

# 基于 *AOX1* 和 *MCM5* 基因水芹地方品种的遗传关系分析及‘玉祁红芹’ISSR-SCAR 标记建立

王月<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 陈闽<sup>1</sup>, 张艳梅<sup>1</sup>, 孙小芹<sup>1</sup>, 杭悦宇<sup>1</sup>, 周广灿<sup>1,2,①</sup>

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 菏泽学院农业与生物工程学院, 山东 菏泽 274015]

**摘要:** 基于低拷贝核基因 *AOX1* 和 *MCM5* 的扩增结果, 对采自南京的水芹 [*Oenanthe javanica* (Bl.) DC.] 野生种和太湖流域 6 个地方品种进行了遗传多样性分析, 并基于 ISSR 标记开发了两步法鉴定‘玉祁红芹’(‘Yuqihongqin’) 的 SCAR 标记。结果显示: 水芹 6 个地方品种的 *AOX1* 基因中检测到 22 个 SNP 位点和 7 个 InDel 位点; *MCM5* 基因中检测到 33 个 SNP 位点, 其中 3 个位于编码区且均为同义突变, 还有 1 个位于非编码区的 InDel 位点。与 *MCM5* 基因相比, *AOX1* 基因提供的信息位点更多, 基于 *AOX1* 基因构建的水芹野生种和 6 个地方品种的 ML 遗传关系树的支持率相对较高; 其中‘玉祁红芹’、‘苏州圆叶芹’(‘Suzhouyuanyeqin’) 和‘梅南水芹’(‘Meinanshuiqin’) 的遗传关系较近, 而‘常熟白芹’(‘Changshubaiqin’)、‘溧阳白芹’(‘Liyangbaiqin’) 和‘江阴青芹’(‘Jiangyinqingqin’) 的遗传关系较近。基于 ISSR-880 引物扩增得到‘溧阳白芹’的特异性片段, 设计的第 1 对 SCAR 引物鉴定出‘玉祁红芹’和‘溧阳白芹’2 个地方品种, 再利用 ISSR-836 引物扩增得到‘玉祁红芹’特异性片段, 设计的第 2 对 SCAR 引物在‘玉祁红芹’所有单株中扩增出特异性条带, 而在‘溧阳白芹’所有单株中均未出现此条带。本研究开发的两步法鉴别‘玉祁红芹’的 ISSR-SCAR 标记可为水芹其他地方品种的鉴定、保存和利用提供参考。

**关键词:** 水芹; ‘玉祁红芹’; *AOX1* 基因; *MCM5* 基因; 遗传关系; ISSR-SCAR 标记

中图分类号: Q946-33; S645.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2021)04-0059-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2021.04.06

**Analysis on genetic relationship of local cultivars of *Oenanthe javanica* based on *AOX1* and *MCM5* genes and establishment of ISSR-SCAR marker for ‘Yuqihongqin’** WANG Yue<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, CHEN Min<sup>1</sup>, ZHANG Yanmei<sup>1</sup>, SUN Xiaolin<sup>1</sup>, HANG Yueyu<sup>1</sup>, ZHOU Guangcan<sup>1,2,①</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Agricultural and Biological Engineering, Heze University, Heze 274015, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2021, 30(4): 50-59

**Abstract:** The genetic diversity of wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. collected from Nanjing and 6 local cultivars in Taihu Lake basin was analyzed based on the amplification results of low copy nuclear gene *AOX1* and *MCM5*, and SCAR markers of a two-step identification method for ‘Yuqihongqin’ were developed based on ISSR markers. The results show that 22 SNP loci and 7 InDel loci are detected in *AOX1* gene in 6 local cultivars of *O. javanica*; 33 SNP loci are detected in *MCM5* gene, in which, 3 SNP loci are synonymic mutations and located in coding region, and 1 InDel locus is located in non-coding region. Compared with *MCM5* gene, *AOX1* gene provides more information sites, and the support rate of ML genetic relationship tree of wild species and 6 local cultivars of *O. javanica* based on *AOX1* gene is relatively high; in which, the genetic relationship of ‘Yuqihongqin’,

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20200292; BK20180316)

作者简介: 王月(1988—), 女, 江苏宿迁人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子遗传与进化方面的研究。

①通信作者 E-mail: zgcan2009@163.com

引用格式: 王月, 刘佳, 陈闽, 等. 基于 *AOX1* 和 *MCM5* 基因水芹地方品种的遗传关系分析及‘玉祁红芹’ISSR-SCAR 标记建立[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(4): 50-59.

‘Suzhouyuanyeqin’, and ‘Meinanshuiqin’ is relatively close, and that of ‘Changshubaiqin’, ‘Liyangbaiqin’, and ‘Jiangyinqingqin’ is relatively close. The specific fragment of ‘Liyangbaiqin’ is amplified with ISSR-880 primer, and 2 local cultivars of ‘Yuqihongqin’ and ‘Liyangbaiqin’ are identified with the first designed pair of SCAR primers. Afterwards, the specific fragment of ‘Yuqihongqin’ is amplified by using ISSR-836 primer, and specific bands can only be amplified in all individuals of ‘Yuqihongqin’ with the second designed pair of SCAR primers, while these bands are not appearing in all individuals of ‘Liyangbaiqin’. The ISSR-SCAR markers of the two-step identification method for ‘Yuqihongqin’ developed in this study can provide references for the identification, preservation, and utilization of other local cultivars of *O. javanica*.

**Key words:** *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; ‘Yuqihongqin’; *AOX1* gene; *MCM5* gene; genetic relationship; ISSR-SCAR marker

水芹 [*Oenanthe javanica* (Bl.) DC.] 为多年生草本植物,水生,不仅是富含维生素、矿物质和膳食纤维的蔬菜<sup>[1]</sup>,也是具有降血压<sup>[2-3]</sup>、降血脂<sup>[3-4]</sup>和抗癌<sup>[5]</sup>功效的药用植物。江苏太湖流域作为水芹主产区之一,拥有大量的、具有早熟和耐寒等优良性状的地方品种,如‘常熟白芹’(‘Changshubaiqin’)、‘苏州圆叶芹’(‘Suzhouyuanyeqin’)、‘溧阳白芹’(‘Liyangbaiqin’)、‘玉祁红芹’(‘Yuqihongqin’)、‘江阴青芹’(‘Jiangyinqingqin’)和‘梅南水芹’(‘Meinanshuiqin’)等,均为水芹遗传育种和品种改良的重要种质资源。

植物遗传多样性研究是植物育种和遗传保护的重要基础<sup>[6]</sup>。在分子标记开发和应用方面,相对于叶绿体 DNA 和细胞核 rDNA,低拷贝核基因具有进化速率更快、含双亲的遗传物质和积累多个非连锁位点的潜力等<sup>[7-8]</sup>优势。近年来,*AOX1* 和 *MCM5* 等低拷贝核基因被广泛用于植物遗传关系分析<sup>[9-11]</sup>。

上述地方品种中,‘玉祁红芹’原产于江苏无锡和常州一带,株高 40 cm,生长势强、基部粗壮,低温时全株叶片变紫红色,耐寒性强;嫩茎和软化叶鞘质地柔嫩,纤维少、蛋白质含量高,是水芹杂交育种中常用的、重要的亲本材料<sup>[12]</sup>。由于水芹大部分品种的植株、花和果实形态相似,通过形态学鉴别方法难以将‘玉祁红芹’与其他地方品种有效区分。随着生物技术的发展,分子标记已成为鉴别植物种类的重要辅助手段<sup>[13-14]</sup>。研究水芹地方品种间的遗传多样性以及开发鉴定‘玉祁红芹’的分子标记均有助于更好地开发水芹种质资源。

基于前人研究结果<sup>[15-16]</sup>,本研究比较了水芹野生种以及‘常熟白芹’、‘苏州圆叶芹’、‘溧阳白芹’、‘玉祁红芹’、‘江阴青芹’和‘梅南水芹’6个地方品

种中 *AOX1* 和 *MCM5* 基因的变异特征,并构建了对应的最大似然法(maximum likelihood, ML)遗传关系树;此外,结合 ISSR-SCAR 技术,开发‘玉祁红芹’的特异性分子标记,以期作为水芹杂交育种中亲本选择和杂交后代优势预测提供分子基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试水芹野生种采自南京中山植物园;6个地方品种采自苏州市漕湖蔬菜产业园,包括‘常熟白芹’、‘苏州圆叶芹’、‘溧阳白芹’、‘玉祁红芹’、‘江阴青芹’和‘梅南水芹’。每种材料采集8个单株,取幼嫩且无病虫害的干净叶片,硅胶干燥后保存、备用。

### 1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取水芹野生种和地方品种各单株叶片的总 DNA,提取的总 DNA 样品经检测后置于 -20 °C 保存、备用。

1.2.2 *AOX1* 和 *MCM5* 基因的 PCR 扩增 以伞形科胡萝卜 (*Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.) 的 *AOX1* (DCAR\_028361) 和 *MCM5* (DCAR\_014827) 基因作为查询序列,在水芹转录组数据库中搜寻同源序列并在该基因的非保守区域两端设计引物。扩增水芹 *AOX1* 基因所用上游和下游引物的序列分别为 5'-ATGTTGATGCGTCATGGCACT-3' 和 5'-CGAAGCAAAGTGGTTAACATCTC-3', 扩增水芹 *MCM5* 基因序列所用上游和下游引物的序列分别为 5'-GCAGTTGCAGTTAGACAGCC-3' 和 5'-CATCGATGCAGACAACCTCCAC-3'。以提取的水芹总 DNA 为模板进行 PCR 分析。PCR 扩增体系总体积 25.0 μL,包括 20 ng 模板 DNA、0.2 μmol · L<sup>-1</sup> 上游和下游引物、1.5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、0.5

mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs、50 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.3) 以及 1 U 高保真 PCR 聚合酶 PrimeSTAR[宝生物工程(大连)有限公司]。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s、53 °C ~55 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 2 min,35 个循环;最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳 (2 000 bp DNA Ladder, 电压 100 V, 电泳 0.5 h) 后,溴化乙锭 (EB) 染色,用 Tanon 3500 全自动数码凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)观察、拍照。

**1.2.3 扩增产物的克隆、测序及数据分析** PCR 扩增产物纯化后,连接到 pMD19-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司],然后将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选后,挑取单菌落进行 PCR 检验,将阳性克隆交由上海华大基因生物科技有限公司测序。使用 Sequencher 4.5 软件对测序结果进行拼接,通过 MEGA5.0 软件对序列进行排序和手动校正。使用 MEGA5.0 软件对核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性进行分析。用胡萝卜基因组 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 中的 *AOX1*、*AOX2a* (DCAR\_021859)、*AOX2b* (DCAR\_029210)、*MCM5* 和 *MCM3* (DCAR\_021877) 基因作为外类群,构建 ML 遗传关系树分析各材料间的遗传关系。每种材料选择 5 个单株用于遗传关系分析。

**1.2.4 ‘玉祁红芹’特异性分子标记的建立**

**1.2.4.1 ISSR-SCAR 特异性条带的克隆及测序** 使用 ISSR-880 引物(5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3')对 6 个地方品种 8 个单株总 DNA 的混合样进行扩增,PCR 扩增体系和扩增程序同“1.2.2”。PCR 扩增产物经质量体积分数 2% 琼脂糖凝胶电泳 (2000 bp DNA Ladder, 电压 80 V, 电泳 1.5 h) 后,EB 染色,用上述凝胶成像分析系统观察、拍照。选择在‘溧阳白芹’中扩增出的特异性条带切胶回收,将回收产物连接到 pMD19-T 载体,然后将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。挑取单菌落进行 PCR 检验,将阳性克隆交由南京锐真生物技术有限公司测序。根据 DNA 序列分析结果,设计 1 对 SCAR 引物用于后续反应。

**1.2.4.2 ISSR-SCAR 标记的验证** 使用上述合成的 SCAR 引物对 6 个地方品种所有单株进行特异性验证。PCR 扩增体系总体积 20.0  $\mu$ L,包括 20 ng ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> 模板 DNA 1.0  $\mu$ L、2 $\times$ Reaction Mix (含 20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl、100 mmol · L<sup>-1</sup> KCl、3 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 和

400  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> dNTPs) 10.0  $\mu$ L、10 mmol · L<sup>-1</sup> 上游和下游引物各 0.8  $\mu$ L 以及 2.5 U ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> *Taq* DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L,最后用双蒸水补足至 20.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s、55 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后于 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物的检测方法同“1.2.2”。

按照上述步骤使用 ISSR-836 引物(5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3')进一步对‘溧阳白芹’和‘玉祁红芹’进行特异性条带的克隆、测序及验证。

## 2 结果和分析

### 2.1 *AOX1* 和 *MCM5* 基因变异位点分析

**2.1.1 *AOX1* 基因变异位点分析** 克隆和测序结果显示:水芹野生种和 6 个地方品种各单株均可扩增出 *AOX1* 基因,野生种扩增出 2 条条带,长度分别为 1 112 和 1 305 bp;6 个地方品种均扩增出 1 条条带,长度为 1 305 ~ 1 316 bp。其中,编码区长度为 885 bp。水芹野生种和地方品种中 *AOX1* 基因的变异位点见表 1,*AOX1* 基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性见表 2。

结果(表 1)显示:水芹野生种和 6 个地方品种 *AOX1* 基因中共检测到 22 个 SNP 位点和 7 个插入/缺失 (InDel) 位点。上述 SNP 位点和 InDel 位点在水芹野生种 *AOX1a* 和 *AOX1b* 基因中的排列模式差异较大,表明已发生遗传分化。其中,*AOX1b* 基因与 6 个地方品种 *AOX1* 基因的相似性更高,且变异位点和变异模式也相似。与 *AOX1b* 基因相比,*AOX1a* 基因内含子 1 中有 11 bp 的插入(318~328 位点)。

结果(表 2)显示:与水芹野生种 *AOX1a* 基因相比较,*AOX1b* 基因与 6 个地方品种 *AOX1* 基因的核苷酸序列的相似性无明显差异,而编码氨基酸序列的相似性较高,相似性为 99.0%~100.0%。不同地方品种间,‘常熟白芹’、‘溧阳白芹’和‘江阴青芹’间 *AOX1* 基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列相似性均较高,分别为 99.9%~100.0% 和 100.0%;‘玉祁红芹’与‘苏州圆叶芹’和‘梅南水芹’*AOX1* 基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性也较高,分别为 99.8%~99.9% 和 99.7%。

**2.1.2 *MCM5* 基因变异位点分析** 克隆和测序结果显示:水芹野生种和 6 个地方品种 *MCM5* 基因的长度为 1 432 或 1 433 bp。水芹野生种和地方品种中

表1 水芹野生种和地方品种AOX1基因变异位点的比较

Table 1 Comparison on variation loci of AOX1 gene in wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.

材料 <sup>1)</sup> Material <sup>1)</sup>	单株号 No. of individual	各位点的碱基 <sup>3)</sup> Base at each site <sup>3)</sup>															
		64	81	137	141	161	213	315	318-328	348	413	504	519	538	539	545	
WS	1-5 <sup>a2)</sup>	A	C	C	C	C	G	A	I	G	G	A	A	G	A	G	
	1-5 <sup>b2)</sup>	G	T	A	T	·	A	G	-	A	A	G	G	A	G	·	
CSBQ	1-5	G	T	A	T	·	A	G	-	A	A	G	G	A	G	·	
SZYYQ	1	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	
	2-4	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	
LYBQ	1-5	G	T	A	T	·	A	G	-	A	A	G	G	A	G	·	
YQHq	1	G	T	A	T	·	A	·	·	A	·	·	·	·	·	C	
	2	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	
	3,4	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	
	5	G	T	A	T	·	A	·	·	A	·	·	·	·	·	C	
JYQQ	1-5	G	T	A	T	·	A	G	-	A	A	G	G	A	G	·	
MNSQ	1,4,5	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	
	2,3	G	T	A	T	A	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	

材料 <sup>1)</sup> Material <sup>1)</sup>	单株号 No. of individual	各位点的碱基 <sup>3)</sup> Base at each site <sup>3)</sup>														
		560	570	577	637	760	803	804	810	899	1 125	1 140	1 221	1 228	1 236	
WS	1-5 <sup>a2)</sup>	-	-	-	-	G	-	-	T	A	C	C	T	C	T	
	1-5 <sup>b2)</sup>	G	A	T	A	A	-	A	A	T	T	G	C	·	G	
CSBQ	1-5	G	A	T	A	A	-	A	A	T	T	G	C	·	G	
SZYYQ	1	T	T	A	-	A	-	T	·	T	·	·	·	T	G	
	2-4	T	T	A	-	A	-	A	·	T	·	·	·	·	G	
LYBQ	1-5	G	A	T	A	A	-	A	A	T	T	G	C	·	G	
YQHq	1	T	T	A	-	A	A	T	·	T	·	·	·	T	G	
	2	T	T	A	-	A	A	T	·	T	·	·	·	·	G	
	3,4	T	T	A	-	A	-	A	·	T	·	·	·	·	G	
	5	T	T	A	-	A	-	T	·	T	·	·	·	T	G	
JYQQ	1-5	G	A	T	A	A	-	A	A	T	T	G	C	·	G	
MNSQ	1,4,5	T	T	A	-	A	-	T	·	T	·	·	·	T	G	
	2,3	T	T	A	-	A	-	-	·	T	·	·	·	T	G	

<sup>1)</sup> WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanye qin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQHq: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’.

<sup>2)</sup> 1-5<sup>a)</sup>和1-5<sup>b)</sup>分别表示扩增出AOX1a和AOX1b基因的水芹野生种1~5号单株1-5<sup>a)</sup>和1-5<sup>b)</sup> represent individuals No. 1 to 5 of wild species of *O. javanica* which AOX1a and AOX1b genes are amplified.

<sup>3)</sup> 以水芹野生种AOX1a基因为基准, “·”表示一致性位点,“-”表示InDel位点 Based on AOX1a gene of wild species in *O. javanica*, “·” represents the concordant site, and “-” represents the InDel site. I: TTATTATAGTC.

表2 水芹野生种和地方品种AOX1基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性<sup>1)</sup>

Table 2 Similarity of nucleotide sequences of AOX1 genes and their encoded amino acid sequences in wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.<sup>1)</sup>

各材料 AOX1 基因 AOX1 gene in each material	序列相似性/% Sequence similarity							
	WS-AOX1a	WS-AOX1b	CSBQ-AOX1	SZYYQ-AOX1	LYBQ-AOX1	YQHq-AOX1	JYQQ-AOX1	MNSQ-AOX1
WS-AOX1a	—	98.6	98.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.3
WS-AOX1b	98.3	—	99.9	99.3	100.0	99.3	100.0	99.0
CSBQ-AOX1	98.3	100.0	—	99.1	99.9	99.2	99.9	98.8
SZYYQ-AOX1	99.2	98.9	98.9	—	99.3	99.7	99.3	99.7
LYBQ-AOX1	98.3	100.0	100.0	98.9	—	99.3	100.0	99.0
YQHq-AOX1	99.1	98.9	98.9	99.9	98.9	—	99.3	99.7
JYQQ-AOX1	98.3	100.0	100.0	98.9	100.0	98.9	—	99.0
MNSQ-AOX1	99.1	98.8	98.8	99.9	98.8	99.8	98.8	—

<sup>1)</sup> WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanye qin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQHq: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’. “—”上方和下方的数据分别为氨基酸序列和核苷酸序列的相似性 The datums above and under “—” are similarity of amino acid sequence and nucleotide sequence, respectively.

*MCM5* 基因的变异位点见表 3, *MCM5* 基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性见表 4。

结果显示:水芹野生种和 6 个地方品种 *MCM5* 基

因中共检测到 33 个 SNP 位点和 1 个位于非编码区的 InDel 位点。基于 *MCM5* 基因的 SNP 位点总体可将供试 7 种水芹材料分为 3 组,第 1 组仅包括水芹野

表 3 水芹野生种和地方品种 *MCM5* 基因变异位点的比较

Table 3 Comparison on variation loci of *MCM5* gene in wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.

材料 <sup>1)</sup> Material <sup>1)</sup>	单株号 No. of individual	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at each site <sup>2)</sup>																	
		155	170	263	285	311	312	322	388	399	407	448	458	490	594	614	848	859	860
WS	1,3,5	T	T	A	A	T	T	G	C	G	G	C	G	G	A	C	C	A	A
	2,4	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	T	A	.	.	.	.	.
CSBQ	1-5	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	T	A	.	.	A	T	.
	SZYYQ	1-3	.	.	.	.	.	C	A	.	T	.	.	T	A	.	.	A	T
LYBQ	4,5	.	.	.	.	C	.	A	.	T	.	.	T	A	.	.	A	T	.
	1-5	C	C	-	C	.	.	.	.	.	A	.	T	A	G	T	A	T	.
YQHQ	1,3,4	C	C	-	C	.	.	.	T	.	A	.	T	A	G	T	A	T	G
	2,5	C	C	-	C	.	.	.	.	.	A	T	T	A	G	T	A	T	G
JYQQ	1-5	C	C	-	C	.	.	.	.	.	A	.	T	A	G	T	A	T	G
	MNSQ	1-5	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	A	.	.	A	T	.

材料 <sup>1)</sup> Material <sup>1)</sup>	单株号 No. of individual	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at each site <sup>2)</sup>																	
		881	929	941	956	1 004	1 005	1 008	1 013	1 025	1 046	1 112	1 158	1 273	1 329	1 333	1 346		
WS	1,3,5	A	C	G	T	A	C	T	G	A	C	G	G	A	C	G	T		
	2,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
CSBQ	1-5	.	T	A	.	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.		
	SZYYQ	1-3	.	T	A	.	.	T	.	.	.	A	T	.	.	.	.		
LYBQ	4,5	.	T	A	.	.	T	.	.	G	.	A	T	.	.	.	.		
	1-5	.	T	A	.	.	T	.	.	.	.	A	T	G	A	A	.		
YQHQ	1,3,4	.	T	A	C	T	.	A	T	.	A	A	.	.	.	.	C		
	2,5	.	T	A	C	T	.	A	T	.	A	A	.	.	.	.	C		
JYQQ	1-5	G	T	A	C	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	C		
	MNSQ	1-5	.	T	A	.	.	T	.	.	.	A	T	.	.	.	.		

<sup>1)</sup> WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQHQ: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’.

<sup>2)</sup> 以水芹野生种 *MCM5* 基因为基准,“.”表示一致性位点,“-”表示 InDel 位点 Based on *MCM5* gene in wild species of *O. javanica*, “.” represents the concordant site, and “-” represents the InDel site.

表 4 水芹野生种和地方品种 *MCM5* 基因的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的相似性<sup>1)</sup>

Table 4 Similarity of nucleotide sequences of *MCM5* genes and their encoded amino acid sequences in wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.<sup>1)</sup>

各材料 <i>MCM5</i> 基因 <i>MCM5</i> gene in each material	序列相似性/% Sequence similarity						
	WS- <i>MCM5</i>	CSBQ- <i>MCM5</i>	SZYYQ- <i>MCM5</i>	LYBQ- <i>MCM5</i>	YQHQ- <i>MCM5</i>	JYQQ- <i>MCM5</i>	MNSQ- <i>MCM5</i>
WS- <i>MCM5</i>	—	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
CSBQ- <i>MCM5</i>	99.7	—	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
SZYYQ- <i>MCM5</i>	99.6	99.9	—	100.0	100.0	100.0	100.0
LYBQ- <i>MCM5</i>	99.2	99.5	99.4	—	100.0	100.0	100.0
YQHQ- <i>MCM5</i>	99.1	99.2	99.2	99.3	—	100.0	100.0
JYQQ- <i>MCM5</i>	99.4	99.7	99.6	99.4	99.3	—	100.0
MNSQ- <i>MCM5</i>	99.7	100.0	99.9	99.5	99.3	99.7	—

<sup>1)</sup> WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQHQ: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’. “—”上方和下方的数据分别为氨基酸序列和核苷酸序列的相似性 The datums above and under “—” are similarity of amino acid sequence and nucleotide sequence, respectively.

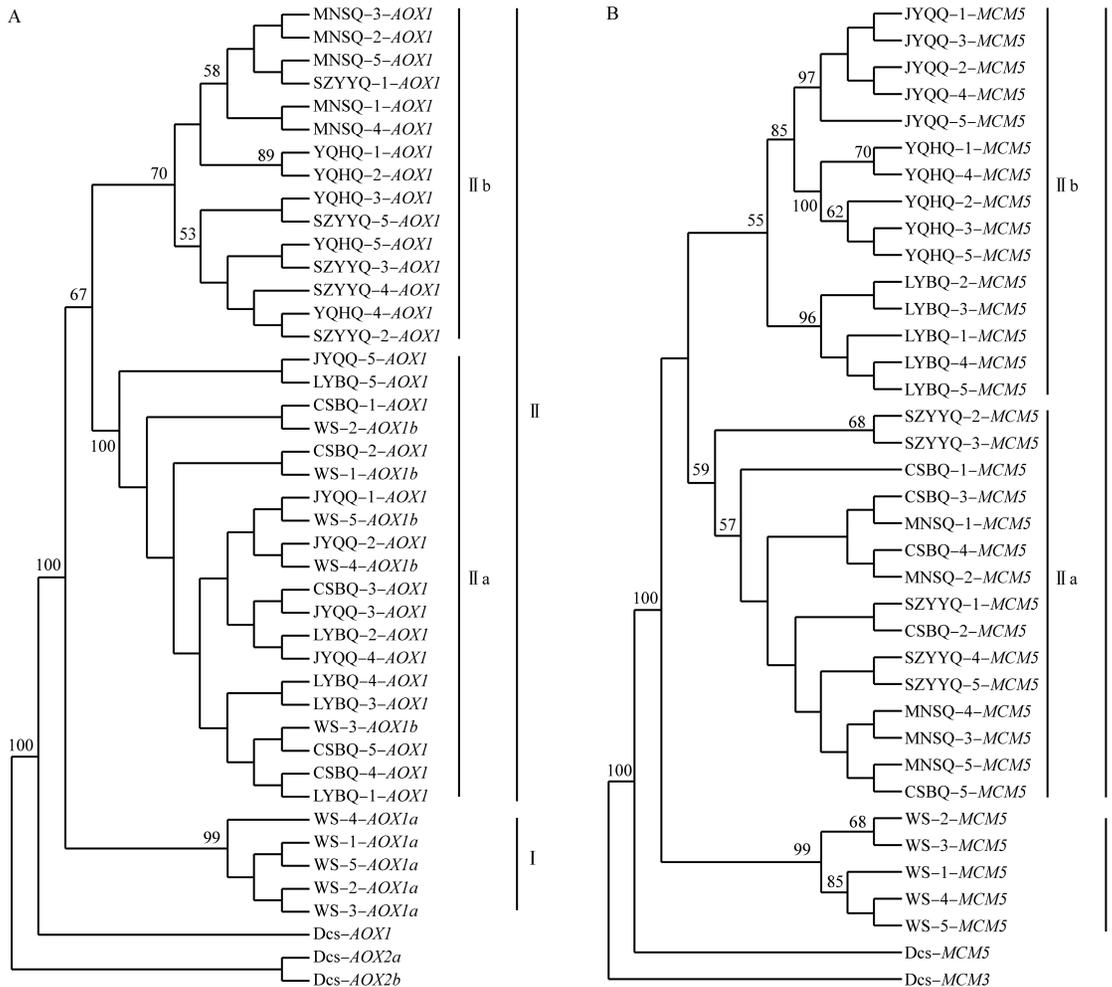
生种,第2组包括‘溧阳白芹’、‘玉祁红芹’和‘江阴青芹’,第3组包括‘常熟白芹’、‘苏州圆叶芹’和‘梅南水芹’。水芹野生种和6个地方品种 MCM5 基因的核苷酸序列相似性为99.1%~100.0%,编码氨基酸序列的相似性达100.0%。总体而言,与 AOX1 基因相比,供试水芹材料的 MCM5 基因较保守。

2.2 水芹野生种和地方品种间的遗传关系分析

基于 AOX1 和 MCM5 基因构建水芹野生种和地方品种的 ML 遗传关系树见图1。结果显示:AOX1 基因的 ML 遗传关系树(图1-A)先分为2个单系遗传分支,其中,水芹野生种的 AOX1a 基因组成基部分支 I ,AOX1b 基因与6个地方品种的 AOX1 基因组成分

支 II。单系遗传分支 II 可进一步分为2个亚支,其中,亚支 II a 由水芹野生种的 AOX1b 基因及‘常熟白芹’、‘溧阳白芹’和‘江阴青芹’的 AOX1 基因组成,显示6个地方品种的 AOX1 基因是野生种 AOX1b 基因的直系同源基因;亚支 II b 由‘苏州圆叶芹’、‘玉祁红芹’和‘梅南水芹’的 AOX1 基因组成。

MCM5 基因的 ML 遗传关系树(图1-B)的主要结构与 AOX1 基因的 ML 遗传关系树相同,先分为2个分支,水芹野生种的 MCM5 基因位于遗传关系树的基部分支 I ,6个地方品种的 MCM5 基因组成分支 II。分支 II 进一步分为2个亚支,但是2个亚支的组成与 AOX1 基因的遗传关系树不同,亚支 II a 由‘常

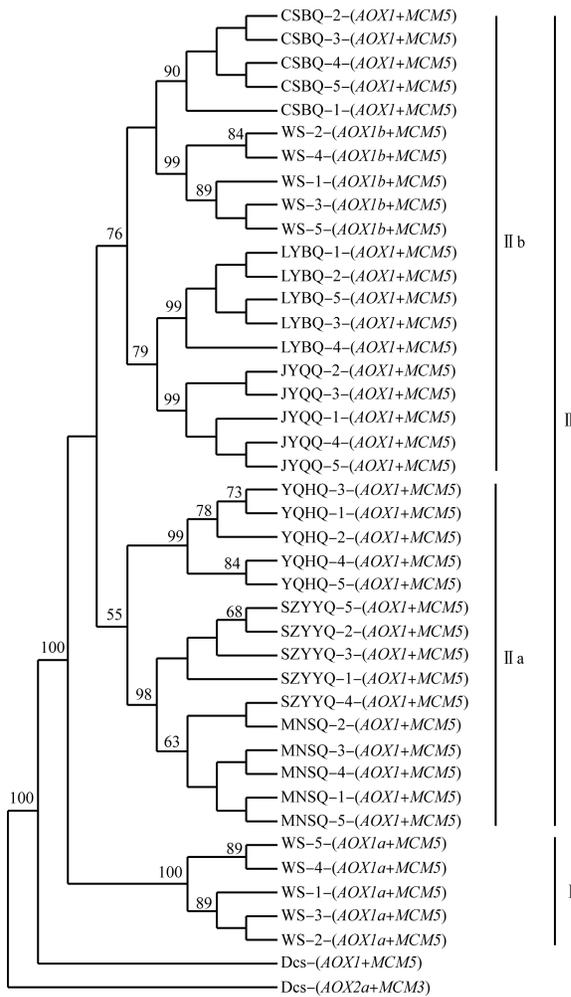


分支上数据表示基于1 000次重复的支持率(%),仅显示支持率大于50%的数据 The datums on the branches represent the support rate (%) based on 1 000 repeats, and show the support rate greater than 50% only. WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQHQ: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyinqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’; Dcs: 胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.

图1 基于 AOX1 (A) 和 MCM5 (B) 基因构建的水芹野生种和地方品种的 ML 遗传关系树  
Fig. 1 ML genetic relationship tree of wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on AOX1 (A) and MCM5 (B) genes

熟白芹’、‘苏州圆叶芹’和‘梅南水芹’组成,亚支 II b 由‘溧阳白芹’、‘玉祁红芹’和‘江阴青芹’组成。

进一步将 AOX1 和 MCM5 基因手动拼接,构建水芹野生种和地方品种的 ML 遗传关系树(图 2)。结果显示:该遗传关系树的结构与 AOX1 基因的遗传关系树相似,水芹野生种的 AOX1a 和 MCM5 基因拼接后组成分支 I,分支 II 中‘玉祁红芹’、‘苏州圆叶芹’



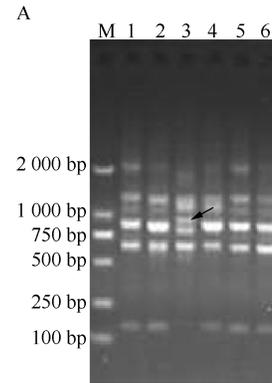
分支上数据表示基于 1 000 次重复的支持率(%),仅显示支持率大于 50%的数据 The datums on the branches represent the support rate (%) based on 1 000 repeats, and show the support rate greater than 50% only. WS: 水芹野生种 Wild species of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC.; CSBQ: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; SZYYQ: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; LYBQ: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; YQH: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; JYQ: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; MNSQ: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’; Des: 胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.

图 2 基于 AOX1 和 MCM5 基因拼接后构建的水芹野生种和地方品种的 ML 遗传关系树 Fig. 2 ML genetic relationship tree of wild species and local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on spliced AOX1 and MCM5 genes

和‘梅南水芹’的 AOX1 和 MCM5 基因拼接后组成亚支 II a,野生种的 AOX1b 和 MCM5 基因拼接后以及‘常熟白芹’、‘溧阳白芹’和‘江阴青芹’的 AOX1 和 MCM5 基因拼接后组成亚支 II b。

### 2.3 ‘玉祁红芹’特异性分子标记的建立

基于 ISSR-880 引物水芹地方品种的 PCR 扩增结果及特异性片段的序列和 SCAR 引物位点见图 3。结果显示:基于 ISSR-880 引物,‘溧阳白芹’扩增出长度约 900 bp 的特异性条带(图 3-A),将该特异性条带切胶回收、克隆测序,得到长度为 1 148 bp 的序列(图 3-B)。根据该序列设计第 1 对 SCAR 引物 3-



B

5'-GTCGACGATTGGAGAGGAGAGGAGATCATTGGTTTATCATATTAAGTCCGGAAGAGTTTAGGTAAGACTTTCTCGTTATTTACTAGACATCTAGGCGAACCGGCATAGCGCTTCGCTCCGGTTCTTCGGAAGAAAGTAAAGAGAAAGAACTGGTCAACTCCTAGGATCGGGTTGACACATCCATAGGACTGTGAGTCCAACTGTGGCTACATCGAAGAGTTTGGAAAGAATTTCGGGAACAGAAGGACTCGTGATTCCTGAACTGGAGTTCAGTAGACCTATTCACCACGGTCCACTCGGCGGTAGCCCTGCATTTTGATAGTCAAAAAGCCAAGTACTTAAAGCCTTATCAGTTAGACCATTTCGCAATTAATTTGTCCTATAATAATAACGTTTATTGAATAATCAATTGACATAAAGGTTTATCAAAAAGAAACATGTATTCGCTCTAGGGCACCTACACCAACAATCTCCACTTGCACCTAGAGCCAATCACCATGGATCTAGTACCCATGGAACACTAGTGTGACCGTCTGCTTCTTCTGCACAAAGCCTTTGGTCAGTGGGTCTGCAATGTATCATTTGTGTGCACTTTACATATATGATGTCACCCCTCCATTAATCTCCTCAGATGAGTGATATCTTTGAGTATATGTTTGGTTCGGGAGTGAGCTCTAGGTTCTTAGCTTGTCAATGGCTCCATTTATTCGCGAGTATAGATCAATGGGATCTGTAATGATGGAACCACTCCCAAATGATGTAATGAAATTTCAAATCCAAACAGCTTCTTAGCTGCTTCAAGCTGCAATGTAAGTACTCAGCCATTCATTGTAGAATTAGTACTGTTTCTGCTTTGAACTCTTCCAACCTACAGTACCTCCGTTTAGACAAAACACAAAACACTAGACTGTGATACAGTACCTCCCTGTCTTTGGAAATTTGCATCAGTGAACCTTTTCAACCAGTTTCTCTCTCTCTCCAATCTCTAGA-3'

M: 2 000 bp DNA Ladder; 1: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; 2: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; 3: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; 4: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; 5: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyingqingqin’; 6: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’. 箭头示特异性条带 The arrow shows the specific band. 下划线示 SCAR 引物位点 The underlines show SCAR primer sites.

图 3 基于 ISSR-880 引物水芹地方品种的 PCR 扩增结果(A)及特异性片段的序列和 SCAR 引物位点(B) Fig. 3 PCR amplification result of local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on ISSR-880 primer (A) and sequence of specific fragment and SCAR primer sites (B)

880-F (5'-GGAAGAGTTTAGGTAAGACTTTCTCG-3')和3-880-R(5'-GGTTGTAAGGTTACTGATGC-3'),分别对应‘溧阳白芹’特异性片段全序列的

50~75及1096~1119位点。

采用上述SCAR引物对6个地方品种的所有单株进行验证,结果见图4。结果显示:‘溧阳白芹’和



M: 2 000 bp DNA Ladder; 1-8: ‘常熟白芹’ ‘Changshubaiqin’; 9-16: ‘苏州圆叶芹’ ‘Suzhouyuanyeqin’; 17-24: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; 25-32: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’; 33-40: ‘江阴青芹’ ‘Jiangyinqingqin’; 41-48: ‘梅南水芹’ ‘Meinanshuiqin’.

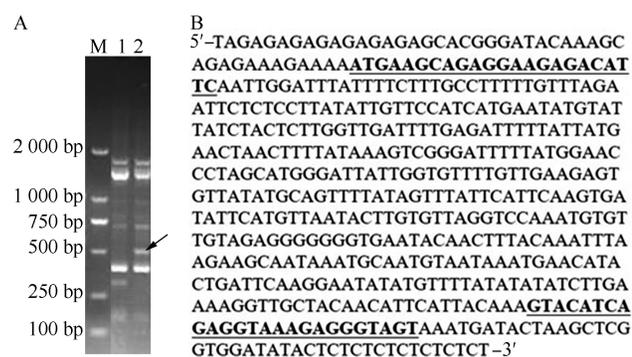
图4 基于第1对SCAR引物水芹地方品种单株的扩增结果

Fig. 4 Amplification result of individuals of local cultivars of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on the first pair of SCAR primers

‘玉祁红芹’的8个单株中均扩增出1条清晰的、长度为1069 bp的条带,其他4个地方品种的所有单株中均未扩增出该特异性条带。

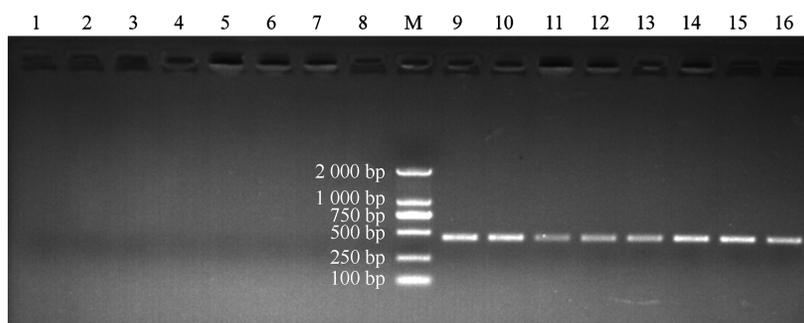
为了进一步区分‘溧阳白芹’和‘玉祁红芹’,采用ISSR-836引物进行扩增,将‘玉祁红芹’长度约500 bp的特异性条带(图5-A)切胶回收、克隆测序,得到长度为514 bp的序列(图5-B)。根据该序列设计第2对SCAR引物4-836-F(5'-ATGAAGCAGGAAAGAGACATTC-3')和4-836-R(5'-ACTACCCTTTACCTCTGATGTAC-3'),分别对应‘玉祁红芹’特异性片段全序列的45~67和448~472位点。

采用这对SCAR引物对‘玉祁红芹’和‘溧阳白芹’的所有单株进行验证,结果见图6。结果显示:‘玉祁红芹’8个单株均可扩增出1条清晰的、长度为428 bp的条带,而‘溧阳白芹’8个单株均未扩增出该特异性条带。



M: 2 000 bp DNA Ladder; 1: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; 2: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’. 箭头示特异性条带 The arrow shows the specific band. 下划线示SCAR引物位点 The underlines show SCAR primer sites.

图5 基于ISSR-836引物水芹地方品种‘溧阳白芹’和‘玉祁红芹’的PCR扩增结果(A)及特异性片段的序列和SCAR引物位点(B)  
Fig. 5 PCR amplification result of local cultivar ‘Liyangbaiqin’ and ‘Yuqihongqin’ of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on ISSR-836 primer (A) and sequence of specific fragment and SCAR primer sites (B)



M: 2 000 bp DNA Ladder; 1-8: ‘溧阳白芹’ ‘Liyangbaiqin’; 9-16: ‘玉祁红芹’ ‘Yuqihongqin’.

图6 基于第2对 SCAR 引物水芹地方品种‘溧阳白芹’和‘玉祁红芹’单株的扩增结果  
Fig. 6 Amplification result of individuals of local cultivar ‘Liyangbaiqin’ and ‘Yuqihongqin’ of *Oenanthe javanica* (Bl.) DC. based on the second pair of SCAR primers

### 3 讨 论

#### 3.1 水芹地方品种间 *AOX1* 和 *MCM5* 基因的变异

本研究基于低拷贝核基因 *AOX1* 和 *MCM5* 进行扩增,在水芹野生种的所有单株中均扩增出长度分别为 1 112 (*AOX1a*) 和 1 305 bp (*AOX1b*) 的 2 条条带,而在 6 个地方品种的所有单株中仅扩增出 1 条条带,长度为 1 305~1 316 bp。为了明确品种间存在的差异,本研究对碱基变异位点、插入/缺失 (InDel) 分析以及核苷酸序列和编码氨基酸序列进一步比对,结果表明:水芹 6 个地方品种的 *AOX1* 基因是 *AOX1b* 基因的直系同源基因,而其旁系同源基因 *AOX1a* 可能在水芹驯化过程中丢失。此外,*AOX1a* 和 *AOX1b* 基因的主要区别在于 *AOX1a* 基因内含子 1 中有 11 bp 的插入,这些变异位点可能通过调控转录和选择性剪接过程影响植物基因的表达<sup>[17-21]</sup>,从而造成不同品种的表型差异。

本研究扩增的 *MCM5* 基因位于 E6-E10 区域,该区域对应的蛋白质结构域可与 MCM2、MCM3、ORC2L、ORC6L 和 STAT1 等染色质蛋白因子结合组成 DNA 复制起始复合体<sup>[16,22-23]</sup>。该 *MCM5* 基因中共有 33 个 SNP 位点,其中有 3 个 SNP 位点位于编码区,且均为同义突变。*AOX1* 蛋白参与应激反应<sup>[15]</sup>,*MCM5* 蛋白参与 DNA 复制<sup>[16]</sup>,与 *AOX1* 基因相比,*MCM5* 基因比较保守,这可能是 2 个基因编码蛋白的功能不同,受到的选择压力也不同所致。

#### 3.2 水芹地方品种间的遗传关系

在基于 *AOX1* 基因构建的 ML 遗传关系树上,‘常

熟白芹’、‘溧阳白芹’和‘江阴青芹’3 个地方品种聚为一个亚支,‘苏州圆叶芹’、‘梅南水芹’和‘玉祁红芹’3 个地方品种聚为另一个亚支,这 2 个亚支组成的分支与水芹野生种 *AOX1a* 基因所在分支之间的支持率较高,因此,该遗传关系树稳定、可靠。尽管低拷贝核基因遵守双亲遗传方式且能提供大量信息位点,可用于研究低等分类阶元之间的系统发育关系,但是不同的低拷贝核基因在物种演化过程中所受的演化压力不同,因此,筛选合适的低拷贝核基因是构建低等分类阶元之间稳定系统发育关系的重要前提。

#### 3.3 ‘玉祁红芹’的特异性标记

太湖流域的水芹地方品种中,‘玉祁红芹’具有许多优良品质。目前,仅通过形态观察将‘玉祁红芹’与其他地方品种进行区分,存在一定的局限性,不利于种质资源的保护和利用。在开发‘玉祁红芹’特异性分子标记的过程中发现,水芹地方品种间差异较小,分子标记开发存在难度。本研究基于 ISSR-SCAR 标记开发了两步法鉴别‘玉祁红芹’的特异性位点 PCR 分子标记,该方法先基于 ISSR-880 引物扩增得到‘溧阳白芹’的特异性片段,设计的第 1 对 SCAR 引物将‘溧阳白芹’和‘玉祁红芹’与其他 4 个地方品种区分开,再基于 ISSR-836 引物扩增得到‘玉祁红芹’特异性片段,设计的第 2 对 SCAR 引物将‘玉祁红芹’与‘溧阳白芹’区分开。与传统的基于形态、理化指标或非特异性分子标记相比,该标记具有准确性高、重现性好、稳定、可靠的优点。‘玉祁红芹’特异性分子标记的开发为其他优质水芹地方资源的种质鉴定、保存和创新利用提供了理论依据和指导意义。

## 参考文献:

- [1] JIANG Q, WANG F, TAN H W, et al. *De novo* transcriptome assembly, gene annotation, marker development, and miRNA potential target genes validation under abiotic stresses in *Oenanthe javanica*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(2): 671-683.
- [2] KU S K, KIM T H, LEE S, et al. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-*O*-galactoside and hyperoside[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 197-204.
- [3] 王鹏, 刘惠民. 中药水芹降血脂的实验研究[J]. *河北中医*, 1994, 17(1): 38-39.
- [4] YANG X B, HUANG Z M, CAO W B, et al. Antidiabetic effect of *Oenanthe javanica* flavone[J]. *中国药理学报*, 2000, 21(3): 239-242.
- [5] KIM J E, LEE D E, LEE K W, et al. Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K[J]. *Cancer Prevention Research*, 2011, 4(4): 582-591.
- [6] XU Y X, SHEN S Y, CHEN W, et al. Analysis of genetic diversity and development of a SCAR marker for green tea (*Camellia sinensis*) cultivars in Zhejiang Province: the most famous green tea-producing area in China[J]. *Biochemical Genetics*, 2019, 57(4): 555-570.
- [7] SMALL R L, CRONN R C, WENDEL J F. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants[J]. *Australian Systematic Botany*, 2004, 17: 145-170.
- [8] MORT M E, CRAWFORD D J. The continuing search: low-copy nuclear sequences for lower-level plant molecular phylogenetic studies[J]. *Taxon*, 2004, 53(2): 257-261.
- [9] ZHANG N, ZENG L, SHAN H, et al. Highly conserved low-copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms[J]. *New Phytologist*, 2012, 195(4): 923-937.
- [10] 丁铭, 曾丽萍, 马红, 等. 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: 以十字花科为例[J]. *植物分类与资源学报*, 2012, 34(3): 211-221.
- [11] CAMPOS M D, CARDOSO H G, LINKE B, et al. Differential expression and co-regulation of carrot *AOX* genes (*Daucus carota*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, 137(4): 578-591.
- [12] 孙芳芳, 鲍忠洲, 尹渝来, 等. 水芹品种的观察、评价和利用[J]. *长江蔬菜(学术版)*, 2012(16): 41-44.
- [13] 兰青阔, 李欧静, 张继波, 等. 津南芹菜 EST-SSR 指纹图谱的构建及遗传差异分析[J]. *天津农业科学*, 2012, 18(5): 7-11.
- [14] WANG S, YANG W, SHEN H. Genetic diversity in *Apium graveolens* and related species revealed by SRAP and SSR markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129(1): 1-8.
- [15] NOGALES A, NOBRE T, CARDOSO H G, et al. Allelic variation on *DcAOX1* gene in carrot (*Daucus carota* L.): an interesting simple sequence repeat in a highly variable intron[J]. *Plant Gene*, 2016, 5: 49-55.
- [16] DAFROSECA C J, SHU F, ZHANG J J. Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN- $\gamma$  [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(6): 3034-3039.
- [17] GIANÌ S, MORELLO L, BARDINI M, et al. Tubulin intron sequences: multi-functional tools[J]. *Cell Biology International*, 2003, 27(3): 203-205.
- [18] FIUME E, CHRISTOU P, GIANÌ S, et al. Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression[J]. *Planta*, 2004, 218(5): 693-703.
- [19] PEYRET H, BROWN J K M, LOMONOSSOFF G P. Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions [J]. *Plant Methods*, 2019, 15(1): 108.
- [20] NER-GAON H, LEVIATAN N, RUBIN E, et al. Comparative cross-species alternative splicing in plants[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1632-1641.
- [21] BAEK J M, HAN P, IANDOLINO A, et al. Characterization and comparison of intron structure and alternative splicing between *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(5): 499-510.
- [22] KNEISSL M, PÜTTER V, SZALAY A A, et al. Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 327(1): 111-128.
- [23] FUJITA M, KIYONO T, HAYASHI Y, et al. *In vivo* interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(16): 10928-10935.

(责任编辑: 张明霞)