

分类号：
学 号：20162012053

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



新疆地区菟丝子种类鉴定、主要种快速检测和种子处理技术研究

学 位 申 请 人	房小燕
指 导 教 师	赵思峰 教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科 、 专 业 名 称	植物保护
研 究 方 向	植物病理学
所 在 学 院	农学院

中国·新疆·石河子
2019 年 6 月

分类号：
学 号：20162012053

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



新疆地区菟丝子种类鉴定、主要种快速检测和种子处理技术研究

学 位 申 请 人	房小燕
指 导 教 师	赵思峰 教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	植物保护
研 究 方 向	植物病理学
所 在 学 院	农学院

中国·新疆·石河子
2019 年 6 月

**Identification to Species of Parasitic Weed *Cuscuta* in XinJiang,
Rapid PCR Detection Technology and Seed Treatment Techniques for
Main Species of *Cuscuta***

**A Dissertation Submitted to
Shihezi University
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of
Master of Agriculture**

By

Fang Xiao-Yan

(Plant Pathology)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhao Si-feng

June, 2019

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：高小燕

时间：2019年5月31日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：高小燕

时间：2019年5月31日

导师签名：赵恩峰

时间：2019年5月31日

摘要

目的: 明确新疆维吾尔自治区发生菟丝子的具体种类, 基于鉴定结果, 以在新疆危害严重、分布最广的菟丝子种为研究对象, 建立其快速 PCR 检测技术和方法, 同时寻找能有效减少菟丝子种子萌发的方法, 降低菟丝子寄生率, 为新疆菟丝子的检验检疫和防治提供理论依据和技术支撑。

方法: 通过形态学鉴定和分子生物学鉴定相结合的方法对采集的 60 份菟丝子样品进行鉴定。然后以鉴定出的 2 个主要种, 设计其种特异性引物, 通过 PCR 扩增, 对 2 个主要种的种特异性引物的特异性和灵敏性进行检测, 从而建立 2 种菟丝子的快速检测技术; 以 2 种菟丝子种子为研究对象, 分别用 40℃ 和 45℃ 进行为期 40d 的高温高湿老化处理, 测定不同天数后的菟丝子种子的皿内萌发率和盆栽萌发率, 并研究老化处理后对菟丝子种子生理生化指标的影响机制。

结果:

1、在新疆南北疆各地菟丝子发生严重的区域采集菟丝子, 从 25 种寄主植物上共采集到菟丝子样品 60 份, 通过形态学鉴定可以将 60 份菟丝子样品初步鉴定为田野菟丝子 *Cuscuta campestris* 和单柱菟丝子 *Cuscuta monogyna* 两个种。田野菟丝子的茎较细, 呈淡黄色至橘黄色, 花白色, 种子较小, 椭圆形; 单柱菟丝子茎藤较粗, 呈微红色并有紫色瘤状突起, 花玫红色或近白色, 种子较大。结合分子辅助鉴定, 经 ITS、*rbcl*、*trnL-F* 3 种序列分析, 最终可以明确新疆维吾尔自治区的菟丝子主要有两种, 即田野菟丝子和单柱菟丝子。

2、针对田野菟丝子和单柱菟丝子, 设计了两种菟丝子的种特异性引物 *trnL-TY* 和 *trnL-DZ*, 田野菟丝子种特异性引物 *trnL-TY* 仅可以从田野菟丝子的 DNA 中扩增一条 256bp 大小的条带, 在其他供试种子的 DNA 中不能检测到条带, 检测灵敏度为 10pg/uL; 特异性引物 *trnL-DZ* 仅可以从单柱菟丝子的 DNA 中扩增一条 275bp 大小的条带, 在其他供试种子的 DNA 中不能检测到条带, 检测灵敏度为 100pg/uL。采用两种菟丝子的 *trnL-F* 基因片段设计的引物及 PCR 方法, 可用于两种菟丝子的快速分子检测。

3、田野菟丝子种子和单柱菟丝子种子分别在 45℃ 和 40℃ 温度条件下老化 40d, 种子的皿内和盆栽萌发率均表现为逐渐下降趋势, 并且在 45℃ 条件下, 菟丝子种子的萌发率下降更快、萌发率更低, 抑制两种菟丝子种子萌发的效果更明显。划破种皮的田野菟丝子种子皿内和盆栽初始萌发率分别为 46.67% 和 39%, 种子老化 40d 后, 在 45℃ 老化温度条件下, 皿内和盆栽萌发率分别为 2% 和 0.33%; 在 40℃ 老化温度条件下, 皿内和盆栽萌发率分别为 29% 和 22%。划破种皮的单柱菟丝子种子皿内和盆栽初始萌发率分别为 60% 和 47%, 种子老化 40d 后, 在 45℃ 老化温度条件下, 皿内和盆栽萌发率分别为 0% 和 0.67%; 在 40℃ 老化温度条件下, 皿内和盆栽萌发率分别为 38% 和 28.33%。

4、两种菟丝子种子在老化 0、10、20、30、40d 后的种子浸出液的相对导电率、可溶性糖含量、MDA 含量均呈现持续上升趋势, 与老化时间成正比, 表明菟丝子种子细胞膜透性不断增加, 细胞膜受到损害, 许多细胞内的物质发生渗漏; 而种子的可溶性蛋白含量、CAT、POD、SOD 活性均呈现持续下降趋势, 与老化时间成反比, 表明菟丝子种子内部调节平衡的相关酶的活性逐渐丧失, 种子内部积累的有害物质逐渐增多, 最终种子发生老化劣变。

关键词: 种类鉴定; 快速检测; 种子处理; 生理生化

Abstract

Objective: The purpose of the study is to clarify the species of *Cuscuta* L. in Xinjiang; establish a rapid PCR detection method for the main species of *Cuscuta*, that is serious damage to host and wide distribution in Xinjiang. Meanwhile, to create an effective method to reduce germination of *Cuscuta*. Finally, the research is to provide theoretical basis and technical support for controlling the *Cuscuta* in Xinjiang.

Method: Based on molecular biology and morphological characteristics, 60 samples of *Cuscuta* were collected and identified. Two *Cuscuta* species were identified, and the species-specific primers of *Cuscuta* were designed according to identification results, respectively. And specificity and sensitivity of species-specific primers were detected by PCR amplification and gel electrophoresis. In addition, *Cuscuta* seeds were treated for 40 days in humid environment and 40°C and 45°C for aging treatment. The germination rates of *Cuscuta* seeds were determined in petri dish and pot after different days aging treatment of different days. Meanwhile, the mechanism of aging treatment effect physiology and biochemistry *Cuscuta* seeds were researched.

Results:

1. A total of 60 samples of *Cuscuta* were collected from 25 host species in area seriously damaged by *Cuscuta* in Xinjiang. Firstly, *Cuscuta* could be preliminarily identified as *C. campestris* and *C. monogyna* from 60 samples of *Cuscuta* through morphological characteristics. The stem of *C. campestris* is thin presenting the phenotype of gradual color change from pale yellow to orange-yellow while their flowers are white, seeds are small and ellipse; the stem of *C. monogyna* is thicker, presenting reddish and with purple tuberous protuberances while their flowers are rosy red or several white, and the seeds are bigger than the seed of *C. campestris*. Combined with ITS, rbcL and trnL-F sequence analysis, they are identified as *C. campestris* and *C. monogyna* respectively.

2. Two species-specific primers of *C. campestris* and *C. monogyna*, trnL-TY and trnL-DZ were designed. The *C. campestris* species-specific primer trnL-TY can distinctively amplify a 256 bp band from *C. campestris* DNA, and detection sensitivity is 10 pg/μL, cannot produce any band from DNA of other seeds. The *C. monogyna* species-specific primers trnL-DZ can distinctively amplify a 275 bp band from *C. monogyna* DNA, detection sensitivity is 100 pg/uL, and no band detection from DNA of other seeds. The results suggested that the developed *trnL-F* can be used to rapid detecting two species of *Cuscuta* in Xinjiang.

3. The germination rate of *C. campestris* and *C. monogyna* seeds decreased in petri dish and pot after aged treatment for 40 days at 45 °C and 40 °C, respectively. Especially at 45 °C, the germination rate of *Cuscuta* seeds decreased faster and the was lower than at 40°C, which the effect of inhibiting the seed germination of the two species *Cuscuta* seeds was more obvious. The initial germination rates of the scarified seeds of *C. campestris* were 46.67% and 39% in petri dish and pot, respectively. After 40 days of aging, at 45°C, the

germination rates decreased to 2% and 0.33%, respectively. At 40°C, the germination rates reduced to 29% and 22%, respectively. The initial germination rates of the scarified seeds of *C. monogyna* in petri dish and pot were 60% and 47%, respectively. After 40 days of aging, at 45°C, the germination rates decreased to 0% and 0.67%, respectively. At 40°C, the germination rates decreased to 38% and 28.33%, respectively.

4. The relative conductivity, soluble sugar content and MDA content of the seeds extracts of the two *Cuscuta* species showed a continuous increase trend after aging for 0, 10, 20, 30 and 40 days, which were proportional to the aging time. It indicated that the membrane function of the seed cells were continuously impaired, the membrane permeability increased, more cell contents penetrated, and the integrity of the cells were destroyed. The soluble protein content, the activities of CAT, POD and SOD showed a continuous decline, which were inversely proportional to the aging time, it indicated that the activity of the related enzymes of *Cuscuta* seeds were decreased, and led the harmful substances excessive accumulation, which is resulting in the seeds damage and deteriorating.

Key word: species identification; rapid detection; seed treatment; physiological and biochemical

目 录

摘 要.....	I
目 录.....	IV
第一章 文献综述.....	1
1.1 寄生性杂草菟丝子.....	1
1.1.1 菟丝子种类及其生物学特性.....	1
1.1.2 菟丝子的分布、危害及其生活史.....	2
1.1.3 菟丝子在新疆的分布及危害.....	3
1.2 菟丝子的防治.....	3
1.2.1 植物检疫.....	4
1.2.2 农业防治.....	4
1.2.3 化学药剂防除.....	4
1.2.4 生物防治.....	5
1.3 菟丝子的鉴定方法.....	5
1.4 菟丝子检验检疫技术研究.....	6
1.4.1 常规检疫方法.....	6
1.4.2 快速检测技术.....	6
1.5 菟丝子种子处理技术研究.....	7
1.5.1 菟丝子种子诱导萌发研究.....	7
1.5.2 种子老化研究.....	7
1.6 研究意义及思路.....	7
1.6.1 研究意义.....	7
1.6.2 技术路线.....	8
第二章 寄生性杂草菟丝子在新疆的主要种类鉴定.....	9
2.1 材料与方法.....	9
2.1.1 材料.....	9
2.1.2 鉴定方法.....	9
2.2 结果与分析.....	10
2.2.1 形态学鉴定结果.....	10

2.2.2 分子鉴定结果.....	12
2.3 讨论.....	18
2.4 小结.....	19
第三章 两种菟丝子 PCR 快速检测技术研究.....	20
3.1 材料与方法.....	20
3.1.1 材料.....	20
3.1.2 方法.....	21
3.2 结果与分析.....	22
3.2.1 <i>trnL-F</i> 基因的检测.....	22
3.2.2 <i>trnL-F</i> 序列比对及两种菟丝子种特异性引物的设计.....	22
3.2.3 物种特异性引物检测.....	23
3.2.4 物种特异性引物灵敏度检测.....	24
3.3 讨论.....	25
3.4 小结.....	26
第四章 两种菟丝子种子处理技术研究.....	27
4.1 材料与方法.....	27
4.1.1 材料.....	27
4.1.2 实验设计.....	27
4.2 结果与分析.....	28
4.2.1 两种温度条件老化不同天数的田野菟丝子种子皿内萌发率.....	28
4.2.2 两种温度条件老化不同天数的单柱菟丝子种子皿内萌发率.....	29
4.2.3 两种温度条件老化不同天数的田野菟丝子种子盆栽萌发率.....	30
4.2.4 两种温度条件老化不同天数的单柱菟丝子种子盆栽萌发率.....	31
4.3 讨论.....	32
4.4 小结.....	32
第五章 不同老化天数处理后的菟丝子种子的生理生化机制.....	33
5.1 材料与方法.....	33
5.1.1 材料.....	33
5.1.2 测定指标及方法.....	33
5.2 结果与分析.....	33

5.2.1 不同老化时间菟丝子种子的电导率的变化.....	33
5.2.2 不同老化时间菟丝子种子的浸出液可溶性糖含量的变化.....	34
5.2.3 不同老化时间菟丝子种子可溶性蛋白含量的变化.....	35
5.2.4 不同老化时间菟丝子种子 MDA 含量的变化	35
5.2.5 不同老化时间菟丝子种子 CAT 活性的变化.....	36
5.2.6 不同老化时间菟丝子种子 POD 活性的变化.....	36
5.2.7 不同老化时间菟丝子种子 SOD 活性的变化.....	37
5.3 讨论	37
5.4 小结	37
第六章 结论与展望.....	39
6.1 结论.....	39
6.2 展望.....	39
参考文献.....	41
致谢.....	48
作者简介.....	49

第一章 文献综述

1.1 寄生性杂草菟丝子

菟丝子属于旋花科 (Convolvulaceae) 菟丝子属 (*Cuscuta*)，是一年生全寄生性草本植物，其无根、无叶或叶片退化成小的鳞片，它不含叶绿素，通过吸器从寄主植物的茎叶上获取自身生长所需的水分和营养物质等，别名又称黄丝藤、黄丝、禅真、黄缠、豆阎王、金丝藤、豆寄生等。其适应环境能力强，具有广泛的寄主范围，生命力顽强，使得被寄生的寄主植物受到损害，严重时可导致寄主植物的死亡，从而使得农林经济受到严重的损失。对菟丝子的防治已成为世界关注的焦点和难点^[1,2]。

1.1.1 菟丝子种类及其生物学特性

全世界大约有 4200 种寄生性植物，分属于 18 个科 274 个属，根据寄生部位和寄生程度可分为根寄生性和茎寄生性植物，从兼性寄生到半寄生至全寄生性植物^[3]。其中，完全寄生于寄主植物茎上的菟丝子属植物造成的危害尤其严重。在世界上，菟丝子属植物大约 200 个种和 70 个变种^[4,5]，其最早发生于美洲，现广泛分布于全世界暖温带地区^[6]。根据《中国植物志》于 1979 年记载，中国有 11 种菟丝子属植物，分别归属于 3 个亚属^[1]。2008 年郭琼霞^[7]报道，我国有 14 种菟丝子，分别是单柱菟丝子 *C. monogyana*、田野菟丝子 *C. campestris*、日本菟丝子 *Cuscuta japonica*、苜蓿菟丝子 *Cuscuta approximata*、中国菟丝子 *Cuscuta chinensis*、杯花菟丝子 *Cuscuta cuplata*、三叶草菟丝子 *Cuscuta trifolii*、五角菟丝子 *Cuscuta pentagona*、南方菟丝子 *Cuscuta australis*、亚麻菟丝子 *Cuscuta epilinum*、沼泽菟丝子 *Cuscuta gronovii*、多花菟丝子 *Cuscuta planiflora*、欧洲菟丝子 *Cuscuta europaea* 和啤酒花菟丝子 *Cuscuta lupuliformis* 等，描述依据主要是其种籽表面的颜色、大小、形状、种脐等形态特征。2017 年田立超等^[8]记述，我国分布的菟丝子种类有 11 种，分别是南方菟丝子、日本菟丝子、欧洲菟丝子、单柱菟丝子、中国菟丝子、杯花菟丝子、田野菟丝子、啤酒花菟丝子、巨菟丝子 *Cuscuta gigantea*、大鳞菟丝子 *Cuscuta macrolepis* 和大花菟丝子 *Cuscuta reflexa*。从各地报道的文献来看，发生和分布较为普遍的种主要有南方菟丝子、大花菟丝子、中国菟丝子、日本菟丝子、啤酒花菟丝子。

菟丝子属植物茎藤表面光滑，大致呈线性，初生时颜色为淡绿色，寄生寄主植物后，不同种类的菟丝子茎的颜色逐渐分别呈黄色，褐色或紫红色。菟丝子的茎缠绕在寄主植物上，不久之后会慢慢长出吸器，然后通过长出的吸器与寄主植物建立联系，通过吸器从寄主植物上吸取维持自身生长所需的营养物质和水份，从而造成寄主植物的输导组织的受到损害。菟丝子的花较小，颜色主要呈现白色或是淡紫红色。种子无毛，没有胚根和子叶，形状大致为不规则的椭球形，颜色呈黄绿至棕褐色，种类不同的菟丝子形状和大小都不一致^[9]。

菟丝子不仅可以通过种子进行繁殖，还可以通过其断茎重新萌发进行繁殖蔓延，并且其种子可以通过混杂在其他作物种子中进行传播扩散到更远的地方，成熟种子脱落入土壤或在枯枝上越冬，

一株菟丝子的结实率一般为千粒种，结实最多时可达 100 万粒，结籽差异依据菟丝子种类不同^[10]。菟丝子种子萌发出土到长出细茎缠绕寄主的时间大约为 3d，如果在 2 周之内还没找到适宜寄生的寄主植物，菟丝子则会因为缺水而干枯死亡。植物种子的萌发出苗会受到许多因素的限制，如湿度、温度、光照及种子在土壤中的掩埋深度等。菟丝子种子在温度低于 10℃ 或者高于 35℃ 条件下均不能正常萌发，而在温度为 25℃~30℃ 时菟丝子种子的萌发率最高^[11]，并且在湿度为 15%~30% 时萌发率最高，种子发芽的土壤深度一般为 0~3cm。种子生命力极强，种子种皮坚硬、不透水，存在物理休眠现象，在土壤中可存活 3~5 年以上^[12]。

1.1.2 菟丝子的分布、危害及其生活史

全世界大约有 200 多种菟丝子^[4,5]，由于其极强的环境适应性和广泛地寄主范围，几乎分布于世界各地，而温带地区及热带亚热带地区是菟丝子的主要发生区，美洲是菟丝子分布种类最多、范围最广的地区^[13]。菟丝子在中国各省区均有分布，但因地理位置和生存环境的不同，各省区分布的菟丝子种类也略有差异，具有地域性特征。南方菟丝子主要分布在亚洲和大洋洲，在中国主要分布在吉林、宁夏、新疆、山东等省^[14]；中国菟丝子分布于埃塞俄比亚、阿富汗、斯里兰卡、澳大利亚，中国的内蒙古、云南、河北、广西、宁夏、新疆等省区^[13,15-20]；日本菟丝子主要分布于亚洲，在中国主要分布于河北、云南、广西、江西、江苏、黑龙江、山东等省区^[13,16,18,21-23]；欧洲菟丝子分布于欧洲、非洲北部、亚洲西部，中国的内蒙古、黑龙江、新疆等省区^[13,15,20,24]；啤酒花菟丝子分布于欧洲、亚洲，中国的东北、山东和新疆等地区^[13,16,25]；田野菟丝子分布于中国的福建、新疆^[26-27]；单柱菟丝子分布于欧洲西部、非洲北部、亚洲中部，中国的东北、内蒙古、宁夏、新疆等省区^[13,15,25,28]。

菟丝子不仅可以直接对寄主植物造成伤害，还可以作为传播其他病害、类菌原体和病毒的媒介，从而引起多种植物发生病害，间接使得动物进食后产生不良反应，给畜牧生产带来重大损失。菟丝子在国外造成的经济损失已不计其数。例如，在前南斯拉夫，菟丝子危害过约 50%~70% 的紫花苜蓿；在白俄罗斯，当地作物受到亚麻菟丝子侵害的面积可达 25 hm²；在希腊等地，据调查约有 20% 的农田受到菟丝子的侵染并造成严重影响；欧亚的许多国家，其果木及许多经济作物，均受到不同程度的菟丝子的侵染^[29]。菟丝子仅在撒哈拉以南非洲就造成了超过 70 亿美元的年产量损失^[30]。在我国菟丝子所造成的危害也非常严重，其主要危害豆科作物、园林植物、牧草以及各种花卉等^[18]，据报道，2007 年，菟丝子在宁夏草原造成严重危害，危害到的草原面积达 10 万 hm²，严重阻碍了当地畜牧业的发展和生态环境的维护^[19]；2004 年，菟丝子在新疆阿勒泰地区的苜蓿上传播蔓延，造成苜蓿减产 30% 以上，并且该地区的苗木也受到不同程度的侵害，严重威胁到该地区畜牧业和林果业的发展^[31-32]，菟丝子对我国农林经济的影响已经越来越大。

菟丝子主要通过种子进行繁殖，在土壤中越冬休眠，第二年夏初萌发，具体萌发时间依据当地气候因素等条件而定，时间大约在 3 月~6 月，并且菟丝子种子的萌发生长与寄主植物的生长发育呈现同步节律性。于合适的条件下萌发后初生幼苗黄绿色丝状细茎，能进行光合作用，该阶段为自养阶段，然后其茎藤会向四周延伸去寻找合适的寄主植物，待 2 周后未寄生到适宜的寄主上，菟丝子即会枯萎死亡。若成功寄生后，菟丝子会产生特化吸器吸附在寄主上，此时进入寄生阶段。菟丝子

在寄生寄主稳定后，其埋藏在土壤中的部分逐渐脱离土壤，营寄生生活。菟丝子的茎继续伸长，随着寄主的生长而生长，开花结籽时间大约 7~10 月，菟丝子的花小、颜色几白色或紫红色，所结种子小而多，种子生命力强，未遇合适萌发条件可在土壤中存活 5~8 年^[11,31]。

1.1.3 菟丝子在新疆的分布及危害

新疆地理位置和气候环境独特，有 5600 多公里的边境线，国家批准的对外开放的一类口岸 16 个，二类口岸 5 个，人员和各种物资往来非常频繁，从而导致一些危险性的有害生物容易传入或者传出，并且有大量文献报道新疆是菟丝子种类最多、危害最严重的地区。1986 年，阴知勤^[33]报道在新疆存在 11 种菟丝子，分别为百里香菟丝子（*Cuscuta epithimum* Morr.）、中国菟丝子、南方菟丝子、田野菟丝子、印度菟丝子（*Cuscuta indica* (Engelm.) V. Petr）、欧洲菟丝子、杯花菟丝子、苜蓿菟丝子、单柱菟丝子、啤酒花菟丝子和恩氏菟丝子（*Cuscuta engelmannii* Korhs），分布于新疆各地。张金兰^[34]1995 年报道新疆主要分布 4 种菟丝子，即苜蓿菟丝子、田野菟丝子、单柱菟丝子和杯花菟丝子，在南北疆均有分布；马德英^[20]在 2007 年依据菟丝子种子的鉴别特征报道了新疆的 8 种菟丝子，即中国菟丝子、南方菟丝子、田野菟丝子、欧洲菟丝子、杯花菟丝子、苜蓿菟丝子、单柱菟丝子和亚麻菟丝子等；迪丽拜尔等^[35]报道伊犁哈萨克自治州主要分布有田野菟丝子、中国菟丝子、苜蓿菟丝子、单柱菟丝子等 4 种菟丝子，其中田野菟丝子是当地优势种，寄主达 8 科 30 种植物；艾尼古丽等^[36]报道石河子地区主要分布有田野菟丝子和单柱菟丝子两种菟丝子。在同一地区，菟丝子的种类，不同调查者报道的数目存在很大差异，可能是由于不同的地理环境使得同种菟丝子表现出不同的形态特征，或者是先前鉴定技术比较单一、不够准确。综上，新疆菟丝子的具体种类还需进一步调查明确。

菟丝子种子生命力顽强、适应力强、寄主范围广、传播蔓延迅速，难以控制，近些年在新疆天山南北迅速蔓延，许多农作物、林木、田边杂草及花卉都遭到不同程度的侵害，对新疆的农林经济已经造成严重的损失。1970 年，在新疆玛纳斯，大片面积的榆树幼林遭受到菟丝子的侵害，80%以上的榆树林都受到不同程度的损害，给玛纳斯造成了严重的经济损失^[33]；1999 年，在伊犁地区，蔡磊明等^[27]调查发现田野菟丝子对苜蓿的危害占种植面积的 90%以上，寄主种类多达 113 种；2004 年，菟丝子在新疆阿勒泰地区的首蓿上传播蔓延，造成首蓿减产 30%以上^[31]；2013 年，阿拉山口出入境检验检疫局在该区域首次发现单柱菟丝子，并且其危害当地的榆树绿化带面积已达 200 m² 以上^[28]。在新疆，菟丝子不仅对油料作物、经济作物、饲料作物、蔬菜、香料植物有严重危害，同时还对果树、观赏植物、经济林木也会造成危害^[36]。

1.2 菟丝子的防治

由于菟丝子的种子多而小、休眠时间长，寄主广泛，适应环境能力强，生育期较短，传播蔓延迅速，具有特殊的寄生策略等特点，导致菟丝子的防治非常困难。目前对于菟丝子的防治主要采取植物检疫、农业防治、化学药剂防治和生物防治等措施，但是现有的防治措施仍然不能有效根除菟丝子的发生和危害，需更进一步的研究和探索。

1.2.1 植物检疫

菟丝子属的所有种都列于中国进境植物检疫性有害生物名录里，它不仅是我国的外检对象，同时在国内跨区时也属于检疫对象^[37]。我国在 1986 年将五角菟丝子列为进口植物检疫植物对象，1992 年国家就将菟丝子属下的所有种全部列为二类检疫杂草，2013 年 1 月将菟丝子列为全国林业危险性有害生物^[6]。目前植物检疫常采用的方法有：比重法、滑动法、磁吸法、干筛正筛法和倒筛法等物理方法^[38]，而分子检测技术应用于植物检疫上的研究也越来越多^[39]。在引进种子和苗木的过程中，若检验发现其携带菟丝子，应当立即将发现的菟丝子进行销毁处理。由于菟丝子种子本身所具有的一些特性，使得菟丝子一旦蔓延传播开后，就会很难根除，所以加强检疫是防止因菟丝子种子调运而传入无疫区最有效的方法。然而菟丝子的检验检疫需要明确菟丝子的种类，即明确检验检疫对象，同时要求检验检疫方法要尽可能快速和准确，这样才有助于更严格的进出口检疫。

1.2.2 农业防治

农业防治是目前农民在田间防治菟丝子时最常用的一种方式。具体防治措施有播前检验与选种，即通过筛选、风选可清除混杂在植物种子中 99%的菟丝子种子；深翻土壤，即结合苗圃和果园的栽培管理，在开春时对土地进行深翻中耕处理，可以将菟丝子种子翻到更深的土壤层里去，过厚的土壤层使得菟丝子的种子不能够萌发出土；肥料腐熟，即将家禽粪便等有机肥料充分腐熟，利用肥料发酵过程中的高温降低混杂在畜禽粪便中的菟丝子种子的萌发率，减少菟丝子种子利用畜禽粪便传播的机会；合理轮作，即与禾本科作物轮作 3 年以上，可以大幅度降低菟丝子数量；刈割，即田间常检查地块，发现菟丝子后，必须立即刈割被感染作物，剪除有菟丝子寄生的枝条，带到田外烧毁或深埋，以免再传播。

1.2.3 化学药剂防除

使用化学药剂控制菟丝子的发生及传播，是农民在田间最不常采用的一种方式，因其承担风险最大。由于药剂喷洒过程中会接触到作物上，可能会造成作物药害，从而造成一定的经济损失，并且喷洒化学农药也会对环境造成危害，破坏生态平衡，间接危害人类的生命安全，这是农民最不常采用的一种防治措施。目前，国内外学者通过研究已经筛选出 60 多种具有较好防治效果的除草剂^[40]。杜晓莉等^[41]对广西园林菟丝子进行 9 种药剂防除筛选，施用药剂 30d 后，仅筛选出 6%菟丝特具有较好的防效，在菟丝子的不同部位施用该药剂，防效均可达 90%以上，并发现其对寄主植物基本无害，而施用的其他药剂要么会对寄主发生不同程度的药害，要么防除菟丝子效果不佳，未达到理想的防治效果。杨思霞等^[42]对 20 种除草剂进行筛选发现，施用在日本菟丝子上可以达到较好防治效果且安全性较高的药剂有 6%菟丝特 AS 30 mg/L 和 41%草甘膦异丙胺盐 AS 365 mg/L。白瑞霞等^[43]从 12 种土壤处理除草剂中筛选出 90%乙草胺 EC、96%精异丙甲草胺 EC、72%异丙甲草胺 EC 和 33%二甲戊灵 EC 等药剂对菟丝子均具有较好的防除效果，并且挑选的 12 种除草剂均能明显抑制菟丝子幼苗的生长和发育。有关许多文献报道田间使用最多防治菟丝子的除草剂是草甘膦和 48%的地乐胺^[44-47]，但是有研究发现使用草甘膦除草剂后，连续观察 10d 发现，只在施药 5d~7d，日本菟丝子藤

蔓开始出现枯萎死亡现象,但是据寄主植物较近的菟丝子茎并没有完全枯萎死亡,随着药效的降低,其很快可以正常生长发育,不能达到彻底根除菟丝子的目的^[48]。

1.2.4 生物防治

目前,关于利用微生物防治有害生物的研究越来越多,因其具有低成本、对环境友好等特点,而应用生物防治去防治菟丝子是一个良好的发展方向。近 40 多年来,关于应用植物病原真菌去防治杂草生物的发展十分迅速,并且有研究已得到了大范围的应用,最终发展为商品^[49-50]。利用微生物控制杂草已发展成为一门新学科^[51-52]。菟丝子生物防治的微生物,目前已报道的主要有菟丝子链格孢菌(*Alternaria cuscutacide* Rudak)、茶褐斑拟盘多毛孢[*Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Stey]、腐皮镰孢[*F.solani* (Mark.) Sacc.]、细交链孢(*Alternaria tenuis* Nees)和半裸镰孢(*Fusarium semitectum* Berk. et Rav.)^[53-55]。1963 年山东省农科院刘志海等研制出一种对大豆菟丝子具有良好防效的微生物菌剂“鲁保一号”^[52,54,56]。1960 年,“鲁保一号”微生物菌剂曾在中国 20 多个省、区进行大面积范围的生产 and 试用,在全国 60 万 hm^2 面积的农作物上推广应用,并且发现其对菟丝子的控制作用显著,可帮助受损的田地挽回约 50%的损失。然而随着时间的延长,该菌剂通过不断地人工培养和筛选,其杀菌活力明显减弱,产孢量急剧下降,致病力减弱,基本失去了生产和应用价值^[57]。后续有许多研究关于菌种退化原因和应用,对菌液产孢、培养条件进行优化,使得胶孢炭疽菌的活力增强,致病力增强,提升防治效果,或是分离出新的致病力更强的微生物菌株,应用于菟丝子的生物防治^[58-60]。

1.3 菟丝子的鉴定方法

菟丝子的鉴定识别方法主要分为以下几大类:形态学鉴定、细胞学鉴定、生物化学鉴定(化学分类标记、同工酶)、分子水平鉴定(制备探针和标记探针、PCR)等^[61]。菟丝子属的形态学鉴定主要是通过肉眼或光学显微镜观察其形态特征,具有直观的特点,是一种比较传统常规的物种鉴定技术^[26,62-68],菟丝子形态特征的研究主要包括:种子、蒴果、茎、花等方面,由于菟丝子种子较小,有些形态特征不够明显,还需要一些细微的形态特征作为补充,比如一些研究人员基于扫描电镜法^[13,38,69-72],对菟丝子的花粉粒、晕轮细胞、种子的种脐、种皮表面的纹饰、孔沟数量等细微特征进行观察研究鉴定,以此区分不同种类的菟丝子。菟丝子的细胞学鉴定主要是通过研究菟丝子某个组织细胞的结构和内含物质从而达到分类的目的。金晓等^[73]通过观察 8 种菟丝子的种子横断面形状、胚乳等特征,对 8 种菟丝子进行鉴定识别;刘丽莎等^[74]对菟丝子染色体的性状特征进行研究,对比 2 种菟丝子,即日本菟丝子和中国菟丝子的染色体相对长度,发现二者存在差异,从而对 2 种菟丝子进行区分,该研究奠定了将染色体应用于菟丝子属的分类鉴定的基础。菟丝子的化学分类研究的是基于对其化学成分的研究分析,已有大量文献关于菟丝子内部的化学成分的研究^[75-81]。例如,Christiane Loffler 等^[82]对菟丝子属的 9 个种类进行分类是通过菟丝子中的酚类成分含量的不同来进行的,并且发现在菟丝子中酚类相对比而言是最稳定的,该结果进一步说明酚类物质可作为菟丝子化学分类的依据。近些年,现代分子生物学技术发展速度飞快,关于将其应用于植物品种鉴定的研究也越来越多,由此品种鉴定的方法得到了进一步补充,鉴定结果也更具科学性和准确性。其中,高必达等^[83]基于 ITS 序列对 7 种药用菟丝子样品进行研究,结果表明菟丝子的 ITS 序列片段在进化

中非常保守; Kooij^[84]等检测了 6 种菟丝子的 *rbcL* 基因, 并且结果发现只有一种菟丝, 即臭菟丝子 *Cuscuta odorata* 子上不含有 *rbcL* 基因, 而在其它 5 种菟丝子上均能检测到 *rbcL* 基因, 因此, 该结果表明菟丝子种的区分可以通过检测 *rbcL* 基因的有无来进行。Taberlet P^[85]等研究基于 *trnL* 基因设计了六种通用引物, 这六种引物可以扩增大部分植物叶绿素 DNA 非编码区, 表明其可用于研究植物的种间进化和种内相关系统发育。并且还有一些研究者在菟丝子的核酸核型、质体 DNA、蛋白质电泳、分子标记等方面进行过初步的研究与探讨, 这些研究都促进了菟丝子分子生物学水平的发展与进步^[86-100]。

1.4 菟丝子检验检疫技术研究

1.4.1 常规检疫方法

菟丝子在我国所造成的危害和经济损失, 已经使得研究者需要更加重视和关注菟丝子的发生并且研究出有效的防治措施。由于菟丝子本身所存在的一些特性, 使得防治非常困难, 而控制住菟丝子进出境传播蔓延就显得十分必要。目前对菟丝子检疫最常用的方法是对其种子大小、种皮花纹、种脐形状、种脐周边晕圈等特征进行鉴定^[20,36-37], 这些都属于比较常规的方法, 但菟丝子种子较小, 不同种类的菟丝子种子的生物学特征区别不明显, 基于此可能会给菟丝子的种类鉴定带来一定困难, 而采用扫描电镜对菟丝子种子的细微特征进行鉴定就成为菟丝子形态鉴定的重要补充手段^[101], 还有采用化学分类标记法、色谱法、细胞学鉴定等方法来区分不同种类菟丝子, 但这些方法均存在费时费力的缺点^[101], 不能够快速准确的检疫鉴别出菟丝子。

1.4.2 快速检测技术

菟丝子种子远距离调运、牲畜粪便、刮风以及流水均可以传播菟丝子种子, 其种子可以混杂在苜蓿、辣椒、甜菜以及其他伪混品种子中是菟丝子在全国快速传播蔓延的主要原因, 快速、准确的检测技术对预防和控制菟丝子进一步扩散非常重要。由于菟丝子的常规检疫方法存在着许多不足和缺点, 近些年来快速检测技术的发展十分迅速, 已然成为研究热点^[102-104]。菟丝子的快速检测技术的研究也越来越多, 高必达等^[83]基于菟丝子的 ITS 序列通过 PCR 鉴定将七种菟丝子与四种易混品区分开, 张裕君等^[39]基于欧洲菟丝子的 *rbcL* 基因, 建立了一种快速且准确的 PCR 检测技术, 灵敏度可实现单粒种子的检测。郭琼霞等^[105]采用 EST-ILPs 技术对菟丝子的 5 个近似种进行 ILPs-PCR 反应, 结果表明供试的这 5 种菟丝子可以通过菟丝子内含子基因型的多态性特征进行区分。除此之外, 郑传进^[106]等基于 *trnL-trnF* 序列建立了一种药用植物何首乌与其混淆品区分的 PCR-RFLP 方法, 并且重现性好效果稳定, 该研究进一步说明 *trnL-trnF* 序列在被子植物的种间鉴定和鉴别检测方面可以得到很好的应用。分子快速检测技术的发展迅速, 根据相关部门需求不断改进检测技术, 有助于检疫部门更好、更快速准确的防控菟丝子的发生和传播蔓延。

1.5 菟丝子种子处理技术研究

1.5.1 菟丝子种子诱导萌发研究

菟丝子的种子种皮比较坚硬、不透水，种子存在物理休眠现象。种子休眠可以通过一些物理和化学方法进行破除^[107-108]。温度、光照、相对湿度、土壤 pH、外源植物激素处理和化感物质对植物种子的发育、休眠和萌发等生理过程均具有重要的影响^[109]。不同种类的菟丝子种子萌发和幼苗生长所需的温度、湿度等有所不同。据先前的研究报道，单柱菟丝子打破休眠的种子在温度为-4~35℃之间均能萌发，并且它的最适萌发温度为 30℃；田野菟丝子打破休眠的种子在温度低于 10℃时，高于 35℃时种子基本不能萌发，而田野菟丝子种子的最适萌发温度为 25℃^[36]。在植物生长发育过程中，植物激素在其中起着重要的调节作用，包括种子的休眠与萌发方面。据杜晓莉^[107]报道，使用不同浓度的 GA 处理中国菟丝子种子发现，仅在一定的浓度范围内，对菟丝子种子萌发起着促进作用，而超出一定范围，即当 GA 浓度高达 300mg/L 时，则表现为抑制菟丝子种子萌发。Juan 等^[109]对南方菟丝子响应植物外源激素 ABA 进行研究，结果表明植物外源激素 ABA 对南方菟丝子的下胚轴伸长和种子萌发均具有较弱的抑制作用。化感作用对于植物的作用强度是与其相对浓度有关^[110]。研究发现，这种关联性呈现出一定的规律性，即化感物质低浓度时对植物的代谢及生长一般表现的是促进效果，而高浓度时一般表现为抑制效果^[111]。

1.5.2 种子老化研究

种子经过人工老化后，其活力也会发生变化。随着种子不断老化，种子的各项生理活动无法顺利进行，导致种子的活力下降^[112]。老化劣变的植物种子的细胞膜均会受到不同程度损伤，从而增强膜的渗透性，若膜受到永久性损伤则会导致膜内物质，如激素、酶蛋白、大量可溶性营养物质的泄露，严重影响种子的正常新陈代谢过程。国内外学者进行过许多研究关于老化及劣变对大豆(*Glycine max*)、花生(*Arachis hypogaea*)等作物，洋葱(*Allium cepa*)、萝卜(*Raphanus sativus*)等蔬菜种子细胞膜透性的影响，研究结果一致说明种子发生劣变后，其细胞膜的透性会增加^[113-116]。在人工老化处理种子的相关研究中，种子的活力指标和生理指标变化趋势基本保持一致，老化劣变种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数，相关保护酶活力均随着老化时间的增加，整体表现为下降趋势；而种子浸出液的电导率、丙二醛(MDA)含量和可溶性糖含量均随着老化时间的增加，整体表现为上升趋势，二者呈现负相关关系。因此，随着种子老化程度的深入，种子内部的物质会发生代谢变化和生理生化劣变，并且与之相应产生的一些代谢产物极有可能更进一步作用于老化种子，加速其劣变，从而使得种子萌发受到严重抑制^[117]。目前，尚未有研究关于菟丝子的老化以及对于其组织内部结构的影响，该方向存在着一定的研究潜力。

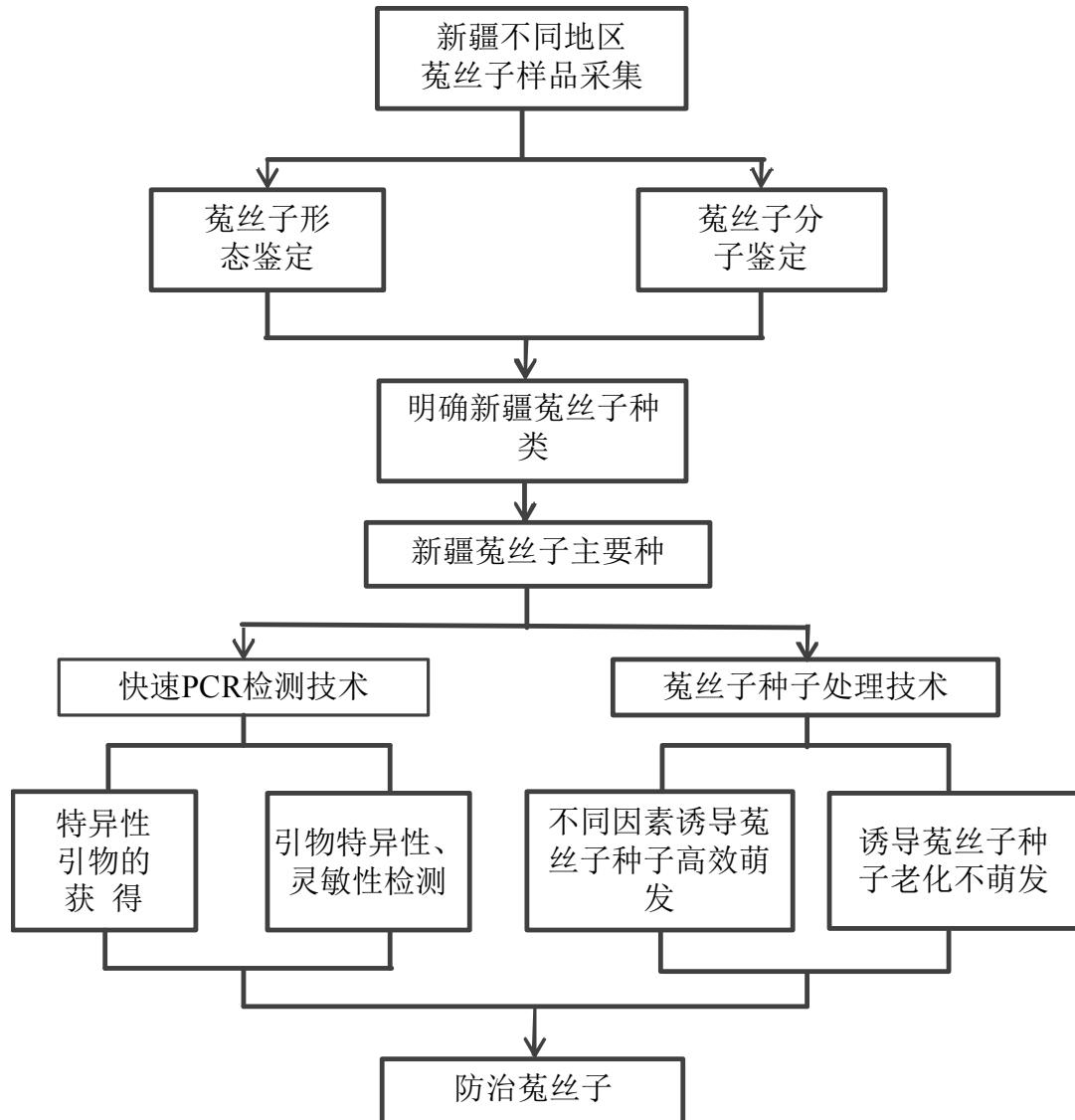
1.6 研究意义及思路

1.6.1 研究意义

新疆有 5600 多公里的边境线，国家批准的对外开放的一类口岸 16 个，二类口岸 5 个，人员和

各种物资往来非常频繁，从而导致一些危险性的有害生物容易传入或者传出，菟丝子种子容易混杂在品相相似的作物和饲料中进行远距离的运输、传播和扩散，同时其环境适应性强、寄主范围广泛，使得菟丝子在新疆的危害越来越严重，给新疆许多地区造成了一定程度的经济损失^[118]。目前，菟丝子的防治主要采取植物检疫（形态）、农业防治（深翻和拔除）、化学防治（除草剂）、生物防治（生防菌或生防昆虫）等方法，而这些方法并不能有效控制菟丝子的发生和传播蔓延，菟丝子的防治仍然十分棘手。本研究主要目的明确新疆菟丝子的种类、为新疆主要种的检疫提供一种快速检测技术，并且初步探究菟丝子种子的处理技术，最终为菟丝子综合防控提供理论支撑和技术指导。

1.6.2 技术路线



第二章 寄生性杂草菟丝子在新疆的主要种类鉴定

菟丝子近几年在新疆的传播速度非常快,造成的危害也日益严重,给甜菜、制干辣椒、甜叶菊、绿化林木、花卉均已造成严重影响,同时新疆也是报道菟丝子种类最多的一个区域,已报道的种类达到8种以上^[20,33],但这些报道的鉴定依据完全依赖于其缠绕的寄主和茎、花、蒴果、种子等形态学特征,因寄主及生长环境的不同,菟丝子形态学特征变化较大,会给形态学鉴定带来困难,将形态学特征结合分子辅助鉴定已成为目前菟丝子鉴定最常用的方法和技术^[39,119]。因菟丝子属所有种类都是我国进境检疫对象^[7],新疆已报道的菟丝子种类在全国最多,会对农产品调运带来较大麻烦,尽快明确新疆地区菟丝子的种类和分布有助于为检疫部门提供参考依据。本研究从南北疆的农田、绿化林带、荒漠等区域采集不同寄主上的菟丝子的茎、花和种子,对其采用形态学鉴定结合分子生物学鉴定的方式,明确新疆地区发生的菟丝子的种类,从而为检疫部门和菟丝子的防治提供依据与指导。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

从2017年7-10月份分别从巴音郭楞蒙古自治州、昌吉回族自治州、塔城地区、阿勒泰地区、石河子市周边农作物、田间杂草、绿化林木、果树、花卉等25种不同寄主上采集菟丝子的茎、花和种子,装入样品袋中带回实验室进行鉴定,样品具体信息见表2-1。

2.1.2 鉴定方法

2.1.2.1 形态学鉴定

将采集来的60份菟丝子样品经过处理后直接目测并置于体式显微镜下,观察菟丝子的茎、花、种子的各部分形态学特征并进行鉴定^[7,36,120-123]。

2.1.2.2 分子生物学鉴定

2.1.2.2.1 提取菟丝子样品的DNA

取60份菟丝子种子样品各20粒,用75%的无水乙醇处理1min,再用10%次氯酸钠浸泡10min,最后用灭菌的蒸馏水冲洗3~5次,冲洗好的样品种子放置在灭过菌的滤纸上晾干。采用改进的CTAB法提取样品植物的DNA^[124]。

2.1.2.2.2 PCR 扩增 ITS、rbcL、trnL-F 序列

采用艾尼古丽^[36]所报道的3对引物(表2-1),扩增体系为25 μ L(2 \times PCR TaqMix(北京全式金生物)12.5 μ L,10 μ mol/L上下游引物各1 μ L,基因组DNA0.5 μ L,ddH₂O10 μ L)。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5min;再经94 $^{\circ}$ C变性30s,53 $^{\circ}$ C退火30s(目标片段ITS和trnL-F)/55 $^{\circ}$ C退火30s(目标片段rbcL),72 $^{\circ}$ C延伸40s循环30次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。扩增产物经1.2~2%琼

脂糖凝胶电泳分离检测 PCR 产物。

表 2-1 PCR 引物详细信息
Table 2-1 PCR primer information

目标片段	引物名称	引物序列 (5'-3')	来源
Target sequence	Primer name	Primer sequence	Source
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	高必达等 ^[83]
	ITS4	GG	
rbcL	rbcL-f	TCACCACAAACAGAGACTAA	张裕君等 ^[39]
	rbcL-r	TCTTCACATGTACCTGCAGT	
trnL-F	C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet P ^[85]
	F	ATTTGAACTGGTGACACGAG	

2.1.2.2.3 ITS、rbcL、trnL-F 序列分析及系统发育树构建

PCR 反应产物委托北京六合华大基因公司进行测序。利用 NCBI 中 BLAST 和 Clustal W 软件进行同源性比较。选取来自不同地区不同寄主的 25 份菟丝子样品，针对其相应序列分别在 NCBI 中下载同源序列。采用 MEGA6 软件，对序列进行比对，通过软件中的 Neighbor-Joining 构建系统发育树，进行 1000 次重复检测。

2.2 结果与分析

2.2.1 形态学鉴定结果

采集到的 60 份菟丝子样品依据茎的颜色、粗细，花的颜色和大小，以及种子的颜色和大小等各类特征，将其大致先分为两类：序号 1~23 的菟丝子样品的茎藤颜色大体为淡黄色至橘黄色，茎细丝状，直径为 0.2~0.6mm（图 2-1A）；序号 24~60 的菟丝子，茎藤颜色大体为微红色并有紫色瘤状突起，茎较粗，直径为 1.2~2.8mm（图 2-1B）。

序号 1~23 的菟丝子的蒴果形状大致为压扁的球形，不开裂。种子形状为椭球形，颜色为黄绿色至黄褐色，并且比较小，长 1.1~1.9mm，宽 0.8~1.1mm，背面圆拱（图 2-2A）。种脐较短，椭圆形（图 2-3A）；序号 24~60 的菟丝子蒴果卵圆形或球形，周裂。种子椭圆形，灰白色至棕褐色，较大，长 2.6~3.4mm，宽 2.0~2.7mm。背面平或微凹（图 2-2B）。种脐较长，线形（图 2-3B）。

序号 1~23 的菟丝子的花颜色大致为近白色，花长约 2~4 mm，有花梗，团伞花序。5 片花萼，裂片呈椭圆形，一般裂片的宽比长大。花冠裂片形状为三角形状。鳞片卵形，边缘流苏状。子房球形。花柱 2，比较纤细，并且其柱头的形状为头状（图 2-4A）；序号 24~60 的菟丝子的花紫红色或

玫红色，花长约 3~4.5mm，不具有花梗或者花梗较短，花序为穗状。花萼有 5 片，花萼裂片呈半圆形。花冠裂片形状为卵圆形。鳞片形状大致为锯齿状，并且鳞片的基部是连在一起的。其花药没有柄。这些样品的子房形状为球形。只有 1 个较短的花柱，并且其柱头的形状大约为头状，中央有一条浅浅的裂缝（图 2-4B）。



注：A 田野菟丝子；B 单柱菟丝子

Note: A. *C. campestris*; B. *C. monogyna*

图 2-1 两种菟丝子的茎藤对比图

Fig. 2-1 Stem comparison of two species of *Cuscuta*

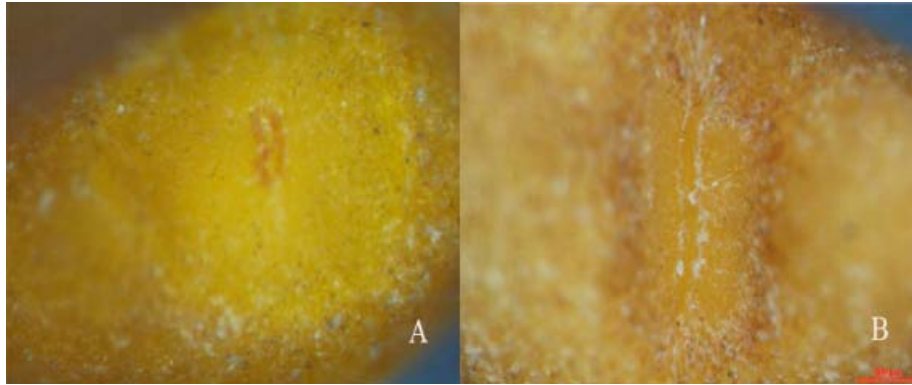


注：A 田野菟丝子；B 单柱菟丝子

Note: A. *C. campestris*; B. *C. monogyna*

图 2-2 两种菟丝子的种子对比图

Fig. 2-2 Seeds comparison of two species of *Cuscuta*

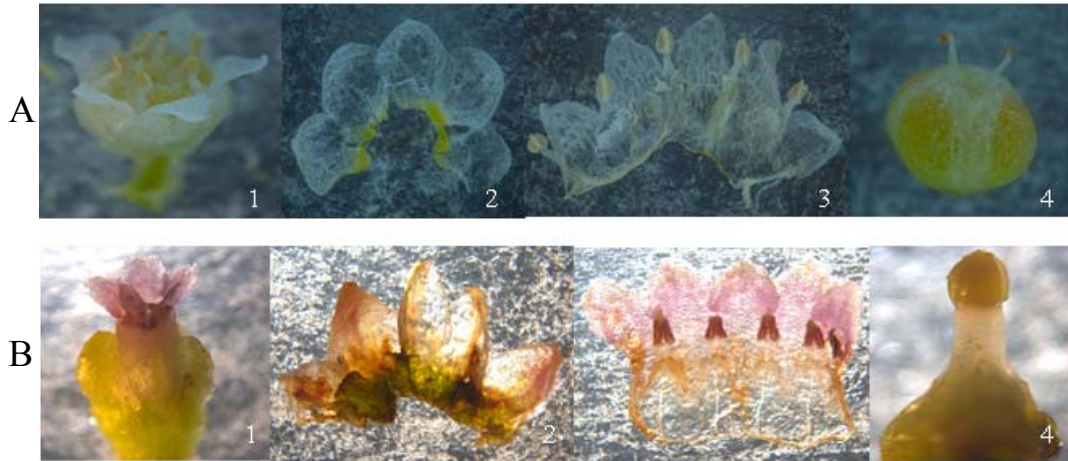


注：A 田野菟丝子；B 单柱菟丝子

Note: A. *C. campestris*; B. *C. monogyna*

图 2-3 两种菟丝子的种子种脐对比图

Fig. 2-3 Umbilici comparison of two species of *Cuscuta*



注：A：田野菟丝子，1：花器，2：花萼，3：花冠，4：花柱；B：单柱菟丝子，1：花器，2：花萼，3：花冠，4：花柱

Note: A: *C. campestris*, 1: flower organ, 2: calyx, 3: expanded corolla, 4: style; B: *C. monogyna*, 1: flower organ, 2: calyx, 3: expanded corolla, 4: style

图 2-4 两种菟丝子的花解剖观察对比图

Fig. 2-4 Flower anatomy comparison of two species of *Cuscuta*

根据以上几个形态特征将序号 1~23 菟丝子样品鉴定为田野菟丝子，序号 24~60 样品鉴定为单柱菟丝子。

2.2.2 分子鉴定结果

经 ITS、*rbcL*、*trnL-F* 三个序列扩增后测序结果显示于下表 2-2 中，采集到的菟丝子样品序号 1~23 与田野菟丝子同源性高达 99%，序号 24~60 与单柱菟丝子同源性高达 99%，测序后将测序结果提交到 GenBank，获得 ITS 序列登录号为 MH392340~MH392399，*trnL-F* 序列登录号为 MH392400~MH392459，*rbcL* 序列已提交，还未获得登录号。基于三个序列，所选取的 25 个菟丝子样品构建的系统发育树如下（图 2-5、图 2-6、图 2-7）。结果显示，ITS 序列、*rbcL* 序列、*trnL-F*

序列测定产物 2、4、5、6、8、9、10、13、15、16、17、18、19、21、23 分别与已登录的相对应的序列 *C.campestris* (KT430863)、*C.campestris* (EU330268)、*C.campestris* (KU761502) 序列相似率达 99%；11、20、28、30、33、42、47、50、52、59 与已登录的相对应的序列 *C.monogyna* (AY554405)、*C.monogyna* (KJ436686)、*C.monogyna* (KX168400) 序列相似率达 99%；ITS, rbcL 和 trnL-F 序列分析结果表明，序号 1~23 为 *C.campestris*，24~60 为 *C.monogyna*，即田野菟丝子和单柱菟丝子两种，与形态鉴定结果所得出的结论一致。

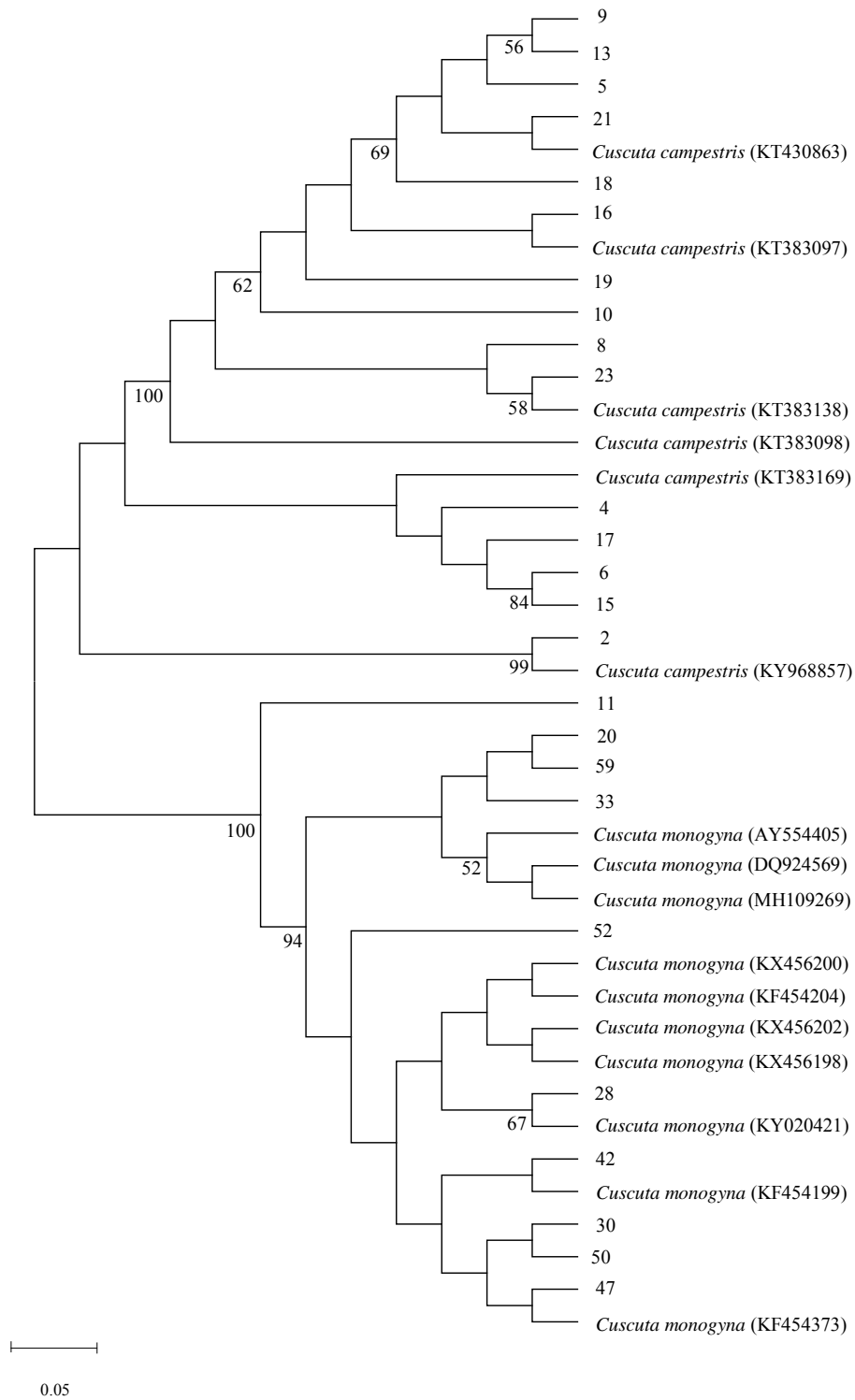


图 2-5 基于 ITS 序列构建的 25 个菟丝子样品的系统发育树

Fig. 2-5 Phylogenetic tree based on alignment of ITS sequences of 25 species of *Cuscuta*

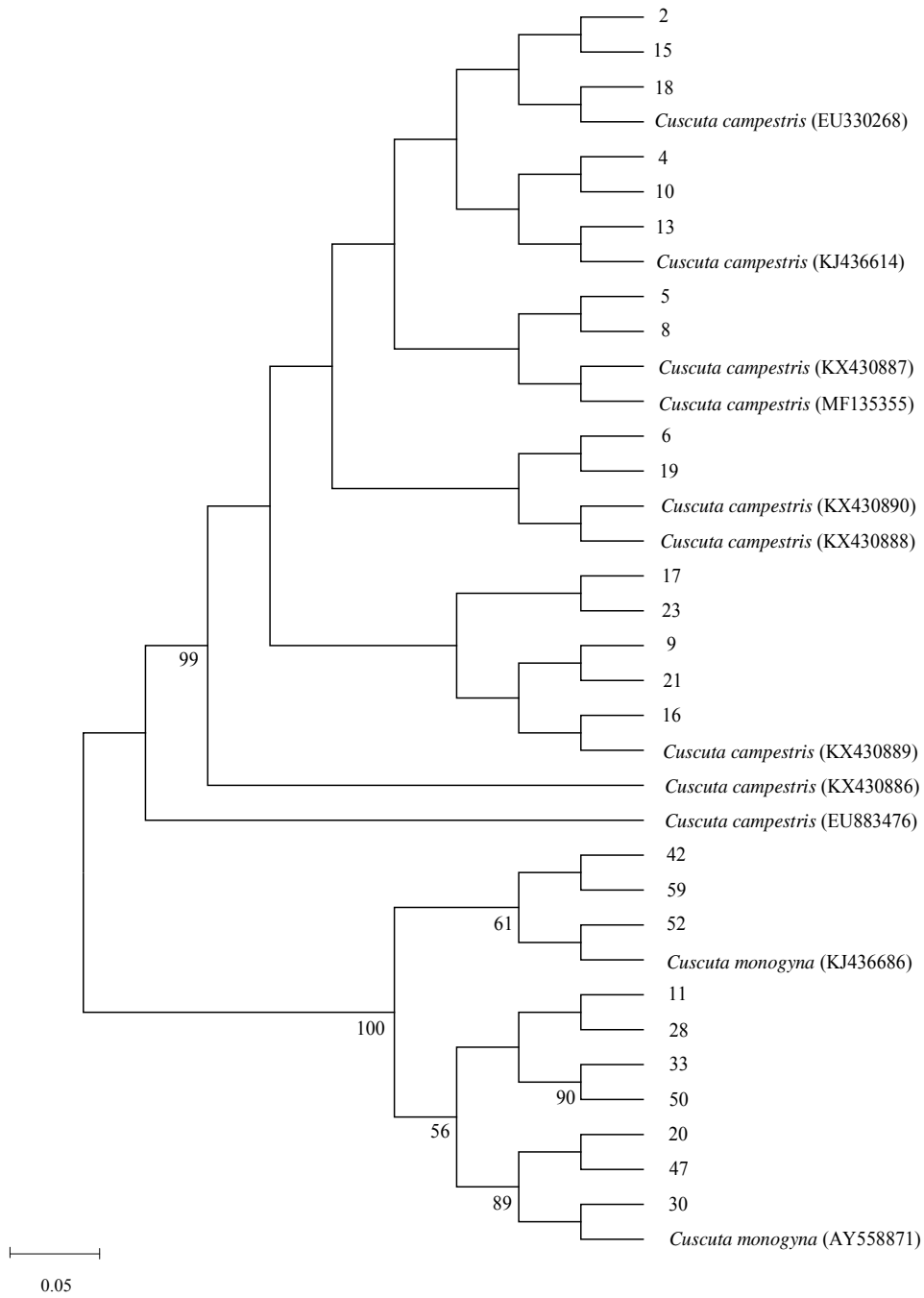


图 2-6 基于 *rbcL* 序列构建的 25 个菟丝子样品的系统发育树

Fig. 2-6 Phylogenetic tree based on alignment of *rbcL* sequences of 25 samples of *Cuscuta*

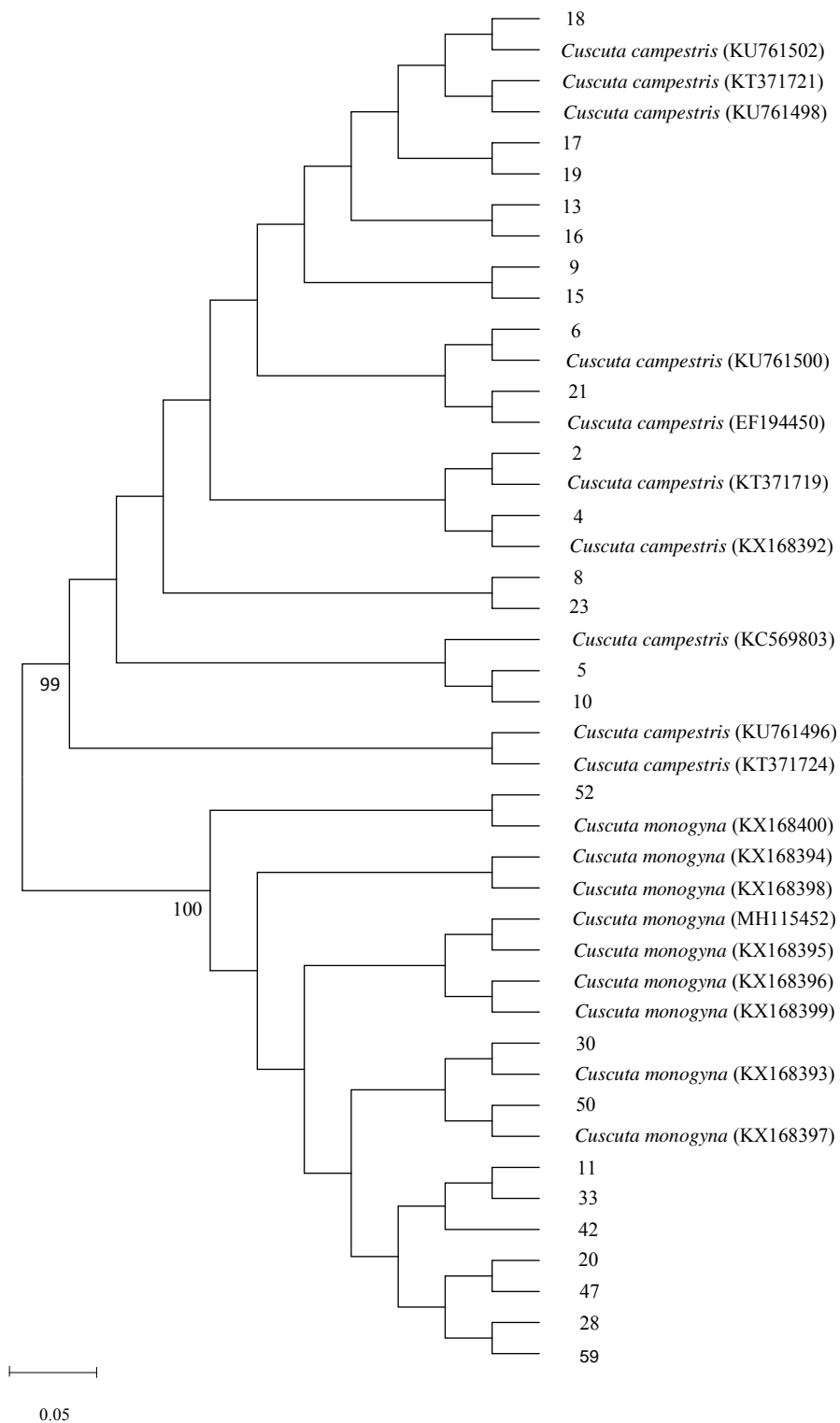


图 2-7 基于 *trnL-F* 序列构建的 25 个菟丝子样品的系统发育树

Fig. 2-7 Phylogenetic tree based on alignment of *trnL-F* sequences of 25 samples of *Cuscuta*

表 2-2 菟丝子样品采集信息和分子鉴定结果统计表

Table 2-2 The information of *Cuscuta* collection and molecular identification results

序号 No.	寄主 Host	采集地点 Collection location	采集日期 Date of collection	分子鉴定 Molecular identification			种名 Species
				ITS	rbcL	trnL	
1	铃铛刺	库尔勒 22 团 3 连	2017.8.14	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
2	加工番茄	库尔勒 22 团 3 连	2017.8.14	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
3	甜菜	库尔勒 22 团 15 连	2017.8.14	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
4	辣椒	库尔勒 21 团 8 连	2017.8.15	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
5	甜叶菊	库尔勒 21 团良繁连	2017.8.15	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
6	甜菜	库尔勒 25 团 2 连	2017.8.16	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
7	加工番茄	库尔勒 25 团农技推广站	2017.8.16	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
8	拉拉藤	库尔勒市市区	2017.8.16	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
9	矮牵牛	喀纳斯景区	2017.8.16	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
10	粉苞苣	哈密市伊吾县	2017.8.17	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
11	苦豆子	第六师军户农场	2017.8.17	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
12	苍耳	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
13	葱	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
14	甜菜	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
15	田旋花	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
16	荆芥	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
17	小蓬草	塔城 163 团 4 连	2017.8.24	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
18	苜蓿	塔城 168 团 4 连	2017.8.25	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
19	苍耳	塔城市阿西尔乡	2017.8.25	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
20	榆树	塔城阿西尔乡	2017.8.25	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
21	小茴香	阿勒泰 188 团 9 连	2017.8.26	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
22	榆树	额敏县霍吉尔特乡	2017.8.26	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
23	苍耳	额敏县霍吉尔特乡	2017.8.26	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
24	苦豆子	石河子市火车站	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
25	榆树	石河子市火车站	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
26	白蒿	石河子市火车站	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
27	芸香	石河子市火车站	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
28	天仙子	石河子市火车站	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
29	苦豆子	新疆农垦科学院内	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
30	铃铛刺	新疆农垦科学院内	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
31	榆树	新疆农垦科学院内	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
32	苍耳	新疆农垦科学院内	2017.10.15	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C.monogyna</i>
33	芦苇	新疆农垦科学院内	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>

新疆地区菟丝子种类鉴定、主要种快速检测和种子处理技术研究

34	榆树	新疆农垦科学院内	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
35	铃铛刺	石河子市军垦第一连	2017.10.15	田野菟丝子	田野菟丝子	田野菟丝子	<i>C. campestris</i>
36	苹果树	石河子市军垦第一连	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
37	苦豆子	石河子市军垦第一连	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
38	小蓬草	石河子市军垦第一连	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
39	榆树	石河子市 143 团	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
40	榆树	沙湾西树窝子村	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
41	苦豆子	沙湾县西树窝子村	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
42	白蒿	沙湾县西树窝子村	2017.10.15	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
43	榆树	呼图壁县大丰镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
44	苦豆子	呼图壁县大丰镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
45	榆树	呼图壁县五工台镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
46	苦豆子	呼图壁县五工台镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
47	小苹果树	呼图壁县五工台镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
48	榆树	呼图壁县县城	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
49	榆树	玛纳斯县平原林场	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
50	杨树	玛纳斯县平原林场	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
51	苦豆子	玛纳斯县平原林场	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
52	梧桐树	玛纳斯县平原林场	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
53	榆树	玛纳斯县兰州湾乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
54	苦豆子	玛纳斯县兰州湾乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
55	天仙子	玛纳斯县兰州湾乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
56	苦豆子	玛纳斯广东地乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
57	榆树	玛纳斯县广东地乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
58	白蒿	玛纳斯县广东地乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
59	枸杞	玛纳斯县广东地乡	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>
60	榆树	玛纳斯县包家店镇	2017.11.7	单柱菟丝子	单柱菟丝子	单柱菟丝子	<i>C.monogyna</i>

2.3 讨论

菟丝子是世界性的杂草检疫对象，多数种类对其寄主都会造成一定程度的损害，近年来引起许多研究者的关注。据报道，全世界分布的菟丝子属超过 200 种，我国大约有 10 种以上^[1,125]。目前，据已报道的菟丝子种类相关文献，在新疆地区，菟丝子无论是在种类、分布范围还是危害情况都相较于其他地区更多、更广、更严重。其中阴知勤等^[33]曾报道新疆存在 11 种菟丝子，并且对 10 种菟丝子的形态学特征进行了描述、寄主及分布地区；马德英等^[20,35]报道了新疆伊犁地区有 4 种菟丝子，并对新疆农田的 8 种菟丝子的种子外部形态特征和种胚形态进行了研究；严丽^[31]等调查发现阿勒泰地区有 3 种菟丝子。以上文献报道调查的菟丝子种类鉴定基本上是通过其茎、花和种子的形态特征区分，而有相关研究发现同种菟丝子的茎、花和种子形态特征确实存在一定差异^[36]，并且对于新疆菟丝子种类调查不够全面、鉴定方法单一，存在极高的不准确率，所以菟丝子单一的形态学鉴定不能够完全准确的判定菟丝子的种类，需要加以分子辅助鉴定来进一步明确。艾尼古丽等^[36]通过形态学特征和分子辅助鉴定相结合鉴定新疆石河子地区仅有田野菟丝子和单柱菟丝子两种。

我们采集了来自新疆不同地区的 25 种寄主上的 60 份菟丝子样品，采用形态学特征和分子辅助鉴定相结合的方式，最终确定新疆地区的菟丝子主要是单柱菟丝子 *C.monogyna* 和田野菟丝子 *C.campestris* 两种，这与阴知勤等^[33]报道的新疆存在 11 种菟丝子的结果有很大的差异，但本次研究所采集的菟丝子样品数目有限，可通过扩大采样范围和增加采样数量来进一步说明鉴定结果的科学性和可靠性。

2.4 小结

在新疆南北疆各地菟丝子发生严重区域采集菟丝子样品 60 份，采用形态学鉴定和分子辅助鉴定相结合的方法，对 60 份菟丝子样品进行鉴定，明确新疆菟丝子主要是两种，即田野菟丝子和单柱菟丝子。采集的 60 份菟丝子样品的寄主植物有 25 种，有 20 种草本植物：分别铃铛刺、番茄、甜菜、辣椒、甜叶菊、拉拉藤、矮牵牛、粉苞菊、苦豆子、苍耳、葱、田旋花、荆芥、小蓬草、苜蓿、小茴香、白蒿、芸香、天仙子、芦苇；木本植物 5 种：分别是榆树、苹果树、梧桐树、枸杞、杨树。调查采样时发现单柱菟丝子多寄生木本植物，也可寄生草本植物；田野菟丝子仅发现在草本植物上有寄生。

第三章 两种菟丝子 PCR 快速检测技术研究

基于新疆菟丝子种类的调查鉴定结果，对于鉴定出的两种菟丝子，即单柱菟丝子和田野菟丝子进行研究。菟丝子种子小，易混杂于其他植物种子或饲料中，目前检疫部门主要依据直接目测或置于显微镜下观察抽取样品的形态特征进行鉴定检测，但菟丝子种子细微特征有时不明显，这给鉴定的准确性造成困难，能为检疫部门提供一种高效、准确的快速检测技术用于菟丝子的检疫就很关键。以新疆 2 种最主要的菟丝子，即单柱菟丝子和田野菟丝子为研究对象，建立一种 PCR 分子检测，该方法能很快将单柱菟丝子和田野菟丝子从其他植物中检测出来，为两种菟丝子检验检疫提供更便利、快捷的检疫手段和技术。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

种子：单柱菟丝子种子采集自新疆额敏县霍吉尔特蒙古族乡、塔城地区阿西尔乡、石河子市、玛纳斯县等地；田野菟丝子种子采集自巴音郭楞蒙古自治州库尔勒市和什力克乡、哈密地区伊吾县、塔城地区阿西尔乡、石河子市等地；两种菟丝子均已经过形态学鉴定和分子鉴定，鉴定准确的种子保存于本实验室；用于对照的南方菟丝子、白花三叶草、紫花苜蓿、欧洲油菜、莱菔子、苦豆子等种子购买自（江苏长景种业有限责任公司）。种子详细信息见表 3-1。

表 3-1 PCR 快速检测供试种子

Table 3-1 The seeds of PCR rapid detection

序号 NO.	编号 Number	采集地点 Collection point	种名 Species	Genbank 序列号 Genbank number
1	DZ-1	新疆额敏 (Xinjiang, Emin)	<i>C.monogyna</i>	MH392422
2	DZ-2	新疆塔城 (Xinjiang, Tacheng)	<i>C.monogyna</i>	MH392423
3	DZ-3	新疆石河子 (Xinjiang, Shihezi)	<i>C.monogyna</i>	MH392424
4	DZ-4	新疆玛纳斯 (Xinjiang, Manas)	<i>C.monogyna</i>	MH392425
5	TY-1	新疆库尔勒 (Xinjiang, Korla)	<i>C. campestris</i>	MH392400
6	TY-2	新疆哈密 (Xinjiang, Hami)	<i>C. campestris</i>	MH392401
7	TY-3	新疆塔城 (Xinjiang, Tacheng)	<i>C. campestris</i>	MH392402
8	TY-4	新疆石河子 (Xinjiang, Shihezi)	<i>C. campestris</i>	MH392403
9	NF	江苏长景种业	<i>C. australis</i>	MH795068

		(Jiangsu Changjing Seed Industry)		
		江苏长景种业		
10	SYC	(Jiangsu Changjing Seed Industry)	<i>Trifolium repens</i>	MH795069
		江苏长景种业		
11	MX	(Jiangsu Changjing Seed Industry)	<i>Medicago Sativa</i>	MH795071
		江苏长景种业		
12	YC	(Jiangsu Changjing Seed Industry)	<i>Brassica napus</i>	MH795072
		江苏长景种业		
13	LFZ	(Jiangsu Changjing Seed Industry)	<i>Raphanus sativus</i>	MH795073
		江苏长景种业		
14	KDZ	(Jiangsu Changjing Seed Industry)	<i>Sophora alopecuroides</i>	MH795074

3.1.2 方法

3.1.2.1 种子总 DNA 的提取及 trnL-F 基因序列 PCR 扩增反应

各取 20 粒种子样品，用 75% 的无水乙醇处理 30 秒，10% 次氯酸钠处理 5 min，蒸馏水冲洗 3 次。采用 DNAsure Plant Kit 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 DNA，按操作说明书的步骤进行，将提取好的 DNA 置于 -20℃ 冰箱保存。

PCR 反应体系与扩增反应程序同第二章 trnL-F 序列的 PCR 扩增时所采用的体系和程序一致。待 PCR 反应完成后，12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

3.1.2.2 物种特异性引物设计

采用 DNAMAN 软件中的 Sequence 程序，对田野菟丝子和单柱菟丝子的 trnL-F 序列在 GeneBank 中找到的同属其它种和另外五种混淆样品的 trnL-F 序列进行多重同源性比较，找出具有稳定差异的变异位点，进而筛选出两种菟丝子的特有变异位点，利用 Primer 5.0 软件根据两种菟丝子特有的变异位点分别设计种特异性引物。

3.1.2.3 引物特异性检测

分别用特异性引物对上述 14 份供试种子基因组 DNA 进行 PCR 扩增，序号 9~14 的供试种子为两种菟丝子共同的阴性对照。PCR 反应体系与反应程序同上。待 PCR 扩增反应完成后，12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离检测 PCR 产物。引物是否具有特异性的依据是电泳结果所呈现的特异性条带的有无。

3.1.2.4 引物灵敏性检测

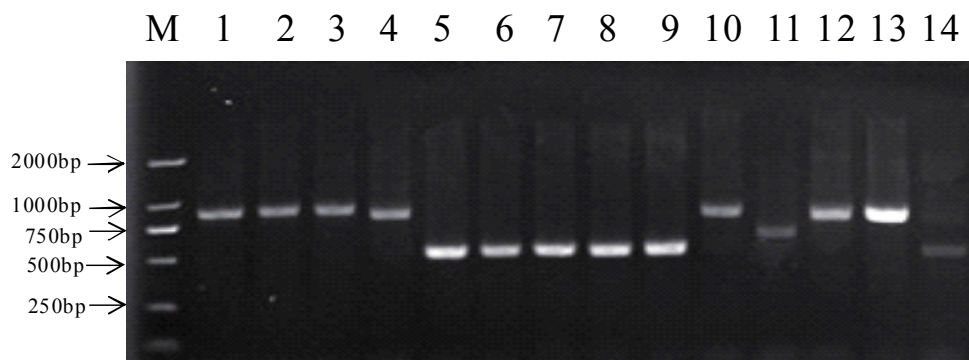
首先使用 Nano Drop ND-1000 分光光度计测量前面所提取的田野菟丝子和单柱菟丝子种子的基因组 DNA 的 OD₂₆₀ 值，然后将其浓度一致调整为 10 ng/uL，并且按照 10 倍稀释梯度分别稀释为 10 ng/uL，1 ng/uL，100 pg/uL，10 pg/uL，1 pg/uL 浓度备用。PCR 反应体系和反应程序同上。待 PCR 扩增反应完成后，12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离检测 PCR 产物。根据不同浓度相对应的 PCR 产物的电泳条带的

有无来确定两对种特异性引物的敏感性限度。

3.2 结果与分析

3.2.1 *trnL-F* 基因的检测

应用 *trnL-f/trnL-F* 对 14 份供试种子的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 14 份供试种子均能扩增出不同大小的条带, 如 1-4 泳道扩增出 850bp 大小的条带, 5-9、14 泳道扩增出 500bp 大小的条带, 10、12-13 泳道扩增出 720bp 大小的条带, 11 泳道扩增出 530bp 大小的条带 (图 3-1), 已将测序结果上传至 GenBank, 获得的登录号列于表 3-1 中。



注: 泳道 1-4 为来自 4 个不同地区的单柱菟丝子, 5-8 来自 4 个不同地区的田野菟丝子, 9 南方菟丝子, 10 三叶草, 11 苜蓿, 12 油菜, 13 莱菔子, 14 苦豆子, M 表示 2000 DNA Marker, 下同

Note: Lane 1-4 is *C.monogyna* from four regions, lane 5-8 *C. campestris* from four regions, lane 9 *C. australis*, lane 10 *Trifolium repens*, lane 11 *Medicago Sativa*, lane 12 *Brassica napus*, line 13 *Raphanus sativus*, lane 14 *Sophora alopecuroides*, M represents 2,000 DNA Marker, the same as below

图 3-1 不同种子的 *trnL-F* 基因的检测结果

Fig. 3-1 Specificity test of *trnL-F* gene by PCR from different seeds

3.2.2 *trnL-F* 序列比对及两种菟丝子种特异性引物的设计

以上 8 种植物种子的 PCR 反应产物委托北京六合华大基因公司进行测序, 采用 DNAMAN 将 8 种植物的 *trnL-F* 序列进行比对, 利用 Primer 5.0 软件根据两种菟丝子特有的变异位点 (图 3-2/3), 分别设计种特异性引物, 设计了 2 对种特异引物 *trnL-DZ1/DZ2*, *trnL-TY1/TY2* (表 3-2), 引物委托北京六合华大基因公司进行合成。

表 3-2 两种菟丝子物种特异性引物的相关信息

Table 3-2 The information of species-specific primers of two species of *Cuscuta*

名称 (Name)	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>trnL-DZ1</i>	CTTTGAATTTGTTAAAAAATTC	53
<i>trnL-DZ2</i>	CATTTACGCTCATATACTTTTGC	
<i>trnL-TY1</i>	GGTGCAGAGACTCAACGGAAGC	66
<i>trnL-TY2</i>	CCCCTGTAGATTCAAATTCGAGAT	

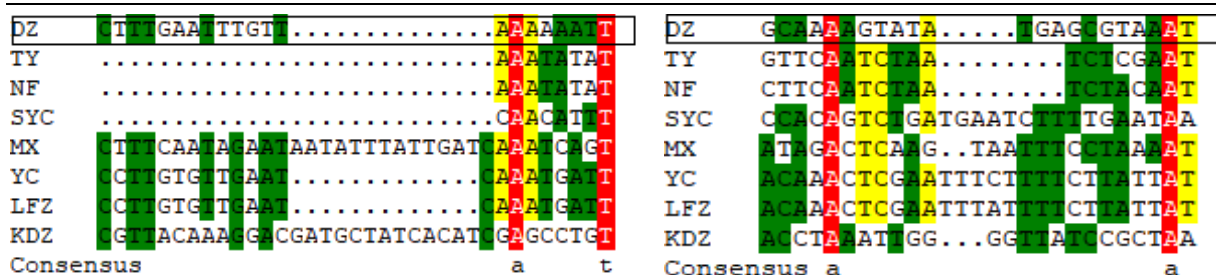


图 3-2 单柱菟丝子和其他几种植物的序列比对图

Fig. 3-2 Sequence alignment of *C.monogyna* and other plants

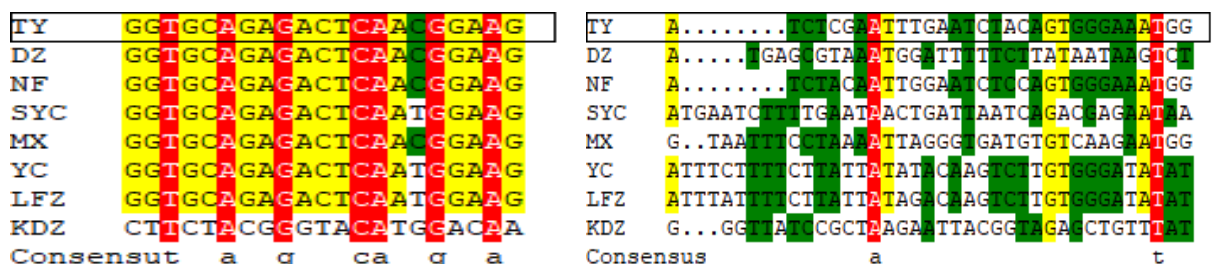


图 3-3 田野菟丝子和其他几种植物的序列比对图

Fig. 3-3 Sequence alignment of *C. campestris* and other plants

3.2.3 物种特异性引物检测

引物检测结果显示，所设计的两种菟丝子的种特异性引物具有较好的特异性。两对种特异性引物对以上 14 份供试种子的基因组 DNA 进行扩增，仅泳道 1-4 来自四个不同地区的单柱菟丝子的基因组 DNA 和泳道 5-8 来自四个不同地区的田野菟丝子的基因组 DNA 可以分别扩增出条带，除此之外的其他混淆品种子的基因组 DNA 中未能扩增到产物。其中单柱菟丝子特异性引物 trnL-DZ1/trnL-DZ2 可以从来自四个不同地区的单柱菟丝子的基因组 DNA 中检测到 275bp 大小的扩增条带，在田野菟丝子、南方菟丝子、白花三叶草、紫花苜蓿、欧洲油菜、菜菔子和苦豆子的基因组 DNA 中均未检测到扩增条带，表明单柱菟丝子特异性引物 TrnL-DZ1/TrnL-DZ2 对于单柱菟丝子具有特异性，可用于单柱菟丝子的快速分子检测（图 3-4）。

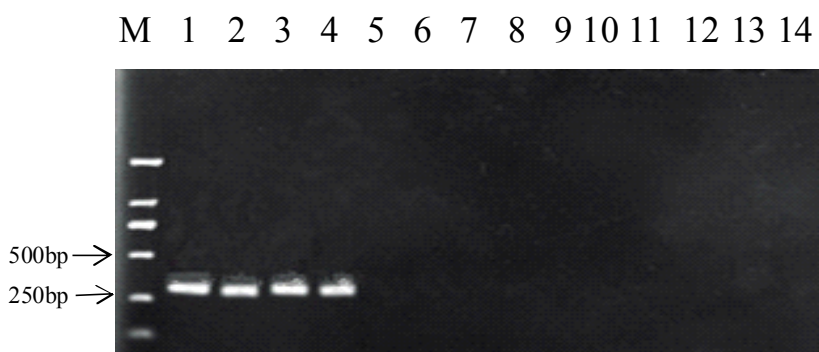


图 3-4 种特异性引物 trnL-DZ 对 14 份种子的特异性检测电泳图

Fig. 3-4 Electrophoretogram of specificity test of species-specific primers trnL-DZ by PCR from 14 seeds

田野菟丝子特异性引物 trnL-TY1/trnL-TY2 可以从来自四个不同地区的田野菟丝子的基因组 DNA

中检测到 256bp 大小的扩增条带，在单柱菟丝子、南方菟丝子、白花三叶草、紫花苜蓿、欧洲油菜、菜菔子和苦豆子的基因组 DNA 中均未检测到扩增条带，表明田野菟丝子特异性引物 trnL-TY1/trnL-TY2 对于田野菟丝子具有特异性，可用于田野菟丝子的快速分子检测（图 3-5）。

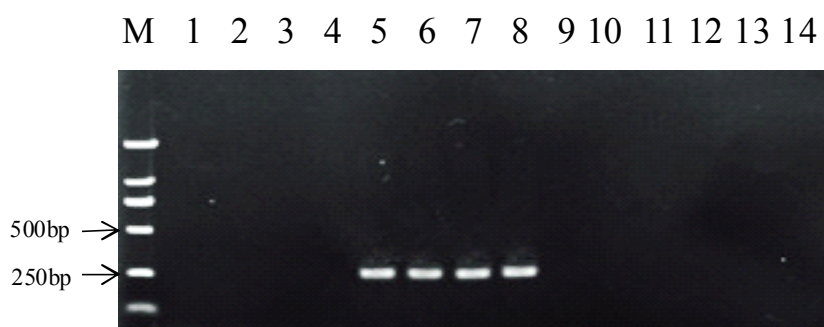
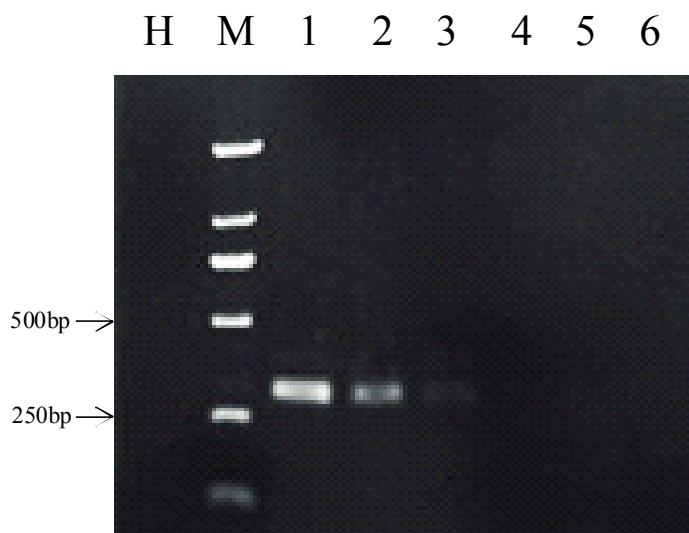


图 3-5 种特异性引物 trnL-TY 对 14 份种子的特异性检测电泳图

Fig. 3-5 Electrophoretogram of specificity test of species-specific primers trnL-TY by PCR from 14 seeds

3.2.4 物种特异性引物灵敏度检测

将稀释为 10ng/uL, 1ng/uL, 100pg/uL, 10pg/uL, 1pg/uL 单柱菟丝子和田野菟丝子的基因组 DNA 作为模板，选择相应的种特异性引物分别进行 PCR 扩增凝胶电泳成像，结果表明，当单柱菟丝子的基因组 DNA 浓度稀释到 100 pg/uL 时可以检测到电泳条带，条带大小为 275bp，所以单柱菟丝子的种特异性引物 TrnL-DZ1/TrnL-DZ2 的灵敏度为 100 pg/uL（图 3-6）；当田野菟丝子的基因组 DNA 浓度稀释到 10 pg/uL 时可以检测到电泳条带，条带大小为 256bp，所以田野菟丝子的种特异性引物 trnL-TY1/trnL-TY2 的灵敏度为 10 pg/uL（图 3-7）。



注：H 为清水对照，M 表示 2000 DNA Marker，泳道 1~6 分别为稀释浓度为 10ng/uL, 1ng/uL, 100pg/uL, 10pg/uL, 1pg/uL, 下同

Note: H for control, M represents 2,000 DNA Marker, lane1-6: DNA at concentrations of 10ng/uL, 1ng/uL, 100pg/uL, 10pg/uL, 1pg/uL, the same as below

图 3-6 单柱菟丝子种特异性引物 trnL-DZ 灵敏度检测电泳图

Fig. 3-6 Electrophoretogram of sensitivity test of species-specific primers trnL-DZ by PCR from

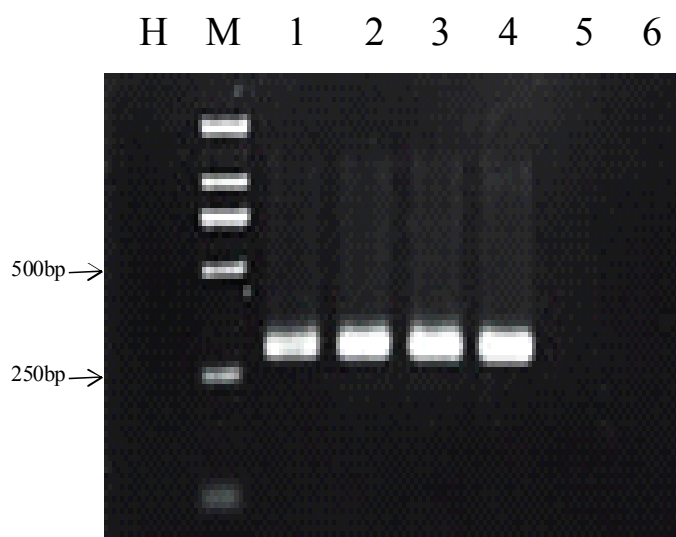
C.monogyna

图 3-7 田野菟丝子种特异性引物 trnL-TY 灵敏度检测电泳图

Fig. 3-7 Electrophoretogram of sensitivity test of species-specific primers trnL-TY by PCR from *C. campestris*

3.3 讨论

目前，菟丝子在世界各地均有分布，由于其很强的适应能力和寄生能力，已经给全球的农业生产和生态环境带来严重的损害。在国外，菟丝子已经被列为世界范围内的农业和园艺有害生物^[122,126]。菟丝子在我国也曾造成严重的经济损失，2007 年菟丝子在宁夏地区草原大面积爆发，危害面积达 33 万 hm^2 ，占草原面积的 13.6%，寄生危害率可达 100%^[19]。菟丝子在新疆分布的种类最多、分布范围最广，并且新疆是受到菟丝子危害最严重的省区之一^[36]。对于菟丝子的防治，目前主要采用农业防治（人工拔除）、化学防治（喷施各种除草剂）等措施，由于菟丝子具有繁殖力强、蔓延迅速、危害持久、难以清除、防治困难等特点，目前还没有一种方式能够完全彻底、有效的控制菟丝子的发生^[43]。所以目前菟丝子的防治重点依然应是有效的控制它的传播蔓延，避免菟丝子从疫区进一步扩散。

在相关研究中，对于菟丝子的检验检疫，传统的检疫方法是通过菟丝子的生物学特征来进行检疫鉴定，如马德英等^[20]对新疆农田中的 8 种菟丝子的种子外部形态特征和种胚形态的描述来检疫鉴定 8 种菟丝子。范伟功等^[127]对新疆口岸截获的 7 种菟丝子的种子种脐、晕轮以及种皮的纹饰特征进行详细的描述来区分 7 种菟丝子，黄可辉等^[26]采用扫描电镜技术研究了 14 种菟丝子种子种脐结构，通过对比 14 种菟丝子种子种脐结构发现不同种类菟丝子的种子种脐细胞形状之间具有显著差异，该方法可作为菟丝子形态鉴定的重要补充。由于菟丝子种子小、形态特征不明显、易混杂在其他种子或饲料中，目前对于菟丝子检疫方法研究越来越多的集中在分子检测技术的研究方面，与传统检测方法相比，分子检测方法具有更快速、准确、高效的优点。

本研究中，相对于十分保守的 rDNA-ITS 区段和变异进化程度较快的 *rbcL* 基因^[39,83]，我们所选取的是植物的质体基因 *trnL-F* 基因，该基因相对保守又存在稳定遗传变异^[128]。基于菟丝子的 *trnL-F* 基因，我们同时选取菟丝子材料和混淆品材料作为对照，设计了单柱菟丝子和田野菟丝子的种特异性引物 trnL-DZ 和 trnL-TY，两种种特异性引物分别可以将两种菟丝子从 2 种菟丝子和 5 种易混品中检测鉴别出来，并且具有特异性，灵敏度基本可以达到 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。建立的两种菟丝子的快速、准确的 PCR

分子检测体系，可以满足植物检疫部门大量样品批量检测的需求，并且检测灵敏度高、专一性强，有利于减少单柱菟丝子和田野菟丝子在新疆的进一步扩散蔓延，减少相应的农业经济损失。

3.4 小结

本试验主要针对新疆常见的两种菟丝子，即单柱菟丝子 *C. monogyna* 和田野菟丝子 *C. campestris*，建立了一种快速 PCR 分子检测体系。基于两种菟丝子的 *trnL-F* 基因设计了两种菟丝子的种特异性引物 *trnL-DZ* 和 *trnL-TY*，单柱菟丝子种特异性引物 *trnL-DZ* 可以在单柱菟丝子中检测到 275bp 大小的条带，田野菟丝子种特异性引物 *trnL-TY* 可以在田野菟丝子中检测到 256bp 大小的条带，两种种特异性引物在菟丝子的混淆品中并不能检测到条带，并且对两种种特异性引物的灵敏性进行了检测，发现两种种特异性引物的灵敏性较好，*trnL-DZ* 引物的灵敏度可达 100pg/uL，*trnL-TY* 引物的灵敏度可达 10pg/uL。该体系具有快速、高效、特异性好、灵敏度高等特点，可为新疆 2 种主要菟丝子检验检疫提供技术支持。

第四章 两种菟丝子种子处理技术研究

菟丝子具有繁殖能力强、结籽率高、寄主广泛、适应环境能力强等特点，使得菟丝子的防治十分困难，并且近年来菟丝子在新疆的危害越来越严重，目前仍然没有有效的防治措施来防治菟丝子。植物的种子进行高温高湿老化处理之后，萌发速度会变慢，萌发率及活力降低，细胞质膜完整性受到迫害，种子内部保护酶活性减弱，从而导致有害有害物质过量累积，脂质过度氧化，损伤 DNA、RNA，从而影响作物的产量和品质^[129]。目前有许多研究关于牧草种子老化后种子活力的变化，如黑麦草、马棘、紫花苜蓿、狗牙根、鸭茅和狗尾草等种类的研究。在老化种子的不同温度处理研究中，许多文献指出比较适宜的老化温度为 38~45℃，但是不同种类的牧草种子适宜的老化强度不尽相同^[130]。本章以两种菟丝子种子为研究材料，探讨不同老化温度和老化时间对两种菟丝子种子的萌发率的影响，从而为菟丝子的防治开辟新的方向。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

两种菟丝子种子于 2017 年采自新疆巴音郭楞蒙古自治州、昌吉回族自治州、塔城地区、阿勒泰地区、石河子市周边农作物、田间杂草、绿化林木、果树、花卉等 25 种不同寄主，经形态学鉴定和分子辅助鉴定为田野菟丝子和单柱菟丝子，保存在实验室。

4.1.2 实验设计

参照吴汉花^[131]等方法略作调整。在进行老化处理之前，将两种菟丝子种子放置在室内常温条件下平衡 24 h。根据前人研究所采用的方法，种子进行人工老化处理使用玻璃干燥器作为老化器。首先准备两个玻璃干燥器，用 10% 的次氯酸钠浸泡若干个小时，然后用无菌水清洗 3 次，再将两个玻璃干燥器中全部加入 1L 的无菌水，两个玻璃干燥器分别放入两个温度不同的恒温培养箱内，其调节温度为 40℃ 和 45℃，接下来平衡 48 h，使两个玻璃干燥器的内部温度始终平衡在 40℃ 和 45℃，并且相对湿度均保持在 100%。然后将两种供试菟丝子种子装入尼龙网袋并平放在玻璃干燥器中，分别进行 0d(CK) 至 40d 的老化处理，然后得到老化程度不同的两种菟丝子种子样品。每隔 2d，取出一批种子样品放在玻璃干燥器中进行回干并保存于玻璃干燥器中，随后用于种子皿内萌发率相关指标的测定；每隔 10d，取出一批种子样品放在玻璃干燥器中进行回干并保存于玻璃干燥器中，用于种子盆栽萌发率相关指标的测定。

4.1.2.1 两种温度条件进行老化处理菟丝子种子皿内萌发率测定

将老化后的两种菟丝子种子进行皿内发芽试验，将不同温度处理下的两种菟丝子种子用 10% 的次氯酸钠溶液处理 5 min，再用无菌水冲洗 3~5 次，用无菌滤纸吸干，并均放置在含有两层滤纸、加入 3 ml 无菌水的玻璃培养皿中，每皿放置 50 粒种子，3 次重复，在光照培养箱中 25℃ 恒温培养 8d^[129]。老化 8d 后，记录种子发芽数量，计算萌发率，根据《国际种子发芽规程》(ISTA1966)，芽长达到种子长度的一半时则视为萌发。由于菟丝子种子具有物理休眠特性，我们另取老化后不同温度处理下的两种菟丝子种子进行划破种皮处理后，再按照以上程序进行皿内发芽试验，相同的培养条件，3 次重复，统计萌发个数，计算萌发率。

4.1.1.2.2 两种温度进条件行老化处理菟丝子种子盆栽萌发率测定

将老化后的两种菟丝子种子进行盆栽发芽试验,将不同温度处理下的两种菟丝子种子用 10%的次氯酸钠溶液处理 5 min,再用无菌水冲洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干,将两种菟丝子种子均匀的撒在装有蛭石的小盆中,蛭石覆盖高度不超过 5cm,每个盆中撒 50 粒种子,搅拌蛭石,使其均匀分布,然后浇透水,将盆栽置于光照温室(温度 20~28℃,相对空气湿度约 40%,光照时长 14 h/d)条件下培养 8d,期间每 2d 浇一次水,3 次重复。另取老化后不同温度处理下的两种菟丝子种子进行划破处理后,再按照以上程序进行盆栽发芽试验,相同的培养条件,3 次重复。8d 后将盆栽进行处理,统计萌发个数,计算各盆栽萌发率。

4.1.1.2.3 数据处理与分析

数据统计在 Microsoft Excel 2010 中进行,用 Spss19.0 进行数据分析。

4.2 结果与分析

4.2.1 两种温度条件老化不同天数的田野菟丝子种子皿内萌发率

田野菟丝子种子在老化温度 45℃和 40℃下老化 0~40d 后的皿内萌发率结果如下表 4-1:随着老化时间的不断延长,无论是在老化温度为 45℃或 40℃条件下,田野菟丝子种子的萌发率均在下降。划破种皮的田野菟丝子种子的初始萌发率为 46.67%,无划破种皮的田野菟丝子种子的初始萌发率为 7.33%。与对照(CK)相比,在老化温度为 45℃条件下,划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率一直在持续下降,在老化 12d 之后,种子的萌发率为 23.22%,比初始萌发率减少了 50.25%,老化 40d 时,种子的萌发率最小,下降到 2%,比初始萌发率减少了 95.71%,基本不萌发;与对照(CK)相比,在老化温度为 45℃条件下,无划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率也一直在持续下降,在老化 6d 之后,种子的萌发率为 4%,比初始萌发率减少了 45.43%,老化到 20d 时,种子的萌发率最小下降到 0%,基本不萌发,延长老化天数,萌发率依然保持在 0%。与对照(CK)相比,在老化温度为 40℃条件下,划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率一直在持续缓慢下降,在老化 26d 之后,种子的萌发率为 26%,比初始萌发率减少了 44.29%,老化到 38d 时,种子的萌发率基本持续在 20%,萌发率最低,比初始萌发率减少了 59.7%;与对照(CK)相比,在老化温度为 40℃条件下,无划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率也一直在缓慢持续下降,在老化 16d 之后,种子的萌发率为 4%,比初始萌发率减少了 45.43%,老化到 38d 时,种子的萌发率最小下降到 0%,基本不萌发,延长老化天数,萌发率依然保持在 0%。结果表明,两种老化温度处理下,45℃时的田野菟丝子种子的萌发率与 40℃时的田野菟丝子种子的萌发率相比下降更快、下降程度更大。

表 4-1 田野菟丝子种子在不同温度和老化时间条件下的皿内萌发率的变化

Table 4-1 The germination of different temperatures and aging time of *C. campestris* seeds in Petri dish

老化时间 Aging time/d	45℃		40℃	
	划破种子萌发率	种子萌发率	划破种子萌发率	种子萌发率
	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%
0(CK)	46.67a	7.33a	46.67a	7.33a
2	42.67a	7.33a	41.33ab	6.67ab
4	32b	5.33ab	38.67abc	6.67ab

新疆地区菟丝子种类鉴定、主要种快速检测和种子处理技术研究

6	30.67bc	4bc	36bcd	6ab
8	24.67bcd	2.67bcde	33.33bcde	6ab
10	24bcde	3.33bcd	30.67cdef	5.33abc
12	23.22bcde	2cde	30cdefg	5.33abc
14	22cdef	0.67de	31.33cdef	4.67abcd
16	20.67def	1.33cde	30cdefg	4bcde
18	14.67efg	1.33cde	29.33defgh	4bcde
20	13.33fgh	0e	27.33defghi	2.67cdef
22	13.33fgh	0e	26.67efghi	2def
24	10.67ghi	0e	26.67efghi	2.67cdef
26	10ghi	0e	26efghi	2.67cdef
28	10ghi	0e	24fghi	2def
30	10ghi	0e	22.67fghi	1.33ef
32	4.67hi	0e	22.67fghi	1.33ef
34	2.67i	0e	21.33ghi	0.67f
36	2.67i	0e	20.67hi	0.67f
38	3.33i	0e	20i	0f
40	2i	0e	20i	0f

注:不同字母表示不同老化时间种子萌发率在 $P \leq 0.05$ 水平存在显著性差异;下同。

Note: The different normal letters indicate significant difference among seed germination rate in the aging time at 0.05 level.

The same as follow.

4.2.2 两种温度条件老化不同天数的单柱菟丝子种子皿内萌发率

单柱菟丝子种子在老化温度 45℃和 40℃下老化 0~40d 后的皿内萌发率结果如下表 4-2: 随着老化时间的不断延长,无论是在老化温度为 45℃或 40℃条件下,单柱菟丝子种子的萌发率均在下降。划破种皮的单柱菟丝子种子的初始萌发率为 60%,无划破种皮的单柱菟丝子种子的初始萌发率为 4%。与对照(CK)相比,在老化温度为 45℃条件下,划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率一直在持续下降,在老化 18d 之后,种子的萌发率为 31.33%,比初始萌发率减少了 47.78%,老化 40d 时,种子的萌发率最小,下降到 0%,基本不萌发;与对照(CK)相比,在老化温度为 45℃条件下,无划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率也一直在持续下降,在老化 14d 之后,种子的萌发率为 2%,比初始萌发率减少了 50%,老化到 24d 时,种子的萌发率最小下降到 0%,基本不萌发,延长老化天数,萌发率依然保持在 0%。与对照(CK)相比,在老化温度为 40℃条件下,划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率在持续缓慢下降,在老化 36d 之后,种子的萌发率基本持续在 38%,萌发率最低,比初始萌发率减少了 36.67%;与对照(CK)相比,在老化温度为 40℃条件下,无划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率也在缓慢持续下降,在老化 30d 之后,种子的萌发率为 2%,比初始萌发率减少了 36.67%,老化到 38d 时,种子的萌发率最小下降到 0%,基本不萌发,延长老化天数,萌发率依然保持在 0%。结果表明,两种老化温度处理下,45℃时的单柱菟丝子种子的萌发率与 40℃时的单柱菟丝子种子的萌发率相比下降更快、下降程度更大。该结果与田野菟丝子得到的结果相似。

表 4-2 单柱菟丝子种子在不同温度和老化时间条件下的皿内萌发率的变化

Table 4-2 The germination of different temperatures and aging time of *C. monogyna* seeds in Petri dish

老化时间 Aging time/d	45℃		40℃	
	划破种子萌发率	种子萌发率	划破种子萌发率	种子萌发率
	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%
0(CK)	60a	4a	60a	4a
2	56.67a	2.67ab	58.67ab	3.33a
4	56a	2.67ab	56abc	3.33a
6	46.67b	2.67ab	55.33abc	3.33a
8	45.33b	2.67ab	54abc	3.33a
10	42.67bc	2.67ab	53.33abcd	3.33a
12	40bcd	2.67ab	53.33abcd	2.67a
14	37.33cde	2ab	52abcd	2a
16	33.33def	2ab	50.67abcde	2.67a
18	31.33ef	2ab	47.33cdefg	3.33a
20	29.33f	2ab	48.67bcdef	2.67a
22	29.33f	1.33ab	48cdefg	2.67a
24	15.33g	0b	46.67cdefg	2.67a
26	14.67gh	0b	46cdefg	2.67a
28	14.67gh	0b	43.33defg	2.67a
30	13.33gh	0b	41.33efg	2a
32	11.33gh	0b	41.33efg	1.33a
34	7.33hi	0b	38.67fg	1.33a
36	7.33hi	0b	38g	1.33a
38	0.67i	0b	38g	0a
40	0i	0b	38g	0a

4.2.3 两种温度条件老化不同天数的田野菟丝子种子盆栽萌发率

田野菟丝子种子在老化温度 45℃和 40℃下老化 0、10、20、30、40d 后的盆栽萌发率结果如下表 4-3: 随着老化时间的不断延长, 无论是在老化温度为 45℃或 40℃条件下, 田野菟丝子种子的萌发率均在下降。划破种皮的田野菟丝子种子的初始萌发率为 39%, 无划破种皮的田野菟丝子种子的初始萌发率为 2.33%。与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 45℃条件下, 划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率一直在持续下降, 在老化 10d 之后, 种子的萌发率就下降到 7.33%, 比初始萌发率减少了 81.21%, 老化至 40d 时, 种子的萌发率最小, 下降到 0.33%, 基本表现不萌发; 与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 45℃条件下, 无划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率也在持续缓慢下降, 在老化 10d 之后, 种子的萌发率为 0.33%, 比初始萌发率减少了 85.84%, 老化到 20~40d 时, 种子的萌发率下降到 0%, 基本不萌发。与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 40℃条件下, 划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率在持续缓慢下降, 在老化 40d 之后, 种子的萌发率基本保持在 22%左右, 比初始萌发率减少了 43.59%; 与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 40℃条件下, 无划破种皮的田野菟丝子种子的萌发率也在缓慢持续下降, 在老化 40d 之后, 种子的萌发率基本保持在 1%左右, 比初始萌发率减少了 57.08%。该结果与田野菟丝子种子皿内萌发结果类似, 萌发率均处于下降趋势。

表 4-3 田野菟丝子种子在不同温度和老化时间条件下的盆栽萌发率的变化

Table 4-3 The germination of different temperatures and aging time of *C. campestris* seeds in pot

老化时间 Aging time/d	45℃		40℃	
	划破种子萌发率	种子萌发率	划破种子萌发率	种子萌发率
	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%
0(CK)	39a	2.33a	39a	2.33a
10	7.33b	0.33b	35a	2ab
20	5bc	0b	27.67b	2ab
30	1.33cd	0b	22.33c	1.67ab
40	0.33d	0b	22c	1b

4.2.4 两种温度条件老化不同天数的单柱菟丝子种子盆栽萌发率

单柱菟丝子种子在老化温度 45℃ 和 40℃ 下老化 0、10、20、30、40d 后的盆栽萌发率结果如下表 4-4: 随着老化时间的不断延长, 无论是在老化温度为 45℃ 或 40℃ 条件下, 单柱菟丝子种子的萌发率均在下降。划破种皮的单柱菟丝子种子的初始萌发率为 47%, 无划破种皮的单柱菟丝子种子的初始萌发率为 1.67%。与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 45℃ 条件下, 划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率一直在持续下降, 在老化 10d 之后, 种子的萌发率为 14%, 比初始萌发率减少了 70.21%, 老化至 40d 时, 种子的萌发率最小, 下降到 0.67%, 基本不萌发; 与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 45℃ 条件下, 无划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率也在持续下降, 在老化 10d 之后, 种子的萌发率为 0.33%, 比初始萌发率减少了 80.24%, 老化到 30~40d 时, 种子的萌发率下降到 0%, 基本不萌发。与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 40℃ 条件下, 划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率在持续缓慢下降, 在老化 40d 之后, 种子的萌发率基本持续在 28.33% 左右, 比初始萌发率减少了 39.72%; 与对照 (CK) 相比, 在老化温度为 40℃ 条件下, 无划破种皮的单柱菟丝子种子的萌发率也在缓慢持续下降, 在老化 40d 之后, 种子的萌发率基本保持在 0.67%, 比初始萌发率减少了 59.88%。该结果与皿内单柱菟丝子种子萌发得到的结果相似, 萌发率均处于下降趋势。

两种菟丝子种子的皿内和盆栽萌发实验结果基本保存一致, 二者均在老化温度为 45℃ 时的种子的萌发率下降更快、萌发率更低。

表 4-4 单柱菟丝子种子在不同温度和老化时间条件下的盆栽萌发率的变化

Table 4-4 The germination of different temperatures and aging time of *C. monogyna* seeds in pot test

老化时间 Aging time/d	45℃		40℃	
	划破种子萌发率	种子萌发率	划破种子萌发率	种子萌发率
	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%	Scarified seeds germination rate/%	Seeds germination rate/%
0(CK)	47a	1.67a	47a	1.67a
10	14b	0.33a	44.67a	1.67a
20	6bc	0.33a	37.67ab	1.33a
30	1.33c	0a	33.67ab	1.33a
40	0.67c	0a	28.33b	0.67a

4.3 讨论

目前,菟丝子的防治仍然是一个棘手的问题,据调查,在菟丝子发生严重的地块,农民大多采用人工拔除这种耗时费力、治标不治本的方式或是直接丢弃严重发生区的作物,任由其蔓延,致使近年来菟丝子在新疆的危害蔓延越来越猖獗。调查研究发现在新疆菟丝子的主要危害种是田野菟丝子和单柱菟丝子,而针对新疆常发生的这两种菟丝子去探究其有效的防治措施显得尤为重要。菟丝子在发生时,尚且没有有效的手段去防治它,如何降低菟丝子种子的萌发率可能会成为防治菟丝子发生的一种有效途径。许多研究表明,植物种子在进行人工的高温高湿老化之后,种子的活力及萌发率等相关指标会降低^[130]。毛培胜等^[132]对紫花苜蓿种子人工加速老化的方法进行研究,筛选确定紫花苜蓿种子进行人工加速老化测定的适宜条件是45℃老化84h,并且种子的发芽率随着老化温度的升高而逐渐下降。翁玲等^[133]在鸭茅种子上得到了类似的结果,鸭茅种子加速老化处理的适宜条件为45℃,84h。韩亮亮等^[134]指出燕麦种子老化的最适宜条件为老化温度41℃,老化时间48h。不同种类的牧草种子适宜的老化温度和时间具有差异,因此不同种类的牧草草种所需适宜的老化条件需要进一步研究确定。在本试验中,筛选出两种菟丝子的老化适宜条件为45℃,40d,由于菟丝子种子具有物理休眠特性,它的种皮较厚,所以耗费的老化时间也相对较长,老化结果基本与毛培胜、翁玲等相一致。

4.4 小结

本章内容以新疆两种菟丝子,即田野菟丝子和单柱菟丝子的种子为研究对象,在老化温度40℃和45℃条件下进行种子老化0d至40d(老化湿度100%),通过皿内萌发试验和盆栽萌发试验相结合的方式,筛选出两种菟丝子种子老化不萌发的最适宜条件,在老化温度条件为45℃、老化湿度100%、老化40d时,两种菟丝子种子基本不萌发,效果更佳,在新疆最为炎热的7月和8月份,采用淹水的办法,对散落在土壤中的菟丝子种子进行高温高湿老化处理20d~40d,可以有效减少菟丝子的活力,降低来年菟丝子种子的萌发率,减少新生菟丝子的萌发,为新疆菟丝子的有效防治提供了思路。

第五章 不同老化天数处理后的菟丝子种子的生理生化机制

种子老化发生劣变可能涉及到种子内部众多复杂的生理和生化反应。老化进程中会表现出其种子活力、发芽率、细胞膜完整性降低,保护酶活性减弱,有毒有害物质累积等特点^[117]。到目前为止,有关于植物种子老化劣变的机理,国内外已经有许多学者先后进行过大量研究,有关文献已不计其数,但是我们对于种子老化劣变的确切机理仍然不是十分明确,可能还需要更进一步的证实和探究。大量研究学者认为,种子老化劣变的重要原因是膜脂的过氧化作用及自由基的增生^[135]。唐祖君等^[136]指出,伴随着大白菜种子老化程度的不断加深,其种子活力、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、脱氢酶的活性呈现逐渐下降趋势,而丙二醛(MDA)及芥子碱的含量呈现逐渐上升的趋势,因此大白菜种子人工老化及劣变的主要机制可能还是在于其种子细胞膜的发生了过度氧化。但是 Kalpana 等^[137]和 Lehner 等^[138]的研究发现,木豆和小麦种子老化劣变后,其种子的细胞膜并没有发生过度氧化,此研究说明种子的老化劣变可能还受到其他因素的影响。本研究采用高温高湿(温度 45℃、相对湿度 100%)方法,分析田野菟丝子和单柱菟丝子种子老化过程中的生理生化特征,探究两种菟丝子种子的劣变机制。

5.1 材料与方方法

5.1.1 材料

采用上一章经过老化(45℃、湿度 100%) 0、10、20、30、40d 后的两种菟丝子种子。两种菟丝子种子于 2017 年采自新疆巴音郭楞蒙古自治州、昌吉回族自治州、塔城地区、阿勒泰地区、石河子市周边农作物、田间杂草、绿化林木、果树、花卉等 25 种不同寄主,经形态学鉴定和分子辅助鉴定为田野菟丝子和单柱菟丝子,保存在实验室。

5.1.2 测定指标及方法

分别在菟丝子种子人工老化处理 0、10、20、30、40d 后,取出并回干的两种菟丝子种子用于生理生化指标的测定。

相对电导率的测定:取经过人工老化处理 0、10、20、30、40d 后的两种菟丝子种子各 50 粒,所取样品放入三角瓶中用双蒸水冲洗 3 次,将冲洗好的种子样品放在灭菌的滤纸上晾干,然后放入玻璃试管中,并在玻璃试管中加入 20mL 的双蒸水,将玻璃试管放在试管架上浸泡 24h,使用 DDS-307 型电导仪测定 2 种种子浸泡液的电导率(a1),再将其放置在 100℃水浴 30min,随后取出玻璃试管,将玻璃试管置于常温下冷却至 25℃,测定煮沸后的电导率(a2)。计算相对电导率^[135]。

$$\text{种子相对电导率} = (a1/a2) * 100\%$$

其他生理指标的测定:取经过人工老化处理 0、10、20、30、40d 后的两种菟丝子种子,放置在湿润的无菌滤纸上吸水吸胀 12h,然后称取相应的吸胀种子样品,测定其相关指标。参考文献^[139-140]测定方法,每个指标 3 个重复,取其平均值。测量仪器使用的是 SPEKOL 2000 型分光光度计。

5.2 结果与分析

5.2.1 不同老化时间菟丝子种子的电导率的变化

两种菟丝子种子浸出液的相对电导率随老化时间的加长,均逐渐上升(图 5-1)。与对照(0d)

相比, 田野菟丝子种子浸出液的电导率在第 40d 达到最大值 58%, 是对照的 3.87 倍; 与对照 (0d) 相比, 单柱菟丝子种子浸出液的电导率在第 40d 达到最大值 69%, 是对照的 3.45 倍。相对电导率的不断增大说明, 两种菟丝子种子的细胞膜功能不断受损, 膜透性不断增加, 有更多的细胞内物质发生渗漏, 破坏了细胞膜的完整性。

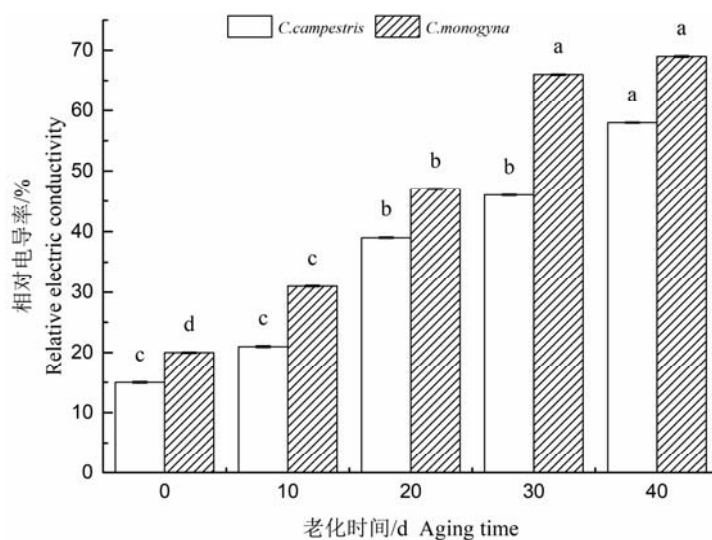


图 5-1 不同老化程度的两种菟丝子种子相对电导率的变化

Fig. 5-1 Change in relative electric conductivity of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging time

5.2.2 不同老化时间菟丝子种子的浸出液可溶性糖含量的变化

两种菟丝子种子浸出液的可溶性糖含量随老化时间的加长, 在持续上升 (图 5-2)。与对照 (0d) 相比, 田野菟丝子种子浸出液的可溶性糖含量在第 40d 达到最大值 7.16mg/mgprot, 是对照的 14.32 倍; 与对照 (0d) 相比, 单柱菟丝子种子浸出液的可溶性糖含量在第 40d 达到最大值 6.43 mg/mgprot, 是对照的 16.08 倍。

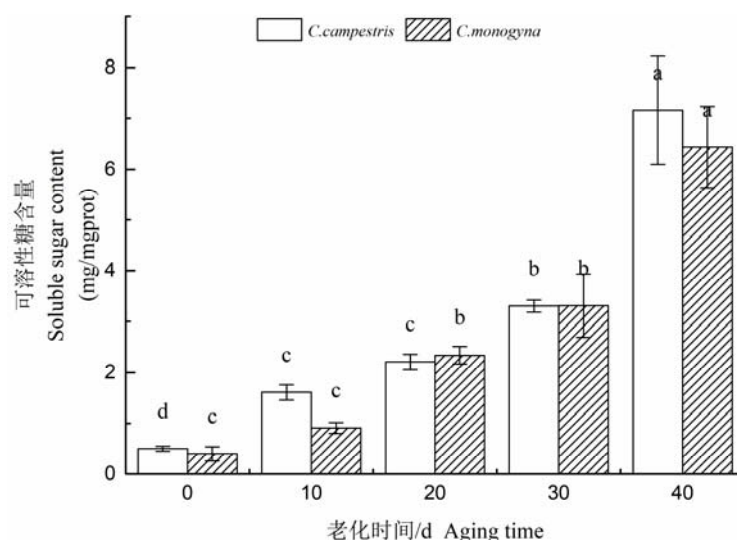


图 5-2 不同老化程度的两种菟丝子种子可溶性糖含量的变化

Fig. 5-2 Change in soluble sugar content of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.2.3 不同老化时间菟丝子种子可溶性蛋白含量的变化

两种菟丝子种子的可溶性蛋白含量随老化时间的加长，在持续下降（图 5-3）。与对照（0d）相比，田野菟丝子种子的可溶性蛋白含量在第 40d 下降到最小值 0.24mgprot/mL，比对照减少了 88.35%；与对照（0d）相比，单柱菟丝子种子的可溶性蛋白含量在第 40d 下降到最小值 0.33mgprot/mL，比对照减少了 89.52%。种子可溶性蛋白含量的减少说明，种子劣变可能会使得某些物质的合成受阻。

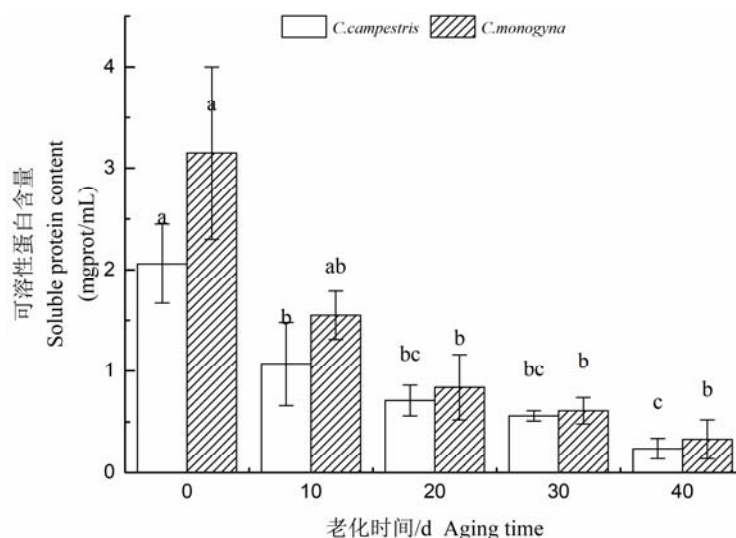


图 5-3 不同老化程度的两种菟丝子种子可溶性蛋白含量的变化

Fig. 5-3 Change in soluble protein content of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.2.4 不同老化时间菟丝子种子 MDA 含量的变化

随着人工老化时间的延长，两种菟丝子种子的 MDA 含量均在持续上升（图 5-4）。与对照（0d）相比，田野菟丝子种子的 MDA 含量在第 40d 达到到最大值 24.75nmol/mgprot，是对照的 9.45 倍；与对照（0d）相比，单柱菟丝子种子的 MDA 含量在第 40d 达到最大值 17.74nmol/mgprot，是对照的 10.31 倍。

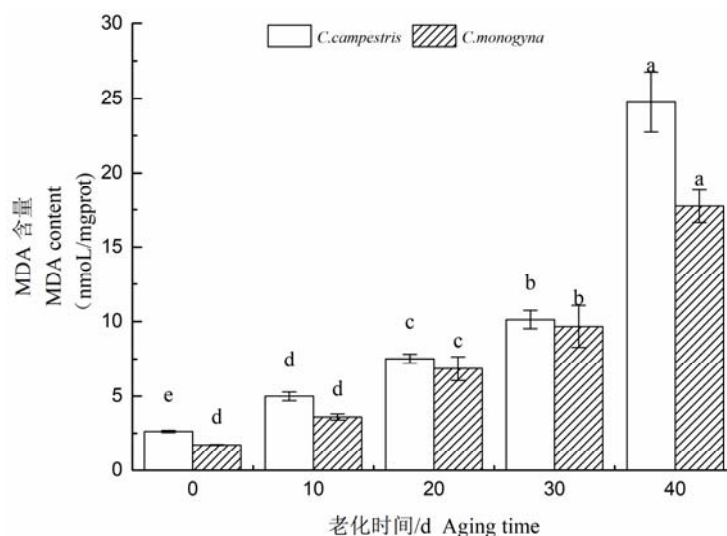


图 5-4 不同老化程度的两种菟丝子种子 MDA 含量的变化

Fig. 5-4 Change in MDA content of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.2.5 不同老化时间菟丝子种子 CAT 活性的变化

随着人工老化时间的延长，两种菟丝子种子的 CAT 活性均在不断下降（图 5-5）。与对照（0d）相比，田野菟丝子种子的 CAT 活性在第 40d 下降到最小值 5.11U/mgprot，比对照减少了 82.36%；与对照（0d）相比，单柱菟丝子种子的 CAT 活性在第 40d 下降到最小值 3.23U/mgprot，比对照减少了 86.31%。

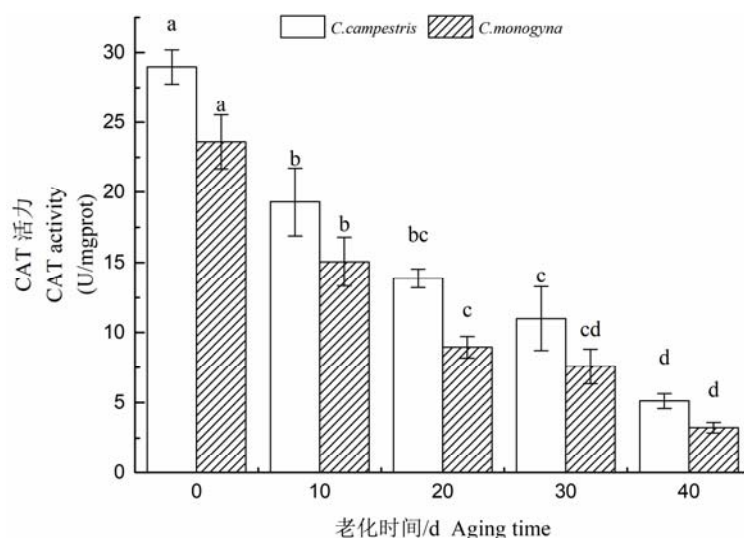


图 5-5 不同老化程度的两种菟丝子种子 CAT 活力的变化

Fig. 5-5 Change in CAT activity of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.2.6 不同老化时间菟丝子种子 POD 活性的变化

随着人工老化时间的延长，两种菟丝子种子的 POD 活性均在不断下降（图 5-6）。与对照（0d）相比，田野菟丝子种子的 POD 活性在第 40d 下降到最小值 2.63U/mgprot，比对照减少了 85.71%；与对照（0d）相比，单柱菟丝子种子的 POD 活性在第 40d 下降到最小值 3.98U/mgprot，比对照减少了 77.51%。

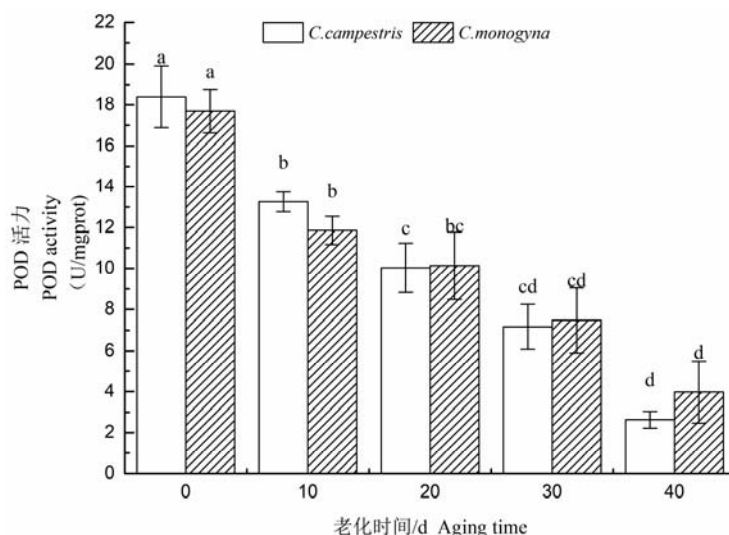


图 5-6 不同老化程度的两种菟丝子种子 POD 活力的变化

Fig. 5-6 Change in POD activity of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.2.7 不同老化时间菟丝子种子 SOD 活性的变化

随着人工老化时间的延长,两种菟丝子种子的 SOD 活性均在不断下降(图 5-7)。与对照(0d)相比,田野菟丝子种子的 SOD 活性在第 40d 下降到最小值 22.4U/mgprot,比对照减少了 83.08%;与对照(0d)相比,单柱菟丝子种子的 SOD 活性在第 40d 下降到最小值 14.99U/mgprot,比对照减少了 87.74%。SOD 活性下降,其对种子中超氧阴离子的消除能力减弱,细胞活性氧代谢平衡受到了破坏,使种子发生了劣变。

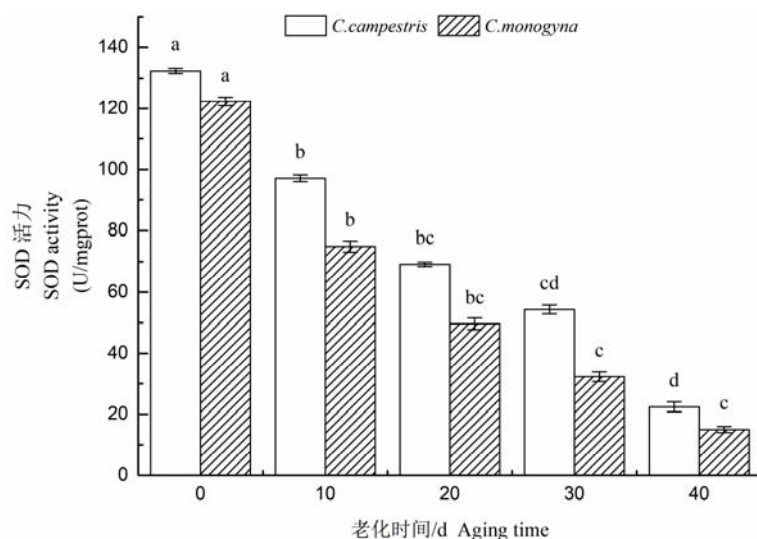


图 5-7 不同老化程度的两种菟丝子种子 SOD 活力的变化

Fig. 5-7 Change in SOD activity of *C. campestris* and *C. monogyna* Seeds in different aging degrees

5.3 讨论

国内外,有大量学者研究认为,植物种子的老化最初是从种子的细胞膜受到损伤开始,其破坏了种子的细胞膜的完整性,致使种子内部物质的流失和泄漏,种子内部的保护机制被打破,相关有毒物质也开始大量积累,致使种子细胞渗透液的导电性增强^[142]。除此之外,在人工老化处理植物种子的过程中,种子抗氧化防御系统的协调能力越来越差,主要表现为 CAT、SOD 和 POD 等保护酶活性降低,MDA 含量增加,细胞膜受活性氧破坏的程度越大^[142]。质膜受损程度可用表征细胞膜透性的浸出液相对电导率来表示,本研究中,相对电导率和可溶性糖含量随着老化时间的增加而不断上升,与老化时间呈正相关,这与吴汉花^[130]和姚侠妹^[142]研究结果一致。在老化的木豆、洋白菜、大豆、豌豆中,由于受到老化的影响,种子活力降低,使得贮藏蛋白合成量低^[143],在菟丝子的研究中也证实了这一说法。此外,MDA 是细胞膜过度氧化的代谢产物之一。在本研究中,菟丝子种子的 MDA 含量是随着老化时间的不断延长而逐渐上升的,这与桔梗种子^[142]和结球甘蓝种子^[135]人工老化中 MDA 含量变化不一致,与白菜种子^[130]中相关研究结果类似,推测这可能是与老化时间的长短和物种间的差异有关。SOD、POD 和 CAT 是清除活性氧的重要保护酶,对自由基及过氧化物具有消除作用,本研究发现,菟丝子老化处理种子的 SOD、POD 和 CAT 活性随老化时间的增加逐渐降低,这与前人结果均保持一致^[130,135,142]。基于此,本研究猜测菟丝子种子老化劣变的重要原因之一是膜脂过氧化作用引起的。目前关于杂草这方面的研究不多,需进一步增加相关研究来证实结果的准确性。

5.4 小结

两种菟丝子种子随着老化时间的不断增加,两种菟丝子种子浸泡液的相对电导率、可溶性糖含量、

MDA 含量逐渐升高，而可溶性蛋白含量、自由基清除酶如超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT、过氧化物酶 POD 等活性在持续降低，结果表明菟丝子种子细胞膜透性不断增加，细胞膜受到损害，细胞的完整性受到损害，许多细胞内的物质发生渗漏，同时种子细胞内部相关保护酶的活性在不断下降，调节维持种子细胞内部平衡的能力减弱，种子细胞消除过氧化氢的能力也在不断下降，导致种子内部会过量积累过氧化氢等有害物质，最终致使菟丝子种子发生老化劣变，抑制其种子萌发。

第六章 结论与展望

6.1 结论

1.综合两种鉴定方式, 将从南北疆菟丝子发生严重区域的 25 种寄主植物上采集到的 60 份菟丝子样品最终鉴定为两个种, 即田野菟丝子和单柱菟丝子, 并且调查采样时发现田野菟丝子仅发现在草本植物上有寄生, 而单柱菟丝子多寄生木本植物, 也可寄生草本植物, 两种菟丝子寄主种类的差异可能是种属差异较大所导致的, 这还需要进行更深一步的探究。明确新疆菟丝子的具体种类, 为检疫部门确定检疫对象和科学防除方案具有重要意义。

2.对于所鉴定出的新疆发生的菟丝子的两个种进行的 PCR 分子快速检测技术的研究, 成功设计出两种菟丝子的种特异性引物 trnL-TY 和 trnL-DZ, 并且田野菟丝子种特异性引物 trnL-TY 仅可以从田野菟丝子的 DNA 中扩增一条 256bp 大小的条带, 在剩余其他供试种子的 DNA 中不能检测到条带, 检测灵敏度为 10pg/uL; 单柱菟丝子种特异性引物 trnL-DZ 仅可以从单柱菟丝子的 DNA 中扩增一条 275bp 大小的条带, 在剩余其他供试种子的 DNA 中不能检测到条带, 检测灵敏度为 100pg/uL。本研究建立的新疆两种主要菟丝子的快速 PCR 检测方法, 为新疆菟丝子的检验检疫和防治提供技术支持。

3.以新疆两种菟丝子, 即田野菟丝子和单柱菟丝子的种子为研究对象, 通过皿内萌发试验和盆栽萌发试验相结合的方式, 筛选出两种菟丝子种子老化不萌发的最适宜条件。通过皿内试验, 划破种皮的田野菟丝子和单柱菟丝子种子的初始萌发率分别为 46.67%和 60%, 老化温度 45℃、老化 40d 后的萌发率分别为 2%和 0%, 老化温度 40℃、老化 40d 后的萌发率分别为 20%和 38%, 得出皿内萌发试验在老化温度条件为 45℃时, 效果更佳。通过盆栽试验, 划破种皮的田野菟丝子和单柱菟丝子种子的初始萌发率分别为 46.67%和 60%, 老化温度 45℃、老化 40d 后的萌发率分别为 2%和 0%, 老化温度 40℃、老化 40d 后的萌发率分别为 20%和 38%, 得出盆栽萌发试验在老化温度条件为 45℃时, 效果更佳, 最终皿内萌发结果和盆栽萌发结果保持一致。两种菟丝子均在老化温度为 45℃、老化湿度 100%、老化 40d 时, 抑制种子萌发效果更好。

4.随着老化时间的不断延长, 两种菟丝子种子的老化程度在不断加深, 两种菟丝子种子浸出液的相对导电率、可溶性糖含量、MDA 含量均呈现持续上升趋势, 与老化时间成正比; 而种子的可溶性蛋白含量、CAT、POD、SOD 活性呈现持续下降趋势, 与老化时间成反比。由此可见, 植物种子发生老化及劣变的这个过程是极其复杂的, 它可能会涉及到细胞膜结构、功能、种子内部代谢的变化等, 并且这一系列的生理生化变化可能会互相影响, 从而加剧植物种子的老化及劣变。

6.2 展望

菟丝子在全世界各地均有分布, 已经给全球农业经济造成巨大损失, 中国由于菟丝子的危害, 据文献报道统计的经济损失已经不计其数。此前, 文献报道新疆不仅是菟丝子发生种类最多的地区, 还是危害最严重的地区之一。鉴于菟丝子带来的这些危害及损失, 它的防治越来越引起大家的重视。由于菟丝子自身具有的一些特性, 如寄主范围广泛、适应能力强、繁殖力高等, 使得它的防治变得十分困难, 并且目前国内针对菟丝子, 并没有有效、安全、达到可根除的防治措施。基于此, 首先明确当地的菟丝子的种类、控制菟丝子的传播及出入境污染非疫区就变得十分关键。新疆菟丝子的种类, 自 1986 阴知勤等^[33]全面报道了新疆存在 11 种菟丝子之后, 历经的 33 年, 本地区的菟丝子种类数目便再

没有进行全面的更新过，这使得关于本地区菟丝子的进出境检验检疫的科学性和准确性都大打折扣。近年来，菟丝子的检疫检测技术发展的越来越快，从之前存在费时费力缺点的常规检疫方法，通过其种子大小、种皮花纹、种脐形状、种脐周边晕圈等特征进行鉴定^[20,36-37]，或者采用扫描电镜、化学分类标记法、色谱法、细胞学鉴定等方法来区分不同种类菟丝子^[101]，到后来对于菟丝子的快速分子检测技术^[39,83,105]的不断研究，这使得菟丝子的检验检疫更加严格、准确、高效、便利。除此之外，对于菟丝子的防治我们可能需要取开辟新的研究方向增加菟丝子的防治方法，更好、更有效的去防除菟丝子。在本研究中，首先我们明确了新疆菟丝子的具体发生种类、对新疆菟丝子主要发生种类的快速 PCR 检测技术进行研究，然后通过对菟丝子主要种的种子进行老化处理来降低种子的萌发率，以此来减少菟丝子的危害，并探究其老化过程中菟丝子种子内部相关生理生化指标的变化，了解菟丝子种子的老化机理，这为菟丝子的检验检疫和防治提供技术支持和新的研究方向。

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 64 (1) 卷. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] Kenneth R. Dodder[M]. Springer Netherlands: 2013-06-15.
- [3] Aashish R, Yasunori I, Moran F, et al. De novo assembly and characterization of the transcriptome of the parasitic weed dodder identifies genes associated with plant parasitism[J]. Plant Physiology, 2014, 166(3): 1186-1199.
- [4] Costea M, Stefanović S. Evolutionary history and taxonomy of the *Cuscuta* umbellate complex (Convolvulaceae): Evidence of extensive hybridization from discordant nuclear and plastid phylogenies. [J]. Taxon, 2010, 59(6): 1783-1800.
- [5] Costea M, García M A, Stefanović S. A phylogenetically based infrageneric classification of the parasitic plant genus *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae)[J]. Systematic Botany, 2015, 40(1): 269-285.
- [6] 石晓峰. 菟丝子的发生及防治方法[J]. 陕西林业科技, 2014(02): 101-103.
- [7] 郭琼霞, 黄可辉. 检疫性有害生物菟丝子的形态比较研究[J]. 武夷科学, 2008, 24(00): 49-53.
- [8] 田立超, 万涛, 吴道军, 等. 菟丝子属植物常见种类鉴定特征及防控方法[J]. 绿色科技, 2017(13): 3-4.
- [9] 王伯荪, 李鸣光, 余萍, 等. 菟丝子属植物的生物学特性及其对薇甘菊的防除[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002(06): 49-53.
- [10] 袁淑珍, 张永宏. 检疫杂草-菟丝子[J]. 生物学通报, 2008, 43(11): 15-17.
- [11] 毕胜, 李桂兰, 李清明. 菟丝子的危害及防治[J]. 中国林副特产. 2000, (2): 24.
- [12] 巴图尔·贾帕. 国家检疫性杂草菟丝子种子的检验及其防治技术[J]. 新疆畜牧业, 2005(05): 62.
- [13] Yuncker T G. The genus *Cuscuta*[J]. Memoirs of the Torrey Botanical Club, 1932, 18(2): 109-331.
- [14] 李娟. 寄生植物南方菟丝子对激素的响应及其传递植物间系统性抗虫信号的研究[D]. 华中农业大学, 2015.
- [15] 郭静敏. 内蒙古自治区菟丝子种类分布和寄主范围调查初报[J]. 植物检疫, 1998(06): 20-21.
- [16] 郭凤根, 李扬汉, 邓福珍. 昆明及邻近地区菟丝子属杂草及其寄主范围的调查研究[J]. 云南农业大学学报, 1999(01): 2-6.
- [17] 白瑞霞, 刘永如, 康利芬, 等. 石家庄市园林菟丝子发生为害情况调查[J]. 河北农业科学, 2015, 19(05): 29-32.
- [18] 马跃峰, 郭成林, 马永林, 等. 广西园林菟丝子发生危害情况调查与分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 2001-2006.
- [19] 李寅菲, 李克昌, 黄文广, 等. 宁夏草原首次大面积发生菟丝子危害[J]. 植物保护, 2008(03): 151-153.
- [20] 马德英, 柴燕, 玉山江·吐尼亚孜, 等. 新疆农田寄生杂草菟丝子种子检疫鉴别特征[J]. 新疆农业科学, 2007(04): 429-433.
- [21] 汤水生. 菟丝子属杂草在江西万载县的发生与危害[J]. 植物检疫, 1997, (03): 44-46.
- [22] 李扬汉, 黄建中. 日本菟丝子寄主种类的调查研究[J]. 植物检疫, 1986, (02): 9-12.

- [23] 黄文广, 赵爱桃, 于钊, 等. 宁夏天然草原菟丝子发生规律试验[J]. 宁夏农林科技, 2009, (06): 49-50.
- [24] 刘晓红. 黑龙江省菟丝子种类及寄主范围[J]. 植物检疫, 2009, 23(03): 60.
- [25] 席家文, 娄巍, 洪权春, 等. 珲春地区菟丝子种类、分布、为害以及主要寄主的调查[J]. 延边大学农学学报, 2000, 22(04): 275-279.
- [26] 郭琼霞, 黄可辉. *Cuscuta* 属 6 个种快速检疫特征[J]. 福建农业学报, 1999, 14(S1): 59-63.
- [27] 蔡磊明, 李扬汉, 翟图娜, 等. 新疆伊宁地区田野菟丝子寄主范围调查[J]. 植物检疫, 1999, 13(02): 18-21.
- [28] 莫善明, 郭开发, 曾怡然, 等. 阿拉山口口岸发现检疫性有害生物单柱菟丝子[J]. 植物检疫, 2014, 28(03):74-76.
- [29] 黄大庆, 姚剑. 外来入侵物种-菟丝子的研究[J]. 中学生物学, 2005(12): 7-9.
- [30] Ejeta G. Breeding for striga resistance in sorghum: exploitation of an intricate host-parasite biology[J]. Crop Sci, 2007, 47: S216-S227.
- [31] 严丽, 焦斌, 李武平, 等. 阿勒泰地区苜蓿菟丝子综合防治技术体系[J]. 陕西农业科学, 2008(04): 116-117.
- [32] 努尔古丽·努木哈买提. 阿勒泰地区苗木基地菟丝子发生规律及防治措施[J]. 现代园艺, 2015(22): 85.
- [33] 阴知勤. 新疆高等寄生植物-菟丝子 *Cuscuta* L. [J]. 八一农学院学报, 1986, (01): 7-14.
- [34] 张金兰, 蒋青, 印丽萍, 等. 新疆寄生杂草菟丝子和列当的调查[J]. 植物检疫, 1995(04): 205-207.
- [35] 迪丽拜尔, 马德英, 陈卫民. 伊犁地区菟丝子种类、分布、危害以及主要寄主的调查[J]. 黑龙江科技信息, 2008(28): 137.
- [36] 艾尼古丽·依明. 石河子地区菟丝子种类鉴定、生物学特性研究及生防菌筛选[D]. 石河子大学, 2017.
- [37] 国家质检总局.有害生物鉴定:菟丝子属
[EB/OL]http://Mwww.aqsiq.gov.cn/qyhypd/ncp/swaq/yhswjd/200610/t20061028_17776.htm.
- [38] 黄建中, 李扬汉, 姚东瑞. 寄生杂草菟丝子属及其防治与检疫[J]. 杂草科学, 1991, (02): 4-7.
- [39] 张裕君, 刘跃庭, 廖芳, 等. 基于 *rbcL* 基因序列的欧洲菟丝子分子检测[J]. 植物保护, 2009, 35(04): 110-113.
- [40] 郭凤根, 李扬汉. 菟丝子属杂草化学防除研究进展[J]. 杂草科学, 1998(03): 2-5.
- [41] 杜晓莉, 黄梅, 马跃峰, 等. 广西园林菟丝子发生危害及药剂防除筛选试验[J]. 南方农业学报, 2011, 42(07): 748-751.
- [42] 杨思霞, 黄旭光, 陆仟, 等. 黄金榕上日本菟丝子防除药剂筛选及其安全性评价[J]. 南方农业学报, 2015, 46(10): 1828-1833.
- [43] 白瑞霞, 胡明明, 孙晓晓, 等. 防除菟丝子的土壤处理除草剂初步筛选[J]. 河北农业科学, 2017, 21(01): 49-52.
- [44] 罗武进. 菟丝子的危害及其防治措施初探[J]. 山西林业科技, 2014, 43(03): 39-40.
- [45] 谢创平. 草甘膦防治龙眼园日本菟丝子试验[J]. 植物保护, 1989(06): 47-48.
- [46] 王军, 端祥光, 邢虎田. 地乐胺行上间隔性两次喷雾防除甜菜田菟丝子[J]. 新疆农垦科技,

- 1992(05): 30.
- [47] 劳美珍, 王智增, 洪加康, 等. 地乐胺防除大豆田菟丝子研究[J]. 植物保护学报, 1989(04): 279-283.
- [48] 曾国军, 曾慧铭. 日本菟丝子防治技术和防控机制探讨[J]. 四川林业科技, 2014, 35(04): 109-111.
- [49] Mortensen K. Biological control of weeds with plant pathogens[M]. Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture. Springer US, 2000.
- [50] Goeden R. A capsule history of biological control of weeds[J]. Biocontrol News and Information, 1988, 9(2): 55-61.
- [51] 王韧. 我国杂草生防现状及若干问题的讨论[J]. 生物防治通报, 1986(4): 173-177.
- [52] 刘志海, 朱全让. 鲁保一号菌. 济南: 山东科技出版社, 1980, 1-179.
- [53] Rudakov O L. The first results in the biological control of *Cuscuta* spp[J]. Zashchita Rast of Vreditelei Boleznei, 1963(2): 25-26.
- [54] 张天宇. 胶孢炭疽菌菟丝子专化型[J]. 真菌学报, 1985, 4(4): 234-239.
- [55] 郭凤根, 李扬汉, 邓福珍. 园林菟丝子生防真菌的筛选研究[J]. 中国生物防治, 1998, 14(4): 159-162.
- [56] 杨春喜. 叶点霉 F-3 菌株对鸭跖草防除潜力的研究[D]. 沈阳农业大学, 2006.
- [57] 林伯荃, 聂征, 郭恒聪. 鲁保一号菌的菌种退化[J]. 微生物学通报, 1979, 6(2): 1-4.
- [58] 高昭远, 干静娥. 菟丝子的生物防除—“鲁保一号”的研究进展[J]. 生物防治通报, 1992(04): 173-175.
- [59] 李健, 李美, 高兴祥, 等. 菟丝子生防菌“鲁保一号”生物学特性及 T-DNA 插入突变体库的构建[J]. 草业学报, 2017, 26(01): 142-148.
- [60] 周浩, 黄宁珍, 郭伦发, 等. 菟丝子寄生真菌 Y TJ-8 的分离和鉴定[J]. 西南农业学报, 2012, 25(01): 157-160.
- [61] 庄蓉. 菟丝子属近似种的超微结构与分子鉴定技术的研究[D]. 福建农林大学, 2008.
- [62] 印丽萍, 颜玉树. 杂草种子图鉴[M]. 中国农业科技出版社, 1996, 168-172.
- [63] 林慧彬, 林建群, 孟蔚, 等. 山东 4 种菟丝子花粉形态的鉴别研究[J]. 江苏中医药, 2006, 27(6): 46-47.
- [64] 郭澄, 苏中武, 李承诺. 七种菟丝子的薄层层析鉴别研究[J]. 基层中药杂志, 1992, 6(3): 12.
- [65] 郭琼霞. 杂草种子彩色鉴定图鉴[M]. 中国农业出版社, 1998, 144-145.
- [66] 关广清, 张王茹, 孙国友, 等. 杂草种子图鉴[M]. 科学出版社, 1998, 161-167.
- [67] 王枝荣, 辛明远, 马德慧等. 中国农田杂草原色图谱[M]. 农业出版社, 1990, 213-216.
- [68] 薛光华, 柴燕, 范伟功, 等. 新疆田间杂草种子图鉴[M]. 新疆科技卫生出版社, 1998, 147-154.
- [69] Vaughn K C. Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization[J]. Protoplasma, 2003(220): 189-200.
- [70] 张芝玉, 郭澄. 中国菟丝子属植物花粉的扫描电镜观察[J]. 广西植物, 1991, 11 (4): 308-311.
- [71] 周俊英. 中药菟丝子花粉形态的扫描电镜研究[J]. 山东科学, 2003, 16(4): 14-16.
- [72] Liao GI, Kuoh CS, Chen MY. Morphological observation on floral variations of the genus *Cuscuta* in Taiwan[J]. Taiwan, 2005, 50(2): 123-130.

- [73] 金晓, 李家实. 中药菟丝子的显微鉴定研[J]. 中国中药杂志, 1990, 15 (4): 9-11.
- [74] 刘丽莎, 张西铃. 菟丝子和大菟丝子核型的比较研究[J]. 中草药, 2000, 31(10): 784-787.
- [75] Harborne J B. Chemosystematics of the leguminosae flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe genisteae[J]. Phytochemistry, 1969, 8: 1449-1456.
- [76] Katrin R, Beate D, Bettina R, et al. Uptake of phloem-specific cardenolides by *Cuscuta* sp. growing on *digitalis lanata* and *digitalis purpurea*[J]. Phytochemistry, 1999, 21: 357-361.
- [77] Hyuncheol O, Dae K, Sunyoung L, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors from *Cuscuta japonica* choisy[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002(83): 105-108.
- [78] Giannasi D E. Generic relationships in the Ulmaceae based on flavonoid chemistry[J]. Taxon, 1978, 27, 331-344.
- [79] Christiane L, Antje S. Soluble phenolic constituents from *Cuscuta relexa* and *Cuscuta platyloba*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1995, 2(23): 121-128.
- [80] Denys J, Charles, Madhav S. Biochemical changes during germination and seedling growth in *Cuscuta campestris*[J]. Physiologia Plantarum, 1982, 56(2): 211.
- [81] 王展, 方积年. 菟丝子多糖 H3 的研究[J]. 药学学报, 2001, 36(3): 192-195.
- [82] Christiane L, Franz C C, Peter P. Phenolic constituents as taxonomic markers in the genus *Cuscuta*(Cuscutaceae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1997, 25(4): 297-303.
- [83] 高必达, 程毅, 朱水芳等. 基于 ITS 序列的菟丝子 PCR 鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(4): 368-370.
- [84] Kooij T A, Krause K, Dorr I, et al. Molecular functional and ultrastructural characterization of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*[J]. Planta, 2000, 210: 701-707.
- [85] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1105-1110.
- [86] Hu SY. A cytological study of plastid inheritance in angiosperms[J]. Acta Bot Sin, 1997, 39(4): 363-371.
- [87] 胡适宜, 袁宗飞. 旋花科植物雄性细胞的细胞质 DNA 存在状况及其系统学意义[J]. 植物分类学报, 2002, 40(6): 511-516.
- [88] Sophie H, Karl J O, Norbert S. Macromolecular trafficking between *nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa* [J]. Journal of Experimental Botany. 2001, 52(354): 173-177.
- [89] Marcelo G, Miguel A G. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae) [J]. Genome, 2004, 47, (1): 134-140.
- [90] Vanzela A, Guerra M S. *Rhynchospora tenuis* link (Cyperaceae): a species with the lowest number of holocentric chromosomes(n=2) [J]. Cytobios, 1996(88): 219-228.
- [91] Stefanovic S, Maria K, Costea M. Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica*(Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences [J]. American Journal of Botany, 2007(94): 568-589.
- [92] Borsics T, Mihalka V, Oreifig A S, et al. Methods for genetic transformation of the parasitic weed dodder (*Cuscuta trifolii* Bab.) and for PCR-based detection of early transformation events [J]. Plant Science, 2002, 162(2): 193-199.

- [93] Sabine B, Kirsten K, Karin K. The *rbcL* genes of two *Cuscuta* species, *C. gronovii* and *C. subinclusa*, are transcribed by the nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP) [J]. *Planta*, 2004, 219: 541-546.
- [94] Jin Y J, Park S W, Kwon Y W, et al. Species identification of dodders (*Cuscuta* spp.) using DNA fingerprinting[J]. *Weed and Turfgrass Science*, 2009, 29(4).
- [95] 李东霄, 陈亮. 南方菟丝子 18S rRNA 基因片段的克隆与序列分析[[J]. *厦门大学学报:自然科版*, 2006, 45(05): 60-62.
- [96] 胡平, 罗国安. 中药菟丝子的高效毛细管电泳法鉴别[J]. *药学学报*, 1997, 32(7): 549-552.
- [97] Funk H, Berg S, Krupinska K. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*[J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1): 45.
- [98] Spaska A S, Zhivko D Z, Zlatka G D. Preliminary studies on the immunomodulatory ect of the C3 binding glycoprotein isolated from *Cuscuta europea*[J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 2000, 22: 15-24.
- [99] Meredith J W, Revill, Susan S, et al. Plastid genome structure and loss of photosynthetic ability in the parasitic genus *Cuscuta*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(419): 2477-2486.
- [100] Andrea D W, Claude W. Alternate paths of evolution for the photosynthetic gene *rbcL* in four nonphotosynthetic species of *Orobanche*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997(33): 965-977.
- [101] 庄蓉, 黄可辉, 郭琼霞, 等. 菟丝子鉴定方法的研究进展[J]. *武夷科学*, 2007, 23(12): 214-218.
- [102] 卢玲. 梨火疫病菌的分子检测技术研究[D]. 南京农业大学, 2004.
- [103] 袁青. 马铃薯病毒多重 RT-PCR 检测技术研究[D]. 西南农业大学, 2004.
- [104] 祁兴华, 郭永斌, 常永旗, 等. 苹果树腐烂病菌 qPCR 检测方法的建立[J]. *河北农业大学学报*, 2017, 40(06): 65-71.
- [105] 郭琼霞, 庄蓉, 黄振, 等. 应用 EST-ILPs 分子标记技术快速鉴定菟丝子属种子[J]. *植物保护*, 2012, 38(6): 101-104.
- [106] 郑传进, 生书晶, 赵树进. 基于 *trnL-trnF* 序列分析的何首乌 PCR-RFLP 分子鉴别[J]. *中药材*, 2012, 35(04): 543-547.
- [107] 杜晓莉, 陆荣生, 马跃峰, 等. 中国菟丝子种子休眠解除方法研究[J]. *江西农业学报*, 2013, 25(11): 79-82.
- [108] Meulebrouck K, Ameloot E, Van A, et al. Germination ecology of the holoparasite *Cuscuta epithymum*[J]. *Seed Science Research*, 2008, 18(01): 25-34.
- [109] Juan L, Christian H, Guiling S, et al. The parasitic plant *Cuscuta australis* is highly insensitive to abscisic acid-induced suppression of hypocotyl elongation and seed germination[J]. *Plos One*, 2015, 10(8): e0135197.
- [110] 耿广东. 辣椒化感作用及其机理研究[D]. 西北农林科技大学, 2005.
- [111] 王宁. 化感物质与狗牙根浸提液对苜蓿和菟丝子种子萌发及幼苗生长的影响[D]. 新疆农业大学, 2008.
- [112] 韦焕琦, 林位夫. 不同贮藏条件下细胞膜透性对橡胶树种子发芽率的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 07: 3043-3045.
- [113] Perez M A, Arguello J A. Deterioration in peanut seeds under natural and accelerated aging[J]. *Seed*

- Science and Technology, 1995, 23: 377-383.
- [114] Gidrol X, Noubhani A, Mocquot B, et al. Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1988, 26: 281-288.
- [115] Seneratna T, Gusse J F, Mckersie B D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean axes[J]. Physiologic Plantarum, 1988, 73: 85-91.
- [116] Ellis R H, Black M, Murdoch A J, et al. Basic and applied aspects of seed biology[C]. Boston: Kluwer Acad Publ, 1997, 787-796.
- [117] 刘娟, 归静, 高伟, 等. 种子老化的生理生化与分子机理研究进展[J]. 生态学报, 2016, 36(16): 4997-5006.
- [118] 林冠伦. 我国杂草生物防治研究进展和趋势(全国杂草生防会议资料综述)[J]. 江苏杂草科学, 1985, 01: 30-34.
- [119] Mar W, Ianni M D, Costea M. Diversity and evolution of pollen-ovule production in *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae) in relation to floral morphology[J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298(2): 369-389.
- [120] 印丽萍. 菟丝子属主要种的分类记述(一)[J]. 植物检疫, 1995(03): 165-174. 90-296.
- [121] 印丽萍. 菟丝子属主要种的分类记述(三)[J]. 植物检疫, 1995(05): 290-296.
- [122] Costea M, Tardif F J. Biology of Canadian weeds[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2006, 86, 293-316.
- [123] 黄建中, 李扬汉, 姚东瑞, 等. 检疫性寄生杂草种子的鉴定方法与菟丝子属常见种的识别特征[J]. 植物检疫, 1992, 6(4): 247-251.
- [124] 朱新霞, 艾尼江, 闫洁, 等. 同步提取棉花 DNA 和 RNA 的方法[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2011, 29(03): 347-351.
- [125] Costea M, García M A, Stefanovic S. A phylogenetically based infrageneric classification of the parasitic plant genus *Cuscuta* (dodders, Convolvulaceae)[J]. Systematic Botany, 2015, 40(1): 269-285.
- [126] Dawson, Musselman, Wolswinkel P, et al. Biology and control of *Cuscuta*[J]. Reviews of Weed Science, 1994, 6, 265-317.
- [127] 范伟功, 柴燕, 薛光华. 菟丝子属种子的检疫鉴定[J]. 新疆农垦科技, 2001(03): 33-35.
- [128] Braukmann T, Kuzmina M, Stefanovic S. Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(4): 977-989.
- [129] 赵欣欣, 宋丽荣, 权薇竹, 等. 高温高湿老化处理对不同豆类种子活力及生长能力的影响[J]. 作物杂志, 2017(05): 168-172.
- [130] 石凤玲, 石凤翎, 薛晓兰, 等. 不同老化时间对 3 种牧草种子活力的影响[J]. 种子, 2015, 34(05): 25-28.
- [131] 吴汉花, 蒋芳玲, 曹雪, 等. 不同老化程度的不结球白菜种子活力指标变化及其相关分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(08): 1606-1614.
- [132] 毛培胜, 李寅菲. 紫花苜蓿种子人工加速老化方法研究[J]. 种子, 2010, 29(10): 10-14.

- [133] 翁玲, 毛培胜, 谭捷. 鸭茅、狗尾草种子人工加速老化条件的筛选[J]. 种子, 2013, 32(09): 92-97.
- [134] 韩亮亮, 毛培胜. 燕麦种子人工加速老化条件的筛选优化[J]. 种子, 2007, 26(11): 31-34.
- [135] 孙春青, 杨伟, 戴忠良, 等. 人工老化处理对结球甘蓝种子生理生化特性的影响[J]. 西北植物学报, 2012, 32(08): 1615-1620.
- [136] Tang ZJ, Song M. Physiological and biochemical analysis of artificially aged Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*(Lour.) Olsson][J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(5): 319-322.
- [137] Kalpana R, Madhava R K. Lowered lipoxygenase activity in seeds of pigeon pea *Cajanus cajan* L. cultivars during accelerated aging[J]. Seed Science and Technology, 1993, 21: 269-272.
- [138] Lehner A, Mamadou N, Poels P. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during aging in wheat grains[J]. Journal of Cereal Science, 2008, 47: 555-565.
- [139] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京高等教育出版社, 2006.
- [140] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京高等教育出版社, 2006.
- [141] 郑光华. 种子生理研究[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 611-613.
- [142] 姚侠妹, 张瑞娥, 偶春, 等. 人工老化处理对桔梗种子生理生化特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(02): 203-209.
- [143] 李颖, 毛培胜. 牧草种子老化生理与修复研究进展[J]. 种子, 2013, 32(01): 48-52.

致 谢

时光匆匆，转眼间三年的研究生生活即将过去，三年的时光既漫长又短暂，其中充满了酸甜苦辣，收获和成长，百感交集。秀丽的校园风景，优良的学习风气，严谨的科学氛围，浪漫充实的校园生活，都使我越来越离不开石河子这个地方。值此毕业论文完成之际，我谨向所有关心、爱护、帮助过的人们表示最诚挚的感谢。

首先，衷心感谢我的导师赵思峰教授研究生三年给予我的耐心指导和悉心关怀，论文的选题、实验设计、开题、试验的开展、论文的修改等多个环节都离不开导师的帮助和指导。在试验过程中，每遇困难求教导师时，导师总能耐心地帮助我分析问题，并指出问题地关键，引导我最终得出解决方案；在论文撰写修改过程中，导师总能提出中肯地意见和建议，并不厌其烦地帮助我完善论文，这种不辞辛劳和精益求精地科研态度也深深地影响和感动着我；在生活中，导师更像是我们的朋友，关心我们的日常生活，您幽默风趣地生活态度，待人行事的价值观无不在我们以后的人生道路上留下浓墨重彩的一笔。再次，我对您表示深深的敬意与感恩之心。

其次，感谢农学院的各位老师对我的指导与帮助。特别感谢姚兆群老师在我实验瓶颈期时，给予我的帮助、建议、指导和鼓励。感谢植保系张国强老师、韩小强老师、黄家风老师、张莉老师、都业娟老师、王晓东老师、任毓忠老师对我学业的关心和帮助，感谢研办莫文萍老师、王春娟老师、陈明老师对我研究生生活上的帮助。

同时，感谢本实验室的各位师姐、师妹及同学，曹小蕾师姐、陈美秀师姐、黄亚丽、张璐、董雪、张菡、胡玲军、刘倩倩、田江丽和魏梦媛等同学对我学习、实验及生活上的帮助，感谢我的各位舍友在我生活上对我的关心、照顾和包容。

还要感谢我的父母在我研究生生涯中给予我无微不至的关心和照顾，一直在我的身后默默的支持我、鼓励我前进，你们是我坚实的后盾，是我一往无前勇气的来源，在此，我对你们表示最衷心的感谢。

求学生涯即将告一段落，我又将踏上新的征程，愿人生的每一阶段都能收获一个更好的自己，始终牢记自己的初心，同时也把最美好的祝愿献给大家，祝大家一切顺利！

作者简介

房小燕，女，生于1994年7月，籍贯安徽。2016年6月毕业于石河子大学农学院植物保护学专业，获农学学士学位。2016年9月考入石河子大学农学院植物病理学专业攻读硕士学位，主要从事菟丝子种类鉴定和防治相关研究。

攻读硕士期间主要参与的研究项目


参与新疆生产建设兵团重大科研项目“加工辣椒有害生物绿色防控技术示范推广”《辣椒主要病虫害综合防治技术与示范》(2018A4A013)的部分研究工作。

攻读硕士期间发表文章

1. 房小燕，姚兆群，陈美秀，曹小蕾，赵思峰. 寄生性杂草菟丝子在新疆的主要种类鉴定[J].石河子大学学报(自然科学版),2019. (已录用)
2. 房小燕，姚兆群，陈虹娇，董雪，赵思峰. 新疆两种主要菟丝子 PCR 快速检测技术研究.新疆农业科学, (已投稿)

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	房小燕	学制	3年
专业	植物保护	研究方向	植物病理学
<p>学术评语:</p> <p>房小燕在攻读硕士学位期间, 科研态度端正, 严格要求自己, 学习成绩优良。同时能够良好运用所学基础理论和专业知识, 把握相关研究领域的学科研究现状, 运用合适的试验技能进行相关研究工作, 理论水平较好, 具有一定的从事植物保护专业相关领域的研究能力。</p> <p>该生攻读硕士学位期间公开发表了1篇论文, 1篇论文在投, 同时全国大学生英语考试获得416分, 学位论文中的中英文翻译较为恰当、准确, 表明该生具有良好的外语程度。</p> <p>学位论文《新疆地区菟丝子种类鉴定、主要种快速检测和种子处理技术研究》明确了新疆菟丝子的具体发生种类, 研究出一套针对2种菟丝子的快速检测鉴定方法, 提出了菟丝子种子老化技术并对其机理进行了分析, 论文完整规范, 表明该生具有较好的学术作风, 研究结果具有一定的理论和应用价值, 具有一定的学术水平。</p> <p>学位论文由该生独立完成, 同意该生进行硕士学位论文答辩, 同意申请硕士学位。</p>			
<p>指导教师签字: </p> <p>日期: 2017年6月31日</p>			