

# 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析

栗 丹<sup>1</sup>, 李振坚<sup>2</sup>, 毛 萍<sup>1</sup>, 严雪峰<sup>1</sup>, 淳 泽<sup>1</sup>, 马欣荣<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; <sup>2</sup>中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘 要:** 以核糖体 DNA 内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, rDNA ITS 区) 作为 DNA 条形码对石斛种进行鉴定, 并进行系统进化分析。收集获得 43 个石斛样品, 其中 35 个为已知鲜样品, 8 个为待确定种的干样品。从 35 个鲜品中获得在 GenBank 中未公布的海南石斛、华石斛以及秋石斛中的两个品种 ‘白花红心秋石斛’ 和 ‘紫红条纹秋石斛’ ITS 序列。ITS 序列差异与形态特征的关系分析, 结果显示, ITS 同源性的差异, 与形态的相似性成正相关。以舌唇兰属为外类群, 并从 GenBank 中获得其他 20 个石斛种的 ITS 序列, 对 35 个已知样品和 8 个待检测样品进行分析。结果显示, 35 个已知样品分为 5 支, 其中大部分石斛种 (24 个) 聚在一支。竹叶石斛和苏瓣石斛聚在一支; 华石斛、聚石斛和小黄花石斛聚在一支; 短棒石斛单独为一支; 竹枝石斛与 ‘白花红心秋石斛’ 和 ‘紫红条纹秋石斛’ 聚在一支; 海南石斛和木石斛聚在一支。根据 ITS 序列, 大多数样品分组与传统分组相同, 但按传统分组不在石斛组的重唇石斛、钩状石斛、鼓槌石斛和叉唇石斛分在了石斛组, 并确定了檀香石斛分在石斛组。确定了 8 个石斛干样品所属的种。

**关键词:** 石斛; ITS 序列; 系统进化; 物种鉴定

**中图分类号:** S 682.31

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 08-1539-12

## Phylogenetic Analysis and Identification of *Dendrobium* Species Based on Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence

LI Dan<sup>1</sup>, LI Zhen-jian<sup>2</sup>, MAO Ping<sup>1</sup>, YAN Xue-feng<sup>1</sup>, CHUN Ze<sup>1</sup>, and MA Xin-rong<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** *Dendrobium* is valued for its ornamental and medicinal purposes. However, the taxonomy of this genus is still in a state of confusion, and it is more difficult to authenticate after processing. Based on the emerging field of molecular systematics as a powerful classification tool, a phylogenetic analysis was conducted using sequences of the Internal Transcribed Spacer of nuclear ribosomal DNA (rDNA ITS) as DNA barcodes for species identification and phylogenetic analysis of *Dendrobium* plants. In this study, the ITS1-5.8S-ITS2 sequence database of the 43 *Dendrobium* samples was constructed. Among them,

**收稿日期:** 2012-05-30; **修回日期:** 2012-07-16

**基金项目:** 中国科学院成都生物研究所前沿项目 (Y0B2031100); 中央级公益性科研院所专项基金项目 (RIF2010-13)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: maxr@cib.ac.cn)

致谢: 感谢常显民博士 (OVS Health Foundation, Institute of Integrative Biology, Biosciences Building, the University of Liverpool, UK) 对英文摘要的修改和审校。

thirty-five fresh specimens were known and the other 8 processed dry samples were undetermined. The results showed that four ITS sequences from *Den. hainanense*, *Den. sinense* and two *Den. hybrida* varieties of *Den. Burana Charming* and *Den. Burana Stripe* respectively were not promulgated in GenBank. Analyzing the relationship between ITS sequence discrepancies and the phenotypic characteristics revealed that the ITS homology was positively correlated to morphology traits. The phylogenetic trees were constructed based on the ITS sequences using *Platanthera dilatata* as an outgroup to root the tree. According to the analysis of phylogeny and cluster, the 35 *Dendrobium* known samples were divided into 5 clusters, and most of the samples (24 out of 35) were clustered together. *Den. hancockii* and *Den. harveyanum* were clustered together. *Den. sinense*, *Den. lindleyi* and *Den. jenkinsii* were grouped to one branch. *Den. capillipes* was parted to a branch individually. *Den. hainanense* and *Den. crumenatum* were clustered together. The results displayed that the sections of most species divided by ITS were as the same as traditional classification. However, there were several species regrouped to different sections by ITS. And *Den. salaccense* was grouped to the same branch of *Den. Burana Charming* and *Den. Burana Stripe*, and the sections were not determined before. Moreover, the authentication of the eight unknown *Dendrobium* processed dry samples were also identified by rDNA ITS.

**Key words:** *Dendrobium*; ITS sequence; phylogenetic analysis; species identification

石斛属 (*Dendrobium*) 是兰科 (Orchidaceae) 植物中最大的属之一, 多年生草本。许多石斛种如铁皮石斛 (*Den. officinale*)、金钗石斛 (*Den. nobile*)、鼓槌石斛 (*Den. chrysotoxum*) 和流苏石斛 (*Den. fimbriatum*) 等是著名的中药材, 具有益胃、生津、止咳、润喉、滋阴、清热等功效。石斛还是四大观赏兰花之一, 依开花时间不同, 可分为春石斛和秋石斛。目前, 世界上约有 1 000 ~ 1 400 种石斛属的植物, 分布在亚洲赤道两侧及南至大洋洲的较大区域内 (王雁 等, 2007)。石斛野生资源在我国已发现有 81 个原生种 (变种), 主要分布在云南、四川、重庆、贵州、广西、广东、海南、福建、台湾等地 (李振坚 等, 2007)。

国内外研究人员在石斛的组织培养、人工栽培、产品深加工 (张明 等, 2000; 宋经元和郭顺星, 2001; 陈立钻 等, 2005)、育种开发、化学成分、药理作用和临床应用 (Adelheid, 2006) 以及生物工程 (Adelheid & Nellie, 1992; Chia et al., 1994; 徐雨和王四清, 2005) 等方面进行了全面的研究, 并取得了一些阶段性成果。这为石斛的产业化发展奠定了基础。但由于石斛对生长环境的要求较高, 自然环境下发芽率过低, 一般不到 5% (张明 等, 2000), 加之人们对其药用价值的认识逐步深入, 导致野生石斛资源遭到破坏, 许多种成为了濒危物种 (王雁 等, 2007)。另外, 石斛加工后的干品外形非常相似, 目前市场上发现不少以假乱真的混伪品, 如以石斛属近似属的金石斛属 (*Ephemerantha*)、石仙桃属 (*Pholidota* Lindl.)、石豆兰属 (*Bulbophyllum* Thou.) 材料加工后充作药材, 或者以药效低的石斛种冒充药效高的石斛种 (滕艳芬 等, 2002)。部分石斛在生长状态下外观差异较小, 而对于石斛干品来说, 依靠经典的鉴定方法则更难鉴别。

在核基因组研究中, 常用核糖体 DNA 内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, rDNA ITS 区) 序列对植物进行鉴定和系统进化分析 (Lau et al., 2001; Lee et al., 2006; 宁淑萍 等, 2008; 田敏 等, 2008; 邱蓉 等, 2012)。在进化过程中 ITS 区所受到的选择压力非常小, 并且进化速率较快, 在大部分的真核生物中都表现出了较为广泛的序列多态性。亲缘关系很近的两个种都能通过 ITS 序列来显示其差异性, 表现出二者的系统进化关系 (刘艳玲 等, 2007; 高凯, 2010; 王化坤 等, 2010)。越来越多的研究人员将 ITS 序列应用于物种的鉴别和系统进化分析 (Baldwin et al., 1995; Ngan et al., 1999; Kita & Ito, 2000; 郝明干 等, 2004; 吴玲 等, 2007; 徐玲玲 等, 2009; 王国勋和张明理,

2011)。在石斛的鉴定和系统发育研究中, 亦有相关研究报道。Tsai 等(2004)利用 rDNA ITS 序列对来自中国台湾的 12 个石斛样品进行了遗传关系分析, 将 12 个样品分为了 4 组; 并研究系统发育关系, 研究认为双花石斛 (*Den. furcatopedicellatum*) 和小双花石斛 (*Den. somai*) 不属于石斛属植物。Takamiya 等(2011)根据建立的石斛属植物 ITS 序列数据库, 对从市场上购得的 21 个石斛制品干品进行了鉴定。Clements(2003)对石斛兰亚族, 特别是石斛属距囊组进行了系统发育分析, 研究表明基于 ITS 序列的分子研究结果与形态学数据结合, 对系统发育的重新评估提供了重要依据。

本研究中通过对部分石斛属植物的 ITS 序列进行比较分析, 探讨石斛种内和种间的遗传变异以及它们之间的亲缘关系, 对待检测石斛进行分类鉴定, 为石斛的系统学研究及鉴定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ITS 序列分离克隆所用材料共 43 个(表 1), 其中已知的样品 35 个, 分别属于 32 个种, 为新鲜叶片, 编号 D1~D35; 另外 8 个样品为加工后的干品, 待检测, 编号 X1~X8。

从 GenBank Database 获得 21 个在不同分组中的石斛 ITS 序列, 与上述 43 个石斛样品一起, 进行石斛系统进化分析, 编号 R1~R21(表 2)。作为外类群的舌唇兰属 (*Platanthera dilatata* var. *dilatata* voucher LEW228, Accession No. EF025527.1) 的序列亦从 GenBank 获得。

表 1 43 份供试材料  
Table 1 The 43 samples

编号 Seq ID	材料名称 Tax name	凭证标本 Specimen voucher	GenBank 登录号 GenBank accession No.	NCBI 已有同种石斛登录号 Accession No. of the same <i>Dendrobium</i> in NCBI	同源性/% Homology
D1	霍山石斛 <i>Den. huoshanense</i>	Anhui native H1	JN388567	EU840696.1	99
D2	聚石斛 <i>Den. lindleyi</i>	Guangdong native L1	JN388568	DQ058784.1	99
D3	美花石斛 <i>Den. loddigesii</i>	Guangdong native L2	JN388569	HQ114220.1	99
D4	檀香石斛 <i>Den. anosmum</i>	Guangxi native A1	JN388570	EU477499.1	98
D5	兜唇石斛 <i>Den. aphyllum</i>	Guangxi native A2	JN388571	HQ114247.1	99
D6	叠鞘石斛 <i>Den. aurantiacum</i>	Guangxi native A3	JN388572	AF362043.1	99
D7	矩唇石斛 <i>Den. linawianum</i>	Guangxi native L1	JN388573	EU003117.1	99
D8	罗河石斛 <i>Den. lohohense</i>	Guangxi native L2	JN388574	AF363024.1	98
D9	海南石斛 <i>Den. hainanense</i>	Hainan native H1	JN388575	少花石斛 <i>Den. parviflorum</i> HQ114252.1	99
D10	海南重唇石斛 <i>Den. hercoglossum</i>	Hainan native H2	JN388576	AB593580.1	99
D11	竹枝石斛 <i>Den. salaccense</i>	Hainan native S1	JN388577	HQ114260.1	99
D12	华石斛 <i>Den. sinense</i>	Hainan native S2	JN388578	-	-
D13	金钗石斛 <i>Den. nobile</i>	Sichuan native N1	JN388579	EF618732.1	99
D14	钩状石斛 <i>Den. aduncum</i>	Yunnan native A1	JN388580	GU339110.1	99
D15	长苏石斛 <i>Den. brymerianum</i>	Yunnan native B1	JN388581	HQ114233.1	99
D16	短棒石斛 <i>Den. capillipes</i>	Yunnan native C1	JN388582	HQ114224.1	99
D17	束花石斛 <i>Den. chrysanthum</i>	Yunnan native C3	JN388584	AF362047.1	100
D18	鼓槌石斛 <i>Den. chrysotoxum</i>	Yunnan native C4	JN388585	HQ114221.1	99
D19	玫瑰石斛 <i>Den. crepidatum</i>	Yunnan native C5	JN388586	HQ114240.1	99
D20	木石斛 <i>Den. crumenatum</i>	Yunnan native C6	JN388587	HM590370.1	99
D21	流苏石斛 <i>Den. fimbriatum</i>	Yunnan native F1	JN388588	HQ114229.1	99
D22	棒节石斛 <i>Den. findleyanum</i>	Yunnan native F2	JN388589	HQ114257.1	99
D23	杯鞘石斛 <i>Den. gratiosissimum</i>	Yunnan native G1	JN388590	DQ058790.1	99
D24	竹叶石斛 <i>Den. hancockii</i>	Yunnan native H1	JN388591	DQ058787.1	99
D25	尖刀唇石斛 <i>Den. heterocarpum</i>	Yunnan native H2-1	JN388592	GU339101.1	99
D26	尖刀唇石斛 <i>Den. heterocarpum</i>	Yunnan native H2-2	JN388593	GU339101.1	99
D27	苏瓣石斛 <i>Den. harveyanum</i>	Yunnan native H3	JN388594	HQ114226.1	99
D28	小黄花石斛 <i>Den. jenkinsii</i>	Yunnan native J1	JN388595	DQ058785.1	100
D29	肿节石斛 <i>Den. pendulum</i>	Yunnan native P1	JN388596	HQ114234.1	99

续表 1

编号 Seq ID	材料名称 Tax name	凭证标本 Specimen voucher	GenBank 登录号 GenBank accession No.	NCBI 已有同种石斛登录号 Accession No. of the same <i>Dendrobium</i> in NCBI	同源性/% Homology
D30	报春石斛 <i>Den. primulinum</i>	Yunnan native P2-1	JN388597	HM054755.1	99
D31	报春石斛 <i>Den. primulinum</i>	Yunnan native P2-2	JN388598	HM054755.1	99
D32	叉唇石斛 <i>Den. stuposum</i>	Yunnan native S1	JN388599	HQ114237.1	99
D33	大苞鞘石斛 <i>Den. wardianum</i>	Yunnan native W1	JN388600	HQ114231.1	99
D34	‘白花红心秋石斛’ <i>Den. Burana Charming</i>	Yunnan strain B1-1	JN388601	-	-
D35	‘紫红条纹秋石斛’ <i>Den. Burana Stripe</i>	Yunnan strain B1-2	JN388602	-	-
X1 ~ X8	待检测样品 8 个 8 undetected samples				

表 2 从 NCBI 上获得的不同组石斛代表  
Table 2 *Dendrobium* representative from different sections on NCBI

编号 Seq ID	材料名称 Tax name	分组 Sect.	NCBI 上石斛登录号 Accession No. of the <i>Dendrobium</i> in NCBI
R1	竹枝石斛 <i>Den. salaccense</i>	禾叶组 <i>Grastidium</i>	HQ114260.1
R2	聚石斛 <i>Den. lindleyi</i>	顶叶组 <i>Chrysotoxae</i>	DQ058784.1
R3	铁皮石斛 <i>Den. officinale</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	JF803245.1
R4	霍山石斛 <i>Den. huoshanense</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	EU840696.1
R5	反瓣石斛 <i>Den. ellipsophyllum</i>	心叶组 <i>Distichophyllum</i>	AF362033.1
R6	重唇石斛 <i>Den. hercoglossum</i>	瘦轴组 <i>Breviflores</i>	AB593580.1
R7	钩状石斛 <i>Den. aduncum</i>	瘦轴组 <i>Breviflores</i>	GU339110.1
R8	叉唇石斛 <i>Den. stuposum</i>	叉唇组 <i>Stuposa</i>	HQ114237.1
R9	长爪石斛 <i>Den. chameleon</i>	距囊组 <i>Pedilonum</i>	AF521607.1
R10	红花石斛 <i>Den. miyakei</i>	距囊组 <i>Pedilonum</i>	AF521614.1
R11	黑毛石斛 <i>Den. williamsonii</i>	黑毛组 <i>Formosae</i>	GU339102.1
R12	梳唇石斛 <i>Den. strongylanthum</i>	草叶组 <i>Stachyobium</i>	DQ058797.1
R13	藏南石斛 <i>Den. monticola</i>	草叶组 <i>Stachyobium</i>	DQ058798.1
R14	勐海石斛 <i>Den. minutiflorum</i>	草叶组 <i>Stachyobium</i>	DQ058800.1
R15	木石斛 <i>Den. crumenatum</i>	基肿组 <i>Crumenata</i>	HM590370.1
R16	剑叶石斛 <i>Den. acinaciforme</i>	剑叶组 <i>Aporum</i>	HQ114253.1
R17	少花石斛 <i>Den. parviflorum</i>	圆柱叶组 <i>Strongyle</i>	HQ114252.1
R18	白血红色石斛 <i>Den. albosanguineum</i>	-	EU477498.1
R19	高山石斛 <i>Den. Infundibulum</i>	黑毛组 <i>Formosae</i>	AB593486.1
R20	<i>Den. haemoglossum</i>	-	HM054639.1
R21	<i>Den. nindii</i>	-	AY239985.1

1.2 方法

采用改良的 CTAB 法提取石斛叶片的总 DNA（王关林和方宏筠，2002）。

根据 Douzery 等（1999）对兰科植物 ITS 区的研究，设计了 1 对石斛属 ITS 区的扩增引物 P1、P2。上游引物 P1 位于 18S 上，下游引物 P2 位于 26S 上。P1：5’CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA AC3’；P2：5’TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG3’。PCR 反应体系（50 μL）：灭菌 ddH<sub>2</sub>O 31.8 μL，10 × Buffer（Mg<sup>2+</sup>）5 μL，MgCl<sub>2</sub>（25 μmol · L<sup>-1</sup>）3 μL，dNTP 混合物（每种浓度为 2.5 mmol · L<sup>-1</sup>）4 μL，引物 P1 和 P2（每种引物浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup>）各 2 μL，模板（50 ng · μL<sup>-1</sup>）2 μL，Taq DNA 聚合酶（2.5 U · μL<sup>-1</sup>）0.2 μL。扩增程序：94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，56 °C 退火 45 s，72 °C 复性 1 min，共 30 个循环后，72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物回收后直接进行 DNA 序列测定。引物合成及序列测定均由生工生物工程（上海）有限公司完成。

rDNA ITS 序列的排序用 CLUSTAL X 软件完成，排序后的序列使用 MEGA（Molecular Evolutionary Genetics Analysis）4.0 分子进化遗传分软件，选择 Kimura-2 参数遗传距离（Kimura-2

parameter genetic distance), 以石斛近缘种属舌唇兰属 (*P. dilatata*) 作为外类群植物, 用 NJ (Neighbor joining) 法构建系统树, 系统树各分支的置信度用自展检验法 (bootstrap test) 检验, 共进行 2 000 次循环, 以评价各分支的系统学意义与可靠性 (Tsai et al., 2004; 顾慧芬 等, 2010; Zamani et al., 2011)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及测序

由 ITS1 和 ITS2 对 43 个石斛样品 rDNA ITS 区 (包括部分 18S rDNA、ITS1、5.8S rDNA、ITS2 和部分 26S rDNA) 进行 PCR 扩增出的条带均约 750 bp (图 1), 与预期片段大小相符合。PCR 产物回收后测序, 获得 43 个样品的 ITS 序列。

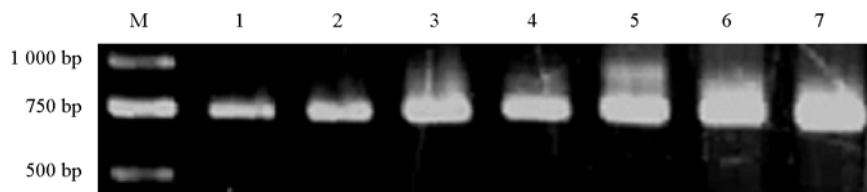


图 1 部分石斛样品 ITS 区扩增条带琼脂糖凝胶电泳图

M: DNA marker; 1~7: 石斛样品。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of ITS from some *Dendrobium* samples

M: DNA marker; 1 - 7: No. of *Dendrobium* samples.

### 2.2 rDNA ITS 序列

35 个已知样品的 ITS 序列经过校对后提交 GenBank, 获得的登录号见表 1。所有样品的序列包括部分 18S rDNA、ITS1、5.8S rDNA、ITS2 和部分 26S rDNA。其中海南石斛 (*Den. hainanense*), 华石斛 (*Den. sinense*) 和秋石斛 (*Den. hybrida*) 中的两个品种 ‘白花红心秋石斛’、‘紫红条纹秋石斛’ 4 个 ITS 序列在 GenBank 中尚未见报道。

### 2.3 rDNA ITS 序列长度和变异

根据 GenBank 中石斛及其近缘种类群已报道的 ITS 序列资料, 确定 43 个石斛样品 rDNA ITS 序列中 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S 和 26S 的界限。

43 个石斛样品的 ITS 序列 (只包含 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2) 长度变化范围在 630 ~ 650 bp。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 666 个位点, 其中有 404 个变异位点, 329 个为简约信息位点, 分别占总序列长度的 60.67% 和 49.40%。平均来说, 在 43 个 ITS 序列中, A 占碱基总数的 23.5%, T 占 23.2%, C 占 24.2%, G 占 29.1%, 转换数为 54, 颠换数为 38。

分析表明, ITS1 序列长度在 223 ~ 238 bp, A 占碱基总数的 26.6%, T 占 22.8%, C 占 23.0%, G 占 27.6%, (G + C) 含量变幅为 44.0% ~ 60.6%。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS1 区全序列排序后的长度为 249 个位点, 变异位点 196 个, 占总位点 78.71%, 简约信息位点 159 个, 占总位点 63.86%。转换数为 25, 颠换数为 19。

ITS2 序列长度在 241 ~ 249 bp, A 占碱基总数的 20.2%, T 占 27.1%, C 占 22.4%, G 占 30.3%, (G + C) 含量变幅为 47.0% ~ 62.1%。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS2 区全序列排序后的长度为 254 个位点, 变异位点 182 个, 占总位点 71.65%, 简约信息位点 147 个, 占总位点 57.87%。转

换数为 25, 颠换数为 17。可见, ITS2 的趋异性小于 ITS1。

5.8S rDNA 序列长度为 163 bp, A 占碱基总数的 23.8%, T 占 17.9%, C 占 28.6%, G 占 29.6%, (G + C) 含量变幅为 56.4% ~ 60.2%。当空位 (gap) 作缺失处理时, 5.8S rDNA 区全序列排序后的长度为 163 个位点, 变异位点 29 个, 占总位点 17.79%, 简约信息位点 20 个, 占总位点 12.27%。转换数为 5, 颠换数为 1。

## 2.4 ITS 序列差异与形态变异的关系

### 2.4.1 海南石斛分析

海南石斛与少花石斛的遗传距离最近, 在 ITS 序列上只有一个碱基差异, 99.84%同源, 与剑叶石斛 92.50%同源, 与华石斛 81.34%同源, 与棒节石斛仅 76.32%同源。

在形态上, 随着同源性的降低, 海南石斛与上述石斛的差异性也逐渐变大 (图 2)。海南石斛茎扁圆柱形, 叶肉厚质, 半圆柱形, 先端钝, 基部扩大呈抱茎的鞘; 少花石斛茎扁圆柱形, 叶肉厚质, 呈半圆柱形, 先端尖锐, 基部扩大呈抱茎的鞘; 剑叶石斛茎扁三棱形, 厚革质或肉质, 先端急尖, 基部扩大呈紧抱茎的鞘; 华石斛叶数枚, 互生, 卵状长圆形, 先端钝并且不等的 2 裂, 叶鞘披黑色粗毛; 棒节石斛叶革质, 互生, 披针形至矩圆状披针形, 先端钝或不等的 2 裂 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999; 王雁 等, 2007)。

### 2.4.2 聚石斛与小黄花石斛分析

在 ITS 序列上, 聚石斛和小黄花石斛的同源性为 93.82%, 在系统进化树上被归在了同一支。二者在表型上十分相似 (图 2, F、G)。聚石斛, 茎卵状矩圆形至纺锤形, 具 4 纵棱, 2 ~ 5 节; 叶革质, 长圆形, 长 2 ~ 8 cm, 宽 2.5 ~ 3.0 cm。小黄花石斛在形态和质地上酷似聚石斛, 但其植株各部分都较小, 叶通常长 1 ~ 2 cm, 宽 8 ~ 12 mm (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999; 王雁 等, 2007)。

### 2.4.3 秋石斛品种间分析

秋石斛中的 ‘白花红心秋石斛’ 和 ‘紫红条纹秋石斛’ 是两个不同的栽培品种。二者的 ITS 序列的同源性也较高, 达到了 99.30%, 在系统进化树上被归在了同一支; 其表型十分相似, 叶片形态难以分辨 (图 2, H、I)。



图 2 部分石斛样品的形态特征比较

A. 海南石斛; B. 少花石斛 (来自 <http://image.baidu.com>, 无标尺); C. 剑叶石斛; D. 华石斛; E. 棒节石斛; F. 聚石斛; G. 小黄花石斛; H. 白花红心秋石斛; I. 紫红条纹秋石斛。

Fig. 2 Comparison on morphological characteristics of some *Dendrobium* samples

A: *Den. hainanense*; B: *Den. parviflorum* (downloaded from <http://image.baidu.com>, without scale); C: *Den. acinaciforme*; D: *Den. sinense*; E: *Den. findleyanum*; F: *Den. lindleyi*; G: *Den. jenkinsii*; H: *Den. Burana Charming*; I: *Den. Burana Stripe*.

分析比较 35 个样品 ITS 序列差异与形态表型的关系, 显示 ITS 同源性的 高低, 与形态的相似性成正相关, 即形态差异越小, ITS 序列同源性越高。

#### 2.4.4 待检测石斛的鉴定

通过已知石斛材料的 ITS 序列在 NCBI 上的比对得知, 35 个石斛材料与 NCBI 已有的同种 ITS 序列的同源性均达到 98% 以上 (表 1), 证明 ITS 序列可以用来进行石斛种的鉴定 (Takamiya et al., 2011)。由 MEGA 4.0 软件计算得到的 43 个石斛样品间的遗传距离可知, X1 和 D24 (杯鞘石斛) 之间, X3 和 D8 (罗河石斛) 之间, X4 和 D27 (尖刀唇石斛 H2-1)、D26 (尖刀唇石斛 H2-2) 之间, X5 和 D6 (叠鞘石斛) 之间, X6 和 D14 (钩状石斛) 之间, X7 和 D20 (玫瑰石斛) 之间, X8 和 D10 (海南重唇石斛) 之间遗传距离均为 0, X2 和 D5 (兜唇石斛) 的遗传距离为 0.002, 二者之间仅有一个碱基差异。在系统进化树中, 它们各自聚在了同一支 (图 3)。由此可以推定, X1 为杯鞘石斛 (*Den. gratosissimum*), X2 为兜唇石斛 (*Den. aphyllum*), X3 为罗河石斛 (*Den. lohohense*), X4 为尖刀唇石斛 (*Den. heterocarpum*), X5 为叠鞘石斛 (*Den. aurantiacum*), X6 为钩状石斛 (*Den. aduncum*), X7 为玫瑰石斛 (*Den. chrysanthum*), X8 为重唇石斛 (*Den. hercoglossum*)。

### 2.5 系统进化和聚类分析

以舌唇兰属作为外类群, 根据试验获得的 43 个 ITS 序列以及从 NCBI 获得的 21 个不同组的石斛的 ITS 序列进行系统进化聚类分析, 结果表明, 石斛属植物与舌唇兰属的植物分化十分明显, 分别为一单系树 (图 3)。进化树中 65 个样品的平均遗传距离为 0.178, 64 个石斛样品之间平均遗传距离为 0.169, 外类群舌唇兰属与 64 个石斛样品之间的平均遗传距离为 0.462。在进化树标尺约 0.07 处, 64 个石斛 ITS 序列可以分为 A、B、C、D、E、F、G 和 H 共 8 支, 并分在不同的组。

A 支包括重唇石斛、矩唇石斛、金钗石斛、霍山石斛、尖刀唇石斛、棒节石斛、铁皮石斛、钩状石斛、肿节石斛、大苞鞘石斛、杯鞘石斛、束花石斛、玫瑰石斛、美花石斛、兜唇石斛、檀香石斛、报春石斛、罗河石斛、叉唇石斛、流苏石斛、长苏石斛、鼓槌石斛、叠鞘石斛、竹叶石斛、苏瓣石斛, 平均遗传距离为 0.122。说明该支石斛的亲缘关系较近, 因而被分在了同一支。其中大部分石斛归于石斛组。但是在传统形态分组中 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999) 分在瘦轴组的重唇石斛和钩状石斛, 分在顶叶组的鼓槌石斛, 分在叉唇组的叉唇石斛, 都聚在 A 支。按照亲缘关系的远近, A 支应该为石斛组, 与传统分组有差异。在中国植物志第十九卷 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999) 的石斛属内分组中未见檀香石斛, 本研究将其分在了石斛组 (表 3)。

B 支包括聚石斛、小黄花石斛、黑毛石斛、华石斛和高山石斛, 该支平均遗传距离为 0.101。其中聚石斛和小黄花石斛聚在了了一小支中, 分在顶叶组; 华石斛、高山石斛和黑毛石斛聚在了了一小支中, 分在黑毛组。表明黑毛组石斛与顶叶组石斛亲缘关系相对较近。

反瓣石斛单独聚在了 C 支。该支与 A 支的遗传距离平均为 0.157, 与 B 支的遗传距离平均为 0.153, 与 D 支遗传距离平均为 0.168。在传统分组中属于心叶组。

D 支包括竹枝石斛、*Den. haemoglossum*、*Den. nindii*、‘白花红心秋石斛’和‘紫红条纹秋石斛’, 平均遗传距离为 0.045。*Den. nindii* 和 *Den. haemoglossum* 尚无中文命名。该支分为两小支, 一支含竹枝石斛和 *Den. haemoglossum*, 传统分组中竹枝石斛分在禾叶组, *Den. haemoglossum* 有可能是竹枝石斛的变种之一 (Samantha & Paul, 2008)。另外一支含‘白花红心秋石斛’、‘紫红条纹秋石斛’和 *Den. nindii*, 在传统分组中尚未确定分组 (表 3), 聚类分析发现, 他们的遗传距离非常近, 为 0.006。

E 支包含短棒石斛和白血红色石斛, 该支平均遗传距离为 0.017。短棒石斛在传统分组中分在石斛组, 但是 ITS 序列分析结果显示不归于石斛组, 与白血红色石斛的遗传距离为 0.017。它们的分组有待进一步确定 (表 3)。

F 支包括长爪石斛和红花石斛, 该支平均遗传距离为 0.045。长爪石斛和红花石斛在传统分组中归于距囊组, 系统进化分析中二者被聚在了同一支。

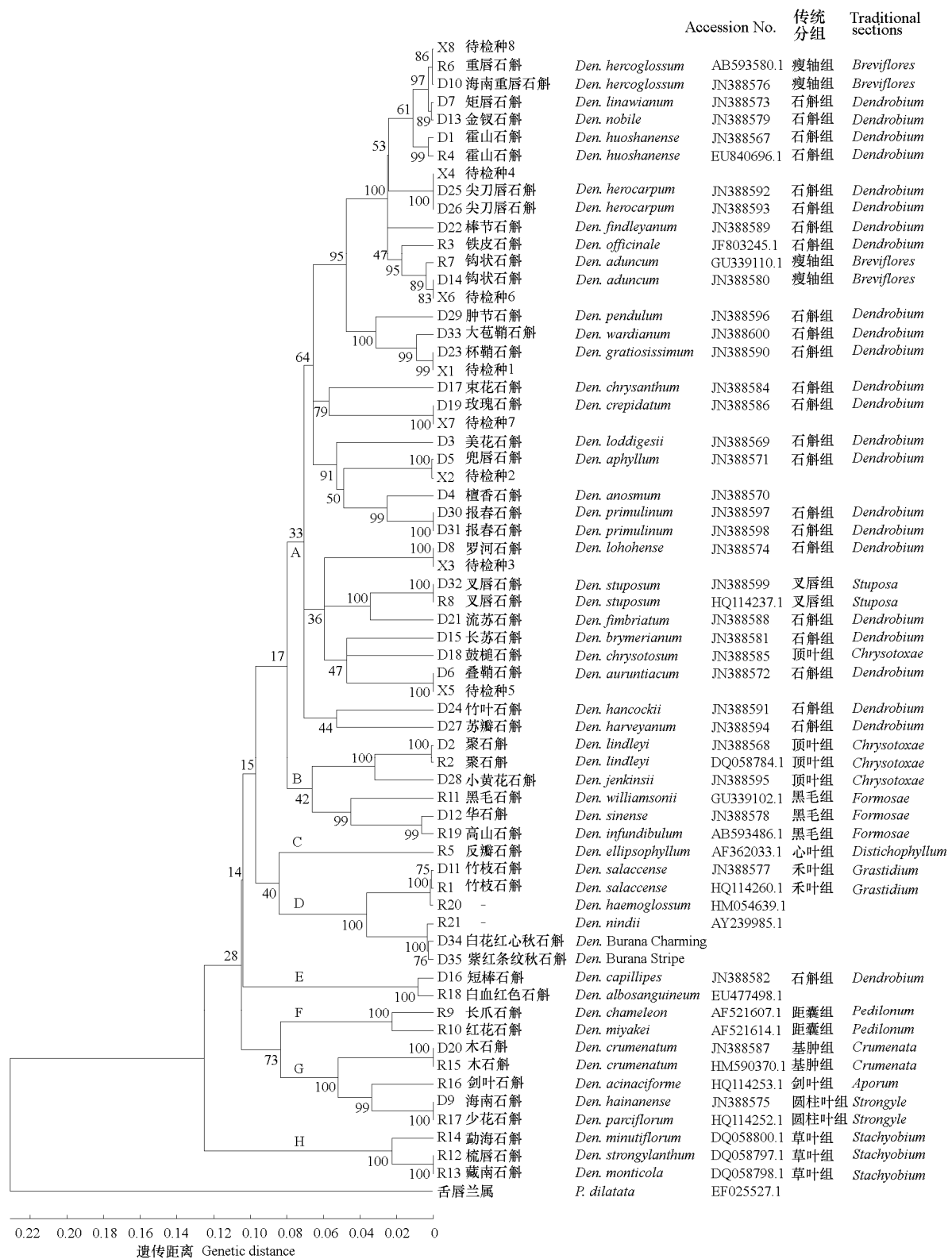


图 3 基于 rDNA ITS 序列的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on the rDNA ITS sequences



G 支包括木石斛、剑叶石斛、海南石斛和少花石斛, 该支平均遗传距离为 0.074。木石斛与剑叶石斛的遗传距离为 0.093, 与海南石斛和少花石斛的为 0.111。剑叶石斛与海南石斛和少花石斛间的遗传距离为 0.066。传统分组中, 木石斛分在基肿组, 剑叶石斛分在剑叶组, 海南石斛和少花石斛分在圆柱叶组, 四者尽管在不同的分组, 但是亲缘关系相对较近。

H 支包括勐海石斛、梳唇石斛和藏南石斛, 该支平均遗传距离 0.030。传统分组中在草叶组。

表 3 基于 ITS 序列石斛分组与传统分组的差异  
Table 3 Difference between the *Dendrobium* Sect. based on the ITS sequence and the traditional Sect.

样品编号及名称 Seq ID and Tax Name	传统分组 (中国科学院中国植物志编辑 委员会, 1999) Traditional Sect.	本研究基于 ITS 序列分组和分支 <i>Dendrobium</i> Sect. and branch based on the ITS sequence	
		分组 Sect.	分支 Branch
D10 重唇石斛 <i>Den. hercoglossum</i>	瘦轴组 <i>Breviflores</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	A
D14 钩状石斛 <i>Den. aduncum</i>	瘦轴组 <i>Breviflores</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	A
D18 鼓槌石斛 <i>Den. chrysotoxum</i>	顶叶组 <i>Chrysotoxae</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	A
D32 叉唇石斛 <i>Den. stuposum</i>	叉唇组 <i>Stuposa</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	A
D4 檀香石斛 <i>Den. anosmum</i>	未确定 Unidentified	石斛组 <i>Dendrobium</i>	A
D34 ‘白花红心秋石斛’ <i>Den. Burana Charming</i>	未确定 Unidentified	待确定 Unidentified	D
D35 ‘紫红条纹秋石斛’ <i>Den. Burana Stripe</i>	未确定 Unidentified	待确定 Unidentified	D
D16 短棒石斛 <i>Den. capillipes</i>	石斛组 <i>Dendrobium</i>	待确定 Unidentified	E

3 讨论

Bruce 等 (1995) 研究表明, 有花植物 (Flowering Plant) 的 ITS 序列大小通常比其他生物短, 变幅在 187 ~ 298 bp 之间。本研究中的 43 个石斛样品的 ITS (ITS1 和 ITS2) 序列变幅为 223 ~ 249 bp, 均在有花植物 ITS 序列长度变化范围内, 并且与前人研究的石斛 ITS 序列长度 (Lau et al., 2001; 刘静 等, 2009) 基本一致。

大多数被子植物基因组 ITS 区的 (G + C) 含量约占 50%, 而槲寄生科为 31%, 禾本科为 77% (Elina & Cecilia, 1999)。本研究中的 43 个石斛样品的 ITS1 序列中 (G + C) 含量平均 50.6%; ITS2 的 (G + C) 含量平均 52.6%。这与多数被子植物的 ITS 序列中的 (G + C) 含量基本一致。另外, 石斛样品的 5.8S rDNA 的 (G + C) 含量平均 58.2%, 高于 ITS 区的 (G + C) 含量。这与其 ITS 区选择压力小, 进化速率快的特征一致。

比较 ITS 序列差异与形态表型的关系, 总体上看, ITS 同源性的 高低, 与形态的相似性成正比相关。海南石斛和少花石斛在 ITS 序列上有一个碱基差异, 99.84%同源, 与剑叶石斛 92.50%同源, 与华石斛 81.34%同源, 和棒节石斛仅 76.32%同源。在形态上, 海南石斛与之差异也逐渐变大, 如叶片宽度逐步增大等。结果显示石斛样品的 ITS 同源性越高, 其形态相似性也越高; 反之则越低。表明 ITS 鉴定准确可靠, 可以根据 ITS 序列并结合形态特征进行石斛的鉴定分类。

在石斛的系统进化、聚类分析中, 基于 ITS 序列 (包括 ITS1、5.8S 和 ITS2) 分类结果, 大部分与传统分类分组一致, 但有少部分种与传统分组结果存在差异 (表 3)。中国植物志第十九卷 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999) 中归于瘦轴组的重唇石斛和钩状石斛, 归于顶叶组的鼓槌石斛, 归于叉唇组的叉唇石斛, 在本研究中与大部分属于石斛组的材料归于一支 (A 支)。本研究结果与他人相关研究报道一致。顾慧芬等 (2010) 根据 ITS 区序列数据用 Kimura-2 参数距离计算出的 NJ 系统树中, 重唇石斛、钩状石斛和鼓槌石斛也被分在一起。刘静等 (2009) 根据材料的 ITS 序列构建的 UPGMA 进化树, 也将顶叶组的鼓槌石斛分在了石斛组。白音等 (2007) 用 AFLP 标记对石斛的亲缘关系分析时, 将叉唇组的叉唇石斛与石斛组的长苏石斛、流苏石斛、叠鞘石斛、肿节石斛、

大包鞘石斛和杯鞘石斛也分在了一支。Wang 等 (2009) 基于 ISSR 标记将叉唇石斛与石斛组的曲轴石斛 (*Den. gibsonii*) 分在了一支。

黑毛组与顶叶组聚在了一支 (B 支), 表明它们的亲缘关系相对较近。D 支中 ‘白花红心秋石斛’ 和 ‘紫红条纹秋石斛’ 与 *Den. nindii* 遗传距离仅为 0.006, 三者分在同一小支中, *Den. nindii* 无文献显示其分组情况, 因此它们的分组待确定。E 支的短棒石斛, 传统分组分在石斛组, 在本研究结果中被分在了 A 支外, 这与徐红等 (2001) 的研究结果一致。E 支与 A 支的平均遗传距离较远, 为 0.221。E 支中的白血红色石斛, 目前未查到其分组情况, 但它与短棒石斛遗传距离非常近, 为 0.017, 推测它们可以分为一个新组。

产生上述现象的原因可能是仅仅基于表型的石斛分类尚比较混乱, 存在争议, 仅从形态上难以正确分组。比如来自一个石斛种的两个居群, 在栽培过程中, 形态已经发生了变异 (丁小余 等, 2002), 分类学家根据表型将其分成了两个种, 但是根据 ITS 序列二者属于同一个石斛种。

因此, 在分类中应当根据形态特征并结合一些 DNA 序列特征, 如 ITS 序列, 方能较正确地进行物种分类、分组及物种鉴定。在本研究中存在的差异, 尚需要进一步研究确定。

本研究中 35 个已知样品中的 29 个与 NCBI 上同种石斛的 ITS 序列差异性均在 1% 左右, 与前人研究结果一致, 重复性很高 (Lau et al., 2001; Takamiya et al., 2011)。这说明, 对石斛伪品和未知石斛的 ITS 序列与已有石斛的 ITS 序列比对, 然后鉴别石斛的真伪和种名是可行的。在石斛干品的鉴定中发现, 未知石斛 X1、X3 ~ X8 分别与已知的杯鞘石斛、罗河石斛、尖刀唇石斛、叠鞘石斛、钩状石斛、玫瑰石斛和重唇石斛的 ITS 序列 100% 同源。X2 与已知的兜唇石斛的 ITS 序列仅有一个碱基差异。因此, 可以确定它们的种属。这表明, 通过 ITS 序列成功地完成了对未知石斛的鉴定。另外, 分别获得海南石斛、华石斛和秋石斛中的两个品种 ‘白花红心秋石斛’ 和 ‘紫红条纹秋石斛’ 的 4 个 ITS 序列, 可为进一步研究提供依据。

## References

- Adelheid R K, Nellie S. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Reports*, 11: 484 - 488.
- Adelheid R K. 2006. Orchids *Dendrobium*. *Flower Breeding and Genetics*, Part II: 539 - 560.
- Bai Yin, Bao Ying-hua, Wang Wen-quan, Jiang Li-li, Yan Yu-ning. 2007. Analysis of the phylogenetic relationship of *Dendrobium* in China by AFLP technique. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1569 - 1574. (in Chinese)
- 白 音, 包英华, 王文权, 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.
- Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, Wojciechowski M F, Campbell C S, Donoghue M J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82 (2): 247 - 277.
- Bruce G Baldwin, Michael J Sanderson, Mark J Porter, Martin F Wojciechowski, Christopher S Campbell, Michael J Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82 (2): 247 - 277.
- Chen Li-zuan, Ni Yun-xia, Sun Ji-jun, Fan Hua-fen, Xu An-ling. 2005. The comparative study of polysaccharide content during the traditional and mechanical process *Dendrobium officinale*. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 16 (4): 284 - 286. (in Chinese)
- 陈立钻, 倪云霞, 孙继军, 范华芬, 许安玲. 2005. 铁皮石斛传统加工品与机械加工品的多糖含量对比研究. *中药新药与临床药理*, 16 (4): 284 - 286.
- Chia Tet-fatt, Chan Yang-sun, Chua Nam-hal. 1994. The fire luciferase gene as a non-invasive report for *Dendrobium* transformation. *The Plant Journal*, 6 (3): 441 - 446.
- Clements M A. 2003. Molecular phylogenetic systematics of the Dendrobieinae (Orchidaceae), with emphasis on *Dendrobium* section *pedilonum*. *Telopea*, 10 (1): 247 - 298.
- Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. 1999. *Flora Republicae Popularis Sinicae*. Tomus 19. Beijing:

- Science Press: 67 - 146. (in Chinese)
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1999. 中国植物志. 第十九卷. 北京: 科学出版社: 67 - 146.
- Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Luo-shan, Xu Hong, Zhou Kai-ya, Shi Guo-xin. 2002. Study on sequence difference and SNP phenomenon of rDNA ITS region in F type and H type population of *Dendrobium officinale*. China Journal of Chinese Materia Medica, 27 (2): 85 - 89. (in Chinese)
- 丁小余, 王峥涛, 徐璐珊, 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.
- Douzery E J, Pridgeon A M, Kores P, Linder H P, Kurzweil H, Chase M W. 1999. Molecular phylogenetics of diasc (Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequence. American Journal of Botany, 86 (6): 887 - 899.
- Elina L, Cecilia A R. 1999. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: Evidence from 5.8S, ITS 1 and ITS 2 of the rDNA. Pl Syst Evol, 215: 209 - 227.
- Gao Kai. 2010. Species identification and phylogenetic evolution study of 10 wild *Phellinus* based on rDNA ITS sequence analysis [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 高 凯. 2010. 基于 rDNA ITS 序列分析对 10 株野生桑黄菌属、种鉴定及其系统发育进化的研究 [博士学位]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Gu Hui-fen, Zhuang Yi-li, Ma Zi-jian, Mei Qi-chun. 2010. Phylogenetic relationships of *Dendrobium candidum* and its related species based on DNA ITS sequences. Chinese Traditional Patent Medicine, 32 (4): 628 - 632. (in Chinese)
- 顾慧芬, 庄意丽, 马子建, 梅其春. 2010. 基于 ITS 序列分析铁皮石斛与近缘类群的亲缘关系. 中成药, 32 (4): 628 - 632.
- Hao Ming-gan, Liu Zhong-quan, Wang Jia-lian. 2004. Application of the sequences of rDNA ITS to identify Chinese crude drug *Hedyotis diffusa*. Journal of Anhui Normal University: Natural Science, 27 (2): 188 - 191. (in Chinese)
- 郝明干, 刘忠权, 王加连. 2004. rDNA ITS 序列分析在中药材白花蛇舌草鉴定中的应用. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 27 (2): 188 - 191.
- Kita Y, Ito M. 2000. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian Aconitum subgenus Aconitum (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. Plant Systematics and Evolution, 225 (1 - 4): 1 - 13.
- Lau D T, Shaw P C, Wang J, But P P. 2001. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Planta Med, 67: 456 - 460.
- Lee S K, Li P T, Lau D T, Yung P P, Kong R Y, Fong W F. 2006. Phylogeny of medicinal *Phyllanthus* species in China based on nuclear ITS and chloroplast *atpB-rbcL* sequences and multiplex PCR detection assay analysis. Planta Med, 72 (8): 721 - 726.
- Li Zhen-jian, Wang Yan, Wu Rong-hua. 2007. The excellent ornamental plants - *Dendrobium* Spp. (part I), Flowers Trees Potted Landscape (Huahui Yuanyi), (3): 24 - 25. (in Chinese)
- 李振坚, 王 雁, 武荣花. 2007. 优良观赏植物石斛兰 (上). 花木盆景 (花卉园艺), (3): 24 - 25.
- Liu Jing, He Tao, Chun Ze. 2009. DNA molecular identification of *Herba dendrobii* and its adulterant species based on ITS sequence analysis. China Journal of Chinese Materia Medica, 34 (22): 2853 - 2856. (in Chinese)
- 刘 静, 何 涛, 淳 泽. 2009. 基于 ITS 序列的中国药用石斛及其混伪品的分子鉴定. 中国中药杂志, 34 (22): 2853 - 2856.
- Liu Yan-ling, Xu Li-ming, Cheng Zhong-ping. 2007. Phylogenetic analysis of stone fruits such as peach, plum, apricot, mume and cherry based on ITS sequences. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1): 23 - 28. (in Chinese)
- 刘艳玲, 徐立铭, 程中平. 2007. 基于 ITS 序列探讨核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系. 园艺学报, 34 (1): 23 - 28.
- Ngan F, Shaw P, But P, Wang J. 1999. Molecular authentication of *Panax* species. Phytochemistry, 50 (5): 787 - 791.
- Ning Shu-ping, Yan Hai-fei, Hao Gang, Ge Xue-jun. 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants. Biodiversity Science, 16 (5): 417 - 425. (in Chinese)
- 宁淑萍, 颜海飞, 郝 刚, 葛学军. 2008. 植物 DNA 条形码研究进展. 生物多样性, 16 (5): 417 - 425.
- Qiu Rong, Cheng Zhong-ping, Wang Zhang-li. 2012. Studies on genetic relationship and evolutionary path of subgenus *Amygdalus* in China. Acta Horticulturae Sinica, 39 (2): 205 - 214. (in Chinese)
- 邱 蓉, 程中平, 王章利. 2012. 中国扁桃亚属植物亲缘关系及其演化途径研究. 园艺学报, 39 (2): 205 - 214.
- Song Jing-yuan, Guo Shun-xing. 2001. Effects of Fungus on the growth of *Dendrobium candidum* and *D. nobile* in vitro culture. Acta Academiae

- Medicinae Sinicae, 23 (6): 547 – 551. (in Chinese)
- 宋经元, 郭顺星. 2001. 离体培养时真菌对铁皮石斛和金钗石斛生长的影响. 中国医学科学院学报, 23 (6): 547 – 551.
- Takamiya T, Wongsawad P, Tajima N, Shioda N, Lu J F, Wen C L, Wu J B, Handa T, Iijima H, Kitanaka S, Yukawa T. 2011. Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. Biol Pharm Bull, 34 (5): 779 – 782.
- Teng Yan-fen, Wu Xiao-jun, Xu Hong, Wang Zheng-tao, Yu Guo-dian, Xu Luo-shan. 2002. A comparison of matK sequences between *Herba dendrobii* (Shihu) and its adulterant species. Journal of China Pharmaceutical University, 33 (4): 280 – 283. (in Chinese)
- 滕艳芬, 吴晓俊, 徐 红, 王峥涛, 余国奠, 徐璐珊. 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.
- Tian Min, Li Ji-yuan, Ni Sui, Fan Zheng-qi, Li Xin-lei. 2008. Phylogenetic study on section *Camellia* based on ITS sequences data. Acta Horticulturae Sinica, 35 (11): 1685 – 1688. (in Chinese)
- 田 敏, 李纪元, 倪 穗, 范正琪, 李辛雷. 2008. 基于 ITS 序列的红山茶组植物系统发育关系的研究. 园艺学报, 35 (11): 1685 – 1688.
- Tsai C C, Peng C I, Huang S C, Huang P L, 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: 315 – 325.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. Plant genetic engineering. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程. 北京: 科学出版社.
- Wang Guo-xun, Zhang Ming-li. 2011. A molecular phylogeny of *Sorbus* (Rosaceae) based on ITS sequence. Acta Horticulturae Sinica, 38 (12): 2387 – 2394. (in Chinese)
- 王国勋, 张明理. 2011. 应用核 DNA ITS 序列探讨广义花楸属 (*Sorbus* L.) 属下系统关系. 园艺学报, 38 (12): 2387 – 2394.
- Wang Hua-kun, Tao Jian-min, Qu Shen-chun, Fang Jing-gui, Ma Rui-juan, Zhang Zhen, Lou Xiao-ming. 2010. Molecular evolution and phylogeny of stone fruit trees based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Acta Horticulturae Sinica, 37 (3): 363 – 374. (in Chinese)
- 王化坤, 陶建敏, 渠慎春, 房经贵, 马瑞娟, 章 镇, 娄晓鸣. 2010. 核果类果树 ITS 序列分子进化及系统发育关系研究. 园艺学报, 37 (3): 363 – 374.
- Wang Hui-zhong, Feng Shang-guo, Lu Jiang-jie, Shi Nong-nong, Liu Jun-jun. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae, 122: 440 – 447.
- Wang Yan, Li Zhen-jian, Peng Hong-ming. 2007. *Dendrobium*. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 王 雁, 李振坚, 彭红明. 2007. 石斛兰——资源·生产·应用. 北京: 中国林业出版社.
- Wu Ling, Lu Yi-jun, Shi Shu-de, Fu Cheng-xin. 2007. Analysis of inter-species relationship of *Lycoris* by use of ITS sequence. Subtropical Plant Science, 36 (1): 31 – 35.
- 吴 玲, 卢毅军, 史树德, 傅承新. 2007. 中国石蒜属种间亲缘关系 ITS 序列分析. 亚热带植物科学, 36 (1): 31 – 35.
- Xu Hong, Li Xiao-bo, Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Luo-shan, Zhou Kai-ya. 2001. rDNA ITS sequencing of *Herba Dendrobii* (Huangcao). Acta Pharmaceutica Sinica, 36 (10): 777 – 783. (in Chinese)
- 徐 红, 李晓波, 丁小余, 王峥涛, 徐璐珊, 周开亚. 2001. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析. 药学学报, 36 (10): 777 – 783.
- Xu Ling-ling, Li Tong-jian, Zhang Mei-yun, Yi Guan-mei, Liao Liang. 2009. Interspecific relationships and variation of 12 species in *Ardisia* Sw. (Myrsinaceae) based on ITS and trnL-F data sets. Acta Horticulturae Sinica, 36 (10): 1531 – 1537. (in Chinese)
- 徐玲玲, 李同建, 张美云, 易官美, 廖 亮. 2009. 基于核 ITS 与叶绿体 trnL-F 序列分析 12 种紫金牛属植物的种间关系与变异. 园艺学报, 36 (10): 1531 – 1537.
- Xu Yu, Wang Si-qing. Advances of *Dendrobium*. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 20 (Special Issue): 152 – 157. (in Chinese)
- 徐 雨, 王四清. 2005. 异军突起之石斛兰的研究进展. 华北农学报, 20 (专辑): 152 – 157.
- Zamani H, Moradshahi A, Karbalaee-Heidari H R. 2011. Characterization of a new *Dunaliella salina* strain MSI-1 based on nuclear rDNA ITS sequences and its physiological response to changes in composition of growth media. Hydrobiologia, 658: 67 – 75.
- Zhang Ming, Xia Hong-xi, Zhu Li-quan, Zhang Yu-jin. 2000. Research progress on tissue culture of *Dendrobium*. China Journal of Chinese Materia Medica, 25 (6): 323 – 326. (in Chinese)
- 张 明, 夏鸿西, 朱利泉, 张玉进. 2000. 石斛组织培养研究进展. 中国中药杂志, 25 (6): 323 – 326.