

石斛的分类鉴别研究现状

杨善岩^{1,2}, 王升贵^{1,2}, 李海龙^{1,2}, 狄志鸿^{1,2}

(1. 中国林业科学院松花粉研究开发中心, 浙江杭州 311400; 2. 浙江亚林生物科技股份有限公司, 浙江杭州 311400)

摘要 石斛为传统中药材, 目前市场上种类繁多真伪难辨。该文对石斛药材的传统形态及显微鉴别、成分分析和分子鉴别方法进行了综述, 介绍了各种鉴别方法的研究现状, 并对其优缺点进行比较, 为当前石斛及中草药的分类鉴别及市场规范提供依据。

关键词 石斛(CAULIS DENDROBII); 显微镜检; 指纹图谱; 分子鉴别

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)04-01495-03

Research Status of Identification on CAULIS DENDROBII

YANG Shan-yan et al (Pine Pollen Research & Development Center, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou, Zhejiang 311400)

Abstract CAULIS DENDROBII was the Chinese traditional medicinal materials, with a wide range of variety on the market, made it difficult to distinguish. The traditional morphology and microscopic identification, component analysis, molecular identify were reviewed, and the research status of all kinds of identification methods were introduced, the advantages and disadvantages of them were compared, which can provide references for identification and market standardization of CAULIS DENDROBII and Chinese herbs.

Key words CAULIS DENDROBII; Microscopic examination; Fingerprint; Molecular identification

石斛(CAULIS DENDROBII)是我国古文献中最早记载的兰科植物之一, 在《神农本草经》中就有记载, 与灵芝、人参和冬虫夏草等被列为上品中药。其具有滋阴清热、生津益胃和润肺止咳的功效。研究表明, 我国的石斛有近 80 种, 其中 33 种在全国或局部地区作为药用。虽然石斛的生药学研究已有很多报道, 但是由于其形态学和组织学特征具有较大的相似性, 给鉴别评价工作带来很大的难度。此外, 石斛市场需求量的日益增加, 多年来无节制的滥采滥挖, 使铁皮石斛的野生资源遭到毁灭性破坏; 加上在自然条件下种子萌发率低、生长缓慢, 导致市场上的铁皮石斛缺口较大, 产品质量良莠不齐, 伪品较多。因此, 石斛真伪鉴别及品种鉴别的研究日益受到重视, 建立有效的铁皮石斛鉴别体系势在必行。笔者对石斛药材的传统形态及显微鉴别、成分分析和分子鉴别方法进行了综述, 介绍各种方法的研究现状, 并对其优缺点进行比较, 以期当前石斛及中草药的分类鉴别工作提供依据。

1 性状鉴别

性状鉴别是传统的中草药鉴别方法。一些药典和专著对石斛的形态特征作了详细的描述, 对石斛品种的鉴别、野生资源的正确利用、石斛市场的规范、以及贵稀品种的保护和人工繁殖起到规范作用。几种常见石斛的鉴别特征见表 1^[1-2]。

由于石斛种属间的形态特征差异很小, 难以把握, 所以在鉴别工作中引入了显微镜检技术, 借助显微镜对导管、筛管、内含物等组织结构进行分析鉴别。解爱华从外形及显微镜检角度, 对铁皮石斛、环草石斛、黄草石斛、金钗石斛和马鞭石斛等 5 种不同的石斛进行了鉴别^[3]。丁小余等通过对茎段的显微解剖, 分析比较了广西、贵州和云南等地的铁皮

石斛居群形态结构差异, 将其分为 F 型和 H 型, 并对性状特点进行了比较, 对铁皮石斛的采收、加工以及大面积人工繁殖具有重要的指导意义^[4]。此外, 研究者还利用显微镜检技术对石斛的孢粉结构、种子形态及细胞特点进行分类鉴别^[5-7]。

表 1 几种石斛的形态特征

品种	拉丁名	形态特征
细叶石斛	<i>Dendrobium hancockii</i>	茎长达 80 cm, 粗 2~10 mm, 表面有深槽, 分枝远细于主茎, 分枝不生根; 叶条形, 近顶生; 花瓣黄色近圆形, 唇瓣 3 裂
霍山石斛	<i>Dendrobium huoshanense</i>	茎直立, 长 5~7 cm, 由下向上逐渐变细, 不分枝, 3~7 节, 节间长 3~8 mm, 淡黄绿色, 有时带淡紫红色斑点; 叶舌状长圆形, 膜质, 互生, 有纸质叶鞘; 花顶生, 总状花序, 花淡黄绿色, 开展; 蕊柱淡绿色, 长约 4 mm
齿瓣石斛	<i>Dendrobium devonianum</i>	茎长 20~60 cm, 具节, 下垂, 肥壮; 叶互生, 披针形, 基部紧抱呈鞘状, 上部张开, 并超过上一节 1/4; 总状花序, 常具 2 朵花, 花期无叶, 唇瓣上表面有 2 个浅黄色斑点, 边缘流苏状
铁皮石斛	<i>Dendrobium officinale kimuraet migo</i>	茎直立, 圆柱形, 长 5~40 cm, 粗 2~4 mm, 部茎节有时生根, 长出新株, 干后青灰色; 叶两列, 纸质, 长圆筒状披针形, 叶鞘具紫斑; 总状花序长 2~4 cm, 常具 3 花, 花淡黄色, 有香气, 常生于无叶茎上部, 唇瓣卵状披针形
黄草石斛	<i>Dendrobium chrysanthum wall. ex Lindl</i>	茎圆柱形, 近肉质, 长 50~200 cm, 粗 0.8~1 cm; 叶纸质, 披针形, 长 13~19 cm, 宽 3~5 cm; 总状花序, 侧生于有叶或无叶的茎节上, 花金黄色, 肉质有香气, 唇瓣近扇形, 两面密被绒毛, 唇盘上面有 2 个紫色斑块, 边缘具短流苏
密花石斛	<i>Dendrobium densiflorum</i>	茎丛生, 棒状或近圆柱状, 中部粗达 2 cm, 分节不分枝, 有 4 个纵棱, 横切面具密而硬的粗纤维; 叶常 3~4 枚, 长圆筒披针状, 革质近顶生; 总状花序近顶生, 下垂, 花淡黄色, 基部 2~4 枚鞘, 唇瓣圆状菱形, 表面被短柔毛状乳突, 边缘具流苏
鼓槌石斛	<i>Dendrobium chrysotoxum</i>	茎直立, 肉质, 纺锤形, 长 6~30 cm, 中部粗 2~4 cm, 具 3~8 节, 干后表面有圆钝的条棱; 近顶端具 2~5 枚叶, 鞘膜质, 叶革质轻而脆, 断面海绵状; 总状花序, 斜出或稍下垂, 梗粗壮, 唇瓣黄色近圆形, 具红色条纹, 边缘流苏, 略带香气
马鞭石斛	<i>Herba dendrobii fimbriati</i>	茎直立, 圆柱形, 绿色, 长 30~150 cm, 粗 0.2~2 cm, 具沟槽, 节长 2.5~4 cm, 断面纤维性, 无粘性, 味苦; 叶薄, 革质, 长椭圆形; 总状花序, 花金黄色有香气, 唇瓣近圆形, 近基部有 1 肾形紫色斑块, 两面均有绒毛, 呈复流苏状

作者简介 杨善岩(1980-), 男, 山东临沂人, 硕士, 从事植物组织培养方面的研究, E-mail: ysy152031@163.com。

收稿日期 2012-12-24

2 成分分析

虽然性状鉴别简单易行, 但市场上的石斛品种繁多, 而

且形态学和组织学特征具有很高的相似性,单靠性状鉴别往往不能实现对石斛质量的全面控制。在这种形势下,出现在了成分分析基础上建立的指纹图谱鉴别方法,一定程度上弥补了性状鉴别的缺陷,常用的有高效液相色谱(HPLC)指纹图谱、气相色谱(GC)指纹图谱和核磁共振波谱(NMR)法等。

2.1 HPLC 指纹图谱分析法 殷放宙等采用梯度洗脱的方法,以 Kromasil® KR100-5C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)为分析用色谱柱,以乙腈-浓度 0.4% 磷酸溶液为流动相,建立了铁皮石斛的 RP-HPLC 指纹图谱,并进行了相似度的计算,该方法可使铁皮石斛中各成分得到较好的分离^[8]。毛幼儿等通过乙醇脱脂,沸水浸提铁皮石斛多糖,然后以盐酸将其水解为单糖,再加入 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)将其衍生化,最后采用 RP-HPLC 法测定多糖的甘露醇含量,建立一种通过 HPLC 测定甘露醇来鉴别铁皮石斛质量的新技术^[9]。高效液相色谱法具有分离效能高、高灵敏度、重现性好及样品易回收等优点,而且还能提供大量的化学成分信息;缺点是有“柱外效应”,即在从样品到检测器(除柱子以外)之间,流动相流型的变化会显著降低柱效^[10-11]。

2.2 气相色谱指纹图谱分析法 气相色谱技术在石油化工、医药卫生等许多领域都有广泛用途^[12],在中药指纹图谱中也有很好的应用^[13]。黄小燕等采用气相色谱法,以 FID 为检测器、OV1701 石英毛细管柱、石斛碱为对照品,建立金钗石斛药材的指纹图谱。试验结果表明,精密度、稳定性、重复性均符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》要求,可以作为金钗石斛内在质量控制的标准^[14]。另外,有研究者利用裂解气相色谱/质谱法(Py-GC/MS)对 10 种不同产地的铁皮石斛进行测定,并结合系统聚类法对其指纹图谱进行分析,能很好的反映铁皮石斛的相似关系及地区差异性,适用于铁皮石斛产地和真伪的区别分析^[15]。气相色谱法因为是以用气体作为流动相,样品在气相中传递速度快,各组分在流动相和固定相之间可以瞬间地达到平衡;固定相可选择的物质很多,是一种高效快速分离分析方法,近年来高灵敏选择性检测器的应用,使其又具有灵敏度高、应用范围广等优点。

2.3 核磁共振波谱分析法 目前,核磁共振波谱的研究主要集中在¹H(氢谱¹H-NMR)和¹³C(碳谱¹³C-NMR)两类原子核的波谱,国内外学者提出用核磁共振波谱法鉴别中药材真伪^[16-17]。秦海林等应用硅胶柱色谱法分离环草石斛的化学成分,鉴别单体化合物的结构并对其¹H-NMR 指纹图谱进行解析,从而实现环草石斛种属鉴别的目的^[18]。张朝凤等采用溶剂萃取法或硅胶色谱分离法获得 3 种石斛的特征提取物及其主要成分,然后测得¹H-NMR 特征图谱并对特征信号进行归属,证明特征提取物的¹H-NMR 特征图谱可作为其基源鉴别的相对标准图谱,对石斛的鉴别工作具有重要的指导意义^[19]。核磁共振波谱法具有高效、准确的特点,但是需要专门的设备,投入较大,对操作人员技术要求较高。

2.4 石斛光谱分析鉴定 中草药成分复杂多样,IR 图谱展现的是各成分吸收光谱的叠加,因为不同中草药所含成分及

含量不同,所以出峰时间、峰形等就存在差异,利用这种差异就能够实现中草药的鉴别。沈宗根^[20]等利用红外光谱测定 3 种石斛和常用伪品细叶石仙桃的红外光谱,并其亲缘关系进行分析,发现细叶石仙桃与石斛的红外光谱存在较大差异,亲缘关系较远,而石斛属组内种间红外光谱图的差异则较小。吕献康等对 11 种石斛进行 IR 特征进行分析,发现其 IR 特征基本相似,但广东石斛和滇贵石斛与其他石斛的主成分存在较大差异^[21]。张氏等根据物质在一定波长下的吸收系数是常数为依据,对 32 个石斛样品的每一波长通道的信息量进行计算,其结果与植物形态分类鉴定结果基本一致^[22]。陈康等对金钗石斛、环草石斛等 5 种石斛类药材的二阶导数光谱进行分析^[23]。试验结果显示,5 种石斛类药材的紫外光谱图形比较相似,经数学处理后得到了较多的信息特征,除金钗石斛与环草石斛二阶导数光谱图极相似外,其余均有明显的差别。说明紫外光谱法对石斛及其混淆品的鉴别有一定的应用价值。光谱鉴别分析法具有样品需要量少、快速、高效和整体性等特点,应用范围已从中药植物扩展到中药材、中成药和中药饮片快速鉴定;缺点是设备投入大、费用高。

3 分子鉴别

药用植物传统的鉴别方法为性状鉴别,后来又发展成成分指纹图谱分析,传统的形态学鉴别方法难以把握,成分指纹图谱分析又受到诸多因素的干扰,具有很大的局限性。分子生物学的发展将药用植物的鉴别提高到分子水平。1994 年香港中文大学 Cheung 首次将 AP-PCR 方法引入西洋参、人参的鉴别研究^[24]。分子鉴别通过对保守序列的测定及同源性比对确定分类学地位,达到鉴别的目的,如 ITS rDNA 序列分析、DNA(RAPD)及 DNA 杂交技术等。

3.1 ITS rDNA 序列分析 ITS 序列属于内转录间隔区,位于核糖体 rDNA 的 18S、5.8S 以及 28S 之间,保守性低,进化速率高,可以鉴别到亚种,已广泛应用于物种的分子系统学研究及中草药的分类鉴别^[25-27]。迄今为止,兰科已有 50 多个属的 ITS 序列进行了分子系统学研究,并有研究者对一些种类的石斛进行了鉴定及系统进化分析^[28-30]。丁小余等在石斛的鉴别过程中,建立了 21 种枫斗类石斛的 ITS rDNA 全序列数据库,运用 Clustal、Mega 等软件以及该数据库对石斛 rDNA 的 ITS 区进行序列分析,成功的实现了待检种的鉴别^[31]。Zhang Y B 等将 16 个不同种属石斛的 ITS1-5.8S-ITS2 序列固定于玻片上制作了基因芯片,用荧光标记的 ITS2 序列作为探针,可检测《药典》所载的 5 种石斛及中药复方中的石斛组分^[32]。ITS rDNA 序列分析是目前真核生物物种鉴定最常用的方法,具有操作简单、快速准确、花费较少等特点,可以鉴定到亚种。

3.2 DNA(RAPD)技术 RAPD 是研究植物遗传多样性及分子鉴别的有效手段,现已广泛应用于生物品种鉴别、系谱分析及进化关系研究^[33-35]。张铭等在对 26 种石斛进行 RAPD 聚类分析的基础上,分析了铁皮石斛某些特异性 DNA 片段,设计出只与基因组某一区域特异性结合的专一引物,

此外复性温度的提高,一定程度上消除外源 DNA 造成的干扰,大大提高了鉴别的准确度,有望成为高效准确鉴别铁皮石斛的新方法^[36]。丁鸽等在对铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析中发现,居群间具有较丰富的遗传多样性^[37];RAPD 可以作为其野生居群遗传多态性、居群亲缘关系研究和分子鉴别的有效手段。RAPD 技术应用广泛,渗透于基因组研究的各个方面,该技术无需专门设计引物和预先知道基因组核苷酸序列;每个反应仅需单条引物,扩增无特异性;退火温度低,引物与模板结合稳定,有较强的纠错功能;简便快捷;所需 DNA 样品量极少^[38-40]。

3.3 DNA 杂交法 该方法由 Diatchenko 等创立,是一种基于 PCR 的差异基因表达筛选方法,最初应用于差异 cDNA 文库的建立^[41]。李同祥利用该法进行石斛鉴别 DNA 探针的筛选,在获得 2 种石斛间差减片段后,用石斛总 DNA 与选取的差减片段克隆杂交,进而筛选出只与同种石斛 DNA 杂交的克隆,作为其特异性 DNA 探针,实现对石斛的高效准确鉴别^[42]。该法是对整个基因组进行筛选,可得到长碱基序列探针,快速、灵敏、准确;缺点是过程比较复杂,不能同时进行数个材料的相互比较,样品要求高。

3.4 其他 意大利动物学家 Paul Hebert 首先提出 DNA 条形码的概念,并将其运用于脊椎动物和无脊椎动物的分类研究中^[43]。根据生物条形码联盟的建议,植物基因条形码目前主要在叶绿体 DNA 中寻找,包括 *matK*、ITS、*rpoC1*、*rpoB*、*accD*、*rbcl* 及各基因的组合等,石斛分类鉴别中 DNA 条形码的研究也逐渐成为热点^[44-46]。此外,还有建立在基因组 DNA 微卫星重复序列检测基础上的 ISSR-PCR 法^[47-48]。研究发现,石斛微卫星重复序列多样性及多态性较高^[49-50],为石斛遗传多样性及亲缘关系的研究提供了有利条件。

4 石斛鉴别研究趋势

石斛最早是通过外观形态特征进行鉴别,经验因素起主要作用;显微技术发展起来后,组织结构的显微鉴别与传统的性状鉴别结合,对石斛的鉴别工作起到很大推动作用;而后起的分子鉴别具有传统方法无法比拟的高效性及准确性,将鉴别技术提升到一个新台阶。随着生物技术的不断发展,必将有更好的鉴别方法推出,如有的研究者开拓思路,采用薄层色谱法,考察不同基源石斛及商品药材中专属性成分联苯类化合物的薄层色谱行为,为石斛的鉴别提供了一种准确、有效的新方法^[51]。不断涌现的新鉴别方法,对石斛有效成分和药理作用的深入研究,质量控制标准体系的建立,以及石斛市场的规范化都起到极大的推动作用。不同的鉴别方法侧重点不同,有各自的优缺点,如性状鉴别简单快速,不需要特殊仪器,但是需要丰富的经验,普通人较难把握;成分分析鉴别相对客观,能同时了解其功效成分,但是设备昂贵,技术要求较高;分子鉴别高效、准确,但同样要求较高的设备及技术。针对各种鉴别方法的特点,在进行石斛的鉴别工作时,应该根据实际需要取长补短,相互结合,建立高效、稳定、准确的石斛鉴定标准。中药植物鉴别中有一个极为重要的指标,就是中药植物的专属鉴别特征,所以在今后的石斛鉴

别工作中,应该对其进行深入研究。石斛种类繁多,要获取每一品种的专属性特征,就必须尽可能广泛的进行不同产地及不同居群的石斛,利用相应的鉴别方法进行系统分析对比。在此基础上,建立石斛品质鉴别数据库公共平台,将各自基础研究成果实现共享。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志. 第 14 卷[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [3] 解爱华. 不同品种石斛的性状和鉴别[J]. 湖南中医药导报, 2004, 10(3): 57-58.
- [4] 丁小余, 徐路珊, 王峰涛, 等. 铁皮石斛居群差异的研究(1) - 植物体形态结构的差异[J]. 中草药, 2001, 32(9): 828-831.
- [5] 王仕玉, 萧凤回. 滇产 17 种石斛的种子形态[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 423-426.
- [6] 蔡盛华, 陆修润, 黄新中, 等. 红肉蜜柚与琯溪蜜柚亲缘关系淀粉学鉴定[J]. 福建农业学报, 2009, 24(6): 525-527.
- [7] 李欣, 张晓军, 张从卓, 等. 兼抗白粉条、锈病小麦参入系 CH7124 抗性遗传及细胞学鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 577-582.
- [8] 殷放甫, 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.
- [9] 毛幼儿, 周桂芬. 基于柱前衍生化 HPLC 法分析铁皮石斛茎和叶多糖中甘露糖的含量[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(4): 38-39.
- [10] 何铁光, 卢声, 王爱勤, 等. 广西铁皮石斛 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 353-358.
- [11] MIYOSHI Y, KOGA R, OYAMA T, et al. HPLC analysis of naturally occurring free D-amino acids in mammals[J]. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 2012, 69: 42-52.
- [12] KOUSSISSI E, DOURTOGLOU V G, AGELOUSSIS G, et al. Influence of toasting of oak chip on red wine maturation from sensory and gas chromatographic headspace analysis[J]. Food Chemistry, 2009, 114: 1503-1509.
- [13] 郑琦, 方悦. 气相色谱技术在中药指纹图谱中的应用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2008(11): 12-14.
- [14] 黄小燕, 乙引. 金钗石斛生物碱组分 GC 指纹图谱的建立[J]. 西南农业学报, 2007, 20(4): 735-738.
- [15] 王丽丽, 王聪, 潘再法, 等. 铁皮石斛的裂解气相色谱指纹图谱及其系统聚类分析[J]. 色谱, 2008, 26(5): 613-617.
- [16] SUAU R, CUEVAS A, GARCIA A I, et al. Isoquinoline alkaloids from *Platycodon*[J]. Phytochemistry, 1991, 30(10): 3315-3317.
- [17] 秦海林, 赵天增. 核磁共振氢谱鉴别植物中药的研究[J]. 药学报, 1999, 34(1): 58-62.
- [18] 秦海林, 张建新, 王峰涛, 等. 环草石斛的¹H-NMR 指纹图谱解析[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 919-923.
- [19] 张朝凤, 王敏, 罗丹, 等. 3 种石斛药材核磁共振谱特征图谱的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2789-2791.
- [20] 沈宗根, 吕洪飞, 程存归. 3 种石斛属植物和细叶叶仙桃的红外光谱分析和鉴定[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 97-102.
- [21] 吕献康, 程存归, 杨国平, 等. 11 种石斛植物的 FTIR 直接测定和主成分分析[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 738-740.
- [22] 张亮, 马国祥, 张正行, 等. 中药石斛质量的化学模式识别[J]. 药学报, 1994, 29(4): 290-295.
- [23] 陈康, 劳燕霞. 五种石斛药材的导数光谱及薄层鉴别[J]. 广东药学, 1996(4): 29-31.
- [24] CHEUNG K S, KWAN H S, BUT P P, et al. Pharmacognostical identification of American and oriental *Ginseng* roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1994, 42(1): 67-77.
- [25] SUKRONG S, ZHU S, RUANGRUNGSI N, et al. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(7): 1284-1293.
- [26] AZEVEDO M I, BOTTON S A, PEREIRA D I B, et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(1/2): 141-150.

表 6 MN 处理母本植株开花留果及种子产量表现

处理	坐果期	留果节位	单果饱满种子粒数	种子饱满率/%	种子千粒重//g	平均单果种子质量//g	产量//kg/hm ²
N1 * M1	05 - 11	14.7	199.40	28.88	25.456	5.081	169.47
N2 * M1	05 - 12	15.0	222.60	35.34	25.472	5.658	188.70
Nck * M1	05 - 14	18.0	208.00	30.05	25.295	4.954	165.21

试验中,在硼肥 0.2% 的处理水平上,海蜜 6 号的制种产量达到最好水平,硼肥在父本、母本植株上更适宜的施用浓度还有待于进一步试验。在海蜜 6 号母本植株 0.1% 硼肥使用水平上,父本喷施一定量的硼肥有提高母本坐果能力,提高单果饱满种子粒数和饱满率,增加种子产量的作用。但在该次试验中,样本含量较少,更恰当的海蜜 6 号父本、母本的硼肥处理水平以及父母本之间的交互作用,仍需要进行进一步的试验研究。由于试验地为多年重茬地,小

区间土壤地力水平也存在一定的差异。这会对该次试验产生一定的影响。

参考文献

- [1] 包卫红,杨洪兴,陆瑾,等. 早熟丰产厚皮甜瓜新品种海蜜 6 号[J]. 中国蔬菜,2011(7):36.
- [2] 徐志红,徐永阳,张建,等. 硼肥在甜瓜制种中的应用初报[C]//王坚. 第 12 次全国西瓜甜瓜科研生产协作会议学术交流论文摘要集. 中国园艺学会西瓜甜瓜专业委员会,2009:121.
- [3] 林文丽,陈华,陈雯倩. 硼肥在“海蜜 5 号”厚皮甜瓜制种上的应用效果初探[J]. 上海农业科技,2012(4):115 - 116.
- (上接第 1497 页)
- [27] KHODAPARAST S A, TAKAMATSU S, HARADA M, et al. Additional rDNA ITS sequences and its phylogenetic consequences for the genus *Leveillula* with emphasis on conidium morphology[J]. *Mycological Progress*, 2012, 11(3):741 - 752.
- [28] 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.
- [29] 栗丹,李振坚,毛萍,等. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析[J]. 园艺学报,2012,39(8):1539 - 1550.
- [30] YUKAWA T, ANDO T, KARASAWA K, et al. Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance[J]. *American Journal of Botany*, 1992, 79(8):946 - 952.
- [31] 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 - 783.
- [32] ZHANG Y B, WANG J, WANG Z T, et al. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal formulations[J]. *Planta Medica*, 2003, 69(12):1172 - 1177.
- [33] MENDES M J, LOPES N, CAPITAO A, et al. Sampaio M - M, et al. Germoplasm bank construction and genetic characterization of the endemic flora from Berleugas Natural Park through RAPD[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(2):16 - 19.
- [34] ARUGA D, TSUCHIYA N, MATSUMURA H, et al. Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Euphytica*, 2012, 187(1):1 - 9.
- [35] MUHAMMAD F A, MUHAMMAD I, MUHAMMAD S M, et al. Assessment of genetic diversity among Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) advanced breeding lines using RAPD and SDS-PAGE · Article[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, 13(3):1 - 10.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] JOSE LUIS P E, LUIS MIGUEL V G, AMAURY MARTIN A F. Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L. f.) DC. assessed by different length RAPD primers[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, 13(4):1 - 7.
- [39] SAMANTARAY S, DHAGAT U M, MAITI S. Evaluation of genetic relationships in *Plantago* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers[J]. *Plant Biotechnology*, 2010, 27(4):297 - 303.
- [40] JAGOSZ B. The relationship between heterosis and genetic distances based on RAPD and AFLP markers in carrot[J]. *Plant Breeding*, 2011, 130(5):574 - 579.
- [41] DIATCHENKO L, LAU Y F, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization a method for generating differentially regulated or tissue - specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18):6025 - 6030.
- [42] LI T X, WANG J K, BAI Y F, et al. A novel method for screening species - specific DNA probes for species identification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4):45.
- [43] ASAHINA H, SHINOZAKI J, MASUDA K, et al. Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2010, 64(2):133 - 142.
- [44] 姚领爱,胡之璧,郑志仁,等. 铁皮石斛种质资源研究中的 DNA 条形码初探[J]. 上海农业学报,2012,28(10):49 - 54.
- [45] 黄海,李劲松,符岸军,等. 石斛植物 DNA 条形码序列的筛选[J]. 热带作物学报,2010,31(10):1769 - 1777.
- [46] YUKAWA T, OHBA H, CAMERON K M, et al. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): Insights from a combined analysis based on *rbcL* sequences and restriction site variation[J]. *Journal of Plant Research*, 1996, 109(2):169 - 176.
- [47] YUE G H, LAM-CHAN L T, HONG Y. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(3):832 - 834.
- [48] 杨春勇,李学兰,王云强,等. 人工栽培石斛的 ISSR 标记分析[J]. 中国农学通报,2011,27(4):148 - 152.
- [49] 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]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(6):1166 - 1168.
- [50] FAN W J, LUO Y M, LI X X, et al. Development of microsatellite markers in *Dendrobium fimbriatum* hook, an endangered Chinese endemic herb [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2009, 9(1):373 - 375.
- [51] 徐蓓,杨莉,陈崇崇,等. 黄草类石斛的薄层色谱鉴别研究[J]. 中国药品标准,2010,11(2):99 - 103.