

# 櫻絨花(*Emilia fosbergii* Nicolson)與紫背草(*E. sonchifolia* L. var. *javanica*)之分子鑑定

袁秋英<sup>1\*</sup> 林李昌<sup>1</sup> 蔣慕琰<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 農委會農業藥物毒物試驗所

## 摘要

櫻絨花(*Emilia fosbergii* Nicolson)為菊科紫背草屬一年或二年生草本植物，原生於非洲地區，現已成為臺灣農地的入侵雜草。由於櫻絨花與同屬植物紫背草(*E. sonchifolia* L. var. *javanica*)的植株形態極為相似，未開花之前不易區別，造成鑑定上的困擾。分子標誌已普遍運用於植物種類之鑑別，本研究針對櫻絨花與紫背草 5.8S rRNA-ITS 核酸序列進行選殖及解序，並建立 PCR-RFLP、multiplex PCR 及 ISSR 的分子標誌。櫻絨花與紫背草的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列長度不同，分別為 643 bp 及 641 bp，一致性(identity)為 90.7%。經由 ITS 序列比對，2 者之間有 *Nsi* I、*Sph* I 及 *Xho* I 3 種限制酵素切位的差異，5.8S rRNA-ITS 核酸片段經 3 種限制酵素反應，故發展 PCR-RFLP 鑑定方法；另於 ITS 序列差異處設計專一性引子，建立 multiplex-PCR 鑑定方法，可分別於櫻絨花與紫背草增幅 678 bp 及 340 bp 片段；此外利用 ISSR 587 引子增幅 1.0-2.1 kb 之間的多型性條帶，可明顯區別櫻絨花與紫背草。multiplex-PCR 及 ISSR 兩種分子標誌具有簡易、快速及明確等特點，可應用於入侵植物的監測及管理，進而維護臺灣原生物種之生態多樣性與平衡。

**關鍵詞：**櫻絨花、紫背草、入侵植物、分子標誌。

## Identification of florida tasselflower (*Emilia fosbergii* Nicolson) and sowthistle tasselflower (*E. sonchifolia* L. var. *javanica*) through molecular markers

Chiou-Ing Yuan<sup>1\*</sup>, Li-Chang Lin<sup>1</sup>, and Mou-Yen Chiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Taiwan Agriculture Chemicals and Toxic Substances Research Institute, COA, Taiwan

\* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

## ABSTRACT

Florida tasselflower (*Emilia fosbergii* Nicolson) is an annual or biennial Compositae plant and native to Africa, became an invasive plant among cropland in Taiwan in recent decades. As the morphological characteristics are similar, Florida tasselflower has been easily misidentified with sowthistle tasselflower (*E. sonchifolia* L. var. *javanica*) before blossom. DNA-based molecular markers have been used to detect the genetic diversity of invaded alien species. Novel methods for the identification of the invasive plant Florida tasselflower and sowthistle tasselflower at the early stage of plant development have established in this study, based on direct sequencing of the internal transcribes spacer (ITS) region of 18S-26S ribosomal DNA (rDNA), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), multiplex PCR and inter-simple sequence repeat (ISSR) assay. The ITS1-5.8S rRNA-ITS2 regions of Florida tasselflower and sowthistle tasselflower was 643 and 641 bp, respectively, and showed 90.7% identity. the amplified 5.8S rRNA-ITS fragments were compared using RFLP analysis with *Nsi* I、*Sph* I and *Xho* I endonucleases, allowing the detection of characteristic patterns of these two *Emilia* species. Fifty ISSR primers were screened in this study, 12 primers amplified 1-8 polymorphic markers. Amplified 1.0 -2.1 kb bands from ISSR 857 primer and using multiplex PCR produced 678 or 340 bp distinct bands, both were clearly and easily distinguished Florida tasselflower and sowthistle tasselflower. These two markers may assist the effective management in invasion plant and maintain the balance of biodiversity in agricultural ecosystems.

**Key words:** *Emilia fosbergii*, *E. sonchifolia* L. var. *javanica*, invasion plant, molecular marker.

## 前言

本地(本土、原有)植物是指在台灣演化及由周邊地區自然擴散而來的植物,凡受人類活動影響而帶入台灣者都是外來植物。目前台灣有紀錄之外來植物已超過 2,600 種 (Chiang *et al.* 2003)。大多數之外來植物為用於食用、畜牧、藥草、觀賞及加工等之栽培種,少部份外來植物於原野中繁衍,其中有 279 種(約 10%)外來植物已野化,以禾本科、菊科及茄科植物的野化比率(30%以上)較高,根據近年農藥所 (Chiang *et al.* 2003) 於農地、休耕田及中部主要溪流流域之調查顯示,

20 種具高度侵佔性及危害力的植物，包括小花蔓澤蘭 (*Mikania micrantha* Kunth)、大花咸豐草 (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Sch.)、豬草 (*Ambrosia artemisiifolia* L.)、銀膠菊 (*Parthenium hysterophorus* L.)、銀合歡 (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) 及布袋蓮 (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) 等。這些外來植物與蔓澤蘭 (*Mikania cordata* (Burm. f.) B. L. Rob.)、台灣莨絲子 (*C. japonica* Choisy var. *formosana* (Hayata) Yunck.) 等台灣本土種植物，於外觀形態相似，常需由花器構造的差異辨識，營養生長時期則不易區別。建立分子標記鑑定方法，可以協助入侵植物的管理與防除。

櫻絨花 (*Emilia fosbergii* Nicolson) 為菊科 (Asteraceae) 紫背草屬 (*Emilia*) 一年或二年生草本植物。可能原產於非洲，經種苗業者為觀賞之用引進臺灣。櫻絨花曾於 1978 及 1981 年先後被命名為 *E. sagittata* 及 *E. javanica* (Ou and Liu 1981)，之後再經由中研院彭鏡毅博士針對 *Emilia* 屬植物特徵 (Nicolson 1980)，更正為 *E. fosbergii*。此植物於全台灣之中、低海拔地區可自然生長，臺中、南投、高雄及屏東等地皆有採集之記載 (Hsieh 2003)。由於櫻絨花與同屬植物紫背草 (*E. sonchifolia* L. var. *javanica*) 的形態極相似，常造成辨識的困擾。紫背草為一年生草本植物，普遍分佈於南非、日本、中國及臺灣低海拔地區。櫻絨花與紫背草二者最大之差異只有 3 處：紫背草的葉緣羽裂，總苞長度與花冠相等，呈窄圓筒狀、花冠為淡紫色；而櫻絨花的葉緣具齒，總苞長度為花冠的 4 分之 3，呈寬圓筒狀，花冠為磚紅色 (Hsieh 2003)。因此櫻絨花與紫背草植株於營養生長期不易區別。

近年來發展之分生技術可經由檢測物種專一性對偶基因，探討植物之遺傳變異、親源關係及群落演化等現象，其中真核生物的核糖體去氧核糖核酸 (ribosomal DNA, rDNA)，包括 18S、5.8S、26S 基因密碼區及內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS)，常被應用為分子系統性研究之基因標誌。核糖體核酸為位於染色體核仁部位的一群重複基因群 (repeated gene families)，呈串縱相排列 (Schaal and Learn 1988)，此 rDNA 經轉錄及修飾作用，形成成熟之 18S、5.8S 及 26S rRNA 參與細胞轉譯主要工作，此三種 rRNA 於同一物種 (species) 內序列相似度極高，但於內轉錄間隔區 (ITS) 的序列常具有明顯差異 (Schaal and Learn 1988, Baldwin 1993)，由於在此間隔區內常具有高度重複數及多分歧性的演化特性 (Baldwin 1993)，因此界於 18S 及 26S rRNA 之間 ITS 序列的比對，常被應用於種間、種內或個體間親源關係之比較與鑑定 (Baldwin 1993, 1995)。

簡單序列重複區間 (Inter-simple sequence repeats, ISSR) 為利用微衛星 (microsatellites) 序列或連續重複核酸片段為長度 2-10 bp 的單一引子，經由 PCR 增幅約 100-3,000 bp 核酸片段。經以電泳分析，可區別約 10-60 個複合基因座的核酸

片段。ISSR 由於是由複合基因座得來之指紋圖譜，具有簡易、快速及檢體 DNA 需求量少等優點，常利用於遺傳研究、親緣鑑定及入侵植物生態學，且可應用於基因圖譜研究。(Sakai *et al.* 2001)。

本研究針對櫻絨花與紫背草 5.8S rRNA-ITS 區域核酸序列，建立 PCR-RFLP 與專一性引子之 multiplex-PCR 檢驗方法及 ISSR 分子標誌，探討作為分子標誌鑑定櫻絨花與紫背草之可行性。

## 材料與方法

### 藥品及儀器

植物基因組 DNA 抽取試劑(Qiagen)、Fast-Run Taq master mix PCR 試劑組(ProTech)、pGEM-T Easy 載體(Promega)、1 kb plus DNA Ladder 核酸標準品、gel extraction kit 及 plasmid extraction kit(GeneMark)。EcoR I、Nsi I、Sph I 及 Xho I 限制酶(Biolab)、核酸引子及定序、UBC ISSR oligonucleotide primer Set #9 (共有 100 個，編號 UBC801-900 引子)(University of British Columbia)、PCR 儀器(Perkin-Elmer, Gene Amp PCR system 2400)。

### 植物材料及核酸萃取

2007 年 1-4 月間於臺灣台中縣、嘉義縣及高雄縣等地區農地，採集櫻絨花與紫背草各 12 株。分別稱 0.1 克新生心葉，依據 Qiagen 操作步驟略修改(如有修改就要詳細說明修改處)，萃取基因組 DNA，以 50  $\mu$ l TE buffer 溶洗出 DNA，以分光光度儀測定於波長 260 nm 之吸光值估算 DNA 的濃度。

### 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

依據 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank 中大花咸豐草於 18S rRNA 與 26S rRNA 基因的保留序列(accession no. AY623061)，設計 1 組引子 ITS-F/ITS-R (Table 1)，取約 0.1  $\mu$ g 櫻絨花及紫背草的 DNA，分別加 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M 引子，利用 10  $\mu$ l PCR kit，反應總體積為 50  $\mu$ l，進行 PCR 反應 (Arnheim and Erlich 1992)。反應步驟為：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 30 秒，煉合溫度 52°C 30 秒，延展溫度 72°C 30 秒，循環 35 週期；最後延展溫度 72°C 7 分鐘。取 8  $\mu$ l PCR 產物，加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% (w/v) agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析，約 25 分鐘，取出膠體於紫外燈下觀察結果，所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較，利用內差法估計長度。

Table 1. Primers used in this study.

Primer Name	DNA sequence (5' → 3')	Gene	Amplified DNA (bps)
ITS-F	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	18s rRNA	700 bp
ITS-R	CTTCTCCTCCGCTTATTGATATGCT	26s rRNA	
EF-ITS-F	CCTATGTACCAGAGTGACTTGTGAACA	5.8s rRNA-ITS	678 bp
EF-ITS-R	TGCGTATACTCAGCGGGTAGTGCCACC		
ESJ-ITS-F	AGCGCTTGTACCATGCTTTCATCGTTC	5.8s rRNA-ITS	340 bp
ESJ-ITS-R	GTGTGTCAATAAAAAGAGGACTCCTAT		

### PCR 產物之序列分析

由 PCR 產物之電泳分析結果，割取約 700 bp 之 DNA，利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出，進行 ligation 及 transformation 步驟。取 3  $\mu$ l 此 DNA，添加於 pGEM-T Easy Vector kit (5  $\mu$ l 2 X Rapid Ligation buffer, 1  $\mu$ l 50 ng pGEM-T Easy vector, 1  $\mu$ l T4 DNA ligase)，於 16°C 反應 14-16 小時。取 200  $\mu$ l 大腸桿菌 TG1 strain 菌液加入接合反應之 10  $\mu$ l DNA，於 42°C 反應 3 分鐘，放置於冰上 3 分鐘，加入 200  $\mu$ l LB 培養液，於 37°C 振盪培養 1 小時，再將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin)，培養 14-16 小時，選取含有 DNA insert 之白色菌落，移入 3 ml LB 培養液中，再於 37°C 培養 14-16 小時。抽取 plasmid DNA，取 5  $\mu$ l plasmid DNA 加 1  $\mu$ l *Eco*RI 限制酵素，總體積為 20  $\mu$ l，於 37°C 反應 1 小時，取出 8  $\mu$ l 加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析。選取具有約 700 bp plasmid DNA 定序。再以 NCBI GenBank 中 Blast 功能比對序列(Aitschul *et al.* 1997)。

### PCR-RFLP 之限制酶反應

取櫻絨花與紫背草樣品之 10  $\mu$ l PCR 產物，分別添加 1  $\mu$ l *Nsi* I、*Sph* I 及 *Xho* I 等 3 種限制酶及 0.2  $\mu$ l 緩衝液，總體積為 20  $\mu$ l，於 37°C 水浴反應 1.5 小時，將酵素反應之樣品進行電泳分析，步驟同前述方法。

### Multiplex-PCR 反應

比對櫻絨花與紫背草 5.8S rRNA-ITS 序列，分別設計 2 組專一性引子 EF-ITS-F, EF-ITS-R 及 ESJ-ITS-F, ESJ-ITS-R (Table 1)，進行 multiplex-PCR 反應。條件為起

始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 30 秒，煉合溫度 55°C 30 秒，延展溫度 72°C 30 秒，循環 35 週期；最後延展溫度 72°C 7 分鐘。電泳分析步驟同前述方法。

### ISSR 分子標誌

取櫻絨花與紫背草 30 ng DNA，分別添加 100 組 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M ISSR 引子，進行 PCR 反應條件為：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘，變性溫度 94°C 30 秒，煉合溫度 54°C 30 秒，延展溫度 72°C 30 秒，循環 35 週期；最後延展溫度 72°C 7 分鐘。電泳分析步驟同前述方法。

## 結果與討論

### 5.8S rRNA-ITS 之 PCR 反應與序列比較

櫻絨花與紫背草之 PCR 反應及電泳分析，結果各樣品皆可增幅單一約 730 bp 核酸條帶(Fig.1)。PCR 產物經由溶洗、接合、轉殖及解序等反應，再利用 NCBI GenBank 之 Blast 功能將序列分別與基因庫內之資料比對顯示，12 株櫻絨花與紫背各自物種 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的一致性(identity)高達 99-100% (資料未呈現)，但草櫻絨花與紫背草 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的長度不同，分別為 643 bp 及 641 bp，二者之一致性為 90.7%，此 2 種植物與一般菊科植物的 ITS 序列的長度相似，ITS1 皆長於 ITS2(Baldwin *et al.* 1995)，其中櫻絨花的 ITS1(261 bp)及 ITS2(222 bp)皆較紫背草多 1 個鹼基，分別於 ITS1 的第 255 個及 ITS2 的第 15 個鹼基處，且分別有 28 及 30 個鹼基之差異，5.8S rRNA 序列則完全相同(Table 2)。NCBI GenBank 目前尚無櫻絨花 5.8S rRNA-ITS 序列之登錄，本研究之紫背草 5.8S rRNA-ITS 序列與 NCBI GenBank(Accession no. EF108405)的紫背草 5.8S rRNA-ITS 序列比對，一致性為 97%，其中於 ITS1、5.8S rRNA 及 ITS2 序列分別有 6、1 及 7 個鹼基之差異。近年來於臺灣危害嚴重的小花蔓澤蘭，也可經由 5.8S rRNA-ITS 序列將蔓澤蘭、小花蔓澤蘭及米甘草，三種蔓澤蘭屬雜草區分開來，其中蔓澤蘭和小花蔓澤蘭之間有 97% 的序列一致性(Tzeng and Chou 2003)。另有研究顯示薔薇科(Rosaceae)懸鉤子屬(*Rubus*)植物的 5.8S rRNA-ITS 序列發現，在親源較近的近緣種之間，ITS 序列的變異性較低(Alice *et al.* 1999)。當外來入侵種與原生種有雜交機會時，一方面可能加速原生種的減少，或導致族群遺傳質多樣性的降低；另一方面雜交可將原生種的基因引入外來種，可能增強了外來種的環境適應性(Sakai *et al.* 2001)，例如利用分子標誌分析北美的 *Spartina alterniflora* 禾草及英國原生的 *S. maritima*，經雜交後染色體加倍，產生入侵性更強的 *S. aglica* (Ayres and Strong 2001)。此外利用

5.8S rRNA-ITS 序列的分析，亦可了解地中海的紫杉葉蕨藻 (*Caulerpa taxifolia*) 可能來自於澳大利亞地區(Meusnier 2004)，此綠藻具有體型巨大、生長快速及耐低溫等特性，美國已於 2000 年由農業部動植物健康檢查署(USDA/APHIS) 將其列為「聯邦有害雜草」。

### PCR-RFLP 標誌

比對櫻絨花與紫背草 5.8S rRNA-ITS 序列於限制酵素切位之異同，選用 *Nsi* I、*Sph* I 及 *Xho* I 等 3 種限制酵素添加於 5.8S rRNA-ITS 之 PCR 產物，經電泳分析結果顯示，由於櫻絨花 5.8S rRNA-ITS 序列中無 *Xho* I 酵素之切位(C/TCGAG)，因此反應後核酸仍為約 730 bp，但紫背草 ITS2 序列有 *Xho* I 酵素之切位，因此經酵素反應後切割為 134 bp 及 590 bp 二片段(Fig. 2)。而櫻絨花於 ITS1 序列中有 *Nsi* I

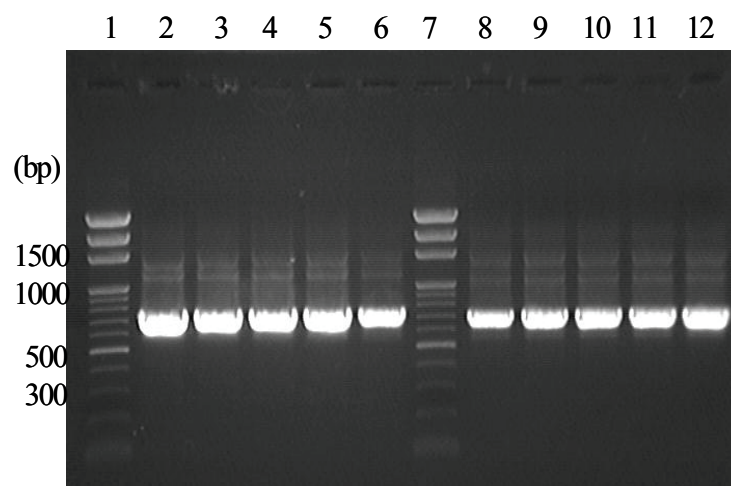


Fig. 1. The 5.8S rRNA-ITS regions of *Emilia fosbergii* and *E. sonchifolia* L. var. *javanica*, were obtained from the PCR amplification by primers ITS-F and ITS-R. Lane 1 and 7 were DNA markers, lane 2-6 were five samples of *E. fosbergii*, lane 8-12 were five samples of *E. sonchifolia* L. var. *javanica*.

Table 2. Sequences identity (%) of 5.8S rRNA, ITS1 and ITS2 in *Emilia fosbergii* and *E. sonchifolia* L. var. *javanica*.

ITS regions	EF	ESJ	Identity (%)
5.8S rRNA	160 bp	160 bp	100
ITS1	261 bp	260 bp	88
ITS2	222 bp	221 bp	86

EF: *E. fosbergii*, FSJ: *E. sonchifolia* L. var. *javanica*

(ATGCA/T)及 *Sph* I (GCATG/C)切位，經酵素反應後切為 232 bp、494 bp 及 236 bp、490 bp。因此櫻絨花與紫背草可先經由 18S/26S 引子組之 PCR 反應，增幅 5.8S rRNA-ITS 片段，再以 *Nsi* I、*Sph* I 及 *Xho* I 限制酵素反應，由電泳多型性條帶結果，即可區別櫻絨花與紫背草。PCR-PFLP 技術不僅可用於區別物種，亦可運用於探討族群之遺傳結構和遺傳質的多樣性，例如入侵的法國大米草(*S. anglica*)與歐洲本地種(*S. maritima*)雜交的遺傳證據，結果法國大米草葉綠體 DNA 與其母本葉綠體 DNA 一致性高，顯示此雜交種於形成初期有遺傳障礙(Baumel *et al.* 2001)。由於 PCR-RFLP 方法受限於序列差異處亦為特定限制酶的相關位置，且檢測時間較長，所需成本較高，因此目前較少以 PCR-RFLP 進行物種的鑑定。

### 多引子(multiplex) PCR 檢測

比對櫻絨花與紫背草 5.8S rRNA-ITS 序列之異同，於 ITS1 及 ITS2 分別設計 2 組引子(Table 1)，經由 multiplex PCR 反應後，櫻絨花可增幅 678 bp 核酸片段，紫背草則可增幅 340 bp 核酸片段(Fig. 3)。此兩組引子經一次 multiplex PCR 反應，即可明確區別櫻絨花與紫背草。Multiplex PCR 方法具有快速、簡易及經濟之特點，且專一性引子的利用，可降低偽陽性的機率，但無法運用於 5.8S rRNA-ITS 序列中無鹼基差異的近緣種之鑑定。

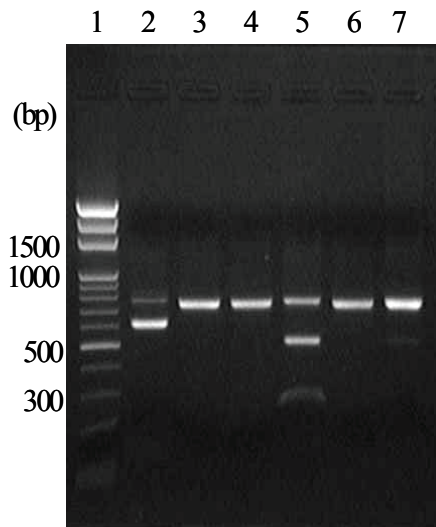


Fig. 2. Polymorphic fragments of the ITS of rDNA from *Emilia fosbergii* and *E. sonchifolia* L. var. *javanica* digested with restriction enzymes. Lane 1 was DNA markers, lane 2, 4, 6 were samples of *Emilia fosbergii*, Lane 3, 5, 7 were samples of *E. sonchifolia* L. var. *javanica*. PCR products were digested with *Xho* I (lane 2, 3), *Sph* I (lane 4, 5) and *Nsi* I (lane 6, 7).

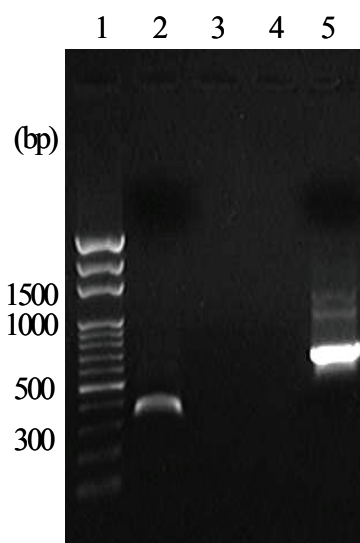


Fig. 3. Specific DNA fragments of 5.8S rDNA-ITS from *Emilia fosbergii* and *E. sonchifolia* L. var. *javanica* were obtained from the multiplex-PCR by primers EF-ITS-F/EF-ITS-R and ESJ-ITS-F/ESJ-ITS-R, respectively. Lane 1 was DNA markers, lane 2 and 4 were *E. sonchifolia* L. var. *javanica*, lane 3 and 5 were *Emilia fosbergii*, PCR products were amplified with ESJ-ITS-F/ESJ-ITS-R (Lane 2, 3) and EF-ITS-F/EF-ITS-R (lane 4, 5).

### ISSR 分子標誌

櫻絨花與紫背草經以 50 個 ISSR 引子之 PCR 反應，結果顯示共有 12 個引子可增幅 1-8 條多型性核酸條帶，其中編號為 842、848、853、856 及 857 的引子增幅之多型性核酸條帶較具明顯差異，尤其 857 引子可於櫻絨花與紫背草分別各增幅 1,000、1,400 bp 及 1,500、2100 bp (Fig. 4)，適用於區別櫻絨花與紫背草。臺灣的小花蔓澤蘭除了可以 5.8S rRNA-ITS 序列與蔓澤蘭及米甘草區別以外，另可利用逢機增幅多型性核酸 (RAPD-PCR) 及 ISSR 分子標誌輔助確認兩小花蔓澤蘭與蔓澤蘭，並可獲得個別植物特有之核酸條帶 (Chen *et al.* 2003)，此外 ISSR 的分析結果亦可得知，蔓澤蘭和小花蔓澤蘭的遺傳變異主要分布在族群間，表示族群間有顯著的分化 (Tzeng and Chou 2003)。ISSR 方法不僅可用於鑑別物種，亦可推測入侵植物的可能來源，美國入侵植物野葛 (*Pueraria lobata* Kudzu) 以 ISSR 分析其基因組核酸，結果顯示該物種可能來自於中國或日本 (Sun *et al.* 2005)。ISSR 方法於 PCR 條件及引子篩選的過程較耗時費工，一旦篩選出最佳引子及反應條件，後續運用於檢測時則具有快速、穩定、核酸用量少及成本低等優點，因此亦常被應用於親緣關係及族群遺傳結構之分析 (Prevosl and Wilkinson 1999)。

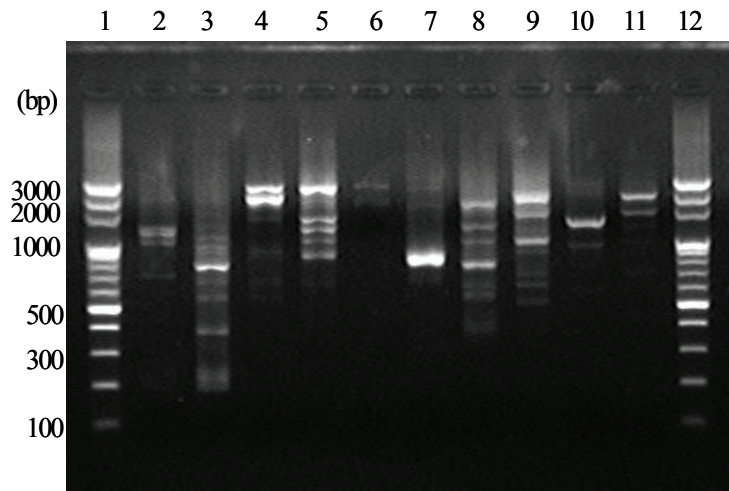


Fig. 4. Polymorphic fragments of *Emilia fosbergii* and *E. sonchifolia* L. var. *javanica* were obtained from the PCR amplification by five ISSR primers. Lane 1 and 12 were DNA markers, lane 2, 4, 6, 8 and 10 were *Emilia fosbergii*, Lane 3, 5, 7, 9 and 11 were *E. sonchifolia* L. var. *javanica*. PCR products were amplified with UBS842 (lane 2, 3), UBS848 (lane 4, 5), UBS853 (lane 6, 7), UBS856 (lane 8, 9) and UBS 857 (lane 10, 11).

## 結論

入侵的外來植物不僅是造成多樣性失衡的重要原因，也可能成為影響農產品貿易及國際利益的重要因素。本研究針對入侵植物櫻絨花，與外觀形態相似的紫背草，建立 3 種檢測的分子標誌。經比對核糖體核酸 5.8S rRNA 兩端的 ITS 序列之差異，此 2 物種 5.8S rRNA-ITS 序列的一致性為 90.7%，可發展為 multiplex PCR 及 PCR-RFLP 的分子檢測方法，前者可直接針對檢體進行一次 PCR 反應，由增幅條帶的長度即可區別櫻絨花與紫背草；後者經 PCR 反應之產物，仍需以限制酶作用才可區別，較費時及增添成本。ISSR 檢測方法亦極簡便，所需的核酸量少，僅以編號 857 引子進行一次 PCR 反應，即可明顯區別櫻絨花與紫背草，此等技術可應用於入侵植物之快速鑑定及檢防疫的有效管理。

## 誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助『95 農科-6.1.3-藥-P1』計畫，謹致謝意。

## 引用文獻

- Aitschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Allice LA, CS Campbell (1999) Phylogeny of *Rulus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Am. J. Bot.* 86: 81-97.
- Arnheim N, H Erlich (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156.
- Ayres DR, DR Strong (2001) Origin and genetic diversity of *Spartina anglica* (Poaceae) using nuclear DNA markers. *Am. J. Bot.* 88: 1863-1867.
- Baldwin BG (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *Am. J. Bot.* 80: 222-238.
- Baumel A, ML Ainouche, JE Lévassieur (2001) Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C. E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Mol. Ecol.* 10: 1689-1701.
- Chen FY, MT Lin, MY Chiang (2003) Study on the morphological and molecular characteristics of indigenous and invasive *Mikania*. p.29-50. In: Proceedings of the conference on the Harmful Effect and Field Management of *Mikania microantha*. Published by Hualien District Agricultural Research and Extension Station and The Weed Science Society of the Republic of China, Taiwan.
- Chiang MY, LM Hsu, CI Yuan, FY Chen, YJ Chiang (2003) The harmful and ecological effects of invasion plants in Taiwan. p.97-109. In: Proceedings of the conference on the Harmful Effect and Field Management of *Mikania microantha*. Published by Hualien District Agricultural Research and Extension Station and The Weed Science Society of the Republic of China, Taiwan.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information. 2008. (<http://www.ncbi.nih.gov/>)
- Meusnier I, M Valero, JL Olsen (2004) Analysis of rDNA ITS1 indels in *Caulerpa taxifolia* (*Chlorophyta*) supports a derived, incipient species status for the invasive strain. *Eur. J. Phycol.* 39: 83-92.
- Nicolson DH (1975) *Emiliafosbergii*, a new species. *Phytologia* 32:33-34.
- Ou CH, YC Liu (1981) Contributions to the Dicotyledonous Plants of Taiwan (VI).

- Quart. J. China Forest. 14(2):21-31.
- Prevost A, MJ Wilkinson (1999) A new systems of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theore. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Sakai AK, Allendorf FW, JS Holt (2001) The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Systemat.* 32: 305-332.
- Schaal BA, GH Learn (1988) Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 75: 1207-1216.
- Sun JH, ZC Li, DK Jewett (2005) Genetic diversity of *Pueraria lobata* (Kudzu) and closely related taxa as revealed by inter-simple sequence as analysis. *Weed Res.* 45: 255-260.
- Tzeng GY, CH Chou (2003) Population genetic variation of *Mikania* species in Taiwan. p. 1-10. In: Proceedings of the conference on the Harmful Effect and Field Management of *Mikania microantha*. Published by Hualien District Agricultural Research and Extension Station and The Weed Science Society of the Republic of China, Taiwan.
- Hsieh CF (2003) Composition, endemism and phytogeographical affinities of the Taiwan flora. Vol.6 p.940-942. In: Flora of Taiwan. TC Huang (ed. in Chief), National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Yuan CI, YC Hsieh, MY Chiang (2005) Identification and population genetic variation of indigenous and alien plants in Taiwan. p.89-101. In: Proceedings of the conference on the Development of Plant Resource Diversity in Taiwan. Published by Hualien District Agricultural Research and Extension Station, Taiwan.