DOI:10.11931/guihaia.gxzw202508045

基于广靶代谢组学的两种兜兰叶黄酮代谢差异及药用成分分析

关　澳，李宗艳*，岳　艳，钱彦冰

（西南林业大学 园林园艺学院，云南省园林绿化植物资源培育与应用重点实验室，昆明 650224）

摘　要：硬叶兜兰（*Paphiopedilum micranthum*）和麻栗坡兜兰（*P. malipoense*）是中国传统药用植物，常以叶入药。然而，目前针对不同兜兰叶片中黄酮代谢物的系统比较研究仍然不足。因此，该研究通过 UPLC-ESI-MS/MS 代谢组学技术，对黄酮类代谢物进行定性定量分析，并辅以相关生理生化指标检测，旨在系统梳理两种兜兰叶中黄酮代谢差异，并筛选和定位黄酮代谢物中高药用活性物质。结果表明：（1）两种兜兰叶中共检测到 696 种黄酮代谢物，其中 532 种在两种兜兰叶中表现出显著差异，在黄酮代谢水平上呈现出显著分化。（2）两种兜兰叶在代谢物类型组成和生物合成通路层面，呈现出明显差异：两种兜兰叶的黄酮代谢物均以黄酮类、黄酮醇类和二氢黄酮类为主，但麻栗坡兜兰叶中花青素类代谢物占比较高，且在异黄酮、花青素及黄酮和黄酮醇生物合成通路中富集显著；硬叶兜兰叶中异黄酮类、查尔酮类代谢物占比相对较高。（3）进一步筛选显著差异的代表性药用活性成分后发现硬叶兜兰叶中黄芩苷、杜鹃素和飞燕草素等代谢物相对含量较高；而麻栗坡兜兰叶中人参黄酮苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖和三叶豆苷等代谢物相对含量较高。该研究为兜兰属植物叶黄酮代谢生理研究及药用替代资源筛选提供了代谢组学支持。

关键词：硬叶兜兰，麻栗坡兜兰，黄酮代谢物，药用成分，代谢组学

中图分类号：Q946　　**文献标识码：A**　　**文章编号：**

Flavonoid metabolic differences and bioactive compound profiling in leaves of two *Paphiopedilum* species based on widely targeted metabolomics

GUAN Ao, LI Zongyan*, YUE Yan, QIAN Yanbin

(*College of Landscape Architecture and Horticulture*, *Southwest Forestry University*, *Yunnan Key Laboratory of Landscape Plant Resource Cultivation and Application*, Kunming 650224, China)

Abstract:*Paphiopedilum micranthum* and *P. malipoense* are traditional medicinal plants in China, whose leaves have long been used as important medicinal materials. Flavonoids are among the major bioactive constituents responsible for their pharmacological effects. However, systematic and comparative investigations of flavonoid metabolites in the leaves of different *Paphiopedilum* species remain limited. To address this gap, the present study performed a comprehensive qualitative and quantitative analysis of flavonoid metabolites in the leaves of *P. micranthum* and *P. malipoense* using UPLC-ESI-MS/MS-based metabolomics, combined with the determination of relevant physiological and biochemical indicators. The objectives were to elucidate interspecific differences in flavonoid metabolic profiles and to screen and localize flavonoid compounds with

基金项目：科技部重点研发计划（2019YFD1001003）；西南林业大学校基金项目（10824099）。

第一作者：关澳(1999—)，硕士，研究生，研究方向为硬叶兜兰代谢生理研究, (E-mai)guan_ao@swfu.edu.cn。

***通信作者：**李宗艳，博士，教授，研究方向为园林植物资源创新与研究, (E-mai)lizyan74@sina.comz。

potential medicinal value. The results demonstrated pronounced differences in flavonoid metabolism between the two species. The results were as follows: (1) A total of 696 flavonoid metabolites were detected across both species, of which 532 metabolites showed significant differential accumulation, indicating substantial divergence in flavonoid composition and abundance. (2) Notable differences were observed in both metabolite classes and biosynthetic pathways. Although flavones, flavonols, and flavanones constituted the dominant flavonoid groups in the leaves of both species, anthocyanidins accounted for a significantly higher proportion in *P. malipoense*. Correspondingly, anthocyanidin metabolites were significantly enriched in the biosynthetic pathways of isoflavonoids, anthocyanidins, flavones, and flavonols in this species. In contrast, the leaves of *P. micranthum* contained relatively higher proportions of isoflavones and chalcones metabolites, suggesting species-specific regulation of flavonoid biosynthesis. (3) Targeted screening of representative flavonoid compounds with significant differences in accumulation revealed that baicalin, farrerol, and delphinidin were present at relatively higher levels in the leaves of *P. micranthum*, whereas panasenoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, and trifolin showed significantly higher abundances in *P. malipoense.* These compounds are known for their diverse biological activities, highlighting the distinct medicinal potential of each species. Overall, this study provides systematic metabolomic evidence for understanding flavonoid metabolic physiology in *Paphiopedilum* leaves and offers a scientific basis for the rational utilization, evaluation, and screening of alternative medicinal plant resources within the genus.
Key words: *Paphiopedilum micranthum*, *Paphiopedilum malipoense*, flavonoids, medicinal ingredients, metabolomics

兰科植物因其富含多样的次生代谢产物，在中国、南亚及东南亚等地区长期被视为重要的医疗资源，并广泛应用于临床实践之中（Ye et al., 2002；Choudhary et al. , 2023）。兜兰属（*Paphiopedilum*）中的硬叶兜兰与麻栗坡兜兰虽已处于濒危状态，但凭借其独特的观赏价值与潜在药用价值，近年来一直是国内外兰科植物研究的重点关注对象（罗毅波等，2003；Evonne, 2007；Lee, 2007；De, 2020）。目前，对于硬叶兜兰与麻栗坡兜兰的人工栽培、迁地保护及菌根共生等方面已开展了较为系统的研究，并初步建立了以物种保育为导向的人工繁育技术体系（丁长春和夏念和，2009；孙晓颖，2014；曾宋君等，2020；任书娴等，2024）。由于受限于濒危保护现状，这两种兜兰尚不具备直接开展野生药用开发的现实条件，但相关人工繁育与保育研究的推进，已为关于珍稀兜兰资源潜在药用成分挖掘及替代资源的筛选评估提供了前期研究的物质基础。

兜兰属植物作为传统药用植物，在中医药学中被认为具有调经止血、消炎止痛等功效，常用于月经不调、膀胱炎等相关疾病的辅助治疗。部分药典中记载硬叶兜兰（*Paphiopedilum micranthum*）叶具有清热透疹、清心安神的功效。已有研究针对硬叶兜兰入药部位开展了系统的生药学鉴别，为其进一步药理学研究提供了形态学依据（李涛等，2018）。相比之下，同属的麻栗坡兜兰（*P. malipoense*）被列为具有鲜明地域特色的药用植物资源（吴明开，2013），在我国西南地区民间用药中具有一定应用基础，但其叶中关键药用活性成分与作用机制仍有待深入阐明。值得注意的是，两种兜兰叶片均具有明显的紫红色斑点与斑纹特征（Schuiteman, 2021），这一特征被认为与叶片中黄酮类代谢物的富集密切相关（Feild et al., 2001；Cao et al., 2022），为兜兰属植物药用物质基础的研究提供了重要线索。

黄酮类代谢物是植物次生代谢产物中的重要组成部分，与植物的多种生理生化指标密切相关（李湘鹏，2025）。在植物体内，黄酮类化合物不仅在着色与抗逆胁迫响应过程中发挥

关键作用。同时还表现出显著的抗病毒、抗癌等方面的药用活性，在增强抗氧化防御体系、缓解活性氧（reactive oxygen species, ROS）诱导的氧化损伤等方面具有重要功能（Agati et al., 2012）。在兰科植物中，已有研究发现铁皮石斛中具有多种较高药理活性的黄酮类代谢物（Li et al., 2023）；此外，传统傣药用植物竹叶兰中富集的黄酮类化合物亦被证实与其抗氧化和抗病毒等药效密切相关（Ahmad et al., 2022）。作为一类重要的植物药理活性成分，黄酮类化合物在多项临床研究中已显示出明确的药用潜力，例如槲皮素和柚皮素对登革热病毒具有抑制作用（Zandi et al., 2011）；芹菜素可参与抑制流感病毒及病毒性肝炎的感染过程（Khachatoorian et al., 2012）；而甘草素和黄芩素则表现出显著的抗菌活性（Cushnie & Lamb, 2005）。近年来，随着相关研究的不断深入，黄酮类化合物已在心血管疾病、糖尿病及癌症等临床研究中广泛应用（Aviram et al., 2000；Vinayagam & Xu, 2015；Ginwala et al., 2019），被认为是植物中高价值药用活性成分的代表。

硬叶兜兰和麻栗坡兜兰均为国家重点保护植物，同时也是珍贵的民族特色药用植物资源。然而，现有研究多集中于两种兜兰的野外生态分布特征及野生资源保护现状（汤欢，2016；张央等，2022），针对其叶片中药用活性成分的系统鉴定与分析仍较为缺乏，仅依赖民间用药经验或形态学鉴别的方法，难以对其药用成分及代谢特征进行科学、全面的评价。因此，本研究通过 UPLC-ESI-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术，并结合对入药部位的表型观察与相关生理生化指标检测，系统解析两种兜兰叶中黄酮代谢差异，以期为人工繁育、开展迁地保护及潜在药用替代资源的科学筛选提供数据支持。该技术的科学性已在黑豆种皮（吴志华等，2024）、何首乌（李春等，2016）等植物研究中得到验证。基于此，本研究拟重点探讨以下问题：（1）两种兜兰叶黄酮代谢具有何种特征规律；（2）两种兜兰叶内黄酮类代谢物存在哪些差异；（3）二者叶片中是否存在显著差异的代表性黄酮类药用活性成分。总体而言，本研究旨在为两种兜兰的保育生物学研究、人工繁育条件优化及潜在替代资源筛选提供基础代谢数据支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

硬叶兜兰和麻栗坡兜兰均来源于西南林业大学标本馆人工繁殖并保存的活体植物标本，由树木园兰科种质资源圃负责日常栽培与养护。在获得相关研究许可后，分别从每个物种中选取 3 株生长状况良好、形态完整的植株，于同一生长阶段、同一时间采集成熟叶片用于后续检测与分析。各项实验均以单株植株作为一个生物学重复，每个物种设置 3 个生物学重复（n=3）。

1.2 叶片表型观察与生理生化指标测定

1.2.1 叶片表型观察与色差分析

从植物材料中选取生长状态良好、形态完整的成熟叶片进行表型观察。分别切取约 0.5 cm × 0.5 cm 的叶片上表皮、下表皮及横切面小块，采用徒手切片法制备临时切片，并使用 Leica DM2500 光学显微镜进行观察与图像采集。

叶片色差测定采用 X-Rite Ci6x 分光色差仪进行。通过扫描窗口分别对两种兜兰叶片的上表皮与下表皮进行多点扫描，采集颜色参数数据。每个样本重复 20 次测定，将所得数据用于后续色差模型的构建与分析。

1.2.2 叶相关生理生化指标检测与分析

生长状态良好、无病虫害的植株中选取成熟叶片，进行相关生理生化指标测定。每项指标均设置 3 个生物学重复，结果以平均值±标准差表示。两组间差异采用 Student's *t*-test 进行统计学分析。最终根据结果绘制统计图表用于后续分析。

1.2.2.1 叶可溶性糖含量测定

叶片可溶性糖含量采用苯酚-硫酸比色法测定（单会娇和王冰，2010）。称取新鲜叶片 0.1 g，加入蒸馏水 10 mL，在沸水浴中提取 30 min，过滤后将提取液定容至 25 mL。重复提取两次并合并定容。取提取液 0.5 mL，加入蒸馏水 1.5 mL 混匀，依次加入苯酚溶液和浓硫酸，室温下反应 30 min 后，于 490 nm 波长下测定吸光度。根据葡萄糖标准曲线计算样品中可溶性糖含量，其计算公式如下：可溶性糖含量（mg·g^{-1} FW）=$\frac{C\times V_0/V_1}{W\times 1\,000}$[$C$ 为标准曲线中查得的糖含量（μg）；V_0 为提取液总体积（mL）；V_1 为测定用样品液体积（mL）；W 为材料鲜重（g）]。

1.2.2.2 叶可溶性蛋白含量测定

叶片可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定（邓丽莉等，2012）。称取新鲜叶片 0.5 g，置于预冷研钵中剪碎，加入 5 mL 预冷的 0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液（pH 7.0），在冰浴条件下充分研磨成匀浆，随后离心 10 min。取上清液 0.1 mL，与考马斯亮蓝 G-250 试剂反应，在 595 nm 波长下测定吸光度，并根据蛋白质标准曲线计算样品中蛋白质含量。其计算公式为：样品可溶性蛋白含量（μg·g^{-1} FW）=$\frac{C\times V}{W}$[C 为查标准曲线所得测定管中蛋白质浓度（μg·mL^{-1}）；V 为提取液总体积（mL）；W 为材料鲜重（g）]。

1.2.2.3 叶绿素 a、b 和总叶绿素含量测定

叶绿素含量测定采用分光光度法进行（张其德，1985）。称取新鲜叶片 0.2 g，加入少量碳酸钙及 80%丙酮，于研钵中迅速研磨成匀浆，过滤后以 80%丙酮作为空白对照。分别在 645、652、663 nm 波长下测定吸光度值，并根据公式计算叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量：叶绿素 a 含量（mg·g^{-1}）=$C_a\times V/W$；叶绿素 b 含量（mg·g^{-1}）=$C_b\times V/W$；总叶绿素含量（mg·g^{-1}）=$C_t\times V/W$[V 为提取液体积（L）；W 为植物材料鲜重（g）]。

1.2.2.4 叶花青素相对含量测定

叶片花青素相对含量采用分光光度法测定（李明军，2007）。称取新鲜叶片 1 g，剪成约 0.3 cm² 的小块，置于烧杯中，加入 10 mL 0.1 mol·L^{-1} HCl 溶液，在 32 ℃恒温培养箱中浸提 4 h 以上。过滤后取滤液，在 530 nm 波长下测定吸光度，以 0.1 mol·L^{-1} HCl 作为空白对照。以吸光度为 0.1 时的花青素浓度定义为 1 个相对单位，将实测吸光度值乘以 10 作为花青素相对含量，用于不同样品间的比较。

1.3 黄酮类代谢物检测

1.3.1 样品的制备与提取

两种兜兰叶片样本采集后立即进行液氮速冻，并在−80 ℃条件下保存。检测前将样本充分研磨均匀，准确称取 50 mg 研磨样品，加入预冷的 70%甲醇水溶液进行代谢物提取。加入内标物后充分涡旋混匀，并于低温条件下静置提取。提取液经高速离心后，取上清液过滤，用于后续 UPLC-ESI-MS/MS 分析。

1.3.2 UPLC-ESI-MS/MS 检测

采用超高效液相色谱-串联质谱系统（UPLC-ESI-MS/MS，ExionLC™ AD，SCIEX）联用 QTRAP 质谱仪对样品进行检测。色谱分离使用 Agilent SB-C18 色谱柱（1.8 μm，2.1 mm ×100 mm）。流动相 A 为含 0.1%甲酸的超纯水，流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序经优化后设置为：流速 0.35 $mL \cdot min^{-1}$，柱温 40 ℃，进样体积 2 μL，以实现黄酮类化合物的有效分离。质谱检测采用电喷雾离子化（ESI）源，离子源温度设为 500 ℃，并在正、负离子模式下分别进行数据采集。其余质谱参数均在标准条件下进行优化设置。

1.3.3 数据采集与分析

采用多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式对黄酮类代谢物进行定性与定量分析，相关质谱参数由 Analyst 1.6.3 软件进行优化。获得的原始数据进一步导入 R 语言环境中，进行主成分分析（principal component analysis，PCA）和层次聚类分析（hierarchical clustering analysis，HCA），以评估样本间整体代谢差异。通过正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）模型对差异代谢物进行筛选，以综合变量重要性投影值（variable importance in projection，VIP ）> 1、倍数变化（fold change，FC）≥2 或≤0.5 以及单变量统计分析结果[*P* value <0.05，经 FDR（false discovery rate）校正]进行筛选。结合 200 次置换检验验证模型稳定性。差异代谢物进一步基于 KEGG 数据库（https://www.kegg.jp/kegg/compound/）进行注释与通路富集分析。

在此基础上，为筛选具有潜在药用意义的关键黄酮成分，进一步设定筛选阈值为 VIP ≥1、FDR≤0.05 且$|\log_2 FC| \geq 1$，结合已有黄酮类药用活性研究，对关键药用活性成分进行二次筛选。最终对两种兜兰叶中关键黄酮药用活性成分的相对含量进行比较，并采用 Student's *t*-test 对两组间差异进行统计学分析。其中，VIP 值越高，表示该代谢物在样本分组区分中的贡献越大；*P* value 用于评估差异的统计学显著性；FDR 用于控制多重检验中的假阳性率；FC 表示两组间代谢物丰度的倍数变化；$\log_2 FC$ 为 FC 的对数转换值。

2 结果与分析

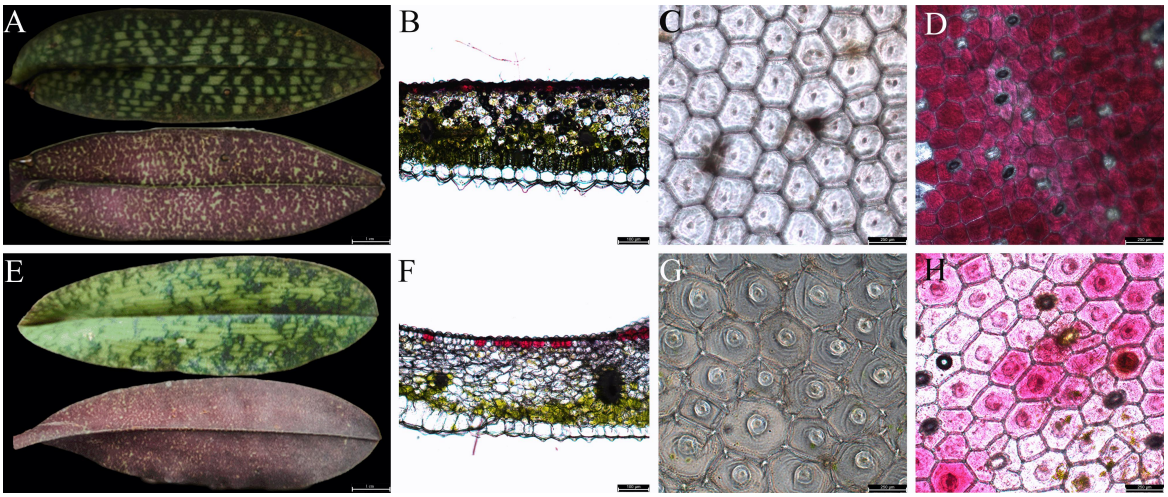
2.1 两种兜兰叶表型差异与生理指标检测分析

2.1.1 两种兜兰叶表型差异分析

观察结果显示，硬叶兜兰（图 1：A）与麻栗坡兜兰（图 1：E）叶片表面均存在明显的马赛克状斑驳特征。然而，两者在叶片形态和色斑分布方面存在差异：硬叶兜兰叶片整体较

小，叶背可见明显的龙骨状突起；相比之下，麻栗坡兜兰叶片表面斑驳数量较多、斑块面积较大，并且叶背紫红色斑点分布更为均匀而丰富。

硬叶兜兰上表皮细胞（图 1：C）相比，麻栗坡兜兰的上表皮细胞体积更大，细胞壁相对较薄（图 1：G）。同时，硬叶兜兰叶片中细胞间气孔尺寸较小，排列结构更为紧密（图 1：B）。通过组织切片观察发现，尽管两种兜兰叶背的部分表皮细胞均富含红紫色素，但这些含色素细胞在分布范围和数量上存在明显差异（图 1：D、H）。



A. 硬叶兜兰叶片正面与背面形态；**B**. 硬叶兜兰叶片横切面结构（5×）；**C**. 硬叶兜兰叶片上表皮显微结构（10×）；**D**. 硬叶兜兰叶片下表皮显微结构（10×）；**E**. 麻栗坡兜兰叶片正面与背面形态；**F**. 麻栗坡兜兰叶片横切面结构（5×）；**G**. 麻栗坡兜兰叶片上表皮显微结构（10×）；**H**. 麻栗坡兜兰叶片下表皮显微结构（10×）。

A. Adaxial and abaxial surfaces of leaves from *Paphiopedilum micranthum*; **B**. Transverse section of *P. micranthum* leaf (5×); **C**. Adaxial epidermal section of *P. micranthum* leaf (10×); **D**. Abaxial epidermal section of *P. micranthum* leaf (10×); **E**. Adaxial and abaxial surfaces of leaves from *P. malipoense*; **F**. Transverse section of *P. malipoense* leaf (5×); **G**. Adaxial epidermal section of *P. malipoense* leaf (10×); **H**. Abaxial epidermal section of *P. malipoense* leaf (10×);

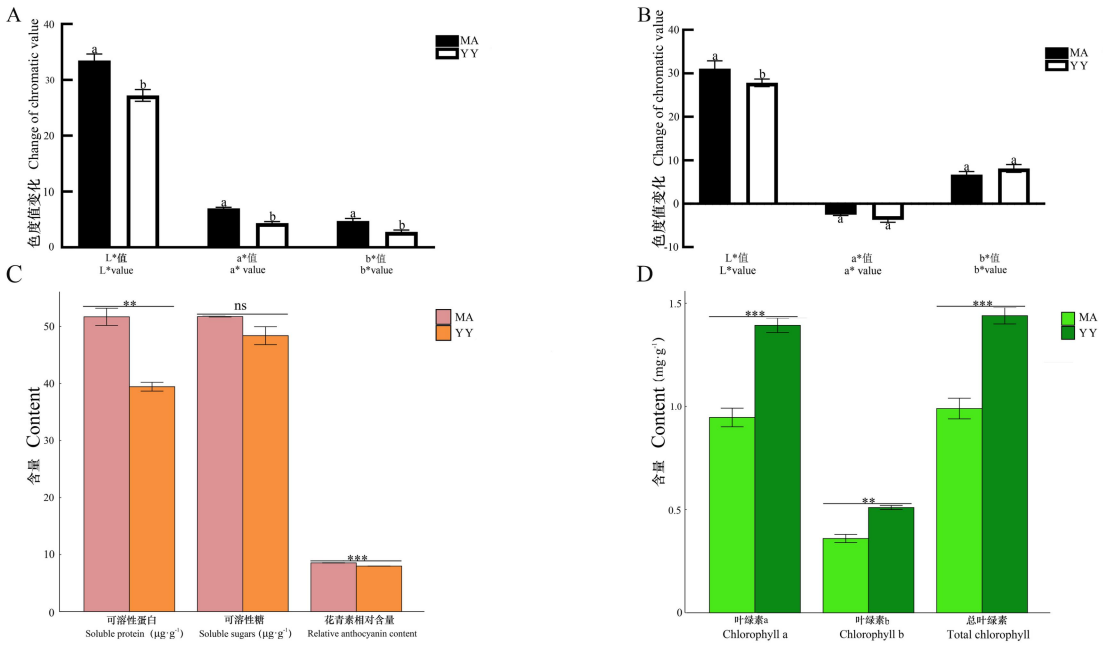
图 1 两种兜兰叶片的表型与显微结构特征

Fig.1 Phenotypic and microscopic structural characteristics of leaves from two *Paphiopedilum* species

2.1.2 两种兜兰叶相关生理生化指标差异分析

在对两种兜兰叶表和叶背进行色度值差异分析时发现，两者在红—绿轴（a*）和黄—蓝轴（b*）色差值上差异较为显著，而在反映亮度的色差参数（L*）方面差异相对较小（图 2：A、B）。

对叶片相关生理生化指标进行检测后发现，两种兜兰叶中可溶性蛋白含量、花青素相对含量以及叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量均存在显著差异。具体而言，麻栗坡兜兰叶中可溶性蛋白含量和花青素相对含量较高，而硬叶兜兰叶中叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量相对较高（图 2：C、D）。



A. 叶背色差模型；**B**. 叶表色差模型；**C**. 叶相关生理指标；**D**. 叶绿素相关生理指标。数据=平均值±标准差（$n = 3$）。采用 Student's t 检验进行两组间差异显著性分析。ns 表示无显著差异，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。**YY**. 硬叶兜兰；**MA**. 麻栗坡兜兰。下同。

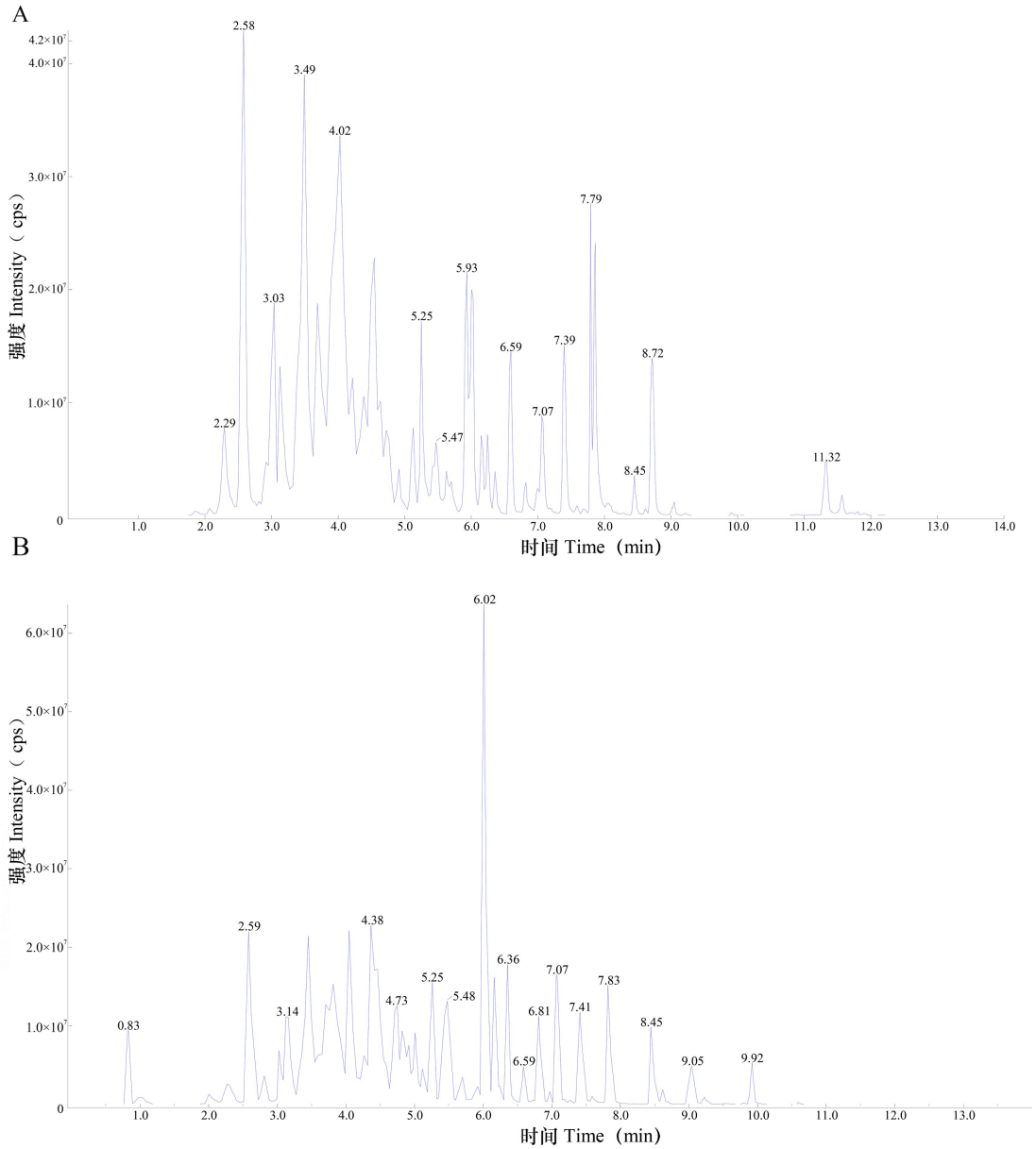
A. Leaf underside color difference model; **B**. Leaf upper surface color difference model; **C**. Leaf-related physiological indicators; **D**. Chlorophyll-related physiological indicators. Data= $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). Statistical significance between the two groups was analyzed using Student's t-test. ns indicates no significant difference, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, and $^{***}P<0.001$. **YY**. *P. micranthum*; **MA**. *P. malipoense.* The same below.

图 2 两种兜兰叶片色差模型与生理指标比较

Fig. 2 Color difference models and physiological parameter comparisons of leaves from two *Paphiopedilum* species

2.2 两种兜兰叶黄酮代谢总体分析与质量检验

结合 Analyst 1.6.3 软件及相关代谢物数据库，对硬叶兜兰与麻栗坡兜兰叶样本中的黄酮类代谢物在正、负离子模式下进行了定性识别与定量分析。结果显示，总离子流图（TIC）中各样本离子流曲线具有较高的重合度，表明质谱检测过程稳定、数据重复性良好（图 3）。



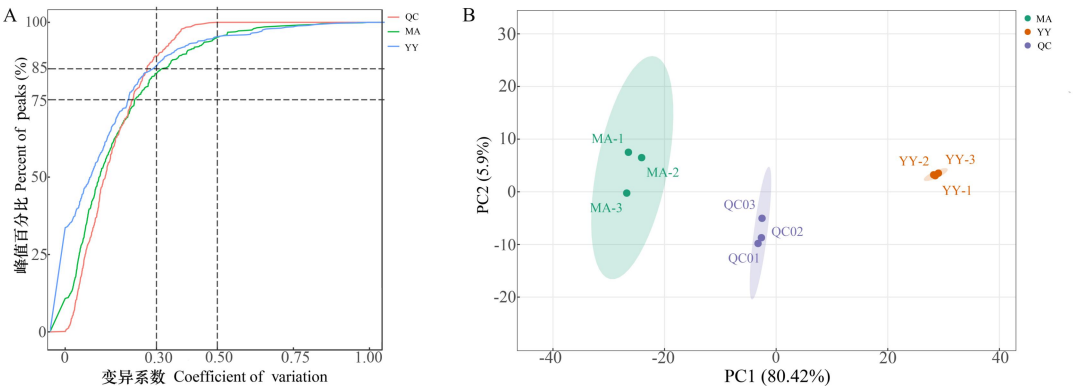
A. 正离子模式下的总离子流图（TIC）；**B** 负离子模式下的总离子流图（TIC）。

A. Total ion chromatogram (TIC) in positive ion mode; **B**. Total ion chromatogram (TIC) in negative ion mode.

图 3 总离子流图（TIC）垛叠图

Fig.3 Stacked total ion chromatograms (TICs)

为进一步评估数据的稳定性与重复性，对质量控制（QC）样本中代谢物的变异系数（coefficient of variation，CV）分布情况进行了统计分析。结果显示（图 4：A），超过 85%的代谢物在 QC 样本中的 CV 值小于 0.5，表明整体数据具有较好的稳定性和可重复性。进一步通过主成分分析（PCA）对样本间差异进行评估（图 4：B），结果表明第一主成分（PC1）和第二主成分（PC2）的贡献率分别为 80.2%和 5.9%。各组样本在 PC1 维度上呈现出明显分离，两种兜兰样本的组间差异显著大于组内差异，表明硬叶兜兰与麻栗坡兜兰叶中黄酮代谢物的整体代谢特征存在显著差异。



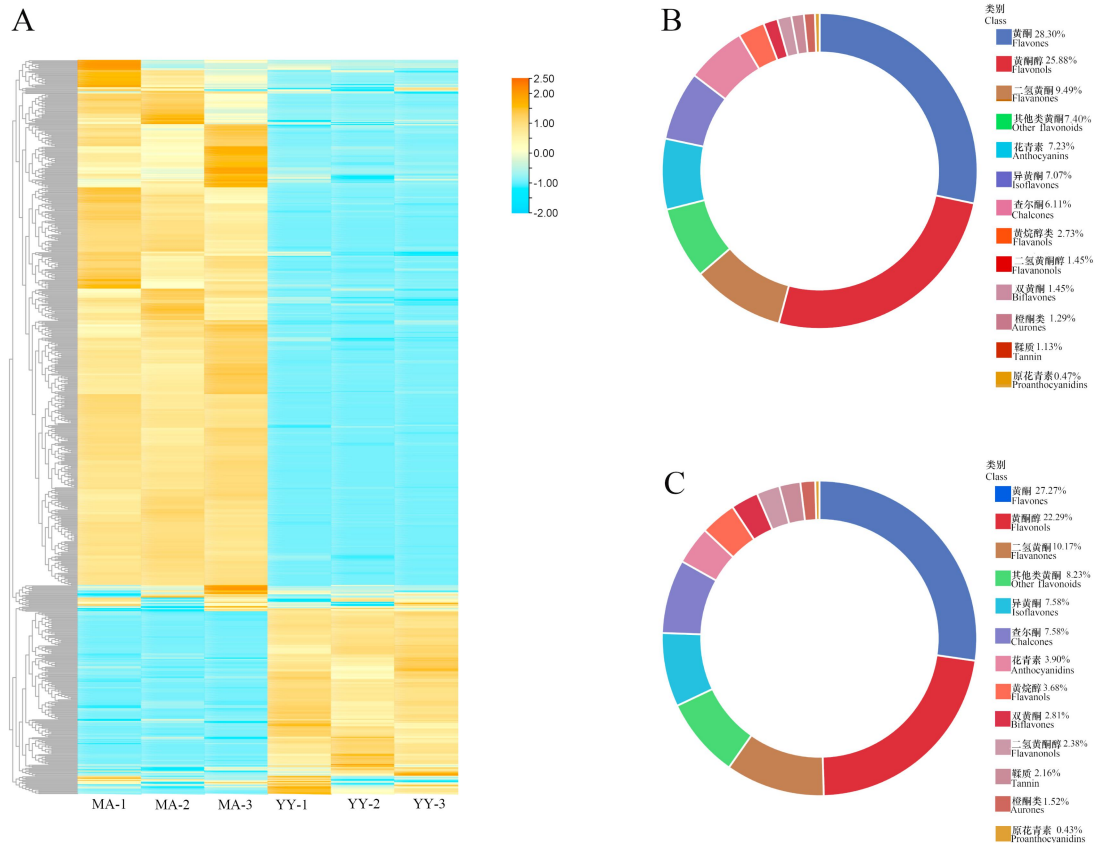
A. 各样本变异系数分布图；**B**. 二维主成分分析图。

A. CV distribution plots for each sample; **B**. 2D PCA score plot.

图 4 QC 质量检测图与 PCA 得分图

Fig.4 QC Quality Inspection Chart and 2D PCA score plot

基于 UPLC-ESI-MS/MS 技术对所有样本进行检测分析，共鉴定出 13 类、696 种黄酮代谢物，其中在正离子模式下检测到 440 种，在负离子模式下检测到 256 种。对全部黄酮代谢物按化学类别进行层次聚类分析结果显示（图 5：A），两种兜兰叶中黄酮代谢物的组成均以黄酮类、黄酮醇类和二氢黄酮类为主。进一步比较不同物种中各类黄酮代谢物的相对组成比例发现，在麻栗坡兜兰叶中（图 5：B），花青素类代谢物所占比例较高（7.23%），略高于异黄酮类（7.07%）和查尔酮类（6.11%）；而在硬叶兜兰叶中（图 5：C），异黄酮类和查尔酮类代谢物的占比均为 7.58%，明显高于花青素类代谢物（3.90%）。



A. 两种兜兰叶中黄酮代谢物层次聚类图；**B**. 麻栗坡兜兰叶黄酮代谢物成分饼图；**C**. 硬叶兜兰叶黄酮代谢物

成分饼图。

A. Hierarchical clustering chart of flavonoid metabolites in leaves of two *Paphiopedilum* species; **B**. Pie chart showing the composition of flavonoid metabolites in leaves of *P. malipoense*; **C**. Pie chart showing the composition of flavonoid metabolites in leaves of *P. micranthum.*

图 5 两种兜兰叶中黄酮代谢物检测情况

Fig. 5 Flavonoid metabolite profiles in leaves of two *Paphiopedilum* species

为进一步分析两种兜兰叶中黄酮代谢物的生物代谢特征，对所有鉴定到的黄酮代谢物按不同结构修饰类型进行了分类统计（表 1）。结果显示，糖基化和羟基化是两种兜兰叶中黄酮代谢物最主要的结构修饰方式。其中，麻栗坡兜兰叶中糖基化、羟基化及酰基化修饰的黄酮代谢物数量相对较多，而硬叶兜兰叶中以甲基化修饰的黄酮代谢物数量相对较高。

表 1 所有代谢物不同结构修饰情况

Table 1 Structural modification types of all detected metabolites

序号 Number	修饰结构 Modifier-head structure	数量 Quantity	
		MA	YY
1	糖基化 Glycosylation	312	193
2	羟基化 Hydroxylation	115	95
3	甲基化 Methylation	14	30
4	酰基化 Acylation	11	5
5	其他 Others	170	139

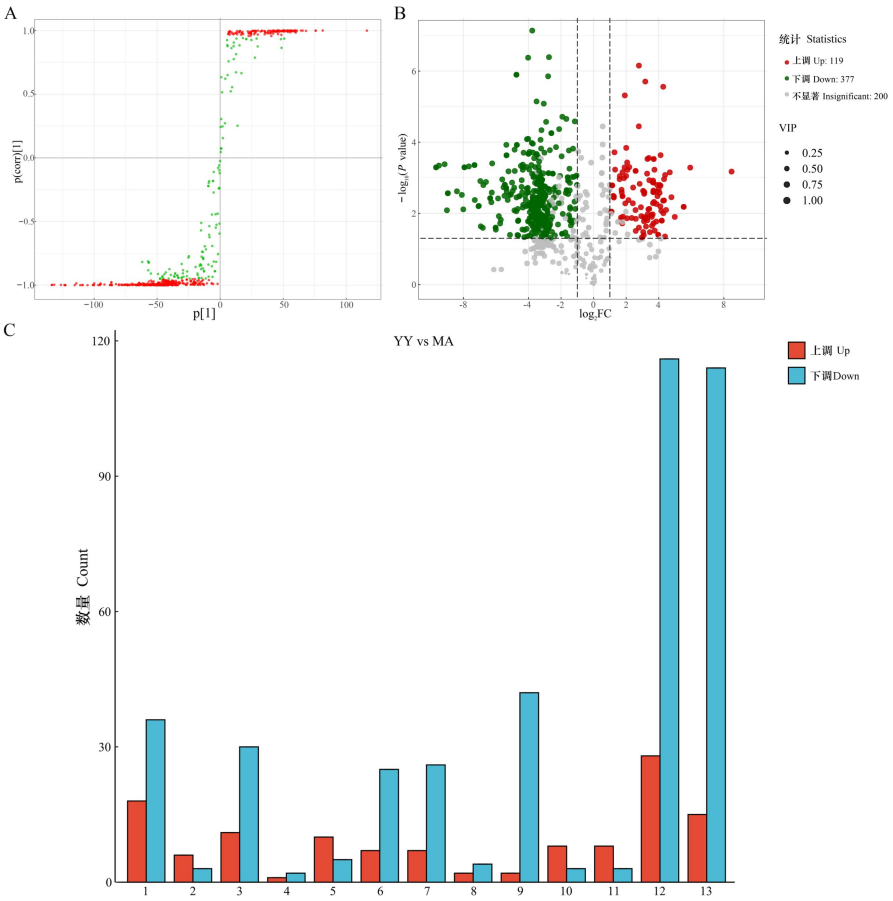
注：“其他”类别包括具有多重结构修饰形式或修饰类型不常见、尚未明确归类的黄酮代谢物。由于其结构修饰特征较为复杂，未单独归入上述四类主要结构修饰类型。

Note: “Others” include flavonoid metabolites with multiple modification patterns or rare, uncommon, or unknown types of modifications. Owing to the complexity of their modification features, these metabolites are not individually classified into the four major structural modification categories described above.

2.3 差异代谢物筛选与分析

为系统比较两种兜兰叶片间的黄酮代谢差异，基于 OPLS-DA 模型（生物学重复≥3）对两类兜兰叶样本的代谢物差异进行了分析（图 6：A）。以硬叶兜兰叶为对照组，综合 VIP>1、倍数变化（FC）≥2 或≤0.5 以及单变量统计分析结果（*P* value<0.05，经 FDR 校正）进行筛选，共鉴定出 532 种显著差异的黄酮类代谢物。通过火山图对差异代谢物的上调与下调分布情况进行了可视化展示（图 6：B）。其中，123 种黄酮代谢物在硬叶兜兰叶中显著富集，而 409 种在麻栗坡兜兰叶中显著富集。

对所有显著差异黄酮代谢物按物质类别进行统计分析后发现（图 6：C），在黄烷醇类、双黄酮类及二氢黄酮醇类代谢物中，上调代谢物数量及整体变化幅度较为明显；而黄酮类、黄酮醇类、花青素类及二氢黄酮类代谢物则以下调为主。



A. 正交偏最小二乘判别分析 S 图；**B**. 差异代谢物质火山图；**C**. 差异代谢物上、下调分类柱状图（**1**. 二氢黄酮；**2**. 二氢黄酮醇；**3**. 其他类黄酮；**4**. 原花青素；**5**. 双黄酮；**6**. 异黄酮；**7**. 查尔酮；**8**. 橙酮类；**9**. 花青素；**10**. 鞣质；**11**. 黄烷醇类；**12**. 黄酮；**13**. 黄酮醇）。

A. OPLS-DA S-plot; **B**. Volcano plot of differential metabolites; **C**. Bar chart showing the numbers of up-regulated and down-regulated differential metabolites（**1**. Flavanones; **2**. Flavanonols; **3**. Other flavonoids; **4**. Proanthocyanidins; **5**. Biflavones; **6**. Isoflavones; **7**. Chalcones; **8**. Aurones; **9**. Anthocyanidins; **10**. Tannin; **11**. Flavanols; **12**. Flavones; **13**.Flavonols）.

图 6 OPLS-DA S-plot 图、差异代谢物火山图与差异代谢物上、下调分类柱状图

Fig. 6 OPLS-DA S-plot, volcano plot of differential metabolites, and bar chart of up- and down-regulated metabolites

2.4KEGG 富集与黄酮代谢通路分析

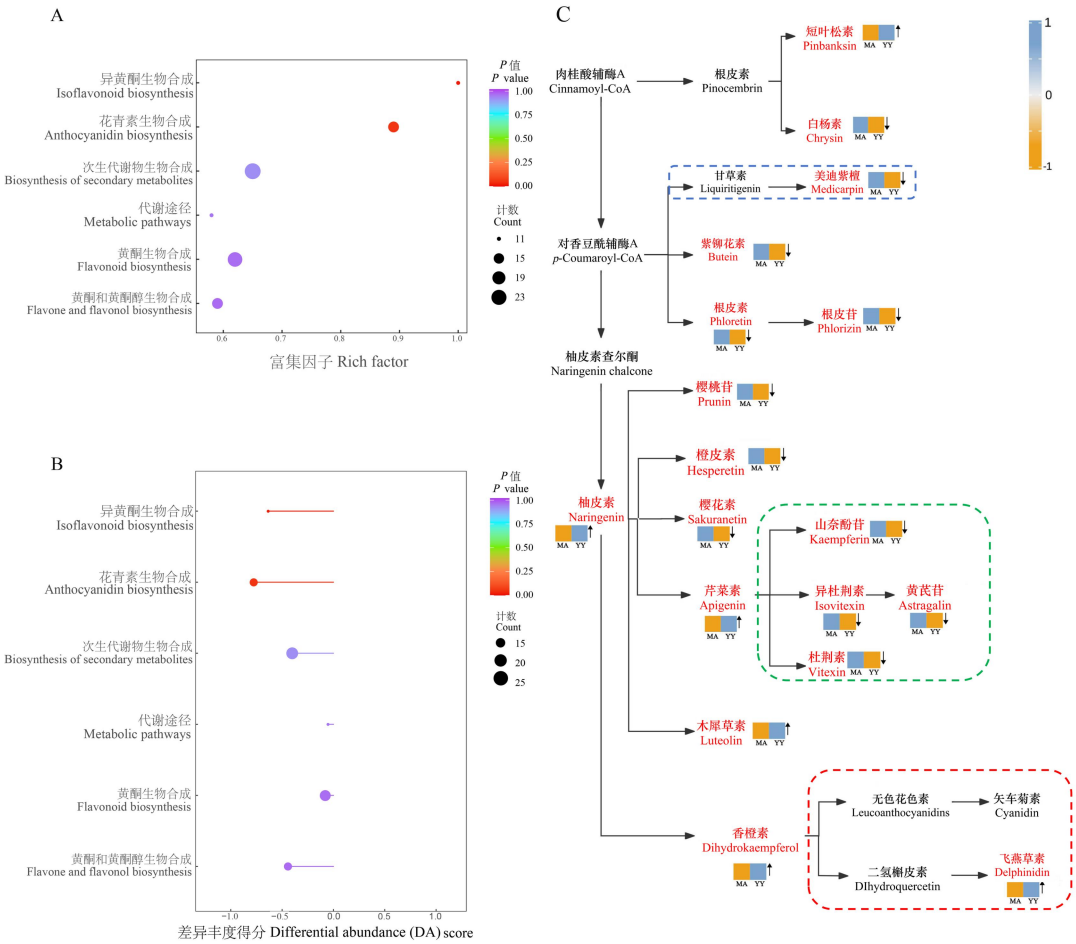
为进一步解析两种兜兰叶中黄酮代谢物的差异特征，对筛选得到的 532 种显著差异黄酮代谢物进行了 KEGG 通路富集分析。结果表明，这些差异代谢物主要显著富集于异黄酮生物合成、花青素生物合成、黄酮生物合成以及黄酮和黄酮醇生物合成等通路中（图 7：A）。其中，11 种差异代谢物被注释至花青素生物合成通路（ko00942），5 种被注释至异黄酮生物合成通路（ko00943），另有 2 种被注释至代谢通路（ko01100）。

KEGG 差异丰度得分图分析结果显示（图 7：B），上述通路在两种兜兰叶之间呈现出明显的方向性差异。其中，麻栗坡兜兰叶中异黄酮、花青素以及黄酮和黄酮醇生物合成相关通路的富集程度更高。

基于两种兜兰叶黄酮生物合成过程中具有代表性的关键节点代谢物，并结合后续药用活

性分析的需要，进一步绘制了两种兜兰叶中黄酮生物合成部分关键节点的通路示意图（图 7：C）。该通路示意图基于在黄酮生物合成网络中处于关键位置且差异显著的代表性代谢物构建，旨在展示两种兜兰叶黄酮代谢差异的整体变化趋势，而非对完整通路中所有差异代谢物的穷尽性呈现。

结果显示，在黄酮生物合成通路中，短叶松素、柚皮素、芹菜素、木犀草素和香橙素在硬叶兜兰叶中相对富集；而白杨素、紫铆花素、根皮素、根皮苷、樱桃苷、橙皮素和樱花素在麻栗坡兜兰叶中相对富集。在异黄酮生物合成通路及黄酮和黄酮醇生物合成通路中，美迪紫檀、山奈酚苷、异杜荆素、黄芪苷和杜荆素在麻栗坡兜兰叶中相对富集；而在花青素生物合成过程中，飞燕草素在硬叶兜兰叶中相对富集。



A. KEGG 富集分析；**B**. KEGG 差异丰度得分图；**C**. 黄酮生物合成代谢关键节点通路示意图。黄酮生物合成代谢关键节点通路示意图中，红色字体表示显著差异代谢物；蓝色、绿色和红色矩形框分别表示部分异黄酮、黄酮及黄酮醇和花青素生物合成通路中的显著差异代谢物。↑表示上调，↓表示下调。

A. KEGG pathway enrichment analysis; **B**. KEGG differential abundance score plot; **C**. Schematic diagram of key metabolic nodes in the flavonoid biosynthesis pathway. In the schematic of key metabolic pathways in flavonoid biosynthesis, metabolites with significant differences are indicated in red font. Blue, green, and red rectangular boxes highlight the metabolites with significant differences in the biosynthetic pathways of isoflavonoid, flavone and flavonol, and anthocyanin, respectively. ↑ denotes up and ↓ denotes down.

图 7 KEGG 富集分析、差异丰度的得分图与黄酮生物合成代谢关键节点通路图

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis, differential abundance score plot, and schematic diagram of key nodes in flavonoid biosynthesis

2.5 差异显著的代表性关键药用活性成分的筛选分析

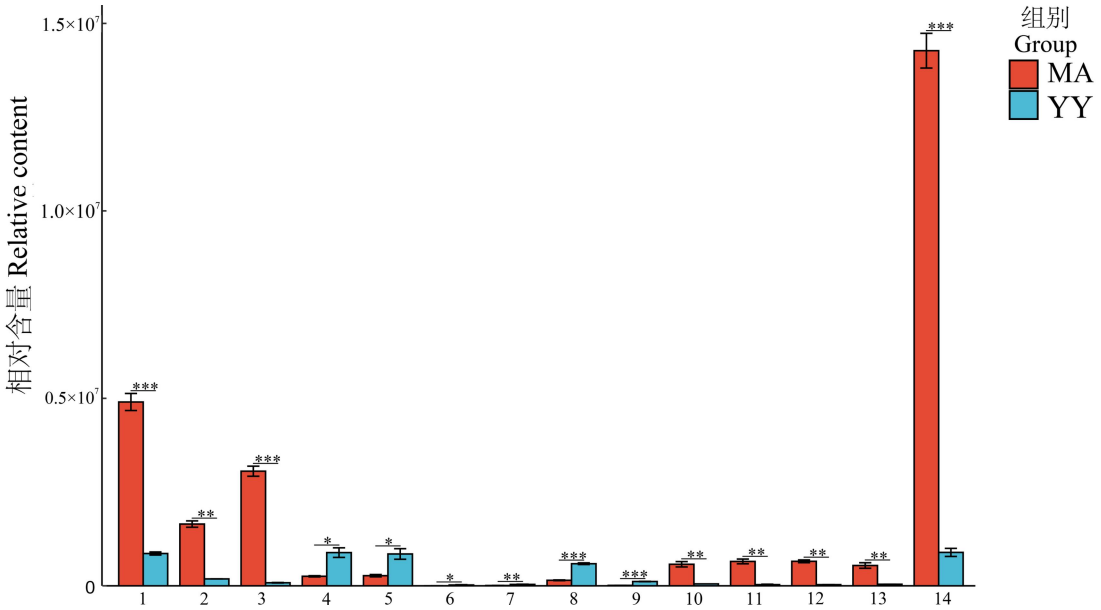
为在大量差异代谢物中进一步识别具有潜在药用意义且在两种兜兰间差异显著的代表性黄酮成分，基于 OPLS-DA 以已筛选的差异代谢物为研究对象，进一步设定筛选阈值为 VIP≥1、FDR≤0.05 且|$\log_2$FC|≥1，对差异代谢物进行重新分析。在上述统计筛选基础上，结合已有植物药理学研究中对抗炎、抗氧化、抗病毒、免疫调节及心血管保护等生物活性具有明确报道的黄酮类化合物，对筛选结果进行二次归纳，最终确定两种兜兰叶中的关键药用活性差异成分（表 2），并以柱状图形式进行可视化展示（图 8）。

结果表明，硬叶兜兰叶中，黄芩苷、杜鹃素、飞燕草素、表甲基桑黄黄酮 A、甲基桑黄黄酮 A 以及芹菜素的相对含量较高；在麻栗坡兜兰叶中，人参黄酮苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、三叶豆苷、紫云英苷、樱花素、槲皮素、根皮苷及槐属黄酮苷的相对含量较高。

表 2 差异显著的代表性关键药用活性黄酮类成分

Table 2 Key representative bioactive flavonoids showing significant differences

物质 Metabolite	变量重要性投影 VIP	P 值 *P* value	假发现率 FDR	倍数变化 Fold change	倍数变化的对数 $\log_2$FC	上调/下调 Up/down
黄芩苷 Baicalin	1.053 7	0.000 8	0.000 4	9.759 5	3.286 8	上调 Up
人参黄酮苷 Panasenoside	1.053 7	0.001 2	0.001 3	0.046 7	-4.418 9	下调 Down
矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 Cyanidin-3-*O*-glucoside	1.053 5	0.001 1	0.001 7	0.111 8	-3.160 7	下调 Down
三叶豆苷 Trifolin	1.053 4	0.000 7	0.001 7	0.026 6	-5.232 0	下调 Down
紫云英苷 Astragalin	1.052 9	0.000 8	0.001 7	0.175 8	-2.508 1	下调 Down
樱花素 Sakuranetin	1.052 2	0.000 2	0.001 7	0.062 4	-4.001 4	下调 Down
槲皮素 Quercetin	1.052 1	0.006 2	0.001 7	0.091 3	-3.453 3	下调 Down
杜鹃素 Farrerol	1.051 7	0.000 1	0.002 1	4.010 5	2.003 8	上调 Up
根皮苷 Phlorizin	1.051 7	0.007 2	0.002 1	0.077 2	-3.695 5	下调 Down
飞燕草素 Delphinidin	1.043 6	0.044 7	0.007 9	20.910 1	4.386 1	上调 Up
表甲基桑黄黄酮 A Epi-Methylphelligrin A	1.042 4	0.012 4	0.008 6	3.492 0	1.804 0	上调 Up
槐属黄酮苷 Kaempferol-3-*O*-sophoroside	1.038 3	0.002 0	0.013 9	0.047 8	-4.387 8	下调 Down
甲基桑黄黄酮 A Methylphelligrin A	1.031 6	0.015 7	0.016 6	3.141 4	1.651 4	上调 Up
芹菜素 Apigenin	1.021 0	0.004 2	0.044 7	4.412 8	2.141 7	上调 Up



1. 紫云葵苷；**2**. 矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷；**3**. 三叶豆苷；**4**. 表甲基桑黄黄酮 A；**5**. 甲基桑黄黄酮 A；**6**. 飞燕草素；**7**. 芹菜素；**8**. 杜鹃素；**9**. 黄岑苷；**10**. 槲皮素；**11**. 槐属黄酮苷；**12**. 人参黄酮苷；**13**. 根皮苷；**14**. 樱花素。差异显著的代表性关键药用活性黄酮类成分数据以平均值±标准差表示（$n = 3$）。两组间差异采用 Student's *t*-test 进行统计学分析。*表示 $P<0.05$，**表示 $P<0.01$，***表示 $P<0.001$.

1. Astragalin; **2**. Cyanidin-3-*O*-glucoside; **3**. Trifolin; **4**. Epi-Methylphelligrin A; **5**. Methylphelligrin A; **6**. Delphinidin; **7**. Apigenin; **8**. Farrerol; **9**. Baicalin; **10**. Quercetin; **11**. Kaempferol-3-*O*-sophoroside; **12**. Panasenoside; **13**. Phlorizin; **14**. Sakuranetin. Data for key bioactive differential metabolites are presented as $\bar{x}\pm s$ ($n = 3$). Statistical differences between the two groups are analyzed using Student's *t*-test. * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, and *** indicates $P<0.001$.

图 8 差异显著的代表性关键药用活性黄酮类成分相对含量柱状图

Fig.8 Bar chart of relative contents of significantly differential representative bioactive flavonoids

3 讨论与结论

本研究筛选并展示的显著差异的代表性药用活性成分表明，硬叶兜兰与麻栗坡兜兰叶片在高丰度差异的黄酮代谢物组成上呈现出显著分化，提示两者对于潜在药用活性成分的组成上可能存在不同的侧重。在硬叶兜兰叶中，存在多种呈现显著上调的黄酮类成分，如黄芩苷（$log_2FC=3.29$）、飞燕草素（$log_2FC=4.39$）、杜鹃素（$log_2FC=2.00$）以及表甲基桑黄黄酮 A（$log_2FC=1.80$）和甲基桑黄黄酮 A（$log_2FC=1.65$）等，整体以植物药理研究报道中具有抗炎、抗氧化及抗病毒等生物活性的黄酮类化合物为主（Hong et al., 2022；Husain et al., 2022；Chen et al., 2023）。相比之下，麻栗坡兜兰叶中相对富集的关键成分主要包括三叶豆苷（$log_2FC=-5.32$）、槐属黄酮苷（$log_2FC=-4.39$）、人参黄酮苷（$log_2FC=-4.42$）、樱花素（$log_2FC=-4.00$）、紫云英苷（$log_2FC=-2.51$）及矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷（$log_2FC=-3.16$）等，这些代谢物以糖苷化黄酮或黄酮醇为主，在既往研究中多与免疫调节、抗过敏及心血管保护等功能相关（Noh et al., 2021；陈世春等，2022；Cheng et al., 2023；林艺燕等，2025）。就代表性化合物的成分功能偏向角度而言，上述结果与中医药文献中的相关记载相符，并暗示了两种兜兰可能具有不同的功效侧重，但仍需相关药理学实验以进一步验证。值得注意的是，在麻栗坡兜兰叶中鉴定出多种在兰科植物中较为罕见或尚未系统报道的高价值药用活性成分，如槐属黄酮苷和人参黄酮苷等，这类黄酮代谢物近年来在植物药用研究中逐渐受到关

注（Hofbauer et al., 2021；Wang et al., 2024），为兜兰属植物药用潜力的进一步挖掘提供了新的研究线索。

进一步结合代谢物组成特征、结构修饰类型及 KEGG 富集分析结果与代谢通路特征可以发现，两种兜兰叶在黄酮代谢层面呈现出系统性的差异。从代谢物数量及组成结构来看，两者均以黄酮类、黄酮醇类和二氢黄酮类代谢物为主，但麻栗坡兜兰叶中黄酮代谢物的数量及整体丰度相对更高。从差异代谢物整体构成及通路富集结果分析发现，麻栗坡兜兰叶中白杨素、根皮素和橙皮素等处于黄酮生物合成中游及下游阶段的代谢物含量相对较高，并在异黄酮、黄酮和黄酮醇生物合成相关通路中的富集程度更为显著，该结果与 KEGG 富集分析结果保持一致；硬叶兜兰叶中的黄酮代谢物则主要集中于黄酮生物合成过程中的若干关键节点，如槲皮素、香橙素和飞燕草素等。此外，糖基化和羟基化是两种兜兰叶黄酮代谢过程中最主要的结构修饰方式，其中麻栗坡兜兰叶中糖基化、羟基化及酰基化代谢物数量相对较多，而硬叶兜兰叶中甲基化代谢物数量相对较多。综合来看，两种兜兰叶在黄酮代谢过程中采取了不同的代谢策略：麻栗坡兜兰叶更倾向于通过下游结构修饰的方式，积累结构复杂且多样的黄酮代谢物；而硬叶兜兰叶则优先富集黄酮生物合成途径中的关键节点代谢物。这种代谢策略上的差异，可能与两者生理特征差异及环境适应性密切相关。张一鸣（2025）研究认为，多样化的结构修饰途径是调控黄酮类代谢物生物活性并塑造不同物种适应性代谢的重要分子机制；就本研究而言，两种兜兰叶中不同的结构修饰特征可能通过影响黄酮代谢物的水溶性与脂溶性，进一步导致其生物活性及潜在药用价值的差异。这种黄酮代谢层面的整体差异，为两种珍稀濒危兜兰开展就地保护与迁地保护提供了参考依据。

此外，作为金线兰的重要药用活性成分之一，槲皮素（陈慧玲等，2023），在本研究中被鉴定同时存在于硬叶兜兰和麻栗坡兜兰叶中。关璟等（2005）研究表明，部分斑叶兰属植物中含有与金线兰相同或相似的代谢物，可作为其潜在的药用替代资源。因此，本研究中相同黄酮代谢物的鉴定结果，提示了在保护前提下筛选兜兰属植物药用替代资源的可能性。然而，在两种兜兰叶中均未检测到白杨黄素、生松素醇以及 2′-羟基-4,4′－二甲氧基查耳酮等附生兰中特有的黄酮类药用活性成分（李墅等，2005）。该现象可能与地生兰与附生兰在黄酮生物合成途径及调控机制上的差异有关，仍有待进一步验证。并且，上述黄酮类代谢物组成差异亦可能与不同器官间的黄酮生物合成差异密切相关，与硬叶兜兰（Deng et al., 2023）花中的黄酮代谢特征相比，叶中黄酮代谢物的组成类型更为丰富，花中黄酮代谢物以花青素类为主，而叶则更为多样丰富，但其具体分子机制仍需进一步研究。此外，硬叶兜兰叶中较高的叶绿素含量与其较强的光适应能力相一致（孙菲菲等，2022），但两种兜兰叶中可溶性糖、可溶性蛋白及花青素相对含量，均显著低于其他兰科植物（王桂兰等，2007；王桂兰等，2010；秦建彬等，2014），可能一定程度上影响了植物体内黄酮代谢物的合成与积累（李湘鹏，2025），这对于进一步解析兜兰属植物黄酮生物合成调控机制及呈色机理具有重要意义（Qiu et al., 2023；李虹等，2024）。

总体而言，本研究通过对硬叶兜兰和麻栗坡兜兰叶中黄酮代谢的系统梳理与分析，初步探讨了两种兜兰叶黄酮代谢的差异及潜在的生物学意义，为理解兜兰属植物的化学多样性和代谢物功能特征提供了代谢组学数据支持。尽管本研究仍局限于代谢物相对含量的分析与理论推断，尚缺乏进一步的药理学实验验证，但是相关结果仍可为兜兰属植物的保育研究、人工繁育优化及药用代替资源的筛选提供科学参考。

参考文献：

AGATI G, AZZARELLO E, POLLASTRI S, et al., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance[J]. Plant Science, 196: 67-76.

AHMAD S, GAO J, WEI Y, et al., 2022. The transcriptome profiling of flavonoids and bibenzyls

reveals medicinal importance of rare orchid *Arundina graminifolia*[J]. Frontiers in Plant Science, 13: 923000.

AVIRAM M, DORNFELD L, ROSENBLAT M, et al., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 71(5): 1062-1076.

CAO H Z, LI H, CHEN X, et al., 2022. Insight into the molecular mechanisms of leaf coloration in *Cymbidium ensifolium*[J]. Frontiers in Genetics, 13: 923082.

CHEN J R, ZHONG K X, QIN S Q, et al., 2023. Astragalin: A food-origin flavonoid with therapeutic effect for multiple diseases[J]. Frontiers in Pharmacology, 14: 1265960.

CHENG Z, SI X, TAN H, et al., 2023. Cyanidin-3-*O*-glucoside and its phenolic metabolites ameliorate intestinal diseases via modulating intestinal mucosal immune system: potential mechanisms and therapeutic strategies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63(11): 1629-1647.

CHEN H L, ZHANG C, ZHENG C J, et al., 2023. UPLC fingerprint and content determination of 6 flavonoids in ten medicinal plants of *Anoectochilus* species[J]. Pharmaceutical Research, 42(10): 765-771.[陈慧玲，张超，郑承剑，等，2023. 金线兰属 10 种药用植物 UPLC 指纹图谱及 6 种黄酮类成分含量测定 [J]. 药学研究，42(10)：765-771.]

CHOUDHARY D, MASHKEY V K, GOUTAM E, et al., 2023. Medicinal orchids: Traditional uses and recent advances [J]. Annals of Phytomedicine, 12(1): 1-9.

CUSHNIE T P T, LAMB A J, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. International Journal Of Antimicrobial Agents, 26(5): 343-356.

CHEN SC, XU YX, HAN WC, et al., 2022. Research progress on pharmacological properties and mechanism of Astragalin [J]. Journal of Chinese Medicine, 40(11): 118-123, 287.[陈世春，徐永祥，韩伟超，等，2022. 紫云英苷的药理特性及其作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，40(11)：118-123，287.]

DE L C, 2020. Morphological diversity in orchids [J]. International Journal of Botany Studies, 5(5): 229-238.

DING C C, XIA N H, 2009. Aseptic Sowing and Rapid Propagation of *Paphiopedilum malipoense* S. C. Chen & Z. H. Tsi in vitro [J]. Plant Physiology Communications, 45(12): 1201-1202.[丁长春，夏念和，2009. 麻栗坡兜兰的无菌播种与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯，45(12)：1201-1202.]

DENG L L, PAN X Q, SHENG J P, et al., 2012. Optimization of experimental conditions for the determination of water soluble protein in apple pulp using coomassie brilliant blue method [J]. Food Science, 33(24): 185-189.[邓丽莉，潘晓倩，生吉萍，等，2012. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化 [J]. 食品科学，33(24)：185-189.]

DENG X Y, HU C, XIE C Z, et al., 2023. Metabolomic and Transcriptomic Analysis Reveal the Role of Metabolites and Genes in Modulating Flower Color of *Paphiopedilum micranthum* [J]. Plants, 12(10): 2058.

EVONNE T, 2007. Conversion of RAPD markers to co-dominant based sequence characterized amplified region (SCAR) markers in three *Paphiopedilum* species [D]. Kota Kinabalu: Universiti Malaysia Sabah.

FEILD T S, LEE D W, HOLBROOK N M, et al., 2001. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood [J]. Plant Physiology, 127(2):

566-574.
GINWALA R, BHAVSAR R, CHIGBU D G I, et al., 2019. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin [J]. Antioxidants, 8(2): 35.
GUAN J, WANG C L, XIAO P, et al., 2005. Chemical constituents and pharmacological effects of terrestrial orchids used as medicinal plants [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 30(14): 1053-1061.[关璟，王春兰，肖培根，等，2005. 地生型兰科药用植物化学成分及其药理作用研究 [J]. 中国中药杂志，30(14)：1053-1061.]
HOFBAUER L, SHIPARD S, GARETTA C, et al., 2021. Panasenoside as a marker for the discrimination of Ginseng root and leaf extracts [J]. Planta Medica, 87(15): PC9-PC66.
HONG S, DIA V P, BAEK S J, et al., 2022. Nanoencapsulation of apigenin with whey protein isolate: Physicochemical properties, in vitro activity against colorectal cancer cells, and bioavailability [J]. LWT - Food Science and Technology, 154: 112751.
HUSAIN A, CHANANA H, KHAN S A, et al., 2022. Chemistry and pharmacological actions of delphinidin, a dietary purple pigment in anthocyanidin and anthocyanin forms[J]. Frontiers in Nutrition, 9: 746881.
KHACHATOORIAN R, ARUMUGASWAMI V, RAYCHAUDHURI S, et al., 2012. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle[J]. Virology, 433(2): 346-355.
LEE Y I, 2007. The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum* species in relation to the time of seed collection and seed pretreatment [C]. International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals, 755: 381-386.
LUO Y B, JIA J S, WANG C L, et al., 2003. Conservation strategy and potential advantages of the Chinese *Paphiopedilum* [J]. Biodiversity Science, 11(6): 491-498.[罗毅波，贾建生，王春玲，等，2003. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势 [J]. 生物多样性，11(6)：491-498.]
LI K Q, WU F J, CHEN M Z, et al., 2023. Identification, biological function profiling and biosynthesis of secondary metabolites in medicinal orchids[J]. Metabolites, 13(7): 829.
LI T, SU C, WANG Q Y, et al., 2018. Pharmacognostical identification of *Paphiopedilum micranthum* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 33(2): 213-215. [李涛，苏趁，王秋燕，等，2018. 硬叶兜兰的生药学鉴别 [J]. 华西药学杂志，33(2)：213-215.]
LI C, SU X, FENG W H, et al., 2016. Simultaneous determination of 12 mycotoxins in Polygoni Multiflori Radix by UPLC-ESI-MS /MS combined with modified QuEChERS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 41(23): 4368-4374.[李春，苏晓，冯伟红，等，2016. 基于 UPLC-ESI-MS/MS 的何首乌中 12 种真菌毒素污染检测 [J]. 中国中药杂志，41(23)：4368-4374.]
LI M J, LIU P, 2007. Plant Physiology Experimental Techniques (Experimental Textbook Series for Basic Biology Courses in the 21st Century) [M]. Beijing: Higher Education Press: 35-39. [李明军，刘萍，2007. 植物生理学实验技术（21 世纪生物学基础课系列实验教材）[M]. 北京：高等教育出版社：35-39]
LI H, WEI D, QU Y T, et al., 2024. Application of targeted metabomics to analyze the differences in flavinoid compounds in *Acer mandshuricum* leavees at different coloration stages [J]. Journal of Northeast Forestry University, 52(10): 66-72. [李虹，魏丹，曲彦婷，等，2024. 应用靶向代谢组学技术分析白牛槭叶片不同呈色期类黄酮化合物的差异 [J]. 东北林业大

学学报，52(10)：66-72.]

LI X P, 2025. Effects of differemt concentrations of ethephon and sucrose on the color and physiological characteristics of *Ginkgo biloba* leaves [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology. [李湘鹏，2025. 乙烯利和蔗糖的不同浓度处理对银杏叶色及生理特性的影响 [D]. 长沙：中南林业科技大学.]

LI S, WANG C L, GUO S X, et al., 2005. Chemical constituents and pharmacological activities of epiphytic orchids used as medicinal plants [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 30(19): 13-20. [李墅，王春兰，郭顺星，等，2005. 附生型兰科药用植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志，30(19)：13-20.]

LIN YY, WU YY, YAN R, et al., 2025. Research progress on the mechanisms of quercetin in the prevention and treatment of acute lung injury [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 30(9): 1272-1280. [林艺燕，吴月莹，严锐，等，2025. 槲皮素防治急性肺损伤作用机制的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学，30(9)：1272-1280.]

NOH H R, KANG J Y, KIM B G, et al., 2021. Biosynthesis of trifolin, a bioactive flavonoid by biotransformation[J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 64(3): 309-316.

QIN J B, YE B W, YU Z Y, et al., 2014. Change of Soluble Sugar Content in Various Organs During Flower Formation of *Cymbidium* [J]. Journal of Tropical Crops, 35(8): 1501-1505. [秦建彬，叶必伟，余祖云，等，2014. 大花蕙兰成花过程中各器官可溶性糖含量的变化 [J]. 热带作物学报，35(8)：1501-1505.]

QIU Y J, CAI C C, MO X, et al., 2023. Transcriptome and metabolome analysis reveals the effect of flavonoids on flower color variation in *Dendrobium nobile* Lindl. [J]. Frontiers in Plant Science, 14: 1220507.

REN S X, LI Z Y, HU M L, et al., 2024.Screening, identification and biological characteristics of high IAA-producing strains of *Paphiopedilum micranthum* [J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 46(4): 902-913. [任书娴，李宗艳，胡梦露，等，2024. 硬叶兜兰高产 IAA 菌株的筛选鉴定及其生物学特性研究 [J]. 江西农业大学学报，46(4)：902-913.]

SCHUITEMAN, 2021. Leopard spots, chequerboards and spider's webs: classification, systematics and function of variegated leaves in Orchidaceae [J]. Rheedea, 31(3): 105-132.

SHAN H J, WANG B, et al., 2010. *Solanum Nigrum* in Dynamic Accumulation of Soluble Sugar

[J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 16(9): 100-102. [单会娇，王冰，等，2010. 龙葵药材中可溶性糖的动态积累[J]. 中国实验方剂学杂志 16(9)：100-102.]

SUN X Y, 2014. Diversity of Mycorrhizal Fungi Isolated from five Species of the Genus *Paphiopedilum* [D]. Beijing: Beijing Forestry University. [孙晓颖，2014. 五种野生兜兰植物菌根真菌多样性研究[D]. 北京：北京林业大学.]

SUN F F, YANG Y S, QIN H Z, et al., 2022. Comparative study on the photosynthetic characteristics of three *Paphiopedilum* species [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 38(2): 155-162.[孙菲菲，杨一山，秦惠珍，等，2022. 3 种兜兰属植物光合特性的比较研究 [J]. 广西科学院学报，38(2)：155-162.]

TANG H, 2016. DNA barcoding identification and ecological suitability of important medicinal plants of Orchidaceae[D]. Sichuan: Sichuan Agricultural University. [汤欢，2016. 兰科重要药用植物 DNA 条形码鉴定及其生态适宜性 [D]. 四川：四川农业大学.]

VINAYAGAM R, XU B, 2015. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review [J]. Nutrition & Metabolism, 12: 60.

WU M K, 2013. Medicinal orchid resources in Guizhou [C]// Botany in Ecological Civilization

Construction: Present and Future. Nanchang : Proceedings of the 15th General Assembly and 80th Anniversary of the Botanical Society of China, Session 4: Resource Botany. [吴明开，2013. 贵州药用兰科植物资源[C]//生态文明建设中的植物学：现在与未来. 南昌：中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会论文集——第 4 分会场：资源植物学]

WU Z H, MA L, CHEN J, et al., 2024. Analysis on chemical components in seed coat of black soybean based on UPLC-ESI-MS/MS technology [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 33(1): 111-113.[吴志华，马丽，陈剑，等，2024. 基于 UPLC-ESI-MS/MS 技术黑豆种皮的化学成分分析 [J]. 植物资源与环境学报，33(1)：111-113.]

WANG G L, CHEN C, LI Y M, et al., 2010. Study on the changes in soluble sugar content during flowering induction and flowering process in *Phalaenopsis aphrodite* [J]. Northern Horticulture, (10): 151-154. [王桂兰，陈超，李艳梅，等，2010. 蝴蝶兰催花及开花过程中可溶性糖含量变化的研究[J]. 北方园艺(10)：151-154.]

WANG G L, QIAO Y X, CHEN C, et al., 2007. Study on the changes in soluble protein content during flowering induction and flowering process in *Phalaenopsis aphrodite* [J]. Northern Horticulture, (4): 121-124. [王桂兰，乔永旭，陈超，等，2007. 蝴蝶兰催花及开花过程中可溶性蛋白含量变化的研究[J]. 北方园艺(4)：121-124.]

WANG R, HU X L, LIU S M, et al., 2024. Kaempferol-3-O-sophoroside (PCS-1) contributes to modulation of depressive-like behaviour in C57BL/6J mice by activating AMPK [J]. British Journal of Pharmacology, 181(8): 1182-1202.

YE Q H, QIN G W, ZHAO W M, et al., 2002. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* [J]. Phytochemistry, 61(8): 885-890.

ZENG S J, GUO B Y, KONG X P, et al., 2020. Advances in Propagation in vitro of *Paphiopedilum* [J]. Journal of Tropical Crops, 41(10): 2080-2089. [曾宋君，郭贝怡，孔鑫平，等，2020. 兜兰离体快繁技术研究进展 [J]. 热带作物学报，41(10)：2080-2089.]

ZHANG Y, AN M T, WU J Y, et al., 2022. Survival status and protection effectiveness of *Paphiopedilum* Subgenus.*Brachypetalum* in China[J]. China Environmental Science, 42(7): 3416-3472. [张央，安明态，武建勇，等，2022. 中国兜兰属宽瓣亚属植物生存现状及保护成效 [J]. 中国环境科学，42(7)：3461-3472.]

ZHANG Q D, 1985. Several methods for determining chlorophyll [J]. Acta Botanica Sinica(5): 60-64. [张其德，1985. 测定叶绿素的几种方法[J]. 植物学通报（5）：60-64.]

ZANDI K, TEOH B T, SAM S S, et al., 2011. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2 [J]. Virology Journal, 8(1): 560.

ZHANG Y M, 2025.Elucidation of the Glycosylation and Methylation Modification Mechanisms in Flavonoids of *Cannabis sativa* [D]. Harbin: Northeast Forestry University.[张一鸣，2025. 工业大麻黄酮类化合物糖基化和甲基化修饰机制解析[D]. 哈尔滨：东北林业大学.]