

· 巴西草药研究专题 ·

基于性状—显微—DNA 条形码联用的巴西牛至属植物药 *HORTELA* 基原鉴定研究

余春霞 臧艺玫 顾选 吴浩忠 马长华 韩丽 刘春生 赵百孝

【摘要】 目的 利用性状—显微—DNA 条形码联用的方法对巴西牛至属植物药 *HORTELA* 进行基原鉴定研究。**方法** 应用性状鉴定的方法初步对药材进行真伪鉴别;再应用显微鉴定的方法验证性状鉴定结果;最后提取样品 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。**结果** 性状—显微—DNA 条形码综合分析结果表明,该样品为牛至属植物 *Origanum elongatum*(Bonnet) Emb. & Maire. 的干燥地上部分。**结论** *HORTELA* 可能为多基原植物类药材,其来源为牛至属 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. 和薄荷属 *Mentha rotundifolia* (Linn.) Huds. 干燥地上部分。

【关键词】 牛至属; 基原鉴定; DNA 条形码

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.009

The variety identification of *HORTELA* in Brazil based on a combined analysis of macroscopic-microscopic-DNA barcoding YU Chun-xia, ZANG Yi-mei, GU Xuan, et al. Henan Province for Drug Evaluation Certification Center, Zhengzhou 450004, China

Corresponding author: LIU Chun-sheng, E-mail: max_liucs@263.net

【Abstract】 Objective To study the variety identification of *HORTELA* of *Origanum* Linn. in Brazil with a combined analysis of macroscopic-microscopic-DNA barcoding. **Methods** Macroscopic identification was used to identify the authenticity of samples preliminarily; then the results was verified by microscopic identification; finally, ITS sequences were amplified by PCR and sequenced, and BLAST in NCBI (basic local alignment search tool) database was used to calculate the similarity of sequences to identify variety of samples. **Results** The combined analysis of macroscopic-microscopic-DNA barcoding indicated that *Hortela* collected from market in Brazil is the dried overground part of *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. **Conclusion** *HORTELA* may be a multi-source herb, which originates from the dried overground part of *Origanum elongatum*(Bonnet) Emb. & Maire and *Mentha rotundifolia* (Linn.) Huds.

【Key words】 *Origanum* Linn.; Variety identification; DNA barcoding

巴西草药 *HORTELA* 是巴西民族的常用药,作者在巴西市场收集药材样本时发现,*HORTELA* 被人们当做圆叶薄荷 *Mentha Rotundifolia*(又称为 *Mentha*

suaveolens)出售及使用,但初步观察其性状与圆叶薄荷并不完全相同,因此有必要对该药材进行基原鉴定研究。

传统的植物药鉴定有性状鉴定和显微鉴定等,二者的优点是简单、易行,不足之处是其主观性较强,且对属内近缘种药材的鉴别能力较差^[1-2]。DNA 条形码鉴定技术具有高效、准确、客观优点^[3-4],其中内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列应用最为广泛^[5-6]。本文提出性状—显微—DNA 条形码联用的方法对植物药进行鉴定,首先通过性状鉴定初步对药材进行真伪鉴别,再用显微鉴定的方法验证性状鉴定结果,然后

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 450004 郑州,河南省药品审评认证中心(余春霞);北京中医药大学中药学院[臧艺玫(硕士研究生)、顾选、吴浩忠、刘春生、马长华],针灸推拿学院(赵百孝),中医养生学研究所[韩丽(硕士研究生)];北京华邈中药工程技术开发中心(顾选)

作者简介: 余春霞(1972-),女,本科,工程师。研究方向: 中药制剂与分析。E-mail: ycxzzh@126.com

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

应用 DNA 条形码鉴定的方法,利用 NCBI 核酸数据库中已注册的 ITS 序列进行相似度分析,确定待测样品的品种。

本实验拟采用性状—显微—DNA 条形码联用的方法对巴西植物药 *HORTELA* 进行基原鉴定,为保证其质量及安全用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

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

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:695672BE);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-3000 PCR 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)等。

1.3 基于性状的鉴定方法

对 *HORTELA* 样品通过眼观、手摸、鼻闻、口尝等方法观察其形状、大小、颜色、表面特征、质地、折断面等的性状特征。

1.4 基于显微的鉴定方法

每份样品取 30 mg 研磨至粉末,取粉末少许,置载玻片上,滴加水合氯醛液,在小火上微微加热透化,加热时需续加水合氯醛液至透化清晰为度。为避免放冷后析出水合氯醛结晶,可在透化后加稀甘油少许,再加盖玻片。在显微镜下观察其显微特征。

1.5 基于 ITS 序列的 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 序列通用引物对样品进行 PCR 扩增,ITS-R:5'-CGTAA-CAAGGTTTCCGTAGGTGAA -3', ITS-F:5'-TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG -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,56℃ 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“基于 ITS 序列的鉴定方法”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。

2 结果

2.1 性状鉴定结果

本样品叶多皱缩卷曲,完全展平后呈阔卵形或阔椭圆形,有的为小碎末。长 0.5~1.2 cm,宽 0.3~1.2 cm。表面棕褐色或棕绿色,有 1 mm 左右的白色柔毛;叶背面棕灰色,柔毛较少,可见棕色小点密集,叶脉明显。叶端渐尖或钝形,基部截斜,全缘,有短叶柄。有特殊的清凉香气,味辛辣。茎呈方形,直径 1 mm 左右,褐色或棕黄色。叶对生,节略膨大。皮部易于木部分离,表面光滑。断面黄白色,髓中空。质脆。有特殊的清凉香气,味酸、涩、微苦。见图 1。

参考《中国植物志》的记载,可知本样品与圆叶薄荷 *Mentha rotundifolia* (Linn.) Huds. 的叶片大小、

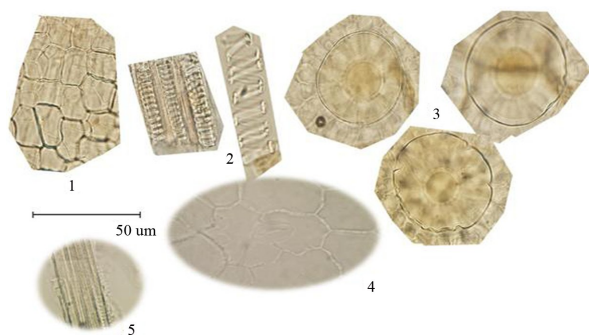
叶片边缘锯齿等性状特征均不相符合,样品与牛至属 *Origanum* 植物性状特征较为符合,但由于鉴定者经验有限,暂不能根据其性状对该样品进行准确鉴定。



图 1 巴西植物药 *HORTELA* 性状特征

2.2 显微鉴定结果

本品粉末呈棕黄色,其显微特征如下:薄壁细胞呈多角形;多为梯纹导管,有时可见螺纹导管;腺鳞头部 8 个细胞,柄部为单细胞;气孔直轴式;纤维成束。见图 2。



1. 薄壁细胞 2. 导管 3. 腺鳞 4. 气孔 5. 纤维

图 2 巴西植物药 *HORTELA* 的粉末特征图

由于显微特征专属性不强,且缺少参考资料,无法根据显微特征对该样品基原进行准确鉴定。

2.3 DNA 条形码鉴定结果

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 分析,样品 ITS 序列与牛至属植物 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. (GU381465.1)、*Origanum vulgare* (GU381469.1)、*Origanum dictamnus* (GU381464.1)、*Origanum majoranae* (JX162835.1)、*Origanum rotundifolium* (GU381463.1)、*Origanum scabrum* (EU252138.1)、*Origanum syriacum* (JX163036.1)、*Origanum virens* (EU252126.1)、*Origanum dayi* (GU381466.1)、*Origanum onites* (JX162994.1) 相似度在 97% 以上,其中,与 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. (GU381465.1) 的得分和相似度最高,达到 99%。而样品 ITS 序列与薄荷属圆叶薄荷 *Mentha rotundifolia* (Linn.) Huds. (AF369161.1) 的相

似度为 83.76%,远低于与牛至属物种相似度。

根据现有数据库,由于样品与 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. (GU381465.1) 序列相似度为 99%,且该物种在巴西分布^[7]。因此,鉴定该样品为 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire.,但目前暂无其性状及显微鉴定参考依据。

3 讨论

性状—显微—DNA 条形码联用的鉴定技术适用于无背景信息或背景信息不准确的植物药基原鉴定研究。第一步依据鉴定者的经验对样品进行性状鉴定,该方法经济、快速,可鉴别出性状特征明显的伪品;第二步通过显微鉴定方法提高性状鉴定结果的客观性。两种传统鉴定方法的联合对样品鉴定的准确性明显提高,但对于同属近缘种样品的基原判断仍存在困难,且有相当数量的植物药性状及显微特征未被记载,难以找到参考文献进行比对核实。鉴于此,本研究团队在传统鉴定方法的基础上,增加了第三步即 DNA 条形码鉴定方法,通过样品的 ITS 等序列分析对样品进行准确定种。性状—显微—DNA 条形码三种方法的联合实现了对样品的多层次鉴定,达到了植物类药材准确、客观、快速鉴定的要求。

本文研究表明,本次收集的 *Hortela* 样品的基原植物为 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. 而非圆叶薄荷 *Mentha rotundifolia* (Linn.) Huds.,故植物类药材 *Hortela* 可能存在同名异物现象。薄荷属植物含有薄荷醇 (Menthol)、香芹酮 (Carvone)、薄荷酮 (Menthone)、 α -蒎烯 (α -Pinene)、 β -蒎烯 (β -Pinene)、桉稀 (Sabinene)、柠檬烯 (Limonene) 等成分^[7-8],具有发汗、退热、抗炎、抗菌、镇痛、抗呼吸道过敏等作用^[7-9];牛至属植物主要含有香芹酚 (Carvacrol)、百里酚 (Thymol)、伞花烃 (Cymene)、 γ -松油烯 (γ -Terpinen) 等成分^[10-11],有抗菌、消炎、镇痛、调节免疫、扩张支气管等功效^[12-14]。牛至属植物与薄荷属植物药的化学成分有差异但功效基本相同,故推测 *Hortela* 为多基原植物类药材,其来源为牛至属 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. 和薄荷属 *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. 干燥地上部分,但该结论仍需进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] 季峰. 浅谈中药的性状鉴定[J]. 国医论坛, 2006, 21(6): 48.
- [2] 杜晔. 论中药鉴定四大鉴定方法[J]. 中国医药科学, 2012,

- 2(5):101-102.
- [3] 黄璐琦,肖培根,郭兰萍,等. 分子生药学:一门新兴的边缘学科[J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2009,39(12):1101-1110.
- [4] 冯彬彬,郑司浩,李亚康,等. 中药材威灵仙及其伪品 DNA 条形码鉴别研究[J]. 药学学报,2014,49(2):260-266.
- [5] 许亮,刘春生,杨燕云,等. DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):217-219.
- [6] 叶子,卢叶,王峰涛,等. 基于 ITS 序列鉴别石斛类药材[J]. 中国中药杂志,2014,39(20):3930-3935.
- [7] 俞桂新,周荣汉. 国产野生薄荷挥发油化学组分变异及其化学型[J]. 植物资源与环境,1998,7(3):13-18.
- [8] 夏秋香,李慧,白红彤,等. 6 种薄荷属植物精油含量及成分的研究[J]. 园艺学报,2012,39(S1):2756.
- [9] 栾世杰. 薄荷寒热药性考辨[J]. 环球中医药,2013,6(8):610-612.
- [10] 孙丽娟,刘红兵,范文乾,等. 牛至的化学成分研究[J]. 中草药,2007,33(12):1782-1785.
- [11] 朱斌,程向炜,刘迎新. 牛至油化学成分、药理活性及提取方法研究进展[J]. 中药材,2007,30(8):1038-1041.
- [12] D'Antuono L F, Galletti G C, Bocchini P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy)[J]. *Annals of Botany*, 2000, 86(3):471-478.
- [13] Hkarenral M. Reichling J, Geiss H K, et al. Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajeput oil, niaouli oil, Manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil[J]. *Pharmazie*, 1999, 54(6):460.
- [14] 周艳艳. 牛至浸膏对肠道运动及解热镇痛作用的实验研究[J]. 湖北中医学院学报,2001,3(3):22-24.

(收稿日期:2015-08-18)

(本文编辑:蒲晓田)