

• 药材与资源 •

石豆兰属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析

蒋 明, 陈贝贝, 贺蔡明

台州学院生命科学院, 浙江 临海 317000

摘要: 目的 通过测定 11 种石豆兰属植物的 ITS 序列, 为石豆兰属植物分子鉴定和遗传多样性研究提供依据。方法 利用 PCR 法从叶片基因组 DNA 中克隆 ITS 序列, 并借助生物信息学软件对其进行分析。结果 11 种石豆兰属植物的 ITS 全长为 633~645 bp, 5.8 S 序列长度 162 bp, ITS1 和 ITS2 序列变异位点丰富, 共 168 个, 其中信息位点 95 个, 序列存在大量的转换、颠换和缺失; 5.8 S 序列较为保守, 仅含 6 个变异位点和 2 个信息位点; 11 种石豆兰属植物的遗传距离为 0.002 2~0.212 0, 其中齿瓣石豆兰与斑唇石豆兰之间的遗传距离最小, 亲缘关系最为接近。序列已上传至 NCBI, 登录号为 JN619409~JN619419。结论 获得了 11 种石豆兰属植物的 rDNA ITS 序列, 为石豆兰属植物分子鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 石豆兰属; ITS 序列; rDNA; 分子鉴定; 遗传多样性

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0343-07

Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from plants in *Bulbophyllum* Thouars

JIANG Ming, CHEN Bei-bei, HE Cai-ming

College of Life Science, Taizhou University, Linhai 317000, China

Abstract: Objective To provide the evidence for molecular identification and genetic diversity studies, sequencing and comparison of ITS sequences from 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars were performed. **Methods** ITS sequences were cloned from leaf genomic DNA by PCR and were analyzed using bioinformatics softwares. **Results** The full ITS and 5.8 S sequences of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars were 633—645 and 162 bp in length, respectively. Variable sites were rich in ITS1 and ITS2 sequences with 168 variable sites among which 95 were parsimony information sites. Many transitions, transversions, and deletions were observed. 5.8 S sequences were conserved and there were only six variable sites and two parsimony information ones. The genetic distance of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars ranged from 0.002 2 to 0.212 0. The smallest genetic distance was observed between *B. levinei* and *B. pectenvenensis* revealing their closest relationship. Sequences were submitted to the NCBI database under the accession numbers of JN619409—JN619419. **Conclusion** rDNA ITS sequences of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars are obtained which could provide a foundation for molecular identification and genetic diversity studies.

Key words: *Bulbophyllum* Thouars; ITS sequence; rDNA; molecular identification; genetic diversity

石豆兰属 *Bulbophyllum* Thouars 是兰科 (Orchidaceae) 植物最大的属, 全世界约有 1 200 种^[1]。我国有 98 种 3 变种, 主要分布在华南、西南地区^[2-3]。石豆兰属植物含菲类、联苄、苯丙素、黄酮、甾体和挥发性成分, 具有抗氧化、抗病毒和抗肿瘤等活性, 具滋阴降火、润肺化痰、行气止痛和生津养胃等功效^[4], 如广东石豆兰 *B. kwangtungense* Schltr. 是民间常用的药用植物, 可治疗风热咽痛、肺燥咳嗽、关节疼痛、跌打损伤和小儿惊风等; 齿瓣石豆兰 *B. levinei* Schlectn 可用于治疗高热口渴、乳痈疗肿和急性咽炎等^[3]。目前, 对石豆兰属植物的研究主要集中在化学成分^[5-9]、组

织培养^[10]、生药学^[11-12]和授粉生物学^[13-15]等方面, 并取得了一定的进展。近年来, 在石豆兰属植物的染色体核型、遗传标记、分子进化和基因克隆等方面也有少量的报道^[16-19]。

石豆兰属植物常与石仙桃属 *Pholidota* Ldl、石斛属 *Dendrobium* Sw. 和金石斛属 *Ephemerantha* Hunt et Summerh. 在市场上作为石斛流通, 经过加工后的药材外形相似, 而且由于化学成分方面的研究报道较少, 通过形态和理化性质进行鉴别比较困难^[20-21]。分子生物学技术已成为中药材鉴定的重要手段, 采用 ISSR、RAPD、AFLP 和 ITS 等标记可快速、准确鉴定植物物种。核糖体 DNA 内转录间隔区

收稿日期: 2011-09-17

作者简介: 蒋 明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学及其分子调控。E-mail: jiangming1973@139.com
网络出版时间: 2011-12-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20111220.1346.002.html>

(internal transcribed spacer, ITS) 序列是常用的分子标记之一, 其长度变异小, 进化速率较快, 已广泛应用于植物属内、属间及种内不同居群间的系统发育分析和分类鉴定^[22]。本研究以分布在我国 11 种石豆兰属植物为材料, 通过克隆、测定核糖体 ITS1-5.8 S-ITS2 的完整序列, 利用生物信息学手段比较其序列特征, 为石豆兰属药用植物的分子鉴定

和遗传多样性研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

11 种石豆兰属植物来自浙江、海南、云南、广西和四川等省区, 具体来源见表 1, 其中的毛药卷瓣兰为浙江新记录种。在野外采集健康、完整叶片, 置于冰盒中带回实验室, 经无菌 ddH₂O 冲洗

表 1 石豆兰属植物来源

Table 1 Sources of plants in *Bulbophyllum* Thouars

编号	植物名称	采集地	经度	纬度	海拔 / m	NCBI 登录号
1	齿瓣石豆兰 <i>B. levinei</i>	浙江黄岩	120°08'	28°41'	276	JN619409
2	黄花卷瓣兰 <i>B. obtusangulum</i>	海南保亭	109°41'	18°38'	923	JN619410
3	双叶卷瓣兰 <i>B. wallichii</i>	云南勐腊	101°35'	21°31'	1 433	JN619411
4	豹斑石豆兰 <i>B. colomaculosum</i>	云南勐腊	101°35'	21°31'	1 730	JN619412
5	芳香石豆兰 <i>B. ambrosia</i>	云南勐腊	101°35'	21°31'	1 247	JN619413
6	广东石豆兰 <i>B. kwangtungense</i>	浙江临海	120°58'	28°50'	466	JN619414
7	天贵卷瓣兰 <i>B. tianguii</i>	广西乐业	106°22'	24°51'	991	JN619415
8	麦穗石豆兰 <i>B. orientale</i>	云南勐海	100°20'	21°57'	1 329	JN619416
9	梳帽卷瓣兰 <i>B. andersonii</i>	四川峨眉	103°31'	29°34'	698	JN619417
10	斑唇卷瓣兰 <i>B. pectenveners</i>	浙江黄岩	120°08'	28°41'	260	JN619418
11	毛药卷瓣兰 <i>B. merandrum</i>	浙江黄岩	120°08'	28°41'	289	JN619419

后于-80 °C 低温冰箱中保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的制备采用 SDS 法^[23], 称取约 0.5 g 叶片, 经液氮研磨成粉末后用于 DNA 的提取。

1.3 ITS 序列的克隆、转化和测序

ITS 序列克隆所用的上、下游引物分别为 P1: 5'-AACAAGGTTTCCGTAGGTGA-3' 和 P2: 5'-TAT-GCTTAAATTCAGCGGGT-3'。反应在 BIO-RAD C1000 型 PCR 仪上进行, 采用 20 μL 的反应体系, 包括 2 μL 10×PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺), 0.4 μL 0.2 μmol/L dNTP (上海生工生物工程有限公司), 0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶 (北京鼎国有限公司), 0.25 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL, 35 ng DNA 模板, ddH₂O 补至 20 μL。扩增条件为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 70 s; 循环 32 次; 72 °C 延伸 7 min。

PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收、纯化, 操作按其提供的说明书进行。各取 5 μL PCR 回收产

物, 克隆到 p-GEM T-easy 载体于室温连接 2 h。将连接产物转入 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 经涂布培养、蓝白斑筛选和菌液 PCR 验证, 各取 2 个阳性克隆双向测序。

1.4 序列分析

ITS1、5.8 S 和 ITS2 序列根据 NCBI 发布的 ITS 序列确定, Dnastar 5.01 软件用于统计 GC 值; 利用 ClustalX 1.81 软件进行序列比对, 用 MEGA 3.1 软件计算遗传距离和构建系统发育树, 进化树的构建采用邻近法, 经 1 000 次自举检测。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度和 GC 值

根据 NCBI 数据库发布的 ITS 序列, 确定 11 种石豆兰属植物 ITS1、5.8 S 和 ITS2 的序列范围。结果表明, 11 种石豆兰属植物的 ITS 全长为 633~645 bp, 其中芳香石豆兰的序列最短, 毛药卷瓣兰、双叶卷瓣兰和广东石豆兰的序列最长。5.8 S 序列的长度相同, 均为 162 bp; ITS1 的长度为 232~244 bp,

其中豹斑石豆兰的序列最短，双叶卷瓣兰最长，两者相差 12 bp；ITS2 的长度为 231~246 bp，芳香石豆兰的序列最短，毛药卷瓣兰的序列最长，两者相差 15 bp。11 种石豆兰属植物 5.8 S、ITS1 和 ITS2 序列的 GC 值分别为 59.2%~61.1%、60.6%~67.9% 和 58.4%~67.1%，见表 2。

2.2 5.8 S 序列的比较分析

用 ClustalX 1.81 软件对 11 种石豆兰属植物的 ITS 序列进行对齐，并利用 MEGA 3.1 软件获得 5.8 S、ITS1 和 ITS2 的变异位点及信息位点。结果表明，5.8 S 序列比较保守，仅含 6 个变异位点，其中信息位点 2 个，分别位于+128 bp 和+138 bp 处，

单核苷酸位点 4 个，分别位于+85 bp、+119 bp、+151 bp 和+161 bp 处。毛药卷瓣兰、梳帽卷瓣兰、天贵卷瓣兰和豹斑石豆兰的 5.8 S 序列完全相同，齿瓣石豆兰、芳香石豆兰和斑唇卷瓣兰与毛药卷瓣兰仅 1 个碱基的差别，其余 3 种植物的 5.8 S 序列与毛药卷瓣兰之间存在 2 个碱基的差别（图 1）。

2.3 ITS1 和 ITS2 序列的比较分析

与 5.8 S 相比较，11 种石豆兰属植物的 ITS1 和 ITS2 序列变异较大，存在大量的转换、颠换和缺失等现象（图 2、3）。ITS1 有 85 个变异位点，其中信息位点 47 个，单核苷酸位点 37 个；ITS2 序列有 83 个变异位点，其中信息位点 48 个，单核苷酸位点

表 2 石豆兰属植物 ITS 序列长度及 G+C 量
Table 2 Length and G + C contents of ITS sequences of plants in *Bulbophyllum* Thouars

编 号	ITS 全长 / bp	5.8 S		ITS1		ITS2	
		长度 / bp	(G+C) / %	长度 / bp	(G+C) / %	长度 / bp	(G+C) / %
1	643	162	61.1	237	67.9	244	65.9
2	639	162	60.4	233	63.9	244	63.1
3	645	162	59.2	244	60.6	239	61.1
4	639	162	60.4	232	62.1	245	58.4
5	633	162	61.1	240	65.0	231	62.7
6	645	162	60.5	239	64.9	244	64.0
7	644	162	60.4	237	62.0	245	66.6
8	639	162	59.8	233	63.9	244	63.5
9	644	162	60.4	237	66.2	245	66.6
10	644	162	61.1	237	67.9	245	65.7
11	645	162	60.4	237	64.6	246	67.1

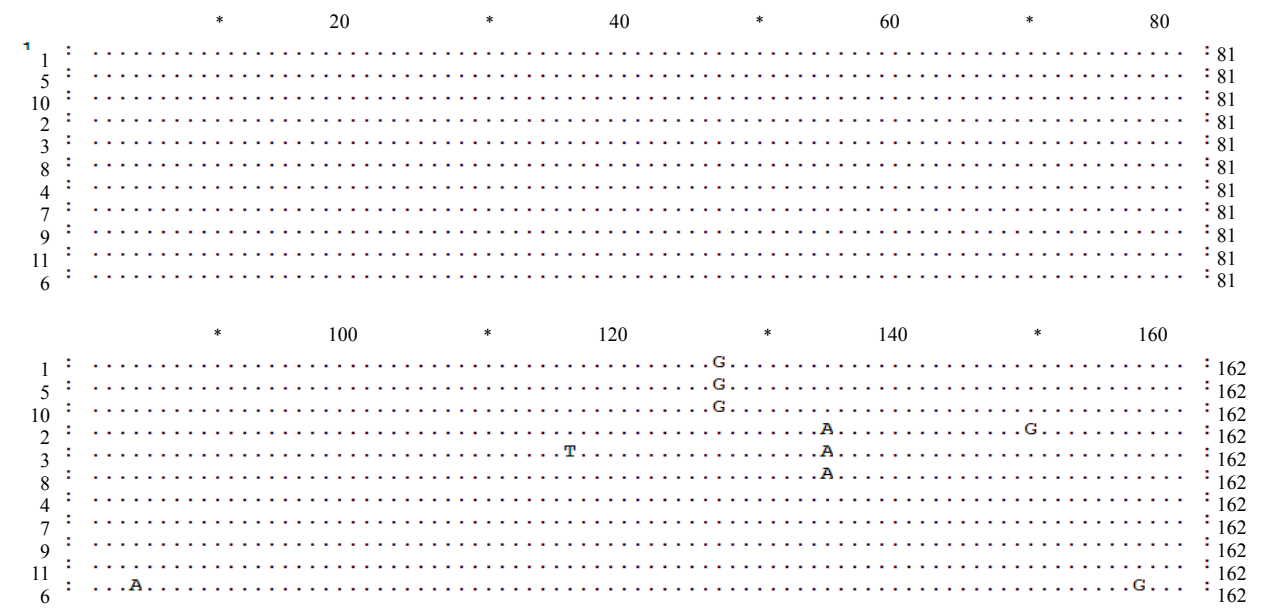


图 1 11 种石豆兰属植物 5.8 S 序列的比对
Fig. 1 Comparison on 5.8 S sequences of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars

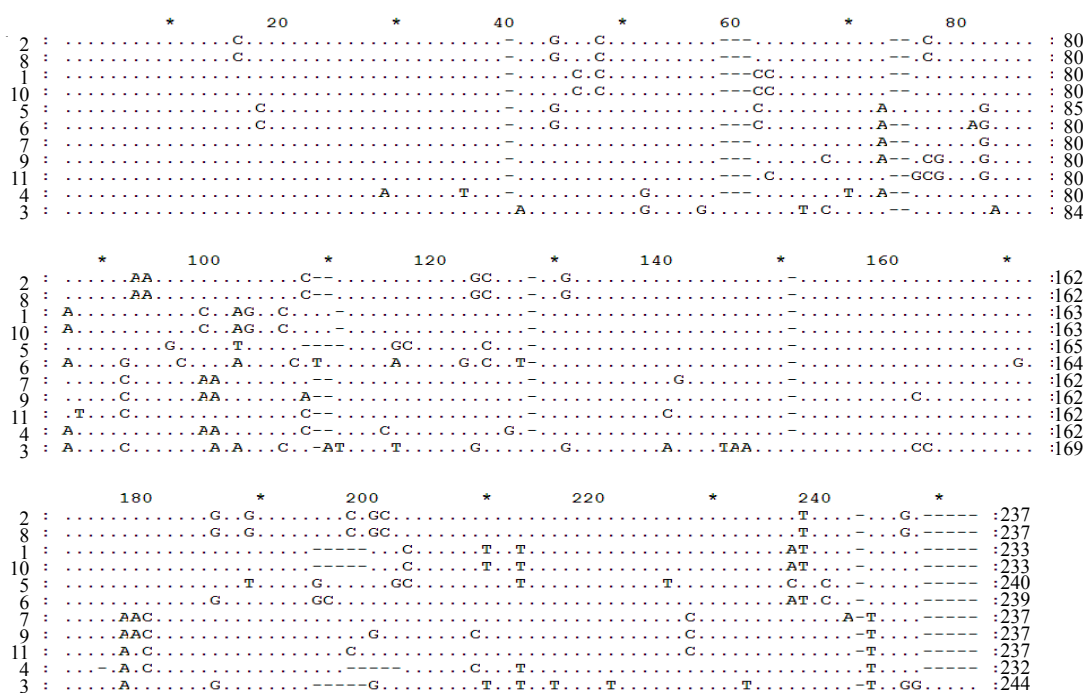


图 2 11 种石豆兰属植物 ITS1 序列的比对

Fig. 2 Comparison on ITS1 sequences of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars

图 3 11 种石豆兰属植物 ITS2 序列的比对

Fig. 3 Comparison on ITS2 sequences of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars

35 个。序列比对结果表明, 双叶卷瓣兰与其他 10 种植物的 ITS1 和 ITS2 序列相差较大, 存在大量的转换、颠换和插入现象, 如 ITS1 序列的+60 位、+151 位和+249 位分别有 3、1、5 bp 的插入。尽管芳香石豆兰与广东石豆兰 ITS 序列之间存在一定的差异, 如在 ITS1 中+118 位和 ITS2 中+26 位分别缺失 4 bp 和 12 bp, 但与其他物种比较, 两者的差异相对较小。

2.4 进化分析

利用 ClustalX 1.81 软件对 ITS1 和 ITS2 进行排序和比对, 并用 MEGA 3.1 软件计算遗传距离, 结果表明, 11 种石豆兰属植物的遗传距离在 0.002 2~0.212 0, 齿瓣石豆兰与斑唇石豆兰之间的遗传距离

最小, 亲缘关系最为接近; 其次是黄花卷瓣兰与麦穗石豆兰, 遗传距离为 0.004 4; 双叶卷瓣兰与广东石豆兰的遗传距离最大, 为 0.212 0, 两者关系最远, 与芳香石豆兰的遗传距离稍近, 为 0.203 7 (表 3)。

采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树, 经 1 000 次自举检测。结果表明, 11 种石豆兰属植物可分为 2 簇, 双叶卷瓣兰单独成 1 簇, 另 10 种植物归为 1 簇, 并可分为若干组, 即齿瓣石豆兰与斑唇卷瓣兰、芳香石豆兰与广东石豆兰、梳帽卷瓣兰、天贵卷瓣兰与毛药卷瓣兰、黄花卷瓣兰与麦穗石豆兰聚为一组, 而豹斑石豆兰单独成为一组 (图 4)。

表 3 11 种石豆兰属植物的遗传距离

Table 3 Genetic distances of 11 plants in *Bulbophyllum* Thouars

编 号	2	8	1	10	5	6	7	11	9	4	3
2											
8	0.004 4										
1	0.122 3	0.117 2									
10	0.124 8	0.119 7	0.002 2								
5	0.133 9	0.128 7	0.132 0	0.134 6							
6	0.132 5	0.127 3	0.118 9	0.121 4	0.115 3						
7	0.116 8	0.111 8	0.114 7	0.117 2	0.137 6	0.124 8					
11	0.138 8	0.133 7	0.131 1	0.128 6	0.143 0	0.135 7	0.051 0				
9	0.124 6	0.119 5	0.103 5	0.106 0	0.131 6	0.113 5	0.050 7	0.065 3			
4	0.123 9	0.121 2	0.129 7	0.132 2	0.139 4	0.137 2	0.102 9	0.113 5	0.116 0		
3	0.149 0	0.143 8	0.166 8	0.169 5	0.203 7	0.212 0	0.138 8	0.150 1	0.158 6	0.162 4	

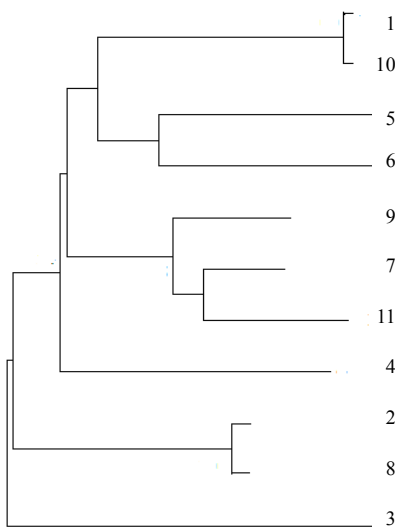


图 4 基于 NJ 法构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed on NJ method

3 讨论

分子标记技术在中药鉴定中得到了广泛应用, 这些标记包括 ISSR、AFLP、SSR、RAPD 和 ITS 等。ISSR、AFLP、SSR 和 RAPD 在兰科药用植物鉴定中已有报道, 主要集中在台湾金线莲、石斛属和铁皮石斛等植物^[24-28]。ITS 序列位于 18 S 和 26 S rDNA 基因之间, 由 5.8 S 基因分成 ITS1 和 ITS2 两段, 在核基因组中高度重复, 变异速度较快, 具有丰富的信息位点, 可用于科以下分类单位的系统发育分析和分子鉴定^[29]。由于操作简单, 结果正确, 近年来, ITS 序列在药用植物分子系统学和鉴定方面得到了广泛应用。通过测定隔山消 *Cynanchum wilfordii*、耳叶牛皮消 *C. auriculatu* 和泰山白首乌 *C. bunge* 的 ITS 序列, 发现样品间存在多个变异位点, 可用于白首乌种质资源的鉴定^[22]; 对重齿当归

Angelica biserrata、紫花前胡 *A. decursiva* 和骨缘当归 *A. cartilaginomarginata* var. *foliosa* 等当归属植物的 ITS 进行测定, 结果与功效差异基本吻合^[30]; 比较川乌、草乌及市场流通的混淆种类 ITS 序列, 结果表明 ITS 序列可准确鉴定这些乌头类药材^[31]; 通过测定、比较牛蒡子 *Arctium lappa* 和伪品毛头牛蒡 *A. tomentosum*、大翅蓟 *Onopordum acanthium*、水飞蓟 *Silybum marianum* 及紫穗槐 *Amorpha fruticosa* 的 ITS 序列, 结果表明, 根据 ITS 序列可有效分辨牛蒡子及伪品^[32]。

ITS 序列在兰科药用植物鉴定方面也有一些报道, 但主要集中在石斛属植物。通过测定线叶石斛 *Dendrobium aurantiacum*、长苏石斛 *D. brymerianum*、细叶石斛 *D. hartcockii* 和金钗石斛 *D. nobile* 等的 ITS 序列, 发现该序列在种内十分保守, 种间则有较大变异, 可作为中药黄草石斛 *D. chrysanthum* 分子鉴定的标记^[20]; 通过测定 17 种药用石斛的 rDNA ITS 序列, 结果表明, ITS1 和 ITS2 序列的变异位点/信息位点分别为 167/106 和 165/115 个, 可以用于石斛属药用植物的分子鉴定^[33]。通过比较浙江乐清铁皮石斛 *D. officinale* 与其他 34 种石斛属植物的 ITS 序列, 发现乐清铁皮石斛与黄石斛 *D. tosaense* 的关系最为接近, 与其他石斛的差异稍大^[34]。

本研究从 11 种石豆兰属植物中克隆到了各自的 ITS 序列, 研究结果表明, 序列中存在大量的转换、颠换和缺失现象, ITS 序列的信息位点与单核苷酸位点十分丰富, 分别占总碱基的 18.8% 和 13.6%, 位点数量在 ITS1 和 ITS2 之间的差异不大, 利用这些位点, 可将 11 种植物完全区分, 因此可用作该属植物鉴定的分子标记。11 种石豆兰属植物的遗传距离在 0.002 2~0.212 0, 在系统发育树上分为两簇, 二叶类型的双叶卷瓣兰单独成为 1 簇, 10 种单叶类型的石豆兰属植物聚为 1 簇。齿瓣石豆兰与斑唇石豆兰之间的遗传距离最小, 亲缘关系最为接近, 在进化树上归为一组, 支持率达 100%; 黄花卷瓣兰与麦穗石豆兰的遗传距离次之, 为 0.004 4, 支持率也为 100%, 揭示了它们之间较近的亲缘关系。11 种石豆兰属植物的 ITS 序列的克隆与比较, 为分子鉴定、遗传多样性研究和系统发育分析提供了依据。

参考文献

[1] Dressler R L. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family* [M]. Portland: Dioscorides Press, 1993.

- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 19 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 易绮斐, 邢福武, 黄向旭, 等. 我国石豆兰属药用植物资源及其保护 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(1): 65-69.
- [4] 陈业高, 徐俊驹, 高 芳, 等. 石豆兰属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(6): 601-605.
- [5] 刘岱琳, 庞发根, 张家欣, 等. 密花石豆兰的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(2): 103-107.
- [6] 吴 斌, 陈坚波, 何 山, 等. 广东石豆兰中的噁庚英和联苯类化合物 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(2): 305-308.
- [7] Xu J, Yu H, Qing C, et al. Two new biphenanthrenes with cytotoxic activity from *Bulbophyllum odoratissimum* [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(7): 381-384.
- [8] Wu B, He S, Pan Y J. New dihydrodibenzoxepins from *Bulbophyllum kwangtungense* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(13): 1244-1247.
- [9] Leong Y W, Harrison L J. A biphenanthrene and a phenanthro [4, 3-b] furan from the orchid *Bulbophyllum vaginatum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(9): 1601-1603.
- [10] 李洪林, 高 丽, 杨 波. 广东石豆兰的组织培养 [J]. 亚热带植物科学, 2009, 38(3): 72.
- [11] 周 莹, 杨树德, 杨竹雅, 等. 石斛混淆品——腾冲石豆兰的生药学研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(6): 644-647.
- [12] 杨树德, 周 莹, 杨竹雅, 等. 麦穗石豆兰与石斛的生药学比较 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(2): 11-13.
- [13] Teixeira S P, Borba E L, Semir J. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) [J]. *Ann Bot*, 2004, 93(5): 499-505.
- [14] Tan K H, Nishida R, Toong Y C. Floral synomone of a wild orchid, *Bulbophyllum cheiri*, lures *Bactrocera* fruit flies for pollination [J]. *J Chem Ecol*, 2002, 28(6): 1161-1172.
- [15] Keng-Hong T, Nishida R. Synomone or kairomone? *Bulbophyllum apertum* flower releases raspberry ketone to attract *Bactrocera* fruit flies [J]. *J Chem Ecol*, 2005, 31(3): 497-507.
- [16] Than M M M, Pal A, Jha S. Chromosome number and modal karyotype in a polysomatic endangered orchid, *Bulbophyllum auricomum* Lindl., the Royal Flower of Myanmar [J]. *Plant Syst Evol*, 2011, 294: 167-175.
- [17] Than M M M, Majumder A, Pal A, et al. Genomic variations among *in vitro* regenerated *Bulbophyllum auricomum* Lindl. plants [J]. *The Nucleus*, 2011, 54(1): 9-17.
- [18] Fischer G A, Gravendeel B, Sieder A, et al. Evolution of resupination in *Malagasy* species of *Bulbophyllum*

- (Orchidaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 45(1): 358-376.
- [19] Schmidt E C, Borba E, Gravendeel B, *et al*. Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using nuclear and plastid spacers [J]. *Taxon*, 2011, 60: 1050-1064.
- [20] 徐红, 李晓波, 丁小余, 等. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析 [J]. *药学报*, 2001, 36(10): 777-778.
- [21] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 商品石斛的调查及鉴定 (III) [J]. *中草药*, 1995, 26(7): 370-372.
- [22] 张宁, 闫滨, 徐星航, 等. 不同来源白首乌 rDNA ITS 序列分析 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(12): 1537-1540.
- [23] Dellaporta S, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: version II [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1983, 1: 19-21.
- [24] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 137-142.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 朱胜男, 周振华, 冯尚国, 等. 31 种石斛属植物的 RAPD 遗传多样性分析 [J]. *杭州师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 4: 333-339.
- [28] 黄海, 李劲松, 曹兵. 分子标记技术在石斛属植物种质资源研究中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2010, 4: 75-80.
- [29] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *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.
- [30] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. *中草药*, 2006, 37(7): 1072-1076.
- [31] 罗艳, 杨亲二. 川乌与草乌的 ITS 序列分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(11): 820-823.
- [32] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 490-496.
- [33] 刘静, 何涛, 淳泽. 基于 ITS 序列的中国药用石斛及其混伪品的分子鉴定 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2853-2856.
- [34] 周倩, 蒋贤慧, 杨晶晶, 等. 浙江乐清铁皮石斛 rDNA ITS 序列的克隆及序列比对 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(3): 513-517.