

· 巴西草药研究专题 ·

基于显微—DNA 条形码—产地分析联用的 巴西柑橘属植物药 *FARINHA DE LARANJA* (枳壳) 基原鉴定研究

臧艺玫 顾选 余春霞 王娟 韩丽 吴浩忠 肖瑶 赵百孝 刘春生 马条华

【摘要】 目的 利用显微—DNA 条形码—产地分析联用的方法对巴西柑橘属植物药 *FARINHA DE LARANJA* 粉末进行基原鉴定研究。**方法** 应用显微鉴定的方法对药材粉末的基原进行初步判定;再提取样品 DNA, 扩增 ITS 序列, 利用 NCBI 数据库中的 BLAST 功能分析相似度, 对样品品种进行 DNA 条形码鉴定;最后结合产地信息对数据库中的序列进行筛选。**结果** 显微—DNA 条形码—产地综合分析结果表明, 该样品为芸香科柑橘属 *Citrus L.* 植物酸橙 *Citrus aurantium* 的干燥未成熟果实粉末。**结论** 巴西植物药 *FARINHA DE LARANJA* 的鉴定可为扩大枳实、枳壳等中药材的药资源提供依据。

【关键词】 柑橘属; 药材粉末; 基原鉴定; DNA 条形码

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.008

The variety identification of *FARINHA DE LARANJA* powder in Brazil based on a combined analysis of microscopic-DNA barcoding-origin ZANG Yi-mei, GU xuan, YU Chun-xia, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
Corresponding author: LIU Chun-sheng, E-mail: max_liucs@263.net

【Abstract】 Objective o study the variety identification of a kind of herbal powder of *FARINHA DE LARANJA* of *Citrus L.* in Brazil with a combined analysis of microscope - DNA barcoding - origin. **Methods** Microscopic identification was used to identify the variety of samples preliminarily; then ITS sequences were amplified by PCR and sequenced, and BLAST in NCBI database was used to calculate the similarity of sequences to identify variety of samples. , Finally, the DNA barcoding identification results were screened and analyzed according to its geographical origin information. **Results** The combined analysis of microscopic - DNA barcoding - origin indicated that *FARINHA DE LARANJA* collected from market in Brazil was the dried fruit powder of *Citrus aurantium*. **Conclusion** The identification of Brazil *FARINHA DE LARANJA* could enrich the alternative resources of Zhigiao and Zhishi.

【Key words】 *Citrus L.*; Powder; Varieties identification; DNA barcoding

植物药基原鉴定的基本方法包括植物文献学研究、产地调研、标本采集和实验室植物分类鉴定

等^[1],但对于粉末类药材,由于其植物形态特征大部分已被破坏,以上方法均难以实行。笔者在巴西市场收集药材样本时发现,一种名为 *FARINHA DE LARANJA* 的粉末类药材来源无法确定,因此有必要对该药材进行基原鉴定。

由于不同科、属植物的显微结构具有不同特征,故可利用显微鉴别的方法初步对药材粉末进行鉴定^[2];DNA 条形码技术具有准确、快速、能鉴别无背景信息物种的优点^[3-5],可对属内植物进行较为准确的鉴定;最后结合该属植物在产地的分布状况,可完成药材粉末的基原鉴定。本文拟采用显微-

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[臧艺玫(硕士研究生)、顾选、王娟、肖瑶、吴浩忠、刘春生、马长华], 针灸推拿学院(赵百孝);北京华邈中药工程技术开发中心(顾选);河南省药品审评认证中心(余春霞);中医养生学研究所[韩丽(硕士研究生)]

作者简介: 臧艺玫(1990-),女,2013级在读硕士研究生。研究方向:药用植物与分子生物学。E-mail:meiyee0810@sina.com

通讯作者: 刘春生(1964-),博士,教授,博士生导师。研究方向:药用植物与分子生物学。E-mail:max_liucs@263.net

DNA 条形码-产地分析联用的方法对 *FARINHA DE LARANJA* 粉末进行基原鉴定,以期为扩大柑橘属药用资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

FARINHA DE LARANJA 样品 10 份,每份 200 g, 2012 年 4 月购买于巴西隆城市市场药材集散地,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室。

1.2 试剂

广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德生物有限公司,批号:69632855)、rTaq 酶(上海生工生物工程有限公司,批号:695673BE)、乙醇(北京化工厂,批号:1124120381060079)、琼脂糖(BIOWEST,批号:142045)、ddH₂O 等。

1.3 仪器

显微镜(OLYMPUS CX-21,中国),SY-601 超级恒温水浴(天津欧诺仪器仪表有限公司),L-901 涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),JA1103N 千分之一精密电子天平, SIGMA 3K-15 低温高速离心机(SIGMA 公司),TECHNE TC-3000PCR 扩增仪,Bio-Rad 电泳仪,水平电泳槽(北京六一仪器厂),JS-680B 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),GRANT 制冰机,超纯水制备系统,KQ5200E 型超声波清洗器,SANYO-80℃ 超低温冰箱(SANYO 公司),DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.4 基于显微的鉴定方法

按照《中华人民共和国药典》(一部)^[6]中显微鉴定的方法,比较样品与中药材枳实显微特征的异同。

1.5 DNA 条形码鉴定方法

取 10 份样品,观察形态,形态结果一致。每份样品取 40 mg 进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉,按照广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒操作步骤提取样品 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 纯度及完整性。采用 ITS (internal transcribed spacer) 序列通用引物对样品进行 PCR 扩增,ITS-R: 5'-CGTAACAAGGTTTCCG-TAGGTGAA -3', ITS-F: 5'-TTATTGATATGCTTA-AACTCAGCGGG -3'。PCR 扩增条件:50 μL 体系含 2×Taq PCR MasterMix 25 μL, ITS-R (5 μmol/L) 2.5 μL, ITS-F (5 μmol/L) 2.5 μL, DNA 模板 4 μL, ddH₂O 16 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性

5 分钟,94℃ 变性 1 分钟,55℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟,35 个循环;72℃ 再延伸 10 分钟。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,条带单一明亮者即扩增成功。PCR 扩增产物经纯化后,送上海生工生物工程有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,以 TCGA/T 和 GACCC/TC 作为 ITS 序列边界截取 ITS 序列,然后利用相似度法分析序列。

根据 NCBI 中相似度搜索法(basic local alignment search tool, BLAST)功能,检索样品的 ITS 序列,本文以相似度 90% 以上为属的鉴定依据,以相似度 97% 以上的最高相似度物种为物种鉴定依据,获得鉴定结果。若 BLAST 比对后得到的序列相似度均在 97% 以下,则认为数据库中可能未注册该序列,此时,根据“DNA 条形码鉴定方法”仅能鉴定到属水平;该属中未注册序列的物种可能为鉴定结果。

1.6 基于产地分析的鉴定方法

根据“基于 DNA 条形码鉴定方法”项下获得的科、属和种的鉴定结果,依据《巴西植物志》记载的巴西分布的该属植物物种信息,依次分析最高相似度物种的产地是否相符合,如果符合,则为产地鉴定结果,继续进行下一项分析;如果不符合,则分析第二最高相似度物种,以此类推,分析直至相似度 97% 的物种。若相似度在 97% 以上的物种产地均与样品产地不相符合,则认为数据库未注册该样品序列,无法根据“基于产地分析的鉴定方法”准确鉴定到种水平。

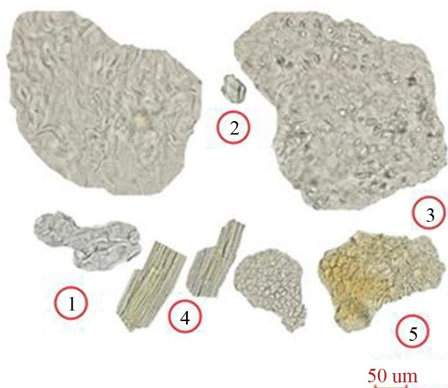
2 结果

2.1 *FARINHA DE LARANJA* 粉末的显微鉴定结果

FARINHA DE LARANJA 粉末的显微特征如下:粉末黄白色或浅黄色;中果皮细胞较多,类圆形或形状不规则,壁大多呈不规则增厚;草酸钙方晶存在于果皮和汁囊细胞中,呈斜方形、多面体形或双锥形,直径 3~30 μm;汁囊组织淡黄色或无色,细胞多皱缩,并与下层细胞交错排列;螺旋导管、网纹导管及管胞细小;果皮表皮细胞表面观多角形、类方形或长方形,见图 1、图 2。显微特征分析表明,本品粉末的显微特征与中药材枳壳基本相同^[7],而无枳实的“橙皮苷结晶、油室碎片”等显微特征,故初步判定该粉末的来源为柑橘属 *Citrus* L. 植物酸橙 *Citrus aurantium* 的干燥未成熟果实。



图 1 FARINHA DE LARANJA 的粉末图



1. 中果皮细胞 2. 草酸钙方晶 3. 汁囊组织
4. 导管 5. 果皮表皮细胞

图 2 FARINHA DE LARANJA 粉末的显微图

2.2 DNA 条形码鉴定结果

2.2.1 科属的鉴定 10 份样品的测序峰图良好, 测序结果一致, 选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后, 经 BLAST 检索, 样品与芸香科柑橘属 *Citrus* L. 植物相似度最高, 相似度范围为 90% ~ 100%, 与其他属相似度均低于 97%。因此, 该样品来自芸香科柑橘属 *Citrus* L. 植物。

2.2.2 种的鉴定 根据分子鉴定指标(相同物种相似度达到 97% 以上), *Citrus clementina* (XM006423861. 1, 100%)、*Citrus reticulata* (FJ641932. 1, 100%)、*Citrus sinensis* (JN681150. 1, 100%) 及 *Citrus aurantium* (AB456074. 1, 98%) 等植物可能为 FARINHA DE LARANJA 的基原, 其中, 最佳鉴定结果为 *Citrus clementina*。

2.3 基于产地分析的鉴定结果

《巴西植物志》记载柑橘属 7 种植物 *C. aurantium*、*C. decumana*、*C. limetta*、*C. limonum*、*C. medica*、*C. spinosissima* (未注册)、*Citrus vulgaris*, 根据 DNA 条形码鉴定结果, 最佳鉴定结果不在巴西分布, 在相似度 97% 以上的可能基原中, 只有 *Citrus aurantium* 在巴西生长, 且在巴西以果实入药, 因此, 根据产地分析, FARINHA DE LARANJA 的基原为芸香科柑橘属酸橙 *Citrus aurantium*。

3 讨论

粉末类的药材易于取用且冲泡便捷, 但由于性状特征不明显, 其真伪鉴别一直是植物药鉴定中的难点。显微鉴定是传统鉴定中的常用方法之一, 它能够对药用部位进行较为准确的判断, 但由于属内植物可能存在组织特征的相似性, 部分近缘种药材较难利用显微鉴别区分^[8]。DNA 条形码技术准确度更高, 且不依赖于药材形态及鉴定人员经验^[9], 更适用于粉末类药材的鉴定。DNA 条形码的序列分析主要依靠 NCBI 数据库中注册的序列, 还需根据本批药材的已知产地来源对数据库中的序列依次进行筛选, 最终结合入药部位确定最佳鉴定结果。

本文研究表明, 本次收集的 FARINHA DE LARANJA 药材的基原植物为芸香科酸橙 *Citrus aurantium* 的干燥未成熟果实, 与 2010 版《中华人民共和国药典》(一部) 中记载的枳壳基原植物相同。但其是否可被当做枳壳使用, 尚需对其主要化学成分进行含量测定及分析研究。

巴西是全世界柑橘属 *Citrus* L. 产品产量最大的国家, 酸橙作为柑橘属的一种, 产量也高于其他产地^[10-11]。因此, 中国可在巴西建立酸橙栽培基地, 适当的进口巴西酸橙幼果和未成熟果实, 进而扩大中药材枳实和枳壳的药用资源。

参 考 文 献

- [1] 康延国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 31.
- [2] 刘萌萌, 李峰. 显微鉴定新技术在中药材鉴定中的应用进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(12): 50-52.
- [3] 陈士林. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [4] 陈念, 赖小平. 通用中药 DNA 条形码鉴定系统的研究及应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(3): 331-336.
- [5] 张南平, 张文娟, 魏锋, 等. 中药 DNA 分子鉴别标准研究方法[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2066-2070.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 230-231.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典中药材显微鉴别彩色图鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 305.
- [8] 季峰. 浅谈中药的性状鉴定[J]. 国医论坛, 2006, 21(6): 48.
- [9] 程新玮, 赵焕新, 宁康, 等. DNA 条形码技术在中药质量评价中的研究进展[J]. 食品与药品, 2013, 15(4): 295-299.
- [10] Maria I R C, Mirtes C. Anxiolytic and Sedative Effects of Extracts and Essential Oil from *Citrus aurantium* L. [J]. Biol. Pharm. Bull., 2002, 25(12): 1629-1633.
- [11] 付陈梅. 柑桔果实品质和类黄酮的含量特征及橙汁掺假检测的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.

(收稿日期: 2015-08-22)

(本文编辑: 董历华)