

- [5] Hashimoto T, Tsukahara Y, Kawai H. Dynamic small-angle x-ray scattering studies on diffusion of macromolecules in bulk. 2. Principle and preliminary experimental results [J]. *Macromolecules*, 1981, 14(3): 708-715.
- [6] 熊开生, 徐溢, 付钰洁. SIS/SBS 压敏胶改性方法 [J]. *中国胶粘剂*, 2003, 12(4): 21-24.
- [7] 王宇. 增黏树脂差异性对热熔压敏胶外观及性能的影响 [J]. *化学与黏合*, 2009, 31(2): 10-13.
- [8] 王宇, 林中祥. 增黏树脂与弹性体 SBS 的相容性以及热熔压敏胶性能的关系 [J]. *增黏树脂与弹性中国胶粘剂*, 2009, 18(2): 28-32.
- [9] 卢言成, 董昕, 孙向东. 石油树脂对热熔胶、压敏胶粘接性能的影响 [J]. *化工生产与技术*, 2007, 14(7): 51-54.
- [10] 丁秀英. SIS 热熔压敏胶的研制 [J]. *中国胶粘剂*, 1996, 9(4): 18-21.
- [11] Mikler C. Styrene-isoprene-styrene copolymer-based transdermal matrix system for the administration of an oestrogen and a progestogen [P]. US:US005580572, 1996-11-3.
- [12] Wilhelm M. Matrix-controlled transdermal therapeutic system based on an adhesive for administering norelgestomin or the combination thereof with an estrogen [J]. US:US20080279915A1, 2008-7-8.
- [13] 路易兹. 具有可接触皮肤的热熔压敏粘合剂的吸收制品 [P]. 中国专利:CN1806856A, 2006-7-26.
- [14] 王隆民. 医用热熔压敏胶型基质及制备 [P]. 中国:CN1800289A, 2006-7-12.
- [15] 石磊. 新型热熔胶压敏胶基质及辣椒风湿贴膏剂的研究 [D]. 河南:河南中医学院, 2007.
- [16] Ho K Y, Dodou K. Rheological studies on pressure-sensitive silicone adhesives and drug-in-adhesive layers as a means to characterise adhesive performance [J]. *Int J Pharm*, 2007, 333: 24-33.
- [17] Kim D J, Kim H J, Yoon G H. Effect of substrate and tackifier on peel strength of SIS (styrene-isoprene-styrene)-based HMPSA [J]. *Int J Adhes Adhes*, 2005, 25: 288-295.
- [18] Kim D J, Kim H J, Yoon G H. Shear creep resistance of styrene-isoprene-styrene (SIS)-based hot-melt pressure-sensitive adhesives [J]. *J Appl Polym Sci*, 2006, 100: 825-831.
- [19] Satas D. *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology* [M]. Warwick: Satas & Associates, 1999.
- [20] Raynaud J P, Augè M, Liorzou L, et al. Adhesiveness of a new testosterone-in-adhesive matrix patch after extreme conditions [J]. *Int J Pharm*, 2009, 375: 28-32.
- [21] Kokubo T. Interaction between drugs and pressure-sensitive adhesive in transdermal therapeutic systems [J]. *Pharm Res*, 1994, 11: 104-107.
- [22] 张斌. 经皮给药压敏胶和水凝胶材料的制备与性能 [D]. 天津:天津大学, 2007.
- [23] 陈政权, 吴滨, 陈康荣. 中药浸膏对中药橡胶膏剂黏附力的影响因素分析 [J]. *国际医药卫生导报*, 2007, 13(19): 76-78.

DNA 分子标记在铁皮石斛研究中的应用

冯尚国, 胡旭, 赵红燕, 王慧中*

(杭州师范大学 生物化学与分子生物学杭州市重点实验室, 浙江 杭州 310018)

摘要:铁皮石斛具有滋阴养胃、润肺止咳、抗癌和延年益寿等功效,是我国的名贵药材。近年来,由于过度采收及生境破坏严重,铁皮石斛资源非常紧缺;另外,目前市场上商品铁皮石斛掺假现象十分常见,严重影响了商品铁皮石斛的质量。综述了 DNA 分子标记技术在铁皮石斛研究中的应用进展,为铁皮石斛的精确鉴定及对其种质资源合理开发和保护提供了有效的分子技术依据。

关键词:铁皮石斛;分子标记;鉴别

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0499-04

Application of DNA molecular marker in study on *Dendrobium officinale*

FENG Shang-guo, HU Xu, ZHAO Hong-yan, WANG Hui-zhong

(Key Laboratory of Hangzhou City for Biochemistry and Molecular Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, China)

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; molecular marker; authentication

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 植物,主要分布于我国云南、广西、浙江、安徽、福建、四川等省区^[1]。铁皮石斛在《神农本草经》中被列为上品,在《道藏》中和天山雪莲、三两重人参、花甲之茯苓、百二十年首乌、深山灵芝、冬虫夏草、苡蓉、海底珍珠等一起被列为“中华九大仙草”,铁皮石斛位于

九大仙草之首,具有滋阴养胃、润肺止咳、清热明目之功效,另外,还有增强人体免疫力、抗肿瘤等作用^[2]。由于铁皮石斛非常名贵,人为过度采收和生境破坏严重,加之铁皮石斛生境独特,繁殖困难,铁皮石斛野生资源处于极度濒危状态,被国家列为重点保护的野生珍贵药材品种。鉴于此,近年来,对铁皮石斛的人工繁殖^[3,4]、药材质量控制^[5]等进行了大

收稿日期:2009-07-03

基金项目:国家自然科学基金(30670199,30770185,30870180);浙江省科技计划项目(2008C12081,2006C32016);杭州市重点实验室项目(20080432 T06);钱江人才计划资助项目

作者简介:冯尚国(1980—),男,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事植物遗传多样性研究。

Tel:15868471071 E-mail:shangguo007@126.com

*通讯作者 王慧中 E-mail:whz62@163.com

量研究。然而,目前市场上商品铁皮石斛掺假现象十分常见,严重影响了商品铁皮石斛的质量。因此,寻找有效的鉴别铁皮石斛的方法是十分重要的。

DNA 分子标记能对不同发育时期的生物个体、任何组织器官甚至细胞进行检测,数量极多,遍及整个基因组,多态性高,遗传稳定,不受环境及基因表达中的限制。本文详细综述了近年来分子标记在铁皮石斛研究中的应用现状,目的是为铁皮石斛的精确鉴定和对其种质资源的合理开发和利用提供有效的分子技术依据。

1 随机扩增 DNA 多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)

RAPD 分子标记是由美国杜邦公司科学家 Williams 与加利福尼亚生物研究所的 Welsh 所领导的两个小组 1990 年同时发展的一种标记技术,该标记具有操作简单、通用性高、费用低、不需知道研究对象基因组序列等优点。

彭锐等^[6]采用 RAPD 分子标记对包括贵州铁皮石斛在内的 15 种石斛进行鉴定,研究从 70 个随机引物中筛选出 10 个有效引物进行 DNA 扩增,共产生 99 个 DNA 片段,平均每个引物扩增出 9.9 个 DNA 片段,99 个片段中公共片段 15 个,显示多态性片段 84 个,占 84.85%;聚类分析表明,10 个引物能将 15 种石斛属植物有效的区分开,其中 4 种扩增出特异性带,说明 RAPD 技术用于中药石斛鉴定是一种有效的方法。张铭等^[7]利用 RAPD 标记技术对石斛属的 26 个种和金石斛属的 1 个种进行了基因组 DNA 多态性分析,并构建聚类树状图,根据筛选到的 DNA 片段序列,将 Sangon18 引物从 3 端延长至 20 bp,设计成的特异性引物能方便快捷地鉴别出铁皮石斛。丁鸽等^[8]采用 RAPD 分子标记技术对铁皮石斛 8 个野生居群的遗传多样性、亲缘关系及分子鉴别等进行研究,利用 S412 引物可以有效地鉴别铁皮石斛的 8 个野生居群。王慧中等^[9]利用 10 个 RAPD 引物对 13 种石斛属植物进行遗传多样性和亲缘关系分析,将铁皮石斛和其他石斛物种区分开。

2 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 分子标记技术由 Zabeau 和 Vos 等在 1993 年发明的,其将基因组 DNA 用成对的限制性内切酶双酶切后产生的片段用与酶切位点互补的接头连接起来,并通过 5 端与接头互补的半特异性引物扩增得到大量 DNA 片段,从而形成指纹图谱的分子标记。AFLP 标记既具有 RAPD 标记技术的方便性,又具有限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术的可靠性^[10],因此,被广泛应用于石斛的研究。

王慧中等^[11]采用 AFLP 技术对 13 种石斛属植物进行研究,选择性扩增引物组合 E + ACT/M + CAC、E + AAC/M + CAC 和 E + ACA/M + CAC 分别对 13 种材料进行扩增,得到丰富的条带,成功地将铁皮石斛与其他石斛物种分开,表明 AFLP 标记技术对石斛属植物的遗传多样性和分类鉴别研究是可行的。白音等^[12]利用 AFLP 标记技术对我国 38

种石斛进行研究,把铁皮石斛与其他 37 种石斛属植物区别开。Li 等^[13]利用 AFLP 标记技术对 12 个铁皮石斛居群的 71 个植株的遗传多样性及居群遗传结构进行研究,发现居群间分化系数处于 0.047 ~ 0.578,居群间的遗传变异平均百分比为 26.97%,利用 TFGPA 软件进行 UPGMA 聚类,把 12 个铁皮石斛居群分为 3 大类。

3 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)

SSR 标记又称微卫星 DNA,是一类由几个(多为 1 ~ 6 个)碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列,SSR 的基序中最常见的是(CA)_n和(TG)_n双核苷酸重复^[14]。SSR 标记技术是由 Moore 等 1991 年创立的,其基本原理是根据微卫星重复序列两端的特定短序列设计引物,通过 PCR 反应扩增微卫星片段。SSR 标记具有数量丰富、多态性高、共显性、重复性好等优点。近年来,微卫星标记已经成为比较理想的分子标记,并且在石斛研究中也开始有所应用。

Yue 等^[15]从研究的 42 个商业石斛杂交品种中开发出了 14 个 SSR 多态性标记,并将其用于石斛品种的鉴定,结果显示,这些 SSR 标记可以用于分子生态学研究、遗传图谱构建和遗传辅助育种,同时还可以用于石斛新品种的保护。Gu 等^[16]从两个富含微卫星的文库中分离和鉴别出 12 个微卫星标记,以乐业铁皮石斛居群的 22 个个体为研究对象,研究发现这些标记具有多态性,并且每个标记出现 3 ~ 12 个等位基因,观察和预期的杂合度分别介于 0.150 ~ 0.624 及 0.162 ~ 0.605,首次从铁皮石斛中发现微卫星标记特征,可以用来进行种质资源保护、遗传多样性、种群结构及个体鉴定等研究。

4 简单重复序列间区(inter-simple sequence repeats, ISSR)

ISSR(简单重复序列中间区域)标记技术是由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等于 1994 年提出的。其原理是用加锚定的微卫星寡核苷酸作引物,即在 SSR 的 5 端或 3 端加上 2 ~ 4 个随机选择的核苷酸,引起特定位点退火,从而导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间的 DNA 片段进行 PCR 扩增。ISSR 标记技术结合了 RAPD 和 SSR 标记技术的优点,既具有很好的稳定性和多态性^[17,18],又有操作简单、快速、高效等^[19]特点,目前已经广泛用于植物的多个领域研究中。

ISSR 标记技术在石斛研究中也广泛应用。沈颖等^[20]最先采用 ISSR-PCR 方法对石属 9 种植物进行鉴别,发现引物 UBC-807 和 UBC-864 具有较高的多态性条带比率,可以独立将云南铁皮石斛和其他 8 种供试种区分开来,表明 ISSR 标记技术作为一种简便、可靠的分子标记鉴定技术,可以用于石斛属种间鉴别。沈洁等^[21]针对铁皮石斛 ISSR 的反应特点,建立了稳定可靠的 ISSR 分子指纹标记反应体系,为进一步研究铁皮石斛的居群差异奠定基础。Shen 等^[22]利用 ISSR 标记技术对铁皮石斛的 8 个居群进行研究,10 个 ISSR 引物扩增出 127 个 DNA 片段,其中 115 个 DNA 片段是多态性,多态性比为 90.5%,同时发现 16 个具有特异性的标记,研究表明供试铁皮石斛的 8 个野生居群可以用 ISSR

标记技术精确的区分开。

5 相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)

SRAP 标记技术由美国加州大学 Li 与 Quiros 于 2001 年开发出来的,是一种基于 PCR 的新型分子标记技术,又名基于序列扩增多态性 (sequence-based amplified polymorphism, SBAP)^[23]。SRAP 通过设计一对特异的引物对开放阅读框 (ORFs) 进行扩增。上游引物中的 CCGG 序列可与 ORFs 区域中的外显子特异性结合,下游引物中的 AATT 序列特异结合于富含 AT 区的内含子和启动子。这样上下游引物结合可以同时对外显子、内含子和启动子区域进行特异性扩增,并且因为个体不同及物种的内含子、启动子和间隔序列不同而产生多态性。SRAP 标记是一种新型的分子标记,具有操作简单、多态性高、稳定、共显性遗传及花费少等优点,目前已经被应用于植物遗传多样性分析^[24]、遗传连锁图谱构建^[25]、重要性状基因标记^[26]及比较基因组学^[27]等研究领域。

樊洪泓等^[28]首次将 SRAP 标记技术应用于石斛遗传多样性研究中,对包括铁皮石斛 3 个居群的 9 种供试石斛进行研究,发现霍山石斛在分类地位上更接近于铜皮石斛 (相似系数为 0.689 4),与铁皮石斛的亲缘关系相对较远 (相似系数为 0.561 3)。浙江、云南和霍山 3 个居群的铁皮石斛中,浙江居群与云南居群的亲缘关系更近,相似系数为 0.789 2。研究表明,SRAP 技术可以应用于药用石斛的遗传多样性及亲缘关系的研究。Ding 等^[29]利用 SRAP 标记对铁皮石斛的 9 个野生种的 84 个植株进行研究,发现在物种水平上遗传多样性较高 (PPB = 88.07%, HE = 0.288 0),居群水平上差异性较低 (PPB = 51.68%, HE = 0.187 8)。同时发现,居群间分化系数分布于 0.132 7 ~ 0.415 1,种群平均遗传多样性为 27.05%。用 TFPGA 软件做得聚类图把 9 种铁皮石斛 84 个植株聚为两类,与 NTSYS 分析得到结果一致。

6 核糖体 DNA (rDNA) 内转录间隔区序列 (ITS) 标记

ITS 在 rDNA 中位于 18S ~ 26S 基因,由 5.8 基因分两段 ITS1 和 ITS2,5.8S、18S、26S 进化速度慢,通常用于研究科级及科级以上等级的系统发育问题,而 ITS 区进化速度较快,可以用于研究属间、种间及居群间的系统关系。现已在冬虫夏草^[30]、绞股蓝^[31]、甘草^[32]、灵芝^[33]、何首乌^[34]、丹参^[35]等中药植物鉴别研究中有所应用。

Lau 等^[36]报道 16 个不同的石斛种间 ITS2 序列平均差异 12.4%,而非兰科植物以及拟石斛之间平均有 29.8% 和 18.8% 的序列不同,并认为 ITS2 序列可以用于鉴别药用石斛的真假。丁小余等^[37]运用 PCR 直接测序法对广西、云南、贵州铁皮石斛主要居群的 rDNA ITS 区进行碱基序列测定,发现铁皮石斛居群内部 rDNA ITS 区的差异与植物生活型的差异呈一定的相关性,H 型居群的铁皮石斛是 F 型的变种,首次报道了铁皮石斛 ITS 区域的碱基序列。另外,丁小余等^[38]对枫斗类石斛的 rDNA ITS 区序列进行测序及分析,并且建立了 21 种枫斗类石斛的 rDNA ITS 区全序列数

据。Ding 等^[39]利用叶绿体基因片段 (mat K 和 rbcL)、rDNA ITS 和线粒体基因 (nad1 intron 2) 对铁皮石斛的 8 个居群进行研究,发现居群间 mat K、rbcL 和 nad1 intron 2 之间没有差异性,而在 rDNA ITS 区存在 9 个单核苷酸多态性 (SNPs)。利用这些 SNPs 设计两对等位基因特异性引物,结合等位基因特异 PCR (AS-PCR) 方法可以将不同来源的铁皮石斛区分开,并将来自 GSG 和 FSC 两个优质种群的样品从 50 种枫斗商品中区分出来,为铁皮石斛的道地性研究和铁皮枫斗的质量监控打下了基础。

7 其他标记技术

与 rDNA ITS 一样,叶绿体基因片段和线粒体基因片段在药用植物研究中也有广泛的应用。滕艳芬等^[40]比较包括铁皮石斛在内的几种《中国药典》收载石斛和常见市场混淆品种的 mat K 基因序列,发现非石斛属的几种混淆品与正品石斛间的 mat K 基因序列差异远大于正品石斛间的差异,研究表明 mat K 基因序列可以分析石斛及其混淆品的遗传关系,将正品与混淆品区分开来。Zhang 等^[41]扩增并测定 9 种石斛属植物线粒体中 NADH 脱氢酶亚基基因 (nad1) 内含子 2 (intron 2) 全长序列,结果显示线粒体 nad 1 intron 2 序列可以作为一种新的标记技术用于石斛属植物的鉴定。这些研究都为铁皮石斛种质资源的鉴别和保护研究提供了新的技术。

另外,抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 技术及适配器连介的等位基因特异性扩增技术 (adapter ligation-mediated allele-specific amplification, ALM-ASA) 在铁皮石斛鉴别研究中也具有重要应用^[42-45]。

8 前景展望

分子标记技术在铁皮石斛上的应用,有助于铁皮石斛种质资源的鉴别保护和开发利用。现代分子标记虽有缺陷,但是与传统标记 (形态标记、细胞标记及生化标记) 相比有许多优点,分子标记是直接在 DNA 分子上检测生物间的差异,是在 DNA 水平上遗传变异的直接反映。随着分子生物理论和技术的快速发展,会不断开发出速度更快、费用更低、可靠性更高的分子标记技术,DNA 分子标记在铁皮石斛研究中应用会更加广泛,更加深入。

参考文献:

- [1] 包雪声, 顺庆生, 张申洪, 等. 中国药用石斛图志 [M]. 上海科学技术文献出版社, 2005.
- [2] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 109-113.
- [3] 付开聪, 冯德强, 张绍云, 等. 铁皮石斛集约化高产栽培技术研究 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 177-179.
- [4] 陈晓梅, 郭顺星, 孟志霞. 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 423-426.
- [5] 殷放宙, 陆兔林, 蔡宝昌, 等. 铁皮石斛药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 433-435.
- [6] 彭锐, 李泉森, 李隆云. 石斛的分子生物学鉴定—基于 RAPD 分析 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(4): 437-440.
- [7] 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.
- [8] 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]. 药学报, 2005, 40 (11): 1028-1032.
- [9] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系 [J]. 中草药, 2006, 37 (4): 558-592.
- [10] 邹喻苹, 哥 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 13 种石斛属植物遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40 (3): 205-210.
- [12] 白 音, 包英华, 王全文, 等. 国产石斛属植物亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2007, 34 (6): 1569-1574.
- [13] 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: 159-166.
- [14] 周廷清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [15] Yue G H, Lamchan L T, Hong Y. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties [J]. *Molecular Ecol Notes*, 2006, 6: 832-834.
- [16] Gu S, Ding X Y, Wang Y, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China [J]. *Molec Ecol Notes*, 2007, 7: 1166-1168.
- [17] Tsumura Y, Ohba K, Straus S H. Diversity and inheritance of intersimple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 40-45.
- [18] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408-417.
- [19] Fernandez M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 845-851.
- [20] 沈 颖, 徐 程, 万小凤, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36 (3): 423-427.
- [21] 沈 洁, 丁小余, 丁 鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 ISSR 指纹标记方法的建立和优化 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (4): 291-294.
- [22] 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.
- [23] Ferriol M, Pico M B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers [J]. *Gen Resour Crop Evol*, 2003, 50: 227-238.
- [24] Han X Y, Wang L S, Shu Q Y, *et al.* Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Biochem Genet*, 2008, 46: 62-179.
- [25] Sun Z D, Wang Z N, Tu J X, *et al.* An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SPAR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 1305-1317.
- [26] Rahman M, Sun Z D, McVetty P B E, *et al.* High throughput genome-specific and gene-specific molecular markers for erucic acid genes in *Brassica napus* (L.) for marker-assisted selection in plant breeding [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 895-904.
- [27] Li G, Cao M, Yang B, *et al.* Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168-180.
- [28] 樊洪泓, 李廷春, 邱 婧, 等. 药用石斛遗传多样性的 SRAP 标记研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (1): 6-10.
- [29] 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: 149-156.
- [30] 郝剑强, 程 舟, 梁洪卉, 等. 基于 rDNA ITS 序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局 [J]. 中草药, 2009, 40 (1): 112-116.
- [31] 蒋玲艳, 郭志刚, 王羽中, 等. 中国不同地区胶股蓝 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2009, 40 (7): 1123-1127.
- [32] Kondo K, Shiba M, Yamaji H, *et al.* Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30 (8): 1497-1502.
- [33] 苏春丽, 唐传红, 张劲松, 等. 基于 rDNA ITS 序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系 [J]. 微生物学报, 2007, 47 (1): 11-16.
- [34] 张宏意, 石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究 [J]. 中草药, 2007, 38 (6): 911-914.
- [35] 汪 红, 王 强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2005, 36 (9): 1381-1385.
- [36] Lau D T, Shaw P C, Wang J, *et al.* Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67 (5): 456-460.
- [37] 丁小余, 王峰涛, 徐珺珊, 等. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (2): 85-89.
- [38] 丁小余, 王峰涛, 徐 红, 等. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别 [J]. 药学报, 2002, 37 (7): 567-573.
- [39] Ding G, Xu G H, Zhang W C, *et al.* Preliminary geotherbalism study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers [J]. *Eur Food Res Technol*, 2008, 227: 1283-1286.
- [40] 滕艳芬, 吴晓俊, 徐 红, 等. 石斛及其常见混淆品的 mat K 基因序列比较 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33 (4): 280-283.
- [41] 张 婷, 王峰涛, 徐珺珊, 等. 线粒体 nad1 内含子 2 序列在石斛属植物分子鉴定中的应用 (英文) [J]. 中草药, 2005, 36 (7): 1059-1062.
- [42] Li T X, Wang J K, Bai Y F, *et al.* A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32 (4): e45.
- [43] Li T X, Wang J K, Lu Z H. Accurate identification of closely related *Dendrobium* species with multiple species-specific gDNA probes [J]. *J Biochem Bioph Methods*, 2005, 62 (2): 111-123.
- [44] Ding G, Zhang D Z, Feng Z Y, *et al.* SNP, ARMS and SSH authentication of medicinal *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and application for identification of Fengdou Drugs [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31 (4): 553-557.
- [45] Zhang W C, Ding X Y, Xie M L, *et al.* Authentication of three valuable *Dendrobium* species by adapter ligation-mediated allele-specific amplification [J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, 229: 1-7.