基于时珍法的柑橘属药用物种鉴定研究

张娜娜[1], 甘雨桐[1], 辛天怡[1], 史志杰[1], 许文杰[1], 宋经元[1,2*]

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院, 药用植物研究所, 中药资源教育部工程研究中心, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193; 2. 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 柑橘属植物是世界上广泛种植的经济作物, 具有显著的药用价值和经济价值。然而, 由于柑橘属遗传背景高度复杂, 该属药用物种的准确鉴定面临挑战。本研究基于全基因组分析法 (analysis of whole-GEnome, AGE), 又称为时珍法, 对柑橘属15个物种的49个基因组进行生物信息学分析, 成功构建涵盖15个物种的候选特异靶标序列库, 各物种靶标序列数量主要集中在10 000～100 000条之间。从候选特异靶标序列库中为相应物种选取特异靶标序列, 并通过Sanger测序和CRISPR-Cas12a技术证实选取的特异靶标序列具有高度特异性, 可有效鉴定柑橘属药用物种。在此基础上构建基于时珍法的柑橘属近缘物种鉴定体系, 实现30份市售橘核药材及饮片的准确鉴定。本研究证明时珍法可用于柑橘属药用物种的准确鉴定, 突破传统鉴定方法的瓶颈, 有效解决柑橘属药用物种的鉴定难题, 为中药材质量控制和临床用药安全提供技术支撑。

关键词: 柑橘属; 时珍法; 生物信息学分析; 特异靶标序列; 药用物种鉴定

中图分类号: R931 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)05-1841-11

Analysis of whole-GEnome for medicinal species identification of *Citrus*

ZHANG Na-na[1], GAN Yu-tong[1], XIN Tian-yi[1], SHI Zhi-jie[1], XU Wen-jie[1], SONG Jing-yuan[1,2*]

(*1. Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing 100193, China*)

Abstract: *Citrus* plants are economically and medicinally important crops worldwide. However, due to the highly complex genetic background of the genus, the accurate identification of medicinal species within this genus remains a major challenge. In this study, we employed the analysis of whole-GEnome (AGE), also known as the Shizhen Method, to conduct bioinformatics analysis on 49 genomes from 15 *Citrus* species, successfully constructing a candidate species-specific target sequence library that covers these species. The number of specific target sequences per species predominantly ranges from 10 000 to 100 000. From this candidate library, species-specific target sequences were selected for the corresponding species. Their high specificity was subsequently verified using Sanger sequencing and CRISPR-Cas12a technology, which confirmed their efficacy in identifying medicinal *Citrus* species. Based on this foundation, we established an AGE-based identification system for closely related *Citrus* species, which enabled the precise authentication of 30 commercial samples of Citri Reticulatae Semen and its decoction pieces. This study demonstrates that the AGE can be used for the accurate identification of medicinal *Citrus* species, which breaks through the bottlenecks of traditional methods and effectively resolves the identification challenges. It thereby provides technical support for quality control of Chinese herbal medicine and

收稿日期: 2025-11-19; 修回日期: 2026-01-12.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2025-I2M-KJ-020).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833199, E-mail: jysong@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1377

clinical medication safety.

Key words: *Citrus*; analysis of whole-GEnome; bioinformatics analysis; specific target sequences; medicinal species identification

柑橘属 (*Citrus* L.) 系芸香科 (Rutaceae) 柑橘亚科 (Aurantioideae) 植物[1], 作为世界上最重要的经济作物之一, 在140多个国家和地区有种植, 广泛分布于热带、亚热带和温带地区[2]。中国是柑橘属植物的重要的起源地之一, 栽培历史悠久、品种繁多, 拥有丰富的野生和栽培种质资源[3]。柑橘属植物是重要的药食同源植物。已有大量研究表明, 柑橘属植物具有显著的药用价值, 功能成分主要包括类黄酮[4]、香豆素[5]、生物碱等[6], 具有抗氧化[7]、抗炎[8,9]、抗病毒[10]、抗癌[11]、降血压和降胆固醇[12,13]、预防糖尿病[14,15]、止咳化痰[16]、神经保护[17,18]等多种生物活性。2025年国家卫生部发布的最新《药食同源物品目录》显示, 代代花、佛手、香橼、陈皮、橘红和化橘红均来自柑橘属。

由于柑橘属存在广泛的杂交、无性繁殖以及形态多样性, 其近缘物种的准确鉴定面临挑战。目前, 柑橘属物种鉴定方法主要包括形态鉴定[19,20]、显微鉴定[21,22]、理化鉴定[23]以及分子鉴定[24-27]。Nurzaman等[28]基于形态学和解剖学数据对柑橘属7种植物进行表型分析, 未能有效区分 *C. reticulata* 'Dekopon'与 *C. sinensis* 'Sunkist', 数量有限的表型性状难以全面代表基因组水平的本质差异, 容易受到主观判断的影响, 进行物种鉴定时可能出现偏差。Wang等[29]应用广泛靶向代谢组方法区分 *C. reticulata* 'DHP'和 *C. reticulata* 'BZH', 但该方法依赖于UPLC-ESI-MS/MS等高端仪器和自建数据库, 设备昂贵, 对实验条件和技术人员要求严格, 且样本前处理步骤繁琐, 不易普及。以DNA条形码为代表的分子鉴定方法对近缘物种和存在广泛种内变异物种的鉴定同样存在挑战[24-26]。Yu[26]对6属柑橘类近缘植物的分子鉴定研究证实, 无论是单一片段 (ITS最佳, 鉴定率 < 60%) 还是多片段组合, 无法实现所有类群的完全区分。因此, 亟需开发一种能够克服现有方法的局限性、兼具高分辨率和高通量特性的新技术, 以解决柑橘药用物种鉴定的难题。

本团队创建基于全基因组分析的物种鉴定新方法——AGE法 (analysis of whole-GEnome), 又称为时珍法。该方法从物种全基因组寻找特异靶标序列, 精准识别特异靶标序列以实现物种的准确鉴定[30]。目前, 时珍法已成功应用于植物[31,32]、动物[33]、真菌[34-37]的近缘物种的鉴定, 具有快速、准确的特点。因此, 本研究拟将时珍法应用于柑橘属药用物种鉴定研究, 对柑橘属15个物种的49个基因组进行分析, 并对极具药用价值的中药材基原物种——柑橘 (*Citrus reticulata*)、柚 (*Citrus maxima*)、香橼 (*Citrus medica*)、甜橙 (*Citrus sinensis*)、温州蜜柑 (*Citrus unshiu*) 等11个近缘物种进行实验验证, 为解决柑橘属药用物种鉴定难题、柑橘种质资源科学管理等提供新的技术手段, 同时也为柑橘属药材混伪品鉴定提供新思路。

材料与方法

物种基因组信息 本研究共涉及柑橘属15个物种49个全基因组 (下载于2024年11月15日), 均下载自NCBI基因组数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), 详见表1。所用基因组由华中农业大学、Kazusa DNA Research Institute、University of California Riverside等机构发布。

实验材料 对应NCBI下载的基因组的柑橘属15个物种, 其中11个物种样品 (图1) 采自中国农业科学院国家果树种质重庆柑桔圃 (National *Citrus* Germplasm Repository Chongqing China, *Citrus* Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, CRI)。其余4个物种 *Citrus hindsii*、*Citrus glauca*、*Citrus nobilis* 和 *Citrus inodora* 由于种质资源限制未采集到样品。另自北京市、广东省、江西省、浙江省、湖南省和福建省等地购买市售橘核药材及饮片共30份, 详见表2。

试剂 50×TAE缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司); 2×Taq PCR Master Mix (北京艾德莱生物科技有限公司); BIOWEST琼脂糖 Agarose G-10 (北京艾普立邦科技有限公司); DNA Marker DL1000 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司]; PCR引物由天一辉远生物科技有限公司合成; DP305型天根植物DNA提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 成簇规律间隔短回文重复序列RNA (clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNA, crRNA) 和单链DNA (single strand DNA, ssDNA) 均由金斯瑞 (江苏) 有限责任公司合成。

仪器 PL203型电子天平 [梅特勒−托利多仪器 (上海) 有限公司]; Pad3-H型加热制冷型金属浴 [卡尤迪生物科技 (北京) 有限公司]; 5424R型台式高速冷冻离心机和5430R型台式高速冷冻离心机 (Eppendorf公司); DYY-8C型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 混合型震

Table 1 Genomic information of *Citrus* genus

Species	NCBI accession	Species	NCBI accession
Citrus australasica	GCA_029618575.1	*Citrus sinensis*	GCA_000695605.1
	GCA_029618585.1		GCA_018104345.1
	GCA_030449855.1		GCA_019143665.1
Citrus cavaleriei	GCA_002013975.2		GCA_019144155.1
	GCA_030448935.1		GCA_019144185.1
Citrus glauca	GCA_029633165.1		GCA_019144225.1
	GCA_029633175.1		GCA_019144245.1
Citrus hindsii	GCA_004802465.1		GCA_022201045.1
Citrus hongheensis	GCA_030448925.1		GCA_022201065.1
Citrus inodora	GCA_029618595.1		GCA_033030525.1
	GCA_029721495.1		GCA_033030535.1
Citrus kinokuni	GCA_033242385.1		GCA_038048705.1
	GCA_033242405.1		GCA_041890265.1
	GCA_033242425.1		GCA_041890275.1
Citrus mangshanensis	GCA_030449895.1		GCA_963573335.1
Citrus maxima	GCA_030448945.1		GCA_019144195.1
	GCA_002006925.1		GCA_018105775.1
	GCA_029641205.1		GCA_000317415.1
Citrus medica	GCA_002013955.2	*Citrus trifoliata*	GCA_018350135.1
Citrus nobilis	GCA_033242445.1	*Citrus unshiu*	GCA_002897195.1
	GCA_033242465.1		GCA_033242305.1
	GCA_033242485.1		GCA_033242325.1
Citrus reticulata	GCA_003258625.1		GCA_033242345.1
	GCA_036169575.1		
	GCA_036169605.1		
	GCA_964263685.1		

荡组织研磨仪 (莱驰公司, 德国); Nanodrop 2000C 分光光度计 (赛默飞科学有限公司, 美国)。

基因组 DNA 提取 使用天根植物 DNA 提取试剂盒 (DP305) 提取基因组 DNA, 用 Nanodrop 2000C 分光光度计测定 DNA 浓度, 加入适量 ddH_2O 稀释成等浓度的 DNA 母液, 于−20 ℃保存备用。

生物信息学分析构建物种特异靶标序列库 使用 AGE1.0 (注册号: 2025SR0250433) 将柑橘属 15 个物种 49 个基因组 (表 1) 分割为 25 bp 片段, 随后提取包含间隔序列相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 的序列 (以 TTTV 开头或 VAAA 结尾) 的片段 (V 代表 A, G 或 C)。随后, 进一步筛选出同时包含 A、G、C、T 四种碱基且不含多聚体 (poly) 结构的特异性靶标序列。对目标物种包含 PAM 序列的 25 bp 片段与分析范围内其他物种的包含 PAM 序列的 25 bp 片段进行比对, 选择除 PAM 序列外的 21 bp 与其他物种序列存在有 3 个以上核苷酸差异或 1 个插入缺失的序列, 从而构建柑橘属物种特异靶标序列库。

基于 BLAST 的候选靶标序列特异性验证 从特异靶标序列库中挑选特异靶标序列, 首先依据靶标在候选库中的频次高低依次选取。在 NCBI 非冗余核苷酸数据库中进行 BLAST 比对, 根据物种特异靶标序列的筛选原则: 一是目标物种特异靶标序列与其他物种相比没有比对到 PAM 序列; 二是除 PAM 序列外的 21-mer 与其他物种序列存在有 3 个核苷酸以上差异或 1 个插入缺失。根据 BLAST 比对结果, 保留符合筛选原则的靶标序列。通过 PCR 扩增及 Sanger 测序, 验证靶标序列是否存在于对应物种基因组中。在此基础上, 优先选择特异性扩增且测序质量较高的特异靶标序列, 进行后续的特异性验证。实际操作中, 只需找到一条特异靶标序列就能够实现物种鉴定的目的。

基于 Sanger 测序验证特异性靶标序列 使用 NCBI Primer-BLAST 工具 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) 设计靶标序列上下游特异性引物, 引物长度为 20～25 bp, T_m 值设定为 59 ± 2 ℃, GC 含量 45%～55%, 预期产物长度 200～600 bp。以柑橘属物种 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增反应体系均为 25 μL, 包括 2×Taq Master Mix 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol·L^{-1}) 各 1 μL, 基因组 DNA 2 μL (10 ng·μL^{-1}) 和灭菌双蒸水 8.5 μL。以等体积的灭菌双蒸水替代模板 DNA 设置阴性对照。扩增程序为 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s, 58 ℃, 30 s, 72 ℃, 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃, 10 min。配置 1.2% 琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增结果, 电泳条件为 120 V、30 min, 并与 DL1000 Marker 对比, 确定扩增目的条带的大小, 将扩增成功的 PCR 产物利用 ABI3730XL 测序仪进行双向测序。使用 CodonCode Aligner 10.0.3

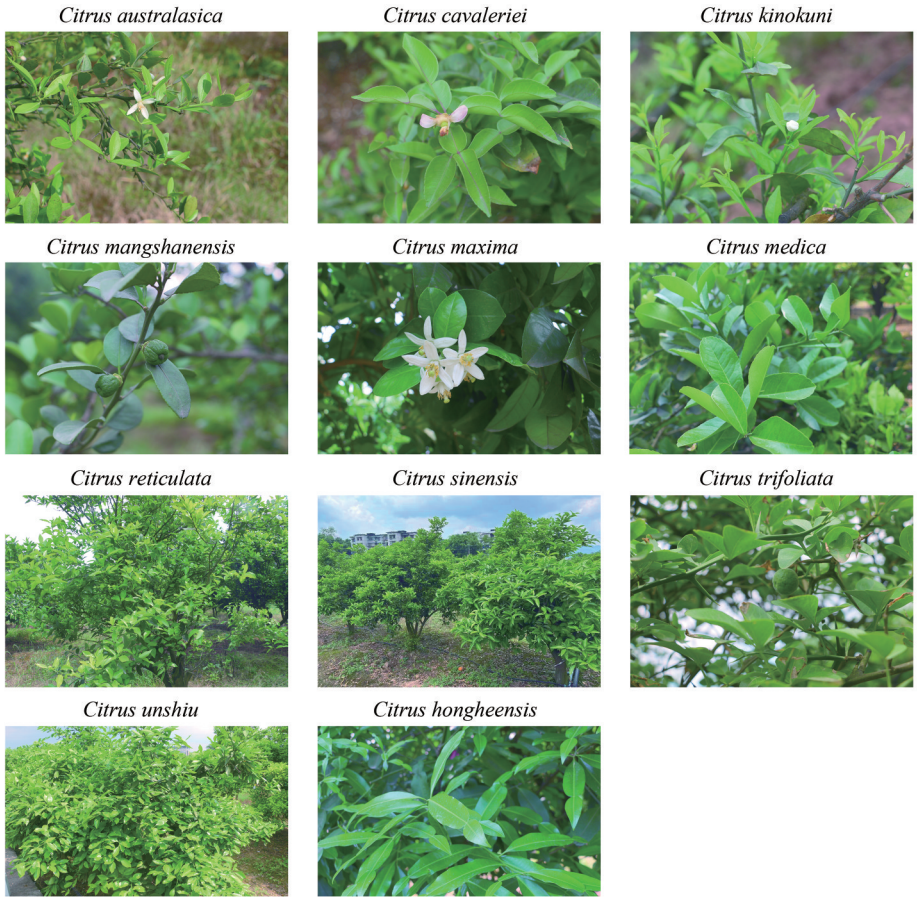


Figure 1 Field records of *Citrus* germplasm growth status. The species names involved in this paper are consistent with the official nomenclature used in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genome database

(CodonCode Co., 美国) 进行序列拼接, 拼接后的序列使用 MEGA 7.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) 进行特异靶标序列比对。评估 PCR 扩增结果及 Sanger 测序结果, 筛选能在各目标物种中实现特异性扩增且测序质量高的靶标序列。

基于 CRISPR-Cas12a 系统验证特异性靶标序列 合成靶标特异性 crRNA, 通过 CRISPR-Cas12a 系统实现可视荧光检测。采用 50 μL 体系, 其中含有 5 μL 10× NEBuffer 2.1、1 μL Cas12a (33 nmol·L^{-1})、1.65 μL crRNA (300 nmol·L^{-1})、10 μL 底物 DNA, 2 μL ssDNA (/5′ 6-FAM/CCCCCCCCCC/3′ BHQ-1, 400 nmol·L^{-1}) 和 30.35 μL 灭菌双蒸水。首先将 Cas12a 和 crRNA 及 DNA 底物在 37 ℃下 1×NEBuffer 中孵育 10 min。之后, 向孵育后的混合液中加入 ssDNA, 最后通过蓝光透射仪 [BG-Vtrans520s, 196 Baygene Biotech (Beijing) Co., Ltd., 中国] 直接观察荧光现象, 拍摄时采用参数: 光圈 *f*/1.6, 曝光时间 1/30 s, ISO 1 000, 曝光补偿 0 eV。

特异靶标序列在柑橘属药材及饮片中的应用 从广东等 6 个省市收集橘核药材及饮片共 30 份, 进行特异靶标序列的检测。以橘核药材及饮片的基因组 DNA 为模板, 使用特异性引物 Cre1-F (5′-GCTACAAAGCG AAGCACACG-3′) 和 Cre1-R (5′-AGCCATTGTCGAAG CACTGA-3′) 进行 PCR 扩增, 反应体系与程序同植物样本验证过程。测序结果使用 CodonCode Aligner 10.0.3 (CodonCode Co., 美国) 进行序列拼接, 拼接后的序列使用 MEGA 7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 进行特异靶标序列比对。

结果

1 柑橘属物种特异靶标序列库的构建

通过对柑橘属 15 个物种的 49 个基因组进行生物信息学分析, 成功构建柑橘属物种候选特异靶标序列库。统计结果分析表明, 分析范围内的物种候选特异靶标序列数量从最低的 243 条 (温州蜜柑 *C. unshiu*) 到最高的 353 002 条 (红河橙 *C. hongheensis*) 相差近 1 500 倍, 特异靶标序列数量大多集中在 10 000 条到 100 000 条之间 (图 2)。从数量上看, 时珍法为柑橘属药用物种鉴定提供了丰富的候选特异靶标序列。从候

Table 2 Source of experimental materials. CRI: National *Citrus* Germplasm Repository Chongqing China, *Citrus* Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

Sample type	Sample ID	Name	Location
Leaf	CL01	*Citrus australasica*	CRI
	CL02	*Citrus cavaleriei*	CRI
	CL03	*Citrus kinokuni*	CRI
	CL04	*Citrus mangshanensis*	CRI
	CL05	*Citrus maxima*	CRI
	CL06	*Citrus medica*	CRI
	CL07	*Citrus reticulata*	CRI
	CL08	*Citrus sinensis*	CRI
	CL09	*Citrus trifoliata*	CRI
	CL10	*Citrus unshiu*	CRI
	CL11	*Citrus hongheensis*	CRI
Crude drug	YC01-1	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC01-2	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC01-3	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC02-1	Citri Reticulatae Semen	Fujian
	YC02-2	Citri Reticulatae Semen	Fujian
	YC02-3	Citri Reticulatae Semen	Fujian
	YC03-1	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC03-2	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC03-3	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YC04-1	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YC04-2	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YC04-3	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YC05-1	Citri Reticulatae Semen	Zhejiang
	YC05-2	Citri Reticulatae Semen	Zhejiang
	YC05-3	Citri Reticulatae Semen	Zhejiang
Decoction pieces	YP01-1	Citri Reticulatae Semen	Beijing
	YP01-2	Citri Reticulatae Semen	Beijing
	YP01-3	Citri Reticulatae Semen	Beijing
	YP02-1	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YP02-2	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YP02-3	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YP03-1	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YP03-2	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YP03-3	Citri Reticulatae Semen	Hunan
	YP04-1	Citri Reticulatae Semen	Jiangxi
	YP04-2	Citri Reticulatae Semen	Jiangxi
	YP04-3	Citri Reticulatae Semen	Jiangxi
	YP05-1	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YP05-2	Citri Reticulatae Semen	Guangdong
	YP05-3	Citri Reticulatae Semen	Guangdong

选特异靶标序列库中为11个物种挑选4～50条特异靶标序列, 共计186条, BLAST结果显示各物种符合筛选原则的特异靶标数量在4～46条之间, 共计158条, 占比约为85%。在此范围内, 分别挑选1～15条靶标, 在目标物种中进行实验验证, 结合PCR扩增及Sanger测序结果, 各物种分别获得1～5条存在于对应物种基因组中的特异靶标序列 (表3), 从中为各物种挑选1条进行后续的特异性验证。

对上述特异靶标序列在各自对应物种基因组中查询, 发现上述特异靶标序列均未进行功能注释, 其中仅11条具有染色体定位信息 (表3)。

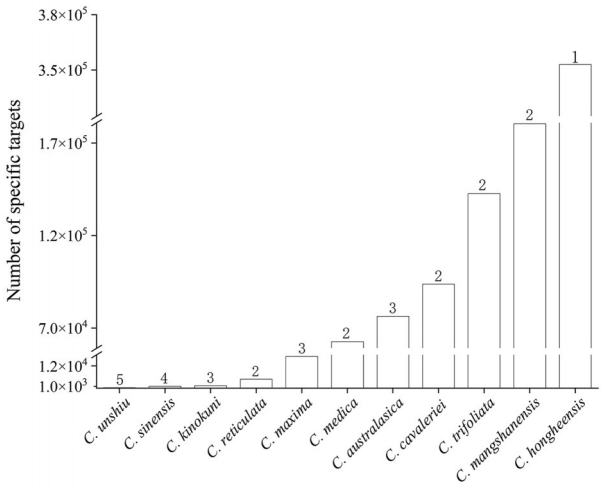


Figure 2 Distribution of specific target sequences across *Citrus* species. The numerical values indicate the count of targets that have been experimentally confirmed in each species during this research

2 琼脂糖凝胶电泳及Sanger测序均可验证靶标序列特异性

对柑橘属11个物种异靶标序列进行特异性实验验证。通过PCR扩增联合琼脂糖凝胶电泳的方法进行检测, 结果显示, 特异靶标序列扩增产物均符合预期大小且仅在目标物种中扩增成功而非目标物种没有扩增成功, 表现出高度的特异性。采用Sanger测序技术对特异靶标序列进行检测。测序数据显示, 成功在目标物种中检测到相应的特异靶标序列。这些特异靶标序列的测序质量高且能够在目标物种中完全匹配 (图3), 进一步说明这11条的靶标序列具有高度的特异性, 能够准确鉴定目标物种。

3 基于CRISPR-Cas12a系统验证靶标序列特异性

利用CRISPR-Cas12a技术对柑橘属植物的特异靶标序列进行检测。与测序结果一致, CRISPR-Cas12a系统成功实现对11个物种特异靶标序列的特异性检测。结果显示, 只有目标物种能够产生明显的荧光信号, 而在非目标物种未观察到明显的荧光信号 (图4)。这表明CRISPR-Cas12a系统能够有效鉴别目标物种且兼具便捷性和直观性的优点, 便于实时分析和现场检测。

4 基于特异靶标序列的柑橘属药材及饮片准确鉴定

利用橘核药材及饮片考察特异靶标序列的实际应用效果。以橘核药材及饮片DNA为模板, 以特异靶标上下游引物进行PCR扩增并通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果显示在30份样品中均扩增得到单一清晰的条带 (图5)。采用Sanger测序技术对PCR产物进行检测。测序数据显示, 成功在30份待检样品中检测到

Table 3 Bioinformatics statistical results of species-specific target sequences in 11 *Citrus* species and crRNA. /: Not available; crRNA: CRISPR RNA, the RNA molecule that pairs complementarily with the target DNA sequence to be cleaved

Species	Number of candidate targets	Validated specific target sequences in the target species (5′→3′)	Chromosomal location	crRNA (5′→3′)
Citrus australasica	76 274	Cau1:CTTTCATAGCTGGAGGTGTTACAAA	/	/
		Cau2:AAAAACAGGCCCATCATGGTAGAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUACCAUGAUGGGCCUGUUUUU
		Cau3:TACATGCCTATTTGATACGACTAAA	/	/
Citrus cavaleriei	93 758	Cca1:ATATGCACCCACACCAGGCCTTAAA	/	/
		Cca2:TAACCGATCGTCCGATCATAATAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUUAUGAUCGGACGAUCGGUUA
Citrus hongheensis	353 002	Cho1:CCATGGCTATGGTGCCCATACCAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUAUGGGCACCAUAGCCAUGG
Citrus kinokuni	1 318	Cki1:TTATACCATAGCTACGCCTTTTAAA	/	/
		Cki2:CGACAACAAATGAAATCGCCAGAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUGGCGAUUUCAUUUGUUGUCG
		Cki3:TAATGACAATCACGACACTATCAAA	/	/
Citrus mangshanensis	180 456	Cman1:AGCAAATTGTGTGCGACTAAGGAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUUAGUCGCACACAAUUUGCU
		Cman2:GCATGGAAGCTAACCGAGCAACAAA	/	/
Citrus maxima	17 135	Cmax1:TTAGCACCCTCCGCCTCTGTTCAAA	Chromosome 9	/
		Cmax2:CGATCGGTAACGCCCGTTGCCCAAA	Chromosome 4	/
		Cmax3:TAGCAGTACCCAGTGTAATCATAAA	Chromosome 4	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUGAUUACACUGGGUACUGCUA
Citrus medica	62 598	Cme1:GGCGTGGGTTAAGGAAAGATCTAAA	/	/
		Cme2:ACCCAGAAGTCTAACAGTCAGTAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUGACUGUUAGACUUCUGGGU
Citrus reticulata	4 838	Cre1:GATCTGTAGGAGCGTTTGCAATAAA	Chromosome 5	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUUGCAAACGCUCCUACAGAUC
		Cre2:AGGCTAGTCAGCTTTGCATTACAAA	Chromosome 5	/
Citrus sinensis	987	Csi1:CAGACCCATGTTTCGTCAACCGAAA	Chromosome 2	/
		Csi2:CTGGCTACTCAACCAGAATTTTAAA	Chromosome 2	/
		Csi3:TTAGTTAGTGCTCATTCCCGAGAAA	Chromosome 4	/
		Csi4: CGTGGCATGTACAAACCCTCTCAAA	Chromosome 1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGAGGGUUUGUACAUGCCACG
Citrus trifoliata	142 617	Ctr1: AGAAATGATGGCTTAAGGTTTCAAA	Chromosome 1	/
		Ctr2:CAAATGGCAACTATGACTCCCCAAA	Chromosome 4	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGGGAGUCAUAGUUGCCAUUUG
Citrus unshiu	243	Cun1:TTACGGGGCTCCTCCAATTACCAAA	/	/
		Cun2:TCGCCATATGGACGCCGTTTGCAAA	/	/
		Cun3:TACACCCCGGGAATGGCCGGACAAA	/	/
		Cun4:TTGGCATCCGAAGGCGCCCGTCAAA	/	/
		Cun5:TGACGCAACGAATTCCCAATGGAAA	/	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCAUUGGGAAUUCGUUGCGUCA

一致的特异靶标序列, 与其基原物种 *Citrus reticulata* 的特异靶标序列一致, 实现橘核药材及饮片的准确鉴定。

讨论

本研究首次将时珍法应用于柑橘属药用物种鉴定。通过建立覆盖柑橘 (*C. reticulata*)、柚 (*C. maxima*)、香橼 (*C. medica*) 等药用物种的靶标序列库, 成功构建柑橘属近缘物种鉴定体系, 该体系辐射到约 80% 的柑橘属中药材。结果表明, 筛选所得 11 条特异靶标序列表现出高度的特异性, 可实现柑橘属药用物种的准确鉴定。其中, Sanger测序可直接反映特异靶标序列差异情况, 而通过 CRISPR-Cas12a 系统可实现对特异靶标序列的特异性检测, 且可通过荧光实现可视化。目前 CRISPR-Cas12a 多用于柑橘病原体 (如细菌、真菌) 检测[38-40], 尚无文献报道其在柑橘属物种鉴定中的系统应用。已有研究通过基因组分析揭示了部分柑橘属物种间的亲缘关系, Fujii 等[41]通过基因组分析揭示纪州蜜橘 (*C. kinokuni*) 作为温州蜜柑 (*C. unshiu*) 母本的关系, Xu 等[42]提出柚 (*C. maxima*) 和红河橙 (*C. hongheensis*) 具有较近的亲缘关系。通过 AGE1.0 分析获得的特异

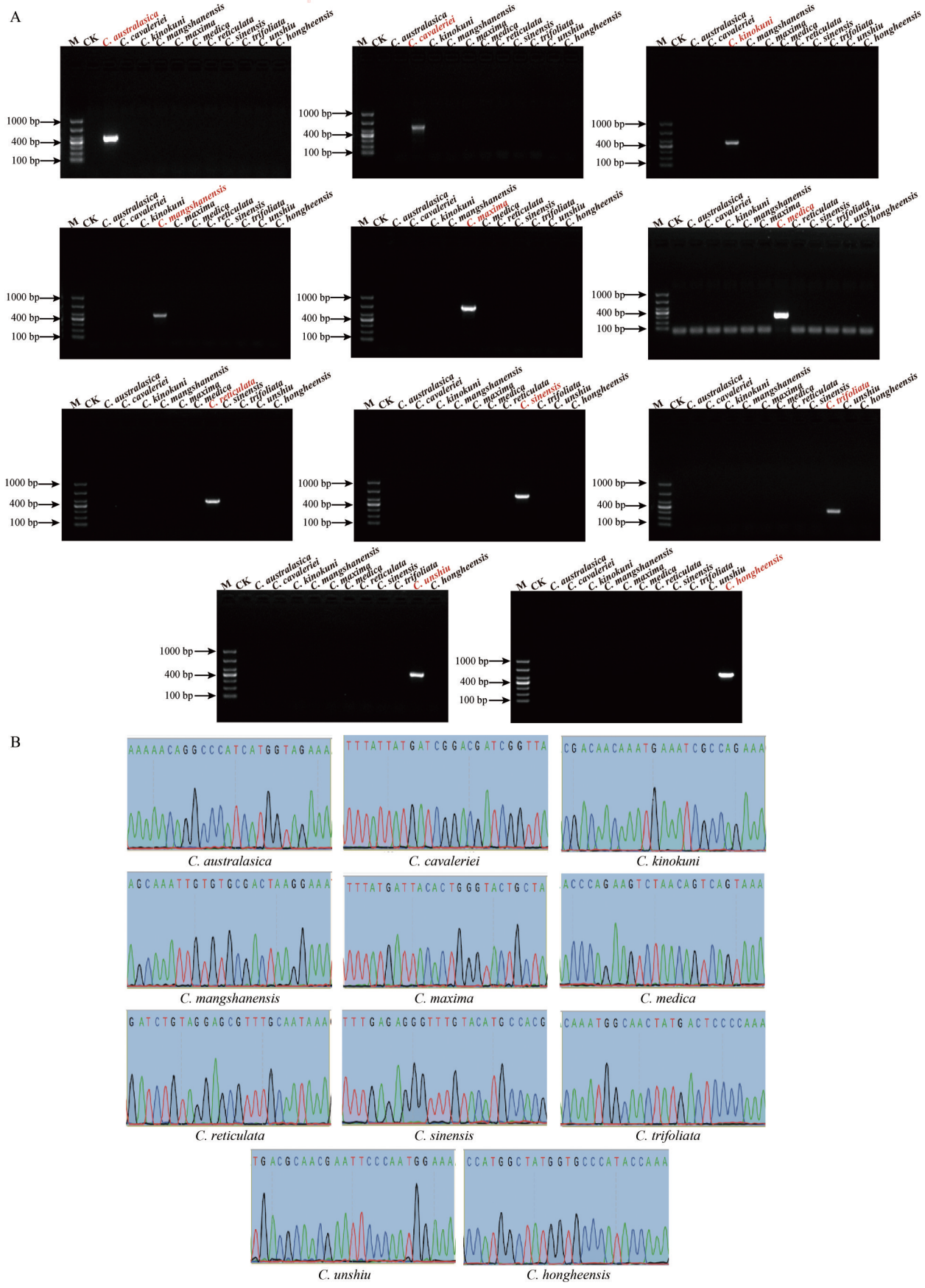


Figure 3 Agarose gel electrophoresis and sequencing peak graphs results of specific target sequences for 11 *Citrus* species. M: DL1000 Marker; CK: Blank control



Figure 4 Precise species identification of 11 *Citrus* species using CRISPR-Cas12a technology. Each group contains DNA from different species as the substrate. CK: Nuclease-free water

靶标序列, 可实现对上述物种的准确鉴定, 且适配Sanger测序、高通量测序、CRISPR、琼脂糖凝胶电泳等多种实验技术[30]。由此可见, 时珍法能突破亲缘关系密切物种的鉴定瓶颈, 为近缘物种的精确鉴别提供可靠技术手段。

时珍法可在遗传背景复杂的近缘物种中实现准确鉴定, 同时完成从生物信息学分析到市售药材及饮片实践应用的验证。这依赖于时珍法的底层逻辑——不同物种基因组序列必然存在差异的原理, 确保特异靶标序列在目标物种中存在, 而在其他物种中不存在, 从而实现物种的精准鉴定[30]。基于时珍法, 本研究以30份橘核药材及饮片的准确基原鉴定为例, 充分展示了时珍法在中药鉴定领域的应用潜力, 为柑橘属药材如化橘红等的精准鉴定提供新方法。多项研究共同揭示药材DNA易降解给分子鉴定带来的挑战, Xin等[43]系统验证DNA条形码技术在市售饮片鉴定中的适用性, 其中橘核饮片因基因组DNA严重降解而无法获得PCR扩增产物, 性状鉴定因缺乏关键鉴别特征, 最终未能确定其基原物种。Cheng等[44]基于ITS2序列对广陈皮基原植物及药材进行DNA分子鉴定, 药材的测序成功率明显低于植物的测序成功率, 且呈现出随贮藏年份增加而递减的趋势。因此, 在应用时珍法鉴定此类药材时, 建议采取诸如将扩增子片段长度控制在200 bp以下[35]、优化PCR扩增体系与条件等针对性策略, 以有效提升在降解DNA样本中的扩增成功率。

时珍法与DNA条形码、SNP分型等现有分子鉴定方法相比, 在成本方面, 时珍法的前期开发需基于目标物种及其近缘种的基因组或测序数据构建候选靶标序列库, 该阶段涉及生物信息学分析与计算平台投入。但一旦靶标库建立, 其具体检测成本取决于所选技术路径, 具有较高灵活性。例如, 若采用PCR结合Sanger测序, 其单样本成本与DNA条形码相近; 而SNP分型通常需要通过重测序等方式筛选特异性位点, 其前期开发与检测成本一般高于DNA条形码方法。在通量方面, 时珍法可根据实际需求适配不同检测手段, 针对单一样本或现场快速筛查, 可采用可视化荧光或侧向流试纸条实现快速检测; 对于批量样本, 则可依托PCR扩增及Sanger测序进行通量分析, 或利用芯片、高通量测

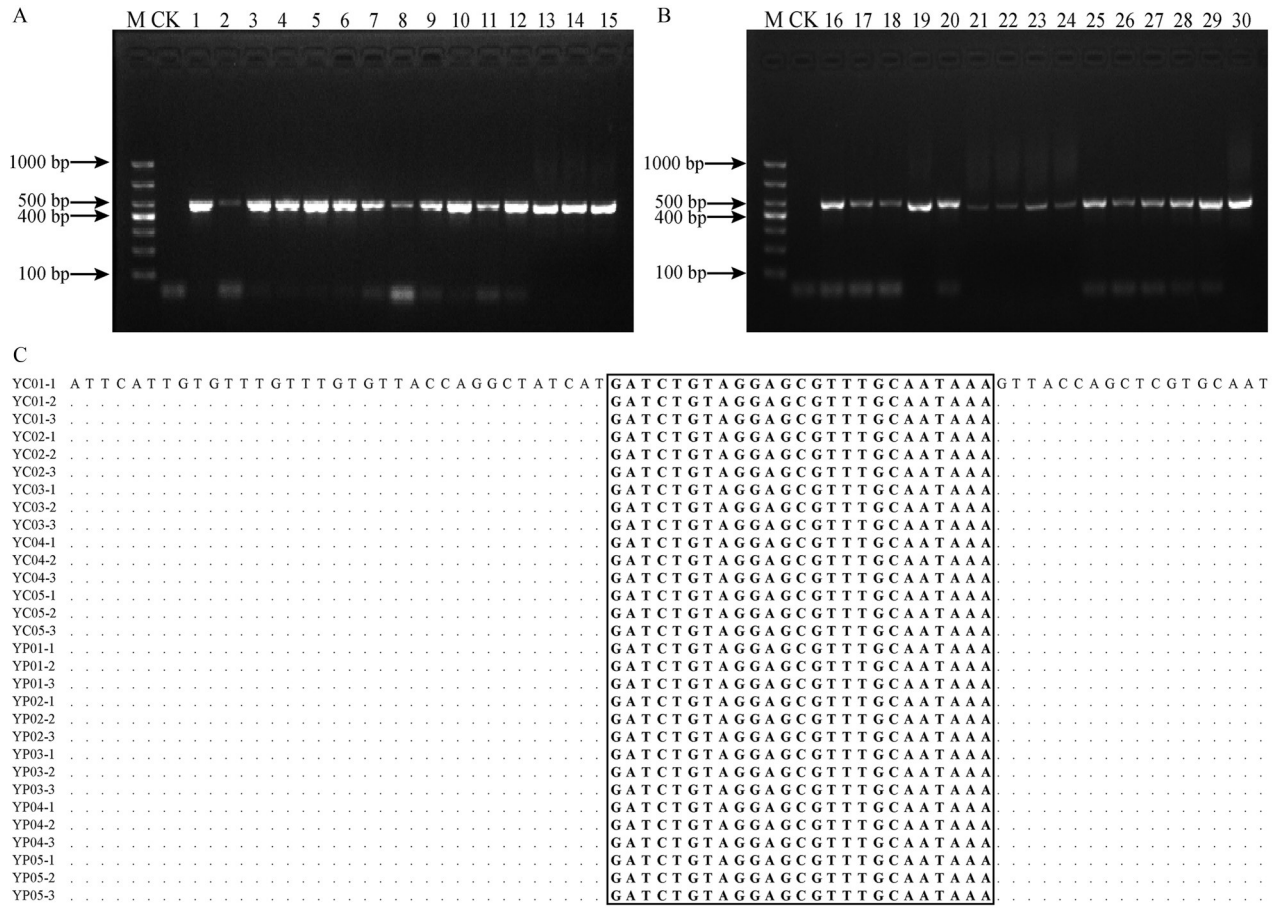


Figure 5 Agarose gel electrophoresis and specific target sequence alignment diagrams of Citri Reticulatae Semen crude drugs and decoction pieces. A: Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from Citri Reticulatae Semen crude drugs. 1−3: YC01-1−YC01-3; 4−6: YC02-1−YC02-3; 7−9: YC03-1−YC03-3; 10−12: YC04-1−YC04-3; 13−15: YC05-1−YC05-3; B: Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from Citri Reticulatae Semen decoction pieces. 16−18: YP01-1−YP01-3; 19−21: YP02-1−YP02-3; 22−24: YP03-1−YP03-3; 25−27: YP04-1−YP04-3; 28−30: YP05-1−YP05-3. M: DL1000 Marker; CK: blank control. C: Multiple sequence alignment of the amplified species-specific target sequences obtained from both Citri Reticulatae Semen crude drugs and decoction pieces. A dot (.) indicates that the nucleotide at this position is the same as in the reference sequence (YC01-1); bold letters indicate specific target sequences

序平台进行。后者类似基于芯片或高通量测序平台的SNP分型技术的大规模样本高通量筛查。在适用场景方面, 时珍法除了在实验室环境下, 尤其适用于现场快速检测。例如, 结合CRISPR-Cas12a技术可在30 min内获得可视化检测结果[34,37], 且无需依赖昂贵仪器, 显著提升了检测效率与现场适用性, 弥补了传统分子鉴定方法在快速响应与便携性方面的不足。

目前将柑橘属15个物种的49个基因组纳入分析, 仍存在一定局限。随着基因组学技术的发展, 更高质量和更多类型的柑橘基因组有望被组装和注释, 建议在此基础上进一步扩大柑橘属物种的分析范围, 同时将更多高质量柑橘属物种基因组纳入分析范畴。并将时珍法与人工智能相结合, 利用实验筛选获得的特异靶标序列训练AI模型, 进而利用成熟后的AI模型实现对海量序列的自动化、智能化筛选以提升效率。值得关注的是, 扩大分析范围将进一步提高时珍法对柑橘属物种鉴定的适用性: 一是物种数量的增加, 有助于实现在更宽泛的遗传背景下评估特异靶标序列的鉴定能力; 二是基因组数量的增多, 能够提供更全面的种内遗传变异信息, 从而筛选出在物种内部保守、种间差异显著的高特异性靶标。相较基因组较小、结构相对简单的真菌[34-37], 柑橘属基因组具有大小中等、重复序列含量高、杂合度高等特点, 而引物设计是实验成功的关键因素之一[35]。因此, 也需应对高杂合度和重复序列带来的技术挑战。一方面, 高重复序列导致候选靶标序列库中非特异性序列 (如多聚体、简单重复序列) 比例过高; 另一方面, 高杂合度则使得在目标物种内部难以找到种内保守的特异序列, 这两者共同增加了筛选有效靶标和设计稳定引物的难度。因此, 需从生物信息学筛选策略层面进行针对性优化。① 针对高重复

序列的靶标序列优化: 在生物信息学分析阶段, 设置更严格的序列过滤与筛选条件。在构建候选靶标数据库时, 进一步筛选出同时包含A、G、C、T四种碱基且不含多聚体 (poly) 结构的特异靶标序列; ② 针对高杂合度的靶标筛选策略强化: 为应对高杂合度带来的挑战, 提高种内保守性要求, 设置更高的种内频率阈值, 过滤掉因杂合位点或测序不准确导致的存疑序列。通过整合这些优化的生物信息学筛选策略, 时珍法有望更有效地克服由基因组结构复杂性带来的障碍, 拓展其在具有复杂基因组特征的物种鉴定中的应用范围。

综上所述, 时珍法为柑橘属药用物种的准确鉴定、商品化药材的准确追溯与真伪鉴别提供有力的技术支撑, 也为保障橘核药材及其相关制剂的质量可控性与用药安全性奠定坚实基础。

植物样本采集与伦理声明: 本研究中所有柑橘植物样本于2025年4月在中国重庆市西南大学柑桔研究所的种质资源圃内采集。所有样本的采集活动均获得西南大学柑桔研究所的同意, 样本采集严格遵守《中华人民共和国野生植物保护条例》及《濒危野生动植物种国际贸易公约》中关于人工培植来源材料用于科学研究的有关规定。采集过程始终遵循最小化干扰原则, 以尽量减少对母株的影响。本研究符合科学伦理规范, 特此声明。

作者贡献: 张娜娜负责实验设计、样本收集、实验工作、数据分析、文章撰写及修改; 甘雨桐负责数据管理及分析, 参与实验工作和稿件修改; 辛天怡负责稿件修改; 史志杰参与实验工作和稿件修改; 许文杰参与稿件修改; 宋经元负责实验设计、总体把关和稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

[1] Wu GA, Terol J, Ibanez V, et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus* [J]. Nature, 2018, 554: 311-316.

[2] Singh B, Singh JP, Kaur A, et al. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of *Citrus* peel [J]. Food Res Int, 2020, 132: 109-114.

[3] Deng XX. A review and perspective for *Citrus* breeding in China during the last six decades [J]. Acta Hortic Sin (园艺学报), 2022, 49: 2063-2074.

[4] He YJ, Zhu M, Zhou Y, et al. Comparative investigation of phytochemicals among ten citrus herbs by ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry and evaluation of their antioxidant properties [J]. J Sep Sci, 2020, 43: 3349-3358.

[5] Tian F, He XF, Sun J, et al. Simultaneous quantitative analysis of nine constituents in six Chinese medicinal materials from *Citrus* genus by high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods [J]. J Sep Sci, 2020, 43: 736-747.

[6] Zhang J, Wu XF, Qiu JQ, et al. Comprehensive comparison on the chemical profile of Guang Chen Pi at different ripeness stages using untargeted and pseudotargeted metabolomics [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 8483-8495.

[7] Yu Q, Tao Y, Huang YT, et al. Aged Pericarpium Citri Reticulatae 'Chachi' attenuates oxidative damage induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) in HepG2 cells [J]. Foods, 2022, 11: 273.

[8] Liu Y, Wu H, Nie YC, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-*κ*B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11: 1606-1612.

[9] Luo YL, Zhang CC, Li PB, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13: 301-307.

[10] Wang F, Chen L, Chen HP, et al. Discovery of the key active compounds in Citri Reticulatae Pericarpium (*Citrus reticulata* 'Chachi') and their therapeutic potential for the treatment of COVID-19 based on comparative metabolomics and network pharmacology [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1048926.

[11] Zheng YY, Zeng X, Peng W, et al. Characterisation and classification of Citri Reticulatae Pericarpium varieties based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS combined with multivariate statistical analyses [J]. Phytochem Anal, 2019, 30: 278-291.

[12] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols [J]. Nutrients, 2010, 2: 1231-1246.

[13] Kim HJ, Oh GT, Park YB, et al. Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition [J]. Life Sci, 2004, 74: 1621-1634.

[14] Benayad O, Bouhrim M, Tiji S, et al. Phytochemical profile, *α*-glucosidase, and *α*-amylase inhibition potential and toxicity evaluation of extracts from *Citrus aurantium* (L) peel, a valuable by-product from Northeastern Morocco [J]. Biomolecules, 2021, 11: 1555.

[15] Kong FS, Ding ZD, Zhang K, et al. Optimization of extraction flavonoids from Exocarpium Citri Grandis and evaluation its hypoglycemic and hypolipidemic activities [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 262: 113178.

[16] Gao S, Li P, Yang HL, et al. Antitussive effect of naringin on experimentally induced cough in guinea pigs [J]. Planta Med, 2011, 77: 16-21.

[17] Wang H, Xu YS, Wang ML, et al. Protective effect of naringin against the LPS-induced apoptosis of PC12 cells: Implications for the treatment of neurodegenerative disorders [J]. Int J Mol Med, 2017, 39: 819-830.

[18] Okuyama S, Katoh M, Kanzaki T, et al. Auraptene/naringin-rich

fruit juice of *Citrus kawachiensis* (Kawachi Bankan) prevents ischemia-induced neuronal cell death in mouse brain through anti-inflammatory responses [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2019, 65: 66-71.

[19] Barrett HC, Rhodes AM. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives [J]. Syst Bot, 1976, 1: 105-136.

[20] Zhou ZQ. Study on cladistic relationship of the true *Citrus* species [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 1991, 9: 130-134.

[21] Li RT, Zhang YN, Tian DL. Studies on the stomata of *Citrus* plant leaves [J]. J Fruit Sci (果树学报), 2004, 21: 419-424.

[22] Kong WZ, Zhang Y, Yi ZL, et al. Genetic relationship analysis of *Fortunella* germplasm resources based on pollen and leaf morphology [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2020, 18: 4083-4096.

[23] Li SZ, Zeng SL, Wu Y, et al. Cultivar differentiation of Citri Reticulatae Pericarpium by a combination of hierarchical three-step filtering metabolomics analysis, DNA barcoding and electronic nose [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1056: 62-69.

[24] Han J. Identification of 76 Varieties of Chinese Herbal Medicine in the Lingnan Area by DNA Barcoding Technique (76种岭南中草药的DNA条形码研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.

[25] Luo K, Chen SL, Chen KL, et al. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family [J]. Sci Sin Vitae (中国科学:生命科学), 2010, 40: 342-358.

[26] Yu J. Development of DNA Barcodes for *Citrus* and Its Related Genera and Their Application in Species Identification (柑橘及其近缘属植物DNA条形码研制及其物种的鉴定研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2011.

[27] Cheng QQ, Tang ZY, Ouyang Y, et al. MYB polymorphism molecular marker: A novel molecular marker for authenticity and geographical origin identification of Citri Reticulatae Pericarpium [J]. Chin Herb Med, 2025, 17: 296-306.

[28] Nurzaman M, Setiawati T, Hasan R, et al. The phenetic relationship of citrus plants based on the morphological and anatomical characteristics [J]. Biodiversitas, 2024, 25: 1201-1213.

[29] Wang F, Chen L, Chen SW, et al. Characterization of two closely related citrus cultivars using UPLC-ESI-MS/MS-based widely targeted metabolomics [J]. PLoS One, 2021, 16: e0254759.

[30] Gan YT, Xin TY, Xu WJ, et al. Principles and strategies for species identification based on analysis of whole-GEnome [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 2364-2374.

[31] Hao LJ, Xu WJ, Qi GH, et al. GAGE is a method for identification of plant species based on whole-GEnome analysis and genome editing [J]. Commun Biol, 2022, 5: 947.

[32] Hao LJ. Identification of Medicinal Plant Species Based on Analysis of Whole-GEnome (基于全基因组分析的药用植物物种鉴定研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2024.

[33] Gan YT, Qi GH, Hao LJ, et al. Analysis of whole-GEnome as a novel strategy for animal species identification [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 2955.

[34] Huang YH, Fu LG, Gan YT, et al. Analysis of whole-GEnome for identification of seven *Penicillium* species with significant economic value [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 8172.

[35] Qi GH, Hao LJ, Gan YT, et al. Identification of closely related species in *Aspergillus* through analysis of whole-GEnome [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1323572.

[36] Qi GH, Hao LJ, Xin TY, et al. Analysis of whole-GEnome facilitates rapid and precise identification of fungal species [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1336143.

[37] Yang Y, Gan YT, Xu WJ, et al. Analysis of whole-GEnome for *Alternaria* species identification [J]. J Fungi, 2025, 11: 185.

[38] Shin K, Kwon S, Lee SC, et al. Sensitive and rapid detection of Citrus scab using an RPA-CRISPR/Cas12a system combined with a lateral flow assay [J]. Plants, 2021, 10: 2132.

[39] Liu YL, Ma LR, Liu WJ, et al. RPA-CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification-enriched DNAzyme: A homogeneous photothermal sensing strategy for plant pathogens [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71: 4736-4744.

[40] Kim H, Cho I, Choi S, et al. Identification of an isolate of Citrus tristeza virus by nanopore sequencing in Korea and development of a CRISPR/Cas12a-based assay for rapid visual detection of the virus [J]. Phytopathology, 2023, 114: 1421-1428.

[41] Fujii H, Ohta S, Nonaka K, et al. Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers [J]. Breed Sci, 2016, 66: 683-691.

[42] Xu Q, Huang Y, Deng XX. The definition, classification and evolution of *Citrus* based on whole genome sequence information [J]. Sci Sin Vitae (中国科学:生命科学), 2024, 54: 525-536.

[43] Xin TY, Lou Q, Hao LJ, et al. DNA barcoding identification of commercial decoctions in traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 879-889.

[44] Cheng SS, Wang WJ, Chen CZ, et al. Identification of *Citrus reticulate* 'Chachi' and its original plant based on ITS2 sequence [J]. J Guangdong Pharm Univ (广东药科大学学报), 2017, 33: 719-722.