地黄属植物 DNA 条形码鉴定及地黄栽培起源研究

夏 至，王璐静，黄 勇， 李贺敏，张红瑞，高致明*
河南农业大学农学院，河南 郑州 450002

摘 要：目的 评价 DNA 条形码通用序列对地黄属植物 *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. 的鉴定作用，探讨中药地黄 *R. glutinosa* 的栽培起源。**方法** 对地黄属物种的 ITS、psbA-trnH、rbcL 和 matK 序列扩增和测序，比较各序列在种内和种间变异。采用最近距离法、相似性搜索法、构建 Neighbor-Joining（NJ）系统聚类树等方法进行鉴定分析。**结果** 对比地黄属各种的 rbcL 和 matK 序列，结果显示 rbcL 序列完全一致，matK 序列同源性为 99.9%～100%。ITS 和 psbA-trnH 序列的平均种间变异均大于平均种内变异，且 2 条序列的种间最小变异均大于种内最大变异。在 ITS 系统树上，地黄的所有样品与茄叶地黄聚在一支，支持率为 96%；psbA-trnH 和联合树上，地黄的所有样品聚为一单系分支（支持率为 55%和 58%）。地黄与茄叶地黄聚在的这一分支分别与裂叶地黄和高地黄聚在一支（在 ITS 和联合树上支持率为 55%和 68%），与裂叶地黄和天目地黄聚在一支（在 psbA-trnH 树上支持率为 80%）。ITS 和联合树支持栽培地黄的 3 个品种与来源于河南温县、郑州、南阳和北京野生地黄居群聚在一支，支持率为 51%和 69%。**结论** 叶绿体基因 rbcL 和 matK 不适合作为条形码对地黄属进行鉴定，ITS 和 psbA-trnH 序列可以作为中药材地黄与同属近缘种进行鉴定的条形码序列。裂叶地黄和天目地黄可能是四倍体地黄的 2 个亲本来源，栽培的地黄品种可能起源于河南温县区域的野生群体。

关键词：ITS；psbA-trnH；地黄；DNA 条形码；鉴定；起源
中图分类号：R282.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2016)04 - 0648 - 07
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.020

Identification of DNA barcoding in plants of *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. and origin of cultivated *Rehmannia glutinosa*

XIA Zhi, WANG Lu-jing, HUANG Yong, LI He-min, ZHANG Hong-rui, GAO Zhi-ming
Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Objective To evaluate the suitable candidate DNA barcoding of plants in *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey., and unravel the origin of cultivated *R. glutinosa*. **Methods** Nuclear DNA ITS and chloroplast gene psbA-trnH, rbcL, and matK sequences of species in *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. were amplified and sequenced. The Kimura 2-Parameter (K2P) distances were calculated. Identification analyses were performed using Nearest Distance, BLAST1, and Neighbor-Joining (NJ) methods. **Results** A comparison on the sequences within species in *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. indicated that the rbcL sequences were identical, the matK sequences were similar by 99.9%—100%. All inter-specific distances (ITS and psbA-trnH data) were far higher than all intra-specific genetic distances. Minimum interspecific distance (ITS and psbA-trnH data) were higher than coalescent depth. The NJ trees (ITS, psbA-trnH, and combined data) indicated that all population of *R. glutinosa* formed a monophyletic clade [Bootstrap (BS) = 96%, 55%, and 58%]. The clades including *R. glutinosa* and *R. solanifolia* were clustered with *R. piasezkii* and *R. elata* in ITS and combined trees (BS = 55% and 68%), and clustered with *R. piasezkii* and *R.chingii* in psbA-trnH tree (BS = 80%). The NJ trees (ITS, psbA-trnH, and combined data) supported that three cultivated varieties of *R. glutinosa* were clustered with wild populations from Wenxian, Zhengzhou, Nanyang, and Beijing (BS = 51% and 69%). **Conclusion** Chloroplast genes rbcL and matK can not be used to identify the medicinal plants of *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. ITS and *psbA-trnH* are two efficient barcodes for authentication of *R. glutinosa* and its relative species. *R. piasezkii* and *R. chingii* may be as both parental species of tetraploid *R. glutinosa*. Furthermore, it appears that native wild populations are involved in the origin of cultivated *R. glutinosa* in Wenxian county.

Key words: inter-transcibed spacer; psbA-trnH; *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch; DNA barcode; authentication; origin

收稿日期：2015-06-21
基金项目：国家自然科学基金河南联合基金项目（U1404302）；河南省基础与前沿计划研究项目（152300410198）
作者简介：夏 至（1974—），男，河南固始人，副教授，博士，研究方向为中药资源的分子鉴定。
Tel/Fax: (0371)63554995 E-mail: xiazhiemail@126.com
***通信作者** 高致明，教授，主要从事中药资源的规范化种植研究。E-mail: gaozhiming672@shou.com

玄参科（Scrophulariaceae）地黄属 *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey. 植物在我国有 6 种，全部产于我国[1]。其中，中药材地黄来源于该属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch，全国各地均有分布，在河南焦作地区广为栽培，是著名的“四大怀药”之一[2]。《中国药典》2010 年版中地黄以块根入药，药材分为鲜地黄、生地黄和熟地黄，具有清热生津、凉血、止血；补血滋阴、益精填髓等功效。用于热病伤阴、舌绛烦渴、温毒发斑、吐血、衄血、咽喉肿痛、骨蒸劳热、肝肾阴虚，腰膝酸软等症的治疗[3]。植物化学和药理学的研究表明地黄属植物活性成分为环烯醚萜苷类化合物，主要包括梓醇和毛蕊花糖苷等[3-4]，具有降血糖、抗炎、保肝、利尿和缓泻、调节免疫功能的作用[5]，临床应用十分广泛。作为河南栽培的主要药材品种，野生和栽培的中药材地黄种内遗传变异显著，形态上有较大差异，与同属近缘种类很难区分，从而影响鉴定的准确性，造成传统鉴定困难[6]。此外，除正品地黄外，同属的一些植物（如湖北地黄等）在地方也作为中药材地黄入药[7]，常有混淆现象，直接影响临床用药的安全。而目前，对该属的鉴定研究主要集中在形态性状和 RAPD（random amplified phlymorphic DNA）分析等[8]。DNA 条形码鉴定仅局限于对 ITS2 单条序列研究[9]，缺乏对其他几个常用 DNA 条形码候选序列 [intemal transcribed spacer（ITS）、psbA-trnH、rbcL 和 matK] 在地黄属鉴定作用的评价和分析，且没有在整个属的水平取样，进行系统的鉴别分析。而在地黄属内，中药材地黄和茄叶地黄均为四倍体（$2n=56$），而其他种类均为二倍体（$2n=28$）[6]。目前，对于四倍体地黄是否来源于该属其他二倍体种类的异源或同源加倍后形成，尚不明确，且栽培地黄品种起源也不清楚。

近年来，随着分子生物学的快速发展，DNA 条形码技术（DNA barcoding）为中药材物种鉴定及中药材物种的系统进化研究提供了方便快捷的方法[10]。DNA 条形码技术是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段对物种进行快速、准确的自动鉴定，并通过构建中药材物种及其近缘种类的亲缘关系，探讨中药材物种的系统演化及栽培品种的起源[11]。目前，DNA 条形码鉴定研究广泛应用于多个科属的药用植物及中药材鉴定[12-15]。因此，本研究通过实验并结合 GenBank 数据库数据，分析 ITS、psbA-trnH、rbcL 和 matK 4 条常用条形码序列对地黄属物种的鉴别能力，以筛选能鉴别地黄属药用植物的优选序列及为地黄属植物的分子鉴定提供依据，并通过上述序列构建中药材地黄及其近缘种类的亲缘关系，探讨中药材地黄的栽培起源。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料的收集包括地黄属 5 个种共 13 个样品，其中地黄栽培品种 3 个样品，地黄野生材料 6 个样品，地黄属其他种 4 个样品，实验材料由中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室王印政研究员鉴定，凭证标本保存于中国科学院植物研究所标本馆（PE）和河南农业大学。实验材料来源于植物新鲜叶片，经硅胶快速干燥后保存于 −80 ℃冰箱，实验材料详细信息及 GenBank 登录号见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取、扩增和测序 采用北京天根生化植物 DNA 提取试剂盒（Tiangen Biotech Co.，China）提取样品 DNA，ITS 序列扩增使用 Wendel 等[16]设计的引物 ITS1（5’-AGAAGTCGTA-ACAAGGTTTCCGTA-3’）和 ITS4（5’-TCCTCCG-CTTATTGATATGC-3’）；psbA-trnH、rbcL 和 matK 序列扩增使用 DNA 条形码通用引物[17]，引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。PCR 反应条件及扩增程序参考 Xia 等[18]和陈士林等[17]的研究。PCR 产物纯化后，用 ABI 3730X 测序仪（Applied Biosystems Co.，美国）进行双向测序，测序结果在 GenBank 注册序列号（表 2）。

1.2.2 数据处理 测序所得的峰图采用 CodonCode Aligner V3.0 软件（CodonCode Co.，美国）对序列峰图进行校对拼接，去除引物区和低质量的序列，同时，本研究从 GenBank 数据库中搜集并下载地黄属 ITS、rbcL 和 matK 序列 49 条（表 2），整合处理后结合样品序列分析。用 PAUP* version 4.0b10（Florida State University，美国）计算 K2P（Kimura-2-Parameter）距离，基于 K2P 模型进行遗传距离分析，对不同序列种间、种内变异大小进行比较。统计不同序列种间、种内遗传距离的分布频度。利用软件 PAUP* version 4.0b10 构建邻接（Neighbor-Joining，NJ）系统发育树，利用 Bootstrap（BS，1 000 次重复）检验各分支的支持率。利用

表 1 植物样品来源

Table 1 Origins of plant samples

种名	凭证标本	采集地	GenBank 登录号			
			ITS	psbA-trnH	rbcL	matK
裂叶地黄 *Rehmannia piasezkii*	XZ-2004-04-001	湖北宜昌	EF363670	KR424760	FJ172721	KR424746
湖北地黄 *R. henryi*	XZ-2004-04-002	湖北兴山	EF363671	KR424761	FJ172722	KR424747
茄叶地黄 *R. solanifolia*	XZ-2004-04-003	重庆城口	EF363672	KR424762	FJ172723	KR424748
天目地黄 *R. chingii*	XZ-2004-04-004	浙江临安	EF363673	KR424763	FJ172724	KR424749
地黄 *R. glutinosa*	XZ-2004-04-005	北京香山	EF363674	KR424764	FJ172725	KR424750
地黄（栽培金九）	XZ-2013-06-jin9	河南温县	KR424730	KR424752	KR424766	KR424738
地黄（栽培北京 3 号）	XZ-2013-06-bj3	河南温县	KR424731	KR424753	KR424767	KR424739
地黄（栽培 85-5）	XZ-2013-06-85-5	河南温县	KR424732	KR424754	KR424768	KR424740
地黄	XZ-2013-05-DH1	河南洛阳	KR424733	KR424755	KR424769	KR424741
地黄	XZ-2013-09-DH2	河南林州	KR424734	KR424756	KR424770	KR424742
地黄	XZ-2014-05-DH3	河南南阳	KR424735	KR424757	KR424771	KR424743
地黄	XZ-2013-06-DH4	河南温县	KR424736	KR424758	KR424772	KR424744
地黄	XZ-2008-05-DH5	河南郑州	KR424737	KR424759	KR424773	KR424745
崖白菜 *Triaenophora rupestris*	XZ-2004-04-009	湖北兴山	EF363675	KR424765	FJ172726	KR424751

表 2 GenBank 序列来源序列号

Table 2 Accession numbers of GenBank database

基因序列	种名	GenBank 登录号
ITS	地黄	DQ069312、FJ770249、FJ770248、FJ770247、FJ770246、FJ770244、FJ770245、FJ770243、FJ770242、FJ770241、FJ770240、FJ770239、FJ770238、FJ770237、FJ770236、FJ770235、FJ770234、FJ770233、FJ770232、FJ770231、FJ770230、FJ770229、FJ770228、FJ770227、FJ770226、FJ770225、FJ770224、FJ770223、FJ770222、FJ770221、FJ770220、FJ770218、EU810386、EU810385、EU810384、EU810383、EU787018、EU787017、EU592019、FJ980430
	湖北地黄	DQ272447
	裂叶地黄	DQ069316
	茄叶地黄	DQ069314
	高地黄	DQ069315
	天目地黄	DQ069313
rbcL	高地黄	HQ384874
	地黄	GQ436719
matK	高地黄	HQ384505
	地黄	GQ434277

相似性搜索（BLAST1）、最近距离（Nearest Distance）、构建 NJ 系统发育树等方法评价各序列对地黄属的鉴定作用，并构建中药材地黄及其近缘种类的系统发育关系。

2 结果与分析

2.1 不同 DNA 条形码的序列信息、种内种间差异分析

本研究中地黄属叶绿体基因 matK 序列有 6 个种，中药材地黄取样个体为 10 个，3 个栽培品种，7 个野生种（包括来源于 GenBank 1 个样品），共计 15 条序列，matK 序列的扩增和测序成功率均为 100%。序列对比发现，matK 序列在地黄属内非常保守，序列同源性为 99.9%～100%。所有序列长度为 820 bp，6 个种 15 条序列，仅出现 2 个位点的差异，分别为湖北地黄在 572 个位点发生 T 到 G 的颠换，和高地黄在 660 个位点发生 G 到 T 的颠换，其余种类茄叶地黄、裂叶地黄、天目地黄与地黄的野生和栽培种类的 matK 序列同源性为 100%。同样，叶绿体基因 rbcL 在地黄属内也极为保守，本实验取样的 6 个物种，中药材地黄取样个体为 10 个，包括

3 个栽培品种，7 个野生种（包括来源于 GenBank 1 个样品），共计 15 条序列，rbcL 序列的扩增和测序成功率均为 100%。所有序列的同源性均为 100%。这表明，进化速率较慢的这 2 个国际通用叶绿体基因的 DNA 条形码序列不适合地黄属内的种间鉴定，因此，在后面分析直接舍弃这 2 条序列。

地黄属 ITS 序列有 6 个种，取样的中药材地黄取样个体为 9 个，3 个栽培品种，6 个野生种，GenBank 下载地黄物种 40 条序列，共计 49 条序列，高地黄 1 个样品，其余 4 个种均为 2 个样品。中药材地黄及其近缘种类的 6 个物种的 ITS 序列长度变异范围为 613～615 bp。其中 ITS1 序列长度变异范围为 223～224 bp，5.8 S 区域长度为 164 bp，6 个物种序列完全一致。ITS2 序列长度变异范围为 224～227 bp。在 ITS 序列的矩阵中，本研究取样的地黄实验样品的 3 个栽培品种，6 个野生种的 ITS 序列比对发现，仅河南林州采集的样品在 162 位点处出现一个由 C 到 A 的颠换，结合 GenBank 的序列，发现地黄属内各种间 ITS 序列具有丰富的变异。地黄属叶绿体基因 psbA-trnH 序列有 5 个种，中药材地黄 9 个样品包括 3 个栽培品种，6 个野生种，其余 4 个种均为 1 个样品。在 psbA-trnH 序列的矩阵中，裂叶地黄和天目地黄的 psbA-trnH 序列最长为 516 bp，湖北地黄最短为 438 bp。湖北地黄对比其他种序列，在 79 个位点有 1 个 T 到 G 的转换，165 位点处有 1 个 G 到 T 的转换，在 200 和 459 位点各有 1 个碱基的缺失，在 223～299 位点处有 77 个碱基的大范围缺失。茄叶地黄对比其他种序列，在第 200 位点处有 1 个碱基的缺失，在 232～236 位点处、286～290 位点处，各有 5 个碱基的缺失。中药材地黄种内，psbA-trnH 序列共有 4 个单倍型，河南温县栽培品种（金九、北京 3 号、85-5）3 个样品与来源于河南温县、郑州和南阳野生地黄的 psbA-trnH 序列同源性为 100%，序列长度为 502 bp，共享 1 个单倍型。其余 3 个单倍型来源于北京、洛阳和林州的野生地黄样品。

种内种间差异是分析 DNA 条形码序列的重要指标。理想的条形码序列具有较大的种间变异、较小的种内变异，以便准确鉴别同属不同种的物种。本研究从平均种间变异、种间最小变异、平均种内变异、种内最大变异分析 ITS 和 psbA-trnH 序列的种内种间差异（表 3）。结果表明，ITS 和 psbA-trnH 序列的平均种间变异（0.017 96 和 0.005 15）均大于平均种内变异（0.006 12 和 0.001 24），且 2 条序列的种间最小变异（0.004 93 和 0.001 71）均大于种内最大变异（0.003 64 和 0.000 81）。因此，ITS 和 psbA-trnH 序列是鉴别中药材地黄及同属近缘种比较理想的条形码序列。

表 3 不同 DNA 条形码序列的种内和种间的变异分析

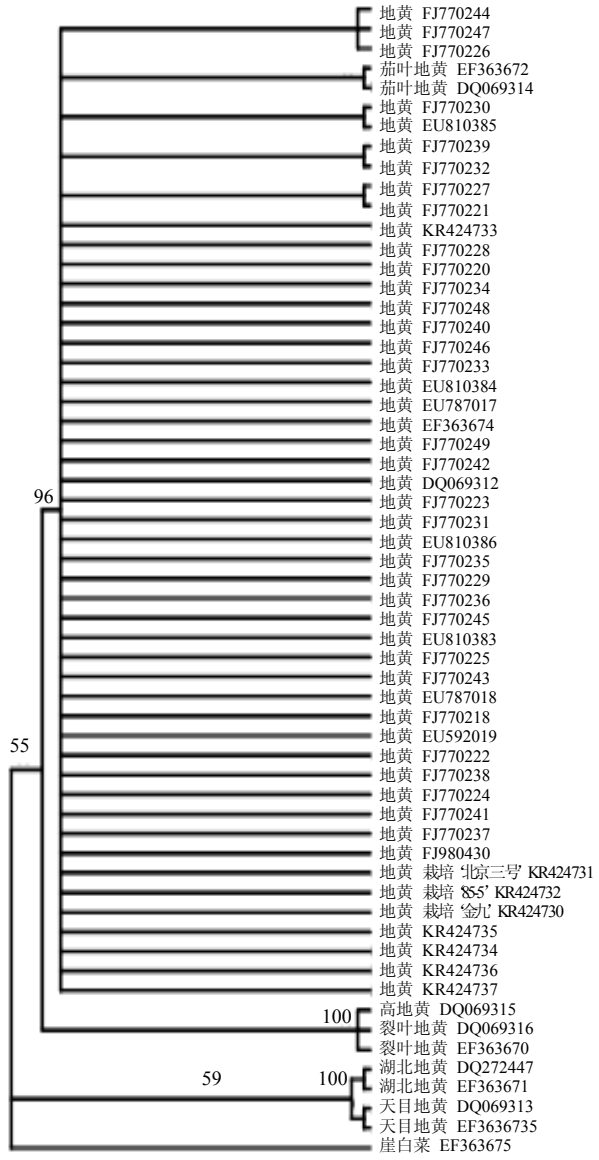
Table 3 Analysis on intra- and inter-specific variation of different DNA barcodes

基因片段	ITS	psbA-trnH
种内最大变异	0.003 64±0.008 15	0.000 81±0.001 82
平均种内变异	0.006 12±0.003 64	0.001 24±0.001 62
种间最小变异	0.004 93±0.005 11	0.001 71±0.001 89
平均种间变异	0.017 96±0.007 98	0.005 15±0.002 75

2.2 地黄属 DNA 条形码序列的鉴定分析

应用 BLAST1 对地黄属种类进行鉴定分析，结果表明 ITS 和 psbA-trnH 序列可以准确鉴别中药材地黄与其同属近缘种类。应用 PAUP* version 4.0b10 软件构建中药材地黄与其同属近缘种类的 ITS 和 psbA-trnH 序列的 NJ 系统发育树（图 1、2），外类群选择与地黄属近缘的崖白菜属。在 ITS 序列构建的分子系统树上（图 1），中药材地黄的 49 个样品与茄叶地黄的 2 个样品聚为一单系分支，支持率 96%，其中，茄叶地黄的 2 个样品聚为一单系分支，支持率为 63%，这表明地黄与茄叶地黄亲缘关系较近。高地黄与裂叶地黄聚为一单系分支，支持率为 100%，湖北地黄和天目地黄的 2 个个体均各自聚为一单系分支，支持率为 100%和 69%。ITS 序列构建的 NJ 树可以将中药材地黄与除茄叶地黄外的其他地黄属种类很好区分开。

在 psbA-trnH 序列构建的分子系统树上（图 2），中药材地黄的 9 个样本单独聚为一单系，支持率为 55%，可以很好地与地黄属其他种类区分开，其中来源于洛阳和林州 2 个野生居群聚为一单系分支，支持率为 66%，其余 3 个栽培品种与来源于河南温县、河南郑州、南阳和北京野生地黄居群聚在一支，支持率为 51%。与 ITS 系统树一致的是茄叶地黄与地黄聚在一起，支持率为 55%，支持二者亲缘关系较近。与 ITS 系统树不同的是在 ITS 系统树上，地黄与茄叶地黄二者构成的单系分支，与裂叶地黄和高地黄构成的单系分支聚在一起，支持率为 55%，但在 psbA-trnH 系统树上，地黄、茄叶地黄二者构成的单系分支，与裂叶地黄和天目地黄构成的单系



分支上部数值表示 NJ 分析的 BS 分析对该分支的支持强度（＞50%），下同

BS values of NJ (> 50%) are shown above and below branches, same as below

图 1　基于 NJ 法 (ITS 序列) 构建系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (ITS data)

分支聚在一起，支持率为 80%。依据 ITS 和 psbA-trnH 序列构建的分子系统树可将中药材地黄与其同属近缘种类明显地区分开。

在 ITS 和 psbA-trnH 序列联合构建的分子系统树上（图 3），中药材地黄的 9 个样本单独聚为一单系，支持率为 58%，其中来源于河南洛阳和林州 2 个野生居群聚为一单系分支，支持率为 52%，其余 3 个栽培品种与来源于河南温县、郑州、南阳和北京野生地黄居群聚在一支，支持率为 69%。与 ITS 和 psbA-trnH 系统树一致的是，茄叶地黄与地黄聚

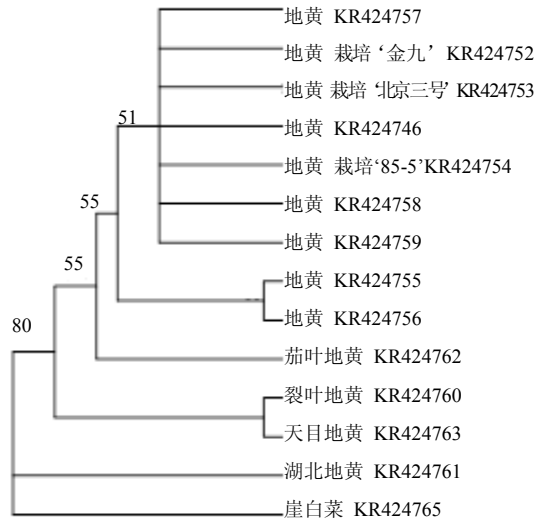


图 2　基于 NJ 法 (psbA-trnH 数据) 构建系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (psbA-trnH data)

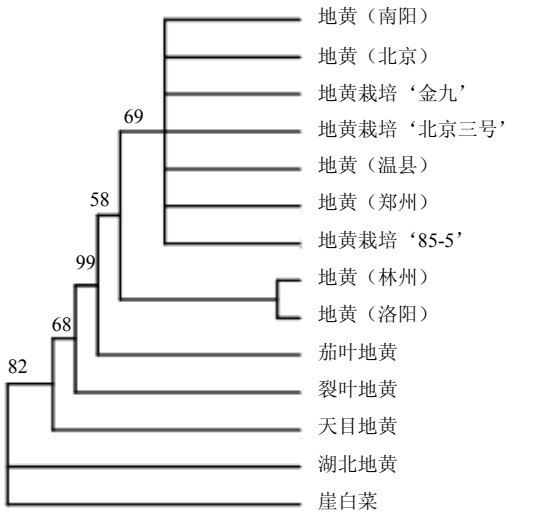


图 3　基于 NJ 法 (ITS 和 psbA-trnH 联合数据) 构建系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree constructed based on NJ method (combined ITS and psbA-trnH data)

在一起，支持率为 99%，支持二者亲缘关系较近。ITS 和 psbA-trnH 序列联合构建的分子系统树支持地黄，茄叶地黄二者构成的单系分支，与裂叶地黄构成的单系分支聚在一起，支持率为 68%，随后与天目地黄聚在一起，支持率为 82%。

3　讨论

3.1　基于 DNA 条形码序列对地黄属分子鉴定评价

本研究通过对国际通用的 DNA 条形码候选序列对比分析发现，虽然叶绿体基因 matK 和 rbcL 在地黄属扩增和测序成功率均能达到 100%，但这 2 个基因序列在该属内极度保守，进化速率较慢，种

间差异极小或没有差异，不适合作为 DNA 条形码序列对该属属下种类进行分子鉴定研究。本研究对地黄属进行全面取样，研究结果发现核基因片段 ITS（包括 ITS2）和叶绿体基因 psbA-trnH 在该属内不仅扩增和测序成功率均能达到 100%，且这 2 条序列在地黄属内存在丰富的变异，支持陈士林等[19]认为核基因 ITS2 的片段可以作为《中国药典》2015 年版中药材地黄种内部分居群间的分子鉴定的 DNA 条形码序列。基于 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 序列对地黄属种间和种内的变异分析表明，ITS 和 psbA-trnH 序列的平均种间变异均大于平均种内变异，且 2 条序列的种间最小变异均大于种内最大变异。NJ 分子系统树分析显示，核基因片段 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 联合可以准确区分中药材地黄及其近缘种。因此，ITS 和 psbA-trnH 序列可以作为地黄属内中药材地黄及其与同属近缘种进行鉴定的条形码序列。

3.2 中药材地黄物种形成及其栽培起源

基于 DNA 条形码技术的分子鉴定不仅能准确鉴定中药材正品与伪品，还能准确构建药用植物与其近缘种类的系统发育关系，是探讨药用植物物种及其栽培品种起源的基础[11]。本研究对地黄属内种间的系统关系的研究结果表明，茄叶地黄与地黄的亲缘关系最近，与 Xia 等[18]和 Albach 等[20]的结果完全一致。与中药材地黄和茄叶地黄的四倍体不同，地黄属内其他 4 个种染色体 $2n=28$，均为二倍体[6,21]。Albach 等[20]认为地黄种内 ITS 基因存在高度变异，加上形态特征的多样性，推断中药材地黄为异源四倍体[22]。本研究核基因 ITS 分子系统树显示，中药材地黄与茄叶地黄构成的分支，与裂叶地黄和高地黄构成的分支聚在一起，支持率为 55%，表明地黄、茄叶地黄与裂叶地黄、高地黄亲缘关系较近。李宏庆等[23]和夏至等[6-7]研究认为裂叶地黄与高地黄为同一种，高地黄为裂叶地黄的异名，因此，ITS 分子系统树支持地黄、茄叶地黄与裂叶地黄亲缘关系最近。叶绿体基因 psbA-trnH 的分子系统树结果显示，中药材地黄与茄叶地黄构成的分支，与裂叶地黄和天目地黄构成的分支聚在一起，支持率为 55%。相对于核基因的双亲遗传，叶绿体基因在被子植物中是母系遗传[24]，因此，推测四倍体地黄的物种形成一定与二倍体裂叶地黄存在密切的联系，天目地黄可能是四倍体地黄物种形成的另一个亲本来源。

中药材地黄的栽培具有悠久的历史，新老产区均存在栽培品种混杂且来源并不清楚[2]。本研究核基因 ITS 和基因 psbA-trnH 的取样既包括地黄的野生类群，同时也包括部分栽培品种。在核基因 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 联合的分子系统树上，发现河南温县取样 3 个栽培品种与河南温县、郑州、南阳和北京取样的野生群体聚在一起，支持率为 69%，而同样这一分支在叶绿体基因 psbA-trnH 的分子系统树上也得到支持。对叶绿体基因 psbA-trnH 的单倍型分析结果表明，地黄野生和栽培品种有 4 个单倍型，河南温县取样 3 个栽培品种与河南温县、郑州和南阳取样的野生群体共享 1 个单倍型，而其余 3 个单倍型分别为河南洛阳、林州和北京的 3 个野生群体。这表明对比野生地黄，栽培地黄的遗传多样性已明显降低。遗传多样性降低的程度取决于人类栽培驯化过程中参与栽培起源的野生群体的大小，以及栽培驯化时间的长短，中药的栽培起源不像农作物那样规模庞大，时间长，人们只是零星地种植从本区域野外收集的药用植物，所以只有有限的野生群体参与了中药的栽培起源[25]。因此推测，取样的栽培地黄品种可能起源于分布于河南温县区域的野生群体。本研究对地黄属的 DNA 条形码鉴定及中药材地黄栽培起源研究进行初步探讨，但鉴于中药材地黄的栽培品种众多，且中药材地黄又是一个广布种，因此进一步在该属扩大取样范围（特别是扩大野生地黄不同区域分布的群体及栽培品种的数量），选取其他多基因片段开展分子谱系地理学研究，方能全面探讨中药材地黄的物种形成及其栽培起源，这将为地黄属的药用植物的资源开发与利用、品种选育、引种栽培提供可靠的理论依据。

志谢：中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室提供本研究分子实验平台。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [第 67(2)卷] [M]. 北京: 科学出版社, 1979.

[2] 温学森, 杨世林, 魏建和, 等. 地黄栽培历史及其品种考证 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 946-949.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[4] 王太霞, 李景原, 胡正海. 地黄的形态结构与化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 585-587.

[5] 邢 洁, 徐为人, 刘 鹏, 等. 栀子和地黄环烯醚萜类成

分抗炎作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 930-935.

[6] 夏 至. 地黄属和崖白菜属的分子系统学研究-兼论地黄属和崖白菜属的科级系统位置 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2009.

[7] 夏 至, 李家美. 地黄属及其近缘属的药用植物资源调查研究 [J]. 商丘师范学院学报, 2009, 25(12): 96-98.

[8] 陈京荔, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 地黄不同品种的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 505-508.

[9] 侯典云, 辛天怡, 杨 培, 等. 应用ITS2条形码鉴定中药材地黄 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 441-445.

[10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al*. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.

[11] 韩建萍, 宋经元, 姚 辉, 等. 中药材 DNA 条形码鉴定的基因序列比较 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1056-1061.

[12] 夏 至, 张红瑞, 李贺敏, 等. 碎米桠及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2904-2909.

[13] 夏 至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.

[14] 夏 至, 高致明, 李贺敏, 等. 鬼针草及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 828-834.

[15] 夏 至, 冯翠元, 高致明, 等. 黄芩及其同属近缘种的DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 107-112.

[16] Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional inter locus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280-284.

[17] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al*. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8613.

[18] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relationships of *R*. and *Triaenophora* (Scrophulariaceae sensu lato) inferred from five different gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.

[19] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.

[20] Albach D, Yan K, Jensen S, *et al*. Phylogenetic placement of Triaenophora (formerly Scrophulariaceae) with some implications for the phylogeny of Lamiales [J]. *Taxon*, 2009, 58: 749-756.

[21] 温学森, 李先恩, 赵华英, 等. 地黄常见种质的染色体观察 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 124-125.

[22] 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.

[23] 李宏庆, 刘国丽. 地黄属的一个新异名 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 23-26.

[24] Soltis D E, Kuzof R K. Discordante between nuclear andchloroplast phylogenies in the Heuchera Group (Saxifragaceae) [J]. *Evolution*, 1995, 49: 727.

[25] 陈 川. 药用植物玄参的栽培起源、亲缘地理及东亚玄参系统发育研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.