

单粒芹菜干种子基因组 DNA 快速提取方法的建立

吴 锋¹, 李可心², 王武台¹, 华德平², 高国训¹

(1. 天津市农业科学院蔬菜研究所·蔬菜生物育种全国重点实验室 天津 300192;

2. 天津大学生命科学学院 天津 300072)

摘 要: 利用植物种子直接提取的基因组 DNA, 可用于种子纯度与特定基因型的分子鉴定, 目前未见芹菜单粒干种子基因组 DNA 直接高效提取方法的相关报道。为建立直接从芹菜种子中快速提取基因组 DNA 的方法, 本研究通过碱裂解法对芹菜单粒干种子进行基因组提取, 并利用芹菜内参基因 *Actin* 的特异性引物进行 PCR (polymerase chain reaction) 扩增, 检验所提取基因组是否满足分子检测的要求。研究结果显示, PCR 扩增可获得清晰的特异性条带, 证明利用芹菜单粒干种子直接提取的基因组 DNA 能够满足 PCR 扩增的需要; 稳定性测试表明, 所提取的基因组 DNA 在 4 °C 条件下保存 14 d 再进行 PCR 扩增, 仍能检测到完整的特异性条带。综上所述, 本研究建立了一种从芹菜单粒干种子中快速、简便、高效提取基因组 DNA 的方法, 采用该方法所提取的基因组 DNA 能够满足 PCR 扩增的需求, 具有良好的储存稳定性, 可以用于芹菜种子纯度与特定基因型的分子鉴定。

关键词: 芹菜; 基因组 DNA 提取; 单粒种子; 分子标记辅助育种

中图分类号: S636.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)12-071-06

Establishment of rapid genomic DNA extraction method from single dry celery seed

WU Feng¹, LI Kexin², WANG Wutai¹, HUA Deping², GAO Guoxun¹

(1. Institute of Vegetables, Tianjin Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Tianjin 300192, China; 2. School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Genomic DNA extracted directly from plant seeds could be used for molecular identification of seed purity and specific genotypes. There is no report on efficient direct extraction methods for genomic DNA from single dry celery seed until now. In this study, the single dried celery seed was subjected to extract genome DNA by alkaline lysis method, which was utilized as the template for PCR (polymerase chain reaction) amplification with *Actin*-specific primers to verify whether the extracted genomic DNA meets the requirements for molecular detection. The results showed that clear specific bands were obtained by PCR amplification, demonstrating that the genomic DNA directly extracted from single dry celery seed was suitable for PCR amplification. To assess DNA stability, PCR amplification was conducted using the genomic DNA stored at 4 °C for 14 days, and successful amplification was confirmed by the presence of expected bands in agarose gels. This study established a rapid, simple and highly efficient method for extracting genomic DNA from individual dried celery seed. The extracted genome DNA was suitable for PCR amplification and exhibited good stability. It could be used for MAS of celery seed purity and specific genotypes.

Key words: Celery; Genomic DNA extraction; Single seed; Molecular marker assisted breeding

芹菜 (*Apium graveolens* L.) 属伞形科芹属草本植物, 起源于南欧及地中海沿岸, 是世界范围内广泛种植的重要叶菜类蔬菜, 也是我国最重要的蔬菜之一^[1]。芹菜不仅叶柄及叶片富含维生素、纤维素

及类胡萝卜素等营养成分, 其种子还含有挥发性香料物质。多项研究表明, 芹菜叶片中含有芹菜苷、佛手苷内酯等多种具有药用价值的成分, 被认为具有潜在的药食同源功效^[2-4]。目前, 鉴定芹菜种

收稿日期: 2025-03-22; 修回日期: 2025-06-13

基金项目: 天津市优秀科技特派员项目 (23ZYCGSN00140); 天津市现代农业蔬菜产业技术体系创新团队芹菜育种岗位 (ITT-VRS2024006); 2024 年度农业重大技术协同推广行动项目 (芹菜新品种及配套栽培技术转化与推广)

作者简介: 吴 锋, 男, 副研究员, 主要从事芹菜种质资源收集整理与育种技术研究。E-mail: wfeng1290@163.com

通信作者: 华德平, 男, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: huadp2016@163.com

高国训, 男, 研究员, 主要从事芹菜种质资源收集整理与育种技术研究。E-mail: ggx@126.com

子的纯度仍以观察田间形态为主,费时费力且易受环境变化及人为经验的影响,建立芹菜种子纯度的分子标记辅助鉴定方法,是芹菜种业健康发展的必然趋势^[5]。

植物基因组 DNA 的提取是分子标记辅助育种的前提。分子标记辅助选择育种可以缩短育种周期,提高育种效率和精度,加快育种进程,近年来逐渐成为育种领域研究的热点。利用分子标记辅助选择芹菜育种已有多篇报道,陈昌龙等^[5]利用转录组测序数据开发了一系列 SSR 标记,在 5 种不同来源的具有代表性的芹菜材料中验证了标记的多态性,并分析了材料间的亲缘关系;也有研究者利用 SSR 标记,建立了芹菜品种 HBN-01 和 HBN-02 种子纯度的分子辅助鉴定方法^[6];Fu^[7]利用 EST-SSR 标记分析芹菜的遗传多样性并构建指纹图谱,最终证明所开发的 55 个分子标记可以完整区分 30 个已知的芹菜品种。提取作物基因组 DNA 是分子标记辅助选择的前提条件,直接利用单粒干种子提取基因组 DNA,省略了种子萌发、生长等过程,大大提高了分子标记辅助选择的时效性。玉米、水稻等大田作物种子基因组 DNA 的提取,从裂解液的配方、裂解时间与温度、磁珠用量等,都已有相对成熟的方法并大规模应用于实际育种等过程^[8-10]。在蔬菜等作物中,许多研究者对直接利用种子进行基因组 DNA 的快速提取进行了研究。杨帆等^[11]利用磁珠法对形状大小不同的 7 种蔬菜(黄瓜、白菜、甘蓝、芥菜、番茄、辣椒和洋葱)单粒种子进行基因组 DNA 提取及检测,建立了多种蔬菜作物单粒种子的基因组 DNA 提取方法,通过这些方法获得的基因组 DNA 均可满足 KASP (kompetitive allele specific PCR) 检测的需要。孙亚玲等^[12]使用全式金 PlantZol 试剂盒、天根快捷型植物基因组 DNA 提取系统、TPS (tris-phenol-SDS) 和 CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 等方法提取洋葱种子基因组 DNA,通过分子标记鉴定种子纯度,表明洋葱干种子基因组总 DNA 的提取以 CTAB 法最佳,能够满足洋葱杂交种种子纯度分子标记辅助鉴定的需要。张红等^[13]利用常规 CTAB 法、蔗糖提取法、改良碱裂解法、改良碱煮法与快提 DNA 释放法 5 种不同的方法,对十字花科作物大白菜、萝卜等的种子进行基因组 DNA 提取,并评估其提取质量与保存时间,发现种子催芽 1~2 d 后,用快提 DNA 释放法所提取的基因组 DNA 能够满足大白菜、萝卜等

分子标记检测的需要,且具有良好的稳定性,极大地缩短了基因组提取时间。

虽然已有很多关于蔬菜种子基因组 DNA 提取的报道,但是芹菜种子特别小,千粒质量仅 0.4~0.5 g^[14],其质量、体积均无法达到可自动化操作级别,至今未见直接利用其单粒干种子进行基因组 DNA 提取的相关报道,这一问题限制了芹菜种子纯度分子标记辅助鉴定方法的应用与推广,进一步制约了芹菜分子育种的发展。本研究基于前人报道的 DNA 提取方法^[15-16],以期建立适用于芹菜单粒干种子的基因组 DNA 的快速提取方法,后续可将获得的芹菜基因组 DNA 用于芹菜种子纯度的大规模快速分子鉴定,以期提高芹菜的育种效率。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2024 年 9—12 月在天津大学生命科学学院分子生物学实验室进行。

供试材料尤文图斯芹菜种子由天津科润蔬菜研究所芹菜课题组提供,为西芹类型。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 本研究采用碱裂解法^[15-16]对芹菜单粒干种子进行基因组 DNA 的提取:利用镊子夹取单粒芹菜干种子,每粒种子分别置于 1 个单独的 1.5 mL 离心管中,用研磨棒将单粒种子挤压至离心管内壁处,手动充分磨碎数次至将种子研磨成大小不等的块状;再向每个离心管中各自加入 100 μL NaOH 溶液 ($0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),继续研磨直至芹菜种子完全破碎,以看不到较大的颗粒状物质或成为粉状物质为佳;之后,将离心管置于 95°C 的金属浴中加热 3 min,再利用离心机 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min;取上清液 10 μL 转入新的 1.5 mL 离心管中,再向离心管中加入 300 μL Tris-HCl ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.0),即可得到芹菜基因组 DNA。采用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000) 对提取的芹菜基因组 DNA 进行浓度和纯度分析。每个 DNA 样品重复测量 3 次,取平均值作为最终结果。并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提基因组 DNA 的完整性与大小。

1.2.2 PCR 扩增及检测 以提取的芹菜基因组 DNA 为模板,针对保守的内参基因 *Actin* 进行 PCR 扩增,用于验证所提取的芹菜基因组 DNA 质量是否满足分子检测的需要。参考相关文献中的特异性引物 (AgActin- F: 5'-CTTCCTGCCATATAT-

GATTGG- 3'; AgActin- R: 5'- GCCAGCACCTC-GATCTTCATG-3')^[17],利用北京擎科生物科技股份有限公司的 2×TSINGKE Master mix(TSE002)进行 PCR 扩增,扩增的反应体系见表 1。本研究所采用 PCR 扩增的反应程序见表 2。

经 1%的琼脂糖凝胶电泳后,利用凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物。

1.3 基因组DNA的稳定性检测

将提取的芹菜单粒种子的基因组 DNA,放置于 4℃冰箱中保存,分别在第 7 天和第 14 天,作为模板,利用 1.2.2 中的引物序列、反应体系和反应程序,对其进行 PCR 扩增,产物经过 1%的琼脂糖凝

表 1 芹菜基因组 DNA 扩增反应体系
Table 1 Reaction system for PCR amplification used celery genomic DNA

配方 Composition	体积 Volume/ μ L
引物 AgActin-F/R Primer AgActin-F/R	各 0.15 0.15 each
2×Taq mix(擎科) 2×Taq mix (Tsingke)	5.0
基因组 DNA Genomic DNA	2.0
双蒸水 ddH ₂ O	2.7

表 2 芹菜基因组 DNA 扩增反应程序
Table 2 Celery genomic DNA amplification reaction procedure

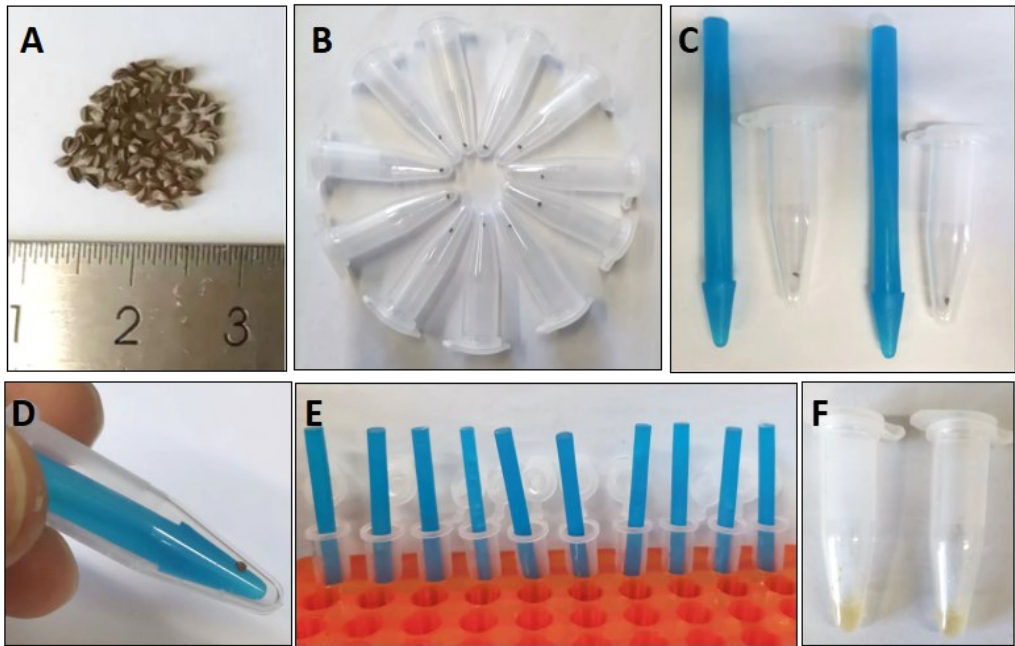
程序 Process	温度 Temperature/ $^{\circ}$ C	时间 Time	循环数 Cycle number
预变性 Pre-denaturation	94	5 min	1
变性 Denaturation	94	20 s	35
退火 Annealing	56	20 s	
延伸 Extension	72	45 s	
终延伸 Final extension	72	5 min	1

胶电泳,再通过凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物,确定所获得的基因组 DNA 在 4℃储存条件下的稳定性。

2 结果与分析

2.1 芹菜单粒干种子基因组DNA的提取

作为伞形科植物,芹菜种子具有体积小、千粒质量轻等特点。将 100 粒芹菜种子平铺于桌面,其所占的面积约相当于直径 1 cm 的圆(图 1-A)。将



注:A. 100 粒芹菜种子大小示意图。B-F. 芹菜单粒种子基因组快速提取示意图,其中,B. 每粒芹菜种子置于 1 个 1.5 mL 的离心管中;C. 研磨棒与放置种子的离心管;D. 准备研磨;E. 种子的研磨过程;F. 芹菜种子基因组 DNA 提取液。

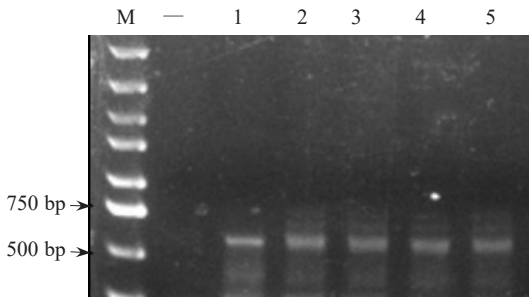
Note:A. The size diagram of 100 celery seeds. B-F. The diagram of rapid genomic extraction of single celery seed. B. One 1.5 mL EP tube with one celery seed; C. Grinding rod and EP tube containing one seed; D. The diagram for preparation of grinding; E. The grinding process of celery seed; F. The genomic DNA extraction solution of celery seed.

图 1 芹菜单粒干种子基因组 DNA 的提取
Fig. 1 Genomic DNA extraction from single dry celery seed

待提取的芹菜单粒干种子分别置于 1.5 mL 离心管中(图 1-B~C),经过初步研磨、添加 NaOH 溶液、充分研磨、加热、离心后(图 1-D~F),取上清液 10 μL 至新的离心管中与 300 μL Tris-HCl 混匀,即可得到基因组 DNA 提取液,备用。进一步经琼脂糖凝胶电泳后,通过凝胶成像仪检测所提取的芹菜基因组 DNA,无任何电泳条带;利用超微量分光光度计(NanoDrop 2000)检测所获得的基因组 DNA 的浓度,其浓度(ρ ,后同)范围在 5.0~9.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 之间,虽然所提取的基因组 DNA 的浓度很低,但依然能够满足 PCR 扩增的需要。

2.2 PCR 扩增产物的凝胶电泳检测

随机取上述芹菜单粒种子提取的基因组 DNA 5 份(记为 1~5 号)为模板,使用 *Actin* 特异性引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳后,进行荧光成像仪检测。发现所有基因组 DNA 都能够正确扩增出特异性的 PCR 产物(图 2),证明利用芹菜单粒干种子提取的基因组 DNA 能够满足 PCR 扩增的需要,可以用于后续芹菜种子纯度的分子标记鉴定工作。

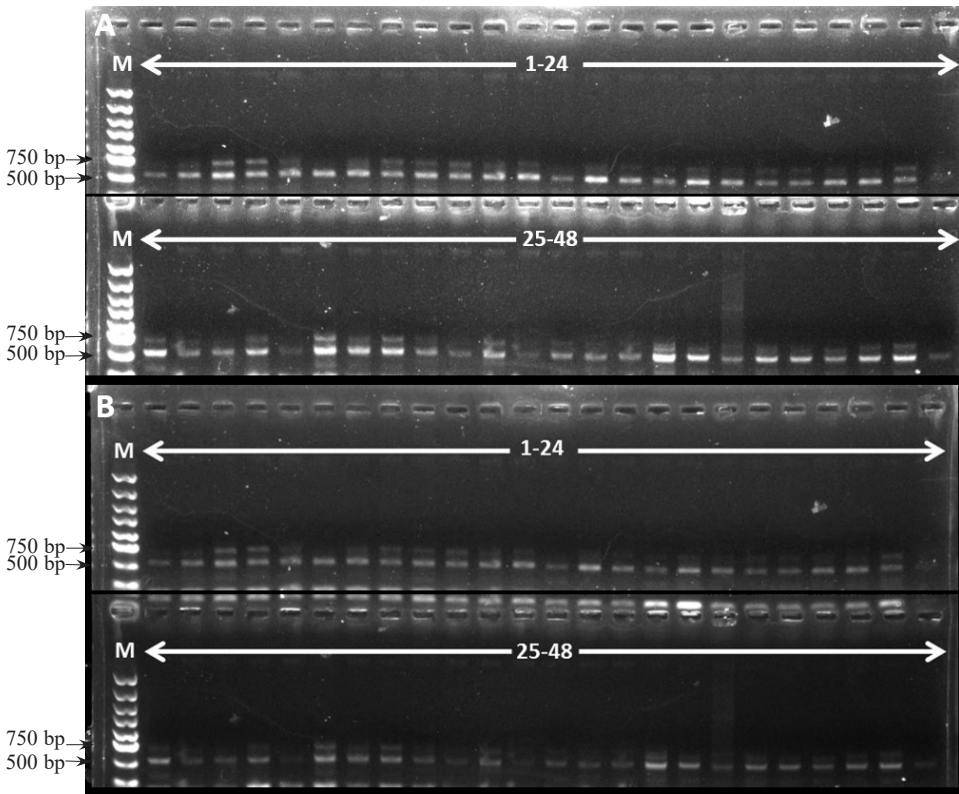


注:M. DNA marker;“-”. 空白对照;1~5. *Actin* 扩增结果。
Note: M. DNA marker;“-”. Negative control; 1-5. PCR amplification of *Actin*.

图 2 芹菜单粒干种子基因组 DNA 中 *Actin* 基因的 PCR 扩增
Fig. 2 PCR amplification of *Actin* from the genomic DNA of single dry celery seed

2.3 所获基因组 DNA 的稳定性鉴定

使用碱裂解法对 48 粒芹菜干种子分别提取基因组 DNA 后,将获得的 48 份芹菜干种子基因组 DNA 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 7 d,以此为模板,使用 *Actin* 特异性引物进行 PCR 扩增,电泳后荧光检测结果如图 3-A



注:A. 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 7 d 后芹菜基因组 DNA 中 *Actin* 的 PCR 扩增结果;B. 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 14 d 的芹菜基因组 DNA 中 *Actin* 的 PCR 扩增结果。
Note: A. PCR amplification of *Actin* from the celery genomic DNA after stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 7 d; B. PCR amplification of *Actin* from the celery genomic DNA after stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 14 d.

图 3 芹菜单粒干种子中提取的基因组 DNA 稳定性检测
Fig. 3 The stable test of genomic DNA from single dry celery seed

所示,几乎所有的样品都能扩增获得相应的特异性条带。将提取的基因组DNA在4℃下继续存放14 d,进行PCR扩增及电泳后的荧光检测,结果如图3-B所示,同样几乎所有的基因组DNA都能扩增出对应的特异性条带。证明采用碱裂解法提取的芹菜单粒干种子基因组DNA至少可以在4℃条件下存放14 d,仍能满足PCR扩增的需要,具有较好的稳定性。

3 讨论与结论

芹菜属于伞形科蔬菜,分为西芹、叶芹与根芹3种类型,其基因组序列的公布为芹菜分子标记辅助选择育种的推进奠定了基础^[18-20]。Lai等^[20]对来自26个国家的177份芹菜材料进行基因组重测序,发现了70 274 110个SNP和12 928 426个InDel变异位点,并初步确定了与根芹下胚轴伸长和增大有关的候选基因,以及芹菜叶柄中空/实心性状的控制基因,这都为分子标记在芹菜育种中的应用提供了便利条件^[20]。利用分子标记辅助选择时,所使用的基因组DNA均为从芹菜叶片等组织中提取,作为伞形科植物,芹菜的花小而密,种子虽然多,但单粒种子体积很小,质量很轻,利用常见的植物组织研磨仪,难以实现对芹菜单粒种子的有效研磨,导致无法高效地从种子中直接提取基因组DNA。参考前人的报道,本研究经过尝试不同规格的研磨棒,最终选择合适大小的研磨棒,直接在1.5 mL的离心管中,对单粒芹菜种子进行手工研磨,结合植物基因组DNA碱裂解提取法直接从芹菜单粒干种子中提取基因组DNA。本研究提取48粒芹菜种子的基因组DNA总用时约30 min,虽然在研磨速度与便捷性上,无法与利用植物组织研磨仪进行植物组织基因组DNA的提取方法相比,但是解决了植物组织研磨仪无法实现微小的单粒作物种子的充分研磨问题,在实验室内能快速完成基因组DNA的提取。其他芹菜基因组DNA的提取方法,一般都以芹菜的叶片为材料,需等待种子的萌发、幼苗的定植与生长等漫长的过程才可进行,本方法直接利用芹菜干种子进行基因组DNA提取,可为芹菜种子纯度的鉴定等工作节省大量的时间,有利于提高芹菜育种工作的效率。

在分子标记辅助选择中,作物杂交种的种子纯度鉴定是其重要的应用之一。冯建起等^[21]利用筛选获得的InDel引物BrID90029,能快速完成汴早九号大白菜杂交种的纯度鉴定,与田间形态鉴定结果

吻合度达99.29%。刘广等^[22]利用2对KASP标记准确完成了西瓜专用砧木苏砧1号种子的纯度鉴定工作,鉴定结果与通过田间表型鉴定的结果一致。PCR扩增具有效率高、受杂质影响小的特点,如常规分子生物学实验中的菌落PCR检测、医学检测中血液样品的PCR直接扩增检测,反应体系都存在基因组模板浓度低、成分复杂等问题,但是都能完成PCR扩增。本研究利用碱裂解法对单粒芹菜种子进行基因组DNA的提取,所获得的基因组DNA浓度在10 ng·μL⁻¹以下,且纯度较低,但依然能够满足PCR扩增的需要,为芹菜种子纯度的分子鉴定储备了技术。在实际应用过程中,由于检测的样品数量较大,所提取的植物基因组DNA需要储存一段时间后,才能完成分子检测,因此所提取基因组DNA的稳定性至关重要。张红等^[13]检测由5种不同方法所提取的大白菜种子的基因组DNA,发现其稳定性存在明显差异:由蔗糖提取法获得的基因组DNA在第15天时,通过PCR扩增就难以检测到有效扩增条带,而碱裂解法和快提DNA释放法获得的基因组DNA,存放30 d后,PCR扩增仍能获得清晰、特异的条带,说明由不同的提取方法获得的植物基因组DNA稳定性存在差异。本研究参考前人的报道,从芹菜单粒干种子中提取获得的基因组DNA在4℃下存放14 d,仍能满足PCR扩增的需要,表明采用该方法提取的基因组具有良好的稳定性。

综上所述,本研究建立了利用碱裂解法从芹菜单粒干种子中提取基因组DNA的方法,所得的基因组能够满足PCR扩增的需要,且具有较高的稳定性,可用于后期芹菜种子纯度的分子标记快速鉴定。

参考文献

- [1] LI M Y, HOU X L, WANG F, et al. Advances in the research of celery, an important apiaceae vegetable crop[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 172-183.
- [2] POWANDA M C, WHITEHOUSE M W, RAINSFORD K D. Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities[J]. Progress in Drug Research, 2015, 70: 133-153.
- [3] KOOTI W, DARAEI N. A review of the antioxidant activity of celery (*Apium graveolens* L.) [J]. Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 22 (4): 1029-1034.
- [4] HEDAYATI N, NAEINI M B, MOHAMMADINEJAD A, et al. Beneficial effects of celery (*Apium graveolens*) on metabolic syndrome: A review of the existing evidences[J]. Phytotherapy Research, 2019, 33(12): 3040-3053.

- [5] 陈昌龙,董岩,田宇,等.芹菜转录组数据 SSR 标记的开发及其遗传多样性分析[J].农业生物技术学报,2020,28(4):616-628.
- [6] 高越,刘双,赵新,等.利用 SSR 标记鉴定芹菜新品种 HBN-01 和 HBN-02 的种子纯度[J].分子植物育种,2020,18(23):7808-7813.
- [7] FU N, WANG P Y, LIU X D, et al. Use of EST-SSR markers for evaluating genetic diversity and fingerprinting celery (*Apium graveolens* L.) cultivars[J]. *Molecules*, 2014, 19(2):1939-1955.
- [8] 钟永丽,江常胜,朱绍勇,等.不同提取方法与研磨方式对玉米种子 DNA 提取效果的影响[J].智慧农业导刊,2023,3(1):32-35.
- [9] AMANI A L, GAMAL O. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize[J]. *Plant Methods*, 2017, 13:1.
- [10] LEACH K A, MCSTEEN P C, BRAUN D M. Genomic DNA isolation from maize (*Zea mays*) leaves using a simple, high-throughput protocol[J]. *Current Protocols in Plant Biology*, 2016, 1(1):15-27.
- [11] 杨帆,武剑,常立春,等.单粒蔬菜种子 DNA 快速提取方法的建立[J].中国蔬菜,2024(7):26-32.
- [12] 孙亚玲,李艳伟,王振宝,等.基于干种子 DNA 的洋葱杂种纯度分子标记快速鉴定[J].山东农业科学,2023,55(11):169-175.
- [13] 张红,王超楠,范伟强,等.植物基因组 DNA 的高效提取方法[J].分子植物育种,2025,23(16):5411-5416.
- [14] 靳力争,高国训,刘如娥,等.芹菜开花结籽情况调查[J].安徽农业科学,2009,37(20):9442-9443.
- [15] WANG H, QI M, CUTLER A J. A simple method of preparing plant samples for PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 25, 21(17):4153-4154.
- [16] 郑琪,蒋超,黄璐琦,等.碱裂解法快速提取中药炒制品 DNA 的研究[J].中国中药杂志,2014,39(19):3678-3683.
- [17] 谭国飞,李梦瑶,罗庆,等.芹菜雄性不育的创制及线粒体不育候选基因鉴定[J].植物遗传资源学报,2022,23(6):1807-1815.
- [18] LI M Y, FENG K, HOU X L, et al. The genome sequence of celery (*Apium graveolens* L.), an important leaf vegetable crop rich in apigenin in the *Apiaceae* family[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7:9.
- [19] SONG X M, SUN P C, YUAN J Q, et al. The celery genome sequence reveals sequential paleo-polyploidizations, karyotype evolution and resistance gene reduction in apiales[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4):731-744.
- [20] LAI E H, GUO S M, WU P, et al. Genome of root celery and population genomic analysis unveil complex celery breeding history[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(3):946-959.
- [21] 冯健起,王培云,蔡亚平,等.利用 InDel 标记鉴定汴早九号大白菜杂种纯度[J].中国瓜菜,2023,36(12):33-38.
- [22] 刘广,刘金秋,羊吉平,等.西瓜专用瓠瓜砧木苏砧 1 号种子纯度的 KASP 鉴定[J].中国瓜菜,2025,38(1):39-43.