

中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析

徐红¹, 李晓波¹, 丁小余², 王峥涛^{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. 南京师范大学遗传资源研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 研究黄草石斛 ITS 片段遗传多样性, 分析该片段在黄草药材 DNA 分子鉴别和石斛属植物系统学研究中的意义。方法 用一对引物进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后用双脱氧终止法(Sanger dideoxy)测序。结果 获得核糖体 DNA 中 ITS 和 5.8S rDNA 完整序列, 14 个石斛类群的 ITS 1 与 ITS 2 序列的长度分别为 228 - 233 bp 和 242 - 247 bp。石斛种间 ITS 1 序列的差异百分率为 11.79% - 31.58%, ITS 2 序列的差异百分率为 10.29% - 25.30%, 金钗石斛种内 ITS 1 序列的差异百分率为 0.87%, ITS 2 序列无差异。石斛各类群与外类群的差异百分率 ITS 1 序列为 23.56% - 36.89%, ITS 2 序列为 26.52% - 33.31%。用 NJ 法根据 ITS 1 与 ITS 2 序列数据重建系统发生树。结论 两段序列在石斛种内保守, 在种间有较大的差异, 与外类群的差异最大, 可作为中药黄草石斛分子鉴定的标记, 而石斛属的系统发生关系尚须进一步研究。

关键词: 石斛属; 黄草; ITS 序列

中图分类号: R282.5; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)10-0777-07

中药石斛为贵重中药材, 应用历史悠久, 中国药典^[1]2000 年版收载为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo (*D. candidum* Wall. ex Lindl., Ch. P.), 石斛 *D. nobile* Lindl (金钗石斛, Ch. P.), 束花石斛 *D. chrysanthum* Wall. ex. Lindl. (黄草石斛, Ch. P.), 粉花石斛 *D. loddigesii* Rolfe (环草石斛, Ch. P.) 和流苏石斛 *D. finbriatum* Hook (马鞭石斛, Ch. P.) 的新鲜或干燥茎, 根据来源与加工规格的不同, 分别称为鲜石斛、枫斗和黄草, 其中黄草石斛, 因应用广泛, 需求量大, 成为目前商品流通中的主流。

石斛主要来自野生, 由于野生资源紧缺, 因此野外能采集到的石斛均被收购做药用, 不但使野生资源遭到毁灭性的破坏, 而且造成商品石斛的来源十分复杂。目前市场上流通的商品石斛中, 药典收载种类较少, 主流品种大多为非药典收载种。据资料记载和我们的实地调查, 共有 30 余种石斛属及部分石仙桃属 (*Pholidota* Lind. Ex Hook.)、金石斛属 (*Flickingeria* Hawkes) 和石豆兰属 (*Bulbophyllum* Thou.) 植物在市场上流通做石斛药用^[2], 这些植物的茎加工成药材后, 外形相似, 形态鉴别比较困难, 不仅如此, 石斛属植物种间的化学成分差异较大, 且

化学成分研究也不够深入, 用理化方法鉴定石斛药材种类十分困难。因此建立有效的中药石斛鉴定方法, 研究我国石斛属植物的种系关系十分必要。

DNA 分子标记技术已广泛的用于药用植物遗传多样性、系统学、分类学研究, 并逐渐渗透到中药材鉴定领域, 如人参、西洋参、沙参、蒲公英、党参、淫羊藿属、铁线莲属、蛇类、龟板和海马等的 DNA 分子鉴定研究^[3,4]。但有关中药石斛的研究尚未见报道, 本文首次报道了在商品市场上流通量大、常做为黄草药材使用的石斛属植物 13 种共计 14 个类群的 ITS 序列分析结果。

材 料 和 方 法

材料 新鲜药材叶片或干燥茎, 原植物经中国科学院植物研究所吉占和研究员及作者鉴定学名, 样品来源见表 1。

植物总 DNA 的提取 取新鲜叶片 100 mg 或干燥茎 50 mg, 加液氮研磨后, 使用 Dneasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国) 进行基因组总 DNA 的提取。

ITS 区片段的 PCR 扩增与产物纯化 ITS 的扩增引物参照 Emmanuel J. P. Douzery^[5] 等的引物设计, P18S3': 5'-ATT GAA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G-3'; P26S5': 5'-AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA G-3'。采用标准的双链 PCR 反应扩增核基因的整个 ITS 片段(5' 18S - 3' 26S, 包括 5.8S 编码区)。30 μL 反应体积含 10 × PCR buffer 3 μL, MgCl₂ (25

收稿日期: 2001-02-26。

作者简介: 徐红(1966-), 女, 讲师, 博士研究生;
王峥涛(1956-), 男, 教授, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (025) 5309639, Fax: (025) 5309639,
E-mail: Wangzht@mailbox.cpu.edu.cn

mmol·L⁻¹) 1.8 μL, dNTP mix (2 mmol·L⁻¹) 2.5 μL, P18S3' 与 P26S5' 引物各 1 μL (10 pmol·L⁻¹), Taq DNA polymerase (5 U·μL⁻¹) 0.2 μL, 1 μL 模板溶液 (DNA 约 70 - 80 ng), ddH₂O 适量。扩增反应在 Mastercycler gradient (Eppendorf, 德国) 上进行, PCR 反应参数为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 循环 30 次, 然后 72 °C 保

温 3 min, 反应结束后, 产物置 4 °C 保存。

PCR 产物用 Wizard™ PCR Preps DNA Purification System 进行纯化。

ITS 序列的测定 纯化后的 PCR 产物作为测序反应的模板, PCR 反应的引物直接作为测序引物, 采用双脱氧终止法 (Sanger dideoxy), 终端荧光标记, 进行 DNA 序列的测定。

Table 1 Samples used in the present study

Section	Taxon	Code	Locality	Voucher	GeneBank No.
Sect. Grastidium	<i>D. salaccense</i> (Bl.) Lindl.	ZHZ	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99013	AF362026
Sect. Chrysotoxae	<i>D. chrysotoxum</i> Lindl.	GCH	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99014	AF362023
	<i>D. thysiflozum</i> Lindl.	QH	Jinghong, Yunnan	Yun-99011	AF362032
Sect. Dendrobium	<i>D. hancockii</i> Rolfe	XYy	Kunming, Yunnan	Yun-99042	AF362025
	<i>D. aurantiacum</i> Rehb. f.	XAN	Kunming, Yunnan	Yun-99045	AF362044
	<i>D. brymerianum</i> Rehb. f.	CHS	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99028	AF362036
	<i>D. fibriatum</i> Hook.	LSy	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99031	AF362041
	<i>D. capillipes</i> Rehb. f.	DB	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99052	AF362035
	<i>D. nobile</i> Lindl.	JCI	Guangxi	G-2000-10	AF372039
	<i>D. nobile</i> Lindl.	JC2	Haikou, Hainan	Haif-98006	AF362037
Sect. Distichophyllum	<i>D. ellipsophyllum</i> T. Tang et F. T. Wang	FB	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99029	AF362033
Sect. Formosae	<i>D. caniferum</i> Rehb. f.	CHE	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99050	AF362027
Sect. Crumenata	<i>D. exile</i> Schltr.	JH	Xishuangbanna, Yunnan	Yun-99026	AF362024
Sect. Aporum	<i>D. acinaciforme</i> Roxb.	JY	Simao, Yunnan	Yun-99038	AF362034

序列数据的处理 DNA 序列的排序用 CLUSTAL X 软件完成; 排序后的序列使用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 1.02 分子进化遗传分析软件, Kimura-2 参数遗传距离 (Kimura-2 parameter genetic distance), 采用邻接法 (neighbor-joining method) 构建 NJ 系统树; 系统树各分支的置信度用自举检验法 (bootstrap test) 检验, 共进行 2000 次循环, 以评价各分支的系统学意义与可靠性。

结果与讨论

1 ITS 1 和 ITS 2 序列的长度与变异

根据兰科近缘种类群 (*Pholidota clemensii*, *Satyrium membranac*) 已报道的序列资料 (Genebank AJ000144, AF076730, AF076768) 确定核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS 1 和 ITS 2 与 3 个编码区 18S, 5.8S 和 26S 的界限 (图 1), 由于所测类群的 5.8S rDNA 较为保守, 本研究不作进一步的分析, PHC 为石仙桃属植物 *Pholidota clemensii*, 资料来自 GeneBank AF076730, AF076768。序列长度、GC 百分含量与信息位点见表 2 及图 1, 石斛各类群间在 ITS 1 与 ITS 2 序列长度上较为接近, ITS 1 长度为 228 - 233 bp, GC 含量为 43.8% - 56.6%, 信息位点 95 个, 占总位点 41.01%; ITS 2 长度为 242 - 247 bp, GC 含量为

48.8% - 58.7%, 信息位点 87 个, 占总位点 34.42%。不同种间的差异百分率 (碱基替换率, 见表 3) ITS 1 为 11.79% - 31.58%, 平均 20.47%; ITS 2 为 10.29% - 25.30%, 平均 17.67%。金钗石斛种内 ITS 1 序列差异百分率为 0.87%, ITS 2 序列没有差异。石斛种间和种内从差异百分率、信息位点上均表现出 ITS 1 的变异分布大于 ITS 2, 即 ITS 1 的趋异性大于 ITS 2, 这与大多数的被子植物相同^[6]。而来自近缘属石仙桃属的 *Pholidota clemensii* 与石斛属各类群间显示较大的差异, ITS 1 与 ITS 2 序列长度均小于石斛属植物, 分别为 225 与 239 bp, 与石斛各类群间的差异百分率 ITS 1 为 23.56% - 36.89%, 平均 25.50%; ITS 2 为 26.52% - 32.31%, 平均 27.37%, 趋异性表现为 ITS 1 小于 ITS 2, 与石斛属各类群及大多数被子植物不同。

2 ITS 1 和 ITS 2 序列在中药黄草石斛分子鉴定中的意义

在中药材的分子鉴别研究中, RAPD, AP-PCR 等 DNA 指纹图谱技术是应用较早的 DNA 分子标记技术, 但是这些方法对 DNA 模板质量要求高, 而中药材在加工储存过程中, DNA 常有不同程度的降解, 从而影响反应结果, 使试验的重现性较差, 因而限制了这些方法的广泛应用。DNA 序列分析技术, 通过

比较 DNA 分子中 4 种碱基序列排列的变化,反映生物体在遗传上的差异,即从 DNA 分子水平区分鉴别种类,不但直观性强,而且重现性好,目前已应用于中药材鉴定领域。

Table 2 Length and GC content of ITS 1 and ITS 2 sequences

Numble	Taxon	Length / bp		GC Content / %	
		ITS 1	ITS 2	ITS 1	ITS 2
1	ZHZ	233	244	49.8	49.6
2	GCH	233	245	52.8	55.1
3	QH	231	247	46.3	53.1
4	XYy	232	245	51.3	55.7
5	XAN	233	243	56.6	52.7
6	CHS	233	244	51.5	50.5
7	Lsy	230	242	50.0	51.3
8	DB	228	247	47.8	50.2
9	JCI	231	242	50.1	53.4
10	JC2	231	242	50.1	53.4
11	FB	232	247	55.6	58.7
12	CHE	230	243	52.6	52.3
13	JH	233	246	43.8	48.8
14	JY	233	244	47.2	52.1
15	PHC	225	239	51.1	57.3

进行中药材的 DNA 序列分析时,先选择合适的目的 DNA 分子片段。rDNA ITS 序列是近年来用于探讨植物种内变异和种间、近缘属间分子系统关系的重要分子标记之一,在不同植物类群中的应用价值不同。本研究将该序列用于中药黄草石斛的品种鉴定中,通过对 14 个黄草石斛类群和一个混淆品石仙桃的序列对位排列分析表明(图 1),ITS 1、ITS 2 序列信息位点丰富,不同种的石斛各类群均有多个特

异性的单核苷酸变异位点,流苏石斛、反瓣石斛、景洪石斛、剑叶石斛中各有一个特异性的双核苷酸变异位点,长苏石斛、短棒石斛、金钗石斛有两个特异性的双核苷酸变异位点;剑叶石斛中有一个特异性的三核苷酸变异位点;混淆品石仙桃的变异幅度最大,特异性的单核苷酸变异位点 26 个,双核苷酸变异位点 5 个,四核苷酸变异位点两个,且有数个多碱基缺失位点。因此通过比较这两段序列可以准确的鉴定每一种石斛药材及其混淆品(表 4)。各类群序列成对比较也表明,金钗石斛种内类群间碱基差异百分率低,分布于广西与海南两产地的金钗石斛 ITS 1 与 ITS 2 序列仅相差两个碱基;石斛种间各类群碱基差异百分率高,但显著的低于与混淆品石仙桃属植物 *Pholidota clemensii* 之间的差异百分率。因此,这种在种内保守,种间分化活跃,属间差异较大的 DNA 序列做为中药黄草石斛的分子标记是可行的。研究中所涉及的金钗石斛、流苏石斛是药典收载种类,球花石斛、翅萼石斛、鼓槌石斛、线叶石斛、长苏石斛、短棒石斛等是黄草药材流通中的常见种类,石仙桃属植物是商品石斛流通中的常见混淆品,因此取样具有代表性。从新鲜药材叶片或干燥茎中提取的 DNA 均能扩增出目的基因片段并能测出完整的序列,因此新鲜和干燥药材均能用此方法进行鉴定。今后随着该属植物及近缘属 ITS 序列数据的积累,能够鉴定的原植物、混淆品的种类也将陆续增多,在进行药材鉴定时,通过测定样品 DNA 序列,然后与数据库中各种序列的比较,就能确定该药材的基源种类,鉴别各种中药材。

Table 3 Genetic distances of ITS 1 (upper right) and ITS 2 (lower-left) sequences of 13 species in *Dendrobium* and the outgroup

Code	ZHZ	GCH	QH	XYy	XAN	CHS	Lsy	DB	JCI	JC2	FB	CHE	JH	JY	PHC
ZHZ		16.38	16.96	12.93	18.10	13.79	13.91	17.98	17.32	17.74	17.75	13.91	27.27	28.57	27.56
GCH	14.81		20.87	17.24	16.74	13.30	18.26	24.12	21.21	20.78	18.70	17.47	29.00	28.57	28.44
QH	20.16	13.47		16.52	23.48	18.26	13.91	20.18	21.40	20.96	15.65	13.10	23.81	24.68	25.78
XYy	14.81	13.93	16.73		16.38	12.07	12.17	17.11	17.32	16.88	15.22	11.79	25.10	26.41	23.56
XAN	10.74	13.17	14.40	11.52		13.93	19.57	25.88	21.65	21.21	20.43	18.78	31.17	32.03	28.00
CHS	12.35	12.30	14.75	11.89	10.29		14.78	21.93	16.88	16.45	15.65	13.97	27.27	28.14	25.78
Lsy	16.60	14.11	12.81	15.29	15.00	14.11		19.74	17.90	18.34	14.78	12.23	26.07	26.52	24.89
DB	19.34	20.82	17.81	21.22	18.93	20.08	21.48		25.55	25.55	22.81	18.50	31.58	30.70	26.22
JCI	16.60	18.60	19.42	17.36	17.43	17.36	17.57	24.38		0.87	19.21	19.74	29.57	30.00	27.68
JC2	16.60	18.60	19.42	17.36	17.43	17.36	17.57	24.38	0.00		18.78	19.30	29.13	29.57	27.23
FB	20.16	18.37	13.36	19.59	17.70	19.26	15.70	21.86	19.00	19.00		13.48	29.00	29.00	23.56
CHE	18.33	16.60	12.76	16.94	13.75	15.35	13.38	19.23	19.25	19.25	14.81		26.64	27.51	23.66
JH	21.07	21.81	19.18	23.04	20.74	19.42	18.75	25.30	22.50	22.50	21.63	18.70		15.45	36.00
JY	18.26	17.84	15.23	19.83	18.75	17.84	20.50	23.46	20.50	20.50	18.11	16.67	13.64		36.89
PHC	29.43	29.74	28.63	28.88	26.96	29.27	32.31	31.20	27.51	27.51	29.49	26.52	32.19	29.18	

Table 4 Numbers of different nucleotide site of ITS 1 and ITS 2 sequences of 14 taxa of *Dendrobium* and *Pholidota clemensii*

Numbers of base	ZHZ	GCH	QH	XYy	XAN	CHS	LSy	DB	JCl	JC2	FB	CHE	JH	JY	PH
1	12	17	13	11	13	6	12	21	9	9	13	11	15	12	26
2	-	-	-	-	-	2	1	2	2	2	1	-	1	1	5
3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

ITS 1															
ZHZ	TCGAGACCGA	AATATATCGA	GC <u>A</u> ATTTTGA	GAACCTGTCA	AAATAAGCGG	TGGATATTGC	TGCTGCG- <u>A</u> C								
GCHC.C.....	..G..C.....CA.....	...C.....A.	<u>G</u> ..C.. <u>A</u>AG..A								
QHA.A.....	..G.....G.. <u>G</u>AT.....AT	.T.C.T...T								
XYyC.....	..G.....TC.....A.....	..C.G.....T...T								
XANGC.....	.TG..C.....CA.....CC <u>G</u> C.....A.A								
CHSC.....	..G..C.....CA.....C.....A.T								
LSyC.....	..G.....G..T.....C.....TC.T...T								
DBG.....	..G.....G..G..T.....	CA.C.....T								
JClC.C. <u>A</u> T..	..G.....CA.....CC.G.A.-T								
JC2C.C. <u>A</u> T..	..G.....TA.....CC.G.A.-T								
FBC.....	..G.....G..C.....G.....	..C..C.T...T								
CHEC.....	..G.....G..C.....C.....	..C.....T								
JH <u>G</u> A.	A.G.....G..TA..A.	..T.....C.	..T.....A.	AT.....A								
JY <u>T</u> A <u>G</u>C.....	ATG.....G..	..T... <u>A</u> A.....	..C.....A.AT	AT.....A..A								
PHG... <u>C</u> G..C.- <u>G</u> ..A..	C.AC <u>A</u> G...C.	..TC.TA.-G								

ZHZ	A <u>T</u> AATCCATC	C <u>A</u> AGTCGTCG	CCTCATCCCA	TCTTCGGGGC	GGGGA- <u>C</u> GCG	ACGAAGGATG	GATGAACCTT
GCH	.A... <u>T</u>C..... <u>G</u> T.	<u>A</u> .C.T...TT.	..A.....	..C.....A
QH	GA. <u>C</u> G.....	.C.....TA-AT.C	C...A... <u>T</u> .	A...T...	<u>G</u> T.....A..
XYy	.A...G..	TC.....C	...T.....	...G.....	.T.....A..
XAN	. <u>A</u> G... <u>G</u> ..	.C..... <u>G</u> C..	G.C.T..... <u>C</u> <u>C</u>T..
CHS	.A.....	.C.A.TAC.A.....T.	.TA.....
LSy	.A.....	.C.....A.T.	.T...-AT.C	C... <u>T</u>T...	.T.....A <u>A</u> .
DB	<u>T</u> A..A.. <u>T</u> G..	.C.....A	T...-AT.C	C...T.....	...AG.....	.T.....	..A...A..
JCl	.A..... <u>C</u> T	.G...A...C	...T... <u>T</u>T.	.T.....
JC2	.A..... <u>C</u> T	.G...A...C	...T... <u>T</u>T.	.T.....
FB	GA..G.....	.C.. <u>A</u> T.. <u>C</u> T.-AT.C	C...G..... <u>G</u> ..T.	.T.....A..
CHE	.A.....	.C.A...T.-AT.C	C...G.....T...	.T.. <u>G</u> .. <u>T</u> ..	A...A..
JH	.G..G.....	.C.. <u>T</u> ..T..AA	T...CAT.C	C <u>A</u> .CGA.. <u>A</u>	.A.AT..AT.	.AT.....	.T...A.A
JY	.G..G.....	. <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> ..A.AACAT.C	C...CGA <u>T</u>A..T..AT.	.AT.. <u>T</u>A...A..
PHC	. <u>A</u> C..A.....	TC.A...T.	...T--T.T	CT..T... <u>G</u>	.A.. <u>C</u> .. <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u>	.T.....-A..

ZHZ	CAAACCGGCG	CAGCGTTG <u>T</u> G	CCAAGGGA- <u>A</u>	TATCAAACA	TGAGCC <u>T</u> AG	AATGGGTTTT	TGTGGCATTG
GCHC.C. <u>T</u>	..G.....A...A	... <u>A</u>	-...T.G.
QH	... <u>G</u>A.C.C. <u>A</u> .	..G.....TAG	G-... <u>A</u> ..G.
XYyA.C.C.C	..G.....	C.....A	-A...G.
XANC.C.A	A..TG.....	C...A...A	.. <u>A</u> .. <u>C</u> ..C.	-...T.G.
CHSC.C.C	..TG.....	C.....A	. <u>T</u> <u>C</u>	-...T.G.
LSyA..C.G.....	C.....C.AG	G-.....G.
DB <u>T</u>	.. <u>A</u> <u>T</u> A.C.C.A <u>T</u>CTAG	-.....G.
JCl	...T.....A.C.C.TG.....	CA...ATA	-... <u>G</u> .. <u>T</u> .
JC2	...T.....A.C.C.TG.....	CA...ATA	-... <u>G</u> .. <u>G</u> .
FB	...T.....C.C.G..G.....	C...A <u>T</u> .. <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>C.	G.....G.
CHEA.C.C. <u>T</u> .. <u>G</u>	.. <u>A</u> ..G... <u>T</u>TA <u>C</u> ..	G-.....G.
JH	<u>T</u>A.A.C.T.	A.. <u>A</u> G..G..	CA...TAG	A- <u>A</u>G.
JYA.C.C.T.	..G..G..	CA...ATAG	G-.....G.
PHC <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> ..C.A	.. <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> G..... <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>	-.....G.

ITS 2													
ZHZ	GGT <u>G</u> T <u>T</u> ATTG	CACGCCATAT	GGATTGATTA	CATCGCTCCA	TGTCAA- <u>G</u> TC	A-CCCTTCGA	TGGATGGGCT						
GCH	...C.GC..G...	.G.....G	... <u>C</u> ...C.G.....						
QH	...C.G...G...	TG.....T.GCTC.	.T...G.....	.. <u>T</u>						

Continue

XYy	T...C.T...G...	.G.....GA...	C.....A...T	C.....T.	
XAN	...C.G...	..T.....	...CG...	.G.....G	..C.....A.....C	
CHS	...C.G...	...T...CG..GGGA.T...T.	
LSy	...C.GC...	..TAG	.G.A...GGTC-	.T...A...T.	
DB	...A.....	..-T...G.G	TG.T.....	..C...CTC	.T...A...A.....A.	
JC1	...C.G.C.T	T.....T	T.....G	..C.T.....	T...A..C...T.T.	
JC2	...C.G.C.T	T.....T	T.....G	..C.T.....	T...A..C...T.T.	
FB	...C.G...CG	.G.A..T.GGCTC	.T...A...A.....C	
CHE	...C.....GG	.G.A...G	..C...CTC	.T.T...A...C	
JH	T...C.G...	.G.C.A...AT	TG.A...G	A...T.TTC	.T...G...T-T...T...	
JY	T...CCG...	.G.C...A	...CT	.G.A...G	A..T.TT	.T...A.A...T.....	
PHC	...C.G.CA	...-...G.	...AG..G	.G.....G	..C...CT	.GT...ACA...T.G...T.TC	
ZHZ	GGCGAAGGCT	TGGATGTGCA	CAGTGGCTCG	TCGTGCCACT	TGGTGC GGCG	GGCTGAAGAG	CGGGTCGTCA
GCH	...T...	C.....CC	...C..	C..CA.....	...T.....	...AA...
QHCGAC	C.....C	A.....A...
XYy	...C...CCC	C...CCA...A...
XAN	..T.....	C.....TCCCA.TA.T
CHSTTC	CA.CTT	T...A...
LSy	...GT	C.....CC	C..C...T	T	A...A...	A...A...
DBT	G.....T	...CAA	C.....C	...C.A	...T.T	...T.T
JC1	..C.....	C.....GCCGA..TA..T
JC2	..C.....	C.....GCCGA..TA..T
FB	..T.....	C.....G	GG.....C	C.....CGT...T...
CHE	..T.....	C.....T	G.....CG	C.....C	...T.....	T...A...	T...A...
JH	..AG.....T	G.....A	C...A	...T.....	T...A.AA...	T...A.AA...
JY	..AG.....GAG	C.....T	...A...A	...A...A
PHC	..TCG...C	C.....C	G.....CCAT	...T.....	...T.....
ZHZ	TCCTCTTGGC	CGCGAACAAT	AATGGGTGGA	TTAAAG---C	GATGCCTAAG	TTATTGTGT-	-GTGCAT-GC
GCH	..TCG.....	T.....T	.TG.....	.A..T	...T..T	A.....CCCC
QH	..TCG.....	T.....G	..G.....G	..G...TC	...T.....
XYy	..TCG...A	T...G.....	..G.....T	..G...TCCCC
XAN	..T.G.....	T...G-G	.A..C	..G...TCC
CHS	..TCG.....	T.....T	..G.....	.A...G	..G...TTT
LSy	..TCG.....	T.....T	..G.....	...T	A.G...TC	...AT-
DB	..TCAC	T.A.....	..C.....	..T	..G...TC	...AT-
JC1	..TCG.....	T..C.....	..G.....	...T	A.G...T	C.....C	AA.GC...
JC2	..TCG.....	T..C.....	..G.....	...T	A.G...T	C.....C	AA.GC...
FB	..TCG.CGG	...T	..G...GT	C.....C	...TGC...
CHE	..TCG.....	T.....G	A.....T	..GA...TC	...T...	...T...
JH	G.T.G.....	T.....GT	..G...GTC	..C.T	..C.T
JY	G.TCG.....	T.....GG	..G...GTC	..A.T	..A.T
PHC	..TCG.....	AAA...C	..G.....	..G...CTGT	..GCAGA	CCG...T.C	TT...T.G
ZHZ	CTAAGAGATG	ATTATACTT-	TTTAAGTGAT	CCCAATTCAT	GCGTCGATCC	ATGGATGACG	TTTTTGAAT
GCH	..CG.....	..C.....A	..C.G.....ACGGG
QH	TCG...AA.A	C.C.G.A...AA	C...G...	C...G...
XYy	...AG.GTGAC	..CA...GGG
XAN	...T	...A	...G	...A	...C	...G	...G
CHSTA	...GAAGGG
LSy	..T...A	..C...T	..GG.A...	..A..A...G	..GA.T	..GA.T
DB	ACC...AA	..C.G..C	..GC.A	..ACT	..A...G	..A...G
JC1	..G.....	GC...A	A...GGG	..A.C-	..A.C-
JC2	..G.....	GC...A	A...GGG	..A.C-	..A.C-
FB	..CG...GA	..C...TG	A.CGG...AC	..G...G	..G...G
CHE	..G...A	..CC-...T	A.C.G.A...AA	..A...G	..A...G
JH	..G...A	...G.A.T	G...G	..A..A...	..AC	TC...G	..G...G
JY	..CG...AT	..C..G-..	G.C.G...AC	..A...G	..A...G
PHC	..CG...AT	TACG...-	..C.C.G...	..G.CCCA	GC...G	GC...G

Figure 1 Alignments of ITS 1 and ITS 2 sequences of 15 taxa of *Dendrobium* and *Pholidota clemensii* (sequences of ITS 2 are black-type, dots indicate sequence identity with ZHZ, dashes denote deletion, bases on the dashes denote differential sites)

3 ITS 1 和 ITS 2 序列在石斛属植物系统学研究中的价值

由于 ITS 1 和 ITS 2 两个片段的长度有限,各自提供的信息量有限,因此多数研究者都是将这两个片段综合起来分析,为此,基于兰科石斛属 7 组的 14 个石斛类群及外类群石仙桃属 1 种的 ITS 1 + ITS 2 片段序列构建了石斛属植物分子系统树——NJ 系统树(图 2)。

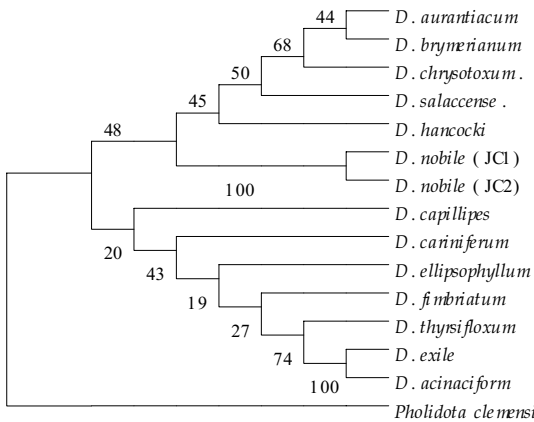


Figure 2 NJ systematic tree based on ITS sequences from 14 taxa of *Dendrobium* and 1 outgroup taxon of *Pholidota* (Bootstrap values are shown above the branches)

从图 2 可见,石斛属与石仙桃属的分化十分明显,各自为一单系树,来自石斛属的 14 个序列形成 3 个分支:a 支由石斛组 Sect. *Dendrobium* 的线叶石斛 *D. aurantiacum*、长苏石斛 *D. brynerianum*、细叶石斛 *D. hancockii*、金钗石斛 *D. nobile*、竹枝组 Sect. *Grastidium* 的竹枝石斛 *D. salaccense* 和顶叶组 Sect. *Chrysotoxae* 的鼓槌石斛 *D. chrysotoxum* 7 个个体构成;b 支为石斛组的短棒石斛 *D. capillipes*, c 支由石斛组的流苏石斛 *D. finbriatum*、黑毛组 Sect. *Formosae* 的翅萼石斛 *D. cariniferum*、顶叶组的球花石斛 *D. thysiflosum*、心叶组 Sect. *Distichophyllum* 的反瓣石斛 *D. ellipsophyllum*、基肿组 Sect. *Crumenata* 的景洪石斛 *D. exile* 和剑叶组 Sect. *Aporum* 的剑叶石斛 *D. acinaciforme* 6 个个体构成,其中金钗石斛的两居群形成一个高度稳定的分支,支持率为 100%;景洪石斛 *D. exile* 和剑叶石斛 *D. acinaciforme* 形成另一个高度稳定的分支。

有关石斛属植物形态学的研究,植物学家 F. Kranzlin 于 1910 年出版了在上世界上影响较大的兰科植物专著,收录石斛属植物约 600 种,属下分为 10 个亚属,27 个组。但后来很多兰科专家都未采用这

个属下等级安排,而认为 J. J. Smith(1905)的爪哇兰科植物志和 R. Schlechter(1919)属下等级的处理较合理。1953 年出版的马来西亚兰科植物, R. E. Holttum^[7]对本属的属下等级就是建立在 J. J. Smith 的基础上。1999 年我国植物学家吉占和等^[8]出版的中国植物志有关石斛属下等级的划分沿用了这个系统。而本研究根据石斛属内 ITS 序列资料建立的 NJ 系统树与该系统的属下等级划分有一定的分歧,NJ 系统树将来自石斛属下同一组的个体分在了不同的分支中,而来自不同组的个体又聚在了同一分支。

rDNA ITS 在核中是多拷贝的重复序列,大多数被子植物的 ITS 序列由于同步进化的力量,众多拷贝已高度相似或一致化,目前该片段已广泛的用于探讨植物种内变异和种间、近缘属间分子系统关系的研究,然而在不同的植物类群以及在不同分类等级上,ITS 序列的价值是不一样的,因为不同类群的起源时间及进化(分化)速率不一样,其 ITS 序列所含有的信息量也不同^[9],如对 *Fouquieria* (*Fouquieriaceae*) 11 种的研究中,信息位点比例为 6%,在沙参属中只有 3.9%^[10],而石斛属 ITS 1 序列种间信息位点比例为 41.01%;ITS 2 为 34.42%。由于本研究的植物类群覆盖了中国石斛属下 12 组中的 7 个组,取样具有一定的代表性,因此可以说,ITS 序列在石斛种间分化活跃,信息含量丰富,对于探讨石斛属下等级划分及种间亲缘关系具有一定的意义。但由于石斛属在兰科中是一个比较特殊的自然类群,植物高度进化,而 ITS 序列分析仅仅反映石斛属植物遗传背景的一方面,因此仅根据 ITS 序列研究石斛属种系关系是不够全面的,有关其系统分类与亲缘关系的研究尚需积累更多的 ITS 序列资料并结合其它 DNA 分析手段做出更科学的评价。

REFERENCES:

- [1] The State Pharmacopoeia Commission of the P. R. China. *Pharmacopoeia of the P. R. China* [M]. (Chinese Edition 2000, Vol). Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2000.70.
- [2] Ma GX, Xu GJ, Xu LS, et al. Survey and identification of commercial sample Shihu (*Dendrobium* Sw) (III) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (in Chinese), 1995, 26(7) :370 - 372.
- [3] Fu RZ, Shaw PC, Gao WY, et al. DNA technology and its prospect in the study of medicinal plant [J]. *Prog Biotech* (in Chinese), 1998, 18(4) :14 - 17.
- [4] Cao H, Liu YP, Shaw PC, et al. The status and prospects of DNA fingerprinting and sequencing in the study of Chinese

- drug quality [J]. *China J Chin Mater Med* (in Chinese) , 1998 , **23** :643 - 645 ,653 .
- [5] Douzery EJP , Pridgeon AM , Kores P , *et al.* Molecular phylogenetics of disease (Orchidaceae) : A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Am J Bot* , 1999 , **86** : 887 - 899 .
- [6] Baldwin ED , Sanderson MJ , Porter JM , *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA : A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard* , 1995 , **82** :247 - 277 .
- [7] Tsi ZH . A preliminary study of the orchid genus *Dendrobium* Sw. in China [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (in Chinese) , 1980 , **18**(4) :427 - 449 .
- [8] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae sinicae Edita . *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M] (Tomus 19) . Beijing : Science Publishing House , 1999 .67 - 146 .
- [9] Wang JB , Zhang WJ , Chen JK . Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (in Chinese) , 1999 , **37** :407 - 416 .
- [10] Ge S , Schaal BA , Hong DY . Reevaluation of the status of *A. lobophylla* based on its sequence , with reference to the utility of its sequence in *Adenophora* [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (in Chinese) , 1997 , **35** :385 - 389 .

rDNA ITS SEQUENCING OF HERBA *DENDROBII* (HUANGCAO)

XU Hong¹ , LI Xiao bo¹ , WANG Zheng-tao¹ , DING Xiao-yu² , XU Luo-shan¹ , ZHOU Kai-ya²

(1 . Department of Pharmacognosy , China Pharmaceutical University , Nanjing 210038 , China ;
2 . Institute of Genetic Resource , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China)

ABSTRACT: **AIM** To study the genetic diversity of ITS sequences of *Herba Dendrobii* (Huangcao) and analyze the utility of ITS sequences in molecular authentication of *Herba Dendrobii* (Huangcao) and phylogenetic of *Dendrobium*. **METHODS** The ITS gene fragment was amplified using a pair of primers . The PCR products were purified and sequenced by the methods of Sanger Dideoxy . **RESULTS** The DNA sequence of 228 - 233 bp ITS 1 , 242 - 247 bp ITS 2 gene fragments and 5.8S rDNA were obtained from 14 samples of *Dendrobium*. The interspecific substitution varies from 11.79 % to 31.58 % at ITS 1 and 10.29 % to 25.30 % at ITS 2 . The intraspecific substitution of *D. nobile* is 0.87 % at ITS 1 and without difference at ITS 2 . The substitution between *Dendrobium* and outgroup varies from 23.56 % to 36.89 % at ITS 1 and 26.52 % to 33.31 % at ITS 2 . The phylogenetic tree based on ITS 1 and ITS 2 data was set up . **CONCLUSION** The ITS 1 and ITS 2 gene fragments were highly conservative at intraspecific level in *Dendrobium*, while they were less conservative at interspecific level in *D. nobile* . They were least conservative between *Dendrobium* and outgroup . Hence , the sequence of this fragment is a good molecular marker for authentication of the Huangcao . But , further study is necessary for the phylogenetic of *Dendrobium*.

KEY WORDS: *Dendrobium*; *Herba Dendrobii* (Huangcao) ; ITS sequences