

• 药材与资源 •

款冬转录组 SSR 标记开发及其多态性研究

贺润丽¹, 韩毅丽¹, 段静静¹, 刘计权¹, 王莉花^{2*}

1. 山西中医药大学中药学院, 山西 太原 030619

2. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 云南 昆明 650223

摘要:目的 分析款冬转录组数据的简单重复序列标记(SSR)位点信息并设计特异引物, 以期为款冬分子标记辅助育种提供有力工具。方法 对款冬转录组测序数据库中长度 1 kb 以上的 18 938 条 unigene, 利用 MISA 软件搜索 SSR 位点信息, 利用 Primer3 设计引物, 并随机选择 55 对 SSR 引物分析 18 份不同来源款冬材料的多态性。结果 共搜索到 4 688 个 SSR 位点, 分布于 3 844 条 unigene 中, SSR 出现频率为 24.75%, 平均 7 979 bp 含 1 个 SSR 位点。SSR 位点中三核苷酸重复类型出现频率最高(37.12%), 其次是单核苷酸重复(32.36%)和二核苷酸重复(28.20%)。共有 60 种重复基元, 其中 A/T(31.42%)、AG/CT(12.80%)、ATC/ATG(9.62%) 是优势重复基元。随机选择 55 对引物进行多态性验证分析, 其中 42 对有扩增产物, 14 对具稳定可重复的多态性; 利用 UPGMA 作图, 将 18 份样品分为 3 类。结论 款冬转录组中 SSR 位点出现频率高, 类型丰富, 多态性高, 为其遗传多样性分析、遗传图谱构建和分子标记辅助育种等研究提供了候选分子标记。

关键词: 款冬; 转录组; 简单重复序列标记; 多态性; PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-5026-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.026

Development and polymorphism analysis of SSR molecular markers in *Tussilago farfara* transcriptomeHE Run-li¹, HAN Yi-li¹, DUAN Jing-jing¹, LIU Ji-quan¹, WANG Li-hua²

1. College of Chinese Materia Medica, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

2. Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Yunnan Provincial Key Laboratory of Agriculture Biotechnology, Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: Objective The SSR loci information in the transcriptome of *Tussilago farfara* was analyzed and specific primers were designed, so as to provide powerful tools for molecular marker-assisted breeding in this plant. **Methods** SSR loci in 18 938 unigenes with length of 1 kb or more obtained by transcriptome sequencing were searched by using MISA. SSR primers were designed by Primer3 and 55 pairs were randomly selected for the polymorphic analysis on 18 samples collected from different habitats. **Results** A total of 4 688 SSRs were detected in the transcriptome of *T. farfara*, distributed in 3 844 unigenes with the distribution frequency of 24.75%. SSR loci occurred every 7 979 bp. Trinucleotide repeats appeared to be the most abundant SSRs with a frequency of 37.12%, followed by mononucleotide (32.36%) and dinucleotide (28.20%). Among all 60 repeat motifs, A/T (31.42%), AG/CT (12.80%), and ATC/ATG (9.62%) were the predominant repeat types. For validating the availability of the SSR primers, 55 pairs of primers were randomly selected for polymorphism analysis. Among them, 42 pairs (76.36%) produced clear and reproductive bands and 14 pairs showed polymorphism. Eighteen plants were divided into three groups by UPGMA. **Conclusion** The SSR markers in the transcriptome of *T. farfara* show high frequency, rich type, and high polymorphism, which will provide the abundant candidate markers for genetic diversity, genetic mapping construction and marker-assisted breeding study for this plant.

Key words: *Tussilago farfara* L.; transcriptome; SSR; polymorphism; PCR

收稿日期: 2019-04-06

基金项目: 山西省自然科学基金项目(201601D011124); 山西省中药现代化关键技术研究振东专项(2016ZD0108); 山西省国际科技合作项目(2012081045-1)

作者简介: 贺润丽(1971—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物资源开发。Tel: (0351)3179903 E-mail: herunli666@163.com

*通信作者 王莉花(1970—), 女, 研究员, 研究方向为植物遗传育种。Tel: (0871)5894713 E-mail: wanglihua70@hotmail.com

款冬 *Tussilago farfara* L. 为菊科款冬属植物, 其干燥未开放花蕾是我国传统中药材款冬花, 具有润肺下气、止咳化痰的功效, 临床用于治疗新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽咳血等症^[1]。在欧洲, 款冬叶同样用于治疗咳嗽^[2]。款冬花药材过去主要依赖野生, 随着需求量的增加, 野生资源逐渐减少, 人工栽培逐渐成为主要药源, 甘肃、内蒙古、河北、山西、陕西、重庆等地均有较大规模种植^[3-4]。款冬一般用根茎进行无性繁殖, 导致品质逐年下降, 亟需进行野生资源保护利用和优良品种选育, 但栽培历史短、遗传基础研究薄弱等因素严重制约了款冬的育种进程和规范化栽培管理。DNA 分子标记是鉴定种质资源遗传多样性的重要方法, 也是一种重要的辅助育种手段, 目前在 DNA 分子水平对款冬种源的遗传背景、亲缘关系研究报道较少^[5]。

SSR (simple sequence repeat) 标记是由 1~6 个核苷酸组成的串联重复序列, 广泛存在于真核生物基因组中, 具有数量丰富、重复性好、共显性、操作简单等特点^[6]。然而, 传统 SSR 标记开发过程繁琐、成本高、周期长, 难以满足研究需要。近年来, 建立于第 2 代高通量测序平台上的转录组测序 (RNA-seq) 技术, 具有快速高效、成本低等优点, 除了能发现特定组织在特定时间基因表达的转录本和基因表达丰度之外, 还可运用生物信息学工具挖掘具有基因信息的 SSR 标记, 人参^[7]、党参^[8]和金银花^[9]等药用植物已运用该方法开发了大量的 EST-SSR。本研究基于前期款冬转录组测序获得的大量 unigene 序列, 运用生物信息学方法挖掘 SSR, 分析其组成、频率、分布特性, 进行可用性初步评价, 以期为款冬的遗传研究、遗传图谱构建和分子标记辅助育种等研究奠定基础。

1 材料

在款冬花主产区及野生分布区甘肃、山西、内蒙古、河北等地收集新鲜或干燥花蕾和叶样品 18 份, 新鲜花蕾带回实验室阴干。所有材料经山西中医药大学裴香萍副教授鉴定为款冬 *Tussilago farfara* L. 实验材料信息见表 1, 每份材料的干燥花蕾和叶用于 DNA 提取。

2 方法

2.1 转录组测序与 SSR 筛选

山西榆社的款冬花蕾和叶用于总 RNA 提取和后续转录组测序 (由北京百迈克生物科技有限公司进行), 测序原始数据经质量控制获得 39 912 371

表 1 不同来源款冬材料

Table 1 Tested samples from different sources

序号	编号	样品来源	生长方式
1	Nm1	内蒙古兴和县	栽培
2	Gs1	甘肃陇西县	栽培
3	Gs2	甘肃天水市	栽培
4	Gs3	甘肃岷县	栽培
5	Gs4	甘肃渭源	栽培
6	Hb1	河北蔚县	栽培
7	Sx1	山西沁源县	野生
8	Sx2	山西庞泉沟镇	野生
9	Sx3	山西和顺县	野生
10	Sx4	山西榆社县	野生
11	Sx5	山西娄烦县	野生
12	Sx6	山西宁武县	野生
13	Sx7	山西太原市	野生
14	Sx8	山西临县	野生
15	Sx9	山西兴县	野生
16	Sx10	山西中阳县	野生
17	Sx11	山西静乐县	野生
18	Sx12	山西夏县	野生

条高质量序列 (clean read), 组装出 91 118 条 unigene。选取其中长度大于 1 kb 的 18 938 序列, 使用 MISA 软件 (<http://pgrc.ikp-gatersleben.de/misa/>) 搜索 SSR 位点, 搜索标准为单、二、三、四、五和六核苷酸最少重复次数分别为 10、6、5、5、5、5, 复合 SSR (包含至少 2 个 SSR) 之间距离小于 100 bp。

2.2 引物设计

用 Primer3 软件 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 对含有 SSR 位点的序列设计引物, SSR 位点侧翼序列长度大于 100 bp, 每条 SSR 产生 3 对引物。引物设计标准: 退火温度 (T_m) 在 55~65 °C, 上、下游引物的 T_m 相差 ≤ 2 °C; PCR 产物在 100~300 bp, 引物长度 18~28 bp; GC 含量在 40%~60%, 尽量避免发卡结构、引物二聚体、错配等的出现, 对批量设计的 SSR 引物对在 unigene 库中进行 Blast 验证。随机挑选 55 对引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.3 DNA 提取与 PCR 扩增

材料基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法^[5], PCR 扩增反应体系 20 μ L: Premix Taq 酶 10 μ L (TaKaRa), 10 μ mol/L 上、下游引物各 1.0 μ L, 50

ng/ μ L 基因组 DNA 2.0 μ L, ddH₂O 6.0 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 恒定电压 220 V 电泳 1 h, 快速银染法显色, 拍照记录。

2.4 数据处理

采用人工读带的方法, 将电泳图上可重复、清晰的条带记为“1”, 同一位置无带或不易分辨的弱带记为“0”, 建立原始数据矩阵, 用 NTsys 2.10e 软件进行 UPGMA 聚类分析。

3 结果与分析

3.1 款冬转录组 SSR 位点数量与分布

对款冬转录组数据长度大于 1 kb 的 18 938 条

unigene (总碱基 37 406 030 bp) 进行 SSR 位点搜索, 在 3 844 条 unigene 中检出 4 688 个 SSR 位点, SSR 发生频率 (含 SSR 的 unigene 数与总 unigene 数之比) 为 20.30%, 出现频率 (检出 SSR 数与总 unigene 数之比) 为 24.75%, 平均每 7 979 bp 出现 1 个 SSR。其中 3 562 条 unigene 只包含单个 SSR 位点, 680 条 unigene 含有 2 个或 2 个以上的 SSR 位点, 以复合物形式存在的 SSR 位点有 219 个。款冬转录组 SSR 类型丰富, 单核苷酸至六核苷酸重复类型均存在, 但各类型数量不同, 其中三核苷酸重复最多, 占总 SSR 的 37.12%, 其次是单核苷酸和二核苷酸重复类型, 分别占 32.36% 和 28.20%, 单、二及三核苷酸重复占优势, 三者之和达 97.68%; 四、五、六核苷酸重复类型的数量极少, 分别占总数的 1.69%、0.30% 和 0.34%, 总计为 2.33% (表 2)。

表 2 款冬转录组 SSR 位点的数量及分布

Table 2 Number and distribution of SSR loci in *T. farfara* transcriptome

SSR 类型	SSR 数量	占比/%	出现频率/%	平均距离/kb	总长度/bp	平均长度/bp
单核苷酸	1 517	32.36	8.01	24.66	16 273	10.73
二核苷酸	1 322	28.20	6.98	28.30	20 110	15.21
三核苷酸	1 740	37.12	9.19	21.50	29 079	16.71
四核苷酸	79	1.69	0.42	473.49	1 704	21.57
五核苷酸	14	0.30	0.07	2 671.86	360	25.71
六核苷酸	16	0.34	0.08	2 337.88	678	42.38
总计	4 688	100.00	24.75	7.98	68 204	14.55

款冬转录组中 SSR 位点的序列总长 68 204 bp, 平均长度 14.55 bp, 其中单、二、三、四、五、六核苷酸重复 SSR 的碱基总长分别为 16 273、20 110、29 079、1 704、360、678 bp, 平均长度分别为 10.73、15.21、16.71、21.57、25.71、42.38 bp (表 2)。一般认为, SSR 长度小于 12 bp 时, 其多态性极低, 长度在 12~20 bp 时多态性中等, 长度能达到 20 bp 时, 多态性较高。款冬转录组 SSR 长度集中在 12~20 bp 的有 2 856 个, 占总数的 60.92%, ≥ 20 bp 的 SSR 553 个, 占 11.80%, < 12 bp 的 SSR 有 1 279 个, 占 27.28%, 表明本研究中款冬转录组大部分 SSR 在理论上具有中等以上的多态性。

3.2 款冬转录组 SSR 的重复数及基序特性

从重复次数来看, 款冬转录组 SSR 重复基元以重复 10 次出现的频率最高, 有 1 116 个, 占总 SSR 的 23.81%, 其次是 5 次重复和 6 次重复, 分别占总 SSR 的 23.53%、20.71% (表 3)。单核苷酸重复主要集中在 10~17 次, 其他 SSR 重复次数主要集中在 5~10 次。

款冬转录组 SSR 位点共包含 60 种重复基元, 单核苷酸至六核苷酸重复基元分别有 2、4、10、20、11 和 13 种。从出现频率来看, 单核苷酸 A/T (1 473 个) 基元出现频率最高, 占总 SSR 的 31.42%, 其次为二核苷酸基元 AG/CT (600 个) 和三核苷酸基元 ATC/ATG (451 个), 分别占 12.80%、9.62%。单核苷酸重复基元中以 A/T 最多, 占单核苷酸重复总数的 97.10%; 二核苷酸重复基元中出现最多的是 AG/CT, 占二核苷酸重复总数的 45.39%, 其次是 AC/GT、AT/AT, 分别占 29.95%、24.58%; CG/CG 出现最少, 仅有 1 个。在三核苷酸重复基元中, ATC/ATG (451) 重复基元最多, 占总三核苷酸重复基元的 25.92%, 其次是 AAG/CTT、ACC/GGT, 分别为 18.97%、17.64%。其他四、五、六核苷酸重复基元类型较多, 但每种类型数量较少, 为 1~3 个, 出现频率较低 (表 4)。

3.3 SSR 引物的设计及有效性检测

采用 Primer3 对 4 688 个 SSR 位点进行引物批量设计, 为验证引物的有效性, 随机选取合成了 55

表 3 SSR 在款冬转录组中的重复数

Table 3 Repeat numbers of SSR different repeat motifs in *T. farfara*

SSR 类型	重复基元数/个								
	5	6	7	8	9	10	11	12	≥13
单核苷酸	—	—	—	—	—	994	285	110	128
二核苷酸	—	470	275	187	191	122	67	8	2
三核苷酸	1 026	476	214	21	1	0	0	1	1
四核苷酸	54	22	0	3	0	0	0	0	0
五核苷酸	12	2	0	0	0	0	0	0	0
六核苷酸	11	1	1	0	0	0	0	1	2
总计	1 103	971	490	211	192	1 116	352	120	133
占比/%	23.53	20.71	10.45	4.50	4.10	23.81	7.51	2.56	2.84

表 4 款冬 SSR 重复基元的类型

Table 4 SSR repeat motifs in *T. farfara*

重复类型	重复基元类型数	重复基元	数量/个	发生频率/%	占总 SSR 比例/%
单核苷酸	2	A/T	1 473	7.78	31.42
		C/G	44	0.23	0.94
二核苷酸	4	AC/GT	396	2.09	8.45
		AG/CT	600	3.17	12.80
		AT/AT	325	1.72	6.93
		CG/CG	1	0.01	0.02
		AAC/GTT	153	0.81	3.26
三核苷酸	10	AAG/CTT	330	1.74	7.04
		AAT/ATT	209	0.86	4.46
		ACC/GGT	307	1.10	6.55
		ACG/CGT	29	0.15	0.62
		ACT/AGT	50	0.26	1.07
		AGC/CTG	136	0.72	2.90
		AGG/CCT	52	0.81	1.11
		ATC/ATG	451	2.38	9.62
		CCG/CGG	23	0.12	0.49
		AAAC/GTTT	4	0.02	0.09
四核苷酸	20	AAAG/CTTT	14	0.07	0.30
		AAAT/ATTT	6	0.03	0.13
		AATC/ATTG	10	0.05	0.21
		AAGG/CCTT	4	0.02	0.09
		ACAT/ATGT	5	0.03	0.11
		其余四核苷酸	36	0.19	0.77
五核苷酸	11	AAAAT/ATTTT	2	0.01	0.04
		AAACT/AGTTT	2	0.01	0.04
		AGATC/ATCGT	2	0.01	0.04
		其余五核苷酸	8	0.04	0.17
六核苷酸	13	AAGAGG/CCTCTT	2	0.01	0.04
		AAAAAG/CTTTTT	2	0.01	0.04
		ACCAGC/CTGGTG	2	0.01	0.04
		其余六核苷酸	10	0.05	0.21

对 SSR 引物,用甘肃天水及山西榆社、和顺、兴县、庞泉沟 5 个产地的款冬检测 SSR 的有效性和多态性,共有 42 对引物扩增出清晰的条带,有效扩增率为 76.36%,其中 14 对引物具多态性;其余 13 对引物无扩增产物。42 对引物均获得预期大小条带,且 41 对引物扩增的条带数多于 1 条,这可能是由于本研究开发的 SSR 标记来源于转录组数据,扩增所用模板是基因组 DNA。

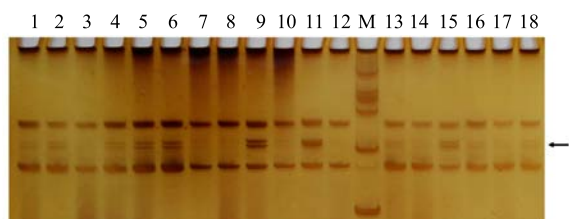
选取 14 对带型清晰稳定的多态性引物对 18 份不同款冬材料进行遗传多样性分析,共得到 65 条带,其中多态性片段 23 个,每对引物产生多态性片段 1~3 个,平均 1.64 个(表 5,图 1)。18 份款冬材料的遗传相似系数介于 0.130 4~0.826 1,

平均 0.541 1,依据遗传相似系数矩阵,采用 UPGAM 法将 18 份材料聚类为 3 类,第 I 类以内蒙古兴和、甘肃天水、河北蔚县的 3 个栽培材料和山西娄烦、兴县、中阳的野生材料聚在一起;第 II 大类以甘肃的 3 个栽培材料和山西的 7 个野生材料聚在一起,第 II 类又进一步被分为 2 个小类群,甘肃岷县、陇西、渭源的栽培材料与山西太原、临县的野生材料聚为一小类,山西沁源、庞泉沟、和顺、榆社、宁武的野生材料聚为另一小类;第 III 类以山西静乐和夏县 2 个野生材料聚为一类(图 2),可见款冬不同来源种质材料的聚类与其地理来源相关性不显著,山西野生居群的遗传基础较为丰富。

表 5 14 对 SSR 引物的扩增信息

Table 5 Information of 14 primer pairs developed from *T. farfara*

引物	引物序列 (5'→3')	重复单元	预期产物/bp	扩增带数	差异带数
Tf1	F: ATCAGCACATGTCAACGAGC R: TTGGAGGAAGAACCATCGTC	(AT) ₉	143	5	3
Tf2	F: TGAGGATTCACCTGGACACCA R: TGGTTACAACCTGTATGTGGA	(TC) ₆ tgc (CA) ₇	241	4	2
Tf3	F: AGGGCCACATATCCGTGTTA R: CGGCAGTTTAAAGTCCTTGCT	(AT) ₈	198	6	3
Tf4	F: CACCATGATTGCAGTGCTTT; R: ATGCCGATTAGCCCACATAG	(T) ₁₂	217	3	1
Tf5	F: TTAATTTGTCTGGGCCGTTAC R: TCGGGCTAGGTTATGGTCTG	(A) ₁₁	220	4	2
Tf6	F: GAGACTCATCATGGCAGCAA R: AAGAACCAATTGCACCAAGC	(T) ₁₀	201	4	2
Tf7	F: TCTGGCCAGCTGTAAGAGGT R: GCTATGGTGTGTCAGGGTTT	(GTG) ₅	184	4	2
Tf8	F: CGATCATCGATTTCAGTATT R: TTGGACGACTTTCAACCTCC	(C) ₁₀	225	4	2
Tf9	F: TAGGCCTTTCGACATTGCT R: GCTGGTTTTGATTGTCGGTT	(AAG) ₅	171	3	1
Tf10	F: GTATGCTGCTGCTGCTTGAG R: TGCTGAGGATCCAGGGATAG	(TGA) ₆	125	3	1
Tf11	F: AACAATGGCGACCAAATCAT R: CGGTCTGGAGAGTTTTGAGA	(CTA) ₅	168	4	1
Tf12	F: TGACATCTCCTTCAGGTCCC R: AGGCTATCTCTGGTGGCTCA	(TGA) ₅	189	3	1
Tf13	F: CCAAATTTATTACAAGTCCCT R: TGTTATCACGAGTTCCGCTG	(A) ₁₀	206	3	1
Tf14	F: CGCGTTATCTCTCTCTCTTT R: TGAAGGTTCCATCCGAATC	(GAT) ₅	186	6	1
总计				65	23



1~18-材料序号同表 1 M-Marker 箭头所指为多态性片段
1—18-Order of plants is the same as table 1 M-Marker Arrow indicates polymorphic fragments

图 1 SSR 引物 Tf7 对 18 份款冬材料的扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of SSR primers Tf7 in 18 different *T. farfara* varieties

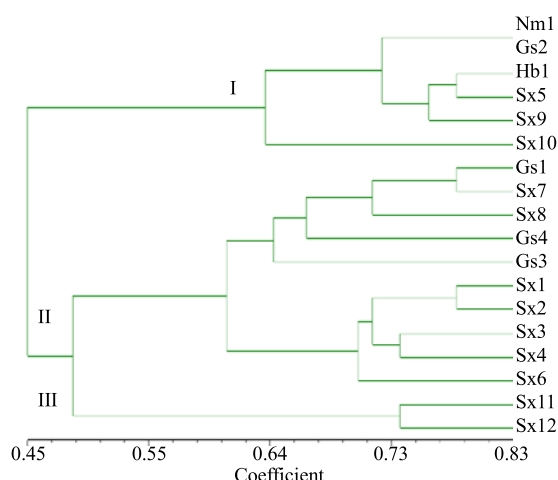


图 2 供试款冬材料的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram for tested *T. farfara*

4 讨论

在款冬转录组 ≥ 1 kb 的 18 938 条 unigene 中, 利用 MISA 软件搜索到 4 688 个 SSR 位点, 分布于 3 844 条 unigene 中, 出现频率为 24.75%, 平均每 7 979 bp 含 1 个 SSR, 与研究方法相似的转录组 SSR 进行比较分析, 发现款冬 SSR 出现频率低于灯盏花 (1/1 170 bp)^[10]、党参 (1/4 520 bp)^[8]、人参 (1/5 800 bp)^[7], 与金银花 (1/7 490 bp)^[9]、膜荚黄芪 (1/7 970 bp)^[11] 相近, 高于鱼腥草 (1/9 040 bp)^[12]、洋葱 (1/14 100 bp)^[13], 这种差别可能与所选数据库大小、SSR 搜索参数设置和物种不同等因素有关。

大量研究表明植物中二、三核苷酸出现频率最高, 但主要重复基元不同。款冬转录组单核苷酸至六核苷酸重复 6 种类型均存在, 其中三核苷酸重复 SSR 出现频率最高, 占总 SSR 位点的 37.12%, 其次是单核苷酸和二核苷酸, 分别占 32.36%、28.20%, 这与虎杖^[14]、芒果^[15]、洋葱^[13]中三核苷酸类型占优

势的特点一致, 但与党参^[8]、灯盏花^[10]、印度南瓜^[16]、中国樱桃^[17]二核苷酸 SSR 占优势的特点不同。所检测到的 SSR 中包含 60 种重复基元, 这表明款冬转录组中 SSR 类型比较丰富, 可为 SSR 的开发提供重要的资源库, 优势基元依次是 A/T (31.42%)、AG/CT (12.80%)、ATC/ATG (9.62%)。GC 重复基元在多数植物中很难见到, 出现频率均很低^[18]。本研究也发现, 款冬转录组中, C/G、CG/CG、CCG/CGG 重复基元在同类型重复中同样比较少 (表 4)。与基因组 SSR 相比, EST-SSR 反映了基因组的编码区域, 可直接获得基因表达的信息, 对于功能基因的研究利用、遗传资源评价、种质资源改良和比较基因组学研究都具有重要的价值。

选取 14 对差异引物对 18 个款冬材料进行遗传分析, 通过 UPGMA 聚类分析, 聚为 3 大类, 从分类情况看不出样品与地理分布位置、生长模式有密切联系, 比如甘肃天水和内蒙古兴和的材料相似系数最大 (0.826 1), 聚在一起, 但甘肃天水与甘肃陇西、渭源、岷县的材料却没有聚在一起, 这可能与不同地区相互间引种以及引种时种根的不确定性有关, 这与用 SRAP 标记分析的结果相类似^[5], 也从分子水平上反映了当前款冬的品种来源和生产现状。款冬的栽培主要采用根茎进行繁殖, 若是大面积引种栽培, 一般均是在周边地区或药材市场购买种根直接进行种植; 若是药农的零星栽培, 更多的是自留种或直接采集当地野生资源用于生产, 因此款冬的种源十分混杂, 主要有野生种和驯化的栽培种, 这种复杂性导致种源整齐度差, 增加了款冬种质的遗传多样性, 这种现象在其它中药材栽培中也出现, 如黄芩^[19]、党参^[20]等。款冬花经过长期的人工驯化栽培, 已经形成了规模化种植, 但种源混杂, 加上近年来土传病虫害、连作的影响, 品质、产量均下降, 提示今后必须加强良种选育和管理。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, et al. Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75(5): 158-164.
- [3] 吴琪珍, 张朝凤, 许翔鸿, 等. 款冬花化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2015, 34(2): 33-36.
- [4] 吕培霖, 李成义, 郑明霞. 甘肃款冬花资源调查报告

- [J]. 中国现代中药, 2008, 10(4): 42-43.
- [5] 贺润丽, 平莉莉, 王伦宇, 等. 不同居群款冬种质资源 SRAP 遗传多样性分析 [J]. 山西农业科学, 2014, 42(4): 321-323.
- [6] 张利达, 唐克轩. 植物 EST-SSR 标记开发及其应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 534-541.
- [7] Li C, Zhu Y, Guo X, *et al.* Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* CA Meyer [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 245-255.
- [8] 王 东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2390-2394.
- [9] 蒋 超, 袁 媛, 刘贵明, 等. 基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 803-810.
- [10] 陈 茵, 李翠婷, 姜倪浩, 等. 灯盏花转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1220-1224.
- [11] 常 越, 闫 嵩, 刘振鹏, 等. 膜荚黄芪的转录组测序质量评估及其 SSR 位点信息分析的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1430-1434.
- [12] 黎晓英, 刘胜贵, 王 丹, 等. 鱼腥草转录组 SSR 位点信息分析及其多态性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1762-1767.
- [13] 李满堂, 张仕林, 邓 鹏, 等. 洋葱转录组 SSR 信息分析及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2015, 42(6): 1103-1111.
- [14] Hao D C, Ma P, Mu J, *et al.* *De novo* characterization of the root transcriptome of a traditional Chinese medicinal plant *Polygonum cuspidatum* [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 452-466.
- [15] 罗 纯, 武红霞, 姚全胜, 等. 芒果转录组中 SSR 位点信息分析与引物筛选 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(7): 1261-1266.
- [16] 王洋洋, 单文琪, 徐文龙, 等. 印度南瓜转录组 SSR 信息分析及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2016, 43(3): 578-586.
- [17] 宗 宇, 王 月, 朱友银, 等. 基于中国樱桃转录组的 SSR 分子标记开发与鉴定 [J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1566-1576.
- [18] 李 清, 李 标, 郭顺星. 金钗石斛转录组 SSR 位点信息分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 63-69.
- [19] 陈妮颖, 刘 娟, 袁 媛, 等. 黄芩 bHLH 转录因子基因家族生物信息学及表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 671-677.
- [20] 刘新星, 石有太, 罗俊杰, 等. 轮叶党参 EST-SSR 标记的开发及在党参属中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3110-3115.