

枫斗类石斛 cpDNA *psbA-trnH* 的序列分析与鉴别

邵世光, 韩 丽, 马艳红, 沈 洁, 张伟超, 丁小余*

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 本研究对常见枫斗类石斛 cpDNA 的 *psbA-trnH* 区进行了测序, 利用 MEGA 4.0 对该区序列进行了比较分析。结果显示: 15 种常见的枫斗类石斛的 *psbA-trnH* 序列长度为 721~767 bp, 变异位点 42 个, 简约信息位点 11 个。以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 常见枫斗类石斛的种间遗传距离为 0.001 3~0.018 3, 平均遗传距离为 0.014 8。不同石斛种间均存在序列差异, 全序列中共出现 6 处 indels, 导致种间片段长度差异较大; 暂未发现所检测的枫斗类石斛居群间在 *psbA-trnH* 区的序列存在差异。利用枫斗类石斛 *psbA-trnH* 序列数据库及遗传分析软件, 通过对待检种的 *psbA-trnH* 序列的测定, 成功鉴别了待检种。cpDNA 的 *psbA-trnH* 区可作为枫斗类石斛分子鉴别的候选标记。

关键词: 石斛属; 枫斗类石斛; *psbA-trnH*; 分子鉴别

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 10-1173-06

Analysis and authentication of cpDNA *psbA-trnH* regions of *Dendrobium* species of Fengdous

SHAO Shi-guang, HAN Li, MA Yan-hong, SHEN Jie, ZHANG Wei-chao, DING Xiao-yu*

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: The *psbA-trnH* regions of *Dendrobium* species of Fengdous were sequenced by our research group. The *psbA-trnH* sequences of fifteen *Dendrobium* species were analyzed with software MEGA 4.0. The results showed that the lengths of sequences varied from 721 to 767 bp. The variable sites were 42 while the informative sites were 11. Genetic distances were calculated using the Kimura 2-parameter model. Genetic distances varied from 0.001 3 – 0.018 3 among fifteen species while the average genetic distance was 0.014 8. The interspecies differences of *psbA-trnH* regions were demonstrated. Six indels happened in this fragment, which led to the great difference of sequence lengths among fifteen species. We found that there were no population differences in the *psbA-trnH* region of various species of Fengdous so far. By using the database of various *Dendrobium* species of Fengdous and two genetics software, the botanical origin of the inspected species of Fengdous was authenticated successfully by sequencing the *psbA-trnH* regions. The *psbA-trnH* region of cpDNA can be used as a candidate marker for authentication of *Dendrobium* species of Fengdous.

Key words: *Dendrobium*; *Dendrobium* species of Fengdous; *psbA-trnH*; molecular authentication

石斛为传统名贵中药材, 早在《神农本草经》中就被列为上品, 有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等

功效^[1]。根据形态特征和加工规格的不同, 可分为枫斗类石斛和黄草类石斛等^[2]。然而, 石斛类药材的鉴别一直是“医工难辨”, 对于枫斗类石斛来说, 无论是鲜品状态下还是其加工后的产品形态上都十分相似, 很难通过形态学加以鉴别^[3]。枫斗类石斛种间的化学成分存在差异, 价格差异很大, 功效也不尽相同。不法商家为了牟取暴利, 经常出现以假乱真、以

收稿日期: 2009-06-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870234); 国家基础人才培养基金资助项目 (J0730650); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008431).

*通讯作者 Tel: 86-25-85891605, E-mail: dingxynj@263.net

次充好的行为,造成了枫斗类石斛药材市场的混乱,因此,枫斗类石斛的基源鉴别突显重要。

近年来, DNA 分子标记技术得到了迅猛发展,其中 DNA 序列因其能够提供可靠的种间鉴别依据,不断被用于中药材的种间鉴别研究。*psbA-trnH* 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 *trnH* 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。对于有花植物来说, *psbA-trnH* 展现了很好的种间鉴别价值^[4]。本文拟运用叶绿体基因组 *psbA-trnH* 对常见枫斗类石斛的序列进行分析与比较,为枫斗类石斛的 DNA 分子鉴别提供鉴别依据。

材料与方法

材料 本研究所用的枫斗类石斛为 2006 年 9 月至 2007 年 12 月采自我国石斛主要分布区云南、广西等省区,开花后经丁小余教授鉴定,每个种 3~5 份标本,实验材料保存于南京师范大学生命科学学院植物资源与环境研究所,样品信息详见表 1。

总 DNA 提取 取硅胶干燥的叶片 0.1 g,用无菌水冲洗干净,在液氮中研磨成粉末,采用改良的 CTAB 法提取各样品的总 DNA^[5]。

叶绿体 *psbA-trnH* 基因间隔区的 PCR 扩增及检测 利用 *psbA-trnH* 基因间隔区的通用扩增引物 P1

(5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') 和 P2 (5'-CGCGCATGGTGGATTTCACAAATC-3') 扩增该段序列^[6]。30 μL 的反应体系包含 3 μL 10 $\times$ PCR buffer、2 μL 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、2 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、0.2 μL 5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ TaKaRa *Taq*、1 μL 10 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物 P1 和下游引物 P2 和 70~80 ng DNA 模板。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 共 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。PCR 反应结束后, 取 5 μL PCR 反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

PCR 产物纯化与测序 PCR 产物用美国 Axygen 试剂盒纯化, 纯化产物送至上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司测序, 每个种进行 3 次重复扩增和测序以保证序列的准确性。

DNA 序列分析 所得石斛属植物的 *psbA-trnH* 序列范围参照 *Androcymbium villosum* (DQ088314) 和 *Pimpinella puberula* (AY587867)。序列比对用 Clustal X 1.8 软件完成, 并辅以人工校对^[7]。应用分子进化遗传分析软件 MEGA 4.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 进行碱基组成、变异位点数、简约信息位点数、转换和颠换数、转换/颠换比值 R 等分析^[8]。以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 以石豆兰属的密花石豆兰 (*Bulbophyllum odoratissimu*) 为外类群,

Table 1 Plant samples of fifteen allied *Dendrobium* species of Fengdous used in the present study

Species	Locality	Voucher	Accession number
<i>Dendrobium aphyllum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ06009	FJ385772
	Simao, Yunnan	ZLJ06006	
<i>Dendrobium officinale</i>	Xilin, Guangxi	ZLJ06019	GQ153537
	Mengla, Yunnan	ZLJ06022	
<i>Dendrobium gratiosissimum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ07105	GQ153536
<i>Dendrobium crepidatum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ06081	GQ162800
<i>Dendrobium wardianum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ08157	GQ162801
<i>Dendrobium chrysanthum</i>	Tiane, Guangxi	ZLJ07112	GQ162805
<i>Dendrobium hercoglossum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ07030	GQ162804
<i>Dendrobium devonianum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ06032	GQ162802
<i>Dendrobium loddigesii</i>	Baise, Guangxi	ZLJ06097	EU881986
<i>Dendrobium moniliforme</i>	Baise, Guangxi	ZLJ07140	GQ162803
<i>Dendrobium primulinum</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ06512	GQ153535
<i>Dendrobium falconeri</i>	Mengla, Yunnan	ZLJ08522	FJ216475
<i>Dendrobium crystallinum</i>	Tiane, Guangxi	GenBank	
		ZLJ08086	FJ216476
<i>Dendrobium aduncum</i>	Rongjiang, Guangxi	GenBank	
		ZLJ08116	FJ216483
<i>Dendrobium pendulum</i>	Mengla, Yunnan	GenBank	
		ZLJ07079	EU887933

构建 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 系统发生树。

结果

1 *psbA-trnH* 区的长度和变异

15 种常见枫斗类石斛 *psbA-trnH* 序列长度为 721~767 bp。经 Clustal X 1.8 和 MEGA 4.0 软件排序, 简并序列长度为 801 个位点。其中碱基组成平均含量 T 为 34.7%, C 为 16.6%, A 为 30.5%, G 为 18.2%, GC 含量为 34.8%, GC 含量明显低于 AT 含量, 各样品 T、C、A、G 的碱基含量见表 2。15 种枫斗类石斛 (不包括外类群) 变异位点 42 个, 简约信息位点 11 个, 分别占序列总长的 5.24% 和 1.37%。平均发生转换 3 个, 平均发生颠换 4 个, 转换和颠换之比为 0.7。共有 6 处 indels, 其中较长的 indels 分别位于 50~68、96~130、135~149、286~301 和 338~349, 较短的 indels 位于 34~35, 最大长 35 bp, 最小长 2 bp。另外, 作者还对枫斗类石斛不同居群的材料进行了该序列的测定, 测序结果表明种内居群间暂时未发现差异。

2 遗传距离的计算及基于 *psbA-trnH* 区对待检种的鉴定

应用 MEGA 4.0 进行分析, 以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 结果见表 3。外类群密花石豆兰与 15 种枫斗类石斛的遗传距离在 0.039 0~0.060 7。15 种枫斗类石斛种间遗传距离在 0.001 3~0.018 3, 平均遗传

距离为 0.014 8。

根据本研究的枫斗类石斛 *psbA-trnH* 序列, 作者成功鉴别了待检样品 No.1~20 (inspected species No.1~No.20), 它们分别是兜唇石斛 (No.1, No.6, No.8)、报春石斛 (No.11, No.15)、齿瓣石斛 (No.2, No.4, No.5)、粉花石斛 (No.3, No.18)、铁皮石斛 (No.7, No.10, No.17)、大苞鞘石斛 (No.9)、串珠石斛 (No.12, No.19)、钩状石斛 (No.13, No.20)、细茎石斛 (No.14, No.16), 详见表 4。20 个待检样品的 *psbA-trnH*

Table 2 The base content in *psbA-trnH* of fifteen *Dendrobium* species of Fengdous

Species	T/%	C/%	A/%	G/%	T+A/%	C+G/%
<i>D. loddigesii</i>	34.7	16.7	30.6	17.9	65.3	34.6
<i>D. primulinum</i>	35.1	16.8	30.4	17.7	65.5	34.5
<i>D. aphyllum</i>	35.0	16.6	30.1	18.2	65.1	34.8
<i>D. pendulum</i>	35.0	16.6	30.1	18.4	65.1	35.0
<i>D. crystallinum</i>	34.9	16.7	30.0	18.3	64.9	35.0
<i>D. gratiosissimum</i>	34.7	17.0	30.1	18.3	64.8	35.3
<i>D. wardianum</i>	34.8	16.6	30.4	18.2	65.2	34.8
<i>D. falconeri</i>	34.1	16.6	30.7	18.6	64.8	35.2
<i>D. devonianum</i>	34.8	16.4	30.6	18.2	65.4	34.6
<i>D. officinale</i>	34.5	16.6	30.6	18.3	65.1	34.9
<i>D. hercoglossum</i>	34.3	16.6	30.7	18.4	65.0	35.0
<i>D. moniliforme</i>	34.4	16.7	30.5	18.4	64.9	35.1
<i>D. aduncum</i>	34.7	16.7	30.6	18.1	65.3	34.8
<i>D. crepidatum</i>	35.1	16.4	30.4	18.0	65.5	34.4
<i>D. chrysanthum</i>	34.5	16.4	31.5	17.6	66.0	34.0

Table 3 Genetic distance of *psbA-trnH* sequences of 15 taxa of *Dendrobium* and *B. odoratissimum* estimated with Kimura two-parameter methods

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1																
2	0.002 7															
3	0.004 1	0.006 7														
4	0.010 9	0.013 4	0.009 3													
5	0.009 5	0.009 3	0.008 0	0.004 0												
6	0.010 9	0.013 5	0.009 4	0.005 4	0.004 0											
7	0.013 6	0.016 2	0.012 1	0.008 1	0.006 7	0.005 4										
8	0.013 6	0.014 8	0.013 5	0.012 1	0.008 1	0.020 0	0.016 2									
9	0.013 6	0.017 6	0.013 5	0.012 1	0.010 8	0.009 4	0.012 1	0.016 2								
10	0.008 4	0.009 7	0.006 9	0.005 5	0.002 7	0.005 5	0.006 9	0.005 5	0.008 3							
11	0.010 9	0.010 8	0.009 4	0.008 1	0.004 0	0.008 1	0.010 8	0.006 7	0.012 1	0.001 3						
12	0.010 9	0.013 5	0.009 4	0.008 1	0.006 7	0.008 1	0.010 8	0.009 4	0.012 1	0.002 7	0.002 6					
13	0.006 8	0.009 4	0.008 1	0.009 4	0.008 1	0.009 4	0.012 1	0.013 5	0.013 5	0.009 6	0.012 0	0.012 0				
14	0.009 5	0.009 4	0.008 1	0.012 1	0.008 1	0.009 4	0.012 1	0.013 5	0.013 5	0.008 3	0.009 4	0.012 1	0.010 8			
15	0.007 0	0.009 8	0.009 8	0.014 0	0.012 6	0.011 2	0.014 0	0.018 3	0.014 0	0.011 5	0.014 0	0.014 0	0.009 8	0.007 0		
16	0.040 8	0.042 8	0.047 1	0.052 9	0.052 6	0.056 7	0.051 9	0.060 7	0.050 4	0.045 9	0.046 1	0.049 0	0.044 6	0.044 6	0.039 0	

1: *D. loddigesii*; 2: *D. primulinum*; 3: *D. aphyllum*; 4: *D. pendulum*; 5: *D. crystallinum*; 6: *D. gratiosissimum*; 7: *D. wardianum*; 8: *D. falconeri*; 9: *D. devonianum*; 10: *D. officinale*; 11: *D. hercoglossum*; 12: *D. moniliforme*; 13: *D. aduncum*; 14: *D. crepidatum*; 15: *D. chrysanthum*; 16: *B. odoratissimu*

序列经 Clustal X 1.8 和 MEGA 4.0 软件运算后, 在所构建的 UPGMA 树 (图 1) 上与各自所属的石斛种聚类为同一支, *psbA-trnH* 序列完全相同。后来, 再经 rDNA ITS 区序列及植株开花后验证, 待检样品 No.1~No.20 所属原植物准确无误, 因此, cpDNA 的 *psbA-trnH* 区可作为枫斗类石斛鉴别的分子标记。

讨论

随着现代分子生物学技术的迅猛发展, RAPD (random amplified polymorphism DNA, 随机扩增多态性 DNA)^[9, 10]、RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)^[11]、ISSR (inter-simple sequence repeat, 简单重复序列间多态性)^[12]、AS-PCR (allele-specific diagnostic polymerase chain reaction, 位点特异性鉴别 PCR)^[13]、DNA 序列^[14]等 DNA 分子技术被广泛应用于药用植物种间鉴别的研究。其中 DNA 序列法因具有简单、准确、重现性好等优点, 在药用植物鉴别领域得到较为广泛

Table 4 Information of the inspected species and the identification results

Inspected species	Identification result
No.1	<i>D. aphyllum</i>
No.2	<i>D. devonianum</i>
No.3	<i>D. loddigesii</i>
No.4	<i>D. devonianum</i>
No.5	<i>D. devonianum</i>
No.6	<i>D. aphyllum</i>
No.7	<i>D. officinale</i>
No.8	<i>D. aphyllum</i>
No.9	<i>D. wardianum</i>
No.10	<i>D. officinale</i>
No.11	<i>D. primulinum</i>
No.12	<i>D. falconeri</i>
No.13	<i>D. aduncum</i>
No.14	<i>D. moniliforme</i>
No.15	<i>D. primulinum</i>
No.16	<i>D. moniliforme</i>
No.17	<i>D. officinale</i>
No.18	<i>D. loddigesii</i>
No.19	<i>D. falconeri</i>
No.20	<i>D. aduncum</i>

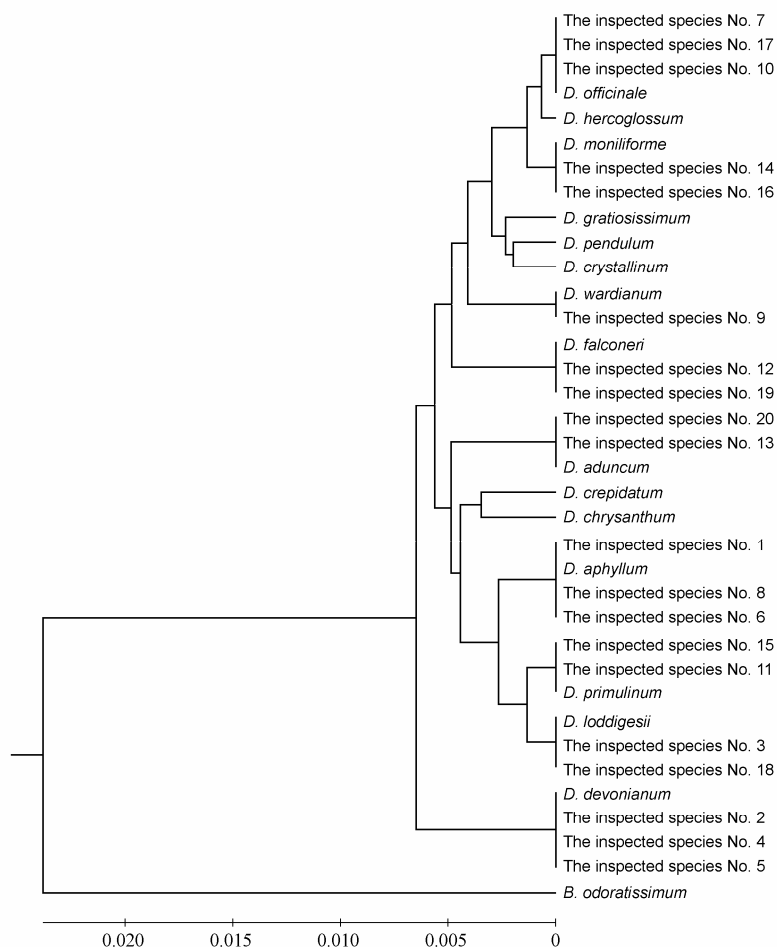


Figure 1 UPGMA tree constructed by MEGA 4.0 based on *psbA-trnH* of 15 taxa of *Dendrobium* and 20 inspected species

的应用。植物基因组间进化速率千差万别,但总体来说,核基因组进化速率最快,叶绿体基因组次之,线粒体基因组进化最慢^[15]。目前,常用于药用植物鉴别研究的主要是核基因组 DNA、叶绿体基因组 DNA,而线粒体基因组 DNA 主要在动物药的鉴别中广泛使用。

rDNA ITS 是核基因组中广泛应用于药用植物鉴别的 DNA 分子标记,前人曾建立了枫斗类石斛和黄草类石斛的 rDNA ITS 全序列数据库,并利用该数据库对石斛属植物进行了准确鉴别^[2,3,16,17]。近年来,叶绿体编码基因开始被应用于药用植物种间的鉴别研究,其中 *matK* 序列被认为是 cpDNA 的编码区中进化速率最快的基因之一^[18]。滕艳芬等^[19]通过分析 5 种药典收藏石斛及其混淆品的 *matK* 序列,将 5 种药典石斛及其混淆品鉴别开来,但该序列在石斛属种间鉴别时尚缺乏应用价值。此外,叶绿体 DNA 的非编码区序列,特别是进化速率较快的序列,亦被用于药用植物的种间鉴别研究^[20, 21]。其中, *psbA-trnH* 序列被认为是 cpDNA 间隔区中进化速率最快的片段之一,在有花植物中展现了较好的种间鉴别价值^[4],已经被用于芍药属^[22]、虎耳草属^[23]、卷耳属^[24]、薯蓣属^[21]等植物的种间鉴别研究,结果表明,该序列存在一定的特异性位点,能够作为种间鉴别的有效手段。

本文运用 cpDNA 间隔区 *psbA-trnH* 对 15 种常见的枫斗类石斛进行了鉴别分析。不同石斛种间均存在序列差异,通过比较这段序列,即可鉴定常见枫斗类石斛。本文所研究的枫斗类石斛 *psbA-trnH* 全序列中共出现 6 处 indels,导致种间片段长度差异较大。因此,将 indels 用作独立的 DNA 分子特征,它们可作为枫斗类石斛分子鉴别的重要信息。将与石斛属亲缘关系较近的密花石豆兰作为外类群构建邻接树,虽然聚类结果大部分与经典分类结果相同,但多数分支的 bootstrap 支持率较低,所以仅凭 *psbA-trnH* 序列难以弄清枫斗类石斛的种间关系,但却可作为枫斗类石斛鉴别的 DNA 分子标记。cpDNA 的 *psbA-trnH* 序列可以与核基因组的 rDNA ITS 序列联合运用,可作为枫斗类石斛鉴别的 DNA 条形码的分子标记,但能否作为中国石斛属鉴别的 DNA 条形码的分子标记,尚待进一步研究。

References

- [1] The State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典, 2000 版) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 70.
- [2] Xu H, Wang ZT, Ding XY, et al. Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rDNA ITS sequence analysis [J]. *Planta Med*, 2006, 72: 89–92.
- [3] Ding XY, Wang ZT, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 567–573.
- [4] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369–8374.
- [5] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15.
- [6] Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Botany*, 1997, 84: 1120–1136.
- [7] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876–4882.
- [8] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244–1245.
- [9] Shaw PC, But PP. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 466–469.
- [10] Ngan F, Shaw PC, But PP, et al. Molecular authentication of *Panax* species [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50: 787–791.
- [11] Nakai R, Shoyama Y, Shirashi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 67–70.
- [12] Shen Y, Xu C, Wan XF, et al. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2005, 36: 423–427.
- [13] Ding XY, Xu LS, Wang ZT, et al. Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. devonianum* from other *Dendrobium* species [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 897–901.
- [14] Crockett SL, Douglas AW, Scheffler BE, et al. Genetic profiling of *Hypericum* (St. John's Wort) species by nuclear ribosomal ITS sequence analysis [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 929–935.
- [15] Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 9054–9060.

- [16] Ding XY, Xu LS, Wang ZT, et al. Authentication of stem of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 191–192.
- [17] 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: 868–873.
- [18] Wolfe KH. Protein-coding genes in chloroplast DNA: compilation of nucleotide sequences, data base entries and rates of molecular evolution, cell culture and somatic cell genetics of plants [M]. San Diego: Academic Press, 1991: 467.
- [19] Teng YF, Wu XJ, Xu H, et al. A comparison of *matK* sequences between *Herba Dendrobii* (shihu) and its adulterant species [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33: 280–283.
- [20] Yuan JH, Sun S, Peng F, et al. Genetic variations in *trnL-F* sequence and phylogenetic clustering of *Lycoris* species [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 1523–1527.
- [21] Sun HQ, Luo K, Zou WJ, et al. *psbA-trnH* fragment sequence analysis of *Dioscorea nipponica*, *D. panthaica* and *D. zingiberens* [J]. *Chin J Appl Environ Bio* (应用与环境生物学报), 2006, 12: 792–797.
- [22] Sang T, Donoghue MJ, Zhang D. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in Peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species [J]. *Mol Biol Evol*, 1997, 14: 994–1007.
- [23] Holderegger R, Abbott RJ. Phylogeography of the Arctic-Alpine *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence variation [J]. *Am J Botany*, 2003, 90: 931–936.
- [24] Scheen AC, Brochmann C, Brysting AK, et al. Northern hemisphere biogeography of *Cerastium* (Caryophyllaceae): insights from phylogenetic analysis of noncoding plastid nucleotide sequences [J]. *Am J Botany*, 2004, 91: 943–952.

《国际药学研究杂志》2010 年征订启事

《国际药学研究杂志》原刊名《国外医学药学分册》，是中国科技论文统计源期刊（中国科技核心期刊），由军事医学科学院主管、军事医学科学院毒物药物研究所主办，是以评述性论文为主的综合性药学期刊。设置栏目有综述、专家论坛、研究论著、编译、文摘和医药信息等。本刊根据国内药学科、教学、临床和生产的需要，追踪报道世界各国药学领域的新进展、新动向、新技术和新成果，包括药物化学、药剂学、药理和毒理学、药物分析、生化药理学和临床药理学等基础研究和应用研究方面的内容。刊登内容既有新颖的基础理论，又有应用研究和临床实践，适合于从事药理学研究的科技人员、临床医师和药师、制药工程技术人员，以及医药院校师生阅读和参考。被国内外多种数据库和检索期刊收录。

本刊为双月刊，大 16 开本，80 页，国内外公开发行，每期定价 10.00 元。国内邮发代号：82-135；国外代号：BM6568，国外发行：中国国际图书贸易总公司（北京 399 信箱）。欢迎广大读者在当地邮局订阅，也可直接与编辑部联系补订。

地址：北京市海淀区太平路 27 号六所《国际药学研究杂志》编辑部（邮编 100850）

电话：010-66931618，010-66931637

期刊网址：<http://www.pharmacy.ac.cn>

E-mail: guol@nic.bmi.ac.cn