

枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别

丁小余^{1,2*}, 王峥涛¹, 徐红¹, 徐珞珊¹, 周开亚²

(1. 中国药科大学药学研究室, 江苏 南京 210038; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 建立枫斗类石斛的 rDNA ITS 区碱基全序列数据库, 利用该数据库对枫斗类石斛待检种进行准确鉴别。方法 对枫斗类石斛的 rDNA ITS 区进行了 PCR 扩增、测序, 运用 CLUSTAL, MEGA 等软件以及枫斗类石斛 rDNA ITS 区全序列数据库对待检种 rDNA ITS 区进行序列分析鉴别。结果 建立了 21 种枫斗类石斛的 rDNA ITS 区全序列数据库, 枫斗类石斛在该区的种间差异显著而稳定, 转换和颠换总数为 11 ~ 122, 变异位点数为 341, 信息位点数为 195。与外类群植物云南石仙桃间的差异较大, 转换和颠换总数为 131 ~ 161。枫斗类石斛居群间的差异较小, 转换和颠换总数为 0 ~ 6。结论 利用枫斗类石斛的全序列数据库及遗传分析软件, 通过对待检种 rDNA ITS 区进行序列测定, 可以成功鉴别属于数据库中枫斗类石斛的待检种。

关键词: 石斛属; 枫斗类石斛; rDNA ITS 区全序列; DNA 分子鉴别

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)07 - 0567 - 07

枫斗类石斛的种类繁多, 基源复杂, 历代本草著作称之为医工难辨之种类^[1]。《中国药典》只收载了铁皮枫斗一种(由铁皮石斛加工), 但在民间加工枫斗时几乎所有具柔软茎的石斛种均可用于枫斗的加工, 因此市场上出现了各种规格的枫斗。对于部分枫斗类石斛来说, 即使在鲜品状态下(无花、有时无叶), 依靠经典的鉴定方法仍难以准确进行种间鉴别, 因此所加工成的枫斗质量很难得到保障, 种的鉴别成为当务之急。

随着分子生物学的飞速发展, 植物 DNA 序列的种间差异不仅被用于分子系统学研究, 而且被用作鉴别种间差异的可靠证据^[2-6, 9]。高等植物核糖体 RNA 基因 rDNA 具有多拷贝的简单重复序列, 每个重复序列包含 1 个跨越 18S, 5.8S 和 26S rDNA 拷贝区的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS), 其中包括 5.8S RNA 基因。rDNA ITS 区的 DNA 序列已广泛用于种间、属间的分子系统学研究^[2-6], 同时也被运用于生药的种间鉴别^[7]。尽管兰科 50 个属的 ITS 序列已用于兰科的分子系统学研究, 但迄今为止, 除了作者对黄草类石斛进行过序列分析外^[15], 对枫斗类石斛的 rDNA ITS 区的序列分析研究仅限于曲茎石斛及其相似种^[14], 绝大部分枫斗类石

斛的 rDNA ITS 区序列尚未见报道。本文将对枫斗类石斛的 rDNA ITS 区序列进行测序及分析, 并建立它们的 rDNA ITS 区全序列数据库, 试图为准确进行枫斗类石斛种间鉴别提供可靠的 DNA 分子标记。

材 料 和 方 法

材料 通过对浙江枫斗加工地的实地调查以及有关文献的查证^[1], 我们发现: 在民间加工枫斗时, 几乎所有具有柔软茎的石斛种均可用于枫斗的加工, 枫斗名称及其所属的原植物种类归纳如下, 详见表 1。另外还有数种石斛属植物如: 伏牛石斛(*Dendrobium funiushanense*)、曲茎石斛(*D. flexicaule*)、罗河石斛(*D. lohohense*)、肿节石斛(*D. pendulum*)等植物柔软的茎也可用于加工枫斗, 但并没有明确的枫斗名称, 常充作各种规格的枫斗。由此可见, 枫斗类石斛的种类繁多, 基源甚为复杂。

实验所用的枫斗类石斛材料为 1999 年 6 月至 2000 年 11 月间采自我国石斛主产区: 云南、广西和贵州等地的原始森林以及安徽、浙江等省, 基本包括了我国用于加工枫斗的石斛种, 外类群植物云南石仙桃(*Pholidota yunnanensis*) 采自云南西双版纳。实验材料经中国科学院植物研究所吉占和教授及作者鉴定, 各居群材料详见表 2。除霍山石斛(*D. huoshanense*)、河南石斛(*D. henanense*)、伏牛石斛(*D. funiushanense*) 等少数种外, 其他枫斗类石斛各居群所测的个体数为 2 ~ 4 个。

收稿日期: 2001-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30171144)

* 通讯作者 Tel: (025) 6271651 (H), Fax: (025) 3598328,

E-mail: dingxynj@263.net

Table 1 Name of various “Fengdou” and their respective *Dendrobium* species

Name of “Fengdou”	Name of original plant
Tiepi Fengdou	<i>D. officinale</i>
Zipi Fengdou	<i>D. devonianum</i>
Shuicao Fengdou	<i>D. crystallinum</i>
Shuicao Fengdou	<i>D. aduncum</i>
Shuicao Fengdou	<i>D. aphyllum</i>
Shuicao Fengdou	<i>D. lituiflorum</i>
Shuicao Fengdou	<i>D. chrysanthum</i>
Shuidabang Fengdou	<i>D. pinnatifidum</i>
Tiepi bianlan Fengdou	<i>D. gratiotissinum</i>
Tiepi bianlan Fengdou	<i>D. wandinum</i>
Zipilan Fengdou	<i>D. cepidatum</i>
Zhumilan Fengdou	<i>D. falconeri</i>
Jizhualan Fengdou	<i>D. hercoglossum</i>
Tongpi Fengdou	<i>D. moniliforme</i>
Diaolan Fengdou	<i>D. loddigesii</i>
Xiaohuangcao Fengdou	<i>D. loddigesii</i>
Zipi Fengdou	<i>D. aduncum</i>
Jinhuodou	<i>D. huoshanense</i>

总 DNA 提取 取各种石斛新鲜的叶片或茎 0.1 g, 或用硅胶干燥的材料 0.05 g, 用无菌水冲洗干净, 在液氮中研成粉末, 部分材料根据 QIAGEN 试剂盒的使用指南进行总 DNA 提取。

其余材料的总 DNA 用 CTAB 法提取: 取石斛的鲜茎、叶约 1 g 或石斛的干燥茎、叶 0.2 g, 用研钵研磨成粉末状(在研磨过程中不断地添加液氮, 以冷冻组织)。将研磨好的组织粉末装入 1.5 mL 的离心管中, 每管约 0.1 g, 每份样品装 2 管以便重复实验。向每个离心管中加入 CTAB 抽提液 600 μL [含 2% CTAB, 1.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone, 聚乙烯吡咯烷酮), 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0, 使用前加入 0.2% 的 β -巯基乙醇, 60 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5~10 min], 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 45 min。接着加入体积比为 24:1 的氯仿-异戊醇 600 μL , 抽提 10 min。以 6 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 5 min, 取上清液再用氯仿-异戊醇重复抽提 1 次。小心吸取上清液并加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 约 1 h, 以沉淀 DNA,

或用异戊醇沉淀 DNA。以 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 轻轻倒掉乙醇。用 70% 乙醇清洗两次, 每次清洗后以 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 轻轻倒掉残留的乙醇。自然干燥管内的 DNA, 最后溶于 100 μL 的水或 TE 中。用 1%~0.8% 的琼脂糖进行电泳检测 (TBE 系统)。

PCR 扩增 根据 Emmanuel 等^[7] 对兰科植物 ITS 区的研究, 设计了一对用于石斛属 rDNA ITS 区的扩增引物 P1 和 P2, 序列如下: P1 为 5'-CGTAACAAGGT TTCCGTAGGTGAAC-3', 位于 18S 上; P2 为 5'-TTATTG ATATGCTTAAACTCAGCGGG-3', 位于 26S 上。由 P1, P2 所扩增的完整的 ITS 区如图 1 所示。PCR 扩增反应在 30 μL 的体系中完成, 反应液含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.3, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1% Triton X100, *Taq* 酶 1 U, 4 种 dNTP 各 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 两个引物各 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DNA 模板约 100 ng。反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行, 循环参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后经 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 2 min, 共 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 补齐, 以 DDH_2O 代替模板 DNA 作空白对照。

PCR 产物纯化 PCR 产物用 Wizard 或 Watson 试剂盒纯化, 按试剂盒操作指南进行。

DNA 序列测定 用 BigDyeTM 测序试剂盒进行测序反应, 测序反应的参数为: Mix 1 μL , 纯化后的 DNA 片段 15~45 ng, Primer 1.6 pmol, buffer 1.2 μL , DDH_2O 适量。测序反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 共 35 个循环。扩增产物纯化后用 TSR 10 μL 溶解, 热循环仪上变性 2 min, 移入全自动测序专用管, 用 ABI 310 全自动测序仪进行序列测定。

DNA 序列数据分析 ITS1 和 ITS2 的起止范围参照 GenBank 中兰科 ITS 范围, 所得 DNA 序列输入计算机后, 用 ClustalX 软件对位排列, 并辅以人工校对。用 MEGA 软件分析各样品 DNA 序列间的差异百分率和转换/颠换数。

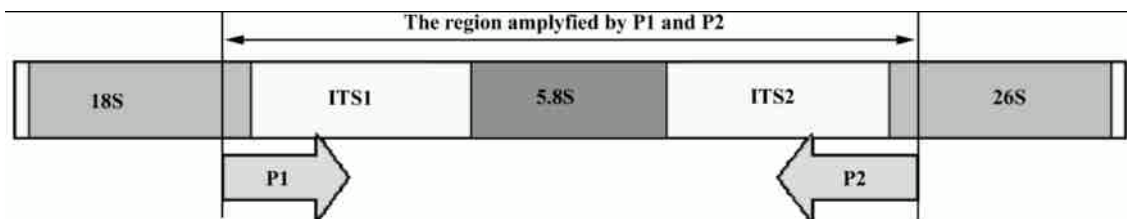


Figure 1 Structure of the whole ITS region which contains ITS1, 5.8S and ITS2. The primers P1 and P2 are used to amplify the whole ITS region

Table 2 Taxa included in the study of *Dendrobium* species

Name of species	Code	Herbarium No.	Number of individuals of each population	Total number of individuals of each species	Accession number in GenBank	Locality
<i>D. officinale</i>	DI - 1	XYD99001*	2	9	AF311776	Xilin, Guangxi
	DI - 2	XYD99002	2			Guangan, Yunnan
	DI - 3	XYD99003	3			Sandu, Guizhou
	DI - 4	XYD99022	2			Tiane, Guangxi
<i>D. miniliforme</i>	D2 - 1	XYD99005*	2	7	AF311777	Baise, Guangxi
	D2 - 2	XYD99026	3			Lijiang, Yunnan
	D2 - 3	XYD99006	2			Nanchang, Jiangxi
<i>D. crystallinum</i>	D3 - 1	XYD99030*	3	5	AF363023	Mengla, Yunnan
	D3 - 2	XYD99020	2			Tiane, Guangxi
<i>D. primulinum</i>	D4 - 1	XYD99031*	2	4	AF362913	Mengla, Yunnan
	D4 - 2	XYD99019	2			Mengla, Yunnan
<i>D. falconeri</i>	D5 - 1	XYD99011*	2	4	AF420246	Mengla, Yunnan
	D5 - 2	XYD99032	2			Mengla, Yunnan
<i>D. chrysanthum</i>	D6 - 1	XYD99012*	3	5	AF355572	Tiane, Guangxi
	D6 - 2	XYD99024	2			Sandu, Guizhou
<i>D. pendulum</i>	D7 - 1	XYD99013*	2	4	AF362912	Mengla, Yunnan
	D7 - 2	XYD99027	2			Mengla, Yunnan
<i>D. devonianum</i>	D8 - 1	XYD99009*	2	5	AF311779	Mengla, Yunnan
	D8 - 2	XYD99010	3			Mengla, Yunnan
<i>D. loddigesii</i>	D9 - 1	XYD99004*	3	6	AF311778	Simao, Yunnan
	D9 - 2	XYD99023	3			Baise, Guangxi
<i>D. lituiflorum</i>	DI0 - 1	XYD99014*	2	4	AF355571	Mengla, Yunnan
	DI0 - 2	XYD99032	2			Mengla, Yunnan
<i>D. huoshanense</i>	DI1	XYD99015*	2	2	AF355569	Huoshan, Anhui
<i>D. hercoglossum</i>	DI2 - 1	XYD99028*	2	5	AF363685	Mengla, Yunnan
	DI2 - 2	XYD99025	3			Simao, Yunnan
<i>D. wendianum</i>	DI3 - 1	XYD99017*	2	4	AF420245	Mengla, Yunnan
	DI3 - 2	XYD99034	2			Mengla, Yunnan
<i>D. lohohense</i>	DI4 - 1	XYD99018*	2	4	AF363024	Mengla, Yunnan
	DI4 - 2	XYD99033	2			Sandu, Guizhou
<i>D. aduncum</i>	DI5 - 1	XYD00001	2	4	AF314125	Rongjiang, Guangxi
	DI5 - 2	XYD00002	2			Rongjiang, Guangxi
<i>D. crepidatum</i>	DI6 - 1	XYD99008*	2	4	AF355574	Mengla, Yunnan
	DI6 - 2	XYD99021	2			Mengla, Yunnan
<i>D. gratiosissimum</i>	DI7 - 1	XYD99007*	2	4	AF311780	Mengla, Yunnan
	DI7 - 2	XYD99016	2			Xilin, Guangxi
<i>D. aphyllum</i>	DI8 - 1	XYD99029*	3	5	AF355573	Mengla, Yunnan
	DI8 - 2	XYD99035	2			Mengla, Yunnan
<i>D. flexicaule</i>	DI9 - 1	XYD00035*	2	3	AF355570	Nanyang, Henan
	DI9 - 2	XYD00038	1			Nanyang, Henan
<i>D. funiushanense</i>	D20	XYD00003*	2	2	AF479761	Funiushan, Henan
<i>D. henanense</i>	D21	XYD99032*	2	2	AF359254	Nanyang, Henan
<i>Pholidota yunnanensis</i> (as outgroup)	W01	XYD99037*	2	2	AF362911	Xishuangbannan, Yunnan

* For which sequences are deposited in GenBank

结 果

1 枫斗类石斛 rDNA ITS 区数据库中各序列的排序及分析

21 种枫斗类石斛以及外类群云南石仙桃 (*Pholidota yunnanensis*) 的 rDNA ITS 区全序列经 CLUSTAL 和 MEGA 软件排序后, 其对位排列的结果详见丁小余博士论文^[16]。铁皮石斛 (*D. officinale*) 的 4 个样本已根据各自的居群特征划分为枫斗型——F 型 (DI - 1, DI - 2, DI - 3) 和非枫斗型——H

型 (DI - 4) (作者已另文发表), 所测序列均已登录 GenBank, 详见表 2。21 种枫斗类石斛以及外类群植物云南石仙桃 (*Pholidota yunnanensis*) 的 rDNA ITS 全序列均经过 MEGA 软件进行对位排列, 结果在图 1 中已全部显示, 因此图 1 已构建了枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库, 该数据库基本包括了我国加工枫斗的石斛属植物种类。

枫斗类石斛在 rDNA ITS 区的种间差异显著, 变异位点多而稳定, 为 341 个, 其中信息位点丰富, 为 195 个, 说明 rDNA ITS 区用于枫斗类石斛的

种间鉴别是理想可靠的。经统计:枫斗类石斛种间的转换和颠换总数为 11~122,居群间的差异较小,转换和颠换总数为 0~6,而与外类群植物云南石仙桃间的差异较大,转换和颠换总数为 131~161,说明云南石仙桃作为外类群植物是合适的。枫斗类石斛 rDNA ITS 区种间的转换、颠换总数以及遗传距离见表 3。

在 21 种枫斗类石斛的测序过程中,绝大部分植物均测定了 2 个以上的居群样本,每个居群样本测试了 1~3 个个体(表 2),而霍山石斛、河南石斛、云南石仙桃(外类群植物)因材料限制,仅测定了单个居群的 1 个个体。rDNA ITS 区的全序列包括 ITS1, 5.8S 和 ITS2 3 个部分,其中 ITS1 和 ITS2 为非编码区,5.8S 为编码区。ITS1 与 18S 之间的界限以及 ITS2 与 26S 之间的分界线是经过参考 GenBank 中兰科植物相关属的 ITS 区全序列以及水稻、小麦等植物的 ITS 区全序列确定的。

2 利用枫斗类石斛 rDNA ITS 区数据库对待检种进行鉴别

运用枫斗类石斛 rDNA ITS 区数据库对待检种进行 DNA 鉴别的全过程可分为 3 个步骤:①首先将待检种的 rDNA ITS 区全序列测出。此过程包括待检种的总 DNA 提取、ITS 区的全序列扩增、PCR 产物的纯化、ITS 区的测序等过程。②利用 CLUSTAL, MEGA 等软件将待检种的序列与数据库中各枫斗类石斛的 rDNA ITS 区全序列进行分析比较。③序列间无差异的种或差异性最小的种即为该种枫斗类石斛的具体种。待检种将与所属种一起被聚类于同一分支上,且置信度为 100%。

运用此方法,作者已成功鉴别了隶属于枫斗类石斛的待检品 1, 2, 3 和 4(来自浙江乐清的枫斗加工地),它们分别是齿瓣石斛(待检种 1)、兜唇石斛(待检种 2)、铁皮石斛(待检种 3)和杯鞘石斛(待检种 4),这些种在无花无叶状态下是难以鉴别其种类的。各待检种的 rDNA ITS 区全序列经 CLUSTAL 和 MEGA 软件运算,在所构建的 NJ 树上与各自所属的石斛种聚类为同一支,与数据库中对应的石斛种在 rDNA ITS 区的序列上无差异,且置信度应为 100%。经 CLUSTAL 和 MEGA 软件构建的枫斗类石斛以及待检种 1~4 的 NJ 树如图 2 所示,该树也能为枫斗类石斛的分子系统关系提供重要的参考证据(作者将另文发表)。

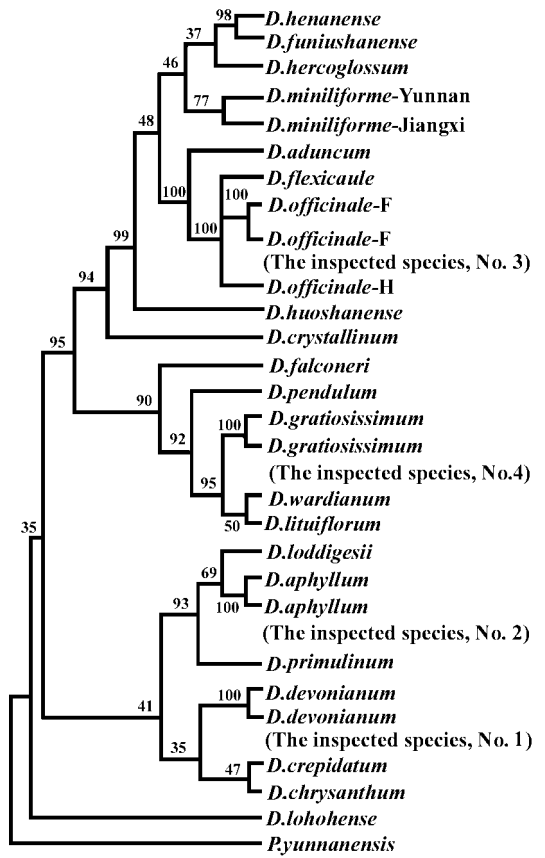


Figure 2 The NJ tree of 21 *Dendrobium* species of Fengdous and 4 inspected species

讨 论

rDNA ITS 区之所以成为被子植物系统进化与种间鉴别研究中的重要分子标记,主要基于以下两个原因:(1) rDNA ITS 区在核基因组中是高度重复的,而且通过不等交换和基因转换,这些重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化^[10],即不同 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致,这就为对 PCR 扩增产物直接测序奠定了理论基础^[11,12];(2) DNA 测序工作的难易程度及成本与 DNA 片段长度有密切关系。被子植物的 ITS 区长度比较稳定,包括 5.8S rDNA 在内,总长度只有 600~700 bp,为测序带来了很大方便。同时,ITS1 和 ITS2 分别位于 18S~5.8S rDNA 和 5.8S~26S rDNA,而 18S,5.8S 和 26S rDNA 的序列又非常保守,这样就可以用与它们序列互补的通用引物对 ITS 区进行 PCR 扩增、测序^[11,12]。而克隆测序前的 PCR 扩增可能会有一定的随机错误,如果所测克隆刚好是误扩增的序列或者是非主导性扩增产物,就会影响结果的准确性^[12,13]。本文所用的测序方法为 PCR 产物直接测序法,测序中所

Table 3 Numbers of transitions and transversions (above diagonal) and percent sequence divergence (below diagonal) of the *Dendrobium* species of various "Fengdou"

	D. officina le-H (1)	D. minilif orme-Yunnan (3)	D. minilif orme-Yunnan Jiangxi (4)	D. hoddi gesii (5)	D. gratiosissimum (6)	D. devo nianum (7)	D. cryst allinum (8)	D. huoshanense (9)	D. wardia num (10)	D. lituiflor um (11)	D. pend ulum (12)	D. falco neri (13)	D. crepi datum (14)	D. chrys anthum (15)	D. herco glossum (16)	D. hena nense (17)	D. aphyll lum (18)	D. primu linum (19)	D. lotho hense (20)	D. adun cum (21)	D. funiu shanense (22)	D. flexi caule (23)	P. yunnan ensis (24)
1	-	2	36	38	106	69	116	63	40	78	80	89	76	108	96	47	39	92	97	33	43	9	153
2	0.3	-	34	36	106	67	116	61	38	76	78	87	74	109	101	45	36	92	97	31	41	7	151
3	5.7	5.4	-	6	100	55	107	45	14	61	69	75	67	101	87	21	13	84	87	30	17	38	136
4	6.0	5.7	0.9	-	99	56	107	46	12	62	69	74	67	101	93	21	11	84	86	35	18	43	137
5	16.7	16.9	15.8	15.6	-	94	116	96	96	101	105	106	100	101	98	96	69	68	98	102	98	110	150
6	11.0	10.7	8.7	8.9	14.9	-	107	49	50	19	31	50	57	90	84	60	55	83	85	67	60	69	135
7	18.4	18.3	16.9	16.9	18.2	16.9	-	100	103	110	110	113	107	104	109	112	107	108	109	110	111	122	161
8	10.0	9.7	7.1	7.3	15.1	7.8	15.7	-	40	55	60	69	64	87	83	49	45	79	79	57	49	67	131
9	6.3	6.0	2.2	1.9	15.1	7.9	16.2	6.3	-	56	63	69	58	94	88	24	16	84	82	37	21	45	133
10	12.3	12.0	9.6	9.8	15.9	3.0	17.3	8.6	8.8	-	32	49	60	93	91	67	62	90	91	89	74	80	141
11	12.7	12.4	10.9	10.9	16.6	4.9	17.4	9.5	10.0	5.0	-	58	60	97	93	72	69	89	93	80	74	83	147
12	14.1	13.7	11.8	11.7	16.7	7.9	17.8	10.8	10.9	7.7	9.1	-	70	104	101	78	72	98	102	85	77	91	145
13	12.1	11.8	10.7	10.6	15.8	9.0	16.9	10.1	9.2	9.5	9.5	11.0	-	96	97	69	65	88	92	75	70	78	141
14	17.6	17.8	16.4	16.4	16.3	14.7	16.9	14.1	15.3	15.1	15.8	16.9	15.7	-	87	102	97	93	89	107	102	113	148
15	15.2	16.1	13.8	14.7	15.5	13.4	17.2	13.2	13.9	14.4	14.8	16.0	15.5	14.0	-	91	91	88	89	91	87	98	143
16	7.5	7.1	3.3	3.3	15.5	9.6	17.8	7.8	3.8	10.6	11.5	12.4	11.0	16.7	14.5	-	20	88	90	40	21	47	136
17	6.2	5.7	2.1	1.7	15.1	8.7	16.9	7.1	2.5	9.8	10.9	11.4	10.3	15.8	14.5	3.2	-	80	85	35	8	44	139
18	14.5	14.5	13.2	13.2	10.8	13.4	16.0	12.9	13.2	14.2	14.0	15.4	15.0	15.0	14.4	13.9	12.6	-	62	87	86	98	152
19	14.5	15.3	13.8	13.6	10.7	13.2	17.0	12.5	13.2	14.4	14.7	14.5	14.0	14.4	13.9	13.7	13.4	9.7	-	94	86	98	141
20	15.4	15.1	13.2	13.3	15.5	13.5	17.2	12.5	13.0	14.0	14.4	16.1	14.6	15.3	14.1	14.3	12.5	14.0	14.5	-	85	102	135
21	5.2	4.9	4.7	5.5	16.1	10.7	17.4	9.0	5.8	11.7	12.7	13.4	11.9	17.4	14.4	6.3	5.5	13.7	14.8	14.2	-	35	145
22	6.8	6.5	2.7	2.8	15.5	9.5	17.5	7.7	3.3	10.6	11.7	12.1	11.1	16.6	13.8	3.3	1.3	13.6	13.6	5.5	-	44	140
23	1.4	1.1	6.0	6.8	17.4	11.0	19.3	10.6	7.1	12.7	13.2	14.4	12.4	18.4	15.6	7.4	7.0	15.5	15.5	16.2	5.4	6.9	153
24	24.3	24.0	21.6	21.7	23.7	21.5	25.5	20.8	21.1	22.3	23.3	22.9	22.5	24.1	22.7	21.7	22.1	24.1	22.3	21.5	23.1	22.2	24.4

表现出的信号由处于主导地位的产物所决定的,因而可避免克隆测序导致的缺陷^[13]。另外,在枫斗类石斛的鉴别过程中,PCR产物直接测序比克隆测序更为简便且更具实用性;只有在PCR产物中非特异性条带较多且不容易消除时,才需进行克隆测序,但在本实验中并未出现这样的情况。

根据上述实验结果,我们发现:枫斗类石斛 rDNA ITS 区序列间的变异位点较多,为 341 个,且位点稳定,信息位点多达 195 个,同种枫斗类石斛居群间在该区的序列差异一般在 0~6 个碱基,但种间差异较大,一般在 6 个碱基以上(表 3)。枫斗类石斛种间的遗传距离呈现出不同情况,有些种间的碱基差异较小,如:河南石斛与细茎石斛间的转换和颠换总数只有 11~13,而曲茎石斛与铁皮石斛间更少,只有 7~9;有些种间的碱基差异则较大,如曲茎石斛与齿瓣石斛间的转换和颠换总数高达 122。外类群植物云南石仙桃与石斛属植物的各类群之间的转换和颠换总数都很大,均在 131 以上,最高达到 161,说明本实验选择石斛属的近缘属——石仙桃属中的云南石仙桃作为外类群是合适的。

在居群的变异上,铁皮石斛居群间的变异较小,只有 2 个碱基的变异,而细茎石斛居群间的变异稍大,达到 6 个碱基的变异,究其原因可能与细茎石斛与铁皮石斛的分布跨度存在差异密切相关。细茎石斛的分布范围较广,从中国云南最南部的热带到北部的河南省均有分布;而铁皮石斛的分布则从云南的北部开始才有分布,大多分布于广西、贵州等省区,因此,铁皮石斛分布上的南北跨度较细茎石斛小,成为细茎石斛较铁皮石斛居群差异大的重要原因。其他的石斛种类暂时没有测出居群间的差异,这可能与这些石斛的分布范围较窄、变异性较小相关。

本论文首次完成 21 种枫斗类石斛的 rDNA ITS 区全序列测序工作,并率先登录于 GenBank。

由于 rDNA ITS 序列能较好地反映石斛属植物的种间差别且具有较好的稳定性,因此,利用枫斗类石斛的 rDNA ITS 序列数据库鉴别石斛属植物及药材具有高度的准确性。在鉴别枫斗类石斛种时,我们已经完成了齿瓣石斛、兜唇石斛、铁皮石斛、钩状石斛等多种鲜品(无花、无叶状态下)的鉴别,并已经申请了专利(申请号为:01127062.4),这些鉴别均在原植物开花后得到验证,非常准确可靠。而在经典的鉴别中,秋季收购的枫斗类石斛药材往往需要在来年晚春开花时才能真正鉴别出,显然不能适应枫

斗类石斛鉴别的实际需要。由于高等植物 rDNA ITS 区的拷贝数极多,因而在应用过程中受材料总 DNA 降解的影响较小。随着 DNA 测序成本的降低,此方法将会更具实用性。

REFERENCES:

- [1] Bao XS, Shun QS, Chen LZ. *The Medicinal Plants of Dendrobium (Shi-hu) in China* (中国药用石斛) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001. 1-40.
- [2] Gu J, Hui DW, Zhuang BC, et al. Studies on rDNA ITS1 regions of soybean and its wild relatives [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, **36**:759.
- [3] Hui DW, Chen SY. Interspecific relationship of 12 species of *Glycine* constructed by the gene of rRNA [J]. *Sci Sin B* (中国科学 B 辑), 1997, **27**(4):327-333.
- [4] Wang JB, Zhang WJ, Chen JK. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1999, **37**(4):407-416.
- [5] Cai JN, Zhou KY, Xu LS, et al. Ribosomal DNA ITS sequences of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(1):56-59.
- [6] Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, et al. Sequencing of Cyt b gene fragments and PCR identification of "Jinqian Baihuashe" (*Bungarus parvus*) and its adulterants [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, **33**(12):941-947.
- [7] Zhao ZL, Zhou KY, Dong H, et al. Characters of nrDNA ITS region sequences of fruits of *Alpinia galanga* and their adulterants [J]. *Planta Med*, 2001, :67-68.
- [8] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M. A new approach for the identification of a Chinese traditional medicine "Chuanxiong" by 18S ribosomal RNA gene sequences [J]. *Phytochemistry*, 1996, **3**:387.
- [9] Douzery EJP, Pridgeon AM, Kores P, et al. Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequence [J]. *Am J Bot*, 1999, **86**(6):887-899.
- [10] Elder JR, Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes [J]. *Quant Rev Biol*, 1995, **70**:297-319.
- [11] Ainouche ML, Bayer R. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997, **40**(5):730-743.
- [12] Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots [J]. *Genome*, 1994, **37**(1):112-120.
- [13] Baldwin BG. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, **1**(1):13-16.

- [14] Ding XY, Xu LS, Xu H, *et al.* Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from its allied species of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868 - 873 .
- [15] Xu H, Li XB, Ding XY, *et al.* rDNA ITS sequencing of herba dendrobii (Huangcao) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(10): 777 - 783 .
- [16] Ding XY. Studies on authentication of Chinese crude drugs "Fengdou" made of stems of *Dendrobium* [A]. *Paper for Doctor's of China Pharmaceutical University* (中国药科大学博士学位论文) [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2001. 65 - 70 .

DATABASE ESTABLISHMENT OF THE WHOLE rDNA ITS REGION OF *DENDROBIUM* SPECIES OF "FENGDOU" AND AUTHENTICATION BY ANALYSIS OF THEIR SEQUENCES

DING Xiao-yu^{1,2}, WANG Zheng-tao¹, XU Hong¹, XU Lu-san¹, ZHOU Kai-ya²

(1. Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China ;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the whole rDNA ITS region sequence database of various *Dendrobium* species of "Fengdou" and to authenticate exactly the inspected species of "Fengdou". **METHODS** The rDNA ITS regions of various *Dendrobium* species of "Fengdou" were amplified and sequenced. The database of their rDNA ITS regions was established in order to authenticate the inspected species by means of the softwares of CLUSTRAL and MEGA which were used to analyze the rDNA ITS region. **RESULTS** A database of the rDNA ITS sequences of 21 species of *Dendrobium* has been established. The notable and stable differences of the interspecies of the rDNA ITS regions have been demonstrated. The numbers of transitions and transversions among 21 species are 11 ~ 122. The variable sites are 341 while the informative sites are 195. The ITS sequence differences between the outgroup species (*Pholidota yunnanensis*) and species of "Fengdou" are obvious. The numbers of transitions and transversions are 131 ~ 161. The population differences of the rDNA ITS region of various species of "Fengdou" are very small (0 ~ 6). **CONCLUSION** On the basis of the database of various *Dendrobium* species of "Fengdou" and two genetics software, the botanical origin of the inspected species of "Fengdou" has been authenticated successfully by sequencing the rDNA ITS regions.

KEY WORDS: *Dendrobium*; *Dendrobium* species of "Fengdou"; the whole sequence of rDNA ITS region; DNA molecular authentication