

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.009

李猛, 王平, 孙吉康 等. 蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 广西植物 2013, 33(2): 185 - 190

Li M, Wang P, Sun JK *et al.* Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system on *Zanthoxylum dissitum* [J]. *Guihaia* 2013, 33(2): 185 - 190

蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化

李 猛, 王 平*, 孙吉康, 孙小青, 程 鹏

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 长沙 410004)

摘 要: 通过单因素试验及正交设计方法对影响蚬壳花椒 ISSR-PCR 扩增的主要因素(模板 DNA、 Mg^{2+} 的浓度、引物、dNTPs、TaqDNA 聚合酶的用量以及退火温度) 进行优化, 以建立蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应的最佳体系。结果表明: 最佳反应体系(20 μ L) 为模板 DNA 60 ng、 $MgCl_2$ 2.5 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、引物 0.6 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 2.4 U。在此基础上, 从 100 条引物中筛选出 18 条扩增稳定、多态性好的 ISSR 引物并经过 10 份蚬壳花椒种质检验, 证明该体系具有扩增条带清晰、稳定、重复性好等优点。该反应体系的建立为蚬壳花椒种质资源分类、遗传多样性分析提供了更客观可靠的方法。

关键词: 蚬壳花椒; 正交优化; ISSR-PCR

中图分类号: Q949 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0185-06

Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system on *Zanthoxylum dissitum*

LI Meng, WANG Ping*, SUN Ji-Kang, SUN Xiao-Qing, CHENG Peng

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: In order to establish the optimal ISSR-PCR reaction system of *Zanthoxylum dissitum*, several factors that mostly affect the amplification of ISSR-PCR reaction of *Z. dissitum*, including DNA template, Mg^{2+} concentration, primers, dNTPs, TaqDNA polymerase dosage and annealing temperature, were investigated and optimized by single-factor test and orthogonal-design method in the experiment. The results indicated the most stable and suitable reaction system had been established when the amount of DNA template was 60 ng, the dosage of Taq DNA polymerase was 2.4 U and the concentration of $MgCl_2$, dNTPs and primers was 2.5 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.6 μ mol/L respectively. Further more, 18 ISSR primers that possessed the characteristics of stable amplification and rich polymorphism were screened from 100 ISSR primers, and they were examined by the germplasm test of 10 *Z. dissitum* parts. The results of the examination proved that this ISSR reaction system had the advantages of clearness, stability and good repeatability. In conclusion, this established ISSR-PCR reaction system provided an available and reliable method for genetic diversity analysis and germplasm classification of *Z. dissitum*.

Key words: *Zanthoxylum dissitum*; orthogonal design; ISSR-PCR

蚬壳花椒(*Zanthoxylum dissitum*) ,中药名为单 学院植物研究所,1979) ,属芸香科花椒属常绿蔓生
面针,又名山枇杷、大叶花椒、蚌壳花椒等(中国科 木质藤本灌木。其根、茎及叶均可入药,临床上主治

* 收稿日期: 2012-11-19 修回日期: 2012-12-28

基金项目: 高等学科博士学科点专项科研基金(200943921110002) ; 国家林业公益性行业科研专项(201204606)

作者简介: 李猛(1986-) ,男,河南汝南县人,在读硕士研究生,生物化学与分子生物学专业, (E-mail) limong7513@163.com。

通讯作者: 王平 教授,博士生导师,主要从事应用生物技术方面的教学与研究工作, (E-mail) csfuwp@163.com。

牙痛、腰痛、妇女月经过多,产后月经不调等症状(全国中草药汇编编写组,1975)。零星分布于我国西南、广东、广西、湖南、湖北、贵州、四川、陕西等地(孙小文,1996)。近年来,相关中成药生产规模日趋扩大,而蚬壳花椒的自然繁殖率低,生长也较缓慢,致使该自然资源日趋贫乏,并逐渐威胁着相关药厂的正常生产。寻求适宜的繁殖途径,迅速扩大蚬壳花椒资源供给已势在必行。目前,只是从分离、鉴定方面对蚬壳花椒有效成分及种子离体胚繁殖方面做了一定研究,分子生物学方面研究却涉及很少。通过对种群遗传结构的分析探讨种间和种内谱系地理结构形成的机制和系统发育关系,并结合种群的地理分布来发现和验证其相关地理时间和环境变化,从而发现最优品系,从根本上解决其繁殖率低的问题(王平等,2008;马英姿等,2009a,b)。

ISSR(Inter-simple sequence repeats)标记检测是由 Zietkiewicz E 等建立的一种基于聚合酶链式反应(PCR)技术的分子标记(Zietkiewicz *et al.*,1994)。本文利用正交实验设计对影响蚬壳花椒 ISSR-PCR 扩增的重要因素进行优化,以建立蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应的最佳体系。旨在为 ISSR 技术进一步应用于蚬壳花椒种群遗传变异分析、辅助育种、系统进化等研究奠定技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

材料于2012年5月初采集于湖南省张家界市青坪乡,将采回的蚬壳花椒新鲜叶片置于-70℃冰箱中保存备用。参照加拿大哥伦比亚 UBC 公司2006年公布的 ISSR 引物序列,由北京鼎国生物技术有限公司合成。经初步筛选出的888号引物,即 BDB(CA)₇ 作为此次反应体系优化实验的固定引物。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取与检测 采用改良的 CTAB 法(恭维,2007),提取蚬壳花椒叶片基因组 DNA。用 Eppendorf 公司的 Biophotometer 核酸蛋白分析仪检测 DNA 含量和纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 DNA 质量,用 G-BOX 紫外凝胶成像系统观察 DNA 是否污染并拍照记录。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系正交实验设计 采用 L₁₆(4⁵) 正交实验设计,对模板 DNA、Mg²⁺、dNTP、引物和 Taq 酶进行筛选(表1)。包括 2.5 μL 10 × PCR

Buffer,引物用 BDB(CA)₇,总反应体系为 20 μL。PCR 扩增程序参考汉素真等(2011):94℃预变性 3 min;94℃变性 50 s,58℃退火 50 s,72℃延伸 90 s,进行 35 个循环;循环结束后,72℃延伸 8 min,4℃保存。扩增结束后反应在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶中含有 0.05% 溴化乙锭,电极缓冲为 1 × TAE,电压为 5 V/cm,电泳结束后在凝胶成像分析仪上观测分析并照相。

表 1 ISSR-PCR 正交实验设计 L₁₆(4⁵)

Table 1 Orthogonal design for ISSR-PCR L₁₆(4⁵)

处理组合 Treatment combination	因素 Factor				
	DNA (ng)	Mg ²⁺ (μmol ·L ⁻¹)	dNTP (mmol ·L ⁻¹)	引物 Primer (μmol ·L ⁻¹)	Taq DNA 聚合酶(U)
1	30.00	1.00	0.10	0.40	1.20
2	30.00	1.50	0.15	0.50	1.60
3	30.00	2.00	0.20	0.60	2.00
4	30.00	2.50	0.25	0.70	2.40
5	40.00	1.00	0.15	0.60	2.40
6	40.00	1.50	0.10	0.70	2.00
7	40.00	2.00	0.25	0.40	1.60
8	40.00	2.50	0.20	0.50	1.20
9	50.00	1.00	0.20	0.70	1.60
10	50.00	1.50	0.25	0.60	1.20
11	50.00	2.00	0.10	0.50	2.40
12	50.00	2.50	0.15	0.40	2.00
13	60.00	1.00	0.25	0.50	2.00
14	60.00	1.50	0.20	0.40	2.40
15	60.00	2.00	0.15	0.70	1.20
16	60.00	2.50	0.10	0.60	1.60

1.2.3 ISSR-PCR 扩增体系的单因素试验设计 依据正交实验结果,选择扩增效果较好的反应体系,在此基础上进行单因素实验,进一步优化影响扩增效果的因素。其中 DNA 模板设置 20、30、40、50、60、70 ng 6 个梯度, Mg²⁺ 浓度设置为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 μmol/L 6 个梯度, dNTP 浓度设置 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L 6 个梯度,引物浓度设置 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μmol/L 6 个梯度, Taq DNA 聚合酶用量设置 1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 U 6 个梯度,以上均为 2 次重复。每个最佳条件确定后,作为后续研究的一个条件。

1.2.4 ISSR-PCR 扩增体系的正交试验设计 根据正交实验的结果,筛选出最佳反应体系,对蚬壳花椒反应程序进行优化,以最佳反应程序对退火温度进行梯度实验。根据所选引物序列计算理论退火温度 T_m,设定退火温度为 53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64℃ 12 个梯度范围,确定最佳退火温度。

1.2.5 最佳反应体系验证 随机选用引物 UBC888, 采用最优体系对 10 份不同的蚬壳花椒种质 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增 验证该体系的稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度与浓度

将提取的蚬壳花椒基因组 DNA 稀释 100 倍, 在 Unico™ UV-2102PC 型紫外分光光度计上检测 260 nm 和 280 nm 的吸光值, 计算所提取 DNA 的纯度和浓度。当 OD_{260}/OD_{280} 比值介于 1.6 ~ 2.0 之间时, 表明提取的 DNA 样品较纯, 可以贮存备用; 若 $OD_{260}/OD_{280} > 2.0$ 说明有酚或者蛋白质存在; 若 $OD_{260}/OD_{280} < 1.6$, 说明有 RNA 存在 (张维铭, 2003)。表 2 结果显示, 所提取 DNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值在 1.6 和 2.0 之间, 浓度和纯度都符合 ISSR 标记技术对 DNA 质量的要求。

表 2 DNA 的紫外检测结果

Table 2 The ultraviolet absorption test of DNA

样品来源 Sample source	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/OD_{280nm}	DNA 浓度 DNA concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
张家界市清平乡	0.107	0.059	1.790	260.000

2.2 PCR 正交设计直观分析

根据 $L_{16}(4^5)$ 正交实验 PCR 电泳结果 (图 1), 参照何正文等 (1998) 的方法, 对其从高到低依次打分。条带数量丰富、清晰度高记为 16 分, 与此相反最差则记为 1 分。1-16 组合分数依次为: 6、8、10、16、10、4、13、11、2、8、12、11、1、1、10、6。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、复带明显为原则, 同时考虑实验成本, $L_{16}(4^5)$ 第 4 组为蚬壳花椒 ISSR-PCR 最佳反应体系。对 DNA 模板、 Mg^{2+} 、dNTP、引物和 Taq 酶 5 因素不同水平间平均值的极差进行统计分析, 其中分别为 5.5、6.5、4.0、0.75、3.75, 说明对 PCR 反应的影响从大到小依次为 Mg^{2+} 、DNA 模板、dNTP、Taq 酶和引物。

2.3 单因子实验结果分析

2.3.1 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

模板 DNA 的浓度对 PCR 结果有很大影响。结果如图 2 所示, 在 20 μL 反应体系内加入 20 ~ 70 ng 模板 DNA 时, 均能扩增出多态性条带。当浓度为 20 ~ 60 ng 时, 随着 DNA 浓度增加谱带数目越多且更

清晰, 当浓度为 70 ng 时, 谱带清晰度稍微下降, 故选择 60 ng 为最佳模板浓度。

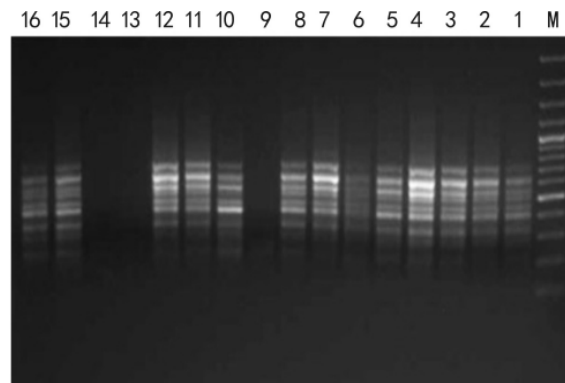


图 1 蚬壳花椒正交实验结果

Fig. 1 Electrophoregram of ISSR-PCR products of *P. vulgaris*

1-16 处理编号同表 1, M-Marker 标准分子量 DL3000。下同。
The Treatments of No. 1-16 are same as the one showed in Table 1.
The standard molecular weight of M-Marker is DL3000. The same below.

2.3.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶活性所必需的, 对 PCR 扩增的效率、特异性、退火温度都有影响 (王关林等, 1998)。 Mg^{2+} 可以和 dNTP、DNA 和引物形成复合物, 从而降低 Mg^{2+} 的有效浓度, 影响 PCR 的结果。结果如图 3 所示, 当 Mg^{2+} 浓度为 1.00 ~ 2.50 mmol/L 时, 随着 DNA 浓度增加谱带数目越多且更清晰; 当 Mg^{2+} 浓度继续增加时则有拖带现象。故选择 2.50 mmol/L 为最佳 Mg^{2+} 浓度。

2.3.3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

dNTPs 是 TaqDNA 聚合酶的底物, 它的浓度也会直接影响到 PCR 反应的结果, 如果 dNTPs 浓度过低会降低 PCR 产物的产量, 过高会造成浪费, 且会降低 Mg^{2+} 的有效浓度 (王关林等, 1998; 周凌瑜等, 2008)。结果如图 4 所示, 随着 dNTP 浓度增加谱带数目越多且更清晰, 当浓度为 0.15 mmol/L 最清晰, 与 0.20 ~ 0.30 mmol/L 无明显差异, 故选择 0.15 mmol/L 为最佳 dNTP 浓度。

2.3.4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

引物是 PCR 特异性反应的关键, PCR 产物的特异性取决于模板 DNA 与引物的互补程度。但引物与模板 DNA 的结合又受到其他因素的影响, 如 Mg^{2+} 浓度。结果如图 5 所示, 当引物浓度在 0.30 ~ 0.60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 扩增条带逐渐增多且清晰, 当浓度为 0.60

μmol/L 时 扩增条带最清晰; 当引物浓度为 0.70 ~ 0.80 μmol/L 时 扩增条带则出现拖尾现象。故选择 0.60 μmol/L 为引物最佳浓度。

2.3.5 TaqDNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 在酶促反应中 酶量的多少起了非常重要的作用 太少会影响底物的结合 减少产物 酶量太多又会造成酶的浪费。ISSR-PCR 反应也是一个酶促反应 对 TaqDNA 聚合酶的优化就显得尤为重要。结果如图 6 所示 随着 TaqDNA 聚合酶用量的增加 扩增条带越谱带越多且清晰; 当 TaqDNA 聚合酶浓度为 2.4 U 时 谱带最清晰 而随着用量的增加清晰度没有明显变化 故选择 2.4 U 为 Taq DNA 聚合酶最佳用量。

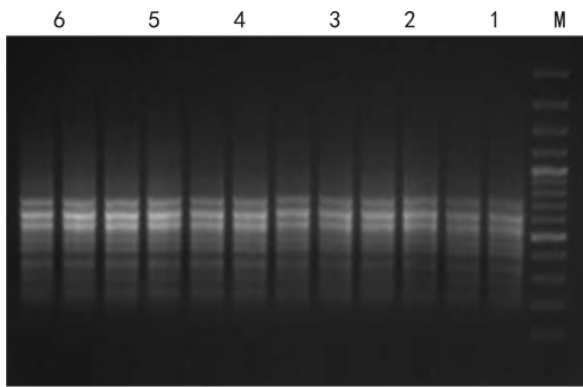


图 2 不同模板 DNA 浓度 (1-6: 20、30、40、50、60、70 ng)
Fig. 2 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentrations of template DNA

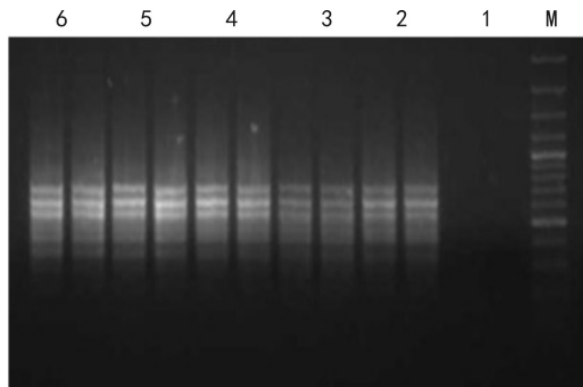


图 3 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 扩增的影响
(1-6: 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 μmol/L)
Fig. 3 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentrations of Mg²⁺

2.3 ISSR-PCR 反应程序优化

退火温度为引物和模板结合时的温度常数, 它

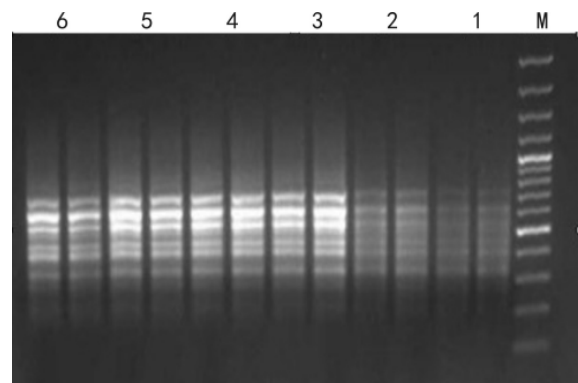


图 4 dNTP 浓度对扩增的影响
(1-6: 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L)
Fig. 4 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentrations of dNTP

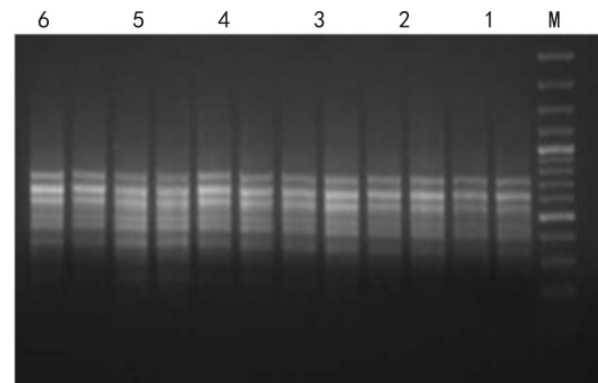


图 5 引物浓度对扩增的影响
(1-6: 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μmol/L)
Fig. 5 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentrations of primer

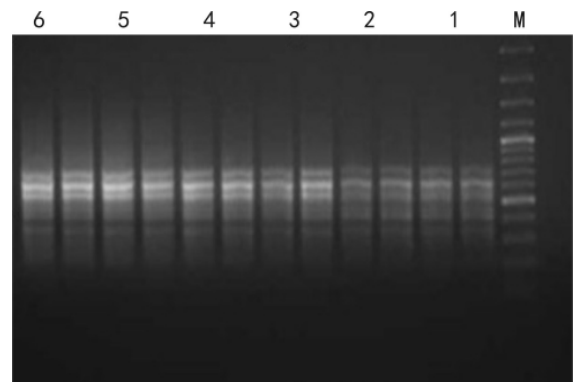


图 6 Taq 酶用量对 ISSR 扩增的影响
(1-6: 1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 U)
Fig. 6 Electrophoregram of ISSR-PCR with different dosages of Taq DNA polymerases

是影响 PCR 特异性的较重要的因素。以本实验所使用引物 UBC888 为例,以其 T_m (58 °C) 值为中心,设置 6 个退火温度梯度(53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64 °C) 进行 PCR 扩增。由图 7 得出,引物 UBC854 在 58 °C 时,扩增出的条带多而亮,而低于或者高于 58 °C,扩增的条带相对较少且亮度浅。因此,退火温度的高低也直接影响着扩增反应的结果,蚬壳花椒 ISSR 反应体系中引物 UBC888 最适宜的退火温度为 58 °C。

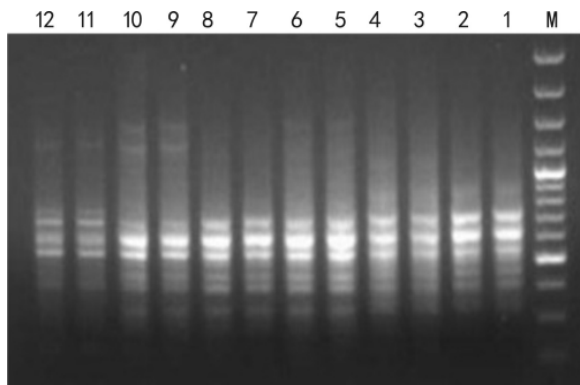


图 7 引物梯度退火电泳图
(1-12: 53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64 °C)
Fig. 7 Electrophoregram of annealing temperature of primer

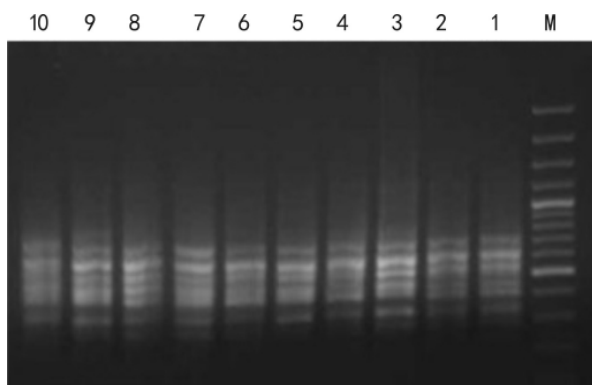


图 8 优化的 ISSR-PCR 反应体系
对 10 份蚬壳花椒种质扩增结果
Fig. 8 Electrophoregram of 10 *P. vulgaris* DNA
with optimized ISSR-PCR reaction system

2.4 ISSR-PCR 反应体系应用

应用建立的蚬壳花椒 ISSR-PCR 的最佳体系,从 100 条 ISSR 引物中筛选出 18 条扩增稳定、多态性高的引物。以 UBC888 引物为例,运用最优组合对 10 份种质材料进行扩增,发现得到的条带数目多、清晰、重复性好,能区分 10 份蚬壳花椒种质,结

果如图 8 所示,这表明建立的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,适合于蚬壳花椒 ISSR-PCR 的反应。

3 结论与讨论

近年来,ISSR 分子标记技术由于其操作简便,具有较高的多态性与重现性,被广泛应用于遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制等众多领域(李嵘等,2008)。基于 PCR 技术的 ISSR 分子标记的研究,反应体系的建立是第一步,这关系到后续的试验能否顺利进行并获得理想的结果。影响 ISSR-PCR 扩增的因素很多,组成反应体系和程序中的每个因子都可以影响到扩增的效果。因此,要获得较稳定、清晰、可重复的条带,需要对 ISSR-PCR 反应体系的各种影响因子如 Taq 酶、dNTPs、引物浓度、模板浓度及退火温度等进行优化。

目前,ISSR-PCR 反应体系的优化方法多采用正交或单因素设计,正交设计可以更快更有效地分析不同因素的互相作用,但处理水平的设置相对有限,单因素设计可以较系统和精细地研究各主要因子的影响,但无法探讨因素间互作效应。本实验首先采用正交设计后结合单因子设计进一步优化体系,弥补上述实验不足,可以简单快速地建立蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应体系,得到稳定且多态性丰富的扩增谱带。

在正交实验中,以 Mg^{2+} 影响最为显著,这与彭继庆等(2011)研究结果一致。 Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶活性所必需的,而且 Mg^{2+} 可以和 dNTP、DNA 和引物形成复合物,从而降低 Mg^{2+} 的有效浓度,影响 PCR 的结果。浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性,浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使扩增失败。从本实验的结果来看,反应体系中 Mg^{2+} 浓度在 2.00 ~ 3.00 mmol/L 能扩增出较好的条带。

本研究确定的蚬壳花椒 ISSR-PCR 反应的最佳体系(20 μ L) 为模板 DNA 60 ng、 $MgCl_2$ 2.5 mmol/L、引物 0.6 μ mol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.4 U。扩增反应程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 50 s, 58 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min; 4 °C 保存。该反应体系的建立为蚬壳花椒种质资源分类、遗传多样性分析以及选取最优性状提供了更客观可靠的方法,同时为其它物种的 ISSR-PCR 分子标记研究提供借鉴与参考。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社: 421
- 中国科学院植物研究所. 1979. 中国高等植物科属检索表[M]. 北京: 科学出版社: 47-52
- 全国中草药汇编编写组. 1975. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社: 345-349
- 张维铭. 2003. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社: 26-28
- 恭维. 2007. 孪生植物银杏的分子亲缘地理学研究[M]. 杭州: 浙江大学: 342
- Han SZ(汉素真), Wang YK(王有科), Li J(李捷) et al. 2011. ISSR genetic diversity analysis of *Zanthoxylum bungeanum* in Gansu Province(甘肃省主产花椒品种 ISSR 遗传多样性分析)[J]. *J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报)* 46(6): 46-51
- He ZW(何正文), Liu YS(刘运生), Chen L(陈立) et al. 1998. Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization(正交设计直观分析法优化 PCR 条件)[J]. *Bull Hunan Med Univ(湖南医科大学学报)* 23(4): 403-404
- Li R(李嵘), Wang Z(王喆). 2008. Establishment and orthogonal optimization of ISSR-PCR amplification system in *Salvia miltiorrhiza*(丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化)[J]. *Guihaia(广西植物)* 28(5): 599-603
- Ma YZ(马英姿), Wang P(王平), Wang XM(王晓明) et al. 2009a. *In vitro* culture and plant regeneration system of *Zanthoxylum Dissitum*(药用植物蚬壳花椒的离体培养及再生体系的建立)[J]. *J Hunan Norm Univ: Nat Sci Edit(湖南师范大学学报·自然科学版)* 32(1): 106-111
- Ma YZ(马英姿), Wang P(王平), Yang BH(杨波华) et al. 2009b. Extracting technology of alkaloids from the stem of *Zanthoxylum dissitum*(蚬壳花椒总生物碱的提取工艺)[J]. *J Centr S Univ For & Technol(中南林业科技大学学报)* 29(2): 68-72
- Peng JQ(彭继庆), Cao FX(曹福祥), Xu RX(许若娴). 2011. Genetic diversity of the *Mytilaria laosensis* in Guangxi detected by ISSR markers(广西壳菜果遗传多样性的 ISSR 研究)[J]. *J Hunan Norm Univ: Nat Sci Edit(湖南师范大学学报·自然科学版)* 34(6): 222-225
- Sun XW(孙小文). 1996. Research progress of medicinal plants of *Zanthoxylum*(花椒属药用植物研究进展)[J]. *Acta Pharm Sin(药学报)* 31(3): 231-240
- Wang P(王平), Ma YZ(马英姿), Wang XM(王晓明) et al. 2008. *In vitro* embryonic culture of *Zanthoxylum dissitum*(药用植物单面针离体胚培养的研究)[J]. *J Centr S Univ For & Technol(中南林业科技大学学报)* 28(1): 130-133
- Wang JB(王建波). 2002. ISSR markers and their applications in plant genetics(ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用)[J]. *Hereditas(遗传)* 24(5): 613-616
- Zietkiwicz E, Rafalshi A, Jabuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)——anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics* 20: 176-183
-
- (上接第 202 页 Continue from page 202)
- 社: 67-146
- 国家药典委员会. 2010. 中华人民共和国药典(2010 版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社: 85-87
- 周荣汉,段金殿. 2005. 植物化学分类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社: 1151-1154
- Bai Y(白音), Bao YH(包英华), Wang WQ(王文全). 2011. Characters and its authentication value of stem epidermal cell of medicinal plant in *Dendrobium* Sw. and their adulterants(石斛属植物及其混淆品茎表皮细胞特征及其鉴别价值)[J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)* 43(3): 593-597
- Huang XQ(黄雪群), Li XE(李续娥), Huang CZ(黄彩珠). 2011. Effect study of dendrobium in traditional Chinese medicine on stomach-heat syndrome in rats(中药石斛对大鼠胃热证的作用研究)[J]. *Chin J Rat Drug Use(临床合理用药杂志)* 4(5B): 4-6
- Li XY(李向阳), Gong QH(龚其海), Wu Q(吴芹) et al. 2010. Effects of *Dendrobium nobile* polyose on hyperlipemia and liver fatty degeneration in rats(金钗石斛多糖对大鼠高脂血症和肝脏脂肪变性的影响)[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)* 45(15): 1142-1144
- Long Y(龙艳), Wei XY(魏小勇), Zhan YJ(詹宇坚) et al. 2008. *In-vitro* experimental study on the extract of *Dendrobium nobile* in counteracting cataract in rats(金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究)[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med(广州中医药大学学报)* 25(4): 345-349
- Lü HF(吕洪飞), Luo WJ(罗文姬), Sheng XY(盛仙永) et al. 2006. Histochemical localization of alkaloid in *Dendrobium* and *Pholidota chinensis*(二种石斛属植物和小叶石仙桃生物碱的组织化学定位)[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)* 41(11): 824-867
- Ma YZ(马英姿), Hu ZH(胡忠红), Yang BH(杨波华) et al. 2009. Study on anatomical structure of vegetative organs and alkaloids distribution in *Zanthoxylum dissitum*(蚬壳花椒营养器官解剖结构及其生物碱分布)[J]. *J Hunan Agric Univ(湖南农业大学学报)* 35(3): 242-245
- Peng SW(彭斯文), Zhang MS(张明生), Wang YF(王玉芳). 2009. The preliminary study on histochemistry localization of alkaloid in *Cremastra appendiculata*(杜娟兰生物碱组织化学定位初步研究)[J]. *World Sci Tech-Mod Trad Chin Med Mat Med(世界科学技术-中医药现代化)* 11(5): 728-730
- Wu QS(吴庆生), Xu L(徐玲). 1995. 金钗石斛茎的不同部位中有效成分分析及其分布规律研究[J]. *Chin J Chin Mat Med(中国中药杂志)* 20(3): 148-149