

牛果藤属植物叶形态多样性以及活性成分差异分析

杨 敏^{1,2}, 何宗桃⁴, 田 莉^{1,2}, 杨 梅^{1,2}, 秦位强⁵, 田春莲^{1,2,3*}

1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000
2. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000
3. 吉首大学 杜仲综合利用技术国家地方联合工程实验室, 湖南 吉首 416000
4. 张家界市农产品质量安全检验检测中心, 湖南 张家界 427000
5. 张家界学院理工农学院, 湖南 张家界 427000

摘要: **目的** 了解牛果藤属种间叶性状的多样性差异, 提高牛果藤属优异种质资源的选育和利用。**方法** 以 5 种牛果藤属植物为研究对象, 采用智能叶面积测量系统、紫外可见分光光度计和高效液相色谱 (HPLC) 测定形态和活性成分指标, 并对数据进行描述性统计、方差分析和多重比较分析。**结果** 形态特征表明 5 种牛果藤属植物种间 (内) 差异明显, 大齿牛果藤 *Nekemias grossedentata* 与牛果藤 *N. cantoniensis* 具有一回或两回羽状复叶, 其他物种均为一回羽状复叶, 叶缘锯齿以大齿牛果藤最明显; 该属植物叶性状除复叶叶柄长和小叶叶面积发生中等变异外, 其余性状均为弱变异, 除小叶厚度外, 其他性状均存在显著的种间差异, 5 个物种大齿牛果藤叶性状最稳定; 叶活性成分以黄酮类化合物为主, 种间差异显著 ($P < 0.001$), 总黄酮含量在 13.81%~38.67%, 大齿牛果藤最高, 是含量最低的牛果藤的 78 倍; 二氢杨梅素、杨梅苷和杨梅素是该属植物的主要成分。**结论** 牛果藤属植物种间和种内呈现明显的性状多样性, 黄酮类化合物是该属植物的主要成分, 种类和含量因物种而异, 研究结果为牛果藤属植物资源的综合利用提供理论依据。

关键词: 牛果藤属; 羽叶牛果藤; 牛果藤; 大齿牛果藤; 大叶牛果藤; 毛枝牛果藤; 叶性状; 二氢杨梅素; 杨梅苷; 杨梅素

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)05-1755-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.024

Analysis of leaf morphological diversity and difference of active components in *Nekemias*

YANG Min^{1,2}, HE Zongtao⁴, TIAN Li^{1,2}, YANG Mei^{1,2}, QIN Weiqiang⁵, TIAN Chunlian^{1,2,3}

1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China
2. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China
3. National and Local United Engineering Laboratory of Integrative Utilization Technology of *Eucommia ulmoides*, Jishou University, Jishou 416000, China
4. Zhangjiajie Inspection and Testing Center for Agro-Products Quality Safety, Zhangjiajie 427000, China
5. School of Technology and Agriculture, Zhangjiajie College, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: **Objective** To understand the diversity differences of interspecific leaf traits of *Nekemias*, so as to facilitate the breeding and development of excellent germplasm resources of *Nekemias*. **Methods** Five species of *Nekemias* were taken as the research objects, and the morphological and active components were determined by intelligent leaf area measurement system, ultraviolet-visible spectrophotometer and HPLC, and the data were analyzed by descriptive statistics, variance analysis and multiple comparative analysis. **Results** Morphological characteristics showed that there were obvious differences among the five species of *Nekemias*. *N. grossedentata* and *N. cantoniensis* had one or two pinnate fronds, while other species all had one pinnate frond, and the serration of leaf margin was the most obvious in *N. grossedentata*. Except for the moderate variation of compound leaf petiole length and lobular leaf area, the other leaf traits of this genus were weak, and there were significant interspecific differences except lobular thickness, and

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2025JJ70626); 吉首大学研究生科研项目 (Jdy23094)

作者简介: 杨 敏 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事植物资源品质评价研究。Tel: 14708618497 E-mail: ym14799@163.com

*通信作者: 田春莲, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药、民族药质量控制及新药研发工作。E-mail: chunlian@jssu.edu.cn

the leaf traits of *N. grossedentata* of five species were the most stable; The active components in leaves were mainly flavonoids, with significant difference among species ($P < 0.001$). The content of total flavonoids was in the range of 13.81%—38.67%, and *N. grossedentata* ranked the highest, with 78 times of the lowest one, *N. cantoniensis*. Dihydromyricetin, myricitrin and myricetin were the main components of this genus. **Conclusion** There are obvious character diversity among and within species of *Nekemias*. Flavonoids are the main components of this genus, and the type and content vary from species to species. The research results provide theoretical basis for the comprehensive utilization of *Nekemias* plant resources.

Key words: *Nekemias* Raf; *Nekemias chaffanjonii* (H. Lév. & Vaniot) J. Wen & Z. L. Nie; *Nekemias cantoniensis* (Hook. & Arn.) J. Wen & Z. L. Nie; *Nekemias grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang; *Nekemias megalophylla* var. *jiangxiensis* (W. T. Wang) J. Wen & Z. L. Nie; *Nekemias rubifolia* (Wall.) J. Wen & Z. L. Nie; leaf traits; dihydromyricetin; myricitrin; myricetin

牛果藤属 *Nekemias* Raf 植物为多年生木质落叶藤本, 是由蛇葡萄属 *Ampelopsis* Michaux 植物中具有羽状复叶的种分离而成立^[1], 主要分布在福建、湖北、湖南、广东、广西、贵州、云南等地^[2]。该属植物茎叶富含黄酮类、酚类、类固醇、萜类、水溶性多糖和挥发性成分, 尤其黄酮类化合物质量分数高达 43.4%~44.0%^[3], 被誉为“黄酮之王”, 藤茶是采用牛果藤属植物加工而成的代用茶, 又称莓茶、别样茶、龙须茶等。民间用于治疗口腔溃疡、咽喉肿痛、感冒发热、湿热黄疸、目赤肿痛、痈肿疮疖等症^[4], 而现代医学研究发现其抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病、保护神经等活性明显^[5], 且无毒性报道。随着基原大齿牛果藤的叶 2013 年被收录为新资源食品, 藤茶已发展成湖南、湖北等山区的支柱产业。但大叶牛果藤和牛果藤在不同民族和地区也被作为藤茶加工原材料, 导致产品质量参差不齐和价格乱象。因此, 应用现代分析手段从叶形态性状和活性成分评价该属植物, 既从源头保证了藤茶产业的可持续发展, 又为牛果藤属植物资源的合理利用提供科学依据。

叶片是植物光合作用和蒸腾作用的主要器官^[6], 叶片进化和形态变化机制是植物学研究的热点^[7]。复叶是植物适应丰富环境的重要特征, 复叶植物叶因高的水分传导率和光合速率而具有较高的资源获取能力和相对生长速率^[8]。木本植物复叶的表型多样性研究主要涉及叶片颜色、复叶数、叶大小变异以及叶活性成分与叶大小性状的相关性, 研究表明, 复叶数与复叶间距、叶长、叶宽极显著正相关^[9], 顶叶长与顶叶宽、小叶长宽比极显著正相关^[10], 一定叶轴长度时, 二回比一回羽状复叶有更大的叶面积与质量^[11], 而皂素等活性成分含量与复叶宽、小叶长均显著负相关^[12]。关于牛果藤属植物, 有研究表明不同产地藤茶材料叶气孔密度和保卫细胞形状差异明显^[13], 中叶型黄酮质量分数高达 31.66%^[14],

大齿牛果藤叶二氢杨梅素含量高于羽叶牛果藤与牛果藤, 杨梅苷含量却相对较低^[15]。但迄今为止, 基于形态特征和活性成分综合评价牛果藤属植物未见涉及。

本研究以羽叶牛果藤、牛果藤、大齿牛果藤、大叶牛果藤和毛枝牛果藤 5 种牛果藤属植物为材料, 采用叶面积仪等测量复叶长、小叶面积等形态指标, 紫外分光光度法和高效液相色谱 (HPLC) 测定总黄酮、二氢杨梅素等活性成分含量, 通过方差分析、LSD 多重比较获得了该属植物叶形态性状和活性成分的差异性, 以期对牛果藤属植物种质评价和遗传改良提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; 色谱柱 Ultimate xb-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 月旭科技(上海)股份有限公司; AF224C 型万分之一电子天平, 上海恒平天平科学仪器有限公司; EX125DZH 型奥豪十万分之一电子天平, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; DSA300-GL1 型超声波清洗仪, 福州德森精工有限公司; CenLee18K 型高速离心机, 湖南湘立科学仪器有限公司; UV757CRT 型紫外可见分光光度计, 赛默飞世尔(上海)科技公司; YMJ-CHA3 型智能叶面积测量系统、YH-1 型植物叶片厚度计(浙江托普云农科技股份有限公司); 游标卡尺(温州韦度电子有限公司)。

1.2 材料

对照品没食子酸(批号 RP221126)、儿茶素(批号 RP210819)、二氢杨梅素(批号 RP220208)、芦丁(批号 RP190213)、杨梅苷(批号 RP230512)、槲皮素(批号 RP211026)、杨梅素(批号 RP210608)、二氢槲皮素(批号 RP220403)、芹菜素(批号 RP200605)、山柰酚(批号 RP210502)均购于成都

麦德生科技有限公司, 质量分数>98%; 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸、乙醇、三氯化铝、醋酸钾等试剂均为 AR, 水为哇哈哈纯净水。2023 年 10 月下旬~12 月初采集 5 种牛果藤属植物成熟叶样品, 50 ℃烘干, 40 目过筛, 常温干燥备用。由吉首大学秦位强教授鉴定为羽叶牛果藤 *N. chaffanjonii* (H.

Lévl. & Vaniot) J. Wen & Z. L. Nie、牛果藤 *N. cantoniensis* (Hook. & Arn.) J. Wen & Z. L. Nie、大齿牛果藤 *N. grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang、大叶牛果藤 *N. megalophylla* var. *jiangxiensis* (W. T. Wang) J. Wen & Z. L. Nie 和毛枝牛果藤 *N. rubifolia* (Wall.) J. Wen & Z. L. Nie, 样品信息见表 1。

表 1 样品及来源信息

Table 1 Samples and source information

样品编号	物种	采样地	采样时间	海拔/m	经度/°(E)	纬度/°(N)
S1	羽叶牛果藤	湖南永定罗塔坪	2023-12-03	402.8	110.12	29.16
S2	牛果藤	湖南永顺润雅	2023-10-28	690.8	110.10	29.11
S3	大齿牛果藤	湖南永顺润雅	2023-10-28	690.8	110.10	29.11
S4	大叶牛果藤	湖南永顺润雅	2023-10-28	690.8	110.10	29.11
S5	毛枝牛果藤	湖南永定罗塔坪	2023-12-03	420.7	110.11	29.16

2 方法

2.1 叶形态指标测量

采用智能叶面积仪扫描测定采用智能叶面积仪扫描测定复叶长、复叶宽、复叶面积、复叶周长; 按小叶在复叶上着生位置排序, 目测选取 1 级小叶 (图 1), 并用智能叶面积仪测定叶长、叶宽、叶面积、叶周长; 游标卡尺测量复叶叶柄长和小叶叶柄长; 采用叶片厚度计测定小叶中部避开叶脉处的厚度, 为小叶厚度, 见图 1。

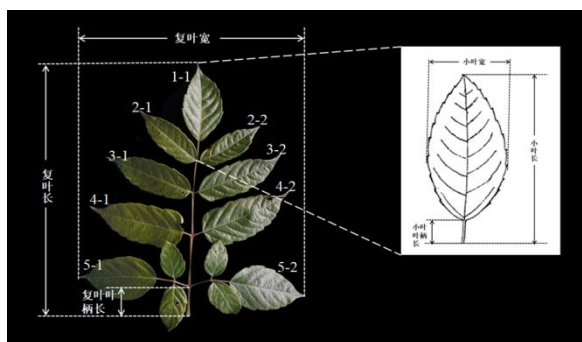


图 1 复叶及小叶形态示例

Fig. 1 Examples of compound leaf and leaflet morphology

2.2 紫外可见分光光度计测定叶总黄酮

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取二氢杨梅素对照品适量置入 25 mL 量瓶中, 加入适量 70% 的乙醇溶液摇匀或超声溶解, 定容至 25 mL, 得到 452.00 μg/mL 对照品储备液 I; 吸取适量对照品储备液用 70% 乙醇溶液稀释 10 倍, 配成 45.20 μg/mL 对照品储备液 II; 对照品储备液 II 用 70% 乙醇溶液稀释 10 倍, 配成 4.52 μg/mL 对照品储备液 III。

2.2.2 供试品溶液的制备 精确称取 0.10 g 样品置

于 50 mL 圆底烧瓶, 加入 70% 乙醇溶液 25 mL 混匀, 50 ℃ 水浴超声提取 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液缓慢倒入 100 mL 量瓶中, 离心后的沉淀物重复提取 3 次, 70% 乙醇定容至 100 mL, 静置, 4 ℃ 保存备用。

2.2.3 线性关系考察 分别精确吸取对照品储备液 II 0、0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 得二氢杨梅素对照品系列质量浓度分别为 2.26、6.78、11.30、15.82、20.34 μg/mL, 依次按 2.2.3 方法测定, 以对照品浓度为横坐标 (X)、吸光度 (A) 值为纵坐标 (Y) 线性回归, 建立回归方程为 $Y = 0.0452X + 0.0009$, $R^2 = 0.9991$ 。

2.2.4 精密度试验 称取样品 (S3) 0.10 g, 按“2.2.2”项操作制备样品溶液, 按“2.2.3”项方法重复检测 6 次, 记录 A 值。计算出 A 值的 $RSD < 3.00\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 称取样品 (S3) 0.10 g, 按“2.2.2”项操作制备样品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 时, 取样品溶液按“2.2.3”项方法检测, 记录各 A 值。计算出各 A 值 $RSD < 3.00\%$, 表明制备保存的样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 称取 6 份 S3 样品 0.10 g, 按“2.2.2”项操作制备样品溶液, 按“2.2.3”项检测方法测定, 记录各 A 值。计算出各相对 A 值 $RSD < 3.00\%$, 表明方法重复性良好。

2.2.7 总黄酮测定 取适宜浓度对照品溶液显色后在 200~800 nm 波长下扫描, 确定检测波长为 292 nm。样品检测时, 精确吸取适量样品溶液于 10 mL 比色管, 加入少量 70% 乙醇, 再加入 2.5% $AlCl_3$ 溶

液 2 mL, 摇匀放置 10 min 后, 再加入 10%醋酸钾溶液 2 mL, 用 70%乙醇定容, 静置反应 20 min, 于 292 nm 下测定 A 值, 根据回归方程, 计算总黄酮的量。

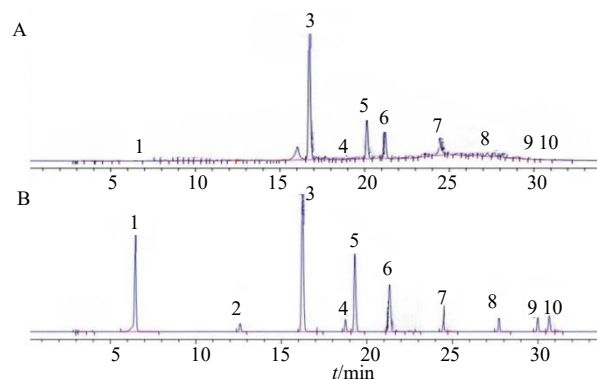
2.3 HPLC 检测叶中活性成分

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量置入容量瓶中, 加入 60%的甲醇溶解, 定容至 5 mL, 充分溶解, 得到含有没食子酸 630.00 $\mu\text{g/mL}$ 、儿茶素 310.00 $\mu\text{g/mL}$ 、二氢杨梅素 10 900.00 $\mu\text{g/mL}$ 、芦丁 700.00 $\mu\text{g/mL}$ 、杨梅苷 2 400.00 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮素 340.00 $\mu\text{g/mL}$ 、杨梅素 260.00 $\mu\text{g/mL}$ 、二氢槲皮素 140.00 $\mu\text{g/mL}$ 、芹菜素 160.00 $\mu\text{g/mL}$ 、山柰酚 340.00 $\mu\text{g/mL}$ 的各对照品溶液, 稀释, 得不同质量浓度的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 分别称取 0.10 g 样品于圆底烧瓶中, 加入 10 mL 60%甲醇溶液后称量, 超声 45 min, 再次称量, 加 60%甲醇溶液补足质量, 8 000 r/min 离心 8 min, 过 0.45 μm 滤膜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 样品溶液备用。

2.3.3 HPLC 条件 采用 Ultimate xb-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.01%磷酸水 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~8 min、95%~85%A, 8~18 min、85%~76%A, 18~25 min、76%~60%A, 25~35 min、60%~50%A); 检测波长 0~15 min、

280 nm, 15~35 min、360 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。混合对照品和供试品溶液色谱图见图 2。



1-没食子酸; 2-儿茶素; 3-二氢杨梅素; 4-芦丁; 5-杨梅苷; 6-槲皮素; 7-杨梅素; 8-二氢槲皮素; 9-芹菜素; 10-山柰酚。
1-gallic acid; 2-catechin; 3-dihydromyricetin; 4-catechin; 5-myricitrin; 6-quercetin; 7-myricetin; 8-dihydroquercetin; 9-apigenin; 10-kaempferol.

图 2 样品 (A) 与混合对照品 (B) HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC graph of sample (A) and reference substance (B)

2.3.4 线性关系考察 将稀释后不同质量浓度的对照品溶液按“2.3.3”项条件分析, 将各化合物的质量浓度与峰面积线性回归, 得各对照品的回归方程、线性范围和相关系数, 线性关系良好, 具体见表 2。

表 2 对照品线性关系数据

Table 2 Reference standard linear relationship data

对照品	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
没食子酸	$Y=5.099\ 2\ X-3.255\ 0$	6.30~422.10	0.999 8
儿茶素	$Y=1.196\ 4\ X-1.957\ 8$	31.00~217.00	0.999 6
二氢杨梅素	$Y=3.925\ 8\ X-6.010\ 6$	109.00~6 104.00	0.999 9
芦丁	$Y=2.562\ 4\ X+0.328\ 2$	7.00~392.00	0.999 7
杨梅苷	$Y=3.121\ 1\ X-0.477\ 9$	24.00~2 400.00	0.999 8
槲皮素	$Y=1.711\ 9\ X+59.007\ 0$	3.40~340.00	0.999 8
杨梅素	$Y=5.006\ 4\ X-80.707\ 0$	26.00~260.00	0.999 5
二氢槲皮素	$Y=13.073\ 0\ X-190.400\ 0$	14.00~112.00	0.999 3
芹菜素	$Y=4.356\ 8\ X-4.888\ 3$	1.60~160.00	0.999 8
山柰酚	$Y=5.138\ 2\ X-12.243\ 0$	3.40~265.20	0.999 2

2.3.5 精密度试验 称取样品 (S3), 按“2.3.2”项操作制备样品溶液, 按“2.3.3”项色谱条件重复进样 6 次, 记录各共有峰的峰面积。计算出各峰面积的 $\text{RSD}<2.00\%$, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 称取 S3 样品, 按“2.3.2”项制备样品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时吸取样品溶液 20 μL , 按“2.3.3”项色谱条件进样, 记录各峰面积。计算出各峰面积 $\text{RSD}<2.00\%$, 表明样

品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 称取 6 份 S3 样品, 分别按“2.3.2”项制备样品溶液, 按“2.3.3”项色谱条件进样分析, 记录各峰面积。计算出各化合物质量分数的 $\text{RSD}<2.00\%$, 表明方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精确称取已知成分含量的大齿牛果藤叶粉末 6 份, 每份 0.05 g, 准确加入与样品中各成分质量相当的混合对照品溶液, 按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件测定，计算得到没食子酸、儿茶素、二氢杨梅素、芦丁、杨梅苷、槲皮素、杨梅素、二氢槲皮素、芹菜素、山柰酚的加样回收率分别为 102.09%、104.78%、98.42%、102.17%、100.29%、103.58%、101.94%、102.45%、99.63%、103.14%，RSD 值均小于 3%，表明各化合物加样回收率良好。

2.3.9 样品的测定 取 5 个样品的供试品溶液 20 μL 按“2.3.3”项下色谱条件进样，根据线性方程计算出各成分含量。

2.4 分析方法

对各性状求算术平均值和标准偏差，利用变异系数（CV）反映各性状的变异程度，CV 按以下公式计算。

$$CV = SD / \bar{x}$$

SD 代表标准偏差， $\bar{x}$ 代表平均值。

叶片形态性状采用双因素方差分析（ANOVA）和 LSD 多重比较，对总黄酮和活性成分采用单因素方差分析，LSD 多重比较分析总黄酮和活性成分含量的差异。以上数据统计、分析和绘图使用 Excel 2019、SPSS 22.0 和 Origin2021 软件。

3 结果与分析

3.1 牛果藤属植物叶形态多样性

5 种牛果藤属植物叶、茎形态特征如图 2-a。结果表明，5 种牛果藤属植物叶性状差异明显。S1、S4 和 S5 为一回羽状复叶，S3 与牛果藤 S2 通常是一回或两回复叶；S1 与 S2 小叶叶型更接近椭圆形，S4 的小叶形状更接近卵圆形，小叶形态和大小因着生位置而异；各物种成熟叶的叶缘锯齿有差异，S3



a-茎、叶形态；b-牛果藤叶缘锯齿；c-大齿牛果藤皮孔。
a-stem and leaf morphology; b-leaf serration of *N. cantoniensis*; c-skin pore of *N. grossedentata*.

图 2 牛果藤属植物茎、叶形态

Fig. 2 Morphology of stems and leaves of *Nekemias*

叶缘锯齿最明显（图 2-b），S2 次之，其余物种叶缘无明显锯齿。小叶面积最大的是 S4，S1 次之。各物种茎表皮均有皮孔，以 S3 最明显（图 2-c），茎表皮颜色和皮纹存在差异，以 S3 皮色最浅，S5 最深；S4 和 S5 有明显纵皮纹，S3 无皮纹。

叶性状描述统计结果见表 3，可知，5 种牛果藤属植物复叶与小叶的 11 个形态性状均存在不同程度的变异。就物种复叶和小叶形态 CV 而言，S3 为 6.12%~11.88%、5.47%~13.81%，S4 为 6.94%~18.09%、5.75%~25.42%，S1 为 6.01%~37.77%、6.00%~19.05%，S5 为 10.63%~35.36%、17.76%~36.37%，S2 为 16.48%~38.57%、13.86%~28.03%，说明 S3 叶性状最稳定、可塑性小，S2 叶表型可塑性大、易受环境影响而发生中等变异（20%<CV<50%）。就单一性状而言，11 个性状除复叶叶柄长（CV 平均值为 26.094%）、小叶面积（CV 平均值

表 3 叶形态性状的描述性统计分析

Table 3 Descriptive statistical analysis of leaf morphological characters

编号	复叶长/mm		复叶宽/mm		复叶周长/mm		复叶面积/mm ²		复叶叶柄长/mm		小叶长/mm	
	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%
S1	118.40	6.01	101.40	11.37	731.25	30.18	5 364.68	16.48	13.74	37.77	78.84	6.00
S2	128.75	16.48	105.55	16.88	913.60	31.51	5 484.16	38.57	22.90	27.37	65.12	22.02
S3	155.09	6.12	112.66	7.69	1 051.55	9.04	7 063.63	7.81	16.71	11.88	76.06	6.64
S4	161.05	6.94	124.11	11.71	1 257.98	8.39	8 300.46	13.73	33.42	18.09	90.97	6.47
S5	154.95	10.63	136.86	10.79	1 257.98	17.09	9 109.54	19.42	16.58	35.36	62.11	21.32

编号	小叶宽/mm		小叶周长/mm		小叶面积/mm ²		小树叶柄长/mm		小树叶厚/mm	
	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%	平均值	CV/%
S1	31.62	8.35	164.26	7.70	1 350.47	14.76	14.17	8.14	0.14	19.05
S2	26.83	13.86	160.04	22.02	885.80	28.03	14.58	22.74	0.14	26.44
S3	30.43	5.47	155.20	9.70	1 059.34	13.81	15.52	6.04	0.15	6.98
S4	50.64	7.91	239.19	5.75	2 355.49	10.78	21.14	11.82	0.13	25.42
S5	27.93	25.83	140.31	18.44	1 045.98	35.24	11.35	36.37	0.13	17.76

为 20.524%) 发生中等变异外, 其他性状为弱变异 (CV 平均值<20%), 性状复叶长最稳定 (CV 平均值为 9.236%)。整体看来, 叶柄性状的 CV 大于叶大小性状, 复叶性状和小叶性状均属于弱变异。
牛果藤属植物 11 个表型性状 ANOVA 方差

分析结果如表 4 所示。除小叶厚度外, 其他性状均存在显著的种间差异。复叶性状以复叶长和复叶叶柄长的差异明显 ($F=18.01$ 、 21.97), 小叶性状以小叶面积和小叶宽的差异明显 ($F=54.28$ 、 52.11)。

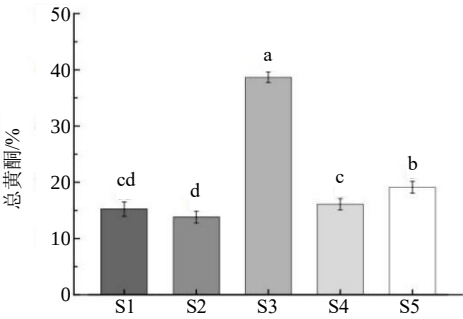
表 4 叶形态性状的方差分析
Table 4 Variance analysis of leaf morphological characters

编号	复叶面积/mm ²	复叶周长/mm	复叶长/mm	复叶宽/mm	复叶叶柄长/mm	小叶面积/mm ²
S1	5 364.68±884.18	731.25±220.72	118.40±7.11	101.40±11.53	13.74±5.19	1 350.47±199.38
S2	5 484.16±2115.04	913.60±287.92	128.75±21.21	105.55±17.82	22.90±6.27	885.80±248.25
S3	7 063.63±551.78	1 219.46±110.27	155.09±9.48	112.66±8.66	16.71±1.99	1 059.34±146.28
S4	8 300.46±1139.57	1 051.55±88.20	161.05±11.17	124.11±14.53	33.42±6.05	2 355.49±253.87
S5	9 109.54±1 769.5	1 257.98±214.93	154.95±16.47	136.86±14.77	16.58±5.86	1 045.98±368.57
<i>F</i>	13.89	12.08	18.01	10.92	21.97	54.28

编号	小叶周长/mm	小叶长/mm	小叶宽/mm	小叶叶柄长/mm	小叶叶厚/mm
S1	164.26±12.65	160.04±35.24	155.20±15.06	239.19±13.75	140.31±25.87
S2	78.84±4.73	65.12±14.34	76.06±5.05	90.97±5.89	62.11±13.24
S3	31.62±2.64	26.83±3.72	30.43±1.66	50.64±4.00	27.93±7.22
S4	14.17±1.15	14.58±3.32	15.52±0.94	21.14±2.50	11.35±4.13
S5	0.14±0.03	0.14±0.04	0.15±0.01	0.13±0.03	0.13±0.02
<i>F</i>	30.18	14.40	52.11	17.67	0.60

3.2 牛果藤属植物叶总黄酮含量差异性

5 种牛果藤属植物叶总黄酮含量及其差异分析结果表明 (图 3), 5 种牛果藤属植物叶总黄酮含量差异较明显, S3 叶总黄酮含量最高达 38.67%, S5 次之为 19.12%, 其次是 S4 为 16.10%, S1 叶总黄酮含量较低为 15.21%, 所有植物中以 S2 最低为 13.81%, S3 叶总黄酮含量为 S2 的 2.8 倍, S1、S4 和 S5 叶总黄酮含量较接近, 位于 15%~20%, S3 高的总黄酮含量进一步印证了其显著的药理作用。



不同字母表示差异显著 $P<0.05$ 。
Different letters indicate significant differences with $P<0.05$.

图 3 牛果藤属植物总黄酮含量差异
Fig. 3 Content of total flavonoids in *Nekemias*

3.3 牛果藤属植物叶活性成分差异性

方差分析显示, 10 种活性成分的种间差异显著 (表 5)。8 种黄酮类化合物, 以二氢杨梅素差异最显著 ($F=2 095.024$), S3 质量分数高达 204.743 mg/g, S2 为 67.985 mg/g, S4 为 8.286 mg/g, S1 仅为 3.225 mg/g, S5 最低 2.642 mg/g, 含量差异接近 78 倍; S4 中杨梅素质量分数高达 5.278 mg/g, S3 最低为 1.276 mg/g; S1 中杨梅苷质量分数高达 63.022 mg/g, S3 最低为 26.120 mg/g; 芦丁 S2 质量分数高达 7.176 mg/g, 二氢槲皮素 S2 质量分数高达 1.018 mg/g, 槲皮素 S5 质量分数高达 4.879 mg/g, 山柰酚 S5 质量分数高达 1.507 mg/g, 芹菜素 S3 质量分数高达 0.503 mg/g。此外, 酚类化合物没食子酸质量分数依次为 S1 (1.812 mg/g) > S2 (1.019 mg/g) > S3 (0.861 mg/g) > S5 (0.831 mg/g) > S4 (0.573 mg/g); 儿茶素差异小, 质量分数在 0.836~1.400 mg/g。结果表明, 二氢杨梅素、杨梅苷和杨梅素在各物种中占比较大, 是主要成分, 大齿牛果藤最富含黄酮类成分, 尤其是二氢杨梅素, 是藤茶加工的最理想基原植物。

4 讨论

林木受长期的环境压力下积累的变异稳定遗

表 5 牛果藤属植物 10 种活性成分含量的种间差异
Table 5 Interspecific differences in contents of 10 active components of *Nekemias*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	没食子酸	儿茶素	二氢杨梅素	芦丁	杨梅苷
S1	1.812±0.203Aa	0.875±0.047Aa	3.225±0.703Aa	0.361±0.030Aa	63.022±3.815Aa
S2	1.019±0.028Bb	1.271±0.092Aa	67.985±1.028Bb	7.176±0.307Bb	52.246±2.162Bb
S3	0.861±0.061Bbc	0.838±0.081Bb	204.743±7.211Cc	2.548±0.229Cc	26.120±1.072Cc
S4	0.573±0.010Bc	0.836±0.088Bb	8.286±0.666Cc	1.078±0.016Dd	30.262±0.690Dd
S5	0.831±0.038Cd	1.400±0.088Bb	2.642±0.105Cc	1.586±0.080Ee	38.621±1.936De

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	槲皮素	杨梅素	二氢槲皮素	芹菜素	山柰酚
S1	0.165±0.096Aa	1.903±0.067Aa	0.768±0.004Aa	0.455±0.022Aa	0.609±0.032Aa
S2	2.538±0.277Ab	2.237±0.030Bb	1.018±0.019Bb	0.313±0.012Bb	0.212±0.080Bb
S3	4.159±0.455Bc	1.276±0.004Cc	0.797±0.002BCb	0.503±0.0130Cc	0.224±0.013Cc
S4	1.301±0.029Cd	5.278±0.068Cc	0.790±0.002BCc	0.193±0.015Dd	0.119±0.000Cc
S5	4.879±0.455De	1.860±0.052Dd	0.773±0.002Cc	0.366±0.022Ee	1.507±0.057Cd

不同大写字母为 0.01 水平 ($P<0.01$), 不同小写字母为 0.05 水平 ($P<0.05$)。

Different capital letters indicate 0.01 level ($P<0.01$), different lowercase letters indicate 0.05 level ($P<0.05$).

传后产生新表型, 其表型变异在适应和进化上具有重要意义^[16]。表型多样性承载着遗传和环境的变异信息, 其形成和演化机制是生物多样性研究的关键问题之一。植物叶形态多样性一定程度取决于叶缘形态变异, 尤其是叶缘锯齿对环境的适应能力^[17-18]。本研究得出大齿牛果藤叶缘锯齿在同属植物中最明显, 可能是生长素在叶缘的不平衡积累促进锯齿产生^[19], 说明实际生产上大齿牛果藤具有更强的空间延伸可塑性, 能快速响应和竞争有限光源^[20], 抵抗水分和冷害胁迫^[21-22]。

CV 反映个体间差异, CV 越大, 性状离散程度越高, 表型多样性越丰富^[23]。牛果藤属植物复叶和小叶形态差异较大。复叶长、复叶宽、复叶周长和复叶面积以牛果藤变异程度最大, 复叶叶柄长以羽叶牛果藤变异程度最大 (CV 37.77%), 大齿牛果藤复叶性状最稳定, CV<10%, 与钟巧连等^[24]研究结果一致。叶性状变异种间大于种内, 可能是遗传和环境因素共同决定植物性状, 性状差异主要来源于遗传背景的差异, 而叶性状受到的遗传基因表达影响最明显^[25-26]。叶面积的 CV 显示大齿和大叶牛果藤的叶大小性状较稳定, 毛枝牛果藤最易受环境的影响而变异。

黄酮类化合物是牛果藤属植物的主要活性成分, 具有显著的抗氧化、活血化瘀、消炎止痛等药理作用。本研究发现该属植物总黄酮含量种间差异

明显, 牛果藤最低为 13.81 g/kg, 大齿牛果藤最高达 386.65 g/kg, 大齿牛果藤与张学英^[27]的报道 300~400 g/kg 近似, 高于雷华平等^[28]的结果。二氢杨梅素而言, 大齿牛果藤的含量占总黄酮的 52.95%, 高于同属植物, 进一步验证了凌伟红等^[15]与张朝阳等^[29]的结论。究其原因, 一是产地、采收季节和采用部位影响化合物的形成和积累^[28, 30-31]; 二是物种的遗传因素和外界环境决定化合物种类和含量高低, 特征组份差异直接反映物种亲缘关系^[32]。牛果藤属植物资源丰富, 民间药用历史悠久。大叶牛果藤在甘肃、陕西、湖北、四川、贵州等地均有分布^[2]。湖北西部、四川等地习用其叶及嫩茎加工成“霉茶”饮用, 具有清热利湿、活血化瘀等功效, 临床用于治疗高血压、头昏目胀等症。现代药理研究表明具有良好的降血压、心脏保护、保肝护肝、抗肿瘤、降血糖等作用^[33-34]。牛果藤为民间常用药材, 特别在江西、两广地区其茎叶常作为“藤茶”的主要品种饮用, 具有清热解毒、调血脂和降血压等功效^[35], 也有发现牛果藤茎叶提取物富含抗炎成分且用于炎症性疾病的化疗药物, 对柑橘溃疡病原菌抑菌效果较强, 有望开发为植物源杀菌剂^[36-37]。

杨梅素和杨梅苷的含量是羽叶牛果藤和牛果藤显著高于大齿牛果藤, 二者除具有抗氧化、抗炎和保护中枢神经系统活性等作用, 杨梅素抗肺癌活性显著, 杨梅苷降糖和抑制骨质疏松药理作用明显,

有望成为治疗阿尔茨海默症、肺癌、降血糖、骨质疏松的潜在候选药^[38-39]。总之,牛果藤属植物具有广阔的开发和应用前景,后续既要应用代谢组学和基因组学等现代分析手段深度开发大齿牛果藤,还要发掘和开发同属其他物种,将其作为替代资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曾铁鑫, 许利嘉, 宋颜君, 等. 蛇葡萄属药用植物亲缘学研究 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(6): 978-988.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 25 卷, 第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 23.
- [3] 何桂霞, 裴刚, 周天达, 等. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 423-425.
- [4] 张云坤, 李娟, 黄丹, 等. 中药藤茶化学成分及抗感染作用研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(6): 2012-2022.
- [5] Zeng T X, Song Y J, Qi S Y, *et al.* A comprehensive review of vine tea: Origin, research on *Materia Medica*, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116788.
- [6] Chapin F S III, Autumn K, Pugnaire F. Evolution of suites of traits in response to environmental stress [J]. *Am Nat*, 1993, 142: S78-S92.
- [7] Peppe D J, Lemons C R, Royer D L, *et al.* Biomechanical and leaf-climate relationships: A comparison of ferns and seed plants [J]. *Am J Bot*, 2014, 101(2): 338-347.
- [8] Yang D, Zhang Y J, Song J, *et al.* Compound leaves are associated with high hydraulic conductance and photosynthetic capacity: Evidence from trees in NorthEast China [J]. *Tree Physiol*, 2019, 39(5): 729-739.
- [9] 罗会英, 赵琼玲, 韩学琴, 等. 优良单株家系辣木叶的表型性状分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(2): 185-191.
- [10] 杨西萌, 李桂香, 潘玉芳, 等. 三叶木通种质资源形态学标记的遗传多样性分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2022, 44(9): 32-40.
- [11] 刘艳杰, 刘玉龙, 王传宽, 等. 东北温带森林 5 个羽状复叶树种叶成本-效益关系比较 [J]. 植物生态学报, 2023, 47(11): 1540-1550.
- [12] 张宸搏, 蒋丽娟, 陈景震, 等. 无患子种质资源树形和叶片表型多样性与皂苷含量分析 [J/OL]. 分子植物育种, 2023: 1-16. (2023-02-28). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230228.0927.004.html>.
- [13] 张学娟. 藤茶的形态学、生物学特性及主要化学成分研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [14] 张伟. 3 种叶型藤茶形态学特征及主要功能成分 [J]. 浙江农业科学, 2012, 53(7): 953-956.
- [15] 凌伟红, 陈燕, 冯淼, 等. 不同产地显齿蛇葡萄以及近缘种指纹图谱的建立及有效成分分析 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5725-5733.
- [16] Pigliucci M, Murren C J, Schlichting C D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation [J]. *J Exp Biol*, 2006, 209(Pt 12): 2362-2367.
- [17] 柯锦秀, 陈多, 郭延平. 植物叶缘形态的发育调控机理 [J]. 生物多样性, 2018, 26(9): 988-997.
- [18] 郑健, 潘继红, 余卫霖, 等. 植物叶缘锯齿调控的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(4): 927-936.
- [19] 李晓屿, Ralf Müller-Xing, Shahid Khan, 等. 植物叶缘锯齿发育的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(1): 50-56.
- [20] Semchenko M, Zobel K. The role of leaf lobation in elongation responses to shade in the rosette-forming forb *Serratula tinctoria* (Asteraceae) [J]. *Ann Bot*, 2007, 100(1): 83-90.
- [21] Sisó S, Camarero J, Gil-Pelegrín E. Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf *Quercus* species: A new interpretation of leaf lobation [J]. *Trees*, 2001, 15(6): 341-345.
- [22] Ledford H. The lost art of looking at plants [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 396-398.
- [23] 冯秋红, 史作民, 徐峥静茹, 等. 岷江柏天然种群种实表型变异特征 [J]. 应用生态学报, 2017, 28(3): 748-756.
- [24] 钟巧连, 刘立斌, 许鑫, 等. 黔中喀斯特木本植物功能性状变异及其适应策略 [J]. 植物生态学报, 2018, 42(5): 562-572.
- [25] 陈文, 王桔红, 马瑞君, 等. 粤东 89 种常见植物叶功能性状变异特征 [J]. 生态学杂志, 2016, 35(8): 2101-2109.
- [26] 胡勐鸿, 贾子瑞, 李青粉, 等. 云杉属 7 个种针叶性状种间和种内变异分析 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2529-2536.
- [27] 张学英. 显齿蛇葡萄叶代用茶总黄酮以二氢杨梅素计的试验验证 [J]. 湖南农业科学, 2021(5): 84-90.
- [28] 雷华平, 冯纪南, 任名新, 等. 不同季节的显齿蛇葡萄中二氢杨梅素和总黄酮的含量测定 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(1): 37-39.
- [29] 张朝阳, 秦邦, 马世龙, 等. 基于主成分分析和聚类分析的藤茶资源评价研究 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2023, 44(2): 138-146.
- [30] 吴佳, 叶文卉, 卢宗元, 等. 藤茶不同部位指纹图谱及其差异研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1507-1514.

- [31] 王淼, 覃洁萍, 奉艳花, 等. 不同炮制方法对藤茶中双氢杨梅素含量的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(17): 1548-1551.
- [32] Escribano-Bailon M T, Santos-Buelga C. Anthocyanin copigmentation - evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines [J]. *Curr Org Chem*, 2012, 16(6): 715-723.
- [33] 湖北省卫生局. 湖北中草药志-二 [M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1982: 1078-1080.
- [34] 桂春, 邹雪, 杨晓利, 等. 大叶蛇葡萄化学成分及药理活性研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2023, 25(2): 118-121.
- [35] 战宇, 宁正祥, 郑成. 粤蛇葡萄黄酮化化合物的纯化及其结晶形态研究 [J]. 食品科技, 2006, 31(3): 34-36.
- [36] Van Thu N, Cuong T D, Hung T M, *et al.* Anti-inflammatory compounds from *Ampelopsis cantoniensis* [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(3): 383-385.
- [37] 覃旭, 邓业成, 张明, 等. 粤蛇葡萄及几种杀菌药剂对柑橘溃疡病菌的抑菌活性 [J]. 农药, 2010, 49(8): 618-620.
- [38] 卢辉. 基于 Cu^{2+} 介导的杨梅素抗氧化、抗肺癌活性及其生理机制研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
- [39] 李建良. 杨梅苷对小鼠抗骨质疏松作用的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.

[责任编辑 时圣明]