

石斛属叶绿体 DNA 序列的系统发育及变异位点分析

钟志敏¹, 张桂芳^{1*}, 黄松¹, 赖小平^{1,2*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东, 广州 510006

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东, 东莞 523808

摘要: **目的** 对石斛属叶绿体 IRa (trnV-GAC~trnR-ACG) 序列进行系统发育和变异位点分析, 深入了解石斛属 10 个物种此序列所含 9 个基因的异同, 为石斛属植物的系统进化历程及 DNA 条形码的研究作重要探索。 **方法** 用改良试剂盒法提取石斛属 10 个样本总 DNA, 自行设计引物, 采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及 T 载体对 PCR 产物进行克隆转化, 扩增石斛属叶绿体 IRa 序列的 DNA 序列, 并与 NCBI 数据库进行序列比对完成序列拼接; 绘制此区域序列的基因结构图, 对 10 条目的序列进行差异位点、遗传距离、系统进化关系等分析。 **结果** 目的序列长约 7 800 bp, 10 条目的序列共存在 55 个差异位点, 在基因 trnV-GAC、rrn16、trnI-GAU、trnA-UGC、orf42、rrn23 及基因间隔区上分布的个数分别是 1、8、12、6、1、9 和 18 个; 系统发育分析将石斛属 10 个样本聚为 4 个类群。 **结论** 建立了测定石斛属叶绿体 IRa 序列的方法, 对石斛属这一序列的系统发育和变异位点分析表明, 此区域序列丰富, 且较为集中分布的变异位点将为石斛属 DNA 条形码的进一步研究、石斛属资源的道地性评价及相关的种质资源鉴定提供较好的理论依据。

关键词: 石斛属; 叶绿体; IRa 序列; 测序; 系统进化; 变异位点; DNA 条形码

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)17-3605-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.024

Phylogenetic and mutation sites analysis on chloroplast DNA sequences in *Dendrobium* Sw.

ZHONG Zhi-min¹, ZHANG Gui-fang¹, HUANG Song¹, LAI Xiao-ping^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China

Abstract: **Objective** To analyze the phylogenetic and mutation sites of IRa (trnV-GAC to trnR-ACG) sequence among 10 *Dendrobium* Sw. samples, to understand the similarities and differences of nine genes in this sequence, and to explore the system evolution and DNA barcode in species of *Dendrobium* Sw. **Methods** The improved kit method was used to extract total DNA and design primers, PCR method and T-vector cloning transformation were used to amplify the region of IRa and the sequences were obtained after the amplified fragment sequences were blasted in NCBI database and splicing. Genetic structures were drawn, and variable sites, genetic distance and phylogenetic relationship among 10 sequences were analyzed. **Results** The lengths of sequences were about 7 800 bp and 55 variable sites were found. The numbers of mutation points distributed on trnV-GAC, rrn16, trnI-GAU, trnA-UGC, orf42, rrn23, and intergenic region were 1, 8, 12, 6, 1, 9, and 18, respectively. These 10 samples were clustered to four latitude-dependent groups based on IRa sequences. **Conclusion** A set of methods on sequence IRa is established. Phylogenetic and mutation point analysis indicate that there is a rich and relatively concentrated distribution variation loci among the research sequences. And it will provide a good theoretical basis on the further study of DNA barcodes, authentic assessment and identification of *Dendrobium* Sw. germplasm resources.

Key words: *Dendrobium* Sw.; chloroplast; IRa (trnV-GAC to trnR-ACG); sequencing; phylogenetic; variable sites; DNA barcode

收稿日期: 2017-01-15

基金项目: 港澳台科技合作专项项目 (2014DFH30010); 广东省省级科技计划科技应用型科技研发专项资金项目 (2015B020234008); 广东省省级科技计划科技基础条件建设领域 (2014A030304059)

作者简介: 钟志敏 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为岭南中药研究。Tel: 18826415755 E-mail: 1826953009@qq.com

*通信作者 张桂芳 (1980—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为药用植物育种研究。Tel: 13929554612 E-mail: zhanggf@gzucm.edu.cn

赖小平 (1960—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为岭南中药研究。Tel: (020)39358045 E-mail: lxp88@gzucm.edu.cn

石斛属 *Dendrobium* Sw. 是兰科 (Orchidaceae) 植物中仅次于石豆兰属的第二大属, 有 1 200~1 500 个种, 其中大多数的物种都具有重要的药用价值和观赏价值。《中国植物志》记载了我国 76 种石斛属植物, 包括 74 种和 2 个变种^[1]。其中, 《中国药典》2015 年版收录的药用石斛有 3 种: 金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.、鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. 或流苏石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. 的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎。石斛属植物具有滋阴清热、生津益胃、泻肺止咳等功效^[2]。然而, 由于石斛属植物大多外形相似, 其属内植物的鉴定与分类一直被认为是兰科植物分类中最复杂的难题。

目前, DNA 条形码技术被认为是进行快速而精确的物种鉴定及系统进化分析中最有前景的技术, 也被广泛用于石斛属植物的鉴定和分类, 为石斛属植物物种鉴定、系统分类、物种进化、植物育种、资源保护等领域研究提供参考, 其中, 被用到的条形码区域有来自叶绿体基因组的 *matK*^[3-7]、*rbcL*^[5-6,8]、*trnH-psbA*^[6,9-12]、*rpoB*^[6]、*rpoC1*^[6]等序列, 以及来自核基因组的 ITS^[8,13-15]序列。尽管使用单位点或者多位点结合的 DNA 条形码都能对石斛属物种进行不同程度的鉴定, 但却没能有一种方法可以达到 100% 的鉴别率。近年来, 随着“超级条形码”^[3]概念的提出及测序技术的快速发展, 已有数十条兰科植物的全叶绿体基因组序列被成功测序并提交到 GenBank 中, 然而要建立“cp-DNA-Barcode”这一“超级条形码”, 这些石斛属样本和种类远远不够, 此外, 完成石斛属全叶绿体基因组测序的成本仍然比较昂贵, 难以推广应用。

IRa (trnV-GAC~trnR-ACG) 区域具有 5 个特点: (1) 在进化过程中存在重组, 导致其萎缩和扩张; (2) 此区域是 tRNA 集中区; (3) 整个 cp-genome 中仅含的 4 个 rRNA 位于此区域; (4) IRa 序列除 trnV-GAC~trnR-ACG 以外的区域为突变率较低的蛋白质编码基因集中区; (5) 此区域序列长度 (约为 7 800 bp) 远远小于全叶绿体基因组序列。为此, 本研究拟建立一套测定石斛属叶绿体 IRa 序列区域基因序列的方法, 并对 10 条目的序列进行差异位点分布、遗传距离、系统进化关系等分析, 深入挖掘此区域序列作为石斛属 DNA 条形码的潜力, 为石斛属植物资源利用、系统进化历程及 DNA 条形码的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

石斛属植物 10 个样本采集自广西植物园的野生种栽培苗, 干冰运输, 保存于 -80 °C 超低温冰箱中。所有石斛属植物样本均经广州中医药大学张桂芳副教授鉴定。石斛属样本的详细信息见表 1。

表 1 石斛属样本信息

Table 1 *Dendrobium* Sw. samples and their information

编号	样本名称	拉丁名	GenBank 号
1	紫皮石斛	<i>D. devonianum</i>	KU156671
2	马鞭石斛	<i>D. fimbriatum</i>	KU156672
3	美花石斛	<i>D. loddigesii</i>	KU156673
4	密花石斛	<i>D. densiflorum</i>	KU156674
5	小黄花石斛	<i>D. jenkinsii</i>	KU156675
6	竹叶石斛	<i>D. hancockii</i>	KU156676
7	线叶石斛	<i>D. aurantiacum</i>	KU156677
8	鼓槌石斛	<i>D. chrysotoxum</i>	KU156678
9	翅萼石斛	<i>D. cariniferum</i>	KU156679
10	束花石斛	<i>D. chrysanthum</i>	KU156680

1.2 仪器与试剂

BSA224S 电子分析天平, 购自德国 ViBRA 公司; Water Bath SY-1210 恒温水浴锅, 购自美国 Crystal 公司; BCD-260WDBD 超低温冰箱, 购自丹麦 Arctiko 公司; 5424DQ261173 台式高速离心机, 购自德国 Eppendorf 公司; Power Pac™ Basic 水平电泳仪, 购自美国 BioRad 公司; Thermo Cycler Block 5020PCR 扩增仪, 购自美国 BioRad 公司; NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计, 购自美国 Thermo 公司; Tanon 2500 凝胶成像仪, 购自上海天能科技有限公司; Mix-3000 混匀小精灵, 购自杭州米欧仪器有限公司。

引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; Goldview 电泳染料, 购自日本 TaKaRa 公司; Plant Genomic DNA Kit 提取试剂盒, 购自北京天根生化科技有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 购自上海生工生物工程股份有限公司; KAPA HiFi HotStart PCR Mix、KAPA TaqTm Extra DNA Polymerase, 购自美国 Roch-KAPA 公司; Abm TaqPlus DNA Polymerase、pEASY-T1 Cloning Kit, 购自北京全式金生物技术有限公司; 酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1)、氯仿、乙醇等常规分析纯试剂购自广州浩玛生物科技有限公司。

1.3 总 DNA 提取及 PCR 扩增

用改良的试剂盒法〔在试剂盒说明书的基础上增加 1~2 次酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提步骤〕提取石斛属 10 个样本的基因组 DNA, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计检测所提基因组 DNA 的纯度和浓度。将 IRa (trnV-GAC~trnR-ACG) 区域序列分为 4 段区域进行 PCR 扩增, 根据参考序列 KT633996, 用 Primer Premier 5.0 软件自行设计以上 PCR 扩增所用引物, 引物序列见表 2。

表 2 IRa 区域序列 PCR 扩增引物
Table 2 PCR amplification primers of IRa

基因名称	引物序列 (5'→3')	大小/bp
IRa-1F	GGCGAGGAGGGATTCGAA	1 840
IRa-1R	CAAAGTCGTAAGACCATGTATGGG	
IRa-2F	ACTTCCTTGACCTTCCGGCA	2 419
IRa-2R	TCACGGACCGACCATAGACC	
IRa-3F	GAGTGATTGCCCTTCTCCGAC	1 987
IRa-3R	CAAGGTAGCCGTACTGGAAGGT	
IRa-4F	CCTAGGATAATAAGCTCATGGGC	2 127
IRa-4R	CCTATTTCGGATAGGAGCAGTTG	

根据 KAPA HiFi HotStart PCR Mix 的说明书配制反应体系: KAPA HiFi HotStart PCR Mix 预混酶 12.5 μ L、上下游引物各 0.75 μ L、DNA 模版 50 ng、加 RNase-free H₂O 至 25 μ L。PCR 扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、20 s, 60 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用 Tanon 2500 凝胶成像仪采集图片。

1.4 目的 DNA 片段测序

采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物中的目的 DNA 片段, 用凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。将纯化后的片段与 pEASY[®]-T1 构建重组质粒, 并转化至 Trans1-T1 感受态细胞中, 轻弹混匀, 冰浴 20~30 min; 42 $^{\circ}$ C 热激 30 s, 立即置于冰上 2 min; 加 250 μ L 平衡至室温的 LB 培养基, 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 取 8 μ L, 500 mmol/L IPTG, 40 μ L, 20 mg/mL X-gal 混合, 均匀涂于准备好的平板上, 在 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 待 IPTG, X-gal 被吸收后, 取 200 μ L 菌液涂板, 培养过夜。用 PCR 方法鉴定阳性重组子, 挑取白色克隆于 10 μ L 无菌水中, 涡旋混匀, PCR 反应

体系参照 Abm TaqPlus DNA Polymerase 说明书配制, 上、下游引物序列分别: 5'-GTAAAACGAC-GGCCAGT-3'、5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min。挑取阳性克隆片段, 送至上海捷易生物科技有限公司用 ABI3730XL DNA Analyzer 测序仪进行测序。

1.5 DNA 序列分析

将测序所得的序列与 NCBI 数据库中下载并截取出的相应区域的目的序列进行比对, 序列拼接。用 Clustal X 软件对 11 条目的序列进行多重比对。将拼接好的序列用 Snap Gene[®] Viewer 2.6.2 绘制此区域序列的基因结构图, 并统计此区域所包含的 9 个基因的序列信息。同时, 用截取的西藏虎头兰 *Cymbidium tracyanum* L. (KC876127) 此区域序列作为系统发育树的外类群, 用 Mega 6.0 软件中的邻接法 (NJ) 和最大似然法 (ML) 构建石斛属物种的系统发育树; 用 Mega 6.0 软件中的 K2P 模型分析石斛属不同物种此区域序列的遗传距离; 用 Mega 6.0 软件中的 Align by Clustal W 寻找差异位点, 并统计这些差异位点在此区域内的分布情况。

2 结果与分析

2.1 石斛属 IRa (trnV-GAC~trnR-ACG) 区域序列扩增及序列分析

本实验石斛属 10 个样本提取的总 DNA 的质量如表 3 和图 1 所示, 其纯度和质量浓度较好, 可作为 PCR 扩增反应的 DNA 模板使用。10 个石斛属样本的 PCR 扩增产物电泳检测图见图 2, 10 个样本分段扩增所得产物的电泳特异性主条带均较明亮, 且

表 3 石斛属 10 个样本总 DNA 质量检测表

Table 3 Total DNA quality detection of *Dendrobium* Sw. samples

编号	样本	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	质量浓度/(ng· μ L ⁻¹)
1	紫皮石斛	1.603	2.129	17.39
2	马鞭石斛	1.655	2.019	41.01
3	美花石斛	1.759	2.215	22.87
4	密花石斛	1.849	2.122	114.96
5	小黄花石斛	1.722	1.955	33.83
6	竹叶石斛	1.770	1.898	11.20
7	线叶石斛	1.686	2.059	44.27
8	鼓槌石斛	1.701	2.037	35.24
9	翅萼石斛	1.906	2.165	14.82
10	束花石斛	1.630	1.924	28.07

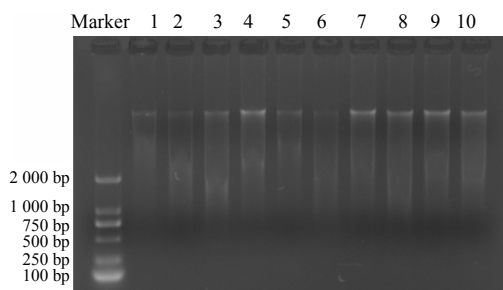
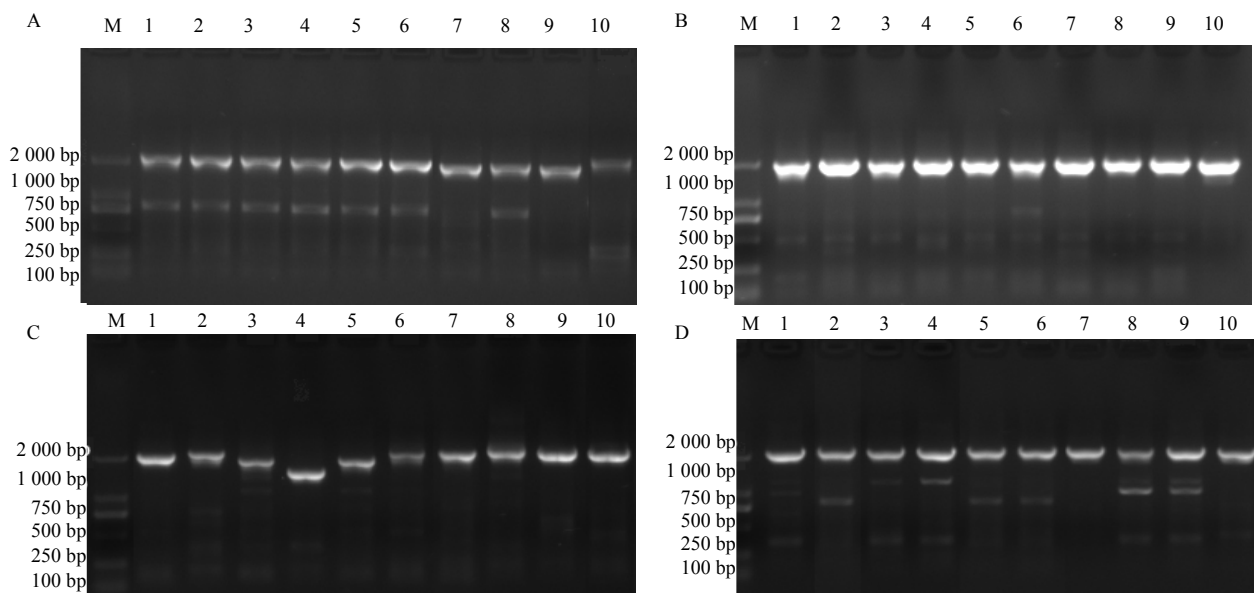


图 1 石斛属 10 个样本总 DNA 的质量检测电泳图

Fig. 1 Electrophoregrams of total DNA quality detection in 10 *Dendrobium Sw.* samples

条带所示的扩增序列长度与预期的基本一致, 经切胶纯化回收, 即可用于后续实验。

拼接所得 10 条石斛属样本的 IRa 区域序列长度均约为 7 800 bp, 这些样本此区域序列的 GC 量均为 53%, 在此区域内所含的 9 个基因 (trnV-GAC、rrn16、trnI-GAU、trnA-UGC、orf42、rrn23、rrn4.5、rrn5、trnR-ACG) 的长度均较接近, 见表 4。绘制所得的 10 个石斛属样本 IRa (trnV-GAC ~ trnR-ACG) 区域序列 9 个基因的结构图也较为相似, 见图 3。



M-Marker A、B、C、D 分别为引物 IRa-1F、IRa-1R; IRa-2F、IRa-2R; IRa-3F、IRa-3R 和 IRa-4F、IRa-4R 4 对引物的 PCR 扩增产物条带

M-Marker A, B, C, D are the amplified fragment of IRa-1F, IRa-1R; IRa-2F, IRa-2R; IRa-3F, IRa-3R and IRa-4F, IRa-4R

图 2 石斛属 10 个样本的 PCR 扩增产物条带

Fig. 2 Amplified fragments of 10 *Dendrobium Sw.* samples

表 4 10 条石斛属样本的 IRa 区域序列信息

Table 4 Information of 10 IRa sequences in *Dendrobium Sw.* samples

样本名称	序列长度/bp	trnV-GAC/bp	rrn16/bp	trnI-GAU/bp	trnA-UGC/bp	orf42/bp	rrn23/bp	rrn4.5/bp	rrn5/bp	trnR-ACG/bp
紫皮石斛	7 840	72	1 489	1 017	874	174	2 806	103	121	74
马鞭石斛	7 841	72	1 490	1 016	874	174	2 806	103	121	74
美花石斛	7 840	72	1 490	1 015	875	174	2 807	103	121	74
密花石斛	7 859	72	1 490	1 024	874	174	2 807	103	121	74
小黄花石斛	7 828	72	1 489	1 015	874	174	2 806	103	121	74
竹叶石斛	7 838	72	1 487	1 016	872	174	2 807	103	121	74
线叶石斛	7 841	72	1 490	1 016	874	174	2 806	103	121	74
鼓槌石斛	7 839	72	1 490	1 015	874	174	2 806	103	121	74
翅萼石斛	7 849	72	1 490	1 024	874	174	2 807	103	122	74
束花石斛	7 835	72	1 490	1 015	870	174	2 806	103	121	74

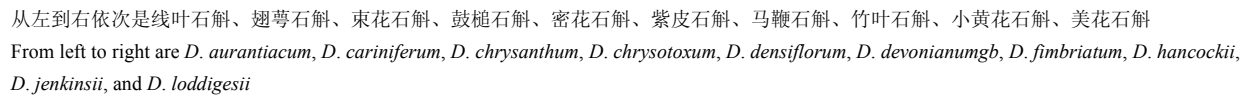


图 3 石斛属 10 个样本 IRa 区域的基因结构图

Fig. 3 Genetic structures of IRa in 10 *Dendrobium* Sw. samples

类分析。结果显示用此区域序列可将石斛属 10 种不同基原植物分为 4 个主要类群, 来自石斛组的线叶石斛与束花石斛聚为第 1 类群; 来自顶叶组的鼓槌石斛、密花石斛, 来自石斛属的紫皮石斛、马鞭石

以截取的西藏虎头兰 (KC876127) IRa 区域序列为系统发育树的外类群, 用邻接法基于 IRa 序列构建系统发育树 (图 4), 对石斛属种质资源进行聚

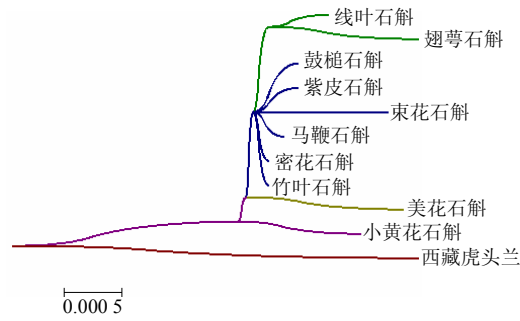


图 4 基于 IRa 序列构建的石斛属 10 个不同基原植物系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 10 *Dendrobium* Sw. samples based on IRa sequences

斛，来自黑毛组的翅萼石斛和目前尚未分组的竹叶石斛聚为第 2 类群；来自石斛属的美花石斛和来自顶叶组的小黄花石斛各自为第 2、4 类群。由此可见，基于 IRa 序列所构建的石斛属 10 不同基原植物的分类与传统的《中国植物志》上的分类

存在较大的差异。

2.3 石斛属 IRa 序列的遗传距离分析

基于 10 条目的序列的变异位点进行遗传距离分析（表 5），发现这些样本间的遗传距离均较大，最小遗传距离和最大遗传距离分别为 0.028 和 0.703，可见石斛属 10 个样本 IRa 序列存在较多的变异位点，说明此区域在作为石斛属 DNA 条形码方面具有一定的潜力。

2.4 石斛属 IRa 序列变异位点

对石斛属 10 个样本的目的序列进行分析，统计得 10 条石斛属样本此区域序列，共含有 55 个变异位点，这些变异位点在基因 *trnV-GAC*、*rrn16*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC*、*orf42*、*rrn23* 及 9 个基因间隔区上分布的个数分别是 1、8、12、6、1、9 和 18 个，见图 5。由此可见，本研究所选区域序列存在较多的变异位点，而这些变异位点主要分布于 *rrn16*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC* 和 *rrn23* 这 4 个基因上。

表 5 基于石斛属 10 个样本的 IRa 序列变异位点的 K2P 遗传距离

Table 5 K2P genetic distances of mutation potints among IRa sequences

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	—	0.083	0.180	0.079	0.090	0.073	0.074	0.191	0.130	0.109
2	0.246	—	0.100	0.043	0.051	0.036	0.036	0.092	0.084	0.054
3	0.553	0.305	—	0.098	0.110	0.094	0.095	0.263	0.171	0.129
4	0.246	0.080	0.305	—	0.051	0.035	0.035	0.105	0.084	0.064
5	0.278	0.103	0.342	0.103	—	0.044	0.044	0.124	0.092	0.072
6	0.221	0.059	0.278	0.059	0.082	—	0.028	0.097	0.080	0.057
7	0.221	0.059	0.278	0.059	0.082	0.039	—	0.097	0.078	0.057
8	0.591	0.278	0.703	0.332	0.371	0.305	0.305	—	0.181	0.099
9	0.460	0.244	0.543	0.244	0.274	0.219	0.219	0.581	—	0.104
10	0.358	0.123	0.427	0.169	0.194	0.145	0.145	0.329	0.356	—

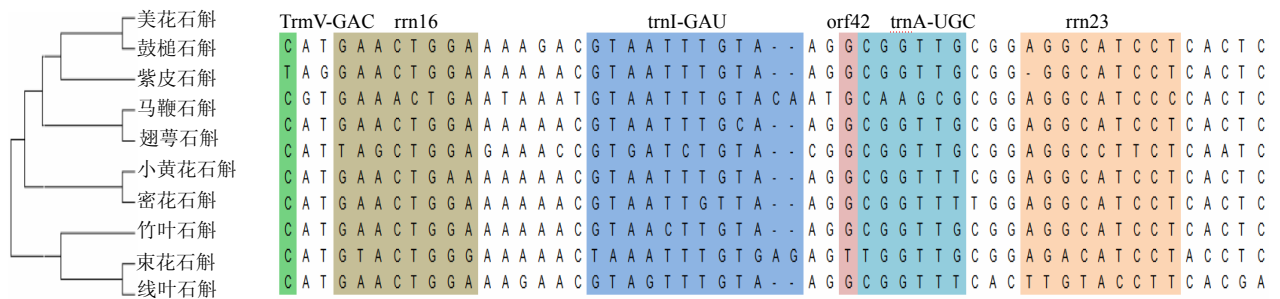


图 5 石斛属 10 个不同基原植物 NJ 树及变异位点分布

Fig. 5 NJ tree and mutation sites distribution among 10 samples of *Dendrobium* Sw.

3 讨论

石斛属植物所具有的药用、保健和观赏价值使得石斛属种质资源的鉴定、开发和利用具有不可忽视的重要意义，但时至今日，对石斛属种质资源的

鉴定仍主要依靠传统的形态学鉴定，缺乏一套客观且易于普及的鉴定评价标准。随着分子生物技术在物种分类及资源鉴定领域中的应用，越来越多的学者尝试用一些新的方法对石斛属种质资源进行分

类、鉴定与评价^[16-18]。而 DNA 条形码技术更是在石斛属药材的遗传进化和物种鉴定中获得相当普及的应用并取得一定的成果^[4-12,19-20]。然而,这些 DNA 条形码序列无论是在石斛属种间还是种内的鉴别率都无法达到 100%,探索一条能 100%鉴别石斛属物种甚至是所有植物物种的 DNA 条形码正是本研究团队以及众多探索植物 DNA 条形码研究团队的共同使命。

本实验选取了石斛属植物叶绿体基因组中一段变异频率较高的序列进行扩增测序,建立一套适用于石斛属 IRa 区域长序列的测定分析方法。发现此区域序列具有丰富的变异位点,说明此序列具有成为石斛属 DNA 条形码的潜力,此外,对这些差异位点进行分布分析,可以统计其分布集中区域,再以这一区域为参考序列设计引物从而缩短 DNA 条形码的长度,降低 DNA 条形码的测序成本和难度,从而获得一条更加简短、更易于普及的 DNA 条形码。因此,本研究是石斛属乃至植物 DNA 条形码研究中的重要探索,将为植物 DNA 条形码的进一步研究奠定基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Li X W, Yang Y, Henry R J, *et al.* Plant DNA barcoding: From gene to genome [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2014, 90(16): 157-166.
- [4] 滕艳芬, 吴晓俊, 徐红, 等. 石斛及其常见混淆品的 matK 基因序列比较 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 280-283.
- [5] 刘静, 何涛, 淳泽. 药用石斛的叶绿体 matK 基因序列分析及鉴别 [J]. 药学学报, 2009, 44(9): 1051-1055.
- [6] Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, *et al.* Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences [J]. *J Nat Med*, 2010, 64(26): 133-138.
- [7] Hemant K S, Iffat P, Saurabh R, *et al.* The loci recommended as universal barcodes for plants on basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5(13): 42-49.
- [8] Kornorn S, Sunisa S, Tanarat K, *et al.* Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast matK gene and nuclear rDNA ITS region [J]. *Hort J*, 2015, 84(3): 243-252.
- [9] 袁佐清, 张建勇, 刘涛. 石斛属植物 rbcL 基因序列变异和系统发育初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1836-1837.
- [10] 邵世光, 韩丽, 马艳红, 等. 枫斗类石斛 cp-DNA psbA-trnH 的序列分析与鉴别 [J]. 药学学报, 2009, 44(10): 1173-1178.
- [11] Yao H, Song J Y, Ma X Y, *et al.* Identification of *dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: The chloroplast psbA-trnH intergenic region [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 667-669.
- [12] Lu S, Ding X Y, Ma Y H, *et al.* Confirming the genetic identify of *dendrobium fimbriatum* using an amplification refractory mutation [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(15): 712-716.
- [13] 李栎, 徐腊红, 唐历波. ITS2 条形码序列对海南大戟科植物的鉴定 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1572-1577.
- [14] 郑司浩, 黄林芳, 陈士林. 鼓槌石斛特异性 PCR 分子鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 744-748.
- [15] 蒋明, 吴丹, 李嵘嵘, 等. 堇菜属 11 种药用植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2454-2459.
- [16] 张婷, 徐珞珊, 王峥涛, 等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究 [J]. 药学学报, 2005, 40(8): 728-733.
- [17] 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.
- [18] 刘明珍, 陈乃富, 刘秀珍, 等. 道地药材霍山石斛及其相似种的分子鉴定 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(5): 34-36.
- [19] 刘思思, 张岗, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛赤霉素 3-氧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 990-996.
- [20] 蒋园, 朱玉球, 高燕会, 等. 铁皮石斛 WRKY5 基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 301-308.