

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202306001

彭晓祺, 吴文如, 来慧丽, 等, 2024. 凤眼果的生药学研究 [J]. 广西植物, 44(6): 1028–1041.

PENG XQ, WU WR, LAI HL, et al., 2024. Pharmacognostical study of *Sterculia monosperma* fruit [J]. *Guihaia*, 44(6): 1028–1041.

凤眼果的生药学研究

彭晓祺¹, 吴文如^{1*}, 来慧丽², 行冰楠¹, 陆亚茹¹, 邹何元¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510006)

摘要: 凤眼果具有温胃、杀虫等功效,其名称和性状易与苹婆属其他物种混淆,然而其相关研究基础比较薄弱。该研究对凤眼果性状、微性状、种子横切面及粉末显微特征进行观察;利用双向测序获取凤眼果 DNA 条形码序列 ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*, 计算 Kimura 2-Parameter (K2P) 遗传距离, 建立邻接系统进化树并进行聚类分析。结果表明: (1) 凤眼果性状特征为外被深红色果皮, 种子表面红褐色或暗栗色, 质硬, 内含浅黄色肥厚胚乳 2 片。 (2) 微性状特征为外种皮红褐色, 极薄, 质脆; 中种皮黑褐色, 较厚, 质硬; 内种皮浅黄色, 质软。 (3) 显微特征为外种皮石细胞结构和排列方式、中种皮栅状细胞结构、内种皮细胞壁呈连珠状增厚、草酸钙簇晶。 (4) 基于 ITS2 序列可将凤眼果与苹婆属其他植物有效区分, *matK* 序列可将假苹婆与苹婆属其他植物有效区分。该研究获取的凤眼果性状、微性状及显微特征数据, 结合 ITS2 条形码序列可有效鉴别凤眼果, 为其资源开发及质量标准制定提供了科学依据。

关键词: 凤眼果, 性状鉴别, 微性状鉴别, 显微鉴别, DNA 条形码

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2024)06-1028-14

Pharmacognostical study of *Sterculia monosperma* fruit

PENG Xiaoqi¹, WU Wenru^{1*}, LAI Huili², XING Bingnan¹, LU Yaru¹, ZOU Heyuan¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Sterculia monosperma* fruit is the dried and mature seed of *Sterculia monosperma*, which belongs to genus *Sterculia*. In China, this plant is a widely distributed arbor with a long planting history in Lingnan area. It is mainly cultivated in Guangdong, Guangxi, Fujian, Yunnan and Taiwan of China; it is also distributed in India, Vietnam and Indonesia, mostly cultivated artificially. *S. monosperma* fruit has many functions like warming the stomach and killing pests, but its name and characteristics are easily confused with other plants of genus *Sterculia*. However, the relevant research foundation is relatively weak. Pharmacognostical study can provide reference for its resource development and quality standard formulation. This study identifies the morphological and microscopic characteristics of *S. monosperma* fruit, as well as the microscopic identification of seed cross-section and powder. The DNA barcode sequences ITS2, *psbA-trnH*, *matK*

收稿日期: 2023-11-15 接受日期: 2024-01-24

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 广州中医药大学大学生创新创业训练计划项目(202310572342); 2020 年度广东省科技特派员项目(KTP20200137)。

第一作者: 彭晓祺(1998—), 硕士研究生, 主要从事中药品种鉴定与质量标准研究, (E-mail) PengXQ1020@163.com。

*通信作者: 吴文如, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药品种鉴定与质量标准研究, (E-mail) wuwenru@gzucm.edu.cn。

and *rbcL* of *S. monosperma* were obtained through bidirectional sequencing, Kimura 2-Parameter (K2P) genetic distance was calculated, and the neighbor joining tree was established for clustering analysis. The results were as follows: (1) The morphological characteristics of *S. monosperma* fruit included dark red fruit shell and reddish brown or dark chestnut surface. It was hard in texture, with two thick yellowish endosperms inside. (2) The micro-morphological characteristics was that the exotesta was reddish brown, extremely thin, and brittle in texture; the mesotesta was black brown, thick, and hard in texture; the endotesta coat was light yellow and soft in texture. (3) The microscopic characteristics included the structure and arrangement of the exotesta stone cell, the grid cell structure of the mesotesta, the bead thickening of the cell wall of the endotesta cells, and the calcium oxalate cluster crystals. (4) Based on the ITS2 sequence, *S. monosperma* fruit could be effectively distinguished from other plants in genus *Sterculia*, while the *matK* sequence could effectively distinguish *S. lanceolata* from other plants in genus *Sterculia*. This study obtained the data on the morphological characteristics, micro-morphological characteristics and microscopic characteristics of *S. monosperma* fruit. Combined with the ITS2 barcode sequence, *S. monosperma* fruit can be effectively identified, which provides a scientific reference for the development of its germplasm resources and the formulation of relevant quality standards.

Key words: *Sterculia monosperma* fruit, morphological identification, micro-morphological identification, microscopic identification, DNA barcode

凤眼果为梧桐科 (Sterculiaceae) 苹婆属 (*Sterculia*) 植物苹婆 (*Sterculia monosperma*) 的干燥成熟种子, 别名为九层皮、苹婆果、频婆果、罗望子、罗晃子、七姐果、富贵子等 (江苏新医学院编, 1985)。凤眼果始载于宋代范成大 (1986) 的《桂海虞衡志》中, 记曰: “罗晃子, 如橄榄, 其皮七重。”《中华本草》第 5 卷 (1998) 将凤眼果列入草药品种, 有温胃, 杀虫的功效, 主治翻胃吐食、虫积腹痛、疝痛、小儿烂头疮等病症。现代研究表明, 凤眼果中含有大量抗氧化活性强的多酚类物质 (Zhang et al., 2018), 具有抗氧化等药理作用。凤眼果体积较大, 直径为 2.0~2.5 cm, 每蓇葖内含 1~5 粒, 种子可食部分占 82%, 营养丰富 (王达明, 2002)。

苹婆是中国的岭南地区分布较多、种植历史较久的乔木, 在广东、广西南部、福建东南部、云南南部、台湾、广州附近和珠江三角洲多有栽培; 印度、越南、印度尼西亚也有分布, 多为人工栽培 (中国科学院中国植物志编委会, 1984)。凤眼果原植物苹婆与同科属的假苹婆 (*S. lanceolata*)、西蜀苹婆 (*S. lanceaefolia*)、膜萼苹婆 (*S. hymenocalyx*) 等名称相似, 极易混淆, 其中假苹婆是苹婆属中分布最广和数量最多的一种 (苏雨苗等, 2019), 其种子不能入药。因此, 需要一种更加客观、准确的鉴定方法对传统鉴定手段进行补充。

DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术, 是传统形态鉴别方法的有

效补充 (陈士林等, 2013)。其中植物类中药材选用 ITS2 为主体序列, *psbA-trnH* 为辅助序列 (Chen et al., 2010), 符合中药材鉴定简单、精确的特点, 有明确的判断标准, 能够实现对中药材及其基原物种的准确鉴定。目前, 国家标准或文献尚无凤眼果生药学特征的描述, 亦无凤眼果相关质量标准。此外, 凤眼果与苹婆属近缘种的亲缘关系尚不明确, 暂未见适用于凤眼果分子鉴定的 DNA 条形码相关报道, 不利于实际鉴定工作开展和种质资源的开发利用。

鉴于此, 本研究从生药学的角度对凤眼果的性状、微性状及组织显微特征进行系统研究, 采用显微正常光和偏振光对其显微鉴别特征进行观察, 以补充和完善凤眼果性状鉴别特征及显微鉴别全息彩色影像数据, 并基于 4 种通用 DNA 条形码序列 (ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 序列) 对 7 种梧桐科苹婆属植物进行聚类分析, 探讨凤眼果与苹婆属其他植物的亲缘关系, 筛选适用于鉴定凤眼果基原物种的 DNA 条形码, 为建立和完善凤眼果的质量标准, 促进资源开发提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药材和序列 样品分别来自广东和广西 (表 1), 经广州中医药大学中药鉴定学教研室吴文如教授鉴定分别为梧桐科苹婆属植物苹婆 (*S.*

monosperma) 的干燥成熟种子和新鲜树叶、梧桐科苹婆属假苹婆 (*S. lanceolata*) 的新鲜树叶。样品存放于广州中医药大学中药材真伪鉴定及品质评价实验室, 4 °C 冰箱保存。

从 GenBank 数据库下载苹婆属条形码序列, 共整理苹婆与假苹婆、短柄苹婆、非洲丽苹婆、家麻树、膜萼苹婆等易混淆品的 92 条有效条形码序列(表 2)。

表 1 苹婆和假苹婆样品信息

Table 1 Sample information of *Sterculia monosperma* and *Sterculia lanceolata*

序号 No.	编号 Code	样品名 Sample name	采集部位 Sampling part	采集地 Sampling site	采集时间 Sampling time
1	PP1	苹婆 <i>S. monosperma</i>	干燥成熟种子 Dry mature seed	广东省清远市 Qingyuan City, Guangdong Province	2022-09-03
2	PP2	苹婆 <i>S. monosperma</i>	干燥成熟种子 Dry mature seed	广西壮族自治区南宁市 Nanning City, Guangxi Zhuang Autonomous Region	2022-10-10
3	PP3	苹婆 <i>S. monosperma</i>	新鲜树叶 Fresh leaf	广东省广州市 Guangzhou City, Guangdong Province	2022-10-04
4	JPP1	假苹婆 <i>S. lanceolata</i>	新鲜树叶 Fresh leaf	广东省广州市 Guangzhou City, Guangdong Province	2022-10-23

1.1.2 试剂 水合氯醛(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司);稀甘油(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司);离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];6×DNA 上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司);DNA 分子量标准(100~2 000 bp)[生工生物工程(上海)股份有限公司];琼脂糖(北京兰杰柯科技有限公司);50×TAE 电泳缓冲液(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);DNA Gel Stain(美国 GpBio 公司);Ex Taq(Premix) PCR 体系[宝日生物技术(北京)有限公司];引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.1.3 仪器 S120 佳能数码相机(日本 Canon 公司);CryoStar NX50 冷冻切片仪(美国 Thermo Scientific 公司);SZ680 连续变倍体视显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司);OPTEC BK5000 生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司);OPTPro3 数码摄像系统(重庆奥特光学仪器有限责任公司);XS125A 电子分析天平[普利赛斯国际贸易(上海)有限公司];HH-24 数显恒温水浴锅[欧莱德科学仪器(北京)有限公司];1-14 台式高速离心机(德国 Sigma Zentrifugen 公司);RePure-B 梯度 PCR 仪(上海创萌生物科技有限公司);JS-2012 凝胶成像仪(上海培清科技有限公司);Power Pac Basic 水平电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);D1008E 掌上离心机(美国 Scilogex 公司);

VORTEX 1 涡旋振荡器[艾卡(广州)仪器设备有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 性状鉴别 取凤眼果样品,从形状、大小、不同部位颜色、表面特征、质地、气味等方面对其种皮和胚乳进行系统观察,利用高清数码相机记录影像数据。将获得的照片在 Adobe Photoshop 2022 软件上作进一步的放大、抠图、拼接等处理,获取全息彩色影像数据。

1.2.2 微性状鉴别 取凤眼果样品,置于体视显微镜下,调节光源的亮度、粗准焦螺旋直至画面清晰,观察记录凤眼果的种皮结构以及每层种皮的微性状特征,获取全息彩色影像数据。

1.2.3 显微鉴别

1.2.3.1 种子横切面显微鉴别 取凤眼果样品,用冷冻切片仪切取种皮横切面,进行水合氯醛透化制片,在生物显微镜下观察拍照,获取全息彩色影像数据。

1.2.3.2 粉末显微鉴别 将适量凤眼果样品充分研磨粉碎,过 60 目筛,取少许粉末,进行水合氯醛透化制片,置于生物显微镜中,在正常光明场和偏振光暗场下对比观察,采用大图影像拼接结合实时景深扩展成像技术进行拍摄,获取全息彩色影像数据。

1.2.4 DNA 提取、PCR 扩增和测序 取表 1 中的 4 个样品各约 100 mg,加液氮在研钵中充分研磨,置

表 2 苹婆及其混淆品 DNA 条形码序列登录号

Table 2 *Sterculia monosperma* and its adulterants DNA barcode sequence accession numbers

DNA 条形码 DNA barcode	种名 Species	GenBank 登录号 Accession number on GenBank
ITS2	苹婆 <i>S. monosperma</i>	MG730774.1、MG730773.1、MG730772.1、MG730771.1、AF460183.1
	假苹婆 <i>S. lanceolata</i>	MG730502.1、MG730501.1、MG730500.1、MG730499.1、MG730498.1、KR532580.1、KR532579.1、KR532578.1、KR532577.1、KR532576.1、KR532575.1、KP093001.1、AF460184.1
	短柄苹婆 <i>S. brevissima</i>	KR532571.1
	西蜀苹婆 <i>S. lanceaefolia</i>	KR532574.1、KR532573.1、KR532572.1
psbA-trnH	苹婆 <i>S. monosperma</i>	KR533990.1
	假苹婆 <i>S. lanceolata</i>	KR533992.1、KR533991.1、KR533989.1、KR533988.1、KR533983.1、KR533982.1、KR533981.1、KR533980.1、KR533978.1、KP095704.1、KP095703.1、HQ415485.1
	短柄苹婆 <i>S. brevissima</i>	KR533984.1
	西蜀苹婆 <i>S. lanceaefolia</i>	KR533987.1、KR533986.1、KR533985.1、KR533979.1
matK	假苹婆 <i>S. lanceolata</i>	MW934372.1、MW934371.1、HQ415311.1、KP093425.1、KP093424.1、KJ510944.1
	短柄苹婆 <i>S. brevissima</i>	KR531474.1、KR531473.1
	非洲丽苹婆 <i>S. africana</i>	JX517698.1
	家麻树 <i>S. pexa</i>	MW044167.1、MW044166.1
	膜萼苹婆 <i>S. hymenocalyx</i>	AB925021.1、AB925016.1、AB925008.1
	西蜀苹婆 <i>S. lanceaefolia</i>	KR531478.1、KR531477.1、KR531476.1、KR531475.1
	苹婆 <i>S. monosperma</i>	AY328187.1、KR530039.1
rbcL	假苹婆 <i>S. lanceolata</i>	MG896003.1、MG895977.1、MG895973.1、MG895972.1、AY082362.1、AY328186.1、HQ415135.1、KU853175.1、KR530038.1、KR530037.1、KR530036.1、KR530035.1、KR530034.1、KR530033.1、KR530032.1、KR530031.1、KR530030.1、KP094343.1、KP094342.1、KJ440044.1
	短柄苹婆 <i>S. brevissima</i>	KR530025.1、KR530024.1
	非洲丽苹婆 <i>S. africana</i>	JX572990.1
	家麻树 <i>S. pexa</i>	MT933897.1、MT933896.1
	膜萼苹婆 <i>S. hymenocalyx</i>	AB925649.1、AB925644.1、AB925636.1
	西蜀苹婆 <i>S. lanceaefolia</i>	KR530029.1、KR530028.1、KR530027.1、KR530026.1

于 1.5 mL 离心管中,用离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 的提取,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。ITS2、psbA-trnH、matK、rbcL 序列扩增所用引物及 PCR 反应条件见表 3。PCR 的反应体系为 50 μ L 扩增反应体系: Ex Taq (Premix) 25 μ L, 正反向引物各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min (退火温度见表 3)。空白对照以 ddH₂O 为模板。扩增产物在凝胶成像仪中观察并拍摄照片, 将电泳条带单一、清晰、明亮的 PCR 扩增产物送至北京六合华大基因科技有限公司广州测序部进行双向测序。

表 3 所用引物序列及相应 PCR 退火温度

Table 3 Sequences of primers and corresponding annealing temperature in PCR

DNA 条形码 DNA barcode	引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}$ C)
ITS2	1F	ATGCGATACCTGGTGTGAAT	59
	1R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
psbA-trnH	2F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	55
	2R	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	
matK	3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	52
	3R	ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC	
rbcL	4F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	55
	4R	GTAAATCAAGTCCACCRGC	

1.2.5 序列分析及物种鉴定 测序峰图采用 SeqMan 软件进行拼接校对,去除引物区和低质量区,剪切获得完整序列,结合 GenBank 数据库中获得的序列,采用 MEGA 11 软件进行 ClustalW 多序列比对,分析种内和种间遗传变异,计算 Kimura 2-Parameter (K2P) 遗传距离,建立邻接系统进化树 (neighbor joining tree, NJ 树),同时以 Bootstrap 自展支持率(1 000 次)重复检验各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 性状鉴别

凤眼果外被深红色果皮(图 1:A、B);种子呈椭圆形或纺锤形,长 2~3 cm,直径 1~2 cm,其先端钝圆,基部略尖(图 1:E);具黄白色的类圆形种脐(图 1:C);表面红褐色或暗栗色,微具光泽,有不规则干缩皱纹,质硬(图 1:D)。将凤眼果横剖后可见胚乳肥厚,2 片,浅黄色,广卵形,表面带有黏液(图 1:F)。气微,味淡。

2.2 微性状鉴别

凤眼果种皮可分为外种皮(图 2:A)、中种皮(图 2:B)和内种皮(图 2:C)3 层(图 2):外种皮红褐色,极薄,质脆,易脱落,表面有不规则干缩皱纹,微具光泽(图 3:A、B);中种皮黑褐色,较厚,质硬,表面有细密的不规则皱纹,不具光泽(图 3:C、D);内种皮浅黄色,质软,与中种皮易剥离,表面有一层透明薄膜(图 3:E、F)。

2.3 显微鉴别

2.3.1 种子横切面显微鉴别 获取凤眼果种子横切面显微图(图 4:A、B)凤眼果外种皮石细胞一列,类方形,排列紧密,外壁极厚,胞腔偏于内侧,内含棕色物,胞腔直径 20~30 μm ;下皮细胞 2~3 列,黄棕色,排列不规则(图 4:C);外种皮薄壁细胞数列,淡黄色,类圆形、类方形或不规则多角形,壁加厚不明显,胞腔较大,有的内含棕色物,横向长 50~60 μm ,径向长 30~40 μm (图 4:D);中种皮栅状细胞层由 2 列细胞镶嵌组成,浅黄色,胞腔含棕色物,径向长 280~300 μm (图 4:E);色素层细胞数列,排列不规则,细胞形状不规则,黄棕色,壁极厚(图 4:F);内种皮细胞类方形或多边形,壁呈连珠状增厚,径向长 10~15 μm (图 4:G);内种皮薄壁细胞数列,淡黄色,类方形、不规则多角形、类圆形,胞腔较大,偶见棕色物,横向长 60~80

μm ,径向长 40~50 μm (图 4:H)。

2.3.2 粉末显微鉴别 凤眼果粉末呈棕褐色。正常光明场下,中种皮栅状细胞表面观淡黄色,壁增厚,呈多角形,胞腔较小,类圆形或扁圆形(图 5:A);侧面观淡黄色,呈长柱形,栅栏状,长 280~300 μm ,胞腔内含黄棕色物(图 5:B)。外种皮石细胞表面观纺锤形、长方形或多角形,胞腔含棕色物,直径 12~18 μm ,壁不甚厚,排列紧密(图 5:D)。草酸钙簇晶直径 30~40 μm (图 5:E)。内种皮细胞类方形或多边形,壁呈连珠状增厚,直径 10~15 μm (图 5:G)。纤维细长,梭形,直径约 20 μm ,长约 400 μm ,常交错、镶嵌状排列(图 5:H)。非腺毛单细胞,长梭形,基部稍膨大,常破碎,完整者长约 150 μm ,胞腔含棕色物(图 5:J)。螺纹导管微木化,直径 12~16 μm ,长 140~160 μm (图 5:K)。梯纹导管微木化,直径 12~15 μm ,长 150~160 μm (图 5:L)。

偏振光暗场下,中种皮栅状细胞侧面观、草酸钙簇晶和纤维在暗视野中形态特征清晰,具有彩色光泽(图 5:C、F、I)。

2.4 Barcoding gap 检验

Barcoding gap 是指物种间 DNA 条形码序列的种间遗传变异明显大于种内变异,并在两者之间形成一个明显的间隔区(Meyer & Paulay, 2005)。ITS2 序列种内平均遗传距离为 0.012,种间平均遗传距离为 0.037;*psbA-trnH* 序列种内平均遗传距离为 0.138,种间平均遗传距离为 0.066;*rbcL* 序列种内平均遗传距离为 0.001,种间平均遗传距离为 0.015。由图 6 可知,这 3 个条形码序列种内和种间变异均有重叠,没有明显的 Barcoding gap,不适合用于凤眼果与易混淆品的鉴别。而 *matK* 序列种内平均遗传距离为 0.000 3,种间平均遗传距离为 0.528,种内遗传距离明显小于种间遗传距离,种间和种内变异没有重叠,明显分为两大部分,有显著的 Barcoding gap,有利于凤眼果与易混淆品的鉴别。计算 4 种序列的 Kimura 2-Parameter (K2P) 遗传距离(表 4)。

2.5 序列信息分析

表 1 中 4 个样品的 4 个条形码序列扩增成功率均为 100%,2 个样品的 ITS2 序列测序失败,测序成功率为 50%,*psbA-trnH*、*matK* 和 *rbcL* 序列的测序成功率均为 100%。将最终得到的 14 条序列,与从 GenBank 数据库下载的 92 条序列分组进



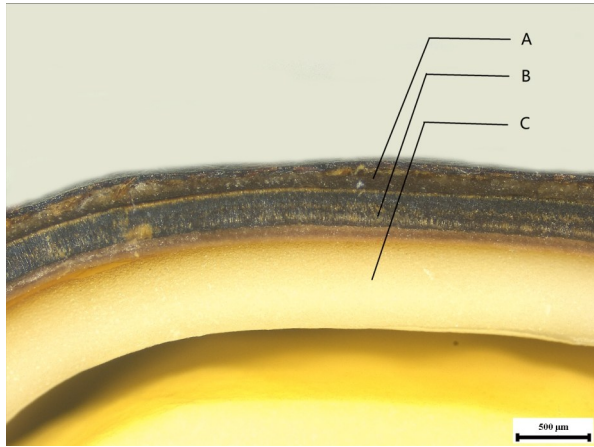
A. 整体观；B. 凤眼果果皮；C. 顶面观；D、E. 侧面观；F. 剖面观。
A. Overall view；B. *S. monosperma* fruit peel；C. Top view；D, E. Side view；F. Section view.

图 1 凤眼果性状特征图

Fig. 1 Morphological characteristics of *Sterculia monosperma* fruit

行多序列比对分析,获得序列特征信息(表 5)。4 组序列比对后的长度为 248~745 bp,由高到低依

次为 *matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*、ITS2, GC 平均量为 25.8%~74.4%,由高到低依次为 ITS2、*rbcL*、*matK*、



A. 外种皮; B. 中种皮; C. 内种皮。
A. Exotesta; B. Mesotesta; C. Endotesta.

图2 凤眼果种皮横切面微性状特征图

Fig. 2 Micro-morphological characteristics of cross-section of *Sterculia monosperma* seed coat

psbA-trnH。序列变异位点比例由高到低依次为 *matK*、*psbA-trnH*、*ITS2*、*rbcL*。变异位点和简约信息位点含量分别为 9.0%~57.4% 和 0.4%~57.3%，其中 *matK* 序列长度最长且变异和信息位点含量均为最高。

2.6 聚类分析

运用 MEGA 11 构建 NJ 系统发育树,以 Bootstrap 自展支持率(1 000次)重复检验各分支的支持率,枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。基于 *ITS2* 序列构建的 NJ 系统发育树(图 7:A)中,PP2 样品与苹婆序列单独聚为一个分支,可以与苹婆属其他植物区分,JPP1 样品与苹婆属其他植物聚为一个分支,无法区分;基于 *psbA-trnH* 序列构建的 NJ 系统发育树(图 7:B)中,4 个样品单独聚为一个分支,不能与苹婆属其他植物区分;基于 *matK* 序列构建的 NJ 系统发育树(图 7:C)中,JPP1 样品与假苹婆序列单独聚为一个小分支,苹婆属其他植物聚为一个分支;基于 *rbcL* 序列构建的 NJ 系统发育树(图 7:D)中,4 个样品单独聚为一个分支,不能与苹婆属其他植物区分。本研究结果表明,*ITS2* 序列可将凤眼果与苹婆属其他植物有效区分;*matK* 序列可将假苹婆与苹婆属其他植物有效区分;而 *psbA-trnH* 和 *rbcL* 序列中,凤眼果与假苹婆样品均聚为一个分支,无法与苹婆属其他植物区分开。

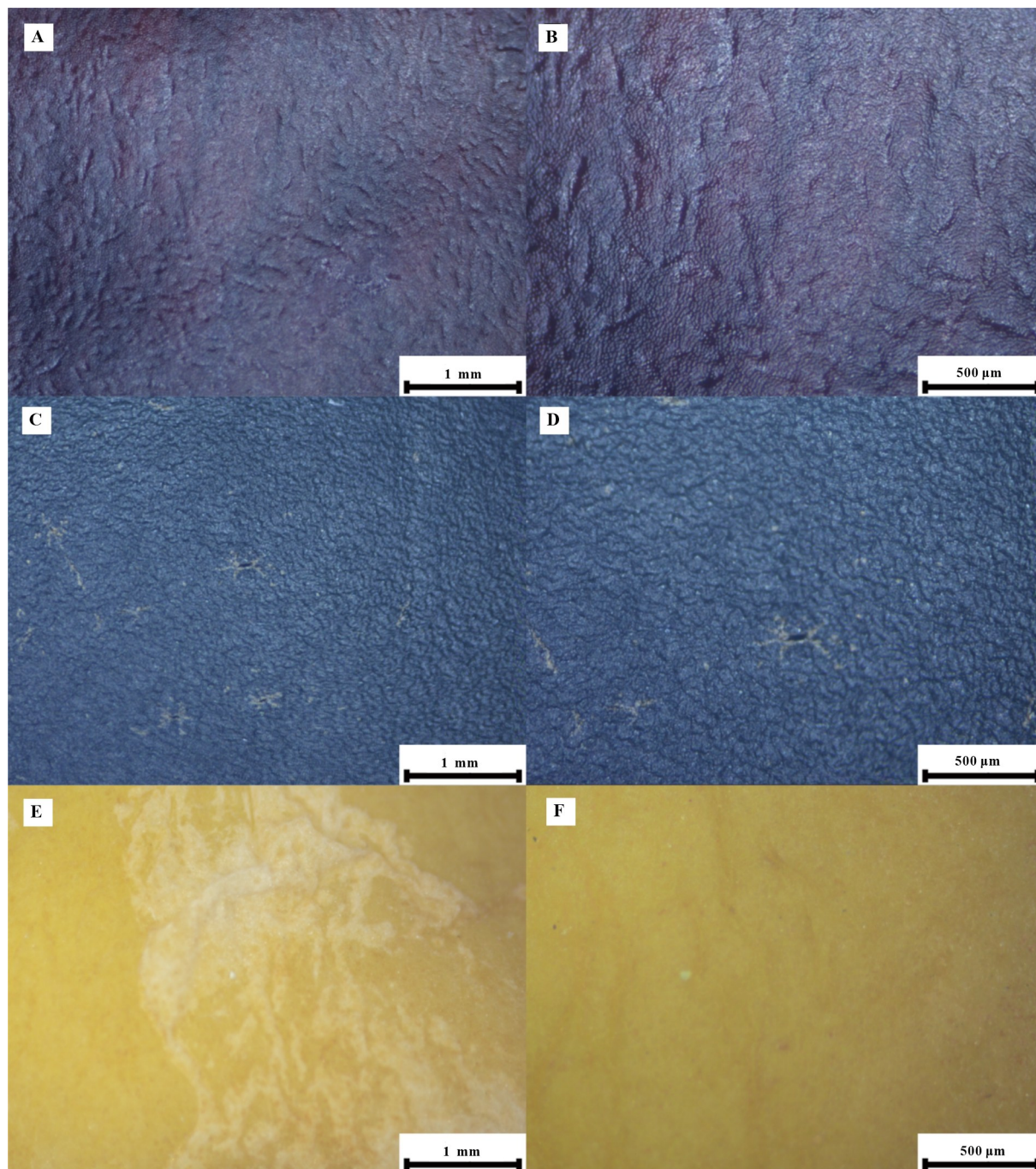
3 讨论与结论

3.1 凤眼果生药学研究

性状和显微鉴别方法在果实种子类中药的鉴别中具有重要意义。梁之桃等(2021)将高清数码成像、大图影像拼接和实时景深扩展成像等技术应用于中药鉴定,将中药的性状显微特征数码图像化,提升中药鉴别的准确性,有助于保障中药质量。本研究基于传统鉴别方法,结合以上技术,获取了凤眼果性状、微性状及显微鉴别特征的全息彩色影像数据,总结出具有鉴别意义的鉴别特征:以凤眼果表面红褐色或暗栗色,内含浅黄色肥厚胚乳 2 片为性状鉴别要点;以外种皮红褐色质脆、中种皮黑褐色质硬、内种皮浅黄色质软为微性状鉴别要点。确定了凤眼果粉末的显微鉴别特征,即外种皮石细胞、中种皮栅状细胞、内种皮细胞、草酸钙簇晶,可作为凤眼果粉末鉴别的重要依据。其中,中种皮栅状细胞和草酸钙簇晶在偏振光下具有彩色光泽,利用偏光镜可实现快速鉴别。

前人对于凤眼果原植物苹婆的生药学研究主要针对其非药用部位,苏雨苗等(2019)对苹婆和假苹婆 2 种植物的茎、叶进行原植物外观形态和显微特征的比较,发现它们在叶、花、茎横切面、叶表皮特征以及叶粉末上均有较大的不同之处。本研究对象凤眼果为苹婆种子,对其进行系统生药学研究,获取性状、微性状及显微鉴别特征,与前人研究结果互为补充。在进行种子横切面显微鉴别时,由于凤眼果体积比较大,其种皮层数较多且结构松散易分离,使用传统的徒手切片和石蜡切片法难以得到完整的、较薄的标本。因此本研究采用冷冻切片法,样品进行固定脱水后,固定于包埋剂在冰冻切片机进行切片。凤眼果新鲜样品可以直接取材后,迅速置于包埋托上,涂包埋剂后进行速冻,立即切片,可得到约 5 μm 厚度的完整种子横切面。此方法避免了石蜡包埋浸蜡不完全导致样品破碎的缺点,简化了切片的流程,从而获得完整清晰的种子横切面微性状和显微特征图片,观察到各层种皮的完整结构。同时,此实验方法也可用于其他体积较大的果实种子类中药的显微观察。

凤眼果别名“九层皮”,该名最早见于明代王济(1936)的《君子堂日询手镜》,书中写道:又有



A, B. 外种皮；C, D. 中种皮；E, F. 内种皮。

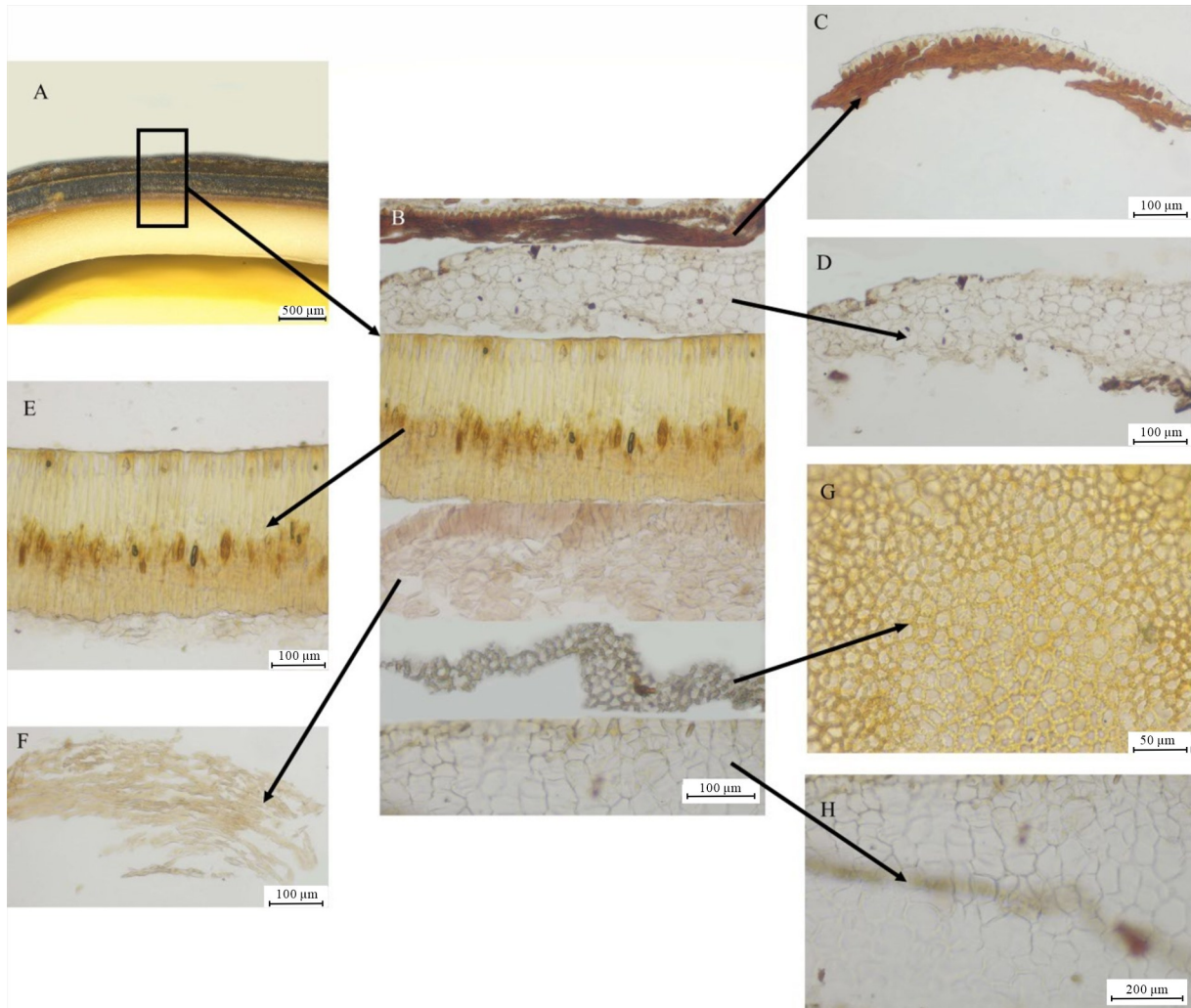
A, B. Exotesta; C, D. Mesotesta; E, F. Endotesta.

图 3 凤眼果种皮表面微性状特征图

Fig. 3 Micro-morphological characteristics of the surface of *Sterculia monosperma* seed coat

名九层皮者，脱至九层方见肉，熟而食之，其味类栗。而宋代范成大(1986)则认为凤眼果种皮有七层：“罗晃子，如橄榄，其皮七重。”可见前人虽然观

察到凤眼果种皮有多层，但历代本草中关于凤眼果性状特征的记载并不统一，使后人在性状鉴定方面存在一定困惑。由于凤眼果种皮质硬、难以分离，



A, B. 种子横切面; C. 外种皮石细胞层及下皮细胞层; D. 外种皮内侧薄壁细胞层; E. 中种皮外侧栅状细胞层; F. 色素层; G. 内种皮细胞层; H. 内种皮内侧薄壁细胞层。

A, B. Seed transverse sections; C. Exotesta stone cell layer and lower testa cell layer; D. Exotesta inner parenchyma cell layer; E. Mesotesta outer grid cell layer; F. Pigment layer; G. Endotesta cell layer; H. Endotesta inner parenchyma cell layer.

图 4 凤眼果种子横切面显微特征

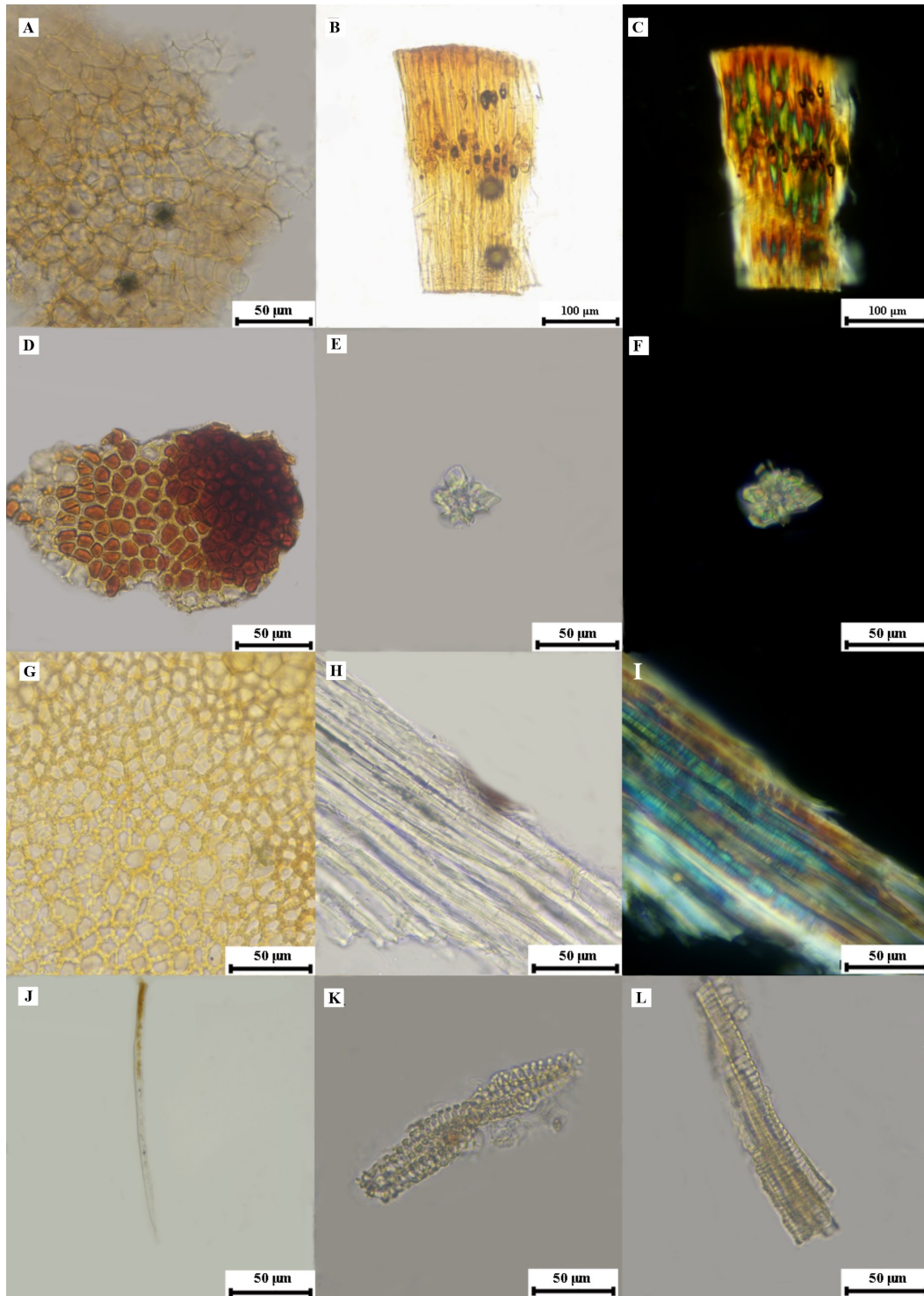
Fig. 4 Microscopic characteristics of cross-section of *Sterculia monosperma* seed

因此至今其种皮层数一直未得到验证。本文对凤眼果进行系统生药学研究,采用冷冻切片技术,结合生物显微镜观察到完整的种皮结构,发现凤眼果种皮实际可分为七层,为探讨本草记载中称凤眼果为“九层皮”的科学性提供参考。

3.2 凤眼果的 DNA 条形码分析

DNA 条形码鉴定方法与其他传统鉴定方法相比具有准确、客观、通用等优点,已应用于多种中药材的鉴定,包括系统进化(任瑶瑶等,2023)、分类鉴定(涂国章和张显强,2023)、亲缘关系(乌仁

吉如拉等,2022)和遗传多样性(尹光耀等,2023)等方面。由于同一株植物不同取样部位的 DNA 条形码基因并无差异,因此 DNA 条形码研究使取样难度大大降低,即使同一株植物未能采集不同部位的样品(陈文强等,2021;蔡一鸣等,2022),仍能保证实验的科学性。本研究对 7 种苹婆属植物的 ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 序列进行了比较分析,并在此基础上对 7 种植物进行了聚类分析,探讨了 7 种植物的亲缘关系。本研究结果表明,单一使用 ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 序列并不能将



A. 中种皮栅状细胞表面观; B. 中种皮栅状细胞侧面观; C. 偏振光下中种皮栅状细胞侧面观; D. 外种皮石细胞表面观; E. 草酸钙簇晶; F. 偏振光下草酸钙簇晶; G. 内种皮细胞; H. 纤维; I. 偏振光下纤维; J. 非腺毛; K. 螺纹导管; L. 梯纹导管。
 A. Surface view of mesotesta grid cells; B. Side view of mesotesta grid cells; C. Side view of mesotesta grid cells under polarized light; D. Surface view of exotesta stone cells; E. Calcium oxalate cluster crystals; F. Calcium oxalate cluster crystals under polarized light; G. Endotesta cells; H. Fibers; I. Fibers under polarized light; J. Non-glandular hair; K. Threaded ducts; L. Ladder ducts.

图 5 凤眼果粉末显微特征

Fig. 5 Microscopic characteristics of *Sterculia monosperma* fruit powder

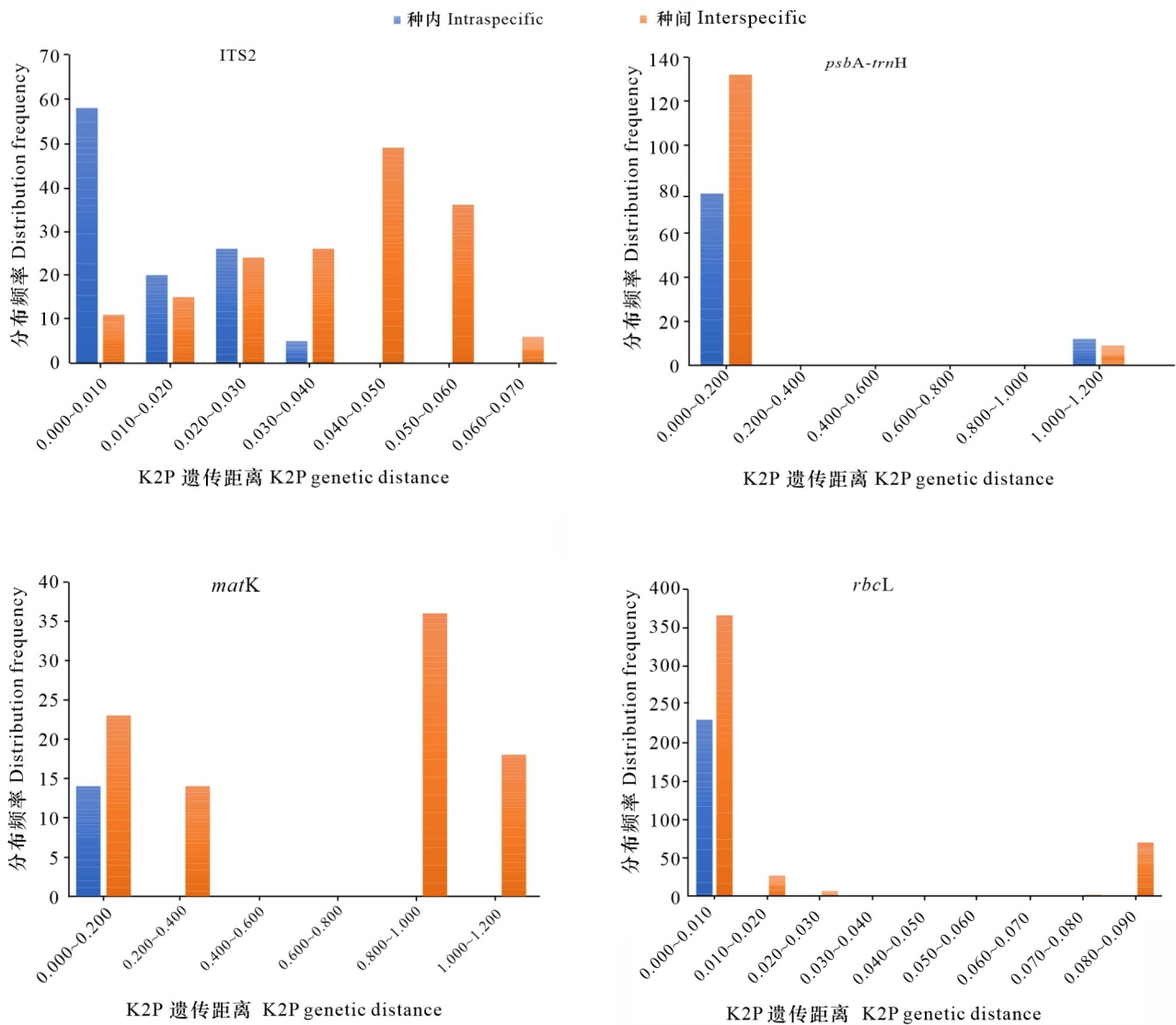


图 6 ITS2、*psbA-trnH*、*matK* 和 *rbcL* 序列的 Barcoding gap 图

Fig. 6 Barcoding gap histograms of ITS2, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcL* sequences

7 种植物全部鉴别出来,但能鉴别出部分植物。ITS2 序列可将凤眼果与苹婆属其他植物有效区分,*matK* 序列可将假苹婆与苹婆属其他植物有效区分,而 *psbA-trnH* 和 *rbcL* 序列中,凤眼果与假苹婆样品均聚为一个分支,无法与苹婆属其他植物区分开。ITS2 序列作为物种鉴定和系统发育研究中一种常用的标记物(Chen et al., 2010),该序列较短,在物种水平的变异较快,有更多的突变位点用于区分不同物种。综合研究结果,建议把 ITS2 序列作为凤眼果最适的 DNA 条形码用于分子鉴定。

本文通过对凤眼果进行系统的生药学研究,总结出凤眼果的性状、显微鉴别要点,筛选出 ITS2 序列为凤眼果分子鉴定的最佳 DNA 条形码,为建立和完善凤眼果的质量标准及促进资源开发提供了科学依据。

参考文献:

- CAI YM, DAI JP, ZHENG YX, et al., 2022. Screening of DNA barcoding sequences for molecular identification of *Uncaria* genus [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 53(6): 1828-1837. [蔡

表 4 基于 *matK* 序列各苹婆属植物间的 K2P 遗传距离
Table 4 K2P genetic distances between *Sterculia* species based on *matK* sequence

序列号 Sequence No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1. PP1																							
2. PP2	0.000																						
3. PP3	0.000	0.000																					
4. JPP1	0.004	0.004	0.004																				
5. KR531474.1	0.996	0.996	0.996	1.007																			
6. KR531473.1	0.996	0.996	0.996	1.007	0.000																		
7. JX517698.1	0.019	0.019	0.019	0.023	1.016	1.016																	
8. MW044167.1	0.232	0.232	0.232	0.234	1.074	1.074	0.228																
9. MW044166.1	0.232	0.232	0.232	0.234	1.074	1.074	0.228	0.000															
10. MW934372.1	0.006	0.006	0.006	0.001	1.000	1.000	0.025	0.239	0.239														
11. MW934371.1	0.004	0.004	0.004	0.000	1.006	1.006	0.024	0.239	0.239	0.001													
12. HQ415311.1	0.004	0.004	0.004	0.000	1.007	1.007	0.023	0.234	0.234	0.001	0.000												
13. KP093425.1	0.004	0.004	0.004	0.000	1.007	1.007	0.023	0.234	0.234	0.001	0.000	0.000											
14. KP093424.1	0.004	0.004	0.004	0.000	1.007	1.007	0.023	0.234	0.234	0.001	0.000	0.000	0.000										
15. KJ510944.1	0.004	0.004	0.004	0.000	1.007	1.007	0.023	0.234	0.234	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000									
16. AB925021.1	0.004	0.004	0.004	0.009	0.982	0.982	0.023	0.237	0.237	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009								
17. AB925016.1	0.004	0.004	0.004	0.009	0.982	0.982	0.023	0.237	0.237	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000							
18. AB925008.1	0.004	0.004	0.004	0.009	0.982	0.982	0.023	0.237	0.237	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000						
19. KR531478.1	0.996	0.996	0.996	1.007	0.000	0.000	1.016	1.074	1.074	1.000	1.006	1.007	1.007	1.007	1.007	0.982	0.982	0.982					
20. KR531477.1	0.998	0.998	0.998	1.009	0.000	0.000	1.019	1.073	1.073	1.004	1.009	1.009	1.009	1.009	1.009	0.984	0.984	0.984	0.000				
21. KR531476.1	0.996	0.996	0.996	1.007	0.000	0.000	1.016	1.074	1.074	1.000	1.006	1.007	1.007	1.007	1.007	0.982	0.982	0.982	0.000	0.000			
22. KR531475.1	0.994	0.994	0.994	1.005	0.001	0.001	1.014	1.072	1.072	0.999	1.004	1.005	1.005	1.005	1.005	0.981	0.981	0.981	0.001	0.002	0.001		

表 5 ITS2、*psbA-trnH*、*matK* 和 *rbcL* 的序列特征
Table 5 Characteristics of ITS2, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcL* sequences

项目 Item	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
序列数量 No. of sequences	24	22	22	38
原序列长度 Original sequence length (bp)	247~668	244~368	708~840	502~1 365
比对后序列长度 Aligned sequence length (bp)	248	256	745	499
保守位点数 No. of conserved sites (bp/%)	223(89.9)	112(43.8)	317(42.6)	453(90.8)
变异位点数 No. of variable sites (bp/%)	25(10.1)	138(53.9)	428(57.4)	45(9.0)
简约信息位点数 No. of parsimonious informative sites (bp/%)	15(6.0)	1(0.4)	427(57.3)	40(8.0)
GC 平均量 GC average content (%)	74.4	25.8	32.8	45.5
种内平均遗传距离 Intraspecific average genetic distance	0.012 0	0.138 0	0.000 3	0.001 0
种间平均遗传距离 Interspecific average genetic distance	0.037	0.066	0.528	0.015

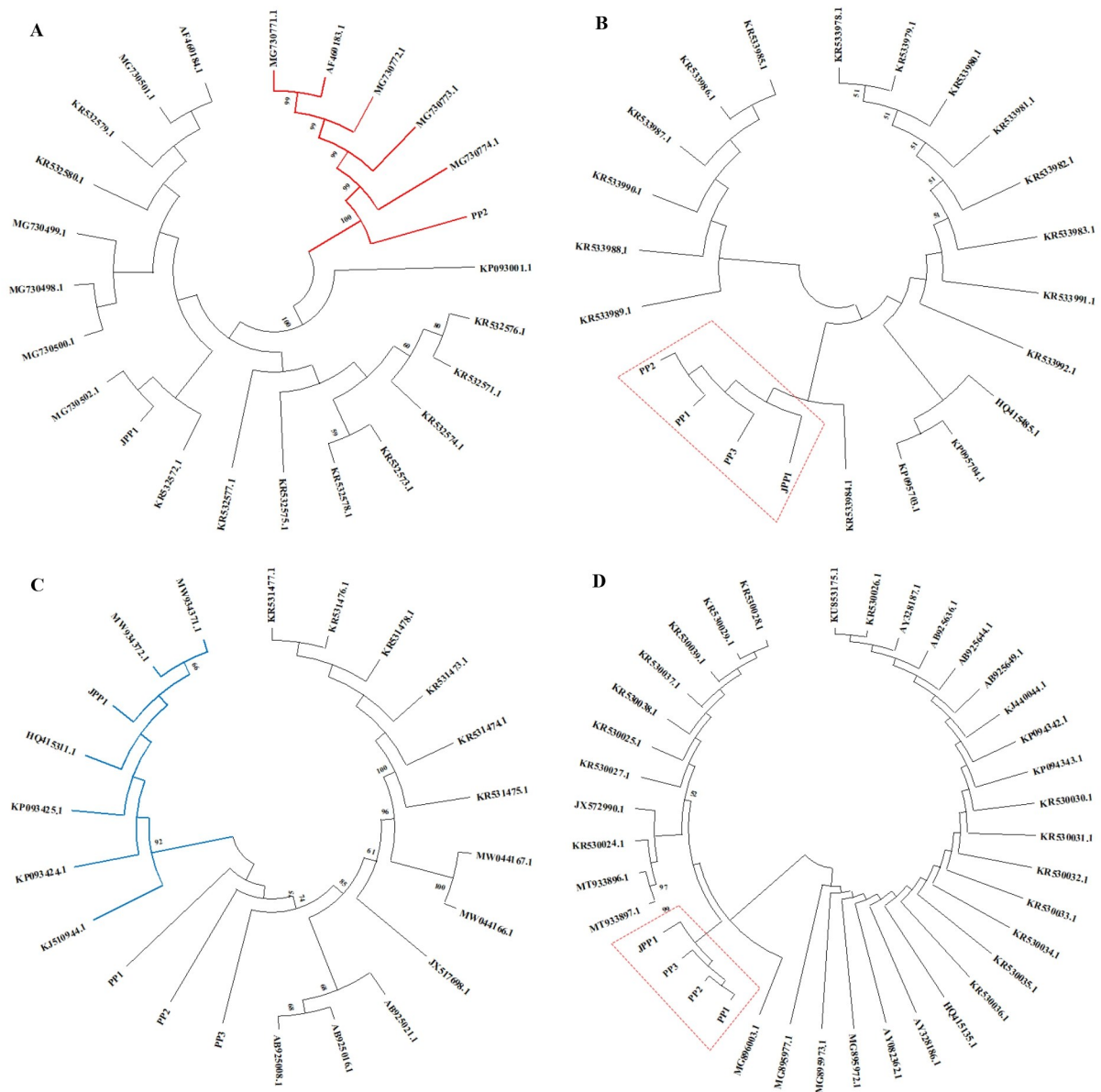


图 7 基于 ITS2 (A)、*psbA-trnH* (B)、*matK* (C) 和 *rbcL* (D) 序列构建的苹婆属植物 NJ 系统进化树

Fig. 7 NJ tree of *Sterculia* species based on ITS2 sequence (A), *psbA-trnH* sequence (B), *matK* sequence (C) and *rbcL* sequence (D)

一鸣, 代江鹏, 郑雨欣, 等, 2022. 钩藤属植物分子鉴定的 DNA 条形码筛选 [J]. 中草药, 53(6): 1828-1837.]

CHEN SL, YAO H, HAN JP, et al., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS ONE, 5(1): e8613.

CHEN SL, YAO H, HAN JP, et al., 2013. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. Chin J Chin Mat Med, 38(2): 141-148. [陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等, 2013. 中药材 DNA

条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 38(2): 141-148.]

CHEN WQ, WANG XF, CHEN XY, et al., 2021. Evaluation of the ability of different plant DNA barcodes to identify *Dendrobium officinale* [J]. Food Sci, 42(22): 131-139. [陈文强, 汪小福, 陈笑芸, 等, 2021. 不同植物 DNA 条形码对铁皮石斛鉴定能力的评价 [J]. 食品科学, 42(22): 131-139.]

Chinese Materia Medica Editorial Committee of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, 1998.

- Chinese materia medica: Vol. 5 [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers; 393-394. [国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1998. 中华本草: 第 5 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社: 393-394.]
- Editorial Committee of Flora of China Chinese Academy of Sciences, 1984. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 49 [M]. Beijing: Science Press; 121. [中国科学院中国植物志编委会, 1984. 中国植物志: 第 49 卷 [M]. 北京: 科学出版社: 121.]
- FANG CD, 1986. Gui Hai Yu Heng Zhi [M]. Nanning: Guangxi People's Publishing House; 84. [范成大, 1986. 桂海虞衡志 [M]. 南宁: 广西人民出版社: 84.]
- Jiangsu New Medical College, 1985. Dictionary of traditional Chinese medicine: Vol. 1 [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers; 490. [江苏新医学院编, 1985. 中药大辞典: 第 1 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社: 490.]
- LIANG ZT, LI XM, CHEN LJ, et al., 2021. Application and prospective usage of using digital images to describe morphological features accurately in the authentication of Chinese medicines [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 32(3): 631-636. [梁之桃, 李丽媚, 陈亮俊, 等, 2021. 应用数码图像精确描述性状特征在中药鉴定中的应用与展望 [J]. 时珍国医国药, 32(3): 631-636.]
- MEYER CP, PAULAY G, 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biol, 3(12): 2229-2238.
- REN YY, ZHENG Y, KE JW, et al., 2023. Validation studies of ITS2 sequence as DNA barcode to identify several Saxifragaceae [J]. Exp Technol Manage, 40(4): 20-24. [任瑶瑶, 郑颖, 柯家伟, 等, 2023. ITS2 序列作为 DNA 条形码鉴定几种虎耳草科植物的有效性研究 [J]. 实验技术与管理, 40(4): 20-24.]
- SU YM, CHEN SM, DU Q, et al., 2019. Identification of *Sterculia nobilis* Smith and *Sterculia lanceolata* Cav. [J]. J Guangzhou Univ Trad Chin Med, 36(3): 414-419. [苏雨苗, 陈诗敏, 杜勤, 等, 2019. 苹婆与假苹婆的比较鉴别研究 [J]. 广州中医药大学学报, 36(3): 414-419.]
- TU GZ, ZHANG XQ, 2023. Application progress of DNA barcoding technology in *Dendrobium* classification and identification [J]. J Food Saf Qual, 14(2): 154-160. [涂国章, 张显强, 2023. DNA 条形码技术在石斛分类鉴定中的应用进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 14(2): 154-160.]
- WANG DM, 2002. Tropical precious dried fruit — *Sterculia nobilis* fruit [J]. Yunnan For, 23(1): 18. [王达明, 2002. 热带名贵干果 —— 凤眼果 [J]. 云南林业, 23(1): 18.]
- WANG J, 1936. Jun Zi Tang Ri Xun Shou Jing [M]. Beijing: The Commercial Press; 14. [王济, 1936. 君子堂日询手镜 [M]. 北京: 商务印书馆: 14.]
- WURENJI RULA, JIN SJ, WUYH, et al., 2022. Identification of medicinal *Aconitum* species based on ITS2 sequences and analysis of genetic relationship [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 28(17): 157-163. [乌仁吉如拉, 金淑杰, 乌雅汉, 等, 2022. 基于 ITS2 序列的乌头属药材分子鉴定及亲缘关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 28(17): 157-163.]
- YIN GY, YUAN L, WANG X, et al., 2023. Screening of specific DNA barcode, identification of germplasm resources, and analysis of genetic diversity of *Atractylodes chinensis* [J]. Acta Pharm Sin, 58(6): 1693-1704. [尹光耀, 袁林, 王馨, 等, 2023. 北苍术特异性 DNA 条形码筛选、种质资源鉴定及遗传多样性分析 [J]. 药学学报, 58(6): 1693-1704.]
- ZHANG JJ, LI Y, LIN SJ, et al., 2018. Green extraction of natural antioxidants from the *Sterculia nobilis* fruit waste and analysis of phenolic profile [J]. Molecules, 23(5): 1059-1072.

(责任编辑 李 莉 王登惠)