

铁皮石斛的研究进展

高正华,杨兵勋,陈立钻(浙江天皇药业有限公司,杭州 310012)

摘要:本文对铁皮石斛的研究现状与发展趋势进行了综述。铁皮石斛的组织培养一般以根尖或茎尖为外植体,在改良的 MS 等培养基上进行组织培养获得幼苗;大田栽培有“黑棚”、“白棚”之分,从仿野生角度阐述了优缺点;对所含的多糖、联苣类和菲酚类化合物、生物碱、氨基酸和微量元素等进行概述;质量标准研究从多糖测定角度作了综述;并概述了基因多态性和指纹图谱的研究进展,认为只适合新鲜药材而不适合干药材及药品的鉴别。同时认为寻求一种快速简便的适合药品、保健食品鉴定铁皮石斛真伪的方法很有必要。

关键词:铁皮石斛;组织培养;大田栽培;成分研究;基因多态性

中图分类号:R931.216 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)08-0692-04

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 为兰科石斛属多年生草本植物。《中国药典》2000年版石斛项下收载有五种,即铁皮石斛、粉花石斛、束花石斛、金钗石斛和流苏石斛;2005年版只收载了金钗石斛、铁皮石斛和马鞭石斛三种。铁皮石斛是我国传统的名贵中药材。现代中医药理论认为,铁皮石斛具有健脾养胃、滋阴补肾、润肺生津等功效,用于治疗慢性萎缩性胃炎、高血压、糖尿病、抗肿瘤、抗衰老等^[1]。全球石斛属植物有1500多种。1980年前我国有各种石斛57种,后陆续发现19种,现共有76种^[2]。包雪声等^[3]对铁皮石斛的植株形态有详细描述。由于铁皮石斛自身繁殖能力低,人为过度采摘,使野生资源基本灭绝,成为“濒危珍稀植物”,被列入《中国植物红皮书》。

铁皮石斛常以铁皮枫斗的形式作为药材使用。铁皮枫斗是将铁皮石斛的茎,在烘烤干燥时手工双向扭曲成螺旋弹簧状的传统药材,目的是将铁皮石斛表皮细胞外的角质层破裂,使有效成分在煎煮时容易释出。到2006年底全国有铁皮石斛为原料的药品2个品种,保健食品79个品种;剂型有颗粒剂、胶囊剂、软胶囊、口服液、丸剂、茶、饮料、口含片等。

1 组织培养研究

铁皮石斛的种子细如粉末,一个蒴果内所含种子达百万粒之多,由于缺乏胚乳(营养物质),种子必须飘落到非常适宜的环境与真菌共生(symbiotical)才能萌发,自然条件下萌发率极低。组织培养是实现快速繁殖、人工栽培的最佳技术手段。组织培养一般采用野生铁皮石斛植株,以其胚、茎尖或根尖为外植体,接种到培养基上进行细胞培养。从细胞到微苗、幼苗、壮苗,周期约1年。

1985年左春芳等开始研究铁皮石斛的组织培养,并取得进展。唐桂香等^[4]以成熟的铁皮石斛种胚,用1/2MS为培养基,接种到含有6-苄基腺嘌呤(BA)和萘乙酸(NAA)以及含有马铃薯、香蕉提取物的培养基上,诱导种胚萌发、增殖、分化及生根。研究结果认为含有20%马铃薯提取物的培

养基有利于种胚的萌发,萌发率接近80%;培养基中加入2%活性炭,原球茎增殖倍数高;添加NAA使试管苗生根多且长。

为解决原球茎转接成活率低的问题,侯丕勇等^[5]对悬浮培养的原球茎在固体培养基上生长和分化进行了研究。他们选用不同的培养基,以植株鲜重和成苗数为指标,考察原球茎的生长和发育。结果发现,降低培养基微量元素含量有利于原球茎的生长,但不利于分化,灭活真菌容易引起原球茎形态变异。刘骅等^[6]对降低试管苗繁殖成本进行了研究,用常水替代蒸馏水、食用白糖替代药用蔗糖,成效明显。

詹忠根^[7]对根尖诱导丛生芽作了研究,选择健壮、根长为3cm的无菌苗,取其长约0.3-0.5cm的根尖分生组织平放在改良的B5培养基中,在25±1℃,光照强度800 lx,持续光照。结果诱导根尖形成了愈伤组织、类原球茎或直接转化成芽且获得再生植株,通过细胞学观察认为铁皮石斛的类原球茎是单细胞起源的体细胞胚。

2 大田栽培研究

铁皮石斛人工繁育的核心技术是组培苗移到大田栽培的工艺,成活率是关键。组培的铁皮石斛壮苗,4-6月份移栽到大田,移栽前先进行异养到自养的炼苗。栽培基地要架设网架,上覆黑色遮阳网。用特定物质组成仿野生基质。每年4-6月和9-10月为植株生长旺盛期,5-6月开花,7月结果。其间要拔草、打苔、喷淋、排水、追肥、修整、病虫害防治等田间管理;一般荫蔽度控制在70-80%,相对湿度85%左右。栽培时间以4年为最好,亩产一般在60-100 kg(干药材)。相对于组培苗的繁育,大田栽培的技术难度更高。

铁皮石斛属于阴生植物,若吸收过剩的光能可能导致光抑制^[8]。现普遍采用地块上搭建遮阳棚的办法,来减少过度光照。从栽培情况看,目前的栽培形式有“白棚”、“黑棚”和“敞开棚”、“密闭棚”之分。在棚架上采用透明塑膜(玻璃)的为“白棚”;采用黑色遮阳网的为“黑棚”。地块与大气相

通的是“敞开棚”;如同蔬菜大棚那样密闭的是“密闭棚”。研究认为黑棚优于白棚,敞开棚优于密闭棚。这是由于白棚遮阳效果差,密闭棚使环境温度高,而使铁皮石斛产生“疯长”变异,生长周期短,产量大,但有效成分含量低。而黑棚(敞开棚)尽管生长周期长,产量小,但符合铁皮石斛仿野生环境的要求。

付开聪等^[9]以铁皮石斛试管苗的大小、栽培基质、不同季节和不同外源生长素作用,对比成活率和产量。认为铁皮石斛的最佳栽培季节为每年3-6月和9-11月;施用外源生长素对促进产量效果明显;共生菌对移栽苗提高成活率有一定影响,但对提高产量无明显作用。采用他们的方法,铁皮石斛的产量可达到 $6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,成活率达92.5%。

铁皮石斛光合特性研究对人工栽培有积极意义。蔡永萍等^[10]对铁皮石斛等三种石斛的光合特性进行研究,测定了这3种石斛的光合速率对光强影响曲线,不同光强处理时叶绿素荧光参数的变化及瞬时光强下叶片荧光猝灭诱导研究等。认为这3种石斛在 $2.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4 \text{ lx}$ 光强下,石斛有较好的光响应能力;同时认为在树木林荫下人工栽培时应补光;大田栽培情况下,采用单层遮阳网比双层遮阳网更好,可提高光合效率和产量。

3 主要成分研究

3.1 多糖类成分

铁皮石斛所含多糖的种类很多,其总多糖含量一般在30%以上。范俊安等^[11]对野生品和人工繁育品进行多糖含量的比较研究,采用提取总多糖后,用苯酚-硫酸法测定,结果认为两类铁皮石斛所含总多糖无显著差异;表明组织培养和人工栽培得到的铁皮石斛质量与野生的一致。王世林等^[12]对黑节草多糖进行了研究,分离得到三种多糖:即黑节草多糖I、II、III;由几个 β -(1→3)-D-甘露吡喃糖基和一个 β -(1→4)-D-葡萄糖吡喃糖基重复构成主链,支链可能由 β -(1→4)-D-葡萄糖吡喃糖基和其它戊糖基组成,并连接在主链葡萄糖基的2-,3或6位上。

多糖是铁皮石斛中最主要的有效成分。黄民权等^[13]提取分离了铁皮石斛中的多糖,研究发现主要由D-木糖、L-阿拉伯糖组成和D-葡萄糖组成。黄民权等^[14]还对铁皮石斛等六种石斛所含水溶性多糖中各单糖的比例进行了研究,发现不同石斛多糖所含的单糖种类和比例均有不同。华允芬等^[15]研究了铁皮石斛等三种石斛的多糖质量分数、分布、组成以及分子相对质量大小的差异,用测定糖含量的方法分析三种石斛不同部位的总多糖TPs和水溶性多糖WPs,用糖醛酸和蛋白质质量分数测定、离子交换柱色谱以及凝胶柱色谱方法分析WPs。结果表明:铁皮石斛TPs和WPs质量分数最高;三种石斛多糖在各部位分布情况存在差异;不同石斛的WPs的组成和分子相对质量大小也不同。另外,对铁皮石斛多糖进行了提取、分离、纯化及结构鉴定,获得一个中性杂多糖DOP-1-A1,含 β -D-甘露糖基,5个酸性糖DOP-2-A1、3、4、5、6-A1,均为含 β -D-甘露糖基的蛋白聚糖。

为对比不同石斛中多糖的差异,李满飞等^[16]对25种石斛属植物36个样品的多糖含量进行了测定,发现不同品种之间多糖含量的差别非常大;凡达到传统标准所说的“质重,嚼之粘牙,口甜,无渣者为优”的被测品,其多糖含量均高于30%,可见多糖是铁皮石斛中一种重要的有效成分。

3.2 联苕类和菲酚类成分

到目前为止,研究人员从12种石斛中分离得到了23个联苕类化合物^[16],从其中8种石斛中分离得到7个具有菲核的化合物,它们分别为:鼓槌菲Chrysotoxene^[17]、毛兰菲Confusarin^[17]、Ephedranthob、Denbinobin、Moscatin、2,7-dihydroxy-3,4,6-methoxyphenanthrene、NudoI;从另4种石斛中分离得到具有9,10-双氢菲母核(9,10-dihydrophenanthrene)的化合物6个,它们分别为Erianthridin^[16]、Lusianthridin^[16]、Rotundatin、2,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene、2,2'-dimethoxy-4,4',7,7'-tetrahydroxy-9,9',10,10'-tetrahydro-1,1'-biphenanthrene^[16]、amocennin;从其它石斛分离得到具有联苕母核(bibenzyI)的化合物10个,它们分别为:毛兰素Erianin^[17]、鼓槌石斛素Chrysotoxine、鼓槌联苕ChrysotobibenzyI^[17]、Batatasin^[16]、3-omethylgigantol^[17]、Gigantol、Moscatilin、Cumulatin、Tristin、Crepidatin。陈立钻等^[18]从石斛中提取分离得到毛兰素,并获“一种从石斛中提取毛兰素的方法”的发明专利。据研究,毛兰素在体外对多种肿瘤有抑制作用。

3.3 生物碱成分

铁皮石斛所含的生物碱是有效成分,生物碱的含量和种类直接与疗效相关。金蓉鸾等在1981年就对11种石斛的总生物碱测定方法进行了研究。到目前为止,研究人员从13种石斛中分离获得29个生物碱,其中有5种含有石斛碱类生物碱(即倍半萜类生物碱)16个,另8种含有其它无共同母核的生物碱13个。铁皮石斛中单个生物碱的分离、鉴定还未见报道,这可能与铁皮石斛中生物碱含量较低、铁皮石斛价高有关。丁亚平等^[19]采用酸性染料比色法对铁皮石斛等三种石斛中的生物碱进行了测定,认为铁皮石斛1年茎<2年茎<3年茎<4年茎,宜4年采收。三种石斛总生物碱含量均为叶>茎≈根。铁皮石斛宜四年采摘,这与人工栽培的实践相一致。

3.4 氨基酸和微量元素

铁皮石斛含有多种氨基酸。黄民权等^[20]对其所含的氨基酸进行了分析,认为铁皮石斛中主要含有天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、酪氨酸16种氨基酸,前五种即天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸占总氨基酸的53%,含有除色氨酸以外的所有人体必须的氨基酸。

铁皮石斛所含微量元素与疗效有关。翁棣^[21]采用超声搅拌悬浮液进样FAAS法测定了铁皮石斛中的微量元素,结果为含铁为 $291.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、锌为 $12.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、锰为 $52.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、铜为 $3.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。许春萱等采用原子吸收法,发

现人工栽培的铁皮石斛含有十多种微量元素,并认为与铁皮石斛的疗效密切相关。

4 质量标准研究

铁皮石斛质量标准收载于《中国药典》2005年版一部。质量标准仅制订了外观性状、显微特征等检查项目。有关药品、保健食品的质量标准,大多仅制订了薄层色谱鉴别和比色法测定多糖含量。《浙江省中药炮制规范》2005版把铁皮石斛和石斛分列成两个品种,相比药典更科学。该《规范》制订了外观性状、显微特征和薄层色谱鉴别;描述了“龙头凤尾”的外观特征;并将干燥品分为石斛药材(直条)和螺旋品(枫斗)。

铁皮石斛加工成铁皮枫斗,作为继承传统中药工艺是必要的,但是中药生产是否一定采用铁皮枫斗,值得商榷。陈立钻等^[22]对铁皮枫斗与机械压扁直条中多糖的含量进行了对比研究。取相同的铁皮石斛为原料,分别按照传统制作(铁皮枫斗)和机械切制压扁制作(直条),采用分光法测定两者的多糖含量,结果无显著差异。表明机械法加工的直条经压扁后有效成分不变,可替代传统工艺。吕献康等^[23]采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)直接测定法对11种石斛的主要成分进行了测定,获得了多种石斛的特征数据,此法具有简便、快速、准确的特点。

5 基因多态性和指纹图谱的研究

基因多态性研究是近年的热门课题。张婷等^[24]扩增并测定了9种石斛属植物线粒体中NADH脱氢酶亚基1编码基因(*nad1*)内含子2(*intron 2*)的全长序列,认为线粒体*nad1* *intron 2*序列可以作为一种新的分子标记用于石斛属植物的鉴定。但操作手续繁杂,且大多数石斛植株通过外观就能鉴别分类,因此至今尚未应用。

随机扩增多态DNA技术(RAPD)可检测物种的遗传多样性,探索物种的亲缘关系、进化趋势和种属特异性。刘石泉等^[25]采用RAPD技术对铁皮石斛无性繁殖的遗传稳定性和不同生长阶段遗传稳定性进行研究,发现七代无性繁殖的组培苗,其代与代之间遗传距离很小,但代数相差越大其遗传差距就越大,在1~3代未发现变异,从第4代开始,有部分引物RAPD带型发生微小变化。铁皮石斛组培过程中存在一定的变异,但变异甚微,因此建立铁皮石斛稳定的无性快繁体系是可行的。张铭等^[29]用RAPD技术对石斛属内26个种和金石斛属的1个种进行了基因组DNA多态性分析,并构建聚类树状图,根据筛选到的DNA片段序列,将Sangon18引物从3'端延长至20 bp,得到所要的特异性引物。此法设计成的特异性引物能方便快捷地鉴别出铁皮石斛,为药材的分子鉴定提供了新思路。

内部简单重复序列分子标记技术(ISSR)已广泛用于植物品种鉴定、基因定位、遗传多样性等研究。针对铁皮石斛ISSR的反应特点,沈洁等^[26]通过对铁皮石斛居群差异的研究,建立稳定可靠的ISSR分子指纹标记反应体系,能较好地应用于铁皮石斛的居群鉴别及居群分子生态研究。而且通过rDNA ITS区碱基序列的比较分析,进一步证明铁皮石斛F

型居群与H型居群间具有显著的差异性。采用该方法,通过对随机引物的筛选,有效鉴别了不同产地来源的8个野生铁皮石斛。同时运用PCR技术建立了21种枫斗类石斛rDNA ITS区全序列数据库,通过对待检种rDNA ITS区进行序列测定,成功完成了数据库中枫斗类石斛待检种的鉴别。

方花等^[27]以Trizol(提取RNA的试剂)一步法从4年生的铁皮石斛叶片中提取总RNA,分离纯化mRNA,用LD-PCR法反转录合成双链cDNA,构建铁皮石斛cDNA文库,cDNA文库的构建为铁皮石斛药用成分相关功能基因的研究奠定了基础。朱书文等^[28]对铁皮石斛干品基因组DNA的提取方法进行了研究,用常规的提取新鲜石斛DNA方法均不能很好地提取干品中的DNA,而采用干茎皮,通过改良的CTAB法可以较好的提取基因组DNA。

另外,在石斛DNA分子标记方面目前有三项专利。李同祥等申请了“五种石斛种质鉴定特异性gDNA探针”的发明专利,以铁皮石斛等五种石斛为材料,筛选获得特异性探针,用这些特异性探针制备成微阵列对不同石斛进行鉴别,能快速准确鉴别不同品种的石斛。王峥涛等人发明了“中国石斛属植物及其药材的DNA分子鉴定方法”,根据中国石斛属植物的rDNA ITS区全序列数据库,设计出鉴别铁皮石斛的高特异性引物,能成功进行铁皮石斛原植物及药材的高特异性PCR鉴别。邵鹏柱等发明了“石斛的DNA序列及利用该序列鉴定其品种或辨别其真伪的方法”,发明公开了16种石斛和一种石仙桃的ITS2及5.8S和28S核糖体部分DNA序列,可用于鉴定石斛品种。

但是,无论是采用RAPD法,还是ISSR、FALP等技术来分析铁皮石斛DNA多态性,均需提取高质量的石斛DNA模板,而DNA往往在干燥、加工时降解,很难提取。因此,目前大多数学者均用新鲜铁皮石斛为对象进行研究。采用基因指纹图谱对于新鲜铁皮石斛的鉴定是有效的,而从铁皮石斛干燥品(铁皮枫斗)中提取DNA往往不准确,而产生误差;对于铁皮石斛的制成品(药品或保健食品),用DNA分子标记的方法则根本不适用。

有关铁皮石斛化学色谱指纹图谱研究方法,尚未见文献报道。其它石斛色谱指纹图谱已经有学者进行了研究。发现不同品种石斛化学色谱指纹图谱在化学物质类别和成分的比例上具有较大差别。因此认为,可通过制订铁皮石斛的化学色谱指纹图谱来区别于其它石斛,但有待深入研究。

综上所述,铁皮石斛人工繁育、大规模栽培、化学成分研究及鉴别方法学研究均取得了突破性进展。但在铁皮石斛(铁皮枫斗)类药品、保健食品等成品的鉴别方面,尚无简便、快速、专一性强的检验方法,因此亟待研究和探索。目前市场上各种铁皮石斛类保健食品的真伪难辨,是当前药品检验、药品监督部门急需解决的问题。

参考文献

- [1] LI Y, ZHAO Y P, CHEN P Y, *et al.* The Scavenging Oxygen Free-radical Effects of Water Extract from Five Kinds of *Dendrobium*

- candidum[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35(11): 1 240-1 242.
- [2] ZHANG M, ZHONG G Y, DING J C. Investigation on Endangered Medicinal Material Natural Resources [J]. Endangered Mater Sci Lett(濒危物种科学通讯), 2004, 4: 126-128.
- [3] BAO X S, SHUN Q S, CHEN L Z, *et al*. The Chinese Medicinal Plantas of Dendrobium [M]. Shanghai: Fudan University publishing house, 2001: 56.
- [4] TANG G X, HUANG F D, ZHOU W J. Studies on the Seed Embryo Gemination and Propagation of Dendrobium candidum in vitro[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(20): 1 583-1 586.
- [5] HOU P Y, GUO S X. Studies on Transplanting Suspension-cultured Protocols of Dendrobium candidum onto Solid Culture Medium[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(10): 729-732.
- [6] LIU H, ZHANG Z G. Studies on reducing costs of clonal propagation in vitro of dendrobium candidum[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 1998, 15(3): 15-17.
- [7] ZHAN Z G. Cluster Shoots Induction from Root-tip Segments of Dendrobium Officinale Kimura[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(6): 928-931.
- [8] DEMMING-ADAMS B, ADAMS III W W. Xanthophyll Cycle and Light Stress in Nature: Uniform Response to Excess Direct Sunlight among Higher Plant Species[J]. Planta Med, 1996, 198: 460-462.
- [9] FU K C, HONG D Q, ZHANG S Y, *et al*. Investigation on Intensificational Higher Productive Agricultural Technology for Dendrobium candidum[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2003, 34(2): 177-179.
- [10] CAI Y P, LI L, LI H S, *et al*. Leaf Photosynthetic Characteristics and Its Response for Light Intensity of Three Species of Dendrobium SW. in Huoshan County[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(4): 586-590.
- [11] FAN J A, WANG J S, ZHANG Y, *et al*. A Comparison of Tissue Formation and The Content of Polysaccharide between Wild and Cultured Dendrobium candidum[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(21): 1 648-1 650.
- [12] WANG S L, ZHENG G Z. Studies on Dendrobium candidum[J]. Acta Bot Yunnanica(云南植物研究), 1988, 10(4): 389-391.
- [13] HUANG M Q, CAI T Y. Extraction, Separation and Analysis of Polysaccharide in Dendrobium candidum[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1994, 25(3): 128-129.
- [14] HUANG M Q, RUAN J Y. Analysis of Single Sugar Constituents in Water-soluble Polysaccharide Extracted from Six Kinds of Dendrobium Herbs[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1997, 22(2): 74, 115.
- [15] HUA Y F. Studies on Polysaccharids in Dendrobium Lindl [D]. Zhejiang University doctor's thesis, 2005.
- [16] YAMAKI M. The stilbenoids from dendrobium plicatile[J]. Phytochemistry, 1996, 43(1): 207-209.
- [17] MA G X, XU G J. Studies on Chemical Constituents of Dendrobium Chrysotoxum Lindl. [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1994, 29(10): 763-766.
- [18] CHEN L Z, YANG B X, SUN J J. One Extraction Method for Erianin from Dendrobium Chrysotoxum Lindl: China, ZL03115752.1[P]. 2005-09-14.
- [19] DING Y P, YANG D Q, WU Q S, *et al*. Content and Distribution of Total Alkaloids in Three Species of Dendrobium in Huoshan County of Anhui Province[J]. Anhui Agri Univ Acta(安徽农业大学学报), 1994, 21(4): 503-506.
- [20] HUANG M Q, RUAN J Y. Analysis the Constituents of Amino Acids in Dendrobium candidum[J]. J Chin Med Mater (中药材), 1997, 20(1): 32-33.
- [21] WENG D. FAAS Determination of Trace Elements in Dendrobium candidum Using Suspension Sampling with Ultrasonic Agitation [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2003, 38(9): 704-706.
- [22] CHEN L Z, NI Y X, SUN J J, *et al*. Comparison the Content of Polysaccharides in Dendrobium candidum Decocted with Traditional and Mechanical Processing[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2005, 16(4): 284-286.
- [23] LV X K, CHENG C G, YANG G P, *et al*. Application of FTIR Spectroscopy to the Analysis of Eleven Kinds of Dendrobium [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(10): 738-740.
- [24] ZHANG T, WANG Z T, XU L S, *et al*. Application of Mitochondrial nad1-intron 2 Sequences to Molecular Identification of Some Species of Dendrobium SW. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(7): 1 059-1 062.
- [25] LIU S Q, LI X J, YU Q B, *et al*. Analysis on Genetic Stability for Different Development Stages of Dendrobium Officinale Kimura et Migo by RAPD[J]. Shanghai Normal Univ(Natural sci) (上海师范大学学报·自然科学版), 2005, 34(2): 72-76.
- [26] SHEN J, DING X Y, DING G, *et al*. Studies on Population Difference of Dendrobium Officinale II Establishment and Optimization of the Method of ISSR Fingerprinting Marker[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(4): 291-294.
- [27] FANG H, WEI X Y. Construction and Analysis of a cDNA Expression Library of Dendrobium candidum[J]. Life Sci Res(生命科学研究), 2005, 9(3): 263-266.
- [28] ZHU S W, LIU W. Genomic DNA Extraction and RAPD Analysis from Aired-dried Stem of Dendrobium candidum[J]. Acta Laser Biol Sin(激光生物学报), 2005, 14(3): 224-227.
- [29] ZHANG M, HUANG H R, LIAO S M, *et al*. Cluster Analysis of Dendrobium by RAPD and Design of Specific Primer for Dendrobium candidum[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-447.

收稿日期: 2007-09-28