差异。这表明硅胶干燥前后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落多样性水平相当,但干燥后物种数量明显变多。新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落的 Chao 1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数分别为 524.492、7.103、0.976;硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落的 Chao 1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数分别为 321.154、6.543、0.973。经硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落 Chao 1 指数远低于新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落。新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落 Shannon 指数、Simpson 指数高于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落。 t -test 检验表明,干燥前后 3 个 α 多样性指数除了 Chao 1 指数($P_{t-test}=0.008$)外其他均无显著性差异。这表明硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落物种数量和多样性明显减少。这一结果与管叶槽舌兰根样内生真菌群落的正好相反。

为研究新鲜与干燥管叶槽舌兰根样中的内生菌群落的差异程度,对 2 组样品内生菌群落的 β 多样性进行比较分析。基于 Weighted Unifrac 的 β 多样性分析发现,新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌的 β 多样性高于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的;而内生细菌基于 Weighted Unifrac 的 β 多样性分析发现,硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生细菌群落的 β 多样性要高于新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌的, t -test 检验发现,干

表 1 管叶槽舌兰根样 Top 15 内生菌属绝对丰度值经硅胶干燥处理前后的变化
Table 1 Changes of absolute abundance of the Top 15 endophyte genera in roots of *Holcoglossum kimballianum* before and after drying with silica gel

内生真菌 Endophytic fungus	新鲜根样组 MRHo.F	干燥根样组 MRHo.D	内生细菌 Endophytic bacterium	新鲜根样组 MRHo.F	干燥根样组 MRHo.D
青霉属 <i>Penicillium</i>	721.25	589.38	马赛菌属 <i>Massilia</i>	339.25	256.75
小脆柄菇属 <i>Psathyrella</i>	37.00	0.00	鞘氨醇菌属 <i>Sphingomonas</i>	159.88	2 867.63
刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	31.38	0.00	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	113.00	571.63
<i>Aporospora</i>	24.00	56.38	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	60.63	79.88
瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	20.63	6.50	蓝藻门 <i>Cyanobacteria</i>	58.13	38.38
<i>Keissleriella</i>	11.38	6.88	肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>	46.13	192.25
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	3.38	170.25	泛菌属 <i>Pantoea</i>	45.63	422.63
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	3.25	9.50	萨特氏菌属 <i>Sutterella</i>	40.50	42.75
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	2.50	77.13	甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i>	31.50	635.88
假裸囊菌属 <i>Pseudogymnoascus</i>	2.38	7.25	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i>	27.63	178.25
红菇属 <i>Russula</i>	1.50	8.50	分支杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	25.63	321.88
硬皮马勃属 <i>Scleroderma</i>	1.38	1.63	<i>Ilumatobacter</i>	18.50	71.00
链格孢属 <i>Alternaria</i>	1.38	3.75	根瘤菌科 <i>Rhizobiaceae</i>	14.88	359.38
<i>Solicoccozyma</i>	1.25	3.25	<i>Rubrobacter</i>	13.25	2.13
亚隔孢壳属 <i>Didymella</i>	1.25	0.63	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	12.38	140.75

注：蓝藻门、肠杆菌科和根瘤菌科未鉴定到属。
Note: No genera are identified for *Cyanobacteria*, *Enterobacteriaceae* and *Rhizobiaceae*.

燥前后 β 多样性指数无显著性差异。为进一步衡量硅胶干燥前后管叶槽舌兰根内生真菌与内生细菌群落间的差异,进行 NMDS 分析。基于 Weighted Unifrac 的 NMDS 分析发现,新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生真菌与细菌群落具有明显分区。分析表明新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生真菌与细菌群落的 β 多样性指数无显著性差异,而在物种组成上却具有明显不同。

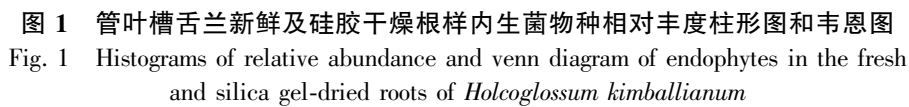
2.3 差异显著性内生菌类群分析

为研究硅胶干燥前后管叶槽舌兰根样中内生真菌与细菌群落间是否具有显著性差异的物种,利用 Metastat 和 LEfSe 分析筛选具有显著性差异的物种。MetaStat 分析表明,硅胶干燥前后,管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的差异显著性真菌有担子菌门小脆柄菇属的黄盖小脆柄菇 (*Psathyrella candolleana*) 及子囊菌门刺盘孢属的 *Colletotrichum tofieldiae*,这 2 个显著性差异物种只存在于新鲜管叶槽舌兰根样的内生真菌群落中(图 4:a、b,表 1);LEfSe 分析发现,新鲜及干燥管叶槽舌兰根样

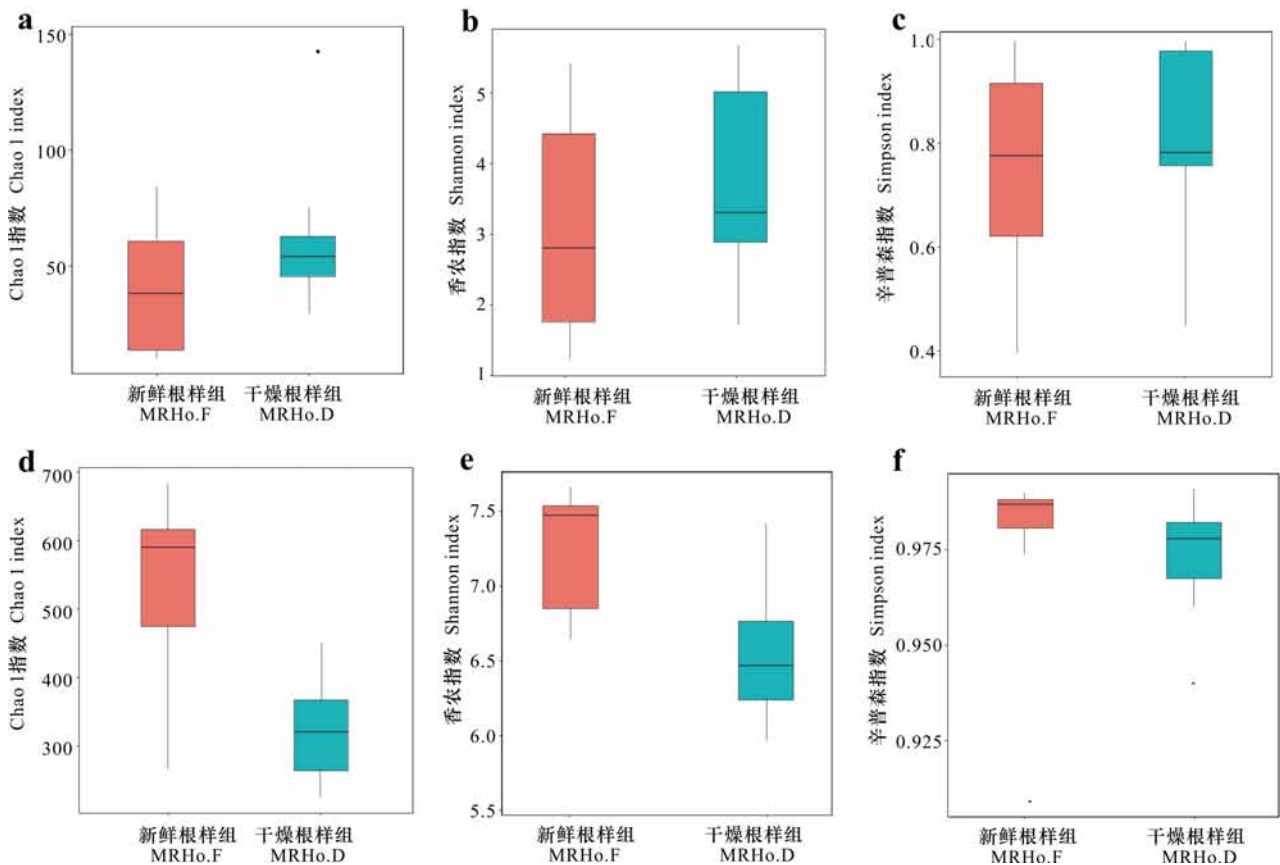
均具有各自的差异显著性内生细菌类群。新鲜管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群为马赛菌属,而干燥管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群较多,在科和属水平上有拜叶林克氏菌科、黄色杆菌科及慢生根瘤菌属(图 4:c、d)。

2.4 共发生网络(Co-occurrence Network) 分析

对新鲜管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落和硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落进行共发生网络分析,结果显示新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落共发生网络中的物种主要分布在子囊菌门、担子菌门及 Mortierellomycota。其中,占互动主导地位的优势属主要有瘤菌根菌属、假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、假尾孢菌属 (*Pseudocercospora*)、*Vishniacozyma* 及 *Aporospora* 等(图 5:a)。硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生真菌群落共发生网络中的物种分布在子囊菌门、担子菌门、Mortierellomycot 和毛霉门。其中,占互动主导地位的优势属主要有 *Vishniacozyma*、*Stephanonectria*、弯



综上所述分析表明,同新鲜管叶槽舌兰根样中的内生菌群落相比,硅胶干燥后管叶槽舌兰根样的内生菌群落中占互作主导地位的优势物种、密切作用的菌类群、丰度及互作模式都发生了改变。同时,与内生真菌群落相比,无论是干燥前还是干燥后管叶槽舌兰根内生细菌共发生网络中密切互作的类群及节点均远远多于内生真菌群落,表明管叶槽舌兰根内生细菌群落具有比真菌更为活跃的相互作用。



a, d. 管叶槽舌兰新鲜和硅胶干燥根样内生真菌($P_{t-test}=0.198\ 1$)、内生细菌($P_{t-test}=0.008$) Chao 1 指数; **b, e.** 管叶槽舌兰新鲜和硅胶干燥根样内生真菌($P_{t-test}=0.409\ 5$)、内生细菌($P_{t-test}=0.090\ 58$) Shannon 指数; **c, f.** 管叶槽舌兰新鲜和硅胶干燥根样内生真菌($P_{t-test}=0.546\ 2$)、内生细菌($P_{t-test}=0.786\ 6$) Simpson 指数。

a, d. Endophytic fungi ($P_{t-test}=0.198\ 1$), endophytic bacteria ($P_{t-test}=0.008$) Chao1 index in fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*; **b, e.** Endophytic fungi ($P_{t-test}=0.409\ 5$), endophytic bacteria ($P_{t-test}=0.090\ 58$) Shannon index in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*; **c, f.** Endophytic fungi ($P_{t-test}=0.546\ 2$), endophytic bacteria ($P_{t-test}=0.786\ 6$) Simpson index in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*.

图 2 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落 α 多样性差异分析图

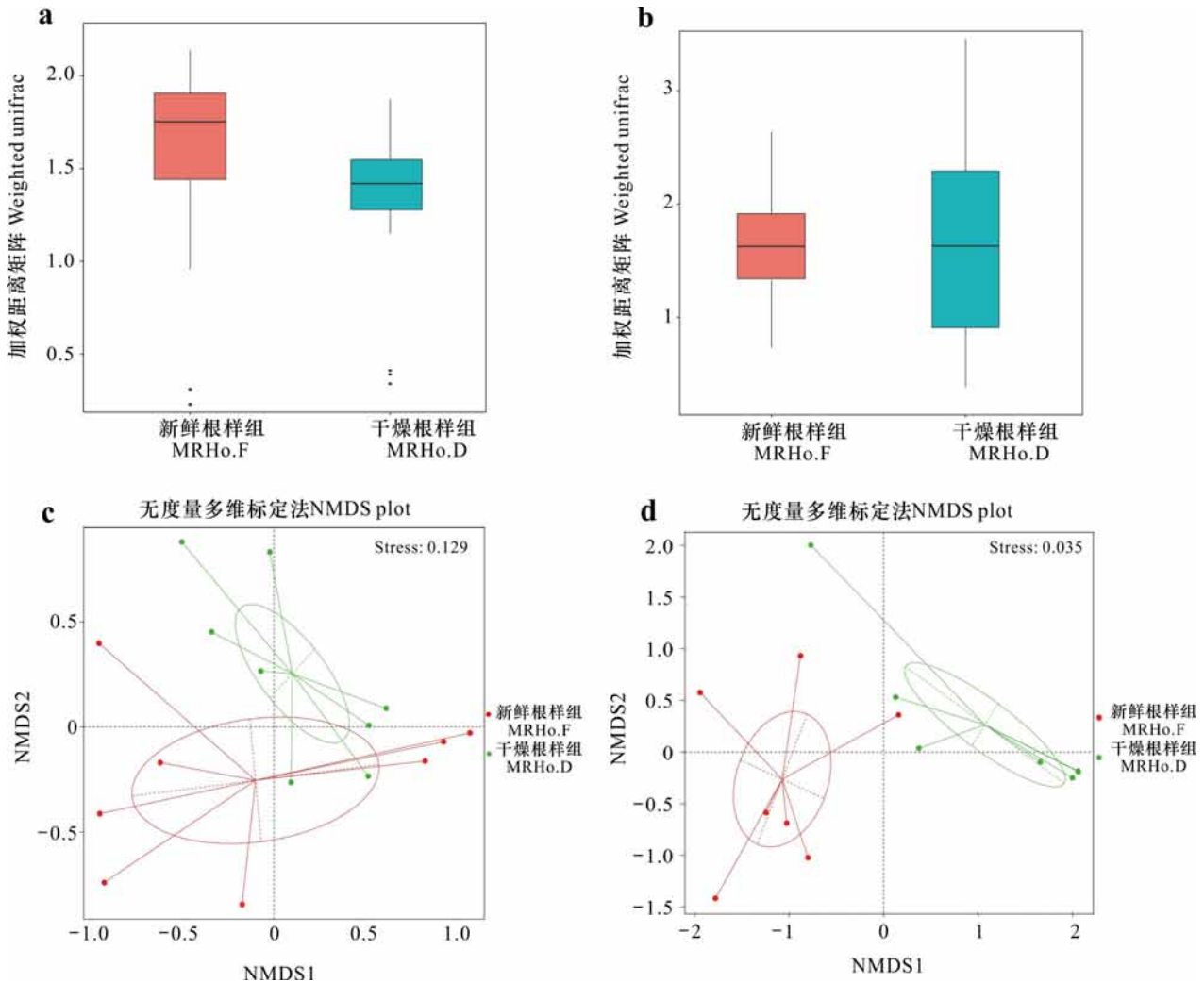
Fig. 2 Differences of alpha diversity indexes of endophyte communities between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

3 讨论与结论

3.1 管叶槽舌兰的菌根真菌与菌根细菌

管叶槽舌兰根内生真菌主要隶属于子囊菌门、担子菌门、球囊菌门、毛霉门和 Mortierellomycota。这一结果与前人研究的兰科植物根内生真菌群落结构的分析结果相同(蒋玉玲等, 2018; 艾叶等, 2019)。本研究发现, 新鲜管叶槽舌兰根样内占有较高丰度的曲霉科、小丛壳科和胶膜菌科, 这 3 个真菌科被报道是兰科植物的

菌根真菌科(Zelmer et al., 1996; Yuan et al., 2010), 其中胶膜菌科是最常见的兰科植物菌根真菌科, 与许多兰科植物形成广泛的菌根关系(Shao et al., 2020; Wang et al., 2022)。在属水平上, 管叶槽舌兰根样内生真菌的优势属有青霉属、小脆柄菇属、刺盘孢属、*Aporospora* 和瘤菌根菌属, 这些真菌类群均被报道是兰科植物的菌根真菌(王美娜等, 2021)。李明等(2006)采用根组织切片法调查碧玉兰(*Cymbidium lowianum*)的菌根真菌, 初步鉴定包括青霉属、链霉属等。Yamato 等(2005)对虎舌兰(*Epipogium roseum*)根内菌根真菌进行研究



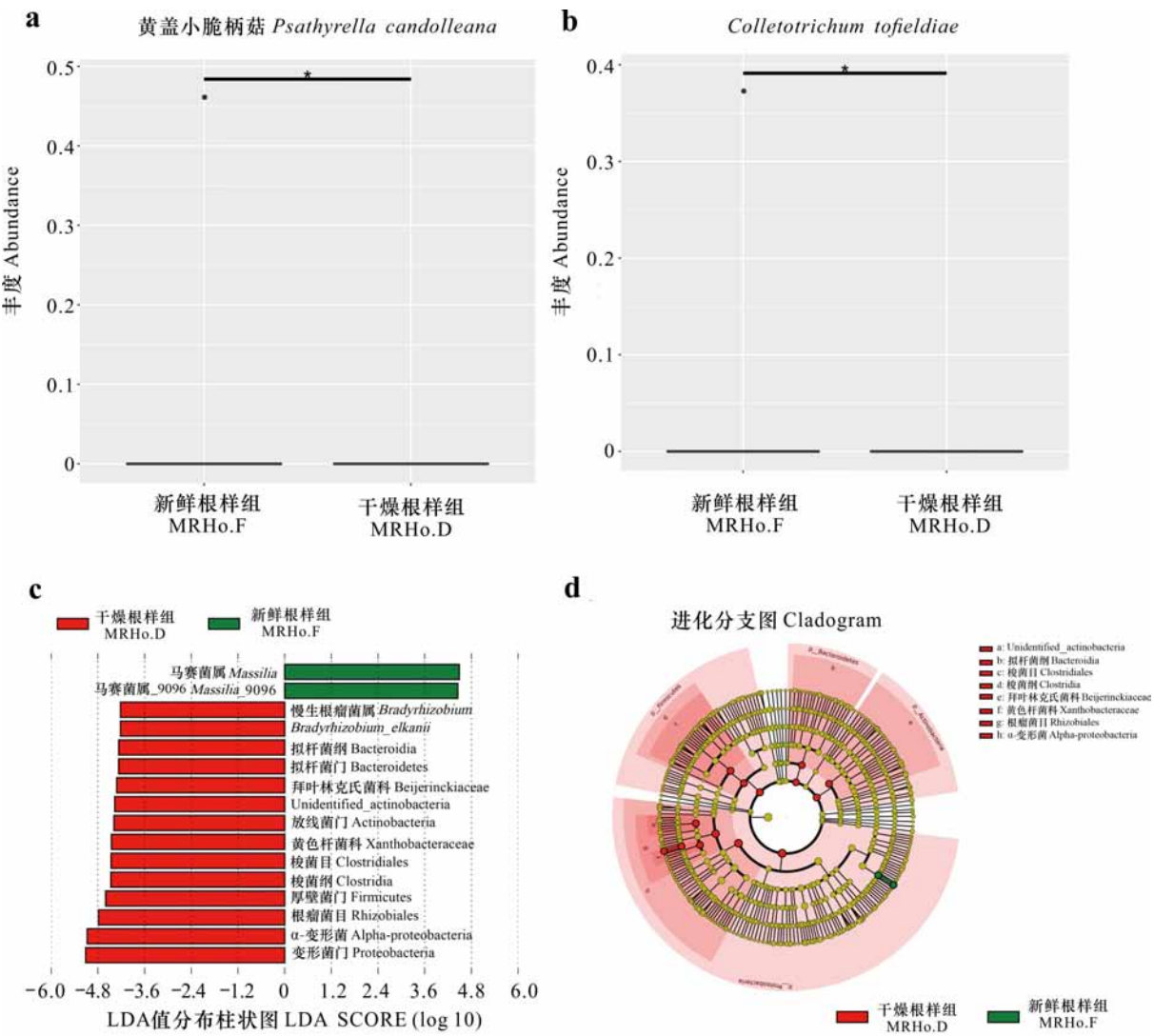
a, b. 管叶槽舌兰新鲜和硅胶干燥根样内生真菌 ($P_{t-test} = 0.074\ 24$)、内生细菌 ($P_{t-test} = 0.727\ 26$) 基于 Weighted Unifrac β 多样性;
c, d. 管叶槽舌兰新鲜和硅胶干燥根样内生真菌、内生细菌基于 Weighted Unifrac 距离的 NMDS 分析。
a, b. Endophytic fungi ($P_{t-test} = 0.074\ 24$), endophytic bacteria ($P_{t-test} = 0.727\ 26$) in fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum* based on Weighted Unifrac β diversity; **c, d.** NMDS analysis of endophytic fungi, endophytic bacteria in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum* based on Weighted Unifrac distance.

图 3 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落 β 多样性差异分析图

Fig. 3 Differences of beta diversity indexes of endophyte communities between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

发现,优势属为小脆柄菇属和鬼伞属 (*Coprinus*)。Chen 等 (2012) 用分离培养和分子系统学方法对金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 和束花石斛 (*D. chrysanthum*) 根部内生真菌进行研究,发现刺盘孢属是两种石斛属的优势属。在金钗石斛、硬叶兜兰 (*Paphiopedilum wardii*) 和杏黄兜兰 (*P. armeniacum*) 的根中都分离到瘤菌根菌属,并将其回接到 3 种兰科植物的组培苗中,发现瘤菌根菌属能够促进无菌苗的生长,并且提高金钗石斛无菌苗的总生物碱和

多糖的含量 (陈晓梅等, 2005; 朱鑫敏等, 2012)。Tan 等 (2012) 从 9 种野生槽舌兰属植物的根内生真菌中分离出 46 株可培养的内生真菌,隶属于 16 属,包括链格孢属、枝孢属、瘤菌根菌属、镰刀菌属、刺盘孢属、亚隔孢壳属、*Stephanonectria*、*Phomopsis*、拟隐孢壳 *Cryptosporiopsis*、*Leptosphaeria*、*Pyrenochaeta*、*Clonostachys*、*Cosmospora*、柱孢属 *Cylindrocarpon*、*Myrmecridium* 和 *Paraconiothyrium*,其中 9 个属在本研究的管叶槽舌兰根样内生真菌中被注释到,表明



a, b. 基于 Metastat 分析的管叶槽舌兰根样干燥前后差异显著性内生真菌类群; **c, d.** 基于 LEfSe 分析的管叶槽舌兰根样干燥前后差异显著性内生细菌类群 (**c.** LDA 值分布柱状图; **d.** 进化分支图)。
a, b. Significant differences in endophytic fungal taxa before and after drying of the root samples of *Holcoglossum kimballianum* based on Metastat analysis; **c, d.** Significant differences in endophytic bacterial taxa before and after drying of the root samples of *H. kimballianum* based on LEfSe analysis (**c.** LDA value distribution histogram; **d.** Cladogram).

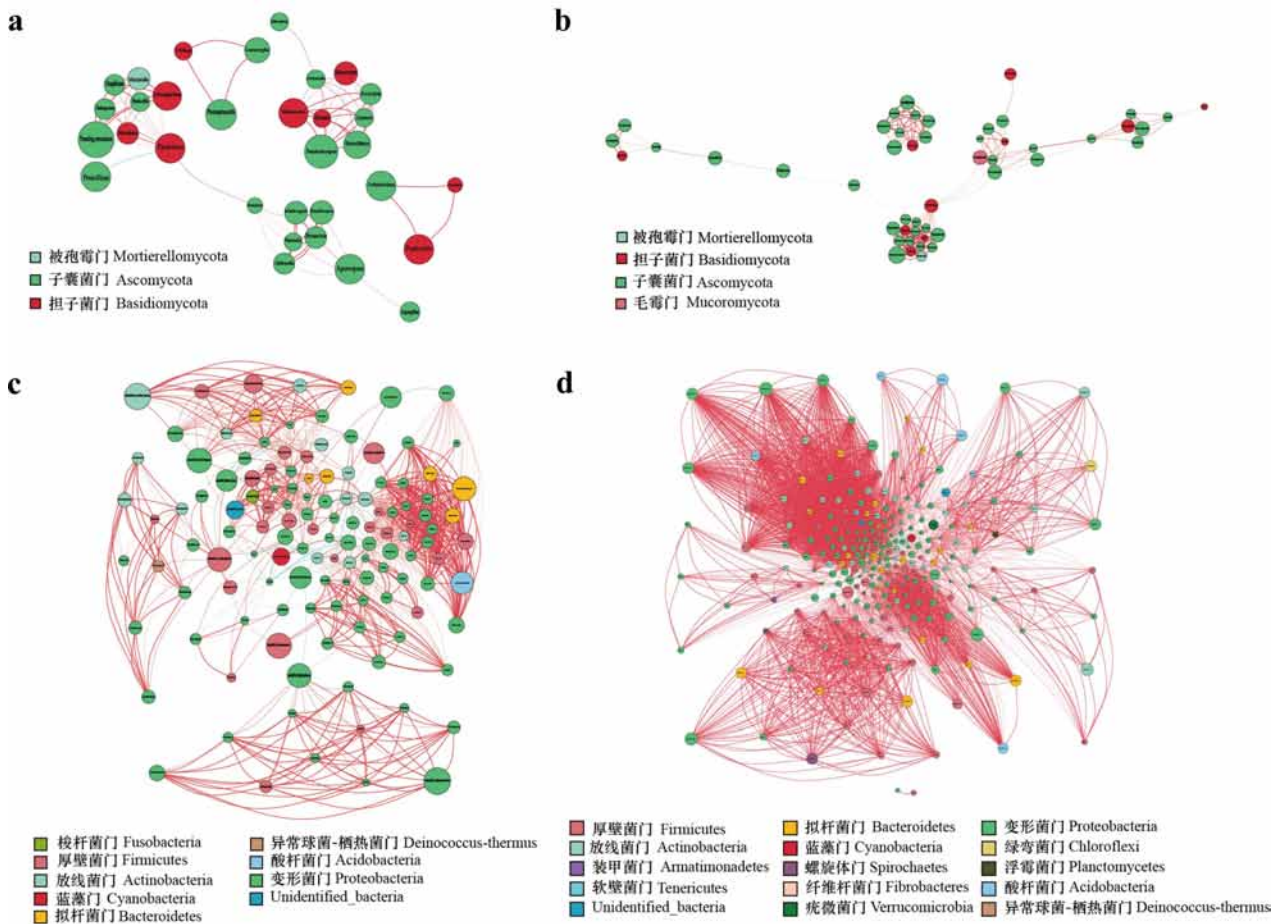
图 4 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌物种显著性差异统计图

Fig. 4 Endophytic fungi and bacteria species with significant differences detected between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

本研究的管叶槽舌兰与同属植物中的内生真菌群落具有一定的相似性,瘤菌根菌属和镰刀菌属是 9 种野生槽舌兰属植物主要的内生真菌。由此推测,这些真菌类群是对管叶槽舌兰有益的菌根真菌。

管叶槽舌兰根内生细菌主要隶属于变形菌门、蓝藻门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、螺旋体门、酸杆菌门和绿弯菌门。其中,变形菌门、厚

壁菌门、蓝藻门和放线菌门等是最为常见的兰科植物内生细菌门,变形菌门有利于生长素的合成 (Tsavkelova et al., 2007a)。Tsavkelova 等 (2003) 在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)、杓唇石斛 (*Dendrobium moschatum*) 和短序脆兰 (*Acampe papillosa*) 中都分离出的兼顾固氮性和光合作用的蓝藻门,厚壁菌门中的芽孢杆菌属能防止叶斑病,



a. 管叶槽舌兰新鲜根样内生真菌 Network 图; b. 管叶槽舌兰干燥根样内生真菌 Network 图; c. 管叶槽舌兰新鲜根样内生细菌 Network 图; d. 管叶槽舌兰干燥根样内生细菌 Network 图。

a. Network diagram of endophytic fungi in *Holcoglossum kimballianum* fresh roots; b. Network diagram of endophytic fungi in silica gel-dried roots of *H. kimballianum*; c. Network diagram of endophytic bacteria in *H. kimballianum* fresh roots; d. Network diagram of endophytic bacteria in silica gel-dried roots of *H. kimballianum*.

图 5 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落共发生网络图

Fig. 5 Co-occurrence network diagram of endophyte communities detected in the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

促进种子的萌发和植株生长,减少幼苗坏死(程萍等,2008; White et al., 2014)。在蝴蝶兰(Girija et al., 2018)和铁皮石斛(Yu et al., 2013)中均有报道螺旋体门和绿弯菌门,但其丰度较低。本研究发现,新鲜管叶槽舌兰根样内丰度较高的伯克氏菌科在干燥后的根样中丰度明显下降。Galdiano等(2011)从 *Cattleya walkeriana* 中分离出的肠杆菌科和伯克氏菌科等细菌发现,它们能促进生长并提高植株的存活率。在属水平上,管叶槽舌兰根样内生细菌的优势属主要有马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属和泛菌属,马赛菌属不

仅能合成各种次级代谢产物和酶,还有溶磷、降解菲和耐受重金属等功能(Zheng et al., 2017; 杨恩东等,2019)。鞘氨醇菌属、假单胞菌属和肠杆菌属是许多兰科植物的优势菌,Tsavkelova等(2007)将杓唇石斛根部分离的鞘氨醇菌属接种于杓唇石斛种子发现,鞘氨醇菌属极大提高了种子萌发率;鞘氨醇菌属还能固定氮,并增加幼苗的生长和生物量(Yang et al., 2014)。假单胞菌属被报道是 *Pterostylis vittata* 根系的优势属,可以产生激素来促进植物吸收营养物质(Wilkinson et al., 1989; 黄腾飞,2012),并有助于真菌在植株根部的定殖,促进

兰花菌根的形成(张萍和宋希强,2012)。童文君等(2014)对美花石斛(*Dendrobium loddigesii*)内生细菌进行分离鉴定发现,肠杆菌属为优势属。

综上所述,结合前人研究及本文结果推测,青霉属、小脆柄菇属、刺盘孢属和瘤菌根菌属等内生真菌是管叶槽舌兰的菌根真菌;而马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属等可能是管叶槽舌兰的“菌根细菌”。这些优势菌群可能在管叶槽舌兰的种子萌发、生长发育过程中起着重要的作用,在今后的研究中,可重点关注这些内生菌类群分离培养,及其与管叶槽舌兰的互利共生机理研究。

3.2 管叶槽舌兰根内生菌类群与多样性水平

管叶槽舌兰的根样内生真菌中共得到 117 个 OTUs, Jacquemyn 等(2016)采用 454 测序平台对火烧兰属(*Epipactis*) 3 个物种根内真菌进行研究共得到 105 个 OTUs, 3 个物种 OTUs 范围为 42~58, OTUs 数量低于本研究管叶槽舌兰根内真菌 OTUs 的数量。Park 等(2018)基于 454 测序平台对虾脊兰属(*Calanthe*) 6 个物种的根内真菌进行研究,在每个样本中得到的 OTUs 数量范围为 22~57, 远低于本研究 OTUs 数量的水平。本研究中,管叶槽舌兰根内真菌群落的 α 多样性指数 Chao 1 为 39.797, Shannon 指数为 3.070, Simpson 指数为 0.723。Zeng 等(2021)用 Illumina MiSeq 平台对白芨(*Bletilla striata*)、黄花白芨(*B. ochracea*)和小白芨(*B. formosana*) 3 种白芨属植物的根内真菌研究发现,内生真菌群落的 α 多样性指数 Chao 1 分别为 94、73、39; Shannon 指数为 2.35、1.76、1.89; Simpson 指数为 0.26、0.32、0.30。本研究中,管叶槽舌兰根内真菌群落的 Shannon 指数和 Simpson 指数均高于 3 种白芨属兰科植物根内真菌群落的多样性水平,但它们的 Chao 1 指数要比本研究中管叶槽舌兰根内真菌群落的高。Tan 等(2012)基于分离培养和 ABI 3730 测序平台对 9 种野生槽舌兰属植物的根内生真菌研究发现,9 种野生槽舌兰属植物的内生真菌 Shannon 多样性指数最高的是在短距槽舌兰(*Holcoglossum flavescens*)中(为 1.913),野生管叶槽舌兰 Shannon 多样性指数是 0.993 8,最低的是舌唇槽舌兰(*H. lingulatum*)(为 0.950 3),本研究中的管叶槽舌兰根内真菌群落的 Shannon 指数均高于 9 种野生槽舌兰属植物根内真菌群落的多样性水平。通过分析表明,迁地保育状态的管叶槽舌兰有着与野生管叶槽舌兰和其

他野生兰科植物相当的内生真菌数量或多样性水平。

管叶槽舌兰的根样中内生细菌共得到 1 283 个 OTUs, Chao 1 指数为 524.492、Shannon 指数为 7.103、Simpson 指数为 0.976, 吴庆珊等(2018)从 3 个样地金钗石斛(*Dendrobium nobile*)的根茎叶中共分离出 1 082 株内生细菌,可分为 41 个 OTUs, 共有 OTUs 有 14 个;陈泽斌等(2016)基于 16S 高通量测序从白芨中获得 48 个 OTU, 数量远低于本研究管叶槽舌兰根内细菌 OTUs 的数量。Ou 等(2017)采用基于 16S rRNA 和 *nifH* 基因的元基因组焦磷酸测序技术,对中国 5 个地区的铁皮石斛相关菌群和重氮化菌群进行了研究,结果发现其 OTUs 范围在 597~3 023 之间, Shannon 指数范围为 4.35~6.49。相比较而言,本研所得到的管叶槽舌兰根内细菌 OTUs 的数量处于中间水平, Shannon 指数高于铁皮石斛的 Shannon 指数。谢泰祥等(2020)采用高通量测序技术分析福州鼓山野生建兰(*Cymbidium ensifolium*)根样内生细菌发现,建兰根内细菌群落的 α 多样性 Chao 1 指数为 700.99、Shannon 指数为 6.10、Simpson 指数为 0.95, 本研究中的管叶槽舌兰根内细菌群落的 Chao 1 指数与野生建兰 Chao 1 指数相当, Shannon 指数及 Simpson 指数则是高于建兰的根内细菌群落。这表明迁地保育状态的管叶槽舌兰有着与其他野生兰科植物相媲美的内生细菌的丰富度和多样性水平。

3.3 新鲜样品与干燥样品对研究内生菌群落的影响

在处理微生物组样品时,如何减少从样品采集到预处理再到储存的过程中原始微生物群落的变化至关重要(Kim et al., 2017)。本研究对比了管叶槽舌兰新鲜与干燥根样中内生菌群落的变化。从新鲜管叶槽舌兰注释到根内生真菌有 6 门 46 科 51 属共 117 个 OTUs, 注释到根内生细菌 15 门 105 科 178 属共 1 283 个 OTUs; 而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 88 科 116 属 184 个 OTUs, 注释到根内生细菌 21 门 154 科 336 属共 1 111 个 OTUs, 新鲜样品与干燥样品根部内生菌群落物种构成相差非常大。对管叶槽舌兰新鲜根样与干燥根样中内生菌群落进行 α 多样性与 β 多样性、共发生网络等分析发现,与新鲜根样相比干燥后的管叶槽舌兰根内生菌群落的

OTUs 数量、物种类群及丰度、 α 多样性、 β 多样性及互作模式均发生了改变。

本研究还发现,在新鲜根样中的菌根真菌类群如小丛壳科和胶膜菌科,它们在干燥根样中的相对丰度几乎为零。在属水平上,青霉属、瘤菌根菌属、*Keissleriella* 及亚隔孢壳属在干燥后丰度值降低,而枝孢属、曲霉属、镰刀菌属、假裸囊菌属、红菇属和链格孢属等在干燥后丰度值增加。差异显著性物种分析也发现在两种采样处理中具有显著差异的担子菌门小脆柄菇属的黄盖小脆柄菇和子囊菌门刺盘孢属的 *Colletotrichum tofieldiae* 仅存在于新鲜管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落。由此推测,瘤菌根菌属、镰刀菌属、小脆柄菇属和刺盘孢属是管叶槽舌兰的益生真菌。管叶槽舌兰菌根真菌在干燥的根样中丰度下降或消失的原因可能是管叶槽舌兰的菌根真菌对宿主有一定的依赖性,健康生长的管叶槽舌兰可为其菌根真菌提供养分以供其生长,而当宿主死亡后,这些菌根真菌失去营养来源而逐渐死亡。

在内生细菌方面,马赛菌属和 *Rubrobacter* 在干燥后丰度值降低,而鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属和分支杆菌属等经干燥后丰度值都明显增加。这些细菌可能在干燥环境中获得适宜的培养条件从而丰度升高。干燥管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群较为丰富,有拜叶林克氏菌科、黄色杆菌科及慢生根瘤菌属。新鲜管叶槽舌兰细菌群落中差异显著性细菌类群是马赛菌属。由此推测,马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、分支杆菌属及慢生根瘤菌属是管叶槽舌兰的益生细菌。干燥可能会引起细菌脱水,进而使细菌活力下降 (Berninger et al., 2018; Majidzadeh et al., 2022)。Moreira 等 (2021) 对乳酸菌 (LAB) 培养物经过干燥处理,发现干燥会增加乳酸菌细胞的损伤,导致培养活力的丧失和细胞保护能力的改变。

综上所述,硅胶干燥的采样处理会显著改变内生菌群落 OTUs 数量、物种类群及丰度、 α 多样性、 β 多样性和互作模式,且会导致根内某些关键真菌及细菌类群尤其是菌根真菌和菌根细菌的丢失和变化,影响数据的完整性和准确性。因此,针对兰科植物根样内生菌的研究应使用新鲜的根样。

3.4 管叶槽舌兰根内生细菌和真菌的比较

本研究的管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 OTUs 有 117 个,Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数分别为 39.797、0.723 和 3.070。而内生细菌群落有 1 283 个 OTUs,Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数分别为 524.492、0.976、7.103。管叶槽舌兰根样内生细菌群落的丰富度和多样性要远比内生真菌群落的高,内生细菌可能有着远比已有认知对管叶槽舌兰更为重要的作用。兰科植物内生细菌与真菌的协作对宿主植物的生长具有重要意义 (张芳芳等, 2016), 王小明等 (2016) 把铁皮石斛中分离得到的真菌和细菌进行组合,对铁皮石斛幼苗进行真菌+细菌联合接种,与未接种和单独接种处理相比,真菌+细菌组合对铁皮石斛幼苗生长的影响存在显著差异。张萍 (2012) 采用平板对峙法对铁皮石斛 6 株促生内生细菌与 8 株促生内生真菌进行促生组合的研究结果显示,某些细菌与真菌组合后处理苗的各个指标均有所提高,与单一接菌的处理苗均形成显著性差异,特定的真菌或细菌组合表现出协同效应或累加效应。推测管叶槽舌兰根部真菌和细菌的相互作用可能共同影响管叶槽舌兰的生长发育,其相互作用的机制有待进一步研究和验证。

管叶槽舌兰作为一种珍稀濒危的兰科植物,根系内生菌在管叶槽舌兰种子萌发、幼苗形成、生长发育过程中起着重要的作用。本研究结果可为进一步采用菌根技术实现管叶槽舌兰种质保育提供理论基础,对管叶槽舌兰的保护与生产栽培具有重要意义,同时,也为兰科植物内生微生物的采样方法提供参考。

参考文献:

- AI Y, XIE TX, LIU JF, et al., 2019. Community structure and biological function of the root symbiotic fungi of *Arundina graminifolia* [J]. *Mycosystema*, 38(10): 1631–1642. [艾叶, 谢泰祥, 刘江枫, 等, 2019. 竹叶兰根系共生真菌群落结构及生物学功能初探 [J]. 菌物学报, 38(10): 1631–1642.]
- BELLEMAIN E, CARLSEN T, BROCHMANN C, et al., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases [J]. *BMC Microbiol*, 10(1): 189–200.
- BERNINGER T, GONZALEZ LO, BEJARANO A, et al., 2018. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants [J].

- Microb Biotechnol, 11(2): 277–301.
- CHEN ZB, LI B, WANG DK, et al., 2016. Composition and diversity of endophytic bacteria in *Bletilla striata* [J]. J S Agric, 47(2): 227–233. [陈泽斌, 李冰, 王定康, 等, 2016. 白芨内生细菌组成及多样性分析 [J]. 南方农业学报, 47(2): 227–233.]
- CHENG P, ZHENG YL, LI YJ, et al., 2008. Study on biocontrol of *Dendrobium* leaf spot caused by *Fusarium* [J]. Chin Agric Sci Bull, 24(9): 357–361. [程萍, 郑燕玲, 黎永坚, 等, 2008. 石斛兰镰刀菌叶斑病的生物防治研究 [J]. 中国农学通报, 24(9): 357–361.]
- CHEN YL, YU LC, QIAN Y, et al., 2019. Isolation and identification of endophytic fungi and bacteria of *Phalaenopsis deliciosa* [J]. J Trop Biol, 10(4): 372–379. [陈耀丽, 俞龙春, 钱悦, 等, 2019. 大尖囊蝴蝶兰内生真菌和细菌的分离与鉴定 [J]. 热带生物学报, 10(4): 372–379.]
- CHEN J, WANG H, GUO SX, 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 22(4): 297–307.
- COMPANT S, SAMAD A, FAIST H, et al., 2019. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application [J]. J Adv Res, 19: 29–37.
- CHEN XM, GUO SX, 2005. Effects of four endophytic fungi on the growth and polysaccharide and total alkaloid content of sterile seedlings of *Dendrobium nobile* [J]. Chin J Chin Mat Med, 30(4): 14–18. [陈晓梅, 郭顺星, 2005. 4种内生真菌对金钗石斛无菌苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 30(4): 14–18.]
- ESCUDEO MC, BULGARELLI D, 2019. Tracing the evolutionary routes of plant-microbiota interactions [J]. Curr Opin Microbiol, 49: 34–40.
- FARIA DC, DIAS ACF, MELO IS, et al., 2013. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth [J]. World J Microbiol Biotechnol, 29(2): 217–221.
- GAI XG, XING XK, GUO SX, 2014. Ecological research of orchid mycorrhizae: a review [J]. Mycosystema, 33(4): 753–767. [盖雪鸽, 邢晓科, 郭顺星, 2014. 兰科菌根的生态学研究进展 [J]. 菌物学报, 33(4): 753–767.]
- GIRIJA D, RAJEEVAN PK, BALAKRISHNAN S, et al., 2018. 16S rRNA gene taxonomic profiling of endophytic bacteria associated with *Phalaenopsis* roots [J]. J Hort Sci, 13(1): 103–107.
- GAO Y, CHEN YH, XING XK, 2019. Symbiotic fungi inducing seed germination of medicinal *Gymnadenia conopsea* of Orchidaceae [J]. Mycosystema, 38(11): 1948–1957. [高越, 陈艳红, 邢晓科, 2019. 兰科药用植物手参种子的真菌共生萌发 [J]. 菌物学报, 38(11): 1948–1957.]
- GALDIANO RF, PEDRINHO EAN, CASTELLANE TCL, et al., 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization [J]. Rev Brasil De Ciência Do Solo, 35(3): 729–737.
- HARRISON JG, FORISTER ML, PARCHMAN TL, et al., 2016. Vertical stratification of the foliar fungal community in the world's tallest trees [J]. Am J Bot, 103(12): 2087–2095.
- JACQUEMYN H, WAUD M, LIEVENS B, et al., 2016. Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica* [J]. Ann Bot, 118(1): 105–114.
- JIANG YL, MIAO Q, CHEN XH, et al., 2018. Root-associated fungi diversity of eight orchid species in Liaoning, China [J]. Chin J Ecol, 37(10): 3001–3009. [蒋玉玲, 苗青, 陈旭辉, 等, 2018. 辽宁省八种兰科植物根内生真菌多样性 [J]. 生态学杂志, 37(10): 3001–3009.]
- KIM D, HOFSTAEDTER CE, ZHAO C, et al., 2017. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research [J]. Microbiome, 5(1): 52–66.
- KAUR J, SHARMA J, 2021. Orchid root associated bacteria: linchpins or accessories? [J]. Front Plant Sci, 12: 661966.
- LI TQ, YANG WK, WU SM, et al., 2021. Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids [J]. Front Plant Sci, 12: 646325.
- LI M, SHI JH, 2006. Investigations of mycorrhizal fungi of *Cymbidium lowianum* [J]. J Yunnan Norm Univ (Nat Sci Ed), 26(3): 54–55. [李明, 施继惠, 2006. 碧玉兰菌根真菌的调查 [J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 26(3): 54–55.]
- LOZUPONE CA, HAMADY M, KELLEY ST, et al., 2007. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 73(5): 1576–1585.
- MOREIRA MTC, MARTINS E, PERRONE ÍT, et al., 2021. Challenges associated with spray drying of lactic acid bacteria: Understanding cell viability loss [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 20(4): 3267–3283.
- MAJIDZADEH HR, GHIASVAND M, REZAEI E, et al., 2022. Assessing the viability of three *Lactobacillus* bacterial species protected in the cryoprotectants containing whey and maltodextrin during freeze-drying process [J]. Lett Appl Microbiol, 74(4): 505–512.
- MARCHESI JR, RAVEL J, 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal [J]. Microbiome, 3: 31.
- OKTALIRA FT, WHITEHEAD MR, LINDE CC, 2019. Mycorrhizal specificity in widespread and narrow-range distributed *Caladenia* orchid species [J]. Fungal Ecol, 42(C): e100869.
- PARK MS, EIMES JA, OH SH, et al., 2018. Diversity of fungi associated with roots of *Calanthe* orchid species in Korea [J]. J Microbiol, 56(1): 49–55.
- SHAO SC, WANG QX, BENG KC, et al., 2020. Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China [J]. Mycorrhiza, 30(4): 529–539.
- TSAVKELOVA EA, LOBAKOVA ES, KOLOMEITSEVA GL, et al., 2003. Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids [J]. Microbiology, 72(1): 92–97.
- TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, KLIMOVA SY, et al., 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial

- yield in response to exogenous auxin [J]. Arch Microbiol, 188(6): 655–664.
- TARKKA MT, FREY-KLETT P, 2008. Mycorrhiza helper bacteria [C]//Mycorrhiza VA. 3rd ed. Berlin: Springer: 113–132.
- TAN XM, CHEN XM, WANG CL, et al., 2012. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China [J]. Curr Microbiol, 64(2): 140–147.
- TONG WJ, ZHANG L, XUE QY, et al., 2014. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential [J]. J Plant Resour Environ, 23(1): 16–23. [童文君, 张礼, 薛庆云, 等, 2014. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较 [J]. 植物资源与环境学报, 23(1): 16–23.]
- WHITE JF, TORRES MS, SULLIVAN RF, et al., 2014. Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids [J]. Microsc Res Technol, 77(11): 874–885.
- WEN T, ZHAO ML, LIU T, et al., 2020. High abundance of *Ralstonia solanacearum* changed tomato rhizosphere microbiome and metabolome [J]. BMC Plant Biol, 20(1): 1–11.
- WILKINSON KG, DIXON KW, SIVASITHAMPARAM K, 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids [J]. New Phytol, 112(3): 429–435.
- WU QS, LEI X, LEI YM, 2018. Analyses on composition and diversity of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* [J]. J Plant Resour Environ, 27(1): 79–90. [吴庆珊, 雷珣, 雷友梅, 等, 2018. 金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析 [J]. 植物资源与环境学报, 27(1): 79–90.]
- WANG XJ, WU YH, MING XJ, et al., 2021. Isolating ecological-specific fungi and creating fungus-seed bags for epiphytic orchid conservation [J]. Glob Ecol Conserv, 28: e01714.
- WANG T, WANG XJ, GANG YQ, et al., 2022. Spatial pattern of endophytic fungi and the symbiotic germination of tulasnella fungi from wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) in China [J]. Curr Microbiol, 79(5): 139.
- WANG MN, HU Y, LI HJ, et al., 2021. New insights into orchids mycorrhizal fungi research [J]. Guihaia, 41(4): 487–502. [王美娜, 胡玥, 李鹤娟, 等, 2021. 兰科植物菌根真菌研究新见解 [J]. 广西植物, 41(4): 487–502.]
- XIE TX, ZHANG QH, ZHOU J, et al., 2020. Microbial communities in rhizosphere and root-endosphere of wild *Cymbidium ensifolium* [J]. Fujian J Agric Sci, 35(5): 560–568. [谢泰祥, 张清华, 周杰, 等, 2020. 野生建兰根际与根内生菌种群结构差异分析 [J]. 福建农业学报, 35(5): 560–568.]
- YANG WK, 2020. Isolating effective fungi to facilitate seed germination of *Paphiopedilum spicerianum* and application in conservation practice [D]. Kunming: Yunnan University. [杨文科, 2020. 促进白旗兜兰种子共生萌发有效真菌的分离与应用 [D]. 昆明: 云南大学.]
- YILMAZ P, PARFREY LW, YARZA P, et al., 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks [J]. Nucl Acids Res, 42(D1): D643–D648.
- YU J, ZHOU XF, YANG SJ, et al., 2013. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 97(22): 9825–9836.
- YUAN L, YANG ZL, LI SY, et al., 2010. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China [J]. Mycorrhiza, 20(8): 559–568.
- YANG ED, CUI DX, WANG WY, 2019. Research progress on the genus *Massilia* [J]. Microbiol Chin, 46(6): 1537–1548. [杨恩东, 崔丹曦, 汪维云, 2019. 马赛菌属细菌研究进展 [J]. 微生物学通报, 46(6): 1537–1548.]
- ZHU XM, HU H, LI SY, et al., 2012. Interaction between endophytic Fungi and seedlings of two species of *Paphiopedilum* during symbiotic culture [J]. Plant Divers, 34(2): 171–178. [朱鑫敏, 胡虹, 李树云, 等, 2012. 内生真菌与两种兜兰共培养过程中的相互作用 [J]. 植物分类与资源学报, 34(2): 171–178.]
- ZHANG FF, 2015. Screen and growth-promoting effect of endophytic bacteria from *Phalaenopsis pulcherrima* roots [D]. Haikou: Hainan University. [张芳芳, 2015. 五唇兰根部内生细菌筛选及其促生效应研究 [D]. 海口: 海南大学.]
- ZHANG FF, SONG XQ, ZHU GP, 2016. Diversity of culturable endophytic bacteria isolated from the root tissues of *Phalaenopsis pulcherrima* in two different habitats [J]. Plant Sci J, 34(1): 135–142. [张芳芳, 宋希强, 朱国鹏, 2016. 不同生境下五唇兰根部可培养内生细菌多样性研究 [J]. 植物科学学报, 34(1): 135–142.]
- ZHANG P, 2012. Study on endophytic bacteria of *Dendrobium catenatum* Lindley (Orchidaceae) [D]. Haikou: Hainan University. [张萍, 2012. 铁皮石斛内生细菌研究 [D]. 海口: 海南大学.]
- ZHENG BX, BI QF, HAO XL, et al., 2017. *Massilia phosphatilytica* sp. nov., a phosphate solubilizing bacteria isolated from a long-term fertilized soil [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 67(8): 2514–2519.
- ZHANG P, SONG XQ, 2012. Advances in diversity and promotion mechanism of endophytic bacteria associated with Orchids [J]. J Trop Subtrop Bot, 20(1): 92–98. [张萍, 宋希强, 2012. 兰科植物内生细菌物种多样性及其促生理研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 20(1): 92–98.]
- ZENG XH, NI ZY, DIAO HX, et al., 2021. Root endophytic fungal community and carbon and nitrogen stable isotope patterns differ among *Bletilla* Species (Orchidaceae) [J]. J Fungi (Basel), 7(2): 69.
- ZELMER CD, CUTHBERTSON L, CURRAH RS, 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms [J]. Mycoscience, 37(4): 439.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202109011

黄雪奎, 覃莹, 谢高, 等, 2023. 广西植物名录补遗 VI——兰科 4 新记录属和 13 新记录种 [J]. 广西植物, 43(6): 1006–1015.

HUANG XK, QIN Y, XIE G, et al., 2023. Supplement to Guangxi Plant List VI: four new record genera and thirteen new record species of Orchidaceae [J]. *Guihaia*, 43(6): 1006–1015.



广西植物名录补遗 VI ——兰科 4 新记录属和 13 新记录种

黄雪奎^{1, 2}, 覃莹¹, 谢高^{1, 3}, 刘演^{1*}

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541006;
中国科学院
3. 桂林理工大学 旅游与风景园林学院, 广西 桂林 541006)

摘 要: 广西壮族自治区位于我国南部, 气候湿润, 生境复杂, 具有丰富的物种多样性。该文报道广西兰科植物 13 个新记录种, 即旗唇兰 [*Kuhlhasseltia yakushimensis* (Yamamoto) Ormerod]、紫茎兰 (*Risleya atropurpurea* King & Pantl.)、指柱兰 (*Stigmatodactylus sikokianus* Maxim. ex Makino)、二尾兰 (*Vrydagzynea nuda* Bl.)、深圳拟兰 (*Apostasia shenzhenica* Z. J. Liu & L. J. Chen)、拟泰国卷瓣兰 (*Bulbophyllum nipondhii* Seidenf.)、南岭叠鞘兰 (*Chamaegastrodia nanlingensis* H. Z. Tian & F. W. Xing)、垂叶斑叶兰 (*Goodyera pendula* Maxim.)、四腺翻唇兰 (*Hetaeria anomala* Lindl.)、褐花羊耳蒜 (*Liparis brunnea* Ormerod)、聚叶钗子股 (*Luisia appressifolia* Aver.)、峨眉竹茎兰 (*Tropidia emeishanica* K. Y. Lang)、芳线柱兰 [*Zeuxine nervosa* (Lindl.) Trimen], 其中, 旗唇兰属 (*Kuhlhasseltia* J. J. Smith)、紫茎兰属 (*Risleya* King & Pantl.)、指柱兰属 (*Stigmatodactylus* Maxim. ex Makino)、二尾兰属 (*Vrydagzynea* Bl.) 为广西新记录属, 广西兰科植物至此记载到 128 属 472 种 4 变种。文中提供了新记录物种的引证标本、地理分布和特征照片。

关键词: 新记录, 广西, 兰科, 物种多样性, 监测样地

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1006-10

Supplement to Guangxi Plant List VI: four new record genera and thirteen new record species of Orchidaceae

HUANG Xuekui^{1, 2}, QIN Ying¹, XIE Gao^{1, 3}, LIU Yan^{1*}

(1. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China*; 2. *College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi, China*; 3. *College of Tourism and Landscape Architecture, Guilin University of Technology, Guilin 541006, Guangxi, China*)

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 国家自然科学基金 (32160050); 广西兰科植物资源调查项目 (2019073012, 2019073013, 2019073014)。

第一作者: 黄雪奎 (1995-), 硕士研究生, 主要从事植物资源调查研究, (E-mail) 1977925631@qq.com。

* 通信作者: 刘演, 研究员, 硕士生导师, 主要从事植物分类、区系地理和植物资源保育等研究, (E-mail) gxibly@163.com。

Abstract: Guangxi Zhuang Autonomous Region is located in South China, with humid climate, complex habitats and rich species diversity. Thirteen species of orchids are reported as new records from Guangxi Zhuang Autonomous Region, viz. *Kuhlhasseltia yakushimensis* (Yamamoto) Ormerod, *Risleya atropurpurea* King et Pantl., *Stigmatodactylus sikokianus* Maxim. ex Makino, *Vrydagzynea nuda* Bl., *Apostasia shenzhenica* Z. J. Liu & L. J. Chen, *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf., *Chamaegastrodia nanlingensis* H. Z. Tian & F. W. Xing, *Goodyera pendula* Maxim., *Hetaeria anomala* Lindl., *Liparis brunnea* Ormerod, *Luisia appressifolia* Aver., *Tropidia emeishanica* K. Y. Lang, and *Zeuxine nervosa* (Lindl.) Trimen. Among them, *Kuhlhasseltia* J. J. Smith, *Risleya* King & Plantl., *Stigmatodactylus* Maxim. ex Makino, and *Vrydagzynea* Bl. are newly recorded genera in Guangxi. There are 128 genera and 472 species and 4 varieties of Guangxi Orchidaceae. Citation specimens, geographical distributions and pictures of the thirteen newly recorded species are provided.

Key words: new records, Guangxi, Orchideaceae, species diversity, monitoring plot

广西兰科植物丰富,2016 年出版的《广西植物志》(第五卷)中,兰科共收载 122 属 438 种 4 变种(李树刚等, 2016),此后相继报道了 5 新种、16 新记录种、2 新记录属,其中,2016—2018 年间,报道的新种有那坡齿唇兰(*Odontochilus napoensis* H. Tang & Y. F. Huang) (Tang et al., 2016)、雅长山兰(*Oreorchis yachangensis* Z. B. Zhang & B. G. Huang) (Zhang et al., 2016),中国新记录种有角唇隔距兰(*Cleisostoma tricornutum* Aver.) (覃营等, 2018a),广西新记录属有鹿角兰属(*Pomatocalpa* Breda)和独花兰属(*Changnienia* S. S. Chien) (覃营等, 2018b),广西新记录种有日本对叶兰 [*Neottia japonica* (Bl.) Szlachetko]、吉氏羊耳蒜(*Liparis tsui* H. Z. Tian & A. Q. Hu)、小羊耳蒜(*L. fargesii* Finet)、条裂鸢尾兰(*Oberonia jenkinsiana* Lindl.)、果香兰(*Cymbidium suavissimum* C. Curtis)、大花斑叶兰 [*Goodyera biflora* (Lindl.) J. D. Hooker] (邹春玉等, 2018)以及台湾鹿角兰 [*Pomatocalpa undulatum* (Lindl.) J. J. Smith subsp. *acuminatum* (Rolfe) S. Watthana & S. W. Chung] 和独花兰(*Changnienia amoena* S. S. Chien) (覃营等, 2018b)。

自 2019 年以来,根据国家林业和草原局的部署,广西组织开展了兰科植物资源调查工作,先后建立了 10 309 个兰花调查监测样地,其中,5 m × 5 m 样方 10 197 个(含固定样方 2 602 个、临时样方 7 597 个),样木 112 个(含固定样木 48 个、临时样木 64 个)。在调查过程中发现一批兰科新种、新记录种和存疑物种,并陆续发表或报

道,如新种那坡羊耳蒜(*Liparis napoensis* L. Li, H. F. Yan & S. J. Li) (Li et al., 2019)、九万山舌唇兰(*Platanthera jiuwanshanensis* Ying Qin & Yan Liu) (Qin et al., 2020)、雅长无叶兰(*Aphyllorchis yachangensis* Ying Qin & Yan Liu) (Qin et al., 2021),中国新记录种宽叶玉凤花(*Habenaria lindleyana* Steud) (曾维波等, 2017)、中越带唇兰(*Tainia acuminata* Aver.) (袁泉等, 2020)、岩生羊耳蒜(*Liparis petraea* Aver. & Averyanova) (农素芸等, 2021),中国大陆新记录种乌来天麻(*Gastrodia uraiensis* T. C. Hsu & C. M. Kuo) (覃营等, 2020a)、折柱天麻(*G. flexistyla* T. C. Hsu & C. M. Kuo) 和叉脊天麻(*G. shimizuana* Tuyama) (覃营等, 2020b)、春天麻(*G. fontinalis* T. P. Lin) (李健玲, 2021)、纹瓣鹿角兰 [*Pomatocalpa tonkinense* (Gagnep.) seidenf.] (刘志荣等, 2021),反映出广西兰科植物具丰富的物种多样性。经进一步整理和追踪观察,广西兰科植物又有 4 属和 13 种被确认为新记录。鉴于兰科植物重要的科学价值和经济价值以及保护生物学意义,特予以报道。凭证标本存放于广西植物研究所标本馆(IBK)。

1 旗唇兰属(*Kuhlhasseltia* J. J. Smith)

地生草本。根状茎节上生根。茎具 3~6 枚叶。叶小,卵圆形、卵形至宽披针形;叶柄基部具抱茎的鞘。花序顶生,中部以下有时具鞘状苞片;花苞片常被疏柔毛或边缘具睫毛;花小,唇瓣位于

下方;萼片在中部以下合生,钟状;花瓣与中萼片等长且与中萼片紧贴呈兜状;唇瓣较萼片长,呈T或Y字形,基部具囊状距,中部爪细长,全缘或在其前部具小齿前部扩大;距末端2浅裂,分隔2室,每室具1枚胼胝体;蕊柱直立,花药生于蕊柱背侧;花粉团2,倒卵状披针形;蕊喙位于蕊柱的顶端,叉状2裂;柱头2个,位于蕊喙之下。

旗唇兰属由 J. J. Smith 于 1910 年建立,全属有 10 种,我国产 1 种,即旗唇兰(*K. yakushimensis*) (Chen et al., 2009a)。

分布:中国陕西、安徽、浙江、台湾、湖南、四川;印度尼西亚、马来西亚、新几内亚、菲律宾、日本、韩国。中国广西首次记录。

旗唇兰

Kuhlthasseltia yakushimensis (Yamam.) Ormerod in Lindleyana 17(4): 209. 2002; Flora of China 25: 63. 2009.——*Vexillabium yakushimense* (Yamam.) F. Maekawa in J. Jap. Bot. 11: 459. 1935; 中国植物志 17: 174. 1999。

植株高 8~13 cm。茎无毛,具 4~5 枚叶。叶卵形,密生茎基部或疏生茎上,具 3 条脉;叶柄基部扩大成抱茎的鞘。花茎常带紫红色,中部以下具粉红色鞘状苞片;苞片粉红色,边缘具睫毛;花小;萼片粉红色;花瓣白色,具紫红色斑块,近顶部收狭具钝的凸尖头,基部与中萼片紧贴呈兜状;唇瓣白色。蕊喙 2 裂;柱头星月形,突出。

凭证标本:广西九万山国家级自然保护区杨梅坳,生于山坡密林下,海拔为 1 479 m,2018 年 9 月 16 日,覃营 QY20180916001 (IBK)。

分布:中国陕西、安徽、浙江、台湾、湖南、四川;日本、菲律宾。模式标本采自日本。中国广西首次记录。

2 紫茎兰属(*Risleya* King & Pantl.)

腐生草本,不具块茎或假鳞茎。茎无叶,暗紫色,基部具鞘,顶端为总状花序;总状花序具多数密生小花;花苞片宿存;花小,肉质;萼片相似,离生;花瓣常较萼片短而狭;唇瓣位于上方,不裂,凹陷,较宽阔;蕊柱短,圆柱形;花药生于背侧,2 室;

花粉团 4 个,成 2 对,蜡质,无花粉团柄,附着于肥厚的、矩圆形的粘盘上;蕊喙粗大,伸出,高于花药。

紫茎兰属由 King 和 Pantling 于 1898 年建立,全属仅 1 种,即紫茎兰(*R. atropurpurea*) (Chen et al., 2009a)。

分布:中国四川、西藏、云南;不丹、印度、缅甸。中国广西首次记录。

紫茎兰

Risleya atropurpurea King & Pantl. in Ann. Roy. Bot. Gard. (Calcutta) 8: 247. 1898; 中国植物志 18: 152. 1999; Flora of China 25: 245. 2009。

腐生草本,具肥厚根状茎。茎无叶,暗紫色,基部具 2 枚鞘,鞘抱茎,膜质。花肉质,黑紫色,稍密集;萼片近长圆形;花瓣近长圆状披针形,展开;唇瓣宽卵形,贴生于蕊柱基部,凹陷,靠近基部的边缘具细齿,先端具朝上翻的小尖头。蒴果椭圆形。

凭证标本:广西雅长兰科植物国家级自然保护区盘古王山脚大沟,生于山坡疏林下,海拔为 1 773 m,2020 年 6 月 28 日,覃营等 QYYC009 (IBK)。

分布:中国四川、西藏、云南;不丹、印度、缅甸。模式标本采自印度。中国广西首次记录。

3 指柱兰属(*Stigmatodactylus* Maxim. ex Makino)

地生小草本,地下具根状茎与小块茎。茎纤细,无毛,中部具 1 枚叶。叶很小,基部无柄。总状花序顶生,具 1~3 花;花苞片叶状;花近直立;萼片离生,狭窄,侧萼片略斜歪且较短;花瓣与侧萼片相似;唇瓣宽阔,基部具有 1 个肉质的、2 深裂的附属物;蕊柱直立,上部向前弯,两侧边缘有狭翅,无蕊柱足;柱头凹陷,下方有指状附属物;花粉团 4 个,成 2 对,无花粉团柄和粘盘。

指柱兰属由 Makino 于 1891 年建立,全属有 10 种,我国产 1 种,即指柱兰(*S. sikokianus*) (陈恒彬和张永田,1994;Chen et al., 2009a)。

分布: 中国福建、湖南、云南、台湾; 日本、印度、印度尼西亚、新几内亚、所罗门群岛、喜马拉雅山。中国广西首次记录。

指柱兰

Stigmatodactylus sikokianus Maxim. ex Makino in Ill. Fl. Japan 1(7): t. 43. 1891; 中国植物志 17: 236. 1999; Flora of China 25: 88. 2009。

根状茎圆柱形, 被绵毛状根毛。茎纤细。叶三角状卵形, 具 3 脉。花苞片略小于叶, 淡绿色; 花淡绿色, 仅唇瓣淡红紫色; 中萼片线形, 基部边缘有长缘毛; 侧萼片狭线形; 唇瓣宽卵状圆形, 边缘具细齿, 基部有附属物; 附属物肉质, 在中部分裂为上裂片与下裂片, 先端均为 2 浅裂; 蕊柱前方中部有小突起。

凭证标本: 广西岑王老山国家级自然保护区, 生于阔叶林下, 海拔为 1 868 m, 2018 年 11 月 3 日, 覃营 GXQY20181103001 (IBK)。

分布: 中国福建、湖南、云南、台湾; 日本。模式标本采自日本。中国广西首次记录。

4 二尾兰属 (*Vrydagzynea* Bl.)

地生草本。根状茎节上生根。茎直立, 具叶。叶稍肉质, 互生, 具柄。总状花序顶生, 具密生花; 花倒置, 花被片不甚张开; 中萼片与花瓣黏合呈兜状; 侧萼片伸展; 唇瓣短, 与蕊柱并行, 基部具距; 距从两侧萼片之间伸出, 距内壁近基部有 2 枚胼胝体; 蕊柱很短; 花药直立, 位于蕊柱后侧, 2 室; 花粉团 2 个, 具粒粉质, 长倒卵形, 共同具 1 个大的粘盘; 蕊喙短, 2 齿裂; 柱头 2, 位于蕊喙前面基部的两侧。

二尾兰属由 Blume 于 1858 年建立, 全属约 35 种, 我国产 1 种, 即二尾兰 (*V. nuda*) (Chen et al., 2009a)。

分布: 中国台湾、海南、香港; 印度至太平洋岛屿。中国广西首次记录。

二尾兰

Vrydagzynea nuda Bl. in Coll. Orchid. 71, tt. 17, 74. 1858; 中国植物志 17: 203. 1999; Flora

of China 25: 76. 2009。

植株高 5~12 cm。茎具 5~7 枚叶, 常散生茎上。叶卵形或卵状椭圆形, 暗绿色; 叶柄基部扩大成抱茎的鞘。花白色或绿白色, 不甚张开; 萼片白色或淡绿色, 中萼片凹陷呈舟状, 与花瓣黏合呈兜状; 侧萼片偏斜, 前侧基部呈耳状, 背面近先端具龙骨状突起; 唇瓣较萼片短, 中部具肉质的脊, 基部具距, 末端 2 浅裂, 其内面具 2 枚肉质、椭圆形、有柄的胼胝体; 合蕊柱粗短。

凭证标本: 广西防城港市防城区那梭镇长歧, 生于山坡疏林下, 海拔为 649 m, 2020 年 4 月 11 日, 覃营等 QYFC20200411009 (IBK); 广西七冲国家级自然保护区义牛冲, 海拔为 212 m, 2021 年 7 月 6 日, 黄雪奎、陈宇娇、戴石昌、李喜涛 QC2236 (IBK)。

分布: 中国台湾、海南、香港; 印度尼西亚、印度、马来群岛。模式标本采自印度尼西亚。中国广西首次记录。

5 新记录种

5.1 深圳拟兰

Apostasia shenzhenica Z. J. Liu & L. J. Chen in Pl. Sci. J. 29(1): 39. 2011。

陆生草本。根状茎具管状根; 管状茎近球形, 茎细长, 向基部单生分枝, 中部以下有圆柱形鞘。叶卵形或卵状披针形, 先端具丝状芒; 叶柄基部抱茎, 膨大。圆锥花序下弯; 花淡绿黄色; 花瓣相似, 近长圆形, 背面具龙骨状突起; 合蕊柱圆柱状; 花药线状披针形, 基部具两个相等小室; 花柱顶端微 3 裂; 退化雄蕊长于花柱。蒴果圆筒状, 绿色。

根据陈利君和刘仲健 (2011) 发表深圳拟兰时的描述, 本种与多枝拟兰 (*A. ramifera* S. C. Chen et K. Y. Lang) 相似, 区别在于本种具块茎状的根和明显长于花柱的退化雄蕊 (上部约 1/3 与花柱分离), 圆锥花序和花不完全开放。但是, 也有学者认为该种的这些性状是不稳定的, 是不足以区分这两个物种的。两者是否为同一物种, 仍需要进一步的研究。

凭证标本: 广西大明山国家级自然保护区水源村至龙头山路上, 生于阔叶林下, 海拔为 934 m, 2020 年 5 月 27 日, 杨平、黄雪奎、王合 450125200527028LY

(IBK)。

分布:中国广东。模式标本采自广东深圳。广西首次记录。

5.2 拟泰国卷瓣兰

Bulbophyllum nipondhii Seidenf. in Nordic J. Bot. 5(2): 162. 1985.

小型附生植物。假鳞茎球形至锥形。叶单生,长圆形至椭圆状长圆形,先端具缺口。花序由假鳞茎基部产生。背侧萼片线状长圆形,白色或黄白色,有紫色条纹;侧生萼片狭线形,紫色或红紫色。花瓣斜卵形或椭圆状卵形,具3脉,白色或淡黄色,具紫色条纹。唇瓣舌状,紫色,在中部向外弯曲,肉质的边缘之间具纵向皱纹。雌蕊锐尖三角形。

凭证标本:广西百色市德保县燕峒乡多龙村,附生于阔叶林的树上,海拔为879 m,2016年9月3日,德保普查队451024160903046LY (IBK);广西百色市德保县燕峒乡多龙村,附生于阳坡阔叶林的树上,海拔为938 m,2020年7月23日,覃营等 QYDB004 (IBK)。

分布:中国云南;泰国。模式标本采自泰国。中国广西首次记录。

5.3 南岭叠鞘兰

Chamaegastrodia nanlingensis H. Z. Tian & F. W. Xing in Novon 18(2): 261–263. f. 1. 2008.

多年生腐生草本。茎直立,浅棕色。花序顶生。花苞片卵状披针形。萼片离生。中萼片卵圆形。侧萼片镰状卵圆形。花瓣镰形,浅黄褐色至黄褐色,与中萼片粘合成兜状。唇瓣黄色,呈“Y”形。中唇具不等长流苏。后唇浅囊状,基部靠下位置具2肉质胼胝体。蕊柱红褐色,前两侧具2较大的片状蕊柱翅。蕊喙先端叉状深2裂。离生柱头2,卵圆形。

叠鞘兰属在 *Flora of China* 中记载有3种,分别是戟唇叠鞘兰 [*C. vaginata* (Hook. f.) Seidenf.]、叠鞘兰 (*C. shikokiana* Makino & F. Maekawa) 和川滇叠鞘兰 [*C. inverta* (W. W. Smith) Seidenf.], 我国均产 (Chen et al., 2009a)。南岭叠鞘兰 (*C. nanlingensis* H. Z. Tian & F. W. Xing) 由田怀珍等人发表 (Tian & Xing, 2008), 虽然次年陈心启等人在 *Flora of China* 中将该种置于

齿唇兰属 (*Odontochilus* Bl.) (Chen et al., 2009a), 但刘巧霞等人后来结合分子生物学证据研究后认为该种及齿爪叠鞘兰 [*Chamaegastrodia poilanei* (Gagnep.) Seidenf. & A. N. Rao] 仍属于叠鞘兰属,该属现有5种 (刘巧霞, 2015; 刘严文, 2018)。本文采纳刘巧霞等人的观点。

凭证标本:广西姑婆山自治区级自然保护区分岔亭右侧山道,生于阔叶林下,海拔为1100 m, 2021年8月5日,牟光福、黄雪奎、张强 GPS584 (IBK)。

分布:中国广东、湖南、江西。模式标本采自广东。广西首次记录。

5.4 垂叶斑叶兰

Goodyera pendula Maxim. in Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg. 32: 623. 1888; 中国植物志 17: 155. 1999; *Flora of China* 25: 49. 2009.

植株附生或石生。茎下垂,基部常匍匐。叶中部略大,向顶端逐渐缩小,披针形至卵形,3~5条脉;叶面绿色带淡黄色斑点,叶背灰绿色。花序下垂而后上升,呈“L”型,花生长于同侧;花白色,萼片外被毛,中萼片狭卵形,1脉;侧萼片卵状披针形;花瓣狭倒卵形至菱状披针形,1脉;唇瓣白色,基部具囊;囊白色,中部至底部橘红色;合蕊柱白色。

凭证标本:广西猫儿山国家级自然保护区,附生于阔叶林下的石壁上,海拔为1953 m,2017年8月8日,资源县普查队50329170808009LY (IBK)。

分布:中国台湾、云南、广东、西藏;日本。模式标本采自日本。中国广西首次记录。

5.5 四腺翻唇兰

Hetaeria anomala Lindl. in J. Proc. Linn. Soc., Bot. 1: 185. 1857; 中国植物志 17: 182. 1999; *Flora of China* 25: 66. 2009.

植株高28~34 cm。茎直立,具3~7枚疏生叶。叶卵状披针形,上面绿色,具3脉。花茎直立,被长柔毛,下部具鞘状苞片;花苞片披针形,边缘具缘毛,背面被长柔毛;花白色;萼片背面疏被糙硬毛,具1脉,中萼片椭圆形,与花瓣粘合呈兜状;侧萼片近斜卵形;花瓣线形,具1脉;唇瓣基部凹陷呈浅囊状,中部收狭成细爪,前部2裂,左右伸展。



A-B. 拟泰国卷瓣兰；C. 指柱兰；D-E. 紫茎兰；F-G. 深圳拟兰；H. 褐花羊耳蒜；I. 芳线柱兰；J-K. 旗唇兰。

A-B. *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf.; C. *Stigmatodactylus sikokianus* Maxim. ex Makino; D-E. *Risleya atropurpurea* King & Pantl.; F-G. *Apostasia shenzhenica* Z. J. Liu & L. J. Chen; H. *Liparis brunnea* Ormerod; I. *Zeuxine nervosa* (Lindl.) Trimen; J-K. *Kuhlhasseltia yakushimensis* (Yamamoto) Ormerod.

图版 1 广西兰科植物 7 个新记录种

Plate 1 Seven new records of Orchidaceae plants in Guangxi



A-C. 峨眉竹茎兰; D-F. 聚叶钗子股; G-H. 二尾兰; I. 四腺翻唇兰; J-K. 垂叶斑叶兰; L. 南岭叠鞘兰。

A-C. *Tropidia emeishanica* K. Y. Lang; D-F. *Luisia appressifolia* Aver.; G-H. *Vrydagzynea nuda* Bl.; I. *Hetaeria anomala* Lindl.; J-K. *Goodyera pendula* Maxim.; L. *Chamaegastrodia nanlingensis* H. Z. Tian & F. W. Xing.

图版 2 广西兰科植物 6 个新记录种

Plate 2 Six new records of Orchidaceae plants in Guangxi

本种与滇南翻唇兰 [*H. affinis* (Griff.) Seidenf. & Ormerod] 相似, 但本种的唇瓣基部极扩大, 花茎被绒毛(张艺祎等, 2018)。

凭证标本: 广西防城港市防城区扶隆镇国防路木材检查站, 生于阔叶林下, 海拔为 477 m, 2021 年 2 月 22 日, 覃营、黄金全、苏春兰、梁津慧 GXQY20210222046 (IBK)。

分布: 中国台湾、海南、西藏; 印度、老挝、泰国、缅甸、菲律宾、越南、马来西亚、印度尼西亚。模式标本采自印度尼西亚。中国广西首次记录。

5.6 褐花羊耳蒜

Liparis brunnea Ormerod in Taiwaniana 52 (4): 309. 2007; Flora of China 25: 218. 2009.

陆生草本。假鳞茎丛生, 椭圆形至近方形, 两侧扁平。叶 1~2 枚, 卵状椭圆形至近圆形, 基部收缩成鞘状。花苞卵状披针形。花褐色。背侧萼片反折, 线形; 侧生萼片线形, 1 脉。花瓣反折, 丝状线形; 唇瓣近方形, 基部收缩, 具深裂的双裂片, 先端微缺。合蕊柱弯曲, 纤细, 基部膨大, 先端具狭翅。

该种与华西羊耳蒜 (*L. pygmaea* King & Pantl.) 接近, 但该种的背萼片线形和整个唇瓣边缘近方形 (Ormerod, 2007; Chen et al., 2009c; 马良等, 2020)。

凭证标本: 广西大瑶山国家级自然保护区圣堂山, 生于山坡密林下的石壁上, 海拔为 1 094 m, 2018 年 5 月 8 日, 刘静、覃营、牟光福 DYS626 (IBK)。

分布: 中国广东、福建。模式标本采自广东。广西首次记录。

5.7 聚叶钗子股

Luisia appressifolia Aver. in Lindleyana 15 (2): 79. 2000.

附生草本, 常分枝。叶圆柱状, 抱钩状。花具绿黄色斑点; 花苞片正面绿黄色, 背面红色。花背面带淡黄绿色萼片, 其具紫色条纹; 花瓣金黄色, 椭圆形, 背面的中间带紫色条纹; 唇瓣金黄色, 厚肉质, 正面具密的棕色斑点。合蕊柱约 3 mm, 蕊喙 2 裂。花药冠近球形, 先端缩小为喙。

凭证标本: 广西木论国家级自然保护区, 附生于石灰岩石山山坡的树上, 海拔为 850 m, 2012 年 7

月 25 日, 彭日成等 ML1985 (IBK); 广西木论国家级自然保护区, 附生于石灰岩石山山坡的树上, 海拔为 870 m, 2012 年 7 月 25 日, 彭日成等 ML1994 (IBK); 广西那坡县百省乡百坎村附近, 附生于石灰岩石山山顶的树上, 海拔为 1 230 m, 2014 年 5 月 29 日, 那坡县调查队 451026140529022LY (IBK); 广西木论国家级自然保护区, 附生于石灰岩石山山坡的石壁上, 海拔为 800 m, 2017 年 5 月 24 日, 陆昭岑、蒋裕良等 LZC102 (IBK)。

分布: 中国云南; 越南。模式标本采自越南。中国广西首次记录。

5.8 峨眉竹茎兰

Tropidia emeishanica K. Y. Lang in Acta Phytotaxo. Sin. 20 (2): 184. 1982; 中国植物志 17: 125. 1999; Flora of China 25: 196; 2009.

植株高 22 cm, 具稍粗的根状茎; 根上有小块状物。茎不分枝, 下部具圆筒状鞘。叶 2 枚, 卵形或椭圆形, 先端渐尖, 基部近圆形。花小, 绿色; 中萼片长圆形, 3 脉; 侧萼片几乎完全合生为合萼片; 合萼片近倒卵状披针形; 花瓣椭圆形, 凹陷; 唇瓣倒卵形, 内具肥厚的纵脊, 基部无距; 蕊喙先端 2 裂。

本种近似于阔叶竹茎兰 [*T. angulosa* (Lindl.) Bl.], 但本种的苞片卵状披针形; 中萼片矩圆形; 侧萼片完全合生成 1 枚先端截平的合萼片; 花瓣椭圆形, 较萼片短; 唇瓣倒卵形, 凹陷, 内面具 1 条纵的脊状突起, 基部无距 (郎楷永, 1982)。

凭证标本: 广西德保县东凌乡新屯村, 生于阔叶林下, 海拔为 1 371 m, 2017 年 5 月 10 日, 德保普查队 451024170510006LY (IBK)。

分布: 中国四川。模式标本采自四川峨眉山。中国广西首次记录。

5.9 芳线柱兰

Zeuxine nervosa Trimen in Syst. Cat. Fl. Pl. Ceylon 90. 1885; 中国植物志 17: 197. 1999.

植株高 20~40 cm。根状茎具节。茎具 3~6 叶。叶卵形或卵状椭圆形, 上面绿色或沿中脉具白色条纹, 先端尖。花序细长, 疏生数花; 花苞片卵状披针形, 红褐色; 花小; 中萼片红褐色或黄绿色; 侧萼片长圆状卵形, 与中萼片同色; 花瓣卵形偏斜, 与中萼片黏合呈兜状; 唇瓣 Y 字形, 白色, 2

裂,裂片基部具绿点,中部收狭成爪;基部深囊状,囊内两侧各具1枚胼胝体。

凭证标本:广西弄岗国家级自然保护区陇瑞站3号界碑陇瑞方向,生于石灰岩石山坡疏林下,海拔为190 m,2020年1月15日,覃营、邓斌 GXQY20200115001 (IBK)。

分布:中国台湾、云南、海南、贵州;印度、柬埔寨、老挝、泰国、越南、菲律宾、日本、不丹、尼泊尔、斯里兰卡、孟加拉国、新几内亚。模式标本采自印度。中国广西首次记录。

在植物界中,兰科是最大的家族之一。大多数的兰科植物极具科学价值、经济价值,在世界范围内都受到过度利用和栖息地破坏的威胁。所有野生兰科植物均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录I或附录II,其国际贸易受到禁止或严格控制;兰科植物也是我国野生动植物和自然保护区保护工程中15种重点保护物种之一;所有野生兰科植物已被列入《广西壮族自治区第一批重点保护野生植物名录》;石斛属(*Dendrobium* Sw.)、金线兰属(*Anoectochilus* Bl.)、独蒜兰属(*Pleione* D. Don)、兰属(*Cymbidium* Sw.)、杓兰属(*Cypripedium* L.)、火焰兰属(*Renanthera* Lour.)、兜兰属(*Paphiopedilum* Pfitzer)、丹霞兰属(*Danxiaorchis* J. W. Zhai, F. W. Xing & Z. J. Liu)8类及其他29种兰科植物被列入2021年调整后的《国家重点保护野生植物名录》,受保护、监管力度空前,是生物多样性保护中的“旗舰”类群。

唐健民等(2022)统计出广西兰科植物已达129属510种。经认真阅读该文献后发现统计数据存在明显的错漏,为此我们仍基于2016年出版的《广西植物志》(第五卷)兰科数据以及该卷出版后报道的广西兰科新种和新记录种进行统计,广西兰科共记载到128属472种4变种。2019年启动开展的广西兰科植物资源调查工作,不仅建立了监测样地10309个,也新增一批兰科新记录种,调查还发现,广西兰科物种多样性本底仍然不清,部分兰科植物面临分布区收缩并破碎化,失去适生环境威胁,部分种类因具有较高的观赏价值、药用价值而遭到过度采挖,资源濒临枯竭威胁。广西兰科调查工作表明,开展专项调查具十分重要现实意义,今后仍需大力加强,以进一步摸清资源

本底,揭示种群濒危机制,同时实施监测规划,落实有效的保育行动。

致谢 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所陆昭岑、邹春玉、杨平、蒋裕良、牟光福、陈宇娇、苏春兰、张强、王合、戴石昌、李喜涛等参加了野外工作,广西九万山国家级自然保护区、广西岑王老山国家级自然保护区、广西七冲国家级自然保护区、广西雅长兰科植物国家级自然保护区、广西弄岗国家级自然保护区、广西大瑶山国家级自然保护区、广西大明山国家级自然保护区、广西猫儿山国家级自然保护区、广西木论国家级自然保护区、广西姑婆山自治区级自然保护区等保护区人员在调查过程中给予了热情支持和帮助,谨致谢意。

参考文献:

- CHEN XQ, GALE SW, CRIBB PJ, 2009a. *Chamaegastrodia* Makino & F. Maek. [M]// WU ZY, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 25: 63, 70, 76, 81, 88, 245.
- CHEN LJ, LIU ZJ, 2011. *Apostasia shenzhenica*, a new species of *Apostasioideae* (Orchidaceae) from China [J]. Plant Sci J, 29(1): 38-41. [陈利君, 刘仲健, 2011. 深圳拟兰, 中国兰科一新种 [J]. 植物科学学报, 29(1): 38-41.]
- CHEN XQ, LANG KY, GALE SW, et al., 2009b. *Goodyera pendula* Maximowicz [M]// WU ZY, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 25: 49.
- CHEN XQ, ORMEROD P, WOOD JJ, 2009c. *Liparis brunnea* Ormerod [M]// WU ZY, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 25: 218.
- CHEN HB, ZHANG YT, 1994. A new record genus of Orchidaceae in China — *Stigmatodactylus* [J]. J Wuhan Bot Res, 12(4): 324-326. [陈恒彬, 张永田, 1994. 中国兰科一新记录属——指柱兰属 [J]. 武汉植物学研究, 12(4): 324-326.]
- LANG KY, 1982. Seven new species of Orchidaceae from Emei Shan, Sichuan [J]. Acta Phytotax Sin, 20(2): 182. [郎楷永, 1982. 四川峨眉山兰科新植物 [J]. 植物分类学报, 20(2): 182.]
- LI SG, WEI FN, LIU Y, et al., 2016. Flora of Guangxi (Vol. 5) [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Press: 386. [李树刚, 韦发南, 刘演, 等, 2016. 广西植物志(第5卷) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社: 386.]

- LI JL, WU L, QIN Y, et al., 2021. *Gastrodia fontinalis*, a newly recorded species of *Gastrodia* to Mainland China [J]. J Trop Subtrop Bot, 29(4): 417–420. [李健玲, 吴磊, 覃莹, 等, 2021. 春天麻, 中国大陆天麻属一新记录种 [J]. 热带亚热带植物学报, 29(4): 417–420.]
- LIU ZR, QIN Y, LIU SY, et al., 2021. New records of *Pomatocalpa* (Orchidaceae) from China [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 41(1): 1971–1974. [刘志荣, 覃莹, 刘晟源, 等, 2021. 中国鹿角兰属(兰科)植物新资料 [J]. 西北植物学报, 41(1): 1971–1974.]
- LIU QX, 2015. Phylogenetic systematic study on *Anoetochilus* s.l. (Orchidaceae) in China [D]. Shanghai: East China Normal University: 1–122. [刘巧霞, 2015. 中国广义金线兰属(*Anoetochilus* s.l.) (兰科)植物的系统分类研究 [D]. 上海: 华东师范大学: 1–122.]
- LIU YW, 2018. Systematic and taxonomic study on *Odontochilus* and allies (Orchidaceae) in China [D]. Shanghai: East China Normal University: 1–139. [刘严文, 2018. 中国齿唇兰属(*Odontochilus*)及其近缘属植物的系统分类研究 [D]. 上海: 华东师范大学: 1–139.]
- LI L, CHUANG S W, LI B, et al., 2019. *Liparis napoensis* (Orchidaceae), a new species from Guangxi, China [J]. PhytoKeys, 119:31–37.
- MA L, CHEN XY, SU XX, et al., 2020. Three new records of Orchidaceae species from Fujian Province [J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 49(2): 182–184. [马良, 陈新艳, 苏享修, 等, 2020. 福建省 3 种兰科植物新记录 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 49(2): 182–184.]
- NONG SY, XIE G, TAN WN, et al., 2021. *Liparis petraea*, a newly recorded species of *Liparis* Rich (Orchidaceae) from China and its unique bulbil propagation mode [J]. Acta Bot Boreal-Orchid Sin, 41(7): 1248–1253. [农素芸, 谢高, 谭卫宁, 等, 2021. 中国兰科羊耳蒜属新记录种——岩生羊耳蒜及其独特的珠芽繁殖方式 [J]. 西北植物学报, 41(7): 1248–1253.]
- ORMEROD P, 2007. Orchidaceous additions to the flora of China and Vietnam (II) [J]. Taiwan, 52(4): 307–314.
- QIN Y, CHEN HL, DENG ZH, et al., 2021. *Aphyllorchis yachangensis* (Orchidaceae), a new holomycotrophic orchid from China [J]. PhytoKeys, 179(4): 91–97.
- QIN Y, HUANG YS, MENG T, et al., 2020. *Platanthera jiuwanshanensis* (Orchidaceae), a new species from Guangxi, China [J]. Phytotaxa, 436(1): 72–78.
- QIN Y, YUAN Q, MENG T, 2018a. *Cleisostoma tricornutum* Averyanov, a newly recorded species of *Cleisostoma* (Orchidaceae) from China [J]. J Trop Subtrop Bot, 26(3): 293–295. [覃莹, 袁泉, 蒙涛, 2018a. 角唇隔距兰, 中国隔距兰属(兰科)一新记录种 [J]. 热带亚热带植物学报, 26(3): 293–295.]
- QIN Y, LI FW, QIU SJ, et al., 2020a. *Gastrodia uraiensis*, a newly recorded species of *Gastrodia* from mainland, China [J]. Guihaia, 40(8): 1123–1126. [覃莹, 李福文, 邱少军, 等, 2020a. 中国大陆天麻属(兰科)一新记录种——乌来天麻 [J]. 广西植物, 40(8): 1123–1126.]
- QIN Y, CHEN HL, HUANG YS, et al., 2020b. New records of *Gastrodia* (Orchidaceae) from mainland, China [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 40(7): 1255–1258. [覃莹, 陈海玲, 黄俞淞, 等, 2020b. 中国大陆天麻属(兰科)新资料 [J]. 西北植物学报, 40(7): 1255–1258.]
- QIN Y, ZOU CY, MENG T, 2018b. Two newly recorded genera of Orchidaceae from Guangxi, China [J]. Guihaia, 38(11): 1475–1479. [覃莹, 邹春玉, 蒙涛, 2018b. 广西兰科植物二新记录属 [J]. 广西植物, 38(11): 1475–1479.]
- TIAN HZ, XING FW, 2008. *Chamaegastrodia nanlingensis* (Orchidaceae), a new species from Guangdong, China [J]. Novon: J Bot Nomen, 19(1): 261–263.
- TANG JM, WEI X, ZOU R, 2022. Study on species diversity and floristic characteristics of orchids in Guangxi [J]. J Guangxi Acad Sci, 38(2): 125–137. [唐健民, 韦霄, 邹蓉, 等, 2022. 广西兰科植物的物种多样性及区系特征研究 [J]. 广西科学院学报, 38(2): 125–137.]
- TANG H, FENG HZ, HUANG YF, 2016. *Odontochilus napoensis* sp. nov. (Orchidoideae: Orchidaceae) from southwestern Guangxi, China [J]. Nord J Bot, 34(4): 405–408.
- YUAN Q, TAN F, QIN Y, et al., 2020. *Tainia acuminata*, a newly recorded species of Orchidaceae from China [J]. J Trop Subtrop Bot, 28(3): 245–247. [袁泉, 谭飞, 覃莹, 等, 2020. 中越带唇兰, 中国带唇兰属(兰科)一新记录种 [J]. 热带亚热带植物学报, 28(3): 245–247.]
- ZOU CY, QIN Y, LI SW, et al., 2018. New records of six Orchidaceae species from Guangxi [J]. Guihaia, 38(8): 1106–1110. [邹春玉, 覃莹, 李述万, 等, 2018. 广西兰科植物新记录 [J]. 广西植物, 38(8): 1106–1110.]
- ZHANG YY, LI YX, ZHAI JW, et al., 2018. *Hetaeria anomala* Lindl, a newly recorded species of Orchidaceae from Tibet, China [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 33(2): 360–362. [张艺祎, 李云霞, 翟俊文, 等, 2018. 西藏兰科一新记录种——四腺翻唇兰 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 33(2): 360–362.]
- ZENG WB, MENG T, QIN Y, et al., 2017. *Habenaria lindleyana*, a newly recorded species of *Habenaria* (Orchidaceae) from China [J]. J Trop Subtrop Bot, 25(2): 171–174. [曾维波, 蒙涛, 覃莹, 等, 2017. 中国玉凤花属(兰科)一新记录种——宽叶玉凤花(英文) [J]. 热带亚热带植物学报, 2017, 25(2): 171–174.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202204020

童妍, 张燕萍, 胡美娟, 等, 2023. 蝴蝶兰新型杂交品种挥发性成分分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1016–1026.

TONG Y, ZHANG YP, HU MJ, et al., 2023. Volatile component analysis of new hybrid varieties of *Phalaenopsis* [J]. *Guihaia*, 43(6): 1016–1026.



蝴蝶兰新型杂交品种挥发性成分分析

童 妍¹, 张燕萍¹, 胡美娟¹, 曹映辉¹, 章杨婷¹, 仝恩慧¹,
王文君¹, 赵 凯², 彭东辉¹, 周育真^{1*}

(1. 福建农林大学 园林学院, 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室,
福州 350002; 2. 福建师范大学 生命科学学院, 福州 350117)

摘 要: 为研究不同蝴蝶兰(*Phalaenopsis*) 品种的关键致香成分, 该研究采用顶空固相微萃取(HS-SPME)与气相色谱-质谱联用(GC-MS)的芳香植物香气收集分析方法, 结合对8个香花蝴蝶兰新型杂交品种盛花期花朵进行花香成分检测, 并以此为基础进行主成分、聚类及香气品质分析。结果表明: (1) 从8个蝴蝶兰新型杂交品种中共鉴定出96种物质, 分为萜烯类、醛类、酯类、醇类、酮类、醚类、酚类和芳香族化合物, 其中萜烯类物质为主要挥发性物质。(2) 主成分分析显示, 各新型杂交品种被划分在3个象限中, F2中挥发性成分种类和数量均最多, 萜烯类物质主要是桉叶油醇、 α -香柑油烯; F1、F4、F5与F8为一组, 挥发性成分种类最少, 萜烯类物质主要是芳樟醇; F3、F6与F7为一组, 挥发性成分种类较多, 萜烯类物质主要是 α -香柑油烯。(3) 聚类分析结果与主成分分析一致, 8个蝴蝶兰新型杂交品种聚为3类, F1、F4、F5与F8关系较近, 为花香气味类型; F3、F6与F7的关系更近, 为木质型花香品质; 而F2与其他7个新型杂交品种却显示有较远的遗传距离, 挥发性物质贡献率相对平均, 花香成分复杂, 兼具木香型、薄荷香型和果香型等。综上表明, 花香物质可以作为潜在特征标记物来区分香味特征各异的品种群体。该研究结果为蝴蝶兰种质资源梳理、特定芳香品种选育及产品加工生产等进一步开发利用研究提供了理论依据。

关键词: 蝴蝶兰, 挥发性成分, GC-MS, 聚类分析, 遗传距离

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1016-11

Volatile component analysis of new hybrid varieties of *Phalaenopsis*

TONG Yan¹, ZHANG Yanping¹, HU Meijuan¹, CAO Yinghui¹, ZHANG Yangting¹,
TONG Enhui¹, WANG Wenjun¹, ZHAO Kai², PENG Donghui¹, ZHOU Yuzhen^{1*}

(1. College of Landscape Architecture, Fujian Agricultural and Forestry University, Key Laboratory of National Forestry and
Grassland Administration for Orchid Protection and Utilization, Fuzhou 350002, China; 2. College of
Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

收稿日期: 2022-07-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1001000302)。

第一作者: 童妍(1998-), 硕士研究生, 研究方向为园林植物与应用, (E-mail) 2474842013@qq.com。

* 通信作者: 周育真, 博士, 讲师, 研究方向为园林植物遗传育种与应用, (E-mail) zhouyuzhen@163.com。

Abstract: *Phalaenopsis* was the genus with the highest ornamental and commercial values among orchids. *Phalaenopsis* with fragrance were rarely distributed in the market due to selection constraints, such as affinity, ploidy and breeding age. Therefore, research on transferring aroma traits into commercial *Phalaenopsis* are of great significance to the breeding of *Phalaenopsis*. In order to investigate the key aroma-causing components among different varieties of *Phalaenopsis*, the floral fragrance components of the eight new hybrid varieties in full blooming period were examined by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. The principal components, clustering and aroma quality analysis were performed based on the identification of floral substance components. The results were as follows: (1) 96 substances were detected in eight varieties of *Phalaenopsis*, mainly divided into eight categories of terpenes, aldehydes, esters, alcohols, ketones, ethers, phenols and aromatic compounds, among which terpenes were dominant in quantity and content and were the main volatile substances of *Phalaenopsis*. (2) Principal component analysis showed that eight varieties were divided into three quadrants, F2 had the most volatile components and the most quantity, terpenes were mainly 1,8-cineole, α -bergamotene, linalool and (+)-calarene; F1, F4, F5 and F8 were divided into a group without ketones, ethers or phenols, and they had the least volatile components and terpenes were mainly linalool; F3, F6 and F7 were divided into a group with more volatile components and the terpenes were mainly α -bergamotene. (3) The results of cluster analysis were consistent with the principal component analysis, and the eight varieties were clustered into three categories, F1, F4, F5 and F8 were more closely related to each other as floral odor types; F3, F6 and F7 were more closely related to each other as woody floral quality; F2 showed a long genetic distance from the other seven varieties, with complex floral components and relatively average contribution of volatile substances, and both woody, minty and fruity types. This study shows that floral fragrance substances can be used as potential trait markers to distinguish between groups of varieties with different fragrance characteristics and provide a theoretical basis for further development and utilization research through cross selection to achieve specific floral fragrance *Phalaenopsis* selection and product processing and production.

Key words: *Phalaenopsis*, volatile component, GC-MS, cluster analysis, genetic distance

花香化合物是植物花朵释放的次生代谢物,在植物中表现出明显的多样性,一种植物中存在十几种甚至上百种挥发物质。普遍认为花香物质有引诱传粉者、提供食物源信号、抵御昆虫和病原体侵害等功能(Dobson, 1994; Shulaev et al., 1997; 孔莹等, 2012)。花香作为“花卉的灵魂”, 现已有2 000多种花香物质从90个属991种植物类群中被鉴定出来(Jette et al., 2006)。国内外已开展大量芳香植物育种工作,如育成四季开花、芳香浓郁香花月季群(李晋华等, 2018); 培育具有香味的常绿杜鹃品种(Ashworth et al., 2003); 培育出30余个适宜北方陆露地栽培的梅花香花品种(陈俊愉等, 1995; 赵靓, 2019); 此外, 山茶也相继培育出芳香品种(范正琪等, 2014)。随着蝴蝶兰鲜切花和盆栽蝴蝶兰市场的发展, 以及人们对芳香植物的喜爱, 香型蝴蝶兰市场的需求扩大, 培育不同香型的蝴蝶兰品种将成为未来重要的育种方向。

肖文芳等(2020, 2021)鉴定得到大叶蝴蝶兰(*Phalaenopsis violacea*)中的单萜类和倍半萜类物

质居多发现, 并特征香气物质榄香素; 之后, 以4个蝴蝶兰品种花朵挥发性成分进一步验证单萜类化合物是蝴蝶兰花朵的主要致香成分。在对兰花花香成分差异比对时发现, 蝴蝶兰中醇类物质在数量和相对含量上占优势(彭红明, 2009; 杨慧君, 2011)。浓香型原生种荧光蝴蝶兰(*P. bellina*)和大叶蝴蝶兰花香由芳樟醇和香叶醇及其衍生物等单萜类化合物决定(Hsiao et al., 2006, 2008)。杨淑珍和范燕萍(2008)在检测2个品种挥发性成分时推测, L-沉香醇为香气物质的主要成分。原生种西蕾丽蝴蝶兰(*P. schilleriana*)中挥发性成分主要为萜烯类和酯类物质, 包含乙酸橙花酯、橙花醇、香茅醇及乙酸香茅酯(Awano et al., 1997)。

现代蝴蝶兰种质资源丰富, 从常绿到落叶、大花型到小花型均有, 传统杂交育种受到遗传背景、基因组倍性、杂交亲和性等制约, 香花育种进程缓慢, 市场中鲜有香花品种流通。不同物种间或同一物种不同品种间花香组分仍有差异, 并且目前对不同蝴蝶兰品种挥发性成分的研究相对较少,

主要针对少数的原生种及商业品种,检测出的特征香气相对单一,未能通过挥发性物质对品种类群进行分类。因此,本研究采用顶空固相微萃取与气相色谱-质谱联用(GC-MS)的芳香植物香气收集分析方法,系统地栽培的8个香花蝴蝶兰新型杂交品种在盛花期时的香气成分进行全面分析,旨在深入了解不同蝴蝶兰品种花朵的香味组分及其含量,并以花香成分为基础进行聚类分析,区分香味特征各异的品种群体,为芳香蝴蝶兰种质资源梳理、特定香味品种选育及产品加工生产等进一步研究与开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

供试材料:F1(*Phalaenopsis* ‘Nobby’ s Doctor’ × *Phalaenopsis* ‘Yaphou Yellow Story’)、F2(*Phalaenopsis* ‘Samela Blue’ × *Phalaenopsis speciosa*)、F3(*Phalaenopsis speciosa* ‘Jiaho Spot SM/TOGA 82P’)、F4(*Phalaenopsis* ‘Super Zebra’)、F5(GS 032)、F6(*Phalaenopsis speciosa* ‘Purple Pixie’)、F7(*Phalaenopsis speciosa* × sib)、F8(*Phalaenopsis* ‘Yaphon Christmas Red Spots’) 8个香花蝴蝶兰新型杂交品种,均取自福建农林大学森林兰苑温室大棚,期间正常水肥管理。各挑选3株盛花期且长势一致的盆栽苗,于测试前1 d搬至样品前处理室,以适应环境条件。于12月22—30日10:00—14:00期间摘取盛开7 d的鲜花进行测试,每个样品取3个生物学重复样本。

仪器:手动SPME进样器和50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头(美国Supelco公司);Agilent 7890B GC-5977B MS和Agilent的HP-INNOWAX(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm)色谱柱。

1.2 方法

1.2.1 HS-SPME萃取 取样前将固相微萃取头在气相色谱进样口老化30 min,老化温度250 $^{\circ}\text{C}$ 。摘取盛花时期蝴蝶兰花朵样品,整朵撕开,置于垫片密封的25 mL萃取瓶中,加入1 μL 含0.1%癸酸乙酯的甲醇(色谱级)溶液为内标,将老化好的萃取头插入样品瓶顶空部分,萃取纤维位于样品上方1 cm处,固定手柄,顶空瓶置于35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下吸附30 min。

1.2.2 GC-MS分析 吸附完成后将固相微萃取头抽回,插入气相色谱-质谱联用仪进样口,250 $^{\circ}\text{C}$

下解析5 min,启动仪器采集数据。色谱条件:采用HP-INNOWAX色谱柱,长60 m、内径0.25 mm、液膜厚0.25 μm ;载气为高纯度氦气(99.99%),不分流模式进样,隔垫吹扫流速为3 mL · min⁻¹,柱流速为1 mL · min⁻¹。程序升温:进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$,柱温起始温度45 $^{\circ}\text{C}$ 下保持1 min,先以5 $^{\circ}\text{C}$ · min⁻¹升至200 $^{\circ}\text{C}$,再以15 $^{\circ}\text{C}$ · min⁻¹升至250 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件:传输线接口温度维持在250 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度230 $^{\circ}\text{C}$,四级杆温度150 $^{\circ}\text{C}$,电离方式为EI,电子能量参数70 eV,发射电流为200 μA 。以扫描方式获得质谱数据,检测质量扫描范围(m/z)为20~500 amu,溶剂延迟时间为3 min。

1.2.3 数据分析 香味组分经气相色谱分离形成各自的总离子流色谱图,解析各个峰所对应的质谱图。将所得到的质谱数据与计算机谱库NIST17标准库检索及资料进行比对,按相似度最高原则结合网站对应物质所列举的相关文献确定样品中的挥发性化学成分。根据离子流峰面积归一化法,计算各组分在总挥发物中的相对含量且进行定量分析。每个样品分别进行3次平行重复试验。利用软件Excel 2010整理汇总数据且制作图表,主成分分析、聚类分析及偏最小二乘分析运用软件Origin Pro 2019b、Metabo Analyst 5.0进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同蝴蝶兰品种花香成分及其相对含量

8个蝴蝶兰品种中共检测出96种挥发性成分(表1),虽然不可避免地在不同品种中测出相同的香气物质,但每个品种都因挥发性成分不同比例的相互组合而表现出独特的花香特征。成分乙酸甲酯在各品种中均被检测出来,相对含量差异很大。乙酸甲酯物质在F1、F5和F7中含量较高,分别为24.69%、14.07%和17.05%,推测物质乙酸甲酯为3个品种的主要香气成分之一。

萜烯类组分的相对含量在蝴蝶兰中具有重要地位,不同品种的蝴蝶兰所检测出的萜烯类物质具有较大差异。6个蝴蝶兰品种F1、F2、F3、F4、F6和F7中均检测出倍半萜物质 α -香柑油烯,物质释放均为高表达,推测它是6个品种的主要香气之一。 β -红没药烯在F3和F7中较高表达,含量可达12.99%和11.4%,推测 β -红没药烯是F3和F7的

表 1 8 个香花蝴蝶兰新型杂交品种盛花期主要挥发性成分及其相对含量

Table 1 Main volatile components of eight varieties of *Phalaenopsis* in their full blooming period and their relative contents

化合物名称 Compound name		匹配度 Matching	相对含量 Relative content (%)							
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
单萜类 Monoterpenes										
1	甲 基-5-(1-甲 基 乙 基)-双 [3.1.0]-2-己烯 5-isopropyl-1-2-methylbicyclo [3.1.0]hex-2-ene	94	1.68±0.24	—	—	—	—	—	—	—
2	(+)-α-蒎烯 (+)-α-pinene	97	—	0.89±0.18	—	—	—	—	—	—
3	(-)-α-蒎烯 (-)-α-pinene	96	—	—	—	—	—	—	—	4.01±0.80
4	(-)-β-蒎烯 (-)-β-pinene	94	—	—	—	—	—	—	—	1.35±0.09
5	β-蒎烯 β-pinene	94	0.75±0.07	0.2±0.04	—	—	—	—	—	—
6	桉烯 Sabinene	96	6.78±1.22	—	—	—	—	—	—	13.24±0.06
7	月桂烯 Myrcene	96	0.2±0.03	0.2±0.07	—	—	0.23±0.01	—	—	1.19±0.09
8	松油烯 Terpinene	84	0.39±0	—	—	—	—	—	—	1.09±0.1
9	(+)-柠檬烯 (+)-dipentene	99	—	0.27±0.08	—	—	—	—	—	1.72±0.11
10	桉叶油醇 1,8-cineole	97	2.01±0.49	6.68±2.17	—	—	—	—	—	23.65±0.7
11	γ-松油烯 γ-terpinene	97	0.80±0.16	—	—	—	—	—	—	1.48±0.09
12	罗勒烯 Ocimene	97	—	0.25±0.12	—	—	4.06±0.98	—	—	—
13	罗勒烯异构体混合物 Ocimene mixture of isomers	97	—	—	—	—	0.56±0.07	—	—	—
14	萜品油烯 Terpinolene	96	—	—	—	—	—	—	—	0.72±0.11
15	别罗勒烯 neo-alloocimene , stab	97	—	—	—	—	1.52±0.41	—	—	—
16	芳樟醇 Linalool	97	8.52±2.98	3.63±2.55	—	8.94±0.39	16.81±3.98	—	—	4.96±2.02
17	萜烯醇 Terpinen-4-ol	96	—	—	—	—	—	—	—	0.19±0.03
18	(6 <i>E</i>)-2,6-二甲基辛-2,6-二烯 (6 <i>E</i>)-2,6-dimethylocta-2,6-diene	97	1.67±0.53	—	—	—	1.18±0.21	—	—	—
19	α-松油醇 α-terpineol	90	—	—	—	—	—	—	—	1.03±0.09
20	香茅醇 Citronellol	98	2.03±0.77	—	—	1.15±0.14	0.57±0.2	—	—	—
21	(3 <i>E</i>)-4,8-二甲基壬-1,3,7-三烯 (3 <i>E</i>)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene	91	—	—	0.1±0.01	—	6.4±1.06	—	—	1.34±0.22
22	(3 <i>E</i> , 5 <i>E</i>)-2,6-二甲基-1,3,5, 7-辛四烯 (3 <i>E</i> , 5 <i>E</i>)-2,6-dimethyl-1,3, 5,7-octatetracene	96	—	—	—	—	0.39±0.08	—	—	—
倍半萜 Sesquiterpenes										
23	(-)-α-葑澄茄油 (-)-α-cubebene	98	—	0.24±0.01	—	—	—	—	—	0.16±0.05
24	榄香烯 Elemen	98	—	1.07±0.08	—	—	—	—	—	0.20±0.06
25	[1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>S</i> , (+)]-1,3- 二甲基-8-(1-甲基乙基) 三环 [4.4.0.0(2,7)]癸-3-烯 [1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>S</i> , (+)]-1,3- dimethyl-8-(1-Methylethyl) Tricyclo [4.4.0.0(2,7)] deca- 3-ene	99	—	0.93±0.07	—	—	—	—	—	0.79±0.22
26	α-古巴烯 α-copaene	99	—	0.14±0.03	—	—	—	—	—	2.34±0.63
27	(+)-7-表-倍半萜烯 (+)-7- <i>epi</i> -sesquithujene	93	—	—	0.36±0.08	—	—	0.23±0.02	0.54±0.05	—
28	β-古巴烯 β-copaene	95	—	0.37±0	—	—	—	—	—	—
29	α-香柑油烯 α-bergamotene	99	18.71±4.89	28.82±4.79	58.73±1.24	28.12±0.19	—	67.18±1.17	48.94±4.28	—
30	α-檀香烯 Santalene	99	—	—	0.13±0.03	—	—	0.09±0.01	—	—
31	β-榄香烯 β-elemene	91	—	1.87±0.11	—	—	—	—	—	—
32	γ-榄香烯 γ-elemene	99	—	4.56±0.37	—	—	—	—	—	1.16±0.38
33	β-倍半水芹烯 β-sesquiphellandrene	95	—	—	0.49±0.07	—	—	—	0.23±0.06	—
34	1-(1,5-二甲基-4-己烯)-4-亚 甲基双环 [3.1.0] 己烷 Sesquisabinene	96	—	—	—	—	—	0.5±0.05	—	—

续表 1

化合物名称 Compound name	匹配度 Matching	相对含量 Relative content (%)							
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
35 (1S-外)-2-甲基-3-亚甲基-2-(4-甲基-3-戊烯基)双环[2.2.1]庚烷 3-methyl-2-methylidene-3-(4-methylpent-3-enyl)bicyclo [2.2.1]heptane	97	—	—	—	—	—	0.08±0.01	—	—
36 反式-β-金合欢烯 trans-β-farnesene	95	—	—	—	—	—	—	2.03±0.04	—
37 1-(1,5-dimethylhexyl)-4-methyl-benzene	90	—	—	0.12±0.07	—	—	0.16±0.01	—	—
38 α-律草烯 α-caryophyllene	92	—	—	—	—	—	—	—	0.34±0.09
39 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1-methyl-6-methylene-4-(1-methylethyl)naphthalene	98	—	0.87±0.31	—	—	—	—	—	—
40 (E)-β-金合欢烯 (E)-β-farnesene	96	—	—	—	0.69±0.10	—	—	—	—
41 β-香柑油烯 β-bergamotene	97	—	2.38±0.26	5.62±0.82	—	—	5.44±1.79	2.45±0.26	—
42 大根香叶烯 D Germacrene D	95	—	—	—	—	—	—	—	1.34±0.33
43 (+)-白菖蒲萜 (+)-calarene	97	—	6.58±1.10	—	—	—	—	—	—
44 α-姜烯 α-zingiberene	94	—	—	0.35±0.12	—	—	0.31±0.02	—	—
45 β-红没药烯 β-bisabolene	98	—	—	12.99±1.06	—	—	2.06±0.11	11.4±1.4	—
46 α-法呢烯 α-farnesene	98	0.44±0.07	—	0.67±0.05	0.74±0.08	—	0.68±0.05	0.67±0.09	0.48±0.02
47 (+)-瓦伦亚烯 (+)-valencene	93	—	0.43±0.10	—	—	—	—	—	—
48 (E)-γ-没药烯 (E)-γ-bisabolene	98	—	—	0.1±0.03	—	—	0.08±0.04	—	—
49 1-甲基-4-[(2E)-6-甲基-2,5-庚二烯-2-基]环己烯 1-methyl-4-[(2E)-6-Methyl-2,5-heptadien-2-yl]cyclohexene	95	—	—	—	—	—	1.88±0.83	—	—
50 δ-杜松烯 (+)-δ-cadinene	96	—	2.34±0.99	—	—	—	—	—	1.20±0.53
51 γ-杜松烯 (+)-γ-cadinene	98	—	1.05±0.94	—	—	—	—	—	—
52 α-雪松烯 α-himachalene	94	—	1.05±0.07	—	—	—	—	—	—
53 α-姜黄烯 α-curcumins	99	0.61±0.12	—	0.58±0.02	—	—	0.76±0.04	1.97±0.77	—
54 α-芹子烯 α-selinene	98	—	1.53±0.12	—	—	—	—	—	—
55 α-衣兰油烯 α-muurolene	98	—	0.88±0.02	—	—	—	—	—	0.31±0.07
56 黑蚊素 Dendrolasin	64	—	—	—	—	—	—	0.33±0.20	—
57 1-乙 烯 基-1-甲 基-4-丙-2-亚基-2-丙-1-烯-2-基环己烷 1-ethenyl-1-methyl-4-propan-2-ylidene-2-prop-1-en-2-ylcyclohexane	97	—	0.35±0.04	—	—	—	—	—	—
58 (+/-)-trans-calamanene	95	—	—	—	—	—	—	—	0.73±0.24
59 (1E,5E)-1,5-二甲基-8-(丙-2-亚基)环癸-1,5-二烯 (1E, 5E)-1, 5-dimethyl-8-(propan-2-ylidene)cyclodeca-1,5-diene	99	—	2.82±0.29	—	—	—	—	—	—
60 α-二去氢菖蒲烯 α-calacorene	91	—	0.32±0.04	—	—	—	—	—	—
61 3,7,11-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇 3, 7, 11-trimethyl-1, 6, 10-dodecatrien-3-ol	96	—	—	0.14±0.06	—	—	—	—	—
62 反式-橙花叔醇 trans-nerolidol	91	—	—	—	—	—	0.34±0.15	—	—
63 (3E,7E)-4,8,12-三甲基十三-1,3,7,11-四烯 (3E,7E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene	68	0.47±0.14	—	0.14±0.03	—	—	0.17±0.02	—	—
双萜类 Diterpenes									
64 贝壳杉-16-烯 Kaur-16-ene	98	—	—	0.17±0.08	—	—	—	—	—
醛类 Aldehydes									
65 正己醛 Hexanal	90	—	—	—	—	0.32±0.07	—	—	—

续表 1

化合物名称 Compound name		匹配度 Matching	相对含量 Relative content (%)							
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
酯类 Esters										
66	乙酸甲酯 Methyl acetate	83	24.69±4.15	7.02±0.66	8.89±1.64	4.26±0.49	14.07±1.48	8.02±0.87	17.05±1.62	5.02±0.01
67	乙酸乙酯 Ethyl acetate	92	1.94±0.05	—	—	—	—	—	—	—
68	丁酸甲酯 Methyl butyrate	91	0.9±0.18	—	—	—	—	—	—	—
69	乙酸丁酯 Butyl acetate	83	—	—	—	—	0.93±0.10	—	—	—
70	己酸甲酯 Methyl hexoate	96	1.56±0.47	—	—	—	—	—	—	—
71	丁酸丁酯 Butyl butyrate	80	—	—	—	—	—	—	—	0.28±0.01
72	乙酸己酯 Hexyl acetate	90	—	—	—	—	2.33±0.44	—	—	—
73	己-4-烯-1-醇乙酸酯 4-hexen-1-ol, acetate	90	—	—	—	—	0.56±0.23	—	—	—
74	癸酸乙酯 Ethyl caprate	99	5.56±1.01	4.25±0.53	2.08±0.32	26.14±0.76	10.51±0.42	3.53±0.43	1.88±0.14	7.36±0.82
75	水杨酸甲酯 Methyl salicylate	97	—	—	—	—	0.72±0.10	—	—	—
76	月桂酸甲酯 Methyl laurate	97	—	—	—	—	—	0.13±0.09	—	—
77	苯甲酸苄酯 Benzyl benzoate	97	—	—	—	—	—	—	1.09±0.40	—
78	惕各酸苄酯 Benzyl tiglate	93	—	—	0.28±0.08	—	—	0.15±0.03	—	—
79	顺式-3-己烯醇苯甲酸酯 cis-3-hexenyl benzoate	83	—	—	0.33±0.05	—	—	—	—	—
醇类 Alcohols										
80	甲醇 Methanol	9	10.85±1.26	3.29±0.70	3.85±1.77	19.7±1.85	5.07±1.64	2.38±1.53	5.21±0.58	8.07±0.94
81	1-己醇 1-hexanol	80	0.32±0.14	0.21±0.05	0.09±0.06	0.77±0.01	0.91±0.13	—	—	0.24±0.04
82	反-3-己烯-1-醇 trans-3-hexen-1-ol	95	0.57±0.26	—	0.06±0.01	0.43±0.27	0.31±0.08	—	0.23±0.065	0.29±0.12
83	3-己烯-1-醇 3-Hexen-1-ol	97	—	1.64±0.01	—	—	—	0.13±0.02	—	—
84	苯甲醇 Benzyl alcohol	91	—	—	—	—	—	—	0.14±0.03	—
85	苯乙醇 Phenethyl alcohol	87	—	—	0.08	—	—	0.14±0.02	0.5±0.22	—
86	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-rel-1, 4-二溴-2, 3- 丁二醇 (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-rel-1, 4-dibromo-2, 3-butanediol	95	—	—	—	—	0.03±0.10	—	—	—
酮类 Ketones										
87	甲基庚烯酮 Methyl heptenone	96	—	—	0.04±0.02	—	—	0.03±0.01	0.11±0.02	—
88	7,8-二氢紫罗兰酮 7,8-dihydro- α -ionone	99	—	—	—	—	—	0.26±0.07	—	—
89	二氢- β -紫罗兰酮 Dihydro- β -ionone	99	—	—	—	—	—	0.2±0.05	—	—
90	香叶基丙酮 Geranyl acetone	93	—	0.09±0.03	0.14±0.05	—	—	0.72±0.10	0.36±0.13	—
醚类 Ethers										
91	苄甲醚 Benzyl methyl ether	96	—	—	—	—	—	0.69±0.19	—	—
92	4-甲基苯甲醚 4-methylanisole	97	—	0.68±0.10	1.61±0.39	—	—	1.35±0.46	1.36±0.06	—
93	4-烯丙基苯甲醚 4-allylanisole	94	—	—	—	—	—	0.18±0.06	0.27±0.04	—
酚类 Phenols										
94	丁香酚 Engenol	94	—	0.23±0.11	—	—	—	0.11±0.04	0.27±0.08	—
芳香族化合物 Aromatics										
95	邻位伞花烃 <i>o</i> -cymene	97	—	—	—	—	—	—	—	0.37±0.02
96	3,4-二甲氧基甲苯 3,4-dimethoxytoluene	93	—	0.52±0.12	—	—	—	0.57±0.10	—	—

特征香气成分之一。在 F2、F3、F6 和 F7 中均检测到 β -香柑油烯,在 F3 和 F6 中其相对含量均高于 5%,推测此物质是 4 个品种中的花香主要香气之一。单萜类物质芳樟醇是 F1、F2、F4、F5 和 F8 的共有成分,在 F5 中相对含量最高,为 16.81%,在

F4 和 F1 中相对含量较高,分别为 8.94% 和 8.52%,推测它是这 3 个品种的主要香气之一。桉叶油醇是 F1、F2 和 F8 的共有成分,在 F8 中的相对含量检测最高为 23.65%,在 F2 中检测次之为 6.68%,在 F1 中仅检测出 2.01% 的相对含量,其余

5 个品种中未检测到,推测桉叶油醇是 F2 和 F8 的主要香气之一。桉烯在 F8 和 F1 中较高表达,相对含量分别为 13.24% 和 6.78%,推测桉烯是构成 F1 和 F8 花香的主成分之一。在 F5 中检测到 (3E)-4, 8-二甲基壬-1, 3, 7-三烯, 相对含量为 6.4%, 判定其为 F5 的香气主成分之一。此外, 在 F2 中还检测到特有成分倍半萜物质 (+)-白菖油萜, 在 F8 中检测到特有成分单萜类物质 (-)- α -蒎烯和 (-)- β -蒎烯, 在 F5 中检测到有单萜物质罗勒烯及别罗勒烯, 在 F7 中检测到有反式- β -金合欢烯, F2 中较多杜松烯及其相关产物。

6 个蝴蝶兰品种中, F1、F2、F3、F4、F5 和 F8 中均检测出微量 1-己醇, F1、F3、F4、F5、F7 和 F8 中检测出微量反-3-己烯-1-醇, 3-己烯-1-醇在 F2 和 F4 中相对含量为 1.64% 和 0.13%, 推测 3-己烯-1-醇是 F2 中醇类组分之一。

2.2 不同蝴蝶兰品种挥发性成分的组分比较

从 8 个香花蝴蝶兰新型杂交品种盛花时期花朵 GC-MS 总离子流色谱图中, 分析得到萜烯类、醛类、酯类、醇类、酮类、醚类、酚类和芳香族化合物 8 类物质。在不同蝴蝶兰品种中, 主要挥发性物质在数量和相对含量上具有较大差异。8 个蝴蝶兰种质资源中检测鉴定出的物质数量依次为 22、35、26、10、20、31、21 和 31, 其总相对含量依次为 91.45%、88.65%、98.14%、90.94%、67.48%、98.55%、97.03%、86.65%, 萜烯类数量相对其他组分较高, 分别为 14、26、15、5、9、15、9、24 (表 2)。不同蝴蝶兰的花香组成存有差异, 每种植物的挥发性成分与含量都不相同, 本研究中各品种的萜烯类物质种类数量占有最多且相对含量最高, 是蝴蝶兰花朵中的主要挥发性成分。

扣除标品物质后, 8 个蝴蝶兰品种中均检测出萜烯类物质、酯类物质和醇类物质, 各组分间相对含量差异较大。萜烯类物质作为蝴蝶兰花香的主要类别, F3 和 F6 中相对含量较高, 分别为 80.69% 和 79.96%; F2、F7、F8 中, 相对含量分别为 70.72%、68.56%、65.02%; F1、F4、F5 中, 相对含量较低, 分别为 45.06%、39.64%、31.72%。醇类物质在各品种中检测相对含量均较低, F2、F5 和 F4 中相对含量分别为 1.85%、1.25% 和 1.2%, F3 中仅占 0.23%。F1 中的酯类物质检测相对含量最高, 为 29.09%; F5 和 F7 次之, 分别为 18.61% 和 18.14%; F4 中的相对含量最少, 为 4.26%。F2、

F3、F6 和 F7 中均检测出酮类物质和醚类物质, F2、F6 和 F7 中检测到有酚类物质, F2、F6 和 F8 中检测到有芳香族化合物, F2 和 F6 中除醛类物质的其他组分外均检测出有效物质, F5 中除共有组分外仅检测到有醛类物质 (图 1)。

2.3 不同蝴蝶兰品种花香主成分聚类分析

不同品种的 96 种物质的主成分分析表明, 品种与挥发性成分具有关联, 并能在一定程度上确定挥发物中的致香成分。桉叶油醇、月桂烯等物质对 PC1 为正影响, α -香柑油烯、 β -香柑油烯、香叶基丙酮、4-甲基苯甲醚等对 PC1 为负影响; β -古巴烯、榄香烯、(+)-白菖油萜、苯乙醇等物质对 PC2 为正影响, 芳樟醇、香茅醇等对 PC2 为负影响。

据此, 根据主成分的不同 8 个蝴蝶兰品种被划分在 3 个象限中, F2 中挥发性成分种类和数量均最多, 萜烯类物质主要是桉叶油醇、 α -香柑油烯、芳樟醇、(+)-白菖油萜; F1、F4、F5 和 F8 分为一组, 不含酮类、醚类、酚类物质, 挥发性成分种类最少, 萜烯类物质主要是芳樟醇; F3、F6 和 F7 分为一组, α -香柑油烯含量最高, 还包含香叶基丙酮、4-甲基苯甲醚等其他挥发性成分种类 (图 2:A)。以 8 个蝴蝶兰品种的 96 种挥发性成分为基础, 用数字 0 和 1 表示某一挥发性物质成分的有无, 含有此种挥发性成分的数据赋值为 1, 没有或未检测即赋值为 0 (林榕燕等, 2016), 利用软件 OriginPro 2019b 聚类功能将 8 个蝴蝶兰品种分为 3 类, 即 I、II、III 类 (图 2:B)。遗传距离在 6.39 附近第一次分支, I 类中仅包含 F2 1 个品种; 在 5.87 附近第二次分支, II 类由 F1、F4、F5 和 F8 组成; III 类由 F3、F6 和 F7 组成。遗传距离越小, 品种间的遗传关系越近。聚类分析与主成分分析一致将 8 个品种划分为同样的 3 大类, 挥发性物质成分可能作为潜在特征标记物质区分不同品种群体, 鉴别蝴蝶兰品种的亲缘关系, 梳理蝴蝶兰芳香种质资源。

2.4 不同蝴蝶兰品种主要差异物质及其品质分析

对鉴定出的 96 种物质进行偏最小二乘 (PLS-DA) 分析, 对 8 个蝴蝶兰品种可以依据绝对回归系数的加权值筛选出的主要差异物质分离开来。将筛选出的加权系数较大的前 15 个花香物质列为主要差异物质, 对其气味类型及其品质进行确定。加权系数大于 20 的物质有 5 个, 加权系数大于 10

表 2 8 个香花蝴蝶兰新型杂交品种挥发性成分的主要类别
Table 2 Types of volatile components of eight varieties of *Phalaenopsis*

组分 Category	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
萜烯类 Terpenes	14	26	15	5	9	15	9	24
醛类 Aldehydes	—	—	—	—	1	—	—	—
酯类 Esters	5	2	4	2	6	4	3	3
醇类 Alcohols	3	3	4	3	4	3	4	3
酮类 Ketones	—	1	2	—	—	4	2	—
醚类 Ethers	—	1	1	—	—	3	2	—
酚类 Phenols	—	1	—	—	—	1	1	—
芳香族化合物 Aromatics	—	1	—	—	—	1	—	1
总相对含量 Total relative content (%)	91.45	88.65	98.14	90.94	67.48	98.55	97.03	86.65

注：— 代表未检测出该类物质。下同。
Note: — means that the substance is not detected. The same below.

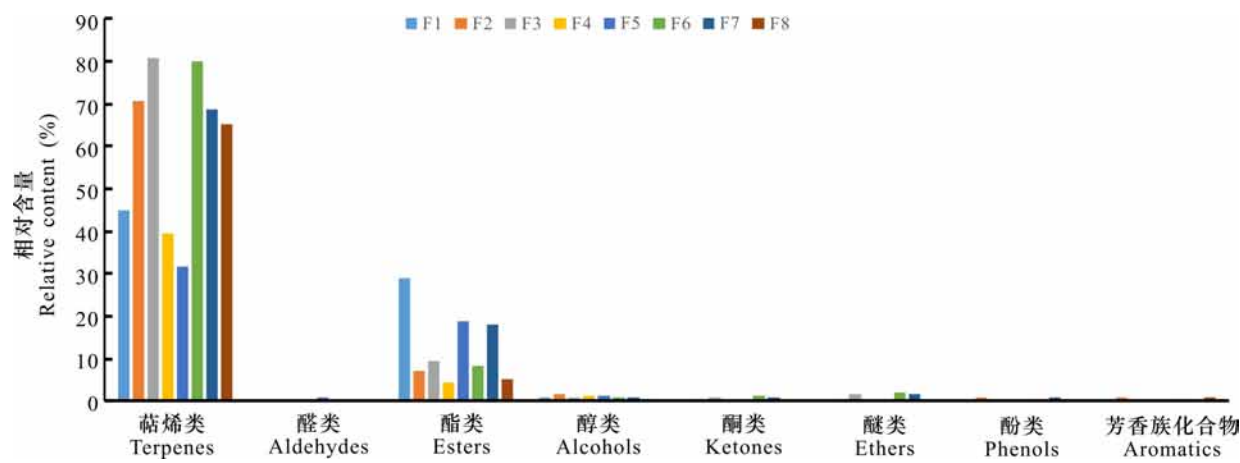


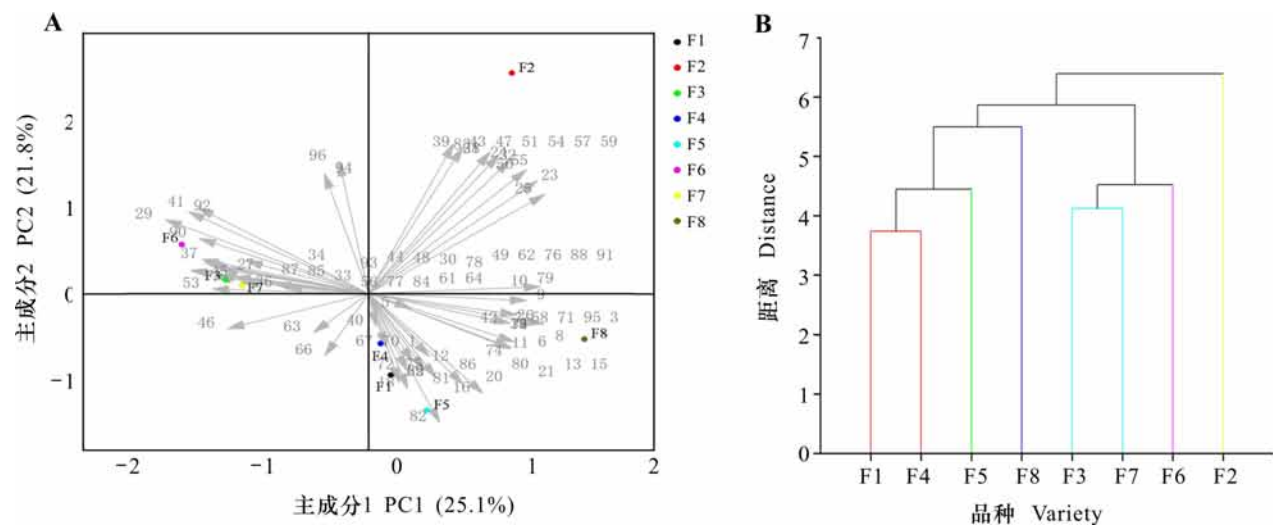
图 1 8 个香花蝴蝶兰新型杂交品种各物质组分的相对含量
Fig. 1 Relative contents of substance components of eight varieties of *Phalaenopsis*

的物质有 10 个。其中,α-香柑油烯的加权和值最高,为 68.725。α-香柑油烯作为最主要差异物质,贡献率最高,在 F3、F6 和 F7 中的表达量较高;β-红没药烯、4-甲基苯甲醚、α-姜黄烯等其他 4 个差异物质表达量在 3 个品种中表达均较高,整体呈现木质型气味类型。F1、F4、F5、F8 和 F2 中的花香物质成分气味较为繁杂,有薄荷型、木香型、清香型和果香型之分,按差异物质芳樟醇贡献率能够将 5 个品种分为两类,即 F1、F4、F5 和 F8 中具有玫瑰花香的物质释放较多,F2 中玫瑰花香的芳樟醇成分表达较少(图 3)。主要差异物质按香气

类型可分为木香型、花香型、发酵香型、薄荷香型、清香香型、果香型和草药香型 7 种,其中有 6 种物质呈现木香型类型,气味品质更具层次变化(表 3)。香气物质可以依据香气品质类型,按贡献率判断关系,区分香味特征各异的各个品系。

3 讨论与结论

花香是植物的天然产物,即使检测出相同的香气成分,每一个品种也可表现出独特的花香特征。与前人研究结果一致,8 个蝴蝶兰品种盛花期



A. 主成分分析; B. 聚类分析。
A. Principal component analysis; B. Cluster analysis.

图 2 主成分分析和聚类分析
Fig. 2 Principal component analysis and cluster analysis

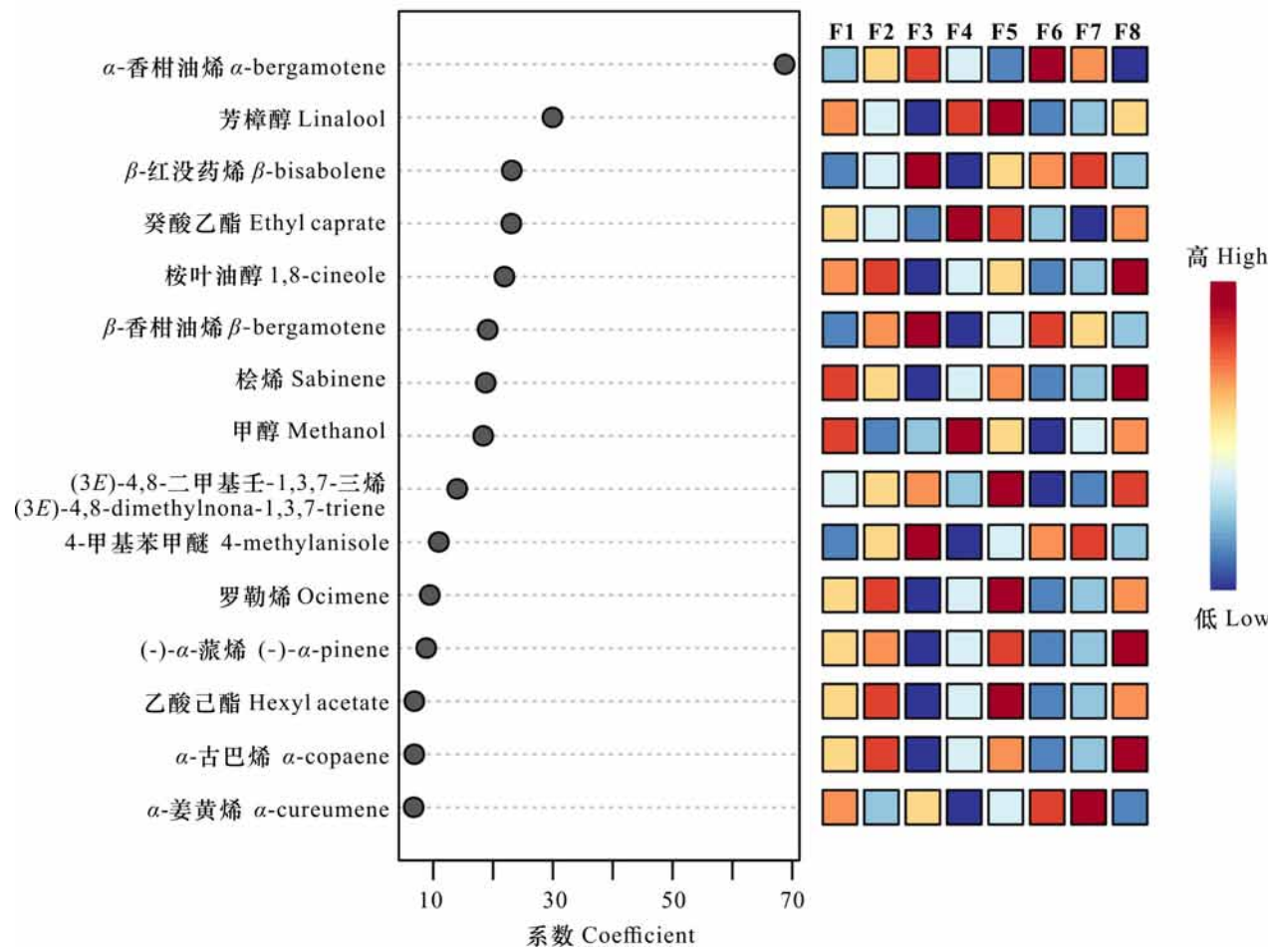


图 3 主要挥发性成分的 PLS-DA 系数
Fig. 3 PLS-DA coefficients of main volatile components

表 3 不同蝴蝶兰品种盛花期的主要差异
物质及其香气品质

Table 3 Main difference substances and aroma quality
of different *Phalaenopsis* varieties in blooming period

化合物名称 Compound name	加权系数 Weighting coefficient	气味品质 Aroma quality	香气类型 Odor type
α -香柑油烯 α -bergamotene	68.725	木质暖茶味 Woody warm tea	木香型 Woody
芳樟醇 Linalool	29.924	玫瑰花香 Rose-like	花香型 Floral
β -没药烯 β -bisabolene	23.131	香脂木香 Balsamic woody	木香型 Woody
癸酸乙酯 Ethyl caprate	23.051	酒味、果味 Alcoholic and fruity	发酵香型 Fermented
桉叶油醇 1,8-cineole	21.902	薄荷味 Minty-like	薄荷香型 Minty
β -香柑油烯 β -bergamotene	19.115		
桉烯 Sabinene	18.768	松树香气 Pine-like	木香型 Woody
甲醇 Methanol	18.359	酒精味 Ethyl alcohol-like	
(3E)-4,8-二甲基壬-1, 3,7-三烯 (3E)-4,8-dimethylnona- 1,3,7-triene	14.015		
4-甲基苯甲醚 4-methylanisole	10.940	坚果味 Nutty-like	木香型 Woody
罗勒烯 Ocimene	9.439	清香 Green	清香型 Green
(-)- α -蒎烯 (-)- α -pinene	8.835	松树香气 Pine-like	木香型 Woody
乙酸己酯 Hexyl acetate	6.844	果香 Fruity	果香型 Fruity
α -古巴烯 α -copaene	6.833	辛辣蜂蜜 Spicy honey-like	木香型 Woody
α -姜黄烯 α -curcumene	6.737	草药味 Herbal	草药香型 Herbal

花朵 96 种挥发性物质中,萜烯类物质的数量及相对含量较多,是蝴蝶兰挥发性物质的主要组分 (Hsiao et al., 2008)。花香香味的形成依靠各种挥发物的相互作用,其香型主要由拥有较高气味值的挥发物决定。肖文芳等(2021)发现,蝴蝶兰 8 个品种的挥发性成分、相对含量和气味品质差异较大,已有报道的芳樟醇、沉香醇、香叶醇等挥发性成分除外,本研究中新检测出桉叶油醇和 α -香柑油烯。芳樟醇存在于多种植物的挥发油中,在各种香型的香精配方中占有重要地位。本研究发

现,在所测定的 8 个蝴蝶兰品种中,有 4 个蝴蝶兰品种的花香香味是由带有玫瑰花香的芳樟醇决定的,包括 F1、F4、F5 和 F8;F3、F6 和 F7 中木质型芳香由 α -香柑油烯决定;F2 为复合型花香,由桉叶油醇、 α -香柑油烯、芳樟醇等物质共同提供。深度挖掘不同香型的香花品种,将花香成分进行合理的归类,形成物种特异性,为进一步有效开发利用花香物质、培育具有不同香味的蝴蝶兰新品种甚至是兰科蝴蝶兰属的新品种提供新的思路。

花香代谢产物作为生物体表型的重要性状之一,其形成具有多样性,对芳香植物的相关研究近年来已成为热门领域(孔滢等,2012)。花香成分繁杂多变,遗传机理复杂,植株个体受到亲本遗传的影响,选育的后代出现性状分离,可能是引起后代花香形成具有差异的主要原因之一。此外,香气变化还受到多种因素的影响,如细胞结构、内源物质的量、物质挥发效率以及物质释放方式等。细胞结构及细胞内含物影响花香物质累积与释放,在释放到细胞外前,花香物质以各种形式存在于细胞内,内源物质是其挥发的基础(EL-Sharkawy et al., 2005)。不同类型的物质释放到细胞外的方式有所不同,花香物质释放到细胞外的转运蛋白及相关酶发挥的作用机理还需要进一步探究。原生蝴蝶兰种质丰富,接近一半的原生种均具有香气特征,传统杂交技术制约香花育种进程。随着花香分子生物学的研究进展,分子育种已成为改良植物花香的重要途径(Jadaun et al., 2017)。通过对植物花香化合物的代谢产物、主要代谢途径及合成关键酶和基因的研究,可更直观有效地了解生物学过程及其形成机理,通过导入外源基因或阻断其相关代谢途径来进行花香遗传改良,从而打破芳香植物育种的种种限制,为解释蝴蝶兰不同品种花香的多样性,理解蝴蝶兰花香物质合成及定向育种目标的高效实现奠定基础。

参考文献:

ASHWORTH V, CLEGG MT, KOBAYASHI MC, 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes [J]. *J Hered*, 94(5): 407-415.

AWANO K, HONDA T, OGAWA T, et al., 2015. Volatile components of *Phalaenopsis schilleriana* Rehb. f [J]. *Flavour*

- Frag J, 12(5): 341–344.
- CHEN JY, ZHANG QX, LIU WX, et al., 1995. Studies on breeding for cold hardiness and regional tests of hardy Mei cultivars [J]. J Beijing For Univ, 17(S1): 42–45. [陈俊愉, 张启翔, 刘晚霞, 等, 1995. 梅花抗寒育种及区域试验的研究 [J]. 北京林业大学学报, 17(S1): 42–45.]
- DOBSON HEM, 1994. Floral volatiles in insects biology [J]. Insect-plant Interact, 5: 47–81.
- EL-SHARKAWY I, MANRIQUEZ D, FLORES FB, et al., 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity [J]. Plant Mol Biol, 59(2): 345–362.
- FAN ZQ, LI JY, LI XL, et al., 2014. Analysis on the aroma components of different floral organs of aromatic *Camellia* ‘Kramer’s supreme’ based on HS-SPME/GC-MS [J]. Bull Bot Res, 34(1): 136–142. [范正琪, 李纪元, 李辛雷, 等, 2014. 基于 HS-SPME/GC-MS 分析山茶品种‘克瑞墨大牡丹’花器官香气成分 [J]. 植物研究, 34(1): 136–142.]
- HSIAO YY, TSAI WC, JENG MF, et al., 2008. Novel homodimeric geranyl diphosphate synthase from the orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD(X)2-4D motif [J]. Plant J, 55(5): 719–733.
- HSIAO YY, TSAI WC, KUOH CS, et al., 2006. Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce monoterpene biosynthesis pathway [J]. J Plant Biol, 6(1): 1–14.
- JADUAN JS, SANGWAN NS, NARNOLIYA LK, et al., 2017. Over-expression of DXS gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented *Geranium* and *Withania somnifera*: Active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis [J]. Physiol Plant, 159(4): 381–400.
- JETTE T, KNUDS E, ROGER E, et al., 2006. Diversity and distribution of floral scent [J]. Bot Rev, 72(1): 1–120.
- KONG Y, SUN M, PAN HT, 2012. Advances in metabolism and regulation of floral scent [J]. J Beijing For Univ, 34(2): 146–154. [孔滢, 孙明, 潘会堂, 2012. 花香代谢与调控研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 34(2): 146–154.]
- LI JH, YAN HJ, YANG JH, et al., 2018. Analysis of volatile components from *Rosa odorata* complex by SPME-GC/MS [J]. SW Chin J Agric Sci, 31(3): 587–591. [李晋华, 晏慧君, 杨锦红, 等, 2018. 香水月季复合群(*Rosa odorata* Complex)花香成分分析 [J]. 西南农业学报, 31(3): 587–591.]
- LIN RY, ZHONG HQ, HUANG ML, et al., 2016. Aromatics in flowers of *Freesia hybrida* [J]. Fujian J Agric Sci, 31(11): 1216–1220. [林榕燕, 钟淮钦, 黄敏玲, 等, 2016. 小苍兰品种花香成分分析 [J]. 福建农业学报, 31(11): 1216–1220.]
- NOGUEIRA P, BITTRICH V, SHEPHERD GJ, et al., 2001. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species(Guttiferae) [J]. Phytochemistry, 56(5): 443–452.
- PENG HM, 2009. Study on the volatile, characteristic floral fragrance components of Chinese *Cymbidium* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [彭红明, 2009. 中国兰花挥发及特征花香成分研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院.]
- SHULAEV V, SILVERMAN P, RASKIN I, 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance [J]. Nature, 385: 718–721.
- XIAO WF, LI Z, CHEN HM, et al., 2020. Determination of volatile components in flowers of *Phalaenopsis violacea* [J]. Chin J Trop Agric, 40(4): 82–87. [肖文芳, 李佐, 陈和明, 等, 2020. 大叶蝴蝶兰花朵挥发性成分测定 [J]. 热带农业科学, 40(4): 82–87.]
- XIAO WF, LI Z, CHEN HM, et al., 2021. Analysis of volatile components in flowers of four different *Phalaenopsis* *germplasm* resources by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chin Agric Univ, 26(3): 38–52. [肖文芳, 李佐, 陈和明, 等, 2021. 基于 HS-SPME-GC-MS 的 4 种不同蝴蝶兰种质资源花朵挥发性成分比较分析 [J]. 中国农业大学学报, 26(3): 38–52.]
- YANG HJ, 2011. Analysis on the volatile components of Chinese orchids [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University. [杨慧君, 2011. 中国兰花挥发性成分分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学.]
- YANG SZ, FAN YP, 2008. Analysis on the volatile components in two cultivars of *Phalaenopsis* [J]. J S Chin Agric Univ, 29(1): 114–116. [杨淑珍, 范燕萍, 2008. 蝴蝶兰 2 个品种挥发性成分差异性分析 [J]. 华南农业大学学报, 29(1): 114–116.]
- ZHAO L, 2019. Genetic diversity analysis and hybrid breeding of *Prunus mume* based on SSR markers [D]. Beijing: Beijing Forestry University. [赵靓, 2019. 基于 SSR 标记的梅花遗传多样性分析与杂交育种 [D]. 北京: 北京林业大学.]

(责任编辑 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202203089

郑芳, 黄智聪, 陈利君, 等, 2023. 基于 MaxEnt 模型预测中国兰属植物的分布格局及主导气候因子 [J]. 广西植物, 43(6): 1027–1040.

ZHENG F, HUANG ZC, CHEN LJ, et al., 2023. Prediction of distribution patterns and dominant climatic factors of *Cymbidium* in China using MaxEnt model [J]. *Guihaia*, 43(6): 1027–1040.



基于 MaxEnt 模型预测中国兰属植物的 分布格局及主导气候因子

郑 芳, 黄智聪, 陈利君, 王 蒙, 严岳鸿, 陈建兵*

(深圳市兰科植物保护研究中心, 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 广东 深圳 518114)

摘 要: 兰属 (*Cymbidium*) 中, 除了兔耳兰 *C. lancifolium* 以外的所有种均被列为国家重点保护野生植物。为探究其在未来气候条件下的潜在分布格局, 该研究基于兰属植物已知的分布点和 19 个气候因子, 利用最大熵 (MaxEnt) 模型和地理信息系统 (ArcGIS) 模拟兰属以及其中 20 种兰属植物在 9 种不同气候情景 (当代以及未来 2030s、2050s、2070s 和 2090s 4 个时间段各两种温室气体排放情景) 下的潜在分布格局。结果表明: (1) 最干旱季降水量 (Bio17)、年降水量 (Bio12) 和温度季节性变化 (Bio4) 是影响兰属植物地理分布格局的主导气候因子。(2) 不同兰属植物在未来情景下的适生区表现出不同的变化趋势, 并且影响其分布的主导气候因子也有所不同。其中, 冬凤兰 (*C. dayanum*) 等 8 个物种的适生区面积整体呈扩张趋势, 而西藏虎头兰 (*C. tracyanum*) 等 12 个物种的适生区面积整体则呈缩减趋势。该研究结果为兰属植物就地保护与迁地保护提供了重要参考, 对兰属等濒危野生植物的保护具有积极意义。

关键词: 最大熵模型, 物种分布模型, 主导气候因子, 保护策略, 气候变化

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1027-14

Prediction of distribution patterns and dominant climatic factors of *Cymbidium* in China using MaxEnt model

ZHENG Fang, HUANG Zhicong, CHEN Lijun, WANG Meng, YAN Yuehong, CHEN Jianbing*

(Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, The Orchid Conservation & Research Center of Shenzhen, Shenzhen 518114, Guangdong, China)

Abstract: Except for *Cymbidium lancifolium*, all the other species of *Cymbidium* have been listed as the national key protected wild plants. In order to explore its future distribution patterns under the future climatic, we gathered the distribution information of *Cymbidium* and 19 climatic factors, and used the Maximum Entropy (MaxEnt) Model and Geographic Information System (ArcGIS) to predict the future distribution patterns of *Cymbidium* in China. The future

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 中央林业改革发展资金 (粤财资环[2019]5 号)。

第一作者: 郑芳 (1980-), 硕士, 实验师, 研究方向为兰科植物保护, (E-mail) zhengfang1102@126.com。

* 通信作者: 陈建兵, 硕士, 研究方向为兰科植物保护, (E-mail) cjb@cnocc.cn。

potential distribution patterns of 20 *Cymbidium* species were predicted under nine different climatic scenarios, including the current climatic and eight future climatic scenarios (two kinds of greenhouse gas emissions for 2030s, 2050s, 2070s and 2090s). The results were as follows: (1) The precipitation of the driest quarter (Bio17), annual precipitation (Bio12) and temperature seasonality (Bio4) were the dominant climatic factors affecting the future distribution of *Cymbidium*. (2) The suitable areas of different *Cymbidium* species had different change trends in the future scenarios, and the dominant climatic factors affecting them were also different. The suitable habitat area of eight *Cymbidium* species such as *C. dayanum* gradually increased, while the suitable habitat area of 12 *Cymbidium* species such as *C. tracyanum* decreased as a whole. In conclusion, the results provide an important reference for *in-situ* and *ex-situ* conservations of *Cymbidium*, and have positive significance to the conservation of *Cymbidium* and other endangered wild plants.

Key words: MaxEnt model, species distribution models, dominant climatic factor, conservation strategy, climatic change

气候是影响物种自然地理分布最重要的因素之一,气候变化会对生态系统结构和功能、群落组成、物种的分布格局和生物多样性等均产生影响 (Bellard et al., 2012; 沈永平和王国亚, 2013)。在过去的 100 年里,人类活动导致全球平均地表温度上升了大约 0.85 °C, 预计至 21 世纪末,与基准期相比,全球平均地表温度将升高 0.3~4.8 °C,降水格局也会发生明显变化 (IPCC, 2014; 秦大河等, 2007)。全球气候变化可能会导致大多数物种的分布区消长、变迁,栖息地丧失和破碎化也会引起自然分布范围狭小的濒危物种灭绝 (Thomas et al., 2004; 周海涛等, 2016)。因此,全球气候变化会影响植物的地理分布格局 (Bertin, 2008)。

物种分布模型 (species distribution model, SDM) (Elith & Leathwick, 2009) 对不同气候情景下物种潜在分布区变化有很好的预测能力,已被广泛应用在植物 (Hu et al., 2015; 张佳琦等, 2019) 和动物 (杨春平等, 2020) 中。其中,由美国学者 Phillips 等 (2006) 开发的极大熵法 (MaxEnt) 生态位模型预测结果准确,性能良好 (许仲林等, 2015), 应用最为广泛,已在狸尾豆属 (*Uraria*) 植物 (朱梦婕等, 2020)、春兰 (*Cymbidium goeringii*) 和蕙兰 (*C. faberi*) (梁红艳等, 2018)、梓叶槭 (*Acer catalpifolium*) (黄睿智等, 2021)、长苞铁杉 (*Tsuga longibracteata*) (谭雪等, 2018) 等类群中得到应用。

兰属 (*Cymbidium*) 是兰科 (Orchidaceae) 中最具观赏价值的类群之一,长期受学者和民众的喜爱和关注,具有重要的科研、经济、文化和社会价值。该属在全世界有 80 余种 (Yang et al., 2013;

刘仲健等, 2006), 主要分布于亚洲热带与亚热带地区,以及澳洲北部,通常被发现于气候凉爽的高海拔地区 (Chen, 1999), 常生长在林下腐殖质土中,偶有生长在石上或附生于树干。中国是该属的分布中心,约有 60 种,其中 20 多种为中国特有 (刘仲健和张景宁, 1998; 刘仲健和陈心启, 2002, 2004; 刘仲健等, 2005)。然而,近年来由于气候变化及人类活动干扰日益严重,适合兰科植物的生境急剧恶化,野生资源日益减少,其生存现状受到严重威胁,多数兰科植物在《中国物种红色名录》中濒危等级为受威胁等级。

本研究以兰科兰属植物为研究对象,选取 19 个气候因子作为环境变量,依托种质资源调查和查阅文献获取的位置信息,以及从中国数字标本馆 (<https://www.cvh.ac.cn/>) 收集的分布信息,采用 MaxEnt 模型和 ArcGIS 地理信息系统空间分析技术,模拟预测该属植物在不同情景下的潜在分布区,拟探讨以下问题: (1) 预测分析兰属植物在未来不同气候情景下的潜在分布格局变化; (2) 确定影响兰属植物分布格局的主导气候因子; (3) 为兰属植物的野外调查、系统分类学、生物地理学和保护生物学研究提供理论依据和实践参考。

1 材料与方法

1.1 数据收集和处理

1.1.1 种质资源调查 依据《中国植物志》(陈心启, 1999)、文献以及标本记录记载的分布和性状描述,查阅兰属植物的历史分布点,并对其在中国境内的实际分布区进行野外实地调查,记录每个

种群的分布地点、经纬度、海拔、受威胁因素、生境类型等信息。

1.1.2 物种分布信息 物种分布信息来源于三个途径:一是根据课题组种质资源调查,分布点经纬度信息由 GPS 实地定位获得;二是通过查阅国内外相关已发表文献,找出其已报道的分布地点,用百度拾取坐标查找相应的经纬度坐标;三是通过中国数字植物标本馆 (<http://www.cvh.ac.cn/>) 和全球生物多样性信息网络 (<https://www.gbif.org/>) 获取标本采集地经纬度信息。通过以上三个途径,获得中国兰属 35 个物种共 3 170 条分布记录。剔除栽培、购买等采集点,以及重叠和记录模糊的采集点,最终得到 24 个物种共 915 条有效分布记录。

1.1.3 气候因子数据 本研究选取的现代(1970—2000 年)和未来 2030s(2021—2041 年)、2050s(2041—2060 年)、2070s(2061—2080 年)和 2090s(2081—2100 年)的 19 个气候因子数据,均来源于世界气候数据库 WorldClim (<http://worldclim.org/>),空间分辨率为 2.5 min。现代气候数据是根据 1970—2000 年全球不同气象站点记录的气候数据经插值法生成。未来气候数据选择 CMIP6 计划中精度为 2.5 min 的 BCC-CSM2-MR 模式下的 SSP1-2.6 和 SSP5-8.5 两组数据。数据经 ArcGIS 10.6 软件剪裁为中国范围并转换为 ASC II 格式。

1.1.4 叶绿体基因组数据 从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库共获取 17 个已公布兰属植物的叶绿体基因组,同时下载贵州地宝兰 (*Geodorum eulophioides*) 的叶绿体基因组作为外类群。叶绿体基因组信息和 GenBank 登录号详见表 1。

另外,取样测序得到莎叶兰 (*Cymbidium cyperifolium*)、莎草兰 (*C. elegans*)、黄蝉兰 (*C. iridioides*) 的叶绿体基因组。

1.2 研究方法

1.2.1 建立模型 采用 MaxEnt version 3.4.1 (http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent) 模拟兰属植物在不同气候情境下的潜在分布格局,设置训练集为 75%,测试集为 25% 进行模拟分析。将物种分布数据与气候因子数据一起导入 MaxEnt 中,选择刀切法 (Jackknife),绘制响应曲线并制作预测图。

1.2.2 模型精度检验 采用受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curves, ROC curves)

对模型的精度进行评价。ROC 曲线与横坐标所围成区域面积 (AUC) 的大小具有不受临界值影响的特性,可用于评价预测模型的准确性 (邓飞等, 2014; 郭杰等, 2017; 周扬等, 2019)。AUC 的取值范围为 0~1,其取值越大表示与随机分布越远,预测的效果越好。当 AUC 值为 0.5~0.6 时,表示模型预测失败;当 AUC 值为 0.6~0.7 时,表示预测结果较差;当 AUC 值为 0.7~0.8 时,表明预测效果一般;当 AUC 值为 0.8~0.9 时,表示预测效果好;当 AUC 值为 0.9~1 时,表示预测效果非常好。

1.2.3 适生区等级的划分 MaxEnt 结果输出文件为 ASC II 格式,将其加载到 ArcGIS 10.6 中,使用“ArcToolbox”中的“格式转换工具”转换为栅格数据,利用“重分类工具 (reclassify)”将兰属植物的生境适宜性按照“自然间断点分级法 (natural break)”划分成 4 类,即非适生区、低适生区、中适生区和高适生区,并计算各适生区的面积。

1.2.4 系统发育树构建 以贵州地宝兰作为外类群,将 20 种兰属植物的叶绿体全基因组序列,利用 HomBlocks (Bi et al., 2018) 软件进行基因组序列的比对;比对结果利用 IQ-TREE version 2.1.2 (Trifinopoulos et al., 2016),构建兰属植物的 ML (maximum likelihood) 系统进化树,Bootstrap 值设置为 1 000,建树最优模块由 IQ-TREE 内置的 ModelFinder (Kalyanamoorthy et al., 2017) 进行选择。

2 结果与分析

2.1 MaxEnt 模型预测潜在分布格局

2.1.1 模型准确性检验 运用 MaxEnt 模型基于 19 个气候因子构建的兰属植物全属及其中 20 个物种 (另外 4 种兰属植物位置信息太少,结果可信度不高,仅用于预测全属的分布格局) 在当代、未来 4 个时间段两种不同气候情景下的地理分布模型的 AUC 值为 0.849~0.992 (表 2),平均值为 0.953。

基于 ROC 曲线分析法对 MaxEnt 预测的当前气候条件整个兰属植物潜在地理分布结果进行检验,分析得出:训练集 (training data) 和测试集 (test data) 的 AUC 值分别可达 0.916 和 0.911,远大于随机预测 (random prediction) 的 AUC 值 0.500 (图 1),表明该模型预测结果准确性较高,可以用于兰属植物在中国的潜在分布区模拟研究。

表 1 研究所用的样本信息
Table 1 Information of sample used in the study

物种 Species	基因组大小 Genome size (bp)	GC 含量 GC content (%)	登录号 Accession number	习性 Habit
纹瓣兰 <i>Cymbidium aloifolium</i>	156 904	36.9	KC876122.1	附生 Epiphytic
冬凤兰 <i>C. dayanum</i>	155 408	36.8	MW160431.1	附生 Epiphytic
独占春 <i>C. eburneum</i>	156 520	36.7	MK820374.1	附生 Epiphytic
建兰 <i>C. ensifolium</i>	149 245	37.1	KU179434.1	地生 Terrestrial
长叶兰 <i>C. erythraeum</i>	156 327	36.8	MK820373.1	附生 Epiphytic
蕙兰 <i>C. faberi</i>	157 262	37.0	KR919606.1	地生 Terrestrial
多花兰 <i>C. floribudum</i>	153 998	36.8	MK848043.1	附生或极罕见地生 Epiphytic or rarely terrestrial
春兰 <i>C. goeringii</i>	157 192	36.9	KT722982.1	地生 Terrestrial
虎头兰 <i>C. hookerianum</i>	155 447	36.8	MT800927.1	附生 Epiphytic
寒兰 <i>C. kanran</i>	150 217	37.1	NC029711.1	地生 Terrestrial
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	149 945	37.1	NC029712.1	地生或附生 Terrestrial or epiphytic
碧玉兰 <i>C. lowianum</i>	155 447	36.8	MT576628.1	附生 Epiphytic
大根兰 <i>C. macrorhizon</i>	149 850	37.0	KU179437.1	腐生 Holomycotrophic
硬叶兰 <i>C. mannii</i>	154 769	37.0	KC876126.1	附生 Epiphytic
豆瓣兰 <i>C. serratum</i>	149 998	37.1	MT273089.1	地生 Terrestrial
墨兰 <i>C. sinense</i>	155 548	37.0	KC876123.1	地生 Terrestrial
西藏虎头兰 <i>C. tracyanum</i>	156 286	36.8	NC021432.1	附生 Epiphytic
莎叶兰 <i>C. cyperifolium</i>	152 712	37.0	—	地生或附生 Terrestrial or epiphytic
莎草兰 <i>C. elegans</i>	155 411	36.8	—	附生 Epiphytic
黄蝉兰 <i>C. iridioides</i>	156 596	36.8	—	附生 Epiphytic
贵州地宝兰 <i>Geodorum eulophioides</i>	149 466	37.0	MK848065	地生 Terrestrial

2.1.2 影响兰属植物分布的主导气候因子 由表 3 可知,当前气候情景下对兰属植物全属地理分布影响较大的气候因子为最干旱季降水量(Bio17)、年降水量(Bio12)和温度季节性变化(Bio4),贡献率分别为 46.3%、28.4%和 7.2%,贡献率总和达到 81.9%。为避免气候因子间的自相关,利用 ArcGIS 10.6 软件提取 915 个兰属植物分布点的气候因子信息,利用 SPSS 23.0 软件的 Pearson 相关系数法分析气候因子的相关性,保留相关系数 $|r| < 0.8$ 的气候因子,对于 $|r| > 0.8$ 的气候因子,保留贡献率较大的一个,最后筛选出 7 个气候因子: Bio2、Bio4、Bio6、Bio10、Bio12、Bio17、Bio18。用筛选出的气候因子进行分析预测,结果显示当前气候情景下对兰属植物全属地理分布影响较大的气候因子仍为 Bio17、Bio12 和 Bio4,贡献率分别为 50.0%、27.3%和 15.9%,贡献率总和达到 93.2%。由图 2 可知,变量单独使用时,Bio12 在受试变量中测试增益最突出;省略变量时,减少增益最多的气候因子是 Bio4。

兰属植物分布对 Bio17、Bio12 和 Bio4 的响应曲线见图 3。兰属植物在最干旱季降水量 50~200 mm 的区域内分布概率较大,在 0~57 mm 范围内,分布概率与降水量呈正相关;当降水量超过 57 mm 后,分布概率与降水量呈负相关;当降水量超过 630 mm 后,降水量变化不再影响兰属植物的分布概率。年降水量为 2 000 mm 时,该属存在概率最大,伴随年降水量的增加,存在概率与降水量呈负相关;当年降水量达到 4 000 mm 以后,存在概率保持不变。温度季节性变化在约 3 ℃时,兰属植物存在概率最高,随着温度季节性变化的升高,兰属植物存在概率急剧下降。

主导冬凤兰(*C. dayanum*)和独占春(*C. eburneum*)地理分布的气候因子为 Bio4 和最冷季的平均温度(Bio11);主导豆瓣兰(*C. serratum*)的地理分布的主要气候因子为年温度变化范围(Bio7)和 Bio4;主导墨兰(*C. sinense*)和纹瓣兰(*C. aloifolium*)地理分布的气候因子为最湿润季降水量(Bio16)和 Bio17;主导碧玉兰(*C. lowianum*)

表 2 九种气候情景下 20 种兰属植物 AUC 值

Table 2 AUC values of 20 *Cymbidium* species for the nine climatic scenarios

物种 Species	现代 Current	SSP1-2.6				SSP5-8.5			
		2030s	2050s	2070s	2090s	2030s	2050s	2070s	2090s
兰属 <i>Cymbidium</i>	0.909	0.905	0.91	0.908	0.907	0.907	0.906	0.908	0.909
纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i>	0.980	0.980	0.979	0.981	0.979	0.984	0.981	0.980	0.981
莎叶兰 <i>C. cyperifolium</i>	0.962	0.955	0.961	0.959	0.957	0.960	0.958	0.953	0.965
冬凤兰 <i>C. dayanum</i>	0.962	0.963	0.960	0.961	0.959	0.961	0.962	0.965	0.955
独占春 <i>C. eburneum</i>	0.976	0.977	0.978	0.974	0.976	0.978	0.973	0.974	0.976
莎草兰 <i>C. elegans</i>	0.969	0.974	0.975	0.974	0.971	0.974	0.968	0.970	0.971
建兰 <i>C. ensifolium</i>	0.938	0.935	0.937	0.934	0.937	0.936	0.940	0.931	0.938
长叶兰 <i>C. erythraeum</i>	0.956	0.969	0.965	0.963	0.969	0.972	0.964	0.961	0.965
蕙兰 <i>C. faberi</i>	0.899	0.910	0.911	0.903	0.908	0.906	0.902	0.900	0.908
多花兰 <i>C. floribludum</i>	0.946	0.947	0.949	0.950	0.946	0.951	0.946	0.946	0.950
春兰 <i>C. goeringii</i>	0.909	0.917	0.921	0.915	0.918	0.921	0.913	0.914	0.918
虎头兰 <i>C. hookerianum</i>	0.968	0.973	0.974	0.964	0.971	0.971	0.964	0.970	0.968
黄蝉兰 <i>C. iridioides</i>	0.978	0.977	0.980	0.974	0.977	0.979	0.973	0.976	0.975
寒兰 <i>C. kanran</i>	0.948	0.950	0.950	0.947	0.951	0.952	0.946	0.946	0.943
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	0.959	0.967	0.966	0.963	0.965	0.965	0.964	0.960	0.959
碧玉兰 <i>C. lowianum</i>	0.990	0.992	0.989	0.990	0.990	0.987	0.988	0.989	0.988
大根兰 <i>C. macrorhizon</i>	0.904	0.907	0.915	0.929	0.849	0.876	0.855	0.853	0.895
硬叶兰 <i>C. mannii</i>	0.982	0.981	0.981	0.985	0.981	0.983	0.983	0.981	0.981
豆瓣兰 <i>C. serratum</i>	0.917	0.918	0.919	0.920	0.915	0.933	0.925	0.926	0.906
墨兰 <i>C. sinense</i>	0.971	0.967	0.968	0.969	0.971	0.974	0.968	0.969	0.970
西藏虎头兰 <i>C. tracyanum</i>	0.982	0.983	0.988	0.978	0.984	0.985	0.977	0.982	0.983

和黄蝉兰 (*C. iridioides*) 地理分布的气候因子为等温性 (Bio3) 和 Bio4; 主导长叶兰 (*C. erythraeum*) 和莎草兰 (*C. elegans*) 地理分布的气候因子为 Bio3、Bio4 和最冷月份最低温度 (Bio6); 主导寒兰 (*C. kanran*)、建兰 (*C. ensifolium*) 和多花兰 (*C. floribludum*) 地理分布的气候因子为 Bio12 和 Bio17; 主导大根兰地理分布的气候因子为 Bio6 和 Bio7; 主导兔耳兰 (*C. lancifolium*) 地理分布的气候因子为 Bio17 和最暖季降水量 (Bio18); 主导西藏虎头兰 (*C. tracyanum*) 地理分布的气候因子为 Bio3、Bio4、Bio17 和 Bio18; 主导莎叶兰 (*C. cyperifolium*) 地理分布的气候因子为 Bio7 和 Bio17; 主导虎头兰 (*C. hookerianum*) 地理分布的气候因子为 Bio4 和 Bio18; 主导硬叶兰 (*C. mannii*) 地理分布的气候因子为 Bio11; 主导春兰地理分布的气候因子为 Bio12 和最干燥月份降水量 (Bio14); 主导蕙兰地理分布的气候因子为 Bio6、Bio12 和 Bio17。

2.1.3 现代及未来气候情景下兰属植物的潜在地理分布格局 选取现代气候情景和未来 2030s、2050s、2070s 和 2090s 两条典型浓度路径 (SSP1-2.6 和 SSP5-8.5), 利用 MaxEnt 模型对兰属植物的潜在地理分布格局进行模拟, 得到不同气候情景下的适生区面积 (附表 1, 图 4、图 6-9)。

现代气候条件下, 兰属植物适生总面积为 $248.18 \times 10^4 \text{ km}^2$, 其中高适生区面积为 $100.37 \times 10^4 \text{ km}^2$, 中适生区和低适生区面积分别为 $80.43 \times 10^4 \text{ km}^2$ 和 $67.39 \times 10^4 \text{ km}^2$ (附表 1, 图 4)。未来不同温室气体排放情景下, 兰属植物适生区面积变化曲线 (图 5) 表明总适生区程缩小趋势, 其中高适生区缩小幅度最大为 33.08%, 中适生区面积缩小幅度最大为 15.57%, 低适生区面积呈增加趋势。

从物种水平来看, 冬凤兰、大根兰、墨兰、豆瓣兰, 碧玉兰、兔耳兰、纹瓣兰和独占春在未来 8 种情景下适生区面积跟现代气候下相比, 整体呈扩

表 3 模拟兰属植物潜在适宜分布的主要气候因子及其贡献率

Table 3 Main climatic factors used for simulating suitable areas of *Cymbidium* species and their contribution rates

气候因子 Climatic factor	昼夜 温差 月均值 Bio2	等温性 Bio3	温度 季节性 变化 Bio4	最冷月份 最低温度 Bio6	年温度 变化 范围 Bio7	最冷季的 平均温度 Bio11	年降 水量 Bio12	最干燥 月份 降水量 Bio14	最湿润季 降水量 Bio16	最干旱季 降水量 Bio17	最暖季 降水量 Bio18
兰属 <i>Cymbidium</i>	—	—	7.2	—	—	—	28.4	—	—	46.3	—
冬凤兰 <i>C. dayanum</i>	—	—	32.9	—	—	42.4	—	—	—	—	—
独占春 <i>C. eburneum</i>	—	—	47.6	—	—	28.3	—	—	—	—	—
大根兰 <i>C. macrorhizon</i>	20.1	—	—	42.3	28.8	—	—	—	—	—	—
豆瓣兰 <i>C. serratum</i>	—	—	22.5	—	57.9	—	—	—	—	—	—
墨兰 <i>C. sinense</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	19.8	34.3	—
纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i>	—	—	—	—	—	10.7	—	—	22.4	29.8	—
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45.1	21.6
碧玉兰 <i>C. lowianum</i>	—	56.4	19.2	—	—	—	—	—	—	—	—
黄蝉兰 <i>C. iridioides</i>	—	31.6	43.2	—	—	—	—	—	—	—	—
西藏虎头兰 <i>C. tracyanum</i>	—	16.3	26.9	—	—	—	—	—	—	22.4	21.4
长叶兰 <i>C. erythraeum</i>	—	29.8	31.9	30.4	—	—	—	—	—	—	—
莎草兰 <i>C. elegans</i>	—	20.5	31.2	35.4	—	—	—	—	—	—	—
莎叶兰 <i>C. cyperifolium</i>	—	—	12.1	—	21.0	—	—	—	—	33.6	—
虎头兰 <i>C. hookerianum</i>	—	—	37.0	—	—	—	—	—	—	—	16.8
硬叶兰 <i>C. mannii</i>	—	—	—	—	—	43.7	—	—	—	—	—
春兰 <i>C. goeringii</i>	—	—	—	14.4	—	—	32	36.1	—	—	—
蕙兰 <i>C. faberi</i>	—	—	—	16.8	—	—	43.2	—	—	16.1	—
寒兰 <i>C. kanran</i>	—	—	—	—	—	—	20.8	—	14.4	46.1	—
建兰 <i>C. ensifolium</i>	—	—	—	—	—	—	30.7	—	—	35.5	—
多花兰 <i>C. floribudum</i>	—	—	—	—	—	—	15.2	—	—	61.1	—

注：数字表示各气候因子对该物种的模拟分布贡献率大小(%)；—表示该气候因子对该物种的模拟分布贡献率较小。

Note: Numbers indicate contribution rates of climatic factors to the species simulating distribution (%); — indicates low contribution rates of climatic factors to the species simulating distribution.

张趋势,其中独占春和兔耳兰的低适生区面积在未来呈缩减趋势,而高适生区和中适生区面积均大幅增加。冬凤兰和豆瓣兰在 SSP1-2.6 情景下,4 个时间段的总适生区、高、中、低适生区面积均大幅增加;在 SSP5-8.5 情景下,高适生区面积也大幅增加(图 4)。碧玉兰在 SSP5-8.5 情景下,未来 4 个时间段的总适生区、高、中、低适生区面积均大幅增加;在 SSP1-2.6 情景下,除高适生区以外,总适生区、中、低适生区面积也都呈扩张趋势。在 2090s 阶段,两种情景下,纹瓣兰的总适生区、高、中、低适生区面积均增加。墨兰和大根兰的总适生区、高、低适生区面积在 SSP1-2.6 和 SSP5-8.5 情景下均呈大幅增加,中适生区面积整体也呈增加趋势,其中墨兰在 SSP5-8.5 情景下,2090s 高适生区面积增幅达 68.42%。

西藏虎头兰、虎头兰、长叶兰、莎草兰、硬叶兰、莎叶兰、多花兰、寒兰、蕙兰、春兰、黄蝉兰和建

兰在未来情景下适生区面积整体呈缩减趋势。其中,长叶兰和莎草兰的总适生区、高、中、低适生区面积在 4 个时间段,两种情景下均呈缩减趋势,幅度为 3.05%~58.88%。莎草兰、硬叶兰在 SSP5-8.5(2061—2100 年)情景下,高适生区面积增加,在其他情景下总适生区、中、低适生区面积均减少。多花兰的总适生区和高适生区面积在 8 种未来情景下呈缩减趋势,中、低适生区面积变化不明显。莎叶兰在 SSP1-2.6(2041—2080 年)和 SSP5-8.5(2081—2100 年)情景下,总适生区面积、高、中、低适生区面积均缩减。在 SSP5-8.5(2061—2100 年)情景下,西藏虎头兰和虎头兰的总适生区和高适生区面积均明显缩减;寒兰的高适生区面积呈缩减趋势;蕙兰的总适生区和中适生区面积呈缩减趋势;春兰的总适生区面积在未来两种情景下,各阶段均呈缩减趋势,其中高、中适生区尤为明显;黄蝉兰和建兰的总适生区面积

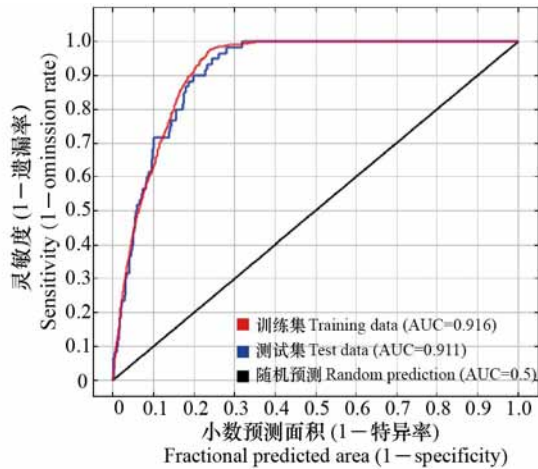


图 1 当前气候情景下 MaxEnt 模型预测结果 ROC 曲线
Fig. 1 ROC curve of MaxEnt model prediction under the current climatic scenario

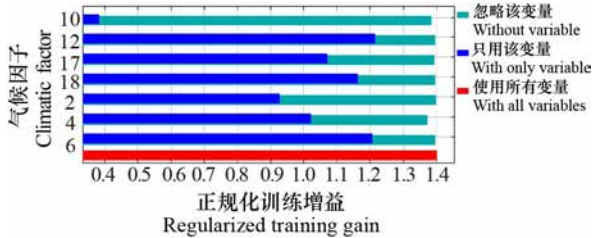


图 2 刀切法检验的各气候因子对兰属植物分布影响的重要性
Fig. 2 Importance of various climatic factors based on Jackknife test

呈略微缩减趋势,其中高、中适生区面积在未来时间段波动较大,在 SSP1-2.6(2081—2100 年)情景下高适生区面积减少,中适生区面积增加,而在 SSP5-8.5(2081—2100 年)情景下高适生区面积增加,中适生区面积减少。

2.2 20 种兰属植物的系统发育关系

基于叶绿体全基因组序列,以贵州地宝兰作为外类群,构建了 20 种兰属植物的系统进化树(图 10)。该进化树分支的自展值多为 100%,表明叶绿体基因组序列构建的兰属植物关系可信度较高。在系统进化树中,兰属植物聚成 3 大类, C1、C2 和 C3。其中, C1 支内的兰属植物有 3 种生活方式,即地生、地生或附生、腐生, C2、C3 支内的兰属植物均为附生植物。热图表示在 SSP1-2.6 和 SSP5-8.5 两种情景下,每种兰属植物的高、中适生区面积之和到 2100 年的变化情况,结果显示

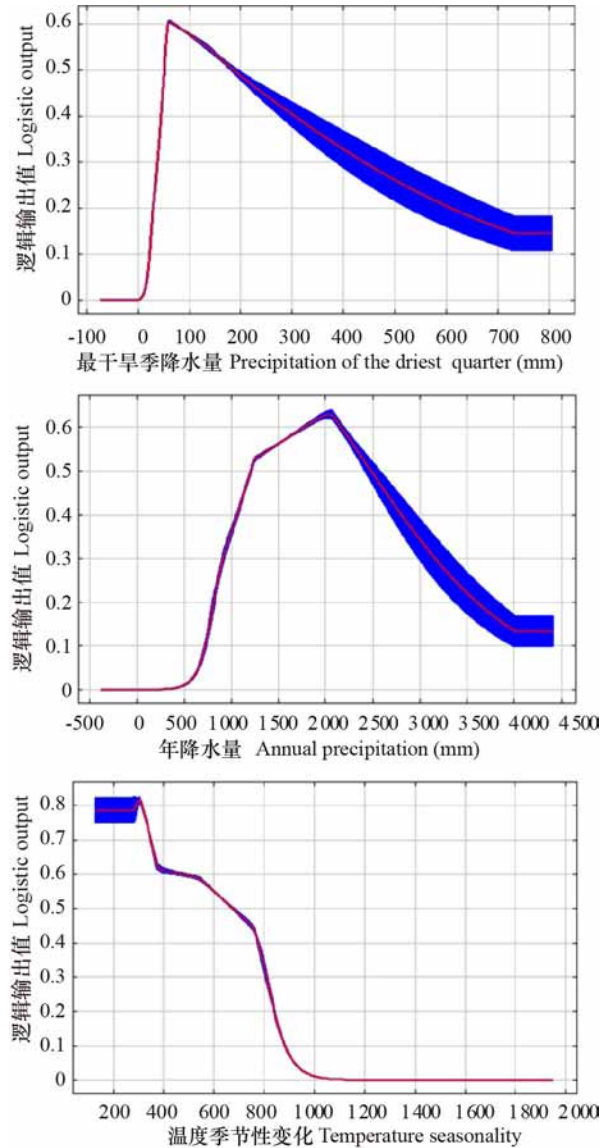
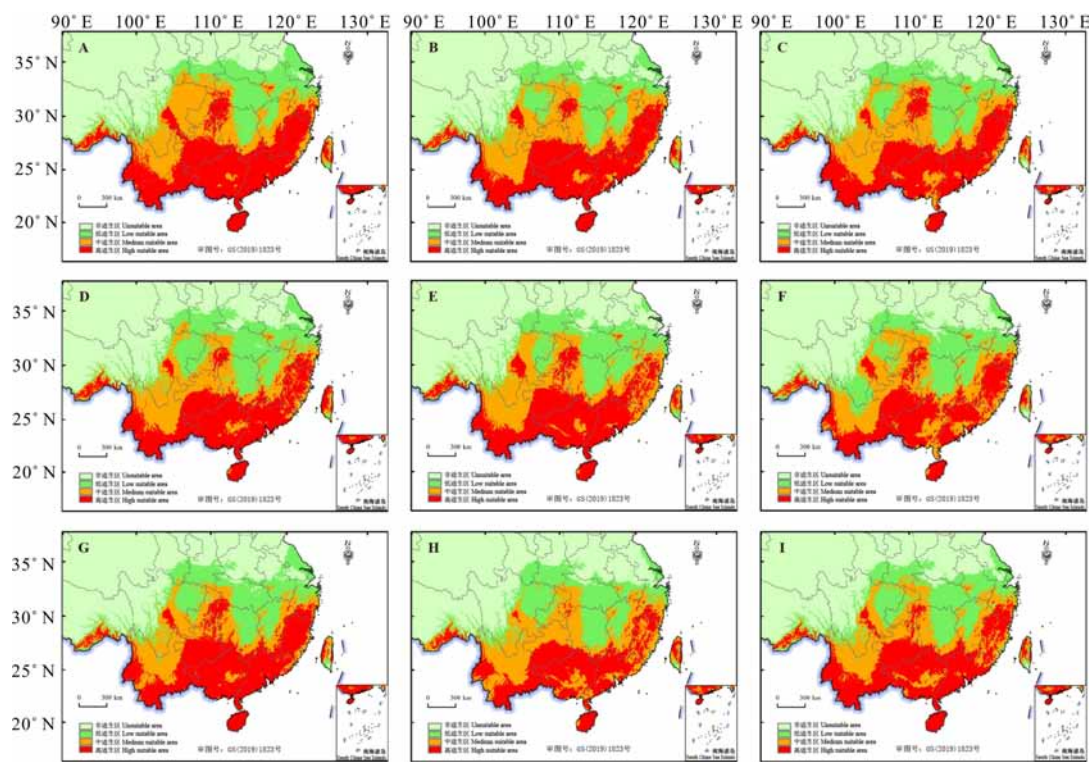


图 3 单变量响应曲线
Fig. 3 Response curves of single variables

在每一大支和小支内均有分布区扩张和收缩的兰属植物。

3 讨论与结论

物种的分布区是物种重要的空间特征,与物种灭绝、生态入侵、生态位幅度密切相关,对研究物种的起源、扩散和演化具有重要意义。在全球变化的背景下,进行物种潜在分布区的模拟和主导因子分析,可以为植物资源的有效保护和可持续利用提供科学依据。对于众多现存的珍稀濒危



A-I 依次为现代 1970—2000 年、未来 2030s、2050s、2070s 和 2090s 在 SSP1-2.6 和 SSP5-8.5 情景下的兰属植物的分布格局。下同。
A-I are the potential distribution patterns of *Cymbidium* under the scenarios of current 1970—2020, SSP1-2.6 and SSP5-8.5 in future 2030s, 2050s, 2070s and 2090s, respectively. The same below.

图 4 不同气候变化情景下兰属的潜在分布格局

Fig. 4 Potential distribution patterns of *Cymbidium* under different climatic scenarios

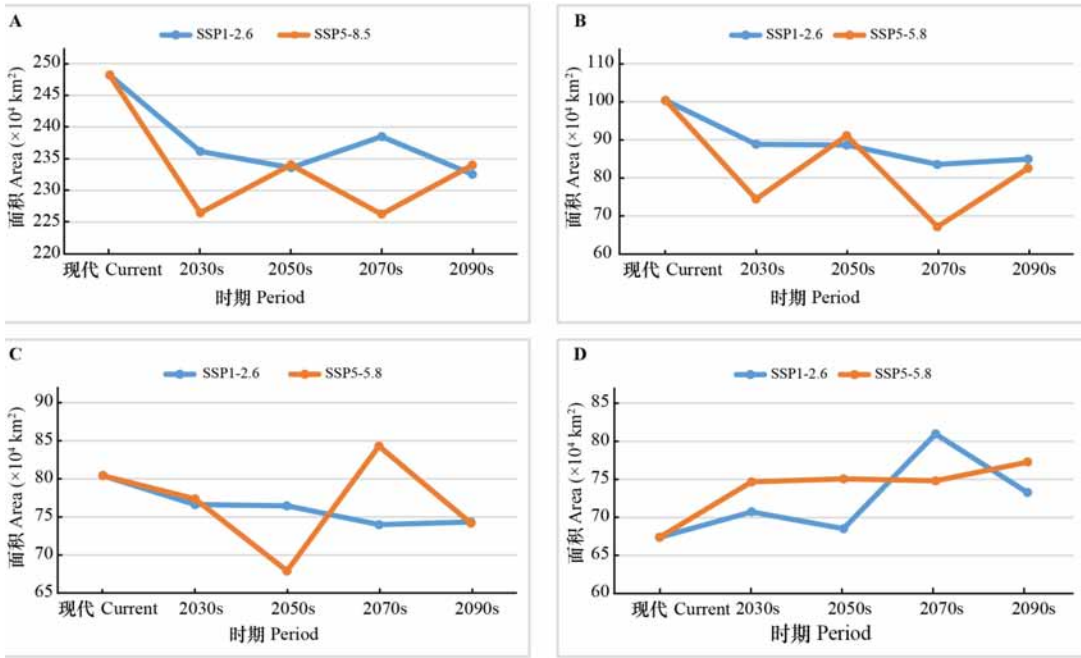


图 5 不同时期兰属植物的适生区变化

Fig. 5 Change of the suitable areas of of *Cymbidium* in different periods

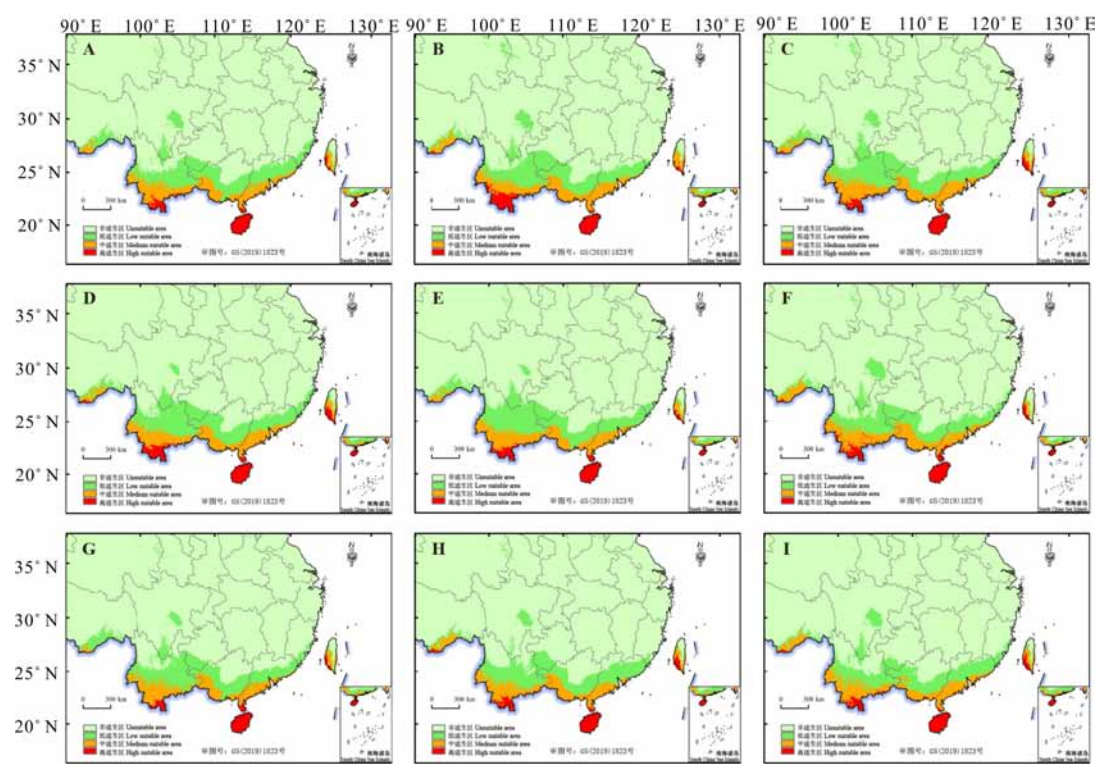


图 6 不同气候变化情景下冬凤兰的潜在分布格局

Fig. 6 Potential distribution patterns of *Cymbidium dayanum* under different climatic scenarios

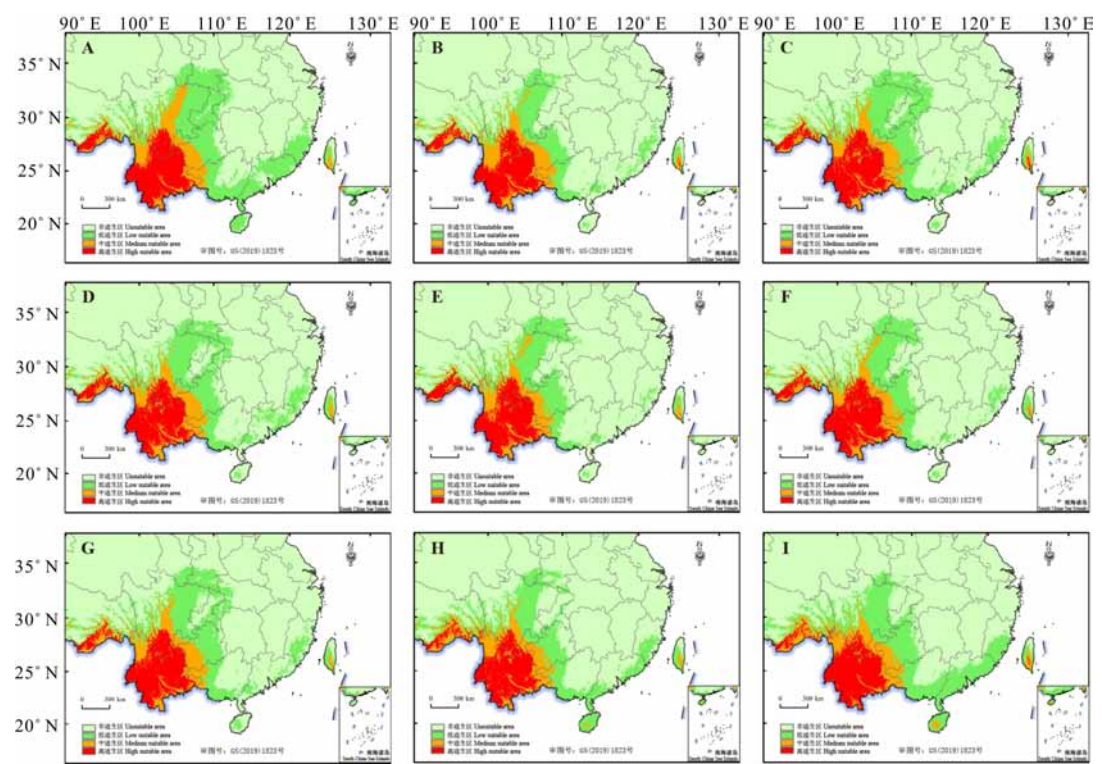


图 7 不同气候变化情景下长叶兰的潜在分布格局

Fig. 7 Potential distribution patterns of *Cymbidium erythraeum* under different climatic scenarios

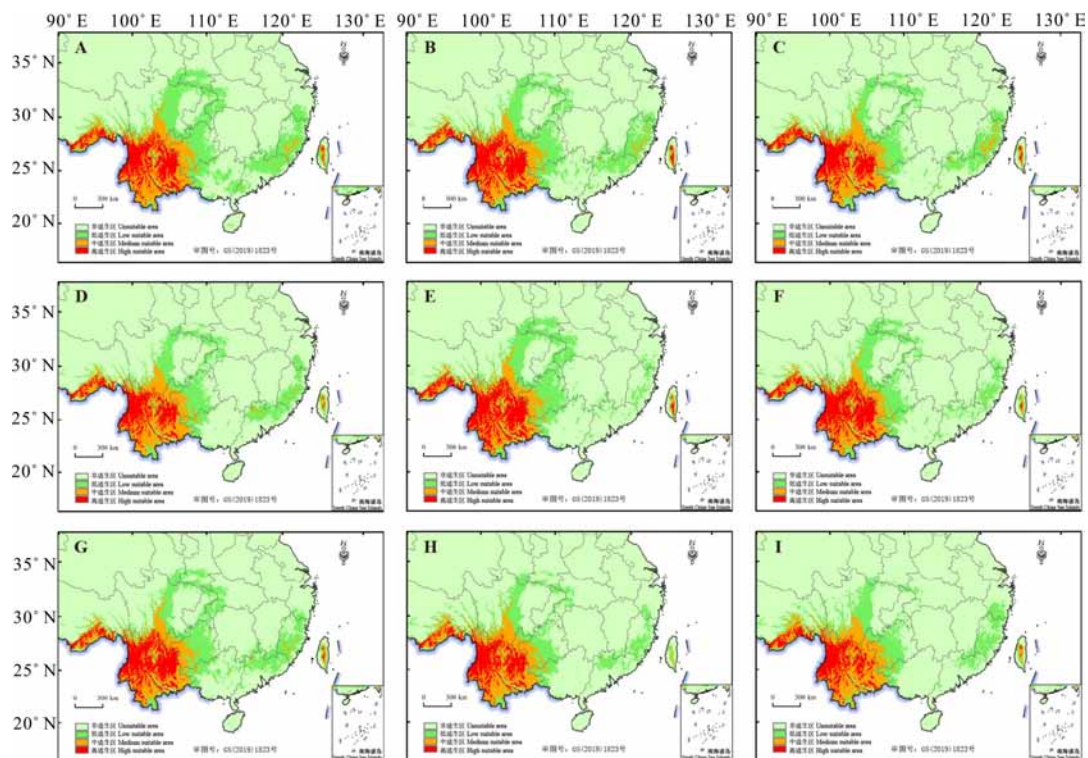


图 8 不同气候变化情景下莎草兰的潜在分布格局

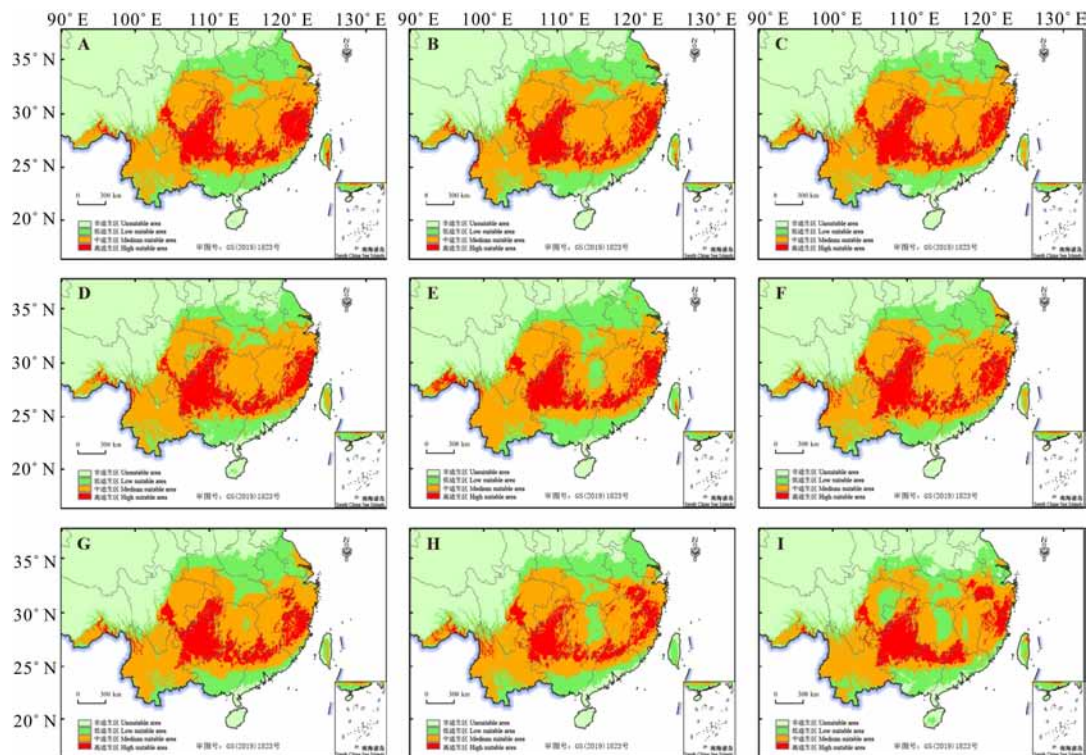
Fig. 8 Potential distribution patterns of *Cymbidium elegans* under different climatic scenarios

图 9 不同气候变化情景下春兰的潜在分布格局

Fig. 9 Potential distribution patterns of *Cymbidium goeringii* under different climatic scenarios

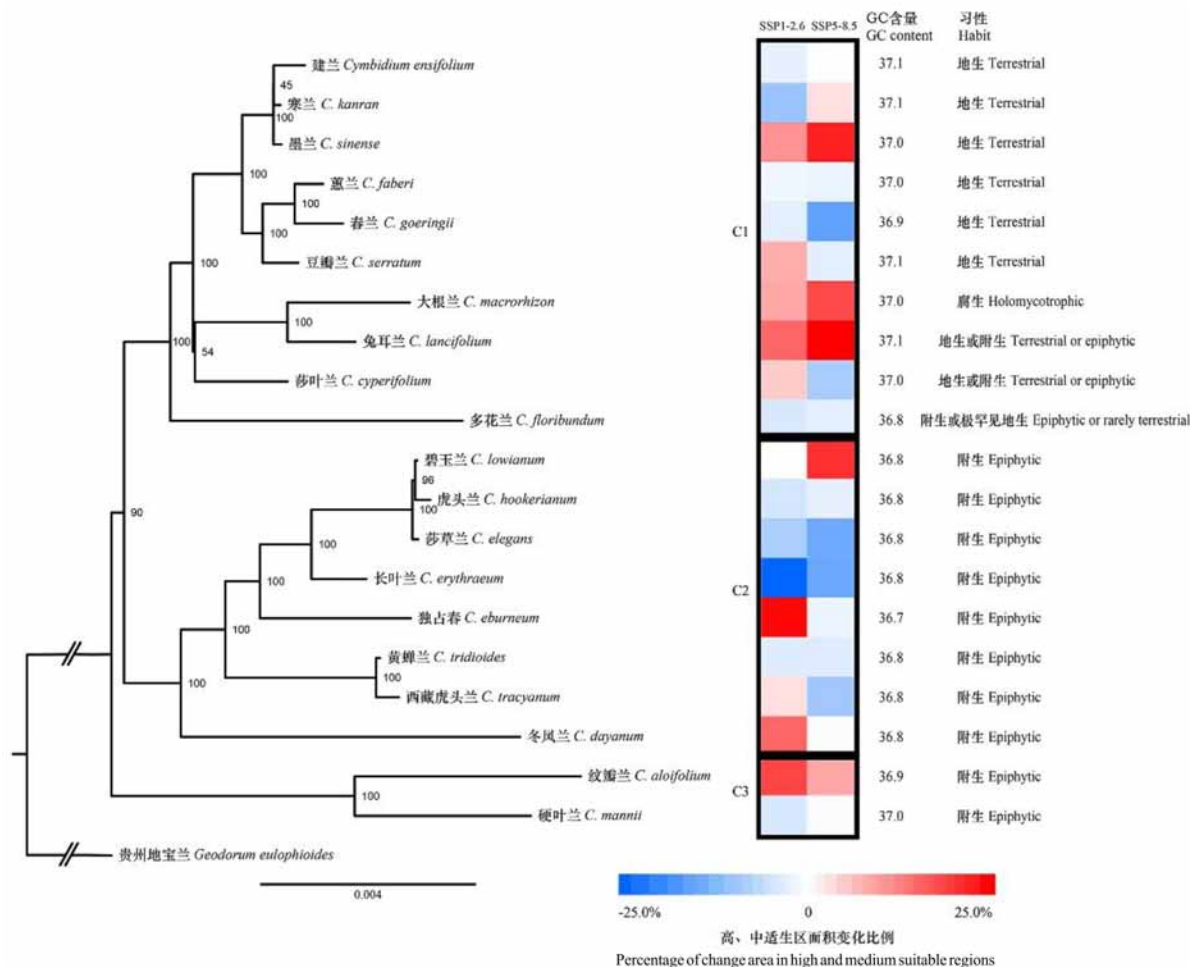


图 10 基于叶绿体基因组序列构建的兰属植物系统进化树

Fig. 10 Consensus phylogenetic tree of *Cymbidium* species based on whole chloroplast genome sequences

物种而言,物种分布区的潜在收缩或扩张趋势对这些珍稀濒危物种的保护具有重要意义。

本研究利用 MaxEnt 模型来模拟兰属植物在现代和未来气候情景 (SSP1-2.6、SSP5-8.5) 下的潜在分布格局。结果表明,在未来气候变化下,兰属植物整个属的潜在分布区面积呈缩减趋势且高适生区面积大幅缩减,8 种情景下缩减 9.26% ~ 33.08%。中适生区面积在两种情景下到 2100 年分别缩减 7.57% 和 7.77%;而低适生区面积呈扩张趋势,不同情景和时间段下,面积增加 1.68% ~ 20.15%。对兰属地理分布影响较大的气候因子为最干旱季降水量 (Bio17)、年降水量 (Bio12) 和温度季节性变化 (Bio4)。

随着全球气温升高,中国区域极端降水发生频率增强,而 SSP5-8.5 情景相比于其他低温室气

体排放浓度情景,降水强度的增幅较大,且我国西南地区降水强度增加较为显著 (陈晓晨等, 2015),这说明兰属整体在未来气候情境下对极端降水不适应。本研究采用 20 种兰属植物,其生活习性差别较大,因此各种兰属植物的空间格局变化各不相同。

冬凤兰现代中国潜在适生区除了与实际现存野生种群分布区较一致的广东、广西、海南、台湾和云南南部以外,还分布于西藏南部,而广泛分布的福建南部却仅有少量低适生区。未来气候变化情境下,高适生区呈扩张趋势,逐渐集中连续分布,主要向高纬度地区扩张,西藏南部地区和台湾地区的高适生区扩张明显。推测是气候变化导致高适生区面积增加,在未来全球气候变暖的情境下,中国年平均气温上升 1.6~5.0 ℃,年降水量增

加 1.5%~2.0% (李垚等, 2016), 影响冬凤兰适生区分布的主要气候因子是温度季节性变化 (Bio4) 和最冷季的平均温度 (Bio11), 因此在未来气温变暖情况下, 冬凤兰的高适生区分布逐渐向北方扩张。

长叶兰和莎草兰现代潜在适生区除了与现存记录相符的西藏东南部、云南、四川西南部和贵州中部至西南部之外, 还广泛分布于广东、广西的沿海地区, 以及台湾地区。根据气候因子贡献率的结果, 等温性 (Bio3)、温度季节性变化 (Bio4) 和最冷月份最低温度 (Bio6) 是影响长叶兰和莎草兰的主要气候因子, 三者对它们的贡献率之和分别为 92.1% 和 87.1%。在未来气候条件下, 它们的适生区面积呈缩减趋势, 整体向云南和西藏东南部这些高海拔地区迁移, 这可能与云南省气候带的变化有关。程建刚等 (2009) 研究表明, 近年来云南的气候带面积中热带面积增加, 而北亚热带和温带面积减少, 气候带呈北移趋势, 并且向高海拔地区扩展的趋势更加明显。

春兰的总适生区面积在 8 种未来情景下均呈减少趋势。其中, 高适生区面积在两种不同排放情景下, 不同未来阶段都呈现先上升后下降的趋势, 这可能与不同排放情景下所造成的温度与降雨变化有关。在 SSP1-2.6 情景下, 2061—2080 年, 高、中适生区扩张, 而低适生区缩减; 在 2081—2100 年, 高适生区缩减 10.4%, 变为中、低适生区。在 SSP5-8.5 情景下, 2061—2080 年, 高适生区扩张 5.94%, 而中低适生区缩减; 在 2081—2100 年, 高、中适生区分别缩减 11.27% 和 18.03%, 低适生区扩张 4.54%。这说明随着 CO₂ 排放, 环境越来越不适宜春兰的生长繁殖。

结合系统发育树, 发现分布区面积变化趋势与系统发育关系的联系并不明显。亲缘关系较近的物种在未来情景下, 分布区有扩张和收缩之分。这符合生态位法则, 即亲缘关系接近的、具有同样生活习性的物种, 不会在同一地方竞争同一生存空间。总体而言, 系统发育树上 C1 支的兰科植物多为地生植物, 叶绿体基因的 GC 含量较高, 适生区面积多为扩张趋势; C2 支的兰科植物为附生植物, 叶绿体基因的 GC 含量较低, 适生区面积多为收缩趋势。

全球气候变暖情况下, 各地干旱和极端降雨频发, 将深刻影响森林分布 (时明芝, 2011), 进而

影响附生的兰属植物的分布。

与现代气候相比, 在未来气候情景下从属的水平来看, 兰属植物呈现缩减趋势; 从物种水平来看, 不同植物的分布区变化规律并不一致, 其分布格局响应气候变化的趋势有所不同。由于植物的实际分布格局受到多方面的影响, 因此进一步的研究可考虑地形、土壤条件、海拔、人为活动等因素。

目前, 大多数学者认为在全球变暖情景下, 物种的适生区面积将不断减少且逐渐向高纬度和高海拔地区迁移 (Parmesan, 2006)。例如, 邱浩杰等 (2020) 对鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) 在中国的分布预测发现其适宜分布区面积不断减少且有向高纬度轻微移动的趋势; 张涛等 (2022) 发现从未次盛冰期至未来气候情境下, 苦参 (*Sophora flavescens*) 在我国的适宜生境面积逐渐减少且整体有向高纬度地区移动的趋势。但是, 也有学者得出不同的结论。例如, 陈俊俊等 (2016) 发现, 在未来气候情景模式下, 短花针茅 (*Stipa breviflora*) 的适生区面积较现在有所增加且向高纬度地区移动; 朱梦婕等 (2020) 发现在未来气候条件下狸尾豆属植物潜在分布区面积增加且高适生区向北推移。

兰属所有野生种均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II 中, 兰属中除兔耳兰外的其他种都被列入《国家重点保护野生植物 (第二批)》名录中。造成兰属植物濒危的主要原因除大量采挖活动外, 主要是人们对生境的过度破坏使其生长空间被完全剥夺或生长环境遭受颠覆性改变。

根据潜在分布区预测发现兔耳兰、碧玉兰、冬凤兰、大根兰、墨兰、豆瓣兰、独占春、纹瓣兰等在未来情境下呈扩张趋势, 保护这类植物要从保护其原有生境入手。对于兰属植物分布密集地区, 应当扩大当地国家级自然保护区的面积, 减少保护空缺区域, 或将省级、县级自然保护区升级为国家级保护区, 消除人为经济活动对其生存构成的威胁, 以维持生境的稳定和连续, 并满足附生所需灌木林等的生长条件, 实行综合性的保护, 为传粉昆虫生长提供环境保证。对于未来情景下缩减明显的莎草兰、长叶兰、硬叶兰、多花兰等这类兰属植物, 根据预测结果推断未来适生区稳定存在的地区可能成为其将来应对气候变化的避难所, 因

此我们应特别重视对这些区域的自然生境保护, 此外, 可以考虑人工繁育后回归原有生境或者进行迁地保护。综上所述, 潜在分布区预测的研究能为珍稀濒危兰属植物提出合理、有效的保护对策。

参考文献:

- BELLARD C, BERTELSMEIER C, LEADLEY P, et al., 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity [J]. *Ecol Lett*, 15(4): 365–377.
- BERTIN RI, 2008. Plant phenology and distribution in relation to recent climate change [J]. *J Torrey Bot Soc*, 135(1): 126–146.
- BI GQ, MAO YX, XING QK, et al., 2018. HomBlocks: A multiple-alignment construction pipeline for organelle phylogenomics based on locally collinear block searching [J]. *Genomics*, 110(1): 18–22.
- CHEN JJ, YAN YY, CONG RH, et al., 2016. Prediction of potential distribution of *Stipa breviflora* in China based on MaxEnt model [J]. *Chin J Grassl*, 38(5): 78–84. [陈俊俊, 燕亚媛, 丛日慧, 等, 2016. 基于 MaxEnt 模型的短花针茅在中国的潜在分布区研究及预估 [J]. *中国草地学报*, 38(5): 78–84.]
- CHEN SC, 1999. *Cymbidium*. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Beijing: Science Press, 17: 52–72. [陈心启, 1999. 兰属. *中国植物志* [M]. 北京: 科学出版社, 17: 52–72.]
- CHEN XC, XU Y, YAO Y, 2015. Changes in climate extremes over China in a 2 °C, 3 °C, and 4 °C warmer world [J]. *Chin J Atmos Sci*, 39(6): 1123–1135. [陈晓晨, 徐影, 姚遥, 2015. 不同升温阈值下中国地区极端气候事件变化预估 [J]. *大气科学*, 39(6): 1123–1135.]
- CHENG JG, WANG XF, FAN LZ, et al., 2009. Variations of Yunnan climatic zones in recent 50 years [J]. *Prog Geogr*, 28(1): 18–24. [程建刚, 王学锋, 范立张, 等, 2009. 近 50 年来云南气候带的变化特征 [J]. *地理科学进展*, 28(1): 18–24.]
- DENG F, LI XB, WANG H, et al., 2014. The suitability of geographic distribution and the dominant factors of alfalfa based on MaxEnt model in Xilin Gol [J]. *Pratacult Sci*, 31(10): 1840–1847. [邓飞, 李晓兵, 王宏, 等, 2014. 基于 MaxEnt 模型评价紫花苜蓿在锡林郭勒盟的分布适宜性及主导因子 [J]. *草业科学*, 31(10): 1840–1847.]
- ELITH J, LEATHWICK JR, 2009. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time [M]. *Ann Agric Environ Med*: 677–697.
- GUO J, LIU XP, ZHANG Q, et al., 2017. Prediction for the potential distribution area of *Codonopsis pilosula* at global scale based on MaxEnt model [J]. *Chin J Appl Ecol*, 28(3): 992–1000. [郭杰, 刘小平, 张琴, 等, 2017. 基于 MaxEnt 模型的党参全球潜在分布区预测 [J]. *应用生态学报*, 28(3): 992–1000.]
- HU XG, JIN Y, WANG XR, et al., 2015. Predicting impacts of future climate change on the distribution of the widespread conifer *Platycladus orientalis* [J]. *PLoS ONE*, 10(7): e0132326.
- HUANG RZ, YU T, ZHAO H, et al., 2021. Prediction of suitable distribution area of the endangered plant *Acer catalpifolium* under the background of climate change in China [J]. *J Beijing For Univ*, 43(5): 33–43. [黄睿智, 于涛, 赵辉, 等, 2021. 气候变化背景下濒危植物梓叶槭在中国适生分布区预测 [J]. *北京林业大学学报*, 43(5): 33–43.]
- IPCC, 2014. Climate Change: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [R]. IPCC, Geneva, Switzerland: 151.
- KALYAANAMOORTHY S, MINH BQ, WONG TKF, et al., 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. *Nat Methods*, 14: 587–589.
- LI Y, ZHANG XW, FANG YM, 2016. Responses of the distribution pattern of *Quercus chenii* to climate change following the last glacial maximum [J]. *Chin J Plant Ecol*, 40(11): 1164–1178. [李垚, 张兴旺, 方炎明, 2016. 小叶栎分布格局对末次盛冰期以来气候变化的响应 [J]. *植物生态学报*, 40(11): 1164–1178.]
- LIANG HY, JIANG XL, KONG YH, et al., 2018. Prediction of the potential geographical distribution of *Cymbidium goeringii* and *C. faberi* under the background of global warming [J]. *Acta Ecol Sin*, 38(23): 8345–8353. [梁红艳, 姜效雷, 孔玉华, 等, 2018. 气候变暖背景下春兰和蕙兰的适生区分布预测 [J]. *生态学报*, 38(23): 8345–8353.]
- LIU ZJ, CHEN SC, 2002. *Cymbidium paucifolium*, a new species of Orchidaceae from China [J]. *J Wuhan Bot Res*, 20(5): 350–352. [刘仲健, 陈心启, 2002. 少叶硬叶兰, 中国兰科一新种 [J]. *武汉植物学研究*, 20(5): 350–352.]
- LIU ZJ, CHEN SC, 2004. *Cymbidium micranthum*, a new orchid from Yunnan, China [J]. *J Wuhan Bot Res*, 22(6): 500–502. [刘仲健, 陈心启, 2004. 细花兰, 中国云南兰科一新种 [J]. *武汉植物学研究*, 22(6): 500–502.]
- LIU ZJ, CHEN SC, RU ZZ, 2005. *Cymbidium changningense*, a new species of Orchidaceae from Yunnan, China [J]. *Acta Bot Yunnan*, 27(4): 378–380. [刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 2005. 中国云南兰科一新种——昌宁兰 [J]. *云南植物研究*, 27(4): 378–380.]
- LIU ZJ, CHEN SC, RU ZZ, et al., 2006. The genus *Cymbidium* in China [M]. Beijing: Science Press: 10–13. [刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 等, 2006. 中国兰属植物 [M]. 北京: 科学出版社: 10–13.]

- LIU ZJ, ZHANG JN, 1998. Five new species of *Cymbidium* from Asia [J]. J S Chin Agric Univ, 19(3): 114–118. [刘仲健, 张景宁, 1998. 亚洲兰属植物五新种 [J]. 华南农业大学学报, 19(3): 114–118.]
- PARMESAN C, 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change [J]. Annu Rev Ecol Evol Syst, 37: 637–669.
- PHILLIPS SJ, ANDERSON RP, SCHAPIRE RE, 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions [J]. Ecol Model, 190(3–4): 231–259.
- QIN DH, CHEN ZL, LUO Y, et al., 2017. Updated understanding of climate change sciences [J]. Adv Clim Change Res, 3(2): 63–73. [秦大河, 陈振林, 罗勇, 等, 2007. 气候变化科学的最新认知 [J]. 气候变化研究进展, 3(2): 63–73.]
- QIU HJ, SUN JJ, XU D, et al., 2020. MaxEnt model-based prediction of potential distribution of *Liriodendron chinense* in China [J]. J Zhejiang A & F Univ, 37(1): 1–8. [邱浩杰, 孙杰杰, 徐达, 等, 2020. 基于 MaxEnt 模型预测鹅掌楸在中国的潜在分布区 [J]. 浙江农林大学学报, 37(1): 1–8.]
- SHEN YP, WANG GY, 2013. Key findings and assessment results of IPCC WGI Fifth Assessment Report [J]. J Glaciol Geocryol, 35(5): 1068–1076. [沈永平, 王国亚, 2013. IPCC 第一工作组第五次评估报告对全球气候变化认知的最新科学要点 [J]. 冰川冻土, 35(5): 1068–1076.]
- SHI MZ, 2011. The influence of the global climate change on forests in China [J]. Chin Popul Resour Environ, 21(7): 68–72. [时明芝, 2011. 全球气候变化对中国森林影响的研究进展 [J]. 中国人口·资源与环境, 21(7): 68–72.]
- TAN X, ZHANG L, ZHANG AP, et al., 2018. The suitable distribution area of *Tsuga longibracteata* revealed by a climate and spatial constraint model under future climate change scenarios [J]. Acta Ecol Sin, 38(24): 8934–8945. [谭雪, 张林, 张爱平, 等, 2018. 孑遗植物长苞铁杉(*Tsuga longibracteata*) 分布格局对未来气候变化的响应 [J]. 生态学报, 38(24): 8934–8945.]
- THOMAS CD, CAMERON A, GREEN RE, et al., 2004. Extinction risk from climate change [J]. Nature, 427(6970): 145–148.
- TRIFINOPOULOS J, NGUYEN LT, HAESELER A, et al., 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis [J]. Nucl Acid Res, 44(W1): W232–W235.
- XU ZL, PENG HH, PENG SZ, 2015. The development and evaluation of species distribution models [J]. Acta Ecol Sin, 35(2): 557–567. [许仲林, 彭焕华, 彭守璋, 2015. 物种分布模型的发展及评价方法 [J]. 生态学报, 35(2): 557–567.]
- YANG CP, ZHAO X, WANG JW, et al., 2020. Predicting the future cultivation regions of *Cyrtotrachelus buqueti* using MaxEnt model under climate change in China [J]. J Sichuan Agric Univ, 38(6): 755–763. [杨春平, 赵霞, 王嘉雯, 等, 2020. 基于 MaxEnt 模型的长足大竹象在中国潜在分布区及其对气候变化的响应 [J]. 四川农业大学学报, 38(6): 755–763.]
- YANG JB, TANG M, LI HT, et al., 2013. Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses [J]. BMC Evol Biol, 13(1): 84.
- ZHANG JQ, XU ZP, WAN T, et al., 2019. Study on potential distribution areas of *Gymnocarpus przewalskii* in China under future climatic conditions [J]. J Plant Resour Environ, 28(3): 51–57. [张佳琦, 徐振朋, 宛涛, 等, 2019. 未来气候条件下裸果木在中国的潜在分布区研究 [J]. 植物资源与环境学报, 28(3): 51–57.]
- ZHANG T, HU W, JIA TJ, et al., 2022. Prediction of potential distribution of *Sophora flavescens* in China under climate change [J]. Guihaia, 42(2): 349–362. [张涛, 胡苑, 贾天娇, 等, 2022. 气候变化条件下苦参在我国潜在分布区的预测分析 [J]. 广西植物, 42(2): 349–362.]
- ZHOU HT, NA XD, ZANG SY, et al., 2016. Applications of maximum entropy (MaxEnt) model in species habitat study [J]. Environ Sci Manage, 41(3): 149–151. [周海涛, 那晓东, 臧淑英, 等, 2016. 最大熵(MaxEnt)模型在物种栖息地研究中的应用 [J]. 环境科学与管理, 41(3): 149–151.]
- ZHOU Y, YI YJ, YANG YF, et al., 2019. Predicting geographical distributions of *Homonoia riparia* Lour by using maximum entropy [J]. Water Resour Hydropower Eng, 50(10): 73–81. [周扬, 易雨君, 杨雨风, 等, 2019. 基于最大熵模型预测水杨柳的潜在生境分布 [J]. 水利水电技术, 50(10): 73–81.]
- ZHU MJ, MIAO J, ZHAO XL, 2020. Simulation of potential distribution of *Uria* in China based on maximum entropy model [J]. Plant Sci J, 38(4): 476–482. [朱梦婕, 缪佳, 赵雪利, 2020. 基于最大熵模型的狸尾豆属植物在中国的潜在分布区模拟 [J]. 植物科学学报, 38(4): 476–482.]

(责任编辑 李 莉 王登惠)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202110045

杨乐, 聂聪, 龙小琴, 等, 2023. 铁皮石斛 SPL 膜结合 (STM) 转录因子的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1041–1050.

YANG L, NIE C, LONG XQ, et al., 2023. Genome-wide identification and expression analysis of SPL with transmembrane motif (STM) transcription factor in *Dendrobium officinale* [J]. *Guihaia*, 43(6): 1041–1050.



铁皮石斛 SPL 膜结合 (STM) 转录因子的 全基因组鉴定及表达分析

杨 乐, 聂 聪, 龙小琴, 何基泽, 颜超越, 朱乾坤, 王万军*

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 成都 610031)

摘 要: SPL 转录因子广泛参与植物生长发育、胁迫响应等过程。目前, 没有关于铁皮石斛 SPL 膜结合 (SPL with transmembrane motif) 转录因子即 STM 转录因子的研究。为了探究 STM 转录因子在铁皮石斛生长发育及胁迫响应等方面的作用, 该文在铁皮石斛全基因组水平鉴定出 4 个 STM 转录因子, 并对 *DoSTM* 基因家族成员进行生物信息学分析, 又利用逆转录 PCR 研究了 *DoSTM* 在不同组织部位及不同逆境处理下的表达情况。结果表明: (1) *DoSTM1*–4 为亲水蛋白, 均具有 SBP 保守结构域和一些激素响应位点。(2) 4 个 *DoSTM* 在根茎叶中均有表达, *DoSTM2* 在叶中的相对表达量最低; *DoSTM1/3/4* 的相对表达水平均无明显差异。(3) *DoSTM1*–4 在低温、高温、干旱胁迫下的相对表达水平都有显著变化, *DoSTM1/3/4* 的表达量降低最为明显, 故推测 *DoSTM* 与植物体内激素响应、温度变化响应及抗旱性有关。这些结论为后续进一步开展铁皮石斛 STM 转录因子的研究提供了参考。

关键词: 铁皮石斛, STM 转录因子, 基因鉴定, 功能分析, 基因表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1041-10

Genome-wide identification and expression analysis of SPL with transmembrane motif (STM) transcription factor in *Dendrobium officinale*

YANG Le, NIE Cong, LONG Xiaoqin, HE Jize, YAN Chaoyue,
ZHU Qiankun, WANG Wanjun*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: SPL transcription factors are widely involved in plant growth and development, stress response and so on. At present, there is no study on the STM (SPL with transmembrane motif) transcription factor in *Dendrobium officinale*. In

收稿日期: 2022-01-02

基金项目: 国家自然科学基金 (31900164); 中央高校基本科研业务费 (2682021CX121); 西南交大个性化实验项目 (GX2021160027)。

第一作者: 杨乐 (1997-), 硕士, 主要从事植物生长发育与次生代谢研究, (E-mail) 2295402195@qq.com。

*通信作者: 王万军, 博士, 教授, 主要从事植物生长发育与次生代谢研究, (E-mail) wanjunwang@home.swjtu.edu.cn。

order to explore the role of STM in the growth, development and stress response of *D. officinale*, four STM transcription factors were identified at the whole genome of *D. officinale*, and bioinformatics analysis of *DoSTM* gene family members were carried out. The expression of *DoSTM* in different tissue parts and different stress treatments were studied by reverse transcription PCR. The results were as follows: (1) *DoSTM*1–4 were hydrophilic proteins with SBP conserved domains and some hormone response sites. (2) Four *DoSTM* were expressed in root, stem and leaf, and the relative expression of *DoSTM*2 was the lowest in leaf; there was no significant differences in the relative expression level of *DoSTM*1/3/4. (3) The relative expression level of *DoSTM*1–4 changed significantly under low temperature, high temperature and drought stress, and the expression of *DoSTM*1/3/4 decreased most significantly. Therefore, it is speculated that *DoSTM* is related to hormone response, temperature change response and drought resistance in plants. These conclusions provide the reference for the further research on STM transcription factor of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*, STM transcription factor, gene identification, functional analysis, gene expression

石斛主要分布在东南亚和大洋洲的热带及亚热带地区,喜生长在温暖潮湿的环境中,附着在树干或岩石上(罗凯等,2021)。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科石斛属多年生草本植物,具有极高药用价值,是一种药食两用中药材,其成分主要包括多糖类、生物碱类、黄酮类以及酚酸类等,在抗肿瘤和增强免疫力等方面具有功效(唐文文等,2021)。近年来由于过度挖采导致野生资源大量减少,故从分子水平研究铁皮石斛的生长发育对其保育有重要意义(曾丹琦等,2021)。

SPL(squamous promoter binding protein like)基因家族作为植物特有的一类转录因子,主要通过结合下游基因启动子区的顺式作用元件来调控下游基因表达。SPL转录因子在植物的生长发育、信号传导、胁迫响应等方面有着重要的作用(吴艳等,2019)。这类转录因子最早在金鱼草中被发现(Huijser et al., 1992)。之后有更多研究发现 SPL 转录因子在植物生长发育以及在胁迫响应中起着重要作用(Yu et al., 2015; Xu et al., 2016)。在甘蓝型油菜的愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角果中有大量 *BoSPL* 表达,并且这些基因可能在甘蓝耐寒性中起重要作用(Shan et al., 2021)。据最近报道,拟南芥 *SPLs* 可能参与其从幼年到成年的营养转化、生殖期的形态变化、花青素生物合成和防御胁迫(Jiang et al., 2021)。其中,*SPL3* 在花序和花器官的发育中发挥重要作用(Gandikota et al., 2007),在各种低磷胁迫反应以及低磷条件下磷饥饿诱导基因表达中都有 *SPL1* 的参与介导(雷凯健等,2016)。

转录因子的研究是植物分子生物学的重要内容,在植物抗逆等方面起着重要作用。转录因子和基因顺式作用元件的相互作用激活了相关抗逆基因的表达,提高了植物的抗逆性。有一类特殊的转录因子存在,因其含有一段跨膜区被称为膜结合转录因子,可直接整合在细胞内的膜结构上(如细胞质膜、内质网膜、核膜等),一般处于休眠状态,当受到外界环境变化刺激后,膜结合转录因子便从膜上释放,转变为激活状态,并转运到细胞核内行使功能(王楠等,2016)。SPL 转录因子中也有这类膜结合转录因子,且目前并没有专门研究 SPL 膜结合转录因子的报道,因此,本研究通过 BLASTP 在铁皮石斛全基因组中鉴定出 4 个 SPL 膜结合转录因子,命名为 *DoSTM* (SPL with transmembrane motif)转录因子,并进行后续生物信息学及表达分析。

1 材料与方法

1.1 材料

将铁皮石斛幼苗分别置于 1/2MS 培养基、含 100 mmol · L⁻¹ NaCl 的 1/2MS 液体培养基、含 5 μmol · L⁻¹ 脱落酸的 1/2MS 液体培养基、质量分数为 10% PEG 的 1/2MS 液体培养基、40 ℃ 1/2MS 液体培养基、4 ℃ 1/2MS 液体培养基中处理 6 h,吸干水分后将幼苗按 200~300 mg 装入 1.5 mL 离心管中,并做好标记,迅速置于液氮中 1 min,取出放入 -80 ℃ 冰箱保存待用。以盆栽铁皮石斛幼嫩的根茎叶组织作为原材料,进行根茎叶差异表达分析。

1.2 试剂

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(北京擎科)、琼脂糖(北京擎科)、2×TSINGKE Master Mix(北京擎科)、RNA 无酶水(北京擎科)、PrimeScript™ II 1st Strand cDNASynthesis Kit 试剂盒(宝生物)、50×TAE(上海生工)。

1.3 方法

1.3.1 铁皮石斛 STM 蛋白的理化性质及亚细胞定位分析 从 NCBI 数据库中下载拟南芥 STM 蛋白序列,将物种限定在铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)并进行 BLAST 搜索,下载搜索到的铁皮石斛的 STM 蛋白序列,去除冗余序列,利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜结构域,最终选取 XP_020685848、XP_020681923、XP_020672795、XP_020688542 这 4 个蛋白进行研究,并分别命名为 DoSTM1、DoSTM2、DoSTM3、DoSTM4。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析铁皮石斛 STM 蛋白家族的理化性质。用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) (Chou & Shen, 2007) 对 DoSTM 蛋白家族进行亚细胞定位分析。

1.3.2 铁皮石斛 STM 家族的系统进化树分析 从 NCBI 数据库中下载野蕉(*Musa balbisiana*)、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)、毛白杨(*Populus tomentosa*)、扇形文心兰(*Erycina pusilla*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、生姜(*Zingiber officinale*)的 STM 蛋白序列 Fasta 格式。用 MEGA-X 邻近法构建进化树,序列比对采用 ClustalW,选择 Bootstrap method, Bootstrap replications 选择 500, Model 选择 p-distance, Gaps/Missing Data Treatment 选择 Partial deletion, Site Coverage Cutoff 设定为 50,进行建树。建树结果在 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 中进行美化。

1.3.3 铁皮石斛 STM 蛋白质二级结构预测 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线网站对铁皮石斛 STM 蛋白质的二级结构进行分析,参数为默认值。

1.3.4 铁皮石斛 STM 蛋白质序列比对及保守基序分析 将 4 个 DoSTM 蛋白导入 MEME (Bailey & Elkan et al., 1994) 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 进行分析,将 motifs 的

数量设定在 10,其他参数默认,进行分析。将铁皮石斛 STM 蛋白序列 Fasta 格式导入 MEGA-X 中进行构树,序列比对采用 ClustalW,选择 Bootstrap method, Bootstrap replications 选择 500, Model 选择 p-distance, Gaps/Missing Data Treatment 选择 Partial deletion, Site Coverage Cutoff 设定为 50,进行构树。从 NCBI 数据库中下载铁皮石斛 STM 蛋白的 CDD,利用 TBtools (Chen et al., 2020) 对 DoSTM 保守基序、保守结构域、进化树进行绘图。将铁皮石斛 STM 蛋白的 ClustalW 比对结果导入 ESPript 3.0 在线网站 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 进行分析。

1.3.5 铁皮石斛 STM 基因结构及顺式作用元件分析 从 NCBI 数据库中下载铁皮石斛的基因组信息,用 TBtools 进行基因结构绘制,同时获得启动子上游 2 000 bp 的序列信息,获得的序列信息用 PlantCARE (Lescot et al., 2002) 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测,并用 TBtools 进行绘图。

1.3.6 引物设计 利用 4 个 DoSTM 的 cDNA 序列,将所得的 cDNA 序列用 Primer-BLAST 进行引物设计,引物大小设定为 18~22 bp, PCR 产物大小设定为 400~800 bp,其他参数均为默认参数,在输出的引物中选择靠近 3'端的作为试验所用引物,选用 EF1-α 做内参,相应的引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
DoSTM1	F: GTCTATCAGCGTCTCTGCC R: CGCGCATAGTCTTCAGGACT
DoSTM2	F: CTTTCTGATGCAATCGGGCG R: ATAAGGCATGTTGACGGCCA
DoSTM3	F: TGAGCCGAGCACTGAAGAAG R: GGAGCACCTCGGAAGAACAA
DoSTM4	F: AGCACTGATTGTGGGCATGA R: ATGCAAGTCAGGAAGCTCA
EF1-α	F: CCACCACCCCCAAATACTCC R: TCCCTAACAGCGAAACGTCC

1.3.7 铁皮石斛 STM 基因表达分析 将铁皮石斛幼苗分别置于 1/2MS 液体培养基、含 100 mmol · L⁻¹ NaCl 的 1/2MS 液体培养基、含 5 μmol · L⁻¹ 脱落酸的 1/2MS 液体培养基、含 10% PEG 的 1/2MS 液

体培养基、40 ℃ 1/2MS 液体培养基、4 ℃ 1/2MS 液体培养基中处理 6 h,迅速置于液氮中 1 min,取出放入-80 ℃ 冰箱保存待用。首先,用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 6 种处理的铁皮石斛幼苗的 RNA 和铁皮石斛幼苗根茎叶的 RNA,并用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成。然后,以 cDNA 第一链为模板,2×TSINGKE Master Mix 及引物进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:98 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 15s,72 ℃ 延伸 1 min,变性-退火-延伸 30 个循环;72 ℃ 继续延伸 10 min。最后,进行 1% 凝胶电泳,拍照记录电泳条带。

1.3.8 数据处理及分析 用 ImageJ 测定电泳条带的灰度值,Excel 对所得灰度值进行处理,将处理后的数据导入 GraphPad Prism 5 中进行分析及作图,分析方法选用 Students *t*-test,显著水平均设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 STM 蛋白家族理化性质及亚细胞定位分析

DoSTM 蛋白家族的理化性质分析结果表明,DoSTM1-4 的氨基酸数目分别为 1 025、977、1 104、830,相对分子质量分别为 113.53、109.09、121.67、93.177;等电点 pI 在 6.07~8.06 之间;不稳定系数在 44.37~58.41 之间,较为不稳定;脂肪系数在 78.15~83.04 之间;总平均亲水系数均为负数,在-0.405~-0.335 之间,表明 DoSTM 蛋白均为亲水蛋白质(表 2)。亚细胞定位预测结果显示 DoSTM1-3 定位在细胞核,DoSTM4 定位在叶绿体。将筛选到的铁皮石斛 STM 蛋白 DoSTM1-4 进行跨膜结构域预测(图 1),结果显示跨膜结构域位于 C 末端 22 个氨基酸残基处。

表 2 DoSTM 蛋白家族理化性质
Table 2 Physical and chemical properties of DoSTM protein family

基因符号 Gene symbol	基因名称 Gene name	蛋白 ID Protein ID	氨基酸大小 Amino acid size (aa)	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 pI	不稳定系数 Instability coefficient	脂肪系数 Fat coefficient	总平均 亲水系数 GRAVY
LOC110102024	<i>DoSTM1</i>	XP_020685848	1 025	113.53	6.79	55.34	80.40	-0.347
LOC110099183	<i>DoSTM2</i>	XP_020681923	977	109.09	8.06	50.08	82.72	-0.335
LOC110092545	<i>DoSTM3</i>	XP_020672795	1 104	121.67	6.64	58.41	78.15	-0.405
LOC110103975	<i>DoSTM4</i>	XP_020688542	830	93.177	6.07	44.37	83.04	-0.280

2.2 铁皮石斛 STM 基因家族的系统进化分析

系统进化分析显示 9 个物种的 34 个 STM 蛋白聚为 4 组(A-D)(图 2),A 组的 STM 蛋白共有 3 个,B 组的 STM 蛋白共有 6 个,C 组的 STM 蛋白共有 9 个,D 组的 STM 蛋白共有 16 个。其中,DoSTM1-2 蛋白共同聚类在 B 组,有可能是较近发生的基因复制事件所造成;DoSTM4 聚类在 C 组;DoSTM3 蛋白聚类在 D 组。

2.3 铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构

对 DoSTM 蛋白质的二级结构进行分析,二级结构占比如表 3 所示,二级结构图如图 3 所示。结果表明,铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构包括 α 螺旋、伸展链、β 转角和无规卷曲,其中,铁皮石斛 STM 蛋白的 α 螺旋占比为 28.62%~33.76%,伸展链占比为 11.68%~14.70%,β 转角占比为 4.09%~

4.78%,无规卷曲占比为 49.56%~55.34%。

2.4 铁皮石斛 STM 家族蛋白结构分析

对 4 个 DoSTM 蛋白进行多序列比对(图 4),结果显示 DoSTM1-2 蛋白序列同源性较高。DoSTM 蛋白的保守基序分析结果表明 4 个 DoSTM 蛋白均有 SBP 保守结构域,而 DoSTM1/3 还同时包含 Ank_2 superfamily,DoSTM2 则还包含 ANKYR(图 5)。同源的 DoSTM1 与 DoSTM2 含有 motif 1-10,而 DoSTM3 与其相比缺少 motif 7/10,DoSTM4 不仅缺少 motif 7/10,还缺少 motif 3/4(图 5)。表明 4 个 DoSTM 的蛋白结构并不高度保守。

2.5 铁皮石斛 STM 基因结构及顺式作用元件分析

DoSTM 基因结构分析如图 6 所示,发现 4 个 *DoSTM* 均有 10 个编码区(由于 gff3 未注释 UTR,故未标识非编码区)。顺式作用元件分析发现 4 个

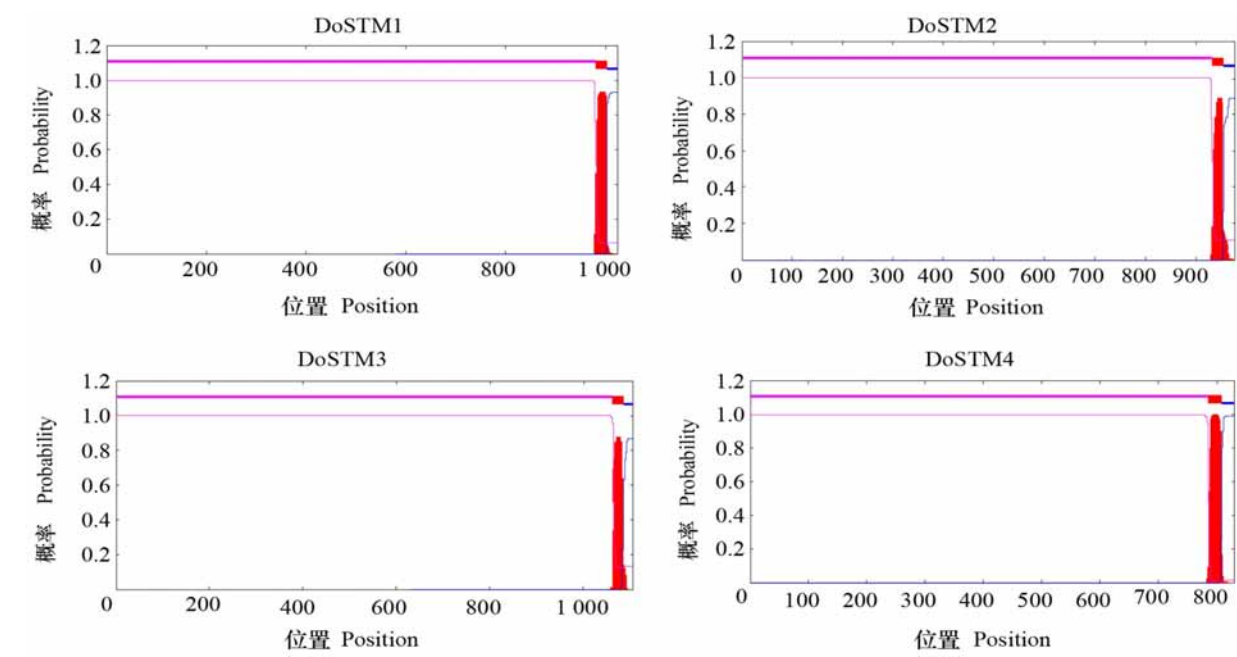
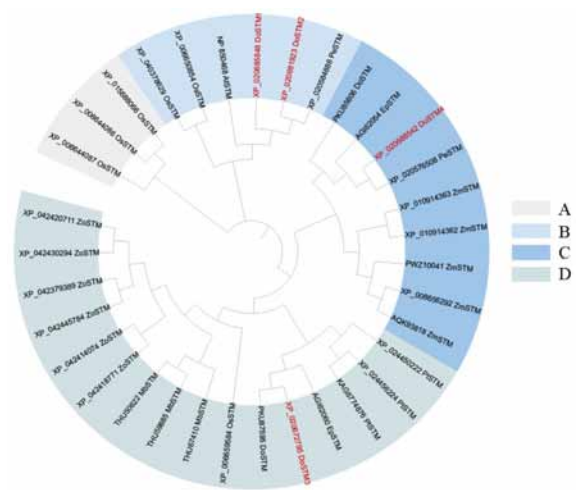


图 1 DoSTM 蛋白跨膜结构预测

Fig. 1 DoSTM protein transmembrane structure prediction



Mb. 野蕉; Do. 铁皮石斛; At. 拟南芥; Pe. 蝴蝶兰; Pt. 毛白杨; Eg. 油棕; Ep. 扇形文心兰; Zm. 玉米; Os. 水稻; Zo. 生姜。

Mb. *Musa balbisiana*; Do. *Dendrobium officinale*; At. *Arabidopsis thaliana*; Pe. *Phalaenopsis equestris*; Pt. *Populus tomentosa*; Eg. *Elaeis guineensis*; Ep. *Erysina pusilla*; Zm. *Zea mays*; Os. *Oryza sativa*; Zo. *Zingiber officinale*.

图 2 9 种植物 STM 蛋白进化关系

Fig. 2 Evolutionary relationship of STM proteins in nine plants

DoSTM 中均有光响应区和光响应元件, 其中 *DoSTM1-3* 共同包含茉莉酸甲酯响应区, 而防御应

表 3 铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构占比

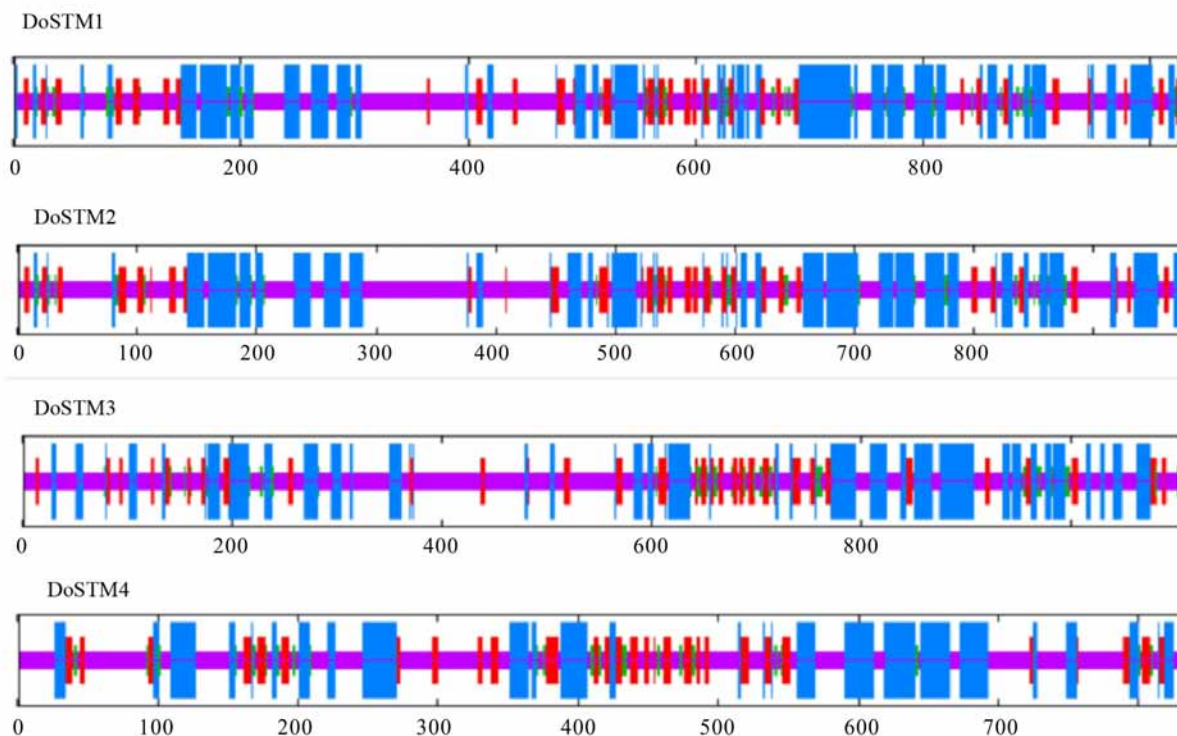
Table 3 Proportion of secondary structure of *Dendrobium officinale* STM protein

基因名称 Gene name	α 螺旋 α -helix (%)	伸展链 Extended strand (%)	β 转角 β -angle (%)	无规卷曲 Random coil (%)
<i>DoSTM1</i>	33.76	11.90	4.78	49.56
<i>DoSTM2</i>	33.06	12.08	4.09	50.77
<i>DoSTM3</i>	28.62	11.68	4.53	55.34
<i>DoSTM4</i>	29.52	14.70	4.58	51.20

急响应只在 *DoSTM2/4* 中具备, 除此之外 *DoSTM4* 还含有生长素响应元件(图 7)。而 *DoSTM1* 则可以对脱落酸作出响应, *DoSTM3* 作为包含顺式作用元件最多的 STM 蛋白, 它还可以对赤霉素、水杨酸、生长素及低温作出响应。

2.6 铁皮石斛 STM 的表达分析

2.6.1 铁皮石斛 STM 在根茎叶中的表达情况 我们对 *DoSTM* 在根茎叶 3 个不同器官的相对表达水平进行了分析(图 8)。本研究发现, *DoSTM* 在根茎叶中均有表达, *DoSTM2* 在叶中的相对表达量显著降低, 而在茎中的表达水平则无明显差异, *DoSTM1/3/4* 的相对表达水平均无明显差异, *DoSTM1* 在茎和叶中的表达量相差无几, 但略高于



蓝色代表 α 螺旋, 红色代表伸展链, 绿色代表 β 转角, 紫色代表无规卷曲。

Blue represents α -helix, red represents extended strand, green represents β -angle, and purple represents random coil.

图 3 SOPMA 预测的 DoSTM 蛋白二级结构

Fig. 3 Secondary structure of DoSTM protein predicted by SOPMA

根, 而 *DoSTM3-4* 则在叶中的相对表达水平高于茎, 且都低于根。

2.6.2 铁皮石斛 STM 在胁迫处理下的表达情况

铁皮石斛多生长在悬崖峭壁, 会受到多种非生物胁迫, STM 转录因子也有被报道参与多种抗逆反应 (王楠等, 2016), 故本研究进一步分析了 *DoSTM* 在不同胁迫条件下的表达情况 (图 9)。结果表明, *DoSTM1* 在 4 °C 低温、40 °C 高温和 10% PEG 胁迫处理下的相对表达水平低于对照组, 而在 ABA 胁迫处理下的相对表达水平无显著差异, 但 NaCl 胁迫处理下, 表达量略有降低; *DoSTM2* 在 4 °C 低温和 40 °C 高温胁迫处理下的相对表达水平与对照组相比显著降低, 在脱落酸、NaCl、10% PEG 胁迫处理下无明显差异; *DoSTM3* 在 NaCl、4 °C 低温和 40 °C 高温胁迫处理下的相对表达水平与对照组相比显著降低, 在脱落酸和 10% PEG 胁迫处理下与对照组相比稍有差异; 与 *DoSTM3* 相似的是, *DoSTM4* 在 4 °C 低温和 40 °C 高温胁迫处理下

有显著变化, 在脱落酸胁迫处理下也发生显著变化, 但在 NaCl 胁迫处理下并无明显差异。

3 讨论与结论

本研究从铁皮石斛基因组上鉴定出 4 个 STM 蛋白序列, 对 4 个 STM 编码的蛋白进行生物信息学分析。结果表明, 4 个 DoSTM 蛋白均为亲水蛋白质; *DoSTM1/3/4* 的等电点均小于 7, *DoSTM2* 则大于 7, 这一点与大部分 STM 蛋白家族成员的理论等电点大于 7 有出入 (张晓红等, 2016; 刘闯等, 2017; 祁香宁等, 2018)。SPL 基因家族蛋白含有 1 个高度保守的 SBP-BOX 结构域, 它是 SPL 蛋白和 DNA 分子特异性结合所必需的。这与我们在保守结构域预测时的发现一致。

李豆等 (2021) 将白桦 *BpSPL6* 基因启动子驱动 *GUS* 基因在转基因拟南芥营养生长期的根尖及根的其他部位表达, 发现在营养生长期其在根

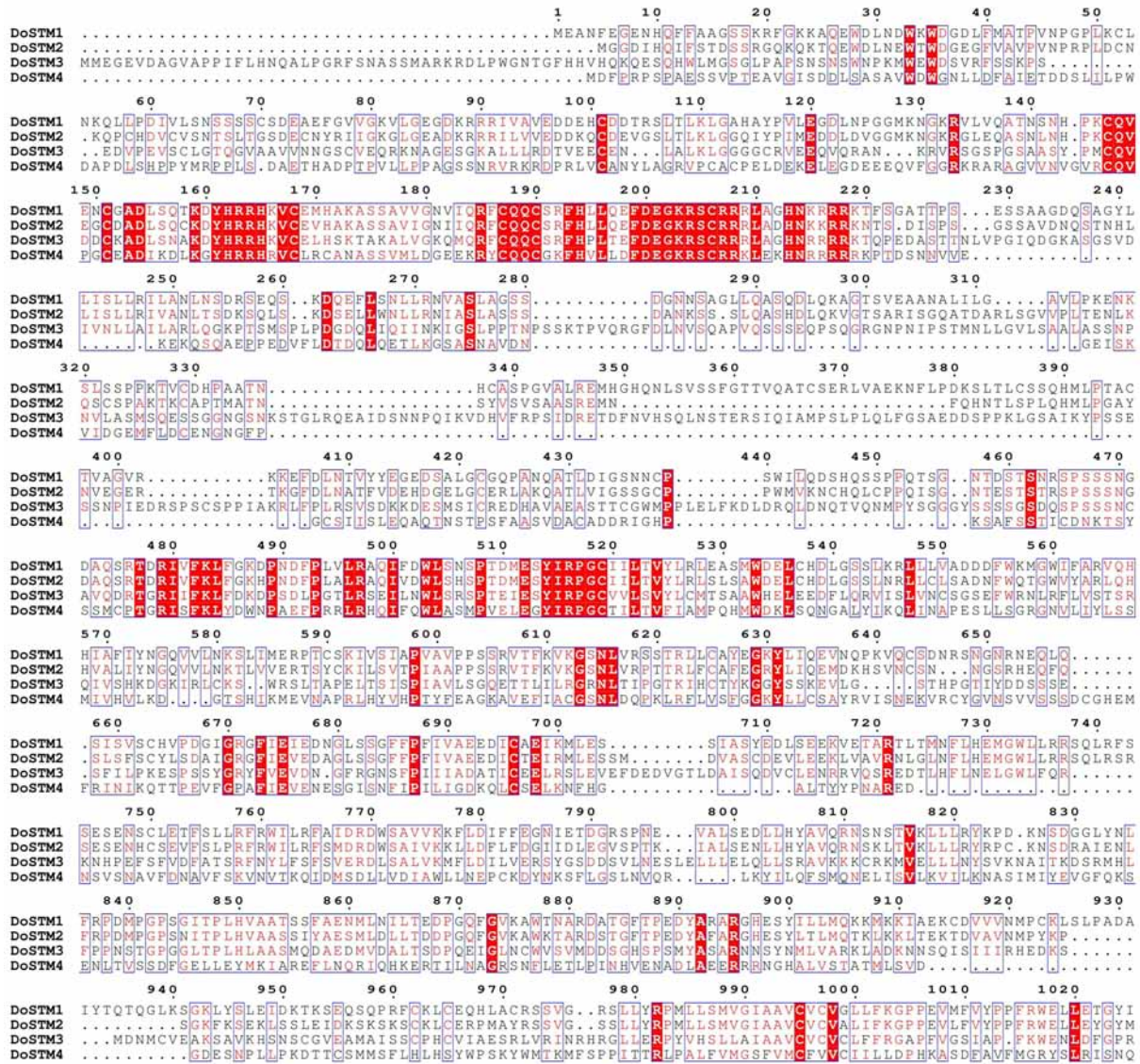


图 4 DoSTM 蛋白的多重序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of DoSTM protein

部的表达也随植物的生长逐渐增加,与前人研究一致,故他推测 *BpSPL6* 基因可能在植物的根发育过程中起作用。这与我们测得 *DoSTM2-4* 在根中的相对表达水平略高一致,推测 *DoSTM* 可能参与根的发育。

激素参与了植物生长发育的各个方面,已有多项研究表明 *SPL* 基因参与植物的激素响应过程。对白桦 *BpSPL6* 基因启动子的顺式作用元件分析表明(李豆等,2021),其启动子区含有 10 种激素响应元件(生长素、赤霉素、水杨酸、脱落酸等)。这与我们得到的 *DoSTM* 顺式作用元件分析

结果类似,并且与在脱落酸胁迫条件下 *DoSTM3-4* 的相对表达水平发生显著变化一致。利用 RNA-seq 研究发现拟南芥 *SPL10* 对茉莉酸、水杨酸和生长素等激素响应过程有广泛影响。*AtSPL10* 通过调节生长素的生物合成抑制根的再生(Ye et al., 2020)。赤霉素通过调节茎分生组织中的 *AtSPL3-5* 基因促进开花(Galvão et al., 2012)。在 *DoSTM* 启动子上也发现了多种激素响应元件,故推测 *DoSTM* 可能参与多种激素响应。

大量研究表明 *SPL* 基因能够响应低温、高温等非生物胁迫的信号。如 Stief 等(2014)发现在

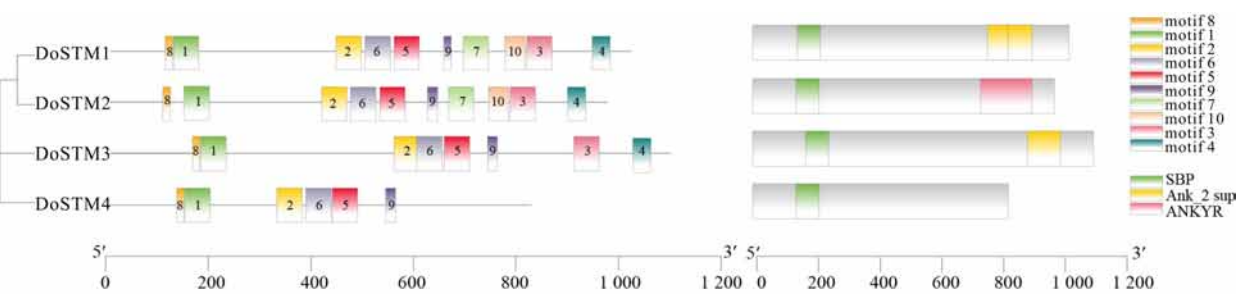
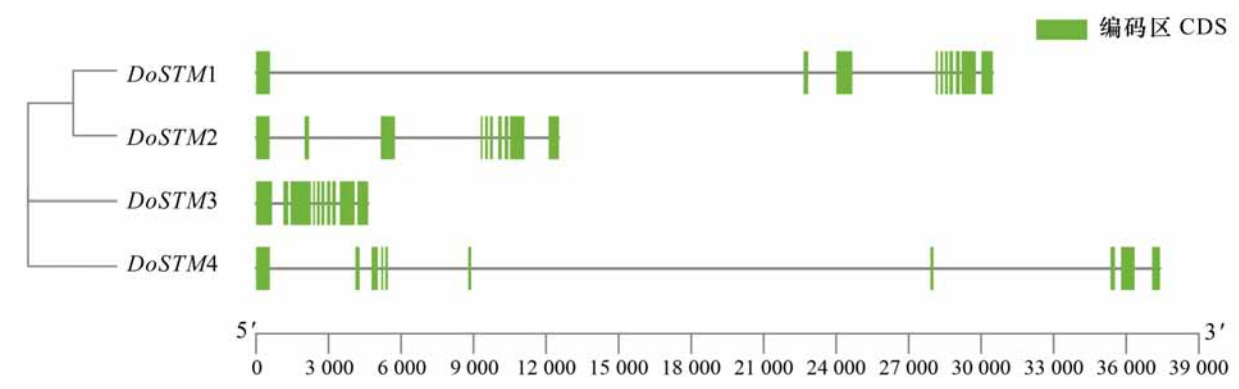


图 5 DoSTM 蛋白保守基序预测
Fig. 5 Conserved motif prediction of DoSTM protein



CDS 表示编码区,黑线表示内含子。
CDS indicates coding region and black line indicates intron.

图 6 DoSTM 基因结构
Fig. 6 DoSTM gene structure

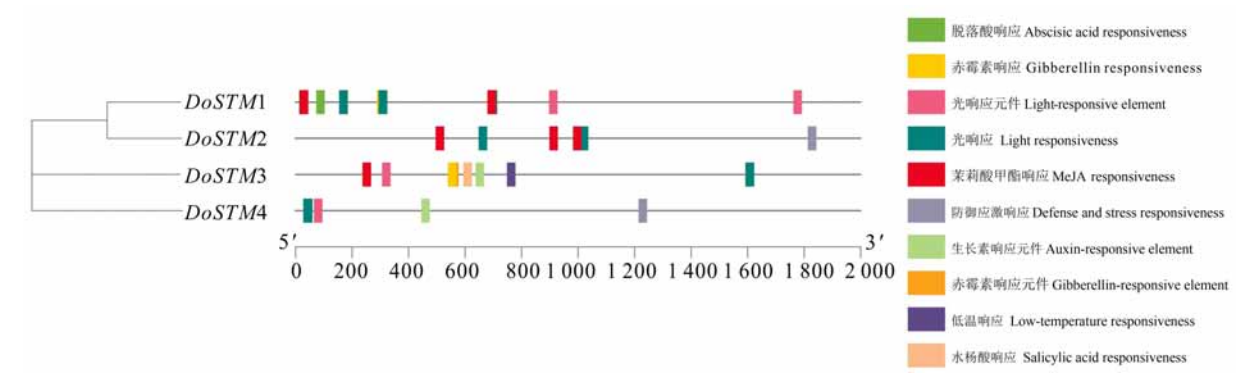
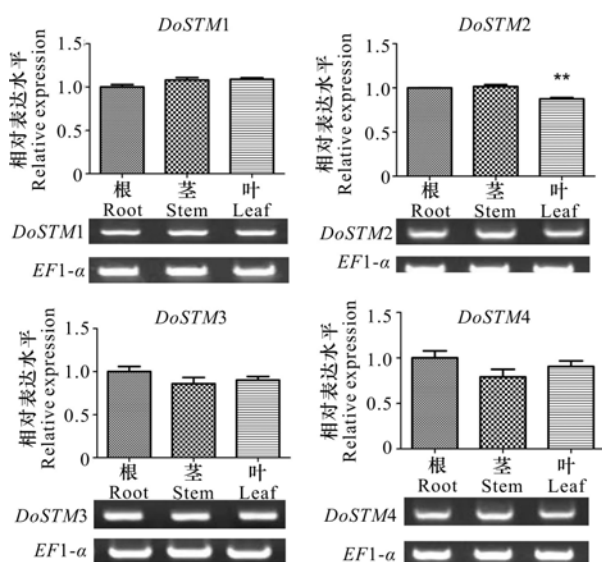


图 7 DoSTM 顺式作用元件分析
Fig. 7 Analysis of *cis*-acting elements of DoSTM

高温条件下, *SPL2/9/11* 基因被 *miR156-f* 和 *miR156-h* 调控使其表达降低,进而延长植物对高温胁迫的耐受性。除高温条件外,葡萄对低温条件也较敏感,在低温条件下 (5 ℃),体内的 *VvSBP3* 和 *VvSBP5* 表达均被上调,而 *VvSBP4* 和 *VvSBP7* 表达明显被下调,表明 *VvSBP3* 和 *VvSBP5* 参与葡萄的低温胁迫反应 (吴艳等,2019)。这与 *DoSTM1-4* 在低温、高温胁迫条件下的相对表达量



EF1- α 为内参。** 表示 $P < 0.01$, $n = 3$ 。

EF1- α is an internal reference. ** indicates $P < 0.01$, $n = 3$.

图 8 *DoSTM* 在根茎叶中的相对表达水平

Fig. 8 Relative expression levels of *DoSTM* in root, stem and leaf

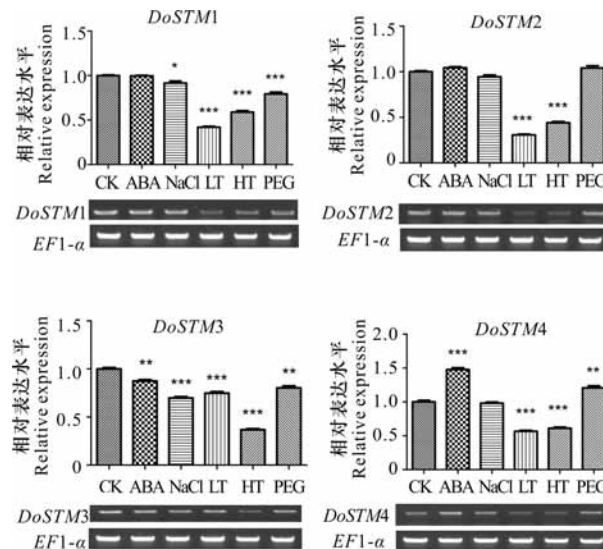
发生显著变化一致。

对白桦 *BpSPL6* 转基因拟南芥进行了 NaCl 和 PEG 胁迫实验,发现受到胁迫后,其表达量有下降(李豆等,2021),与我们观测到的在 PEG 胁迫条件下,*DoSTM* 的相对表达水平显著下调一致,推测 *DoSTM* 很可能参与植物的干旱胁迫响应。崔扬等(2019)发现玉米遭受干旱胁迫时,*ZmSPL16* 在根中的表达量显著上调,这与 *DoSTM4* 结果一致,但与 *DoSTM1/3* 不一致,具体原因有待进一步研究。

本研究在铁皮石斛全基因组水平鉴定出 4 个 STM,生物信息学分析显示他们均为亲水蛋白,大部分定位在细胞核,都具有高度保守的 SBP 结构域以及与激素响应有关的顺式作用元件。表达分析显示他们在根中的表达量略高于茎和叶,胁迫分析显示其在低温、高温及干旱胁迫下相对表达水平显著变化,且部分 *DoSTM* 可以对脱落酸作出响应。以上研究结果为进一步研究 *DoSTM* 转录因子的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

BAILEY TL, ELKAN C, 1994. Fitting a mixture model by



CK. 对照; NaCl. 含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h; ABA. 含 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的脱落酸的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h; PEG. 含 10% PEG 的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h; HT. 40°C 1/2MS 液体培养基中培养 6 h; LT. 4°C 1/2MS 液体培养基中培养 6 h; EF1- α 为内参。

* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$, $n = 3$ 。CK. Control; NaCl. Cultured in 1/2MS liquid medium containing $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl for 6 h; ABA. Cultured in 1/2MS liquid medium containing $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ abscisic acid for 6 h; PEG. 1/2MS liquid medium containing 10% PEG cultured in medium for 6 h; HT. Cultivated in 40°C 1/2MS liquid medium for 6 h; LT. Cultivated in 4°C 1/2MS liquid medium for 6 h; EF1- α is an internal reference. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$, $n = 3$.

图 9 *DoSTM* 在胁迫处理 6 h 下的相对表达水平

Fig. 9 Relative expression levels of *DoSTM* under stress treatments for 6 h

expectation maximization to discover motifs in biopolymers [J]. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol; 28-36.

CHOU KC, SHEN HB, 2007. Large-scale plant protein subcellular location prediction [J]. J Cell Biochem, 100(3): 665-78.

CHEN CG, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 13(8): 1194-1202.

CUI Y, FENG YH, CHEN ZF, et al., 2019. Cloning and functional identification of maize transcription factor *ZmSPL16* [J]. Mol Plant Breed, 17(20): 6583-6589. [崔扬, 冯彦辉, 陈众峰, 等, 2019. 玉米转录因子 *ZmSTM16* 的克隆与功能鉴定 [J]. 分子植物育种, 17(20): 6583-6589.]

GALVÃO VC, HORRER D, KÜTTNER F, et al., 2012. Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis*

- thaliana* [J]. Development, 139(21): 4072–4082.
- GANDIKOTA M, BIRKENBIHL RP, HOHMANN S, et al., 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings [J]. Plant J, 49(4): 683–693.
- HUIJSER P, KLEIN J, LÖNNIG WE, et al., 1992. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS – box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus* [J]. EMBO J, 11(4): 1239–1249.
- JIANG XW, CHEN P, ZHANG XW, et al., 2021. Comparative analysis of the SPL gene family in five Rosaceae species: *Fragaria vesca*, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Rubus occidentalis*, and *Pyrus pyrifolia* [J]. Open Life Sci, 16(1): 160–171.
- LUO K, LI ZS, BAI YB, et al., 2021. Current situation of diversity utilization and protection of *Dendrobium* [J]. Heilongjiang Agric Sci, (8): 85–89. [罗凯, 李泽生, 白燕冰, 等, 2021. 石斛兰多样性利用及保护现状 [J]. 黑龙江农业科学, (8): 85–89.]
- LEI KJ, REN J, ZHU YY, et al., 2016. *Arabidopsis* SPL1 gene is involved in regulating rhizosphere acidification under low phosphorus conditions [J]. Acta Bot Sin, 51(2): 184–193. [雷凯健, 任晶, 朱园园, 等, 2016. 拟南芥 SPL1 基因参与调节低磷条件下的根际酸化反应 [J]. 植物学报, 51(2): 184–193.]
- LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, et al., 2002. Plant CARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences [J]. Nucl Acids Res, 30(1): 325–7.
- LI D, SU GB, HU XQ, et al., 2021. Cloning and expression analysis of *BpSPL6* gene promoter of *Betula platyphylla* [J]. J Beijing For Univ. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1932.S.20210610.0948.001.html>. [李豆, 苏功博, 胡晓晴, 等, 2021. 白桦 *BpSPL6* 基因启动子的克隆及表达分析 [J]. 北京林业大学学报. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1932.S.20210610.0948.001.html>.]
- LIU C, 2017. Identification of 18 *Betula platyphylla* STMs genes and functional analysis of *BpSPL8* gene [D]. Harbin: Northeast Forestry University. [刘闯, 2017. 18 个白桦 STMs 基因的鉴定及 *BpSPL8* 基因的功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- QI XN, 2018. Identification, evolution and expression analysis of *Actinidia sinensis* SBP-box transcription factor gene [D]. Yangling: Northwest A & F University. [祁香宁, 2018. 猕猴桃 SBP-box 转录因子基因的鉴定、进化及其表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- SHAN X, ZHANG W, HUANG JX, et al., 2021. Identification and characterization of SPL transcription factor family reveals organization and chilling-responsive patterns in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) [J]. Agronomy, 11(7): 1445–1445.
- STIEF A, ALTMANN S, HOFFMANN K, et al., 2014. *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors [J]. Plant Cell, 26(4): 1792–1807.
- TANG WW, XIA JL, CHEN Y, 2021. Functional components, antioxidant activity and correlation of stem, leaf and flower of *Dendrobium officinale* [J]. Food Mach, 37(7): 45–50. [唐文文, 夏俊丽, 陈垣, 2021. 铁皮石斛茎、叶、花功能性成分、抗氧化活性及其相关性 [J]. 食品与机械, 37(7): 45–50.]
- WANG N, XIANG FN, LI S, 2016. Advance in plant membrane-bound transcription factors and stress response [J]. Chin Bull Life Sci, 28(7): 799–806. [王楠, 向凤宁, 李朔, 2016. 植物膜结合转录因子与胁迫响应 [J]. 生命科学, 28(7): 799–806.]
- WU Y, HOU ZH, CHENG Q, et al., 2019. Research progress of SPL transcription factors [J]. Soybean Sci, 38(2): 304–310. [吴艳, 侯智红, 程群, 等, 2019. SPL 转录因子的研究进展 [J]. 大豆科学, 38(2): 304–310.]
- XU ML, HU TQ, ZHAO JF, et al., 2016. Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS Genet, 12(8): e1006263.
- YE BB, SHANG GD, PAN Y, et al., 2020. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration [J]. Plant Cell, 32(1): 226–241.
- YU ZX, WANG LJ, ZHAO B, et al., 2015. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors [J]. Mol Plant, 8(1): 98–110.
- YANG ZT, XIONG ML, JIAN Y, et al., 2018. Research progress on the activation mechanism of membrane-bound transcription factors in endoplasmic reticulum stress [J]. Mol Plant Breed, 16(24): 8028–8033. [杨正婷, 熊孟连, 简燕, 等, 2018. 内质网应激中膜结合转录因子的活化机制研究进展 [J]. 分子植物育种, 16(24): 8028–8033.]
- ZENG DQ, ZHANG MZ, HE CM, et al., 2021. Identification and analysis of WOX transcription factors in *Dendrobium officinale* [J]. J Trop Subtrop Plants, 29(3): 301–310. [曾丹琦, 张明泽, 何春梅, 等, 2021. 铁皮石斛 WOX 转录因子的鉴定和分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 29(3): 301–310.]
- ZHANG XH, 2016. Functional study and regulatory analysis of flowering related genes in upland cotton [D]. Yangling: Northwest A & F University. [张晓红, 2016. 陆地棉开花相关基因的功能研究及调控分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202205014

魏春梅, 孟丹晨, 李凡, 等, 2023. 滇水金凤花距发育相关基因 *ABP* 的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1051–1058.
WEI CM, MENG DC, LI F, et al., 2023. Cloning and expression analysis of *ABP* gene related to spur development in *Impatiens uliginosa* [J]. *Guihaia*, 43(6): 1051–1058.



滇水金凤花距发育相关基因 *ABP* 的克隆及表达分析

魏春梅, 孟丹晨, 李 凡, 向南星, 杨建园, 黄美娟, 黄海泉*

(西南林业大学 园林园艺学院, 国家林业和草原局西南风景园林工程技术工程研究中心, 云南省功能性花卉资源及产业化技术工程研究中心, 西南林业大学园林园艺花卉研发中心, 昆明 650224)

摘 要: 为探究滇水金凤(*Impatiens uliginosa*) *ABP* 基因的结构和表达特征, 该研究以滇水金凤为材料, 采用 RT-PCR 技术对滇水金凤 *ABP* 基因进行克隆, 运用 DNAMAN 和 MEGA 对其所编码的蛋白序列进行同源性和系统进化分析, 并利用 qRT-PCR 分析 *ABP* 基因的时空表达模式。结果表明: (1) 滇水金凤 *ABP* 基因的 cDNA 全长为 627 bp, 编码 208 aa, 命名为 *IuABP* 基因, 其蛋白具有 Cupin 超家族蛋白的典型结构。(2) 同源性分析表明滇水金凤 *ABP* 基因的氨基酸序列与喜马拉雅凤仙花(*I. glandulifera*)、月季(*Rose chinensis*)、木薯(*Manihot esculenta*)等物种的同源性均达 71%; 系统进化分析表明 *IuABP* 与喜马拉雅凤仙花(*Impatiens glandulifera*)聚为一支, 亲缘关系最近。(3) qRT-PCR 分析表明 *IuABP* 基因在滇水金凤花距发育的 3 个时期及 2 个部位均有表达。随着花距的发育, *IuABP* 基因在滇水金凤花距檐部的表达量呈先下降后上升的趋势, 在盛花期时达最高, 而在花距距部的表达量逐渐下降。以上结果为进一步研究滇水金凤 *ABP* 基因在花距发育中的功能及其表达调控机制提供了一定的理论参考。

关键词: 滇水金凤, 花距发育, *ABP* 基因, 基因克隆, 表达分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1051-08

Cloning and expression analysis of *ABP* gene related to spur development in *Impatiens uliginosa*

WEI Chunmei, MENG Danchen, LI Fan, XIANG Nanxing,
YANG Jianyuan, HUANG Meijuan, HUANG Haiquan*

(College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture (State Forestry and Grassland Administration), Yunnan Engineering Research Center for Functional Flower Resources and Industrialization, Research and Development Center of Landscape Plants and Horticulture Flowers, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The purpose of this study was to explore the structural and expression characteristics of *ABP* gene from *Impatiens uliginosa*. *ABP* gene related to spur development of *I. uliginosa* was cloned by using RT-PCR method, whose

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: 国家自然科学基金(32060364, 32060366, 31860230, 31560228); 云南省重大科技专项(202102AE090052); 云南省高校园林植物与观赏园艺科技创新团队项目(51700204); 云南省园林植物遗传改良与高效繁育博士生导师团队项目; 云南省中青年学术技术带头人培养项目(2018HB024)。

第一作者: 魏春梅(1998-), 硕士, 研究方向为园林植物资源与应用, (E-mail) weichunmei@swfu.edu.cn。

*通信作者: 黄海泉, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为园林植物研究, (E-mail) haiquanl@163.com。

homology and phylogenetic analyses of protein sequence were analyzed by using DNAMAN and MEGA softwares. In addition, the spatiotemporal expression patterns of *ABP* gene were investigated by qRT-PCR method. The results were as follows: (1) *ABP* gene of *I. uliginosa* was successfully cloned, whose full-length cDNA sequences was 627 bp, encoding 208 aa, and named *IuABP*. The protein encoded by *ABP* gene had the typical structure of Cupin superfamily proteins. (2) According to the result of its homology analysis, it showed that the homology of *ABP* gene of *I. uliginosa* reached 71% with those of *I. glandulifera*, *Rose chinensis* and *Manihot esculenta*. Based on phylogenetic analysis, it was found that *IuABP* and *Impatiens glandulifera* clustered into a branch, with the most close genetic relationship. (3) qRT-PCR analysis showed that the *IuABP* were expressed in both three stages and two different parts of spur development of *I. uliginosa*. With the development of spur, the expression level of *IuABP* in the blade had a tendency of declining at the beginning and rising up later, and reached the highest in the blooming stage, while the expression level decreased gradually in the spur cup. These results provide a theoretical reference for further studies on the function and the expression regulation mechanism of *IuABP* gene in spur development.

Key words: *Impatiens uliginosa*, spur development, *ABP* gene, gene cloning, expression analysis

花距是植物进化的结果,它不仅能提高植物的传粉效率和繁殖成功率(童祯开等,2022),还造成某些植物发育谱系的迅速多样化(Hodges & Arnold, 1995),成为调节生物入侵的重要性状(Vervoort et al., 2011)。开展植物花距的研究,不仅能够判断物种形成和进化的机制,还能更加了解植物与传粉者个体之间的相互作用(Hodges et al., 2003; Fernández-Mazuecos & Glover, 2017)。Puzey 等(2011)对耬斗菜花距组织和细胞水平进行观测,结果表明耬斗菜花距的伸长生长主要依赖于细胞的各向异性扩张。Mack 和 Davis(2015)对红排草(*Centranthus ruber*)的研究也发现其花距的伸长主要是通过表皮细胞的各向异性生长。然而,Tsai 等(2018)对两种天竺葵属植物(*Pelargonium ionidiflorum* 和 *P. odoratissimum*)的花距研究发现,花托生长速度的加快和发育时间的延长是花距形成的主要原因;Cullen 等(2018)认为细胞分裂是柳穿鱼属(*Linaria*)花距长度变化的主要原因,这与植物花距的伸长主要是通过细胞各向异性实现的观点形成鲜明对比。此外,研究还发现某些调控细胞分裂和伸长的基因也参与了花距发育的调控,如在耬斗菜花距杯中表达量较高的 *TCP*、*ARF6/8* 和 *BEH* 基因,通过 VIGS 病毒对其进行沉默后,花距杯内的细胞分裂与细胞扩张的平衡被扰乱,最终导致花距变短并且向内弯曲生长(Yant et al., 2015; Zhang et al., 2020; Stephanie et al., 2021)。综上表明,植物花距的伸长生长不仅依赖于细胞分裂与细胞各向异性的扩张,而且花距发育相关基因 *ABP*、*TCP*、*ARF*

及 *BEH* 对花距的细胞分裂与伸长也起重要作用。

ABP(auxin binding protein)是一种生长素受体,包括 *ABP I*、*ABP II*、*ABP III*,以及生长素运输抑制剂 NPA 的结合蛋白 4 类,在植物体内广泛分布。*ABP* 基因参与质膜上生长素的响应过程,还参与调控细胞扩增、细胞扩张以及细胞周期等快速反应(乔麟轶等,2012)。研究发现,*ABP1* 基因在苎麻的幼茎和芽中大量表达;*ABP1* 基因在玉米幼苗中表达较高,而在根内的表达较低;在烟草植物细胞生长比较活跃的时期,*ABP1* 基因的表达量极高,而在细胞快结束分化时的表达较低,并且 *ABP* 基因在细胞中不同位置的分布存在较大的差异(高启祥等,2001;黄好等,2008)。*ABP* 基因不仅具有在植物生长较快的组织器官中表达量较高的特点,还能介导生长素诱导的细胞扩张,进而调控植株大小。在烟草中,诱导拟南芥 *ABP1* 基因过表达能够促进叶表皮细胞的扩张,组成型 *ABP1* 基因在玉米或烟草的悬浮细胞中,过表达 *ABP1* 基因能够正向调节细胞尺寸(Jones et al., 1998)。此外,对拟南芥组织叶片中的 *ABP1* 进行下调,能导致细胞的体积缩小(Braun et al., 2008);而当拟南芥胚中的 *ABP1* 基因缺失后,胚内细胞不能正常扩张且细胞直径均等(Chen et al., 2001)。由此发现 *ABP1* 基因在植物细胞分裂、细胞体积增大及分生组织伸长方面具有重要意义。

滇水金凤(*Impatiens uliginosa*)是凤仙花科(Balsaminaceae)凤仙花属(*Impatiens*)的一年或多年生植物,具有分布广、生长快、生物量大、周年开花、抗逆性强等特点,全草可入药,也可用于染指

甲,是具有观赏、生态、药用以及经济价值的重要花卉材料(Luo et al., 2019)。滇水金凤作为观赏植物不仅具有花色多样、花形奇特的特点,其花距的长短、数量及颜色各异还具有很好的研究价值。迄今为止,国内外尚未见有关滇水金凤 *ABP* 基因的相关报道。因此,在滇水金凤中克隆 *ABP* 基因并分析其分子机制及表达特征,对深入研究其在花距发育中的调控机制具有重要意义。本研究在课题组前期滇水金凤转录组测序的基础上,对滇水金凤花距发育相关基因 *ABP* 进行克隆,借助在线软件与 qRT-PCR 分析,利用生物信息学方法,通过对 *ABP* 基因的进化关系、结构特征、组织表达等进行分析,拟探讨以下问题:(1)滇水金凤 *ABP* 蛋白亲缘进化关系;(2)该蛋白的基本理化性质和结构特征;(3)滇水金凤 *ABP* 基因在花距发育的不同时期和不同部位中的表达模式。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为西南林业大学后山试验大棚的滇水金凤,采取其花苞期(S1)、始花期(S2)和盛花期(S3)的花距距部和花距檐部进行目的基因的 qRT-PCR 实验(图1)。

1.2 总 RNA 的提取与 *ABP* 基因的克隆

利用 RNA 提取试剂盒(OMEGA)提取滇水金凤花器官总 RNA;根据逆转录试剂盒(全式金)将 RNA 逆转录成 cDNA,保存在-20℃条件下备用。

以滇水金凤转录组中的 *IuABP* 基因为依据,对引物进行设计,并送往生工合成。引物为 *IuABPF* (5'-ATGTTGCGCCTCGTTTTTC-3')、*IuABPR* (5'-TTAATTGGTTCCTCCAAGAACACC-3')。以滇水金凤花距的 cDNA 为模板进行 *ABP* 基因的 cDNA 扩增,扩增体系为 20 μL,反应条件:95℃ 5 min;95℃ 5 s,56℃ 30 s,72℃ 48 s,35 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。PCR 产物经回收纯化后,与载体 pMD19-T 连接,转化 DH5α 感受态细胞,最后挑选阳性菌液送生工测序。

1.3 滇水金凤 *ABP* 基因序列分析

运用 ExPasy 在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)对滇水金凤 *IuABP* 基因的基本理化特性进行分析;借助 SMART 在线工具([\[smart.embl-heidelberg.de/\]\(http://smart.embl-heidelberg.de/\)\)来预测 *IuABP* 基因结构域;运用 Target P \(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>\)预测 *IuABP* 蛋白的亚细胞定位;借助 SWISS-MODEL \(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>\)预测 *IuABP* 蛋白的三维空间结构;利用 DNAMAN v9.0 对 *IuABP* 蛋白进行比对分析;运用 MEGA-X 软件的邻接法\(Bootstrap = 1 000\)进行系统进化分析。](http://</p></div><div data-bbox=)

1.4 滇水金凤 *ABP* 时空表达模式分析

分别提取滇水金凤 3 个时期(花苞期、始花期、盛花期)和 2 个部位(檐部和距部)花距器官的 RNA,逆转录合成的 cDNA 备用。*IuABP* 基因 qRT-PCR 引物为 *qABPF* (5'-CGGGCTTTGTGGCTCAATAC3')、*qABPR* (5'-TTCGCAAACAGCGCGAAATC'),内参基因为 *IuActin* [*ActinF* (5'-TGAATGTCCCTGCTGTTTG-3')、*ActinR* (5'-ACCTTCCGCATAACTTTAC C-3')]。以 3 个时期的 2 个部位的 cDNA 为模板,借助 Light Cycler 480 II (Roche)实时定量 PCR 仪进行基因表达相对定量分析。反应体系为 20 μL,反应程序为预变性 95℃,5 min;变性 95℃,10 s,退火 60℃,20 s;延伸 72℃,20 s,40 个循环。每个样品进行 3 个重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。将盛花期花距距部定义为单位 1 作为对照,对 *IuABP* 基因在不同时期和不同部位的时空表达模式进行分析。

2 结果与分析

2.1 滇水金凤 *ABP* 基因的克隆及序列分析

根据滇水金凤花距转录组设计的特异性扩增引物,以花距器官的 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 克隆获得 *ABP* 的基因片段(图2:A)。

运用 ExPasy-ProtParam 对滇水金凤 *ABP* 基因编码的蛋白进行分析,*IuABP* 全长 627 bp,编码 208 aa,相对分子量为 22 108.6 Da,理论等电点为 6.95,总共包括 3 162 个原子,不稳定指数为 27.46,属于稳定蛋白。总平均亲疏水性指数为 0.405,表明该蛋白为疏水性蛋白。利用 SMART 分析发现 *IuABP* 含有一个典型的 Cupin-1 结构域(147 个氨基酸),E-value 为 7.85e-36,并含有一个 20 aa 的信号肽,说明该基因属于 Cupin 超家族成员(图2:B)。滇水金凤 *ABP* 基因不存在跨膜结构域,亚细胞定位于细胞壁。此外,借助 SWISS-MODEL 对滇水金凤 *ABP* 基因进行三维空间结构

的预测,发现 *IuABP* 蛋白具有 Cupin 超家族蛋白典型的小桶装折叠结构(图 2:C)。

2.2 滇水金凤 *ABP* 基因的系统进化分析

运用 NCBI 数据库中的 BlastP 功能,将 *IuABP* 基因编码的氨基酸序列与其他物种的 *ABP* 氨基酸序列进行在线比对,结果表明 *IuABP* 与喜马拉雅凤仙花(*Impatiens glandulifera* XP_047342663.1)、辣椒(*Capsicum annuum* XP_016567466.1)、桃(*Prunus persica* XP_007202573.1)、拟绒毛烟草(*Nicotiana tomentosiformis* XP_009600028.1)、野草莓(*Fragaria vesca* XP_004287628.1)、斑点猴面花(*Erythranthe guttata* XP_012830892.1)、美国山核桃(*Carya illinoensis* XP_042972396.1)、月季(*Rosa chinensis* XP_024182988.1)、胡桃(*Juglans regia* XP_018844294.1)、杨梅(*Morella rubra* KAB1209489.1)、开心果(*Pistacia vera* XP_031267949.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum* XP_006342915.1)、木薯(*Manihot esculenta* XP_021596589.1)、橡胶树(*Hevea brasiliensis* XP_021647439.1)的 *ABP* 蛋白同源,并且与它们具有较高的相似性。利用 DNAMAN v9.0 将 *IuABP* 和这些物种的氨基酸序列进行多序列比对,结果显示,*IuABP* 与其他物种的 *ABP* 蛋白具有较高的相似性,均达 71%(图 3)。进一步利用 MEGA-X 软件,采用邻接法(Bootstrap = 1 000)构建系统进化树,发现滇水金凤 *ABP* 基因与喜马拉雅凤仙花聚为一支,亲缘关系最近(图 4)。

2.3 滇水金凤 *ABP* 基因的时空表达分析

研究发现 *IuABP* 基因在滇水金凤花距发育的 3 个时期(花苞期、始花期和盛花期)及 2 个部位(檐部和距部)均有表达(图 5)。在滇水金凤花距檐部中,*IuABP* 基因的表达量呈先下降后上升的趋势,在盛花期时达最高;而在花距距部中,在花苞期时表达最高,随后逐渐下降。此外,*IuABP* 基因在滇水金凤盛花期檐部中表达量最高,其次是在花苞期檐部中,可能与 *IuABP* 基因在滇水金凤花距檐部的细胞生长与扩张中起重要作用有关。因此,可以推测 *IuABP* 基因在滇水金凤花距的细胞发育过程中发挥了重要作用。

3 讨论与结论

ABP 对植物细胞的分裂与伸长具有较为显著

的促进作用,因此逐渐被当作为一种生长素的潜在受体蛋白(张聪等,2018)。近年来,越来越多的 *ABP* 基因从不同植物中被分离克隆出来,并对其功能作用进行了研究。本研究从滇水金凤中成功克隆了花距发育相关基因 *IuABP*,其 cDNA 全长为 627 bp,编码 208 aa,属于疏水性稳定蛋白。Cupin 结构域的 β 折叠桶状结构,具有热稳定性,能够用来储存氨基酸(符霖等,2021)。本研究中 *IuABP* 基因具有典型的 Cupin-1 结构域,三维空间结构也具有典型的小桶状折叠结构,与任浩然等(2019)对月季 *RcABP19* 基因结构的研究结果一致,推测 *IuABP* 属于 Cupin 超家族,可能参与了花距发育所需的氨基酸的储存过程。同源性分析发现,滇水金凤 *ABP* 基因与桃、喜马拉雅凤仙花、月季等物种 *ABP* 基因的同源性较高,均达 71%。张巍等(2013)对桃 *ABP1* 进行了研究,发现在桃的果实发育过程中,存在 *ABP1* 介导的信号转导途径。大量研究表明 *ABP* 蛋白能够接收和转运生长素信号,并诱导细胞快速膨大和伸长等。因此,滇水金凤 *ABP* 蛋白是否与桃 *ABP1* 蛋白具有相似的功能仍需进一步探究。系统进化分析表明滇水金凤 *ABP* 基因与喜马拉雅凤仙花聚为一支,两者亲缘关系最近。

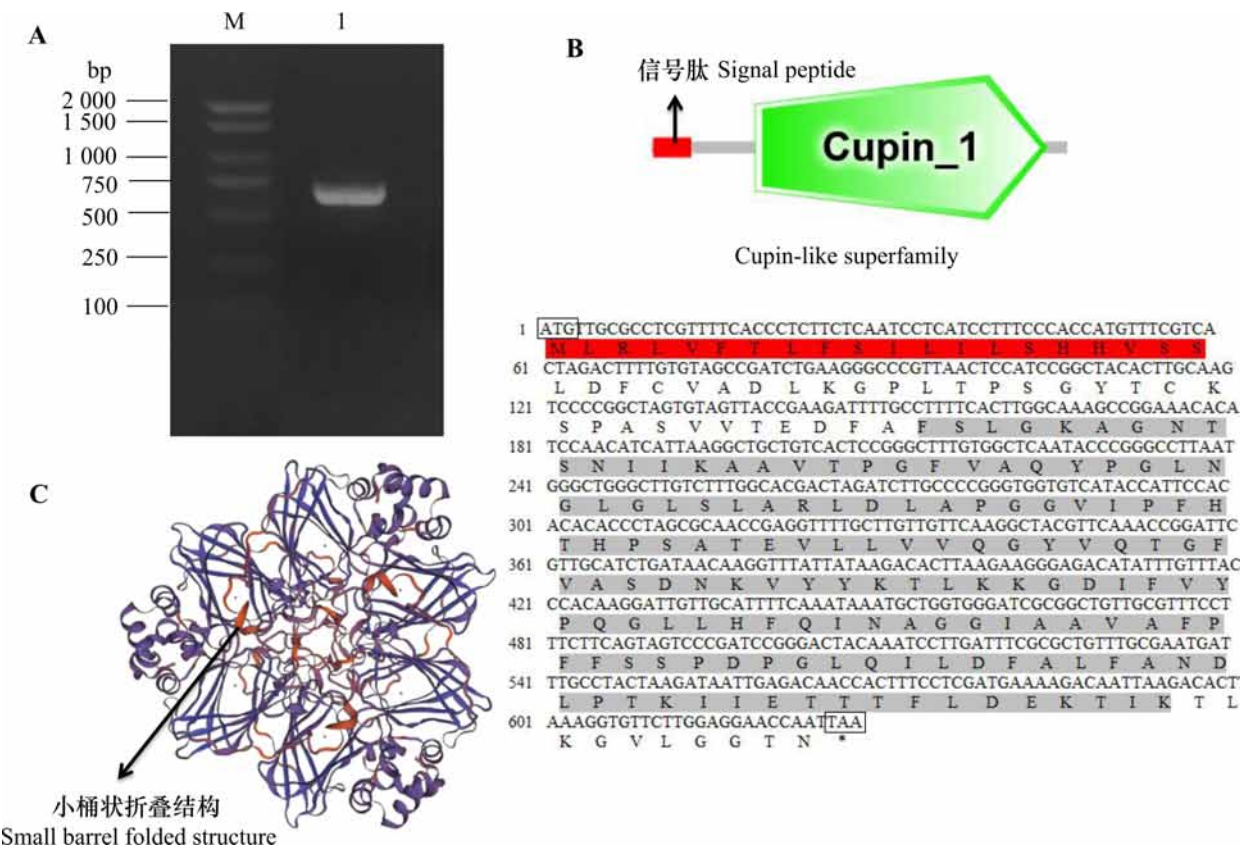
ABP1 作为生长素信号途径中的新受体,不仅能够调控非转录细胞质反应,还能诱导许多生长素早期应答基因的转录,如 *PLT*、*Aux/IAA* 以及 *ARF* 基因等,从而参与细胞扩张和细胞增殖、生长素反馈调控等过程(Chen et al., 2001; Kim & Triplett, 2004)。Steffens 等(2001)的研究发现,促使原生质体变得膨大的生长素信号是因为受到原生质体外面的 *ABP1* 基因诱导,玉米中的 *ABP1* 基因在烟草叶片中过量表达,能够提高细胞对生长素的敏感能力。本研究通过 qRT-PCR 分析发现,在滇水金凤檐部,*IuABP* 基因的表达量随着花距的发育逐渐上升,在盛花期达到最高;而在距部中,*IuABP* 基因的表达量在花苞期最高,随着花距的发育逐渐降低,这与 *ABP1* 基因在烟草细胞生长活跃的时期表达量较高,而在细胞快结束分化时表达较低的情况一致(高启祥等,2001)。*ABP* 基因在植物体不同部位的表达可能存在较大的差异,本研究中 *IuABP* 基因在滇水金凤花距的檐部和距部的表达情况相反,这说明 *IuABP* 基因在滇水金凤花距中的表达存在发育时期和组织特异性,推测



S1. 花苞期; S2. 始花期; S3. 盛花期。
S1. Bud stage; S2. Beginning flowering stage; S3. Blooming stage.

图 1 滇水金凤花发育 3 个关键时期及其唇瓣 2 个不同部位

Fig. 1 Three key stages of flower development and two different parts of flab in *Impatiens uliginosa*



A: M. Marker 2000; 1. *ABP*. B. *ABP* 蛋白的保守结构域。C. *ABP* 蛋白的空间结构预测。
A: M. Marker 2000; 1. *ABP*. B. Conserved domains of *ABP* protein. C. Spatial structure prediction of *ABP* protein.

图 2 滇水金凤 *ABP* 基因 PCR 扩增及序列分析

Fig. 2 PCR product of *ABP* gene and sequence analysis from *Impatiens uliginosa*

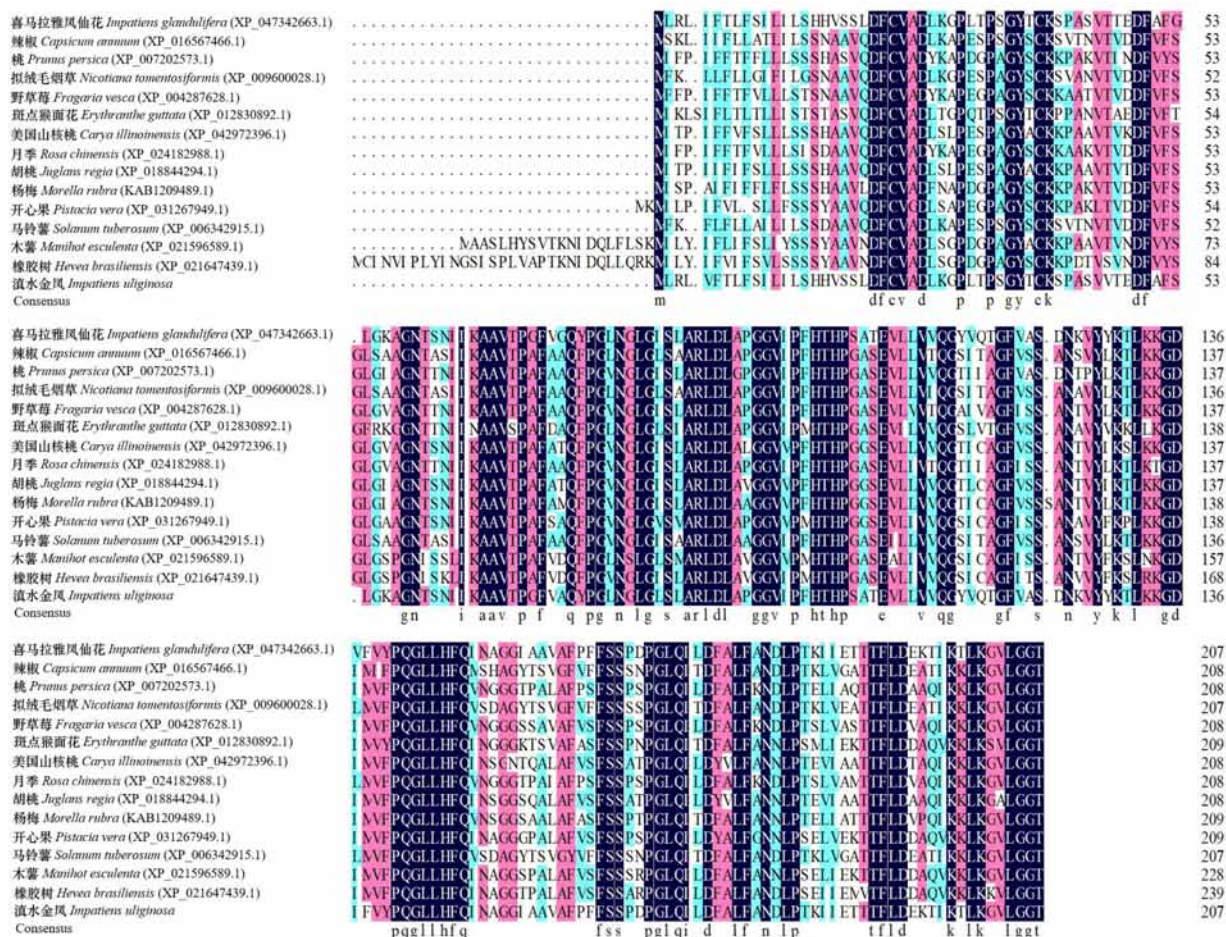


图3 ABP基因的同源氨基酸序列比对

Fig. 3 Homologous amino acid sequence alignment of ABP gene from *Impatiens uliginosa*

IuABP 基因在檐部和距部的作用机制可能不同 (乔麟轶等, 2012; 张巍等, 2013)。*IuABP* 基因在距部的表达模式可能是在始花期促进了细胞分裂与伸长, 而盛花期时其促进作用急剧减缓。综上所述, 推测 *IuABP* 基因在滇水金凤花距生长发育过程具有重要作用, 可能通过调控生长素来促进细胞的分裂与伸长进而参与调控花距的发育, 但具体的调控机制有待进一步探究。

本研究发现的 *IuABP* 基因属于滇水金凤 ABP 亚族新成员, 具有 Cupin 超家族典型的结构域。*IuABP* 基因荧光定量的结果表明 *IuABP* 基因对滇水金凤的花距细胞生长有促进作用, 但具体作用机制还需进一步探究。在今后的实验中, 可以利用 VIGS 对 *IuABP* 基因进行沉默, 验证 *IuABP* 基因在滇水金凤花距细胞生长发育中的功能。对本研

究的进一步探索不仅为探究滇水金凤花距发育的分子机制奠定研究基础, 还为凤仙花花距发育、花形改良及新品种培育提供一定的基础数据和理论依据。

参考文献:

- BRAUN N, WYRZYKOWSKA J, MULLER P, et al., 2008. Conditional repression of auxin binding protein 1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco [J]. *Plant Cell*, 20(10): 2746–2762.
- CHEN JG, SHIMOMURA S, SITBON F, et al., 2001. The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells [J]. *Plant J*, 28(6): 607–617.
- CHEN JG, ULLAH H, YOUNG JC, et al., 2001. ABP1 is

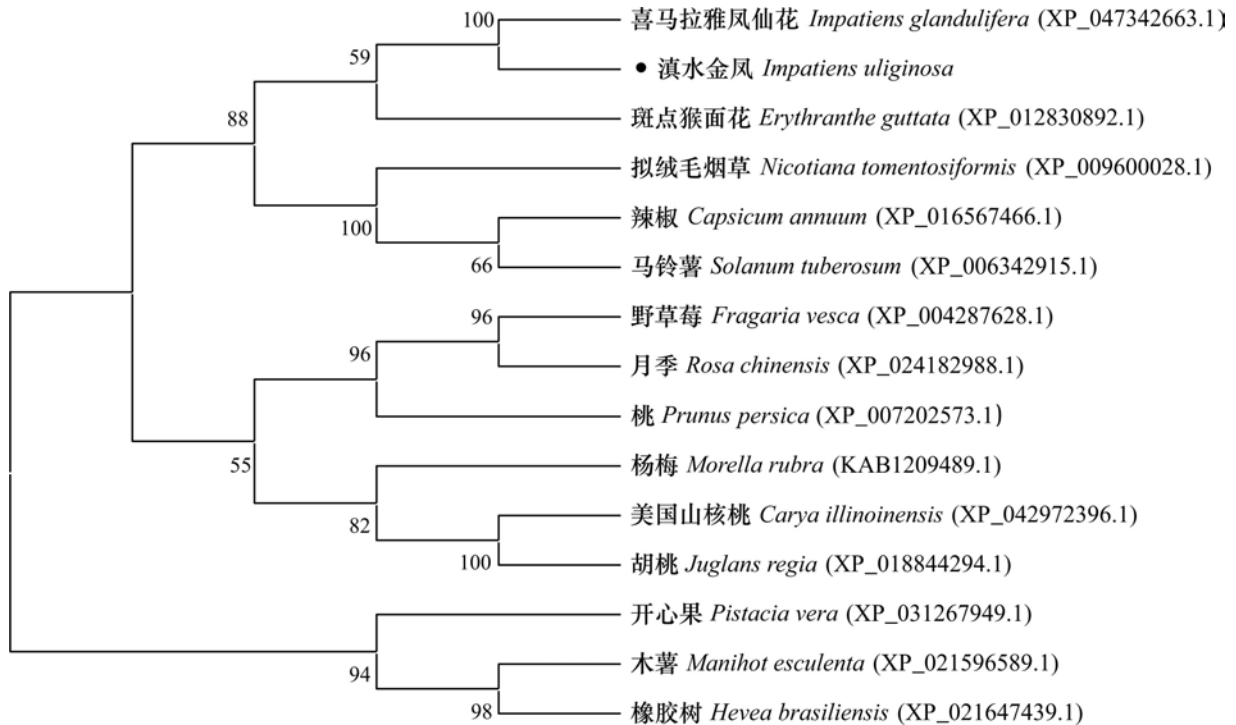
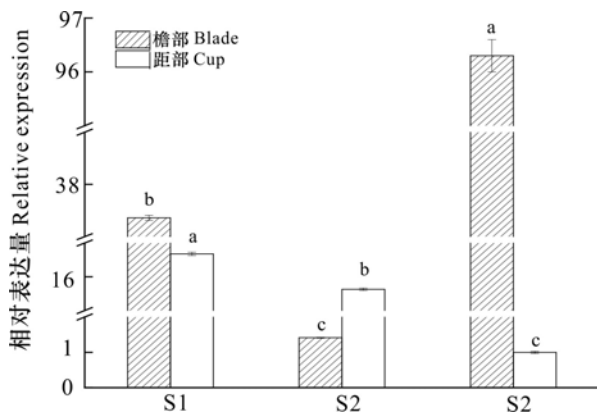


图 4 基于滇水金凤 *ABP* 基因氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *ABP* gene from *Impatiens uliginosa*



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 5 *ABP* 基因在滇水金凤 3 个关键时期及檐部 2 个部位的时空表达模式分析

Fig. 5 Spatio-temporal expression pattern analysis of *ABP* genes in three key flower development stages and two different parts of blade in *Impatiens uliginosa*

required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis embryogenesis* [J]. *Genes Dev*, 15 (7):

902–911.

CULLEN E, FERNÁNDEZ-MAZUECOS M, GLOVER BJ, 2018. Evolution of nectar spur length in a clade of *Linaria* reflects changes in cell division rather than in cell expansion [J]. *Ann Bot*, 122(5): 801–809.

FERNÁNDEZ-MAZUECOS M, GLOVER BJ, 2017. The evolution of plant speciation [J]. *Nat Ecol Evol*, 1(4): 11.

FU L, WANG HH, HUANG SL, et al., 2021. Alternative splicing of rice OsEnS51 and structural analysis of encoding protein [J/OL]. *Mol Plant Breed*. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210901.1702.006.html>. [符霖, 王慧慧, 黄思琳, 等, 2021. 水稻 OsEnS51 可变剪接及编码蛋白结构分析 [J/OL]. 分子植物育种. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210901.1702.006.html>.]

GAO QX, LI YZ, LIU SL, 2001. Distribution and expression of auxin binding protein 1 (ABP1) in the thin cell layers of tobacco [J]. *Acta Bot Sin*, 43(10): 1018–1023. [高启祥, 李颖章, 刘淑兰, 2001. 烟草薄层培养生长素结合蛋白 ABP1 的定位和 ABP1 在细胞分化中的变化 [J]. 植物学报, 43(10): 1018–1023.]

HODGES SA, ARNOLD ML, 1995. Spurring plant diversification: are floral nectar spurs a key innovation? [J]. *Proc Royal Soc Lond Series B Biol Sci*, 262(1365): 343–348.

- HODGES SA, FULTON M, YANG JY, et al., 2003. Verne grant and evolutionary studies of *Aquilegia* [J]. New Phytol, 161(3): 113–120.
- HUANG Y, LIU F, GUO QQ, et al., 2008. Cloning and expression of auxin-binding proteins 1 gene in ramie [*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud.] [J]. Acta Agron Sin, 34(8): 1358–1365. [黄妤, 刘峰, 郭清泉, 等, 2008. 苧麻生长素结合蛋白 ABP1 基因 cDNA 的克隆及表达 [J]. 作物学报, 34(8): 1358–1365.]
- JONES AM, IM KH, SAVKA MA, et al., 1998. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1 [J]. Science, 282 (5391): 1114–1117.
- KIM HJ, TRIPLETT BA, 2004. Characterization of GhRac1 GTPase expressed in developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers [J]. Biochim Biophys Acta, 1679(3): 214–221.
- LUO C, HUANG WL, ZHU JP, et al., 2019. The complete chloroplast genome of *Impatiens uliginosa* Franch., an endemic species in Southwest China [J]. Mitochondrial DNA B, 4(2): 3846–3847.
- MACK JL, DAVIS AR, 2015. The relationship between cell division and elongation during development of the nectar-yielding petal spur in *Centranthus ruber* (Valerianaceae) [J]. Ann Bot, 115(4): 641–649.
- PUZEY JR, GERBODE SJ, HODGES SA, et al., 2011. Evolution of spur-length diversity in *Aquilegia* petals is achieved solely through cell-shape anisotropy [J]. Proc Biol Sci, 279(1733): 1640–1645.
- QIAO LY, ZHANG WP, ZHANG L, et al., 2012. Research advances in auxin binding protein ABP1 [J]. Guangdong Agric Sci, 39(7): 230–232. [乔麟轶, 张文萍, 张磊, 等, 2012. 植物生长素结合蛋白 ABP1 的研究进展 [J]. 广东农业科学, 39(7): 230–232.]
- REN HR, FU XD, ZHI QJ, et al., 2019. Cloning and expression profile analysis of auxin binding protein gene *RcABP19* in *Rosa chinensis* [J]. Plant Physiol J, 55(7): 983–992. [任浩然, 傅晓东, 支秋娟, 等, 2019. 月季生长素结合蛋白基因 *RcABP19* 的克隆及表达特征分析 [J]. 植物生理学报, 55(7): 983–992.]
- STEFFENS B, FECKLER, PALME K, et al., 2001. The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1 [J]. Plant J, 27(6): 591–599.
- STEPHANIE JC, CRISTINA WC, KATE SB, 2021. Brassinosteroids regulate petal spur length in *Aquilegia* by controlling cell elongation [J]. Ann Bot, 128 (7): 931–942.
- TONG ZK, LI Y, CAI B, et al., 2022. Cloning and expression analysis of *SAUR* gene of *Impatiens uliginosa* Franch. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 42(1): 21–28. [童桢开, 李洋, 蔡斌, 等, 2022. 滇水金凤 *SAUR* 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 42(1): 21–28.]
- TSAI T, DIGGLE PK, FRYE HA, et al., 2018. Contrasting lengths of *Pelargonium* floral nectar tubes result from late differences in rate and duration of growth [J]. Ann Bot, 121(3): 549–560.
- VERVOORT A, JACQUEMART AL, CAWOY V, 2011. Comparative reproductive biology in co-occurring invasive and native *Impatiens* species [J]. Int J Plant Sci, 172(3): 366–377.
- YANT L, COLLANI S, PUZEY J, et al., 2015. Molecular basis for three-dimensional elaboration of the *Aquilegia* petal spur [J]. Proc Biol Sci, 282(1803): 20142778.
- ZHANG C, ZHAO KL, HU JJ, et al., 2018. Analysis of ABP1 family in *Arabidopsis thaliana* and Gramineae [J]. Mol Plant Breed, 16(11): 3526–3532. [张聪, 赵康路, 胡静静, 等, 2018. 拟南芥和禾本科植物 ABP1 家族分析 [J]. 分子植物育种, 16(11): 3526–3532.]
- ZHANG R, MIN Y, LYNN DH, et al., 2020. A role for the auxin response factors *ARF6* and *ARF8* homologs in petal spur elongation and nectary maturation in *Aquilegia* [J]. New Phytol, 227(5): 1392–1405.
- ZHANG W, SHI MY, YU J, et al., 2013. Cloning and expression analysis of auxin-binding proteins 1 from *Prunus persica* L. fruit [J]. J Beijing Agric Coll, 28(2): 1–4. [张巍, 史梦雅, 余佳, 等, 2013. 桃果实生长素结合蛋白 ABP1 的克隆及表达分析 [J]. 北京农学院学报, 28(2): 1–4.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202203084

李玲燕, 唐银, 钟明慧, 等, 2023. 缓释肥对杉木容器苗生长、光合生理和养分积累的影响 [J]. 广西植物, 43(6): 1059–1069.

LI LY, TANG Y, ZHONG MH, et al., 2023. Effects of slow-release fertilizer on growth, photosynthetic physiology and nutrient accumulation of container seedlings of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Guihaia, 43(6): 1059–1069.



缓释肥对杉木容器苗生长、光合生理和养分积累的影响

李玲燕^{1,2,3}, 唐 银^{1,2,3}, 钟明慧^{1,2,3}, 郑雪燕⁴, 许珊珊^{1,2,3}, 曹光球^{1,2,3}, 叶义全^{1,2,3*}

(1. 福建农林大学 林学院, 福州 350002; 2. 国家林业和草原局杉木工程技术研究中心, 福州 350002; 3. 林木逆境生理生态及分子生物学福建省高校重点实验室, 福州 350002; 4. 福建省洋口国有林场, 福建 南平 353200)

摘 要: 为探索杉木容器苗生长、光合特性及养分积累对不同缓释肥用量的响应特征, 该文通过设置 6 种不同缓释肥处理(0、200、400、800、1 000、1 200 $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), 研究不同缓释肥用量对杉木幼苗生长、光合色素含量、叶绿素荧光特性和养分含量的影响, 并结合隶属函数法对各生长和生理指标进行综合评价, 以期筛选出适合杉木容器苗生长的施肥水平, 为杉木优质苗木的高效培育提供参考。结果表明: (1) 与对照相比, 缓释肥处理可不同程度促进杉木幼苗苗高、地径生长及植株总生物量的积累。(2) 与对照相比, 缓释肥处理可显著增加杉木叶片叶绿素和类胡萝卜素含量, 提高叶片最大荧光(F_m)、可变荧光(F_v)、PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)、PS II 潜在光化学效率(F_v/F_o)和实际量子产量(QY)值。(3) 缓释肥处理可不同程度促进杉木幼苗养分的积累, 其中锰、铁和锌积累量变化最显著。(4) 隶属函数法分析结果表明, 当缓释肥用量为 1 000 $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 时其隶属值最大, 表明该处理下苗木综合生长状况最好。综上所述, 1 000 $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 缓释肥用量是适宜杉木壮苗培育的施肥量, 在该处理下通过促进植株体内与光合作用密切相关元素的积累, 增加叶片光合色素含量, 提高叶片 PS II 光化学效率和电子传递速率, 进而增强叶片对光能捕获和利用效率, 最终改善苗木生长。

关键词: 苗木培育, 缓释肥, 杉木, 叶绿素荧光参数, 容器苗, 苗木质量

中图分类号: Q945.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1059-11

Effects of slow-release fertilizer on growth, photosynthetic physiology and nutrient accumulation of container seedlings of *Cunninghamia lanceolata*

LI Lingyan^{1,2,3}, TANG Yin^{1,2,3}, ZHONG Minghui^{1,2,3}, ZHENG Xueyan⁴,
XU Shanshan^{1,2,3}, CAO Guangqiu^{1,2,3}, YE Yiquan^{1,2,3*}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Cunninghamia lanceolata Engineering Technology Research Center of State Forestry and Grassland Administration, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Forest Stress Physiology, Ecology and Molecular Biology, Fuzhou 350002, China; 4. Fujian Yangkou State-Owned Forest Farm, Nanping 353211, Fujian, China)

收稿日期: 2022-06-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0600301); 福建省林业科技项目(闽林科便函[2020]29号)。

第一作者: 李玲燕(1997-), 硕士研究生, 研究方向为森林培育, (E-mail) 1543677291@qq.com。

* 通信作者: 叶义全, 博士, 硕士生导师, 研究方向为林木逆境生理, (E-mail) yeyiquan008@163.com。

Abstract: In order to explore the responses of growth, photosynthetic characteristics and nutrient accumulation of *Cunninghamia lanceolata* container seedlings to different amounts of slow-release fertilizer application. In this paper, the effects of different amounts of slow-release fertilizer application treatments (0, 200, 400, 800, 1 000 and 1 200 g · m⁻³) on the growth of seedlings height, ground diameter, biomass, photosynthetic pigment content, chlorophyll fluorescence characteristics and nutrient content of *C. lanceolata* seedlings were investigated. Moreover, subordinate function value method was also employed to comprehensive evaluate the growth and physiology indexes of seedlings under different fertilization treatments, and screening suitable slow-release fertilizer levels for the growth of *C. lanceolata* seedlings, which providing reference for the efficiency cultivation of high quality *C. lanceolata* seedlings. The results were as follows: (1) Compared with the control, the slow-release fertilizer application could promote the growth of seedling height, ground diameter and the accumulation of total biomass of *C. lanceolata* seedlings to varying degrees. (2) The slow-release fertilizer treatments could significantly increase the contents of chlorophyll and carotenoid in leaves of *C. lanceolata* compared with control. In addition, slow-release fertilizer treatments also increased the values of maximum fluorescence (F_m), variable fluorescence (F_v), maximum photochemical efficiency of PS II (F_v/F_m), potential photochemical efficiency of PS II (F_v/F_o) and actual quantum yield(QY) to varying degrees compared with control. (3) The slow-release fertilizer treatments could promote the nutrient accumulation in seedlings of *C. lanceolata* to varying degrees, among which the contents of Mn, Fe and Zn were found to be changed most significantly. (4) The results of subordinate function value method showed that when the amount of slow-release fertilizer application was 1 000 g · m⁻³, its membership value was the largest, which indicated that the comprehensive growth of seedlings under this treatment was the best. In conclusion, the amount of 1 000 g · m⁻³ slow-release fertilizer application is the most suitable treatment for the cultivation of high quality seedlings of *C. lanceolata* in the present study, under this treatment, the growth of *C. lanceolata* seedlings can be improved by increasing the accumulation of nutrient elements closely related to photosynthesis, thus increasing the contents of photosynthetic pigment in leaves, which in turn enhance the PS II photosynthetic efficiency and electron transfer rate, further enhance the efficiency of light energy capture and utilization of leaves, and ultimately improve seedling growth.

Key words: seedling cultivation, slow-release fertilizer, *Cunninghamia lanceolata*, chlorophyll fluorescence parameters, container seedling, seedling quality

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方重要的速生用材树种(叶义全等,2018;饶丽莎等,2021)。据第九次全国森林资源清查结果表明,我国杉木人工林面积和蓄积均居主要人工乔木林树种首位,在保障我国生态安全和木材安全等方面具有重要作用(Kang et al., 2017)。近年来随着杉木人工林造林面积逐年扩大,市场对杉木优质苗木的需求也在不断增加(李茂等,2020a;周岚等,2022)。传统的杉木育苗主要以大田裸根苗为主,但是裸根苗存在苗木出圃率低、起苗易伤根、造林季节短和圃地需轮作等问题,极大增加了育苗成本,降低了造林成活率(伊昊,2019),相对于裸根苗而言,容器苗则能有效克服上述问题(潘平等,2019)。因此,容器育苗已成为目前杉木苗木繁育的另一种重要途径。然而由于容器苗的生长空间有限,且所用基质中可供苗木吸收的养分相对较少,无法满足苗木在快速生长过程中对养分

的需求,因而施肥是保证杉木容器苗优质生长的关键措施(张培等,2021)。随水施肥是目前容器苗培育普遍采用的一种施肥方式,但这种传统的施肥方式容易导致肥料和水的浪费,降低苗木对养分的利用效率,增加生产成本,甚至还可能引起环境污染(李小茹等,2017)。因此,开展杉木容器苗施肥技术研究对于提高苗木质量,进而增强苗木抗逆性,改善造林效果具有重要意义。

作为一种新型肥料,缓释肥具有养分利用效率高、挥发、淋溶少以及肥效长等特点,近年来在苗木培育中的应用日趋广泛(魏红旭等,2011;王艺等,2013;吴小林等,2014;历月桥等,2021)。潘平等(2019)在薄壳山核桃容器苗生长对不同缓释肥用量响应研究中发现,施用 3 kg · m⁻³的缓释肥能有效促进薄壳山核桃生长和根系发育,这与缓释肥改善植株 N、P、K 养分状况密切相关。姚光刚等(2019)研究表明,从养分利用率和成本来

看, $0.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓释肥能有效促进榲栌容器苗苗高和地径的生长, 增加生物量和养分含量的积累。庞圣江等(2018)在白木香容器苗研究中也发现当缓释肥用量为 $2.5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时容器苗生长效果最优, 其苗高、地径和生物量等指标均显著高于其他处理。类似地, 宋协海等(2018)通过研究不同缓释肥用量对黄连木生长和养分积累影响中发现, 低水平的缓释肥用量有利于根系生长, 随着施肥量的增加植株茎叶的生长得到显著改善, 并在缓释肥用量为 $1.6 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, 其苗高、地径和生物量达到最大值。可见, 不同树种之间由于生物学特性的差异, 最适宜其容器苗生长的缓释肥用量也存在较大差别。因此, 开展杉木容器苗生长对不同用量缓释肥响应规律的研究, 对于实现苗木优质、精准和高效培育具有重要的理论和现实意义。

尽管以往关于杉木苗木施肥的研究较多, 但主要集中在常规施肥、配方施肥和指数施肥等方面(刘欢等, 2016; 任衍敏等, 2021; 李茂等, 2021)。一方面, 有关缓释肥对杉木容器苗生长的研究相对较少(尚斌, 2017; 周新华等, 2017), 其生长对缓释肥用量的响应机制尚不完全清楚。另一方面, 近年来随着一些杉木高世代良种材料, 如优良无性系‘洋-061’在全国推广, 显著提升了我国杉木人工林的良种化水平和经济效益, 然而与高世代优良材料相配套的苗木培育技术体系尚未建立(朱晗等, 2018; 李茂等, 2020b)。如前所述, 不同的杉木优良材料因其自身生物学特性的差异, 它们对养分的需求也不尽相同(魏宁等, 2021), 而且优良材料对育苗技术的要求相对较高, 传统的育苗技术已无法适应这些良种对生长的需求(朱晗等, 2018)。因此, 开展与杉木优良材料相匹配的缓释肥施用技术研究, 对实现杉木优质材料的高效培育具有重要意义。鉴于此, 本研究以杉木优良无性系‘洋-061’为研究对象, 研究不同缓释肥施用量对杉木轻型基质容器幼苗生长、生物量积累、光合色素合成、叶绿素荧光参数以及植株养分含量的影响, 同时利用隶属函数法对各生理指标进行综合分析, 拟探讨以下问题: (1) 杉木幼苗生长、光合和养分积累对不同缓释肥施用量的响应规律如何; (2) 最适宜‘洋-061’生长的缓释肥施用量是多少以及适宜的缓释肥用量通过何种途径改善苗木生长。以期为杉木优质苗木的高效培育提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于福建农林大学金山校区田间试验大棚 ($119^{\circ}13' \text{ E}$, $26^{\circ}05' \text{ N}$)。该地区海拔 10 m , 年平均温度 25°C , 亚热带季风气候, 年平均日照 $1\,700 \sim 1\,980 \text{ h}$, 年平均降水量 $900 \sim 2\,100 \text{ mm}$, 无霜期 326 d 。

1.2 试验材料来源

扦插用的穗条由福建省洋口国有林场提供的长势一致的‘洋-061’当年生穗条, 长度为 $(10 \pm 0.4) \text{ cm}$ 。轻型基质泥炭土、珍珠岩和杉木皮采购于南平市森科种苗有限公司, 购买回来后将轻型基质按泥炭土、珍珠岩和杉木皮按 $1:2:2(V:V:V)$ 比例进行充分混合, 混合后的轻型基质化学性质见表 1。缓释肥为美国爱贝施缓释肥, 全氮含量 $180 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全磷含量 $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全钾含量 $120 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.3 试验设计

2019 年 4 月中旬在按泥炭土、珍珠岩、杉木皮 $1:2:2(V:V:V)$ 比例充分混合的轻型基质中添加不同量的缓释肥。试验共设置 6 个处理, 分别为 CK ($0 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)、T1 ($200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)、T2 ($400 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)、T3 ($800 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)、T4 ($1\,000 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)、T5 ($1\,200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$)。轻型基质与缓释肥充分混合后装入无纺布袋(直径 $6 \text{ cm} \times$ 高 10 cm)中备用。随后将无纺布袋置于塑料托盘上, 把采回的穗条扦插至不同的轻型基质中, 每袋扦插 1 株苗, 每个处理扦插 300 株。2019 年 5 月中旬从每个处理扦插的 300 株苗中挑选出扦插成活、长势良好且一致的幼苗共 90 株, 每个重复 30 株, 每个处理 3 次重复, 6 个处理共 540 株苗, 进行不同缓释肥施肥培养试验。苗木培养期间进行正常的水分和除草管理。2020 年 11 月中旬试验结束, 进行取样测定。

1.4 样品取样与测定

1.4.1 生长量、生物量及苗木质量指数测定 2020 年 11 月中旬用游标卡尺和直尺分别测量苗木地径和苗高, 计算各重复的平均地径及平均树高, 依据平均值每个重复选出 3 株标准株。将标准株按根、茎、叶分别剪下, 于 105°C 杀青 2 h , 随后在 75°C 下烘干至恒重, 根据朱晗等(2018)的方法计算苗木质量指数。

表 1 轻型基质基本化学性质
Table 1 Basic chemical properties of light matrix

全氮 Total nitrogen (g · kg ⁻¹)	水解氮 Hydrolyzed nitrogen (g · kg ⁻¹)	有效磷 Available phosphorus (g · kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium (g · kg ⁻¹)	镁 Mg (g · kg ⁻¹)	钙 Ca (g · kg ⁻¹)	锰 Mn (g · kg ⁻¹)	铁 Fe (g · kg ⁻¹)	有机质 Organic matter (g · kg ⁻¹)
9.93±0.09	0.26±0.02	0.64±0.02	11.33±0.13	5.32±0.84	5.97±1.55	0.27±0.02	13.97±2.71	295.15±8.04

苗木质量指数 = 苗木总干质量 / (苗木高 / 地径 + 地上干质量 / 地下干质量) (1)

1.4.2 光合色素含量测定 选取标准株上部第一轮生枝条中部当年生的健康成熟叶片测定光合色素。光合色素的提取采用乙醇丙酮法 (Lin et al., 2016)。提取结束后,吸取 200 μL 提取液置于酶标板中,分别于 470、645、663 nm 处测吸光度 (A_{470} 、 A_{645} 、 A_{663}),每个处理重复 3 次。

叶绿素 a 含量 (C_a) = $(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times$
提取液体积 × 稀释倍数 / 样品质量 (2)

叶绿素 b 含量 (C_b) = $(22.88 \times A_{645} - 4.76 \times A_{663}) \times$
提取液体积 × 稀释倍数 / 样品质量 (3)

叶绿素总量 = $(20.29 \times A_{645} + 8.04 \times A_{663}) \times$
提取液体积 × 稀释倍数 / 样品质量 (4)

类胡萝卜素含量 = $(1000 \times A_{470} - 3.27 \times C_a - 104 \times C_b) / 229$ (5)

1.4.3 叶绿素荧光参数测定 利用 PAM-2500 便携式叶绿素荧光仪 (Walz, Germany) 对选出的标准株上部第一轮生枝条中部当年生的健康成熟叶片,根据陶文文等 (2011) 的方法开展叶绿素荧光参数测定,相关荧光参数指标按照 Baker (2008) 的方法进行计算。

1.4.4 养分含量测定 将经杀青和烘干后的根、茎、叶等样品研磨至粉状,过 0.149 mm 的细筛,利用微波高压消解法对样品进行消解,采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 对样品元素 (Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn) 的含量进行检测。

1.5 数据处理

本研究采用 Excel 2019 进行数据统计,利用隶属函数法综合评价不同处理杉木幼苗的生长性,其中若某一指标与生长呈正相关,则其隶属函数值 = $(X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$,若为负相关则其隶属函数值 = $1 - (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ 。式中: X_i 为某一指标测定值; $X_{\max}$ 为该指标实际测定的最大值; $X_{\min}$ 为该指标实际测定的最小值 (戴昀等, 2021)。

用 SPSS 26.0 对数据进行单因素分析,不同处理平均值间采用 LSD 比较进行检验,作图采用 Origin 8.5 软件。

2 结果与分析

2.1 不同缓释肥施用量对杉木幼苗生长的影响

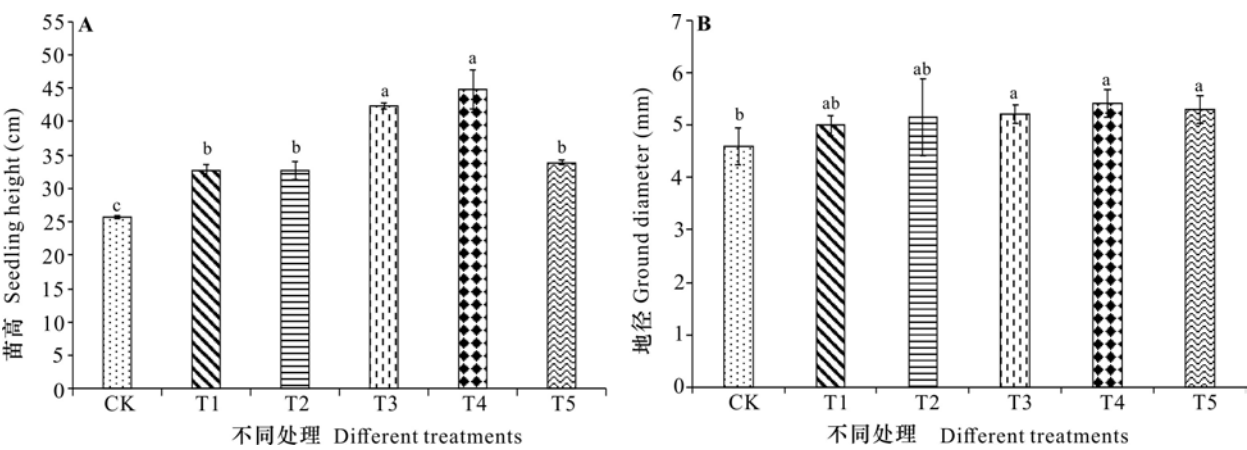
2.1.1 不同缓释肥施用量对杉木幼苗地径和苗高生长的影响 不同用量缓释肥处理均能促进杉木幼苗苗高和地径生长 (图 1)。与 CK 相比,不同缓释肥处理下杉木幼苗苗高增幅介于 26.94% ~ 73.83% 之间 (图 1:A),地径增幅介于 8.79% ~ 17.79% 之间 (图 1:B),且均在 T4 处理时达到最大值。

2.1.2 不同缓释肥施用量对杉木幼苗生物量积累的影响 如表 2 所示,随着施肥量增加,杉木幼苗的根、茎、叶和植株总生物量整体上呈增长趋势,其中茎和植株总生物量则呈先增长后降低趋势。就根生物量而言,仅 T4 和 T5 处理根系生物量高于 CK。与 CK 相比,除 T1 处理叶生物量低于 CK 外,其余处理的茎、叶和植株总生物量增幅分别介于 12.23% ~ 122.28%、5.07% ~ 108.57% 以及 1.27% ~ 85.00% 之间,且均在 T4 处理时为最大值。

2.1.3 不同缓释肥施用量对杉木幼苗苗木质量指数的影响 由图 2 可知,不同缓释肥施用量对杉木幼苗苗木质量指数存在显著影响 ($P < 0.05$)。与 CK 相比,随着施用量的增加,杉木幼苗苗木质量指数呈先降后升的趋势,苗木质量指数大小顺序为 $T5 > T4 > T3 > CK > T2 > T1$,其中 T3、T4 和 T5 处理分别较 CK 增加了 9.25%、44.34% 和 60.08%。

2.2 不同缓释肥施用量对杉木幼苗叶片光合色素含量的影响

由表 3 可知,施用缓释肥可有效促进幼苗光合色素含量的积累。与 CK 相比,不同处理显著增加杉木幼苗叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总叶绿



柱状图上不同字母表示不同处理之间的显著性($P<0.05$)。下同。
Different letters above histograms indicate significant differences between different treatments ($P<0.05$). The same below.

图 1 不同缓释肥施用量对杉木幼苗苗高与地径生长的影响

Fig. 1 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on the growth of seedling height and ground diameter of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

表 2 不同缓释肥施用量对杉木幼苗生物量积累的影响

Table 2 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on biomass accumulation of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

处理 Treatment	根生物量 Root biomass (g)	茎生物量 Stem biomass (g)	叶生物量 Leaf biomass (g)	植株 总生物量 Total plant biomass (g)
CK	1.27± 0.51ab	1.38± 0.30c	2.24± 0.83b	4.46± 0.88b
T1	0.90± 0.17b	1.62± 0.22bc	1.99± 0.17b	4.51± 0.35b
T2	1.20± 47b	1.55± 0.23bc	2.35± 0.67b	5.09± 1.38b
T3	1.24± 0.48b	2.44± 0.35ab	3.60± 0.93ab	6.47± 0.98ab
T4	1.73± 0.34a	3.06± 0.38a	4.67± 1.40a	8.24± 1.43a
T5	2.01± 0.30a	2.21± 0.38b	3.49± 0.41ab	7.72± 0.87a

注：不同字母表示不同处理之间的显著性($P<0.05$)。下同。
Note: Different letters indicate significant differences between different treatments ($P<0.05$). The same below.

素含量($P<0.05$),T5 处理时叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量达最大值,而类胡萝卜素含量在 T4 处理时达最大值。叶绿素 a/叶绿素 b 随着施用量的增加呈先升后降的趋势,但不同处理之间差异不显著($P>0.05$)。

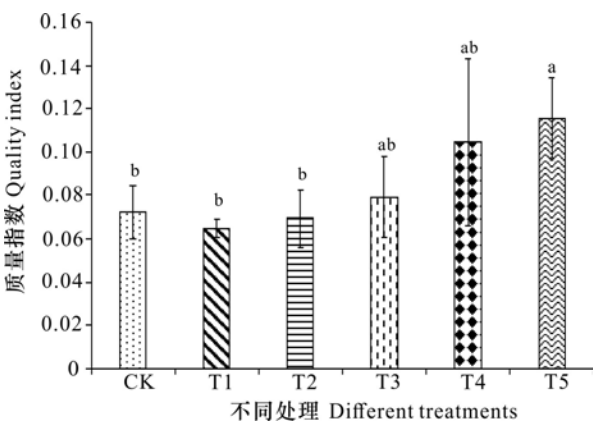


图 2 不同缓释肥施用量对杉木幼苗苗木质量指数的影响

Fig. 2 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on seedling quality index of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

2.3 不同缓释肥施用量对杉木容器幼苗叶绿素荧光参数的影响

由表 4 可知,随着缓释肥施用量的增加,杉木叶片初始荧光(F_0)值、非光化学淬灭系数(non-photochemical quenching, NPQ)值总体呈逐渐下降的趋势;与 CK 相比,不同处理 F_0 值降幅介于 17.38%~23.73%之间,NPQ 值降幅介于 13.28%~53.63%之间。不同缓释肥施用量处理可不同程度

表 3 不同缓释肥施用量对杉木幼苗叶片光合色素含量的影响

Table 3 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on photosynthetic pigment contents in leaves of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

处理 Treatment	叶绿素 a Chlorophyll a (mg · g ⁻¹)	叶绿素 b Chlorophyll b (mg · g ⁻¹)	总叶绿素 Total chlorophyll (mg · g ⁻¹)	叶绿素 a/叶绿素 b Chlorophyll a / Chlorophyll b	类胡萝卜素 Carotenoid (mg · g ⁻¹)
CK	0.65±0.12c	0.38±0.02c	1.04±0.25c	1.72±0.10a	0.06±0.005c
T1	1.04±0.12b	0.58±0.05b	1.63±0.16b	1.79±0.14a	0.11±0.002b
T2	0.94±0.15b	0.52±0.04b	1.46±0.29bc	1.82±0.23a	0.11±0.008b
T3	0.95±0.12b	0.51±0.06b	1.47±0.18b	1.85±0.03a	0.11±0.006b
T4	1.13±0.07ab	0.59±0.08b	1.72±0.15b	1.92±0.16a	0.14±0.009a
T5	1.29±0.08a	0.75±0.04a	2.04±0.11a	1.68±0.10a	0.12±0.009ab

表 4 不同缓释肥施用量对杉木幼苗叶绿素荧光参数的影响

Table 4 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on chlorophyll fluorescence parameters of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

处理 Treatment	初始荧光 F_o	最大荧光 F_m	可变荧光 F_v	PS II 最大 光化学效率 F_v/F_m	PS II 潜在 光化学效率 F_v/F_o	实际量子 产量 QY	光化学 淬灭系数 PQ	非光化学 淬灭系数 NPQ
CK	94.89± 2.99a	393.21± 49.06b	298.33± 48.81c	0.76± 0.025a	3.14± 0.69c	0.81± 0.02a	0.60± 0.027a	1.36± 0.13ab
T1	78.40± 8.49b	416.16± 42.87b	337.76± 34.38bc	0.81± 0.001a	4.31± 0.05b	0.82± 0.002a	0.57± 0.028a	1.18± 0.31ab
T2	74.79± 7.67b	419.94± 45.49b	345.15± 38.12bc	0.82± 0.005a	4.62± 0.16b	0.82± 0.006a	0.60± 0.034a	0.96± 0.18bc
T3	76.88± 6.98b	461.47± 20.50b	384.60± 13.84b	0.83± 0.008a	5.00± 0.27b	0.83± 0.008a	0.57± 0.005a	0.98± 0.10b
T4	72.37± 9.02b	532.82± 35.79a	460.44± 35.55a	0.86± 0.026a	6.36± 0.75a	0.81± 0.02a	0.56± 0.03a	0.63± 0.16c
T5	75.57± 4.85b	428.50± 27.13b	352.94± 22.32bc	0.82± 0.001a	4.67± 0.04b	0.82± 0.002a	0.59± 0.009a	1.62± 0.30a

提高杉木叶片最大荧光(F_m)、可变荧光(F_v)、PS II 潜在光化学效率(F_v/F_o)和 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m),且均在 T4 处理时达最大值。方差分析结果表明,T4 处理的 F_o 、NPQ、 F_m 、 F_v 、 F_v/F_o 与 CK 之间差异显著,而不同处理对杉木幼苗叶片 F_v/F_m 、实际量子产量(quantum yield, QY)和光化学淬灭系数(photochemical quenching, PQ)的影响差异不显著($P>0.05$)。

2.4 不同缓释肥施用量对杉木幼苗养分含量的影响

除施肥量较低的 T1 处理中 Ca 元素外,其余施肥处理均不同程度地促进‘洋-061’幼苗各元素含量的积累(图 3)。与 CK 相比,不同施肥处理下杉木幼苗 P、K、Mg 含量增幅分别介于 29.50% ~

103.65%、22.92% ~ 80.06% 及 14.52% ~ 74.07% 之间,且均在 T4 处理达最大值。随着施肥量的增加,Ca 积累量呈先降后升的变化趋势,并在 T5 处理达最大值。就微量元素而言,Mn、Fe 和 Zn 含量均在 T4 处理达到最大值,与 CK 相比分别增加了 157.14%、216.39% 和 238.08%。

2.5 基于隶属函数法的杉木幼苗生长和生理相关指标综合分析

苗木生长状况是一个综合性的性状,单纯用某一生长指标来衡量其生长情况的好坏不够全面,而采用多个指标对苗木生长情况进行综合评价,能准确反映苗木的生长状况。因此,本研究采用隶属函数法对不同处理下杉木幼苗生长指标、光合色素含量和叶绿素荧光参数进行综合评价。

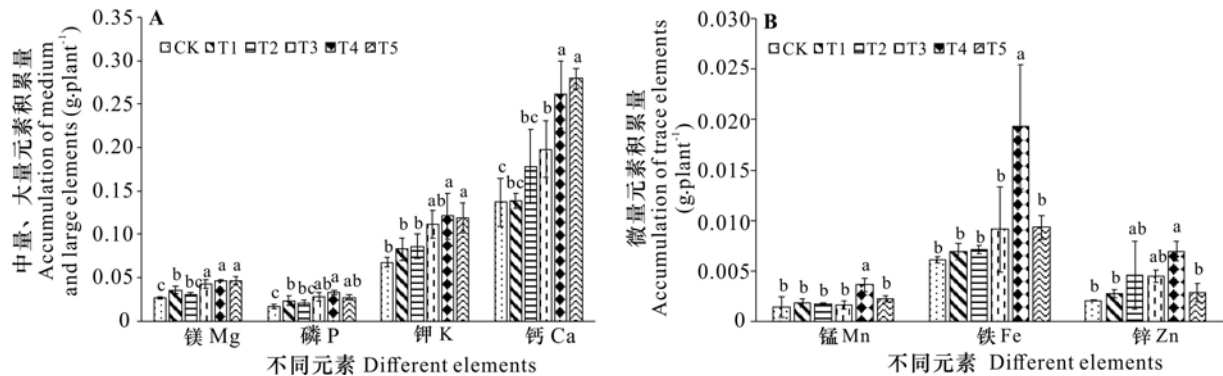


图 3 不同缓释肥施用量对杉木幼苗元素积累量的影响

Fig. 3 Effects of different amounts of slow-release fertilizer application on elements accumulation of *Cunninghamia lanceolata* seedlings

由表 5 可知,杉木幼苗生长综合评价指数顺序为 T4>T5>T3>T2>T1>CK。

3 讨论

施肥是苗木培育的关键环节,科学合理施肥不仅能有效减少养分的损失,提高肥料的利用效率,而且还能提高苗木质量,降低生产成本。缓释肥因其具有肥效长且释放稳定等特点,能够通过调节养分释放速度来实现与植物养分吸收的同步,从而大幅提高植物对养分的利用效率(潘平等,2019;张富鑫等,2021)。目前通过在轻型基质中添加缓释肥开展容器苗培育的研究报道较多。研究表明在薄壳山核桃(潘平等,2019)、榿栎(姚光刚等,2019)、白木香(庞圣江等,2018)、黄连木(宋协海等,2018)、木荷(马雪红等,2010)、赤皮青冈(吴小林等,2014)等容器苗培育基质中施加 $0.95 \sim 3.50 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的缓释肥能有效促进容器苗的生长,可见不同的植物种类最适宜其生长缓释肥用量存在较大差异,这可能也与所施用的缓释肥种类以及基质类型等因素有关。因此,开展容器苗施肥技术研究对于促进苗木生长,提高苗木质量具有重要意义。本研究比较了 $200 \sim 1\,200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ 缓释肥对杉木优良无性系‘洋-061’生长的影响,发现施用缓释肥可明显促进‘洋-061’苗高和地径的生长以及生物量的积累,但当缓释肥用量达到 $1\,200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ 时,苗木生长相关指标出现不同程度下降。该结果与楼君(2015)和孟庆银等

(2020)关于施肥对容器苗生长的研究结果相类似,表明在一定范围内随着肥料用量的增加可以促进苗木的生长,而过量施肥则可能会对幼苗的生长产生一定的抑制作用。苗木质量指数是衡量苗木质量的重要指标(柏小娟等,2018)。本研究,施用缓释肥可不同程度提高杉木幼苗苗木质量,但仅 T5 和 CK 之间存在显著差异,这与李茂等(2020a)的研究结果类似。导致这种现象的可能原因有以下 2 个。(1)由于研究所使用的无纺布当根系长满布袋后继续生长会发生“空气修根”现象,因此无法进一步促进基质苗根系生长,增加根系生物量。由于容器袋空间较小,在苗木培育后期,不同处理苗木根系基本都能长满整个袋,导致不同处理根系生物量差异较小,从而对苗木质量指数这一指标产生一定的干扰。(2)本研究中采用较小容积的无纺布袋也可能造成根系穿透布袋与空气进行养分和水分交换,且随着雨水的淋容作用可能出现部分养分流失的情况,进而对试验结果造成一定的影响,具体的原因仍有待进一步研究。

光合作用是植物碳同化产物的主要能量来源,也是植物生长的物质基础,因此植物的生长快慢与其光合能力密切相关(唐洁等,2014)。众所周知,叶绿素是保证植物光合作用正常进行的主要物质,它在光能捕获、传递和转换中扮演关键角色,因此植物的光合能力与光合色素含量密切相关(谢辉等,2021)。施肥提高植物光合能力很大程度上与其增加叶片光合色素含量有关。本研究

表 5 苗木生长综合评价

Table 5 Comprehensive evaluation of seedling growth

处理 Treatment	苗高 Seedling height	地径 Ground diameter	植株 生物量 Plant biomass	苗木 质量 指数 Seedling quality index	叶绿素 a 含量 Chloro- phyll a content	叶绿素 b 含量 Chloro- phyll b content	总叶绿素 含量 Total chlorophyll content	类胡 萝卜素 含量 Carotenoid content	初始 荧光 F_o	最大 荧光 F_m	可变 荧光 F_v	PS II 最大 光化学 效率 F_v/F_m	PS II 潜在 光化学 效率 F_p/F_o	非光 化学 淬灭 系数 NPQ	隶属值 Membership value	排序 Sort
CK	0.21	0.01	0.19	0.17	0.09	0.07	0.09	0.19	0.17	0.24	0.28	0.55	0.42	0.29	0.21	6
T1	0.43	0.34	0.21	0.07	0.55	0.54	0.56	0.53	0.23	0.34	0.37	0.70	0.53	0.30	0.41	5
T2	0.52	0.34	0.21	0.25	0.29	0.25	0.28	0.54	0.33	0.35	0.40	0.70	0.64	0.58	0.42	4
T3	0.56	0.80	0.52	0.27	0.44	0.38	0.43	0.52	0.29	0.53	0.58	0.73	0.67	0.45	0.51	3
T4	0.67	0.91	0.85	0.62	0.64	0.56	0.63	0.72	0.79	0.84	0.85	0.86	0.83	0.77	0.77	1
T5	0.60	0.40	0.60	0.77	0.83	0.93	0.88	0.62	0.25	0.39	0.43	0.55	0.64	0.05	0.57	2

发现,与 CK 相比,随着缓释肥施用量的增加杉木叶片叶绿素含量和类胡萝卜素含量均呈显著增加的趋势,这与李茂等 (2020b) 的研究结果类似,说明施肥可通过提高叶片光合色素含量,增强植株光合能力。除叶绿素含量外,叶绿素 a/叶绿素 b 值也常与光合色素含量一起用于表征植物对光能利用率的高低(王亚楠等,2020)。当叶绿素含量和叶绿素 a/叶绿素 b 值同时增加时,植物叶片的光能利用效率是增强的(闫萌萌等,2014)。本研究发现施肥处理均能不同程度提高叶绿素 a/叶绿素 b 值,因此上述结果共同表明,施用缓释肥可通过提高叶片光合色素含量和叶绿素 a/叶绿素 b 值来增强叶片对光能的吸收能力,进而将更多光能用于光合作用,最终达到促进植物生长的目的,这也与上述生长和生物量结果相一致。

叶绿素荧光参数主要用于表征叶片光系统对光能的吸收、传递、耗散和分配的内在特征,常用于研究胁迫条件下植物光能利用能力的变化(岑海燕等,2018)。与 CK 相比,施用缓释肥显著降低杉木叶片的初始荧光(F_o)值。 F_o 值下降说明杉木叶片类囊体膜受到的损害较小,能较好地维持 PS II 反应中心的活性(黄秋娴等,2015)。这可能与施肥改善植株叶片养分,避免叶片因养分缺乏胁迫引起活性氧积累,进而减轻活性氧对光合结构的破坏有关(李茂等,2020b)。最大荧光(F_m)、可变荧光(F_v)、PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)和 PS II 潜在光化学效率(F_p/F_o)值主要用于表征 PS II 反应中心活性、电子传递能力和效率(李晓等,2006)。随着施肥量的增加,杉木叶片上述荧光值呈先升后降趋势,在 T4 处理下达到最大值。上述荧光值的增加有利于提高叶片将吸收的光能转化为化学能的速度和效率,为叶片碳同化过程

提供更多的能量,从而增强叶片对光能利用效率。类似研究结果在银叶树(张卫强等,2021)和柳枝稷(何海锋等,2020)中也有发现,说明提高叶片对光能的利用率,促进碳同化产物的合成是施缓释肥促进苗木生长的光合生理基础。此外,研究表明植物叶片 F_v/F_m 值通常维持在 0.80~0.85 之间,胁迫会导致该值出现不同程度的下降(李茂等,2020b)。与施肥处理相比,不施肥对照该值明显低于 0.80,表明在不施肥条件下,植株可能受到了养分胁迫,从而发生光抑制现象。非光化学淬灭(NPQ)是植物叶片光合机构的一种自我保护机制,通过将植物吸收的多余光能以热能形式耗散,防止过剩光能对光合机构造成破坏(李晓等,2006)。除 T5 外,其他施肥处理的 NPQ 值均显著低于 CK,暗示适量施肥处理可以有效减少以热能形式耗散的光能,而将吸收的更多光能用于光合碳同化过程,进而提高叶片对光能的利用率,促进碳同化产物的积累,而养分胁迫和过量施肥处理叶片吸收的光能更多是以热能形式耗散掉,保护光合机构免受伤害,从而减少了进入光合碳同化产物过程的光能。因此,在 T5 处理下杉木幼苗苗高和总生物量出现下降,部分可能是由于过量施肥引起叶片光能利用效率出现一定程度下降引起的。

施肥处理除了对生长和光合生理有影响外,它还能促进植株养分元素的积累。与 CK 相比,施用缓释肥均能不同程度促进杉木幼苗植株养分元素的积累,尤其是微量元素含量的变化趋势更为显著,但当缓释肥过量时,苗木养分的含量则出现一定程度的下降,但仍高于 CK 处理。这与魏红旭等(2011)关于长白山落叶松容器苗养分库构建的研究以及肖遥等(2015)对关于缓释肥加载对红豆

杉、浙江楠和浙江樟容器苗生长和 N、P 库构建的研究结果类似,可能原因在于过量施肥引起基质中养分元素浓度超过某一阈值时,对杉木苗木生长产生一定的离子毒害,从而抑制其对养分的吸收造成的(潘平等,2019),但具体原因仍有待进一步研究。值得注意的是,在适量施肥条件下,植株养分元素含量,特别是与光合密切相关的养分元素含量,如镁(Mg)、钾(K)、磷(P)、铁(Fe)、锌(Zn)等均显著高于不施肥对照处理。可能是这些元素作为光合色素的重要组成成分或参与光合作用的重要过程,通过提高这些养分元素的含量,能增强叶片对光能的捕获和转化能力,从而达到提高植物光合作用能力,促进生长的目的。这与上述叶绿素荧光的结果相一致,说明适宜施肥提高杉木叶片光能利用率可能与其改善植株养分元素状况,特别是改善植株体内与光合作用密切相关的养分元素有关。

4 结论

利用隶属函数法综合生长、光合生理相关指标最终确定缓释肥施用量为 $1\ 000\ \text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 是适合杉木优良无性系‘洋-061’幼苗生长的适宜用量。该处理下杉木幼苗通过增加叶片光合色素含量,提高叶片对光能的捕获和吸收能力,同时通过促进植株中与光合作用密切相关元素的积累,提高叶绿素荧光 F_m 、 F_v 、 F_v/F_m 和 F_v/F_o 值,增强叶片光能利用效率,进而促进光合碳同化产物的积累,最终促进苗木的生长。

参考文献:

- BAI XJ, LU JG, LI XR, et al., 2018. The effects of container size and growing medium on the growth *Calycanthus floridus* seedlings [J]. J Anhui Agric Univ, 45(3): 462–467. [柏小娟, 芦建国, 李小茹, 等, 2018. 基质配比对美国蜡梅容器苗生长的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 45(3): 462–467.]
- BAKER NR, 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo* [J]. Ann Rev Plant Biol, 59(1): 89–113.
- CEN HY, YAO JN, WENG HY, et al., 2018. Applications of chlorophyll fluorescence in plant phenotyping: a review [J]. Spectrosc Spectr Anal, 38(12): 3773–3779. [岑海燕, 姚洁妮, 翁海勇, 等, 2018. 叶绿素荧光技术在植物表型分析的研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 38(12): 3773–3779.]
- DAI Y, YUAN LY, ZHANG SJ, et al., 2021. Changes of photosynthetic fluorescence and evaluation of cold tolerance in Wucai (*Brassica campestris* L.) under low temperature stress [J]. Mol Plant Breed, 19(2): 622–631. [戴昀, 袁凌云, 张淑江, 等, 2021. 低温胁迫下不同乌菜光合及荧光特性的变化及耐寒性评价 [J]. 分子植物育种, 19(2): 622–631.]
- HE HF, YAN CH, WU N, et al., 2020. Effects of nitrogen application rate on chlorophyll fluorescence characteristics and dry matter accumulation in switchgrass (*Panicum virgatum*) leaves [J]. Acta Pratac Sin, 29(11): 141–150. [何海锋, 闫承宏, 吴娜, 等, 2020. 施氮量对柳枝稷叶片叶绿素荧光特性及干物质积累的影响 [J]. 草业学报, 29(11): 141–150.]
- HUANG QX, ZHAO S, LIU CM, et al., 2015. Effects of shading treatments on chlorophyll fluorescence characteristics of *Sabina vulgaris* seedlings grown in iron tailings media [J]. Sci Silv Sin, 51(6): 17–26. [黄秋娴, 赵顺, 刘春梅, 等, 2015. 遮荫处理对铁尾矿基质臭柏实生苗快速叶绿素荧光特性的影响 [J]. 林业科学, 51(6): 17–26.]
- KANG HJ, SEELY B, WANG GY, et al., 2017. Simulating the impact of climate change on the growth of *Cunninghamia lanceolata* plantations in Fujian Province, China [J]. New Zealand J For Sci, 47(1): 20.
- LI M, HONG K, XU SS, et al., 2020a. Effects of exponential fertilization on *Cunninghamia lanceolata* superior clone seedling growth and nutrient content [J]. Chin J Appl Environ Biol, 26(6): 1490–1497. [李茂, 洪凯, 许珊珊, 等, 2020a. 指数施肥对杉木优良无性系幼苗生长和养分含量的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 26(6): 1490–1497.]
- LI M, REN ZB, ZHENG MM, et al., 2020b. Effects of exponential fertilization on the growth and photosynthetic characteristics of the superior clone of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Chin J Appl Environ Biol, 26(2): 400–409. [李茂, 任正标, 郑鸣鸣, 等, 2020b. 指数施肥对杉木优良无性系生长和光合特性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 26(2): 400–409.]
- LI M, LIN KM, ZHENG MM, et al., 2021. Effects of nitrogen fertilization on microbial functional diversity in a light-medium for *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook seedlings [J]. Chin J Appl Environ Biol, 27(1): 54–61. [李茂, 林开敏, 郑鸣鸣, 等, 2021. 指数施肥对杉木苗期基质中微生物功能多样性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 27(1): 54–61.]
- LIU H, WANG CQ, WU JS, et al., 2016. Effects of exponential N fertilization on the growth and nutrient content in clonal *Cunninghamia lanceolata* seedlings [J]. Chin J Appl Ecol, 27(10): 3123–3128. [刘欢, 王超琦, 吴家森,

- 等, 2016. 氮素指数施肥对杉木无性系苗生长及养分含量的影响 [J]. 应用生态学报, 27(10): 3123-3128.]
- LIU KL, SUN XY, ZHAO TR, et al., 2007. Leaf nutrients(N, P, K, Ca and Mg) in selected *Populus tomentosa* triploid clones [J]. J Zhejiang For Coll, 24(3): 297-301. [刘克林, 孙向阳, 赵铁蕊, 等, 2007. 三倍体毛白杨不同无性系叶片营养元素质量分数差异 [J]. 浙江林学院学报, 24(3): 297-301.]
- LI X, FENG W, ZENG XC, 2006. Advances in chlorophyll fluorescence analysis and its uses [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 26(10): 2186-2196. [李晓, 冯伟, 曾晓春, 2006. 叶绿素荧光分析及应用进展 [J]. 西北植物学报, 26(10): 2186-2196.]
- LI XR, LU JG, BAI XJ, 2017. Effects of slow-release fertilizer with different N, P and K ratios on the growth of potted *Sinocalycanthus chinensis* and *Calycanthus floridus* seedlings [J]. J Anhui Agric Univ, 44(1): 55-59. [李小茹, 芦建国, 柏小娟, 2017. 不同氮磷钾配比缓释肥对夏蜡梅、美国蜡梅容器苗生长的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 44(1): 55-59.]
- LI YQ, HE P, ZHOU XH, et al., 2021. Effects of substrate ratio, amount of slow-release fertilizer and container standard on container seedling of *Lithocarpus litseifolius* [J]. J NE For Univ, 49(6): 46-52. [厉月桥, 何平, 周新华, 等, 2021. 基质配比、缓释肥用量和容器规格对多穗柯容器育苗的影响 [J]. 东北林业大学学报, 49(6): 46-52.]
- LOU J, 2015. Nutrition loading research for container seedling of 5 important *Precious* tree species [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [楼君, 2015. 浙江楠等 5 种珍贵树种容器苗养分有效加载研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院.]
- MA XH, HU GC, FENG JG, et al., 2010. Comparison on the substrate and container size of container nursery of *Schima superba* [J]. For Res, 23(4): 505-509. [马雪红, 胡根长, 冯建国, 等, 2010. 基质配比、缓释肥量和容器规格对木荷容器苗质量的影响 [J]. 林业科学研究, 23(4): 505-509.]
- MENG QY, HU YL, HONG YC, et al., 2020. A comparative study on afforestation growth of container seedlings of *Cunninghamia lanceolata* with exponential fertilization [J]. S Chin For Sci, 48(5): 33-36. [孟庆银, 胡亚林, 洪宜聪, 等, 2020. 指数施肥杉木实生容器苗造林生长对比研究 [J]. 南方林业科学, 48(5): 33-36.]
- PAN PP, DOU QQ, TANG WH, et al., 2019. Effects of slow release fertilizer dosage on growth and nutrient contents of *Carya illinoensis* container seedlings [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 43(5): 163-168. [潘平平, 窦全琴, 汤文华, 等, 2019. 缓释肥用量对薄壳山核桃容器苗生长及养分含量的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 43(5): 163-168.]
- PANG SJ, ZHANG P, MA Y, et al., 2018. Effect of substrate ratio and slow-release fertilizer dose on the growth of containerized *Aquilaria sinensis* seedlings [J]. J NE For Univ, 46(11): 12-15. [庞圣江, 张培, 马跃, 等, 2018. 白木香容器苗基质配比与缓释肥施用量的生长效应 [J]. 东北林业大学学报, 46(11): 12-15.]
- RAO LS, LI M, DAI MJ, et al., 2021. Cloning and bioinformatics analysis of *ClSAUR25* gene 5' flanking sequence in *Cunninghamia lanceolata* [J]. Mol Plant Breed, 19(4): 1107-1112. [饶丽莎, 李茂, 戴明金, 等, 2021. 杉木 *ClSAUR25* 基因 5'侧翼序列的克隆与生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 19(4): 1107-1112.]
- REN YM, CHEN MJ, LI HT, et al., 2021. Effects of formula fertilization on species structure of large diameter wood in near mature forest of Chinese fir [J]. J For Environ, 41(1): 18-25. [任衍敏, 陈敏健, 李惠通, 等, 2021. 配方施肥对杉木近熟林大径材材种结构的影响 [J]. 森林与环境学报, 41(1): 18-25.]
- SHANG B, 2017. Effects of slow-release fertilizer on the growth of container seedlings of *Cunninghamia lanceolata* [J]. J Sichuan For Sci Technol, 38(3): 93-94. [尚彬, 2017. 缓释肥对杉木容器育苗生长的影响 [J]. 四川林业科技, 38(3): 93-94.]
- SONG XH, GUO HH, LIU Y, et al., 2018. The growth response of *Pistacia chinensis* Bunge containerized seedlings to slow-release fertilizer [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 42(3): 117-122. [宋协海, 郭欢欢, 刘勇, 等, 2018. 黄连木容器苗生长对缓释肥的响应 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 42(3): 117-122.]
- TANG J, TANG YX, SU XH, et al., 2014. A study on photosynthetic physiological characteristics of *Populus deltoids* clones at seedling stage [J]. J Cent S Univ For Technol, 34(9): 12-16. [唐洁, 汤玉喜, 苏晓华, 等, 2014. 美洲黑杨无性系苗期光合生理特性研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 34(9): 12-16.]
- TAO WW, JIANG WW, ZHAO LJ, 2011. Chlorophyll fluorescence parameters in three cultivars of *Penstemon* [J]. J Zhejiang A & F Univ, 28(3): 367-371. [陶文文, 蒋文伟, 赵丽娟, 2011. 3 个钓钟柳品种叶绿素荧光特性比较 [J]. 浙江农林大学学报, 28(3): 367-371.]
- WANG Y, WANG XH, WU XL, et al., 2013. Effects of slow-release fertilizer loading on growth and construction of nutrients reserves of *Phoebe chekiangensis* and *Phoebe bournei* container seedlings [J]. Sci Silv Sin, 49(12): 57-63. [王艺, 王秀花, 吴小林, 等, 2013. 缓释肥加载对浙江楠和闽楠容器苗生长和养分库构建的影响 [J]. 林业科学, 49(12): 57-63.]
- WANG YN, DONG LN, DING YF, et al., 2020. Effects of shading on photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of four *Corydalis* species [J]. Chin J Appl Ecol, 31(3): 769-777. [王亚楠, 董丽娜, 丁彦芬, 等, 2020. 遮阴对 4 种紫堇属植物光合特性和叶绿素荧光参数的影响 [J]. 应用生态学报, 31(3): 769-777.]
- WEI HX, XU CY, MA LY, et al., 2011. Effects of controlled-

- release fertilizer and organic amendment on the construction of nutrients reserves in *Larix olgensis* container seedlings [J]. Chin J Appl Ecol, 22(7): 1731–1736. [魏红旭, 徐程扬, 马履一, 等, 2011. 缓释肥和有机肥对长白落叶松容器苗养分库构建的影响 [J]. 应用生态学报, 22(7): 1731–1736.]
- WEI N, LI GL, CAI MX, et al., 2021. Effects of slow-release fertilization rates on seedling quality and field survival rates of four exotic oaks [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 45(3): 53–60. [魏宁, 李国雷, 蔡梦雪, 等, 2021. 缓释肥施氮量对 4 种国外栎苗木质量及移栽成活率的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 45(3): 53–60.]
- WU XL, ZHANG DB, CHU XL, et al., 2014. Effect of substrate ratio and slow-release fertilizer dose on the growth of containerized *Cyclobalanopsis gilva* seedlings [J]. For Res, 27(6): 794–800. [吴小林, 张东北, 楚秀丽, 等, 2014. 赤皮青冈容器苗不同基质配比和缓释肥施用量的生长效应 [J]. 林业科学研究, 27(6): 794–800.]
- XIAO Y, CHU XL, WANG XH, et al., 2015. Effect of slow-release fertilizer loading on growth and N, P accumulation of container-growing seedlings for three precious tree species [J]. For Res, 28(6): 781–787. [肖遥, 楚秀丽, 王秀花, 等, 2015. 缓释肥加载对 3 种珍贵树种大规格容器苗生长和 N、P 库构建的影响 [J]. 林业科学研究, 28(6): 781–787.]
- XIE H, ZHANG W, HAN SA, et al., 2021. Effect of shading degree on the grain yield and photosynthetic characteristics of wheat at the grain filling stage in an almond-winter wheat intercropping system [J]. Chin J Eco-Agric, 29(4): 704–715. [谢辉, 张雯, 韩守安, 等, 2021. 扁桃-冬小麦间作系统树冠截光程度对小麦产量和灌浆期光合特性的影响 [J]. 中国生态农业学报(中英文), 29(4): 704–715.]
- YAN MM, WANG ML, WANG HB, et al., 2014. Effects of light quality on photosynthetic pigment contents and photosynthetic characteristics of peanut seedling leaves [J]. Chin J Appl Ecol, 25(2): 483–487. [闫萌萌, 王铭伦, 王洪波, 等, 2014. 光质对花生幼苗叶片光合色素含量及光合特性的影响 [J]. 应用生态学报, 25(2): 483–487.]
- YAO GG, LI GL, ZHENG YL, et al., 2019. Effects of slow-release fertilizer rate on the quality of *Quercus aliena* container seedlings [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 43(1): 69–75. [姚光刚, 李国雷, 郑永林, 等, 2019. 缓释肥施用量对槲栎容器苗苗木质量的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 43(1): 69–75.]
- YE YQ, LUO HY, LI M, et al., 2018. Effects of nitrogen forms on lateral roots development and photosynthetic characteristics in leaves of *Cunninghamia lanceolata* seedlings [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 38(11): 2036–2044. [叶义全, 罗红艳, 李茂, 等, 2018. 氮素形态对杉木幼苗侧根生长和叶片光合特性的影响 [J]. 西北植物学报, 38(11): 2036–2044.]
- YI H, 2019. Analysis on the growth and biomass of Chinese fir seedlings in different ways [J]. Anhui Agric Sci Bull, 25(24): 74–75. [伊昊, 2019. 不同育苗方式对杉木苗木生长的影响研究 [J]. 安徽农学通报, 25(24): 74–75.]
- ZHANG FX, XIE JM, YANG HX, et al., 2021. Effects of fertilizing slow-release fertilizer combined with bio-organic fertilizer on growth physiology, yield and quality of cabbage [J]. J Gansu Agric Univ, 56(6): 73–81. [张富鑫, 颜建明, 杨海兴, 等, 2021. 缓释肥配施生物有机肥对结球甘蓝生长生理、产量及品质的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 56(6): 73–81.]
- ZHANG M, TANG SH, ZHANG FB, et al., 2017. Slow-release urea of 60-day-release period is suitable for one basal application in early and late rice [J]. J Plant Nutr Fert, 23(1): 119–127. [张木, 唐拴虎, 张发宝, 等, 2017. 60 天释放期缓释尿素可实现早稻和晚稻的一次性基施 [J]. 植物营养与肥料学报, 23(1): 119–127.]
- ZHANG P, PANG SJ, LIU SL, et al., 2021. Effects of slow release fertilizer on growth of *Keteleeria fortune* seedlings cultured in container [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 49(9): 92–98. [张培, 庞圣江, 刘士玲, 等, 2021. 缓释肥对江南油杉容器苗生长的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 49(9): 92–98.]
- ZHANG WQ, HUANG FF, GAN XH, et al., 2021. Effects of fertilization on the growth and photosynthetic characteristics of *Heritiera littoralis* seedlings [J]. Guihaia, 41(6): 862–871. [张卫强, 黄芳芳, 甘先华, 等, 2021. 施肥对银叶树幼苗生长及光合特性的影响 [J]. 广西植物, 41(6): 862–871.]
- ZHOU L, WU DY, LÜ QS, et al., 2022. Morphology and biomass differentiations of fine roots in *Pinus massoniana* plantation infected by *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Acta Ecol Sin, 42(15): 1–13. [周岚, 巫大宇, 吕秋实, 等, 2022. 松材线虫侵染的马尾松人工林细根形态及生物量分异特征 [J]. 生态学报, 42(15): 1–13.]
- ZHOU XH, LI YQ, XIAO ZY, et al., 2017. Influences of growth substrate ratio, container size and SRF on *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook container seedling [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 39(1): 72–81. [周新华, 厉月桥, 肖智勇, 等, 2017. 基质配比、容器规格和缓释肥量对杉木容器育苗的影响 [J]. 江西农业大学学报, 39(1): 72–81.]
- ZHU H, LUO HY, LI Y, et al., 2018. Effect of planting density on the growth of cutting seedlings of a superior Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) clone [J]. Subtrop Agric Res, 14(4): 236–241. [朱哈, 罗红艳, 李勇, 等, 2018. 扦插密度对杉木优良无性系扦插苗生长的影响 [J]. 亚热带农业研究, 14(4): 236–241.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202205034

苏桂军, 李霞, 陈芋西, 等, 2023. 花生铝响应类受体蛋白激酶 AhPRK4 的原核表达分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1070–1079.

SU GJ, LI X, CHEN YX, et al., 2023. Prokaryotic expression analysis of aluminum associated receptor-like protein kinase AhPRK4 in peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. Guihaia, 43(6): 1070–1079.



花生铝响应类受体蛋白激酶 AhPRK4 的原核表达分析

苏桂军¹, 李霞¹, 陈芋西¹, 詹洁^{1,2,3}, 王爱勤^{1,2,3}, 何龙飞^{1,2,3}, 肖冬^{1,2,3*}

(1. 广西大学 农学院/植物科学国家级实验教学示范中心, 南宁 530004; 2. 广西农业环境与农产品安全重点实验室, 南宁 530004; 3. 广西高校作物栽培学与耕作学重点实验室, 南宁 530004)

摘要: 花粉类受体蛋白激酶(pollen receptor-like protein kinase, PRK)是一类富含 LRR 结构域的一类受体蛋白激酶,不仅在花粉发育和植物受精中发挥作用,也在胁迫响应中发挥作用。基于对前期花生根尖铝胁迫转录组数据的分析,我们发现了在转录水平响应铝胁迫的花粉类受体蛋白激酶基因 *AhPRK4*,为探究 *AhPRK4* 在花生铝胁迫中的功能,该文进一步分析了铝胁迫处理下 *AhPRK4* 在花生耐铝品种‘99-1507’和铝敏感品种‘中花 2 号’(‘ZH2’)根尖中的转录变化,通过序列分析、进化树构建等分析了 *AhPRK4* 蛋白的结构特点和亲缘关系,克隆了 *AhPRK4* 的胞内域序列(*AhPRK4*-CD),并通过原核表达和体外磷酸化体系分析了 *AhPRK4*-CD 的自磷酸化活性。结果表明:(1)不同铝处理时间及不同铝浓度处理后,*AhPRK4* 的转录水平上调,显著响应铝处理,是铝诱导基因;(2)*AhPRK4* 含有 673 个氨基酸,属于 LRR-III 蛋白激酶家族成员,具跨膜域和信号肽,且预测具有磷酸化活性位点;(3)体外诱导表达出约 71 kD 的可溶性蛋白(*GST-AhPRK4*-CD),经凝胶亲和层析纯化,得到基于蛋白印迹实验(Western Blot)验证正确的重组蛋白,重组蛋白可发生磷酸化修饰,但无明显的自磷酸化现象。综上所述,*AhPRK4* 是一个铝胁迫应答基因,参与花生铝胁迫早期应答机制,且能发生磷酸化修饰。

关键词: 花生, 铝胁迫, 花粉类受体蛋白激酶, 表达分析, 原核表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1070-10

Prokaryotic expression analysis of aluminum associated receptor-like protein kinase AhPRK4 in peanut (*Arachis hypogaea*)

SU Guijun¹, LI Xia¹, CHEN Yuxi¹, ZHAN Jie^{1,2,3}, WANG Aiqin^{1,2,3},
HE Longfei^{1,2,3}, XIAO Dong^{1,2,3*}

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 国家自然科学基金(31701356)。

第一作者: 苏桂军(1999-), 硕士研究生, 研究方向为作物生理, (E-mail) su_guijun@163.com。

* 通信作者: 肖冬, 博士, 副教授, 研究方向为作物生理与分子生物学, (E-mail) xiaodong@gxu.edu.cn。

(1. National Demonstration Center for Experimental Plant Science Education/College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2. Guangxi Key Laboratory for Agro-Environment and Agro-Product Safety, Nanning 530004, China; 3. Key Laboratory of
Crop Cultivation and Tillage, Guangxi Colleges and Universities, Nanning 530004, China)

Abstract: The pollen receptor-like protein kinase (PRK) family, an LRR receptor-like protein kinase, not only plays a role in pollen development and fertilization, but also plays a role in stress response. Based on the analysis of transcriptome data that generated in our previous study, we found that *AhPRK4* was an aluminum-responsive gene. To explore the role of *AhPRK4* in response to aluminum stress, we analyzed the expression of *AhPRK4* by qRT-PCR in ‘ZH2’ (Al-sensitive) and ‘99-1507’ (Al-tolerant), clarified the protein structure and genetic relationship of *AhPRK4* by sequence analysis, phylogenetic tree construction and other genetic analysis, constructed the recombinant plasmid by homologous recombination, obtained the intracellular domain recombinant protein of *AhPRK4* by prokaryotic expression technology and determined the activity of the recombinant protein by incubation with phosphorylated antibodys. The results were as follows: (1) The transcription level of *AhPRK4* was up-regulated after different aluminum treatments time and different aluminum concentrations, indicating that *AhPRK4* was an aluminum inducible gene. (2) The *AhPRK4* protein had 673 amino acids with transmembrane domain, signal peptide and phosphorylation active sites, belonging to the LRR-III protein kinase family. (3) The GST-*AhPRK4*-CD recombinant protein was induced *in vitro* and verified by Western Blot. And the recombinant protein had phosphorylated on both serine/threonine and tyrosine residues, but had no significant auto-phosphorylation activity. In conclusion, *AhPRK4* is an aluminum responsive gene, which participates in the regulation of short-term aluminum stress and is phosphorylated *in vitro*.

Key words: peanut (*Arachis hypogaea*), aluminum stress, pollen receptor-like protein kinase, expression analysis, prokaryotic expression

花生(*Arachis hypogaea*)是我国重要的油料和经济作物,是主要的食用植物油来源。在我国,花生产区可分为南方产区和北方产区。但是南方地区的土壤多为酸性土壤,pH 值在 4.5~6.0 之间,Al₂O₃ 含量高,交换性 Al³⁺ 占阳离子交换量的 20%~80%(李庆逵,1983)。当 pH 低于 5.0 时,铝以有毒的形态存在来引起作物毒害,故酸雨和铝毒被认为是南方地区农作物生长重要的限制因子之一(李学垣等,1995)。在我国,南方产区花生产量低于全国平均水平,与北方产区相比仍然存在较大的差距(鲁清等,2017),故通过阐明花生受铝毒害的机制,进而选育耐铝性品种来提高南方花生生产力愈发重要。研究表明花生受铝毒害的部位主要是根尖,表现为根系生长受抑制、线粒体功能受损、ROS 迸发以及发生细胞程序性死亡等(詹洁等,2008;徐芬芬等,2014;Huang et al., 2014)。花生响应铝毒害的机制主要包括外部排斥和内部耐受两种,这两种机制中需要众多成员参与来传递信号,发挥功能,最终使得花生响应铝毒害。

类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinases, RLKs)是一种由胞外域接收信号,后通过激酶域传

递和激活下游信号通路完成胞内外信号转导的酶活性受体(马媛媛等,2005),在植物中广泛存在,并可分为多个家族(Shiu & Bleeker, 2001a, b),参与众多生长代谢过程的调控,如参与植物的生长发育进程(Nibau & Cheung, 2011)、植物对病虫害防御应答(Yang & Ramonell, 2012)和植物抵抗非生物胁迫(Osakabe et al., 2010)等。PRKs 蛋白是一类富含亮氨酸重复序列(LRR)的 RLK 蛋白(Duckney et al., 2017),首个 PRK 激酶是在矮牵牛中被发现,命名为 PRK1,特异性分布在花粉中,并在减数分裂中发挥作用(Mu et al., 1994)。拟南芥中的 6 个 PRK 成员也在花粉中高表达,并命名为 *AtPRK1-6*(Chang et al., 2013)。研究发现,PRKs 在花粉管发育(Chang et al., 2013; Duckney et al., 2017)、信号转导(Huang et al., 2014)和细胞死亡(Wrzaczek et al., 2014)等方面发挥了重要的调控作用,但关于 PRKs 在胁迫中的功能研究很少,仅在拟南芥的低水势胁迫下研究发现,相较于野生型,突变体 *prk1* 会积累更多的脯氨酸来响应胁迫(Verslues et al., 2014),而 PRKs 在铝胁迫下是否有响应还未见报道。

RLKs 通过磷酸化作用传递信号进而响应胁迫。在冷胁迫下,激酶 OST1 (OPEN STOMATA 1) 活性被激活,通过磷酸化 ICE1 (Inducer of CBF expression 1) 来增加该转录因子的蛋白稳定性和转录活性,进而增强拟南芥对低温的抵抗能力 (Ding et al., 2015)。CIPK26 (CBL-interacting protein kinase 26) 与 RBOHF (respiratory burst oxidase homolog F) 的 N 端存在相互作用,并且可磷酸化 RBOHF 来刺激 ROS 产生,进而影响 RBOHF 在植物胁迫应答中的调控 (Drerup et al., 2013)。SOBIR1 (suppressorn of BIR1-1) 激酶依赖于其蛋白浓度发生自磷酸化,其第 529 位的苏氨酸以及 $\beta 3$ - αC 环结构对磷酸化至关重要,并影响 SOBIR1 对烟草细胞死亡的调控 (Wei et al., 2022)。拟南芥 CPK28 (calcium-dependent protein kinase 28) 可响应拟南芥 Ca^{2+} 信号路径参与免疫反应和生长发育调控,研究发现 CPK28 具自磷酸化活性,并随着 Ca^{2+} 浓度增加而活性增强,其中第 318 位丝氨酸是关键活性位点,尽管该位点突变不会影响 CPK28 调控营养生长和生殖生长时期的转换,却会对 AtPep1 引发的氧化应激表现高敏性状,同时对丁香假单胞菌具有更强的抵抗力 (Bredow et al., 2021)。这表明 RLKs 的磷酸化活性与这些蛋白在植物胁迫应答中的作用密切相关。

通过对实验室已有转录组数据的挖掘 (Xiao et al., 2021), 我们发现花粉类受体蛋白激酶基因 *AhPRK4* 转录受铝胁迫处理的诱导,并且在不同花生铝耐性品种中有着不同的响应模式,暗示其参与花生铝胁迫响应过程。本研究以 *AhPRK4* 的铝胁迫响应模式和蛋白活性为研究内容,采用 qRT-PCR 检测了不同铝浓度和处理时间条件下, *AhPRK4* 在花生耐铝品种 ‘99-1507’ 和铝敏感品种 ‘中花 2 号’ (‘ZH2’) 的转录变化,对 *AhPRK4* 胞内域进行克隆,并开展了原核表达分析,通过磷酸化抗体对其自磷酸化活性进行检测,拟探讨以下问题:(1) *AhPRK4* 的铝响应模式;(2) *AhPRK4* 胞内域的磷酸化状态。为后续在蛋白质水平上探究 *AhPRK4* 蛋白的生化功能以及在铝胁迫下的作用机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试花生品种由中国农业科学院油料作物研

究所提供,并经实验室早期筛选鉴定出的铝敏感品种 ‘中花 2 号’ (‘ZH2’) 和耐铝品种 ‘99-1507’ (詹洁等, 2008)。将花生种子经湿润珍珠岩催芽 3 d 后,去除花生种皮并掐除约 1 cm 的主根根尖,在 26 °C 条件下将材料置于改良的 Hoagland 营养液中培养至第三片真叶长出,转移花生幼苗至 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液 (pH 4.2) 中培养 24 h,之后做以下两种处理:一是用 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液 (含 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 4.2) 分别处理花生幼苗 4、8、12、24 h;二是用不同浓度的 AlCl_3 溶液 (50、100、200、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别处理花生幼苗 4 h 和 8 h。以上两种处理均以改良的 Hoagland 营养液处理作为对照,取约 1 cm 的根尖作为实验材料。

1.2 RNA 提取

先参照植物总 RNA 提取试剂盒 (Promega) 方法提取 RNA,之后参照反转录试剂盒 (Takara) 方法进行 RNA 反转录,获得 cDNA。

1.3 *AhPRK4* 在铝胁迫下表达量检测

根据 *AhPRK4* 基因 CDS (coding sequence) 序列设计荧光定量 PCR 检测引物 (表 1), 参照 TB Green Premix Ex Tap II 酶 (Takara) 说明,设置 qRT-PCR 反应体系和程序,以 *UBQ10R* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行基因相对表达量的分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>AhPRK4</i> -F1	GATGCATTCTCGGCATGAG	荧光定量 qRT-PCR
<i>AhPRK4</i> -R1	GCTAGGAATATGGCCGCTGA	
<i>UBQ10R</i> -F	CGCACACTCGCTGACTACAAC	
<i>UBQ10R</i> -R	CACGGAGACGGAGGACAAGG	原核表达 (下划线 表示酶切位点) Prokaryotic expression (underline indicates enzyme digestion site)
<i>AhPRK4</i> -F2	GAATTCGTTTCAAGTGATGAGG CCAAGAT	
<i>AhPRK4</i> -R2	CTCGAGAAGAGTTT CCGAATAAAAGGACAAG	

1.4 生物信息学分析

利用在线网站 ProtParam tool 预测 *AhPRK4* 的分子量、等电点等理化性质 (<https://web.expasy.org/protparam/>); 通过 WoLF PSORT 来预测其亚细胞定位 (<https://wolfsort.hgc.jp/>); 通过 NCBI 比对获得其他物种对应的基因序列,利用 MEGA 7.0 构建进化树,并在软件 DNAMAN 进行多序列比对,同时通过

NCBI Conserved Domain 预测 AhPRK4 蛋白的保守结构域 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。对于目的蛋白的跨膜域以及信号肽分析分别通过在线网站 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 完成,同时对 AhPRK4 的磷酸化位点以及互作蛋白进行了预测,磷酸化预测软件为 iGPS 1.0,互作蛋白预测网站为 STRING (https://stringdb.org/cgi/input.pl?sessionId=K7gDcPsKo9E0&input_page_active_form=single_sequence)。AhPRK4 启动子元件预测于 PlantCARE 在线网站进行 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。

1.5 AhPRK4 激酶域克隆和原核表达载体构建

从 NCBI 上搜索得到 AhPRK4 的基因序列,运用软件 PrimerPremier 5 设计激酶域克隆引物(表 1)。以‘ZH2’根尖 cDNA 为模板,克隆获得 AhPRK4 的胞内激酶域,参照 ClonExpressII One Cloning Kit 试剂盒方法连接 AhPRK4-CD 至 pGEX-6p-1 载体(双酶切位点为 EcoR I 和 XhoI),热激转化至 DH5 α ,将经过测序验证正确的阳性克隆菌株提取质粒(AhPRK4-CD-pGEX-6p-1)。

1.6 AhPRK4 蛋白的原核表达和纯化

将 AhPRK4-CD-pGEX-6p-1 重组质粒转化至 Rosetta 感受态细胞,37 °C 培养至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8,加入终浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),在 16 °C 下诱导 GST-AhPRK4-CD 蛋白表达,经 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达情况。参考 Glutathione Sepharose 4B 填料(GE 公司)说明纯化 AhPRK4-CD 重组蛋白,并进行 Western Blot 验证。

1.7 GST-AhPRK4-CD 自磷酸化检测

加 0.5 μ g 的 GST-AhPRK4-CD 蛋白到 100 μ L PBS 磷酸缓冲液(含 25 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol · L⁻¹ MnCl₂, 1 mmol · L⁻¹ DTT, 1 $\times$ 蛋白酶抑制剂和 1 mg · mL⁻¹ ATP)中,以不加 ATP 为对照组,混合液于 28 °C 下孵育 10 min,并于 100 °C 下孵育 10 min 变性,后取 30 μ L 样品经 12% SDS-PAGE 分离,并转膜依次用兔抗的酪氨酸磷酸化抗体(Cell Signaling 公司)、苏氨酸磷酸化抗体(Cell Signaling 公司)以及鼠抗的 GST 抗体(康为世纪公司)孵育并化学显色,根据对照组和处理组条带差异判断磷酸化及激酶活性。

2 结果与分析

2.1 AhPRK4 在不同铝处理时间、浓度下的表达

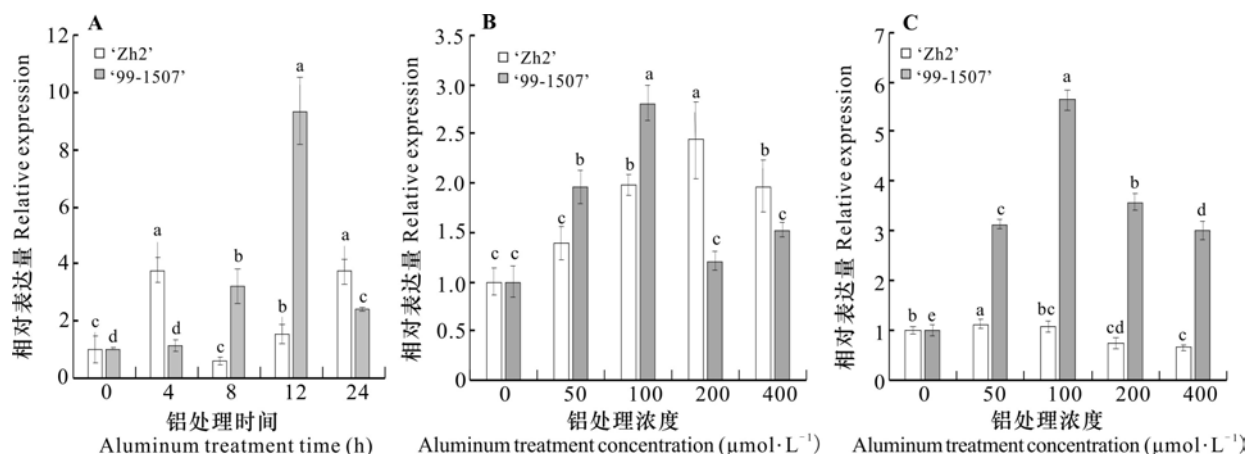
由图 1:A 可知,‘ZH2’和‘99-1507’经铝处理不同时间后,与对照相比,AhPRK4 的表达量均上升,但两个花生品种中 AhPRK4 的表达趋势有所差异,‘ZH2’中,AhPRK4 在 4 h 的表达量最高,8 h 的表达量最低,随后表达量则一直增加。‘99-1507’中,AhPRK4 表达量则先增加后降低,在 12 h 达到最高。由图 1:B,C 可知,在经不同铝浓度处理 4 h 和 8 h 后,发现在两个花生品种中 AhPRK4 的表达量随着处理浓度的增加同样呈先增加后降低的趋势;且在不同铝浓度处理 8 h 时,AhPRK4 在耐铝性品种‘99-1507’中的响应比敏感性品种‘ZH2’更剧烈。综上所述,这些结果表明 AhPRK4 是铝胁迫响应基因。

2.2 AhPRK4 的生物信息学分析

2.2.1 AhPRK4 蛋白理化性质、结构特征及亲缘关系的分析 分析 AhPRK4(LOC112718333)的序列信息可知,该基因 CDS(coding sequence)全长为 2 022 bp,编码 673 个氨基酸。经预测该蛋白质分子量为 74.92 kD,理论等电点为 6.06;AhPRK4 蛋白 N 端具多个亮氨酸重复结构域,C 端具丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶结构域,激酶域含有 ATP 结合位点,并与其他物种 PRK 成员的激酶域具有较高的同源性(图 2);AhPRK4 蛋白含有两个跨膜域,属于膜功能蛋白。因此,AhPRK4 蛋白属于具有跨膜域和信号肽的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。

进化树构建结果显示 AhPRK4 独立成一个分支,与比对的 9 个物种之间有较大的差异;拟南芥中,AhPRK4 与 AtPRK1 和 AtPRK4 有较高的同源性(图 3)。进一步查询花生 LRR-RLK 家族分类,AhPRK4 属于 LRR-III 蛋白激酶家族(Wang et al., 2021)。经预测 AhPRK4 具可磷酸化的氨基酸位点,包括丝氨酸(S)和苏氨酸(T)。因此,AhPRK4 可能与 AtPRK1 和 AtPRK4 具相近的功能,可能发生磷酸化。

2.2.2 AhPRK4 启动子分析和互作蛋白预测 经花生基因组序列提取,得到 AhPRK4 基因 ATG 前长 2 000 bp 的启动子序列。分析启动子元件,结果表明:AhPRK4 的启动子元件包括生长素响应元件、ABA 响应元件、MeJA 响应元件等激素响应元件,



A. 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同铝处理时间; B. 不同浓度铝处理 4 h; C. 不同浓度铝处理 8 h。不同小写字母代表 0.05 水平上存在差异。
A. 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aluminum for different time of treatments; B. Different concentrations of aluminum treatment for 4 h; C. Different concentrations of aluminum treatment for 8 h. Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

图 1 *AhPRK4* 在铝处理下的表达分析

Fig. 1 Expression analysis of *AhPRK4* under aluminum treatment

光调控元件,干旱胁迫响应元件和 60 K 蛋白结合位点(图 4:A)。以拟南芥数据库为筛选基础,筛选 *AhPRK4* 的相互作用蛋白,发现 *AhPRK4* 可与多个蛋白存在互作,包括 LMK1 (leucine-rich repeat receptor-like kinase with extracellular malectin-like domain 1)、ABCB16 (ATP-binding cassette B16)、PME30 (pectin methylesterase 30)、激酶 AT1G34420 (leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein)、HAK1 (HDS-associated RLK1)、PEPR2 (PEP1 receptor 2)、AT1G12460 (leucine-rich repeat protein kinase family protein)、AT1G24650 (leucine-rich repeat protein kinase family protein)、FEI1、AT1G49100 (leucine-rich repeat protein kinase family protein)(图 4:B),推测 *AhPRK4* 可能参与激素调控、细胞死亡、非生物胁迫应答、生物防御、细胞壁膨大等调控过程。

2.3 *AhPRK4* 激酶域克隆和原核表达载体构建

以 'ZH2' 根尖 cDNA 为模板,克隆到 *AhPRK4* 胞内域片段 (*AhPRK4*-CD)(图 5:A),序列长度为 1 122 bp,与目的片段 (LOC107470884) 序列 100% 同源。连接 *AhPRK4*-CD 片段和 pGEX-6p-1 载体,获得重组质粒 (*AhPRK4*-CD-pGEX-6p-1)(图 5:B)。

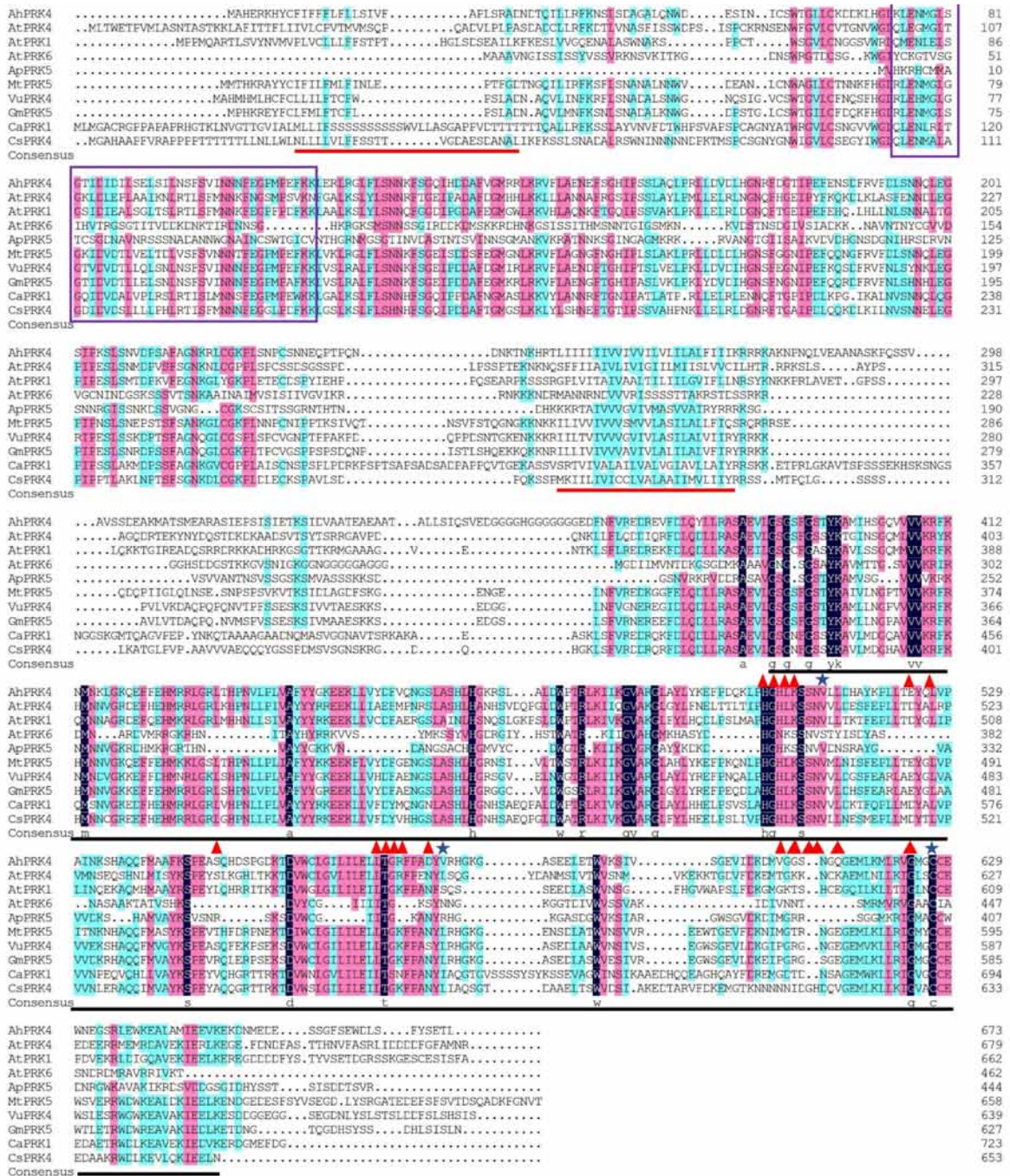
2.4 重组蛋白诱导表达和纯化

将含有 *AhPRK4*-CD-pGEX-6p-1 重组质粒的

Rosetta 菌株在 16 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 环境中培养,在约 71 kD 处发现诱导后的上清液中有加深的特异性条带,表明其以可溶性的形式存在于上清液中(图 6)。GST-*AhPRK4*-CD 重组蛋白用 Glutathione Sepharose 4B 填料纯化,在结合后用 PBS 洗脱无明显条带(图 7:A),表明层析柱与 GST-*AhPRK4*-CD 重组蛋白结合较好,后经 Elution buffer 洗脱后获得了条带单一且位置正确的目的条带,表明 GST-*AhPRK4*-CD 重组蛋白已成功纯化。将获得的 GST-*AhPRK4*-CD 纯化蛋白根据携带的标签蛋白经特异性 GST 一抗孵育,进行 Western Blot 验证,可以发现在约 71 kD 处出现清晰的特异性目的条带(图 7:B),表明 GST-*AhPRK4*-CD 重组蛋白纯化效果较好。

2.5 重组蛋白体外磷酸化检测

将纯化的 GST-*AhPRK4*-CD 蛋白进行体外磷酸化实验,用磷酸化抗体检测磷酸化水平,用 GST 抗体标定上样水平。由图 8 可知,两个磷酸化抗体孵育后,均能在目标蛋白位置处检测到条带,磷酸化苏氨酸抗体 (anti-pT) 有着更强的磷酸化信号,磷酸化酪氨酸抗体 (anti-pY) 信号较弱,表明该蛋白在原核诱导的过程中已经发生了磷酸化修饰。但与对照组相比,ATP 处理并未使得条带有加深的现象(图 8),暗示 *AhPRK4*-CD 蛋白不存在体外自磷酸化活性。



红线表示跨膜域；紫框表示 LRR 结构域；红三角表示 ATP 结合位点/活性位点；五角星表示活性位点；黑线表示激酶域。
Ah. 花生；**At.** 拟南芥；**Ap.** 非洲相思子；**Mt.** 蒺藜苜蓿；**Vu.** 豇豆；**Gm.** 大豆；**Ca.** 小果咖啡；**Cs.** 茶。蛋白序列号依次为 XP_029145249.1、AT3G20190.1、AT5G35390.1、AT5G20690.1、XP_027356884.1、XP_039687740.1、XP_027905246.1、XP_003523723.2、XP_027124100.1、XP_028090548.1。下同。

Red underline indicates transmembrane domain; purple frame indicates LRR structure domain; red triangles indicate ATP binding site or active site; pentagram indicate active site; black underline indicates kinase domain. **Ah.** *Arachis hypogaea*; **At.** *Arabidopsis thaliana*; **Ap.** *Abrus precatorius*; **Mt.** *Medicago truncatula*; **Vu.** *Vigna unguiculata*; **Gm.** *Glycine max*; **Ca.** *Coffea arabica*; **Cs.** *Camellia sinensis*. The accession number of protein sequence are as follows: XP_029145249.1, AT3G20190.1, AT5G35390.1, AT5G20690.1, XP_027356884.1, XP_039687740.1, XP_027905246.1, XP_003523723.2, XP_027124100.1, and XP_028090548.1. The same below.

图 2 花生与其他物种 PRK 氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison of PRK amino acid sequences between peanut and other species

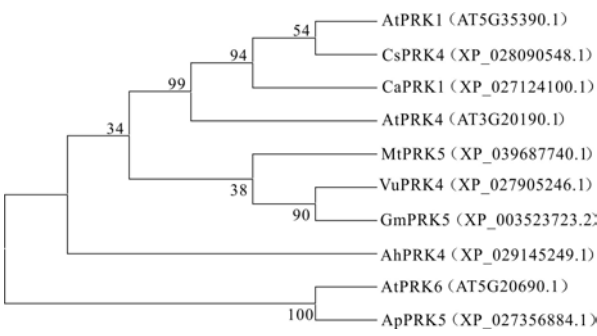


图 3 AhPRK4 进化树分析

Fig. 3 Evolutionary tree analysis of AhPRK4

3 讨论与结论

目前对 PRK 家族在胁迫应答机理的研究还未见系统的报道,仅在拟南芥突变体 *prk1* 缺水处理下发现,相较野生型来说,该突变体会积累 3.2 倍的脯氨酸来响应低水量胁迫 (Verslues et al., 2014)。前人研究也表明随着铝处理浓度的增加和铝处理时间的延长,花生根系游离脯氨酸的含量整体呈递增的趋势 (徐芬芬等,2014)。本研究在对铝处理下花生根尖 *AhPRK4* 转录水平的检测

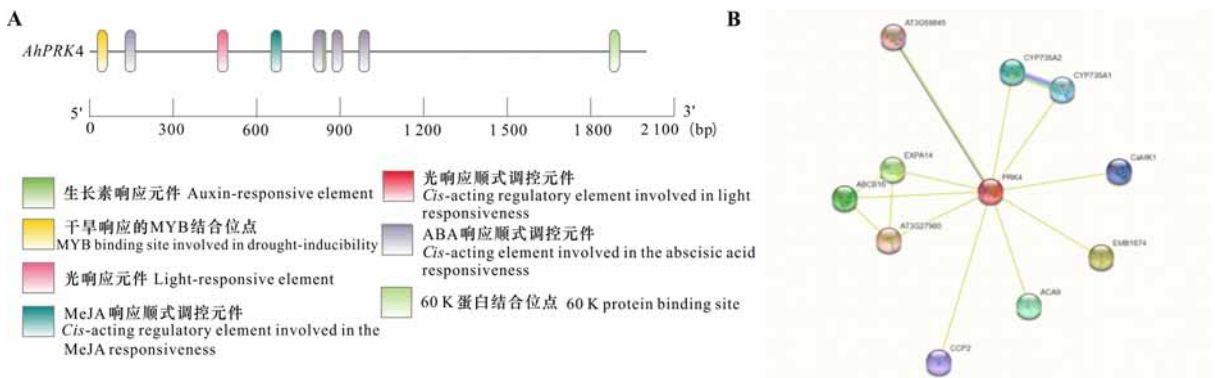
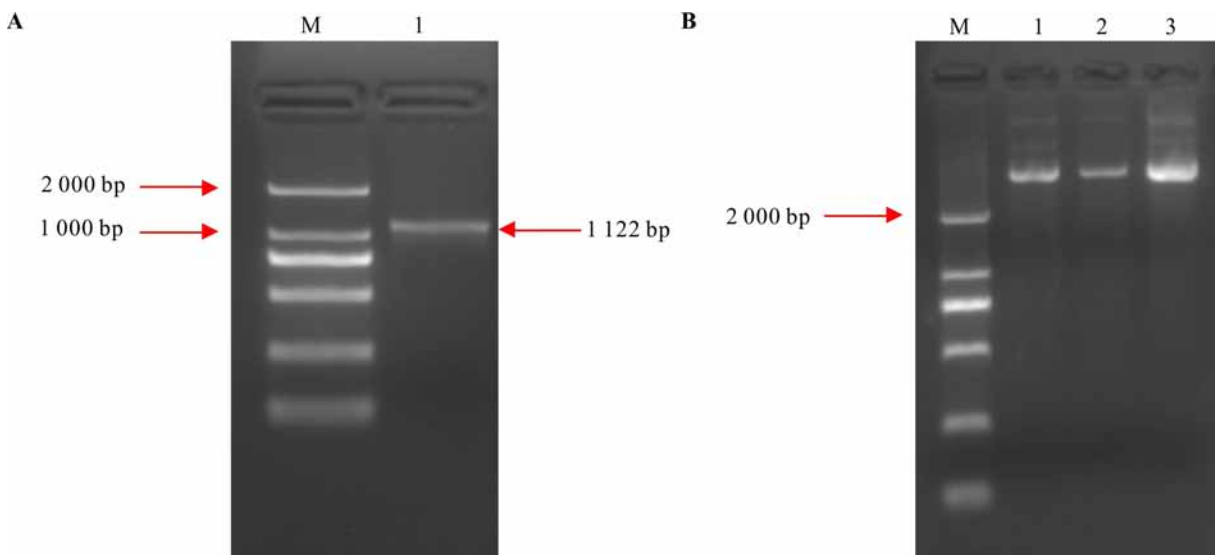


图 4 *AhPRK4* 启动子元件分析及互作蛋白分析

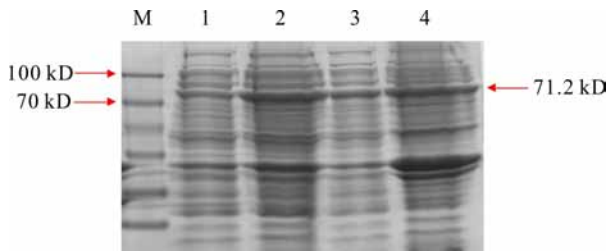
Fig. 4 Promoter element analysis and interaction protein analysis of *AhPRK4*



A: M. Marker; 1. 扩增产物。B: M. Marker; 1,2,3. 质粒样品编号。
A: M. Marker; 1. Amplified products. B: M. Marker; 1,2,3. Plasmid sample number.

图 5 PCR 扩增 *AhPRK4*-CD 片段及重组质粒电泳检测

Fig. 5 PCR amplification of *AhPRK4*-CD fragment and detection of recombinant plasmid electrophoresis

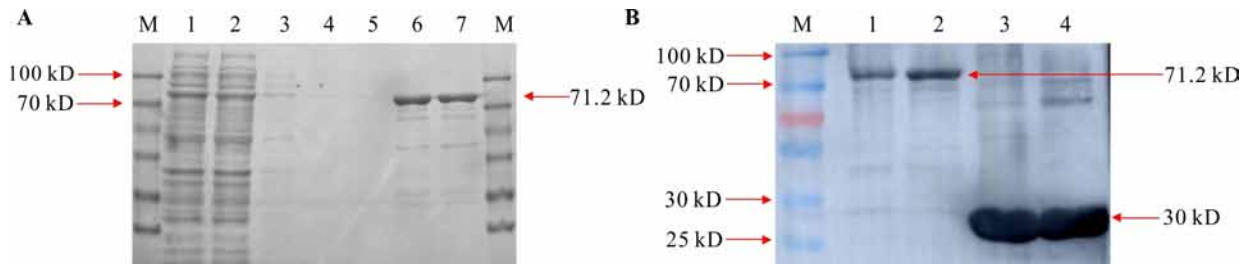


M. 蛋白 marker; 1. 未诱导的总蛋白; 2. IPTG 诱导后的总蛋白; 3. IPTG 诱导后裂解液上清; 4. IPTG 诱导后裂解液沉淀。

M. Protein marker; 1. Total uninduced protein; 2. IPTG-induced total protein; 3. IPTG-induced supernatant; 4. IPTG-induced precipitation.

图 6 AhPRK4-CD 原核表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis analysis of prokaryotic expression of AhPRK4-CD



M. 蛋白 marker。A: 1. 经 IPTG 诱导后的总蛋白; 2. IPTG 诱导后裂解液上清; 3. 流穿液; 4, 5. PBS 洗脱液; 6, 7. 纯化蛋白样品。B: 1, 2. GST-AhPRK4-CD 纯化蛋白; 3, 4. GST 标签蛋白。

M. Protein marker. A: 1. IPTG-induced total protein; 2. IPTG-induced supernatant; 3. Flowthrough buffer; 4, 5. PBS wash buffer; 6, 7. Purified protein. B: 1, 2. GST-AhPRK4-CD purified protein; 3, 4. GST purified protein.

图 7 GST-AhPRK4-CD 重组蛋白的纯化和 Western Blot 检测

Fig. 7 Purification and Western Blot detection of GST-AhPRK4-CD recombinant protein

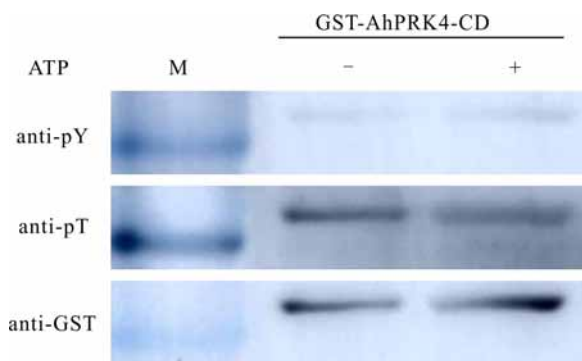
在水势胁迫下通过脯氨酸响应胁迫 (Verslues et al., 2014), 故 AhPRK4 也可能参与花粉管发育和响应胁迫中。以 AhPRK4 的拟南芥同源蛋白 AtPRK4 的序列在拟南芥数据库中筛选预测 AhPRK4 的互作蛋白, 发现互作蛋白中以各类型激酶最多, 同时预测 AhPRK4 具有磷酸化位点, 故 AhPRK4 可能以磷酸化与各类型激酶之间形成调控网络。在预测的互作蛋白中, 部分蛋白功能已有报道, 其中 LMK1 调控叶片死亡 (Li et al., 2020), HAK1 可与 PBL27 蛋白互作参与 HDS (herbivore-derived danger) 防御反应 (Uemura et al., 2020), PEPR2 参与 BSCTV (beet severe curly top virus) 病害防御 (Zeng et al., 2020), 推测 AhPRK4 在胁迫防御中起作用, 进一步验证其互

中也发现 AhPRK4 是一个铝胁迫响应基因, 进一步分析 AhPRK4 的表达水平发现其在两个铝耐性不同的花生品种中的表达模式不同, 在不同铝浓度处理下, AhPRK4 表达水平均显著提高, 在铝处理 8 h 后, 在耐铝品种 ‘99-1507’ 中的表达上调更强烈, 暗示 AhPRK4 是花生耐铝相关基因, 在铝胁迫下, AhPRK4 是否与 AtPRK1 功能类似而与应激脯氨酸之间有关联? 有待进一步研究。

AhPRK4 蛋白与其他物种的 PRK 成员的激酶域具有较高的同源性, 表明此结构域在不同物种 PRK 以及同一物种不同 PRK 成员的保守性。系统进化树中, AhPRK4 与 AtPRK4 以及 AtPRK1 在同一大分支上, 具有较近的亲缘关系, 其中 AtPRK4 与 AtNET2A 互作共同参与微管运动来调控花粉管发育 (Duckney et al., 2017), AtPRK1 可

作蛋白对探究 AhPRK4 在铝胁迫中的响应机制具有重要意义。除此之外, 本研究对 AhPRK4 基因的启动子元件进行预测, 发现该基因启动子区域含有生长素和 ABA 响应元件。生长素在植物铝胁迫响应信号传递途径中发挥作用, 铝胁迫下植物的生长素在根尖的细胞分布和在细胞的运输可能会受到影响, 进而导致根长受到抑制 (吴道铭等, 2014); 除生长素外, 在大豆铝胁迫与 ABA 实验中也发现, 大豆根尖内源 ABA 与铝处理时间和铝处理浓度呈正相关关系, 并且 ABA 处理可减少铝胁迫下的氧化伤害 (侯宁宁, 2009)。故 ABA 和生长素是否也调控花生铝胁迫? 有待进一步研究。

AhPRK4 属于 LRR-III 类受体蛋白激酶家族



M. 蛋白 marker; -/+ 是否添加 ATP; **anti-pY**. 酪氨酸磷酸化抗体; **anti-pT**. 苏氨酸磷酸化抗体; **anti-GST**. GST 标签抗体。蛋白 marker 处蓝色条带表示 70 kD 蛋白位置。

M. Protein marker; -/+ Whether ATP is added; **anti-pY**. Phospho-tyrosine antibody; **anti-pT**. Phospho-threonine antibody; **anti-GST**. GST-Tag mouse monoclonal antibody. The blue band of the marker indicates the location of 70 kD protein.

图 8 GST-AhPRK4-CD 重组蛋白自磷酸化检测

Fig. 8 Auto-phosphorylation detection of GST-AhPRK4-CD recombinant protein

的成员之一,具丝氨酸/苏氨酸激酶域,并经预测具有磷酸化位点,为了验证 AhPRK4 是否可发生磷酸化及探究 AhPRK4 的活性,本研究采用原核表达和亲和柱层析的方法获得 AhPRK4-CD 重组蛋白来探究其生物功能,在蛋白诱导过程中,16℃条件下可获得较好的诱导效果。本研究已成功诱导并纯化得到 GST-AhPRK4-CD 重组蛋白,体外磷酸化抗体孵育检测 AhPRK4-CD 重组蛋白可以发生磷酸化修饰,但在酪氨酸位点的磷酸化修饰水平极低,由于我们使用的磷酸化苏氨酸抗体(Cell Signaling Technology, 9381)对磷酸化丝氨酸残基也有一定的识别能力,所以我们认为 AhPRK4-CD 的磷酸化修饰主要发生在丝/苏氨酸残基上。在本研究中,我们未检测到 AhPRK4-CD 的自磷酸化活性,一方面,可能是 AhPRK4 蛋白的自磷酸化活性较低,需要采用更灵敏的检测手段,如同位素标记等方法来进行检测;另一方面,AhPRK4 也可能是一种需要被其他因子磷酸化来共同发挥作用的辅助蛋白,仍需要进一步实验探究。

综上所述,AhPRK4 为铝胁迫应答基因,该基因启动子区域含有胁迫激素应答元件,预测的互作蛋白也可在胁迫下起作用。在此基础上,采用

原核表达的技术成功诱导得到 AhPRK4-CD 纯化蛋白,并验证其可以发生磷酸化修饰,为探究该蛋白在花生铝胁迫中的调控功能奠定了基础。

参考文献:

- BREDOW M, BENDER KW, JOHNSON DA, et al., 2021. phosphorylation-dependent subfunctionalization of the calcium-dependent protein kinase CPK28 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118(19): e2024272118.
- CHANG F, GU Y, MA H, et al., 2013. AtPRK2 promotes ROP1 activation via RopGEFs in the control of polarized pollen tube growth [J]. *Mol Plant*, 6(4): 1187-1201.
- DING YL, LI H, ZHANG XY, et al., 2015. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 32(3): 278-289.
- DRERUP MM, SCHLÜCKING K, HASHIMOTO K, et al., 2013. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF [J]. *Mol Plant*, 6(2): 559-569.
- DUCKNEY P, DEEKS MJ, DIXON MR, et al., 2017. Actin-membrane interactions mediated by NETWORKED2 in *Arabidopsis* pollen tubes through associations with pollen receptor-Like kinase 4 and 5 [J]. *New Phytol*, 216(4): 1170-1180.
- HOU NN, 2009. Study of the regulating mechanism of abscisic acid and antioxidative system on aluminum tolerance in soybean (*Glycine max* L.) [D]. Changchun: Jilin University. [侯宁宁, 2009. 脱落酸和抗氧化系统对大豆耐铝性的调控机制 [D]. 长春: 吉林大学.]
- HUANG WJ, LIU HK, MCCORMICK S, et al., 2014. Tomatopistil factor STIG1 promotes *in vivo* pollen tube growth by binding to phosphatidylinositol 3-phosphate and the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2 [J]. *Plant Cell*, 26(6): 2505-2523.
- HUANG WJ, OO TL, HE HY, et al., 2014. Aluminum induces rapidly mitochondria-dependent programmed cell death in Al-sensitive peanut root tips [J]. *Bot Stud*, 55(1): 67.
- LI QK, 1983. Red soil of China [M]. Beijing: Science Press. [李庆逵, 1983. 中国红壤 [M]. 北京: 科学出版社.]
- LI XW, SANAGI M, LU Y, et al., 2020. Protein phosphorylation dynamics under carbon/nitrogen-nutrient stress and identification of a cell death-related receptor-like kinase in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 11: 377.
- LI XY, HUANG QY, HU HQ, et al., 1995. Forms of active aluminum in acid soils and aluminum phytotoxicity [J]. *J Huanzhong Agric Univ*, (4): 356-361. [李学垣, 黄巧云,

- 胡红青, 等, 1995. 酸性土壤中活性铝的形态与铝毒 [J]. 华中农业大学学报, (4): 356–361.]
- LU Q, LI SX, CHEN XP, et al., 2017. Current situation, problems and suggestions of peanut breeding in southern China [J]. Chin J Oil Crop Sci, 39(4): 556–566. [鲁清, 李少雄, 陈小平, 等, 2017. 我国南方产区花生育种现状、存在问题及育种建议 [J]. 中国油料作物学报, 39(4): 556–566.]
- MA YY, GAN R, WANG NN, 2005. Biological functions of leucine-rich repeat class of receptor-like protein kinases in plants [J]. J Plant Physiol Mol Biol, 31(4): 331–339. [马媛媛, 甘睿, 王宁宁, 2005. 植物富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的生物学功能 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 31(4): 331–339.]
- MU JH, LEE HS, KAO TH, 1994. Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase [J]. Plant Cell, 6(5): 709–721.
- NIBAU C, CHEUNG AY, 2011. New insights into the functional roles of CrRLKs in the control of plant cell growth and development [J]. Plant Signal Behav, 6(5): 655–659.
- OSAKABE Y, MIZUNO S, TANAKA H, et al., 2010. Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. J Biol Chem, 285(12): 9190–9201.
- SHIU SH, BLEECKER AB, 2001a. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 98(19): 10763–10768.
- SHIU SH, BLEECKER AB, 2001b. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling [J]. Sci STKE, (113): re22.
- UEMURA T, HACHISU M, DESAKI Y, et al., 2020. Soy and *Arabidopsis* receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from *Spodoptera* species and mediate herbivore resistance [J]. Comm Biol, 3(1): 224.
- VERSLUES PE, LASKY JR, JUENGER TE, et al., 2014. Genome-wide association mapping combined with reverse genetics identifies new effectors of low water potential-induced proline accumulation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 164(1): 144–159.
- WANG X, WU MH, XIAO D, et al., 2021. Genome-wide identification and evolutionary analysis of RLKs involved in the response to aluminium stress in peanut [J]. BMC Plant Biol, 21(1): 281.
- WEI X, WANG YL, ZHANG S, et al., 2022. Structural analysis of receptor-like kinase SOBIR1 reveals mechanisms that regulate its phosphorylation-dependent activation [J]. Plant Comm, 3(2): 100301.
- WRZACZEK M, VAINONEN JP, STAEL S, et al., 2015. GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in *Arabidopsis* [J]. EMBO J, 34(1): 55–66.
- WU DM, CAO HP, SHEN H, 2014. Response of auxin and its transporter to aluminum stress in plants [J]. Plant Physiol J, 50(8): 1135–1143. [吴道铭, 曹华苹, 沈宏, 2014. 生长素及其运输蛋白对植物铝胁迫的响应 [J]. 植物生理学报, 50(8): 1135–1143.]
- XIAO D, LI X, ZHOU YY, et al., 2021. Transcriptome analysis reveals significant difference in gene expression and pathways between two peanut cultivars under Al stress [J]. Gene, 781: 145535.
- XU FF, CHENG SY, TIAN YQ, 2014. Effects of aluminum stress on growth and physiological characteristics in peanut root [J]. J Henan Agric Sci, 43(9): 52–55. [徐芬芬, 程诗雨, 田玉清, 等, 2014. 铝胁迫对花生根系生长和生理特性的影响 [J]. 河南农业科学, 43(9): 52–55.]
- YANG X, RAMONELL D, 2012. Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity [J]. Front Biol, 7(2): 155–166.
- ZENG RX, LIU XS, LI HY, et al., 2020. Danger peptide signaling enhances internalization of a *Geminivirus* symptom determinant in plant cells during Infection [J]. J Exp Bot, 71(9): 2817–2827.
- ZHAN J, KOU RJ, HE LF, 2008. Effects of aluminum on morphological structure of peanut root tips [J]. Chin J Oil Crop Sci, 30(1): 79–83. [詹洁, 寇瑞杰, 何龙飞, 2008. 铝对花生根尖细胞形态结构的影响 [J]. 中国油料作物学报, 30(1): 79–83.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202203018

夏科, 赵志国, 吴巧芬, 等, 2023. 土壤因子与华重楼生物量和药效成分含量相关性分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1080–1087.

XIA K, ZHAO ZG, WU QF, et al., 2023. Correlation analysis between soil factors with biomass and medicinal components of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. Guihaia, 43(6): 1080–1087.



土壤因子与华重楼生物量和药效成分含量相关性分析

夏科¹, 赵志国¹, 吴巧芬¹, 李秀娟¹, 郑文俊², 仇硕^{1,2*}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室,
中国科学院
广西 桂林 541006; 2. 桂林理工大学 旅游与风景园林学院, 广西 桂林 541006)

摘要: 为研究土壤因子对华重楼生长和药效成分积累的影响, 该研究利用高效液相色谱技术 (HPLC) 以及相关性和多元线性回归分析方法, 测定了华重楼不同产地土壤成分、样品的生物量和重楼皂苷的含量, 分析了土壤因子与华重楼生物量和药效成分的相关性。结果表明: (1) 不同产地土壤成分和华重楼产量及其重楼皂苷含量均有差异。(2) 相关性分析显示, 干重与有机质、全氮、碱解氮显著正相关, 重楼皂苷 I 与有机质和速效磷显著正相关, 重楼皂苷 II 与速效磷和速效钾显著正相关, 而重楼皂苷 VII 与土壤各因子的相关性不显著。(3) 多元线性回归分析显示, 影响干重的主导因子为碱解氮, 影响重楼皂苷 I 的主导因子为有机质, 影响重楼皂苷 II 的主导因子为速效磷, 而重楼皂苷 II 与碱解氮呈线性负相关。综合分析认为, 影响华重楼干重的土壤因子主要是碱解氮, 而影响华重楼皂苷含量的土壤因子主要为有机质和速效磷, 该研究结果为华重楼的人工栽培提供了理论依据。

关键词: 华重楼, 土壤因子, 产量, 重楼皂苷, 相关性分析

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1080-08

Correlation analysis between soil factors with biomass and medicinal components of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

XIA Ke¹, ZHAO Zhiguo¹, WU Qiaofen¹, LI Xiujuan¹, ZHENG Wenjun², QIU Shuo^{1,2*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. College of Tourism & Landscape Architecture, Guilin University of Technology, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: In order to study the effect of soil factors on the growth and medicinal component of *Paris polyphylla* var. *chinensis*, the biomass and the polyphyllin contents of different samples from different origins were determined, soil

收稿日期: 2022-06-16

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB18294026); 广西自然科学基金 (2020GXNSFAA297260); 广西科学院基本业务费项目 (2018YJJ909, CQZ-E-1919); 科技创新基地建设类项目 (2021ZYZX2063)。

第一作者: 夏科 (1985-), 硕士, 助理研究员, 主要从事药用植物栽培及生理生化研究, (E-mail) xiake4502@163.com。

* 通信作者: 仇硕, 博士, 副研究员, 主要从事园林植物栽培生理和分子生物学研究, (E-mail) qiushuo001@163.com。

composition was measured, and the correlations between soil factors biomass and medicinal components were analyzed. The results were as follows: (1) There were differences in soil composition in different place, while the yield and polyphyllin content in samples in different places were quite different. (2) Correlation analysis showed that the dry weight was significantly positively correlated with organic matter, total nitrogen, and alkaline nitrogen, the polyphyllin I content was significantly positively related with organic matter and available phosphorus, the polyphyllin II content was significantly positively correlated with available phosphorus and available potassium. (3) Multiple linear regression analysis showed that the dry weight was dominantly affected by alkaline nitrogen, the polyphyllin I was dominantly affected by organic matter, the polyphyllin II was dominantly affected by available phosphorus, and was linear negatively correlated with alkaline nitrogen. In summary, the main soil factors affecting dry weight was alkaline nitrogen, the main soil factors affecting the polyphyllin total content was organic matter and available phosphorus. The results provide a support for the artificial cultivation.

Key words: *Paris polyphylla* var. *chinensis*, soil factor, yield, polyphyllins, correlation analysis

华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis*) 为百合科 (Liliaceae) 重楼属 (*Paris* L.) 多年生草本植物, 主要分布于我国云南、贵州、广西、四川等地, 为七叶一枝花变种之一 (中国植物志, 1978), 华重楼与云南重楼为《中国药典》收入的 2 个重楼属基源植物。华重楼以根茎入药, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 是云南白药等多种中成药的主要原料 (中华人民共和国药典, 2020)。现代化学和药理研究表明, 华重楼中主要活性成分为重楼皂苷, 临床上常被用于抗肿瘤、抗菌、止血、镇痛等 (刘帅等, 2020)。

药用植物的药效成分及其含量是衡量中药质量的重要指标。药效成分大多为次级代谢产物, 既受自身遗传因素的影响, 也受生长环境因素的影响 (吴庆生等, 2002; 卜静等, 2012; 任平等, 2019)。重楼属植物主要药效成分为重楼皂苷, 其含量的积累受土壤水分 (梁娟等, 2014)、环境温度 (梁娟等, 2016)、光质 (李铂等, 2019) 以及土壤肥力 (郑梅霞等, 2020) 等因素的影响较大, 而受经纬度和海拔高低的影响较小。刘哲等 (2019) 报道了氮、磷、钾配施有利于提高华重楼块茎生物量及总皂苷含量; 刘哲等 (2020) 研究发现, 速效磷和速效钾是影响皂苷含量的主要土壤因子。近年来, 华重楼的人工种植越来越多, 各种林下套种、遮阴种植、露天种植均有进行, 但产量和质量差别较大, 如皂苷总含量有的高达 5.08%, 有的则达不到《中国药典》规定标准 0.6%, 有的成分含量很低或检测不到 (刘哲等, 2020)。造成这种现象的原因至今未见有报道。鉴于此, 有关土壤因子等对重楼

属植物特别是华重楼和滇重楼的生长及药效成分积累的影响仍需要更多研究和进一步分析。

本研究收集我国广西、湖南等地不同种植环境的华重楼及生长地土壤, 并调查样品的生长势, 测定其鲜重和干重; 提取重楼皂苷成分, 并利用高效液相色谱技术 (HPLC) 检测重楼皂苷 I、II、VII 的含量; 同时, 检测土壤的 pH 值、有机质、全氮、全磷、全钾、碱解氮、速效磷及速效钾的含量; 采用相关性和多元线性回归法分析土壤因子与干重和重楼皂苷含量之间的相关性, 进而分析土壤因子对华重楼干重和重楼皂苷含量的影响, 以期对华重楼的人工栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

华重楼的种植地为广西资源的两水乡、瓜里乡、梅溪镇和广西那坡龙谷乡、广西融水杆洞乡以及湖南新宁崑山镇, 种植方式分为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7。

S1: 广西资源两水乡、落叶阔叶林; S2: 广西资源瓜里乡、杉木林; S3: 广西资源瓜里乡、毛竹林; S4: 广西资源梅溪镇、75% 的遮阳网; S5: 湖南新宁崑山镇、落叶阔叶林; S6: 广西那坡龙谷乡、落叶阔叶林; S7: 广西融水杆洞乡、露地栽培。种植地均为海拔 600 ~ 1 300 m 的山区, 除了 S4 和 S7 以外, 其余种植地林下郁闭度均在 0.7 以上。种苗均为根茎分株繁殖苗, 种植时间 4 a, 每个种植地的管理基本保持一致。

1.2 样品采收和指标测定

每年观察植株长势情况,于种植后第4年的10月,采用等距取样法采挖根茎,每个种植地选择3个采样点,每个采样点面积为 $1\text{ m} \times 2\text{ m}$,每个采样点随机采挖9株,洗净,去根,称取鲜重,置于烘箱烘干至恒重,称干重,并分别检测重楼皂苷I、重楼皂苷II、重楼皂苷VII的含量,计算出这3种皂苷的总和,同时分别采挖种植地土壤,进行土壤营养成分分析。

1.3 重楼皂苷的提取

重楼皂苷提取参照2020年版《中国药典》的提取方法(中华人民共和国药典,2020)。取干粉末过3号筛,精密称定0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加入乙醇25 mL,称定重量,加热回流30 min后,放冷,再称定重量,用乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液进行HPLC检测重楼皂苷I、II、VII的成分。

1.4 重楼皂苷的高效液相检测

对照品溶液配制:对照品均由成都恩斯特生物技术有限公司提供,精密称取重楼皂苷I、II、VII各对照品适量,分别加入甲醇溶解,配制成含重楼皂苷I $0.563\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、重楼皂苷II $0.506\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、重楼皂苷VII $0.507\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

色谱条件(Wu et al., 2012):流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~40 min, 30%~60% A; 40~45 min, 60%~90% A; 45~55 min, 90% A; 55~56 min, 90%~30% A; 56~64 min, 30% A);检测波长203 nm;体积流量 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.5 土壤成分检测

土壤的pH值、有机质、全氮、全磷、全钾、碱解氮、速效磷、速效钾含量分别按照林业标准(LY/T 1239—1999、LY/T 1237—1999、LY/T 1228—2015、LY/T 1232—2015、LY/T 1234—2015、LY/T 1228—2015、LY/T 2445—2015、LY/T 2445—2015)进行测定,根据全自动间断化学分析仪(Dechem-Tech CleverChem 380)分析结果进行统计,每个样品进行3次重复。

1.6 数据分析

重楼皂苷含量按外标一点法计算。计算公式:

皂苷含量(%) = $(A_1 \times C \times V \times 100) / (A_2 \times W \times 1\ 000)$ 。

式中: A_1 为样品峰面积; A_2 为对照品峰面积; C 为对照品浓度; V 为稀释倍数; W 为样品称样量; 统计数据使用Excel和SPSS 19.0软件处理; 品种的聚类分析使用SPSS 19.0软件进行分析; 皂苷成分与土壤等相关性分析和多元线性回归法分析使用SPSS 19.0软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同种植地土壤条件及华重楼生长情况比较

不同种植地土壤特性及华重楼生长情况见表1和表2。由表1可知,7个样本的pH值在4.73~6.48之间,均为酸性土壤,瓜里乡、崑山镇、龙合乡生长地的有机质含量较丰富,瓜里乡杉木林、梅溪镇、崑山镇、龙合乡土壤全氮含量较丰富,梅溪镇和崑山镇全磷含量较丰富,除了两水乡和杆洞乡外,其余种植地碱解氮含量较丰富,梅溪镇速效磷含量较丰富,崑山镇速效钾含量较丰富。由表2可知, S2和S6鲜重分别为167.45 g和178.45 g,差异不大,而两者的干重分别为52.33 g和63.73 g,差异较大($P < 0.05$),表明S2鲜货的含水量比S6高,而S6干重显著高出其他种植地样品1.2~8.6倍;露地种植的S7产量最低,干重仅为7.40 g,远低于其余样品($P < 0.05$);同一地区不同生长环境的2个样品,干重存在差异, S2是S3的1.91倍。由表2还可知,林下栽培或遮阳种植的样品生长较好,植株比较健壮,而露地种植的样品产量比较低,长势较差、植株比较弱小,表明光照强度会影响其生长。

2.2 不同种植地对重楼皂苷I、II、VII含量的影响

样品及混合对照品的离子色谱图见图1,根据各组分的峰面积计算出样品中3种重楼皂苷含量,皂苷含量统计见表3。由表3可知,不同的生长地根茎重楼皂苷I、II、VII以及3种皂苷的总含量均有差异。从3种皂苷总量来看, S2含量最高,为1.773%,与其他样品差异显著($P < 0.05$); S1、S3、S6、S5含量较高,其中S5和S6含量超过1.00%, S1和S3含量分别为0.886%和0.927%,均超过《中国药典》规定0.600%的限量标准; S4和S7含量较低,分别为0.536%和0.520%,均未达标。S6和S5的重楼皂苷I含量较高,分别为0.650%和0.547%,高于其他5个样品的重楼皂苷I,而S7未检测到该成分; S5重楼皂苷II含量最高,

表 1 不同种植地土壤特性的分析

Table 1 Analysis of soil characteristics from different region

编号 No.	土壤源 Soil sources	pH 值 pH value	有机质 Organic matter (g · kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen (g · kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus (g · kg ⁻¹)	全钾 Total potassium (g · kg ⁻¹)	碱解氮 Alkaline nitrogen (mg · kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus (mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium (mg · kg ⁻¹)
S1	两水阔叶林 Broad-leaved forest in Liangshui	5.38	34.9	1.17	0.69	4.82	113	11. 8	73.0
S2	瓜里杉木林 <i>Cunninghamia lanceolata</i> forest in Guali	6.27	49.9	2.06	0.81	51.60	208	28.5	99.6
S3	瓜里竹林 Bamboo forest in Guali	4.76	40.6	1.42	0.48	42.60	173	25.8	83.2
S4	梅溪荫棚 Under the shed in Meixi	5.92	27.2	3.56	1.72	30.60	178	44.3	69.7
S5	崑山阔叶林 Broad-leaved forest in Langshan	6.48	58.3	3.05	1.84	34.00	198	42.7	192.3
S6	龙合阔叶林 Broad-leaved forest in Longhe	4.73	48.4	5.04	1.02	19.80	229	29.9	102.7
S7	杆洞露天 Field in Gandong	6.40	13.21	1.63	1.32	43.40	132	10.4	53.6

表 2 不同种植地样品的生物量及长势

Table 2 Biomass and growth of samples from different regions

编号 No.	种植地 Cultivation region	海拔 Altitude (m)	鲜重 Fresh weight (g)	干重 Dry weight (g)	种植环境 Cultivation environment	长势情况 Growing situation
S1	广西资源两水 Liangshui, Ziyuan, Guangxi	894	165.44±9.87d	41.11±0.43c	林下栽培 Understory	健壮 Strong
S2	广西资源瓜里 Guali, Ziyuan, Guangxi	615	167.45±19.23ab	52.33±6.01b	林下栽培 Understory	健壮 Strong
S3	广西资源瓜里 Guali, Ziyuan, Guangxi	615	143.75±18.58bc	27.44±2.95bc	林下栽培 Understory	健壮 Strong
S4	广西资源梅溪 Meixi, Ziyuan, Guangxi	961	137.17±18.57c	41.57±2.69c	遮阳栽培 Sun shade	健壮 Strong
S5	湖南新宁崑山 Langshan, Xinning, Hunan	601	137.35±28.69c	45.78±4.52bc	林下栽培 Understory	健壮 Strong
S6	广西那坡龙合 Longhe, Napo, Guangxi	1260	178.45±10.67a	63.73±2.32a	林下栽培 Understory	健壮 Strong
S7	广西融水杆洞 Gandong, Rongshui, Guangxi	664	24.43±4.52e	7.40±1.37e	露地栽培 Exposed	弱小 Weak

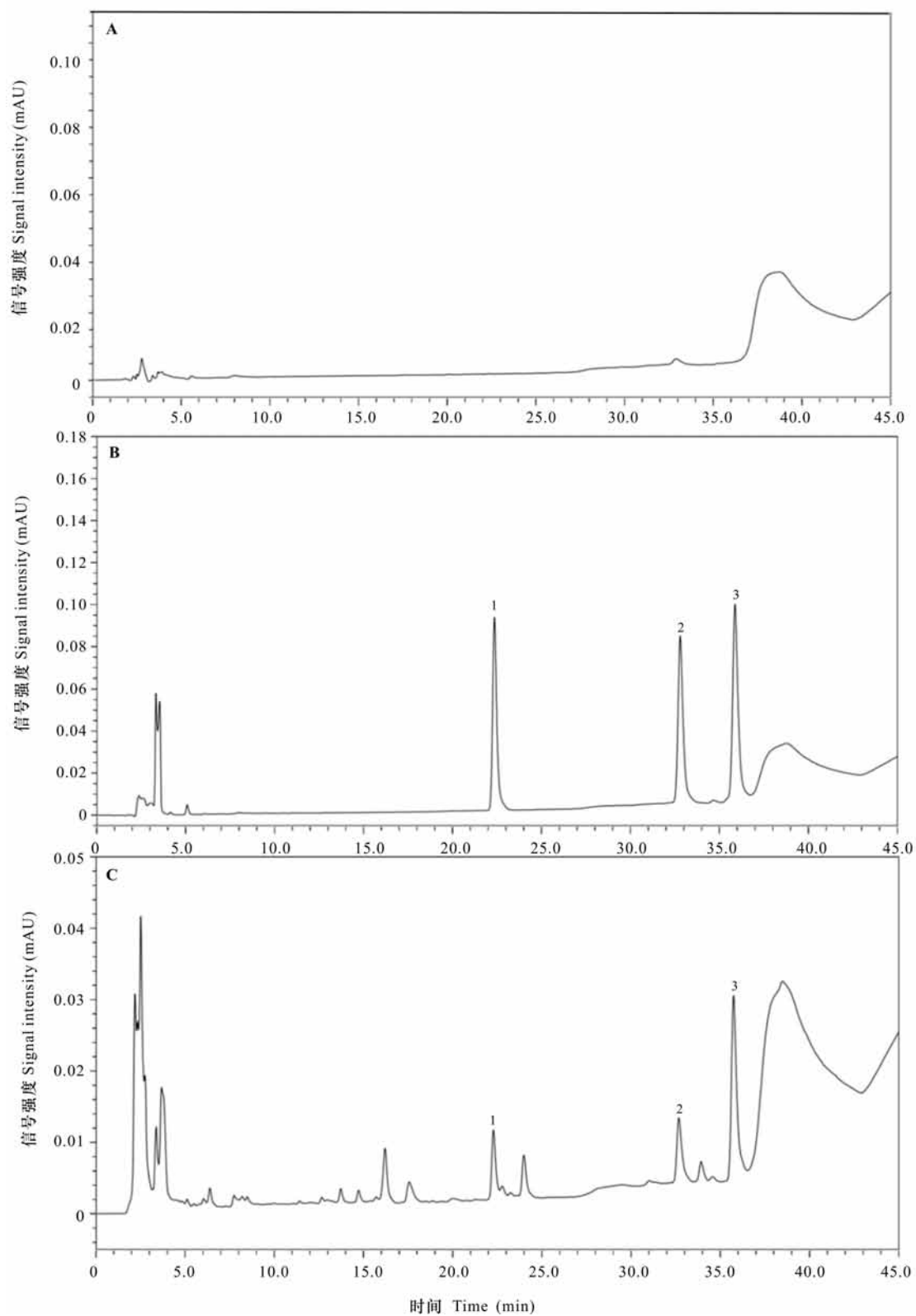
注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)； $n=3$ 。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)； $n=3$. The same below.

为 0.386%，其次是 S6 的样品，含量为 0.245%，而其他 5 个样品的重楼皂苷Ⅱ含量不足 0.2%；S2 重楼皂苷Ⅶ含量最高，为 1.387%，与其他 6 个样品差异显著 ($P<0.05$)，而其他 6 个样品的重楼皂苷Ⅶ含量不足 0.5%。

2.3 土壤因子与华重楼干重和重楼皂苷含量之间的相关性分析

将华重楼干重、重楼皂苷Ⅰ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅶ、土壤 pH 值、有机质、全氮、全磷、全钾、碱解氮、速效磷、速效钾的含量进行相关性分析，结



A. 空白对照; B. 混合对照品; C. 样品; 1. 重楼皂苷Ⅶ; 2. 重楼皂苷Ⅱ; 3. 重楼皂苷Ⅰ。

A. Blank control; B. Reference substances; C. Sample; 1. Polyphyllin Ⅶ; 2. Polyphyllin Ⅱ; 3. Polyphyllin Ⅰ.

图 1 样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of samples

表 3 华重楼的重楼皂苷含量
Table 3 Contents of polyphyllins from *Paris polyphylla* var. *chinensis*

编号 No.	重楼皂苷含量 Polyphyllin content (%)			
	重楼皂苷 I Polyphyllin I	重楼皂苷 II Polyphyllin II	重楼皂苷 VII Polyphyllin VII	皂苷总量 Total polyphyllin
S1	0.412±0.041bc	0.181±0.051b	0.293±0.096b	0.886±0.162b
S2	0.281±0.071c	0.105±0.020b	1.387±0.162a	1.773±0.230a
S3	0.381±0.071c	0.116±0.074b	0.464±0.097b	0.927±0.085b
S4	0.146±0.051c	0.097±0.037b	0.138±0.024b	0.536±0.109c
S5	0.547±0.077ab	0.386±0.034a	0.113±0.025b	1.047±0.055b
S6	0.650±0.177a	0.245±0.051ab	0.211±0.037b	1.107±0.160b
S7	—	0.151±0.038c	0.336±0.058b	0.520±0.085c

注：— 代表未检测出成分。
Note: — indicates no ingredients detected.

果见表 4。由表 4 可知,干重与碱解氮、全氮及有机质显著正相关,而与土壤 pH 值和全钾呈负相关;此外,干重与重楼皂苷 I 显著性正相关,而与重楼皂苷 VII 呈负相关。重楼皂苷 I 与有机质和速效磷呈显著性正相关,与速效钾其次,而与 pH 值、全磷和全钾呈负相关。重楼皂苷 II 与速效磷和速效钾呈显著性正相关,而与全钾和碱解氮呈负相关。重楼皂苷 VII 与全钾相关性最高,与碱解氮、有机质和土壤 pH 值其次,而与全氮、全磷、速效磷、速效钾呈负相关。

以干重(Y_1)、重楼皂苷 I (Y_2)、重楼皂苷 II (Y_3) 及重楼皂苷 VII (Y_4) 等反应根茎质量的指标为因变量,以 pH (X_1)、有机质(X_2)、全氮(X_3)、全磷(X_4)、全钾(X_5)、碱解氮(X_6)、速效磷(X_7) 和速效钾(X_8) 等反应土壤的因子为自变量,进行多元线性逐步回归法分析,分析 4 个因变量与 8 个自变量之间的线性关系(表 5)。由表 5 可知,干重(Y_1) 回归方程的决定系数为 0.986,与碱解氮(X_6) 呈线性正相关,说明碱解氮是影响华重楼干重的主导因子。重楼皂苷 I (Y_2) 回归方程的决定系数为 0.830,与有机质(X_2) 呈线性正相关,说明有机质是影响重楼皂苷 I 的主导因子。重楼皂苷 II (Y_3) 回归方程的决定系数为 0.982,与速效磷(X_7) 呈线性正相关,而与碱解氮(X_6) 呈线性负相关,说明速效磷是影响重楼皂苷 II 的主导因子。重楼皂苷 VII (Y_4) 未拟合出回归方程。

综合相关性分析及多元线性逐步回归分析,影响华重楼干重的主要因子是碱解氮,影响重楼

皂苷 I 的主要因子是有机质,影响重楼皂苷 II 的主要因子速效磷。因此,影响华重楼生物量和药效品质的主要土壤因子有碱解氮、有机质和速效磷。

3 讨论与结论

土壤因子是生态系统的关键因子,会直接影响中药材生长发育及有效成分的积累(陈文霞和谈献和,2006)。合理的氮磷钾配施不仅可以提高中药材产量和品质,还可以提高肥料利用率。然而,关于氮磷钾影响华重楼产量和品质的报道不多,刘哲等(2019)报道了一定比例的氮、磷及钾肥有利于提高华重楼根茎产量及总皂苷含量。本研究调查土壤因子对华重楼产量和药效成分的影响,发现根茎产量主要受碱解氮影响,其次是有机质和全氮,而与土壤 pH 值和钾含量呈负相关,这与苏泽春等(2015)报道影响云南重楼根茎产量的主要影响因子为碱解氮、有机质和全氮的结果一致。本研究还发现,华重楼不同皂苷成分含量差别较大,与土壤因子之间的相关性不同,其中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 主要受速效磷、速效钾和有机质的影响;重楼皂苷 VII 与全钾、碱解氮和有机质呈正相关,而与速效磷和速效钾呈负相关。这与人研究土壤因子与华重楼以及云南重楼中重楼皂苷(I 、 II 、 VII) 的相关性不完全一致(杨永红等,2012;刘哲等,2020)。土壤中的有机质在提供氮源的同时也能有效促进土壤中全磷的降解,从而

表 4 重楼皂苷含量与土壤因子的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between polyphyllin content and soil factors

指标 Index	干重 Dry weight	重楼皂苷 I Polyphyllin I	重楼皂苷 II Polyphyllin II	重楼皂苷 VII Polyphyllin VII	pH 值 pH value	有机质 Organic matter	全氮 Total nitrogen	全磷 Total phosphorus	全钾 Total potassium	碱解氮 Alkaline nitrogen	速效磷 Available phosphorus	速效钾 Available potassium
干重 Dry weight	1.000	0.738*	0.312	-0.264	-0.182	0.755*	0.785*	0.143	-0.132	0.922**	0.465	0.507
重楼皂苷 I Polyphyllin I		1.000	0.652	-0.183	-0.508	0.830*	0.464	-0.151	-0.409	0.521	0.725*	0.636
重楼皂苷 II Polyphyllin II			1.000	-0.460	0.162	0.570	0.363	0.464	-0.272	-0.267	0.887**	0.855*
重楼皂苷 VII Polyphyllin VII				1.000	0.197	0.215	-0.331	-0.478	0.377	0.220	-0.323	-0.117
pH 值 pH value					1.000	-0.126	-0.194	0.636	0.242	-0.125	0.110	0.265
有机质 Organic matter						1.000	0.338	-0.040	-0.065	0.696	0.797*	0.821*
全氮 Total nitrogen							1.000	0.459	-0.233	0.751	0.568	0.318
全磷 Total phosphorus								1.000	0.000	0.171	0.457	0.431
全钾 Total potassium									1.000	0.225	-0.048	0.017
碱解氮 Alkaline nitrogen										1.000	0.660	0.520
速效磷 Available phosphorus											1.000	0.949**
速效钾 Available potassium												1.000

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)； $n=3$ 。
Note: * indicates significant differences ($P<0.05$)；** indicates extremely significant differences ($P<0.01$)； $n=3$ 。

表 5 多元线性逐步回归分析

Table 5 Analysis of multiple linear regression

成分 Component	多元线性回归方程 Multiple linear regression equation	决定系数 Determination coefficient (R^2)
干重 Dry weight	$Y_1 = -39.268 + 0.434 X_6$	0.986
重楼皂苷 I Polyphyllin I	$Y_2 = 0.041 + 0.012 X_2$	0.830
重楼皂苷 II Polyphyllin II	$Y_3 = -0.004 - 0.001 X_6 + 0.011 X_7$	0.982
重楼皂苷 VII Polyphyllin VII	—	

注：— 代表未拟合出回归方程。
Note: — indicates the regression equation is not fitted.

在提高根茎增产和药效积累中起到协同促进作用。由于植物药效成分受自身遗传因素以及小气候环境等各方面的影响,造成这种不一致的原因

还值得深入研究。重楼皂苷Ⅶ与根茎产量、重楼皂苷Ⅰ及重楼皂苷Ⅱ均呈负相关,而与全钾含量相关性最高;根茎产量、重楼皂苷Ⅰ及重楼皂苷Ⅱ与全钾均呈负相关。样品采样地瓜里杉木林皂苷总含量(1.773%)远高于其他样品的原因主要是重楼皂苷Ⅶ含量(1.387%)较高,这可能与该土壤地全钾含量($51.60\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)相对较多有关,这说明土壤因子钾可能在华重楼产量及药效成分积累中具有重要作用。

本研究中,土壤 pH 值对华重楼 3 种药效成分的影响不显著,也无规律,而云南重楼根茎皂甙含量随土壤 pH 值增加呈现升高的趋势(毛玉东等, 2011),说明华重楼与云南重楼对土壤酸碱度的土壤环境需求可能不同。此外,生长地光照、温度、水分等环境条件对华重楼生长及有效成分积累的有影响。从总体上分析,7 个不同地区的华重楼药效成分表现为林下>遮阳>露地,而李海涛等(2014)认为,当云南重楼林下栽培环境越接近野

生环境时,重楼皂苷含量就越高,原因可能是因林下富含较多的腐殖叶而导致土壤有机质较高,而毛竹林则因毛竹丰富的根系吸收了很多土壤养分而造成产量和品质降低。因此,根据种植环境及土壤因子的相关性综合分析,人工种植华重楼时,同时选择腐殖质较高的林地种植,同时配合施用腐熟有机肥与磷肥作为基肥来改善土壤环境。

参考文献:

- BU J, LI DW, WANG DM, 2012. Correlations between wild *Polygonatum odoratum* quality and main ecological factors [J]. *Chin J Appl Ecol*, 23(6): 1447-1454. [卜静, 李登武, 王冬梅, 2012. 玉竹品质与主要生态因子的相关性 [J]. *应用生态学报*, 23(6): 1447-1454.]
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Med Sci Press. [国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社.]
- CHEN WX, TAN XH, 2006. Relationships between cultivation of Chinese materia medica and soil factors [J]. *Chin J Inf TCM*, 13(12): 48-49. [陈文霞, 谈献和, 2006. 中药材栽培与土壤生态因子的关系 [J]. *中国中医药信息杂志*, 13(12): 48-49.]
- Delectis Flora Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita, 1978. Flora Reipublicae Popularis Sinicae; Vol. 15 [M]. Beijing: Science Press; 92. [中国科学院中国植物志编委会, 1978. 中国植物志: 第 15 卷 [M]. 北京: 科学出版社; 92.]
- LIANG J, GUO ZY, YE Y, 2014. Effects of different soil moisture conditions on photosynthetic characteristics and effective content of saponin of *Paris polyphylla* [J]. *Plant Physiol J*, 50(1): 56-60. [梁娟, 郭泽宇, 叶漪, 2014. 不同土壤水分条件对七叶一枝花光合特性及有效成分皂苷含量的影响 [J]. *植物生理学报*, 50(1): 56-60.]
- LIANG J, YANG JS, YE Y, 2016. Effects of temperatures on photosynthetic characteristics and saponins of *Paris polyphylla* [J]. *Guihaia*, 36(3): 323-328. [梁娟, 杨家胜, 叶漪, 2016. 温度对七叶一枝花光合特性及皂苷含量的影响 [J]. *广西植物*, 36(3): 323-328.]
- LI B, TANG ZS, WANG N, et al., 2019. Effects of different LED light quality on physiological characteristics and component accumulation of *Paris polyphylla* in Shaanxi Province [J]. *Mod Chin Med*, 21(10): 1386-1391. [李铂, 唐志书, 王楠, 等, 2019. 不同 LED 光质对陕产重楼生理特性和成分积累的影响 [J]. *中国现代中药*, 21(10): 1386-1391.]
- LI HT, LUO XW, GUAN YH, et al., 2014. Comparison between content of saponins of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* in different areas of Yunnan Province [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 39(5): 803-806. [李海涛, 罗先文, 管燕红, 等, 2014. 云南省不同地区滇重楼皂苷含量的对比及影响因子分析 [J]. *中国中药杂志*, 39(5): 803-806.]
- LIU S, LI SS, ZHANG DL, 2020. Polyphyllin VII: pharmacological effects and mechanisms of action [J]. *Chin Med J Res Prac*, 34(5): 82-86. [刘帅, 李沙沙, 张登禄, 2020. 重楼皂苷 VII 药理作用及作用机制的研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 34(5): 82-86.]
- LIU Z, YU MJ, XIANG HY, et al., 2020. Study on the correlation between 6 kinds of steroidal saponins of *Paris polyphylla* and soil nutrients [J]. *Chin Trad Pat Med*, 42(11): 3079-3084. [刘哲, 余孟杰, 向海燕, 等, 2020. 七叶一枝花中 6 种甾体皂苷与土壤肥力的相关性探究 [J]. *中成药*, 42(11): 3079-3084.]
- MAO YD, LIANG SW, HE ZJ, et al., 2011. Effects of soil pH on growth, nutrient content and total saponin contents of *Pairs polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 24(3): 985-989. [毛玉东, 梁社往, 何忠俊, 等, 2011. 土壤 pH 对滇重楼生长、养分含量和总皂甙含量的影响 [J]. *西南农业学报*, 24(3): 985-989.]
- REN P, FU B, LIU C, et al., 2019. Correlation between the active components and soil and meteorological factors of *Sedum aizoon* [J]. *Ecol Environ Sci*, 28(5): 908-917. [任平, 付博, 刘晨, 等, 2019. 景天三七主要活性成分与土壤、气象因子的相关性 [J]. *生态环境学报*, 28(5): 908-917.]
- SU ZC, WANG ZQ, LI ZG, et al., 2015. Study on high-yielding and good-quality cultivation techniques for *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 27(1): 61-65. [苏泽春, 王泽清, 李兆光, 等, 2015. 云南重楼的高产优质栽培技术初探 [J]. *江西农业学报*, 27(1): 61-65.]
- WU QS, ZHU RB, WAN ZH, et al., 2002. The correlation between effective components of American ginseng and climatic factors [J]. *Acta Ecol Sin*, 22(5): 779-782. [吴庆生, 朱仁斌, 宛志沪, 等, 2002. 西洋参有效成分与气候生态因子的关系 [J]. *生态学报*, 22(5): 779-782.]
- WU X, WANG L, WANG H, et al., 2012. Steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 81: 133-143.
- YANG YH, DAI LJ, HE KH, et al., 2012. Relation between soil nutrient of artificially cultivated area and rhizome quality of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *J Chin Med Mat*, 35(10): 1557-1561. [杨永红, 戴丽君, 何昆鸿, 等, 2012. 土壤营养与人工栽培滇重楼品质相关性评价 [J]. *中药材*, 35(10): 1557-1561.]
- ZHENG MX, CHEN H, SU HL, et al., 2020. Analysis on the correlation between polyphyllin content of different *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* and soil nutrients [J]. *Fujian Agric Sci Technol*, 4(8): 58-66. [郑梅霞, 陈宏, 苏海兰, 等, 2020. 不同重楼资源的重楼皂苷含量比较及与土壤养分的相关性分析 [J]. *福建农业科技*, 4(8): 58-66.]

(责任编辑 蒋巧媛 王登惠)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202206068

王宇萧, 刘明庆, 李妍, 等, 2023. 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长特性的影响 [J]. 广西植物, 43(6): 1088–1096.
WANG YX, LIU MQ, LI Y, et al., 2023. Effects of cinnamaldehyde on growth characteristics of tomato seedlings under NaCl stress [J]. *Guihaia*, 43(6): 1088–1096.



肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长特性的影响

王宇萧^{1,3}, 刘明庆², 李妍², 黄思杰^{2*}, 杨立飞^{1,3}

(1. 南京农业大学 园艺学院, 南京 210095; 2. 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042;
3. 南京农业大学和县新农村发展研究院, 安徽 和县 238200)

摘要: 为探明肉桂醛对番茄幼苗耐盐性的影响, 该研究以番茄‘合作 903’为试验材料, 探究肉桂醛 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对处于 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下番茄种子萌发与幼苗生长特性的影响。在试验中设置 4 组处理: 对照 (CK, 蒸馏水)、NaCl (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、NaCl+CA (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CA)、CA (100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。结果表明: (1) 在 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 添加 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肉桂醛, 番茄种子的发芽势和发芽率均有所提升, 番茄幼苗的根长和鲜重均显著提高, 说明添加肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄种子的萌发与幼苗生长均有一定缓解作用。(2) 肉桂醛能够有效降低 NaCl 胁迫导致的番茄幼苗根尖总活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过量累积, 缓解膜脂过氧化程度从而降低细胞死亡率。综上表明, 肉桂醛处理能够通过缓解幼苗的氧化损伤程度, 提高番茄萌发与幼苗时期的耐盐性, 肉桂醛作为一种新型制剂具有在田间生产应用的潜力。

关键词: 番茄, 肉桂醛, NaCl 胁迫, 生长特性, 耐盐性

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1088-09

Effects of cinnamaldehyde on growth characteristics of tomato seedlings under NaCl stress

WANG Yuxiao^{1,3}, LIU Mingqing², LI Yan², HUANG Sijie^{2*}, YANG Lifei^{1,3}

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China; 3. Hexian New Rural Development Research Institute, Nanjing Agricultural University, Hexian 238200, Anhui, China)

Abstract: In order to investigate the effects of cinnamaldehyde (CA) on salt tolerance of tomato seedlings, we used tomato ‘Cooperative 903’ as experimental material, and investigated the characteristics of germination and seedling growth of tomato under NaCl (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) stress compared with the treatment of adding CA (100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). We set up four groups of treatments in the experiment: Control (CK, distilled water), NaCl (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), NaCl+CA (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CA), and CA (100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). The results were as follows: (1) With the application of

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金 [CX(20)3166]; 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-23-B16)。

第一作者: 王宇萧 (1999-), 硕士研究生, 主要从事蔬菜栽培生理与生物技术研究, (E-mail) yxwang@stu.njau.edu.cn。

* 通信作者: 黄思杰, 硕士, 农艺师, 主要从事有机农业、生态农业栽培技术方面的研究, (E-mail) hsjofrc@126.com。

CA, the germination potential and the germination rate of tomato seeds were both improved. The root length and fresh weight of tomato seedlings were also significantly increased under NaCl ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) stress. (2) CA could effectively alleviate the excessive accumulation, oxidative damage and cell death of total ROS caused by salt stress in roots of tomato seedlings. To sum up, CA can improve the salt tolerance of tomato during germination and seedling stage by alleviating the degree of oxidative damage of seedlings, and CA has the potential in field production as a new preparation.

Key words: tomato (*Solanum lycopersicum*), cinnamaldehyde, NaCl stress, growth characteristics, salt tolerance

设施栽培自我国农业生产结构调整以来得到大范围的推广,“十三五”期间,我国设施蔬菜面积基本稳定,年均增长率为 1% 左右(周杰等,2021)。随着连续种植年限的延长与种植面积的扩大,设施土壤次生盐渍化现象加重(李燕等,2022)。土壤次生盐渍化主要现象为土壤表层结白霜,土壤板结。这影响了作物苗期生长,致使农产品质量、产量下降(王梅等,2021)。目前,我国的番茄生产主要以设施栽培为主,番茄已成为我国设施栽培面积最大的蔬菜种类之一(田永强和高丽红,2021)。番茄 (*Solanum lycopersicum*),对盐中度敏感(Daliakopoulos et al., 2019),土壤盐渍化现象严重影响设施番茄栽培效益。

近年研究发现,缓解盐害的最有效方式之一是利用外源物质调控植物自身的生理过程,提高其抗盐性。外源水杨酸和硫化氢(H_2S)单一或复配处理皆可提高加工番茄幼苗的耐盐性(张雪蒙等,2022);外源褪黑素可促进侧根及主根的发育,提高棉花 (*Gossypium* spp.) 的耐盐性(段文静等,2022);外源茉莉酸甲酯可通过调控玉米 (*Zea mays*) 幼苗 AsA-GSH 循环提高其抗盐性(陈芳等,2021)。

肉桂醛(cinnamaldehyde, CA),一种醛类有机化合物,具有桂皮油和肉桂油的辛香气和烧焦芳香味,香气强烈持久,在肉桂等植物中含量较多(Yang et al., 2021)。肉桂醛具有广谱抑菌作用,能够预防和治疗细菌或真菌引起的病害(张文平等,2003)。在蔬菜作物的应用上,肉桂醛对辣椒 (*Capsicum annuum*) 疫霉菌表现出较强的体外抑菌作用,并能抑制辣椒疫霉菌的侵染和致病性(李丽娜等,2016)。肉桂醛也可以用于缓解盐胁迫与重金属离子胁迫对植物造成的毒害作用。外源添加肉桂醛可以提高烟草 (*Nicotiana tabacum*) 幼苗抵御盐胁迫的能力(刘晓涵等,2021);肉桂醛也能缓解烟草幼苗中重金属镉胁迫所引起的生长抑

制、氧化损伤和细胞死亡,并能减少烟草根尖中因镉胁迫而产生的多余 H_2S ,缓解重金属对幼苗的毒害(凌天孝,2017)。鉴于植物免疫抵抗生物胁迫和非生物胁迫的通用性,我们推测肉桂醛在提高番茄耐盐性方面可能同样具备潜力。现有的研究主要通过发芽率和抗氧化酶活性等指标探讨植物刺激素通过提高抗氧化能力来改善非生物胁迫下种子萌发及幼苗生长情况,鲜有研究通过根系化学染色和荧光染色更直观和综合地分析幼苗细胞膜氧化损伤程度、根系活性氧积累程度及细胞死亡情况。因此,本研究以番茄‘合作 903’为试验材料,从番茄种子的萌发状况及幼苗化学染色和荧光染色所反映的根系氧化损伤程度两方面探讨外源肉桂醛处理是否能通过调控番茄生理生化过程提高其抗盐性。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料番茄‘合作 903’购自上海虹桥天龙种业有限公司。

1.2 试验方法

本试验于 2021 年 1 月在江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所进行。挑选外形大小一致、饱满的番茄种子,用 1% 次氯酸钠消毒 15 min,蒸馏水反复冲洗干净后将种子放入 55°C 蒸馏水中吸涨 40 min 后放在铺有双层滤纸的培养皿内。前期预试验设置了 0、50、100、150、200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个 NaCl 处理浓度,进行萌发试验,根据发芽率、发芽势、根长、鲜重 4 个指标确定 NaCl 胁迫对番茄的半抑制浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下加入不同浓度的肉桂醛(0、50、100、150、200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),根据发芽率和发芽势确定肉桂醛对 NaCl 胁迫的最佳缓解浓度为

100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 后续试验采用以下 4 组处理: 对照 (CK, 蒸馏水)、NaCl (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、NaCl+CA (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CA)、CA (100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。每个处理重复 3 次, 处理液均直接加入发芽试验的培养皿内 (每皿 10 mL 处理液, 50 颗种子)。发芽后 7 d 测定各项指标。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 发芽指数

(1) 发芽势 (%) = (3 d 内正常发芽种子数/供试种子数) $\times 100$;

(2) 发芽率 (%) = (7 d 内发芽种子数/供试种子数) $\times 100$ 。

1.3.2 胚根长度 直尺测量番茄幼苗胚根长度。

1.3.3 幼苗鲜重 各处理分别收集幼苗 30 株, 用滤纸吸干幼苗表面水分, 用天平称量幼苗鲜重 (以 10 株为单位)。

1.3.4 根毛密度及侧根数量 在电子显微镜下对比 4 组处理的根毛密度及长度进行拍照并计数 4 组处理的侧根数量。

1.3.5 番茄幼苗根尖总 ROS 的测定 幼苗根尖的总活性氧 (ROS) 使用特定的荧光探针 DCFH-DA 进行检测 (Foreman et al., 2003)。将番茄幼苗根用双蒸水冲洗 3 次后孵育在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 溶液中 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光处理 20 min, 双蒸水冲洗 3 次后在荧光显微镜 (激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 525 nm) 下拍照。照片使用 Image-Pro Plus 6.0 进行荧光密度值统计。

1.3.6 番茄幼苗根尖脂质过氧化物的组织化学分析 植物根尖的脂质过氧化物通过 Schiff base 试剂进行检测 (Wang, 1987)。将番茄幼苗根用双蒸水冲洗 3 次后, 浸泡在 Schiff base 试剂中 20 min, 然后用 0.5% (W/V) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液 (含 0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl) 进行冲洗固定直至根的颜色变鲜亮后使用相机拍照。

1.3.7 番茄幼苗根尖细胞膜完整性的组织化学分析 植物根尖的细胞膜完整性通过 Evans blue 试剂进行检测 (Yamamoto et al., 2002)。方法同 1.3.6, 浸泡液改为 0.025% (W/V) 的 Evans blue 溶液, 时间为 15 min, 反复冲洗至无蓝色析出后进行拍照。

1.3.8 番茄幼苗根尖细胞死亡的组织化学分析 幼苗根尖的细胞死亡使用特定的荧光探针碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 进行检测 (Kellermeier et al., 2002)。方法同 1.3.5, 孵化液改为 10 $\mu\text{mol} \cdot$

L^{-1} PI 溶液, 荧光显微镜激发光波长为 535 nm, 发射光波长为 615 nm。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用 IBM Statistics SPSS 23.0 统计软件单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 多重比较进行差异显著性检验, 使用 Graphpad Prism 8.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NaCl 对番茄种子萌发及幼苗生长的影响

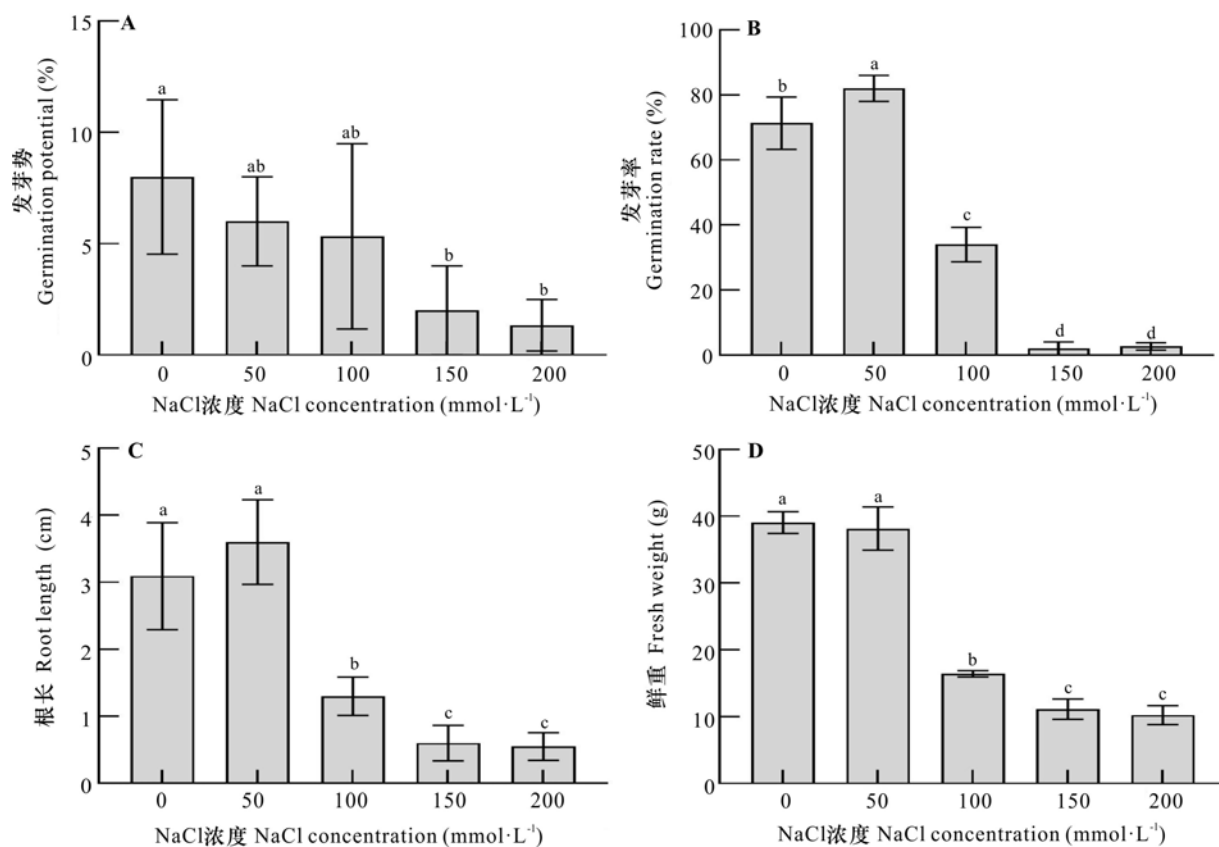
由图 1:A、B 可知, NaCl 胁迫在番茄种子的萌发过程中具有抑制作用。番茄种子发芽率总体随着盐胁迫浓度不断增加呈下降趋势, 但当盐浓度为 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相较于 CK 发芽率提升了 14.95%, 说明低浓度的盐溶液对番茄种子萌发具有一定的促进作用。当盐浓度为 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发芽率下降了 52.34%, 显著抑制了番茄种子的萌发。当盐浓度为 150、200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发芽势与发芽率较 CK 均下降了 60% 以上, 说明高浓度的盐胁迫对番茄种子萌发过程有显著抑制作用, 并给种子造成了一定程度的致死伤害。

NaCl 胁迫对番茄幼苗的根长和鲜重也具有抑制作用。由图 1:C 可知, 当盐浓度为 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 番茄幼苗根长相较于 CK 降低了 57.96%, 鲜重相较于 CK 下降了 57.95%, 均达到显著水平 ($P < 0.05$), 该浓度的 NaCl 处理显著抑制番茄幼苗的生长。由图 1:D 可知, 在 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 番茄幼苗的根长与鲜重较 CK 差异均不显著, 表明番茄幼苗对低浓度的盐胁迫具有一定的适应性; 当 NaCl 浓度达到 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 番茄幼苗的根长、鲜重较 CK 分别下降了 80.59%、71.51%; 当 NaCl 浓度达到 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 幼苗的根长、鲜重较 CK 分别下降了 82.21%、73.76%, 差异均十分显著。

由图 1:C、D 可知, 在 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 浓度下番茄幼苗的根长与鲜重较 CK 均下降了 50% 左右, 因此该浓度即为 NaCl 对番茄幼苗生长的半抑制浓度, 后续试验选择该浓度作为盐处理浓度。

2.2 不同浓度肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄种子萌发及幼苗生长的影响

由图 2 可知, NaCl 胁迫抑制了番茄种子的萌发, 而不同浓度的肉桂醛溶液对此有不同程度的

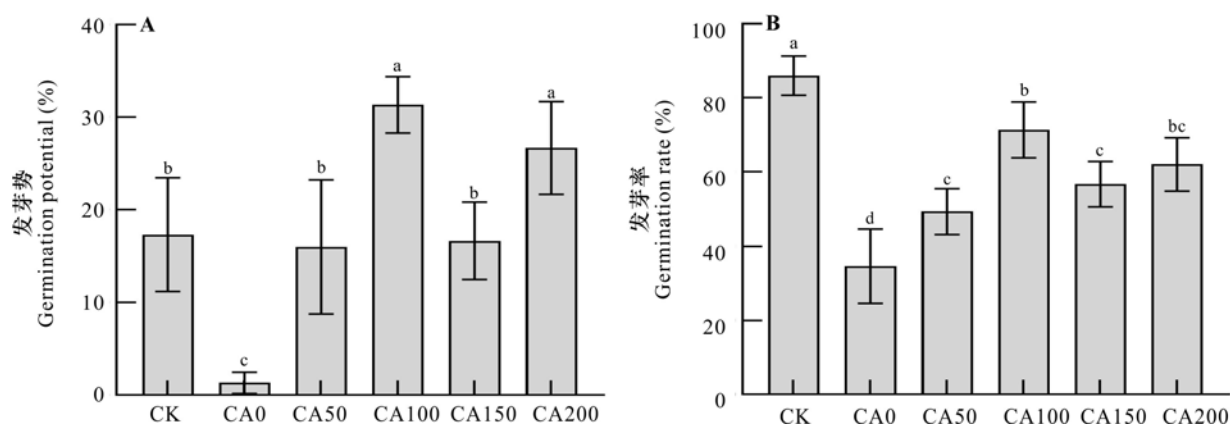


不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different letters indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$). The same below.

图 1 不同浓度 NaCl 对番茄种子萌发及幼苗根长和鲜重的影响

Fig. 1 Effects of NaCl on tomato seed germination, root length and fresh weight of tomato seedlings



CA0、CA50、CA100、CA150、CA200 表示在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 盐胁迫下分别添加 0、50、100、150、200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肉桂醛处理。

CA0, CA50, CA100, CA150, CA200 indicate 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CA are added respectively under $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl salt stress.

图 2 不同浓度肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄种子萌发的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of cinnamaldehyde on tomato seed germination under NaCl stress

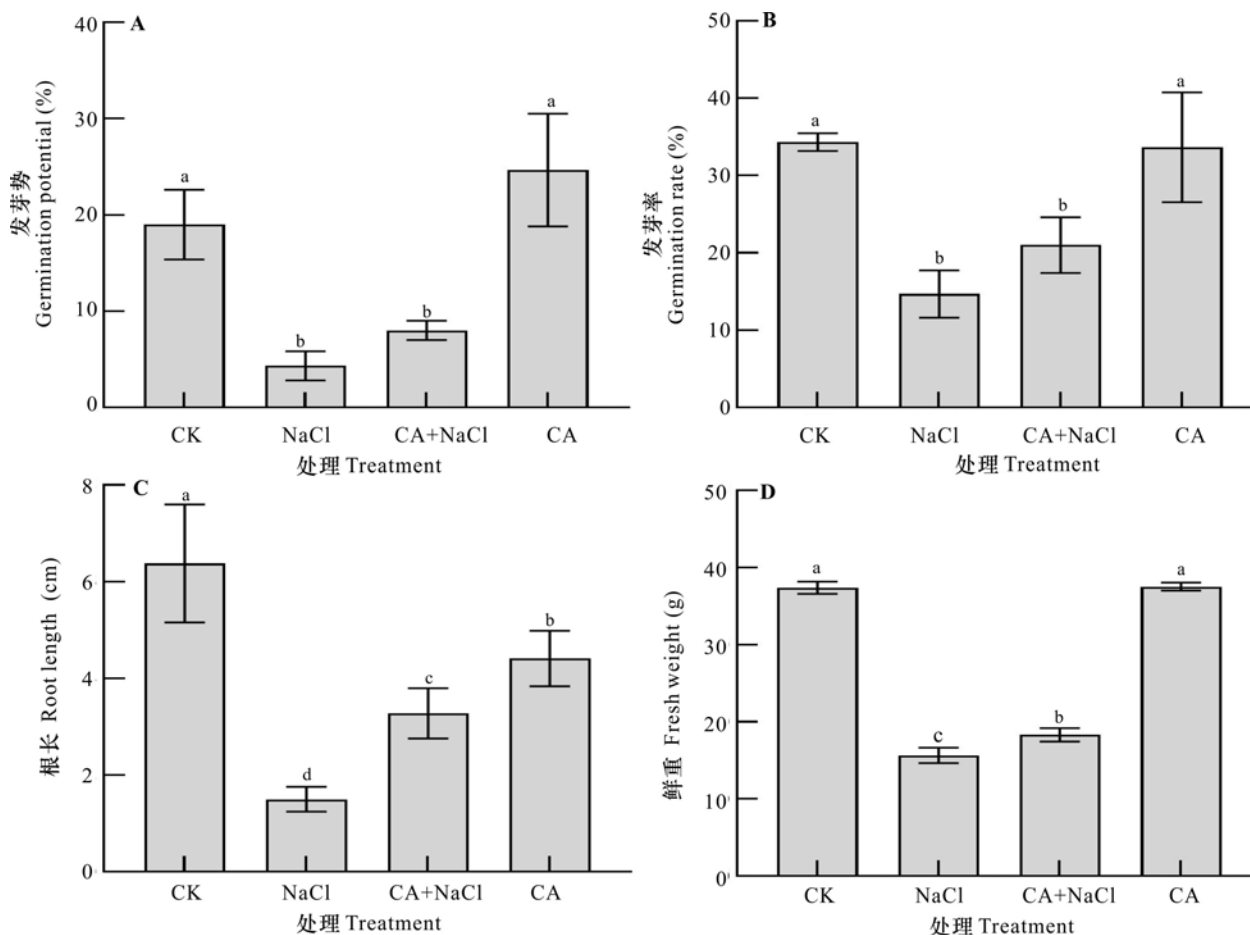


图3 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄种子萌发及幼苗根长和鲜重的影响

Fig. 3 Effects of cinnamaldehyde on tomato seed germination, root length and fresh weight of tomato seedlings under NaCl stress

缓解作用。随着肉桂醛浓度的提升,番茄种子的发芽势和发芽率均显著提高,在肉桂醛浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值,而在 150 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其发芽势和发芽率均降低,但仍然显著高于单独盐处理。由于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肉桂醛能够表现出最佳的缓解盐胁迫抑制番茄种子萌发效应,因此后续试验采用 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肉桂醛所为最佳缓解浓度。

2.3 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄种子萌发及幼苗生长的影响

由图 3:A、B 可知,单 NaCl 胁迫较对照显著抑制番茄种子萌发 ($P < 0.05$)。与单 NaCl 胁迫相比,肉桂醛处理提升了 84.61% 的发芽势和 43.18% 的发芽率,表明添加肉桂醛可以促进 NaCl 胁迫下番茄种子的萌发。NaCl 胁迫降低了番茄幼苗的根长和鲜重,肉桂醛处理对幼苗发育具有促进作用(图

3:C、D)。在正常条件下,添加肉桂醛对番茄萌发的促进效果不显著,而在 NaCl 胁迫下,添加肉桂醛显著缓解了 NaCl 胁迫对番茄幼苗生长的抑制 ($P < 0.05$),CA + NaCl 组合处理幼苗的根长和鲜重分别为 3.28 cm 和 18.33 mg,与单 NaCl 处理相比分别增加了 118.47% 和 17.23%,表明肉桂醛处理能显著缓解 NaCl 胁迫对番茄幼苗生长的抑制 ($P < 0.05$)。

2.4 肉桂醛对 NaCl 下番茄幼苗根尖根毛密度和侧根数量的影响

由图 4:A 可知,CK 的处理下,番茄幼苗根尖处是有部分根毛分化,而单 NaCl 处理下,几乎未见根毛分化,CA + NaCl 组合处理可以观察到根毛密度与长度均明显增加,说明肉桂醛可以从根系形态分化上缓解 NaCl 胁迫对番茄幼苗的伤害。

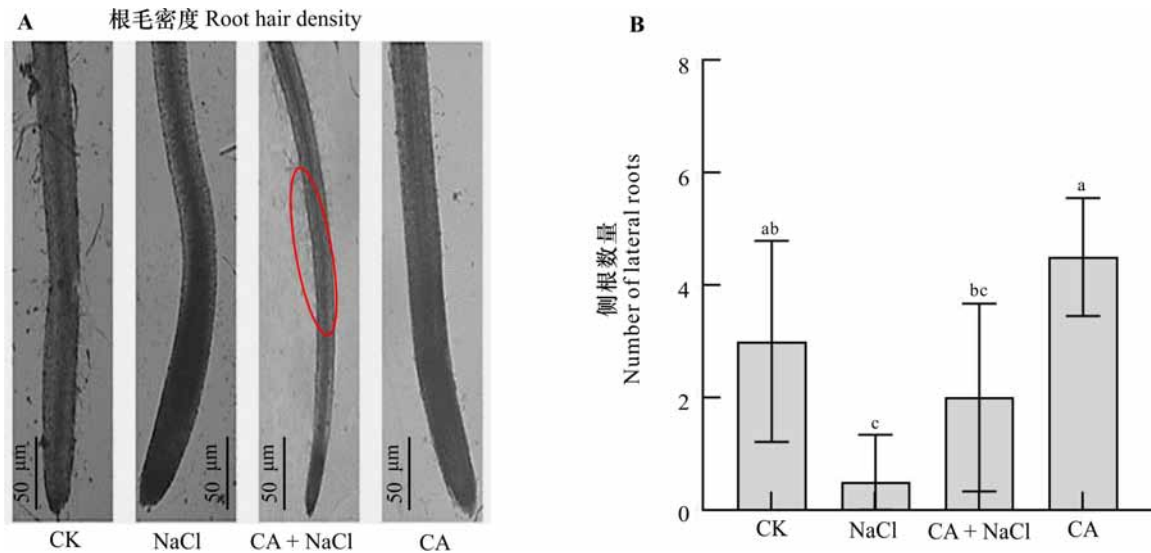


图 4 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根毛密度和侧根数量的影响

Fig. 4 Effects of cinnamaldehyde on root hair density and lateral root number of tomato seedlings under NaCl stress

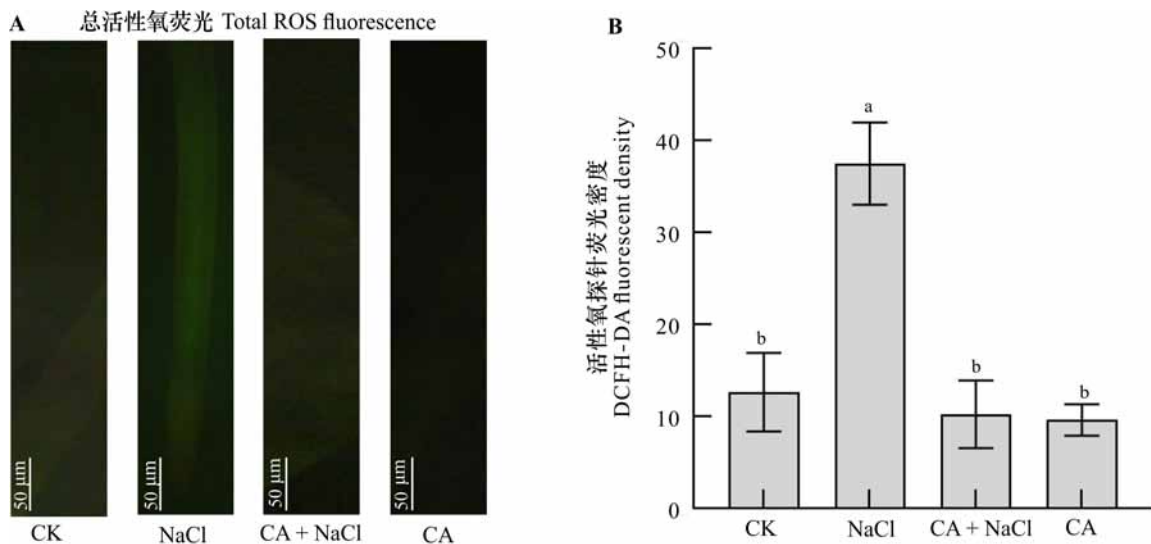


图 5 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根尖总活性氧 (ROS) 含量的影响

Fig. 5 Effects of cinnamaldehyde on total ROS content of tomato seedling roots under NaCl stress

由图 4:B 可知,在正常条件下,添加肉桂醛可以促进番茄幼苗侧根的发生。CA + NaCl 组合处理的侧根数量相比单 NaCl 胁迫增多,表明肉桂醛可能通过促进幼苗侧根的分枝缓解 NaCl 胁迫对植株造成的生理性干旱。

2.5 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根尖总活性氧的影响

采用活性氧探针 DCFH-DA 可以对根尖总活性氧 (ROS) 进行原位检测,研究肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根尖总 ROS 含量的影响。由图

5:A 可知,与 CK 相比,NaCl 胁迫处理下的根尖荧光亮度较强,添加肉桂醛后其亮度减弱。由图 5:B 可知,NaCl 胁迫导致了番茄幼苗根尖总 ROS 的大量积累,其总 ROS 的含量相比 CK 增加了 1.97 倍,加入肉桂醛后总 ROS 的含量降低了 72.78%,差异显著 ($P < 0.5$)。单独经肉桂醛处理的番茄幼苗根尖总 ROS 含量虽略微低于 CK,但差异不显著。

2.6 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根尖膜透性和脂质过氧化的影响

使用 Evans blue 染色对根尖质膜透性进行检

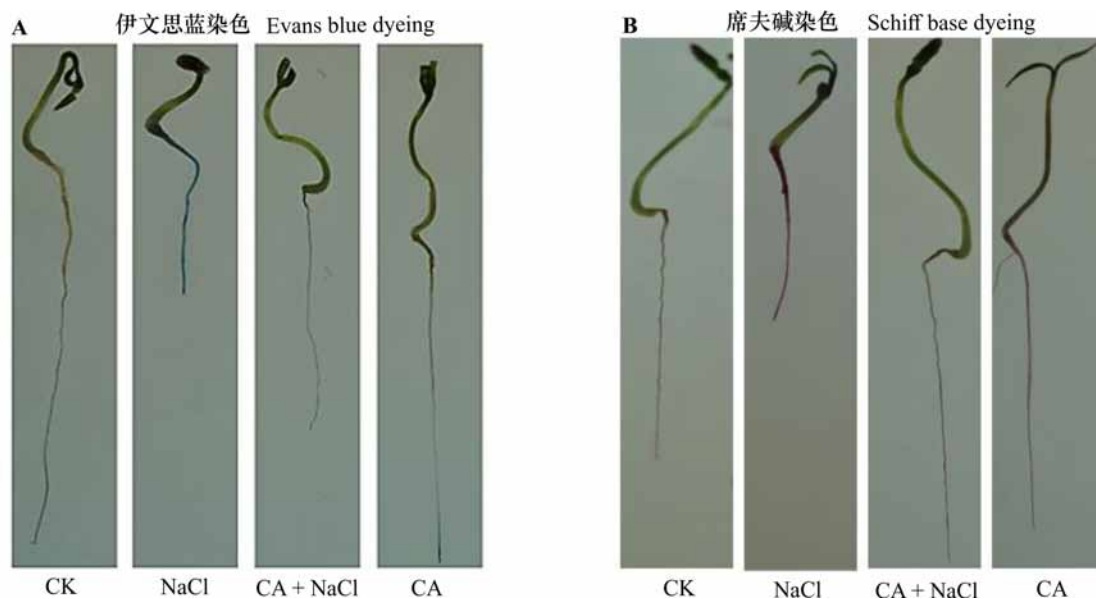


图 6 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗根尖氧化损伤的影响

Fig. 6 Effects of cinnamaldehyde on oxidative loss of root tips from tomato seedlings under NaCl stress

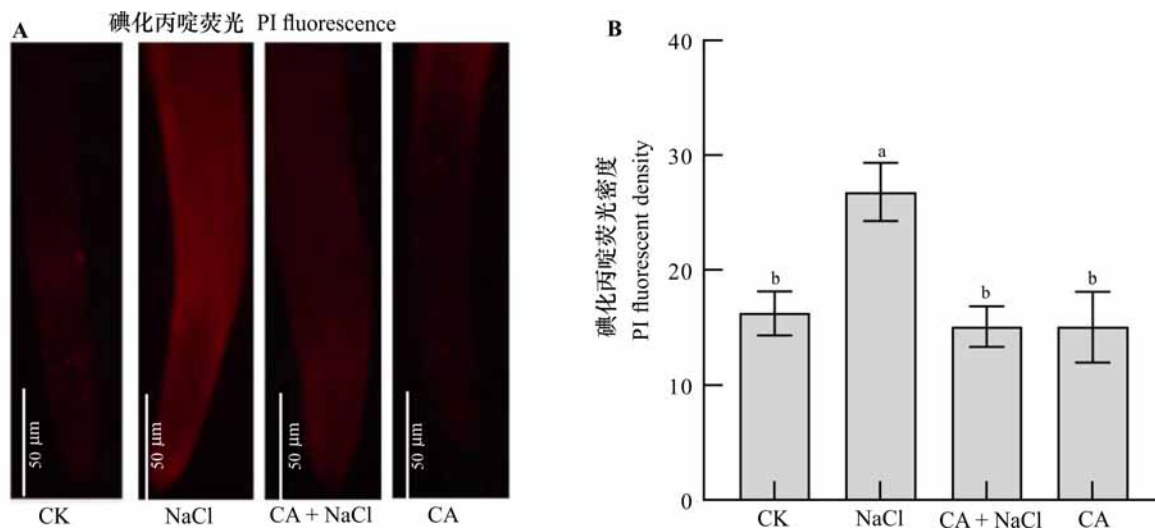


图 7 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗细胞死亡的影响

Fig. 7 Effects of cinnamaldehyde on cell death of tomato seedlings under NaCl stress

测,蓝色越深代表细胞膜完整性越差、质膜透性越强、活性氧对细胞膜引起的损伤越严重。由图6:A可知,盐胁迫下番茄幼苗根尖蓝色比CK深,添加肉桂醛后,染色程度明显变浅,单独肉桂醛处理下的番茄幼苗根尖被染成的蓝色较CK稍浅一些。这表明肉桂醛可以缓解NaCl胁迫下大量活性氧对幼苗根尖细胞膜完整性的损伤。

使用 Schiff base 对番茄幼苗根尖进行染色,检

测根尖脂质过氧化程度,粉色越深代表脂质过氧化越严重。由图6:B可知,与CK相比,NaCl胁迫下番茄幼苗根尖粉色较深,加入肉桂醛后,粉色明显变浅,单独的肉桂醛处理组比CK稍深一些。这表明肉桂醛可以缓解NaCl胁迫下大量活性氧所造成的根尖脂质氧化的损伤。

2.7 肉桂醛对 NaCl 胁迫下番茄幼苗细胞死亡的影响

使用特定的荧光探针 PI 检测植物根尖细胞死

亡程度,已死亡的细胞会发出红色荧光,因此可以通过红色荧光密度反映细胞相对死亡的情况。由图 7:A 可知,NaCl 处理组荧光亮度明显高于 CK,添加肉桂醛后其荧光亮度明显降低。由图 7:B 可知,单独 NaCl 胁迫下细胞死亡率较 CK 提高了 64.77%,添加肉桂醛后,细胞死亡率降低了 43.79%,差异显著 ($P<0.5$)。

3 讨论与结论

天然植物源化合物肉桂醛在抑菌抗炎方面具有重要的作用,其药用价值一直被广泛地讨论 (Hermawan et al., 2021; Wang et al., 2021),但是肉桂醛对植物生理的调控与植物抗性方面的研究近几年才有报道。本研究以番茄‘合作 903’为试验材料,探讨外源肉桂醛处理是否能调控番茄生理生化过程来提高其抗盐性。

种子萌发是植物生长周期中最基本与最重要的环节,也是植物生长最敏感的阶段 (刘文瑜等, 2015)。盐胁迫主要通过渗透胁迫离子特异效应和氧化胁迫影响种子萌发,并且影响植物外部形态变化、内部结构建成及各种代谢过程 (方晶, 2014)。本研究发现添加肉桂醛后,盐胁迫下番茄种子的发芽势与发芽率均有所提升,番茄幼苗的根长与鲜重显著提升。结合番茄幼苗质膜透性染色情况的结果来看,这可能是因为肉桂醛可以通过维持细胞膜的完整性和减少电解质的渗漏来缓解盐胁迫对番茄幼苗造成的伤害 (耿书德等, 2022)。

种子萌发后,植物根系是首先感受逆境的器官,根系生长状况发生的变化可以反映植物对逆境的表现。本试验中发现,添加肉桂醛可以促进盐胁迫下番茄幼苗侧根的发生,有助于增加植物根系与土壤的接触面积,从而促进根系吸收水分。本研究发现,肉桂醛可以通过调控内源硫化氢促进辣椒幼苗侧根发生,这与 Xue 等 (2016) 的研究结果一致。同时,本研究结果表明,添加肉桂醛后,NaCl 胁迫下的番茄幼苗的根长、根毛密度与长度、侧根数量均显著提高,整个根系与环境接触面积增大,促进根系吸水,说明外源添加肉桂醛能够通过改变幼苗根系形态使番茄幼苗适应盐胁迫环境。

活性氧 (ROS) 是一类具有很强氧化能力、化学性质活泼的含氧物质及其衍生物质的总称。当

植物遭遇逆境胁迫的时候,ROS 的形成和清除之间的动态平衡遭到破坏,ROS 大量积累,引起氧化损伤。本研究发现在 NaCl 胁迫下,番茄幼苗根尖的总 ROS 含量相比对照显著提高,而添加了肉桂醛后,根尖总 ROS 含量显著下降,根尖膜脂过氧化程度与细胞死亡程度均显著下降,表明肉桂醛可以通过减少 NaCl 胁迫下植物体内 ROS 的大量积累,减少氧化损伤与细胞死亡程度,从而缓解 NaCl 胁迫给番茄幼苗造成的伤害。本课题组前期研究发现在低盐胁迫下,肉桂醛可以显著降低结球白菜根内 PAO 活性和 H_2O_2 水平 (杨会敏等, 2022)。PAO 代谢多胺产生 H_2O_2 是植物体内 ROS 产生的一个重要途径,鉴于植物抵抗非生物胁迫的通用性,我们推测肉桂醛提升番茄苗期耐盐性也是通过该途径减少逆境造成 ROS 的积累。

综上所述,本研究发现肉桂醛可以提高番茄种子在盐胁迫下的发芽率与发芽势,对番茄种子在盐胁迫环境中的萌发过程具有缓解作用。同时,肉桂醛可以通过改变番茄幼苗根系形态,促进根系的分化与生长,提升幼苗根系的吸水能力,从而提升番茄幼苗的耐盐能力。肉桂醛也可以抑制番茄幼苗根尖总 ROS 的大量积累并减少细胞死亡率,减轻番茄幼苗的氧化损伤,从而提升番茄幼苗的耐盐性。本研究初步证明了肉桂醛具有提高番茄幼苗耐盐性的能力,为肉桂醛田间的推广应用提供一定参考,也为后续相关生理与生化机理的探究提供一定理论基础。

参考文献:

- CHEN F, YANG SL, ZHANG L, et al., 2021. Effect of exogenous methyl jasmonate on AsA-GSH cycle in maize seedlings under salt stress [J]. Bull Biol, 56(11): 44–48. [陈芳, 杨双龙, 张莉, 等, 2021. 外源茉莉酸甲酯对盐胁迫下玉米幼苗 AsA-GSH 循环的影响 [J]. 生物学通报, 56(11): 44–48.]
- DALIAKOPOULOS IN, APOSTOLAKIS A, WAGNER K, et al., 2019. Effectiveness of *Trichoderma harzianum* in soil and yield conservation of tomato crops under saline irrigation [J]. Catena, 46(175): 144–153.
- DUAN WJ, MENG YJ, JIANG D, et al., 2022. Effects of exogenous melatonin on the morphology and antioxidant enzyme activities of cotton seedlings under salt stress [J]. Chin J Eco-Agric, 30(1): 92–104. [段文静, 孟妍君, 江丹, 等, 2022. 外源褪黑素对盐胁迫下棉花幼苗形态及抗氧化系统的影响 [J]. 中国生态农业学报 (中英

- 文), 30(1): 92-104.]
- FANG J, 2014. Effect of exogenous gibberellin on germination of oil sunflower under salt stress [J]. *Seed*, 33(4): 90-93. [方晶, 2014. 外源赤霉素对盐胁迫下油葵种子萌发的影响 [J]. *种子*, 33(4): 90-93.]
- FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL JHF, et al., 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Nature*, 422 (6930): 442-446.
- GENG SD, WU Y, GAO QH, 2022. Effects of exogenous melatonin on seed germination and physiological characteristics of watermelon seedlings under salt stress [J]. *J Anhui Agric Sci*, 50(2): 52-55. [耿书德, 吴燕, 高青海, 2022. 盐胁迫下外源褪黑素浸种对西瓜种子萌发及幼苗生理特性的影响 [J]. *安徽农业科学*, 50(2): 52-55.]
- HERMAWAN A, PUTRI H, UTOMO RY, 2021. Exploration of targets and molecular mechanisms of cinnamaldehyde in overcoming fulvestrant-resistant breast cancer: a bioinformatics study [J]. *NetMAHIB*, 10(1): 1-14.
- KELLERMEIER F, CHARDON F, AMTMANN A, 2013. Natural variation of *Arabidopsis* root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation [J]. *Plant Physiol*, 161(3): 1421-1432.
- LI LN, SHI ZQ, GAO T, et al., 2016. Mechanism research on cinnamaldehyde enhances pepper resistance to phytophthora capsica [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 36(1): 100-105. [李丽娜, 石志琦, 高弢, 等, 2016. 肉桂醛对增强辣椒疫霉病抗性的作用机制研究 [J]. *西北植物学报*, 36(1): 100-105.]
- LI Y, ZHANG QY, WANG DD, et al., 2022. A cultivation technique for summer and spring dandelions based on secondary salinization improvement of soils in a facility rapeseed [J]. *Vegetable*, 30(3): 35-36. [李燕, 张庆银, 王丹丹, 等, 2022. 基于设施菜地土壤次生盐渍化改良的夏秋蒲公英栽培技术 [J]. *蔬菜*, 30(3): 35-36.]
- LING TX, 2017. Mechanism of thymol and cinnamaldehyde alleviating cadmium stress in tobacco seedlings [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University: 24-35. [凌天孝, 2017. 麝香草酚和肉桂醛缓解烟草幼苗镉胁迫机制研究 [D]. 郑州: 河南农业大学: 24-35.]
- LIU WY, YANG HW, WEI XH, et al., 2015. Effects of exogenous nitric oxide on seed germination, physiological characteristics and active oxygen metabolism of *Medicago truncatula* under NaCl stress [J]. *Acta Pratac Sin*, 24(2): 85-95. [刘文瑜, 杨宏伟, 魏小红, 等, 2015. 外源 NO 调控盐胁迫下蒺藜苜蓿种子萌发生理特性及抗氧化酶的研究 [J]. *草业学报*, 24(2): 85-95.]
- LIU XH, LI XL, WANG YL, et al., 2021. Mechanism of exogenous cinnamaldehyde additive in enhancing resistance to salt stress for tobacco seedlings [J]. *Acta Tab Sin*, 27(4): 59-65. [刘晓涵, 李雪利, 王悦霖, 等, 2021. 外源添加肉桂醛提高烟草幼苗抵御盐胁迫机理的研究 [J]. *中国烟草学报*, 27(4): 59-65.]
- TIAN YQ, GAO LH, 2021. Theory and technology for facility cultivation of high-quality tomato [J]. *Chin Veg*, 40(2): 30-40. [田永强, 高丽红, 2021. 设施番茄高品质栽培理论与技术 [J]. *中国蔬菜*, 40(2): 30-40.]
- WANG M, XU Y, SHI J, et al., 2020. Effects of optimized fertilization and adding microbial agents on greenhouse tomato growth and soil microorganism in secondary salinized soil [J]. *Shandong Agric Sci*, 52(11): 111-114. [王梅, 徐钰, 石璟, 等, 2020. 优化施肥及增施微生物菌剂对次生盐渍化土壤设施番茄生长和土壤微生物的影响 [J]. *山东农业科学*, 52(11): 111-114.]
- WANG RJ, LI SL, JIA H, et al., 2021. Protective effects of cinnamaldehyde on the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis in liver of *Salmonella typhimurium*-challenged mice [J]. *Molecules*, 26(8): 2309.
- WANG W, 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants [J]. *Environ Toxicol Chem*, 6(5): 409-414.
- XUE YF, ZHANG M, QI ZQ, et al., 2016. Cinnamaldehyde promotes root branching by regulating endogenous hydrogen sulfide [J]. *J Sci Food Agric*, 96(3): 909-914.
- YAMAMOTO Y, KOBAYASHI Y, DEVI SR, et al., 2002. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells [J]. *Plant Physiol*, 128(1): 63-72.
- YANG HM, WANG X, HAO YN, et al., 2022. Cinnamaldehyde ameliorates selenium stress by regulating PAO-H₂O₂ system in *Brassica rapa* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 42(5): 787-795. [杨会敏, 王旭, 郝漪旎, 等, 2022. 肉桂醛调控不结球白菜多胺氧化酶-过氧化氢系统缓解硒胁迫的机理研究 [J]. *西北植物学报*, 42(5): 787-795.]
- YANG JL, HUANG CX, XU X, et al., 2021. Synthesis, optical properties, determination and imaging in living cells and bamboo of cinnamaldehyde derivatives [J]. *Spectrochim Acta A*, 255: 119730.
- ZHANG WP, FU YY, XIE XM, 2003. Study on antifungal mechanism of cinnamaldehyde citral and in aspergilli [J]. *J Acta Acad Med Jiangxi*, 43(6): 10-13. [张文平, 傅颖媛, 谢小梅, 2003. 柠檬醛、肉桂醛抗曲霉菌作用机制研究 [J]. *江西医学院学报*, 43(6): 10-13.]
- ZHANG XM, KANG C, TENG YX, et al., 2022. Effects of exogenous hydrogen sulfide and salicylic acid on growth and physiological characteristics of processing tomato seedlings under salt stress [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 42(2): 255-262. [张雪蒙, 亢超, 滕元旭, 等, 2022. 外源硫化氢和水杨酸对盐胁迫下加工番茄幼苗生长与生理特性的影响 [J]. *西北植物学报*, 42(2): 255-262.]
- ZHOU J, XIA XJ, HU ZJ, et al., 2021. Technological development and production of protected vegetable in China during 'The Thirteenth Five-Year Plan' and future prospect [J]. *China Veget*, 40(10): 20-34. [周杰, 夏晓剑, 胡璋健, 等, 2021. “十三五”我国设施蔬菜生产和科技进展及其展望 [J]. *中国蔬菜*, 40(10): 20-34.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202204017

彭凤, 路承凯, 梁岗, 2023. *OsIMA1* 增强水稻对镉逆境的适应性 [J]. 广西植物, 43(6): 1097–1104.

PENG F, LU CK, LIANG G, 2023. *OsIMA1* enhances tolerance to cadmium stress in rice [J]. *Guihaia*, 43(6): 1097–1104.



OsIMA1 增强水稻对镉逆境的适应性

彭 凤^{1,2}, 路承凯^{1,2}, 梁 岗^{1,2*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 昆明 650223;
2. 中国科学院大学 生命科学学院, 北京 100049)

摘 要: 铁(Fe)是植物生长发育所必需的营养元素而镉(Cd)是对植物有害的元素且对植物 Fe 和 Cd 的吸收存在拮抗作用。*OsIMA* 是一类正调控水稻 Fe 吸收的一类小肽,其过表达可以促进 Fe 的积累。为探究 *OsIMA* 是否参与水稻对 Cd 胁迫的适应性,该研究以水稻为研究材料,利用荧光定量 PCR 分析了 *OsIMA* 基因的表达水平,通过遗传转化和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 *OsIMA1* 过表达植物和 *ima1* 突变体植物,评估了 *OsIMA1* 过表达和突变体植物在 Cd 逆境条件下的株高,并利用电联耦合等离子体质谱法测量了根和地上部的 Fe 和 Cd 含量。结果表明:(1) Cd 处理后,*OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的转录水平上调。(2) *OsIMA1* 过表达植物比野生型植物对 Cd 胁迫更耐受。(3) *ima1* 功能缺失突变体比野生型植物对 Cd 胁迫更敏感。(4) *OsIMA1* 过表达植株根系的 Cd 含量较高,而 *ima1* 突变体植株地上部的 Cd 含量较高。综上所述,*OsIMA1* 通过限制 Cd 从根向地上部的转运以增强水稻对 Cd 逆境的适应能力,该研究结果为定向培育耐 Cd 作物提供了理论参考。

关键词: 水稻, *OsIMA*, Cd, Fe, 拮抗作用

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1097-08

OsIMA1 enhances tolerance to cadmium stress in rice

PENG Feng^{1,2}, LU Chengkai^{1,2}, LIANG Gang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Iron (Fe) is crucial for the growth and development of plants and cadmium (Cd) is toxic to plants. There is an antagonistical mechanism between Fe and Cd uptake in plants. *OsIMAs* are a class of small peptides, and their overexpression improves Fe accumulation in rice. To explore the role of *OsIMA* genes in response to Cd stress, we analyzed the expression of two *OsIMA* genes by qRT-PCR, generated *OsIMA1* overexpression plants and CRISPR/Cas9 edited *ima1* mutants by genetic transformation, assessed the plant heights of *OsIMA1* overexpressing plants and *ima1* mutant plants under Cd stress, and measured the Fe and Cd concentration of root and shoot. The results were as follows: (1) Transcriptional levels both *OsIMA1* and *OsIMA2* were up-regulated by Cd treatment. (2) Overexpression of *OsIMA1*

收稿日期: 2022-05-28

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(202003AD150007)。

第一作者: 彭凤(1996-), 硕士研究生, 主要从事植物铁营养代谢研究, (E-mail) 1272277231@qq.com。

* 通信作者: 梁岗, 博士, 研究员, 主要从事植物矿质营养研究, (E-mail) lianggang@xtbg.ac.cn。

gene improved the tolerance of plants to Cd stress. (3) The loss-of-function of *OsIMA1* led to the higher sensitivity of plants to Cd stress. (4) *OsIMA1* overexpressing plants accumulated more Cd in the root and the *ima1* mutants accumulated more Cd in the shoot. To sum up, *OsIMA1* improves Cd tolerance by restricting Cd translocation from root to shoot, which provides the theoretical reference for breeding the Cd-tolerant rice.

Key words: rice, *OsIMA*, cadmium, iron, antagonism

Cd 是对所有生物都有害的重金属元素,极易在根系从土壤吸收的过程中与其他二价金属离子(如 Fe 和 Zn)竞争。Cd 还可以通过食物链在人体内富集,长期积累可导致骨质疏松症、癌症和肾功能障碍等多种疾病。随着工业化的快速发展以及化肥和农药的过度使用,土壤中不断增加的 Cd 污染已经严重威胁到粮食安全,增加了对人类健康的潜在风险,并造成了巨大的经济损失(Kirkham, 2006; Wei & Yang, 2010)。因此,研究植物吸收 Cd 的分子机理并筛选和培育耐 Cd 胁迫或低 Cd 累积的农作物,对人类健康和生态保护具有重要意义。

由于 Cd 和 Fe 具有相似的水合离子半径,Cd 极易通过与 Fe 竞争并借助 Fe 离子通道或转运蛋白进入植物体内(Nightingale, 1959; Eide et al., 1996; Schutzendubel & Polle, 2002; Clemens, 2006)。Cd 在植物体内的积累导致幼叶明显褪绿、坏死、生长受阻甚至死亡,这与典型的缺 Fe 症状相似(Das et al., 1997; Cohen et al., 1998; Yoshihara et al., 2006)。相关研究表明,Cd 胁迫改变了细胞壁成分,增强了细胞壁对 Fe 的结合能力,导致 Fe 滞留在根的质外体中,并抑制 Fe 从根部到地上部的转运(Xu et al., 2015),这些症状可以通过给植物补给 Fe 元素得到改善(Bao et al., 2010; He et al., 2017; Huang et al., 2020)。Fe 转运体(iron-regulated transporter 1, IRT1)参与 Cd 的吸收过程(Cohen et al., 1998; Korshunova et al., 1999; Vert et al., 2002; Fan et al., 2014; Mao et al., 2014; Guan et al., 2019; Zhu et al., 2020)。在拟南芥里,IRT1 的表达直接受转录因子 FIT (FER-like Iron deficient-induced transcription factor) 和 bHLH 1b 亚族成员(bHLH38、bHLH39、bHLH100 和 bHLH101)的调控(Yuan et al., 2008)。FIT 和 bHLH38 或 bHLH39 的共表达通过增加根部对 Cd 的螯合而减少地上部的 Cd 积累来提高植物对 Cd 胁迫的耐受性(Wu et al., 2012)。

转录因子 bHLH104 正调控拟南芥 Fe 稳态,过表达 *bHLH104* 则可提高植物对 Cd 的耐受性(Zhang et al., 2015; Li et al., 2016; Yao et al., 2018)。BTS (BRUTUS)负调控 Fe 稳态,敲除 *BTS* 显著增强了拟南芥对 Cd 胁迫的耐受性,同时增加了 Fe 和 Cd 的积累(Kobayashi et al., 2013; Hindt et al., 2017; Zhu et al., 2020)。在水稻中,2 个 Fe 转运蛋白 OsNRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1) 和 OsIRT1 可以介导根系从土壤中吸收 Cd,并且过表达 *OsNRAMP1* 和 *OsIRT1* 可以增加水稻的 Cd 含量(Lee & An, 2009; Takahashi et al., 2019)。由于 Fe 和 Cd 之间存在拮抗作用,因此水稻缺 Fe 会显著增加根系对 Cd 的吸收,外源施加 Fe 则会降低水稻的 Cd 含量并减缓 Cd 毒害(Shao et al., 2007)。综上所述,改善 Fe 的积累和分配可以显著减轻 Cd 对植物的毒害。因此,全面了解 Fe 和 Cd 的拮抗作用有利于指导农业生产和降低 Cd 对植物的毒性。

小肽泛指小于 100 个氨基酸的蛋白质,具有短的氨基酸共有基序,参与植物生长发育和非生物等逆境的胁迫响应(Czyzewicz et al., 2013; Matsubayashi, 2014)。IMA (IRON MAN) 多肽家族成员的碳末端包含一个 17 氨基酸的共有基序,在被子植物中高度保守,并且这 17 个氨基酸就足以代替其全长蛋白发挥作用(Grillet et al., 2018; Li et al., 2021)。近年来,小肽作为激素类信号分子受到广泛的关注,参与器官内通讯、植物发育和胁迫应答(Tavormina et al., 2015; Takahashi et al., 2019)。IMA 可能介导了 Fe 从地上部到根部的长距离信号,参与 Fe 的吸收、转运和细胞内稳态(Grillet et al., 2018; Li et al., 2021)。Meng 等(2022)研究表明,过表达 IMA 可以提高在拟南芥中对 Cd 胁迫的适应性。但是,目前关于 IMA 是否可以提高农作物对 Cd 胁迫的适应性尚不清楚。本研究探究了水稻 *OsIMA1* 调控 Cd 胁迫方面的作用,以期未来利用分子育种提高水稻对 Cd 胁迫的耐受性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为粳稻品种“日本晴”,种植地点为云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇中国科学院西双版纳热带植物园的作物保护与育种基地(101°19' E、21°52' N)。将水稻种子用双蒸水(ddH_2O)浸泡 24 h 后均匀地散布在吸水滤纸中,在 28 °C 人工温室黑暗放置 3 d 后,转移到 1/2MS 培养液中萌发生长 7 d,转移至不含 Cd 或含 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉(CdCl_2)的 1/2MS 水培液中培养 7 d。每 2 d 换 1 次水培液。生长光周期为光 16 h、暗 8 h 的循环。

1.2 转基因植株的构建

利用 CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn/>) 在线设计 *OsIMA1* 的编辑靶点。通过 Overlapping PCR 构建包含该靶点的 sgRNA,并融合至 *OsU6a* 启动子的下游,然后将 *OsU6a*-sgRNA 克隆至携带 Cas9 的 pMH-SA 载体(Liang et al., 2016)。将表达载体转化至农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻转化,并对转基因阳性苗进行 PCR 测序。对纯合植株进行扩繁,并进一步对 T3 代植物在进行 PCR 测序,获得纯合突变植株。

用玉米 Ubiquitin 启动子驱动 *OsIMA1* 全长 CDS,获得 *OsIMA1* 过表达载体。将构建的质粒转化至农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻转化。选用含潮霉素抗性的转基因植株进行基因表达水平检测,T3 转基因植株用来试验分析。

1.3 qRT-PCR

利用水饱和酚法提取水稻根(root)或地上部(shoot)的总 RNA。采用 RT Primer Mix (oligo dT) 和 PrimeScript RT Enzyme Mix for qPCR (宝生物,日本)试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,随后使用 PrimeScriptTM RT 试剂(Perfect Real Time) Kit (宝生物,日本)在 Light-Cycler 480 实时 PCR 仪(罗氏,瑞士)上进行 qRT-PCR 检测。每个基因的定量至少含 3 次生物学重复。以 *OsACTIN1* 和 *OsOBP* 作为内参对照,对样品进行归一化处理。

1.4 Fe 和 Cd 含量测定

不同基因型的水稻材料于 1/2MS 营养液体萌发生长 7 d 后转移至不含 Cd 或含 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 的 1/2MS 水培液培养 7 d。分别收取根和叶,并置于 65 °C 烘箱干燥 7 d。用高通量组织研

磨仪打磨样品成粉末。每个样品称取 500 mg,加入 5 mL 硝酸于 185 °C 中消解 3 h,加入 2 mL 高氯酸于 220 °C 氧化 30 min。利用美国 Thermo SCIENTIFIC 公司的电联耦合等离子体质谱仪(ICP-MS iCAP6300)测定样品元素含量。

1.5 统计分析

所有试验数据均使用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。每个试验至少有 3 次生物学重复。利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way variance, ANOVA) ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫引起水稻 *OsIMA* 基因表达上调

水稻基因组包含两个 *OsIMA* 基因(*OsIMA1* 和 *OsIMA2*)。近来的研究表明 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 受到缺 Fe 诱导(Kobayashi et al., 2021)。Cd 胁迫会严重限制植物的生长发育,从而导致植物表现出缺 Fe 症状。为研究 Cd 胁迫是否能影响 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达,对野生型(wild type, WT)水稻进行 Cd 处理后,检测了 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达情况。将在正常培养液上生长 7 d 的幼苗转移至不含 Cd (Cd0)或含 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 (Cd25)的培养液中生长 7 d。提取根和地上部的 RNA 并利用荧光定量 PCR 检测 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达水平。结果表明,在 Cd 胁迫条件下,无论在根还是地上部, *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达均显著上调(图 1)。

2.2 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 耐受性更高

OsIMA1 和 *OsIMA2* 属于同源蛋白且二者在 Fe 稳态方面的功能相近。考虑到二者的转录水平均受到 Cd 处理诱导,本研究接下来以 *OsIMA1* 作为代表进行研究。本研究利用玉米的 Ubiquitin 启动子驱动 *OsIMA1* 基因,并且转化了野生型水稻品种“日本晴”(图 2:A)。通过定量 PCR 筛选获得了 *OsIMA1* 的过表达转基因水稻植株,评估 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 胁迫的适应能力。在正常水培溶液生长一周的幼苗分别转移到不含 Cd (Cd0)或含 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 (Cd25)的溶液再生长一周,观察和分析其表型。结果表明,在 Cd0 生长条件下, *OsIMA1* 的过表达植株与野生型植株无明显区别,而在 Cd25 处理条件下,过表达植株的株高显著高于野生型植株(图 2:B, C)。综上表明, *OsIMA1* 过表达增强了植物对 Cd 胁迫的适应性。

2.3 *OsIMA1* 的功能缺失突变体对 Cd 胁迫更敏感

为了进一步研究 *OsIMA1* 在适应 Cd 胁迫方面的作用,本研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术对 *OsIMA1* 基因进行了编辑,并获得了两个 *ima1* 突变体。本研究在 *OsIMA1* 基因的编码区设计了一个特异性的靶点,用 *OsUba* 启动子驱动整合了该靶点的 sgRNA,并构建了相应的表达载体。通过转化野生型水稻愈伤组织,获得了转基因植株。通过 PCR 鉴定及后代分离纯化,得到 2 个纯合的突变体株系 *ima1-1* 和 *ima1-2*。2 个株系均因基因编码区插入一个碱基导致移码突变(图 3:A)。此外,本研究对野生型和 2 个功能缺失突变体的植株进行了 Cd 处理试验。在正常水培液生长条件下,2 个突变体株系与野生型植株无明显差别(图 3:B,C)。在 Cd 处理条件下,突变体植株表现出幼叶缺绿甚至萎蔫等症状(图 3:B)。综上所述,*OsIMA1* 功能缺失增加了植物对 Cd 的敏感性。

2.4 *OsIMA1* 负调控 Cd 从根向叶的转运

本研究结果表明 *OsIMA1* 过表达植株比野生型更耐 Cd 胁迫,而 *ima1* 突变体则相反。为了进一步分析 *OsIMA1* 正调控 Cd 耐受的分子机制,本研究测定了野生型、*OsIMA1* 过表达株系和 *ima1* 突变体的根和叶片中的 Cd 和 Fe 含量。先将在正常培养液中生长 7 d 的幼苗分别转移到不含 Cd 或含有 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 的培养液中培养 7 d,然后分别取根和叶用来检测 Fe 和 Cd 的含量。与野生型相比,*OsIMA1* 过表达植株的根和地上部都积累了更多的 Fe,而 *ima1* 突变体则积累了较少的 Fe;*OsIMA1* 过表达植物在根中积累了较多的 Cd,而 *ima1* 突变体在地上部积累了较多的 Cd(图 4)。综上所述,*OsIMA1* 负调控 Cd 从根向地上部的运输。

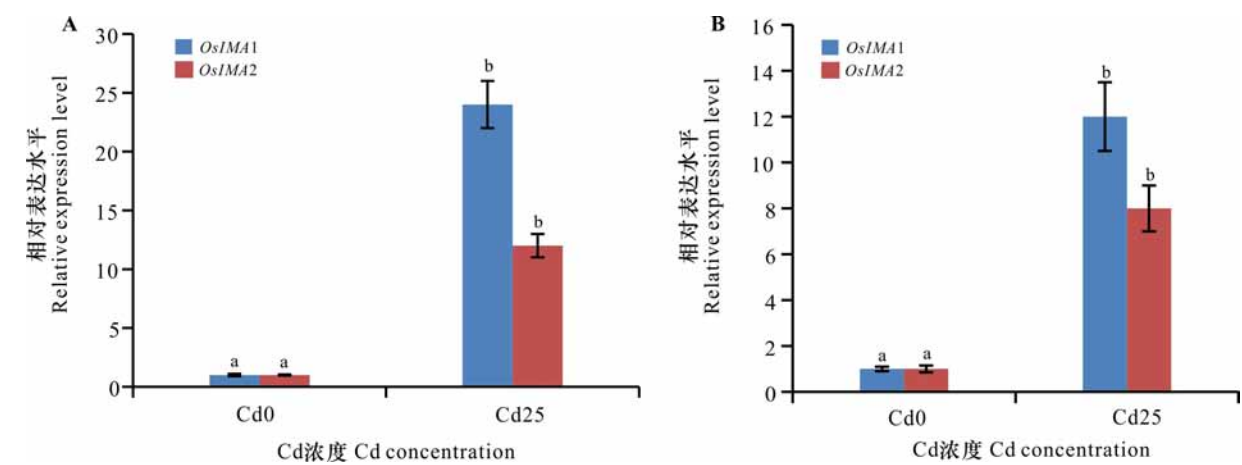
3 讨论与结论

Cd 对动植物的生长发育有害,近年来水稻受到 Cd 污染的事件频频发生。因此,减少植物的 Cd 吸收或提高植物对 Cd 胁迫的适应性,有利于保障粮食安全。Fe 是植物生长发育所必需的营养元素,而缺 Fe 是导致人类贫血症的一个主要原因。水稻作为主粮作物,是人类 Fe 元素的一个主要来源。因此,培育富 Fe 稻米有益于改善人类健康。由于 Fe 和 Cd 之间的拮抗作用,额外施加 Fe 可以

减少植物对 Cd 的吸收(Wu et al., 2012; Sebastian & Prasad, 2016)。因此,利用 Fe 和 Cd 的拮抗机制可以提高植物对 Cd 胁迫的适应性。水稻中存在两个 *OsIMA* 基因:*OsIMA1* 和 *OsIMA2*,它们的过表达能激活缺 Fe 诱导基因的表达,从而增加 Fe 的累积(Kobayashi et al., 2021)。本研究发现,Cd 胁迫时 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达显著上调。Cd 处理试验发现 *OsIMA1* 的功能缺失突变体提高了水稻对 Cd 的敏感性,主要表现在植株叶片白化萎蔫。*OsIMA1* 过表达一方面增加了 Fe 的积累,另一方面却抑制了 Cd 从根向地上部的转运,这可能是 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 耐受性提高的原因。因此,增加 *OsIMA1* 的表达水平是缓解植物 Cd 毒害的一个有效策略。

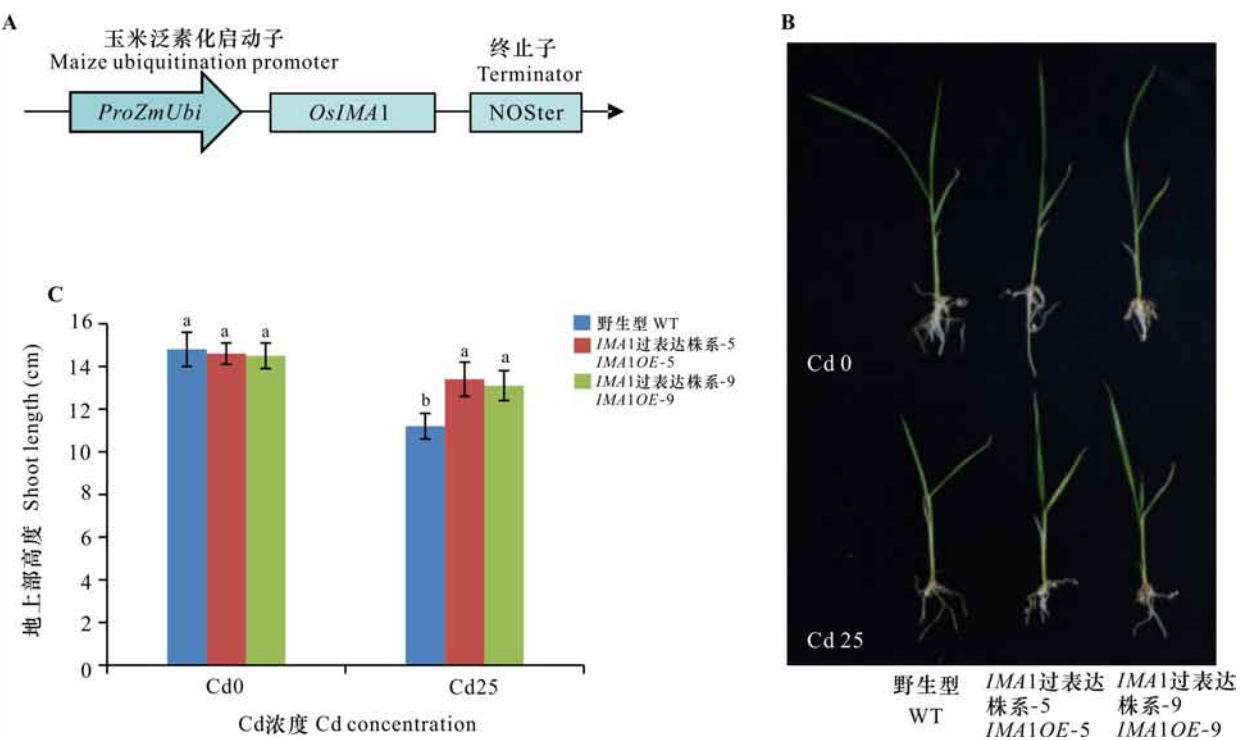
Meng 等(2022)研究表明,*IMA* 过表达可以提高拟南芥对 Cd 胁迫的适应能力。本研究发现 *OsIMA1* 过表达提高了水稻对 Cd 胁迫的耐受性。水稻根摄入的 Fe 和 Cd 经地上部转运至稻米中。*OsIMA1* 过表达既促进了 Fe 在根部的累积,又促进了 Cd 在根部的积累。但是,*OsIMA1* 过表达促进了 Fe 在地上部积累的同时,也抑制了 Cd 从根向地上部的转运。这表明 *OsIMA1* 可以通过特异性地抑制 Cd 从根向地上部的转运,提高植物对镉胁迫的适应性。Fe 和 Cd 同属于二价离子,在体内可能被类似的转运蛋白识别。*OsIMA1* 过表达植株根部累积的 Fe 可能竞争抑制了 Cd 与这些转运蛋白的结合。*OsIMA1* 这种限制植物从根向地上部转运 Cd 的能力可能有助于减少稻米中的 Cd 累积。未来可以测试 *OsIMA* 过表达是否可减少稻米中的 Cd 含量。无论在拟南芥还是在水稻中,*IMA* 均具有增加 Fe 吸收、增强 Cd 耐受的生物学功能,揭示了 *IMA* 在不同物种中的功能保守。*IMA* 的高度保守性可能有助于打破基因功能物种特异性的限制(Grillet et al., 2018)。因此,未来研究可以测试 *IMA* 是否可以提高其他作物的耐 Cd 能力。

IMA 小肽碳末端的 17 个氨基酸就足以发挥其分子功能(Grillet et al., 2018; Li et al., 2021)。目前,人工合成小分子多肽的技术已经非常流行。因此,未来有望将 *IMA* 开发为一种商用多肽,通过施肥的方式提高植物对 Cd 耐胁迫的适应性。综上所述,*IMA* 可作为减轻植物 Cd 毒害的一个潜在可利用的小分子。进一步研究 *IMA* 调控 Cd 胁迫



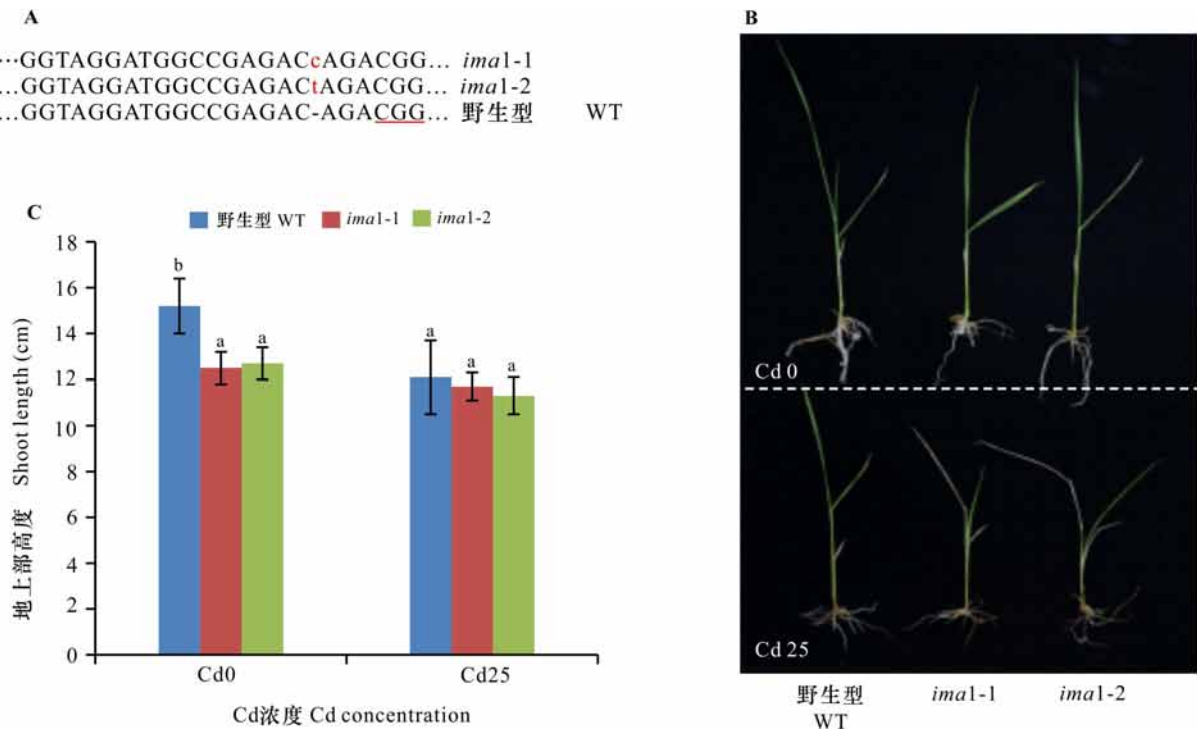
A. 根；B. 地上部。不同小写字母表示 *OsIMA* 在不同 Cd 浓度处理下的显著差异 ($P<0.05$)。
A. Root; B. Shoot. Different small letters indicate significant differences between different Cd concentration treatments of *OsIMA* ($P<0.05$).

图 1 水稻 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 对 Cd 胁迫的响应
Fig. 1 *OsIMA1* and *OsIMA2* of rice in response to Cd stress



A. *OsIMA1* 过表达载体示意图；B. 野生型和 *IMA1* 过表达株系的表型；C. 野生型和 *IMA1* 过表达株系突变体的地上部高度。不同小写字母表示不同植株同一镉浓度处理之间的显著差异 ($P<0.05$)。下同。
A. Schematic diagram of *OsIMA1* overexpression vector; B. Phenotypes of wild-type (WT) and *IMA1* overexpressed plants; C. Shoot height of wild-type (WT) and *IMA1* overexpressed plants. Different small letters indicate significant differences between the same Cd concentration treatment of different plants ($P<0.05$). The same below.

图 2 *OsIMA1* 过表达水稻植株对 Cd 胁迫处理耐受性
Fig. 2 Tolerance of *OsIMA1* overexpressed rice plants to Cd stress



A. *ima1* 突变体的基因型。 *OsU6a* 启动子用来驱动 sgRNA 的表达。下划线的 3 个碱基代表 CRISPR/Cas9 系统识别的 PAM 位点。 *ima1-1* 包含一个碱基“c”插入； *ima1-2* 包含一个碱基“t”插入。 **B.** 野生型和 *ima1* 突变体的表型。 **C.** 野生型和 *ima1* 突变体的地上部高度。

A. Genotypes of *ima1* mutants. Promoter *OsU6a* was used to drive the expression of sgRNA. The underlined three bases indicate the PAM region recognized by CRISPR/Cas9 system. *ima1-1* contains an insertion of ‘c’ and *ima1-2* contains an insertion of ‘t’. **B.** Phenotypes of wild-type (WT) and *ima1* mutants. **C.** Shoot height of WT and *ima1* mutants.

图 3 *ima1* 功能缺失突变体的表型

Fig. 3 Phenotypes of *OSIMA1* loss-of-function mutants

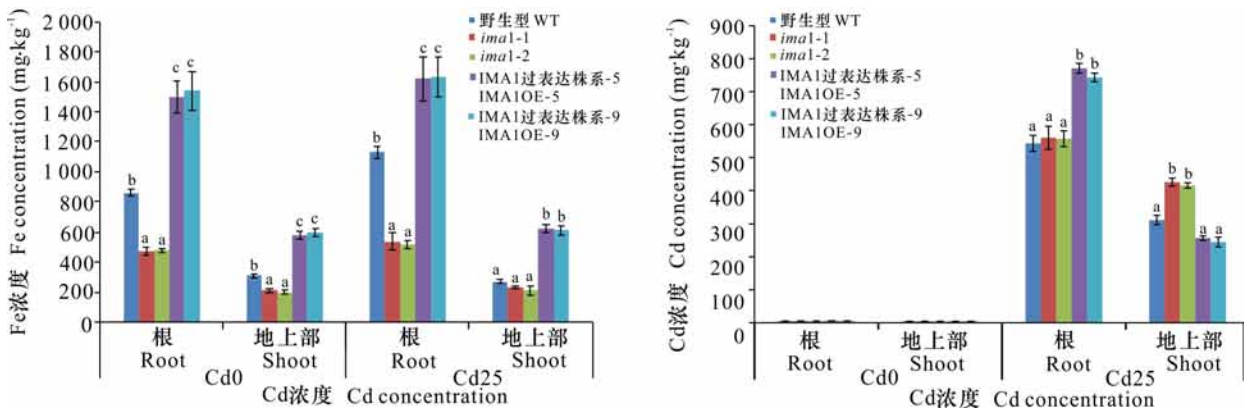


图 4 水稻植株的 Fe 和 Cd 浓度

Fig. 4 Fe and Cd concentrations in rice plants

的机制,将为基因工程技术改造植物或培育耐 Cd 胁迫的农作物提供理论依据。

参考文献:

- BAO T, SUN LN, SUN TH, 2010. Evaluation of iron on cadmium uptake by tomato, morel and leaf red beet in hydroponic culture [J]. *J Plant Nutr*, 33(5): 713–723.
- CLEMENS S, 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants [J]. *Biochimie*, 88(11): 1707–1719.
- COHEN CK, FOX TC, GARVIN DF, et al., 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants [J]. *Plant Physiol*, 116 (3): 1063–1072.
- CZYZEWICZ N, YUE K, BEECKMAN T, et al., 2013. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development [J]. *J Exp Bot*, 64 (17): 5281–5296.
- DAS P, SAMANTARAY S, ROUT GR, 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review [J]. *Environ Poll*, 98(1): 29–36.
- EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, et al., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(11): 5624–5628.
- FAN SK, FANG XZ, GUAN MY, et al., 2014. Exogenous abscisic acid application decreases cadmium accumulation in *Arabidopsis* plants, which is associated with the inhibition of IRT1-mediated cadmium uptake [J]. *Front Plant Sci*, 5(1): 721.
- GRILLET L, LAN P, LI WF, et al., 2018. IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants [J]. *Nat Plants*, 4(11): 953–963.
- GUAN MY, ZHU YX, LIU XX, et al., 2019. Induction of S-nitrosoglutathione reductase reduces root cadmium uptake by inhibiting iron-regulated transporter 1 [J]. *Plant Soil*, 438(1): 251–262.
- HE XL, FAN SK, ZHU J, et al., 2017. Iron supply prevents Cd uptake in *Arabidopsis* by inhibiting IRT1 expression and favoring competition between Fe and Cd uptake [J]. *Plant Soil*, 416(1): 453–462.
- HINDT MN, AKMAKJIAN GZ, PIVARSKI KL, et al., 2017. BRUTUS and its paralogs, BTS LIKE1 and BTS LIKE2, encode important negative regulators of the iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Metalomics*, 9(7): 876–890.
- HUANG G, DING C, LI Y, et al., 2020. Selenium enhances iron plaque formation by elevating the radial oxygen loss of roots to reduce cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Hazard Mat*, 398(1): 122860.
- KIRKHAM MB, 2006. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments [J]. *Geoderma*, 137(1): 19–32.
- KOBAYASHI T, NAGANO AJ, NISHIZAWA NK, 2021. Iron deficiency-inducible peptide-coding genes *OsIMA1* and *OsIMA2* positively regulate a major pathway of iron uptake and translocation in rice [J]. *J Exp Bot*, 72 (6): 2196–2211.
- KOBAYASHI T, NAGASAKA S, SENOURA T, et al., 2013. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation [J]. *Nat Commun*, 4(1): 2792.
- KOBAYASHI T, NAGANO AJ, NISHUIZAWA NK. 2021. Iron deficiency-inducible peptide codin genes *OsIMA1* and *OsIMA2* positively regulate a major pathway of iron uptake and translocation in rice [J]. *J Exper Bot*, 72 (6): 2196–2211.
- KORSHUNOVA YO, EIDE D, CLARK WG, et al., 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range [J]. *Plant Mol Biol*, 40(1): 37–44.
- LEE S, AN G, 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice [J]. *Plant Cell Environ*, 32(4): 408–416.
- LI J, LIU JC, YAN CL, et al., 2019. The alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove *A. marina*. Alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh [J]. *Chemosphere*, 226(1): 413–420.
- LI XL, ZHANG HM, AI Q, et al., 2016. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 170(4): 2478–2493.
- LI Y, LU CK, LI CY, et al., 2021. IRON MAN interacts with BRUTUS to maintain iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118(39): e2109063118.
- LIANG G, ZHANG HM, LOU DJ, et al., 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing [J]. *Sci Rep*, 6(1): 21451.
- MAO QQ, GUAN MY, LU KX, et al., 2014. Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 166(2): 934–U730.
- MATSUBAYASHI Y, 2014. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 65(1): 385–413.

- MENG X, LI W, SHEN R, et al., 2022. Ectopic expression of IMA small peptide genes confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis* through activating the iron deficiency response [J]. *J Hazard Mat*, 422(1): 126913.
- NIGHTINGALE ER, 1959. Phenomenological theory of ion solvation-effective radii of hydrated ions [J]. *J Physiol Chem*, 63(9): 1381-1387.
- SCHUTZENDUBEL A, POLLE A, 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization [J]. *J Exp Bot*, 53(372): 1351-1365.
- SEBASTIAN A, PRASAD MN, 2016. Iron plaque decreases cadmium accumulation in *Oryza sativa* L. and serves as a source of iron [J]. *Plant Biol*, 18(6): 1008-1015.
- SHAO GS, CHEN MX, WANG WX, et al., 2007. Iron nutrition affects cadmium accumulation and toxicity in rice plants [J]. *Plant Growth Regul*, 53(1): 33-42.
- TAKAHASHI F, HANADA K, KONDO T, et al., 2019. Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 51(1): 88-95.
- TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SENOURA T, et al., 2011. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice [J]. *J Exp Bot*, 62(14): 4843-4850.
- TAVORMINA P, DE CONINCK B, NIKONOROVA N, et al., 2015. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions [J]. *Plant Cell*, 27(8): 2095-2118.
- VERT G, GROTZ N, DEDALDECHAMP F, et al., 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth [J]. *Plant Cell*, 14(6): 1223-1233.
- WEI BG, YANG LS, 2010. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China [J]. *Microchem J*, 94(2): 99-107.
- WU HL, CHEN CL, DU J, et al., 2012. Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in *Arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots [J]. *Plant Physiol*, 158(2): 790-800.
- XU SS, LIN SZ, LAI ZX, 2015. Cadmium impairs iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by increasing the polysaccharide contents and the iron-binding capacity of root cell walls [J]. *Plant Soil*, 392(1): 71-85.
- YAO XN, CAI YR, YU DQ, et al., 2018. bHLH104 confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Integr Plant Biol*, 60(8): 691-702.
- YOSHIHARA T, HODOSHIMA H, MIYANO Y, et al., 2006. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants [J]. *Plant Cell Rep*, 25(4): 365-373.
- YUAN YX, WU HL, WANG N, et al., 2008. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 18(3): 385-397.
- ZHANG J, LIU B, LI MS, et al., 2015. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 27(3): 787-805.
- ZHU YX, DU WX, FANG XZ, et al., 2020. Knockdown of BTS may provide a new strategy to improve cadmium-phytoremediation efficiency by improving iron status in plants [J]. *J Hazard Mat*, 384(1): 121473.

(责任编辑 李 莉 王登惠)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202204038

方玲, 林玉虎, 何云晓, 等, 2023. 锰胁迫和性别竞争交互处理下沙棘雌雄幼苗生理响应特征 [J]. 广西植物, 43(6): 1105–1113.

FANG L, LIN YH, HE YX, et al., 2023. Physiological response characteristics of *Hippophae rhamnoides* seedlings under interaction of Mn stress and sexual competition [J]. *Guihaia*, 43(6): 1105–1113.



锰胁迫和性别竞争交互处理下 沙棘雌雄幼苗生理响应特征

方 玲¹, 林玉虎¹, 何云晓^{1,2}, 陈 浩¹, 徐元洪¹, 孙旭东^{1,2}, 陈 娟^{1,2*}

(1. 绵阳师范学院 城乡建设与规划学院, 四川 绵阳 621000; 2. 川西北乡村人居环境
建设四川省高校工程研究中心, 四川 绵阳 621000)

摘 要: 沙棘(*Hippophae rhamnoides*)是重要的雌雄异株人工林防护树种,但对其环境胁迫的性别响应差异研究不足,性别竞争与胁迫因子的交互效应响应特征尚不清楚。为了探讨锰胁迫和性别竞争交互处理下沙棘雌雄植株的生理响应特征和耐受能力,旨在为沙棘修复土壤重金属污染提供实践指导,该文研究了锰胁迫(4 000 mg·kg⁻¹)和3种不同性别组合模式(雌雄、雌雌、雄雄)处理下沙棘的生理响应,分别测定雌雄沙棘叶片中叶绿素、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总酚(total phenols, TP)、游离脯氨酸(free proline, Pro)、可溶性糖(soluble sugar, SS)、甜菜碱(glycine betaine, GB)以及锰含量。结果表明:(1)锰胁迫下,在所有竞争组合中,性间竞争的雄株(M/FM)SOD活性最高,而MDA含量与对照相比未有明显升高,表明雄株的抗氧化能力更好,膜氧化损伤程度更小。(2)锰胁迫时M/FM积累了更多的游离脯氨酸,表现出更好的渗透调节能力和耐受能力。(3)交互效应分析显示性别互作和锰胁迫交互处理显著影响了沙棘雌雄叶片的光合色素、抗氧化酶活性和渗透调节能力;主成分分析显示SOD、POD、MDA、叶绿素b(chlorophyll b, Chlb)、SS、Pro可作为重要的生理响应指示参数。该研究结果对于利用沙棘修复土壤重金属污染可提供一定的参考。

关键词: 土壤修复, 锰胁迫, 沙棘, 性别竞争, 生理响应

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1105-09

Physiological response characteristics of *Hippophae rhamnoides* seedlings under interaction of Mn stress and sexual competition

FANG Ling¹, LIN Yuhu¹, HE Yunxiao^{1,2}, CHEN Hao¹,
XU Yuanhong¹, SUN Xudong^{1,2}, CHEN Juan^{1,2*}

(1. College of Urban and Rural Construction and Planning, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, Sichuan, China; 2. Sichuan University
Engineering Research Center of Rural Human Settlement Environment Construction in Northwest Sichuan, Mianyang 621000, Sichuan, China)

收稿日期: 2022-05-20

基金项目: 四川省科技厅项目(2021YJ0293); 国家自然科学基金(31500505); 绵阳师范学院科研项目(XSKY202101)。

第一作者: 方玲(1996-), 硕士研究生, 研究方向为生态环境修复, (E-mail)896972899@qq.com。

*通信作者: 陈娟, 博士, 教授, 研究方向为景观生态和环境修复, (E-mail)cj-041698@163.com。

Abstract: Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) is an important dioecious tree species of protective plantation with insufficiently documented on the sexual responses difference to environmental stress as well as the interaction between sexual competition and heavy metal stress. In order to provide the practical guidance for repairing heavy metal pollution in soil, the physiological responses and tolerance of male and female sea buckthorn plants under Mn stress and different sexual competition interaction patterns were discussed. The physiological responses of sea buckthorn under Mn stress ($4\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and three different sexual combinations (female $\times$ female, male $\times$ male, female $\times$ male) were determined, including the contents of chlorophyll, peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), total phenols (TP), free proline (Pro), soluble sugar (SS), glycine betaine (GB) and manganese in male and female leaves. The results were as follows: (1) Under Mn stress, the SOD of male plants (M/FM) was the highest in all competition combinations, while the MDA content was not significantly increased compared with the control, indicating that the male plants had better antioxidant capacity and less membrane oxidative damage. (2) M/FM accumulated more free proline and showed better osmotic adjustment ability under Mn stress, indicating that male plants under sexual competition showed better tolerance to Mn stress. (3) The study indicated that male-female interaction and Mn stress interaction significantly affected the physiological response characteristics of sea buckthorn leaves, such as chlorophyll content, antioxidant enzyme activity and osmotic adjustment. Principal component analysis showed that the contents of SOD, POD, MDA, chlorophyll b (Chlb), SS and Pro in leaves could be used as the main physiological response indicators. The results can be used as a reference for the remediation of soil heavy metal pollution by sea buckthorn plants.

Key words: soil remediation, Mn stress, sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*), sexual competition, physiological response

由于不合理的矿山开采、冶金以及锰肥等各种富锰物质的过度使用,导致高浓度的锰严重污染土壤。因此,对锰污染土壤进行生态修复已成为重要课题。植物修复是利用具有重金属富集作用的植物将重金属从土壤转移到植物的根系或者地上部分的植物体中,利用植物的根系吸收、钝化有毒金属,降低重金属生物有效性,从而达到固定或者从土壤中去除重金属的目的(张玉秀等,1999;罗玉虎,2019)。在植物修复技术应用中,植物对重金属污染的生理生态响应和富集特性的研究是筛选植物修复物种的基础和关键环节。虽然锰是植物生长发育必需的微量元素,对植物的叶绿素形成以及酶活性调节等方面具有重要作用(李欣航等,2020)。但是过量的锰会导致植物的质膜结构改变,线粒体损伤,甚至细胞死亡。目前关于锰胁迫下植物的生理生化响应已有一些研究。有研究发现马尾松(*Pinus massoniana*)可通过改变气体交换参数、光合色素含量和叶绿素荧光来维持光合作用,并通过提高过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化酶活性和可溶性糖、可溶性蛋白等非酶代谢物含量来抵御锰胁迫(Bai et al., 2021);黄花草(*Cleome viscosa*)能通过提高脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖含量缓解较高浓度锰胁迫带来的毒害(肖泽华

等,2019);廖阳等(2015)研究了油茶(*Camellia oleifera*)幼苗对锰的生理响应和耐受性,发现油茶会产生大量的 SOD 和过氧化物酶(peroxidase, POD)等抗氧化酶以抵御植株体内的锰毒。这说明锰胁迫下植物产生的抗氧化酶以及分泌的渗透调节物质将影响其对锰的耐受性。

最新统计表明,全世界的雌雄异株植物大约有15 600种,隶属于约175科987属(Renner, 2014),其中有许多物种是重要的造林和生态防护树种。前人的研究已发现,环境胁迫条件下雌雄异株植物表现出明显的性别差异。干旱胁迫下黄柳(*Salix gordejvii*)雌株的抗氧化能力较强,受到的氧化损伤和膜质过氧化水平较低(马少薇等, 2019)。Jiang等(2013)研究发现在锌(Zn)胁迫下滇杨(*Populus yunnanensis*)雄株比雌株具有更有效的自我保护机制。也有研究显示重金属胁迫下雌株相比雄株具有更强的耐受性和富集能力,如白玉草(*Silene latifolia*)雌株组织中累积了更多的铜,雌株对镉的耐受性也较高(Vilas et al., 2016)。沙棘(*Hippophae rhamnoides*)是胡颓子科沙棘属落叶性灌木,具有耐旱、抗逆能力强、适应性广、抗风沙和水土保持能力强等特点(裴斌等,2013)。研究显示在NaCl胁迫下沙棘幼苗的生物量以及单株总叶面积显著下降(秦景等,2009),但未有研究其雌雄植株

响应的性别差异。高丽等(2010)研究发现干旱胁迫下中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*)雌株叶片的游离脯氨酸和可溶性糖含量上升幅度大于雄株,对于干旱胁迫的适应性和生理调节能力更强。Li 等(2004)研究发现 50%田间持水量时雌雄沙棘的植株株高、干物质积累量和根冠比等生长特征表现出了明显的性别差异。近年来,虽然有少量研究探讨了雌雄沙棘对环境适应的性别差异,但未有涉及性别竞争效应。在重金属胁迫下,雌雄性别交互模式是否影响沙棘对重金属胁迫的生理响应特征尚未有报道。因此,本研究以沙棘为试验材料开展盆栽试验,分析锰胁迫和性别竞争交互处理下沙棘雌雄植株叶片的生理特征变化,拟探讨以下问题:(1)锰胁迫和性别竞争交互处理是否影响了雌雄沙棘光合和抗氧化能力;(2)锰胁迫和性别交互处理下,雌雄沙棘是否表现出渗透调节能力差异;(3)哪种性别组合模式的雌株或雄株表现出对锰胁迫更好的生理响应特征和耐受能力。研究结果将为矿区重金属污染土壤修复中沙棘的应用提供科学依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试验设置

试验材料为沙棘雌雄幼苗。试验地点位于绵阳市太乙仙山植物园(104°50′13.423″E、31°27′37.951″N)内的实验基地,年均温 16.4 °C,年均降水量约 969.6 mm。挑选高度、生长形态较一致的雌雄沙棘幼苗种植于盆口直径 27 cm、盆底直径 19 cm、盆高 23 cm 的塑料花盆中,每盆栽种 2 株,其中每盆土壤平均重 7.5 kg,含水量约 11%,干重约 6.675 kg。

采用三因素(性别、竞争、锰胁迫)完全随机设计,设置雌雌(FF)、雄雄(MM)、雌雄(FM)3 种不同性别竞争组合,设置施锰与对照 2 种处理,锰胁迫浓度参照了锰矿开采区污染土壤的污染值,设定为 4 000 mg·kg⁻¹,以不施锰处理为对照。每个处理设置 10 个重复。自 2021 年 4 月开始每天向锰处理组施加 100 mL 浓度为 486 mmol·L⁻¹的四水合氯化锰溶液,共施加 10 次,使土壤最终锰浓度为 4 000 mg·kg⁻¹。重金属胁迫处理 2 个月后,收获雌雄沙棘叶片用于生理参数测定。

1.2 测定方法

2021 年 6 月底,每个处理随机选取 3 株幼苗,

采集每株植物上的叶片测定其生理指标和锰含量。叶绿素 a(chlorophyll a, Chla)、叶绿素 b(chlorophyll b, Chlb)含量测定参照《植物生理学实验指导》的丙酮提取法(高俊凤,2006);参照《植物生理学模块实验指导》(李玲,2009),游离脯氨酸(free proline, Pro)采用磺基水杨酸法,SOD 采用氮蓝四唑法,POD 采用愈创木酚法,丙二醛(malondialdehyde, MDA)采用硫代巴比妥酸法,可溶性糖(soluble sugar, SS)含量采用蒽酮法;采用 Folin-酚比色法测定植物总酚含量(total phenols, TP)(颜小捷等,2013);采用比色法测定甜菜碱(glycine betaine, GB)含量(周芹等,2008;郭培国等,2011);沙棘叶片经消煮后提取过滤后的消煮液采用火焰原子吸收分光光度计测定叶片锰(Mn)含量。

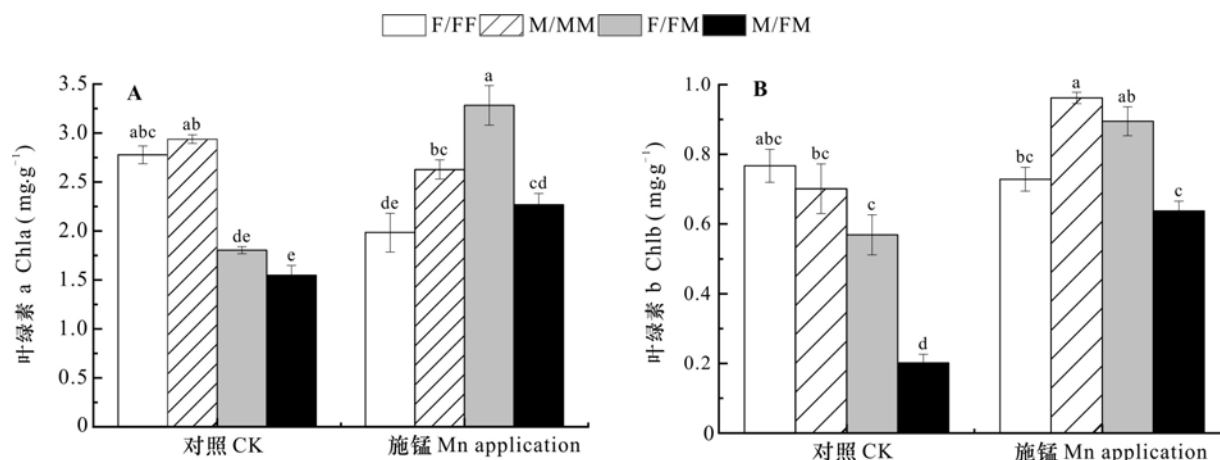
1.3 数据处理与分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,不同处理间的差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),不同处理间差异显著性采用多重比较检验(Tukey's test)。性别、竞争、施锰处理及其交互效应采用多因素方差分析,检验自变量中受单个因素影响的主效应以及自变量各个因素交叉组合下的交互效应。采用主成分分析方法判定主要的生理响应参数,分析雌雄叶片的 9 个生理响应特征参数中主成分的特征值、贡献率和累计贡献率。采用 Origin 2021 软件绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 锰胁迫和性别竞争交互处理下雌雄沙棘叶片叶绿素含量变化

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素,能反映植物光合作用的强弱。由图 1 可知,对照处理时性别内竞争雌雄沙棘的 Chla 和 Chlb 含量总体高于性别间竞争。与对照相比,施锰处理后性别间竞争显著提高了雌雄叶片的 Chla 和 Chlb 含量($P<0.05$)。性别间竞争处理的雌株(F/FM)叶片的 Chla 和 Chlb 含量显著高于雄株(M/FM),但与对照相比,雄株(M/FM)的 Chlb 增加更多,这说明雄株对锰处理具有更明显的响应特征。施锰处理显著降低了性别内竞争中的雌株(F/FF)的 Chla 含量,施锰处理时性别内竞争处理的雄株(M/MM)叶片的 Chla 和 Chlb 含量显著高于雌株(F/FF)($P<0.05$),这说明性别内竞争下雄株比雌株拥有更好的光合能力。



不同的小写字母表示各处理之间差异显著(采用 Tukey's test, $P < 0.05$)。F/FF 表示性别内组合下的雌株; M/MM 表示性别内组合下的雄株; F/FM 性别间组合内的雌株; M/FM 性别间组合下的雄株。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (By Tukey's test, $P < 0.05$). F/FF indicates female plants under intra-sex combinations; M/MM indicates male plants under intra-sex combinations; F/FM indicates female plants in inter-sex combinations; M/FM indicates male plants in inter-sex combination. The same below.

图 1 锰胁迫和性别竞争交互处理对雌雄沙棘叶片叶绿素 a(A)和叶绿素 b(B)含量的影响

Fig. 1 Effects of Mn stress on chl a(A) and chl b(B) contents of sea buckthorn leaves under different sexual competition interaction patterns

2.2 锰胁迫和性别竞争交互下雌雄沙棘叶片抗氧化酶活性和 MDA 含量变化

植物受重金属胁迫时会产生大量的活性氧自由基,损伤主要的生物大分子及引起膜脂过氧化。植物中的多种抗氧化防卫系统包括 SOD、POD 等抗氧化酶能清除自由基,保护细胞免受氧化胁迫的危害(曾小颺等,2019)。由图 2 可知,在锰胁迫下沙棘叶片 SOD、POD 含量总体低于对照组。对照处理时性别内和性别间竞争的雌雄叶片 SOD、POD 含量差异均不显著,施锰处理时性别间竞争的雄株(M/FM)叶片的 SOD 含量显著高于雌株(F/FM) ($P < 0.05$),POD 含量无显著差异。与对照相比,施锰处理显著抑制了雌株(F/FF 和 F/FM)叶片的 SOD 含量,增加了性别间竞争组合的差异。与对照相比,施锰处理显著抑制了 F/FF 和 M/FM 的 POD 值。

丙二醛(MDA)是细胞膜脂过氧化反应的产物,作为植物受胁迫生理响应的指标,其含量的变化可反映逆境条件下膜系统受损程度(文珂等,2018;张宝成等,2021)。由图 2 可知,施锰组的叶片 MDA 含量总体上高于对照组。与对照相比,施锰处理显著增加了性别间竞争组合的差异,雌株(F/FM)MDA 含量显著高于雄株(M/FM) ($P < 0.001$),而 M/MM 和 M/FM 的 MDA 含量与对照相

比差异不显著,这说明雄株表现出更好的细胞膜稳定性和抗膜脂过氧化能力。

2.3 锰胁迫和性别竞争交互下沙棘叶片可溶性糖和脯氨酸含量变化

可溶性糖(SS)是植物生长发育的主要营养成分,也是植物体内的重要信号分子,能够参与植物在逆境胁迫下的信号转导和渗透调节;游离脯氨酸(Pro)也在植物渗透调节中发挥着重要的作用(张虎等,2015)。由图 3 可知,对照处理下所有的竞争组合中,性别内竞争模式下雌株(F/FF)SS 含量最高($P < 0.05$),而施锰处理后显著降低了雌株(F/FF)SS 含量,使各竞争组合中雌雄叶片无明显差异。对照处理下,性别间竞争中的雄株(M/FM)的 Pro 含量显著高于雌株。施锰处理后 M/FM 叶片 Pro 含量总体高于对照处理显著上升,在所有竞争组合中, M/FM 的叶片 Pro 积累量最高,为 $1\,914.75\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。施锰处理增加了性别内竞争的雌雄(F/FF 和 M/MM)叶片 Pro 含量的差异,表现为 M/MM 显著高于 F/FF。总体上看,对照下性别内竞争组合中和锰处理下的性别内和性别间竞争组合中的雄株叶片 Pro 含量均显著高于雌株 ($P < 0.001$),这说明沙棘雄株表现出比雌株更好的渗透调节能力。

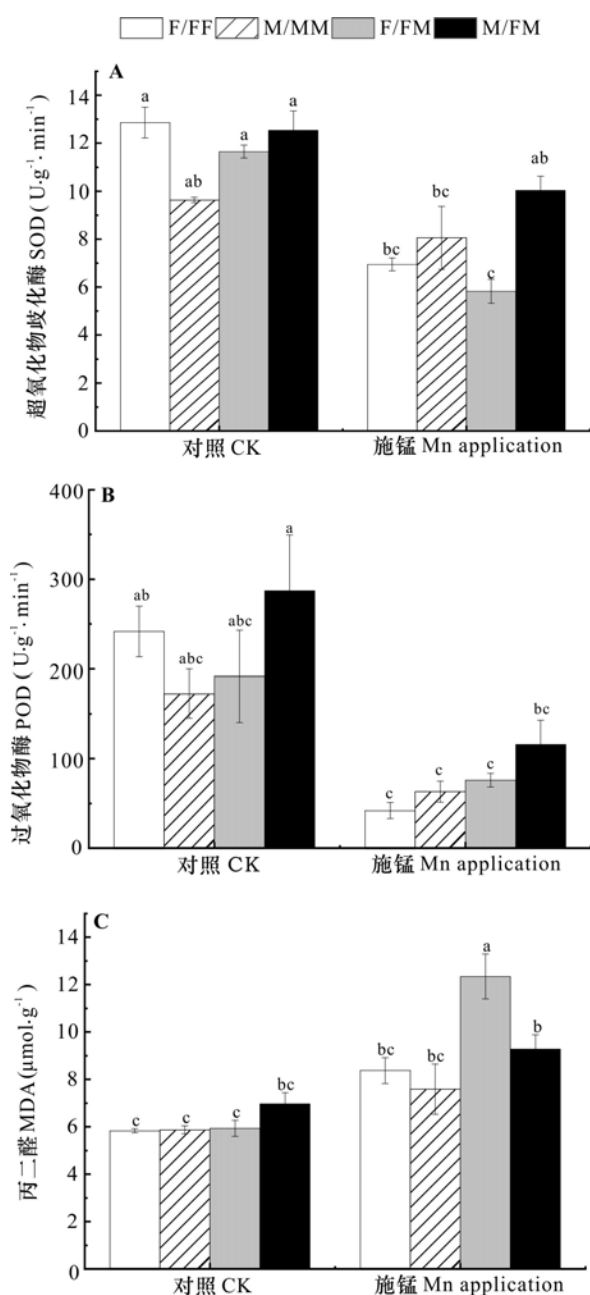


图2 锰胁迫和性别竞争交互处理对雌雄沙棘叶片SOD(A)、POD活性(B)和MDA含量(C)的影响
Fig. 2 Effects of Mn stress on SOD (A), POD (B) activities and MDA contents (C) of sea buckthorn leaves under different sexual competition interaction patterns

2.4 锰胁迫和性别竞争交互下雌雄沙棘叶片总酚和甜菜碱含量变化

植物酚类具有抗氧化的作用,能以单电子转移的方式清除或减少活性氧自由基(文珂等, 2018;朱珍珍等, 2019)。甜菜碱(GB)是高等植物重要的渗透调节物质,能够提高细胞的渗透调节

能力,降低因渗透失水造成对细胞膜、酶及蛋白质结构与功能的伤害。由图4可知,对照处理时总酚(TP)含量的取值范围在47.52~73.15 mg·g⁻¹之间,施锰处理时取值在54.17~83.70 mg·g⁻¹之间,其中性别内竞争模式下的雌株(F/FF)TP含量显著高于性别间竞争模式下的雄株(M/FM)。但锰处理下各竞争组合的雌雄叶片TP含量较对照组无显著变化($P>0.05$)。对照处理下性别间竞争模式中雌株(F/FM)GB含量显著高于雄株(M/FM)和性别内竞争中的雌株(F/FF) ($P<0.001$),施锰处理显著降低了性别间竞争中雌株(F/FM)和性别内竞争中雄株(M/MM)的叶片TP含量,但施锰处理下性别内和性别间竞争模式的叶片GB含量均无显著差异($P>0.05$),这说明锰处理降低了各竞争组合中雌雄叶片GB含量的性别差异。

2.5 锰胁迫和性别竞争交互下雌雄沙棘叶片锰含量变化

由图5可知,与对照处理相比,施锰显著增加了所有竞争组合中雌雄沙棘叶片的锰含量($P<0.001$)。对照处理时两种混栽模式的叶片锰含量无明显差异,施锰处理后性别内和性别间栽种模式中的雌株叶片锰含量均高于雄株,但未达到显著水平。

2.6 交互效应和主成分分析

主体间效应检验如表1所示,性别和竞争的交互处理显著影响了Chla、Chlb、SOD、MDA、Pro和GB,性别和重金属胁迫交互显著影响了Chlb、SOD、MDA、SS和Pro,竞争与重金属交互显著影响了Chla、Chlb、MDA、SS和Pro,而性别、竞争和重金属胁迫的交互显著影响了Chla、Pro和GB。

由表2和图6可知,三个主成分共同解释了73.507%的信息。主成分PC1解释了37.678%,主要受SOD、POD、Chlb、MDA的影响,PC1与Chlb、MDA均为正相关,与SOD、POD为负相关,其中SOD与PC1相关性最高,相关系数达-0.887。PC2解释了21.228%,PC3解释了14.600%,均主要受SS、Pro的影响。说明SOD、POD、MDA、Chlb、SS、Pro含量可作为性别竞争交互处理下沙棘雌雄叶片受重金属胁迫的主要指示指标。

3 讨论

3.1 锰胁迫和性别竞争交互对雌雄沙棘叶片光合色素和抗氧化酶活性的影响

研究显示在植物受到胁迫时,叶绿素会呈现

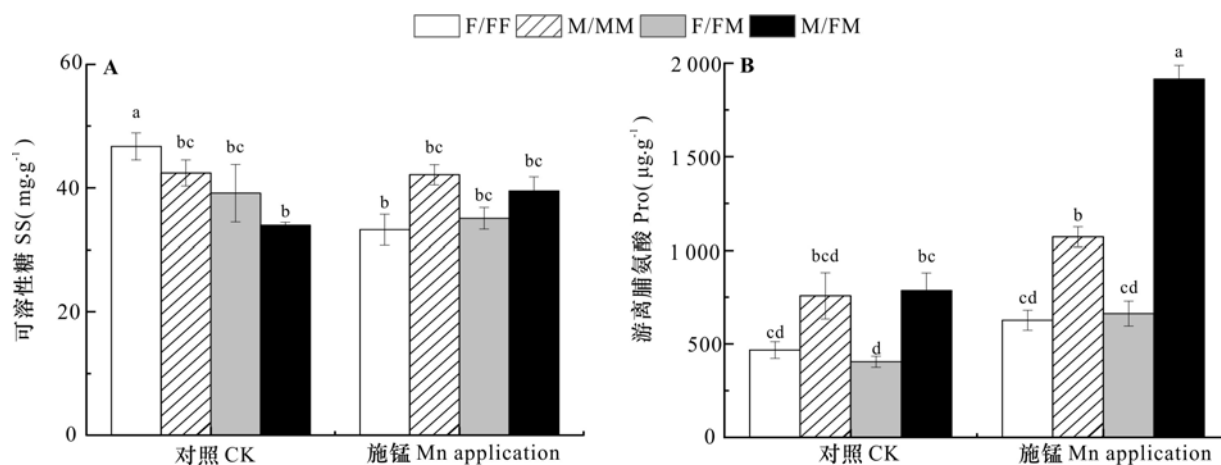


图 3 锰胁迫和性别竞争交互处理对雌雄沙棘叶片可溶性糖(A)和游离脯氨酸(B)含量的影响

Fig. 3 Effects of Mn stress on SS (A) and Pro (B) contents of sea buckthorn leaves under different sexual competition interaction patterns

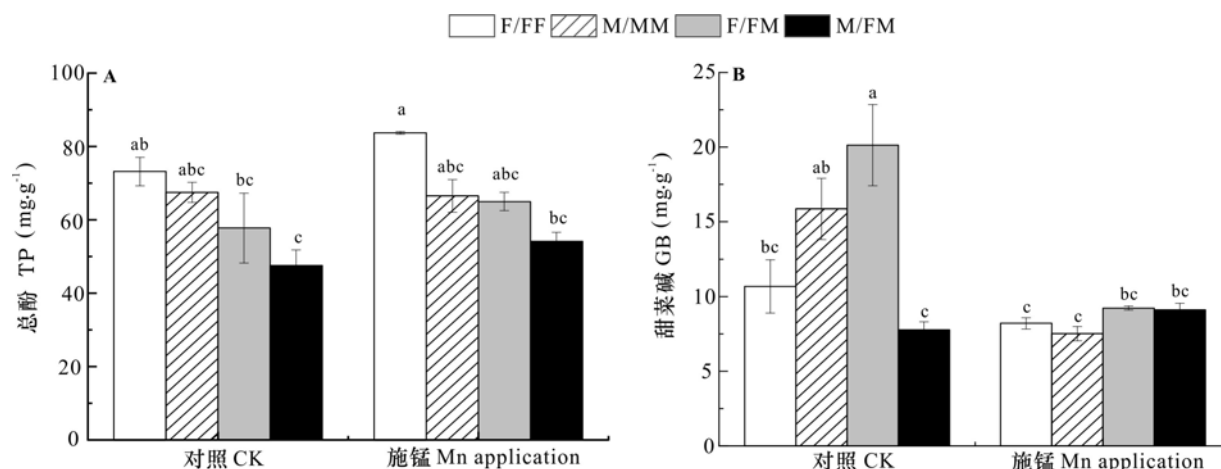


图 4 锰胁迫和性别竞争交互处理对雌雄沙棘叶片总酚(A)和甜菜碱(B)含量的影响

Fig. 4 Effects of Mn stress on TP (A) and GB (B) contents of sea buckthorn leaves under different sexual competition interaction patterns

上升的趋势,当胁迫达到一定程度之后叶绿素含量开始下降。如低铁、锰胁迫下人参叶片的 Chla 和 Chlb 含量表现出上升的趋势(高明等,2012);铅处理会显著增加桑树雌雄幼苗叶片 Chla 和 Chlb 的含量,且雄株的叶绿素增加幅度高于雌株(秦芳等,2014)。本研究显示在高浓度锰的胁迫下,沙棘叶片的 Chla 和 Chlb 含量较对照处理高。其原因可能是沙棘受到高浓度锰的胁迫时,生长受到强烈抑制,生物量降低,相比对照处理产生了“浓缩效应”导致叶绿素含量的相对增长(高明等,2012)。

研究显示,锰胁迫在一定程度上会改变植物

的抗氧化酶活性。高浓度的锰离子抑制紫花苜蓿的抗氧化酶活性,叶片 MDA 含量呈现上升趋势(曹婧等,2019)。野大豆幼苗在锰浓度增加到一定程度时 POD 含量开始降低且比对照组减少 80.30%(文珂等,2018)。这与本研究结果一致,抗氧化酶可以清除植物受胁迫时产生的大量膜脂过氧化产物,但当毒害物质含量超过植物自身清除能力时,高浓度的锰离子抑制抗氧化酶的活性,损害细胞的正常代谢,植物的抗氧化能力和应激反应能力降低。研究显示,雌雄异株植物对环境胁迫表现出性别响应差异。有研究发现铅胁迫对雌株美洲黑杨负面影响更大(朱珍珍等,2019)。

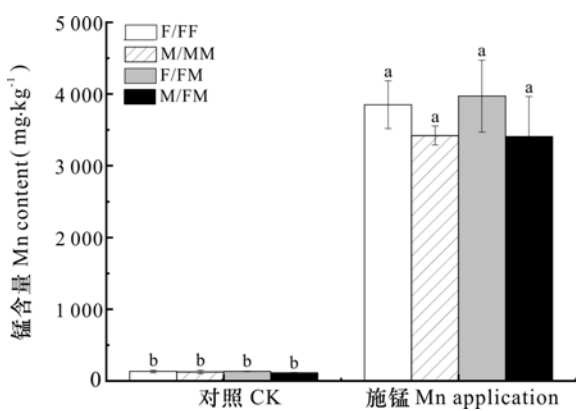


图 5 锰胁迫和性别竞争交互处理下雌雄沙棘叶片锰含量变化

Fig. 5 Effects of Mn stress on Mn contents of sea buckthorn leaves under different sexual competition interaction patterns

淹水胁迫下青杨雄株表现出比雌株更强的抗逆性(杨鹏和胥晓,2012)。本研究结果显示,不同性别组合的雌雄沙棘叶片 SOD、POD 活性和 MDA 含量在锰胁迫下表现出显著差异,这表明性别竞争调节了雌雄植株对锰胁迫的抗氧化酶响应特征。施锰后 M/FM 的 SOD 活性较雌株更高,MDA 含量较雌株低,且 MDA 含量与对照相比无显著差异,这说明性别间竞争中的雄株表现出更好的抗氧化酶活性和膜稳定性。

3.2 锰胁迫和性别竞争交互对雌雄沙棘叶片代谢物质和锰积累的影响

研究显示,沙棘体内渗透调节物质对锰胁迫的响应存在性别差异。施锰处理后沙棘叶片中的可溶性糖并无显著提高,但游离脯氨酸含量较对照升高。锰胁迫下性别内和性别间竞争下的雄株

表 1 性别、竞争、施锰处理及其交互作用对雌雄沙棘叶片生理指标的影响
Table 1 Effects of sex, competition and Mn application and their interaction on physiological indexes of sea buckthorn leaves

生理指标 Physiological index	性别 Sex	竞争 Competition	施锰 Mn application	性别 × 竞争 Sex × Competition	性别 × 施锰 Sex × Mn application	竞争 × 施锰 Competition × Mn application	性别 × 竞争 × 施锰 Sex × Competition × Mn application
叶绿素 a (Chla)	0.202ns	0.001**	0.007*	0.000**	0.442ns	0.000**	0.003*
叶绿素 b (Chlb)	0.002*	0.000**	0.000**	0.000**	0.004*	0.000**	0.144ns
超氧化物歧化酶(SOD)	0.135ns	0.196ns	0.000**	0.002*	0.001**	0.657ns	0.595ns
过氧化物酶(POD)	0.373ns	0.131ns	0.000**	0.073ns	0.719ns	0.824ns	0.146ns
丙二醛(MDA)	0.131ns	0.001**	0.000**	0.476ns	0.012*	0.021*	0.079ns
游离脯氨酸(Pro)	0.000**	0.001**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.003*
可溶性糖(SS)	0.587ns	0.028*	0.097ns	0.451ns	0.005*	0.043*	0.614ns
甜菜碱(GB)	0.060ns	0.327ns	0.000**	0.001**	0.126ns	0.753ns	0.000**
总酚(TP)	0.003*	0.000**	0.085ns	0.888ns	0.357ns	0.741ns	0.405ns
锰(Mn)	0.239ns	0.911ns	0.000**	0.865ns	0.262ns	0.890ns	0.885ns

注：*表示显著(0.001<P<0.05)；**表示极显著(P≤0.001)；ns表示不显著(P>0.05)。

Note: * indicates significant differences (0.001<P<0.05); ** indicates extremely significant differences (P≤0.001); ns indicates no significant differences (P>0.05).

游离脯氨酸值均大于雌株,表现出显著的性别响应差异。有研究表明盐分、干旱胁迫以及两者的交互胁迫下,滇杨雌雄植株中积蓄大量的脯氨酸,渗透调节能力表现为雄株高于雌株(Chen et al., 2010)。这与本研究结果一致,说明沙棘雄株在锰胁迫下表现出更好的渗透调节能力。有研究表明甜瓜的西州密 17 号和黄皮 9818 在不断加重的盐胁迫下甜菜碱含量表现出先升高后降低的趋势,且下降趋势明显(熊韬等,2021)。我们的试验结

果显示,施锰处理后显著降低了 M/MM 和 F/FM 的甜菜碱含量。对照处理下性别间竞争模式中雌雄株差异显著(P<0.001),而施锰处理下性别内和性别间竞争模式的叶片甜菜碱含量均无显著差异(P>0.05),说明锰胁迫改变了雌雄植株体内的甜菜碱含量水平,降低了其性别差异。总体上,在观测的 3 种渗透调节物质中,游离脯氨酸表现出更显著的渗透调节响应特性和性别差异。另外,本研究表明,与对照相比,施锰对雌雄沙棘植株叶片

表 2 主成分特征值及累计贡献率
Table 2 Principal component eigenvalue and accumulative contribution rate

成分 Component	初始特征值 Initialeigen value	贡献率 Contribution rate (%)	累计贡献率 Accumulative contribution rate (%)
1	3.391	37.678	37.678
2	1.911	21.228	58.907
3	1.314	14.600	73.507

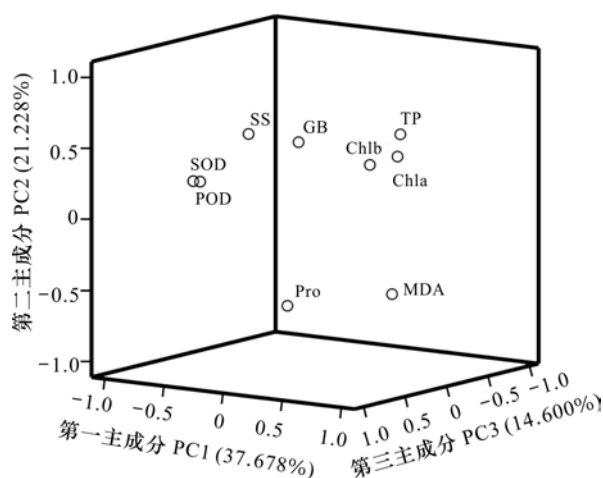


图 6 锰胁迫和性别竞争交互处理下雌雄沙棘生理响应参数的主成分分析

Fig. 6 Principal component analysis of physiological response parameters of sea buckthorn under Mn stress and sexual competition interaction patterns

总酚含量无显著影响,这说明沙棘叶片代谢物质对锰胁迫的响应敏感性存在差异。

在重金属积累方面,有研究显示,铅、镉胁迫下美洲黑杨雌株叶片重金属的含量显著大于雄株(陈良华等,2017),表现出性别响应差异。本研究中锰胁迫显著增加了雌雄沙棘叶片锰含量,但两者并未表现出显著的性别差异,其他器官锰积累上的性别差异仍值得进一步研究。

4 结论

(1)雌雄互作和锰胁迫交互影响了沙棘雌雄叶片的 Chla 和 Chlb 含量、SOD、POD、MDA 以及 Pro、SS 和 GB 等生理响应特征,且雌雄植株间表现出显著的性别差异。

(2)锰胁迫显著抑制了性别内处理时雌株(F/FF)的 Chla、SOD、POD 和 SS 含量,且显著增加了 MDA 含量,表明其受到更大的锰毒害,抗逆性和耐受性更低;性别间处理时雄株(M/FM)比雌株积累更多的渗透调节物质,更低的 MDA 含量,表明其抗氧化能力较强,对锰的耐受能力更强。

参考文献:

- BAI YX, ZHOU YC, GONG JF, 2021. Physiological mechanisms of the tolerance response to Mn stress exhibited by *Pinus massoniana*, a candidate plant for the phytoremediation of Mn-contaminated soil [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 28(16): 45422–45433.
- CAO J, LI XL, WAN LQ, 2019. Effects of Mn stress on physiological and growth characteristics of *Medicago sativa* L. [J]. *Chin J Grassl*, 41(6): 15–22. [曹婧, 李向林, 万里强, 2019. 锰胁迫对紫花苜蓿生理和生长特性的影响 [J]. *中国草地学报*, 41(6): 15–22.]
- CHEN LH, HU XW, YANG WQ, et al., 2017. Effects of arbuscular mycorrhizae fungi inoculation on absorption of Pb and Cd in females and males of *Populus deltoides* when exposed to Pb and Cd pollution [J]. *Acta Sci Circum*, 37(1): 308–317. [陈良华, 胡相伟, 杨万勤, 等, 2017. 接种丛枝菌根真菌对雌雄美洲黑杨吸收铅镉的影响 [J]. *环境科学学报*, 37(1): 308–317.]
- CHEN LH, ZHANG S, ZHAO HX, et al., 2010. Sex-related adaptive responses to interaction of drought and salinity in *Populus yunnanensis* [J]. *Plant Cell Environ*, 33(10): 1767–1778.
- GAO JF, 2006. Experimental guidance on plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press: 74. [高俊凤, 2006. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社: 74.]
- GAO L, YANG J, LIU RX, 2010. Leaf morphological structure and physiological and biochemical characteristics of female and male *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* under different soil moisture condition [J]. *Chin J Appl Ecol*, 21(9): 2201–2208. [高丽, 杨劼, 刘瑞香, 2010. 不同土壤水分条件下中国沙棘雌雄株叶片形态结构及生理生化特征 [J]. *应用生态学报*, 21(9): 2201–2208.]
- GAO M, SUN H, ZHANG LN, et al., 2012. Effects of iron and Mn stress on some physiological characters of *Panax ginseng* leaves [J]. *J Jilin Agric Univ*, 34(2): 130–137. [高明, 孙海, 张丽娜, 等, 2012. 铁、锰胁迫对人参叶片某些生理特征的影响 [J]. *吉林农业大学学报*, 34(2): 130–137.]
- GUO PG, SONG BL, XU LG, et al., 2011. Improvement of spectral method for determination of betaine content in plant tissues [J]. *J Guangzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 10(3): 32–36. [郭培国, 宋波龙, 许兰桂, 等, 2011. 光谱法测定植物组织中甜菜碱含量方法的改良 [J]. *广州大学学报(自然科学版)*, 10(3): 32–36.]
- JIANG H, KORPELAINEN H, LI CY, 2013. *Populus yunnanensis* males adopt more efficient protective strategies than females to cope with excess zinc and acid rain [J]. *Chemosphere*, 91(8): 1213–1220.
- LI CY, REN J, LUO JX, et al., 2004. Sex-specific

- physiological and growth responses to water stress in *Hippophae rhamnoides* populations [J]. *Acta Physiol Plant*, 26(2): 123–129.
- LI L, 2009. Experimental guidance of plant physiology module [M]. Beijing: Science Press: 48–98. [李玲, 2009. 植物生理学模块实验指导 [M]. 北京: 科学出版社: 48–98.]
- LI XH, XIAO ZH, LIU WS, 2020. Physiological and biochemical responses of *C. chinensis* seedlings in heavy metal polluted and non-polluted areas to Mn stress [J]. *N Hort*, 14: 118–128. [李欣航, 肖泽华, 刘文胜, 2020. 重金属污染区与非污染区鸡眼草幼苗对锰胁迫的生理生化响应 [J]. *北方园艺*, 14: 118–128.]
- LIAO Y, YAN RL, CHENG J, et al., 2015. Early physiological response and manganese tolerance of *Camellia oleifera* seedlings to different concentrations of manganese ions [J]. *Guihaia*, 35(6): 922–929. [廖阳, 闫荣玲, 程俊, 等, 2015. 油茶幼苗对不同浓度锰离子的早期生理响应及其耐锰能力初探 [J]. *广西植物*, 35(6): 922–929.]
- LUO YH, 2019. Research progress of heavy metal contaminated soil remediation [J]. *S Chin Agric*, 13(22): 73–76. [罗玉虎, 2019. 重金属污染土壤修复研究进展 [J]. *南方农业*, 13(22): 73–76.]
- MA SW, LIU GH, WANG L, et al., 2019. Effects of drought stress on growth and physiological characteristics of male and female cutting seedlings of *Salix babylonica* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 39(7): 1250–1258. [马少薇, 刘果厚, 王蕾, 等, 2019. 干旱胁迫对黄柳雌雄扦插苗生长和生理特性的影响 [J]. *西北植物学报*, 39(7): 1250–1258.]
- PEI B, ZHANG GC, ZHANG SY, et al., 2013. Effects of soil drought stress on photosynthetic and antioxidant enzyme activities in *Hippophae rhamnoides* Linn. seedlings [J]. *Acta Ecol Sin*, 33(5): 1386–1396. [裴斌, 张光灿, 张淑勇, 等, 2013. 土壤干旱胁迫对沙棘叶片光合作用和抗氧化酶活性的影响 [J]. *生态学报*, 33(5): 1386–1396.]
- QIN F, XU X, LIU G, et al., 2014. Gender differences in physiological tolerance and accumulation ability of *Morus alba* seedlings to lead pollution [J]. *Acta Sci Circumst*, 34(10): 2615–2623. [秦芳, 胥晓, 刘刚, 等, 2014. 桑树 (*Morus alba*) 幼苗对铅污染的生理耐性和积累能力的性别差异 [J]. *环境科学学报*, 34(10): 2615–2623.]
- QIN J, HE KN, TAN GD, et al., 2009. Effects of NaCl stress on growth and photosynthetic characteristics of *Hippophae rhamnoides* and *Shepherdia argentea* seedlings [J]. *Chin J Appl Ecol*, 20(4): 791–797. [秦景, 贺康宁, 谭国栋, 等, 2009. NaCl 胁迫对沙棘和银水牛果幼苗生长及光合特性的影响 [J]. *应用生态学报*, 20(4): 791–797.]
- RENNER SS, 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database [J]. *Amer J Bot*, 101(10): 1588–1596.
- VILAS JS, CAMPOY JG, RETUERTO R, 2016. Sex and heavy metals: Study of sexual dimorphism in response to soil pollution [J]. *Environ Exp Bot*, 126: 68–75.
- WEN K, GUO XY, TAN NN, et al., 2018. Effects of Mn stress on seed germination and physiological and biochemical characteristics of *Glycine soja* seedlings [J]. *Seed*, 37(3): 40–45. [文珂, 郭晓玉, 谭娜娜, 等, 2018. 锰胁迫对野大豆种子萌发及幼苗生理生化特征的影响 [J]. *种子*, 37(3): 40–45.]
- XIAO ZH, LI XH, PAN G, et al., 2019. Effects of Mn stress on seed germination, and seedling physiological and biochemical characteristics of *Cleome viscosa* [J]. *Acta Pratac Sin*, 28(12): 75–84. [肖泽华, 李欣航, 潘高, 等, 2019. 锰胁迫对黄花草种子萌发及幼苗生理生化特征的影响 [J]. *草业学报*, 28(12): 75–84.]
- XIONG T, YAN M, WANG JT, et al., 2021. Effects of saline-alkali stress on osmotic adjustment substances of *Cucumis melo* L. seedlings [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 62(12): 2430–2434. [熊韬, 闫森, 王江涛, 等, 2021. 盐碱胁迫对甜瓜幼苗渗透调节物质的影响 [J]. *浙江农业科学*, 62(12): 2430–2434.]
- YAN XJ, GU ZX, LU FL, et al., 2013. Determination of total phenol in *Callicarpa nudiflora* by FOLIN-phenol colorimetric method [J]. *Chin J Exp Trad Med Formul*, 19(18): 74–78. [颜小捷, 谷陟欣, 卢凤来, 等, 2013. FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 19(18): 74–78.]
- YANG P, XU X, 2012. Effects of waterlogging stress on physiological characteristics and growth of male and female *Poplar cathayana* seedlings [J]. *Chin J Plant Ecol*, 36(1): 81–87. [杨鹏, 胥晓, 2012. 淹水胁迫对青杨雌雄幼苗生理特性和生长的影响 [J]. *植物生态学报*, 36(1): 81–87.]
- ZENG XB, TANG JM, ZHU CH, et al., 2019. Effects of nickel stress on physiological and biochemical characteristics of *Helianthus annuus* seedlings [J]. *Guihaia*, 39(12): 1702–1709. [曾小彪, 唐健民, 朱成豪, 等, 2019. 重金属镍胁迫对向日葵幼苗生理生化特性的影响 [J]. *广西植物*, 39(12): 1702–1709.]
- ZHANG BC, LIU YF, LI YL, et al., 2021. Effects of Mn stress on growth, physiological and biochemical characteristics of *Conyza canadensis* [J]. *J NE Agric Sci*, 46(4): 110–112. [张宝成, 刘云芳, 李应禄, 等, 2021. 锰胁迫对小飞蓬生长与生理生化特征影响初探 [J]. *东北农业科学*, 46(4): 110–112.]
- ZHANG H, KOU JT, SHI SL, 2015. Physiological and biochemical responses of *Medicago sativa* seed germination to cobalt stress [J]. *Acta Pratacul Sin*, 24(9): 146–153. [张虎, 寇江涛, 师尚礼, 2015. 紫花苜蓿种子萌发对钴胁迫的生理生化响应 [J]. *草业学报*, 24(9): 146–153.]
- ZHANG YX, CHAI TY, GERARDBURKARD, 1999. Research progress on mechanism of heavy metal tolerance in plants [J]. *Acta Bot Sin*, 41(5): 453–457. [张玉秀, 柴团耀, Gerardburkard, 1999. 植物耐重金属机理研究进展 [J]. *植物学报*, 41(5): 453–457.]
- ZHOU Q, WU YM, HU XH, et al., 2008. Determination of betaine content in sugar beet root by colorimetric method [J]. *Sugar Crop Chin*, 4: 27–28. [周芹, 吴玉梅, 胡晓航, 等, 2008. 比色法测定甜菜块根中甜菜碱含量 [J]. *中国糖料*, 4: 27–28.]
- ZHU ZZ, ZHANG MJ, ZHANG J, et al., 2019. Effects of exogenous NO on physiological characteristics of poplar under lead stress [J]. *J Yunnan Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 34(3): 494–502. [朱珍珍, 张明锦, 张健, 等, 2019. 外源 NO 对铅胁迫下雌雄美洲黑杨生理特征的影响 [J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 34(3): 494–502.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202204085



李丽, 雷艳, 汪洋, 等, 2023. 杏叶防风的化学成分及抗炎活性研究 [J]. 广西植物, 43(6): 1114–1123.

LI L, LEI Y, WANG Y, et al., 2023. Chemical constituents of *Pimpinella candolleana* and their anti-inflammatory activities [J].

Guihaia, 43(6): 1114–1123.

杏叶防风的化学成分及抗炎活性研究

李 丽^{1,3}, 雷 艳^{1,3}, 汪 洋¹, 马 雪¹, 陆 苑², 刘春花², 王永林^{1,2*}

(1. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550004)

摘 要: 杏叶防风(*Pimpinella candolleana*)为贵州苗族习用草药,用于黄疸型肝炎、急性胆囊炎等病症的治疗。为探究杏叶防风的化学成分及其抗炎活性,该研究采用硅胶、凝胶、ODS 等色谱技术对杏叶防风全草 70%乙醇提取物进行分离纯化,通过 NMR、MS 等波谱数据鉴定化合物结构,采用脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞作为炎症模型,评价单体化合物的抗炎活性。结果表明:(1)从杏叶防风中分离并鉴定了 20 个化合物,分别为香草醛(1)、芝麻素(2)、2-甲基-2-羟基-5-甲氧基苯并[d] 氢化呋喃-3-酮(3)、原儿茶醛(4)、1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone(5)、异鼠李素(6)、山奈酚(7)、8-羟基-2-甲基色原酮(8)、木犀草素(9)、槲皮素(10)、1-*O*- β -D-葡萄糖-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-羟基棕榈酰胺]-8-十八烯-1,3,4-三醇(11)、异鼠李素-3-*O*- β -D-半乳糖苷(12)、异槲皮苷(13)、去甲当药醇苷(14)、木犀草素-6-*C*- α -L-阿拉伯糖苷(15)、山奈酚-3-*O*- β -D-半乳糖苷(16)、山奈酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(17)、木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷(18)、异牡荆苷(19)、芦丁(20)。其中,化合物 1、3、4、6、7、10、13、16、18、20 均为首次从该植物中分离得到。(2)抗炎结果显示,化合物 2-10、12、18、19 均可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放量($P<0.05$, $P<0.01$),其中化合物 4、7、10、18 在浓度为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率分别为 57.37%、83.60%、68.16%、81.14%。该研究丰富了杏叶防风的化学成分,明确了黄酮类化合物是其发挥抗炎功效的活性成分,为杏叶防风的进一步研究与开发利用提供了一定的依据。

关键词: 杏叶防风,化学成分,分离鉴定,RAW264.7 细胞,抗炎活性**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1114-10

Chemical constituents of *Pimpinella candolleana* and their anti-inflammatory activities

LI Li^{1,3}, LEI Yan^{1,3}, WANG Yang¹, MA Xue¹, LU Yuan²,
LIU Chunhua², WANG Yonglin^{1,2*}

(1. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

收稿日期: 2022-08-26**基金项目:** 国家自然科学基金(U1812403);贵州省高层次创新型人才培养计划(20165677)。**第一作者:** 李丽(1998-),硕士研究生,主要从事药效物质基础与质量控制技术研究,(E-mail) 2695215038@qq.com。***通信作者:** 王永林,博士生导师,教授,主要从事中药新技术、新工艺研究与新药研究开发,(E-mail) gywyl@gmc.edu.cn。

Abstract: *Pimpinella candolleana* is known as Miao ethnic herbal medicine in Guizhou for the treatment of icteric hepatitis, acute cholecystitis and other diseases. To investigate the chemical constituents of *P. candolleana* and their anti-inflammatory activities, the chemical constituents from the 70% ethanol extract of *P. candolleana* were separated by silica gel, Sephadex LH-20, Toyopearl HW-40F, Toyopearl HW-40C, ODS and other column chromatography technologies, and their structures were elucidated by extensive spectroscopic analysis such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrum (MS). The inflammatory cell model, built by LPS-induced RAW264.7 macrophage cells, was used to evaluate the anti-inflammatory activity. The results were as follows: (1) Twenty compounds from *P. candolleana* were isolated and identified of including vanillin (1), sesamin (2), 2-methyl-2-hydroxy-5-methoxy benz (d) hydrofuran-3-one (3), procatechin (4), 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone (5), isorhamnetin (6), kaempferol (7), 8-hydroxy-2-methylchromone (8), luteolin (9), quercetin (10), 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2'-hydroxypalmitoylamino]-8-octadecene-1,3,4-triol (11), isorhamnetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside (12), isoquercitrin (13), norswertianolin (14), luteolin-6-C- α -L-arabinoside (15), kaempferol-3-*O*- β -D-galactopyranoside (16), kaempferol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (17), luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (18), isovitexin (19), rutin (20). Compounds 1, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 16, 18, and 20 were obtained from this plant for the first time. (2) The anti-inflammatory results showed that compounds 2-10, 12, 18 and 19 could significantly inhibit the LPS-induced NO content in RAW264.7 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the inhibition rates of compounds 4, 7, 10, and 18 at a concentration of $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were 57.37%, 83.60%, 68.16%, 81.14%, respectively. Overall, this study enriches the chemical constituents of *P. candolleana*, and clarifies that flavonoids are the active ingredients in the course of anti-inflammatory, which provides a theoretical reference for further research and exploitation of *P. candolleana*.

Key words: *Pimpinella candolleana*, chemical constituents, isolation and identification, RAW264.7 cells, anti-inflammatory activity

杏叶防风 (*Pimpinella candolleana*) 为伞形科 (Umbelliferae) 茴芹属 (*Pimpinella* L.) 多年生草本植物, 又名杏叶茴芹、山当归、骚羊古、蜘蛛香等, 为贵州民间常用草药之一, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 版) 中, 广泛分布在我国广西及西南一带。其味辛、微苦、性温, 归肝、肺、脾、胃经, 以全草入药用于治疗上腹部疼痛、消化不良、痢疾和蛇咬伤等 (危英等, 2005; 赵超等, 2007), 在许多地方药志中均有记载, 如《贵阳民间药草》述其“温中散寒止痛, 治中寒、发痧、胃痛、腹痛”, 《四川中药志》记载其“消食健脾, 截疟; 用于中寒腹痛、寒疝偏坠、风湿痹痛、脾虚食滞和疟疾; 近有用于治淋巴结核”。近年来该药已被研制用于治疗慢性乙型肝炎、脂肪乳致静脉炎等复方制剂 (曾德祥, 2007; 孙霞, 2016)。目前, 杏叶防风已分离鉴定的化学成分主要有黄酮类、甾醇类及挥发油类等 (梁光义等, 2003; 常星, 2011; 邢煜君等, 2011), 有关杏叶防风化学成分文献报道较少, 对其化学成分的活性研究更少, 除已报道的 α -葡萄糖苷酶抑制活性、抗氧化活性及抗菌活性外 (Chang & Kang, 2012), 未见该植物其他药理作用的有关报道, 其抗炎物质基础不明确。因此, 为深

入了解杏叶防风化学成分, 探究其抗炎活性物质, 本研究对杏叶防风全草 70% 乙醇提取物进行分离纯化, 分离并鉴定了 20 个化合物, 并对其中的 18 个化合物进行了抗炎活性测定, 以期对杏叶防风的深入研究和开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

药材: 杏叶防风药材采收于贵州花溪高坡, 经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为伞形科茴芹属植物杏叶防风 (*Pimpinella candolleana*) 的干燥全草。其凭证样品 (20190901) 保存于贵州省药物制剂重点实验室。

细胞株: 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自 ATCC 中心。

1.2 仪器

JEOL-ECS 400 MHz 核磁共振波谱仪 (日本电子株式会社); Bruker AV-600 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); ACQUITY-UPLC-TQD 超高液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 (美国 Waters 公司); CO₂ 细胞培养箱 (Thermo scientific 公司);

Varioskan LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 试剂

D-101 型大孔树脂(天津市海光化工有限公司);柱层析硅胶、薄层层析硅胶(青岛海洋化工有限公司);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(瑞士 Pharmacia Biotech 公司);Toyopearl HW-40C 凝胶、Toyopearl HW-40F 凝胶(日本东曹株式会社);ODS(日本 YMC 公司);试剂均为分析纯。

胎牛血清 FBS、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);脂多糖(LPS)、青链霉素混合液、二甲基亚砷、PBS 缓冲液(北京 Solarbio 科技有限公司);CCK-8 试剂盒(美国 Glpbio 公司);NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所);地塞米松(DEX,上海甄准生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 提取与分离

取干燥的杏叶防风全草(12 kg)切成粗段,用 70%乙醇加热回流提取 3 次,合并提取液,减压回收溶剂得浸膏(1.3 kg),过 D-101 大孔吸附树脂,用水(2 倍柱体积)、80%乙醇(5 倍柱体积)依次洗脱,得水段浸膏(972 g)、80%乙醇段浸膏(530 g)。80%乙醇段经正相硅胶柱层析,以二氯甲烷-甲醇(7:3→6:4)进行等度洗脱,回收溶剂,浓缩后得干浸膏 290 g,经正相硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯(10:0→0:10)、乙酸乙酯-甲醇(10:0→7:3)进行梯度洗脱,分段收集,各段进行 TLC 检测合并后浓缩,得到 10 个组分(Fr.1-10)。

Fr.4 过正相硅胶柱,以石油醚-二氯甲烷(3:1→0:1)、二氯甲烷-甲醇(70:1→20:1)梯度洗脱,TLC 检测合并后浓缩,得到 7 个组分(Fr.4.1-4.7)。其中,Fr.4.3 反复过 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇 1:1)、Toyopearl HW-40F(甲醇),得化合物 **1**(10.5 mg)、化合物 **2**(7.0 mg)。Fr.4.5 反复过正相硅胶、Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇 1:1)、Sephadex LH-20(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇),得化合物 **3**(30.0 mg)。

Fr.5 过 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇 1:1),TLC 检测合并后浓缩,得到 5 个组分(Fr.5.1-5.5)。其中,Fr.5.2 反复过 Toyopearl HW-40F(甲醇)、Sephadex LH-20(甲醇),得化合物 **4**(10.0 mg)、化合物 **5**(24.4 mg)。Fr.5.4 过

Toyopearl HW-40F(甲醇)、Sephadex LH-20(甲醇),得化合物 **6**(10.0 mg)。Fr.5.5 过 Toyopearl HW-40F(甲醇),得化合物 **7**(17.0 mg)。

Fr.6 过 Sephadex LH-20(甲醇),TLC 检测合并后浓缩,得到 5 个组分(Fr.6.1-6.5)。其中,Fr.6.2 过 Toyopearl HW-40C(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)、Sephadex LH-20(50%丙酮水)、ODS 柱色谱(20%~50%甲醇水),得化合物 **8**(11.0 mg)。Fr.6.4 过 Toyopearl HW-40C(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)、Sephadex LH-20(甲醇),得化合物 **9**(80.0 mg)。Fr.6.5 过 Toyopearl HW-40F(甲醇),得化合物 **10**(87.0 mg)。

Fr.8 过正相硅胶,以二氯甲烷-甲醇(20:1→3:1)进行梯度洗脱,得到 6 个组分(Fr.8.1-8.6)。Fr.8.4 过 Toyopearl HW-40C(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)、Toyopearl HW-40F(二氯甲烷-甲醇 1:1)、ODS 柱色谱(20%~40%甲醇水)、Sephadex LH-20(甲醇)、Sephadex LH-20(50%丙酮水),得化合物 **11**(150.0 mg)、化合物 **12**(44.0 mg)、化合物 **13**(36.4 mg)。Fr.8.5 过 Toyopearl HW-40C(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)、ODS 柱色谱(20%~60%甲醇水)、Sephadex LH-20(甲醇)、Sephadex LH-20(50%丙酮水),得化合物 **14**(5.2 mg)、化合物 **15**(3.7 mg)、化合物 **16**(7.0 mg)、化合物 **17**(2.7 mg)。

Fr.9 过 Sephadex LH-20(甲醇),得到 2 个组分(Fr.9.1-9.2)。其中,Fr.9.2 过 Toyopearl HW-40C(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)、Sephadex LH-20(50%丙酮水)、正相硅胶柱、二氯甲烷-甲醇(8.5:1.5),得化合物 **18**(26.0mg)、**19**(25.0 mg)、化合物 **20**(87.0 mg)。

2.2 抗炎活性评价

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整细胞浓度为每毫升 3×10^5 个,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。实验设置空白组、模型组、阳性对照组和给药组,每组设置 3 个复孔,阳性对照为地塞米松(DEX)。空白组和模型组加入完全培养基,阳性对照组加入终浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX,给药组加入安全浓度范围内的化合物。培养 3 h 后,除空白组外,其他组均加入终浓度为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS,培养 24 h 后收集上清液,按 NO 检测试剂盒说明书测定上清液 NO 水平,重复 3 次实验。按公式(1)计算 NO 含量,按公式(2)计算 NO 抑制率。

NO 含量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) = $(OD_{\text{测定}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}) \times \text{标准品浓度} (20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{稀释倍数} (4 \text{ 倍})$ (1)

NO 抑制率 (%) = $(\text{NO 含量}_{\text{LPS}} - \text{NO 含量}_{\text{样品}}) / (\text{NO 含量}_{\text{LPS}} - \text{NO}_{\text{空白}}) \times 100\%$ (2)

2.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据的分析处理, 组间差异比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行比较, 两组间比较采用 LSD 法, 检验水准 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色针状结晶。ESI-MS m/z : 153 $[M+H]^+$, 分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.80 (1H, s, H-7), 7.40 (1H, overlap, H-6), 7.40 (1H, overlap, H-2), 7.02 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.24 (1H, brs, -OH), 3.94 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 191.1 (C-7), 151.9 (C-3), 147.4 (C-4), 130.1 (C-1), 127.8 (C-6), 114.6 (C-5), 109.0 (C-2), 56.3 ($-\text{OCH}_3$)。以上数据与文献 (陈美安和甄丹丹, 2020) 基本一致, 故鉴定该化合物为香草醛。

化合物 2: 白色针状结晶。分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.92 (2H, d, $J=1.6$ Hz, H-2, 2'), 6.86 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.83 (2H, dd, $J=8.0, 1.6$ Hz, H-6, 6'), 5.99 (4H, s, $2 \times \text{OCH}_2\text{O}$), 4.64 (2H, d, $J=4.4$ Hz, H-7, 7'), 4.11 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.75 (2H, dd, $J=9.2, 4.4$ Hz, H-9b, 9'b), 2.99 (2H, m, H-8, 8'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 147.4 (C-4, 4'), 146.5 (C-3, 3'), 135.5 (C-1, 1'), 119.4 (C-5, 5'), 108.0 (C-6, 6'), 106.6 (C-2, 2'), 100.9 ($2 \times \text{OCH}_2\text{O}$), 84.9 (C-7, 7'), 71.0 (C-9, 9'), 53.8 (C-8, 8')。以上数据与文献 (吴美婷等, 2021) 基本一致, 故鉴定该化合物为芝麻素。

化合物 3: 白色粉末。ESI-MS m/z : 193 $[M-H]^-$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.31 (1H, dd, $J=9.2, 2.8$ Hz, H-6), 7.07 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-4), 7.00 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-7), 3.79 (3H, s, 5-OCH_3), 1.52 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ :

202.1 (C-3), 167.1 (C-9), 156.6 (C-5), 129.9 (C-6), 119.8 (C-8), 115.5 (C-7), 106.1 (C-4), 105.9 (C-2), 56.5 (5-OCH_3), 22.2 ($-\text{CH}_3$)。以上数据与文献 (石慧丽等, 1998) 基本一致, 故鉴定该化合物为 2-甲基-2-羟基-5-甲氧基苯并 [d] 氢化呋喃-3-酮。

化合物 4: 白色粉末。ESI-MS m/z : 139 $[M+H]^+$, 分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 9.67 (1H, s, H-7), 7.30 (1H, dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.29 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.89 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 193.2 (C-7), 154.7 (C-3), 147.5 (C-4), 130.6 (C-1), 126.8 (C-6), 116.5 (C-5), 115.3 (C-2)。以上数据与文献 (杨超等, 2021) 基本一致, 故鉴定该化合物为原儿茶醛。

化合物 5: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 289 $[M+H]^+$, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.75 (1H, s, 1-OH), 10.51 (1H, brs, 5-OH), 7.54 (1H, dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-8), 7.31 (1H, dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, H-6), 7.25 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-7), 6.75 (1H, s, H-4), 3.95 (3H, s, 3-OCH_3), 3.74 (3H, s, 2-OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 180.8 (C-9), 160.0 (C-3), 153.2 (C-1), 152.7 (C-4a), 146.3 (C-5), 145.0 (C-4b), 131.1 (C-2), 124.2 (C-7), 120.6 (C-8a), 120.5 (C-6), 114.4 (C-8), 103.2 (C-8b), 91.4 (C-4), 60.1 (2-OCH_3), 56.5 (3-OCH_3)。以上数据与文献 (Yuan et al., 2006) 基本一致, 故鉴定该化合物为 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone。

化合物 6: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 317 $[M+H]^+$, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 7.75 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.68 (1H, dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, $3'\text{-OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 175.9 (C-4), 164.3 (C-7), 160.7 (C-5), 156.2 (C-9), 148.8 (C-4'), 147.4 (C-3'), 146.5 (C-2), 135.9 (C-3), 122.0 (C-1'), 121.7 (C-6'), 115.5 (C-5'), 111.7 (C-2'), 102.9 (C-10), 98.3 (C-6), 93.6 (C-8), 55.8 ($3'\text{-OCH}_3$)。以上数据与文献 (董丽华等,

2019)基本一致,故鉴定该化合物为异鼠李素。

化合物 **7**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 287 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.47 (1H, s, 5-OH), 8.04 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-5), 159.2 (C-4'), 156.2 (C-9), 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 129.5 (C-2', 6'), 121.7 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 103.0 (C-10), 98.2 (C-6), 93.5 (C-8)。以上数据与文献(Jung et al., 2003)基本一致,故鉴定该化合物为山奈酚。

化合物 **8**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 177 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{10}H_8O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 7.98 (1H, dd, $J=8.0, 1.6$ Hz, H-5), 7.44 (1H, dd, $J=8.0, 1.6$ Hz, H-7), 7.29 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-6), 6.28 (1H, s, H-3), 2.05 (3H, s, 2-CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 178.4 (C-4), 166.3 (C-2), 148.6 (C-10), 147.5 (C-8), 126.0 (C-9), 125.8 (C-7), 120.2 (C-6), 115.5 (C-5), 111.1 (C-3), 20.4 (2-CH₃)。以上数据与文献(王洪玲等, 2011)基本一致,故鉴定该化合物为 8-羟基-2-甲基色原酮。

化合物 **9**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 287 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.33 (2H, m, H-2', 6'), 6.84 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 6.51 (1H, s, H-3), 6.35 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.10 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.0 (C-4), 166.8 (C-2), 163.7 (C-7), 161.3 (C-5), 157.4 (C-9), 151.3 (C-4'), 146.3 (C-3'), 120.4 (C-1'), 118.7 (C-6'), 115.9 (C-5'), 112.6 (C-2'), 102.6 (C-10), 102.0 (C-3), 99.4 (C-6), 94.1 (C-8)。以上数据与文献(陈林等, 2018)基本一致,故鉴定该化合物为木犀草素。

化合物 **10**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 303 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{15}H_{10}O_7$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 7.68 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.8 (C-9), 156.2

(C-5), 147.7 (C-4'), 146.8 (C-2), 145.1 (C-3'), 135.8 (C-3), 122.0 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.6 (C-2'), 115.1 (C-5'), 103.0 (C-10), 98.2 (C-6), 93.4 (C-8)。以上数据与文献(王晓阳等, 2020)基本一致,故鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 **11**: 白色无定型粉末。ESI-MS m/z : 732 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{40}H_{77}NO_{10}$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.54 (1H, d, $J=9.2$ Hz, N-H), 5.34 (2H, m, H-8, 9), 4.13 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.08 (1H, m, H-2), 3.83 (1H, m, H-1b), 3.82 (1H, m, H-2'), 3.66 (1H, m, H-6''b), 3.64 (1H, m, H-1a), 3.42 (1H, m, H-6''a), 3.39 (2H, m, H-3, 4), 1.22 [s, (CH₂)_n], 0.84 (6H, t, $J=6.8$ Hz, 2 $\times$ CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.8 (C-1'), 130.3 (C-8), 129.6 (C-9), 103.5 (C-1''), 76.9 (C-5''), 76.5 (C-3''), 74.0 (C-3), 73.5 (C-2''), 71.0 (C-2'), 70.5 (C-4), 70.0 (C-4''), 69.1 (C-1), 61.1 (C-6''), 49.9 (C-2), 34.4, 32.4, 32.1, 31.6, 31.4, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 25.6, 24.5, 22.2 (均为 CH₂), 13.9 (Me)。以上数据与文献(黄朝辉等, 2005)基本一致,故鉴定该化合物为 1-*O*- β -D-葡萄糖-(2*S*, 3*S*, 4*R*, 8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-羟基棕榈酰胺]-8-十八烯-1, 3, 4-三醇。

化合物 **12**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 479 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{22}H_{22}O_{12}$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.61 (1H, brs, 5-OH), 8.03 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.43 (1H, brs, H-8), 6.20 (1H, brs, H-6), 5.52 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1''), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.36~3.69 (6H, 糖上的质子); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.4 (C-4), 164.7 (C-7), 161.3 (C-5), 156.5 (C-9), 156.2 (C-2), 149.5 (C-3'), 147.1 (C-4'), 133.2 (C-3), 121.9 (C-6'), 121.1 (C-1'), 115.2 (C-2'), 113.6 (C-5'), 103.9 (C-10), 101.7 (C-1''), 98.9 (C-6), 93.8 (C-8), 76.0 (C-5''), 73.2 (C-3''), 71.3 (C-2''), 68.0 (C-4''), 60.4 (C-6''), 56.0 (3'-OCH₃)。以上数据与文献(张涛等, 2021)基本一致,故鉴定该化合物为异鼠李素-3-*O*- β -D-半乳糖苷。

化合物 **13**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 465 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 。 1H -NMR (600 MHz,

DMSO- d_6) δ : 12.63 (1H, s, 5-OH), 7.58 (1H, dd, $J=9.0, 2.4$ Hz, H-6'), 7.58 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 6.84 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 5.46 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'), 3.07~3.59 (6H, 糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.4 (C-4), 164.8 (C-7), 161.3 (C-5), 156.4 (C-2), 156.1 (C-9), 148.6 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.2 (C-5'), 115.3 (C-2'), 103.8 (C-10), 101.0 (C-1''), 98.9 (C-6), 93.6 (C-8), 77.6 (C-5''), 76.6 (C-3''), 74.2 (C-2''), 70.0 (C-4''), 61.0 (C-6'')。以上数据与文献(余邦伟等, 2021)基本一致, 故鉴定该化合物为异槲皮苷。

化合物 **14**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 421 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-6), 7.12 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-7), 6.32 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.12 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 3.17~3.76 (糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.2 (C-9), 167.0 (C-3), 162.9 (C-1), 156.5 (C-4a), 149.3 (C-8), 144.8 (C-4b), 141.0 (C-5), 120.6 (C-6), 112.7 (C-7), 111.9 (C-8a), 103.6 (C-1'), 102.1 (C-8b), 98.5 (C-2), 93.8 (C-4), 77.4 (C-5'), 75.9 (C-3'), 73.5 (C-2'), 69.8 (C-4'), 60.9 (C-6')。以上数据与文献(Sakamoto et al., 1982)基本一致, 故鉴定该化合物为去甲当药醇苷。

化合物 **15**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 419 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.40 (2H, overlap, H-2', 6'), 6.89 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, s, H-8), 6.49 (1H, s, H-3), 4.55 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-1''), 3.39~4.17 (5H, 糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.7 (C-4), 163.7 (C-2), 163.1 (C-7), 159.9 (C-5), 156.2 (C-9), 149.8 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.3 (C-1'), 118.9 (C-6'), 115.9 (C-5'), 113.2 (C-2'), 108.9 (C-6), 103.3 (C-10), 102.7 (C-3), 93.9 (C-8), 74.5 (C-3''), 74.0 (C-1''), 70.2 (C-5''), 68.9 (C-4''), 68.5 (C-2'')。以上数据与文献(Wang et al., 2011; Liaw et al., 2022)基本一致,

故鉴定该化合物为木犀草素-6-C- α -L-阿拉伯糖苷。

化合物 **16**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.06 (2H, m, H-2', 6'), 6.86 (2H, m, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.37 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.29~3.68 (糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.4 (C-4), 164.6 (C-7), 161.1 (C-5), 159.9 (C-4'), 156.4 (C-2), 156.2 (C-9), 133.2 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 120.8 (C-1'), 115.0 (C-3', 5'), 103.7 (C-10), 101.8 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 75.7 (C-5''), 73.1 (C-3''), 71.2 (C-2''), 67.8 (C-4''), 60.1 (C-6'')。以上数据与文献(石舒雅等, 2019)基本一致, 故鉴定该化合物为山奈酚-3-O- β -D-半乳糖苷。

化合物 **17**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 10.16 (1H, s, 3-OH), 9.56 (1H, s, 4'-OH), 8.08 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 6.42 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 5.07 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.16~3.72 (6H, 糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 176.1 (C-4), 162.7 (C-7), 160.4 (C-5), 159.4 (C-4'), 155.8 (C-9), 147.5 (C-2), 136.0 (C-3), 129.7 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 115.5 (C-3', 5'), 104.7 (C-10), 99.9 (C-1''), 98.8 (C-6), 94.4 (C-8), 77.2 (C-3''), 76.4 (C-5''), 73.1 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.6 (C-6'')。以上数据与文献(李彦等, 2018)基本一致, 故鉴定该化合物为山奈酚-7-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **18**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.45 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 6.76 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 5.09 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.15~3.72 (6H, 糖上的质子); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-4), 164.5 (C-2), 163.0 (C-7), 161.2 (C-5), 157.0 (C-9), 150.0 (C-4'), 145.8 (C-3'), 121.4 (C-1'), 119.2 (C-6'), 116.0 (C-5'), 113.6 (C-2'), 105.4 (C-3), 103.2

(C-10), 99.9 (C-1''), 99.6 (C-6), 94.7 (C-8), 77.2 (C-4''), 76.4 (C-3''), 73.1 (C-2''), 69.5 (C-5''), 60.6 (C-6''). 以上数据与文献(肖春荣等, 2019)基本一致,故鉴定该化合物为木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **19**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 433 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{10}$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.93 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.79 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, s, H-8), 4.59 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-1''), 3.09~4.08 (6H, 糖上的质子); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-4), 163.6 (C-2), 163.5 (C-7), 161.3 (C-9), 160.8 (C-4'), 156.3 (C-5), 128.6 (C-2', 6'), 121.2 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 109.0 (C-6), 103.4 (C-10), 102.8 (C-3), 93.7 (C-8), 81.7 (C-5''), 79.0 (C-1''), 73.1 (C-2''), 70.7 (C-3''), 70.2 (C-4''), 61.6 (C-6''). 以上数据与文献(任英杰等, 2021)基本一致,故鉴定该化合物为异牡荆苷。

化合物 **20**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 611 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.54 (1H, dd, $J=8.0, 2.4$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.33 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.38 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-1'''), 0.98 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6'''), 3.05~3.71 (糖上的质子); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.2 (C-4), 164.5 (C-7), 161.1 (C-5), 156.4 (C-2, 9), 148.4 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.5 (C-6'), 121.0 (C-1'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.7 (C-10), 101.2 (C-1''), 100.6 (C-1'''), 98.7 (C-6), 93.5 (C-8), 76.5 (C-3''), 75.8 (C-5''), 74.0 (C-2''), 71.9 (C-4''), 70.6 (C-3'''), 70.2 (C-4''), 70.0 (C-2'''), 68.1 (C-5'''), 66.9 (C-6''), 17.5 (C-6'''). 以上数据与文献(Zhu et al., 2020)基本一致,故鉴定该化合物为芦丁。

4 抗炎活性筛选结果

利用 CCK-8 法测定 RAW264.7 细胞在不同化合物浓度环境下的存活率来评价对应化合物的细胞毒性作用。根据细胞毒性测试结果对本实验化

合物的给药浓度进行设计,结果显示,化合物 **2**、**3**、**14**、**16**、**20** 在浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,化合物 **1**、**5**、**6**、**8**、**9**、**11**–**13**、**19** 在浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 **4**、**7**、**10**、**18** 在浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率均在 90% 以上,表明在此给药浓度范围内无细胞毒性。

采用 LPS 造模 24 h 后,与空白组相比,模型组细胞的 NO 分泌量显著增加 ($P<0.01$),表明造模成功。由表 1 可知,与模型组相比,除 6 个化合物(化合物 **1**、**11**、**13**、**14**、**16**、**20**)对细胞的 NO 分泌量无显著影响外,化合物 **4**、**7**、**10**、**18** 在浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,化合物 **5**、**6**、**8**、**9**、**12**、**19** 在浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,化合物 **2**、**3** 在浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均可显著降低细胞的 NO 分泌量 ($P<0.05, P<0.01$)。

5 讨论与结论

本研究从杏叶防风全草 70% 乙醇提取物中分离鉴定了 20 个化合物,包括 15 个黄酮类化合物(**5**–**10**、**12**–**20**), 2 个酚类化合物(**1**、**4**), 1 个木脂素类化合物(**2**), 1 个苯丙烷类化合物(**3**)和 1 个酰胺类化合物(**11**)。其中,化合物 **2**、**5**、**8**、**11**、**12**、**14**、**15**、**17** 均为首次从茜苳属植物中分离得到,化合物 **1**、**3**、**4**、**6**、**7**、**10**、**13**、**16**、**18**、**20** 均为首次从杏叶防风中分离得到。

炎症是机体稳态受到干扰时常见的病理状态,许多疾病的发生会伴随着炎症的产生,即“十病九炎”。炎症的发生是由多种炎症介质、细胞因子及信号通路共同参与调节来完成的,NO 作为一种同时拥有促炎和抗炎双重作用的生物活性物质(曹谨玲等, 2021; 李潭等, 2021),在炎症级联反应中,特别是在炎症反应的发生和信号传导方面起到关键的调节作用(羊波等, 2016)。因此,本研究利用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 为评价模型,从实验结果来看,木脂素类化合物(**2**)、苯丙烷类化合物(**3**)、黄酮类化合物(**5**–**10**、**12**、**18**、**19**)及酚类化合物(**4**)在安全浓度范围内对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生的 NO 具有显著抑制作用,其抑制率分别为 78.36%、76.51%、80.82%、64.88%、83.60%、61.21%、79.80%、68.16%、62.14%、81.14%、71.26%、57.37%。其中,化合物 **5** 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,化合物 **7**、**18** 在 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的 NO 抑制率与阳性对照药地塞米松在 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的 NO 抑制率相当。

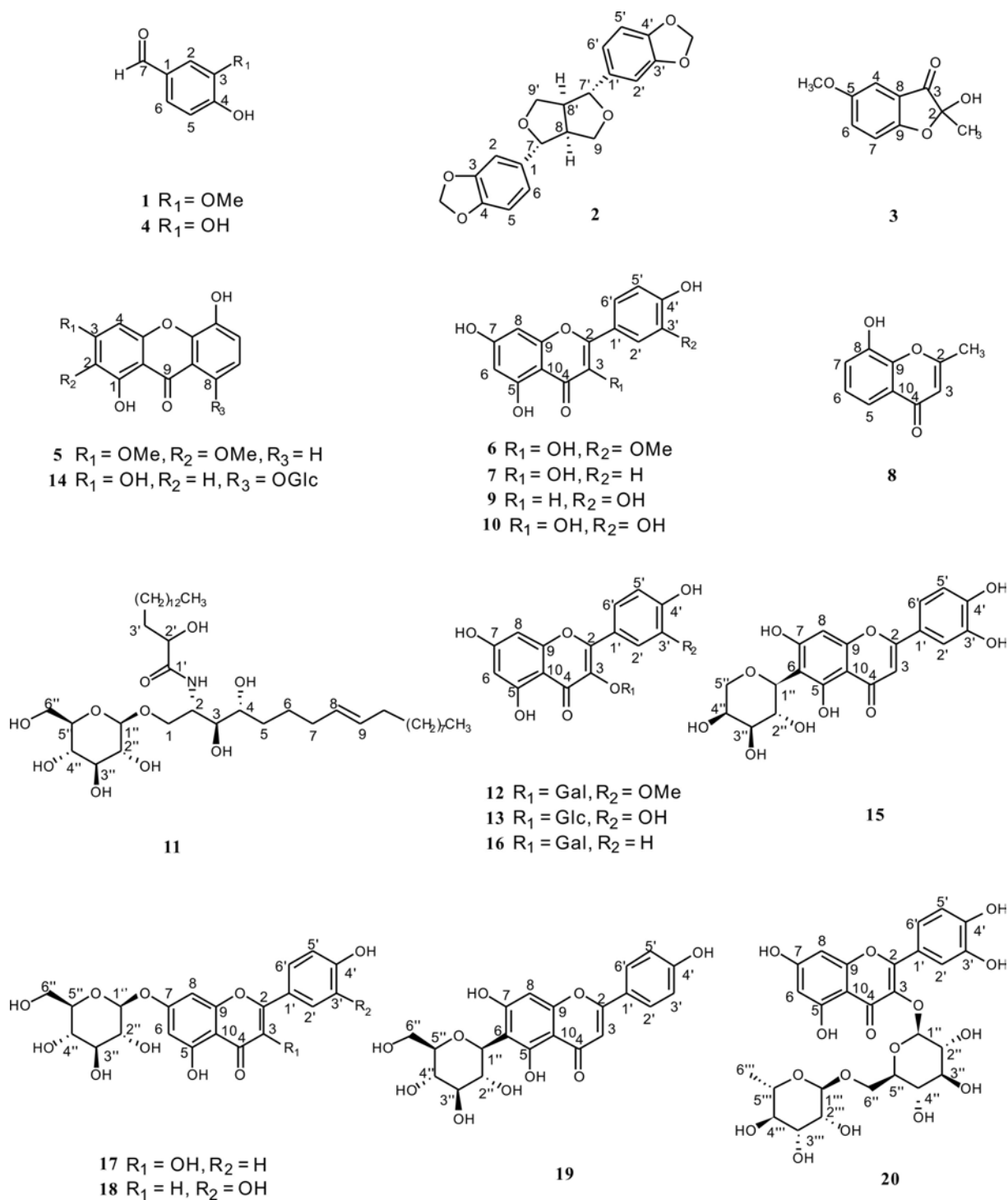


图 1 化合物 1-20 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-20

目前, 茜苳属民间药用植物的药理活性研究多为粗提物, 单体化合物的药理活性尤其是抗炎活性方面的研究较少, 仅见短果茜苳甲醇提取物中分离得到的奎宁酸衍生物对 LPS 诱导 BV-2 细

胞的抗炎活性 (Lee et al., 2013)。本研究对杏叶防风进行了化学成分和抗炎活性研究, 在一定程度上丰富了杏叶防风的化学成分, 初步探明了黄酮类化合物是其发挥抗炎作用的活性成分, 为进

表 1 杏叶防风化合物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO 的抑制率 ($n=3$)

Table 1 Inhibition ratios of constituents on production of NO in LPS-induced RAW264.7 cells ($n=3$)

化合物 Compound	浓度 Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO 抑制率 NO inhibition ratio (%)	化合物 Compound	浓度 Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO 抑制率 NO inhibition ratio (%)
DEX	25	91.08	9	50	79.80
2	100	78.36	11	50	15.76
3	100	76.51	12	50	62.14
14	100	45.06	13	50	38.20
16	100	30.29	19	50	71.26
20	100	34.24	4	25	57.37
1	50	32.11	7	25	83.60
5	50	80.82	10	25	68.16
6	50	64.88	18	25	81.14
8	50	61.21			

一步研究和开发其药理活性奠定了基础,同时也为进一步扩大茜苳属药用植物的化学成分及活性研究提供了重要的参考依据。

参考文献:

- CAO JL, CHEN JJ, LI LJ, et al., 2021. Effects of *Artemisia argyi* essential oils on anti-inflammatory of macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J Anim Nutr, 33 (6): 3479–3486. [曹谨玲, 陈剑杰, 李丽娟, 等, 2021. 艾叶挥发油对脂多糖诱导的巨噬细胞的抗炎作用 [J]. 动物营养学报, 33(6): 3479–3486.]
- CHANG X, 2011. Studies on the active constituents of *Tamarix Ramosissima* Ledeb. and *Pimpinella Candolleana* Wight Et Arn [D]. Zhengzhou: Henan University, [常星, 2011. 多枝柽柳和杏叶茜苳活性成分研究 [D]. 郑州: 河南大学.]
- CHANG X, KANG WY, 2012. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory compounds from *Pimpinella candolleana* Wight et Arn [J]. Med Chem Res, 21(12): 4324–4329.
- CHEN L, WANG Q, WU B, et al., 2018. Isolation and identification of chemical constituents from *Disporum cantoniense* (II) [J]. Chin Trad Herb Drugs, 49(20): 4803–4807. [陈林, 王琦, 吴蓓, 等, 2018. 百尾参化学成分的分离与鉴定(II) [J]. 中草药, 49(20): 4803–4807.]
- CHEN MA, ZHEN DD, 2020. Chemical constituents from Feikangming [J]. Chin Trad Pat Med, 42(7): 1786–

1790. [陈美安, 甄丹丹, 2020. 肺康明化学成分的研究 [J]. 中成药, 42(7): 1786–1790.]
- DONG LH, ZHU YY, GE F, et al., 2019. Chemical constituents of flavonoids from *Polygonum divaricatum* [J]. J Chin Med Mat, 42(3): 567–569. [董丽华, 朱玉野, 葛菲, 等, 2019. 叉分蓼黄酮类化学成分研究 [J]. 中药材, 42(3): 567–569.]
- Guiyang Municipal Health Bureau, 1959. Guiyang folk herbs [M]. Guiyang: Guizhou People's Publishing House: 276–277. [贵阳市卫生局, 1959. 贵阳民间药草 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社: 276–277.]
- Guizhou Provincial Drug Administration, 2003. Quality Standards for Chinese Medicinal Materials and Ethnic Medicinal in Guizhou Province [S]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 230. [贵州省药品监督管理局, 2003. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 贵阳: 贵州科技出版社: 385.]
- HUANG ZH, XU KP, ZHOU YJ, et al., 2005. Studies on chemical constituents of *Polygala aureocauda* [J]. Nat Prod Res Dev, 17(3): 298–300. [黄朝辉, 徐康平, 周应军, 等, 2005. 黄花倒水莲化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 17(3): 298–300.]
- JUNG HA, KIM JE, CHUNG HY, et al., 2003. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens [J]. Arch Pharm Res, 26(4): 279–285.
- LEE SY, MOON E, KIM SY, et al., 2013. Quinic acid derivatives from *Pimpinella brachycarpa* exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia [J]. Bioorg Med Chem Lett, 23(7): 2140–2144.
- LIANG GY, WANG DP, XU BX, et al., 2003. Studies on the compounds from *Pimpinella candolleana* [J]. Guizhou Sci, 21(1): 58–60. [梁光义, 王道平, 徐必学, 等, 2003. 民族药茜苳羊古化学成分的研究 [J]. 贵州科学, 21(1): 58–60.]
- LIAN CC, LIN YC, WU SY, et al., 2022. Anti-inflammatory constituents from *Phyllostachys makinoi* Hayata [J]. Nat Prod Res, 36(6): 1425–1432.
- LI T, SUN YH, LI GF, 2021. Anti-inflammatory mechanism of phloretin on RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide *in vitro* [J]. Chin J Immunol, 37(7): 812–818. [李潭, 孙一涵, 李国峰, 2021. 根皮素对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的体外抗炎作用机制 [J]. 中国免疫学杂志, 37(7): 812–818.]
- LI Y, ZHOU BP, ZHANG WJ, et al., 2018. Chemical constituents from aerial parts of *Ribes mandshuricum* [J]. Chin Trad Herb Drug, 49(4): 772–779. [李彦, 周宝萍, 张皖晋, 等, 2018. 东北茶藨子化学成分研究 [J]. 中草药, 49(4): 772–779.]
- REN YJ, CAO YG, ZENG MN, et al., 2021. Chemical constituents from the stems and leaves of *Dioscorea oppositifolia* Thunb. [J]. Chin Pharm J, 56(12): 963–970. [任英杰,

- 曹彦刚, 曾梦楠, 等, 2021. 薯蓣茎叶化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 56(12): 963-970.]
- SHI HL, MI CF, QIAO BL, et al., 1998. Study on the chemical constituents of the root of *Pimpinella thellungiana* [J]. J Chin Med Mat, 21(5): 236-237. [石慧丽, 米彩峰, 乔博灵, 等, 1998. 羊红膻根的化学成分研究 [J]. 中药材, 21(5): 236-237.]
- “Sichuan Traditional Chinese Medicine” Collaborative Writing Group, 1979. Sichuan Traditional Chinese Medicine Chronicle (Vol. 1) [M]. Chengdu: Sichuan People's Publishing House: 125-126. [《四川中药志》协作编写组, 1979. 四川中药志(第一卷) [M]. 成都: 四川人民出版社: 125-126]
- SAKAMOTO I, TANAKA T, TANAKA O, et al., 1982. Xanthone glucosides of *Swertia japonica* Makino and a related plant: structure of a new glucoside, isoswertianolin and structure revision of Swertianolin and Norswertianolin. [J]. Chem Pharm Bull, 30(11): 4088-4091.
- SHI SY, CUI HH, YIN YQ, et al., 2019. Chemical constituents from *Calystegia sepium* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 50(1): 772-779. [石舒雅, 崔红花, 尹永芹, 等, 2019. 宽叶打碗花化学成分研究 [J]. 中草药, 50(1): 36-41.]
- SUI X, 2016. A kind of pharmaceutical composition for treating phlebitis caused by fat emulsion [P]. CN105412449A. [孙霞, 2016. 一种治疗脂肪乳致静脉炎的药物组合物 [P]. CN105412449A.]
- WANG HL, CHEN H, GENG CA, et al., 2011. Chemical constituents of *Halenia elliptica* [J]. Chin J Chin Mat Med, 36(11): 1454-1457. [王洪玲, 陈浩, 耿长安, 等, 2011. 椭圆叶花锚的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 36(11): 1454-1457.]
- WANG XY, 2020. Chemical constituents from *Lobelia chinensis* [J]. Chin Trad Pat Med, 42(12): 3208-3210. [王晓阳, 2020. 半边莲化学成分的研究 [J]. 中成药, 42(12): 3208-3210.]
- WANG Y, CHEN M, ZHANG J, et al., 2011. Flavone C-glycosides from the leaves of *Lophatherum gracile* and their *in vitro* antiviral activity [J]. Planta Med, 78(1): 46-51.
- WEI Y, ZHANG X, WEI L, et al., 2005. Analysis of chemical constituents of volatile oil of *Pimpinella candolleana* [J]. J Guizhou Univ Trad Chin Med, 27(4): 56-57. [危英, 张旭, 危莉, 等, 2005. 杏叶防风挥发油化学成分分析 [J]. 贵阳中医学院学报, 27(4): 56-57.]
- WU MT, LIU SY, HUANG DL, et al., 2021. Chemical constituents from the leaves of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* and their anti-inflammatory activities [J]. Chin J Chin Mat Med, 46(14): 3592-3598. [吴美婷, 刘诗瑶, 黄达龙, 等, 2021. 芳樟叶的化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 中国中药杂志, 46(14): 3592-3598.]
- XIAO CR, TU LF, ZHANG RZ, et al., 2019. Study on chemical constituents of flavonoids in *Turpinia arguta* [J]. Acta Pharm Sin, 54(9): 1620-1626. [肖春荣, 涂林锋, 张睿增, 等, 2019. 山香圆叶黄酮类化合物的研究 [J]. 药学学报, 54(9): 1620-1626.]
- XING YJ, CHANG X, ZHANG Q, et al., 2011. Analysis of volatile compounds from *Pimpinella candolleana* in Guizhou by SPME-GC-MS [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 17(4): 93-95. [邢煜君, 常星, 张倩, 等, 2011. 固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析贵州产杏叶茴芹挥发性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 17(4): 93-95.]
- YANG B, YING Y, CHEN LL, et al., 2016. Advance in studies on anti-inflammatory mechanism of flavonoids [J]. Chin Pharm, 19(7): 1369-1373. [羊波, 应茵, 陈冬丽, 等, 2016. 黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展 [J]. 中国药师, 19(7): 1369-1373.]
- YANG C, WANG LK, TIAN WY, et al., 2021. Study on fatty acid constituents of *Lianzixin* (*Plumula nelumbinis*) [J]. Chin Arch Trad Chin Med, 39(10): 35-37. [杨超, 王立抗, 田文月, 等, 2021. 莲子心脂肪酸类成分研究 [J]. 中华中医药学刊, 39(10): 35-37.]
- YUAN W, ZHANG LP, CHENG KD, et al., 2006. Microbial O-demethylation, hydroxylation, sulfation, and ribosylation of a xanthone derivative from *Halenia elliptica* [J]. J Nat Prod, 69(5): 811-814.
- YU BW, SONG XH, CHEN YF, et al., 2021. Chemical constituents from the stems and leaves of *Argyrea acuta* [J]. J Chin Med Mat, 44(4): 873-876. [余邦伟, 宋雪慧, 陈艳芬, 等, 2021. 白鹤藤的化学成分研究 [J]. 中药材, 44(4): 873-876.]
- ZENG DX, 2007. A kind of preparation method of Huang Xuan Yi Gan Pill [P]. CN1947773. [曾德祥, 2007. 一种黄萱益肝丸剂的制备方法 [P]. CN1947773.]
- ZHAO C, CHEN HG, CHENG L, et al., 2007. Analysis of volatile oil in herb of *Pimpinella candolleana* by SPME-GC-MS [J]. Chin J Chin Mat Med, 32(17): 1759-1762. [赵超, 陈华国, 程力, 等, 2007. 杏叶防风挥发油成分 SPME-GC-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 32(17): 1759-1762.]
- ZHANG T, LV S, JIA HM, et al., 2021. Glycosides from the pericarps of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Chin Pharm J, 56(8): 626-632. [张涛, 吕双, 贾红梅, 等, 2021. 花椒果皮中糖苷类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 56(8): 626-632.]
- ZHU H, CHEN L, YU JQ, et al., 2020. Flavonoid epimers from custard apple leaves, a rapid screening and separation by HSCCC and their antioxidant and hypoglycaemic activities evaluation [J]. Sci Rep, 10(1): 8819-8830.

(责任编辑 李 莉 王登惠)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202204057

吴其妹, 李影, 李志荣, 等, 2023. 基于 HPLC-ECD 研究牡荆叶抗氧化的谱-效关系 [J]. 广西植物, 43(6): 1124–1134.
WU QM, LI Y, LI ZR, et al., 2023. Spectrum-effect relationship of antioxidant activity in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves based on HPLC-ECD [J]. *Guihaia*, 43(6): 1124–1134.



基于 HPLC-ECD 研究牡荆叶抗氧化的谱-效关系

吴其妹¹, 李影¹, 李志荣², 刘明容¹, 马继敏², 余念念², 陈荣祥^{2,3}, 周亚平^{1*}

(1. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医科大学 基础医学院, 贵州 遵义 563000;
3. 遵义市理化分析测试工程技术研究中心, 贵州 遵义 563000)

摘要: 为研究牡荆叶指纹图谱与抗氧化活性的谱-效关系, 该研究首先建立了 18 批牡荆叶的高效液相色谱-电化学检测法 (HPLC-ECD) 指纹图谱, 对不同来源牡荆叶药材进行聚类分析, 鉴定主要酚类化合物且测定其含量, 分析牡荆叶的总酚和总黄酮含量, 并采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、氧自由基吸收能力法及铁离子还原能力法考察其体外抗氧化活性, 通过皮尔逊相关分析、灰度关联分析及偏最小二乘回归分析法研究牡荆叶的谱-效关系。结果表明: (1) 牡荆叶的指纹图谱标定 21 个共有峰, 共指认出 10 个峰, 其含量顺序为绿原酸>异荭草苷>木犀草苷>异牡荆素>异绿原酸 A>异绿原酸 C>原儿茶酸>荭草苷>异绿原酸 B>新绿原酸; 不同产地样品间相似性较高, 相似度结果为 0.816~0.983。 (2) 系统聚类分析显示, 样品含量对分类有一定影响, 不同来源样品被分为 3 类, 其中南北方样品存在一定差异。 (3) 牡荆叶中总酚和总黄酮的含量分别为 15.82~61.83 mg·g⁻¹ 和 27.85~157.65 mg·g⁻¹, 样品均具不同程度的抗氧化活性。 (4) 谱-效关系表明, 牡荆叶的抗氧化活性是多种化合物协同作用的结果, 峰 9 (异荭草苷)、峰 4 和峰 5 (绿原酸) 等化合物对牡荆叶药材抗氧化活性的贡献最大。综上表明, 牡荆叶具有较好的抗氧化活性, 其中主要的活性指标是异荭草苷和绿原酸。该研究结果可为牡荆叶抗氧化活性成分的筛选及其质量控制提供参考依据。

关键词: 牡荆叶, HPLC, 电化学检测, 抗氧化, 谱-效关系, 总酚, 总黄酮

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1124-11

Spectrum-effect relationship of antioxidant activity in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves based on HPLC-ECD

WU Qimei¹, LI Ying¹, LI Zhirong², LIU Mingrong¹, MA Jimin²,
YU Niannian², CHEN Rongxiang^{2,3}, ZHOU Yaping^{1*}

(1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; 2. School of Basics Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; 3. Zunyi Engineering Technology Research Center of Physical and Chemical Analysis, Zunyi 563000, Guizhou, China)

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: 国家自然科学基金(21665031, 81760652)。

第一作者: 吴其妹(1995-), 硕士研究生, 研究方向为药用植物开发与利用, (E-mail) 510578364@qq.com。

* 通信作者: 周亚平, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药物分析, (E-mail) yaping20302@163.com。

Abstract: In order to study the spectrum-effect relationship between fingerprint and antioxidant activity of the leaves of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, the fingerprints of 18 batches of *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were established by high performance liquid chromatography-electrochemical detection (HPLC-ECD), and the cluster analysis of medicinal materials from different sources was performed simultaneously. The main phenolic compounds from *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were identified and determined. The contents of total phenolics and total flavonoids in *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were analyzed, and the antioxidant activities *in vitro* were evaluated by the methods of DPPH radical scavenging capacity, ABTS radical scavenging capacity, oxygen radical absorbance capacity and ferric ion reducing ability power. The spectrum-effect relationships of *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were analyzed by Pearson correlation analysis, gray relational analysis and partial least square regression analysis. The results were as follows: (1) The fingerprints of *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were established with 21 common peaks and a total of 10 peaks were identified. The order of content was chlorogenic acid > isoorientin > luteoloside > isovitexin > isochlorogenic acid A > isochlorogenic acid C > protocatechuic acid > orientin > isochlorogenic acid B > neochlorogenic acid. The similarity among the samples from different producing areas was high, and the values were ranged from 0.816 to 0.983. (2) The results of the cluster analysis showed that the content of the compounds had a certain influence on the classification and the samples from different sources were divided into three categories, among which the samples from the south and the north were different. (3) The contents of total phenolics and total flavonoids in *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves were 15.82 to 61.83 mg · g⁻¹ and 27.85 to 157.65 mg · g⁻¹, respectively, and the antioxidant activity of all samples from *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves existed differences. (4) The spectrum-effect relationship indicated that the antioxidant activity of *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves was the result of the synergistic effect of many compounds, and compounds such as peak 9 (isorientin), peak 4 and peak 5 (chlorogenic acid) made the greatest contribution to the antioxidant activity of *V. negundo* var. *cannabifolia* leaves. *V. negundo* var. *cannabifolia* has good antioxidant activity, and the main activity indexes are isoorientin and chlorogenic acid. This study can provide a reference basis for the screening and quality control of antioxidant components in *V. negundo* var. *cannabifolia*.

Key words: *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves, HPLC, electrochemical detection, antioxidation, spectrum-effect relationship, total phenolics, total flavonoids

牡荆 (*Vitex negundo* var. *cannabifolia*) 是马鞭草科牡荆属植物, 分布于中国华东各省及广西、广东、河北、贵州、四川等地, 其叶具有解表化湿、祛痰平喘等功效(《全国中草药汇编》编写组, 1996; 国家药典委员会, 2020)。牡荆主要成分为酚酸、黄酮、木脂素和萜类等化合物。现代药理研究表明, 牡荆具有抗氧化、抗炎镇痛、抑菌、抗肿瘤等生物活性(舒柄垚等, 2020)。抗氧化是牡荆的主要生物活性之一, 向蓉等(2021)研究表明牡荆水提取物和醇提取物均具有一定的抗氧化活性, 其中酚酸和黄酮类物质是其主要活性成分。Hu 等(2015)研究上证实大部分酚酸类物质具有较强的 2, 2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)自由基清除活性。然而, 其抗氧化活性药效物质基础尚不明确, 并且未将指纹图谱结合生物活性进行质量控制评价研究。

谱-效关系研究是将药用植物的指纹图谱与其药效结果相结合起来, 通过建立“谱-效”数学模型

来反映中药的内在品质, 其广泛应用于药用植物内在质量控制评价研究(王勤等, 2017; 晏朝操和张建峰, 2020)。HPLC 具有灵敏度高、分离度和重现性好、高效快速、应用范围广等特点, 目前已成为色谱指纹图谱研究的首选方法, 而电化学检测法(electrochemical detection, ECD)通过测量物质的电信号变化, 可选择性地检测具有氧化还原性质的化合物, 如带有硝基、巯基、酚羟基等基团的有机化合物。因此, 可用 HPLC-ECD 筛查药用植物的抗氧化活性成分(罗敏等, 2020; Zhang et al., 2021)。目前, 谱-效关系研究的分析方法众多, 其中灰度关联分析法(gray relational analysis, GRA)能够分析共有峰峰面积的变化与药效指标的变化趋势, 偏最小二乘回归分析法(partial least square regression analysis, PLSR)对于系统的信息和噪声更易于辨别, 可以弥补灰度关联分析法中关联度均为正值所带来的分析误差(刘晓燕等, 2020)。因此, 常将 GRA 和 PLSR 相结合应用于谱-效关系分析研究。

本研究收集 18 批不同来源的牡荆叶样品,采用 HPLC-ECD 和体外抗氧化活性评价方法,通过建立 HPLC-ECD 指纹图谱且结合样品含量测定、系统聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)和谱-效关系分析,拟探讨以下问题:(1)牡荆叶的化学成分及其含量;(2)牡荆叶不同化学成分对抗氧化活性的贡献。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 药材与试剂 新鲜牡荆叶样品采自广西、广东和河北,按照 2020 年《中国药典》中牡荆叶的鉴定要求,经遵义医科大学孟令杰博士鉴定为马鞭草科牡荆属牡荆(*Vitex negundo* var. *cannabifolia*)的叶,其详细信息见表 1。新鲜牡荆叶于 40 ℃下烘干后,分别粉碎并过 50 目筛,放置在 4 ℃条件下保存备用。

原儿茶酸、绿原酸、木犀草苷、没食子酸、奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox)(阿拉丁生化科技股份有

限公司,批号分别为 K1717091、J1523050、10122401、L1810248、A2010059,纯度≥97%);荭草苷、异荭草苷、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为 20031202、20052201、19042305、20032601、20032602、20080802,纯度≥98%);异牡荆素(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号为 ST09650120,纯度≥98%);芦丁(国药集团化学试剂有限公司,批号为 2016092,纯度≥95%);甲醇、乙腈均为色谱级,均购自北京伊诺凯科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 Thermo UltiMate 3000 bio-RS 型 HPLC 仪,检测器为 ECD-3000 RS;Sorrall ST 8R 型高速离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司);SpectraMax i3x 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];ME104E 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Purelab Chorus 2 型纯水超纯水系统(英国埃尔格公司);GZX-9070MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

表 1 牡荆来源信息
Table1 Sources of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*

样品编号 Sample number	产地 Place of origin	采集时间 Harvest time	样品编号 Sample number	产地 Place of origin	采集时间 Harvest time
S1	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S10	广东潮州 Chaozhou, Guangdong	2021-10-08
S2	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S11	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-13
S3	广东清远 Qingyuan, Guangdong	2021-10-07	S12	广西来宾 Laibin, Guangxi	2021-09-02
S4	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S13	广西来宾 Laibin, Guangxi	2021-09-02
S5	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-18	S14	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	2021-10-10
S6	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-18	S15	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-13
S7	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S16	河北保定 Baoding, Hebei	2021-10-15
S8	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S17	河北保定 Baoding, Hebei	2021-10-15
S9	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S18	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-20

1.2 方法

1.2.1 标准品溶液的制备 精密称取原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆素、木

犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 适量,用甲醇溶解制成 2 mg·mL⁻¹的标准品储备液,于-20 ℃下冷冻保存以备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取不同批号的牡荆叶样品,以 80% 甲醇为溶剂,按 1 : 30 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的料液比在 25 °C 下超声提取 30 min,于 9 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 5 min,取上清液加 80% 甲醇按 1 : 1 等体积稀释混匀,过 0.22 μm 有机滤膜即制得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件 XBridge BEH Shield RP18 色谱柱 (3.0 mm $\times$ 150 mm, 2.5 μm); 流动相乙腈 (A) - 甲酸铵柠檬酸混合溶液 (B) (25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 甲酸铵溶液和 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 柠檬酸溶液以 1 : 1 等体积混匀,用甲酸调 pH 至 2.6) 梯度洗脱 (0 ~ 9.5 min, 5% $\rightarrow$ 7.5% A; 9.5 ~ 12.5 min, 7.5% $\rightarrow$ 12% A; 12.5 ~ 30 min, 保持 12% A; 30 ~ 40 min, 12% $\rightarrow$ 19% A; 40 ~ 48 min, 保持 19% A; 48 ~ 53 min, 19% $\rightarrow$ 45% A; 53 ~ 55 min, 45% $\rightarrow$ 80% A); ECD 检测电压 700 mV; 流速 0.6 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 柱温 45 °C, 样温 12 °C; 进样量 1 μL 。

1.2.4 总酚、总黄酮含量测定及体外抗氧化实验

1.2.4.1 总酚含量测定 参照 Dzigan 等 (2018) 的方法并稍作修改,先吸取 250 μL 供试品稀释液 (加 80% 甲醇稀释 40 倍) 和 250 μL 0.25 mol $\cdot$ L $^{-1}$ Folin 酚试剂混合静置 3 min 后,加入 500 μL 15% Na_2CO_3 溶液混匀后暗反应 30 min,离心取上清液于酶标仪 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸溶液为标准,所有样品测量结果均以没食子酸当量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示。没食子酸标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.014 2x + 0.062 5$, $R^2 = 0.998 8$ 。

1.2.4.2 总黄酮含量测定 参照 He 等 (2015) 的方法并稍作修改,先吸取 500 μL 供试品稀释液 (加 80% 甲醇稀释 5 倍)、1 000 μL 80% 甲醇、250 μL 5% NaNO_2 溶液,混匀放置 6 min 后,再加入 250 μL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,混匀放置 6 min 后,又加入 2 000 μL 4% NaOH 溶液,混匀放置 15 min 后,于酶标仪 510 nm 处测定吸光度。以芦丁溶液为标准,所有样品测量结果均以芦丁当量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示。芦丁标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.000 9x + 0.046 0$, $R^2 = 0.999 2$ 。

1.2.4.3 铁离子还原能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 测定 参照王金梅等 (2017) 的方法并稍作修改,分别吸取供试品稀释液 (加入 80% 的甲醇稀释 60 倍),加入 80% 的甲醇至 100 μL 后,加入 300 μL TPTZ 工作液混匀反应,

5 min 后于酶标仪 593 nm 处测定吸光度。以 Trolox 溶液为标准,所有样品测量结果均以 Trolox 当量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示。Trolox 标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.019 2x + 0.022 2$, $R^2 = 0.996 9$ 。

1.2.4.4 DPPH 自由基清除实验 参照 Zhang 等 (2015) 的方法并稍作修改,分别吸取 80 μL 的供试品稀释液 (加入 80% 的甲醇稀释 20 倍),加入 80% 的甲醇至 200 μL 后,再加入 DPPH 自由基母液 [DPPH : 80% 甲醇 = 1 : 10 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)] 400 μL ,摇匀,暗反应 10 min 后,于酶标仪 517 nm 处测定吸光度。以 80% 甲醇为空白组,不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以清除率表示,清除率计算公式:

$$\text{DPPH 清除率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{样品组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4.5 ABTS 自由基清除实验 参照 Aati 等 (2018) 的方法并稍作修改,分别吸取 100 μL 的供试品稀释液 (加入 80% 的甲醇稀释 30 倍),加入 200 μL 的 ABTS 工作液,混匀暗反应 20 min 后,于酶标仪 734 nm 处测定吸光度。以 80% 甲醇为空白组,不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以清除率表示,清除率计算公式:

$$\text{ABTS 清除率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{样品组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4.6 氧自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 测定 在供试品溶液中加入磷酸盐缓冲溶液稀释 500 倍得到供试品稀释液,实验步骤参照徐维盛等 (2014) 的方法,每隔 5 min 测定一次荧光强度,总时间为 3 h。以磷酸盐缓冲溶液为空白组,不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以 Trolox ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示,具体计算公式表示为式 (3) 和式 (4):

$$AUC = 0.5 \times [2 \times (f_0 + f_1 + \dots + f_{n-1} + f_n) - f_0 - f_n] \times \Delta t \quad (3)$$

式中: AUC 为荧光衰退曲线下面积; f_n 为第 n 个测定点的相对荧光强度; Δt 为测定荧光强度的时间间隔。

$$\text{ORAC 值} = [(AUC_{\text{样品组}} - AUC_{\text{空白组}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{空白组}})] \times C_{\text{Trolox}} / C_{\text{样品组}} \quad (4)$$

Trolox 标准品与净荧光衰退曲线下面积 ($AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{空白组}}$) 的回归方程为 $y = 1.368 0x + 8.301 9$, $R^2 = 0.994 6$ 。

1.2.5 数据处理与分析 采用 Excel 2013 软件进行数据处理和灰度关联分析;采用 SPSS 26 软件进行皮尔逊相关分析和系统聚类分析;采用 SIMCA 14.1 软件进行 PLSR 分析。色谱图和 PLSR 结果通过 Origin 2021 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱方法学考察

2.1.1 精密度试验 取牡荆叶(批号为 S2),按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,于“1.2.3”项的色谱条件连续进样 6 次,21 个共有峰保留时间的 $RSD \leq 0.45\%$,峰面积的 $RSD \leq 1.31\%$,这说明试验方法符合分析检测要求。

2.1.2 重复性试验 取牡荆叶(批号为 S2),按“1.2.2”项下方法制备成 6 份供试品溶液,于“1.2.3”项的色谱条件下进样分析,21 个共有峰保留时间的 $RSD \leq 1.72\%$,峰面积的 $RSD \leq 4.81\%$,结果表明试验建立的方法重复性较好。

2.1.3 稳定性试验 取牡荆叶(批号为 S2)按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液,在“1.2.3”项的色谱条件下分别于 0、4、8、12、16、18、24 h 进样分析,21 个共有峰保留时间的 $RSD \leq 0.58\%$,峰面积的 $RSD \leq 3.94\%$,结果表明 24 h 内稳定性较好。

2.2 HPLC-ECD 指纹图谱的建立及共有峰指认

分别取 18 批牡荆叶,按照“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,同“1.2.3”条件测定并记录色谱图和总峰面积,将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,以 S8 为参照图谱,生成牡荆叶 HPLC-ECD 指纹图谱(图 1)、混合标准品图(A)和对照指纹图谱(B)(图 2)。通过多点校正和 Mark 峰匹配得到 21 个共有峰,其中峰 1、2、5、8、9、11、12、14、15、17 分别为原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C。计算其与对照指纹图谱的相似度,相似度结果为 0.816~0.983,样品 S1-S18 的相似度分别为 0.843、0.983、0.967、0.959、0.953、0.916、0.969、0.966、0.968、0.980、0.978、0.953、0.974、0.947、0.964、0.847、0.816、0.950。

2.3 标准曲线和检测限

分别取“1.2.1”项下的对照品溶液制备成系列质量混合标准品溶液,在“1.2.3”条件下,以对照品

质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,以信噪比为 3:1 计算分析方法的检测限(LOD)。结果显示各化合物在一定的质量浓度范围内,峰面积有良好的线性相关性(表 2),相关系数大于 0.999,LOD 为 2.2~30.4 ng·mL⁻¹。

2.4 加标回收实验

称取已知含量的牡荆叶样品,平行精密称定 6 份,加入一定量的对照品混合储备溶液,于“1.2.3”项下的色谱条件进样分析。表 2 结果显示,10 种化合物的回收率为 90.13%~99.56%, $RSD \leq 6.41\%$,该方法的准确度良好。

2.5 含量测定

按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,于“1.2.3”项的色谱条件下,测定不同产地牡荆叶的 10 个化合物含量,结果见表 3。由表 3 可知,牡荆叶含有丰富的酚酸和黄酮类化合物,不同批次和产地的各成分含量存在较大差异。以各批次含量的平均值计算,含量最高的化合物为绿原酸,其次分别为异荭草苷、木犀草苷、异牡荆素、异绿原酸 A、异绿原酸 C、原儿茶酸、荭草苷、异绿原酸 B、新绿原酸。

2.6 聚类分析

为了研究产地与含量之间的关系,以 21 个共有峰的相对峰面积为变量,采用 HCA 分析方法,通过 SPSS 26 软件采用平方欧式距离为测量度对 18 批牡荆叶样品进行聚类分析(图 3)。图 3 结果表明,当欧式距离为 4 左右时,药材可分为 3 类,即测定的 10 个化合物总含量分别为 13.06~31.69、38.01~41.03、78.99 mg·g⁻¹。河北产地药材为 13.06~31.69 mg·g⁻¹,而广东和广西的在分类中存在交叉情况。

2.7 总峰面积、总酚含量、总黄酮含量及体外抗氧化实验结果

18 批牡荆叶 HPLC-ECD 总峰面积、总酚、总黄酮含量及体外抗氧化实验结果见表 4。由表 4 可知,不同批次牡荆叶的总酚、总黄酮类化合物存在较大差异,其含量分别为 15.82~61.83 mg·g⁻¹和 27.85~157.65 mg·g⁻¹。牡荆叶具有一定的 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、氧自由基吸收能力及铁离子还原能力,说明牡荆叶 80% 甲醇提取物具有一定抗氧化活性。

2.8 谱-效关系分析

2.8.1 皮尔逊相关分析 对牡荆叶 HPLC-ECD 样品的总峰面积、总酚含量、总黄酮含量分别与体外

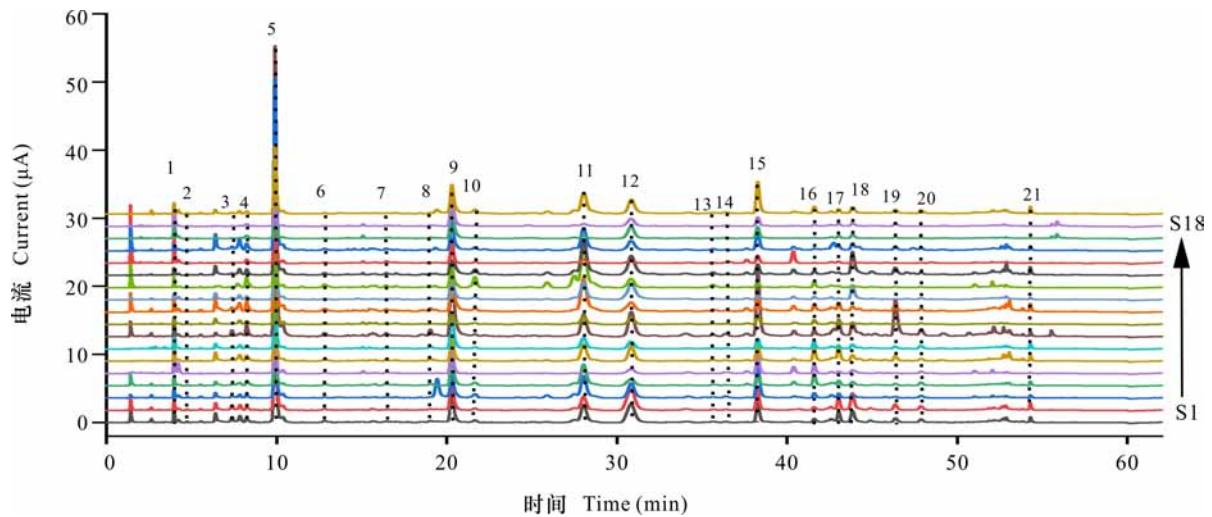


图 1 18 批牡荆叶指纹图谱

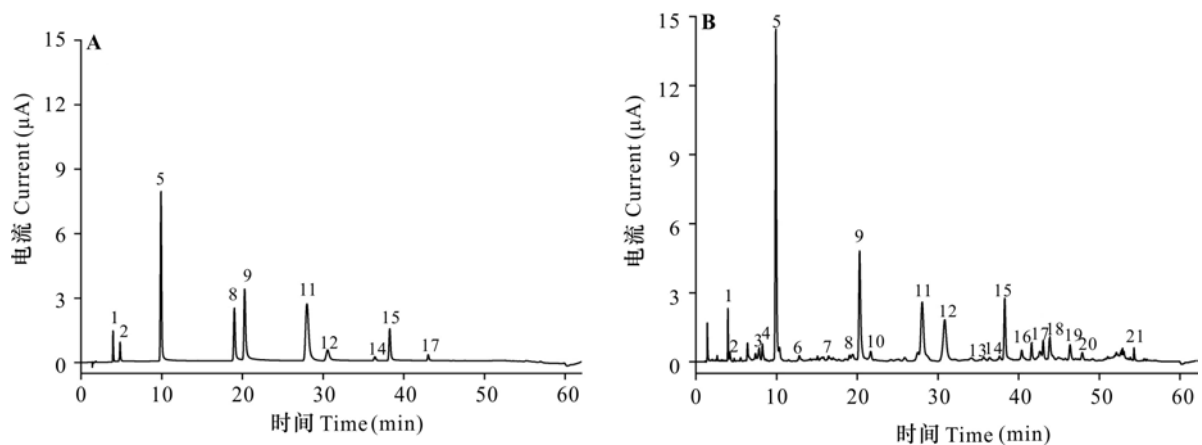
Fig. 1 Fingerprints of 18 batches of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves

图 2 混合标准品图 (A) 和对照指纹图谱 (B)

Fig. 2 Chromatograms of mixed reference substance (A) and reference fingerprint (B)

抗氧化活性进行皮尔逊相关分析比较,结果见表 5。

由表 5 可知,牡荆叶中总酚、总黄酮含量分别与 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、ORAC 氧自由基吸收能力及铁离子还原能力均呈显著正相关,相关系数大于 0.77。ECD 检测器可选择性地检测具有氧化还原性质的化合物,同时,分析结果表明 HPLC-ECD 样品中总峰面积与总酚、总黄酮的含量和体外抗氧化活性均呈显著正相关。

2.8.2 灰度关联分析 采用均值化法对原始数据进行无量化处理。以不同批次牡荆叶的抗氧化结果作为母序列,以共有峰峰面积作为子序列,分辨系数 ρ 取 0.5,按照文献(帖晓燕等,2021; Du et

al., 2021)的方法计算共有峰与药效之间灰度关联度系数(r)的大小,结果见表 6。

由表 6 可知,牡荆叶中的共有峰与各抗氧化活性的关联度很高,关联度均大于 0.79,表明牡荆叶的抗氧化活性是多种化合物的协同作用结果。以 4 种抗氧化活性关联度的平均值计算,关联度最高的 10 个峰依次为峰 9(异荭草苷)>峰 4>峰 2(新绿原酸)>峰 5(绿原酸)>峰 6>峰 11(异牡荆素)>峰 20>峰 12(木犀草苷)>峰 15(异绿原酸 A)>峰 14(异绿原酸 B)。

2.8.3 PLSR 分析 PLSR 分析是以典型相关分析、主成分分析和多元线性回归分析方法为基础的多元统计方法,能反映共有峰对药效指标的综合贡

表 2 10 种化合物的线性回归方程、检测限和加标回收率
Table 2 Linear regression equations, LODs and recoveries of the 10 compounds

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限 LOD ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
原儿茶酸 Protocatechuic acid	$y = 23.345x + 0.788$	0.999 0	0.4~20	2.2	91.68	3.67
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$y = 7.038x + 0.702$	0.999 6	0.2~10	6.7	90.13	5.14
绿原酸 Chlorogenic acid	$y = 6.570x + 4.532$	0.999 1	12~600	5.1	99.56	1.47
荭草苷 Orientin	$y = 5.040x - 0.530$	0.999 6	0.15~18	11.6	92.73	6.15
异荭草苷 Isoorientin	$y = 4.780x + 2.042$	0.999 2	8~400	8.2	99.41	2.58
异牡荆素 Isovitexin	$y = 7.551x - 1.175$	0.999 5	2~200	30.4	91.05	6.41
木犀草苷 Luteoloside	$y = 4.965x + 2.011$	0.999 7	6~300	10.5	94.59	3.76
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	$y = 8.760x + 2.223$	0.999 7	0.3~15	15.4	92.24	4.36
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	$y = 7.210x + 2.104$	0.999 7	4~200	16.7	99.06	3.98
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	$y = 10.000x + 2.098$	1.000 0	0.6~30	16.5	93.26	5.03

表 3 牡荆叶 10 种化合物的含量测定
Table 3 Content determination of the 10 compounds in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves

样品 编号 Sample number	含量 Content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)									
	原儿茶酸 Protoca- techuic acid	新绿原酸 Neochlo- rogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	荭草苷 Orientin	异荭草苷 Isoorientin	异牡荆素 Isovitexin	木犀草苷 Luteoloside	异绿原酸 B Isochlo- rogenic acid B	异绿原酸 A Isochlo- rogenic acid A	异绿原酸 C Isochlo- rogenic acid C
S1	0.159	0.036	5.884	0.079	5.022	6.528	3.478	0.037	0.593	0.067
S2	0.205	0.077	15.773	0.174	7.200	3.404	9.025	0.116	2.495	0.738
S3	0.141	0.074	14.474	0.134	7.165	2.327	10.734	0.117	2.507	0.872
S4	0.141	0.094	10.753	0.022	4.973	3.789	5.753	0.246	5.642	0.281
S5	0.121	0.051	5.850	0.216	7.068	3.609	2.882	0.087	1.240	0.281
S6	0.634	0.067	5.726	0.009	5.396	0.190	1.865	0.303	2.337	0.147
S7	0.171	0.060	7.322	0.334	6.008	3.295	5.980	0.121	2.246	1.259
S8	0.332	0.038	6.962	0.283	8.493	2.038	2.997	0.085	1.438	0.158
S9	0.246	0.099	33.402	0.936	19.352	4.331	9.323	0.404	9.622	1.272
S10	0.104	0.048	6.010	0.041	2.449	1.389	2.629	0.089	1.432	0.258
S11	0.228	0.083	15.073	0.396	11.089	6.432	4.279	0.122	1.877	0.543
S12	0.090	0.027	8.912	0.154	6.621	3.685	8.603	0.042	0.541	0.055
S13	0.114	0.054	15.058	0.159	9.093	6.671	8.369	0.061	1.375	0.074
S14	0.453	0.053	5.139	0.018	4.365	0.591	1.175	0.109	1.033	0.119
S15	0.094	0.067	18.572	0.049	6.994	4.768	4.061	0.081	3.161	0.167
S16	0.542	0.059	4.162	0.128	9.503	0.480	5.002	0.119	1.626	0.184
S17	0.368	0.052	2.686	0.121	7.697	0.541	3.210	0.106	1.086	0.171
S18	0.155	0.056	7.269	0.057	6.491	3.758	6.163	0.201	4.714	0.285

献程度,相关系数大于 0,表明二者之间呈正相关,反之为负相关;在重要投影(VIP)模型中,VIP 值>1,表明该成分对模型有显著影响(刘晓燕等,2020)。本研究以不同批次的牡荆叶 HPLC-ECD

指纹图谱中各共有峰的峰面积为自变量(X),以不同批次牡荆叶的抗氧化结果为因变量(Y),采用 SIMCA 14.1 软件进行 PLSR 分析,计算 X 对应 Y 的回归系数和 VIP 值,结果见图 4。

表 4 总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性的结果

Table 4 Results of total peak areas, total phenolics, total flavonoids and *in vitro* antioxidant activities

样品编号 Sample number	总峰面积 Total peak area (nA · min)	总酚含量 Total phenolics content (mg · g ⁻¹)	总黄酮含量 Total flavonoids content (mg · g ⁻¹)	FRAP 值 FRAP value (mg · g ⁻¹)	ORAC 值 ORAC value (mg · g ⁻¹)	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate (%)	ABTS 清除率 ABTS scavenging rate (%)
S1	8 921.67	35.21	77.26	92.91	220.86	40.34	38.15
S2	11 047.03	35.28	78.14	99.08	221.27	36.50	38.24
S3	11 024.16	33.29	74.78	89.70	203.30	33.77	33.75
S4	9 703.31	34.23	75.84	74.75	217.58	31.58	33.23
S5	6 908.73	32.07	67.49	89.16	188.09	35.81	34.01
S6	5 764.26	20.03	37.14	56.18	232.16	19.91	19.99
S7	8 263.87	31.18	69.91	79.54	182.19	34.68	28.29
S8	6 379.86	29.30	61.48	76.78	200.75	31.46	29.05
S9	22 019.76	61.83	157.65	185.33	352.21	90.28	55.84
S10	4 443.38	22.45	49.98	57.44	151.37	18.97	18.88
S11	11 748.60	50.41	114.09	151.63	234.40	43.44	50.38
S12	7 653.31	28.20	58.61	80.79	185.06	21.50	32.07
S13	12 236.62	38.90	83.07	102.04	250.55	26.46	31.31
S14	4 427.90	20.07	40.34	51.71	175.67	11.31	19.43
S15	11 131.31	42.73	98.16	92.83	282.50	44.67	39.29
S16	5 353.85	17.70	32.44	49.58	128.46	8.26	13.40
S17	4 229.23	15.82	27.85	37.46	184.05	14.22	13.48
S18	8 484.97	27.68	59.39	71.44	194.95	30.00	27.20

表 5 总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性的相关系数

Table 5 Correlation coefficients among total peak areas, total phenolics, total flavonoids and *in vitro* antioxidant activities

	总峰面积 Total peak area	总酚含量 Total phenolics content	总黄酮含量 Total flavonoids content	FRAP 值 FRAP value	ORAC 值 ORAC value	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate	ABTS 清除率 ABTS scavenging rate
总峰面积 Total peak area	1						
总酚含量 Total phenolics content	0.929**	1					
总黄酮含量 Total flavonoids content	0.943**	0.995**	1				
FRAP 值 FRAP value	0.915**	0.969**	0.966**	1			
ORAC 值 ORAC value	0.870**	0.840**	0.844**	0.786**	1		
DPPH 清除率 DPPH scavenging rate	0.910**	0.916**	0.940**	0.900**	0.852**	1	
ABTS 清除率 ABTS scavenging rate	0.863**	0.964**	0.951**	0.945**	0.778**	0.888**	1

注：**表示相关性显著($P < 0.01$)。
Note: ** indicates a significant correlation ($P < 0.01$).

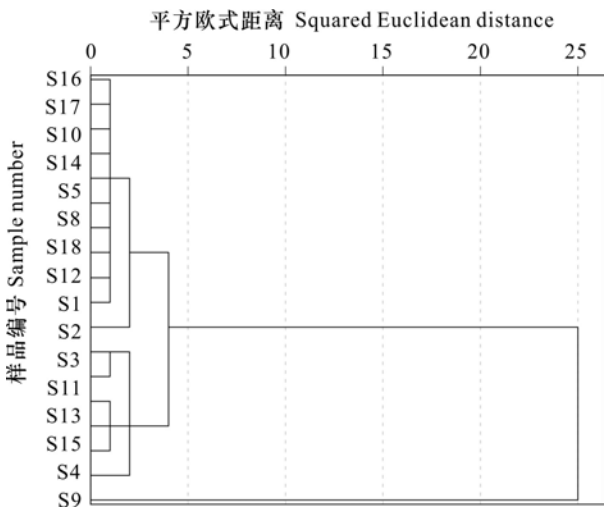


图 3 牡荆叶系统聚类分析

Fig. 3 HCA of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves

由图 4 可知,峰 1(原儿茶酸)和峰 16 与抗氧化效果呈负相关,其余共有峰在 PLSR 模型中与各抗氧化活性的回归系数均呈正相关。共有峰与抗氧化活性呈正相关且 VIP 值大于 1 的峰有 3、4、5(绿原酸)、6、8(荭草苷)、9(异荭草苷)、19、20。

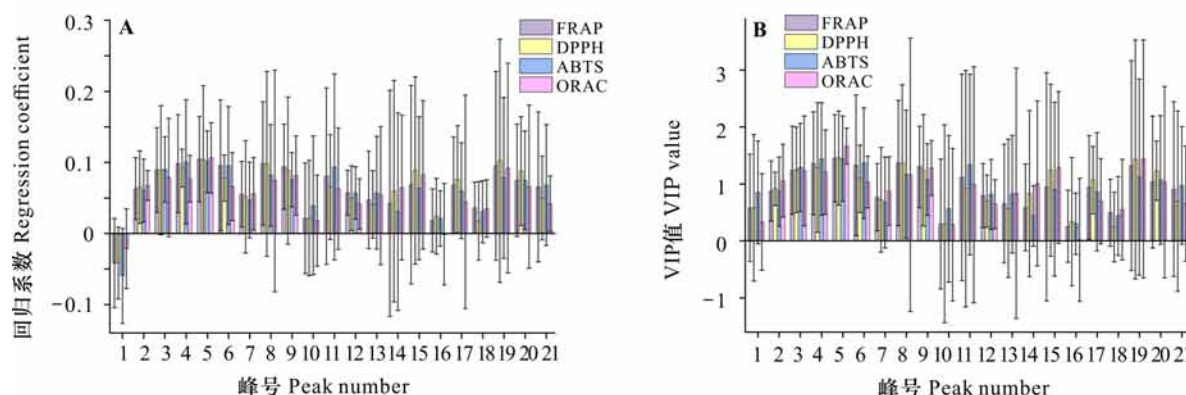
3 讨论与结论

本研究建立了 18 批牡荆叶药材的 HPLC-ECD 指纹图谱,提取出 21 个共有峰,相似度在 0.816 以上,说明不同来源的牡荆叶样品质量较为相近。通过参考文献(罗娅君等,2011; Huang et al., 2015)等资料,借助超高效液相色谱串联质谱仪定性和标准品进行比较,共指认出 10 个峰,并对其定量分析,结果表明牡荆叶主要成分为绿原酸、异荭草苷、木犀草苷和异牡荆素等。通过 HCA

表 6 关联度结果

Table 6 Correlation results

峰号 Peak number	FRAP 关联度系数 <i>r</i> of FRAP	峰号 Peak number	ORAC 关联度系数 <i>r</i> of ORAC	峰号 Peak number	DPPH 关联度系数 <i>r</i> of DPPH	峰号 Peak number	ABTS 关联度 系数 <i>r</i> of ABTS
9	0.933	2	0.942	5	0.908	4	0.922
4	0.931	9	0.929	9	0.903	2	0.919
6	0.915	4	0.908	4	0.900	9	0.919
2	0.910	6	0.903	20	0.889	6	0.916
5	0.909	5	0.900	2	0.888	5	0.914
11	0.889	14	0.890	11	0.879	11	0.906
12	0.878	12	0.887	6	0.879	12	0.888
20	0.875	11	0.884	15	0.868	20	0.884
15	0.867	15	0.880	3	0.865	3	0.873
7	0.866	20	0.872	21	0.860	15	0.871
3	0.862	10	0.862	14	0.854	13	0.867
14	0.861	7	0.861	12	0.852	10	0.865
21	0.860	13	0.859	16	0.850	21	0.864
10	0.855	16	0.858	17	0.849	7	0.864
13	0.854	1	0.853	7	0.845	14	0.860
8	0.850	3	0.852	13	0.844	16	0.855
17	0.849	18	0.845	19	0.841	17	0.848
19	0.849	21	0.843	10	0.836	18	0.847
16	0.845	19	0.843	8	0.835	19	0.846
18	0.840	8	0.839	18	0.807	8	0.845
1	0.816	17	0.833	1	0.792	1	0.821



FRAP 表示铁离子还原能力; DPPH 表示 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力; ABTS 表示 2, 2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基清除能力; ORAC 表示氧自由基吸收能力。

FRAP indicates the ferric ion reducing antioxidant power; DPPH indicates the free radical scavenging ability of 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine; ABTS indicates the free radical scavenging ability of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ORAC indicates the oxygen radical absorbance capacity.

图 4 牡荆叶各共有峰与抗氧化活性的 PLSR 模型回归系数 (A) 和 VIP 值 (B)

Fig. 4 Regression coefficients (A) and VIP values (B) between common peaks and antioxidant activities in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* leaves analyzed by PLSR model

分析可知,牡荆叶药材可能受到采收季节、气候和新老叶等的影响,样品分类存在产地交叉情况,而我们所测定化合物的含量差异可能对样品分类起着相对重要的作用。

对牡荆叶进行体外抗氧化实验并进行皮尔逊相关分析比较,结果表明牡荆叶具有较强的抗氧化活性,样品中的总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性相互之间均呈显著相关性,这与前人的研究结果 (Hu et al., 2015; Wang et al., 2022) 相符,说明总酚、总黄酮可能是牡荆叶抗氧化活性的主要化合物, HPLC-ECD 能够检测牡荆叶中的抗氧化活性物质。借助 GRA 和 PLSR 分析方法对牡荆叶的共有峰与抗氧化活性进行谱-效关系研究。GRA 分析结果表明牡荆叶的抗氧化活性是多种成分协同作用产生的,同时,结合 PLSR 分析,对牡荆叶抗氧化活性贡献最大的为峰 9 (异荭草苷),其次为峰 4 和峰 5 (绿原酸)。绿原酸已被报道可能是区分牡荆不同药用部位的潜在化学标志物,能作为牡荆质量控制的定量指标之一 (Hu et al., 2015),其具有多种功能的生物活性,如抗氧化、抗炎、抗菌等 (王文龙等, 2017)。同时, Deepha 等 (2014) 研究表明异荭草苷因含有 3'-OH 的 B 环、分子内氢键、O-H 等结构,在药物植物中表现出很强的抗氧化活性 (Deepha et al., 2015)。因

此,现有研究可反向说明该谱-效关系结果的准确性。

综上所述,本研究首次基于 HPLC-ECD 建立牡荆叶药材的指纹图谱,本方法筛选得到的抗氧化活性化合物主要为绿原酸类化合物和黄酮类化合物,化合物含量差异对样品分类有一定的影响,其中异荭草苷和绿原酸对牡荆叶药材抗氧化作用有重要贡献。本方法可为牡荆叶药材关键成分的质量控制及质量标志物筛选提供参考,对牡荆叶药材的质量评价体系的完善具有重要意义。

参考文献:

- AATI H, EL-GAMAL A, KAYSER O, 2018. Chemical composition and biological activity of the essential oil from the root of *Jatropha pelargoniifolia* Courb. native to Saudi Arabia [J]. Saudi Pharm J, 27(1): 88-95.
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Pharmacopoeia of China: Vol. I [M]. 2020 ed. Beijing: China Medical Science Press: 1037. [国家药典委员会, 2020. 中国药典: 一部 [M]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社: 1037.]
- Compilation of China's Medicinal Herb Writing Group, 1996. Compilation of China's medicinal herb: Vol. 1 [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Press: 792. [《全国中草药汇编》编写组, 1996. 全国中草药汇编: 上册 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社: 792.]

- DEEPA V, PRAVEENA R, SADASIVAM K, 2015. DFT studies on antioxidant mechanisms, electronic properties, spectroscopic (FT-IR and UV) and NBO analysis of C-glycosyl flavone, an isoorientin [J]. J Mol Struct, 1082: 131–142.
- DEEPA V, PRAVEENA R, SIVAKUMAR R, et al., 2014. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globos* [J]. Spectrochim Acta Part A, 121: 737–745.
- DU WF, ZHU WH, GE WH, et al., 2021. Research on the effect of spleen-invigorating and anti-swelling active ingredients in crude and processed *Coix* seed based on Spectrum-Effects relationship combined with chemometrics [J]. J Pharm Biomed Anal, 205: 114–350.
- DŽUGAN M, TOMCZYK M, SOWA P, et al., 2018. Antioxidant activity as biomarker of honey variety [J]. Molecules, 23(8): 2069–2082.
- HE JM, YIN TP, CHEN Y, et al., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers of *Pyrus pashia* [J]. J Funct Foods, 17: 371–379.
- HUANG MQ, ZHANG YP, XU SY, et al., 2015. Identification and quantification of phenolic compounds in *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Siebold et Zucc.) Hand.-Mazz. using liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometers [J]. J Pharm Biomed Anal, 108: 11–20.
- HU P, LI DH, WANG KB, et al., 2015. New phenolic compounds from *Vitex negundo* var. *heterophylla* and their antioxidant and NO inhibitory activities [J]. J Funct Foods, 19: 174–181.
- LIU XY, JIANG YP, ZHANG JB, et al., 2020. Establishment of HPLC fingerprint and its spectrum-effect relationship study of *Humulus lupulus* [J]. Chin Pharm, 31(2): 138–143. [刘晓燕, 蒋益萍, 张嘉宝, 等, 2020. 啤酒花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究 [J]. 中国药房, 31(2): 138–143.]
- LUO M, GU W, HE T, et al., 2020. Determination of three constituent in *Ligustri Lucidi Fructus* by ultra-high performance liquid chromatography-electrochemical detection [J]. Chin Pharm J, 55(24): 2006–2011. [罗敏, 顾雯, 何婷, 等, 2020. 超高效液相色谱-电化学检测法测定女贞子中的 3 种成分 [J]. 中国药学杂志, 55(24): 2006–2011.]
- LUO YJ, BIAN QQ, CHEN J, et al., 2011. Determination of vitexin in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* by HPLC [J]. Guihaia, 31(3): 418–421. [罗娅君, 边清泉, 陈佳, 等, 2011. HPLC 法测定牡荆中牡荆素的含量 [J]. 广西植物, 31(3): 418–421.]
- SHU BY, PENG XY, WEI WK, et al., 2020. Progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* [J]. Progr Veter Med, 41(5): 105–110. [舒柄垚, 彭新宇, 魏文康, 等, 2020. 牡荆的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展, 41(5): 105–110.]
- TIE XY, DAI HR, XIN GX, et al., 2021. Spectrum-effect relationship of petroleum ether fraction of *Aconitum sinomontanum* for promoting *qi* before and after steaming with licorice juice based on grey correlation analysis [J]. Chin Trad Herb Drugs, 52(5): 1303–1311. [帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等, 2021. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系 [J]. 中草药, 52(5): 1303–1311.]
- WANG JM, YAO C, LI CQ, et al., 2017. Spectrum-effect relation of antioxidant activity of Flos Carthami based on DPPH, ABTS and FRAP assay [J]. Chin Pharm J, 52(10): 825–831. [王金梅, 姚辰, 李昌勤, 等, 2017. 基于 DPPH、ABTS 和 FRAP 法的红花抗氧化谱效关系研究 [J]. 中国药学杂志, 52(10): 825–831.]
- WANG Q, XIAO XQ, DONG W, et al., 2017. Spectrum-effect relationship on expectorant efficacy of *Siraitia grosvenorii* [J]. Guihaia, 37(5): 606–609. [王勤, 肖喜泉, 董威, 等, 2017. 罗汉果祛痰作用谱效关系研究 [J]. 广西植物, 37(5): 606–609.]
- WANG WL, WEN CY, GUO QP, et al., 2017. Biological properties of chlorogenic acid and its mechanism of action [J]. Chin J Anim Nutr, 29(7): 2220–2227. [王文龙, 文超越, 郭秋平, 等, 2017. 绿原酸的生物活性及其作用机制 [J]. 动物营养学报, 29(7): 2220–2227.]
- WANG MY, ZHANG P, ZHANG YZ, et al., 2022. Chemical fingerprinting, quantification, and antioxidant activity evaluation of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. flowers by UPLC-ECD [J]. Int J Food Prop, 25(1): 648–660.
- XIANG R, SHU BY, GAO Y, et al., 2021. Chemical constituents and free radical scavenging ability of *Vitex tract* [J]. Chin J Vet Sci, 41(6): 1146–1153. [向蓉, 舒柄垚, 高原, 等, 2021. 牡荆提取物主要化学成分分析及自由基清除能力 [J]. 中国兽医学报, 41(6): 1146–1153.]
- XU WS, LI D, LIU J, et al., 2014. Study on antioxidant activities of 12 kinds of fruit [J]. Food Ind, 35(1): 247–250. [徐维盛, 李东, 刘静, 等, 2014. ORAC 法对 12 种水果总抗氧化能力评价研究 [J]. 食品工业, 35(1): 247–250.]
- YAN CC, ZHANG JF, 2020. Research status of traditional Chinese medicine based on spectrum effect correlation technology [J]. Mod Chin Med, 22(10): 1735–1740. [晏朝操, 张建锋, 2020. 基于谱效关联技术的中药研究现状 [J]. 中国现代中药, 22(10): 1735–1740.]
- ZHANG L, TU ZC, WANG H, et al., 2015. Metabolic profiling of antioxidants constituents in *Artemisia selengensis* leaves [J]. Food Chem, 186(1): 123–132.
- ZHANG P, CHUN Z, SHAO Q, et al., 2021. Evaluation of the phytochemicals and antioxidant activity of *Lophatherum gracile* brongn based on chemical fingerprinting by HPLC with electrochemical detection [J]. J Sep Sci, 44(20): 3777–3788.

(责任编辑 邓斯丽 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202202008

马文杰, 苏志维, 马仲辉, 2023. 全缘叶紫珠化学成分研究 [J]. 广西植物, 43(6): 1135–1144.

MA WJ, SU ZW, MA ZH, 2023. Chemical constituents of *Callicarpa integerrima* [J]. *Guihaia*, 43(6): 1135–1144.

全缘叶紫珠化学成分研究

马文杰^{1,2}, 苏志维^{2*}, 马仲辉¹

(1. 广西大学 农学院/广西甘蔗生物重点实验室/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/广西大学中草药资源与中药农业研究所, 南宁 530004; 2. 广西中医药大学 海洋药物研究院, 南宁 530200)

摘要: 全缘叶紫珠 (*Callicarpa integerrima*) 具有祛风散结和治风湿痹痛的功效, 但目前对其化学成分的报道较少。为探究全缘叶紫珠根、茎的化学成分, 该研究利用硅胶柱层析色谱、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析色谱、ODS 反相硅胶柱层析色谱以及高效液相色谱等现代分离方法对全缘叶紫珠根和茎的 95% 乙醇提取物进行系统的分离纯化, 并运用 NMR 和 ESI-MS 等现代波谱技术对化合物进行结构鉴定。结果表明: 从全缘叶紫珠根和茎的 95% 乙醇提取物中共鉴定了 15 个化合物分别为豆甾烷-4-烯-3-酮 (1)、(24*R*)-5 α -豆甾烷-3,6-二酮 (2)、2'-羟基-4'-甲氧基二氢查尔酮 (3)、 α -香树脂醇 (4)、 β -谷甾醇 (5)、熊果酸 (6)、对羟基间甲氧基苯甲酸 (7)、4-羟基吡啶 (8)、对羟基苯甲酸 (9)、连翘酯苷 B (10)、nepetifosides D (11)、异毛蕊花苷 (12)、毛蕊花苷 (13)、pedicularioside M (14)、 β -甲氧基连翘酯苷 B (15)。除化合物 4-6、12 和 13 外, 其他化合物均为首次从全缘叶紫珠植物中分离得到, 其中化合物 1、2、3、8、11 和 14 为首次从紫珠属植物中分离得到。该研究结果丰富了全缘叶紫珠植物的化合物库, 为该药用植物的进一步开发利用奠定了科学基础。

关键词: 紫珠属, 全缘叶紫珠, 化学成分, 苯乙醇苷类, 三萜类**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2023)06-1135-10

Chemical constituents of *Callicarpa integerrima*

MA Wenjie^{1,2}, SU Zhiwei^{2*}, MA Zhonghui¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University / Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology / State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources / Traditional Chinese Herbal Medicine Resources and Agriculturalization Research Institute, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: *Callicarpa integerrima* has very good effects in removing blood stasis and resolving static blood and treatment of rheumatism evil. However, there are few reports on its chemical constituents. In order to explore the chemical constituents from the roots and stems of *C. integerrima*, the 95% ethanol extracts of *C. integerrima* roots and stems were isolated and purified by diverse column chromatography, such as silica gel, Sephadex LH-20 gel column, ODS column

收稿日期: 2022-05-03**基金项目:** 国家自然科学基金 (31760045, 31970220); 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA281132, 2018GXNSFAA281146); 广西甘蔗生物学重点实验室开放课题项目 (GXKLSCB-202004)。**第一作者:** 马文杰 (1996-), 硕士研究生, 主要从事药用植物天然产物化学研究, (E-mail) mawenjie1018@163.com。***通信作者:** 苏志维, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学等研究, (E-mail) suzw@gxtcmu.edu.cn。

chromatography, and preparative HPLC. In addition, these compounds were identified on the basis of NMR, ESI-MS as well as other modern spectral techniques. The results were as follows: A total of 15 compounds were isolated from the 95% ethanol extracts of the roots and stems of *C. integerrima*, which were identified as stigmast-4-en-3-one (**1**), (24*R*)-5 α -stigmastane-3,6-dione (**2**), 2'-hydroxy-4'-methoxydihydrochalcone (**3**), α -amyrin (**4**), β -sitosterol (**5**), ursolic acid (**6**), 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (**7**), 4-pyridinol (**8**), *p*-hydroxybenzoic acid (**9**), forsythoside B (**10**), nepetifosides D (**11**), isoacteoside (**12**), acteoside (**13**), pedicularioside M (**14**), β -methoxy forsythoside B (**15**). All compounds, except for compounds **4-6**, **12** and **13**, were isolated from *C. integerrima* for the first time. Furthermore, compounds **1**, **2**, **3**, **8**, **11** and **14** were isolated from the genus of *Callicarpa* for the first time. Therefore, the results of this research has enriched the compound library and afford a scientific foundation for the further rational use of *C. integerrima*.

Key words: *Callicarpa*, *Callicarpa integerrima*, chemical constituents, phenylethanoids, triterpenoids

紫珠属植物具有悠久的药用历史,首载于《本草拾遗》,民间常用于止血和解毒,该属植物的化学成分主要有萜类、苯乙醇苷类、黄酮类,具有止血、抗菌、抗炎、改善记忆力等药理作用(占丽丽等,2020)。目前,《中国药典》(2020)收录了4种紫珠属植物,即广东紫珠、裸花紫珠、大叶紫珠、杜虹花。以这4种紫珠属植物为主要药效成分研发的临床药物已得到了广泛应用,如以广东紫珠为主要成分的抗宫炎胶囊和抗宫炎片,以裸花紫珠为主要成分的裸花紫珠片、裸花紫珠抑菌凝胶、裸花紫珠颗粒、裸花紫珠胶囊等,以大叶紫珠为主要成分的紫地宁血散和三七血伤凝胶,以杜虹花为主要成分的11号止血粉、痔疮消颗粒和妇炎灵胶囊等(莫霞和李瑶,2019;邬秋萍等,2019)。由此可见,紫珠属植物资源的开发利用具有广阔的发展空间。

全缘叶紫珠(*Callicarpa integerrima*)为唇形科紫珠属罕见的藤本型植物,系我国特有种(王雪芬等,1986),常生长于海拔200~700 m的山坡或谷地林中,主要分布于广西、广东、江西、福建等省(区)(《中国植物志》编辑委员会,1982)。全缘叶紫珠的根和叶入药,具有祛风散结、治风湿痹痛的作用(柴玲等,2010)。目前已从全缘叶紫珠中发现二萜类、三萜类、黄酮类、挥发油等化学成分(王雪芬等,1986;柴玲等,2010;祝晨蓀等,2012;Di et al., 2021)。数十年来,国内外的研究重点集中在该属小乔木型、灌木型植物,如裸花紫珠、广东紫珠和杜虹花等个别种类的化学及药理活性研究,而对该属罕见的藤本型植物全缘叶紫珠的化学成分研究却很少报道,且其药效物质基础仍不明确。

全缘叶紫珠作为我国南方民间常用药,明确其化学成分是其用药安全和资源开发的根本前提。因此,为了更好地了解和应用全缘叶紫珠这一药用植物,阐明其化学成分组成和药理药效基础,进而深入开发利用这一特色资源,该研究从全缘叶紫珠的根、茎提取物中共鉴定了15个化合物(图1),分别鉴定为豆甾烷-4-烯-3-酮(**1**)、(24*R*)-5 α -豆甾烷-3,6-二酮(**2**)、2'-羟基-4'-甲氧基二氢查尔酮(**3**)、 α -香树脂醇(**4**)、 β -谷甾醇(**5**)、熊果酸(**6**)、对羟基间甲氧基苯甲酸(**7**)、4-羟基吡啶(**8**)、对羟基苯甲酸(**9**)、连翘酯苷B(**10**)、nepetifosides D(**11**)、异毛蕊花苷(**12**)、毛蕊花苷(**13**)、pedicularioside M(**14**)、 β -甲氧基连翘酯苷B(**15**)。除化合物**4-6**、**12**、**13**外,其他化合物均为首次从全缘叶紫珠植物中分离得到,其中化合物**1**、**2**、**3**、**8**、**11**、**14**为首次从紫珠属植物中分离得到。这些化合物的发现,丰富了紫珠属植物的化合物库,为进一步系统地探究全缘叶紫珠的药理活性以及作用机制奠定了基础,也为更加合理地开发和利用紫珠属药用植物资源提供了科学依据。

1 仪器与材料

DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);SHB-ⅢA 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);AR224CN(上海电子分析天平奥豪斯仪器有限公司);CX-1000A 粉碎机(上海市晟喜制药机械有限公司);3510E-DTH 超声波清洗机(美国必能信公司);KQ-800DE

数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AVIII HD 600 和 AVIII 500 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);岛津 LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪(日本岛津公司);数显恒温水浴锅 HH-S4(常州金坛良友仪器有限公司);郑州长城 DLSB-10/20 低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司);上海 EYELA OSB-2200 小型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);WFH-203B 暗箱式紫外分析仪(杭州齐威仪器有限公司);MCI GEL CHP20P 树脂填料(日本三菱化学公司);ODS 反相色谱填料 C18 MB100-40/75(富士化学有限公司);分析型 HPLC 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);半制备型 HPLC 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μ m);优普 UPH-II-20T 纯水机(南京优普仪器设备有限公司);柱色谱硅胶(100~200 目、200~300 目,烟台江友硅胶开发有限公司);GF254 薄层层析硅胶板(青岛谱科分离材料有限公司);显色剂为 10%硫酸乙醇溶液,浸湿后加热显色;聚酰胺(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(40~70 μ m, GE healthcare)。

石油醚、正丁醇购于天津富宇精细化工有限公司,乙酸乙酯购于天津大茂化学试剂厂,甲醇、二氯甲烷、氯仿购于上海泰坦化学有限公司,上述所用试剂均为分析纯级别;氘代试剂购于 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;色谱纯乙腈、甲醇均购于上海星可高纯溶剂有限公司。

本实验所用全缘叶紫珠植物样品于 2019 年 4 月采自广东省广州市从化区温泉镇温泉派出所附近,经广西大学农学院马仲辉副教授鉴定为唇形科紫珠属植物全缘叶紫珠(*Callicarpa integerrima*)。凭证标本(采集号:20190426)保存于广西大学农学院植物标本室(GAUA)。

2 提取分离

将阴干的全缘叶紫珠根 0.55 kg、茎 9.78 kg 分别粉碎后,用 95%乙醇室温浸泡 1 周后各提取 3 次,提取液经减压浓缩得根部醇提物(41.66 g)、茎部醇提物(448.50 g)。将茎部醇提物(448.50 g)加热水混悬后,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,减压浓缩后得到石油醚部位(46.26 g)、乙酸乙酯部位(72.90 g)和正丁

醇部位(106.56 g)。

取根部乙醇提取物(41.66 g)经聚酰胺柱层析,用甲醇-水(0:100~30:70~50:50~70:30~100:0)梯度洗脱,得到 11 个流分(Fr.1~Fr.11)。流分 Fr.9(1.00 g)经 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇=1:1)纯化,在氯仿甲醇混合液中重结晶,得到化合物 **1**(7.10 mg)和化合物 **2**(11.70 mg),经薄层层析硅胶板进行制备,得到化合物 **3**(2.60 mg)。

取茎部石油醚萃取物(46.26 g)经硅胶柱层析,用石油醚-二氯甲烷(98:2~5:5)梯度洗脱,得到 15 个流分(Fr.1~Fr.15)。流分 Fr.10(5.69 g)经 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇=1:1)、硅胶柱层析(石油醚:二氯甲烷=19:1)、ODS 反相硅胶柱(90%甲醇水)反复纯化,得到化合物 **4**(21.20 mg),在氯仿甲醇混合液中重结晶,得到化合物 **5**(10.11 mg)。Fr.14(6.80 g)经 MCI 柱层析(85%甲醇水)和硅胶柱层析(石油醚:二氯甲烷:甲醇=50:99:1)纯化,得到化合物 **6**(11.40 mg)。

取茎部乙酸乙酯萃取物(72.90 g)经硅胶柱层析,二氯甲烷-甲醇(98:2~5:5)梯度洗脱,得到 13 个流分(Fr.1~Fr.13)。Fr.5(3.64 g)经 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇=1:1)纯化,再经半制备 HPLC,18%乙腈水等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **7**(10.00 mg, t_R =19 min)和化合物 **8**(4.50 mg, t_R =27 min)。Fr.6(2.56 g)经 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇=1:1)纯化,再经半制备 HPLC,20%乙腈水(含 0.1%甲酸)等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **9**(5.22 mg, t_R =15 min)。Fr.12(56.11 g)经硅胶柱层析(二氯甲烷-甲醇=95:5~5:5),中压 ODS 反相柱层析(乙腈-水=15%~100%),Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇=1:1),反复纯化,得到化合物 **10**(69.90 mg)。再经半制备 HPLC,21%乙腈水(含 0.1%甲酸)等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **11**(7.04 mg, t_R =52 min);34%甲醇水等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **12**(40.00 mg, t_R =31 min);35%甲醇水等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **13**(94.00 mg, t_R =20 min)和化合物 **14**(13.00 mg, t_R =27 min);15%乙腈水(含 0.1%甲酸)等度制备,流速 2 mL·min⁻¹,得到化合物 **15**(10.62 mg, t_R =36 min)。

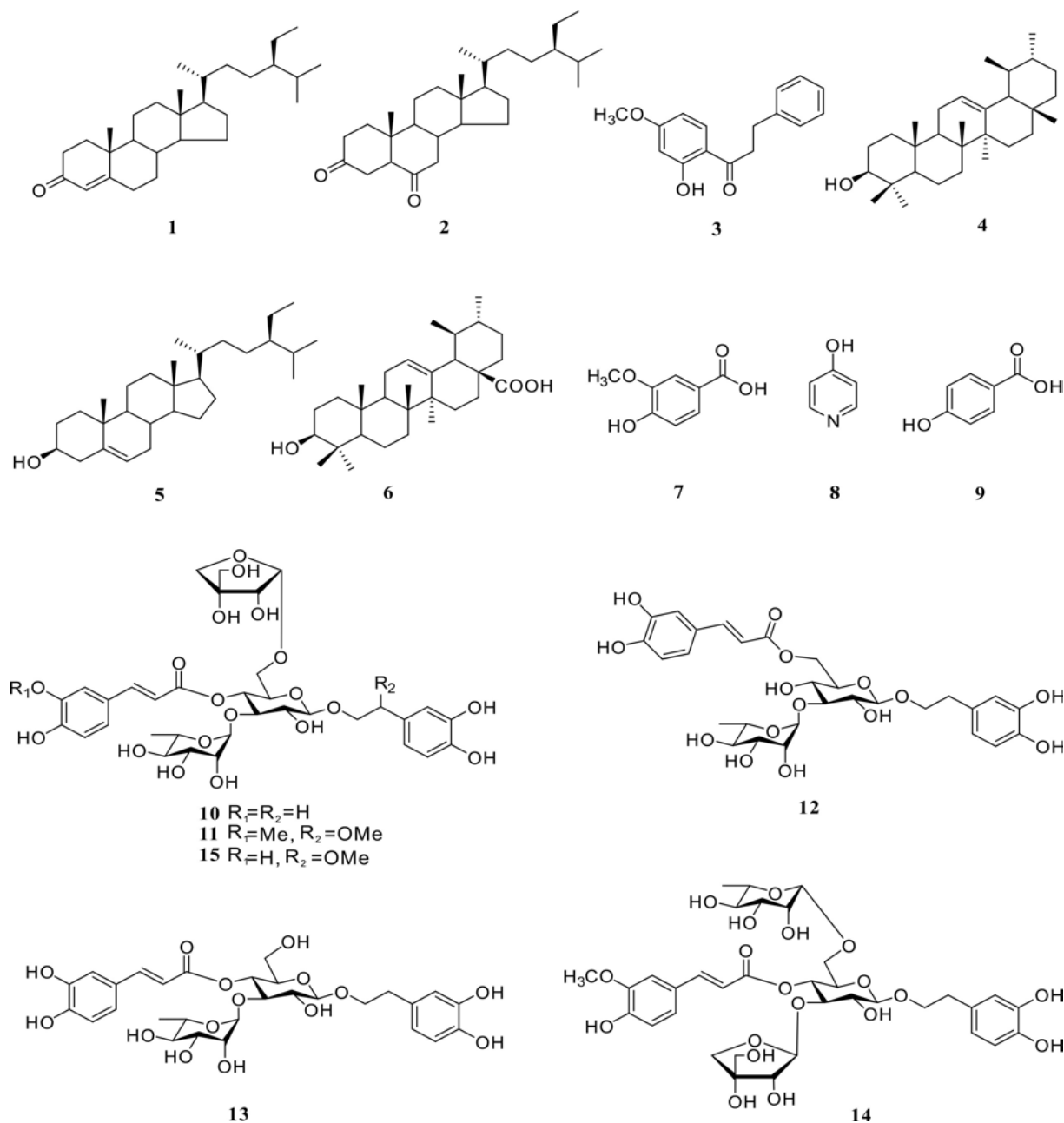


图 1 化合物 1-15 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-15

3 结构鉴定

化合物 1 白色针晶状结晶, 分子式为 $C_{29}H_{48}O$ 。ESI-MS m/z : 413.37 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 5.74 (1H, s, H-4), 0.92 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 0.86 (3H, t, $J = 8.1$ Hz, H-29), 0.85 (3H, d, $J =$

7.1 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.70 (3H, s, H-18)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 198.8 (C-3), 171.6 (C-5), 123.9 (C-4), 56.1 (C-17), 55.9 (C-14), 53.8 (C-9), 45.9 (C-24), 42.3 (C-13), 39.8 (C-10, C-12), 38.7 (C-8), 36.1 (C-20), 35.6 (C-1), 33.9 (C-2), 33.8 (C-22), 32.9 (C-6), 32.0 (C-7), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.2 (C-

15), 23.0 (C-28), 21.0 (C-11), 19.9 (C-27), 19.1 (C-26), 18.8 (C-21), 17.6 (C-19), 12.1 (C-18/29)。以上数据与文献 (Abdelhameed et al., 2020) 报道的豆甾烷-4-烯-3-酮 (stigmast-4-en-3-one) 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为豆甾烷-4-烯-3-酮 (stigmast-4-en-3-one)。

化合物 **2** 白色针晶状结晶, 分子式为 $C_{29}H_{48}O_2$ 。ESI-MS m/z : 429.37 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 0.95 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 0.86 (3H, t, $J = 8.1$ Hz, H-29), 0.83 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.70 (3H, s, H-19)。¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 211.4 (C-6), 209.1 (C-3), 57.5 (C-5), 56.6 (C-17), 56.0 (C-14), 53.5 (C-9), 46.6 (C-7), 45.8 (C-24), 43.0 (C-13), 41.2 (C-10), 39.4 (C-2), 38.1 (C-1), 38.0 (C-8), 37.4 (C-12), 37.0 (C-4), 36.0 (C-20), 33.9 (C-22), 29.1 (C-25), 28.0 (C-16), 26.0 (C-23), 24.0 (C-15), 23.0 (C-28), 21.7 (C-11), 19.9 (C-26), 19.1 (C-27), 18.6 (C-21), 12.7 (C-18), 12.1 (C-19/29)。以上数据与文献 (李小军等, 2014) 报道的 (24*R*)-5 α -豆甾烷-3,6-二酮 [(24*R*)-5 α -stigmastane-3,6-dione] 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 (24*R*)-5 α -豆甾烷-3,6-二酮 [(24*R*)-5 α -stigmastane-3,6-dione]。

化合物 **3** 白色无定形粉末, 分子式为 $C_{16}H_{16}O_3$ 。ESI-MS m/z : 257.11 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H : 7.53 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 7.22 (5H, m, H-2/3/4/5/6), 6.36 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-3'), 6.40 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-5'), 3.83 (3H, s, H-4'), 3.22 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H- α), 2.90 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H- β)。¹³C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C : 201.8 (C=O), 164.8 (C-4'), 163.0 (C-2'), 143.1 (C-1), 133.6 (C-6'), 129.5 (C-2/3/5/6), 127.0 (C-4), 113.3 (C-1'), 108.9 (C-3'), 99.9 (C-5'), 56.0 (4'-OCH₃), 46.2 (C- α), 32.2 (C- β)。以上数据与文献 (Edyta et al., 2017) 报道的 2'-羟基-4'-甲氧基二氢查尔酮 (2'-hydroxy-4'-methoxydihydrochalcone) 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 2'-羟基-4'-甲氧基二氢查尔酮 (2'-hydroxy-4'-methoxydihydrochalcone)。

化合物 **4** 白色针状结晶, 分子式为 $C_{30}H_{50}O$ 。ESI-MS m/z : 427.39 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 5.13 (1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 11.3, 4.8$ Hz, H-3), 1.07 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, H-25), 0.91 (3H, s, H-30), 0.87 (3H, s, H-28), 0.80 (3H, s, H-24), 0.74 (3H, d, $J = 11.8$ Hz, H-29)。¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 139.6 (C-13), 124.4 (C-12), 79.1 (C-3), 59.1 (C-18), 55.2 (C-5), 47.7 (C-9), 42.1 (C-14), 41.5 (C-22), 40.0 (C-8), 39.7 (C-19), 39.6 (C-20), 38.8 (C-1), 38.8 (C-4), 36.9 (C-10), 33.8 (C-17), 33.0 (C-7), 31.3 (C-21), 28.8 (C-15), 28.1 (C-23), 28.1 (C-28), 27.3 (C-2), 26.6 (C-16), 23.4 (C-11), 23.3 (C-27), 21.4 (C-29), 18.4 (C-6), 17.5 (C-30), 16.9 (C-26), 15.7 (C-25), 15.6 (C-24)。以上数据与文献 (莫青胡等, 2020) 报道的 α -香树脂醇 (α -amyrin) 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 α -香树脂醇 (α -amyrin)。

化合物 **5** 白色粉末, 分子式为 $C_{29}H_{50}O$ 。ESI-MS m/z : 415.39 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 5.35 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.84 (3H, d, $J = 2.9$ Hz, H-26), 0.83 (3H, m, H-29), 0.81 (3H, m, H-27), 0.69 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.1 (C-17), 50.1 (C-9), 45.9 (C-24), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 36.2 (C-20), 34.0 (C-22), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 31.9 (C-2), 29.2 (C-25), 28.3 (C-16), 26.0 (C-23), 24.3 (C-15), 23.0 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-26), 19.4 (C-19), 19.0 (C-27), 18.8 (C-21), 12.0 (C-29), 11.9 (C-18)。以上数据与文献 (查显进等, 2021) 中报道的 β -谷甾醇 (β -sitosterol) 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 β -谷甾醇 (β -sitosterol)。

化合物 **6** 白色粉末, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。ESI-MS m/z : 457.36 [M + H]⁺。¹H-NMR (600

MHz, CD_3OD) δ_{H} : 5.26 (1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-12), 3.29 (1H, dd, $J = 3.3, 1.6$ Hz, H-3), 1.32 (3H, m, H-27), 1.30 (3H, s, H-29), 1.27 (3H, s, H-24), 1.16 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, m, H-30), 0.83 (3H, s, H-25), 0.75 (3H, s, H-26)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO) δ_{C} : 179.3 (C-28), 138.9 (C-13), 127.1 (C-12), 78.2 (C-3), 55.9 (C-5), 53.6 (C-18), 48.1 (C-17), 48.1 (C-9), 42.6 (C-14), 40.1 (C-8), 39.6 (C-1), 39.5 (C-4), 39.4 (C-19), 39.2 (C-20), 37.5 (C-22), 37.4 (C-10), 33.7 (C-7), 31.1 (C-21), 28.8 (C-23), 28.8 (C-2), 28.2 (C-15), 25 (C-16), 24 (C-11), 23.7 (C-27), 21.4 (C-30), 18.8 (C-6), 17.5 (C-26), 17.5 (C-29), 16.5 (C-24), 15.7 (C-25)。以上数据与文献(陈雪林等,2020)报道的熊果酸(ursolic acid)的数据基本一致,故鉴定化合物 **6** 为熊果酸(ursolic acid)。

化合物 **7** 白色粉末,分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ 。ESI-MS m/z : 169.04 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.56 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.86~6.81 (1H, m, H-5), 3.89 (3H, s, 8- OCH_3)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 167.6 (C-7), 152.7 (C-4), 148.8 (C-3), 125.3 (C-6), 123.5 (C-1), 115.9 (C-2), 114.1 (C-5), 56.6 (8- OCH_3)。以上数据与文献(李药兰等,2006)报道的对羟基间甲氧基苯甲酸(4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid)的数据基本一致,故鉴定化合物 **7** 为对羟基间甲氧基苯甲酸(4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid)。

化合物 **8** 白色粉末,分子式为 $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}$ 。ESI-MS m/z : 96.04 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 9.76 (1H, s, 4-OH), 7.74 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2/6), 6.91 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3/5)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 160.7 (C-4), 149.8 (C-2/6), 115.9 (C-3/5)。以上数据与文献(王伟忠,2008)报道的4-羟基吡啶(4-pyridinol)的数据基本一致,故鉴定化合物 **8** 为4-羟基吡啶(4-pyridinol)。

化合物 **9** 白色粉末,分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。ESI-MS m/z : 139.03 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.87 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2/6), 6.80 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3/5)。 ^{13}C -NMR (150

MHz, CD_3OD) δ_{C} : 171.6 (C-7), 163.1 (C-4), 133.0 (C-2/6), 124.1 (C-1), 116.0 (C-3/5)。以上数据与文献(李艳茸等,2014)报道的对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)的数据基本一致,故鉴定化合物 **9** 为对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)。

化合物 **10** 红棕色固体,分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$ 。ESI-MS m/z : 779.25 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, Caf H-7''), 7.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Caf H-2''), 6.99 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, Caf H-6''), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Caf H-5''), 6.75~6.71 (2H, m, Agl H-2/5), 6.60 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, Agl H-6), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, Caf H-8''), 5.21 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, Rha H-1'''), 4.98 (1H, m, Glu H-4'), 4.94 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, Api H-1'''), 4.40 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Glu H-1'), 4.02 (1H, m, Agl H-8), 3.96~3.90 (2H, m, Rha H-2'', Api H-4'''), 3.83 (1H, m, Glu H-3'), 3.80~3.69 (4H, m, Glu H-5'/6', Api H-2''''/4'''' b), 3.64~3.60 (1H, m, Rha H-3'''), 3.58 (2H, s, Api H-5'''), 3.51 (1H, dd, $J = 11.2, 5.7$ Hz, Glu H-2'), 3.35~3.30 (2H, m, Rha H-4'''/5'''), 2.82 (2H, m, Agl H-7), 1.11 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, Rha H-6''')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 168.3 (Caf C-9''), 149.8 (Caf C-4''), 148.2 (Caf C-7''), 146.8 (Caf C-3''), 146.1 (Agl C-3), 144.7 (Agl C-4), 131.6 (Agl C-1), 127.7 (Caf C-1''), 123.4 (Caf C-6''), 121.5 (Agl C-6), 117.3 (Agl C-2), 116.7 (Caf C-5''), 116.5 (Agl C-5), 115.4 (Caf C-2''), 114.8 (Caf C-8''), 111.1 (Api C-1'''), 104.2 (Glu C-1'), 103.1 (Rha C-1''), 81.8 (Glu C-3'), 80.7 (Api C-3'''), 78.3 (Api C-2'''), 76.2 (Glu C-2'), 75.2 (Api C-4'''), 74.6 (Glu C-5'), 73.8 (Rha C-4'''), 72.4 (Rha C-2''), 72.4 (Agl C-8), 72.1 (Rha C-3'''), 70.9 (Glu C-4'), 70.5 (Rha C-5'''), 68.5 (Glu C-6'), 65.7 (Api C-5'''), 36.7 (Agl C-7), 18.5 (Rha C-6'')。以上数据与文献(Yamasaki et al., 2007)报道的连翘酯苷 B (forsythoside B) 的数据基本一致,故鉴定化合物 **10** 为连翘酯苷 B (forsythoside B)。

化合物 **11** 黄绿色固体,分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_{20}$ 。ESI-MS m/z : 823.27 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (600

MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.54 (1H, d, J = 15.8 Hz, Acyl H-7''), 7.29 (1H, d, J = 2.0 Hz, Acyl H-2''), 7.09 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, Acyl H-6''), 6.79 (1H, d, J = 8.1 Hz, Acyl H-5''), 6.70 (2H, d, J = 8.1 Hz, Agl H-2/5), 6.58 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz, Agl H-6), 6.42 (1H, d, J = 15.9 Hz, Acyl H-8''), 5.03 (1H, d, J = 1.7 Hz, Rha H-1'''), 4.76 (1H, d, J = 2.9 Hz, Api H-1'''), 4.68 (1H, t, J = 9.7 Hz, Glu H-4'), 4.42 (1H, d, J = 7.9 Hz, Glu H-1'), 4.25 (1H, dd, J = 7.9, 3.8 Hz, Agl H-7), 3.80 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.78 (1H, s, Agl H-8a), 3.69 (3H, m, Glu H-5', Rha H-2''', Api H-2'''), 3.62 (3H, m, Api H-3'''/4'''), 3.57~3.48 (3H, m, Agl H-8b, Glu H-2'/3'), 3.40~3.30 (2H, m, Glu H-6', Rha H-5'''), 3.26 (3H, m, Rha H-3''', Api H-5'''), 3.13 (3H, s, 7-OCH₃), 3.09 (1H, d, J = 9.4 Hz, Rha H-4'''), 0.98 (3H, d, J = 6.2 Hz, Rha H-6'''). ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 165.8 (Acyl C-9''), 149.5 (Acyl C-3''), 147.9 (Acyl C-4''), 145.8 (Agl C-4), 145.2 (Acyl C-7''), 145.0 (Agl C-3), 129.7 (Agl C-1), 125.5 (Acyl C-1''), 123.3 (Acyl C-6''), 118.1 (Agl C-6), 115.5 (Agl C-5, Acyl C-5''), 114.1 (Agl C-2), 113.9 (Acyl C-8''), 111.1 (Acyl C-2''), 109.1 (Api C-1'''), 102.8 (Glu C-1'), 101.3 (Rha C-1'''), 82.3 (Agl C-7), 78.9 (Api C-3'''), 78.8 (Glu C-3'), 75.9 (Api C-2'''), 74.3 (Glu C-2'), 73.7 (Agl C-8), 73.4 (Api C-4'''), 72.8 (Glu C-5'), 71.7 (Rha C-4'''), 70.5 (Rha C-2'''), 70.4 (Rha C-3'''), 69.3 (Glu C-4'), 68.8 (Rha C-5'''), 67.1 (Glu C-6'), 63.2 (Api C-5'''), 56.0 (7-OCH₃), 55.6 (3''-OCH₃), 18.1 (Rha C-6''). 以上数据与文献(Xu et al., 2019)报道的 nepetifosides D 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 nepetifosides D。

化合物 **12** 橙红色膏体, 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ 。ESI-MS m/z : 647.21 [M + Na]⁺。 ^1H -NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_H : 7.57 (1H, d, J = 15.8 Hz, Caf H-7''), 7.05 (1H, d, J = 2.1 Hz, Caf H-2''), 6.89 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, Caf H-6''), 6.78 (1H, d, J = 8.2 Hz, Caf H-5''), 6.69 (1H, d, J = 2.0 Hz, Agl H-2), 6.65 (1H, d, J = 8.0 Hz, Agl H-5), 6.54 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, Agl H-

6), 6.30 (1H, d, J = 15.9 Hz, Caf H-8''), 5.20 (1H, d, J = 1.7 Hz, Rha H-1'''), 4.51 (1H, dd, J = 11.9, 2.2 Hz, Glu H-6a'), 4.39~4.36 (1H, m, Glu H-6b'), 4.34 (1H, d, J = 7.9 Hz, Glu H-1'), 4.04~3.93 (3H, m, Agl H-8b, Rha H-2'''/4'''), 3.75~3.69 (2H, m, Agl H-8a, Rha H-3'''), 3.58~3.55 (1H, m, Glu H-5'), 3.54 (1H, d, J = 8.9 Hz, Glu H-3'), 3.42 (1H, m, Glu H-4'), 3.35~3.30 (1H, m, Glu H-2'), 2.83~2.73 (2H, m, Agl H-7), 1.26 (3H, d, J = 6.2 Hz, Rha H-6'')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 169.2 (Caf C-9''), 149.5 (Caf C-4''), 147.2 (Caf C-7''), 146.7 (Caf C-3''), 146.0 (Agl C-3), 144.6 (Agl C-4), 131.4 (Agl C-1), 127.6 (Caf C-1'), 123.2 (Caf C-6''), 121.3 (Agl C-6), 117.1 (Agl C-2), 116.5 (Agl C-5), 116.4 (Caf C-5''), 115.1 (Caf C-2''), 114.8 (Caf C-8''), 104.3 (Glu C-1'), 102.6 (Rha C-1'''), 83.9 (Glu C-3'), 75.6 (Glu C-2'), 75.3 (Glu C-5'), 73.9 (Rha C-4'''), 72.4 (Agl C-8), 72.3 (Rha C-3'''), 72.2 (Rha C-2'''), 70.3 (Glu C-4'), 70.0 (Rha C-5'''), 64.6 (Glu C-6'), 36.6 (Agl C-7), 17.9 (Rha C-6'')。以上数据与文献(Saimaru & Orihara, 2010)报道的异毛蕊花苷(isoacteoside)的数据基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为异毛蕊花苷(isoacteoside)。

化合物 **13** 橙红色膏体, 分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ 。ESI-MS m/z : 647.21 [M + Na]⁺。 ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.46 (1H, d, J = 15.8 Hz, Caf H-7''), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, Caf H-2''), 6.97 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, Caf H-6''), 6.76 (1H, d, J = 8.1 Hz, Caf H-5''), 6.65~6.61 (2H, m, Agl H-2/5), 6.49 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz, Agl H-6), 6.20 (1H, d, J = 15.9 Hz, Caf H-8''), 4.72 (1H, m, Glu H-4'), 4.35 (1H, d, J = 7.9 Hz, Glu H-1'), 3.88 (1H, dd, J = 9.2, 6.4 Hz, Rha H-2'''), 3.72~3.07 (10H, m, Agl H-8, Rha/Glu-H), 2.76~2.63 (2H, m, Agl H-7), 0.96 (3H, d, J = 6.1 Hz, Rha H-6'')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 166.0 (Caf C-9''), 148.8 (Caf C-3''), 145.8 (Caf C-7''), 145.2 (Agl C-3, Caf C-4''), 143.8 (Agl C-4), 129.4 (Agl C-1), 125.7 (Caf C-1''), 121.7 (Caf C-6''), 119.8 (Agl C-6), 116.5 (Caf C-5''), 116.0 (Agl C-2), 115.7

(Agl C-5), 114.9 (Caf C-8''), 113.8 (Caf C-2''), 102.5 (Glu C-1'), 101.5 (Rha C-1'''), 79.3 (Glu C-3'), 74.7 (Glu C-5'), 74.7 (Glu C-2'), 71.9 (Rha C-4'''), 70.8 (Rha C-2'''), 70.6 (Rha C-3'''), 70.5 (Agl C-8), 69.4 (Rha C-5'''), 69.0 (Glu C-4'), 61.0 (Glu C-6'), 35.2 (Agl C-7), 18.4 (Rha C-6'''). 以上数据与文献(Lan et al., 2018)报道的毛蕊花苷(acteoside)的数据基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为毛蕊花苷(acteoside)。

化合物 **14** 黄色固体, 分子式为 $C_{35}H_{46}O_{19}$ 。ESI-MS m/z : 793.26 $[M + Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, Acyl H-7''), 7.29 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Acyl H-2''), 7.09 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, Acyl H-6''), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Acyl H-5''), 6.59 (2H, m, Agl H-2/5), 6.50 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, Agl H-6), 6.41 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, Acyl H-8''), 5.03 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, Rha H-1'''), 4.78 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, Api H-1'''), 4.64 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, Glu H-4'), 4.38 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Glu H-1'), 3.80 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.76~3.63 (7H, m, Glu H-3'/5', Api H-2'''/3'''/4''', Rha H-2'''), 3.57~3.48 (2H, m, Agl H-8), 3.32~3.18 (6H, m, Api H-5''', Glu H-2'/6', Rha H-3''/5'''), 3.10 (1H, t, $J = 9.4$ Hz, Rha H-4'''), 2.80~2.65 (2H, m, Agl H-7), 0.98 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, Rha H-6''')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 166.3 (Acyl C-9''), 150.0 (Acyl C-3''), 148.4 (Acyl C-4''), 146.2 (Acyl C-7''), 145.5 (Agl C-3), 144.0 (Agl C-4), 129.6 (Agl C-1), 126.0 (Acyl C-1''), 123.7 (Acyl C-6''), 120.0 (Agl C-6), 116.8 (Agl C-2), 116.0 (Agl C-5), 115.7 (Acyl C-8''), 114.3 (Acyl C-5''), 111.5 (Acyl C-2''), 109.6 (Api C-1'''), 102.7 (Glu C-1'), 101.7 (Rha C-1'''), 79.3 (Glu C-3', Api C-3'''), 76.4 (Api C-2'''), 74.8 (Glu C-2'), 73.9 (Api C-4'''), 73.3 (Glu C-5'), 72.1 (Rha C-4'''), 71.0 (Rha C-2'''), 70.8 (Rha C-3'''), 70.8 (Agl C-8), 69.9 (Glu C-4'), 69.2 (Rha C-5'''), 67.6 (Glu C-6'), 63.6 (Api C-5'''), 56.1 (3''-OCH₃), 35.5 (Agl C-7), 18.6 (Rha C-6'')。以上数据与文献(Jia & Gao, 1993)报道的 pedicularioside M 的数据基本一致, 故鉴定化合物 **14** 为

pedicularioside M。

化合物 **15** 黄绿色固体, 分子式为 $C_{35}H_{46}O_{20}$ 。ESI-MS m/z : 809.26 $[M + Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, Caf H-7''), 7.03 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Caf H-2''), 6.98 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, Caf H-6''), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Caf H-5''), 6.71~6.68 (2H, m, Agl H-2/5), 6.58 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, Agl H-6), 6.20 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, Caf H-8''), 5.02 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Rha H-1'''), 4.76 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, Api H-1'''), 4.68 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, Glu H-4'), 4.42 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glu H-1'), 4.25 (1H, dd, $J = 7.8, 3.9$ Hz, Agl H-7), 3.79 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, Agl H-8a), 3.72~3.57 (7H, m, Glu H-3'/5', Api H-2'''/3'''/4''', Rha H-2'''), 3.57~3.46 (2H, m, Agl H-8b, Glu H-6'a), 3.36~3.17 (6H, m, Api H-5''', Glu H-2'/6', Rha H-3''/5'''), 3.13 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, 7-OCH₃), 3.09 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, Rha H-4'''), 0.96 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, Rha H-6''')。 ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 165.7 (Caf C-9''), 148.5 (Caf C-4''), 145.8 (Caf C-7''), 145.6 (Caf C-3''), 145.2 (Agl C-4), 145.0 (Agl C-3), 129.7 (Agl C-1), 125.5 (Caf C-1''), 121.4 (Caf C-6''), 118.1 (Agl C-6), 115.8 (Caf C-5''), 115.4 (Agl C-5), 114.8 (Caf C-2''), 114.0 (Agl C-2), 113.4 (Caf C-8''), 109.1 (Api C-1'''), 102.8 (Glc C-1'), 101.2 (Rha C-1'''), 82.2 (Agl C-7), 78.9 (Glc C-3'), 78.8 (Api C-3'''), 75.9 (Api C-2'''), 74.3 (Glc C-2'), 73.7 (Agl C-8), 73.4 (Api C-4'''), 72.7 (Glc C-5'), 71.6 (Rha C-4'''), 70.5 (Rha C-5'''), 70.4 (Rha C-3'''), 69.3 (Glc C-4'), 68.7 (Rha C-5'''), 67.0 (Glc C-6'), 63.2 (Api C-5'''), 56.0 (7-OCH₃), 18.1 (Rha C-6'')。分析质谱和 NMR 数据, 发现化合物 **15** 与连翘酯苷 B 的结构相近(Wang et al., 2005), 主要区别在于化合物 **15** 多了 1 个甲氧基结构片段信号 [δ_H 3.13 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, 7-OCH₃), δ_C 56.0 (7-OCH₃)], 以及由甲氧基引起的 C-7 位次甲基 CH 的化学位移向低场位移的信号 δ_C 73.4 (Agl C-8), 82.2 (Agl C-7), 129.7 (Agl C-1), HMBC 谱上可观测 δ_H 3.13 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, 7-OCH₃) 与 δ_C 82.2 (Agl C-7) 远程相关的信号, 进

一步确定甲氧基连在苯乙醇结构片段 Agl C-7 位,故鉴定化合物 **15** 为 β -甲氧基连翘酯苷 B (β -methoxy forsythoside B)。

4 讨论与结论

本研究采用多种现代色谱分离技术和波谱鉴定手段从我国特有植物全缘叶紫珠的根、茎提取物中分离鉴定了 15 个化合物,包括 3 个甾体类(**1**、**2**、**5**),2 个三萜类(**4**、**6**),6 个苯乙醇苷类(**10**–**15**),1 个黄酮类(**3**),2 个苯甲酸类(**7**、**9**)和 1 个生物碱(**8**)。本研究结果表明,苯乙醇苷类化合物是全缘叶紫珠的特征性物质成分,该类化合物是由苯乙醇苷元、咖啡酰基、葡萄糖/鼠李糖/芹菜糖等糖基取代衍生而成的天然水溶性糖苷(Tian et al., 2021)。现代药理研究表明,苯乙醇苷类物质具有抗氧化、改善记忆、保肝、神经保护、抗肿瘤等多种药理作用,在治疗阿尔茨海默病、改善记忆力等方面的发展潜力尤为突出(Lee et al., 2006)。紫珠属植物作为常见的民间药,其最早便是被用于止血。余婧等(2015)研究表明广东紫珠发挥止血作用的主要成分为苯乙醇苷类,本研究发现的苯乙醇苷类化合物大多为首次从全缘叶紫珠中得到,其中化合物 **11** 和化合物 **14** 为首次从紫珠属中报道。因此,本研究不仅丰富了全缘叶紫珠植物的次生代谢化合物库,也为进一步挖掘全缘叶紫珠中结构新颖的止血活性成分及其药理机制研究奠定了物质基础。

本研究结果发现,全缘叶紫珠的石油醚萃取部位的化学成分主要为甾体、萜类等小极性物质,结合文献研究发现: α -香树脂醇(化合物 **4**)对白背飞虱雌虫具有较好的杀灭效果; β -谷甾醇(化合物 **5**)不仅对 *Aedes aegypti* 和 *Culex quinquefasciatus* 2 种蚊虫具有较好的杀灭效果(Chenniappan & Kadarkari, 2012; Angajala & Subashini, 2018),还对烟曲霉菌、黑曲霉菌、根霉菌的生长有一定的抑制作用(Prince et al., 2019);熊果酸(化合物 **6**)可通过减少浮游细菌在表面的附着力和破坏其生物膜的形成达到抑菌作用(Sycz et al., 2022);对羟基苯甲酸(化合物 **9**)通过促进氧自由基的产生,抑制铜绿微囊藻的生长(张庭廷等,2008)。因此,我们推测全缘叶紫珠脂溶性物质在植物病害防控方面具有一定的应用前景,为进一步开发和利用

该植物提供了一定的科学依据。

2020 版《中国药典》收录的紫珠属物种包括广东紫珠、裸花紫珠、大叶紫珠、杜虹花,它们均为常见的乔木型或灌木型类群,这些类群往往喜欢生长在路旁、林缘等易受外界干扰的向阳环境,而全缘叶紫珠作为紫珠属仅有的几个藤本型类群之一,往往生活在林下环境,通常靠攀缘其他植物得以获得阳光和生长空间。这些特定的林下环境胁迫是否影响全缘叶紫珠次生代谢活动? 本研究表明全缘叶紫珠中的 15 个化合物中就有 6 个化合物为紫珠属首次报道,这些意外的发现将激励着我们进一步加深对全缘叶紫珠天然产物成分的挖掘和药理活性研究。

参考文献:

- ABDELHAMEED RFA, NAFIE MS, IBRAHIM AK, et al., 2020. Cytotoxic, apoptosis-inducing activities, and molecular docking of a new sterol from bamboo shoot skin *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(23): 5650.
- ANGAJALA G, SUBASHINI B, 2018. Evaluation of larvicidal potential of β -sitosterol isolated from indigenous *Aegle marmelos* Correa crude leaf extracts against blood feeding parasites and its binding affinity studies towards sterol carrier protein [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 16: 586–593.
- CHAI L, LIN ZZ, ZHU CC, et al., 2010. Analysis of the chemical constituents of essential oil from the leaves of *Callicarpa integrifolia* [J]. *J Chin Med Mat*, 33(3): 382–385. [柴玲, 林朝展, 祝晨露, 等, 2010. 全缘叶紫珠叶挥发油化学成分分析 [J]. *中药材*, 33(3): 382–385.]
- CHA XJ, SHI Q, SHAO F, et al., 2021. Chemical constituents of *Euphorbia helioscopia* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 52(2): 341–348. [查显进, 石强, 邵峰, 等, 2021. 泽漆化学成分研究 [J]. *中草药*, 52(2): 341–348.]
- CHENNIAPPAN K, KADARKARI M, 2012. Adult mortality and blood feeding behavioral effects of α -amyrin acetate, a novel bioactive compound on *in vivo* exposed females of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) [J]. *Parasitol Res*, 110(6): 2117–2124.
- CHEN XL, LU ZY, GONGPAN PC, et al., 2020. Study on the chemical constituents from *Trevesia palmate* and their cytotoxicity [J]. *Nat Prod Res Dev*, 32(11): 1882–1888. [陈雪林, 卢志远, 贡潘偏抽, 等, 2020. 刺通草的化学成分及其肿瘤细胞毒活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 32(11): 1882–1888.]
- DI QQ, ZHAO XB, ZHANG RH, et al., 2021. Novel clerodane-type diterpenoid Cintelactone A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by promoting ubiquitination, proteasomal degradation of TRAF6 [J].

- Pharmacol Res, 164: 105386.
- Editorial Committee of Flora of China, 1982. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 65(1): 25-79. [《中国植物志》编辑委员会, 1982. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 65(1): 25-79.]
- EDYTA KS, MONIKA D, URSZULA G, et al., 2017. *Stenotrophomonas maltophilia*: a gram-negative bacterium useful for transformations of flavanone and chalcone [J]. Multidiscip Dig Publ Inst, 22(11): 1830.
- JIA ZJ, GAO JJ, 1993. Phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis striata* pall ssp. *arachnoidea* [J]. Phytochemistry, 34(4): 1188-1190.
- LAN YH, CHI XF, ZHOU GY, et al., 2018. Antioxidants from *Pedicularis longiflora* var. *tubiformis* (Klotzsch) P.C. Tsoong [J]. Rec Nat Prod, 12(4): 332-339.
- LEE KY, JEONG EJ, LEE HS, et al., 2006. Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments [J]. Biol Pharm Bull, 29(1): 71-74.
- LI XJ, YUAN Y, LI Z, et al., 2014. Chemical constituents from cane of *Pileostegia viburnoides* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 45(8): 1052-1055. [李小军, 袁燕, 李芝, 等, 2014. 苗药冠盖藤的化学成分研究 [J]. 中草药, 45(8): 1052-1055.]
- LI YL, SU MX, CEN YZ, et al., 2006. Study on the chemical constituents of *Ardisia chinensis* [J]. J Chin Med Mat, 29(4): 331-333. [李药兰, 苏妙贤, 岑颖洲, 等, 2006. 小紫金牛的化学成分研究 [J]. 中药材, 29(4): 331-333.]
- LI YR, LI C, WANG ZM, et al., 2014. Chemical constituents from whole plants of *Aconitum tanguticum* (Ⅲ) [J]. Chin J Chin Mat Med, 39(7): 1163-1167. [李艳茸, 李春, 王智民, 等, 2014. 藏药甘青乌头化学成分研究 (Ⅲ) [J]. 中国中药杂志, 39(7): 1163-1167.]
- MO QH, ZHOU XL, ZHOU Y, et al., 2020. Chemical constituents from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa* [J]. J Chin Med Mat, 43(3): 587-590. [莫青胡, 周先丽, 周云, 等, 2020. 桃金娘叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 43(3): 587-590.]
- MO X, LI Y, 2019. Analysis on the clinical prescription of Luohuazizhu tablet [J]. Chin Med J Res Prac, 33(3): 65-69. [莫霞, 李瑶, 2019. 裸花紫珠片临床应用处方分析 [J]. 现代中药研究与实践, 33(3): 65-69.]
- PRINCE JN, TERRUMUN AT, EMMANUEL M, 2019. Stigmasterol and β -sitosterol from the root of *Mangifera indica* and their biological activities against some pathogens [J]. J Compl Altern Med Res, 7(4): 1-10.
- SAIMARU H, ORIHARA Y, 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea* [J]. J Nat Med, 64(2): 139-145.
- SYCZ Z, TICHACZEK GD, WOJNICZ D, 2022. Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes — asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals [J]. Biomolecules, 12(1): 98.
- TIAN XY, LI MX, LIN T, et al., 2021. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides [J]. Eur J Med Chem, 209: 112563.
- WANG RD, SUN LN, TAO ZY, et al., 2005. Chemical constituents of *Lamiophlomis rotata* [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 16(10): 1171-1173. [王瑞冬, 孙连娜, 陶朝阳, 等, 2005. 独一味化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 16(10): 1171-1173.]
- WANG WZ, 2008. Study on synthesis of 4-pyridinol [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology. [王伟忠, 2008. 4-羟基吡啶的合成研究 [D]. 南京: 南京理工大学.]
- WANG XF, WEI RF, LU WJ, et al., 1986. Study on chemical constituents of *Callicarpa integerrima* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 17(3): 12. [王雪芬, 韦荣芳, 卢文杰, 等, 1986. 全缘叶紫珠化学成分的研究 [J]. 中草药, 17(3): 12.]
- WU QP, XU Y, LUO YH, et al., 2019. Discussion on a novel model for quality evaluation of Kanggongyan tablets based on reference drug [J]. Chin J Pharm Anal, 39(10): 1762-1770. [邬秋萍, 许妍, 罗跃华, 等, 2019. 基于对照制剂的抗宫炎片质量评价新模式的探讨 [J]. 药物分析杂志, 39(10): 1762-1770.]
- XU HT, ZHANG CG, HE YQ, et al., 2019. Phenylethanoid glycosides from the *Schnabelia nepetifolia* (Benth.) P. D. Cantino promote the proliferation of osteoblasts [J]. Phytochemistry, 164(5): 111-121.
- YAMASAKI T, MASUOKA C, NOHARA T, et al., 2007. A new phenylethanoid glycoside from the fruits of *Callicarpa japonica* Thunb. var. *luxurians* Rehd. [J]. J Nat Med, 61(3): 318-322.
- YU J, YANG YF, HU X, et al., 2015. Spectrum-effect correlation for blood coagulation activity of *Callicarpa kwangtungensis* Chun [J]. Chin J Pharm, 46(5): 467-472. [余婧, 杨义芳, 胡晓, 等, 2015. 广东紫珠止血谱效相关模式的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 46(5): 467-472.]
- ZHAN LL, YE XW, ZHANG M, et al., 2020. Progress on chemical composition and pharmacological activity of *Callicarpa* [J]. Jiangxi J Trad Chin Med, 51(8): 66-73. [占丽丽, 叶先文, 张敏, 等, 2020. 紫珠属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 江西中医药, 51(8): 66-73.]
- ZHANG TT, HE M, WU AP, et al., 2008. Allelopathic inhibition of *p*-hydroxybenzoic acid on *Microcystis aeruginosa* Kuetz with no toxicological effects on *Cyprinus carpio* Linnaeus [J]. Acta Sci Circum, 28(9): 1887-1893. [张庭廷, 何梅, 吴安平, 等, 2008. 对羟基苯甲酸对铜绿微囊藻的化感效应以及对鲤鱼的毒性作用 [J]. 环境科学学报, 28(9): 1887-1893.]
- ZHU CC, GAO L, ZHAO ZX, et al., 2012. Triterpenes from *Callicarpa integerrima* Champ [J]. Acta Pharm Sin, 47(1): 77-83. [祝晨蓁, 高丽, 赵钟祥, 等, 2012. 全缘叶紫珠三萜类成分研究 (英文) [J]. 药学报, 47(1): 77-83.]

(责任编辑 邓斯丽 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202206062

霍华珍, 蔡爱华, 郭春雨, 等, 2023. 不同品种毛茶水浸出物成分及抗氧化、降血糖活性研究 [J]. 广西植物, 43(6): 1145–1154.

HUO HZ, CAI AH, GUO CY, et al., 2023. Components, antioxidant and hypoglycemic activities of water extracts from different varieties of raw tea [J]. *Guihaia*, 43(6): 1145–1154.



不同品种毛茶水浸出物成分及抗氧化、降血糖活性研究

霍华珍¹, 蔡爱华^{1*}, 郭春雨², 谢运昌¹, 李典鹏¹

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 广西 桂林 541006;
中国科学院
2. 广西壮族自治区茶叶科学研究所, 广西 桂林 541004)

摘 要: 为比较 7 个不同品种毛茶水浸出物活性成分及体外抗氧化与降血糖活性的差异, 确定各成分与活性之间的相关性, 该文选取制作六堡茶常用的 7 个茶树品种制备的毛茶作为研究对象, 测定毛茶水浸出物及其浸膏中总多酚、总黄酮、茶多糖的含量, 以 DPPH · 清除能力、ORAC 值和 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制作用为指标评价毛茶水浸出物的抗氧化和降血糖活性, 并采用 Pearson 进行相关性分析。结果表明: (1) 7 个茶树品种毛茶水浸出物、总多酚、总黄酮、茶多糖含量均存在显著差异, 含量最高的分别为黄金茶 ($53.42\% \pm 0.14\%$)、桂红 4 号 ($40.87\% \pm 1.09\%$)、云南大叶种 ($27.17\% \pm 0.26\%$)、福云 6 号 ($2.70\% \pm 0.02\%$)。 (2) 对 DPPH · 清除能力、ORAC 值存在显著差异, 在两种评价方法中均显示较好抗氧化效果的品种为六堡群体种、桂红 4 号、宛田种。 (3) 对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的抑制作用均显著强于阳性对照阿卡波糖, 在两种评价方法中均显示较好降血糖效果的品种为六堡群体种、桂红 4 号、桂青种。 (4) 抗氧化、降血糖活性均与总多酚、总黄酮含量有较强正相关。综上所述, 六堡群体种、桂红 4 号、宛田种、桂青种的毛茶品质均较好, 其中六堡群体种、桂红 4 号同时具有开发成抗氧化、降血糖功能食品的前景, 宛田种、桂青种分别具有开发成抗氧化、降血糖功能食品的潜力; 总多酚、总黄酮对毛茶体外抗氧化、降血糖活性的贡献较大, 在毛茶进一步的加工利用过程中应着重注意对这类成分的保护。该研究结果为开发抗氧化、降血糖活性更好的六堡茶产品在毛茶原料筛选和加工方式选择方面提供了科学依据。

关键词: 不同品种, 毛茶, 水浸出物成分, 抗氧化活性, 降血糖活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1145-10

Components, antioxidant and hypoglycemic activities of water extracts from different varieties of raw tea

HUO Huazhen¹, CAI Aihua^{1*}, GUO Chunyu², XIE Yunchang¹, LI Dianpeng¹

收稿日期: 2022-12-18

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA20302018-10); 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室主任基金 (ZRJJ2022-7, ZRJJ2020-3, ZRJJ2018-2); 广西植物研究所基本科研业务费项目 (桂植业 21004, 桂植业 22001); 广西科学院基本科研业务费项目 (CQZ-C-1901); 桂林市创新平台和人才计划项目 (20210102-3, 20220124-13)。

第一作者: 霍华珍 (1993-), 硕士, 助理研究员, 研究方向为植物资源开发与利用, (E-mail) hhz5951@foxmail.com。

* 通信作者: 蔡爱华, 副研究员, 研究方向为植物资源开发与利用, (E-mail) 356542930@qq.com。

- (1. *Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China;*
2. *Guangxi Tea Research Institute, Guilin 541004, Guangxi, China*)

Abstract: To compare the differences in the active components, the antioxidant and hypoglycemic activities *in vitro* between seven different varieties of raw tea water extracts, and to determine the correlation between each ingredient and activity, the contents of total polyphenols, total flavonoids and tea polysaccharides in the water extracts of raw tea and its infusion were determined. The antioxidant and hypoglycemic activities of raw tea water extracts were evaluated by DPPH · scavenging ability, ORAC value and α -glucosidase and α -amylase inhibition as indicators, and Pearson correlation analysis was performed. The results were as follows: (1) There were significant differences in the contents of water extract, total polyphenols, total flavonoids and tea polysaccharides among the seven varieties, while the highest contents were found in Golden tea ($53.42\% \pm 0.14\%$), Guihong No.4 ($40.87\% \pm 1.09\%$), Yunnan big leaf species ($27.17\% \pm 0.26\%$) and Fuyun No.6 ($2.70\% \pm 0.02\%$), respectively. (2) There were also significant differences in DPPH · scavenging abilities and ORAC values among the seven varieties, while the varieties showing better antioxidant effects in both evaluation methods were the Liupao group species, Guihong No.4 and Wantian species. (3) The inhibitions of α -glucosidase and α -amylase by the water extracts of seven varieties were significantly stronger than those of acarbose positive control. The varieties showing better hypoglycemic effects in both evaluation methods were Liupao group species, Guihong No.4 and Guiqing species. (4) The antioxidant and hypoglycemic activities were all strongly and positively correlated with the contents of total polyphenols and flavonoids. In summary, raw tea quality of Liupao group species, Guihong No.4, Wantian species and Guiqing species are better, among which Liupao group species and Guihong No.4 have the prospect of developing antioxidant and hypoglycemic functional food; Wantian species and Guiqing species have the potential of developing antioxidant and hypoglycemic functional food respectively. Total polyphenols and total flavonoids have a great contribution to the *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of raw tea, so that attention should be paid to the protection of such components during the further processing and utilization of raw tea. The results of this study provide a scientific basis for the development of Liupao tea products with better antioxidant and hypoglycemic activities in the selection of raw materials and processing methods of raw tea.

Key words: different varieties, raw tea, water extract components, antioxidant activity, hypoglycemic activity

六堡茶为广西特有的传统名茶,属于黑茶类,不仅具有丰富的功能成分和良好的保健功效,还给人“红、浓、陈、醇”的感官体验,越来越受到消费者青睐(黄敏周等,2020;马婉君等,2020),已成为广西壮族自治区重点支持发展“千亿元茶产业”中的重要组团(李欣鞠,2019;孔妮,2020)。由于六堡茶是以鲜茶叶为原料,经初制工艺制成毛茶,在此基础上进一步精制陈化(渥堆发酵)而成,因此六堡茶生产过程中原料毛茶的品质优劣对六堡茶品质的形成至关重要(马婉君等,2020)。然而,通过前期市场调研发现,制作六堡茶所采用的毛茶来源于较多的茶树品种且原料质量不一,从而导致生产的六堡茶成品茶质量参差不齐,严重阻碍了六堡茶产业的发展,迫切需要评价这些茶树品种之间的毛茶品质差异,有利于六堡茶生产企业准确地选择毛茶中间原料以进一步稳定成品六堡茶的品质。

随着人们生活水平的提高和饮食方式的改变,糖尿病的患病率日益增长且有年轻化趋势(杨玉洁等,2021)。抗氧化剂是能捕获并中和自由基,从而保护人体免受自由基损害的一类物质(张泽生等,2017),能增强机体的抗氧化能力,是预防和治疗糖尿病及其并发症的常用物质。随着生活中诱发自由基产生的辐射增多以及人类对健康越来越重视,抗氧化剂已成为食品以及医学领域研究的热点。然而,目前常用的抗氧化剂多为西药,有较多毒副作用,并且不能有效地控制并发症(龚艳振等,2012)。人们更青睐可长期食用、毒副作用小的天然抗氧化剂,选择茶产品时,除了注重口感外,人们也会更多关注它在抗氧化、降血糖方面的保健功效。因此,开发抗氧化、降血糖活性更好的六堡茶产品具有广阔的市场前景。

茶多酚(黄烷醇类、黄酮类、花青素、酚酸)、茶

多糖是茶叶中重要的活性成分,不仅具有抗氧化、降血糖、护肝等保健功效,还可以调节茶汤的口感,是决定茶叶品质的关键性物质基础(刘小玲等,2012;宋林珍等,2018;马婉君等,2020;刘淑文等,2022)。茶叶中的活性成分通常是通过煮茶或泡茶的方式被人体所吸收利用,其茶汤中浸出物含量的多少反映出茶汤的厚薄、滋味的强弱程度,在一定程度上还可以反映其品质的优劣(刘小玲等,2012)。因此,测定毛茶水浸出物含量及水浸出物中活性成分的含量对毛茶的品质研究具有重要意义。

尽管已有较多有关六堡茶方面的研究报道,但主要集中于六堡茶成品茶活性成分(陈小强等,2008;林小珊等,2019;张均伟等,2019)、香气成分(温立香等,2021)、加工工艺(黎敏等,2021)和生物活性(叶颖等,2019;龚受基等,2020)等方面,而对六堡茶中间原料毛茶的相关研究较少报道。周伟勤等(2013)对不同季节的六堡茶原料茶树品种(六堡群体种、桂青种、云南大叶种)鲜叶中的茶多酚、水浸出物、儿茶素含量进行了测定,并对其毛茶进行感官(外形、汤色、香气、滋味、叶底)评价,结果表明六堡群体种更适制六堡茶,而该文献却未涉及毛茶中活性成分的比较分析,并且采用的茶树品种较少。林国轩等(2012)报道了9个品种不同季节茶鲜叶的活性及营养成分含量,结果表明茶多酚含量高的茶树品种适制六堡茶,虽然该文献采用的茶树品种较多,但未涉及毛茶中活性成分的比较分析。刘小玲等(2012)对7种六堡茶及单一产地(柳州)六堡毛茶制备的水浸出物、总多酚、总黄酮、总游离氨基酸等含量进行了测定,结果表明毛茶水浸出物含量、总多酚、总黄酮含量均比六堡茶成品茶高,但该文献所用毛茶的茶树品种不详且未涉及不同茶树品种之间活性成分的比较分析。黄敏周等(2020)对不同干燥工艺的毛茶品质进行感官评价,结果表明最佳的工艺为萎凋棚下晾晒4 h辅助鼓风机工艺。由此可见,已有的关于毛茶的研究仅侧重于感官品质和生化成分的含量水平方面。然而,从其保健价值角度来看,由于缺少对不同品种毛茶的活性成分及其抗氧化、降血糖活性比较的研究,因此无法科学判断不同品种毛茶的保健价值及成分和活性之间的相关性。“七分靠原料,三分靠工艺”,这说明毛茶原料抗氧化、降血糖活性与六堡茶产品的保健价值具有密切关系。

本研究以制作六堡茶常用的主要茶树品种(六堡群体种、桂青种、宛田种、云南大叶种)以及桂红4号、黄金茶、福云6号茶树品种制备的毛茶为对象,测定毛茶水浸出物及其浸膏中活性成分的含量和体外抗氧化、降血糖活性,并利用 Pearson 进行相关性分析,确定各成分与活性之间的相关性,从活性成分含量、体外抗氧化以及降血糖活性3个方面综合考虑,优选出品质较好的毛茶原料品种,以期开发抗氧化、降血糖活性更好的六堡茶产品在毛茶原料筛选和加工方式选择方面提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

鲜茶叶来自树龄为6 a的7个茶树品种,于2021年4月采自广西壮族自治区茶叶科学研究所茶园,并统一按一芽三叶标准进行采摘。7个茶树品种分别为黄金茶(L1)、六堡群体种(L2)、桂红4号(L3)、福云6号(L4)、宛田种(L5)、云南大叶种(L6)、桂青种(L7)。

芦丁(纯度 $\geq 98\%$,合肥博美生物科技有限责任公司),没食子酸、水溶性维生素E(Trolox)、维生素C(VC)(纯度 $\geq 98\%$,上海士锋生物科技有限公司), α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶(美国sigma公司),福林酚(FC)试剂、亚硝酸钠、九水合硝酸铝、氢氧化钠、95%乙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸(ABAP)、荧光素钠、对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(PNPG)均为分析纯,试验用水为实验室自制超纯水。

1.2 仪器和设备

电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),T6紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),XS205分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),RIOS 8超纯水系统(美国Millipore公司),移液器(美国Thermo Fisher公司),TD5A-WS低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),HH-S4恒温水浴锅(上海况胜实业发展有限公司),N1100旋转蒸发器(上海艾朗仪器有限公司),Tecan Spark多功能酶标仪(上海帝肯贸易有限公司),BCD-213D11D双门冰箱(广东容声电器股份有限公司),MJ-系列霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 六堡茶毛茶及其水浸出物的制备 参考黄敏周等(2020)的六堡茶毛茶制作工艺,将鲜叶先在萎凋棚下晾晒 4 h,再经滚筒杀青、揉捻后以提香机 70 ℃烘至茶样足够干,即得六堡茶毛茶。将毛茶进一步粉碎后密封置于-20 ℃保存,备用。

按 GB/T 8305—2013(中华人民共和国国家标准化管理委员会,2013)的方法对毛茶水浸出物进行提取,所得提取液分装后置于-20 ℃保存,待用。

1.3.2 六堡茶毛茶水浸出物含量的测定 按 GB/T 8305—2013(中华人民共和国国家标准化管理委员会,2013)的方法对六堡茶毛茶水浸出物含量进行测定,茶叶中水浸出物含量以干态质量分数(%)表示。

1.3.3 六堡茶毛茶水浸出物浸膏中总多酚含量的测定 参考 GB/T 8313—2018(中华人民共和国国家标准化管理委员会,2018)中的福林-酚法,并稍作改进。取毛茶水浸出物提取液 0.2 mL 进行测定,加水补足至 6 mL,随后分别加入 FC 试剂 0.5 mL,混匀,10 min 后加入 1.5 mL 20% Na_2CO_3 溶液,充分混合后加水定容至 25 mL,30 ℃避光反应 30 min。以水为空白对照,在 760 nm 波长下测定吸光度 A 。以没食子酸为标准品绘制标准曲线,水浸出物浸膏中总多酚含量以干态质量分数(%)表示,按式(1)计算。

总多酚含量(%) = 水浸出物提取液中总多酚(g)/水浸出物浸膏质量(g) × 100 (1)

1.3.4 六堡茶毛茶水浸出物浸膏中总黄酮含量的测定 参考罗磊等(2016)的硝酸铝比色法,并稍作改进。取毛茶水浸出物提取液 1.0 mL 进行测定,用 50%乙醇补足至 10.0 mL。加入 5%的亚硝酸钠溶液 1.0 mL,混匀,10 min 后再加入 17.6%的九水硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,放置 10 min,加入 4%的氢氧化钠溶液 10.0 mL,用 50%乙醇定容至刻度,摇匀,放置 30 min,同时做试剂空白,于 510 nm 波长处测定吸光度 A 。以芦丁为标准品绘制标准曲线,水浸出物浸膏中总黄酮含量以干态质量分数(%)表示,按式(2)计算。

总黄酮含量(%) = 水浸出物提取液中总黄酮质量(g)/水浸出物浸膏质量(g) × 100 (2)

1.3.5 六堡茶毛茶水浸出物浸膏中茶多糖含量的测定 参照 GB/T 40632—2021(中华人民共和国

国家标准化管理委员会,2021)中的苯酚-浓硫酸比色法进行茶多糖含量测定。

1.3.6 体外抗氧化、降血糖活性的测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力 参考李明杨等(2022)的方法,并稍作改进。将毛茶水浸出物稀释成合适的系列浓度的待测样品。分别精密量取 1.0 mL 待测样品与 2.0 mL 95%乙醇、1.0 mL 0.12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DPPH 溶液混合摇匀,于室温下避光静置反应 20 min,作为样品组。以 4.0 mL 95%乙醇为调零组,以相同体积的 95%乙醇代替 DPPH 溶液为样品本底组,空白组为 3.0 mL 95%乙醇和 1.0 mL DPPH 溶液,在 517 nm 波长下测定吸光度。以 VC 为阳性对照物(浓度梯度为 5、10、15、20、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),清除率按式(3)计算。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (T - T_0)/C] \times 100 \quad (3)$$

式中: T 表示样品组的吸光度; T_0 表示样品本底组的吸光度; C 表示空白组的吸光度。

毛茶水浸出物对 DPPH 自由基的清除能力以半数清除浓度 IC_{50} 表示, IC_{50} 值越小说明清除自由基的能力越强(吕平和潘思轶,2020)。

1.3.6.2 氧自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 参照 Wen 等(2016)的方法测定水浸出物样品的 ORAC 值,并表示为每克水浸出物浸膏(干重)的 Trolox 当量($\mu\text{mol TE} \cdot \text{g}^{-1}$)。ORAC 值越大说明毛茶水浸出物的氧自由基吸收能力越强,其抗氧化活性越高。

1.3.6.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性 按 Pan 等(2020)的方法,测定毛茶水浸出物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性。抑制 50%的酶活所需要的样品质量浓度用 IC_{50} 值表示($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), IC_{50} 值越小说明对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力越强。

1.3.6.4 α -淀粉酶抑制活性 参考柳梅等(2017)的 DNS 法,并稍作改进。将不同浓度的样品溶液(1.0 mL)和 1 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -淀粉酶(1.0 mL)混合,在 37 ℃下孵育 10 min,随后加入 1.0 mL 1%可溶性淀粉溶液(已煮沸糊化),在 37 ℃下反应 15 min,取出,经高温灭酶后分别加入 1.5 mL DNS,继续煮沸 8 min。将混合体系定容至 25 mL,以水代替 α -淀粉酶溶液、1%可溶性淀粉溶液为校零管,于 540 nm 波长处测定其吸光度 A_1 ,以无样品的反应体系为空白对照,测定其吸光度 A_0 ,阿卡波糖为阳性对照;试剂背景以水校零,以等体积水取代 DNS,测定其吸光度 A_2 。按式(4)计算抑制率。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / (A_0 - A_2)] \times 100 \quad (4)$$

抑制 50% 的酶活所需要的样品质量浓度用 IC_{50} 值表示 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), IC_{50} 值越小说明对 α -淀粉酶的抑制能力越强。

1.3.7 数据处理和分析 每个试验设置 3 个平行, 采用 Excel 2019 软件进行数据处理, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。样品间各指标的差异采用 SPSS 19.0 软件, 利用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 多重范围检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示无显著差异。体外活性试验中的 IC_{50} 值采用 SPSS 19.0 软件中的 Probit 进行计算。采用 Pearson 对各项指标间的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同茶树品种制备的六堡茶毛茶水浸出物及活性成分含量分析

由图 1 可知, 7 个不同品种毛茶水浸出物含量变化范围为 ($45.18\% \pm 0.11\%$) $\sim$ ($53.42\% \pm 0.14\%$), 其中黄金茶的含量最高 ($53.42\% \pm 0.14\%$), 其次是桂红 4 号, 福云 6 号的最低。水浸出物含量不仅都高于国家标准 (全国茶叶标准化技术委员会, 2016) 对中小叶种绿茶水浸出物的规定 ($\geq 36.0\%$), 而且大于 45%, 说明这些茶树品种内容物丰富, 具有较高的耐泡性 (纪鹏彬等, 2021), 满足六堡茶耐冲泡特性所需的物质基础。7 个不同品种毛茶水浸出物的总多酚含量在 ($34.50\% \pm 0.22\%$) $\sim$ ($40.87\% \pm 1.09\%$) 之间, 其中桂红 4 号的总多酚含量最高 ($40.87\% \pm 1.09\%$), 比桂青种高出 6.37%, 两者总多酚含量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 福云 6 号、桂青种的总多酚含量均显著低于其他品种 ($P < 0.05$), 表明不同茶树品种制备的毛茶水浸出物中总多酚含量存在差异, 这与苏秋芹等 (2018) 的研究结果基本一致。7 个不同品种毛茶水浸出物的总黄酮含量变化范围为 ($16.63\% \pm 0.32\%$) $\sim$ ($27.17\% \pm 0.26\%$), 含量最高的品种为云南大叶种 ($27.17\% \pm 0.26\%$), 其次为六堡群体种、桂红 4 号, 含量最低的品种为桂青种 ($P < 0.05$)。7 个不同品种毛茶水浸出物的茶多糖含量分布范围为 ($1.76\% \pm 0.04\%$) $\sim$ ($2.70\% \pm 0.02\%$), 平均茶多糖含量为 ($2.23\% \pm 0.03\%$), 其

中福云 6 号的茶多糖含量最高, 是云南大叶种的 1.5 倍, 其余品种毛茶水浸出物的茶多糖含量差异也较大 ($P < 0.05$)。以上结果表明不同茶树品种制备的毛茶水浸出物含量及浸膏中活性成分的含量存在显著差异 ($P < 0.05$)。产生显著性差异的原因可能与茶树品种之间遗传基因的差异有关 (刘淑文等, 2022) 有关。

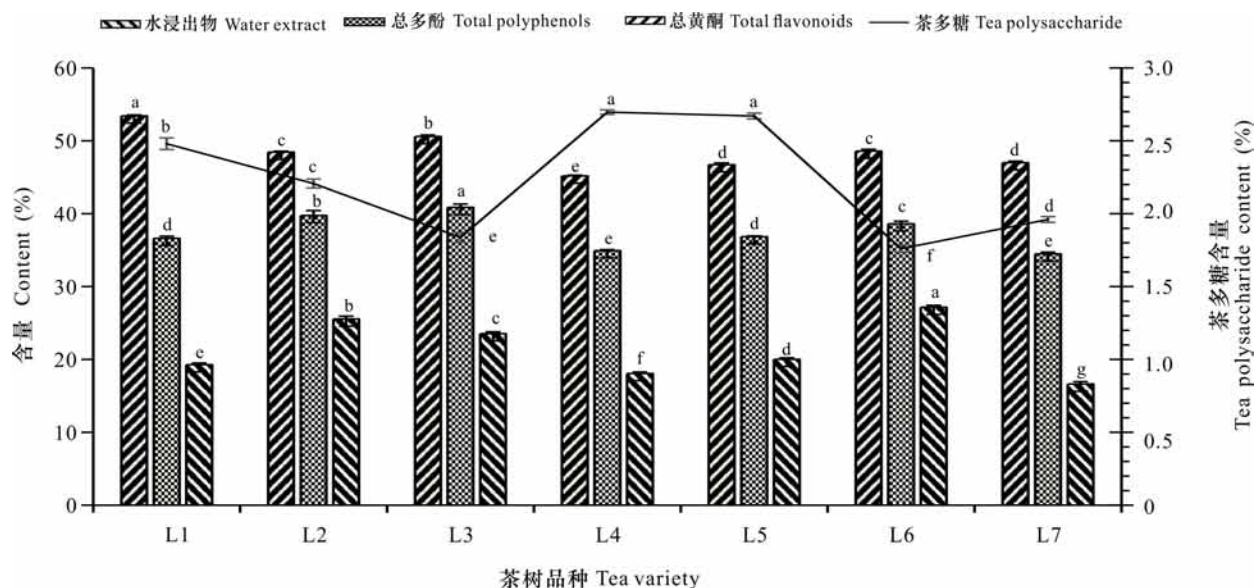
2.2 不同茶树品种制备的六堡茶毛茶水浸出物抗氧化活性比较

由图 2 可知, 不同品种毛茶水浸出物对 DPPH 自由基的清除能力 (IC_{50}) 存在显著性差异 ($P < 0.05$), 其中对 DPPH 自由基的清除能力最强的品种为六堡群体种 [$(16.73 \pm 0.02) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$], 其次为桂红 4 号 [$(17.20 \pm 0.25) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$], 宛田种 [$(19.51 \pm 0.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]。由图 3 可知, 不同品种的 ORAC 值存在显著差异 ($P < 0.05$)。7 个品种毛茶水浸出物的 ORAC 值在 (5387.41 ± 39.71) $\sim$ (6762.63 ± 50.81) $\mu\text{mol TE} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 其中桂红 4 号、宛田种、六堡群体种的 ORAC 值相对较高。

采用 ORAC 法与 DPPH 自由基清除法测定的 7 个品种毛茶水浸出物的抗氧化活性强弱顺序不完全一致, 这与周金伟等 (2014) 的研究结果相似, 产生这一结果的原因可能与这两种评价方法的自由基和作用机理不同有关。由于 DPPH 在溶液中以自由基形态和正离子态 (DPPH^+) 存在, 因此存在单电子转移和氢转移两种作用机制 (李铨军等, 2011)。ORAC 法是一种经典的氢原子转移反应过程终止自由基链式反应, 具有较高的特异性 (续洁琨等, 2006)。不同品种毛茶水浸出物中含有的大分子抗氧化剂含量可能不同, 而大分子抗氧化剂由于空间位阻不能与 DPPH 自由基反应 (续洁琨等, 2006), 因此导致抗氧化效果有偏差。虽然所测样品采用 ORAC 法与 DPPH 自由基清除法测定的结果存在差异, 但桂红 4 号、宛田种、六堡群体种水浸出物的 ORAC 值和 DPPH 自由基清除能力均较高, 说明这 3 个品种的抗氧化活性优于其余品种。

2.3 不同茶树品种制备的六堡茶毛茶水浸出物体外降血糖活性比较

由图 4 可知, 7 个品种毛茶水浸出物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用均显著强于阳性对照阿卡波糖 $IC_{50} = (606.21 \pm 4.30) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明这些品种均



不同字母表示不同茶树品种制备的毛茶水浸出物及其浸膏中活性成分的含量存在显著差异 ($P < 0.05$); 相同字母表示无显著差异 ($P > 0.05$)。下同。

Different letters indicate that there is a significant difference in the contents of active components in the water extract and extract of raw tea prepared by different tea varieties ($P < 0.05$); the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$). The same below.

图 1 不同茶树品种制备的毛茶水浸出物浸膏中活性成分的含量

Fig. 1 Contents of active components in raw tea water extracts prepared from different tea varieties

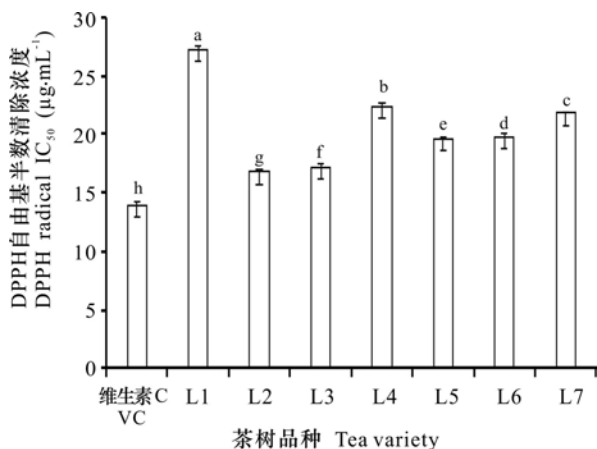


图 2 不同茶树品种制备的毛茶水浸出物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 2 DPPH free radical scavenging ability of raw tea water extracts prepared from different tea varieties

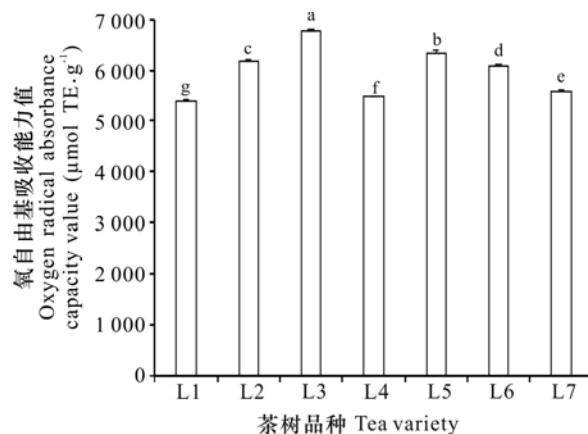


图 3 不同茶树品种制备的毛茶水浸出物的氧自由基吸收能力值

Fig. 3 ORAC values of raw tea water extracts prepared from different tea varieties

可作为 α -葡萄糖苷酶的天然抑制剂,其中六堡群体种、桂青种、桂红 4 号水浸出物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果更佳, IC_{50} 值分别为 (9.66 ± 0.11) 、 (10.87 ± 0.07) 、 $(11.06 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。福云 6

号、宛田种对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用均显著低于六堡群体种 ($P < 0.05$),其余品种对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用差异不大。由图 5 可知,部分品种对 α -淀粉酶的抑制作用有显著差异 ($P < 0.05$)。

7 个品种毛茶水浸出物对 α -淀粉酶的半数抑制浓度 (IC_{50}) 在 $(89.13 \pm 1.07) \sim (160.15 \pm 1.88) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 均具有显著的 α -淀粉酶抑制效果, 其中六堡群体种、桂红 4 号、桂青种比其他品种有更好的抑制 α -淀粉酶活效果。两种体外降血糖评价方法的结果均显示六堡群体种、桂红 4 号、桂青种的体外降血糖活性更好。

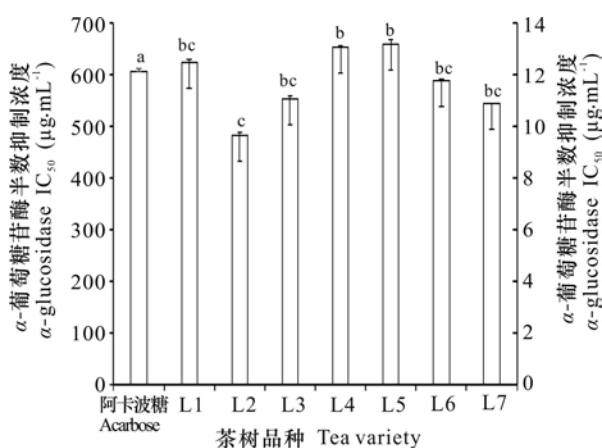


图 4 不同茶树品种制备的毛茶水浸出物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of α -glucosidase by raw tea water extracts prepared from different tea varieties

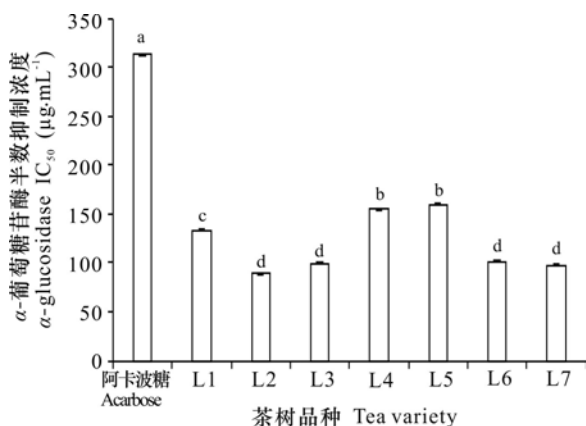


图 5 不同茶树品种制备的毛茶水浸出物对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of α -amylase by raw tea water extracts prepared from different tea varieties

2.4 不同茶树品种制备的六堡茶毛茶水浸出物活性成分与体外抗氧化、降血糖活性的相关性分析

由于样品活性越强, 其 IC_{50} 值则越小, 因此进行活性成分与抗氧化、降血糖活性的相关性分析

时用 $1/IC_{50}$ 表示样品活性的强弱。由表 1 可知, 总多酚含量分别与 DPPH 自由基清除作用和 ORAC 值呈显著的正相关, 相关系数分别为 0.751 和 0.817, 表明总多酚含量与体外抗氧化活性有显著的相关性。总多酚含量与总黄酮含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 这是因为黄酮是多酚的组成成分之一。总多酚含量与 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制作用有较好的正相关关系, 总黄酮含量分别与 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制作用有中等强度、显著正相关, 表明体外降血糖活性与总多酚、总黄酮相关。DPPH 自由基清除作用与 ORAC 值具有显著正相关, 表明这两种抗氧化活性的评价方法可以相互佐证。同理, α -葡萄糖苷酶抑制作用与 α -淀粉酶抑制作用相关系数为 0.929 ($P < 0.01$), 表明这两种体外降血糖的评价方法可以互为辅助参考。而茶多糖含量与体外抗氧化、降血糖活性均没有正相关性, 这与余启明等 (2021) 和宋林珍等 (2018) 的研究结果不同, 可能是不同品种之间的茶多糖的分子量、化学成分、结构和立体构象不同从而导致体外降血糖活性不同 (宋林珍等, 2018), 具体影响因素有待进一步研究。

3 讨论与结论

7 个品种毛茶水浸出物及其浸膏中总多酚、总黄酮、茶多糖的含量之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 体外抗氧化、降血糖活性也存在差异。

两种抗氧化评价方法结果均表明六堡群体种、桂红 4 号、宛田种毛茶水浸出物的抗氧化活性较好, 同时总多酚、总黄酮含量也较高。相关性分析表明总多酚含量与抗氧化活性有显著的正相关, 总黄酮含量与抗氧化活性也有较好的正相关, 因此总多酚、总黄酮对毛茶抗氧化活性的贡献较大。总多酚含量与 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制作用有较好的正相关, 总黄酮含量分别与 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制作用有中等强度、显著正相关, 表明总多酚和总黄酮均具有降血糖活性, 同时两者可能还具有协同作用。两种降血糖评价方法结果均表明六堡群体种、桂红 4 号、桂青种的毛茶水浸出物比其余品种的降血糖活性更好, 其中六堡群体种、桂红 4 号毛茶水浸出物的总多酚、总黄酮含量均较高, 而桂青种的却低于其余品种。可能与以下两个因素有关: 潘福璐等 (2020) 研究表

表 1 不同品种毛茶水浸出物的 1/IC₅₀ 值、ORAC 值与各项指标的相关性分析
Table 1 Correlation analysis of 1/IC₅₀ value, ORAC value and various indexes
of raw tea water extracts from different varieties

指标 Index	总多酚 Total polyphenols	总黄酮 Total flavonoids	茶多糖 Tea polysaccharide	DPPH · 清除能力 DPPH · scavenging ability	ORAC 值 ORAC value	α-葡萄糖苷酶 抑制作用 α-glucosidase inhibition	α-淀粉酶 抑制作用 α-amylase inhibition
总多酚 Total polyphenols	1	0.850*	-0.495	0.751*	0.817*	0.501	0.521
总黄酮 Total flavonoids		1	-0.537	0.660	0.614	0.449	0.757*
茶多糖 Tea polysaccharide			1	-0.419	-0.394	-0.586	-0.839
DPPH · 清除能力 DPPH · scavenging ability				1	0.855*	0.622	0.564
ORAC 值 ORAC value					1	0.285	0.312
α-葡萄糖苷酶抑制作用 α-glucosidase inhibition						1	0.929**
α-淀粉酶抑制作用 α-amylase inhibition							1

注：* 表示在 0.05 级别（双尾），相关性显著；** 表示在 0.01 级别（双尾），相关性显著。
Note: * indicates significant correlation at 0.05 (two-tailed); ** indicates significant correlation at 0.01 (two-tailed).

明茶叶中多酚组分 ECG 分别与 EGCG、GCG 两两组合对抑制 α-葡萄糖苷酶活性存在协同作用,且这两种组合及组合内不同含量对比对 α-葡萄糖苷酶活性抑制作用存在差异,因此不同品种毛茶水浸出物中 ECG、EGCG、GCG 的含量组成差异对降血糖活性产生影响;茶多糖的单糖组成、分子量、支链结构、立体构象是影响其降血糖活性的重要因素(杨玉洁等,2021),如糖醛酸能明显影响多糖的活性,而茶树品种间的中性糖、糖醛酸含量存在极显著差异(刘思思,2009),因此不同品种毛茶水浸出物的茶多糖的单糖组成、分子量、支链结构和有效结构含量等方面可能不同,从而影响其降血糖活性。桂青种的体外降血糖活性的物质基础及其作用机制有待进一步研究。

综上所述,六堡群体种、桂红 4 号、宛田种、桂青种的毛茶品质均较好,其中六堡群体种、桂红 4 号同时具有开发抗氧化、降血糖功能食品的前景,宛田种、桂青种分别具有开发抗氧化、降血糖功能食品的潜力;总多酚、总黄酮对毛茶体外抗氧化、降血糖活性均有较大贡献;总多酚具有一定的热稳定性,但在高湿高温及强光条件下含量迅速下降(沈生荣,1993)。为得到抗氧化、降血糖活性更

好的六堡茶产品,在毛茶进一步的加工利用过程应着重注意对这类成分的保护,不宜长时间使用高温、强光直射的加工方式。储存时应密封避光置于干燥阴凉通风处或冷藏。总黄酮是总多酚的组成成分之一,因此其保护方法与总多酚的一致。另外,为保证同一品种茶树品质的稳定性,在对茶树进行异地引种栽培时,宜选择地域、土壤、气候、海拔高度等条件与原产地相近的地理环境(刘淑文等,2022),同时还需采用统一的茶叶采摘标准。本研究为开发抗氧化、降血糖活性更好的六堡茶产品在毛茶原料筛选和加工方式选择方面提供科学依据。

参考文献:

CHEN XQ, YE Y, CHENG H, et al., 2008. Studies on physical and chemical properties of Liupao tea [J]. Chin Agric Sci Bull, 24(7): 77-80. [陈小强, 叶阳, 成浩, 等, 2008. 六堡茶的理化分析研究 [J]. 中国农学通报, 24(7): 77-80.]
GONG YZ, XU YJ, LIU HW, et al., 2012. Progress of synergistic antioxidant effects of natural antioxidants [J]. Food Sci Technol, 37(6): 264-267. [龚艳振, 徐亚

- 健, 刘华巍, 等, 2012. 天然抗氧化剂复配研究进展 [J]. 食品科技, 37(6): 264-267.]
- GONG SJ, TENG CQ, LIANG DY, et al., 2020. *In vitro* study on hypolipidemic effects of theabrownins in Liupao tea [J]. J Tea Sci, 40(4): 536-543. [龚受基, 滕翠琴, 梁东娥, 等, 2020. 六堡茶茶褐素体外降脂功效研究 [J]. 茶叶科学, 40(4): 536-543.]
- HUANG MZ, TAN SB, WANG XY, 2020. Different drying processes on the sensory quality of primary tea of Liubao tea [J]. J Guangxi Agric, 35(5): 43-45. [黄敏周, 谭少波, 王小云, 2020. 不同干燥工艺对六堡茶毛茶感官品质的影响 [J]. 广西农学报, 35(5): 43-45.]
- JI PB, LI XS, YAN F, et al., 2021. Research progress on tea suitability [J]. Food Res Devel, 42(13): 219-224. [纪鹏彬, 李新生, 燕飞, 等, 2021. 茶叶适制性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 42(13): 219-224.]
- KONG N, 2020. Research progress in chemical constituents of Liubao tea [J]. Pop Sci Technol, 22(4): 35-37. [孔妮, 2020. 六堡茶化学成分的研究进展 [J]. 大众科技, 22(4): 35-37.]
- LI M, PANG YL, YANG C, 2021. Analysis of chemical constituents of Liubao tea in different processes [J]. J Anhui Agric Sci, 49(2): 193-195. [黎敏, 庞月兰, 杨春, 等, 2021. 不同工艺六堡茶化学成分分析 [J]. 安徽农业科学, 49(2): 193-195.]
- LI MY, LIU SG, LU MJ, et al., 2022. Comparison of antioxidant activity *in vitro* of antioxidants used in heat-processed meat products and their effects on oxidation [J]. Food Sci, 43(1): 67-75. [李明杨, 刘帅光, 卢梦娇, 等, 2022. 不同抗氧化剂体外抗氧化活性及其对肉品氧化稳定性的影响 [J]. 食品科学, 43(1): 67-75.]
- LI QJ, 2019. Liupao tea industry science and technology innovation and cooperation summit forum held in Yong [N]. Wuzhou Daily, 2019-09-22. [李欣鞠, 2019. 六堡茶产业科技创新与合作高峰论坛在邕举行 [N]. 梧州日报, 2019-09-22.]
- LIU SW, YOU JP, LI YB, et al., 2022. Analysis of factors affecting the content of tea polyphenols in tea [J]. Fujian Tea, 44(2): 18-21. [刘淑文, 游静萍, 李云冰, 等, 2022. 影响茶叶中茶多酚含量的因素分析 [J]. 福建茶叶, 44(2): 18-21.]
- LIN XS, HUANG L, XIA N, et al., 2019. Analysis, identification and fingerprint of phenols in Liupao tea [J]. Light Ind Sci Technol, 35(6): 8-11. [林小珊, 黄丽, 夏宁, 等, 2019. 六堡茶酚类物质的分析鉴定及指纹图谱研究 [J]. 轻工科技, 35(6): 8-11.]
- LIN GX, LIU YF, LAN Y, et al., 2012. Choice of varieties, seedling breeding and raw tea bases construction suitable for making six fort tea [J]. Pop Sci Technol, 14(5): 140-142. [林国轩, 刘玉芳, 兰燕, 等, 2012. 适制六堡茶品种的选择、苗木繁育及原料茶基地建设 [J]. 大众科技, 14(5): 140-142.]
- LIU XL, LI Y, JIANG YX, et al., 2012. Analysis on feature composition of Guangxi Liupao tea [J]. J Beijing Technol Bus Univ (Nat Sci Ed), 30(1): 46-50. [刘小玲, 李颖, 姜元欣, 等, 2012. 广西六堡茶主要特征成分分析 [J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 30(1): 46-50.]
- LUO L, ZHANG BJ, ZHU WX, et al., 2016. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidation of flavonoids from *Lonicera japonica* Thunb. leaves: process optimization by response surface methodology and antioxidant activity evaluation [J]. Food Sci, 37(6): 13-19. [罗磊, 张冰洁, 朱文学, 等, 2016. 响应面试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性 [J]. 食品科学, 37(6): 13-19.]
- LÜ P, PAN SY, 2020. Synergistic antioxidant effects of total flavonoids from tangerine peel and Pu'er tea [J]. Food Res Dev, 41(3): 59-64. [吕平, 潘思轶, 2020. 陈皮与普洱茶总黄酮的协同抗氧化作用研究 [J]. 食品研究与开发, 41(3): 59-64.]
- LIU M, REN X, YAO YJ, et al., 2017. Antioxidant and *in vitro* hypoglycemic activities of polyphenol in sea buckthorn leaves [J]. Nat Prod Res Dev, 29(6): 1013-1019. [柳梅, 任璇, 姚玉军, 等, 2017. 沙棘叶多酚提取物抗氧化及体外降血糖活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 29(6): 1013-1019.]
- LI XJ, CUI SY, 2011. DPPH radical scavenging mechanism of ascorbic acid [J]. Food Sci, 32(1): 86-90. [李铨军, 崔胜云, 2011. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理 [J]. 食品科学, 32(1): 86-90.]
- LIU SS, 2009. Study on composition, bioactivity of tea polysaccharides from 140 varieties and structure of tea polysaccharides with higher bioactivity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [刘思思, 2009. 茶树品种间多糖组成、活性差异及高活性茶多糖的结构分析 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- MA WJ, MA SC, LIU CM, et al., 2020. Research progress on chemical composition and biological activity of Liupao tea [J]. J Tea Sci, 40(3): 289-304. [马婉君, 马士成, 刘春梅, 等, 2020. 六堡茶的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 茶叶科学, 40(3): 289-304.]
- PAN ZH, NING DS, FU YX, et al., 2020. Preparative isolation of piceatannol derivatives from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds by high-speed countercurrent chromatography combined with high-performance liquid chromatography and screening activities [J]. J Agric Food Chem, 68(6): 1555-1562.
- PAN FL, JI YH, YU GH, et al., 2020. Study on binding

- kinetics profiles of tea polyphenols- α -glucosidase interaction [J]. Chin J Chin Mat Med, 45(18): 4472-4481. [潘福璐, 冀艳华, 于国华, 等, 2020. 茶多酚与 α -葡萄糖苷酶结合动力学特征研究 [J]. 中国中药杂志, 45(18): 4472-4481.]
- Standardization Administration of the People's Republic of China, 2013. Tea—Determination of water extracts content: GB/T 8305-2013 [S]. Beijing: China Stand Press: 1-4. [中华人民共和国国家标准化管理委员会, 2013. 茶水浸出物测定 GB/T 8305-2013 [S]. 北京: 中国标准出版社: 1-4.]
- Standardization Administration of the People's Republic of China, 2016. Dark tea—Part 4: Liupao tea: GB/T 32719.4-2016 [S]. Beijing: China Stand Press: 1-6. [中华人民共和国国家标准化管理委员会, 2016. 黑茶 第4部分: 六堡茶: GB/T 32719.4-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社: 1-6.]
- Standardization Administration of the people's Republic of China, 2018. Determination of total polyphenols and catechins content in tea: GB/T 8313-2018 [S]. Beijing: China Stand Press: 1-6. [中华人民共和国国家标准化管理委员会, 2018. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313-2018 [S]. 北京: 中国标准出版社: 1-6.]
- Standardization Administration of the People's Republic of China, 2021. Determination for polysaccharides in bamboo leaves: GB/T 40632-2021 [S]. Beijing: China Stand Press: 1-2. [中华人民共和国国家标准化管理委员会, 2021. 竹叶中多糖的检测方法: GB/T 40632-2021 [S]. 北京: 中国标准出版社: 1-2.]
- SONG LZ, ZHU LY, GAO YS, et al., 2018. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from green tea leaves [J]. Food Sci, 39(19): 162-168. [宋林珍, 朱丽云, 高永生, 等, 2018. 茶多糖的结构特征与降血糖活性 [J]. 食品科学, 39(19): 162-168.]
- SHEN SR, 1993. Stability of tea polyphenols [J]. J Tea, 19(2): 27-29. [沈生荣, 1993. 茶多酚的稳定性 [J]. 茶叶, 19(2): 27-29.]
- WEN LR, ZHENG GQ, YOU LJ, et al., 2016. Phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of *Malus doumeri* (bois) chevalier on 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP)-induced oxidative stress [J]. J Funct Foods, 25: 242-256.
- WEN LX, ZHANG F, HE MZ, et al., 2021. Quality characteristics of stale flavor Liupao teas and establishment for evaluation method of aroma quality [J]. Sci Technol Food Ind, 42(2): 230-236. [温立香, 张芬, 何梅珍, 等, 2021. 陈香六堡茶品质特征及香气质量评价方法建立 [J]. 食品工业科技, 42(2): 230-236.]
- XU JK, YAO XS, SU YB, 2006. Oxygen radical absorbance capacity assay and its application [J]. Chin Pharmacol Bull, 22(8): 1015-1021. [续洁琨, 姚新生, 栗原博, 2006. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用 [J]. 中国药理学通报, 22(8): 1015-1021.]
- YE Y, WEI BY, TENG JW, et al., 2019. Effect of Liupao tea on levels of short chain fatty acids in intestinal tract of rats with hyperlipidemia [J]. J Tea Sci, 39(2): 211-219. [叶颖, 韦保耀, 滕建文, 等, 2019. 六堡茶对高脂饮食大鼠肠道短链脂肪酸含量的影响 [J]. 茶叶科学, 39(2): 211-219.]
- YANG YJ, LIU JY, TAN Y, et al., 2021. Progress in understanding the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharides [J]. Food Sci, 42(23): 355-363. [杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等, 2021. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展 [J]. 食品科学, 42(23): 355-363.]
- ZHANG JW, HOU C, DU YG, et al., 2019. Effect of fermentation on chemical compositions of Liupao tea using high-resolution mass spectrometry combined with principal component analysis [J]. Food Sci Technol, 44(12): 328-334. [张均伟, 侯粲, 杜显光, 等, 2019. 基于高分辨质谱结合主成分分析技术评价发酵过程对六堡茶关键品质成分的影响 [J]. 食品科技, 44(12): 328-334.]
- ZHOU WQ, NONG YF, SU SM, et al., 2013. On the relationship between the quality of Liupao tea and tea plants in Liupao population species [J]. Sino-foreign Food Ind, 6: 34-35. [周伟勤, 浓艳芳, 苏淑梅, 等, 2013. 论六堡茶品质与六堡茶群体种的关系 [J]. 中外食品工业, 6: 34-35.]
- ZHOU JW, CHEN X, YI YJ, et al., 2014. Comparative analysis on antioxidant capacities of different types of fermented teas *in vitro* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 14(8): 262-269. [周金伟, 陈雪, 易有金, 等, 2014. 不同类型茶叶体外抗氧化能力的比较分析 [J]. 中国食品学报, 14(8): 262-269.]
- ZHANG ZS, GUO Q, GAO YF, et al., 2017. Industrialization progress of natural antioxidants [J]. Food Res Dev, 38(7): 206-209. [张泽生, 郭擎, 高云峰, 等, 2017. 天然抗氧化剂的产业化进展 [J]. 食品研究与开发, 38(7): 206-209.]

(责任编辑 蒋巧媛 王登惠)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202203019

任文静, 马艳, 蔡梅超, 等, 2023. 北豆根化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 广西植物, 43(6): 1155–1162.

REN WJ, MA Y, CAI MC, et al., 2023. Chemical constituents from the rhizome of *Menispermum dauricum* and their anti-inflammatory activities [J]. Guihaia, 43(6): 1155–1162.

北豆根化学成分及其抗炎活性研究

任文静^{1,2}, 马艳¹, 蔡梅超¹, 王凤山³, 李莉⁴, 刘玉红^{1,2,4*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078; 3. 国家药品监督管理局糖药物质量研究与评价重点实验室, 国家糖工程技术研究中心, 山东大学药学院, 济南 250012; 4. 泗水泗河源文化旅游开发有限责任公司, 山东 济宁 272000)

摘要: 北豆根, 防己科蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum*) 的干燥根茎, 是重要的中药材。为阐明北豆根的药效物质基础, 该研究利用硅胶柱层析、大孔吸附树脂及高压制备 HPLC 等色谱技术对北豆根化学成分进行系统分离, 采用 NMR 等波谱技术对化合物进行结构鉴定, 并通过测定化合物对脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 和 IL-6 炎症因子的含量评价其抗炎活性。结果表明: (1) 从北豆根甲醇提取物中分离鉴定了 15 个化合物, 分别鉴定为对羟基苯甲醛 (1)、香草酸 (2)、丁香醛 (3)、2-羟基-1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-1-丙酮 (4)、对羟基苯乙酸甲酯 (5)、2-(4-羟基苯基)-硝基乙烷 (6)、对羟基苯乙腈 (7)、邻苯二甲酸二丁酯 (8)、franginsin B₂ (9)、7-hydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-phenanthraquinone (10)、棕榈酸 (11)、花生酸 (12)、 β -谷甾醇 (13)、 β -豆甾醇 (14)、胡萝卜苷 (15)。其中, 化合物 4-7、9、12 为首次从防己科植物中分离得到, 化合物 1、3-11、14 为首次从蝙蝠葛属植物中分离得到。上述化合物包括苯酚类、木脂素类、菲醌类、脂肪酸类及甾醇类。(2) 化合物 12 在 25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下可以显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 和 IL-6 的释放, 具有潜在的抗炎作用。该研究结果丰富了北豆根的化学多样性, 明确了其抗炎活性的活性成分, 为药用植物资源的合理利用提供了有效参考。

关键词: 防己科, 北豆根, 化学成分, 结构鉴定, 抗炎活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1155-08

Chemical constituents from the rhizome of *Menispermum dauricum* and their anti-inflammatory activities

REN Wenjing^{1,2}, MA Yan¹, CAI Meichao¹, WANG Fengshan³,
LI Li⁴, LIU Yuhong^{1,2,4*}

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2019MH082); 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0024); 泰山产业领军人才工程专项 (tscy20200410); 国家药品监督管理局糖药物质量研究与评价重点实验室开放课题项目 (2021QRECM02)。

第一作者: 任文静 (1995-), 博士研究生, 研究方向为中药化学成分与活性, (E-mail) 1362402241@qq.com。

*通信作者: 刘玉红, 博士, 教授, 研究方向为天然药物化学成分与活性, (E-mail) yhliu@sdutcm.edu.cn。

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; 3. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Carbohydrate-Based Medicine, National Glycoengineering Research Center, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 4. Sishui Siheyuan Culture and Tourism Development Co., Ltd., Sisui 273200, Shandong, China)

Abstract: Bei-dou-gen, the dried rhizome of *Menispermum dauricum* from the Menispermaceae family, is an important Chinese medicinal material. In order to clarify the pharmacodynamic substance basis, the methanol extract of the rhizome in *M. dauricum* was systematically isolated and purified using various chromatographic methods and the structures of isolated compounds were identified. The potential anti-inflammatory activity of obtained compounds from *M. dauricum* was measured *in vitro*. In this study, the chemical constituents were separated via silica gel column chromatography, macroporous adsorption resin and preparative HPLC, and their structures were determined on the basis of MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and other spectroscopic data analysis, as well as comparison with relevant literatures. Meanwhile, the anti-inflammatory activities of against NO and IL-6 production from LPS-induced RAW264.7 cells of the chemical components were evaluated *in vitro*. The results were as follows: (1) Fifteen compounds were isolated from the rhizome of *M. dauricum*, and identified as *p*-hydroxybenzaldehyde (**1**), vanillic acid (**2**), syringaldehyde (**3**), 2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanone (**4**), methyl 4-hydroxyphenylacetate (**5**), 2-(4-hydroxyphenyl)-1-nitroethane (**6**), 4-hydroxyphenylacetonitrile (**7**), dibutyl phthalate (**8**), fragransin B₂ (**9**), 7-hydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-phenanthraquinone (**10**), palmitic acid (**11**), arachidic acid (**12**), β -sitosterol (**13**), β -stigmasterol (**14**) and daucosterol (**15**). Among them, compounds **4**–**7**, **9** and **12** were isolated from Menispermaceae for the first time, while compounds **1**, **3**–**11** and **14** were first reported from *Menispermum* genus. The above compounds were all non-alkaloids components, including phenols, lignans, phenanthraquinones, fatty acids and sterols. (2) Anti-inflammatory assay *in vitro* showed that Compound **12** could significantly inhibited releases of NO and IL-6 induced by LPS from RAW264.7 cells at the concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, indicating potential anti-inflammatory activity. The results of this study enrich the chemical diversity of the rhizome of *M. dauricum* and clarifies the active ingredients of its anti-inflammatory activity, and provide effective reference for the rational utilization of medicinal plant resources.

Key words: Menispermaceae, rhizome of *Menispermum dauricum*, chemical constituents, structure identification, anti-inflammatory activity

北豆根系防己科蝙蝠葛属植物蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum*) 的干燥根茎, 原名为蝙蝠葛根(喻瑛瑛等, 2019a)。主产于东北、华北、河北、山东、四川及陕西等地。北豆根气微、味苦、寒、有小毒, 具有清热解毒、祛风止痛的功效, 在民间广泛用于治疗肠炎、痢疾、风湿病和支气管炎等炎性疾病。目前已开发上市的北豆根总碱片、北豆根胶囊、复方北豆根氨酚那敏片及北豆根注射液等在临床上被广泛应用于扁桃体炎、牙龈肿痛、咽喉肿痛等疾病的治疗。此外, 气雾剂、滴丸及复方制剂也普遍应用于临床(苏慧等, 2015)。

北豆根在我国资源丰富, 分布广泛, 为药材资源的开发和临床应用提供了坚实基础。目前的研

究多集中于北豆根提取物或酚性碱, 它们具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗脑缺血、免疫调节等药理作用(喻瑛瑛等, 2019b; 邵佳等, 2019)。然而, 蝙蝠葛碱、青藤碱等生物碱成分具有肾毒性和肝毒性, 但其体内毒性过程、作用特点、作用机制尚不完全明确(孙蓉和王晨, 2009)。因此, 寻找具有良好活性的非生物碱类成分是必要的。为了丰富北豆根化学成分信息, 更全面地阐明北豆根药效物质基础, 也为了临床的安全用药及合理开发植物资源, 本研究以北豆根为对象, 依托药学研究平台, 采用现代色谱分离手段、现代波谱学技术和现代药理学方法, 拟探讨以下问题: (1) 北豆根甲醇提取物的化学成分; (2) 分离得到的部分化合物的体外抗炎活性。

1 材料与仪器

1.1 药材

实验用北豆根药材于 2018 年 10 月购自百味堂中药饮片科技有限公司(产地山东,批号:180506),经山东中医药大学李佳教授鉴定为防己科蝙蝠葛属植物蝙蝠葛的干燥根茎,药材标本保存于山东中医药大学天然药物实验室。

1.2 仪器和试剂

Bruker AV-400(600 MHz)核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);6540 UHD Q-TOF-MS 液相色谱质谱联用仪(美国安捷伦公司);Agilent 1290 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);艾杰尔 FL-H050G 高压液相制备色谱仪,Innoval ODS-2 制备柱(10 mm × 250 mm, 5 μm)(天津博纳艾杰尔科技有限公司);AB-8 型大孔吸附树脂(上海源叶生物科技有限公司);Sarto-rius BP211D 型电子天平(德国赛托利斯集团);柱层析硅胶、薄层层析硅胶(青岛海洋化工厂);氘代试剂(萨恩化学技术有限公司);NO、IL-6 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);小鼠巨噬细胞 RAW264.7(北纳创联生物科技有限公司,BNCC 101020)。

2 实验方法

2.1 提取和分离

将 9.2 kg 的北豆根药材粉碎成粗粉后,10 倍量甲醇冷浸 2 次,每次 15 d。将浸提液减压浓缩,得浸膏约 700.0 g,加适量蒸馏水悬浮,依次用正己烷(4.5 L)、乙酸乙酯(4.0 L)、正丁醇(3.5 L)进行萃取,将各级萃取液减压浓缩分别得到正己烷部位 49.8 g、乙酸乙酯部位 23.7 g、正丁醇部位 124.7 g 和水部位 417.8 g。

取正己烷部位浸膏 40.0 g,经正相硅胶柱色谱,采用正己烷-乙酸乙酯流动相(1:0、50:1、20:1、10:1、5:1、1:1、1:4、0:1, V/V)进行梯度洗脱。收集的流分经 TLC 检识,合并得 12 个组分 Fr. A-K。化合物 12(9.83 mg)经过甲醇反复重结晶从 Fr. C(3.0 g)中获得。Fr. E(3.0 g)经过硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇系统(200:1、150:1、100:

1、50:1、20:1、20:1、0:1, V/V)梯度洗脱得到 Fr. E1-E17。Fr. E6 经甲醇重结晶得到化合物 13(40.18 mg)和化合物 14(40.18 mg)。Fr. H(3.5 g)经硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯系统(1:0、50:1、20:1、10:1、5:1、1:1、0:1, V/V)梯度洗脱得到 Fr. H1-H20。Fr. H9 经高压反相色谱法,45%甲醇-水系统等度洗脱得化合物 11(19.65 mg, t_R = 16.0 min)。Fr. I(0.7 g)通过正相硅胶柱色谱,采用二氯甲烷-甲醇系统(200:1、150:1、100:1、50:1、20:1、10:1、0:1, V/V)梯度洗脱得到 Fr. I1-I17。Fr. I10 中析出白色片状固体经甲醇反复重结晶得到化合物 15(15.12 mg)。

取乙酸乙酯部位浸膏 20.0 g 进行硅胶柱色谱纯化,用二氯甲烷-甲醇系统(1:0、50:1、30:1、15:1、10:1、0:1, V/V)梯度洗脱,经 TLC 检识,合并流分得 Fr. L-Q。Fr. N(2.4 g)通过高压制备液相色谱(甲醇:水 = 33:67)分离纯化得化合物 5(2.03 mg, t_R = 37.0 min)和化合物 6(12.74 mg, t_R = 22.0 min)。Fr. O(12.4 g)经硅胶柱以二氯甲烷-甲醇系统(1:0、100:1、80:1、50:1、40:1、30:1、0:1, V/V)梯度洗脱得 Fr. O1-O9。Fr. O2(0.3 g)经过高压制备液相色谱,以 35%甲醇-水系统等度洗脱获得化合物 1(2.05 mg, t_R = 26.0 min)、化合物 3(1.91 mg, t_R = 30.0 min)、化合物 7(1.87 mg, t_R = 10.0 min),以 60%甲醇-水等度洗脱获得化合物 10(1.63 mg, t_R = 35.0 min)。经高压反相色谱法(甲醇:水 = 23:77)从 Fr. O3(0.4 g)中分离出化合物 2(16.72 mg, t_R = 27.5 min)和化合物 4(1.01 mg, t_R = 35.9 min)。Fr. O4(0.6 g)经高压制备液相色谱(甲醇:水 = 70:30)纯化获得化合物 9(2.76 mg, t_R = 12.0 min)。

取正丁醇部位浸膏 90.0 g,经 AB-8 型大孔吸附树脂(10%、30%、50%、70%、90%乙醇依次洗脱至接近无色)并收集流分,经减压浓缩得 Fr. R-V。Fr. V(0.6 g)经高压制备液相色谱(甲醇:水 = 77:23)纯化获得化合物 8(3.35 mg, t_R = 34.0 min)。

化合物 1-15 的化学结构如图 1 所示。

2.2 体外抗炎活性测试

将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个 · mL⁻¹ 密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,培养 24 h,加入含药培养基。实验组别设置为正常组(不做处理)、模

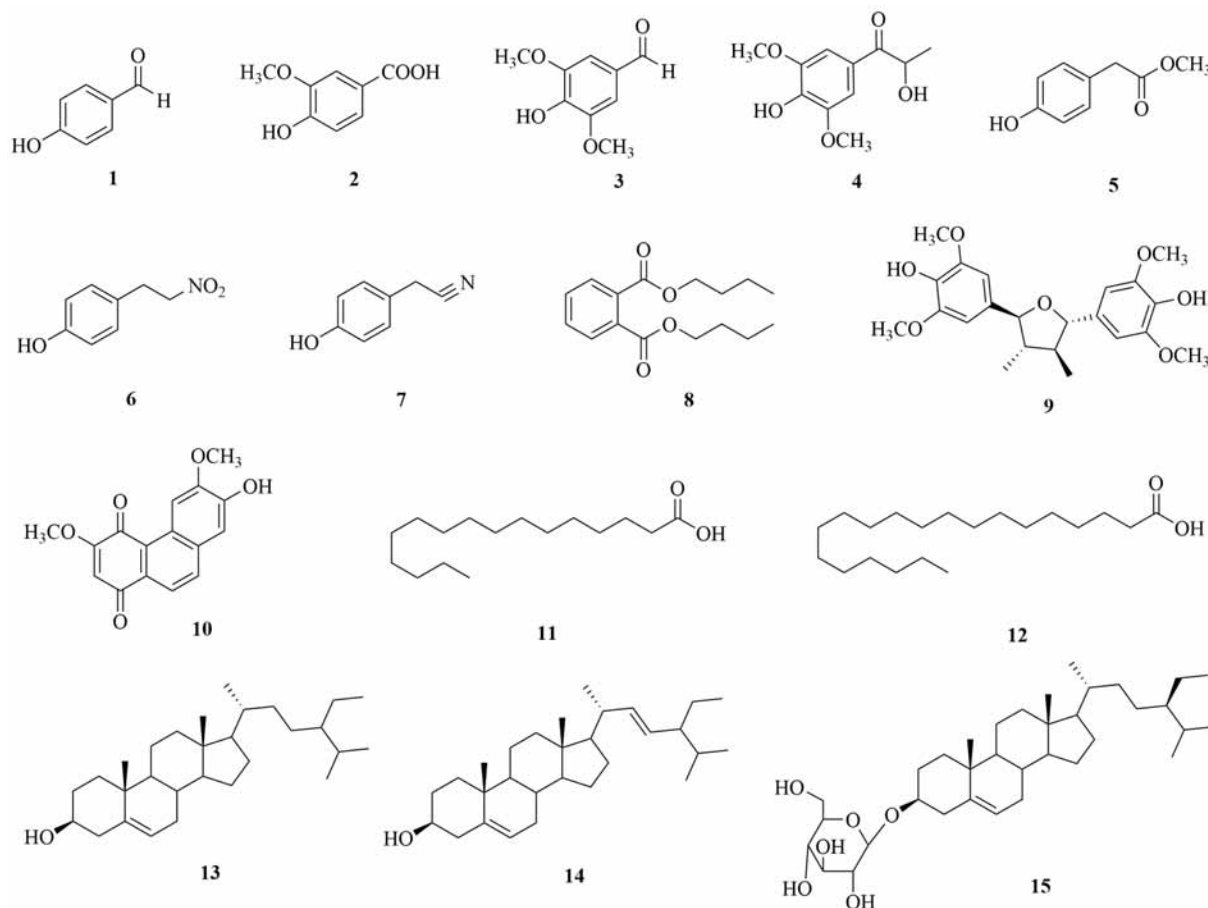


图 1 化合物 1-15 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-15

型组、阳性对照组 (25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素) 和样品组 (25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不同化合物), 每组 5 个复孔。正常组和模型组加入不含药培养基, 药物组加入含药培养基, 孵育细胞 1 h 后, 除正常组外, 其他各组均加入 LPS 使其终浓度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 继续孵育细胞 24 h, 收集细胞上清液, 离心取上清液, 按照试剂盒说明书检测 (陈千, 2020) NO 和 IL-6。同一批次的细胞采用 MTT 法对细胞活力进行测定。计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(OD_{\text{正常对照组}} - OD_{\text{样品组}})}{(OD_{\text{正常对照组}} - OD_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1 无色结晶 (丙酮)。m.p. 113 ~ 114

$^{\circ}\text{C}$ 。C₇H₆O₂, ESI-MS m/z : 121.0 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 9.76 (1H, s, H-7), 7.78 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3, 5)。¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 130.5 (C-1), 133.6 (C-2, 6), 117.0 (C-3, 5), 165.4 (C-4), 193.0 (C-7)。以上数据与文献 (张春花等, 2020) 对照基本一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 2 浅粉色无定形粉末 (甲醇)。m.p. 198 ~ 200 $^{\circ}\text{C}$ 。C₈H₈O₄, ESI-MS m/z : 169.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (1H, br s, H-6), 7.54 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.83 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 3.82 (3H, s, OCH₃-1)。¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 122.5 (C-1), 113.9 (C-2), 152.7 (C-3), 148.8 (C-4), 16.0 (C-

5), 125.4 (C-6), 170.5 (COOH), 56.5 (OCH₃-1)。以上数据与文献(何康等, 2021)对照基本一致, 故鉴定该化合物为香草酸。

化合物 3 无色晶体(氯仿)。m.p. 110~112 °C。C₉H₁₀O₄, ESI-MS m/z : 183.1 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 9.74(1H, s, H-7), 7.23(2H, s, H-2, 6), 3.92(6H, s, OCH₃-3, 5)。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 129.0(C-1), 108.3(C-2, 6), 149.7(C-3, 5), 140.9(C-4), 193.0(C-7), 56.9(OCH₃-3, 5)。以上数据与文献(张春花等, 2020)对照基本一致, 故鉴定该化合物为丁香醛。

化合物 4 白色无定形粉末(甲醇)。m.p. 126~127 °C。C₇H₆O₂, ESI-MS m/z : 121.0 [M - H]⁻。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.32(2H, s, H-2, 6), 5.19(1H, q, J = 6.9 Hz, H-8), 3.90(6H, s, OCH₃-3, 5), 1.49(3H, d, J = 6.9 Hz, CH₃-8)。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 126.3(C-1), 107.8(C-2, 6), 149.3(C-3, 5), 143.2(C-4), 202.1(C-7), 70.2(C-8), 57.1(OCH₃-3, 5), 22.2(CH₃-8)。以上数据与文献(遆慧慧等, 2015)对照基本一致, 故鉴定该化合物为2-羟基-1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-1-丙酮。

化合物 5 淡黄色粉末(氯仿)。m.p. 119~120 °C。C₉H₁₀O₃, ESI-MS m/z : 167.0 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.16(2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.72(2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 3.66(3H, s, OCH₃-8), 3.52(2H, s, H-7)。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 126.4(C-1), 131.4(C-2, 6), 116.4(C-3, 5), 157.4(C-4), 40.9(C-7), 174.6(C-8), 52.5(OCH₃-8)。以上数据与文献(莫胡青等, 2020)对照基本一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯乙酸甲酯。

化合物 6 黄色油状物(氯仿)。m.p. 107~108 °C。C₈H₉O₃N, ESI-MS m/z : 166.1 [M - H]⁻。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 7.05(2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.77(2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 4.55(2H, t, J = 7.4 Hz, H-8), 3.21(2H, t, J = 7.4 Hz, H-7)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 128.0(C-1), 130.1(C-2, 6), 116.0(C-3, 5), 155.1(C-4), 32.9(C-7), 76.8(C-8)。以上数据与文献(孙彦君等, 2012)对照基本一致, 故鉴定该化合物为2-(4-羟

苯基)-硝基乙烷。

化合物 7 白色粉末(甲醇)。m.p. 66~67 °C。C₈H₇ON, ESI-MS m/z : 134.1 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.15(2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.78(2H, d, J = 9.0 Hz, H-2, 6), 3.75(2H, s, H-7)。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 158.5(C-1), 116.9(C-2, 6), 130.4(C-3, 5), 120.3(C-4), 22.8(C-7), 122.9(C-8)。以上数据与文献(张普照等, 2016)对照基本一致, 故鉴定该化合物为对羟基苯乙腈。

化合物 8 无色油状物(甲醇)。m.p. 149~150 °C。C₁₆H₂₂O₄, ESI-MS m/z : 279.1 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.72(2H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz, H-3, 6), 7.61(2H, dd, J = 5.7, 3.3 Hz, H-4, 5), 4.29(4H, t, J = 6.6 Hz, H-8, 8'), 1.71(4H, m, H-9, 9'), 1.45(4H, m, H-10, 10'), 0.98(6H, t, J = 7.4 Hz, H-11, 11')。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 133.7(C-1, 2), 130.0(C-3, 6), 132.5(C-4, 5), 169.5(C-7, 7'), 66.8(C-8, 8'), 31.9(C-9, 9'), 20.4(C-10, 10'), 14.2(C-11, 11')。以上数据与文献(莫胡青等, 2020)对照基本一致, 故鉴定该化合物为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 9 白色无定形粉末(氯仿)。m.p. 153~155 °C。C₁₁H₁₄O₅, ESI-MS m/z : 227.2 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 6.69(4H, br s, H-2, 2', 6, 6'), 4.64(2H, m, H-7, 7'), 3.86(12H, s, OCH₃-3, 3', 5, 5'), 1.82(2H, m, H-8, 8'), 1.04(6H, d, J = 6.0 Hz, C-9, 9')。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 134.0(C-1, 1'), 104.9(C-2, 2', 6, 6'), 149.3(C-3, 3', 5, 5'), 136.3(C-4, 4'), 90.4(C-7, 7'), 52.1(C-8, 8'), 56.8(OCH₃-3, 3', 5, 5'), 14.0(C-9, 9')。以上数据与文献(李小珍等, 2017)对照基本一致, 故鉴定该化合物为 fragransin B₂。

化合物 10 红棕色针形晶体(甲醇)。m.p. 243~244 °C。C₁₆H₁₂O₅, ESI-MS m/z : 285.0 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 9.04(1H, s, H-5), 8.00(1H, d, J = 8.4 Hz, H-9), 7.93(1H, d, J = 8.4 Hz, H-10), 7.23(1H, s, H-8), 6.05(1H, s, H-2), 4.05(3H, s, OCH₃-6), 3.87(3H, s, OCH₃-3)。¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD) δ : 185.8(C-1), 107.6

(C-2), 160.9 (C-3), 183.4 (C-4), 134.2 (C-4a), 126.4 (C-4b), 105.8 (C-5), 151.3 (C-6), 147.8 (C-7), 110.3 (C-8), 124.8 (C-8a), 134.1 (C-9), 121.1 (C-10), 131.3 (C-10a), 56.8 (OCH₃-3), 56.4 (OCH₃-6)。以上数据与文献(Zhang et al., 2004)对照基本一致,故鉴定该化合物为 7-hydroxy-3,6-dimethoxy-1,4-phenanthraquinone。

化合物 11 白色颗粒状结晶(氯仿-甲醇)。m.p. 60 ~ 62 °C。C₁₆H₃₂O₂, ESI-MS m/z : 255.2 [M-H]⁻。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 2.32 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2), 1.61 (2H, m, H-3), 1.28 (24H, m, H-4~15), 0.86 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-16)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 34.2 (C-1), 24.9 (C-2), 29.3~29.9 (C-3-12), 32.2 (C-13), 22.0 (C-14), 14.3 (C-15), 179.9 (C=O)。以上数据与文献(张纪越等, 2020)对照基本一致,故鉴定该化合物为棕榈酸。

化合物 12 白色粉末(石油醚-乙酸乙酯)。m.p. 75 ~ 76 °C。C₂₀H₄₀O₂, ESI-MS m/z : 311.2 [M-H]⁻。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 0.86 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH₃-20), 1.21~1.34 (32H, m, CH₂-3~19), 1.61 (2H, m, CH₂-3), 2.35 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂-2)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 179.4 (C-1), 34.1 (C-2), 24.9 (C-3), 32.2 (C-4), 29.3~29.9 (C-5-18), 22.9 (C-19), 14.3 (C-20)。以上数据与文献(Li et al., 2010)对照基本一致,故鉴定该化合物为花生酸。

化合物 13 白色针晶(石油醚-乙酸乙酯)。10%硫酸-乙醇显紫红色。m.p. 140 ~ 142 °C。C₂₉H₅₀O, ESI-MS m/z : 415.0 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 5.28 (1H, m, H-6), 3.45 (1H, m, H-3), 0.95 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-21), 0.94 (3H, s, CH₃-19), 0.85 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-26), 0.76 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃-29), 0.74 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH₃-27), 0.61 (3H, s, CH₃-18)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 37.5 (C-1), 31.9 (C-2), 72.0 (C-3), 42.5 (C-4), 141.0 (C-5), 122.0 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.7 (C-10), 21.3 (C-11), 40.0 (C-12), 42.5 (C-13), 57.0 (C-14), 24.5 (C-15), 28.5 (C-16), 56.2 (C-17), 12.1 (C-18), 19.6 (C-19), 36.4 (C-20), 19.0 (C-21),

34.2 (C-22), 26.3 (C-23), 46.1 (C-24), 29.4 (C-25), 20.0 (C-26), 19.3 (C-27), 23.3 (C-28), 12.5 (C-29)。以上数据与文献(惠昱昱等, 2021)对照基本一致,故鉴定该化合物为 β -谷甾醇。

化合物 14 白色块状结晶(氯仿)。10%硫酸-乙醇显紫红色。m.p. 140 ~ 142 °C。C₂₉H₄₈O, ESI-MS m/z : 413.0 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 5.28 (1H, m, H-6), 5.08 (1H, dd, J = 15.2, 8.7 Hz, H-22), 4.95 (1H, dd, J = 15.2, 8.8 Hz, H-23), 3.45 (1H, m, H-3), 0.95 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-21), 0.94 (3H, s, CH₃-19), 0.85 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-26), 0.76 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃-29), 0.74 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH₃-27), 0.61 (3H, s, CH₃-18)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 37.5 (C-1), 31.9 (C-2), 72.0 (C-3), 42.5 (C-4), 141.0 (C-5), 122.0 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.7 (C-10), 21.3 (C-11), 40.0 (C-12), 42.5 (C-13), 57.1 (C-14), 24.6 (C-15), 29.1 (C-16), 56.3 (C-17), 12.2 (C-18), 19.6 (C-19), 40.7 (C-20), 12.3 (C-21), 138.6 (C-22), 129.5 (C-23), 51.5 (C-24), 32.1 (C-25), 21.4 (C-26), 19.3 (C-27), 25.6 (C-28), 12.5 (C-29)。以上数据与文献(卢澄生等, 2020)对照基本一致,故鉴定该化合物为 β -豆甾醇。

化合物 15 白色无定形粉末(丙酮)。10%硫酸-乙醇显紫色, Molish 反应阳性。m.p. 300 ~ 301 °C。C₃₅H₆₀O₆, ESI-MS m/z : 577.4 [M + H]⁺。¹H-NMR(600 MHz, DMSO) δ : 5.33 (1H, s, H-6), 4.44 (1H, t, J = 5.8 Hz, H-1'), 0.82 (9H, m, H-26~27, 29), 0.66 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR(150 MHz, DMSO) δ : 36.9 (C-1), 29.3 (C-2), 71.5 (C-3), 38.3 (C-4), 140.5 (C-5), 121.3 (C-6), 31.4 (C-7), 31.5 (C-8), 49.6 (C-9), 36.3 (C-10), 20.6 (C-11), 39.2 (C-12), 41.9 (C-13), 56.2 (C-14), 23.9 (C-15), 27.8 (C-16), 56.4 (C-17), 11.7 (C-18), 19.1 (C-19), 35.6 (C-20), 18.7 (C-21), 33.4 (C-22), 25.4 (C-23), 45.2 (C-24), 28.7 (C-25), 19.0 (C-26), 19.7 (C-27), 22.6 (C-28), 11.8 (C-29), Glc: 100.8 (C-1'), 76.9 (C-2'), 76.8 (C-3'), 73.5 (C-4'), 70.1 (C-5'), 61.1 (C-6')。以上数据与文献(惠昱昱等, 2021)对照基本一致,故鉴定该化合物为胡萝卜苷。

表 1 化合物 4、8、9-12 对 RAW264.7 细胞生成 NO 和 IL-6 的抑制率
Table 1 Inhibition rates of compounds 4, 8, 9-12 on the production of NO and IL-6 in RAW264.7 cells

组别 Group	浓度 Concen- tration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 Inhibition rate (%)	组别 Group	浓度 Concen- tration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 Inhibition rate (%)
槲皮素 ^a quercetin	NO (25)	83.28		NO (50)	47.89
	IL-6 (25)	72.14		IL-6 (50)	23.15
	NO (50)	69.46	10	NO (25)	58.93
	IL-6 (50)	37.30		IL-6 (25)	46.02
4	NO (25)	35.10		NO (50)	50.31
	IL-6 (25)	33.79		IL-6 (50)	25.77
	NO (50)	35.19	11	NO (25)	60.43
	IL-6 (50)	18.24		IL-6 (25)	49.20
8	NO (25)	37.62		NO (50)	46.74
	IL-6 (25)	34.47		IL-6 (50)	21.09
	NO (50)	31.33	12	NO (25)	84.66
	IL-6 (50)	16.15		IL-6 (25)	79.60
9	NO (25)	55.37		NO (50)	72.79
	IL-6 (25)	40.18		IL-6 (50)	34.83

注：“^a”表示阳性对照。
Note: “^a” indicates positive control.

3.2 体外抗炎活性

与正常组比较,LPS 模型组的 NO 和 IL-6 含量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的化合物 12 能显著抑制 NO 的产生, 并降低细胞上清液中 IL-6 含量 ($P<0.01$)。化合物 12 和槲皮素对 NO 和 IL-6 含量的抑制率见表 1。由表 1 可知, 化合物 2 与阳性药的体外抗炎活性相当, 可为后续抗炎机制研究奠定基础。

4 讨论与结论

北豆根以清热解毒功效著称, 其总碱制成的片剂和注射液已广泛应用于各种炎症疾病的治疗。随着医学和科技的进步, 北豆根中的化学成分及有效成分更加明确, 药理研究逐步从有效部位深入到化学成分。本文对北豆根化学成分进行

了系统研究, 共分离鉴定出 15 个化合物, 其中化合物 4-7、9、12 为首次从防己科植物中分离得到, 化合物 1、3-11、14 为首次从蝙蝠葛属植物中分离得到。上述化合物包括苯酚类、木脂素类、菲醌类、脂肪酸类及甾醇类, 丰富了北豆根的化学多样性。为了保证抗炎活性的真实性和可靠性, 化合物必须在无毒的情况下进行细胞实验。因此我们选取了 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以内对细胞活力没有影响的化合物 (1-3、5-7、13-15) 进行体外抗炎活性研究。研究结果表明化合物 12 具有较强的抑制 RAW264.7 细胞释放 NO 和 IL-6 的作用, 提示其有良好的体外抗炎活性。但是, 本研究发现 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下化合物 12 对炎症因子抑制率更高一些, 作用效果并没有成剂量依赖关系。猜测可能是由于对给药浓度的设定存在一定的缺陷, 后期实验可以在 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度以下设置浓度梯度; 也可能由于化合物结构中存在多种官能团, 炎症相关通路及机制尤为复杂, 因此可能产生不同构效关系。本文主要对北豆根的化学成分及其抗炎活性进行了系统研究, 值得指出的是, 北豆根中的化学成分及药理活性研究集中于酚性总碱, 对非生物碱类及单一化合物的药理活性研究需更加深入的探索。因此, 本研究结果为后续寻找新的药效物质基础提供科学依据, 为全面深入研究抗炎作用机制奠定基础, 同时对进一步合理开发和利用该植物资源及拓展其临床应用范围具有一定的指导意义。

参考文献:

CHEN Q, 2020. Study on the chemical constituents in *Hypericum sampsonii* and their anti-tumour and anti-inflammatory activity [D]. Hefei: Anhui Medical University: 27-28. [陈千, 2020. 元宝草化学成分及其抗肿瘤和抗炎活性的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学: 27-28.]

HE K, FAN LL, WU TT, et al., 2021. Chemical constituents from *Pyrrosia shearerii* [J]. *Guizhou*, 41 (11): 1862-1867. [何康, 范琳琳, 伍天苔, 等, 2021. 庐山石韦的化学成分研究 [J]. *广西植物*, 41(11): 1862-1867.]

HUI YY, CHEN D, YANG XF, 2021. Chemical constituents from the roots of *Piper longum* and their antitumor activities [J]. *Chin Trad Pat Med*, 43(1): 98-102. [惠昱昱, 陈镛,

- 杨秀芳, 2021. 茛菪根化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 43(1): 98-102.]
- LI FS, YAN DL, LIU RR, et al., 2010. Chemical constituents of *Boswellia carterii* (Frankincense) [J]. Chin J Nat Med, 115(1): 25-27.
- LI XZ, YAN YM, CHENG YX, 2017. Compounds from *Clerodendranthus spicatus* [J]. Nat Prod Res Dev, 29(2): 183-189. [李小珍, 晏永明, 程永现, 2017. 肾茶化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 29(2): 183-189.]
- LU CS, ZHANG Q, ZENG J, et al., 2020. Chemical constituents of Zhuang medicine *Whitfordiodendron filipes* Caculis [J]. Chin Med Mat, 43(7): 1635-1638. [卢澄生, 张强, 曾洁, 等, 2020. 壮药黄皮血藤化学成分研究 [J]. 中药材, 43(7): 1635-1638.]
- MO QH, ZHOU XL, ZHOU Y, et al., 2020. Chemical constituents from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa* [J]. Chin Med Mat, 43(3): 587-590. [莫青胡, 周先丽, 周云, 等, 2020. 桃金娘叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 43(3): 587-590.]
- SHAO J, SHI CF, WEI JX, 2019. Chemical constituents from rhizome of *Menispermum dauricum* and their anti-hypoxic activities [J]. Chin J Chin Mat Med, 44(4): 723-729. [邵佳, 师超峰, 魏金霞, 等, 2019. 北豆根中化学成分及其抗缺氧活性研究 [J]. 中国中药杂志, 44(4): 723-729.]
- SU H, WANG XG, LIU SQ, 2015. Research progress on the dosage from the extract of *Menispermum dauricum* [J]. J Hebei Trad Chin Med, 30(2): 61-64. [苏慧, 王兴刚, 刘霜琪, 2015. 北豆根提取物剂型的研究进展 [J]. 河北中医药学报, 30(2): 61-64.]
- SUN R, WANG C, 2009. Research development on toxicity of *Rhizoma menispermii* [J]. Chin J Pharmacovigil, 6(9): 546-549. [孙蓉, 王晨, 2009. 北豆根毒性研究进展 [J]. 中国药物警戒, 6(9): 546-549.]
- SUN YJ, ZHOU W, CHEN H, et al., 2012. Phenols from roots and rhizomes of *Sinopodophyllum emodi* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 43(2): 226-229. [孙彦君, 周巍, 陈虹, 等, 2012. 桃儿七中酚类成分研究 [J]. 中草药, 43(2): 226-229.]
- TI HH, XU LX, CHEN ZH, 2015. Megastigmane sesquiterpenes and phenylpropanols from *Epimedium pseudowushanense* [J]. J Trop Subtrop Bot, 23(1): 99-102. [蒯慧慧, 徐良雄, 陈志辉, 2015. 拟巫山淫羊藿的 megastigmane 糖苷和苯丙醇类成分 [J]. 热带亚热带植物学报, 23(1): 99-102.]
- YU YY, SHAO J, WEI JX, et al., 2019a. Research progress on alkaloids and their pharmacological effects of the rhizome of *Menispermum dauricum* [J]. Chin Med Mat, 42(10): 2453-2461. [喻瑛瑛, 邵佳, 魏金霞, 等, 2019a. 北豆根中生物碱类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中药材, 42(10): 2453-2461.]
- YU YY, SHAO J, CHEN F, et al., 2019b. Study on oxoisoporphine alkaloids from rhizome of *Menispermum dauricum* and their anti-myocardial ischemia activities [J]. J Logist Univ PAP (Med Sci), 28(11): 1-6. [喻瑛瑛, 邵佳, 陈飞, 等, 2019b. 北豆根中氧化异阿朴啡型生物碱类成分及其抗心肌缺血活性研究 [J]. 武警后勤学院学报(医学版), 28(11): 1-6.]
- ZHANG CH, XU QL, ZENG L, et al., 2020. Chemical constituents from leaves of *Dendrobium officinale* [J]. For Environ Sci, 36(3): 30-34. [张春花, 徐巧林, 曾雷, 等, 2020. 铁皮石斛叶的化学成分研究 [J]. 林业与环境科学, 36(3): 30-34.]
- ZHANG JY, ZENG LF, JIN YL, et al., 2020. Study on the chemical constituents of the *n*-butanol fractions of the stems and branches of *Altingia chingii* Metc. [J]. Technol Innovat Appl, 4(12): 30-31. [张纪越, 曾令峰, 靳永亮, 等, 2020. 金缕半枫荷茎枝正丁醇部位的化学成分研究 [J]. 科技创新与应用, 4(12): 30-31.]
- ZHANG PZ, SU MS, WANG YQ, et al., 2016. Chemical constituents from *Gymnotheca involucrata* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 47(19): 3366-3369. [张普照, 苏明声, 王雅琪, 等, 2016. 白苞裸蒴化学成分研究 [J]. 中草药, 47(19): 3366-3369.]
- ZHANG ZJ, ZHANG XQ, YE WC, et al., 2004. A new 1,4-phenanthraquinone from *Menispermum dauricum* [J]. Nat Prod Res, 18(4): 301-304.

(责任编辑 邓斯丽 李 莉)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202205052

刘亚男, 文雅丽, 陈霞蔚, 等, 2023. 苦橙不同部位挥发油成分及抗氧化与抗菌活性分析 [J]. 广西植物, 43(6): 1163–1172.

LIU YN, WEN YL, CHEN XW, et al., 2023. Essential oil components and their antioxidant and antibacterial activities in different parts of *Citrus aurantium* var. *amara* [J]. *Guihaia*, 43(6): 1163–1172.



苦橙不同部位挥发油成分及抗氧化与抗菌活性分析

刘亚男¹, 文雅丽², 陈霞蔚¹, 林家逊¹, 许有瑞^{1*}

(1. 桂林医学院 药学院, 广西 桂林 541199; 2. 桂林医学院科学实验中心, 广西 桂林 541199)

摘 要: 为较全面地研究苦橙 (*Citrus aurantium* var. *amara*) 全植株挥发油成分及抗氧化与抗菌活性, 该研究以其叶、花、幼果为材料, 采用水蒸气蒸馏法 (SD) 结合气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用技术分析其成分, 并利用体外测试方法比较了三者的抗氧化与抗菌活性。结果表明: (1) 从苦橙叶、花、幼果 3 个部位挥发油中共分离鉴定出 94 种成分, 3 个部位的挥发油成分种类及含量存在一定差异, 其中 13 种为共有成分。从叶中鉴定出 34 种成分, 含量较高的有芳樟醇 (30.51%)、 α -松油醇 (14.78%); 从花中鉴定出 32 种成分, 主要成分有芳樟醇 (57.59%) 和 *d*-柠檬烯 (16.15%); 从幼果中鉴定出 69 种挥发性成分, 主要含有 *d*-柠檬烯 (25.55%) 和 γ -蒎品烯 (10.48%)。 (2) 苦橙 3 个部位挥发油表现出不同程度的抗氧化活性, 其中苦橙幼果、叶及花的挥发油对 ABTS 自由基的 IC_{50} 值分别为 2.6、5.1、8.2 $mg \cdot mL^{-1}$, 对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 2.7、4.3、5.0 $mg \cdot mL^{-1}$, 幼果挥发油的抗氧化活性最好。 (3) 苦橙幼果挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌表现出的抗菌活性强于叶和花。该研究结果为苦橙叶、花及其幼果中挥发油的提取与利用提供了理论依据。

关键词: 苦橙, 挥发油, GC-MS, 抗氧化活性, 抗菌活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)06-1163-10

Essential oil components and their antioxidant and antibacterial activities in different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*

LIU Yanan¹, WEN Yali², CHEN Xiawei¹, LIN Jiayun¹, XU Yourui^{1*}

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China; 2. Science Experiment Center, Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China)

Abstract: In order to comprehensively analyze the essential oil components, antioxidant and antibacterial activities of the whole plant of *Citrus aurantium* var. *amara*, the essential oils from leaves, flowers and young fruits were extracted respectively by steam distillation (SD) and their chemical compositions were identified by GC-MS. Moreover, their

收稿日期: 2022-10-17

基金项目: 广西自然科学基金 (2017GXNSFAA198237)。

第一作者: 刘亚男 (1995-), 硕士研究生, 研究方向为药物研发与转化, (E-mail) medicallyn@163.com。

* 通信作者: 许有瑞, 博士, 讲师, 研究方向为中药活性成分的研究与开发, (E-mail) xuyourui1980@sina.com。

antioxidant and antibacterial activities were evaluated and compared using *in vitro* methods. The results were as follows: (1) A total of 94 volatile components were isolated and identified from the essential oils of leaves, flowers and young fruits, there were some differences between three parts, of which 13 were common components. A total of 34 components were identified from leaves, and the major compounds were linalool (30.51%) and α -terpineol (14.78%); a total of 32 components were identified from flowers, the main components were linalool (57.59%) and *d*-limonene (16.15%); a total of 69 components were identified from young fruits, mainly containing *d*-limonene (25.55%) and γ -terpene (10.48%). (2) The essential oils from different parts showed different antioxidant activities. The IC_{50} values of essential oils from young fruits, leaves and flowers to ABTS free radicals were 2.6, 5.1 and 8.2 $mg \cdot mL^{-1}$, respectively, and the IC_{50} values to DPPH free radicals were 2.7, 4.3 and 5.0 $mg \cdot mL^{-1}$, respectively. The antioxidant activity of young fruits was better than that of leaves and flowers. (3) The essential oil from young fruits showed certain antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, which was better than the leaves and flowers. The results can provide a theoretical basis for the extraction and utilization of the essential oils from different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*.

Key words: *Citrus aurantium* var. *amara*, essential oil, GC-MS, antioxidant activity, antibacterial activity

苦橙 (*Citrus aurantium* var. *amara*) 为芸香科 (Rutaceae) 柑橘属常绿带刺小乔木, 为酸橙 (*Citrus aurantium*) 的一个栽培变种, 广泛种植于中国长江以南地区 (黄善松等, 2016)。作为中药枳实与枳壳的一个重要来源, 苦橙具有理气宽中、行滞消胀、破气消积、化痰散痞之功效。现代研究表明, 苦橙可用于焦虑症、肺癌和前列腺癌等多种疾病的治疗 (Suntar et al., 2018; 叶一丹等, 2019)。芸香科植物普遍含有挥发油, 主要成分为萜烯类、芳香族、脂肪族和含硫含氮类化合物 (靖会和佐建锋, 2005; 陈丽艳和崔志恒, 2006), 而苦橙挥发油中含有的芳樟醇、柠檬烯、甲酸芳樟酯、 α -松油醇、橙花醇、3-萜烯等成分 (Ali et al., 2015), 具有浓郁的铃兰香味、清新的柠檬香味和柑橘味, 广泛应用于香料、日化 and 食品等方面 (Stohs, 2017), 已进入美国食品香料和萃取物制造者协会 (FEMA) 的食用香料名录, 同时被《中国食品添加剂使用卫生标准》纳入允许食品香料。更为重要的是, 从苦橙中提取到的具有独特芬芳气味的橙花油 (又名 Neroli), 被 FDA 认定为 GRAS (generally regarded as safe), 在伊朗、突尼斯、阿尔及利亚、摩洛哥、埃及、法国等地被用来缓解多种疼痛、抑郁、痉挛等症 (Haj Ammar et al., 2012; Choi et al., 2014)。

植物资源是指来源于植物的器官 (如根、茎、叶、花、果实、种子) 或植物的全株。近年来, 不少研究者开始关注药用植物的非药用部位或全株, 检测其成分和效用差异, 以实现资源的全面利用。柑橘属植物果实在外果皮的表层生长有大量油

囊, 合成并储存具有独特芳香气味的挥发油, 广泛应用于芳香治疗、食品加工、化妆品制备等领域 (樊荣, 2011)。然而, 苦橙药用部位主要是其未成熟的果实, 已有研究对苦橙叶和花中挥发油成分进行了分析, 并进行了抗炎和抗菌活性比较, 但其幼果的挥发油成分种类、相对含量和抗氧化活性尚不明确, 而将其幼果作为挥发油提取原料也未见报道, 为了全面开发苦橙全植株, 避免造成资源浪费, 从而达到综合开发其地上部分的目的。本研究采用水蒸气蒸馏法分别对苦橙叶、花及其幼果的挥发油进行提取, 并应用 GC-MS 分析其化学成分; 通过 DPPH 法和 ABTS 法对苦橙不同部位挥发油的抗氧化活性进行研究, 并对其抗菌活性进行评价, 以期对苦橙叶、花及其幼果中挥发油的提取与利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

材料: 苦橙叶、花和幼果来源于浙江省金华市浙八味中药材市场, 以上材料由桂林医学院黄德青副教授鉴定为苦橙 (*Citrus aurantium* var. *amara*) 的叶、花、幼果。

试剂: ABTS (纯度 $\geq 98\%$)、DPPH (纯度为 99%)、BHT (纯度为 99%) 均购自 Sigma-Aldrich 公司; 琼脂粉购自成都科龙化学试剂有限公司; 无水乙醇购自南宁西陇化工有限责任公司。

1.2 仪器

Aglient7890B-5977B 型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司);UV-PC1800 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达科学仪器有限公司);DLSB-5L/30 低温冷却循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司);BT224S 型电子分析天平(北京 Satorius 天平有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 苦橙不同部位挥发油的提取

1.3.1.1 苦橙叶挥发油的提取 依照 2020 年版《中国药典》四部通则中 2204 挥发油测定法提取苦橙叶挥发油(L.O)。取干燥苦橙叶 80 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶中,按料液比 1 : 10($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入 800 mL 蒸馏水,置于电炉上加热使微沸,连续提取 5 h,得微黄绿色油状物,冷却后收集得 0.780 2 g 挥发油。连续提取 5 次后得到苦橙叶挥发油供试品 3.804 g,密封,于 4 °C 冰箱中避光保存,挥发油单次提取率为 0.95%。

1.3.1.2 苦橙花挥发油的提取 取盐浸苦橙花 280 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶中,按料液比 1 : 3($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入 840 mL 蒸馏水,按“1.3.1.1”中方法提取苦橙花挥发油(F.O),连续提取 4 次,待冷却后收集苦橙花挥发油供试品 3.056 g,密封,置于 4 °C 冰箱中避光保存,苦橙花挥发油单次提取率为 0.27%。

1.3.1.3 苦橙幼果挥发油的提取 取干燥苦橙幼果粉末 200 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶中,按料液比 1 : 4($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入 800 mL 蒸馏水,按“1.3.1.1”中方法提取苦橙幼果挥发油(YF.O),连续提取 4 次得黄绿色油状物,冷却后收集得 2.708 g 苦橙幼果挥发油供试品,密封,于 4 °C 冰箱中避光保存,苦橙幼果挥发油单次提取率为 0.34%。

1.3.2 GC-MS 分析条件

1.3.2.1 GC 条件 气相色谱条件:HP-5MS 石英毛细柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);柱温 45 ~ 200 °C,45 °C 维持 3 min,20 °C · min⁻¹升温至 200 °C,维持 10 min;柱流量为 1.2 mL · min⁻¹;进样口温度为 250 °C;柱前压 9.466 7 psi,进样量 1 μL ;不分流;载气为高纯氮气。

1.3.2.2 MS 条件 质谱条件:电离方式 EI;电子能量 70 eV;传输线温度 250 °C;离子源温度 230 °C;四级杆温度 150 °C;质量范围 50 ~ 550 amu。

1.3.3 体外抗氧化活性研究

1.3.3.1 ABTS 自由基清除率的测定 根据孔钰婷等(2021)的方法,精密称取 6.62 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 于 10 mL 棕色容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容至刻度,摇匀后得 2.45 mmol · L⁻¹ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液。另精密称取 38.41 mg ABTS 于 10 mL 棕色容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容至刻度,摇匀后得 7 mmol · L⁻¹ ABTS 溶液。将以上两种溶液按 1 : 1 体积混合定容至 25 mL 棕色容量瓶中,室温下暗处反应 13 h 后,用无水乙醇稀释至其在 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02。在具塞试管中加入 1 mL 不同浓度挥发油乙醇溶液和 5 mL ABTS 工作液,涡旋混匀,置于室温下避光反应 6 min 后于 734 nm 处测量样品吸光度(A_i);用无水乙醇代替样品溶液按上述方法测定对照品溶液吸光度(A_c);用无水乙醇代替 ABTS 工作液按上述方法测定空白吸光度(A_o);以 BHT 为阳性对照,平行试验 3 次取平均值,按式(1)计算。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_o}{A_c}\right) \times 100 \quad (1)$$

1.3.3.2 DPPH 自由基清除率的测定 根据王定美等(2021)的方法,精密称取 DPPH 标准品 4 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀后得到 0.2 mmol · L⁻¹ DPPH 母液,置于冰箱中冷藏保存。准确量取 DPPH 母液 10 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇稀释并定容,摇匀后得到 0.02 mmol · L⁻¹ 的 DPPH 工作液。在具塞试管中依次加入不同浓度的挥发油乙醇溶液 2.0 mL 和 DPPH 工作液 4.0 mL,涡旋混匀,于暗处反应 30 min 后在 517 nm 处测定样品吸光度(A_i);用无水乙醇代替样品溶液按上述方法测定对照品溶液吸光度(A_c);用无水乙醇代替 ABTS 工作液按上述方法测定空白吸光度(A_o);以 BHT 为阳性对照,平行试验 3 次,按式(2)计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_o}{A_c}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.3.4 抑菌实验

1.3.4.1 抗菌活性评估 选用桂林医学院基础医学院微生物实验室提供的 3 种致病菌,即大肠杆菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC

25923) 和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。抽取供试菌液(1×10^8 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$) 200 μ L 置于 LB 培养基中,通过经典的圆盘扩散试验评估 3 种精油的抗菌敏感性(Rota et al., 2008)。用等量 DMSO 制备阴性对照,用庆大霉素作阳性对照。37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h 后,通过测量抑菌圈的大小来评估抑菌活性。

1.3.4.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定 采用肉汤微量稀释法测定精油对供试菌的 MIC(Zhang et al., 2017)。试验菌悬液用无菌生理盐水调至 1×10^7 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 。不同部位精油在 DMSO 中采用 2 倍稀释法配制,加入 LB 肉汤培养基中,得到(1 ~ 32) μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的最终浓度。将 20 μ L 菌悬液转移到 96 孔培养板上。阳性对照品和阴性对照品分别用相同体积的庆大霉素溶液和空白溶液制备,不加供试品。37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h。MIC 定义为无肉眼可见菌生长的测试样品的最低浓度。

1.4 数据处理

利用峰面积归一化法对其挥发性成分进行定量分析(魏婧等,2022)。所有数据均以 3 次重复测量的平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 化学成分分析

苦橙不同部位挥发油经 GC-MS 分析后,得到图 1 的总离子流图。对分离出的各挥发性成分采用 NIST17.L 标准谱库计算机检索进行定性分析,经质谱解析,苦橙 3 个部位中共鉴定出 94 种挥发性成分,其中叶 34 种、花 32 种、幼果 69 种。

苦橙不同部位挥发油的化学成分有一定差异,叶和花中含量最高的均是芳樟醇,分别为 30.51%、57.59%;幼果中含量较高的有 *d*-柠檬烯(25.55%) 和 γ -蒈品烯(10.48%)。苦橙叶挥发油中醇类化合物含量最多,占总化学成分的 55.37%,酯类占 22.71%,烯类占 20.25%;主要化学成分有芳樟醇(30.51%)、 α -松油醇(14.78%)、甲酸芳樟酯(11.60%)、橙花醇(8.56%)、3-萜烯(7.39%)、 β -蒎烯(4.45%)等。苦橙花挥发油中醇类化合物成分最多,占总化学成分的 65.70%,其次是烯类占 30.81%,酯类占 2.02%;主要化学成分有芳樟醇(57.59%)、*d*-柠檬烯(16.15%)、3-萜烯(5.35%)、桉烯(4.36%)、 α -松油醇(3.32%)、 β -蒎烯(3.26%)等。苦橙幼果挥

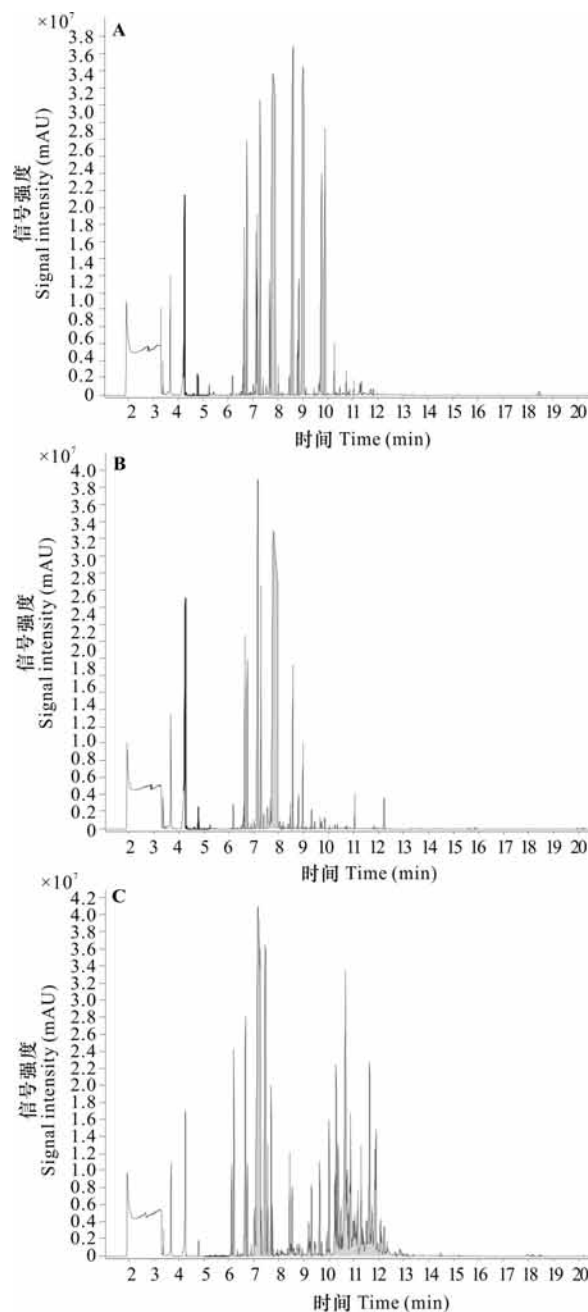


图 1 苦橙叶挥发油(A)、花挥发油(B)、幼果挥发油(C)的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion current chromatograms of the essential oils from leaves (A), flowers (B) and young fruits in *Citrus aurantium* var. *amara* (C)

发油中烯类成分最多,占 75.43%,醇类占 17.31%,酯类占 1.31%;主要化学成分有 *d*-柠檬烯(25.55%)、 γ -蒈品烯(10.48%)、 γ -多烯(4.05%)、桉烯(3.66%)、3-萜烯(3.25%)等。表 1 结果表明烯类成分是苦橙幼果区别于叶、花的特异性成分。

表 1 苦橙不同部位中的挥发性成分及相对含量

Table 1 Chemical compositions of essential oils from different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*

编号 Number	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	类别 Category	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)		
					L.O	F.O	YF.O
1	6.18	3-蒎烯 3-carene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	7.39	5.35	3.25
2	6.35	2-甲基双环 [4.3.0] 非-1(6)-烯 2-methylbicyclo [4.3.0] non-1(6)-ene	烷烃类 Alkanes	C ₁₀ H ₁₆	—	—	0.07
3	6.53	假枯烯 Pseudocumene	烯类 Alkenes	C ₉ H ₁₂	0.05	0.08	—
4	6.60	桉烯 Sabinene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	2.61	4.36	3.66
5	6.76	β-蒎烯 β-pinene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	4.45	3.26	1.01
6	6.77	(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-甲基-5-(丙-1-烯-2-基)-2-乙基四氢呋喃 (2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)-2-vinyltetrahydrofuran	呋喃类 Furan	C ₁₀ H ₁₆ O	—	0.06	—
7	6.90	α-水芹烯 α-phellandrene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	—	—	0.15
8	6.90	伪柠檬烯 Pseudolimonene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	0.06	—	—
9	6.90	紫苏醇 Perilla alcohol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	0.16	—
10	7.08	4-乙基邻二甲苯 4-ethyl-1,2-dimethylbenzene	芳香烃类 Aromatic hydrocarbons	C ₁₀ H ₁₄	0.06	—	—
11	7.13	<i>d</i> -柠檬烯 <i>d</i> -limonene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	2.06	16.15	25.55
12	7.40	γ-蒎品烯 γ-terpinene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	0.17	0.25	10.48
13	7.52	4-侧柏醇 4-thujanol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.06
14	7.53	2-(5-甲基-5-乙基四氢呋喃-2-基)丙-2-基碳酸乙酯 2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)propan-2-yl carbonate ethyl	酯类 Esters	C ₁₃ H ₂₂ O	0.30	1.28	1.00
15	7.67	α-蒎品烯 α-terpinene	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	1.57	0.85	2.81
16	7.77	异蒲勒醇 Isopulegol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.09
17	7.80	芳樟醇 Linalool	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	30.51	57.59	0.47
18	7.88	香芹醇 Carveol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	0.07	0.04
19	7.95	反式-薄荷基-2,8-二烯-1-醇 <i>trans</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.05
20	7.96	反式-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇 <i>trans</i> -1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-ol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.07
21	8.01	2,4,6-辛三烯-2,6-二甲基 2,4,6-octatriene-2,6-dimethyl	烯类 Alkenes	C ₁₀ H ₁₆	0.41	0.19	—
22	8.06	(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-环己基-2-烯-1-醇 (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1-methyl-4-(1-methylvinyl)-cyclohex-2-en-1-ol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.15
23	8.14	反式马鞭草醇 <i>trans</i> -verbenol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.34
24	8.20	异蒲勒醇 Isopropanol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	0.06	—	0.09
25	8.20	(3,3-二甲基环己基)-乙醛 (3,3-dimethylcyclohexyl)-acetaldehyde	醛类 Aldehyde	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.07
26	8.35	(+)-莰醇 (+)-borneol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.16
27	8.46	4-蒎烯醇 4-terpinenol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	0.28	0.41	1.30
28	8.48	百里香酚 Thymol	酚类 Phenols	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	0.61
29	8.53	α-松油醇 α-terpineol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	14.78	3.32	0.89
30	8.61	顺式异紫萘醇 <i>cis</i> -isocaryl alcohol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.08
31	8.65	薄荷醇 Piperitol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.04
32	8.75	1- <i>p</i> -薄荷脑 1- <i>p</i> -menthol	醛类 Aldehyde	C ₁₀ H ₁₆ O	—	0.07	—
33	8.79	橙花醇 Neryl alcohol	醇类 Alcohols	C ₁₀ H ₁₈ O	8.56	2.56	—
34	8.94	右旋香芹酮 D-carvone	酮类 Ketones	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	0.13
35	9.00	甲酸芳樟酯 Linalyl formate	酯类 Esters	C ₁₁ H ₁₈ O	11.60	—	—

续表 1

编号 Number	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	类别 Category	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)		
					L.O	F.O	YF.O
36	9.12	柠檬醛 Citral	醛类 Aldehyde	C ₁₀ H ₁₆ O	0.10	0.08	—
37	9.23	香芹酚 Carvacrol	酚类 Phenols	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	0.39
38	9.27	3-甲基-4-异丙基酚 3-methyl-4-isopropylphenol	酚类 Phenols	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	1.02
39	9.31	吲哚 Indole	吲哚类 Indoles	C ₈ H ₇ N	—	0.38	—
40	9.44	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	酚类 Phenols	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.13	0.16	0.19
41	9.46	4-乙基-1,2-二甲氧基苯 4-ethyl-1,2-dimethoxy benzene	烃类 Alkanes	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	0.11
42	9.56	7-亚甲基-2,4,4-三甲基-2-乙烯基-双环 [4.3.0]壬烷 7-methylene-2,4,4-trimethyl-2-vinyl-bicyclo [4.3.0] nonane	烃类 Alkanes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.06
43	9.64	δ-榄香烯 δ-elemene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.13
44	9.64	4-异亚丙基-1-乙烯基- <i>O</i> -甲基-8-烯 4-isopropylidene-1-vinyl- <i>O</i> -menthyl-8-ene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	0.19	—	—
45	9.66	氨基酸甲酯 Methyl anthranilate	酯类 Esters	C ₈ H ₉ NO ₂	—	0.25	—
46	9.68	α-乙酸萜品酯 α-terpinyl acetate	酯类 Esters	C ₁₂ H ₂₀ O	0.19	—	—
47	9.72	可巴烯 Copaene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.45
48	9.75	丙酸叶醇酯 Geranyl propionate	酯类 Esters	C ₁₃ H ₂₂ O	11.62	0.36	—
49	9.90	依兰烯 Ylangene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.11
50	9.97	双环 [5.3.0]癸烷,2-亚甲基-5-(1-甲基乙烯基)-8-甲基 Bicyclo [5.3.0] decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.70
51	10.03	茉莉酮 Jasnone	酮类 Ketones	C ₁₁ H ₁₆ O	—	0.09	—
52	10.05	(-)-α-雪松烯 (-)-α-cedrene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.09
53	10.23	γ-多烯 γ-murolene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	4.05
54	10.25	石竹烯 Caryophyllene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	0.74	0.09	2.38
55	10.35	赛斯奎沙宾 Sesquisabinen	烷烃类 Alkanes	C ₁₅ H ₂₄	—	0.07	—
56	10.47	1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环己烯 1,5,9,9-tetramethyl-1,4,7-cycloundecatriene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	0.15	—	—
57	10.60	(<i>EZ</i>)-β-紫罗兰酮 (<i>EZ</i>)-β-ionone	酮类 Ketones	C ₁₃ H ₂₂ O	0.05	—	—
58	10.66	α-蒎烯 α-copaene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	6.70
59	10.73	(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>R</i>)-3,7,11,11-四甲基双环 [8.1.0]十一碳二烯 (1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>R</i>)-3,7,11,11-tetramethylbicyclo [8.1.0] undeca-2,6-diene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	0.38	0.08	3.74
60	10.86	δ-卡宾烯 δ-cadinene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	0.08	—	2.49
61	10.94	(+)-α-长叶蒎烯 (+)-α-longipinene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.25
62	10.97	环苜蓿烯 Cyclosativene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.54
63	10.99	Selina-3,7(11)-二烯 Selina-3,7(11)-diene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.16
64	11.04	喇叭烯 Varidiflorene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.92
65	11.04	反式橙花叔醇 <i>trans</i> -nerolidol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	0.21	0.69	—
66	11.16	大根香叶烯 B Germacrene B	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.26
67	11.23	β-桉叶醇 β-eucalyptol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₄ O	0.25	—	1.67
68	11.28	桉油烯醇 Spathulmol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₄ O	0.19	—	1.99
69	11.35	蓝桉醇 Globulol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	0.74
70	11.38	愈创木醇 Guaiol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	0.25
71	11.40	白千层醇 Viridiflorol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	0.05	—	—
72	11.51	4,5,10-大根香叶三烯-1-醇 4,5,10-germacatrien-1-ol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	1.02

续表 1

编号 Number	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	类别 Category	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)		
					L.O	F.O	YF.O
73	11.54	6-芹子烯-4 α -醇 6-selin-en-4 α -ol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	1.09
74	11.63	月桂烯醇 Junenol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	2.81
75	11.67	10S,11S-雪松-3(12),4-二烯 10S,11S-himachala-3(12),4-diene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.31
76	11.70	τ -杜松醇 τ -cadinol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	0.19	—	1.39
77	11.80	白菖醇 Shyobunol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	0.09	—
78	11.84	τ -木糖醇 τ -muurolol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	0.12	—	2.21
79	11.89	十氢二甲基甲乙烯基萘酚 Decahydrodimethyl methyl vinyl naphthol	酚类 Phenols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	1.89
80	11.95	γ -雪松烯 γ -himachalene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.42
81	12.22	法尼醇 Farnesyl alcohol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₆ O	—	0.81	—
82	12.22	杜松樟脑 Juniper camphor	萜类 Terpenoids	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	0.45
83	12.37	6-异丙烯基-4,8 α -二甲基-1,2,3,5,6,7,8,8 α -八氢萘-2-醇 6-isopropenyl-4,8 α -dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8 α -octahydro-naphthalen-2-ol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	0.09
84	12.55	(1aR,4aS,8aS)-4a,8,8-三甲基-1,1a,4,4a,5,6,7,8-八氢环丙烷[d]萘-2-甲醛 (1aR,4aS,8aS)-4a,8,8-trimethyl-1,1a,4,4a,5,6,7,8-octahydrocyclopropa[d]naphthalene-2-carbaldehyde	醛类 Aldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O	—	—	0.04
85	12.69	依兰醇 Ylangenol	醇类 Alcohols	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	0.05
86	12.84	7R,8R-8-羟基-4-亚异丙基-7-甲基双环[5.3.1]十一烯-1-烯 7R,8R-8-hydroxy-4-isopropylidene-7-methylbicyclo[5.3.1]undec-1-ene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	0.20
87	13.13	14-羟基- δ -卡丁烯 14-hydroxy- δ -cadinene	烯类 Alkenes	C ₁₅ H ₂₄ O	—	—	0.10
88	14.47	十六酸甲酯 Methyl palmitate	酯类 Esters	C ₁₇ H ₃₄ O	—	0.07	0.10
89	15.21	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	酯类 Esters	C ₁₆ H ₂₂ O	—	—	0.04
90	15.87	西柏烯 Thunbergen	烯类 Alkenes	C ₂₀ H ₃₂	—	0.08	—
91	17.97	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	酯类 Esters	C ₁₉ H ₃₄ O	—	—	0.09
92	18.15	亚麻酸甲酯 Methyl linolenate	酯类 Esters	C ₁₉ H ₃₂ O	—	—	0.08
93	18.45	叶绿醇 Phytol	醇类 Alcohols	C ₂₀ H ₄₀ O	0.17	—	0.07
94	19.96	亚油酸乙酯 Ethyl linoleate	酯类 Esters	C ₂₀ H ₃₆ O	—	0.06	—

注: L.O, F.O 和 YF.O 分别为苦橙的叶、花和幼果的挥发油。下同。

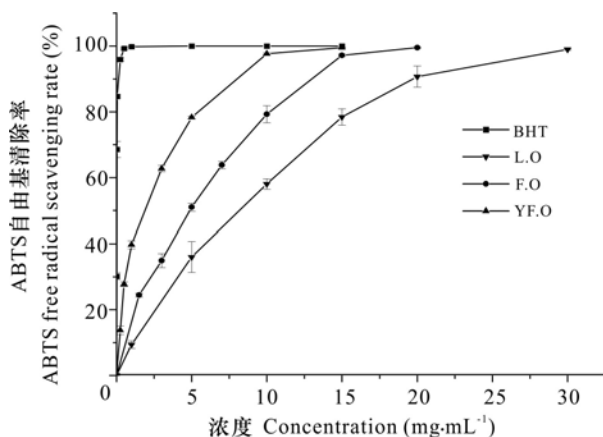
Note: L.O, F.O and YF.O are the essential oils from leaves, flowers and young fruits of *Citrus aurantium* var. *amara*. The same below.

2.2 体外抗氧化活性

2.2.1 ABTS 自由基清除率 ABTS 在 734 nm 波长处有最强吸收峰, 当其与抗氧化剂结合后, 两者反应能使 ABTS 溶液本身的蓝绿色褪去, 其褪色程度与抗氧化剂成定量关系。由图 2 可知, BHT 和苦橙不同部位挥发油对 ABTS 自由基的清除能力均随着浓度的增大而逐步增强。当苦橙叶挥发油浓度为 30 mg · mL⁻¹ 时, 对 ABTS 的清除率可超 99.00%, 表现出较强的抗氧化能力。当苦橙花挥

发油浓度为 20 mg · mL⁻¹ 时, 对 ABTS 的清除率可达 99.52%。当苦橙幼果挥发油浓度为 15 mg · mL⁻¹ 时, 对 ABTS 的清除率可达 100.0%。而幼果、花、叶的 IC₅₀ 值分别为 2.6、5.1、8.2 mg · mL⁻¹, BHT 为 0.1 mg · mL⁻¹。可见, 幼果的挥发油清除 ABTS 自由基能力优于花和叶的。

2.2.2 DPPH 自由基清除率 DPPH 自由基本身存在单电子, 在 517 nm 波长处有最大吸收, 当其醇溶液与抗氧化剂反应时, 抗氧化剂可以和孤对电



L.O, F.O 和 YF.O 分别为苦橙的叶、花和幼果的挥发油。下同。

L.O, F.O and YF.O are the essential oils from leaves, flowers and young fruits of *Citrus aurantium* var. *amara*. The same below.

图2 不同部位挥发油对 ABTS 自由基的清除率

Fig. 2 Free radical scavenging rate of the essential oils from different parts on ABTS

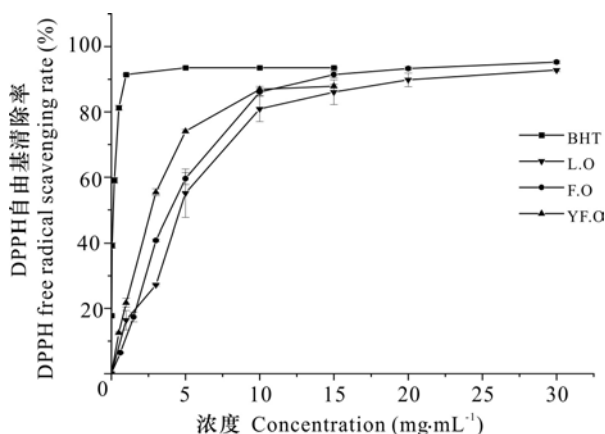


图3 不同部位挥发油对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 3 Free radical scavenging rate of the essential oils from different parts on DPPH

子配对使得吸收逐渐下降,甚至褪色消失,其吸光度下降程度与其接受的电子数量成定量关系。由图3可知,随着 BHT 及苦橙挥发油浓度的增大,其对 DPPH 自由基的清除能力不断增强。当苦橙叶挥发油浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其对 DPPH 自由基的清除率可达 92.8%,与阳性组 BHT 的清除率基本达到相同水平,并且继续增大浓度,清除率基本保持不变。当苦橙花挥发油浓度小于 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其对 DPPH 自由基的清除能力均小于阳性

组 BHT,而当浓度大于 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,苦橙花挥发油对 DPPH 自由基的清除率大于 BHT 对 DPPH 自由基的清除率,最高清除率达 95.24%。苦橙幼果挥发油对 DPPH 自由基的清除率始终低于 BHT,当浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,苦橙幼果挥发油对 DPPH 的清除率达 86.92%,继续增大浓度,清除率基本保持不变。而幼果、花、叶的 IC_{50} 值分别为 2.7 、 4.3 、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, BHT 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见,幼果的挥发油清除 DPPH 自由基能力优于花和叶的。

2.3 抗菌活性

由表2可知,3种挥发油对所有被测细菌均表现出一定的抗菌活性,特别是对抑菌圈直径为 $(15.2 \sim 22.7) \text{ mm}$ 的大肠杆菌具有一定的抗菌活性。此外,苦橙的花和幼果对被试菌有较强的抗菌活性,这可归因于 *d*-柠檬烯的存在,其相对含量分别为 16.15% 和 25.55%。3种挥发油对被试菌的 MIC 值不同,大肠杆菌对挥发油更敏感。苦橙花的 MIC 值为 $1 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,苦橙幼果的 MIC 值为 $8 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。苦橙花挥发油的抗菌活性与之前关于橙花油的报告一致。

3 讨论与结论

常见的挥发油提取方法有水蒸气蒸馏法、超临界流体萃取法、超声波辅助萃取法等。超临界流体萃取法虽然能够提升挥发油的提取率,但从经济效益、设备要求等多方面综合考虑,水蒸气蒸馏法更适用于工业生产(孙吴倩等,2022)。本研究采用水蒸气蒸馏法提取苦橙叶、花及其幼果的挥发油,应用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对其化学成分进行定性定量分析。本研究结果表明苦橙叶、花和幼果的挥发油单次提取率分别为 0.95%、0.27% 和 0.34%。从得率来看,苦橙叶挥发油含量较高,易于获取,为可持续利用资源。而苦橙3个部位挥发油的化学成分种类与含量均存在一定差异,也正是这些香气成分及含量的不同,从而形成了各自的特性:苦橙叶挥发油呈微黄绿色油状,清香轻飘,主要成分有芳樟醇(30.51%)、 α -松油醇(14.78%)、甲酸芳樟酯(11.60%)、橙花醇(8.56%)、3-萜烯(7.39%)等;苦橙花挥发油呈无色透明油状,花香扑鼻,主要成分有芳樟醇(57.59%)、*d*-柠檬烯(16.15%)、3-萜烯(5.35%)、

表 2 3 种挥发油的抗菌活性
Table 2 Antimicrobial activities of three essential oils

微生物菌株 Microbial strain	抑制区直径 Inhibition zone diameter (mm)				最小抑制浓度 Minimum inhibition concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	L.O	F.O	YF.O	庆大霉素 Gentamicin	L.O	F.O	YF.O	庆大霉素 Gentamicin
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	15.2±0.4	22.7±0.3	19.5±0.6	22.6±0.8	16	1	8	0.25
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	8.5±0.2	10.1±0.4	13.2±0.4	40.5±0.9	>32	>32	16	0.5
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.0±0.5	15.6±0.7	16.4±0.3	31.3±0.2	>32	16	16	0.5

α -松油醇(3.32%)、 β -蒎烯(3.26%)等;苦橙幼果挥发油呈黄绿色油状物,香味浓郁,主要成分有d-柠檬烯(25.55%)、 γ -萜品烯(10.48%)、 γ -多烯(4.05%)、桉烯(3.66%)、3-萜烯(3.25%)等。

董雪等(2022)对苦橙花挥发油化学成分分析发现其主要的化合物为醇类和萜烯类,叶一丹等(2019)对苦橙叶挥发油化学成分研究发现其含酯类和醇类物质为主,它们与本研究结果一致。另外本研究发现苦橙幼果中萜烯类成分最多,这是有异于叶和花的地方,可能是植株在生长发育过程中的代谢产物转化导致。

药用植物不同部位的生物学活性具有显著性差异的现象已有前人的研究结果得到佐证:李慧敏等(2022)研究发现北柴胡不同部位总黄酮含量与抗氧化活性从高到低分别为花、叶>茎>根;查雨锋等(2022)研究表明三七根提取物对改善氧化损伤的作用优于茎、叶、花提取物;此外也有研究对冷饭团、丁香、木蝴蝶的不同部位进行成分与活性比较(杨艳和高渐飞,2018;左遨勋等,2022;李慧敏等,2022)。了解其成分与活性差异有助于明确物质在植株中转运和积累机制。本研究结果表明苦橙不同部位挥发油对 ABTS 自由基和 DPPH 自由基均有较强的清除能力,幼果挥发油成分主要为萜烯类化合物,其抗氧化活性优于叶和花。大部分芸香科挥发油对葡萄球菌、大肠杆菌、伤寒杆菌和枯草芽孢杆菌的生长均表现出不同程度的抑制活性(刘巧等,2019)。本研究中幼果挥发油表现出的抗菌活性优于叶,可将幼果作为苦橙挥发油提取原料用于功效产品研

发,其功效等级高于叶、花,但无显著性差异,也可用叶、花作为苦橙挥发油提取原料以实现苦橙资源的综合开发利用。

参考文献：

ALI B, AL-WABEL NA, SHAMS S, et al., 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 5(8): 601-611.

CHEN LY, CUI ZH, 2006. Research progress on antibacterial activity of plant essential oils [J]. Heilongjiang Med J, 19(3): 197-198. [陈丽艳, 崔志恒, 2006. 植物精油抗菌活性的研究进展 [J]. 黑龙江医药, 19(3): 197-198.]

CHOI SY, KANG P, LEE HS, et al., 2014. Effects of inhalation of essential oil of *Citrus aurantium* L. var. *amara* on menopausal symptoms, stress, and estrogen in postmenopausal women: a randomized controlled trial [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014: 796518.

DONG X, LIU X, XIAO RX, et al., 2022. Chemical constituents of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers and its *in vitro* activities [J]. J Qingdao Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 43(3): 40-46. [董雪, 刘霞, 肖瑞欣, 等, 2022. 苦橙花精油化学成分分析及其体外活性 [J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 43(3): 40-46.]

FAN R, 2011. Composition and antioxidant activity of the *Citrus maxima* peel essential oils obtained by three different extraction methods [D]. Guangzhou: South China University of Technology: 14-22. [樊荣, 2011. 柚皮精油的提取分析及活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学: 14-22.]

HAI AMMAR A, BOUAJILA J, LEBRIHI A, et al., 2012. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential

- oil (neroli oil) [J]. Pak J Biol Sci, 15(21): 1034–1040.
- HUANG SS, HOU PJ, LI XL, et al., 2016. Analysis of volatile oil compounds of *Citrus bigaradia* V. by supercritical fluid [J]. Hubei Agric Sci, 55(12): 3182–3184. [黄善松, 侯鹏娟, 李小兰, 等, 2016. 超临界提取苦橙精油的成分分析 [J]. 湖北农业科学, 55(12): 3182–3184.]
- JING H, ZUO JF, 2005. Pharmacological research progress of volatile oil [J]. NW Pharmaceutical J, 20(2): 97–98. [靖会, 佐建锋, 2005. 挥发油的药理研究进展 [J]. 西北药学杂志, 20(2): 97–98.]
- KONG YT, HE H, AN FP, et al., 2021. Comparative study on antioxidant capacity of *Radix pseudostellariae* extracts [J]. Food Res Dev, 42(19): 28–35. [孔钰婷, 何洪, 安凤平, 等, 2021. 太子参提取物抗氧化能力的比较研究 [J]. 食品研究与开发, 42(19): 28–35.]
- LI HM, GAO Y, SHAO XF, et al., 2022. Study on total flavonoids content and comparison of antioxidant activity in different parts of *Bupleurum chinense* DC. from different provenances [J]. Chin Food Add, 33(4): 211–217. [李慧敏, 高月, 邵雪飞, 等, 2022. 柴胡不同部位总黄酮含量及抗氧化活性比较研究 [J]. 中国食品添加剂, 33(4): 211–217.]
- LIU Q, ZHONG LY, ZENG JH, et al., 2020. Study on the antibacterial activity of essential oils from seven species in the Rutaceae family [J]. Chin Food Add, 31(5): 37–41. [刘巧, 钟灵允, 曾佳恒, 等, 2020. 7 种芸香科植物精油抑菌活性的研究 [J]. 中国食品添加剂, 31(5): 37–41.]
- ROTA MC, HERRERA A, MARTÍNEZ RM, et al., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils [J]. Food Control, 19(7): 681–687.
- STOHS SJ, 2017. Safety, efficacy, and mechanistic studies regarding *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and *p*-synephrine [J]. Phytother Res, 31(10): 1463–1474.
- SUN WQ, ZHANG XF, XIN XD, et al., 2022. Comparative study on extraction of volatile oil from *Artemisiae argyi* Folium by steam distillation and water extraction coupling rectification [J]. Acad J Shanghai Univ Trad Chin Med, 36(1): 27–32. [孙吴倩, 张秀芳, 忻晓东, 等, 2022. 水蒸气蒸馏法和提取-共沸精馏耦合技术提取艾叶挥发油比较研究 [J]. 上海中医药大学学报, 36(1): 27–32.]
- SUNTAR I, KHAN H, PATEL S, et al., 2018. An overview on *Citrus aurantium* L.: its functions as food ingredient and therapeutic agent [J]. Oxid Med Cell Long, 2018: 7864269.
- WANG DM, CHEN XF, MAI LW, et al., 2021. Study on the relationship between antioxidant capacity and total flavonoids contents of cassava leaves [J]. Food Res Dev, 42(2): 37–43. [王定美, 陈新富, 麦力文, 等, 2021. 木薯叶抗氧化能力与总黄酮含量及其关系研究 [J]. 食品研究与开发, 42(2): 37–43.]
- WEI Q, TANG LJ, LOU XY, et al., 2022. GC-MS analysis of constituents of volatile oil in different parts of *Vitex negundo* var. *heterophylla* [J]. Sci Technol Food Ind, 43(12): 310–316. [魏婧, 唐丽杰, 娄晓月, 等, 2022. 荆条不同部位挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 食品工业科技, 43(12): 310–316.]
- YANG Y, GAO JF, 2018. Volatile components and their antioxidant activities in different parts of *Kadsura coccinea* [J]. Guihaia, 38(7): 943–952. [杨艳, 高渐飞, 2018. 冷饭团不同部位挥发性成分及抗氧化活性分析 [J]. 广西植物, 38(7): 943–952.]
- YE YD, ZHANG N, LI YH, et al., 2019. Chemical composition and anti-inflammatory effect of essential oil from leaves of *Citrus aurantium* L. [J]. Nat Prod Res Dev, 31(5): 760–765. [叶一丹, 张楠, 李玉红, 等, 2019. 苦橙叶精油化学成分及抗炎作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 31(5): 760–765.]
- ZHA YF, ZHAN Y, LI T, et al., 2022. Study on antioxidant effect of extracts from different parts of Sanqi (*Radix Notoginseng*) *in vitro* [J]. Acta Chin Med, 37(1): 142–148. [查雨锋, 詹易, 李婷, 等, 2022. 三七不同部位提取物体外抗氧化功效研究 [J]. 中医学报, 37(1): 142–148.]
- ZHANG HY, GAO Y, LAI PX, 2017. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil from *Premna microphylla* Turczaninow [J]. Molecules, 22(3): 381.
- ZUO AX, LIU JG, GAO YM, et al., 2022. GC-MS analysis and comparison of antioxidant activities of volatile oils from different parts of *Eugenia caryophyllata* Thunb [J]. Food Res Dev, 43(8): 146–151. [左遨勋, 刘积光, 高玉梅, 等, 2022. 丁香不同部位挥发油的 GC-MS 成分分析和抗氧化活性比较 [J]. 食品研究与开发, 43(8): 146–151.]

(责任编辑 邓斯丽 蒋巧媛)

世界环境日

6月5日

美丽中国 我是行动者

—— 建设人与自然和谐共生的现代化 ——



广西植物被国际和国内重要数据库收录:

- ☆ 俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI, Abstract Journal)
- ☆ 美国《化学文摘》(CA, Chemical Abstracts)
- ☆ 英国《国际农业与生物科学研究中心(全文库)》(CABI)
- ☆ 英国《全球健康》(Global Health)
- ☆ 美国《剑桥科学文摘》(CSA: NS)
- ☆ 波兰《哥白尼索引精选数据库》(ICI Journals Master List)
- ☆ 日本《日本科学技术振兴机构数据库》(JST, Japan Science and Technology Agency)
- ☆ 美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's, PD)
- ☆ 美国《史蒂芬斯全文数据库—艾博思科数据库》(EBSCOhost)
- ☆ 英国《邱园索引》(Index Kewensis)
- ☆ 美国《柯尔比科学文化信息中心》(CICSC)
- ☆ 中国《中文核心期刊要目总览》—中文核心期刊
- ☆ 中国科技论文统计与分析数据库(CSTPCD)—中国科技核心期刊
- ☆ 中国科学引文数据库(CSCD)、科学引文数据库(SCD)
- ☆ 中国生物学文献数据库(CBAD)、中国生物学文摘(CBA)
- ☆ 中国学术期刊文摘数据库(CSAD)、中国化学化工文摘(网络版)
- ☆ 中国期刊全文数据库(CJFD)
- ☆ 中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)
- ☆ 中国知识资源总库—中国科技期刊精品数据库(<http://epub.cnki.net>)
- ☆ 中国知网《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)首批收录期刊(<http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=GZXW>)
- ☆ 中文科技期刊数据库(SWIC) (<http://www.cqvip.com>)
- ☆ 中国核心期刊(遴选)数据库(<http://wanfangdata.com.cn>)
- ☆ 中国生物医学文献服务系统(SinoMed) (<http://www.sinomed.ac.cn>)
- ☆ 中国台湾华艺中文电子期刊服务资料库—思博网(CEPS)(<http://www.ceps.com.tw>)
- ☆ 博看网(<http://www.boookan.com.cn>)、龙源期刊网(<http://www.qikan.com.cn>)
- ☆ 中国科学院科技论文预发布平台(ChinaXiv)(<http://chinaxiv.org>)
- ☆ 中国科学院科技期刊开放获取平台(CAS-OAJ)(<http://www.oaj.cas.cn>)
- ☆ 国家科技期刊开放平台 (<http://doaj.istic.ac.cn>)

广西植物

月刊, 1981年创刊
第43卷 第6期 2023年6月

GUIHAIA

Monthly, Started in 1981
Vol. 43 No. 6 Jun. 2023

主管单位: 广西科学院
主办单位: 广西壮族自治区 广西植物研究所
中国科学院
广西植物学会

名誉主编: 马克平
主 编: 李先琨
副 主 编: 蒋巧媛(常务) 李 莉
编辑单位: 《广西植物》编辑部
地 址: 桂林市雁山 邮编: 541006
电话/传真: (0773) 3550074
电子信箱: guihaia@gxib.cn
网 址: <http://www.guihaia-journal.com>

出版单位: 科学出版社
(北京东黄城根北街16号 邮编: 100717)
印刷装订: 桂林日报印刷厂
订 购 处: 全国各地邮局
总 发 行: 科学出版社
国内发行: 中国邮政集团公司桂林市分公司
海外总发行: 中国国际图书贸易集团有限公司
(北京399信箱)

Supervised by Guangxi Academy of Sciences
Sponsored by Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang
Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences
Guangxi Society of Botany
Honorary Editor-in-Chief: MA Keping
Editor-in-Chief: LI Xiankun
Associate Editors-in-Chief: JIANG Qiaoyuan(Managing) LI Li
Edited by Editorial Office of GUIHAIA
Addr.: Yanshan, Guilin 541006, Guangxi, China
Tel./Fax: 86-773-3550074
E-mail: guihaia@gxib.cn
<http://www.guihaia-journal.com>
Published by Science Press
(16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China)
Printed by Guilin Daily Printer (China)
Subscribed by All Local Post Offices in China
Distributed by Science Press
Domestically Distributed by Guilin Branch of China Post Group
Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation
(P.O.Box 399, Beijing)

ISSN 1000-3142
CN 45-1134/Q

国内定价: 45.00元
国内邮发代号: 48-43
国外发行代号: MO-5054

版权所有© 国内外公开发刊



(购买本刊请扫上方二维码)

ISSN 1000-3142
9 771000 314237