

铁皮石斛及其混伪品的 rDNA ITS 序列分析与鉴别

张蕾, 邱道寿, 蔡时可, 邓瑞云, 罗焕明, 刘晓津*

(广东省农科院作物所, 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东广州 510640)

摘要 [目的]从分子水平上实现对铁皮石斛及其混淆品快速准确的鉴别。[方法]通过对铁皮石斛及其混淆品的 rDNA ITS 区序列进行分析, 计算遗传距离, 并采用邻接法构建 NJ 系统树。[结果]8 个来自不同产区的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列全长 636 bp; 铁皮石斛及其 6 个常见混淆品药材 ITS 序列长度范围为 636~641 bp, 其中 ITS 区(不包括 5.8S)片段长度为 483 bp, 含信息位点 60 个(12.4%), 变异位点 185 个(38.3%); 各样品间遗传距离范围为 1.108%~2.594%, NJ 系统树也表明铁皮石斛与其混淆品的亲缘关系较远。[结论]ITS 序列可对铁皮石斛及其混淆品进行快速简便的鉴别。

关键词 铁皮石斛; 混淆品; rDNA ITS 序列; DNA 分子鉴别

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02872-03

The Genuine and Adulterants Identification of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS Sequences Analysis

ZHANG Lei et al (Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement of Guangdong Province, Crop Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract [Objective] To accurately identify *D. officinale* and its adulterants on the molecular level. [Method] Through the analysis of rDNA ITS sequences of *D. officinale* and its adulterants, the genetic distance was calculated, and a NJ systematic tree was established by the neighbor-joining method. [Result] The results showed that the full length of rDNA ITS regions of 8 *D. officinale* samples from different producing areas was 650 bp, the length of ITS sequences (not including 5.8 s) of *D. officinale* and its 6 adulterants varied from 598 bp to 601 bp. Of 483 total sites in ITS1 and ITS2, 60 were informative sites (12.4%), 185 were mutable sites (12.4%). The distance between *D. officinale* and its adulterants was 1.108% to 2.594%. The NJ trees also indicates the relationship and differences of *D. officinale* and its adulterants. [Conclusion] It was concluded that ITS sequence can be used to discriminate between *D. officinale* and its adulterants rapidly and accurately.

Key words *Dendrobium officinale*; Adulterants; rDNA ITS region; DNA molecular authentication

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 又称黑节草, 为兰科多年附生草本植物。据《本草纲目》记载, 铁皮石斛具有“主治伤中、补五脏虚劳、强阴益精、厚肠胃、补内绝不足、平胃气、长肌肉、益智除惊、轻身延年之功效”^[1], 现代药理研究也表明, 铁皮石斛具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、降血糖、提高免疫功能等作用, 在治疗恶性肿瘤、胃肠道疾病、糖尿病、白内障、关节炎及慢性咽炎等疾病方面有很好的疗效^[2-4]。野生铁皮石斛生长于树林中树干上或石灰岩地区岩石上, 在海拔达 1 600 m 的地区也可生存^[3], 在我国主要分布于浙江、云南、广东、贵州等地。由于铁皮石斛生长周期缓慢, 极难存活, 资源稀少, 但临床疗效显著, 所以铁皮石斛及其制品枫斗的价格一直居高不下。不少不法商贩为谋取暴利, 将石斛属其他种的石斛加工为枫斗, 替代铁皮枫斗。其中, 钩状石斛、齿瓣石斛、重唇石斛、美花石斛、细茎石斛、短棒石斛等因其原植物及药材与铁皮石斛较为相似, 常被加工后冒充铁皮石斛进入市场。目前, 传统的性状鉴别方法以性状、显微及理化鉴定为主, 受环境条件、加工炮制方法、取样等因素影响, 具有很大的变异性和随意性^[5-6], 因此, 迫切需要寻找一种快速、简便、可靠的鉴别方法对原植物及成品进行鉴别, 这有利于铁皮石斛的资

源保护及综合开发利用, 并为其成品的安全及疗效提供保障。

近年来分子生物技术飞速发展, 植物 DNA 序列已被用作鉴别种间及种内差异的可靠证据。rDNA 内转录间隔区(internal transcribed sequence, ITS) 序列为 rDNA 基因中 18S rDNA、5.8S rDNA 与 26S rDNA 之间的基因间隔序列。ITS 区具有很高的可变性, 为物种鉴定提供了丰富的变异位点和信息位点^[7-8], 目前已广泛应用于中药材及其混淆品的分子鉴别, 如高良姜、花椒、当归等^[9-11]。为探讨不同产区铁皮石斛 DNA 水平上的差异, 笔者采集了 7 个不同产区的铁皮石斛样品, 通过 PCR 直接测序技术, 对不同产地铁皮石斛的 rDNA ITS 基因进行测序分析研究, 以期对铁皮石斛的分子鉴别、种质资源研究及药材的引种和栽培提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。试验所用石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 采自我国铁皮石斛生产区广东、浙江、云南等地(表 1), 当年移植于广东省农业科学院南药资源圃。供试材料为采集于南药资源圃的新鲜叶片, 保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.1.2 主要试剂和仪器。DNA 提取采用 BioTeke 植物 DNA 大量提取试剂盒; 用于 PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Ladder 等购于 TaKaRa 公司; 试验所用扩增引物序列由英潍捷基贸易有限公司合成。主要仪器: 紫外检测器(UV-2450, 日本岛津公司); PCR 扩增仪(C1000, 美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统(INFINITY-1000, 法国 VL 公司)。

基金项目 广东省科技计划项目(2011A030100002); 广东省教育产学研结合项目(2011B090400537, 2012B091100168); 广东省农科院院长基金项目(2011109)。

作者简介 张蕾(1987-), 女, 中国台湾人, 研究实习员, 硕士, 从事岭南药材资源收集鉴定与评价工作, E-mail: vipz08@163.com。* 通讯作者, 研究员, 从事作物品种选育、推广和科技管理工作, E-mail: lxj6306@yahoo.com.cn。

收稿日期 2013-02-25

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取。称取铁皮石斛叶片 1 g,置于研钵中加入液氮充分碾磨成细粉,然后采用 BioTeke 植物 DNA 大量提取试剂盒提取铁皮石斛基因组 DNA,最后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和岛津紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,并将其浓度稀释至 50 ng/ μ l,置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 铁皮石斛及其混伪品的采集地点

样品序号	样品名	采集地
NYT1	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	广东省潮州市饶平县
NYT2	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	广东省广州市华南植物园园区
NYT3	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	广东省广州市华南植物园园区
NYT4	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	浙江省温州市乐清县
NYT5	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	浙江省温州市乐清县
NYT6	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	云南省玉溪市
NYT7	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	云南省德宏州芒市
NYT8	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	云南省德宏州芒市
NYD1	钩状石斛 <i>Dendrobium aduncum</i>	云南省保山市腾冲县
NYD2	齿瓣石斛 <i>Dendrobium devonianum</i>	云南省保山市龙陵县
NYD3	重唇石斛 <i>Dendrobium hercoglossum</i>	广西省百色市
NYD4	美花石斛 <i>Dendrobium loddigesii</i>	广西省百色市
NYD5	细茎石斛 <i>Dendrobium moniliforme</i>	浙江省温州市
NYD6	短棒石斛 <i>Dendrobium capillipes</i>	浙江省温州市

1.2.2 ITS 序列扩增和产物纯化。参照相关文献对兰科石斛属植物的研究^[12],设定 PCR 扩增引物 ITS1 为:5'-CGTAA-CAAGCTTTCGTTAGGTGAAC-3', ITS2 为 5'-TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG-3',PCR 扩增反应各组分参数为:10 \times buffer 2.5 μ l (含 Mg²⁺),200 μ mol/L 的 dNTPs, *Taq* DNA 聚

合酶 1.0 U,引物 0.5 μ mol/L,DNA 模板 50 ng,用灭菌 ddH₂O 补足至 25 μ l。

基本扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 复性 2.0 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。以 ddH₂O 代替 DNA 作空白对照,PCR 产物用 AXYGEN 试剂盒纯化。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳时电压为 4 V/cm,电泳缓冲液为 1 \times TAE。电泳完成后用 Goldview 染色,在凝胶成像系统下检测并拍照。

1.2.3 DNA 序列测定。采用双脱氧终止法 (Sanger dideoxy) 测序,每个样品均双向测序,由英潍捷基贸易有限公司完成。测序仪器为 ABI 3730 测序仪及配套的 BigDye Terminator v3.1。

1.2.4 数据分析。用 DNAMAN 软件对序列进行对位排列,手工适当校正以尽量减少所需缺失的数目,得到的序列用 MEGA 3.1 分子进化遗传分析软件分析;根据 Kimura - 2 参数遗传距离 (Kimura - 2 parameter genetic distance) 法计算各样品间的遗传距离值;采用邻接法构建 NJ 系统树,系统树各分支的置信度用自展检验法 (bootstrap test) 检验,共进行 1 000 次循环,以评价各分支的系统学意义与可靠性。

2 结果与分析

2.1 ITS 区 PCR 扩增结果 铁皮石斛及其混伪品 rDNA ITS 区的 PCR 扩增电泳结果如图 1 所示,扩增条带清晰,无拖尾,无非特异条带,片段大小在 750 ~ 1 000 bp 之间,为保证测序结果的准确性,对 PCR 产物进行纯化后再进行测序反应。

2.2 ITS 长度与 GC 质量分数比较 试验中 8 个来自不同

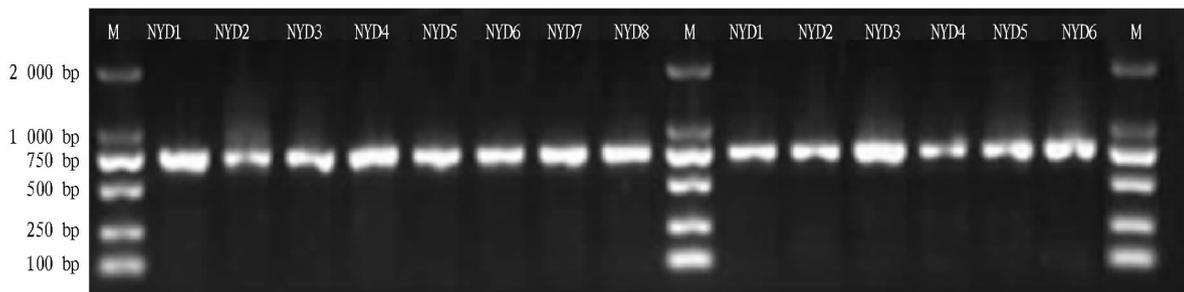


图 1 rDNA ITS 区 PCR 扩增电泳图谱

地区铁皮石斛样品的 ITS 序列 (包括 5.8S) 长度均为 636 bp (表 2),其中 5.8S rDNA 序列高度一致。而 6 个铁皮石斛常见混伪品的 ITS 序列 (包括 5.8S) 长度范围为 636 ~ 641 bp,其中 5.8S rDNA 序列与铁皮石斛样品也存在较大差异。

2.3 rDNA ITS 序列差异 来自 3 个产地的 8 个铁皮石斛样品的 rDNA ITS 序列中,5.8S 编码区及 ITS 2 非编码区的序列都很保守,而 ITS1 非编码区存在细微的差异。而铁皮石斛及其 6 个混伪种,在 5.8S 编码区序列存在 12 个位点的差异 (表 3),且多为 C - T 间的颠换,有 2 个位点 (123 位及 137 位) 是 A - G 间的颠换,而 ITS1、ITS2 区差异更加显著,ITS1 区同源率为 89.12%,存在 101 个位点的差异;ITS2 区的同源率为 89.46%,存在 99 个位点的差异。

2.4 变异信息 8 个铁皮石斛样品 ITS 序列间只存在细微的碱基差异,因此随机选择样品 NYT1 ITS 序列与 6 个铁皮石斛混伪品样品,对其变异信息进行比较 (表 4)。由于铁皮石斛 5.8S rDNA 片段较为保守,因此不适合选入进行遗传位点变异信息的分析,仅选取 ITS1 及 ITS 片段进行研究。由表 4 可知,ITS 区片段长 483 bp,有 291 个保守位点,占总长度的 60.3%,其中 ITS1 及 ITS2 区的保守位点分别占 59.6% 和 60.9%;ITS 区共有 185 个变异位点,占总长度的 38.3%,其中 ITS1 区的变异位点所占比例高于 ITS2 区;ITS 区共有 60 个信息位点,其中 ITS1 区和 ITS2 区的信息位点数量分别为 32 和 28;ITS1 区的转换/颠换比值为 1.828,高于 ITS2 区 (1.193)。

表2 铁皮石斛及其混淆品 ITS 区的序列长度及 GC 质量分数

样品	ITS(含 5.8S)		ITS1		5.8S		ITS2	
	长度//bp	G+C//%	长度//bp	G+C//%	长度//bp	G+C//%	长度//bp	G+C//%
NYT1	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYT2	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYT3	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYT4	636	52.20	231	50.22	163	57.67	242	50.41
NYT5	636	52.20	231	50.22	163	57.67	242	50.41
NYT6	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYT7	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYT8	636	52.36	231	50.65	163	57.67	242	50.41
NYD1	636	53.30	231	51.08	163	58.28	242	52.07
NYD2	641	49.61	234	44.87	163	57.67	244	48.77
NYD3	636	53.62	231	50.65	163	58.28	242	53.31
NYD4	636	52.20	231	50.22	163	57.67	242	50.41
NYD5	636	53.77	232	52.59	163	58.28	241	51.87
NYD6	638	50.94	228	47.81	163	57.06	247	49.80

表3 铁皮石斛及其混淆品 5.8S 编码区的序列差异

样品	变异位点											
	4	60	65	89	122	123	131	136	137	146	148	156
NYT1 ~ NYT8	C	C	T	C	C	A	C	T	A	T	C	C
NYD1	C	C	T	C	C	G	C	T	A	T	C	C
NYD2	T	C	C	T	C	G	C	C	A	T	T	C
NYD3	C	C	T	C	T	G	C	T	G	T	C	C
NYD4	C	C	T	C	C	G	T	C	A	C	T	T
NYD5	C	C	T	C	T	G	C	T	G	T	C	C
NYD6	T	T	C	C	T	G	C	C	A	T	C	T

表4 ITS 区变异信息比较

序列	保守位点	变异位点	信息位点	Singleton 位点	Si/sv
ITS1	140/235(59.6)	92/235(39.2)	32/235(13.6)	60/235(25.5)	1.828
ITS2	151/248(60.9)	93/248(37.5)	28/248(11.3)	64/248(25.8)	1.193
总数	291/483(60.3)	185/483(38.3)	60/483(12.4)	124/483(25.7)	1.468

注:括号中数据为该位点所占比例,单位为%。

2.5 遗传距离 比较样品 NYT1 ITS 序列与 6 个铁皮石斛混淆品样品的遗传距离(表 5),发现各样品间遗传距离范围为 1.108%~2.594%,混淆品与 NYT1(铁皮石斛)样品间遗传距离从大至小排列为:美花石斛、细茎石斛、重唇石斛、短棒石斛、齿瓣石斛、钩状石斛、遗传距离依次为:2.316、1.875、1.808、1.462、1.321、1.108。

表5 铁皮石斛 NYT1 及其混淆品遗传距离的比较

样品	NYT1	NYD1	NYD2	NYD3	NYD4	NYD5	NYD6
NYT1	-						
NYD1	1.108	-					
NYD2	1.321	1.483	-				
NYD3	1.808	2.413	1.276	-			
NYD4	2.316	2.338	1.401	2.091	-		
NYD5	1.875	2.581	1.368	1.825	2.594	-	
NYD6	1.462	1.618	1.220	1.558	1.870	1.768	-

2.6 进化树 对铁皮石斛样品及其混淆品的 rDNA ITS 区碱基序列进行聚类分析,并采用邻接法构建 NJ 系统树,结果见图 2。8 个不同产地的铁皮石斛样品单独聚为一支,自展值

为 99%,其余 6 个铁皮石斛混淆品则聚在别处。在铁皮石斛这一支中,来自浙江的铁皮石斛样品与来自云南及广东的样品存在细微区别。在铁皮石斛混淆品中,钩状石斛(NYD1)与铁皮石斛亲缘关系最近,重唇石斛(NYD3)与细茎石斛(NYD5)的亲缘关系较近。短棒石斛(NYD6)及齿瓣石斛(NYD2)与铁皮石斛的亲缘关系最远,分别聚为一支。

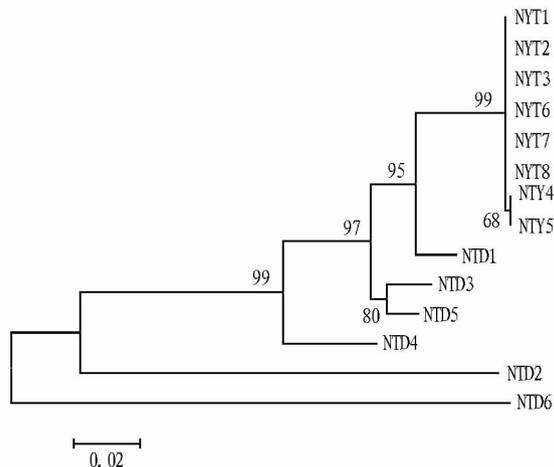


图2 利用邻接法构建的 NJ 系统树

3 讨论

目前铁皮枫斗市场混杂,真假难辨,造成使用上的混乱,因此,为控制铁皮石斛药材的质量,确保铁皮石斛药效的安

(下转第 2888 页)

地区大别山地区山野菜资源不明、种植栽培规模不大、贮藏保鲜难以安全化等难题,填补黄冈地区大别山野菜资源开发利用的空白,为大别山野菜的开发利用提供技术支持,扩大黄冈地区山野菜人工栽培种植面积,实现黄冈地区山野菜栽培种植规模化,加工生产产业化。

3.4 树立“旗杆”,做强做大龙头企业 通过优惠政策招商引资建设大中型野生蔬菜加工企业,或在现有常规蔬菜加工企业增加野生蔬菜生产线,扩大野生蔬菜加工产能,提高加工设备档次,改进工艺,扩大加工规模,做大野生蔬菜龙头企业,实行公司+农户经营模式,带动野生蔬菜开发,与产地农民签订产销合同,明确供应数量、质量标准、服务承诺、收购价格,引导农民采管结合、长短结合。在野生蔬菜集中产地可以成立专业合作社,实行公司+合作社+农户的经营模式。龙头企业还要改进包装,加强野生蔬菜品牌创建,创造出省级知名品牌。要积极开拓市场,切实改变黄冈地区野生蔬菜“养在深闺人不知”的状况,大胆走出去,挤占大城市市场。

3.5 精深加工,提高产值 山野菜的营养价值是多方面的,除了食用味道鲜美外,还具备营养保健功能和治病防病功能,如野生食用菌类具有防治高血压、癌症及心血管病等^[10],故除了要开发野生蔬菜的食用价值外,还要开发野生蔬菜的营养价值和医药价值,加深开发力度,充分实现野生蔬菜的综合价值。另外,在对野生蔬菜成分深入了解的基础上,还可利用高新技术提取出天然色素、香料、果胶、淀粉以

及其他有用化学成分,用以开发功能性营养保健食品和药品。如马齿苋含有去甲肾上腺素 250 mg/kg 以及二羟基、香豆精、黄酮、强心苷等药物成分^[11]。

利用现代科技对野生蔬菜进行综合加工和深加工,充分发挥野生蔬菜多用性的优势,提高其利用率,将野生蔬菜加工成饮料、保健口服液或野生蔬菜复合产品,使产品系列化、多样化。

参考文献

- [1] 汪兴汉. 野生蔬菜的开发与利用[M]. 北京:中国农业出版社,2002:1-3.
- [2] 赵恒田,王新华. 我国野菜资源人工开发利用及可持续发展[J]. 农业系统科学与综合研究,2004,20(4):300-303.
- [3] 蔡虹,刘金铜. 太行山区山野菜植物资源与开发利用探讨[J]. 中国生态农业学报,2002,10(1):90-92.
- [4] 潘文维,罗庆熙,刘建福. 三峡库区野菜资源现状及开发利用前景[J]. 西南园艺,2000,28(4):26-27.
- [5] 袁玉霞,厉天有. 豫南大别山区森林野菜资源开发利用研究初报[J]. 中国林副特产,2000(1):44-45.
- [6] 袁玉霞,许家明,厉天有,等. 豫南大别山森林野菜资源名录[J]. 中国林副特产,2001(4):57-58.
- [7] 王广印,刘会超. 河南省野菜资源开发利用探析[J]. 中国生态农业学报,2002,10(4):127-128.
- [8] 闵运江,刘文中,刘乃富. 皖西大别山区野菜资源及其开发利用[J]. 中国林副特产,2004(3):44-48.
- [9] 方元平,项俊,张颖. 鄂东大别山野生植物资源及其开发利用[J]. 安徽农业科学,2007,35(4):1085-1086.
- [10] 吕贵学,王菊兰,王月梅. 绿色保健与野菜开发利用[J]. 甘肃农业,2002(6):37.
- [11] 王红卫,程月琴,王玲. 河南省野菜资源及开发利用[J]. 南都学坛:自然科学版,1999,19(6):56-57.

(上接第2874页)

全性和有效性,迫切需要寻找一种高效准确的铁皮石斛鉴别方法。李兆奎等^[6]通过比较不同石斛的红外光谱来鉴别铁皮石斛与其他4种常见混淆品,但该方法易受环境条件、加工方法和取样等因素的影响。近年来ITS技术已广泛应用于中药材的道地性研究及种间分子鉴别,由于其在核基因组中高度重复,不同ITS拷贝间的序列趋于相近或完全一致,而且被子植物的ITS区长度比较稳定,包括5.8S rDNA,总长度只有600~700 bp,为测序带来了很大方便。该试验8个来自不同地区的铁皮石斛样品ITS序列(包括5.8S)长度均为636 bp,且各样品间的遗传距离较小,表明样品间的遗传变异较小。铁皮石斛及其6个混淆品药材的ITS区段变异丰富,含大量信息位点,其中ITS1区信息位点多于ITS2区。所有样品间遗传距离范围为1.108%~2.594%,远大于铁皮石斛种内各样品间的遗传距离。NJ系统树中,6个混伪品明显与铁皮石斛样品聚在不同的分支,说明它们之间有明显的遗传差异,表明该试验方法可作为快速准确鉴别铁皮石斛及其混伪品的有效方法。

参考文献

- [1] 邸淑菊. 铁皮石斛产业化的调查研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(11):

137-138.

- [2] 屠国昌. 铁皮石斛的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 海峡药学,2010,22(2):70-71.
- [3] ZHOU G, LV G. Comparative studies on scavenging DPPH free radicals activity of flavone C-glycosides from different parts of *Dendrobium officinale* [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2012, 37(11):1536-1540.
- [4] SUN Z R, WANG M Y, ZHANG H G, et al. Comparison of Stomatal Characteristics between *Dendrobium loddigesii* and *Dendrobium candidum* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(8):1161-1165.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:265.
- [6] 李兆奎,孙彩华,李美琴,等. 铁皮石斛与几种常用混淆品的红外光谱鉴别[J]. 海峡药学,2005,17(3):91-93.
- [7] 牛宪立,姬可平,吴群,等. rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中的应用[J]. 生物信息学,2009,7(4):268-271.
- [8] KANG H M, BAI J, CHEN K, et al. Phylogenetic Relationships of *Caragana* (Fabaceae) by the Use of nrITS Sequences [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(1):36-39.
- [9] 庞启华,严萍,赵树进,等. 高良姜及其混淆品 rDNA ITS 序列的分析与鉴别[J]. 华南理工大学学报,2009,37(6):63-68.
- [10] 沈洁,丁小余,张卫明,等. 花椒及其混淆品 rDNA ITS 区序列分析与鉴别[J]. 药学报,2005,40(1):80-86.
- [11] 张春,王晓丽,朱焯,等. 中药当归及其混伪品 rDNA ITS 序列分析与鉴别[J]. 四川农业大学学报,2011,29(2):218-224.
- [12] DOUZERY E J P, PRIDGEON A M, KORES P, et al. Molecular phylogenetics of disease (orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86(6):887-899.