

基于红外光谱法的云南重楼及其近缘种的亲缘关系研究

吴 喆^{1,2}, 王元忠^{2,3}, 张 霁^{2,3}, 杨绍兵^{2,3}, 张金渝^{1,2,3*}, 徐福荣^{1*}

1. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650200

3. 云南省省级中药原材料质量监测技术服务中心, 云南 昆明 650200

摘要: 目的 傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 结合化学计量学方法分析云南重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 及其近缘种的亲缘关系, 为重楼属药用植物资源的开发利用提供理论依据。方法 采集云南重楼、白花重楼 *Paris polyphylla* var. *alba*、毛重楼 *Paris mairei*、南重楼 *Paris vietnamensis*、五指莲 *Paris axialis* var. *axialis* 共 50 份样品的红外光谱信息, 对光谱数据进行自动基线校正、自动平滑、纵坐标归一化、多元散射校正、二阶求导等预处理, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 及系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 分析光谱数据。结果 原始红外光谱中, 1 653、1 156、1 082、1 021、925、851、759、572、524 cm^{-1} 等为重楼属植物的共有峰, 主要归属为黄酮、淀粉和糖苷类成分的吸收峰; 毛重楼和五指莲分别在 1 535 和 1 369 cm^{-1} 附近有特征吸收峰, 可与另外 3 种重楼属植物相区分。以全波段光谱数据进行 PLS-DA 和 PCA, PLS-DA 对重楼属植物分类效果优于 PCA, 能够准确区分 5 种野生重楼属植物。系统聚类分析 (HCA) 及向量夹角余弦相关性分析能够反映 5 个重楼属植物的亲缘关系, 云南重楼与白花重楼和南重楼的亲缘关系较近, 与毛重楼和五指莲的关系较远。结论 FTIR 结合化学计量学方法, 能够快速区分不同种类重楼属植物, 明确云南重楼及其近缘种之间的亲缘关系, 为重楼属植物亲缘关系研究提供一种快速、有效的方法, 同时为重楼种质资源开发和利用提供理论基础。

关键词: 傅里叶变换红外光谱; 云南重楼; 近缘种; 亲缘关系; 种质资源主成分分析; 偏最小二乘判别分析; 系统聚类分析
中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2279-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.021

Study on genetic relationship of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and its wild relatives based on infrared spectroscopy

WU Zhe^{1,2}, WANG Yuan-zhong^{2,3}, ZHANG Ji^{2,3}, YANG Shao-bing^{2,3}, ZHANG Jin-yu^{1,2,3}, XU Fu-rong¹

1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

3. Yunnan Technical Center for Quality of Chinese Materia Medica, Kunming 650200, China

Abstract: Objective The genetic relationship between *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and its relatives has been researched using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with chemometrics methods in order to provide a theoretical basis for the development and utilization of medicinal plant resources of genus *Paris* L. **Methods** The infrared spectrum information of 50 samples of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. polyphylla* var. *alba*, *P. mairei*, *P. vietnamensis*, and *P. axialis* var. *axialis* was collected. The original infrared spectra data were pretreated by automatic baseline correction, automatic smoothing, ordinate normalization, multiplicative scatter correction and second derivative, and analyzed by principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and hierarchical cluster analysis (HCA). **Results** The common peaks of 1 653, 1 156, 1 082, 1 021, 925, 851, 759, 572 and 524 cm^{-1} in original spectra data of 50 samples might be relative to the contents of flavonoids, starches and glycosides. The absorption peaks of 1 535 and 1 369 cm^{-1} belonged to *P. mairei* and *P. axialis* var. *axialis*, respectively which could be distinguished from other three species. By PCA and PLS-DA, the former one which could accurately distinguish five species of wild

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460584); 农业部公益性行业科研专项资助 (201303117)

作者简介: 吴 喆 (1993—), 女, 研究生, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: 15887843024@163.com

*通信作者 张金渝, 男, 研究员, 主要从事植物资源评价与利用。E-mail: jy Zhang2008@126.com

徐福荣, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药资源开发与利用。E-mail: xfrong99@163.com

genus *Paris* L. presented a better classification result than the latter. HCA and vector included angle cosine analysis could reflect the genetic relationship of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and its wild relatives. *P. polyphylla* var. *alba* and *P. vietnamensis* had closed relationship with *P. polyphylla* var. *yunnanensis* while *P. mairei* and *P. axialis* var. *axialis* were relative far. **Conclusion** FT-IR spectroscopy combined with chemometrics methods can distinguish different species of genus *Paris* L. and display the genetic relationship between *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and its wild relatives, clearly. Furthermore, it could provide a fast and effective method for the study of plant genetic relationships and a theoretical basis for the development and utilization of medicinal plant resources of genus *Paris* L.

Key words: Fourier transform infrared spectroscopy; *Prais polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; wild relatives; genetic relationship; germplasm resources; PCA; PLS-DA; HCA

重楼为百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物云南重楼 *Prais polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 或七叶一枝花 *Prais polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara. 的干燥根茎^[1]。重楼属植物共有 24 个种, 我国占 19 种, 常见药用种为云南重楼(滇重楼)、南重楼 *Paris vietnamensis* (Takht.) H. Li、七叶一枝花、长药隔重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *pseudothibetica* H. Li、凌云重楼 *Paris cronquistii* var. *cronquistii* (Takht.) H. Li 等^[2]。现代药理研究表明, 重楼具有抗癌、抗菌、止血镇痛等作用, 其甾体皂苷、植物内生菌素、黄酮等成分是其药效物质基础^[3-7]。滇重楼被广泛应用于中医临床, 以其为主要原料的中成药包括云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药片等^[8]。重楼在我国分布广泛, 因其药用价值和市场需求量高而被掠夺性采挖, 导致野生资源极度匮乏, 供需矛盾日益尖锐。通过对野生资源引种、育种、栽培和从近缘种中寻找替代品等途径, 可缓解野生资源紧张局面, 但对缓解重楼野生资源濒危局面仍然有限^[9-10]。因此, 依据重楼属野生近缘种的亲缘关系寻找云南重楼替代品显得尤为重要。

药用植物亲缘关系研究的传统方法主要是凭借经验从植物形态、显微结构等方面入手^[11], 但受主观因素干扰大, 且在野生重楼生长过程中, 其形态特征易受自然环境影响, 所以仅利用植物性状进行鉴定难以准确、详尽阐明其亲缘关系。目前分子生物学被应用于中药材亲缘关系研究, 如马剑等^[12]基于 *matK* 基因对 10 种重楼属植物进行了遗传分析, 为重楼属植物的保护、引种驯化和合理利用提供依据。刘涛等^[13]对滇重楼的 *psbA-trnH* 条形码分子进行鉴定研究, 结果表明 *psbA-trnH* 序列可区分滇重楼及其同属物种。分子生物学技术需对药材进行分离提取, 所需仪器和试剂价格昂贵, 专业性强, 技术难度大, 不利于推广应用。

近年红外光谱在药用植物近缘种研究中的应用已有报道。Li 等^[14]利用傅里叶红外光谱 (fourier

transform infrared spectroscopy, FTIR) 对 18 种柑橘属植物花瓣进行了亲缘关系分析, 结果表明 FTIR 可用于植物亲缘关系分析及品种鉴定。Demir 等^[15]利用 FTIR 对小麦属及其近缘属山羊草属的 12 种植物进行了系统分类, 发现 FTIR 结合化学计量学方法可适用于小麦属和山羊草属的亲缘关系分析。FTIR 是一种振动光谱, 对样品中不同的官能团及化学键会产生不同的振动吸收, 继而根据不同植物所含化学成分的差异, 对产生的不同的红外光谱进行分析^[16]。FTIR 具有无损、快速等特点, 能够全面反映物质内部分子结构定性定量信息, 使其在复杂中药材鉴别、品质评价及亲缘关系鉴别中具有一定优势^[17-18]。本研究采集云南重楼及其近缘种植物 50 个野生样品的红外光谱数据, 通过对其红外光谱进行主成分 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 及系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA), 快速鉴别重楼种类, 分析重楼属植物不同物种间的亲缘关系, 以期寻找云南重楼合适替代品提供新思路, 为药用重楼种质资源开发利用提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 材料

重楼属植物样品由云南省农业科学院药用植物研究所张金渝研究员鉴定为云南重楼 *Prais polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.、白花重楼 *Paris polyphylla* var. *alba* H. Li、毛重楼 *Paris mairei* Lév.、南重楼 *Paris vietnamensis* (Takht.) H. Li、五指莲 *Paris axialis* var. *axialis* H. Li, 样品来源见表 1。样品采集后, 洗净根茎部位, 置于干净白纸上阴干。用粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 存放于自封袋中, 备用。

1.2 仪器

Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Perkin Elmer 公司); YP-2 型压片机 (山岳科学仪器有限

表 1 重楼属样品来源
Table 1 Information of plant samples from *Paris* L.

样品	产地	样品数
白花重楼	云南省个旧市卡房镇	7 (编号 1~7)
云南重楼	云南省保山市隆阳区瓦渡乡	15 (编号 1~15)
毛重楼	云南省丽江市玉龙县	8 (编号 1~8)
南重楼	云南省普洱市思茅区镇远县	10 (编号 1~10)
五指莲	云南省保山市腾冲县界头镇	10 (编号 1~10)

公司); 80 目标准筛盘 (道墟五四仪器厂); FW-100 型高速粉碎机 (华鑫仪器厂); XS125A 型电子分析天平 (瑞士 Precisa 公司)。

2 方法

2.1 红外光谱的采集及数据处理

扫描范围 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 扫描信号累加 16 次, 分辨率为 $4\ \text{cm}^{-1}$ 。取样品粉末与 KBr 以 1:50 的比例充分混合研磨后, 加入模具压成均匀薄片。每个样品扫描 2 次, 取平均光谱, 扫描时扣除 CO_2 和 H_2O 背景。OMNIC 8.0 软件对原始光谱进行自动平滑、自动基线校正、纵坐标归一化等预处理。SIMCA- P^+ 10.0 软件进行 PCA 和 PLS-DA。SPSS 20.0 软件进行 HCA。

2.2 精密度试验

以 1 号白花重楼样品为考察对象, 按“2.1”项下方法, 连续重复扫描 5 次, 所得红外图谱的相关

系数在 0.999 9~1.000 0, RSD 为 0.01%, 表明精密

2.3 稳定性试验

以 1 号白花重楼样品为考察对象, 每隔 10 min 扫描 1 次, 总共扫描 5 次, 所得红外图谱的相关系数在 0.999 7~1.000 0, RSD 为 0.01%, 表明稳定性良好。

2.4 重现性试验

以 1 号白花重楼样品为考察对象, 按“2.1”项下方法分别压片 5 次, 所得红外图谱的相关系数在 0.994 9~0.999 4, RSD 为 0.19%, 表明重现性良好。

3 结果与分析

3.1 不同野生重楼原始红外光谱对比

图 1 为重楼属 5 种植物平均红外光谱图, $3\ 380\ \text{cm}^{-1}$ 附近主要为 O-H 伸缩振动吸收峰, $2\ 930\ \text{cm}^{-1}$ 附近为亚甲基 C-H 反对称伸缩振动吸收峰, $1\ 653\ \text{cm}^{-1}$ 附近为黄酮成分酰胺 I 带中 C=O 伸缩振动峰, $1\ 369\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为 $-\text{CH}_3$ 对称弯曲振动^[19]; $1\ 156$ 、 $1\ 082$ 、 $1\ 021$ 、 925 、 851 、 759 、 572 、 $524\ \text{cm}^{-1}$ 等为糖苷类成分和淀粉的特征吸收峰^[20]。由以上光谱分析可知, 5 种重楼属植物中含有的主要成分为黄酮、淀粉和糖苷类等物质。

由图 1 可知, 毛重楼的红外光谱图在 $1\ 535\ \text{cm}^{-1}$ 处酰胺 II 带的特征峰吸收峰与其他 4 种野生近缘种

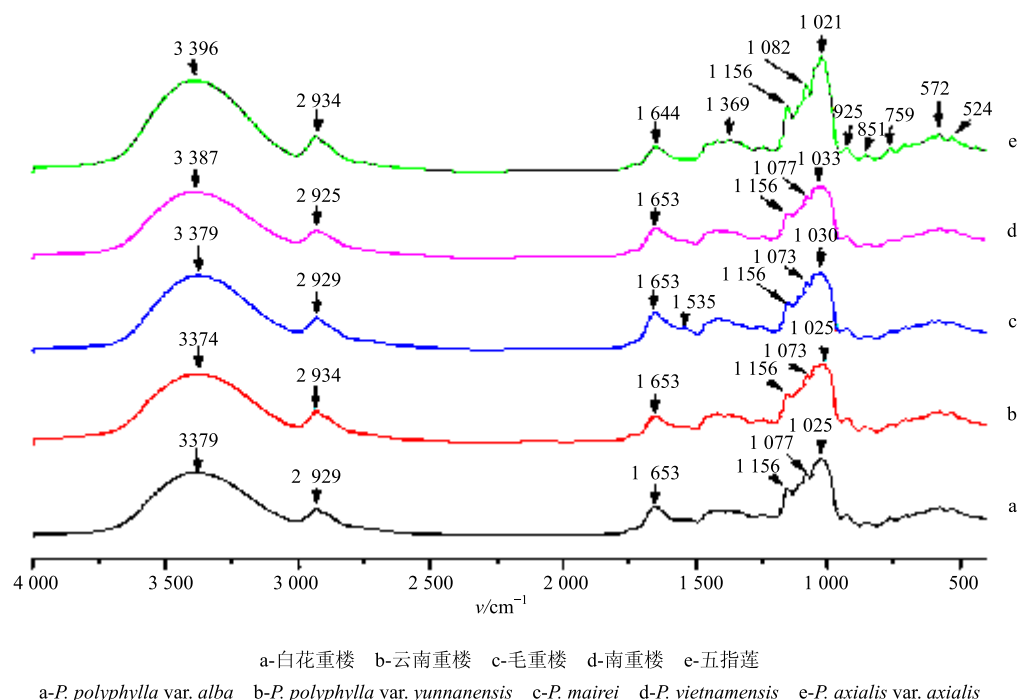


图 1 5 种重楼原始光谱图

Fig. 1 Original spectra of five species in genus *Paris* L.

差异较明显,表明毛重楼的化学成分与其他近缘种存在差异,可能含有的黄酮量更高。五指莲的红外光谱图在 $1\ 369\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征吸收峰与其他 4 种野生重楼差异较大,显示五指莲和其他种的野生重楼在化学成分上有所不同。并且除五指莲之外,其余 4 种野生重楼的红外光谱图的峰位和峰形基本一致,只有峰强度存在差异,表明不同种野生重楼化学组分基本相同,但所含化学成分的积累量有差异。通过对重楼属 5 个野生近缘种的平均原始光谱分析可以发现毛重楼和五指莲与其他 3 种野生重楼的化学成分以及量存在明显的差异。

3.2 PCA 和 PLS-DA

化学计量学方法中 PCA 和 PLS-DA 都是常用的判别分类方法。PCA 是将多维具有相关性的数据压缩为少数几个相互独立数据的统计方法,在不丢失主要光谱信息的前提下选择较少的新变量代替原来较多的变量,排除化学信息共存并相互重叠的信息,

简化数据,揭示变量间的关系,从而达到解决中药谱带重叠无法分析的困难^[21]。PLS-DA 综合了多元线性回归和主成分回归的优势,能够剔除不相关或非线性变量,通过潜在变量或者提取主成分进行聚类分析,是一种有监督模式识别的分析方法^[22]。将全波段谱图进行多元散射校正和二阶求导预处理后,PCA 提取前 3 个主成分作为坐标轴,绘制了 5 种重楼植物的主成分分析三维得分图;PLS-DA 提取了前 4 个主成分,以前 3 个为坐标轴,绘制了 PLS-DA 三维得分图。在 PCA 得分图中(图 2-a),五指莲的聚类效果好;白花重楼与毛重楼的距离很近,但也可以较好地聚为一类;云南重楼除了部分个体与毛重楼和南重楼有混杂外,其余的聚类效果也好;南重楼的聚类效果较差。在 PLS-DA 三维得分图中(图 2-b),5 种野生重楼能够很好地分开。虽然个别云南重楼与毛重楼距离很近,但聚类效果还是明显优于 PCA。

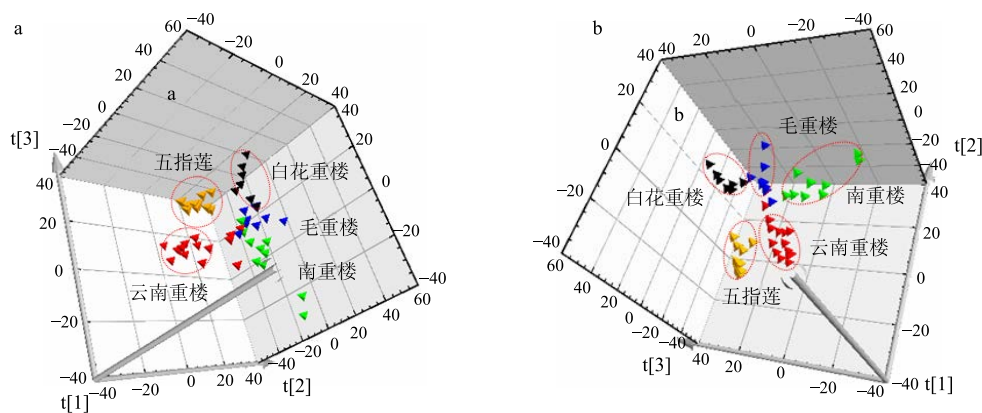


图 2 5 种不同重楼的 PCA (a) 和 PLS-DA (b) 三维得分图

Fig. 2 3D Scattered scores plot for PCA (a) and PLS-DA (b) of five species in *Paris* L.

3.3 HCA 和相关性分析

基于平方欧式距离,应用系统聚类中的 ward 聚类法对 5 种重楼属植物进行分析,建立亲缘关系树状图(图 3)。从结果可以看出,在距离系数为 15 处,5 种野生重楼可聚为 2 类,五指莲单独为一类,其余 4 种野生重楼聚为一类;在距离系数为 25 处,5 种野生重楼全部聚为一类。五指莲在距离为 1 处聚为一类,聚类效果最好;南重楼和毛重楼均在距离为 2 时聚为一类;大部分云南重楼在距离系数为 5 处聚为一类;白花重楼在距离系数为 5 处与云南重楼 1、2、3、5 号个体聚为一类。小部分云南重楼与白花重楼聚为一类,可

能是因为白花重楼和云南重楼均属于多叶重楼的变种^[23]。

向量夹角余弦法是评价相似度的计算方法将红外光谱数据相似性的问题转化为多维向量之间的相似度,两物种间向量夹角余弦值越接近 1,表明它们的关系越近^[24]。采用向量夹角余弦法对 5 个重楼近缘种进行相关性分析,结果见表 2。五指莲与其他种的野生重楼相关系数均低于等于 0.995,与系统聚类中五指莲单独聚为一类吻合,表明五指莲与其他种差异较大、亲缘关系远;其中相关系数最高(0.999)的有 3 组,分别为白花重楼-云南重楼、白花重楼-南重楼、南重楼-云南重楼,表明 3 种重楼

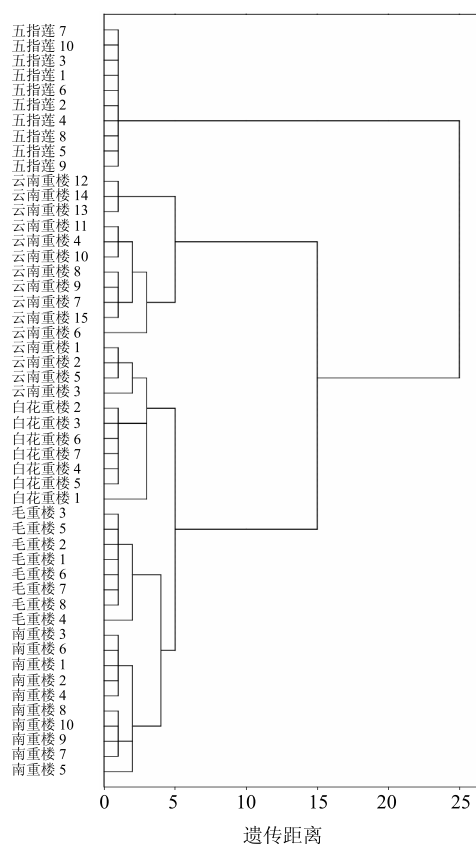


图 3 5 种不同重楼的 HCA 图

Fig. 3 Dendrogram for HCA of five species in *Paris* L.

表 2 5 种不同重楼的相似度分析

Table 2 Semblance analysis of five species in genus *Paris* L.

相似度	白花重楼	云南重楼	毛重楼	南重楼	五指莲
白花重楼	1.000	0.999	0.998	0.999	0.995
云南重楼		1.000	0.996	0.999	0.995
毛重楼			1.000	0.998	0.991
南重楼				1.000	0.993
五指莲					1.000

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 赵志勇, 高文远, 黄贤校, 等. 重楼植物分类学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 244-246.
- [3] Zhao Y, Kang L P, Liu Y X, *et al.* Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75(4): 356-363.
- [4] Zhao J, Mou Y, Shan T, *et al.* Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7961-7970.
- [5] Man S, Gao W, Zhang Y, *et al.* Characterization of steroidal saponins in saponin extract from *Paris polyphylla* by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(2): 495-505.
- [6] Zhang J Y, Shen T, Wang Y Z, *et al.* Chemical assessment of wild *Paris rhizome* from southwest China [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2012, 40(6): 2802-2807.
- [7] Wei J C, Gao W Y, Yan X D, *et al.* Chemical constituents of plants from the genus *Paris* [J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11(9): 1277-1297.
- [8] Zhang J Y, Wang Y Z, Zhao Y L, *et al.* Phytochemicals and bioactivities of *Paris* species [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(7): 670-681.
- [9] Li X, Chen Y, Lai Y, *et al.* Sustainable utilization of

间的亲缘关系较近; Wang 等^[25]从化学分类学的角度研究, 建议南重楼可代替云南重楼入药。但系统聚类中, 只有小部分云南重楼 (1、2、3、5 号) 在距离系数为 5 时与南重楼聚为一类, 其余的均在距离系数为 15 处才聚为一类, 这可能与云南重楼个体间的成分量的差异有关。毛重楼与云南重楼之间的相关系数为 0.996, 表明两者之间的差异较小或亲缘关系较近。综上所述, 5 种野生重楼夹角余弦相似度分析的结果与系统聚类结果相吻合。

4 讨论

本实验采用 FTIR 结合化学计量学对 5 种重楼属野生植物进行了亲缘关系分析。5 个近缘种红外光谱的峰形、峰位较为相似, 但毛重楼和五指莲与其他 3 个近缘种的化学成分和量存在一定的差异。红外光谱进行多元散射校正和二阶求导处理后进行 PCA 和 PLS-DA, PLS-DA 的分类结果优于 PCA, 能够更好地区分 5 个重楼属植物。HCA 及向量夹角余弦相关性分析能明确重楼属植物的亲缘关系, 云南重楼与白花重楼和南重楼亲缘关系最近, 其次是毛重楼, 最远的是五指莲。然而, 若要把白花重楼或南重楼作为云南重楼的替代药源, 需进一步对其药效成分及量进行测定分析。

- traditional Chinese medicine resources: Systematic evaluation on different production modes [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, doi: 10.1155/2015/218901.
- [10] 张朝阳, 赵庭周. 重楼资源再生策略及其关键技术环节探讨 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 319-323.
- [11] Amirabadizadeh H, Jafari A, Mahmoodzadeh H. Comparative morphology, anatomy and palynological studies of perennial species of *Onobrychis* (Fabaceae) in northeast Iran [J]. *Nord J Bot*, 2015, 33(2): 159-169.
- [12] 马 剑, 李迪强, 张于光, 等. 基于 matK 基因的几种重要重楼属植物遗传关系分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 18-21.
- [13] 刘 涛, 赵英良, 杨 莹, 等. 滇重楼的 psbA-trnH 条形码分子鉴定研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 758-762.
- [14] Li X, Yi S, Zheng Y, *et al.* Analysis of phylogenetic relationships of main citrus germplasms based on FTIR spectra of petals [J]. *Intell Autom Soft Co*, 2015, 21(3): 295-304.
- [15] Demir P, Onde S, Severcan F. Phylogeny of cultivated and wild wheat species using ATR-FTIR spectroscopy [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2015, 135(25): 757-763.
- [16] Cheng C, Liu J, Zhang C, *et al.* An overview of infrared spectroscopy based on continuous wavelet transform combined with machine learning algorithms: Application to chinese medicines, plant classification, and cancer diagnosis [J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2010, 45(2): 148-164.
- [17] McGoverin C, September D, Geladi P, *et al.* Near infrared and mid-infrared spectroscopy for the quantification of adulterants in ground black pepper [J]. *J Near Infrared Spec*, 2012, 20(5): 521-528.
- [18] 闫珂巍, 王 福, 梅国荣, 等. 基于近红外光谱技术快速定性鉴别广陈皮模型的建立 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3096-3099.
- [19] 李清玉, 司民真, 饶高雄, 等. 云南不同产地灯盏细辛总黄酮含量测定与红外光谱相关分析 [J]. 光散射学报, 2009, 21(1): 73-76.
- [20] 黄冬兰, 陈小康, 徐永群, 等. 三七炮制前后的红外光谱分析研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(7): 1849-1852.
- [21] Abdi H, Williams L J. Principal component analysis [J]. *Computation Stat*, 2010, 2(4): 433-459.
- [22] Bassbasi M, De Luca M, Ioele G, *et al.* Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data [J]. *J Food Comp Anal*, 2014, 33(2): 210-215.
- [23] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [24] Xing X, Li D. Identification and quality assessment of *Chrysanthemum* buds by CE fingerprinting [J]. *J Anal Methods Chem*, 2015, doi: 10.1155/2015/ 517402.
- [25] Wang Y, Gao W, Li X, *et al.* Chemotaxonomic study of the genus *Paris* based on steroidal saponins [J]. *Biochem System Ecol*, 2013, 48: 163-173.