

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2023.02.006

外来入侵杂草假苍耳的形态学及 DNA 分子鉴定

冯佳楠¹, 依米提·热苏力², 吴明媚¹, 史博², 张兴³, 方艳³, 马德英^{1*}

¹新疆农业大学农学院/农业农村部西北荒漠绿洲农林外来入侵生物防控重点实验室/农林有害生物
监测与安全防护重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052; ²中华人民共和国乌鲁木齐海关,
新疆 乌鲁木齐 830011; ³中华人民共和国塔城海关, 新疆 塔城 834700

摘要: 2019 年在新疆塔城市进行入侵有害生物实地踏查中发现疑似假苍耳的植株, 首先采用传统形态学
鉴定方法, 根据植物的根、茎、叶、花及果实等外部形态特征进行初步鉴定, 再以植物的 *Rps16*、*psbA* 和
matK 基因序列为参考, 设计特异性引物 (分别为 IXR、IXP 及 IXM) 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和测
序。通过形态学和 DNA 分子鉴定可知, 采自塔城市的野生杂草为假苍耳, 待检测植物基因测序片段与假
苍耳 *psbA* 和 *matK* 基因序列的相似度高达 98%, 是我国入境植物检疫性有害生物之一。本研究建立了假
苍耳的快速检测方法, 可为新疆地区假苍耳的检验检疫及有效防控提供参考。

关键词: 入侵杂草; 假苍耳; 形态学; 分子鉴定



开放科学标识码
(OSID 码)

Morphological and DNA molecular identification of invasive alien weed *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen.

FENG Jianan¹, YIMITI · Resuli², WU Mingmei¹, SHI Bo², ZHANG Xing³, FANG Yan³, MA Deying^{1*}

¹College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University/Key Laboratory of Prevention and Control of Invasive Alien Species in
Agriculture & Forestry of the North-western Desert Oasis (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of
Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Monitoring and Safety Prevention and Control of Agriculture
and Forest Pests, Urumqi, Xinjiang 830052, China; ²Urumqi Customs District P. R. China, Urumqi,
Xinjiang 830011, China; ³Tacheng Customs District P. R. China, Tacheng, Xinjiang 834700, China

Abstract: In 2019, plants suspected to be *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen. were found during the field trek of invasive
pests in Tacheng, Xinjiang in 2019. The traditional morphological identification method was used to identify the root, stem, leaf,
flower, fruit and other external morphological characteristics of the plant. Then specific primers (IXR, IXP and IXM respectively)
were designed for polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing based on the *Rps16*, *psbA* and *matK* gene se-
quences. The morphological and DNA molecular identification showed that the wild weed from Tacheng area was *C. xanthiifolia*, and
the similarity between the plant gene sequencing fragment and the *psbA* and *matK* gene sequences of *C. xanthiifolia* was up to 98%,
which are one of the entry plant quarantine pests. In this study, a rapid detection method for false celandine was established, which
can provide reference for the inspection and quarantine and effective prevention and control of false celandine in Xinjiang region.

Key words: invasive weed; *Cyclachaena xanthiifolia*; morphology; molecular identification

假苍耳 *Cyclachaena xanthiifolia* (Nutt.) Fresen. 2020)。假苍耳在农田、路旁及荒地等生境中较为
是一年生草本植物, 属菊科假苍耳属, 原产于北美, 常见, 对环境适应能力较好, 其生长迅速、繁殖力
是我国入境植物检疫性有害生物之一 (李凤兰等, 强, 主要靠抢夺当地植物的阳光、养分和水分等来

收稿日期 (Received): 2022-05-06 接受日期 (Accepted): 2022-08-01
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1200602); 外来有害植物鉴定及风险评估; 乌鲁木齐海关合作项目
作者简介: 冯佳楠, 女, 硕士研究生。研究方向: 农药学。E-mail: fjn8210@163.com
* 通信作者 (Author for correspondence), 马德英, E-mail: mdyxnd@163.com

生存。假苍耳在生长过程中极易排斥其他植物,形成单一群落,改变当地原有植物种类和群落类型,这种极强的竞争力对农业生产和生态环境的多样性具有潜在危害(王晶,2012)。此外,假苍耳的花粉易引起枯草热病,皮肤敏感的人接触到假苍耳的叶片会引起皮肤炎,危害人类健康(王丽娟等,2021;许志东等,2012)。

1981年,关广清(1983)在辽宁省朝阳县大营子公社发现一种过去从未见过的植物,经形态学鉴定得出该植物为假苍耳,之后其主要分布在我国东北地区。2012年8月,杜珍珠等(2017)首次在新疆塔城市发现该植物。2019年,本课题组在新疆塔城市进行入侵有害生物实地踏查中发现疑似假苍耳的植株,但目前对假苍耳形态鉴定方面的研究较少,暂未见其DNA分子鉴定相关研究的报道。因此,亟需建立假苍耳快速、准确的检测方法,避免其在新疆大范围的扩散。本研究通过传统形态学结合DNA分子鉴定方法,旨在简便、高效地识别和鉴定假苍耳,为新疆地区假苍耳的检验检疫及有效防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料于2019年9月11日采自塔城市巴克图口岸。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:DNA Marker、2×San Taq PCR Mix、TAE溶液、核酸染料、Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒等,均为上海生工生物工程股份有限公司提供。

主要仪器:SZN45型双目体视显微镜(宁波舜宇仪器有限公司)、ZEISS(蔡司)V20体视显微镜(蔡司ZEISS集团)、DK-8D型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)、Eppendorf离心机(德国Eppendorf公司)、NanoDrop One微量分光光度计(美国Thermo Fisher)、QL-901型旋涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)、Biomtra型PCR扩增仪(德国Biomtra公司)、DYY-6C型水平电泳槽(北京六一生物科技有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 形态学鉴定 根据植物的外部形态特征,对其根、茎、叶、花、果实进行描述。先将植物的细微结构如种子、雌雄蕊等放入培养皿中,用清水浸

泡20 min,取出晾干后用ZEISS(蔡司)V20体视显微镜观察,并对其进行拍照,根据相关文献(关广清,1983;杜珍珠等,2017)进行形态鉴定。

1.3.2 DNA分子鉴定 (1)基因组DNA提取:取植物叶片50~100 mg置于预冷的无菌研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末状并转移至1.5 mL离心管中。参照Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒说明书进行操作,提取植物基因组DNA,并用微量分光光度计检测所提基因组DNA的纯度和浓度。(2)设计引物:根据形态学鉴定结果,在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上搜索假苍耳核苷酸序列。经过筛选,以该物种*Rps16*、*PsbA*和*matK*基因序列为参考,设计特异性引物(表1)。(3)PCR扩增反应:反应体系为2×San Taq PCR Mix 12.5 μL、10 μmol·L⁻¹上下游引物各1 μL、DNA模版2 μL,以ddH₂O定容至25 μL。PCR反应程序为95℃预变性3 min,95℃变性30 s,50℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环,72℃保持10 min。(4)测序与序列比对:使用Ezup柱式植物基因DNA抽提试剂盒,提取待检测物种DNA作为模板,分别以*Rps16*、*PsbA*和*matK*基因的特异性引物进行扩增,均获得了对应长度的目标片段。目标片段送上海生工生物工程有限公司测序,以测序获得的序列在NCBI上进行Blast X比对,最高相似度均为对应参考基因。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

根:根系为直根系,主根发达,周围有多个侧根(图1A)。

茎:茎秆绿色或紫色,具有明显的纵条纹,表面有毛(图1B)。

叶:叶为单叶,长卵圆形,叶片前段渐尖,叶缘呈重锯齿状,有明显的主脉(图1C)。

花:花序为头状花序,有5枚总苞,覆瓦状排列(图1D);苞片椭圆状至菱形,长约2.5 mm,宽约2 mm,顶端有短尖,边缘呈齿状,有毛(图1E);萼片膜质,长约3 mm,宽约2 mm(图1F);雌雄同花,雌蕊为特化的舌状花,子房5个,长约1.5 mm(图1G);雄花中具有特化的雌蕊,花柱长约1 mm,柱头盘状(图1H)。

果实:瘦果黑褐色至灰褐色,倒卵形,长约2

mm,宽约 1.5 mm,背面隆起,腹面光滑,中部、两侧各有一条脊棱,顶端略有毛(图 1I)。

根据植物的外部形态特征,通过查阅相关文献

可知,采自塔城市巴克图口岸的野生杂草初步鉴定为假苍耳,为菊科假苍耳属植物,是我国入境植物检疫性有害生物之一。

表 1 引物序列及参考基因 GenBank 序列号
Table 1 Primer sequence and reference gene GenBank sequence number

参考基因 Reference gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length/bp	GenBank 序列号 GenBank serial number
<i>matK</i>	IXM	CATTTATTAAGATTCTTTCTTAGCCGCACACTTGAAC	505	MK519975.1
<i>PsbA</i>	IXP	CTGCTATTGAAGCTCCATCATCCACTTGGCTACATCC	461	KY215766.1
<i>Rps16</i>	IXR	GTCATTGGTTCACTCGGTCAAGGTTCTCTTTCAAGGTC	860	KY215798.1

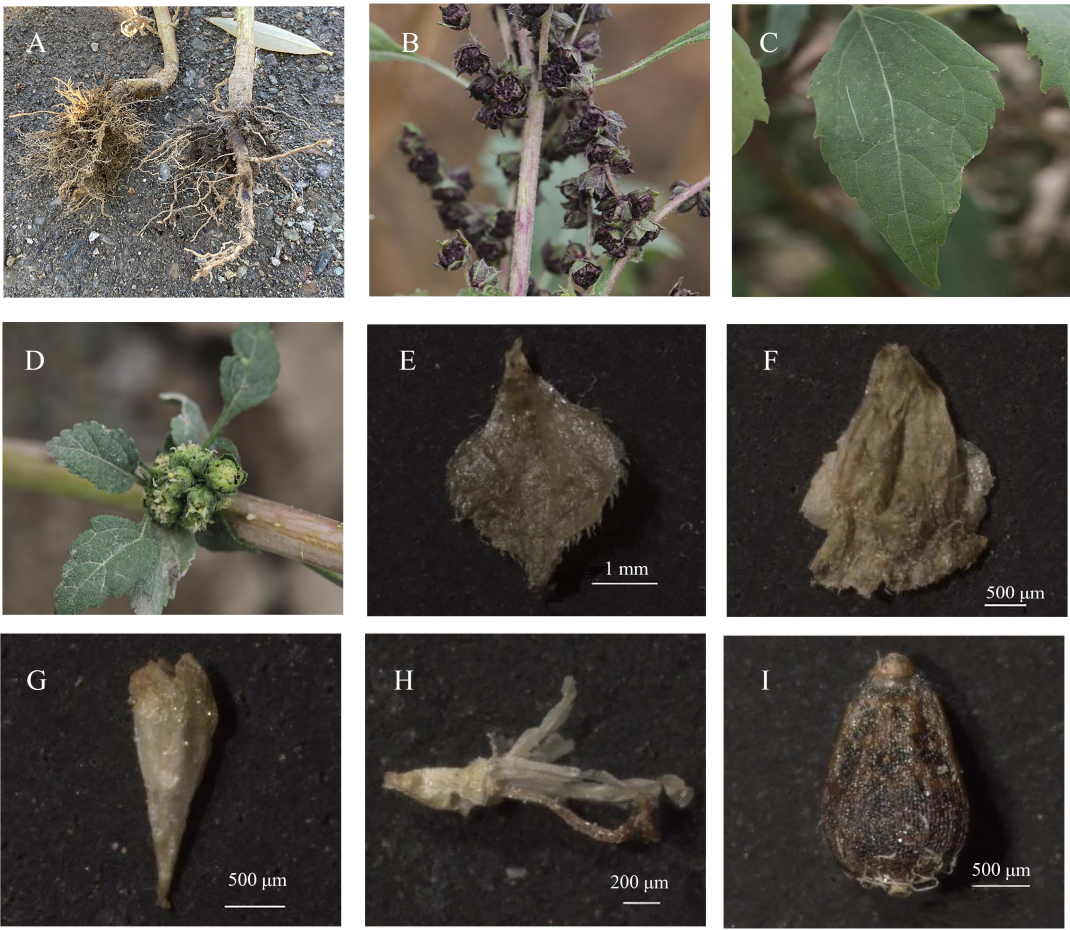


图 1 假苍耳的形态特征

Fig.1 The morphological characteristics of *C. xanthiifolia*

A:根;B:茎;C:叶;D:头状花序;E:苞片;F:萼片;G:雌蕊;H:雄花中特化的雌蕊;I:瘦果。

A: Root; B: Stem; C: Leaf; D: Capitulum; E: Bract; F: Sepal; G: Pistil; H: Specialized pistils in male flowers; I: Achene.

2.2 DNA 分子鉴定

2.2.1 PCR 扩增结果 以提取 DNA 作为模板,分别以 *Rps16*、*PsbA* 和 *matK* 基因的特异性引物进行扩增,得到的 PCR 产物经凝胶电泳检测后,分别得到 860、461 和 505 bp 左右的目的条带,条带明亮且无杂带(图 2)。

2.2.2 UNKNOWN_1 为待检测物种测序片段与假苍耳基因部分片段测序结果 UNKNOWN_1 为待检测物种测序片段,*matK*_MK519975.1 为假苍耳 *matK* 基因部分序列,GenBank 序列号为 MK519975.1。由图 3 可知,待检测物种测序片段与假苍耳 *matK* 基因

序列比对只有 9 个碱基不同,基因序列配对率可达 98%以上,待检测物种为假苍耳的准确度很高。

2.2.3 UNKNOWN_2 为待检测物种测序片段与假苍耳基因部分片段测序结果 UNKNOWN_2 为待检测物种测序片段,psbA_KY215766.1 为假苍耳 *psbA* 基因部分序列,GenBank 序列号为 KY215766.1。由图 4 可知,待检测物种测序片段与假苍耳 *psbA* 基因序列比对前 372 个基因序列相同,后 60 个基因序列中有 8 个碱基不同,相似度达 98%以上。可知待检测植物为假苍耳的准确率为 98%。

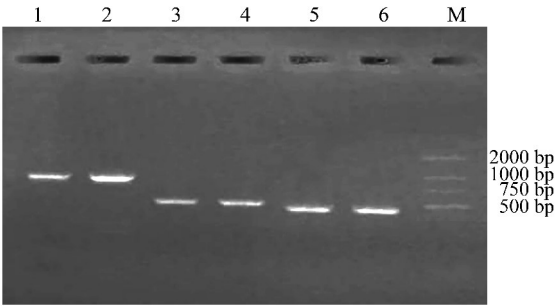


图 2 PCR 扩增结果
Fig.2 Results of PCR amplification

1~2、3~4 和 5~6 分别为基于 *Rps16*、*matK* 和 *PsbA* 基因序列的扩增条带; M:Marker。
1~2,3~4 and 5~6: Amplified band based on *Rps16*, *matK* and *PsbA* gene sequence respectively.



图 3 待检测物种测序片段与假苍耳 *matK* 基因序列比对
Fig.3 Sequence alignment of *matK* gene of *C. xanthiifolia* and sequencing fragments of tested species

2.2.4 UNKNOWN_3 为待检测物种测序片段与假苍耳基因部分片段测序结果 UNKNOWN_3 为待检测物种测序片段,*Rps16*_KY215798.1 为假苍耳 *Rps16* 基因部分序列,GenBank 序列号为 KY215798.1。由图 5 可知,待检测物种测序片段与假苍耳 *Rps16* 基因序列对比中有 27 个碱基不同,相似度达 93%,待测物种的相似度与假苍耳 *Rps16* 基因序列低于假苍耳的 *psbA* 基因片段和 *matK* 基因片段。原因可能是所选假苍耳的基因

片段较长,其中有部分基因发生突变导致相似度降低,或是因假苍耳在不同的生长环境中会有部分基因发生突变导致相似度降低。故 *Rps16*_KY215798.1 不适宜作为假苍耳分子生物学鉴定基因序列。

综上所述,综合传统形态学与现代 DNA 分子鉴定结果,最终确定采自塔城市巴克图口岸的野生植物为假苍耳。

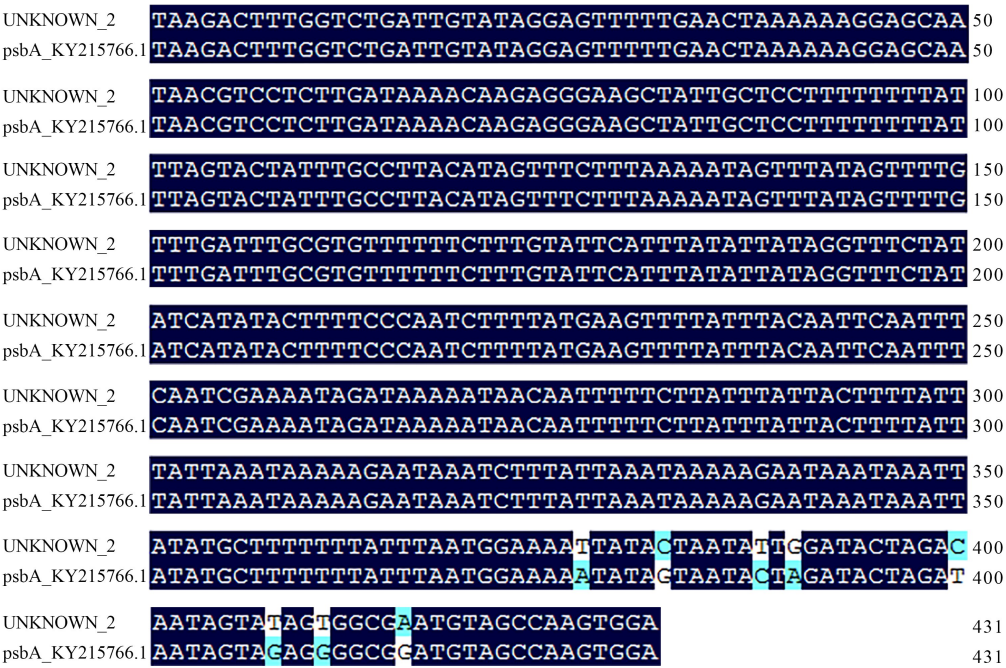


图 4 待检测物种测序片段与假苍耳 *psbA* 基因序列比对

Fig.4 Sequence alignment of *psbA* gene of *C. xanthiifolia* and sequencing fragment of tested species

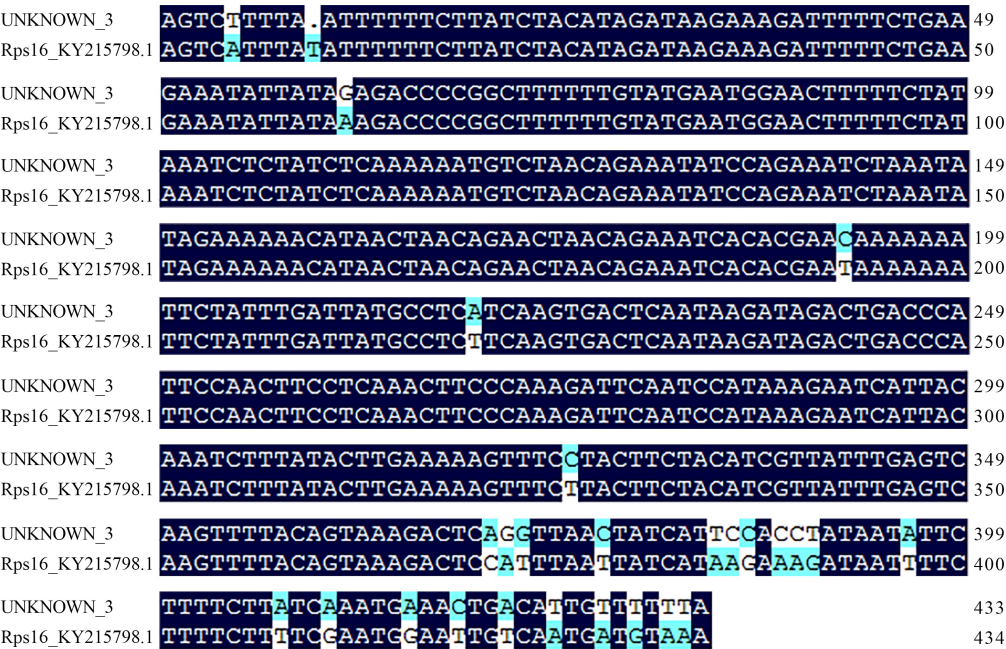


图 5 待检测物种测序片段与假苍耳 *Rps16* 基因序列比对

Fig.5 Sequence alignment of *Rps16* gene of *C. xanthiifolia* with the sequencing fragment of the tested species

3 讨论

假苍耳种子小,主要以种子为传播途径,不仅能随风进行短距离传播,还极易混杂于作物种子、进口货物及交通工具中进行远距离传播(贾晶,2007)。新疆巴克图口岸毗邻哈萨克斯坦共和国东哈州,进出口贸易往来为假苍耳的扩散提供了

有利条件。假苍耳适应能力强,占领发生地后排挤本土植物,对当地的生态环境构成威胁(赵微和陶波,2009)。其入侵到农作物区,会影响农作物生长,降低农产品的质量,对农、林、牧业生产均有较大威胁(姚树宽等,2018)。新疆主要以农业和畜牧业为主,若假苍耳进一步扩散势必会造成严重的经济损失。强化口岸检疫措施,筑牢假苍耳

入侵的第一道防线,是防范其入侵最直接、有效,也是最经济的手段和措施。

仅采用传统形态学鉴定方法对假苍耳进行鉴定,需具备较高的专业能力,且容易造成鉴定结果不准确,将形态学鉴定与 DNA 分子鉴定方法相结合可以保证鉴定结果的可靠性。DNA 条形码技术较为通用、能够利用容易扩增且相对较短的 DNA 片段来进行物种的快速鉴定,该技术在物种鉴定方面具有良好的应用前景(胡志刚等, 2014)。

本研究根据假苍耳的形态特征进行初步鉴定,再以植物的 *psbA* 和 *matK* 基因序列为参考,设计特异性引物进行 PCR 扩增和测序,待检测植物基因测序片段与假苍耳 *psbA* 和 *matK* 基因序列的相似度高达 98%,最终确定采自塔城市巴克图口岸的野生杂草为假苍耳,研究结果可为后期口岸检疫人员快速、准确鉴定假苍耳提供参考。

参考文献

杜珍珠,崔瑜,阎平,徐文斌,黄刚,2017. 新疆发现外来有害杂草——假苍耳. *生物安全学报*, 26(1): 95-97.
关广清,1983. 一种新侵入我国的杂草——假苍耳. *植物检疫* (5): 44-49.

胡志刚,夏叶,郑贝,胡志强,高欢欢,刘合刚,2014. 菊属植物 DNA 分子鉴定研究进展. *世界科学技术——中医药现代化*, 16(8): 1840-1845.

贾晶,2007. 林业有害植物假苍耳的入侵特性研究. 硕士学位论文. 哈尔滨:东北林业大学.

李凤兰,武佳文,姚树宽,赵梓颐,赵潇臻,贺付蒙,朱元芳,石奇海,周磊,徐永清,2020. 假苍耳不同部位水浸提液对 5 种土著植物化感作用的研究. *草业学报*, 29(9): 169-178.

王晶,2012. 假苍耳化感作用对生物生长发育的研究. 硕士学位论文. 哈尔滨:东北农业大学.

王丽娟,李爱雨,冯旭,武佳文,王雪,刘丹,李翠婷,徐永清,2021. 外来入侵植物假苍耳种子的萌发特性. *生态学杂志*, 40(7): 1979-1987.

许志东,丁国华,刘保东,池春玉,肖玮,金晓霞,李春烨,2012. 假苍耳的地理分布及潜在适生区预测. *草业学报*, 21(3): 75-83.

姚树宽,李凤兰,彭丽娜,冯旭,董佳敏,冯哲,张俊峰,赵巧琴,冯珊珊,徐永清,胡宝忠,2018. 假苍耳不同部位水浸提液对五种十字花科植物化感作用的研究. *草业学报*, 27(9): 56-66.

赵微,陶波,2009. 外来杂草假苍耳(*Iva xanthifolia*)化感作用研究. *东北农业大学学报*, 40(4): 21-24.

(责任编辑:郑珊珊)