

# 利用 5.8S rRNA-ITS 序列發展 3 種鑑定外來入侵植物 南美獨行菜 (*Lepidium bonariense* L.) 與獨行菜 (*L. virginicum* L.) 之分子標誌

袁秋英<sup>1,2\*</sup>、蘇承鉉<sup>2</sup>、林李昌<sup>1</sup>、蔣慕琰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組

<sup>2</sup>私立朝陽科技大學生化科技研究所

## 摘要

外來植物的入侵及歸化，常造成棲地生物多樣性失衡，也可能影響人畜的健康，或關聯於進出口農產品貿易及國際利益等因素。因此，如何建立正確、快速及靈敏的檢測方法，為杜防有害外來植物入侵的重要植物防檢疫工作。南美獨行菜(*Lepidium bonariense* L.)為十字花科(Brassicaceae)獨行菜屬一年生草本植物，原產地位於南美洲，現已成為臺灣中部非耕地的新歸化雜草。由於南美獨行菜與獨行菜(*L. virginicum* L.)的植株及種子外觀極為相似，易造成形態鑑定上的困擾。分子標誌已普遍運用於植物種類之鑑別，本研究利用 5.8S rRNA-ITS 序列之差異，衍生為 AS-PCR、PCR-RFLP 及核酸晶片技術，建立南美獨行菜與獨行菜之檢測方法。試驗結果顯示南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列長度分別為 620 及 621 bp，獨行菜於 ITS2 多 1 個鹼基，二者於 5.8S rRNA-ITS 序列的一致性(identity)為 98.9%，僅有 6 個鹼基之差異，其中 2 個鹼基位於 ITS1，4 個鹼基位於 ITS2。經由比對南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 核酸之異同，設計 AS-PCR 的特異性引子，PCR 反應可於南美獨行菜與獨行菜分別增幅 365 及 263 bp 核

酸片段；另可利用核酸差異處之 *Bse*Y I 及 *Rsr* II 限制酶反應，將南美獨行菜與獨行菜 18S rRNA-26S rRNA 之 PCR 核酸片段，切割為 555 及 152 bp 或是 551 及 157 bp 之多型性條帶；亦可經由設計專一性探針，延續發展為呈色系統之核酸晶片檢測法。本研究所建立之 AS-PCR 分子標誌具有簡易、快速及經濟等特點，適合少量樣品檢測之用；而核酸晶片法適用於高通量樣品的快速檢測，後續可應用於進口作物種子中夾帶雜草種子之檢驗，或入侵來源比對之用，協助外來入侵植物之風險評估、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：**南美獨行菜、獨行菜、分子鑑定、核糖體核酸、間隔區、聚合酶鏈鎖反應-限制酶片段長度多型性、等位基因特異性之聚合酶鏈鎖反應、核酸晶片。

## Three Molecular Markers Developed from 5.8S rRNA-ITS Sequences Used in Rapid Detection of Invasive Plants *Lepidium bonariense* L. and *L. virginicum* L.

Chiou-Ing Yuan<sup>1,2\*</sup>, Cheng -Hung-Su<sup>2</sup>, Li-Chang Lin<sup>1</sup>, and Mou-Yen Chiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan ROC

<sup>2</sup> Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung 41349, Taiwan ROC

\* 通信作者, yci@tactri.gov.tw

投稿日期：2011 年 3 月 17 日

接受日期：2011 年 6 月 15 日

作物、環境與生物資訊 8:119-128 (2011)

Crop, Environment & Bioinformatics 8:119-128 (2011)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

## ABSTRACT

Invasive alien species impose one of the greatest biological threats on biodiversity, in addition to affecting ecosystems, native species and human health. Thus, developing accurate, fast and sensitive methods to detect harmful exotic plants is important for plant inspection and quarantine works. *Lepidium bonariense* L., an annual Brassicaceae plant native to South America, has naturalized in Taiwan in recent years. Its morphological characteristics are similar to *L. virginicum* L. and can be easily mixed at the early stage of plant growth. DNA-based molecular markers have been widely used to detect the genetic diversity of invaded alien species. In this study, we developed 18S-26S ribosomal DNA (rDNA), based on direct sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region, to differentiate these two weed species by the methods of allelic-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA chips. The 5.8S rRNA-ITS regions of *L. bonariense* and *L. virginicum* were 620 and 621 bp, with the similarity of 98.9%. The specific primers of AS-PCR were designed from the 5.8S rRNA-ITS nucleotide polymorphism via multiplex PCR, to produce unique 365 bp and 263 bp single bands, respectively. Through PCR-RFLP method, the PCR products of 18S-26S rRNA in *L. bonariense* and *L. virginicum* were digested with the restriction of endonucleases *Bse* I and *Rsr* II. Each fragment gave unique electrophoretic profiles. DNA chips assay of amplified DNA fragments from AS-PCR products used specific oligo nucleotide probes. Visible spots could be detected on the nylon slides. Results suggest that AS-PCR markers and DNA chips are effective for management of invasive plant *L. bonariense* and maintaining the balance of biodiversity in agricultural ecosystem.

**縮寫字：** rRNA, ribosomal RNA; ITS, internal transcribed spacer; PCR-RFLP, Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; AS-PCR, Allele-specific polymerase chain reaction.

**Key words:** *Lepidium bonariense* L., *L. virginicum* L., Molecular marker, Ribosomal DNA, Internal transcribed spacer (ITS), Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), DNA chip.

## 前言

外來入侵植物是由於人為或自然原因，從原生地進入另一個環境，並克服地理及生態差異性的障礙，而可正常生長、繁衍的植物。外來植物的入侵常破壞本土植物原有生態平衡，進而造成農作物生產的嚴重損失，亦可能成為人畜健康、環境安全的疑慮。各國針對危害嚴重的入侵植物，往往需投入相當龐大的人力、時程及經費實施防除作業。生物入侵及生態平衡是全球性的環境問題，已引起聯合國的高度關注，例如布袋蓮原產於南美洲，現廣泛分佈于北美、亞洲、大洋洲和非洲的 60 多個國家，被列為世界上危害最為嚴重的十大惡性雜草之一(Holms *et al.* 1977)。

目前臺灣外來植物已超過 2,600 種，而歸化(或野化)植物約有 300 種(Chiang *et al.* 2003)，其中成為危害嚴重的入侵植物，如布袋蓮(*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)、小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha* Kunth)、大花咸豐草(*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schultz-Bip)、平原菟絲子(*Cuscuta ampestris* Yunck.) 以及銀膠菊(*Parthenium hysterophorus* L.)等，皆造成臺灣植物相的明顯變異。農政單位亦花費相當龐大經費、人力及時間配合防除工作，全國各縣市及林管處於 90-96 年間防治小花蔓澤蘭約 3 萬 2 千餘公頃，花費高達約 6.5 億元(Chen and Xiao 2003)，實為不容忽視的生態問題。

聯合國於 1992 年於巴西里約熱內盧舉行環境與開發會議，由 150 餘締約國共同簽署「生物多樣性公約(Convention on Biological Diversity; CBD)」，主要目標在於促使世界各國保護生物多樣性，達到資源的

永續利用，並且公平合理地分享由自然資源所衍生的利益。由於臺灣非聯合國會員，無法直接參與公約組織的運作與資訊交流，農委會乃於 2001 年擬定「生物多樣性推動方案」，2002 年 12 月行政院永續會再通過「生物多樣性行動計畫」，作為現行臺灣生物多樣性政策的施政依據，推動的業務工作包括外來種動植物防治、保育政策、生物安全管理以及生物多樣性研究與永續利用等(Fang 2006)。

根據「臺灣地區歸化植物之侵略性評估系統建立」的研究資料顯示(Chang *et al.* 2008)，新歸化的 B 群植物中，以牙買加長穗木(*Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl.) 生物侵略潛能最高，其次即為南美獨行菜。南美獨行菜(*Lepidium bonariense* L.) 為十字花科(Brassicaceae) 獨行菜屬一年生草本植物，原產於南美洲(Hitchcock 1945)。許再文等首度於彰化縣發現類似獨行菜(*L. virginicum* L.) 的十字花科植物，經由比對中央研究院植物所標本館及特有生物研究保育中心植物標本館的標本形態特徵，鑑定此植物為獨行菜屬之另一歸化植物南美獨行菜(Hsu *et al.* 2005)。南美獨行菜也曾分別歸化於澳洲(Hewson 1981)及日本(Osada 1992, Shimizu 2003)。目前南美獨行菜主要分布於臺灣中部海邊的空曠或荒廢地、海邊沙質草地、硬土草地、水泥裂縫、魚塭埂邊等處，太魯閣國家公園中也出現過南美獨行菜的蹤跡(Sun 2008)。南美獨行菜與獨行菜外觀主要的差異位於葉形，南美獨行菜的莖生葉為 1-3 回羽狀複葉，而獨行菜的基生葉為羽狀裂葉或 1 回羽狀複葉，莖生葉為單葉(Hsu *et al.* 2005)。二者種子皆為黃色，其外觀形態及色澤並無顯著差異，若進口作物中夾帶南美獨行菜種子，未經萌芽長出葉片之前不易區別。

分子標誌(molecular marker)為針對生物核酸序列特性進行分生差異的辨識技術，已普遍應用於分析物種之遺傳關係、品種鑑定、演化系統及特定基因標誌等研究(Culley and Wolfe 2001, Hess *et al.* 2000, Qian *et al.*

2001, Sun *et al.* 2005, Yuan *et al.* 2005)。由於分子標誌檢驗技術具有操作簡易、快速、正確、檢體用量少以及不易受外在環境影響等特點，近年來此技術已衍生於外來植物的鑑定、入侵來源追蹤、入侵機制及危害潛力分析等應用(Baumel *et al.* 2001, Duan *et al.* 2005, Hollingsworth *et al.* 1998, Li *et al.* 2006)。由於目前全球尚無以分子標誌鑑定南美獨行菜之報導，本研究已針對南美獨行菜與獨行菜(已歸化臺灣多年之唯一同屬植物)建立 ISSR 及 RAPD 分子標誌之檢驗技術(Su *et al.* 2010)，進而探討南美獨行菜與獨行菜之 5.8S rRNA-ITS 序列，並發展為 AS-PCR、PCR-RFLP 及核酸晶片之檢測技術。同時評估此等分子標誌之適用性及優缺點，期望未來可利用於協助進口作物種子中夾帶雜草種子之檢驗與管理。

## 材料與方法

### 一、南美獨行菜與獨行菜植材收集

2009 年 4-10 月間於臺中市霧峰區、彰化縣竹塘鄉等 6 個採集點，收集南美獨行菜及獨行菜各 12 株，播種及栽種於 15 吋盆鉢，置於溫室中生長，待植株發育至 8-10 葉齡，分別稱 0.1 g 新生葉片萃取基因組 DNA。

### 二、藥品及儀器

基因組 DNA 萃取試劑(DNeasy Plant Maxi kit)購自 Qiagen 公司，plasmid DNA 純化試劑(miniprep system kit)、DNA 純化回收套組(gel extraction kit)及 DNA marker(1 kb plus DNA Ladder) 購自 GenMark 公司，核酸引子由臺灣明欣公司合成，DNA 載體(pGEM-T Easy Vector kit) 購自 Promega 公司，PCR 試劑(Fast-Run Taq Master Mix kit) 及 pfu DNA polymerase 購自 Protech 公司。BseYI 及 Rsr II 限制酶購自 Biolab 公司。雜合反應試劑(Dr.Hyb kit)及核酸晶片購自晶宇生物科技有限公司。PCR 熱循環器(DNA Engin Theral Cyler, MJ

Research PTC-200)為美國 GMI 公司產品。DNA 定序儀 (ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer)則為美國 Perkin-Elmer 公司產品。

### 三、南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列之增幅與解序

各別稱取 0.1 g 南美獨行菜及獨行菜之幼葉，以基因組 DNA 萃取試劑抽取 DNA。根據 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>) 菊科植物於 18S rRNA 與 26S rRNA 序列，設計 ITS-F/ITS-R 引子 (Table 1)，進行 PCR 反應。反應添加物為 50 ng 模板 DNA、1  $\mu$ L ITS-F 引子、1  $\mu$ L ITS-R 引子、10  $\mu$ L 5X Fast-Run Taq master mix PCR buffer 及 1  $\mu$ L Pfu DNA polymerase，添加無菌去離子水使總體積為 50  $\mu$ L。PCR 反應條件為起始變性溫度 94°C 5 min，變性溫度 94°C 30 S，煉合溫度 50°C 30 s，延展溫度 72°C 30 min，循環 35 週期，最後延展溫度 72°C 7 min。取 10  $\mu$ 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<sup>-1</sup>) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 V 電壓進行電泳分析。

PCR 增幅之核酸片段經溶洗後，進行接合反應 (ligation)，取 3  $\mu$ L PCR 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector 試劑 (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 h。將單一菌落之大腸桿菌 TG1 strain，加 3 mL LB 培養液，於 37°C 振盪培養 14 h，取 200  $\mu$ L 菌液加入接合反應之 10  $\mu$ L DNA，放置於冰上 30 min，再加入 200  $\mu$ L LB 培養液，於 37°C 振盪培養 1 h，將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin)，培養 14-16 h，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 h，抽取 plasmid DNA，取 20  $\mu$ L plasmid DNA 加 1  $\mu$ L EcoRI 限制酵素，於 37°C 反應 2 h，取出 6  $\mu$ L 加入樣品 0.1 倍體積之 EtBr 染劑，注入於含 1.2% agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 V 電壓進行電泳分析。確證轉殖之 plasmid DNA 並進行解序，利用 NCBI GenBank 的 Blast 功能比對基因庫之核酸序列。

### 四、檢測南美獨行菜及獨行菜之 AS-PCR 標誌

根據南美獨行菜及獨行菜於 5.8S rRNA-ITS 序列之差異處，分別設計專一性引子 LB-ITS-F/LB-ITS-R 及 LV-ITS-F/LV-ITS-R (Table 1)，以 10  $\mu$ L 5X Fast-Run Taq Master mix PCR buffer、2  $\mu$ L LB-ITS-F/LB-ITS-R (或 LV-ITS-F/LV-ITS-R)、1  $\mu$ L 南

Table 1. DNA primers and probes used in identification of *Lepidium bonariense* L. and *L. virginicum* L. in this study.

Primer name	DNA sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Gene	Amplified DNA (bps)
ITS-F	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG	18S rRNA	707 (LB)
ITS-R	CTTCTCCTCCGCTTATGATATGCT	26S rRNA	708 (LV)
LB-ITS-F	TTCCGAACGGGAGATCTCTCCCGA	ITS1	365
LB-ITS-R	TTCCGTCCCGCACTCGCATAATTC	ITS2	
LV-ITS-F	GTTCGCCTTCCCGGAGACGGTGCA	ITS1	263
LV-ITS-R	GCTTCCGTCCCGCACTCGCATAATTTT	ITS2	
LB-probe	(T) <sub>21</sub> CCCTCACGAATTATGCG		
LV-probe	(T) <sub>21</sub> CCCTCACAAAATTATGCG		

LB: *Lepidium bonariense*

LV: *L. virginicum*

美獨行菜(或獨行菜) 基因組 DNA(約 30 ng), 37  $\mu$ L 無菌去離子水, 總體積為 50  $\mu$ L 進行 PCR 反應。南美獨行菜增幅條件為起始變性溫度 94°C 5 min, 變性溫度 94°C 30 S, 煉合溫度 53°C 5 s (南美獨行菜)、68°C 5 s (獨行菜), 延展溫度 72°C 30 min, 循環 22 週期, 最後延展溫度 72°C 7 min。以 1.2% agarose gel 進行電泳分析, 步驟同方法三。

### 五、檢測南美獨行菜及獨行菜之 PCR-RFLP 標誌

利用南美獨行菜及獨行菜於 ITS 序列有 *Bse*Y I 及 *Rsr* II 限制酶之差異(Fig. 2, 星號標示處), 進行 PCR-RFLP 之檢測。分別取 5  $\mu$ L 南美獨行菜及獨行菜 18S rRNA-26S rRNA 之 PCR 產物, 添加 1  $\mu$ L 限制酶及 2  $\mu$ L 緩衝液, 加無菌去離子水使總體積為 20  $\mu$ L, 於 37°C 反應 90 min。以 2.0% agarose gel 進行電泳分析, 步驟同方法三。

### 六、檢測南美獨行菜及獨行菜之核酸晶片技術

本試驗建立之核酸晶片檢測法為晶宇生技公司之技術平台, PCR 使用之引子分別以 biotin 標定南美獨行菜及獨行菜專一性引子 LB-ITS-F/LB-ITS-R 及 LV-ITS-F/LV-ITS-R (序列如 Table 1、Fig. 2, 字下劃線處)。南美獨行菜及獨行菜核酸探針分別為 LB-probe 及 LV-probe(序列如 Table 1、Fig. 2, 框線處)。探針矩陣之配製如 Fig. 5A 所示: 編號 1 為南美獨行菜, 編號 2 為獨行菜, M 為晶片雜合反應之正對照(4 重覆)。

南美獨行菜及獨行菜經 AS-PCR 反應後進行晶片雜合反應, AS-PCR 產物於 95°C 加熱 10 min 立即冰浴 3 min, 添加 200  $\mu$ L Dr.Hyb buffer 於晶片盒中, 再分別加入 10  $\mu$ L AS-PCR 產物, 於 60°C 進行雜合反應 1 h, 以 200  $\mu$ L Wash buffer 洗滌 3 次, 加入 200  $\mu$ L Blocking reagent 與 0.2  $\mu$ L Strep-AP, 於室溫反應 30 min, 再以 200  $\mu$ L Wash buffer 洗滌晶片, 添加 200  $\mu$ L Detection buffer 並以 4  $\mu$ L

NBT/BCIP 呈色, 室溫下避光靜置 10 min, 即判讀結果。

## 結果

### 一、南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 之增幅及序列比較

經由 PCR 反應增幅南美獨行菜及獨行菜 18S rRNA 至 26S rRNA 之間 DNA 片段, PCR 產物經電泳分析, 結果顯示兩者皆可增幅長度分別為 707 及 708 bp 之核酸片段(Fig. 1)。將此 PCR 產物經轉殖於大腸桿菌、抽取質體 DNA 及定序及與 NCBI GenBank 之基因序列比對, 結果本研究之南美獨行菜與 GenBank 中南美獨行菜 ITS1(accseeion No. AJ582458)及 ITS2 (accseeion No. AJ582506) 的序列完全相同。此外, 本研究之獨行菜與 GenBank 中獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列 (accseeion No. AF128109)亦完全相同, 證明於南美獨行菜及獨行菜選殖之核酸皆為正確, 並登錄於 NCBI GenBank, 南美獨行菜與獨行菜 5.8S rRNA-ITS 接受碼分別為 HM134831 及 HM134830。

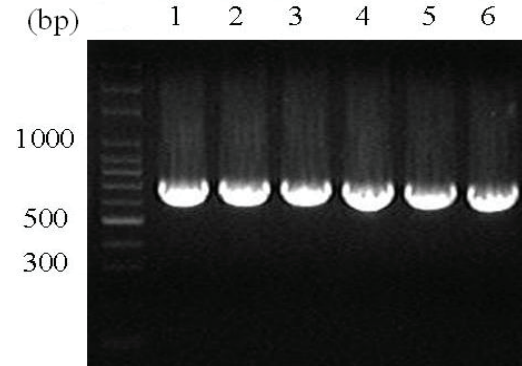


Fig. 1. The 5.8S rRNA-ITS regions of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum* were obtained by PCR amplification using primers ITS-F and ITS-R. Lanes 1 to 3 were samples of *L. bonariense*, and lanes 4 to 6 were samples of *L. virginicum*. 1 to 3 were samples of *L. bonariense*, and lanes 4 to 6 were samples of *L. virginicum*.

南美獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列全長為 620 bp，其 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 分別為 164、267 及 189 bp，而獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列較南美獨行菜者長(621 bp)，主要於 ITS2 多 1 個鹼基，其 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 分別為 164、267 及 190 bp (Fig. 2)，南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列的一致性(identity) 為 98.9%，僅有 6 個鹼基之差異，其中 2 個鹼基位於 ITS1，4 個鹼基位於 ITS2 (Fig. 2)。

## 二、檢測南美獨行菜及獨行菜之 AS-PCR 標誌

利用南美獨行菜及獨行菜於 5.8S

rRNA-ITS 序列中有 6 個鹼基之差異，分別設計南美獨行菜及獨行菜的專一性引子：LB-ITS-F/LB-ITS-R 及 LV-ITS-F/LV-ITS-R，其序列如 Table 1 及 Fig. 2 (字下劃線處) 所示。經由 PCR 反應，結果顯示南美獨行菜可增幅 365 bp 之專一性片段，而獨行菜可增幅 263 bp 專一性片段 (Fig. 3)，且經由重複測試無偽陽性或交叉干擾現象發生。

## 三、檢測南美獨行菜及獨行菜之 PCR-RFLP 標誌

經由分析南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列之差異，二者序列中分別有不

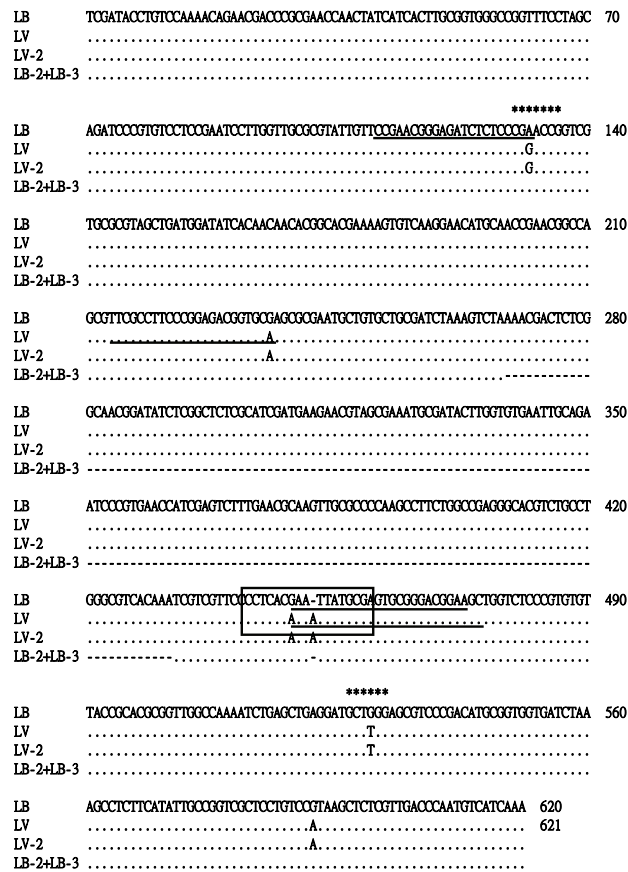


Fig. 2. Sequence comparison of 5.8S rRNA-ITS from *Lepidium bonariense* and *L. virginicum*. LB (accession No. HM134831) and LV (accession No. HM134830) indicate the 5.8S rRNA-ITS of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum* in this study, respectively. LV-2, LB-2 and LB-3 indicate the 5.8S rRNA-ITS partial sequences of *Lepidium bonariense* and/or *L. virginicum* from NCBI's GenBank (accession Nos.: AF128109, AJ582458 and AJ582506).

同的限制酶切位置(Fig. 2, 星號標示處), 南美獨行菜有 *BseY I* 限制酶反應之 GCTGG/G 序列, 而獨行菜有 *Rsr II* 限制酶反應之 CG/GACCG 序列。經 PCR 反應分別增幅 18S rRNA-26S rRNA 核酸, 再以 *BseY I* 及 *Rsr II* 進行限制酶反應及電泳分析, 結果顯示南美獨行菜 PCR 產物經 *BseY I* 酵素反應, 切割為 555 bp 與 152 bp, 而獨行菜者未被切割仍為 708 bp (Fig. 4, lanes 1 and 2); 反之, 獨行菜的 PCR 產物可被 *Rsr II* 酵素反應, 切割為 551 bp 與 157 bp, 南美獨行菜者仍為 707 bp (Fig. 4, lanes 3 and 4)。

#### 四、檢測南美獨行菜及獨行菜之核酸晶片技術

利用 AS-PCR 已增幅之南美獨行菜及與獨行菜 5.8S rRNA-ITS PCR 產物, 進一步發展為核酸晶片檢測, 於南美獨行菜及與獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列的主要差異處, 各別設計 1 核酸探針 (Fig. 2, 框線標示處), 再將 AS-PCR 產物, 與晶片探針進行 60°C 雜合反應及呈色。結果於晶片上編號 1 及編號 2 之黑褐色雜合點 (Fig. 5), 可分別正確呈現南美獨行菜與獨行菜的相關位置, 外圍 4 個雜合點為晶片之正對照, 且經由重複測試無偽陽性及交叉干擾現象。

#### 討論

近年由於農產品於國際間互動頻繁, 臺灣的外來植物亦日漸增多, 若侵佔潛力強的植物野化後大量繁衍, 極易造成對原有物種及生態體系的長遠影響。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)。因此欲降低外來植物對農業生產及環境之衝擊, 須建立有效檢防疫控管機制, 將高危害潛力的外來植物屏拒於境外, 或於植物侵入初期即進行防治, 並配合高效率之監測系統以防範大規模之擴散。

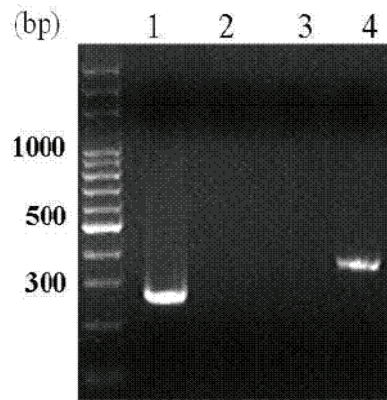


Fig. 3. AS-PCR markers by using specific DNA fragments of 5.8S rRNA-ITS to identify *Lepidium bonariense* and *L. virginicum*. Lanes 1 and 3 were *L. virginicum*, lanes 2 and 4 were *L. bonariense*, and PCR products were amplified with LV-ITS-F/LV-ITS-R (Lane 1 and 2) and LB-ITS-F/LB-ITS-R (lanes 3 and 4).

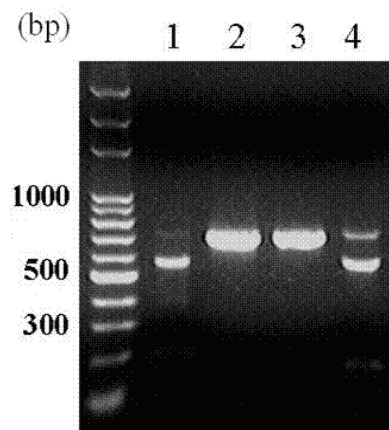
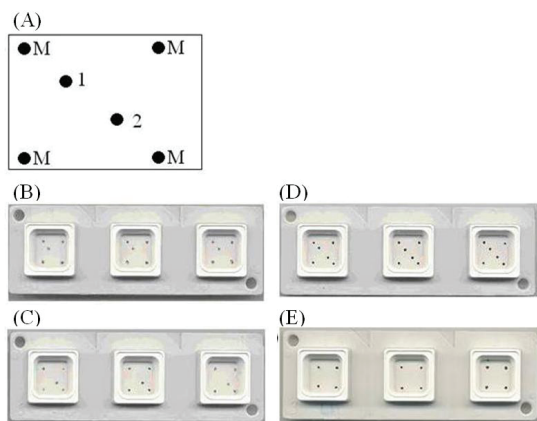


Fig. 4. PCR-RFLP analysis using restriction enzymes *BseY I* and *Rsr II* on partial 18S rRNA-26S rRNA regions of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum*. Lanes 1 and 3 were samples of *L. bonariense*, and lanes 2 and 4 were samples of *Lepidium virginicum*. PCR products were digested with *BseY I* (lanes 1 and 2) and *Rsr II* (lanes 3 and 4).



**Fig. 5.** Detection of AS-PCR products of 5.8S rRNA-ITS specific regions in *Lepidium bonariense* and *L. virginicum* on DNA chips. Capture probes were printed in the order shown in (A) parts: M, biotin-dA20 (positive control marker); spot 1, *L. bonariense*; spot 2, *L. virginicum*. Detected samples shown in (B) *L. bonariense*, (C) *L. virginicum*, (D) *L. bonariense* and *L. virginicum*, and (E) positive control.

目前進口之農產品種子中是否夾帶有雜草種子，經由過篩、比重，以及肉眼觀察種子之顏色、大小、外形與重量等特徵，可區別作物及雜草種子(Hsu and Chiang 2010)，然而由於多種同科屬親緣相近的植物，其植體或種子外觀形態不易區別，或需待開花期由花器結構辨識，無法快速而正確的鑑別物種。因此利用分生技術建構外來入侵植物的分子標誌，於有害生物防檢疫工作上的運用具有重要意義。

本研究針對具強侵佔潛力的南美獨行菜與已歸化之獨行菜，進行 5.8S rRNA-ITS 序列之選殖、比較，進而利用此序列差異處建立 PCR-RFLP、AS-PCR 及核酸晶片檢測方法。此外，亦已完成基因組核酸之 ISSR 及 RAPD 分子標誌(Su *et al.* 2010)，即針對南美獨行菜分別建立特定基因(5.8S rRNA-ITS)及基因組核酸(微衛星序列)之多重檢測方法，期望具有互補優缺點及協同驗證之效果。

一般而言，被子植物的 5.8S rRNA-ITS 長度介於 560-700 bp 之間，此核酸長度上常具有相當的保守性，而於 ITS 序列則呈現高度變異性，常被運用於種間或種內分類階層之分子鑑定及遺傳特性研究。本試驗結果南美獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列全長為 620 bp，與 GenBank 中由德國 Osnabrueck 大學於 2003 年登錄的南美獨行菜 ITS1(accseeion No. AJ582458)及 ITS2 (accseeion No. AJ582506) 序列完全相同 (Fig. 2)，顯示不同地區的南美獨行菜其 ITS 序列的變異性相當低；相同地，本研究之獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列全長為 621 bp，與 GenBank 中由我國中央研究院植物所於 2000 年登錄的獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列也完全相同(Fig. 2)，因此推測利用 5.8S rRNA-ITS 序列之異同，鑑別南美獨行菜及獨行菜，應具有良好可信度及再現性。

根據 Baldwin (1993)等學者之研究顯示：一般被子植物 ITS1 的長度介於 187-298 bp 之間，ITS2 的長度介於 187-252 bp 之間。ITS1 與 ITS2 的相對長度於不同科屬間差異較大，如菊科 (Compositae) 及十字花科 (Cruciferae)植物的 ITS1 比 ITS2 長；而葫蘆科 (Cucurbitaceae) 及玄參科 (Scrophularia) 植物的 ITS1 比 ITS2 短。本試驗的南美獨行菜及獨行菜為十字花科植物，2 者 ITS1 的長度皆為 267 bp，ITS2 的長度分別為 189 及 190 bp (Fig. 2)，ITS1 亦長於 ITS2。外來入侵菊科植物貓腥草 (*Praxelis clematidea* Griseb.) 及櫻絨花 (*Emilia fosbergii* Nicoison) 分子鑑定的研究顯示 ITS1 皆長於 ITS2 (Yuan *et al.* 2008, 2009)。近年於臺灣危害嚴重的小花蔓澤蘭，也可經由 5.8S rRNA-ITS 序列區分蔓澤蘭及小花蔓澤蘭，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)。此外利用 5.8S rRNA-ITS 序列的分析，亦可追蹤探討外來植物之原生地，如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」。

由於南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列的一致性相當高度(98.9%)，僅有 6 個鹼基之差異，2 個鹼基位於 ITS1，4 個鹼基位於 ITS2，分別於南美獨行菜及獨行菜 ITS1 差異處設計專一性引子，經 AS-PCR 反應後，可分別增幅 365 及 263 bp 核酸片段 (Fig. 3)。此方法具有快速、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其他近緣種之鑑定。此外，外來植物貓腥草與外形相似之紫花藿香薊 (*Ageratum houstonianum* Mill.) 及藿香薊 (*A. conyzoides* L.) 可分別增幅 353、485 及 485 bp 核酸片段；櫻絨花與紫背草 (*E. sonchifolia* L. var. *javanica*) 可增幅 678 及 340 bp 核酸片段鑑別 (Yuan *et al.* 2008, 2009)。

於南美獨行菜 5.8S rRNA-ITS 序列中有 *Bse*Y I 限制酶反應的 GCTGG/G 序列，而獨行菜的 5.8S rRNA-ITS 序列中有 *Rsr* II 限制酶反應的 CG/GWCCG (W=A or T) 序列。因此經由 PCR 反應分別增幅南美獨行菜及獨行菜 5.8S rRNA-ITS 核酸，將 PCR 產物以 *Bse*Y I 及 *Rsr* II 進行限制酶切反應，再由電泳多型性條帶判讀，即可區別南美獨行菜與獨行菜。由於 PCR-RFLP 方法受限於序列差異處必須為特定限制酶的相關位置，並需限制酶的費用，且檢測時間較長，因此僅以 PCR-RFLP 為物種鑑定之佐證。PCR-PFLP 技術另可運用於探討外來入侵植物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 (*Spartina 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)。

外來入侵植物不僅是造成生態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南美獨行菜，與外觀形態相似的同屬植物-獨行菜，

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 98.9%，利用其中 5 個鹼基之差異，發展為 PCR-RFLP、AS-PCR 及核酸晶片的檢測方法，其中 PCR-RFLP 經 PCR 增幅之產物，需以限制酶作用才可區別，較費時及增添成本；AS-PCR 檢測法直接針對檢體進行 1 次 PCR 反應，由增幅條帶的長度即可區別南美獨行菜及獨行菜；核酸晶片的呈色反應，具有靈敏及快速特點，適於大量檢體的篩檢之用。已完成之 ISSR 及 RAPD 檢測方法亦極簡便 (Su *et al.* 2010)，所需的核酸量少，適用之引子分別為 ISSR UBC#820、823、846 及 881 等 4 個引子，以及 RAPD #4、17 及 30 等 3 個引子，皆只需 1 次 PCR 反應，即可明顯區別南美獨行菜及獨行菜，此等技術皆可應用於入侵植物之快速鑑定及檢防疫之有效管理。

## 引用文獻

- Baldwin BG (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. **Amer. J. Bot.** 80:222-238.
- Baumel A, ML Ainouche, JE Levasseur (2001) Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C. E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany. **Mol. Eco.** 10: 1689-1701.
- Chang CY, HYu Tzeng, KC Lu, YH Tseng (2008) Invasiveness assessment system of naturalized plants in Taiwan. **Quart. J. For. Res.** 30:29-40.
- Chiang MY, LM Hsu, CI Yuan, FJ Chen, YC Chiang (2003) Naturalized and ecology of alien plants in Taiwan. (in Chinese) p.47-65. *In: Plant Biodiversity and Sustainable Development and Utilization of Plant Resources*. Tunghai University Press. Taichung. Taiwan ROC.
- Culley TM, AD Wolfe (2001) Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. **Heredity** 86: 545-556.
- Duan JH, ZC Li, DK Jewett (2005) Genetic diversity of *Pueraria lobata* (Kudzu) and closely related taxa as revealed by inter-simple

- sequence repeat analysis. **Weed Res.** 45: 255-260.
- Fang GY (2006) The Eighth Conference of Parties to the Convention on Biological Diversity: the Key Issues and Countermeasures. (in Chinese) **Agric. Pol. Agric. Situ.** 169:52-55.
- GenBank of National Center for Biotechnology Information. (2010) <http://www.ncbi.nih.gov/> (visit on Feb. 10, 2010)
- Hess J, JW Kadereit, P Vargas (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed space I (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). **Mol. Ecol.** 9: 857-868.
- Hewson HJ (1981) The genus *Lepidium* L. (Brassicaceae) in Australia. **Brunonia** 4: 217-308.
- Hitchcock CL (1945) The South American species of *Lepidium*. **Lilloa** 11: 75-134.
- Hollingsworth ML, PM Hollingsworth, GI Jenkins (1998) The use of molecular to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). **Mol. Ecol.** 7: 1681-1691.
- Holms LG, DL Plucknett, JV Pancho (1977) *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. 18<sup>th</sup> Ed. Honolulu: Hawaii University Press, Honolulu, Hawaii, USA.
- Hsu LM, MY Chiang (2010) Plant quarantine and identification of weeds in agricultural import products. (in Chinese) **Agric. Pol. Agric. Situ.** 216:89-93.
- Hsu TW, TY Chiang, CI Peng (2005) *Lepidium bonariense* L. (Brassicaceae) newly naturalized to Taiwan. **Endemic Species Res.** 7:89-94.
- Li WG, BR Wang, JB Wang (2006) Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. **Aquatic Bot.** 84: 176-180.
- Meusnier I, M Valero, LJ Olsen, W Stam (2004) Analysis of rDNA ITS1 indels in *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) supports a derived, incipient species status for the invasive strain. **Eur. Phycol.** 39: 83-92.
- Osada T (1992) *Colored Illustrations of Naturalized Plants of Japan*. Hoikusha, Osaka, Japan.
- Qian W, S Ge, DY Hong (2001) Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theor. App. Genet.** 102: 440-449.
- Ratnaparkhe MB, DK Santra, A Tullu (1998) Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. **Theor. App. Genet.** 96: 348-353.
- Sakai AK, FW Allendorf, JS Holf (2001) The population biology of invasive species. **Ann. Rev. Ecol. Evol. Systemat.** 32:305-332.
- Shimizu T (2003) *Naturalized plants of Japan*. p.1-337. Heibonsha Ltd., Publishers, Tokyo, Japan.
- Su CH, LC Lin, MY Chiang, CI Yuan (2010) Use of ISSR and RAPD markers in identification of invasive plants-*Lepidium bonariense* L. and *L. virginicum* L. (in Chinese with English abstract) **Weed Sci. Bull.** 31:1-12.
- 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.
- Sun LZ (2008) Invasive plant research in Taroko national park. (in Chinese) **Conser. Quar.** 61:24-29.
- 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. ROC.
- Yuan CI, LC Lin, LH Cheng, MY Chiang (2009) Application of molecular markers in identification of invasive plant *Praxelis (Praxelis clematidea)*. (in Chinese with English abstract) **Weed Sci. Bull.** 30:129-141.
- Yuan CI, LC Lin, MY Chiang (2008) Identification of *florida tasselflower (Emilia fosbergii* Nicoison) and sowthistle *tasselflower (E. sonchifolia* L. var. *javanica*) through molecular markers. (in Chinese with English abstract) **Weed Sci. Bull.** 29: 109-120.
- Yuan CI, YC Hsieh, MY Chiang (2005) Identification and population genetic variation of indigenous and alien plants in Taiwan. (in Chinese) p.89-101. *In*: 2005 Proceedings of the Conference on the Development of Plant Resource Diversity in Taiwan. Published by Hualien District Agricultural Research and Extension Station, Taiwan ROC.