

评述与展望

Review and Progress

分子标记技术及其在中药石斛研究中的应用进展

张文龙^{1*} 曾桂萍²

1 贵阳中医学院药学院, 贵阳, 550002; 2 贵州大学农学院, 贵阳, 550025

* 通讯作者, wlzhsst@yeah.net

摘要 石斛是中国传统名贵药材, 因其基源广泛, 药效独特, 历来都是备受关注的道地药材之一。近年来, 随着分子生物学的快速发展, 分子标记类型逐年增多, 目前在中药材品种研究上应用日益广泛。本文简要阐述了各种不同类型的分子标记及其优缺点, 回顾了其在石斛研究中的应用实践, 分析了目前分子标记在石斛研究中存在的主要问题, 并对分子标记技术在今后研究中的美好前景和深入应用做出了展望。

关键词 石斛, 分子标记, 应用, 中药

Application and Advance of Study on Medicinal Herb *Dendrobium* by Molecular Marker

Zhang Wenlong^{1*} Zeng Guiping²

1 Pharmacy Department, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550002; 2 Agriculture College, Guizhou University, Guiyang, 550025

* Corresponding author, wlzhsst@yeah.net

DOI: 10.13417/j.gab.033.000452

Abstract *Dendrobium*, as a kind of rare Chinese traditional herb, has attracted great attention in china and abroad due to broad botanic origin and unique effect. With rapid development of molecular biology recently, molecular markers are increasing widely applied in the variety research of chinese medicinal materials. This paper covered various types of molecular markers, summarized the advantages and disadvantages of various types of molecular markers, reviewed application practice of molecular marker currently, analysed the main problems on *Dendrobium* by use of molecular marker and predicted nicety prospect and further application for research on *Dendrobium* in future.

Keywords *Dendrobium*, Molecular marker, Application, Medicinal herb

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记, 是植物 DNA 水平上的遗传多态性的直接反映。上世纪 70 年代 RFLP 分子标记技术的问世, 开创了直接检测和利用 DNA 分子的多型性。特别是 80 年代 PCR 技术的诞生, 使得体外直接扩增 DNA 的多态性成为可能。基于这一技术发明的创新性和它在应用上的广泛性, 分子标记技术发展迅速, 目前已经发展了多种基于 DNA 多态性的分子标记技术。这些分子标记技术广泛应用在系统进化、品种鉴定及品种选育、遗传图谱构建、基因定位、分子育种及杂种优势预测等生命科学的各个领域, 应用日趋成熟。而在中药研究领域, DNA 标记已成为探究传统中药生物

本质与进化关系的常规分子标记之一, 为经典的中药鉴定学与中药资源学的发展赋予了新的科学生机(胡之壁, 2009)。

石斛是中国传统名贵中药材, 从《神农本草经》记载至今已有 2000 多年的历史, 具有益胃生津、滋阴清热、明目利嗓、润肺止咳等功效, 用于热病伤津、口干烦渴、病后虚热等多种病症, 在临床上及中药复方中被广泛应用(徐红等, 2001)。据调查, 全国石斛属植物共有 74 种 2 变种, 是基源最复杂的药用植物之一。因其良好的药用价值及其观赏价值, 被广泛选取作为研究对象。其中, 有关中药石斛分子标记方面的研究是近年来石斛研究的热点之一, 并取得了一定

的理论成果。基于此,本文对分子标记技术在石斛研究上取得的最新成果进行了综述,以期更好地为其它中药材的应用提供有益借鉴。

1 分子标记概述

随着分子生物学技术的快速发展,新型分子标记技术大量涌现。根据其检测手段或研究技术不同,大致可分为四类,分别是以 Southern 杂交技术为核心的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP),以聚合酶链式反应(polymerase-chain reaction, PCR)技术为核心的 DNA 指纹标记, DNA 序列标记以及基因芯片技术。

1.1 基于 DNA-DNA 杂交的 DNA 标记

RFLP 是 20 世纪 70 年代在国外发展起来的 DNA 片段分析技术,既可以检测基因组 DNA (genome DNA),也可检测核糖体 DNA (ribosome DNA, rDNA) 或叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA),结果较为稳定,为共显性表达。但是,由于 RFLP 对 DNA 需求量较大,且费用昂贵,实验过程操作复杂,需要对探针进行同位素标记,即使应用非放射性的 Southern 杂交技术,仍然费时费力,致使其应用受到一定程度的限制(Tomki et al., 2001)。

1.2 基于 PCR 技术的分子标记

PCR 是 20 世纪 80 年代中期发明的一种无细胞分子克隆技术。该技术问世为现代生物技术领域开创了全新时代。根据其所用引物是否具有特定的核苷酸序列,可分为随机引物 PCR 标记和特异引物 PCR 标记,前者主要有随机扩增多态性 DNA (random amplified length polymorphism, RAPD)和任意引物 PCR (arbitrary primer-PCR, AP-PCR)、简单重复间隔序列(inter-simple sequence repeats, ISSR)、简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)和扩增性片段长度多态性(amplified restriction fragment polymorphism, AFLP),其特点主要表现为标记数量几乎无限, DNA 用量少,引物通用性强,检测位点多,同时实验成本低,时间短,操作简单。主要缺点是实验易受模板、扩增条件的影响,稳定性和重复性比较差,以显性为主,不易区分杂合和纯合。后者主要有 SSR,是呈孟德尔方式遗传的共显性标记,揭示的多态性高,重复性好。缺点表现为种属特异性较强,需要对特定序列测序,开发成本较高。

1.3 DNA 序列标记

建立在 PCR 技术基础之上,通过比较扩增序列

间差异为原理的 DNA 测序技术极大地提高了分子标记分析效率。常用的序列标记主要来自于三个基因组系统,分别是核基因组(nuclear DNA, nDNA)、线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)和叶绿体基因组(chloroplast DNA, cpDNA)。三个基因组的大小、起源及进化机制不同,进化速率差别也很大。

来自线粒体基因组的序列标记主要用于动物类中药的研究,常用的有 12S rRNA 与细胞色素还原酶 b (*cyt b*)。在植物类中药的研究中,目前用于 DNA 序列标记的基因主要有植物叶绿体基因组核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit, *rbcL*),编码赖氨酸转移核糖核酸酶 K (transfer RNA for lysine, *trnK*)及其内含子中编码成熟酶基因(maturase for lysine, *matK*),植物核基因组的核糖体 rDNA 和内部转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)等。

一般来说,*rbcL* 基因相对保守,一般用于科级以上分类研究,而 *matK* 基因位于 *trnK* 基因内含子中,进化速率在 *rbcL* 和 ITS 之间,变异均一,可用于种及以下一级分类群亲缘关系研究(刘静等, 2009)。

但由于叶绿体基因属于细胞质遗传,并不能准确反映真正的种或其进化历程。高等植物的 rDNA 18S-5.8S-26S rRNA 基因是串联在一起的重复序列,拷贝数在 1 000~10 000 之间,从 5' 到 3' 的排列依次为以外部转录间隔区 ETS (externally transcribed spacer)、18S rRNA、内部转录间隔区-ITS1 (internal transcribed spacer 1)、5.8S rRNA、内部转录间隔区 2-ITS2 (internal transcribed spacer 2)、26S rRNA 和非转录间隔区 NTS (non transcribed spacer)或称基因间隔区(intergenic spacer, IGS) (于华会等, 2010),18S rRNA 基因序列保守,进化速率非常慢,5.8S rRNA 基因片段较短,提供的信息量有限,26S rRNA 基因长约 3.5 kb,比 18S rRNA 基因大得多,在分子系统学较少应用。5S rRNA 基因是核基因组中编码 5S 核糖体 RNA 的多拷贝基因,与 18S-5.8S-26S rRNA 基因是相对独立。由于其序列太短,提供的信息位点不足,不太适合于系统发育的研究。位于 18S-5.8S-26S rRNA 之间的 ITS 被 5.8S rRNA 基因分为两段 ITS1 和 ITS2,ITS 进化速率快,长度较为稳定,总长度约为 600~700 bp (被子植物中) (刘静等, 2008),该片段在不同重复单元间序列组成趋于一致,便于进行序列分析,广泛用于研究低等级如属、种间甚至居群间的系统关系与分类研究。ITS 序列分析检测的指标是遗传信息的基本单位-核苷酸,因此其潜在遗传信息量非常大。缺

点是 ITS 片段在进化过程中承受的选择压力较小,虽有着丰富的遗传多样性,但同时也不可避免地增大了分析的误差(徐田军等,2006)。

1.4 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片、核酸芯片、DNA 微阵列,是后基因组时代的一项高新技术。DNA 芯片技术实现了 DNA 分析的高通量、微型化和自动化,检测效率非常高。在一次实验中就可以同时分析成千个多态性,大大节约了时间和精力,且减少了实验的随机误差(方宣钧等,2001;詹秀琴和王明艳,2001)。缺点是基因芯片技术需要昂贵的尖端仪器,如光刻机器和寡核苷酸合成仪等,技术上也还存在一些问题,如原位合成寡核苷酸技术复杂,芯片的特异性不强等等。此外,还有自动化程度不够高,对结果的扫描、去除背景、数据处理等目前还不能做得很完美等等(赵树进,2009)。

除了以上分子标记技术外,还有序列相关扩增多态性标记技术(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)(杨旻和陈科力,2011;李仁伟等,2012;白坚等,2012)、扩增阻碍突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)(Diao et al., 2010)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)(Ding et al., 2008;吴波等,2011;王佳媛等,2012)等,这些技术已被用于其它一些领域和植物的研究之中。

2 研究进展

2.1 石斛属植物正伪品及混淆品鉴别

近年来,随着石斛中成药和保健品的开发,石斛药材的大量需求与资源短缺的矛盾日益严重。目前市场上流通的石斛药材有石斛属近 30 种,石斛品种严重混乱,而且已经成为业界公认的鉴定难度最大的中药材。利用常规的鉴定方法对其进行形态学特征比较、显微鉴定及理化鉴定等,很难评价其真伪优劣。而 DNA 分子标记由于在同种内具有高度的遗传稳定性,且不受外界环境因素和生物个体发育阶段及器官组织差异的影响。可有效的克服这些弊端,鉴定结果准确、可靠和高效。Lau 等(2001)利用 ITS、滕艳芬等(2002)利用 *matK* 基因,张婷等(2005)利用 RFLP,已成功将正品与混淆品区别开来。

2.2 石斛种质资源研究

2.2.1 遗传多样性分析

遗传多样性是指种内不同群体之间或同一群体不同个体的遗传变异的总和。遗传多样性的研究对

于认识植物的起源与进化,植物育种和遗传改良,开展植物保护生物学研究都具有重要意义。目前其检测方法已从形态水平发展到分子水平,揭示的遗传多态性信息丰富、准确。彭锐等(2004)、白音等(2007)、任羽等(2008)通过利用不同类型的分子标记,成功揭示了石斛属植物具有较高的遗传多样性水平。

2.2.2 亲缘关系和系统分类研究

建立在表观观测水平之上的形态分类学、孢粉学、同工酶等方法易受到植物的生长发育阶段和不同的环境条件影响,分子标记则可对形态上难以区分、日常中争议较大的不同的生态与栽培类型、亚种与组及组下进行相对准确划分。金国虔等(2006)、Tsai 等(2004)利用分子标记可对来自同一区域的不同石斛属植物及非石斛属植物准确构建进化树,确定其亲缘关系远近,有效开展系统分类。

2.2.3 种质纯度鉴定

我国的石斛药材主要来自野生资源,目前过度采挖,野生资源已濒于枯竭状态,而石斛类药材市场需求旺盛,各地纷纷开始人工栽培。传统的无性繁殖方法主要是利用分株或扦插方法,但是产量仍然很低,不能满足市场的需求。利用植物离体快繁技术规模化生产组培苗已经成为目前获得种源的主要繁殖方式。但是组织培养过程常会产生各类变异类型,组培苗质量无法保证。利用传统的鉴定方法很难快速识别这些变异株。石斛 SSR 分子标记的开发,则可以快速、准确的解决石斛组培苗的纯度问题。谢明璐等(2010)利用课题组开发的 60 对铁皮石斛的 SSR 引物,从中筛选出 4 对分辨率较高的 SSR 引物(XML003, XML005, XML006, XML008)检测了集约化种植过程中的铁皮石斛组培苗的种质纯度,通过对随机抽取福建某居群种质(FJ02)的 500 株组培苗的检测,结果表明,这些 SSR 引物可以明显区分出种质品种和混杂株,在中药材种子(苗)纯度鉴定中率先走到了前列,这也是国内对石斛种质纯度率先进行的检测。

2.3 道地性与非道地性鉴别

道地药材是传统医药文化中的精品,是在特定产区的外界环境和产区内该物种的地方种群遗传性状等综合因素的作用下,形成的品质优、疗效佳的中药材。道地药材与非道地药材物种来源一致或十分相近,在形态、生药性状及化学成分等特征上具有高度相似性,难以运用传统方法准确鉴别药材道地性(罗洪斌等,2010)。现代分子生物学研究认为“道”的生物学本质是某一物种在特定条件下的“居群”,而

“地方特化基因型”则是产生“道”的遗传本质。因此在分子水平上利用 DNA 分子信息以及基因序列间的变异位点的多少可将道地非道地药材区别开来,从而为优良品种的选取和栽培提供分子依据,增强了用药的安全性和效能。丁小余等(2002)、Ding 等(2008)利用分子标记对不同居群的铁皮石斛进行了道地性研究,证明了铁皮石斛的居群类型与分子标记存在一定的相关性,为其道地性研究和枫斗质量监控打下了基础。

2.4 遗传图谱的构建

遗传图谱(或称连锁图谱)的构建是基因定位克隆与基因组结构功能研究的基础,是当前研究的热点。

分子标记构建的遗传图谱由于具有较高的分辨率和精确度,其应用愈来愈受到重视。黄少玲(2007)、Xue 等(2010)、赵红燕(2011)开创了利用分子标记构建石斛遗传图谱的先河,成功利用多个标记位点构建了药用植物研究中相对饱和的遗传图谱,为开展下一步研究奠定了基础。

2.5 中药 DNA 指纹图谱的建立

中药指纹图谱是指中药材经过适当的处理后,采用一定的分析手段和仪器检测得到的,能够标识其中各种组分群体特征的共有峰的图谱。一般可以分为两大类,基于化学分析方法建立的指纹图谱和生物方法建立指纹图谱。DNA 指纹图谱是利用生物技术方法建立起来的,由于直接分析生物的基因型而非表现型,为基源复杂的中药品种资源开辟了暂新的方法,AFLP 分子标记被公认为是目前构建 DNA 指纹图谱最理想的标记。虞泓等(2004)利用该标记成功对多个药用石斛构建了 DNA 分子指纹图谱。

3 存在的问题和改进方法

3.1 实验成本高,稳定性不足

分子标记技术虽然发展较快,但是对技术人员和设施设备有一定的要求,其成本还相对较高。因此,首先应从分子标记技术的全过程考虑不断降低其使用成本(张文龙,2010)。其次,实验过程中要严守操作规程,彻底消除外源 DNA 可能会带来的指纹图谱失真(周佐斌和葛刚,2008)。第三,一些分子生物学方法本身的稳定性问题尚待进一步提高。如 RAPD 虽然是首先被用于中药鉴定的 DNA 分子标记鉴别方法,但实验过程中实验条件的任何微小变化都会改变实验结果的一致性,重复性比较差。因此,在选择分子标记时,应尽可能选择对 DNA 质量要求高,

不易受污染,稳定性好的分子标记。

3.2 操作难度大,准确性不高

目前,对于具有多个不同部位入药的同一药材,由于各部 DNA 标记一致,尚无法区分,某些药材中可能存在的次生代谢产物严重干扰了 DNA 提取,对于经过加工的干燥药材而言,高分子量的 DNA 提取比较困难,并不适合对干燥样品的研究;当中药复方是经过提取分离,并精制成散剂或颗粒剂时,DNA 指纹图谱如 RAPD、RFLP、SSCP 则无效。同时,分子标记本身并不能与中药质量直接相关,因而不能取代中药化学成分指纹图谱等的鉴定。分子标记技术目前阶段只适合作为一种辅助技术,短期内无法解决中药材相关方面的质量控制(李力等,2009)。

4 前景与展望

随着基因组学的不断发展、生物信息学等研究的不断深入,DNA 条形码(DNA barcodes)理论的发展成熟,DNA 分子标记除了在中药资源与道地性评价、药用植物的分类与亲缘关系研究以及中药材品种与真伪鉴定等领域大量应用外,利用最新的分子标记进一步构建中药品种遗传连锁图谱,逐步开展有关种质资源遗传背景、化学成分和疗效相关性的研究,中药重要品质性状的基因定位和克隆以及中药材分子标记辅助育种必将成为中药材利用分子标记下一步研究的重点。

作者贡献

张文龙完成了文章的撰写;曾桂萍对部分内容补充完善。

致谢

本研究由贵州省自然科学基金项目“黔西南州环草石斛的保护遗传学研究”(黔科合 J 字[2013]2072 号)、贵阳中医学院博士基金“贵州道地药材石斛属植物遗传多样性的简单重复间序列分析”(贵中医博[2012]01 号)共同资助。

参考文献

Bai J., Hu X., Zhou S.T., and Wang H.Z., 2012, Genetic diversity of 47 cymbidium ensifolium varieties assessed by SRAP markers, *Zhiwu Yichuang Ziyuan Xuebao* (Journal of Plant Genetic Resources), 13(3): 376-380 (白坚, 胡旭, 周淑婷, 王慧中, 2012, 47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析,

- 植物遗传资源学报, 13(3): 376-380)
- Bai Y., Bao Y.H., Wang W.Q., Jiang L.L., and Yan Y.N., 2007, Analysis of the phylogenetic relationship of *Dendrobium* in China by AFLP technique, *Yuanyi Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 34(6): 1569-1574 (白音, 包英华, 王文全, 姜丽丽, 阎玉凝, 2007, 国产石斛属植物亲缘关系的 AFLP 分析, *园艺学报*, 34(6): 1569-1574)
- Diao Y., Duan W.T., Lin X.M., Liao C.L., Hu Z.L., and Wang Y.W., 2010, Molecular authentication of valeriana jatamansi by ARMS based on 5S rDNA sequence, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 45(8): 1067-1070
- Ding G., Zhang D.Z., Feng Z.Y., Fan W.J., Ding X.Y., and Li X.X., 2008, SNP, ARMS and SSH authentication of medicinal *dendrobium officinale* kimura et migo and application for identification of Fengdou drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, 31(4): 553-557
- Ding G., Xu G., Zhang W., Lu S., Li X., Gu S., and Ding X.Y., 2008, Preliminary geoherbism study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers, *European Food Research and Technology*, 227(4): 1283-1286
- Ding X.Y., Wang Z.T., Xu L.S., Xu H., Zhou K.Y., and Shi G.X., 2002, Study on sequence difference and SNP phenomenon of rDNA ITS region in F Type and H Type population of *Dendrobium officinale*, *Zhongguo Zhongyao Zazi* (China Journal of Chinese Materia Medica), 27(2): 85-89 (丁小余, 王峥涛, 徐珞珊, 徐红, 周开亚, 施国新, 2002, 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, *中国中药杂志*, 27(2): 85-89)
- Fang X.J., Wu W.R., and Tang J.L., 2001, DNA marker assisted breeding of crop, Science Press, Beijing, China, pp.20 (方宣钧, 吴为人, 唐纪良, 2001, 作物 DNA 标记辅助育种, 科学出版社, 中国, 北京, pp.20)
- Hu Z.B., ed., 2009, Modern biotechnology of Chinese traditional medicine, People's Health Publishing House, Beijing, China, pp.97-100 (胡之璧, 主编, 2009, 中药现代生物技术, 人民卫生出版社, 中国, 北京, pp.97-100)
- Huang S.L., 2007, Identification of the chromosome ploidy and construction of RAPD meloculer genetic maps of *Dendrobium*, Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisors: Bao M.Z., and Zhu G.F., pp.36-37 (黄少玲, 2007, 春石斛兰品种的倍性鉴定及 RAPD 分子遗传图谱的构建, 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 包满珠和朱根发, pp.36-37)
- Jin G.Q., Cai C.H., Ding L.J., Li P., and Ye B.P., 2006, Analysis on genetic diversity of four *Dendrobium* plants from Huoshan in Anhui province, *Yaowu Shenwujishu* (Chinese Journal Of Pharmaceutical Biotechnology), 13(1): 28-31 (金国虔, 蔡春海, 丁凌杰, 李萍, 叶波平, 2006, 霍山地区 4 种石斛属植物的遗传多态性分析, *药物生物技术*, 13(1): 28-31)
- Lau D.T., Shaw P.C., Wang J., and But P.P., 2001, Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA, *Planta Medica*, 67(5): 456-460
- Li L., Xu Y.L., Zhang Y.Y., and Zhao C.J., 2009, Application of DNA molecular markers in chinese medicinal material identification and its development trends, *Lishizhen Guoyi Guoyao* (Lishizhen Medicine and Material Medica Research), 20(11): 2845-2847 (李力, 徐永莉, 张月云, 赵成坚, 2009, DNA 分子标记在中药鉴定中的应用及发展趋势分析, *时珍国医国药*, 20(11): 2845-2847)
- Li R.W., Wang C., Dai S.L., Luo X.Y., Li B.Q., Zhu J., Lu J., and Liu Q.Q., 2012, The association analysis of phenotypic traits with SRAP markers in chrysanthemum, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 45(7): 1355-1364 (李仁伟, 王晨, 戴思兰, 雒新艳, 李宝琴, 朱珺, 卢洁, 刘倩倩, 2012, 菊花品种表型性状与 SRAP 分子标记的关联分析, *中国农业科学*, 45(7): 1355-1364)
- Liu J., He T., and Chun Z., 2008, Advance in application of DNA molecular markers on *Dendrobium*, *Yingyong Yu Huanjing Shengwu Xuebao* (Chinese Journal of Applied and Environmental Biology), 14(6): 855-862 (刘静, 何涛, 淳泽, 2008, 分子标记技术在石斛属植物中的应用研究进展, *应用与环境生物学报*, 14(6): 855-862)
- Liu J., He T., and Chun Z., 2009, Analysis and authentication of chloroplast *matK* gene sequences of herba *Dendrobium*, *Yaowu Xuebao* (Acta Pharmaceutica Sinica), 44(9): 1051-1055 (刘静, 何涛, 淳泽, 2009, 药用石斛的叶绿体 *matK* 基因序列分析及鉴别, *药学报*, 44(9): 1051-1055)
- Luo H.B., Yuan D.P., and Ding L., 2010, An exploration on the extraction of genomic DNA from genuine medicinal material, *Hubei Minzuxueyuan Xuebao Yixueban* (Journal of Hubei University for Nationalities (Medical Edition)), 27(3): 1-4 (罗洪斌, 袁德培, 丁莉, 2010, 提取道地药材基因组 DNA 方法的探讨, *湖北民族学院学报医学版*, 27(3): 1-4)
- Pen R., Li Q.S., and Li L.Y., 2004, Rapid-based molecular identification of *Dendrobium* species, *Xi'nan Nongye Daxue Xuebao* (Ziran Kexue Ban) (Journal of Southwest University-Natural Science), 26(4): 437-440 (彭锐, 李泉森, 李隆云, 2004, 石斛的分子生物学鉴定——基于 RAPD 分析, *西南农业大学学报(自然科学版)*, 26(4): 437-440)
- Ren Y., Yin J.M., and Yang G.S., 2008, Analysis of genetic relationship of *Dendrobium* in Hainan by SRAP makers, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 9(6): 767-770 (任羽, 尹俊梅, 杨光穗, 2008, 海南石斛属植物亲缘关系的 SRAP 分析, *热带作物学报*, 9(6): 767-770)
- Teng Y.F., Wu X.J., Xu H., Wang Z.T., Yu G.D., and Xu L.S., 2002, A comparison of *matK* sequences between herba

- Dendrobium* (Shihu) and its adulterant species, *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* (Journal of China Pharmaceutical University), 33(4): 280-283 (滕艳芬, 吴晓俊, 徐红, 王峥涛, 余国奠, 徐珞珊, 2002, 石斛及其常见混淆品的 *matK* 基因序列比较, *中国药科大学学报*, 33(4): 280-283)
- Tomki M., Mitsuo O., and Tomoya A., 2001, Distribution of rutaceae-specific repeated sequences isolated from citrus genomes, *Annals of Botany*, 87(6): 845-849
- Tsai C.C., Peng C.I., Huang S.C., Huang P.L., and Chou C.H., 2004, Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA, *Scientia horticulturae*, 101(3): 315-325
- Wang J.Y., Wu C.F., and Tang Y., 2012, Preliminary study on genetic diversity of *Magnolia sargentiana* (Magnoliaceae) through SNP marker, *Guangxi Zhiwu* (Guihaia), 32(4): 542-547 (王佳媛, 吴传芳, 唐亚, 2012, 基于 SNP 分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究, *广西植物*, 32(4): 542-547)
- Wu B., Gao D., Pan C.M., Luo G.M., and Zhang S.W., 2011, Cloning of SOD gene segments and SNP analysis in *Evodia rutaecarpa*, *Jiangxi Nongye Kexue* (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis), 33(6): 1206-1211 (吴波, 高丹, 潘超美, 罗光明, 张寿文, 2011, 吴茱萸 SOD 基因片段克隆和 SNP 分析, *江西农业科学*, 33(6): 1206-1211)
- Xie M.L., Hou B.W., Han L., Ma Y.H., and Ding X.Y., 2010, Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm, *Yaoxue Xuebao* (Acta Pharmaceutica Sinica), 45(5): 667-672 (谢明璐, 侯北伟, 韩丽, 马艳红, 丁小余, 2010, 珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定, *药科学报*, 45(5): 667-672)
- Xu H., Wang Z.T., Ding J.Y., and Xu L.S., 2001, General research aspect of biotechnology about medical *Dendrobium*, *Zhongguo Yesheng Zhiwu Ziyuan* (Chinese Wild Plant Resources), 20(1): 1-4 (徐红, 王峥涛, 丁家宜, 徐珞珊, 2001, 药用石斛生物技术的研究概况, *中国野生植物资源*, 20(1): 1-4)
- Xu T.J., Liu C.W., Liu L., Dong Q.F., and Yang Y.X., 2006, Application of ITS on genetic diversity analysis and germplasm identification from aquatic animals, *Zhanjiang Haiyang Daxue Xuebao* (Journal of Zhanjiang Ocean University), 26(1): 84-88 (徐田军, 刘楚吾, 刘丽, 董秋芬, 杨叶欣, 2006, 基因间隔序列(ITS)在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用, *湛江海洋大学学报*, 26(1): 84-88)
- Xue D.W., Feng S.G., Zhao H.Y., Jiang H., Shen B., Shi N.N., Lu J.J., Liu J.J., and Wang H.Z., 2010, The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers, *Journal of Genetics and Genomics*, 37(3): 197-204
- Yang M., and Chen K.L., 2011, Analysis of genetic diversity of germplasm of pinellia ternate based on SRAP, *Zhongguo Zhongyao Zazhi* (China Journal of Chinese Material Medica), 36(3): 334-337 (杨旻, 陈科力, 2011, 半夏种质资源遗传多样性的 SRAP 分析, *中国中药杂志*, 36(3): 334-337)
- Yu H., He R., Ni N.C., and Zhang S.G., 2004, Fingerprinting analysis of plants of *Dendrobium* Sw. by AFLP, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 35(7): 808-810 (虞泓, 和锐, 倪念春, 张时刚, 2004, 石斛属 4 种植物的 AFLP 分析, *中草药*, 35(7): 808-810)
- Yu H.H., Yang Z.L., Yang X., Tan Z.F., Shu X., and Liu R.N., 2010, Advances in studies on ITS sequence of medicinal plants germplasm resources, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 41(3): 491-496 (于华会, 杨志玲, 杨旭, 谭梓峰, 舒泉, 刘若楠, 2010, 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展, *中草药*, 41(3): 491-496)
- Zhan X.Q., and Wang M.Y., 2001, Application of molecular biological technology in identification of traditional chinese medicine, *Shenwuxue Tongbao* (Bulletin of Biology), 36(11): 3-4 (詹秀琴, 王明艳, 2001, 分子生物学技术在中药鉴定中的应用及探讨, *生物学通报*, 36(11): 3-4)
- Zhang T., Xu L.S., Wang Z.T., Zhou K.Y., Zhang N., and Shi Y.F., 2005, Molecular identification of medicinal plants: *Dendrobium chrysanthum*, *Dendrobium fimbriatum* and their morphologically allied species by PCR-RFLP analyses, *Yaoxue Xuebao* (Acta Pharmaceutica Sinica), 40(8): 728-733 (张婷, 徐珞珊, 王峥涛, 周开亚, 张宁, 史永峰, 2005, 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, *药科学报*, 40(8): 728-733)
- Zhang W.L., 2010, Polymerizing two high lysine genes *o2*, *o16* and *waxy* gene of maize by molecular marker-assisted selection, Dissertation for Ph.D., Southwest University, Supervisors: Cai Y.L., and Yang W.P., pp.23 (张文龙, 2010, 分子标记辅助选择聚合玉米两个高赖氨酸基因 *o2*, *o16* 及糯质基因 *wx*, 博士学位论文, 西南大学, 导师: 蔡一林和杨文鹏, pp.23)
- Zhao H.Y., 2011, Construction genetic linkage map of *Dendrobium* based on molecular markers, Thesis for M.S., Hangzhou Normal University, Supervisors: Shen B., and Wang H.Z., pp.11 (赵红燕, 2011, 石斛分子遗传图谱的构建, 硕士学位论文, 杭州师范大学, 导师: 沈波和王慧中, pp.11)
- Zhao S.J., ed., 2009, Chinese traditional medicine biodiversity and nucleic acid analysis, Science press, Beijing, China, pp. 163 (赵树进, 主编, 2009, 中药材生物多样性及核酸分析技术, 科学出版社, 中国, 北京 pp.163)
- Zhou Z.B., and Ge G., 2008, Identify genuine medicinal materials by the DNA molecule, *Jiangxi Kexue* (Jiangxi Science), 26(3): 507-510 (周佐斌, 葛刚, 2008, 中药材道地性的 DNA 分子鉴定, *江西科学*, 26(3): 507-510)