·综述·

石斛资源分子水平研究进展

丁鸽[1*]，张代臻[2]，丁小余[3]
（1. 盐城工学院 化学化工学院，江苏 盐城 224003；
2. 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室，江苏 盐城 224002；
3. 南京师范大学 生命科学学院，南京 210046）

［摘要］ 石斛作为我国传统中药材，具有养阴生津、润肺明目、抗癌防老等显著功效，有着广泛的分布和悠久的应用历史。随着分子生物学技术的发展，石斛属药用资源的研究进展迅速，分子标记技术具有微量、快速、特异性强、准确可靠等特点，为石斛资源的研究提供了新的方法。通过选用 RAPD，ISSR，AFLP，SRAP 等不同分子标记的结合使用，对石斛不同种类之间的遗传多样性及亲缘关系进行分析，获得的遗传信息，可以为濒危的石斛资源的保护及开发利用提供理论依据。核基因、线粒体基因、叶绿体基因的结合应用，可以有效便捷地鉴定石斛正品，为进一步发展中药材特异性分子鉴定提供科学依据。同时不同基因片段序列的联合运用，可以作为石斛鉴别 DNA 条形码的分子标记，将为石斛类药材的鉴定提供新的思路和方法，有效提高石斛属植物的鉴定速度和效率。该文从分子鉴定，DNA 序列，石斛功能基因等方面进行论述，为石斛属药用植物的进一步开发应用提供理论基础，同时也为石斛属植物的有效保护和可持续开发提供科学依据。

［关键词］ 石斛；分子标记；DNA 条形码；遗传多样性
［中图分类号］ R282；R931；P968；G353.11 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2018)04-0208-08
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040208
［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1444.008.html
［网络出版时间］ 2017-11-25 14:44

Molecular Level of *Dendrobium* Resources

DING Ge[1*], ZHANG Dai-zhen[2], DING Xiao-yu[3]
(1. *School of Chemistry and Chemical Engineering*, *Yancheng Institute of Technology*, *Yancheng* 224003, *China*; 2. *Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bio-resources and Environmental Protection*, *Yancheng* 224002, *China*;
3. *School of Life Science*, *Nanjing Normal University*, *Nanjing* 210046, *China*)

[**Abstract**] As a traditional Chinese medicinal herb, *Dendrobium* has significant effects in nourishing yin and generating body fluid, benefiting lung and eyes, resisting cancer and prolonging life, thus with a wide distribution and a long history of application. With the development of molecular biological technology, studies on *Dendrobium* medicinal resources have advanced rapidly. DNA marker technology has the characteristics of micro-scale and high velocity, specificity, accuracy and credibility, and provides a new method for studies on *Dendrobium* resources. The genetic diversity and genetic relationship among different species of *Dendrobium* were analyzed based on combined use of RAPD, ISSR, AFLP, SRAP and other molecular markers. The genetic information obtained from these studies could be used for the conservation and development of *Dendrobium* resources. The combined application of nuclear gene, mitochondrial gene and chloroplast gene can identify *Dendrobium* effectively and accurately, and provide scientific basis for the further development of specific molecular identification of traditional

［收稿日期］ 20170730(012)
［基金项目］ 江苏省自然科学基金项目(BK20171276)
［通信作者］ *丁鸽，博士，副教授，从事药用植物资源多样性研究，Tel：0515-88298429，E-mail：dingzyc@163.com

Chinese medicinal herbs. At the same time, the combined use of different gene sequences can be taken as molecular markers of DNA barcode of *Dendrobium*, which will provide new ideas and methods for the identification of *Dendrobium* herbs, and improve the identification speed and efficiency of *Dendrobium* species effectively. In this paper, molecular identification, DNA sequences, functional genes of *Dendrobium* genus were discussed, in order to provide the theoretical basis for the further development and application of the medicinal plants, as well as scientific basis for the effective protection and sustainable development of *Dendrobium*.

[**Key words**] *Dendrobium*; molecular marker; DNA barcoding; genetic diversity

石斛是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)的珍稀濒危植物,在我国有 74 种 2 变种[1],主要分布于广西、广东、贵州、云南、福建、浙江、江西、湖南、安徽等省的山区。早在《神农本草经》中石斛药材就被列为上品,应用历史悠久,具有养阴生津、润肺明目、抗癌防老等功效[2]。2005 年版《中国药典》[3]中收载了 5 种石斛,分别为铁皮石斛、粉花石斛、金钗石斛、流苏石斛、束花石斛。石斛的药用部分是新鲜或干燥茎,是制作“脉络宁注射液”、“石斛夜光丸”、“复方清咽宁”等复方中药的重要原料[4]。民间将石斛称之为“救命仙草”,又因其稀少濒危、市价昂贵,有“植物软黄金”之称。

石斛在每年的 4,5 月份开花,种子细如粉尘且不具胚乳,没有营养物质供发芽之用,生长发育完全依赖共生真菌提供营养[5];种子成熟后保持发芽力的时间又很短,所以在自然状态下自我繁殖能力较低[6]。石斛通过风力传播繁殖,从种子萌发到进入商品阶段需 2~3 年。石斛曾广泛分布于我国的亚热带地区[7-8],但由于其特殊的生长环境和自身繁殖特点以及近几十年来的人为过度采挖,已经使铁皮石斛资源急剧减少[9-10],面临濒危的现状。

近年来关于石斛的多糖鉴定及活性、功能研究[11-13]、生物碱研究[14-15]、组织培养[16-17]、种质资源鉴定[18-19]等领域研究内容较多。司华阳等[20]对霍山石斛多糖的分离鉴定及药理活性相关研究进展进行概述,为霍山石斛多糖的进一步研究奠定基础。陈晶[21]对金钗石斛生物碱的作用进行分析论述,涉及神经系统、心血管系统、内分泌系统及消化系统多个方面,为临床应用及基础研究发展奠定了坚实的药理学基础。袁颖丹等[22]对铁皮石斛组织培养过程中种子无菌萌发、外植体诱导、原球茎发生、增殖与分化进行综述,建议可以通过遗传变异、单倍体诱导、离体开花授粉等非常规育种方式,快速培育优良品种,或者在进行组织培养研究时,直接以组织培养物替代原药材使用。李桂琳等[23]对齿瓣石斛的植物学性状、生物学习性、显微鉴别、成分分析等种质资源鉴定进行分析,可为齿瓣石斛的进一步开发利用提供参考。本文在不同种类石斛研究的基础之上,对药用石斛的分子鉴定,DNA 序列,石斛功能基因等分子生物学方面研究进展进行总结,为石斛属药用植物的研究提供理论基础,也为进一步保护和利用石斛资源提供科学参考。

1 分子鉴定

1.1 随机引物 随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是 Williams 等[24]发现的一种检测核苷酸序列多态性的方法,此方法以 PCR 为基础,不必预先知道 DNA 序列的信息。RAPD 只需要 1 个引物,长度为 10 个核苷酸,引物序列是随机的,因此可以在基因组序列未知的情况下对研究对象进行扩增。RAPD 标记技术具有简便快速,具有广泛性和通用性,DNA 需要样品量少等优点[25],在石斛的研究中得到了广泛应用。张铭等[26]对石斛属的不同物种进行 RAPD 分析,并获得可以鉴别铁皮石斛的特异性引物。丁鸽等[27]对铁皮石斛的 8 个野生居群的 RAPD 反应体系进行构建及优化,筛选获得 10 个引物对野生居群进行分子指纹图谱研究,发现 S412 引物可以准确鉴别出铁皮石斛的野生居群并获得了不同居群的特异性条带。包英华等[28]利用 8 条 RAPD 引物对不同产地美花石斛进行鉴定,引物 S2108 产生的特异位点可以鉴别不同居群。张建勇等[29]选用多态性好的引物对石斛属 16 个种进行 RAPD 扩增,得到多态性带 118 条,多态性比率为 83.1%,可以为石斛属的系统学研究提供分子依据。任羽等[30]利用 RAPD 技术对石斛种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行分析,发现 10 种石斛之间遗传相似度为 0.356~0.676。构建 UPGMA 聚类树可以将不同的物种区别开来,证明 RAPD 标记技术可以从分子水平较好地揭示石斛资源之间的遗传关系。DING 等[31]采用 RAPD 技术对铁皮石斛的 9 个野生居群进行遗传多样性分析,16 个引物的扩增数据表明,铁皮石斛的遗传多样性为 89.33%。21.12% 的遗

传分化发生在居群间,基因流数值为 0.440 6,这些都与铁皮石斛的繁育特点及人类对此珍贵资源的过度开发利用、生境破坏有关。由此可见,RAPD 技术是对石斛属药材真伪性及来源鉴定的有效方法,为石斛属植物资源的开发利用提供了新途径。同时,基于 RAPD 分析获得的遗传多样性数据,为石斛属的物种保护奠定了基础,同时也为其他珍稀濒危植物的保护提供了理论依据。

AP-PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction),即任意引物聚合酶链式反应,由 Welsh 等[32]报道,所使用的引物长度通常为 10 ~ 50 bp,技术原理和特点与 RAPD 类似,差别在于扩增过程的退火温度要求不同,结果分析在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行[33]。AP-PCR 在操作过程中不需预知序列资料,且检测的基因组样本是任意的,可用于检测物种的多态性。金国虔等[34]利用 10 种 AP-PCR 引物对 4 种霍山来源石斛的遗传多态性进行分析,扩增获得的片段多态性为 66%,显示出霍山来源石斛种类具有较高的多样性。UPGMA 聚类分析发现铁皮石斛和铜皮石斛亲缘关系最近,二者的遗传相似系数为 0.78,此技术的应用为霍山石斛的鉴别提供分子水平的依据,同时对霍山石斛替代药材研究的可行性进行了初步探讨。此方法操作快捷简单,在有石斛药材 DNA 降解的过程中也可使用,对于药材的鉴别具有较好的应用前景。

1.2 DNA 标记 ISSR (inter-simple sequence repeat)称为简单重复序列间区标记技术,是以锚定的微卫星 DNA 为引物,即在 SSR 序列的 3' 或 5' 端加上 2 ~ 4 个随机核苷酸,在 PCR 反应中,引物可以锚定于微卫星上,扩增可得到相邻 SSR 间区域的扩增片段[35-36],扩增的多条带可以通过凝胶电泳得以分辨。由于 ISSR 是基于 SSR 的基础之上,因此其稳定性和可重复性大大提高,应用于石斛种间及居群间的分析越来越多。SHEN 等[37]运用 10 对引物对铁皮石斛的 8 个居群进行鉴定,获得 16 条特征性条带并构建了铁皮石斛的身份认证,可以快速、精确地对不同产地的铁皮石斛进行鉴别。DING 等[31]选用 12 个 ISSR 引物对铁皮石斛 9 个野生居群进行进化分析,得到了与 RAPD 类似的实验结果,剖析了铁皮石斛高物种水平的遗传多样性及较低居群水平多样性的原因,可能与传粉昆虫飞行能力弱、居群间的地理距离普遍较大、自交不亲和的繁育体系[38]及人为的过度开采及生境的片段化有关,为铁皮石斛濒危资源的保护提出了合理的策略,也为其他药用植物的保护奠定了理论基础。ISSR 标记方法的使用,可以对石斛属植物的遗传结构和遗传多样性有了深入地了解,从遗传学角度提出石斛致濒的一些原因,为更好地保护这珍稀的资源提供了理论依据,也为其保护遗传学的研究奠定了基础。

AFLP (amplified fragment length polymorphism)是兼有限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和 RAPD 优点的新型分析标记,具备了简单、稳定等特点,在石斛属的指纹图谱构建和遗传多样性研究方面有着广泛的应用并取得了可靠性的结果。HONG 等[39]运用 AFLP 对 39 种杂交石斛属植物进行分析,发现除去在栽培过程中发生突变的个体及组织外,可以获得石斛属植物不同生长阶段的特征性指纹图谱。LI 等[40]对铁皮石斛 12 个居群进行多样性分析,与兰科其他濒危物种相比,铁皮石斛具有物种水平较高的多样性。与 72% 的石斛属植物类似的自交不亲和的繁育特点及地理隔离是造成目前该物种遗传结构的部分原因。YE 等[41]选取 10 对 AFLP 引物对细茎石斛的 15 个居群进行研究,结果表明 80.80% 的遗传变异发生于居群内且构树的分支组成与地理分布一致,表明 AFLP 可以很好的用于石斛属的系统进化分析。AFLP 技术结合了之前技术的优点,具有更广阔的应用空间,为石斛类植物的鉴别及资源多样性分析提供更为详细的理论基础,为石斛类植物的就地保护、迁地保护及该濒危资源的移栽提供高可信度的技术支持,为石斛类植物进行更为深入的基因研究提供依据。

微卫星又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs),在基因组中的拷贝数大于 10^5,重复序列在基因组中所占的比例随着进化程度的提高而增加。具有共显性遗传、丰度高、多态信息含量丰富、杂合程度高、分布广、可稳定遗传、检测技术简单等优点,广泛应用于物种亲缘关系比较和鉴定、遗传连锁图谱构建、物种进化和系统发生、质量和数量性状基因位点定位分析、分子标记辅助育种等方面。YAN 等[42]从金钗石斛 7 个野生居群分离得到 10 对微卫星引物,产生的多态性位点从 12 到 32 不等,其中 YWJ001 偏离哈迪-温伯格平衡。YUAN 等[43]运用 14 对 SSR 引物对中国药品市场的球花石斛来源进行鉴定,发现 136 个个体分别来自于中国、印度、缅甸及老挝。同时对江苏南京药品市场获得的 12 种产地不明的黄草类石斛进行鉴别,发现大多数的商品石斛来自于缅甸和老挝,对于石斛类药材的产

地来源追踪起到重要作用。该技术在石斛类药材中的广泛使用,突显了 SSR 标记应用于石斛真伪鉴定、商品来源确定的真实性,对石斛商品质量控制起到重要作用。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,SRAP)是对基因开放阅读框(open reading frames,ORFs)的特定区域进行扩增的标记系统,具有简便、高效、重复性好等特点,已成功地应用于植物遗传图谱的构建、遗传多样性分析、基因的克隆等方面。DING 等[5]对铁皮石斛 9 个野生居群进行 SRAP 分析,得到物种水平 88.07% 的遗传多样性,分析可知 27.05% 的遗传变异存在于居群之间,所有的居群在 UPGMA 树中分成 2 个大支。CAI 等[44]筛选获得 17 对 SRAP 引物用于粉花石斛 7 个居群的遗传结构分析,居群的遗传距离与地理分布没有明显的关联。粉花石斛物种水平的多样性高于被子植物平均水平,但与其他兰科植物具有相似的遗传结构。该技术在石斛属植物的应用,使得遗传多样性分析又增添新的实验依据,可以为濒危的石斛属植物保护提供新的基础支持。

AS-PCR(alleli-specific PCR),又称位点特异性 PCR(diagnostic PCR),可以根据正品及其伪、混品特定区域的 DNA 序列数据,设计有高度特异性的正品药材的鉴别引物,在珍稀濒危植物种质的鉴别中有着广泛的应用前景。DING 等[45]对石斛属植物鉴别性引物设计做了大量研究,设计了铁皮石斛的特异性鉴别引物,可以有效地将铁皮石斛从其他 30 多种枫斗类及黄草类石斛中一次性鉴别出来。此后又设计了特异性鉴别引物通过一次 PCR 准确鉴别出了兜唇石斛、齿瓣石斛、束花石斛[46-48]。此种高效、便捷的鉴别方法还在球花石斛、金钗石斛、霍山石斛等[49-51]石斛属植物中得到广泛应用。综上所述,位点特异性 PCR 方法具有成本低、时间短、效率高等特点,同时所需模板 DNA 的量较少,节省了样品,不会造成标本整体的破坏,即使在有外源 DNA 污染的情况下也不会影响检测结果。同时位点特异性 PCR 在混合组分中也能检测出某一组分存在与否,不仅为中药材的鉴别提供了一种新的方法,还可能成为中成药复方组分鉴别的一种新方法。

2 基因序列

2.1 核基因组序列 核基因组结构大且复杂,大部分核基因中又存在直系同源和异系同源拷贝,使得核基因的应用也复杂化。rRNA 是编码核糖体 DNA 的基因,在植物中以重复连续排列方式存在,包含进化速率不等的编码区、非编码转录区和转录区。ITS(内转录间隔区)在核糖体 DNA 中位于 18S 与 26S 基因之间,由 5.8S 基因分为 2 段 ITS1 和 ITS2,它们共同构成 1 个转录单位。由于在被子植物中 ITS 存在于高重复的核糖体 DNA 中,进化速率快且片段长度仅 700 bp,加上协同进化使该片段在基因组不同重复单元间非常一致,从而使 ITS 成为近年研究科、属、种间系统发育和分类的重要分子标记;加之核基因是双亲遗传,能真正反应物种的进化历程,使得核基因组在中药材的真实性鉴定中具有重要意义。

丁小余等[46-48]用 rDNA ITS 区序列鉴定了兜唇石斛、齿瓣石斛、束花石斛等并根据 rDNA ITS 区序列设计出位点特异性 PCR 引物成功鉴别了石斛属各种。随后,顾慧芬等[52]运用 ITS 序列对 25 种铁皮石斛及其近缘类群的亲缘关系进行分析,发现 ITS 序列在不同种类的石斛中间存在较明显的差异,并且各种石斛有各自特异性的序列位点存在,证明了该序列作为石斛属植物种间的分子鉴定标记的可行性。中药材在加工、炮制和存储的过程中,DNA 会发生不同程度的降解。rDNA ITS 区是基因组中高度重复的多拷贝 DNA 序列,18S rDNA-ITS-26S rDNA 在植物中的拷贝数可达 500 ~ 40 000,所以对于加工过的商品药材,尽管提取的总 DNA 模板有部分降解,但一般不会影响对 rDNA ITS 区的扩增,因此广泛应用于中药材的鉴别研究中。Takamiya 等[53]建立了 196 种石斛属植物的 ITS 序列数据库,并且成功运用获得的序列对市场购买的石斛药材干品进行鉴别。DING 等[54]运用 ITS 序列及位点特异性 PCR 结合的方法,运用不同产地铁皮石斛之间存在的 SNP 位点,将 GSG 和 FSC 2 个道地性居群快速区分,并且 ITS 序列可以将 50 个市场购买的石斛类商品进行分类,其中 5 个为细茎石斛,7 个为粉花石斛,结合 AS-PCR 可以将剩余 38 个石斛药品的产地来源分辨清楚。由此可以看出,ITS 序列是快速、便捷鉴定正品的有效分子标记,为进一步设计中药材特异性分子鉴定试剂盒提供了科学依据。

2.2 叶绿体基因组序列 *mat*K 基因位于叶绿体 *trn*K 基因的内含子中,长约 1 500 bp,编码成熟酶并参与 RNA 转录体中Ⅱ型内含子的剪切,是叶绿体基因组的蛋白编码区中进化最快的基因之一,变异较均一。丁鸽等[55]利用 *mat*K 基因对保健食品铁皮石斛及其 10 种混淆品进行分子鉴别并对其亲缘关系进行分析,可以在保健食品原料来源鉴定及终端产品的鉴别等方面展现广阔的应用前景。刘静等[56]

分析了 12 种药用石斛的 *mat*K 基因并发现其中存在的碱基替换、碱基插入及缺失,这些序列特点可以很好的区分不同种类及不同居群的石斛,证明 *mat*K 基因序列可以作为中药材鉴定的有效手段。

*psb*A-*trn*H 位于编码光合系统Ⅱ反应中心的 D1 蛋白的 psbA 基因和编码 tRNA 组氨酸的 *trn*H 基因之间,被认为是被子植物叶绿体基因组中变异位点最多的序列之一。邵世光等[57]成功运用 *psb*A-*trn*H 对 15 种常见的枫斗类石斛进行了鉴别分析,发现不同石斛种间均存在序列差异。在获得的全序列中,存在 6 处 indels,导致种间片段长度差异较大。因此,建议可将 indels 用作独立的 DNA 分子特征,作为枫斗类石斛分子鉴别的重要信息。从以上的研究可以看出,叶绿体基因组序列的应用,可以作为枫斗类石斛鉴别的 DNA 条形码的分子标记。同时,结合植物核基因组中进化速率更快的基因片段,序列的联合运用将为石斛类药材的鉴定提供新的思路和方法,有效提高石斛属植物的鉴定速度和效率。

2.3 线粒体基因组序列 *nad*1 基因编码线粒体呼吸传递链的复合体 I-泛醌氧化还原酶(NADH)的 *nad*1 亚基,*nad*1 基因的内含子 2 位于 *nad*1/b 和 *nad*1/c 之间,是线粒体中进化较快的内含子,在石斛属植物中的应用较少。ZHANG 等[58]运用该序列对石斛属 9 种植物进行鉴别,获得了 *nad*1 基因内含子 2(intron 2)的全长序列 872 bp,其中有 17 个变异位点,可以鉴别除粉花石斛以外的 8 种植物,证明线粒体 *nad*1 intron2 序列可以作为 1 种新的分子标记用于石斛属植物的鉴定。耿丽霞等[59]运用 PCR 技术扩增出 17 种枫斗类石斛 39 个个体的 7 个基因片段,分析发现 *nad*1-*intron*2 和 *psb*A-*trn*H 的序列变异度较高,可较好地用于枫斗类石斛的鉴定。为了避免单一序列无法鉴别相似度非常高的细茎石斛及霍山石斛,选用 nrDNA ITS + *nad*1-*intron*2 新型联合片段构建的 UPGMA 树,更能有效地对枫斗类石斛基原植物进行鉴别并可区分细茎石斛及霍山石斛。由此可见,将线粒体基因片段作为 DNA 条形码用于枫斗类石斛的鉴定是有效的,可以为石斛药材的鉴别提供可靠的科学依据,同时也对规范枫斗类石斛市场提供理论指导。

3 功能基因

石斛属植物功能基因研究是揭示石斛属植物生长发育和代谢调控机制的重要途径[60]。ZHANG 等[61]采用基因芯片技术来鉴定不同种类的石斛,将石斛属 16 种植物的核基因组 rDNA ITS 区的 PCR 产物纯化后印迹在芯片上,以荧光染料(Cy3 或 Cy5)标记的 ITS2 片段作为探针进行杂交,杂交后的 DNA 微阵列芯片通过激光共聚焦扫描,可以鉴定《中国药典》(2000 年版)收载的 5 种石斛属植物。方花等[62]首次报道铁皮石斛 cDNA 文库的构建及其分析,文库质量鉴定结果表明,构建的铁皮石斛 cDNA 文库具有较好的库容量、较高的重组率以及较大的插入片段,可以为铁皮石斛药用成分相关功能基因的研究奠定基础。CHEN 等[63]首次获得铁皮石斛 *DOA*2 基因的 cDNA 全长为 777 bp,其中包含 1 个 513 bp 的开放阅读框(ORF),可以编码 170 个氨基酸。通过对 *DOA*2 基因的分析及与兰科其他植物的氨基酸序列相比,发现 *DOA*2 基因有与甘露糖结合凝集素共同的特性。半定量 RT-PCR 分析表明 DOA2 mRNA 在茎中的表达量最高,在叶中表达量最低。抗真菌测定表明,DOA2 有针对玉米赤霉的抗真菌活性。

YAN 等[64]采用流式细胞分析方法估算出铁皮石斛的基因组大小为 1.27 Gb 并经过碱基序列测定及组长后,得到长度为 1.35 Gb 的铁皮石斛基因组草图,分析发现其中存在的基因,与干旱、真菌共生、维持细胞渗透压等功能相关。赵明明等[65]构建了铁皮石斛共生真菌萌发 cDNA 文库,首次较为全面地揭示了铁皮石斛种子在萌发过程中与共生真菌之间的生理生化反应并从其中分离得到 *S*-腺苷酸脱羧酶基因(*DoSAMDC*1),促分裂原蛋白激酶基因(*DoMAPK*5)和 2 个钙依赖蛋白激酶基因(*DoCDPK*1,*DoCPK* 32-like)。对获得的基因进行蛋白质的理化性质、结构特点分析及 RT-PCR,结果显示 4 个基因在石斛种子萌发过程中表达量显著增多,受到真菌侵染诱导表达,证明 Ca^{2+} 信号途径和多胺调控途径是石斛种子萌发过程中发挥重要作用的信号传导系统[66-68]。林艳君等[69]成功得到了铁皮石斛 *Do-HDR* 基因的全长为 1 784 bp,分析结果表明该基因编码的蛋白为稳定的亲水蛋白,定位于内质网。采用灭活的尖孢镰刀菌菌液作为诱导子,可诱导 *Do-HDR* 基因相对表达量,推测 *Do-HDR* 基因与生物碱的合成与积累有关。该基因的研究可以为如何提高石斛属植物中生物碱这一重要的药用活性成分提供重要的研究思路和理论依据。石斛属植物基因的研究,涉及植物体内较多种类的功能基因,与生物体的各项调节功能关系密切。更多的与糖类合成、花形态结构、抗逆性、生物碱合成、与真菌共生、应对环境胁迫等基因相关研究的开展,可以为深

入揭示石斛属植物的生命活动的分子机制奠定基础,同时也为优质的石斛资源的筛选培育提供理论依据。

4 总结

石斛是我国珍稀濒危的兰科药材,其具有的特效是其广泛应用的基础。分子标记是应用分子生物学手段开展药用植物研究的一个必不可少的工具。DNA 分子标记在中药鉴定及其相关研究方面具有独到的优势和广阔的应用前景,在石斛属植物的正品及伪混品鉴定中获得了广泛应用。同时,多样化分子标记的应用,全面地揭示了石斛属植物之间遗传多样性及亲缘关系,为该珍贵资源的开发利用以及合理保护提供了理论依据。石斛对生长环境要求严格,自然繁殖率较低,加上采挖力度过度导致野生资源濒临灭绝,因此其野生资源的引种及分子育种方面的研究急需提高。在后续的与生产实际相联系的过程中,应加强分子育种方面的研究,加强分子标记与优良农艺性状基因的连锁开发,为优质石斛品种的培育及石斛药材的快速鉴别提供理论基础及研究依据。

石斛属植物功能基因研究起步较晚,系统的基因组及转录组的研究目前的报道较少。如何利用新一代的测序技术与生物信息学相结合,进一步分析石斛的功能基因信息,发掘基因与石斛的生长、代谢、与真菌共生等分子机制,研究其互相作用的分子基础,调控植物生长周期及植物体内活性成分含量,可以促进石斛属植物资源的合理利用及资源保护,也可以为其他药用植物的育种及产业化发展提供依据。随着分子生物学技术的发展,加速开发利用祖国传统的中药资源是当务之急。要被世界接受和认同,必须建立自己的一系列调控体系,以实现中药产业的规范化、产业化、规模化,推动祖国传统中药的新发展。

[参考文献]

[1] WANG X K, ZHAO T F. A discussion of the chemical constituents of *Dendrobium* plants and of the Chinese herbal drug Shi-hu[J]. Int J Orient Med, 1990, 15: 146-155.

[2] DING X Y, XU L S, WANG Z T, et al. Authentication of stem of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences[J]. Planta Med, 2002, 68(2): 191-192.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:85.

[4] 王康正,高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药,1997,28(10):633-635.

[5] DING G, ZHANG D Z, DING X Y, et al. Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis[J]. Plant Syst Evol, 2008, 276(3/4): 149-156.

[6] 张明,夏鸿西,朱利泉,等. 石斛组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志,2000,25(6): 323-326.

[7] 童绍光,丁炳扬. 浙江植物志. 七卷[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1993.

[8] 吴征镒. 云南植物志. 十四卷[M]. 北京:科学出版社,2003.

[9] SUN Y Y, LI K, LI C R, et al. Current situation and development countermeasures of *Dendrobium* spp. industry for medicinal purpose of Yunnan province[J]. Forest Inventory and Planning, 2006, 31(5): 45-47.

[10] SU H, YANG Y. State quo of *Dendrobium* spp. resources of Nabanhe nature reserve and countermeasures for protection[J]. Forest Inventory and Planning, 2006, 31(5): 100-102.

[11] ZHA X Q, LUO J P, LUO S Z, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*[J]. Carbohydr Polym, 2007, 69(1): 86-93.

[12] LI X L, XIAO J J, ZHA X Q, et al. Structural identification and sulfated modification of anantiglycation *Dendrobium huoshanense* polysaccharide[J]. Carbohydr Polym, 2014, 106(1): 247-254.

[13] ZHA X Q, LUO J P. Production stability of active polysaccharides of *Dendrobium huoshanense* using long-term cultures of protocorm-like bodies[J]. Planta Med, 2008, 74(1): 90-93.

[14] 华茉莉,杨洋,沈志伟. 气相色谱法测定金钗石斛药材中石斛碱的含量[J]. 中药材, 2006, 29(4): 338-339.

[15] 黄琦,廖鑫,吴芹,等. 金钗石斛生物总碱对糖尿病大鼠血糖及肝脏脂肪变性的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2013,32(6):490-493.

[16] 李荣珍. 铁皮石斛种子试管苗的快速繁殖研究[J]. 广东农业科学,2012(14):22-24.

[17] 余乐,兰芹英,姜宗庆. 铁皮石斛离体快繁技术[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):268-270.

[18] 黄月纯,杨丽娥,魏刚,等. 齿瓣石斛 HPLC 特征图谱[J]. 药物分析杂志,2012,32(11):2071-2076.

[19] 李涛,汪元娇,王秋燕. 小瓜石斛的生药学鉴定[J]. 华西药学杂志,2017,32(2):200-201.

[20] 司华阳,陈乃东,陈乃富. 霍山石斛多糖的分离鉴定及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,

2016,28(3):467-470.

[21] 陈晶.金钗石斛生物总碱研究进展[J].现代医药卫生,2016,32(5):728-730.

[22] 袁颖丹,李志,胡冬南,等.铁皮石斛组织培养研究进展[J].湖北农业科学,2016,55(1):9-12.

[23] 李桂琳,白燕冰,周侯光,等.齿瓣石斛种质资源鉴定评价研究进展[J].热带农业科技,2016,39(3):22-27.

[24] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22):6531-6535.

[25] 丁鸽,丁小余,沈洁,等.铁皮石斛野生居群研究(Ⅳ):RAPD 反应体系的构建与优化[J].南京师大学报:自然科学版,2006,29(1):84-88.

[26] 张铭,黄华荣,廖苏梅,等.石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计[J].中国中药杂志,2001,26(7):442-447.

[27] 丁鸽,丁小余,沈洁,等.铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别[J].药学学报,2005,40(11):1028-1032.

[28] 包英华,白音,王文全,等.美花石斛种质资源的 RAPD 分子鉴定[J].时珍国医国药,2007,18(5):1034-1035.

[29] 张建勇,袁佐清,刘涛.石斛属植物遗传多样性 RAPD 分析[J].北方园艺,2007,31(7):134-136.

[30] 任羽,杨光穗,尹俊梅,等.石斛种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J].中国农学通报,2007,23(6):598-600.

[31] DING G, LI X X, DING X Y, et al. Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers[J]. Genetika, 2009, 45(3):327-334.

[32] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerpringting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24):7213-7218.

[33] 刘静,何涛,淳泽.分子标记技术在石斛属植物中的应用研究进展[J].应用与环境生物学报,2008,14(6):855-862.

[34] 金国虔,蔡春海,于凌杰,等.霍山地区 4 种石斛属植物的遗传多态性分析[J].药物生物技术,2006,13(1):28-31.

[35] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anhored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2):176-193.

[36] FANG D Q, Roose M L, Krueger R R, et al. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(1/2):211-219.

[37] SHEN J, DING X Y, LIU D Y, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(3): 420-422.

[38] Johansen B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. Bot J Linn Soc, 1990, 103(2):165-196.

[39] HONG Y, XIANG N, Lam-Chan L T, et al. Genetic profiling for identification of plant varieties based on UPOV principles: fluorescent AFLP analysis of *Dendrobium* hybrids as an example[J]. Floric Ornam Plant Biotechnol, 2006, 19(11): 584-590.

[40] LI X X, DING X Y, CHU B H, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP[J]. Genetica, 2008, 133(2):159-166.

[41] YE M R, HOU B W, LUO J, et al. Genetic diversity and conservation of the endangered herb *Dendrobium moniliforme* based on amplified fragment lengthpolymorphism markers[J]. Sci Hortic, 2015, 189: 51-58.

[42] YAN W J, DING X Y. Isolation and characterization of 10 microsatellite markers for *Dendrobium nobile*, a traditional Chinese tonic medicine[J]. Conser Genet Resour, 2015, 7(1):303-304.

[43] YUAN Y H, HOU B W, XU H J, et al. Identification of the geographic origin of *Dendrobium thyrsiflorum* on Chinese herbal medicine market using trinucleotide microsatellite markers[J]. Biol Pharm Bull 2011, 34(12):1794-1800.

[44] CAI X Y, FENG Z Y, ZHANG X X, et al. Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers[J]. Sci Horti, 2011, 129(4):877-881.

[45] DING X Y, WANG Z T, ZHOU K Y, et al. Allele-specific primers for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale*[J]. Planta Med, 2003, 69(6): 587-588.

[46] 丁小余,徐珞珊,常俊,等.兜唇石斛的位点特异性 PCR 鉴别[J].南京师大学报:自然科学版,2002,25(4):71-76.

[47] 丁小余,徐珞珊,王峥涛,等. 齿瓣石斛的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 药学学报,2002,37(11): 897-901.

[48] 丁小余,徐珞珊,王峥涛,等. 束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别[J]. 中国中药杂志,2002,27(6): 407-411.

[49] 应依,徐红,王峥涛. 球花石斛的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 药学学报,2007,42(1): 98-103.

[50] 徐红,王峥涛,丁小余,等. 金钗石斛的位点特异性 PCR 鉴别研究[J]. 中草药,2005,36(10): 1540-1544.

[51] 刘石泉,李小军,余庆波,等. 霍山石斛及相似种的位点特异性 PCR 鉴别[J]. 中草药,2006,37(1): 111-115.

[52] 顾慧芬,庄意丽,马子建,等. 基于 ITS 序列分析铁皮石斛与近缘类群的亲缘关系[J]. 中成药,2010,32(4): 628-632.

[53] Takamiya T, Wongsawad P, Tajima N, et al. Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(5): 779-782.

[54] DING G, XU G, ZHANG W C, et al. Preliminary geoherbalism study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(4): 1283-1286.

[55] 丁鸽,张代臻,张伟超,等. 保健食品铁皮石斛及其混淆品的分子鉴别及亲缘关系分析[J]. 食品科学,2011,32(2):141-145.

[56] 刘静,何涛,淳泽. 药用石斛的叶绿体 *mat*K 基因序列分析及鉴别[J]. 药学学报,2009,44(9): 1051-1055.

[57] 邵世光,韩丽,马艳红,等. 枫斗类石斛 cpDNA *psb*A-*trn*H 的序列分析与鉴别[J]. 药学学报,2009,44(10): 1173-1178.

[58] ZHANG T, WANG Z T, XU L S, et al. Application of mitochondrial nad 1 intron 2 sequences to molecular identification of some species of *Dendrobium* Sw[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2005, 36(7): 1059-1062.

[59] 耿丽霞,郑瑞,任洁,等. 新型联合片段: nrDNA ITS + *nad* 1-*intron* 2 在枫斗类石斛鉴定中的意义[J]. 药学学报,2015,50(8): 1060-1067.

[60] 李清,李标,郭顺星. 兰科石斛属植物分子生物学研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(15):2753-2761.

[61] ZHANG Y B, WANG J, WANG Z T, et al. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal formulations[J]. Planta Med, 2003, 69(12):1172-1174.

[62] 方花,魏小勇. 铁皮石斛 cDNA 文库的构建及分析[J]. 生命科学研究,2005,9(3):263-266.

[63] CHEN Z, SUN X, TANG K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale*[J]. Toxicon, 2005, 45(4): 535-540.

[64] YAN L, WANG X, LIU H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese Orchid herb[J]. Mol Plant, 2015, 8(6):922-934.

[65] 赵明明,张岗,宋超,等. 铁皮石斛种子接菌共生萌发抑制差减杂交文库的构建及序列分析[J]. 中国药学杂志,2013,48(5): 341-345.

[66] 赵明明,张岗,张大为,等. 铁皮石斛 DoMAPK5 基因的克隆及表达特征分析[J]. 时珍国医国药,2016,27(2): 509-512.

[67] 赵明明,张岗,张大为,等. 铁皮石斛 S-腺苷酸脱羧酶基因 DoSAMDC1 的克隆及特征分析[J]. 药学学报,2013,48(6):946-952.

[68] ZHAO M M, ZHANG G, ZHANG D W, et al. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72705.

[69] 林艳君,赖钟雄. 铁皮石斛 HDR 基因克隆及真菌诱导子对其表达和生物碱含量的影响[J]. 热带作物学报,2015,36(4): 680-686.

[责任编辑 顾雪竹]