

地黄属植物的 DNA 条形码研究

程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 原超, 李雪童, 刘占林*

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要: 地黄属 (*Rehmannia*) 为玄参科 (Scrophulariaceae) 药用植物, 广泛分布于中国中东部及北部地区。由于地黄属植物经历了快速成种, 导致其属内物种间形态性状差异较小, 运用传统的形态学分类方法已难以准确地鉴定物种, 近年来迅速发展起来的 DNA 条形码技术为快速、准确地鉴别物种提供了新思路。本研究选用 3 个叶绿体 DNA 非编码区片段 (*trnL-trnF*, *trnM-trnV* 和 *trnS-trnG*) 及核基因 ITS 片段, 运用 PWG-distance 和 Tree-Building 两种方法对地黄属 5 个物种 75 个个体进行了 DNA 条形码分析。结果表明: 单个叶绿体 DNA 片段或核基因 ITS 片段对地黄属物种的鉴别率较低 (0%~20%), 组合的叶绿体 DNA 片段分辨能力虽然高于单个 DNA 片段, 但并不能将地黄属 5 个物种完全区分开; *trnS-trnG* + ITS 片段组合的分辨率可达 100%, 能够将地黄属 5 个物种准确区分, 与所有叶绿体 DNA 片段和核基因 ITS 片段组合 (*trnL-trnF* + *trnM-trnV* + *trnS-trnG* + ITS) 的鉴别率相同, 因此推荐 *trnS-trnG* + ITS 作为地黄属植物的标准条形码。此外, 利用 DNA 条形码鉴别物种时, 可采用叶绿体 DNA 片段和核 DNA 片段组合的方法来提高物种鉴定的成功率。

关键词: DNA 条形码; 地黄属; 叶绿体 DNA; 核基因 ITS 片段; 分辨率

中图分类号: Q949. 777. 8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)01-0025-08

DNA Barcoding of the Genus *Rehmannia* (Scrophulariaceae)

CHENG Fang-Ting, LI Zhong-Hu, LIU Chun-Yan, YUAN Chao, LI Xue-Tong, LIU Zhan-Lin*

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education,
College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: *Rehmannia*, a genus of Scrophulariaceae, is widely distributed in central, eastern and northern China. However, it is relatively difficult to distinguish species by traditional morphological methods due to rapid speciation of the genus. Recently developed DNA barcoding provides a new approach to identify species quickly and accurately. In this study, three candidate DNA noncoding regions (*trnL-trnF*, *trnM-trnV* and *trnS-trnG*) from the chloroplast genome and internal transcribed spacer (ITS) region from the nuclear genome were evaluated among 75 individuals of five species of *Rehmannia*, and identification efficiency was assessed using PWG-distance and Tree-Building methods. Results indicated that the five *Rehmannia* species could not be accurately distinguished by single or the combination of chloroplast DNA fragments with low species discrimination rates (0%–20%), but could by the combination of chloroplasts and nuclear DNA regions (*trnS-trnG* + ITS) with 100% discrimination rates. Thus, *trnS-trnG* + ITS can be considered as a potential barcode for species identification in *Rehmannia*. The combination of chloroplasts and nuclear fragments can be widely adopted for the discrimination of plant species when a single DNA barcode fails.

Key words: DNA barcoding; *Rehmannia*; Chloroplast DNA; nrDNA ITS; Discrimination rate

收稿日期: 2014-04-14, 退修日期: 2014-05-15。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (31170311, 31370353)。

作者简介: 程芳婷 (1989–), 女, 硕士研究生, 研究方向为系统与进化植物学 (E-mail: ttcUUR@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: liuzl@nwu.edu.cn)。

地黄属 (*Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey.) 是玄参科 (Scrophulariaceae) 多年生草本植物, 广布于中国中东部及北部地区。《中国植物志》记载地黄属有 6 个种, 包括天目地黄 (*R. chingii* Li.)、裂叶地黄 (*R. piasezkii* Maxim.)、高地黄 (*R. elata* N. E. Brown)、湖北地黄 (*R. henryi* N. E. Brown)、茄叶地黄 (*R. solanifolia* Tsoonget Chin), 还有我国著名的传统中药材地黄 [*R. glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey.]. 但近年来的形态学、化学成分以及分子证据均显示高地黄和裂叶地黄的表型性状相似、组成成分相近且遗传组成也趋于一致, 两者实为同一物种^[1]。长期以来, 不同学者对地黄属植物的研究多偏重于地黄的药性、化学成分及品种间遗传基础和系统发育关系等方面^[1-4]。如闰坤等^[1]和 Albach 等^[4]利用叶绿体 DNA 片段和 nrDNA ITS 序列明确了地黄属 6 个物种的系统发育关系, 并结合植物化学、形态解剖学及细胞学证据对其种间关系进行了研究, 认为该属物种为单系类群。此外, 地黄属植物分布范围广, 且不同地区间的物种在外观形态性状上差异较小, 以致经常造成分类学上的混乱。然而目前对该属植物种间关系的划分却仅局限于传统的形态学分类方法, 如叶片与花粉形态、花色及种子微形态等。就地黄属种子的形态鉴定指标而言, 天目地黄和湖北地黄较一致, 裂叶地黄和高地黄相近, 而地黄在种子长度、宽度上与天目地黄和湖北地黄接近, 在外种皮内侧网纹直径上与裂叶地黄和高地黄接近^[1,5]。另外, 同一地域生长的地黄属植物植株叶形态也有很大差异, 如裂叶地黄的叶片具有裂叶和圆叶两种类型, 且其圆形叶与天目地黄的叶片非常相似, 致使在野外采集时难以区分这两个种, 因此鉴于形态学分类的局限性, 有必要借助 DNA 条形码技术对地黄属物种进行准确区分和鉴定。除地黄作为传统的中药植物外, 地黄属内的其它物种还具有潜在的药用与观赏价值^[6], 故准确鉴别地黄属物种对研究地黄属植物的系统发育关系以及资源的开发利用都具有重要意义。

近年来, DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 的发展为解决地黄属内物种的划分和鉴定提供了新的工具。2003 年 Hebert 等^[7]正式提出将 DNA 条

形码用于分类学研究, 即利用一个或多个 DNA 片段实现对物种快速准确的鉴定。与传统鉴定方法的理论基础不同, DNA 条形码技术是基于物种基因型的差异, 而不是与环境密切相关的表型, 它克服了传统鉴定方法的诸多缺陷, 具有鉴定结果准确、可重复性好、方法通用性强等优点^[8]。在植物中多选择进化速率较快的叶绿体基因片段和核糖体内转录间隔区 (internal transcribed spacers, ITS) 作为鉴别植物物种的 DNA 条形码^[9-11]。2009 年生命条形码联盟植物工作组 (CBOL Plant Working Group) 提出将 *rbcL*+*matK* 片段组合作为陆地植物的核心条形码, 并建议将叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段和核基因 ITS 片段作为补充的 DNA 条形码^[12,13]。2011 年中国植物条形码研究团队 (China Plant BOL Group) 通过对大量数据的综合分析, 提出将 nrDNA ITS/ITS2 纳入到种子植物的核心条形码中^[14]。

为了筛选出更适合地黄属植物的候选或标准条形码, 我们研究了目前推荐使用的 3 个叶绿体 DNA 条形码片段 (*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*)、核基因 ITS 片段以及进化速率较快的 3 个候选叶绿体 DNA 片段 (*trnL-trnF*、*trnM-trnV* 和 *trnS-trnG*), 并评估它们在地黄属植物 5 个物种 75 个个体间的通用性及物种鉴别能力, 尝试筛选出适合该属植物物种鉴定的 DNA 条形码片段或片段组合, 以期为地黄属物种的快速、准确鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取地黄属 (*Rehmannia*) 植物 5 个物种 13 个居群的 75 个个体作为研究材料 (表 1), 每个物种至少 5 个个体。采集 13 个地黄属植物野生居群的幼嫩叶片, 经硅胶快速干燥后带回实验室保存、备用。同时压制地黄属植物物种标本并存放于西北大学生命科学学院。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序

根据植物基因组 DNA 小型提取试剂盒 (Plant Genomic DNA kit) 说明书操作步骤提取样品 (约 20 mg 干燥叶片) 总 DNA。各基因片段的 PCR 扩

表 1 材料来源
Table 1 Origin of *Rehmannia* material

物种 Species	居群 Populations	个体数 Individual No.	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 (m) Altitude
地黄 <i>R. glutinosa</i>	山西大同 Datong, Shanxi (DT)	5	113.0	40.1	1098
	甘肃崇信 Chongxin, Gansu (CC)	5	107.0	35.2	1215
	山西长治 Changzhi, Shanxi (CZ)	5	113.0	36.1	929
	四川隘口 Aikou, Sichuan (AK)	5	107.5	31.5	787
	山东泰安 Taian, Shandong (TA)	5	117.1	36.2	203
茄叶地黄 <i>R. solanifolia</i>	重庆城口 Chengkou, Chongqing (CK)	10	108.1	31.7	950
天目地黄 <i>R. chingii</i>	安徽绩溪 Jixi, Anhui (AH)	5	118.5	30.1	222
	安徽棠溪 Tangxi, Anhui (TX)	5	117.6	30.4	86
	浙江丽水 Lishui, Zhejiang (LS)	5	120.0	28.4	195
湖北地黄 <i>R. henryi</i>	湖北宜昌 Yichang, Hubei (YC)	10	110.6	31.3	299
裂叶地黄 <i>R. piasezkii</i>	陕西后柳 Houliu, Shanxi (HL)	5	108.2	32.9	383
	湖北保康 Baokang, Hubei (BK)	5	111.5	31.9	251
	湖北竹山 Zhushan, Hubei (ZS)	5	110.2	32.1	495

增在 PTC-100PCR 仪上完成，反应体系为 20 μL，包含 20~30 ng 模板 DNA、40 mmol/L Tris-HCL (pH 8.3)、6 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L dNTPs、0.3 μL 的正反扩增引物(表 2)、0.3 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，送往上海生工生物公司利用 ABI3130xl 遗传分析仪进行测序。

1.2.2 数据处理

采用软件 Bioedit 7.0.9.1^[22] 和 MEGA 5.0^[23] 对原始序列进行人工校对，并利用 DnaSP 5.0^[24] 统计每个基因片段的 indels(插入或缺失碱基)和单核苷酸多态性(SNPs)。将 4 个 DNA 片段(*trnL-trnF*、*trnM-trnV*、*trnS-trnG* 及核基因 ITS)单独构建矩阵、3 个叶绿体 DNA 片段两两组合或全部组合来构建矩阵、叶绿体 DNA 片段与核基因 ITS 片段联合构建矩阵，来评估单个基因片段或基因片段组合的 DNA 条形码对地黄属物种的辨别能力。利用软件 MEGA 5.0^[23] 对 4 个 DNA 片段种内、种间的 Kimura-2-parameter 遗传距离进行分析，并构建单个基因片段以及片段组合的邻接树(NJ)；同时利用两种不同的方法，即 PWG(Plant Working Group)距离法^[25] 和构建 NJ 系统聚类树(Tree-Building)法，对地黄属物种的鉴别力予以评估。生命条形码联盟植物工作组推荐使用的 PWG 距离法(单独计算每个物种的遗传距离)认为，只有种

间最小的遗传距离大于种内最大的遗传距离时才表明物种鉴定成功。而利用 Tree-Building 方法时，只有同一个物种的不同个体在构建的 NJ 系统树上形成单系分支才认为物种鉴定成功^[14]。

2 结果与分析

2.1 基因片段序列

由于国际生命条形码联盟(CBOL)植物工作组所建议使用的 3 个叶绿体基因片段 *psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 在地黄属植物 5 个物种中扩增反应及测序结果均不理想，本研究利用 3 个候选叶绿体 DNA 片段(*trnL-trnF*、*trnM-trnV*、*trnS-trnG*)及核基因 ITS 片段对地黄属植物 13 个居群 75 个个体进行了 PCR 扩增及目的电泳谱带的测序(成功率均为 100%)，共获得 225 个叶绿体 DNA 序列、75 个核基因 ITS 序列。对位排列后(表 3)，3 个叶绿体 DNA 片段的序列长度范围为 739~806 bp，其中 *trnL-trnF* 片段的序列长度为 806 bp，*trnM-trnV* 片段 756 bp，*trnS-trnG* 片段 739 bp；ITS 片段 598 bp。4 个 DNA 条形码基因片段中，*trnS-trnG* 的变异位点最多，共 37 个(包括 13 个 SNPs，24 个 indels)，占其序列总长度的 5.01%；其次是 *trnL-trnF*，共 13 个变异位点(9 个 SNPs，4 个 indels)，变异率为 1.61%；再次是 *trnM-trnV*，共 16 个变异位点(12 个 SNPs，4 个 indels)，占其序列总长度的 2.12%；变异位点最少的是核基因

表 2 PCR 扩增引物
Table 2 Primer pairs used for PCR amplification and sequencing for DNA barcoding

基因片段 Gene Amplification region	引物序列 Primers sequence (5'-3')	来源 Reference
<i>trnL-trnF</i>	F: TCCTCCGCTTATTGATATGC R: ATTTGAAGTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> ^[15] Taberlet <i>et al.</i> ^[15]
<i>trnM-trnV</i>	<i>trnM</i> : TACCTACTATTGGATTGAACC <i>trnV</i> : GCTATACGGGCTCGAACC	Cheng <i>et al.</i> ^[16] Cheng <i>et al.</i> ^[16]
<i>trnS-trnG</i>	<i>trnS</i> : AACGGATTAGCAATCCGACGCTTTA <i>trnG</i> : CTTTACCCTAACTATACCCGC	Dong <i>et al.</i> ^[17] Dong <i>et al.</i> ^[17]
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i> : GTTATGCATGAACGTAATGCTC <i>trnH</i> : CGCGCATGGTGGATTACAATC	Sang <i>et al.</i> ^[18] Tate <i>et al.</i> ^[19]
<i>matK</i>	F: ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC R: CGTACAGTACTTTTGTGTTACGAG	Hilu <i>et al.</i> ^[20] Hilu <i>et al.</i> ^[20]
<i>rbcL</i>	F: ATGTCAACCAAAACGGAGAC R: GCAGCTAATTCAGGACTCC	Ivanova <i>et al.</i> ^[21] Ivanova <i>et al.</i> ^[21]
ITS	ITS4: TGTGACGATGCCCCGAGAAGA ITS5: TCGAAACCTGCAAAGCAGACC	Modified from White <i>et al.</i> ^[22] Modified from White <i>et al.</i> ^[22]

表 3 用于条形码分类的 DNA 片段长度、测序成功率和变异位点信息
Table 3 Sequence length, sequencing success rate and variation site of each DNA region

基因片段 Gene region	序列比对长度 Aligned sequence length (bp)	PCR 扩增成功率 PCR amplification success rate (%)	测序成功率 Sequencing success rate (%)	SNPs 位点数 No. of SNPs	插入或缺失碱基数 No. of indels	变异位点 No. and percentage of variable sites
<i>trnL-trnF</i>	806	100	100	9	4	13 (1.61%)
<i>trnM-trnV</i>	756	100	100	12	4	16 (2.12%)
<i>trnS-trnG</i>	739	100	100	13	24	37 (5.01%)
ITS	598	100	100	6	19	25 (4.18%)

ITS 片段, 共 25 个变异位点(6 个 SNPs, 19 个 indels), 变异率为 4.48%。

2.2 4 个 DNA 片段的物种分辨率

采用 PWG-distance 和 Tree-Building 两种方法比较了单个基因片段及其不同组合对地黄属植物 5 个物种的鉴别率。由图 1 可见, 3 个叶绿体片段 *trnS-trnG*、*trnL-trnF*、*trnM-trnV* 的分辨率分别为 0%、20%、20%; 核基因 ITS 片段的分辨率为 20%; 在叶绿体 DNA 片段的不同组合分析中, 无论是 2 个还是 3 个片段组合对地黄属 5 个物种的分辨率都为 20%, 即与单个 DNA 片段的分辨能力相当。而在核基因 ITS 片段和叶绿体 DNA 片段组合的分析中, 物种的分辨率明显高于单个或多个叶绿体 DNA 片段组合, 如 *trnL-trnF* + ITS、*trnL-trnF* + *trnM-trnV* + ITS 的物种分辨率为 60%; 组合 *trnS-trnG* + ITS 的物种分辨率高达 100%, 可将地黄属 5 个物种完全区分开。

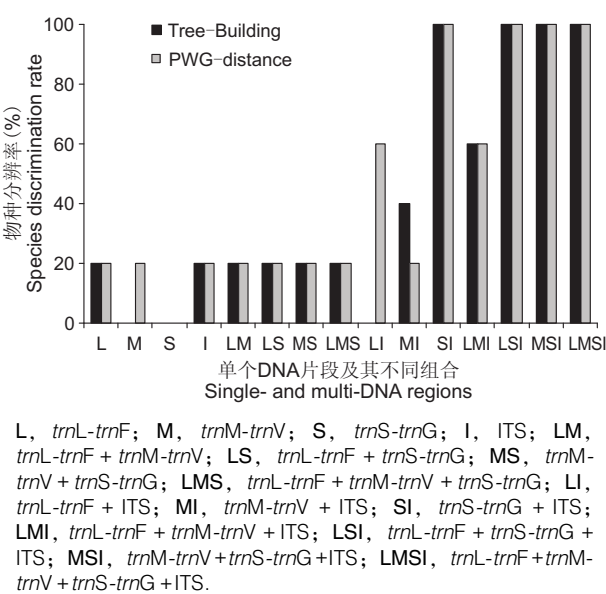


图 1 单个 DNA 片段及其不同组合对地黄属 5 个物种的分辨率
Fig. 1 Species discrimination rate of all tested single- and multi-DNA regions in *Rehmannia*

3 讨论

3.1 单个叶绿体 DNA 片段及核基因 DNA 片段对地黄属物种的鉴别率较低

一般而言,叶绿体基因组进化速率较慢,使用其基因片段鉴定植物类群存在上限^[26],在两两组合的基础上增加片段组合(如 2 个或 3 个叶绿体 DNA 片段组合)都不能进一步提高物种分辨率。本研究结果也显示单个叶绿体 DNA 片段及其不同组合对地黄属物种的分辨率较低(0%~20%),其中 3 个叶绿体 DNA 片段组合(*trnL-trnF*+*trnM-trnV*+*trnS-trnG*)的最高分辨率也仅有 20%(图 1)。叶绿体 DNA 条形码对地黄属物种鉴别率较低的原因可能是:首先,地黄属近缘种之间可能存在杂交渐渗^[4],导致单个或少量叶绿体 DNA 条形码片段组合难以分辨。闰坤等认为地黄(*R. glutinosa*)和茄叶地黄(*R. solanifolia*)是杂交多倍体^[1],裂叶地黄(*R. piasezkii*)和湖北地黄(*R. henryi*)的杂交可能参与地黄(*R. glutinosa*)与茄叶地黄(*R. solanifolia*)的物种形成^[27],从而使地黄属各物种之间的 DNA 变异界限模糊。本实验 3 个叶绿体 DNA 片段组合的 NJ 系统发育树也显示(图 2),地黄(*R. glutinosa*)、裂叶地黄(*R. piasezkii*)、湖北地黄(*R. henryi*)及茄叶地黄(*R. solanifolia*)在系统树中始终形成平行支,使物种之间难以明确分辨。其次,地黄属植物经历了快速成种^[4],导致种间在短时间内没有积累足够的遗传变异,物种之间难以分辨,如地黄(*R. glutinosa*)和茄叶地黄(*R. solanifolia*)。刘占林等采用叶绿体基因(*rbcl*、*rps2*、*rps16*、*trnL-trnF*)单独分析及与核基因 ITS 片段联合分析构建的地黄属植物系统发育关系表明,茄叶地黄始终被包含在地黄类群内,与地黄共同形成一组^[27]。本研究也发现,茄叶地黄(*R. solanifolia*)与地黄(*R. glutinosa*)的花形态很接近,在形态性状上的差别仅体现在叶与花的表型上,前者是卵形叶、花生叶腋,后者是长椭圆形叶、总状花序;二者都是多倍体,且其分布区重叠,类群间的分化时间很短^[1],种间遗传差异非常小,在进化树上难以形成单系(图 2)。

核基因 ITS 具有较快的突变速率,能够提供更加丰富的遗传信息,被认为是陆地被子植物的核心

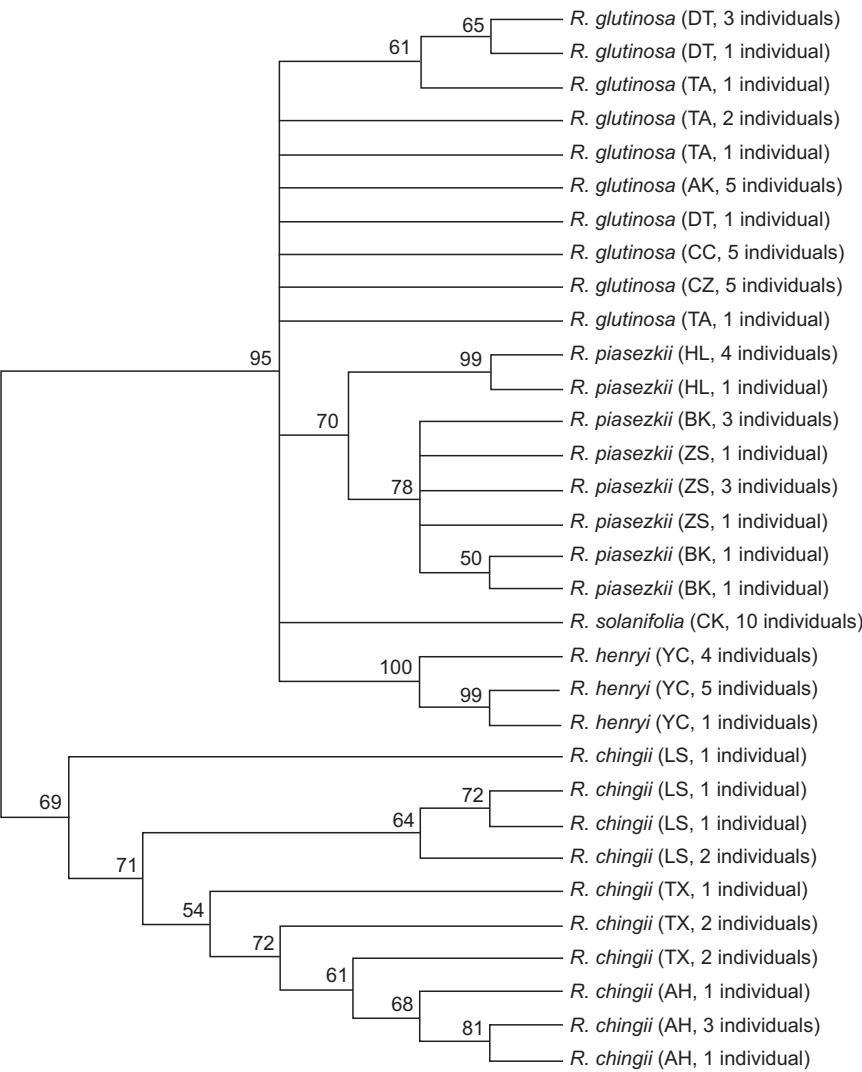
条形码^[14]。但本研究采用核基因 ITS 片段对地黄属 5 个物种的分辨率仅有 20%(图 3),即除能成功鉴定裂叶地黄(*R. piasezkii*)外,其余 4 个物种都不能被成功分辨。这也许是地黄属物种划分可能存在不合理之处,或是由于这些物种不完全的谱系筛选导致保留了大量祖先多态性和较低水平的种间分化^[28]。

综上分析,地黄属植物存在较复杂的地理遗传结构,单独使用叶绿体 DNA 片段或核基因 ITS 片段对该属植物进行鉴定均存在一定的困难。

3.2 叶绿体 DNA 片段和核基因 DNA 片段组合能够提高地黄属物种的鉴别率

核基因和叶绿体基因具有不同的遗传模式,即核基因是双亲遗传,而叶绿体基因为单亲遗传模式,因此在研究分析中依据这两种不同的遗传方式,我们可以追踪到植物不同的进化历史,也可加深对植物进化过程的了解。目前选择多种基因片段组合,尤其是不同遗传背景来源的基因片段组合构建系统发育矩阵也是进行 DNA 条形码鉴定尝试较多的方法之一^[29,30]。

对于地黄属植物而言,仅依靠单个或数个叶绿体 DNA 条形码片段或核基因 ITS 片段是很难明确鉴别的,如闰坤等^[1]和 Albach 等^[4]基于核基因 ITS 片段和叶绿体 DNA 片段的分析结果表明,地黄属物种能够聚为一个单系分支且具有较高的支持率;其中,地黄和茄叶地黄的亲缘关系较近,但属内其它物种间的分类地位没有得到很好的支持。故我们将核基因 ITS 片段和叶绿体 DNA 片段组合分析试图提高对该属物种的鉴别率,结果显示任何一个或多个叶绿体 DNA 片段与核基因 ITS 片段的组合分析都提高了对地黄属物种的鉴别率(图 1),这与前人对柃木(*Alnus cremastogyne* Burk.)^[31]和槽舌兰(*Holcoglossum quasipinifolium*)^[32]DNA 条形码的研究结果一致;单个叶绿体 DNA 片段与核基因 ITS 片段的组合中,*trnS-trnG*+ITS 的物种分辨能力最好(100%),可将 5 个物种完全区分(图 1,图 4);由于单片段组合 *trnS-trnG*+ITS 具有与三条码组合(*trnL-trnF*+*trnM-trnV*+*trnS-trnG*)、四条码组合(*trnL-trnF*+*trnM-trnV*+*trnS-trnG*+ITS)相同的物种鉴别率,本研究推荐将 DNA 片段组合 *trnS-trnG*+ITS 作为地黄属植物鉴定的标准条形码。



括号中的大写字母表示地黄属植物居群名称缩写，即：DT，山西大同；TA，山东泰安；AK，四川隘口；CC，甘肃崇信；CZ，山西长治；HL，陕西后柳；BK，湖北保康；ZS，湖北竹山；CK，重庆城口；YC，湖北宜昌；LS 浙江丽水；TX，安徽棠溪；AH，安徽绩溪。下同。Capital letters in parentheses indicate population name abbreviation of *Rehmannia*. DT: Datong, Shanxi; TA: Taian, Shandong; AK: Aikou, Sichuan; CC: Chongxin, Gansu; CZ: Changzhi, Shanxi; HL: Houliu, Shanxi; BK: Baokang, Hubei; ZS: Zhushan, Hubei; CK: Chengkou, Chongqing; YC: Yichang, Hubei; LS: Lishui, Zhejiang; TX: Tangxi, Anhui; AH: Jixi, Anhui. Same below.

图 2 基于 3 个叶绿体 DNA 片段组合构建的地黄属植物 NJ 系统发育树
Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Rehmannia* based on the combination of all three chloroplast DNA regions

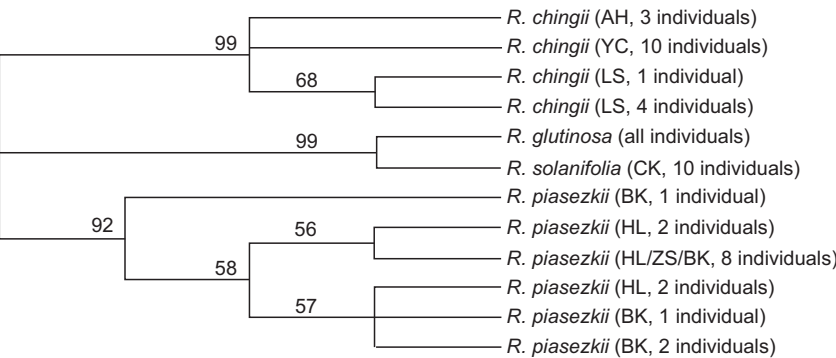


图 3 基于核基因 ITS 片段构建的地黄属植物 NJ 系统发育树
Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Rehmannia* based on the internal transcribed spacer region

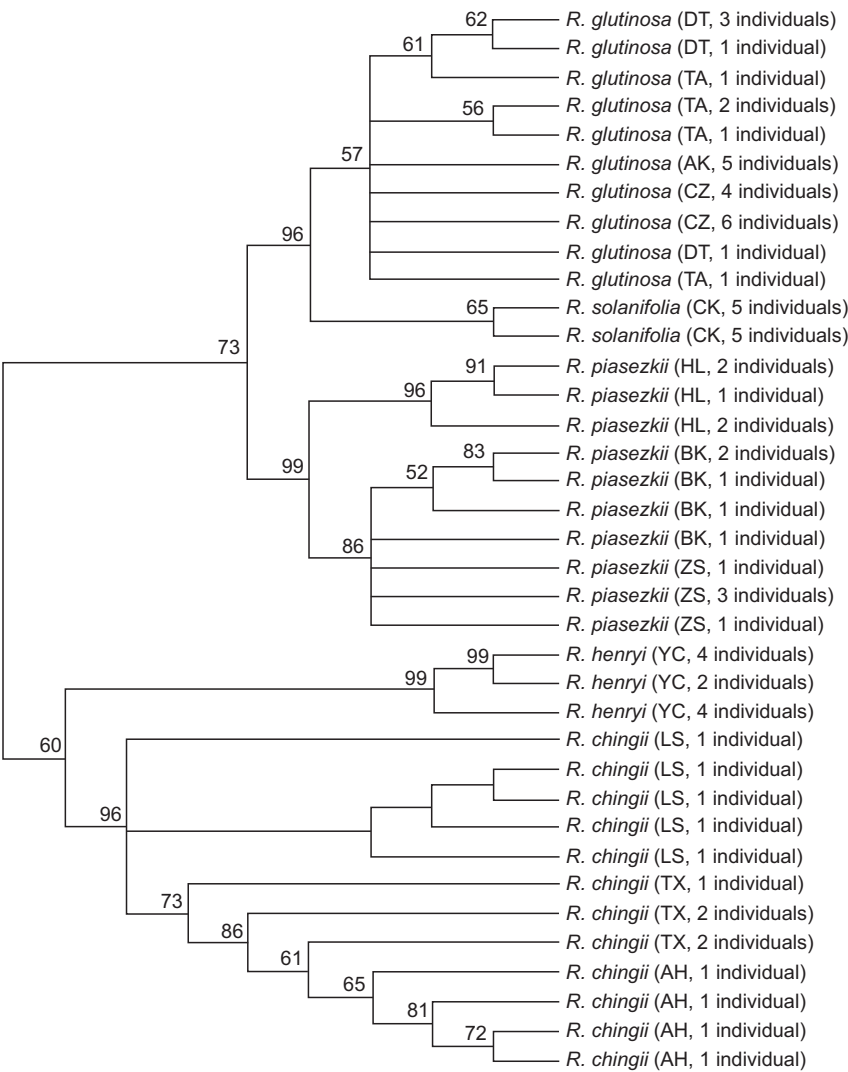


图 4 基于 3 个叶绿体 DNA 片段和核基因 ITS 片段组合构建的地黄属植物 NJ 系统发育树
Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Rehmannia* based on the combination of all three chloroplast regions and nrDNA ITS

因此，在利用 DNA 变异鉴别植物物种的研究分析中，若叶绿体 DNA 条形码片段不起作用或鉴别率较低时，可采用这种叶绿体 DNA 条形码片段和核基因 DNA 片段组合的方法来鉴别一些属内的近缘物种。

参考文献：

[1] 闰坤, 赵楠, 李宏庆. 地黄属种间亲缘关系研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(6): 1112–1120.
[2] 肖玲, 赵先贵, 常思明. 地黄块根的发育解剖学研究[J]. 西北植物学报, 1996, 16(5): 44–47.
[3] Sun P, Guo YH, Qi JJ, Zhou LL, Li XN. Isolation and expression analysis of tuberous root development related genes in *Rehmannia glutinosa* [J].

Mol Biol Rep, 2010, 37(2): 1069–1079.
[4] Albach DC, Li HQ, Zhao N. Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2007, 35: 293–300.
[5] 李宏庆. 地黄属分类学与系统学研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005: 42.
[6] Xia Z, Wang YZ, Smith JF. Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae) inferred from five gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519–30.
[7] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Jeremy R. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 1512(270): 313–321.
[8] 夏至, 高志明, 张红瑞, 李贺敏. 黄芩及其同属近

- 缘种的DNA条形码鉴定研究[J]. 中草药, 2013, 45(1): 107–112.
- [9] Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ. Comprehensive DNA Barcode coverage of North American birds [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(4): 535–543.
- [10] Palmer JD, Herbon LA. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence[J]. *J Mol Evolution*, 1988–1989(1–2): 87–97.
- [11] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for landplant[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794–12797.
- [12] Hollingsworth PM. Refining the DNA barcode for landplants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451–19452.
- [13] Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19254.
- [14] China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, *et al.* Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641–19646.
- [15] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(5): 1105–1109.
- [16] Cheng YP, Hwang SY, Lin TP. Potential refugia in Taiwan revealed by the phylogeographical study of *Castanopsis carlesii* Hayata (Fagaceae) [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(7): 2075–2085.
- [17] Dong W, Liu J, Yu J, Zhou S. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35071.
- [18] Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 738–743.
- [19] Tate JA, Simpson BB. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploidy species[J]. *Syst Bot*, 2003, 28(4): 723–737.
- [20] Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Savolainen V, Chatrou LW, *et al.* Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information [J]. *Am J Bot*, 2003, 90(12): 1758–1776.
- [21] Ivanova NV, Fazekas AJ, Hebert PDN. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2008, 26(3): 186–198.
- [22] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program or windows 95/98/NT [C]//Nucleic acids symposium series. Oxford University Press, 1999, 41: 95–98.
- [23] Sudhir K, Masatoshi N, Joel D, Koichiro T. MEGA: Abiologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequence [J]. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 299–306.
- [24] Librado P, Rozas J. DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [25] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794–12797.
- [26] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2923–2928.
- [27] 刘占林, 李建芳. 地黄属分子系统学分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(1): 77–82.
- [28] 杜芳, 徐放. 基因流介导的种间渐渗与物种界定 [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(3): 257–262.
- [29] 丁铭, 曾丽萍, 马红, 张宁. 初探低拷贝核基因在低等分类阶元系统发育重建中的适用性 [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(3): 211–221.
- [30] 邹嘉宾, 王茜, 李丽丽, 刘建全. 结合叶绿体和核DNA序列变异可提高云杉属物种的分子鉴别率 [J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(3): 375–385.
- [31] Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(4): 594–605.
- [32] Xiang XG, Hu H, Wang W, Jin XH. DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): a test of DNA barcode candidates [J]. *Mol Ecol Resour*, 2011, 11(6): 1012–1021.