

銀膠菊 (*Parthenium hysterophorus* L.) 5.8S rRNA-ITS 基因序列之分析

袁秋英*、賴鍵賢、蔣慕琰、謝玉貞

行政院農業委員會農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組。台中。台灣

摘要

外來植物的入侵及歸化，常造成棲地生物多樣性之失衡，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。銀膠菊 (*Parthenium hysterophorus* L.) 為菊科 1 年生草本有毒植物，原生於美洲熱帶及亞熱帶地區，現已成為臺灣中、南部地區及金門縣的重要入侵雜草。分子標誌已普遍運用於植物種類之鑑別，本研究針對不同地區銀膠菊的 5.8S rRNA-ITS 核酸序列，進行其遺傳特性分析。所有銀膠菊樣品的 5.8S rRNA-ITS 長度為 649 bp (僅屏東縣潮州鄉樣品於 IST1 序列有 6 個鹼基缺失)，其中 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 分別為 164、261 及 224 bp，各樣品間相同度(identity)大於 99.4%，序列中的保守位點有 633 bp (97.5%)，變異位點共有 16 個(2.5%)，其中 4 個為信息位點(0.62%)。除屏東縣潮州鄉樣品(PT-CJ3)缺失 6 個鹼基(第 215-221 鹼基)，造成其二級結構形態明顯改變外，所有銀膠菊 ITS2 部份二級結構皆相同。經系統發育分析，可將銀膠菊區別為 2 群，一群為以屏東縣及彰化縣為主的銀膠菊，另一群為金門縣的銀膠菊。可能由於銀膠菊為 4 倍體植物，銀膠菊於 5.8S rRNA-ITS 序列鹼基缺失或置換之多樣性、二級結構之變異，以及臺灣中南部與離島金門縣樣品分群之差異，顯示銀膠菊遺傳質仍處於致同進化(concerted evolution)不完全之狀態。

關鍵詞：銀膠菊、外來入侵植物、5.8S 核糖體核酸、轉錄區間。

5.8S rRNA-ITS sequences analysis of *Parthenium hysterophorus* L. from different habitats

Chiou-Ing Yuan*, Chen-Shen Lai, Mou-Yen Chiang and Yu-Chen Hsieh

Division of Plant Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances
Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan

* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

Abstract

Invasion by alien species represents one of the greatest biological threats to biodiversity, second only to habitat destruction. In addition to affecting ecosystems and contributing to the extinction of native species, invasive alien species also cause major socio-economic damage and may affect human and animal health. *Parthenium hysterophorus* L., an annual compositae plant native to tropical and subtropical America, has become a naturalized plant in Kinmen county, middle and southern areas of Taiwan in recent decades. DNA-based molecular markers have been used to detect the genetic diversity of invaded alien species. In this study, we used 5.8S rRNA-ITS sequence markers to investigate the genetic characterization of 27 invading populations of *P. hysterophorus* and to examine genetic relationship of Kinmen, Changhua and Pingtung populations. The ITS1-5.8S rRNA-ITS2 regions of *P. hysterophorus* were 649 bp, and showed above 99.4% identity between 26 samples. The proportion of variable sites is 2.5% and the proportion of parsimony information site is 0.62%. This 5.8S rRNA-ITS sequence diversity patterns, secondary structure and phylogenetic analysis suggested that Kinmen population is clearly separated from most other middle and southern populations. We conclude the diversity 5.8S rRNA-ITS genotype among 26 samples, indicated that concerted evolution may still occur in this tetraploid of *P. hysterophorus* populations.

Key words: *Parthenium hysterophorus* L., invasion plant, 5.8S rRNA, Internal transcribed spacer (ITS).

前言

目前台灣有紀錄之外來植物已超過 2,600 種。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(蔣等，2003)。外來入侵植物則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。根據農藥所於農地及休耕田之調查顯示，菊科(Asteraceae)植物除了小花蔓澤蘭及大花咸豐草以外，南部出現的銀膠菊(*Parthenium hysterophorus* L.)將成為另一具高度侵佔性及危害力的外來入侵植物(蔣等，2003)。

銀膠菊為菊科銀膠菊屬一年生草本植物，原產中南美洲，目前已入侵至北美、南美、加勒比、非洲、亞洲及澳大利亞等地區(朱等，2005; Hsu and Chiang, 2004)。由於銀膠菊種子量多、植株生長快速、適應性強、於管理粗放地易成為優勢雜草，印度農田的銀膠菊干擾作物之生長，造成作物減產約40% (Ramaswami, 1997)。且銀膠菊植株體表的微細狀體和花粉，易引起人畜過敏性鼻炎、皮膚炎及肝臟等遺傳性病變(Mcfadyen, 1995)。澳大利亞原始牧場遭受銀膠菊之危害，導致畜牧業年度經濟的損失超過1,600萬澳元(Chippenda and Panetta, 1994)，美澳各國每年皆需花費數千萬元經費進行銀膠菊的防除工作(Tamado and Milberg, 2000)，因此銀膠菊為國際間大量關注的入侵性毒草。

銀膠菊為一年生草本植物，莖直立，株高30-150 cm，具深淺間雜條紋，被短柔毛，上部多分枝。葉互生，形態由基部往上逐漸變小，一回羽狀全裂至二回羽裂。抽苔後葉子由下往上先羽狀淺裂，後轉為鈍鋸齒狀。葉被柔毛或腺毛。花序頂生或腋生；頭花直徑3-5 mm，舌狀花白色，長約1.3 mm，瘦果黑色，狹倒卵形。一般而言，銀膠菊的花果期在4-10月之間，但亦有少部份植株周年可開花，每株銀膠菊能產生約7,500-10,000粒種子，種子在土壤表層能保持至少6年的活性，成熟種子約有3個月的休眠期或可直接萌芽(曾等，2008; Holm *et al.*, 1997)，種子發芽的適宜溫度介於12-28 °C之間(徐及蔣，2004)，顯示其繁殖潛力及環境適應性皆強，且銀膠菊植株冠幅可達0.16-0.36 m²，易競爭生長空間而抑制其他植物之生長(曾等，2008)，此等生態特性皆為入侵優勢的重要因素。

臺灣的銀膠菊最早被發現於屏東縣九如鄉，至1988年始紀錄為台灣新歸化的有毒雜草(Peng *et al.*, 1988)，銀膠菊族群目前主要分布於金門縣、屏東縣，以及彰化縣與台中市濱海地區，於非耕地、田埂、道路旁較易形成群落，其次為休耕地或管理較粗放的農地。由於銀膠菊種子僅於土壤表層具較高萌芽率，土表1.5 cm以下的銀膠菊不能萌芽(徐及蔣，2004)，因此，銀膠菊較不易於經常耕犁的短期作物田中大量繁殖。近年中部低海拔地區多個縣市的非耕地已零星出現銀膠菊，且有漸向北擴散及蔓延之趨勢。自98年7月起，林務局已訂定4年銀膠菊防治行動計畫，會同各縣市政府、相關機關推動銀膠菊監測及防治工作(臺東林區管理處，2010)。

植物核糖體DNA(ribosomal DNA, rDNA)是編碼核糖體RNA的基因，包括可轉錄的rRNA基因和相鄰的轉錄區間(Internal transcribed spacer, ITS)，由編碼核糖體的18S rRNA、5.8S rRNA及26S rRNA共同構成一個轉錄單位(David and Thien, 1997)，由18S rDNA、26S rDNA、5.8S rDNA和位於三者之間的基因內轉錄區間

組成。被子植物核 rDNA 包括 5.8S rDNA 及 ITS 的總長度介於 565-700 bp 之間，其中 5.8S rDNA 的長度及序列皆非常保守，一般為 163 或 164 bp (David and Thien, 1997)，偶有變異位點或完全無變異。而 ITS1 和 ITS2 為 2 個 ITS 轉錄區間，分別位於 5.8S rDNA 兩端，具有多拷貝數、高變異速率，以及較快速的同步進化等特徵，已成為多種親緣關係、族群遺傳結構及演化的重要分子標誌 (袁等, 2005; Ratnaparkhe *et al.*, 1998, Hess *et al.*, 2000, Qian *et al.*, 2001)。

由於銀膠菊歸化於臺灣已超過 20 年，近年銀膠菊出現大量生長及蔓延的現象，其遺傳質是否發生明顯改變？本研究針對銀膠菊於臺灣的主要分佈地區樣品，進行 5.8S rDNA 序列分析，探討銀膠菊 ITS 序列之多樣性及遺傳分化等特性。

材料與方法

一、銀膠菊植材收集

自 2010 年 9 月至 2011 年 3 月之間，於臺灣全島及金門縣進行銀膠菊分佈頻率普查(蔣等, 資料未發表)，結果顯示銀膠菊主要出現於臺灣西部苗栗以南各縣市，其中銀膠菊普遍分佈金門縣全島，其次於屏東縣、臺南縣及彰化縣皆有較高銀膠菊密度，東部地區僅偶見銀膠菊。因此，本研究針對金門縣、屏東縣、彰化縣及台東縣的銀膠菊進行其 5.8S rDNA-ITS 序列的特性分析。主要採集之地區包括金門縣金城鎮(KM-JC)、金湖鎮(KM-JH)、金沙鎮(KM-JS)與金寧鎮(KM-JN)7 個採樣區；屏東縣佳冬鄉(PT-JD)、林邊鄉(PT-LB)、恆春鎮(PT-HC)、潮州鄉(PT-CJ)、麟洛鄉(PT-LL)10 個採樣區；彰化縣大城鄉(CH-DH)、竹塘鄉(CH-JT)、芳苑鄉(CH-FY)、福興鄉 CH-FS)10 個採樣區，以及台東縣東河鄉(TT-DH)1 個採樣區，共 28 個採樣區 (圖 1)，分別採集銀膠菊植株葉片，稱取 0.1 g 新生葉片做為萃取基因組 DNA 之用。

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。*EcoR* I 限制酶購自 Biolab 公司。PCR 熱循環器(DNA Engin Thermal Cycler, 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。



圖 1. 臺灣銀膠菊之採樣族群分布圖。屏東縣佳冬鄉(PT-JD1)、林邊鄉(PT-LB1~2)、恆春鎮(PT-HC1~2)、潮州鄉(PT-CJ1~3)、麟洛鄉(PT-LL1)；彰化縣大城鄉(CH-DH1~3)、竹塘鄉(CH-JT1)、芳苑鄉(CH-FY1~5)、福興鄉 CH-FS1)；台東縣東河鄉(TT-DH1)；金門縣金城鎮(KM-JC1~2)、金湖鎮(KM-JH1~2)、金沙鎮(KM-JS1~2)與金寧鎮(KM-JN1)。

Fig. 1. Location of sampled populations of *Parthenium hysterophorus* in Taiwan. Samples from Pingtung county: PT-JD1, PT-LB1~2, PT-HC1~2, PT-CJ1~3, PT-LL1; Changhua county: CH-DH1~3, CH-JT1, CH-FY1~5, CH-FS1, TT-DH1; Kinmen county: KM-JC1~2, KM-JH1~2, KM-JS1~2, KM-JN1.

三、銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列之增幅與解序

各別稱取 0.1 g 銀膠菊之幼葉，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 18S-F

(5'-AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG-3')及 26S-R(5'-CTTCTCCTCCGCTT-ATTGATATGCT-3')引子，進行 PCR 反應。反應添加物為 50 ng 模板 DNA、1 μ L ITS-F 引子、1 μ L ITS-R 引子、10 μ L 5X Fast-Run Taq master mix PCR buffer 及 1 μ L Pfu DNA polymerase，添加無菌去離子水使總體積為 50 μ 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 μ 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⁻¹) 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 μ L PCR 產物，添加於 pGEM-T Easy Vector 試劑 (5 μ L 2 X Rapid Ligation buffer, 1 μ L 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 μ L T4 DNA ligase)，於 16°C 反應 14-16 hs。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 hs，取 200 μ L 菌液加入接合反應之 10 μ L DNA，放置於冰上 30 min，再加入 200 μ 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 14-16hs，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 hs，抽取 plasmid DNA，取 20 μ L plasmid DNA 加 1 μ L *Eco*RI 限制酵素，於 37°C 反應 2 h，取出 6 μ 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、銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列二級結構分析

利用 Vienna RNA 軟體(<http://rna.tbi.univie.ac.at/>)，將 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 核酸序列分別進行最小自由能及二級結構分析。

五、5.8S rRNA-ITS 序列分析及親源關係分析(phylogenetic analysis)

應用 ClustalW2 軟體進行銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列之排序，再使用 MEGA4.0.2 軟體(Molecular Evolution Genetics Analysis)進行系統發育分析，空位(gap)處理為缺失(missing)，以 Maximum parsimony method 分析 5.8S rRNA-ITS 序列鹼基的組成，比較鹼基替換(transition)及鹼基置換(transversion)發生的頻率質比值，演算遺傳距離，再依據鄰位連接法(*Neighbor-Joining Method*)原理(Saitou and Nei, 1987)構築不同地區銀膠菊樹狀圖，樹狀圖中每一個分支之可信度利用重複 1,000 次的自舉檢驗法(bootstrap test)檢測。

結果與討論

一、銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列之比較

本研究使用 18S-F 及 26S-R 引子進行 PCR 反應，增幅銀膠菊 18S rRNA 至 26S rRNA 之間 DNA 片段，PCR 產物經電泳分析，結果顯示皆可增幅長度約為 700 bp 核酸片段(圖 2)。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 26 個銀膠菊樣品的 5.8S rRNA-ITS 序列為 649 bp，僅屏東縣潮州鄉樣品(PT-CJ3)於 IST_1 序列有 6 個鹼基缺失(第 215-221 鹼基)，故皆與 NCBI GenBank 中銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列(accseeion No. AY947417、GU724305 及 EF108403)皆有 99% 相同性(identity)，其中 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 分別為 164、261 及 224 bp，與一般菊科植物的 ITS 序列的長度相似，ITS1 皆長於 ITS_2 (Baldwin *et al.*, 1995)，銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 核酸序列以屏東縣佳冬鄉樣品(PT-JD1)為例列於圖 3。

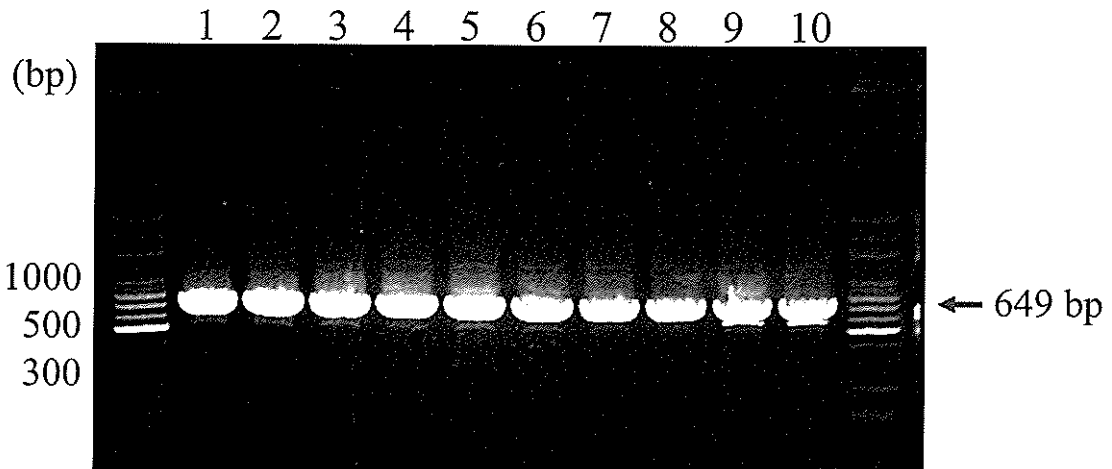


圖 2. 銀膠菊於屏東縣、彰化縣、金門縣及臺東縣樣品增幅之 5.8S rRNA-ITS 核酸片段。第 1-3 欄為屏東縣 PT-JD1, PT-CJ1, PT-HC1 樣品、第 4-6 欄為彰化縣 CH-DC1, CH-JT1, CH-FY1 樣品、第 7-9 欄為金門縣及 KM-JS1, KM-JC1, KM-JH1 樣品、第 10 欄為臺東縣 TD-DH1 樣品。

Fig. 2. The 5.8S rRNA-ITS regions of *Parthenium hysterophorus* were obtained from the PCR amplification by primers 18S-F and 26S-R. Lanes 1-3 were PT-JD1, PT-CJ1, PT-HC1 samples, lanes 4-6 were CH-DC1, CH-JT1, CH-FY1 samples, lanes 7-9 were KM-JS1, KM-JC1, KM-JH1 samples, lane 10 was TD-DH1 sample of *P. hysterophorus*.

```

1   TCGAACCCCTGCATAGCAGAATGACACGTGAACAAGTAAAGACACTCGGCTGAGCTAGGGC
61  CGTACGTTATGTTTCGGTCCCTTGCATGCCTTGTGAGCTTGTGTGTATGTTGCCCGTAC
121 ATACTGGGCTTCATGGATATCATGCTGACATAATAACAAACCCCCGGCACGGGACGTGCC
181 AAGGATAAATAAACTTAAAAGGGCTTGTGCTATTGCGCCCCGTTTTCGGGTGTGCCATTG
241 TACTGGTGCCTTTGTAAACTTAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATC
301 GATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG
361 AGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCCGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGT
421 CACGCATCATGTTGCCCAACCAAGCATCCCTTTTTAGGGACGTCATTGGTTGGGGCGGA
481 GATTGGTCTCCCGTGCCCAAGGCGTGGTTGGCCTAAATAGTAGTCTTCCCAGAAGGGAGG
541 CATGGCTAGTGGTGGTTGATAAAACAGTCGTCCTCGTGCATGCGTTTTCTTTCACGGGTG
601 TAGATGCTCTTAATCCCTGATGTGTTTTCTTGCGATAACGCTTCGATC

```

圖 3. 銀膠菊於屏東縣佳冬鄉(PT-JD1)樣品之 5.8S rRNA-ITS 序列。1-261 bp 為 ITS1，262-425 bp 為 5.8S rRNA，426-649 bp 為 ITS2。

Fig.3. The 5.8S rRNA-ITS sequence of *Parthenium hysterophorus* from PT-JD1 sample. 1-261 bp was ITS1 region, 262-425 bp was 5.8S rRNA, 426-649 bp was ITS2 region.

所有樣品 5.8S rRNA-ITS 序列的保守位點有 633 bp (97.5%)，變異位點共有 16 個(2.5%)，於 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 分別有 2、6 及 8 個，26 個樣品 5.8S rRNA 序列之 GC% 為 53.6%，ITS1 及 ITS2 則低於 50%，分別為 49.0-49.8% 及 49.0-50.9%。依不同採樣地點將銀膠菊於 5.8S rRNA-ITS 序列之變異位點進行差異比對(表 1)，其中信息位點有 4 個，於 ITS1 及 ITS2 各有 2 個(0.62%，第 75、211、449 及 466 鹼基)。

以 Maximum parsimony method 分析 5.8S rRNA-ITS 序列的組成，比較鹼基替換(transition)及鹼基置換(transversion)之發生，鹼基變異類型主要為 T/C、A/C、A/T 及 A/G 轉換，第 75、211、及 449 鹼基的信息位點皆為 T/C 轉換，只有金門縣的銀膠菊(KM-JC, KM-JH, KM-JS)於第 75 及 449 位點有 T 之變異，其最初入侵的銀膠菊是否與九如鄉最早被發現的銀膠菊是同一親源，尚無法得知，唯此等銀膠菊目前已適應當地生態，且普遍分佈於金門縣之非耕地及道路旁；而第 466 鹼基為 A/C 轉換，也僅屏東縣的銀膠菊(PT-HC, PT-LB, PT-CJ)有 A 之變異，可能為九如鄉銀膠菊經多年向南擴散，漸分佈於潮州鄉、林邊鄉、佳冬鄉及恆春鄉等近海地區而產生之變異(表 1)。

表 1. 銀膠菊於不同縣市樣品 5.8S rRNA-ITS 序列之差異比較

Table 1. Comparison of 5.8S rRNA-ITS sequences from 26 samples of *Parthenium hysterophorus*

Sample location	ITS1						5.8S rRNA			ITS2						
	38	75	135	163	211	251	316	409	443	449	466	473	568	588	631	640
PT-JD	A	C	G	C	T	T	A	C	A	C	A	G	T	G	T	C
HC				A	C						M					
LB					Y				R		M					
CJ*											M			S		
LL					C						C					A
JR								A			C					
TT-DH				A	C						C					
CH-JT				A	C						C					
DH					Y						C					Y
FY								R			C		K			
FS											C					
KM-JC		Y									C					
JH		Y			Y					Y	C					
JS	W	Y	R							T	C					
JN		T				A				T	C			C		

*PT-CJ3 sample missing 6 bp from 215 to 221 of ITS1.

**The genetic code: K=G or T, M=A or C, R=A or G, S=C or G, W=A or T, Y=C or T.

二、銀膠菊 5.8S rRNA-ITS 序列二級結構分析

5.8S rRNA-ITS 序列常被應用於探討種間親緣關係或族群遺傳結構組成。5.8S rRNA 為演化速度較慢的譯碼基因(coding genes)，演化速度較快的部份為轉錄區間(ITS)，此外，rDNA 經轉錄而成的 rRNA 時 ITS 會因單股核苷酸相互鍵結形成折疊區(folding domain)的核糖核酸二級結構，折疊區可分為核苷酸鍵結的莖部(stem)，以及沒有形成鍵結的圈環部位(loop)，此折疊區擔負著核糖核酸酵素(nucleases)接合位置(binding site)的功能(van Nues *et al.*, 1995; Cote *et al.*, 2002)，其中若 ITS2 核苷酸序列改變，使得二級結構的構型產生變化，核糖核酸酵素不能鍵結，則 pre-rRNA 的轉錄就無法完成。Goertzen 等學者(2003)曾利用 ITS₂ 序列之二級結構建立菊科植物屬間之親源關係。

本研究利用 Vienna RNA 分析軟體針對銀膠菊 5.8S rRNA、ITS1 及 ITS2 序列分別建構二級結構圖，屏東縣九如鄉樣品(PT-JR1)於 5.8S rRNA 變異(第 409 鹼基為 A)，造成中間圈環部位變大，從 11 個鹼基形成的圈環變成 14 個鹼基的圈環(圖

4A)；而彰化縣芳苑鄉樣品(CH-FY2)於 5.8S rRNA 變異(第 316 鹼基為 G)，其二級結構並未改變(圖 4A)。另於 ITS1 部份差異最大者為屏東縣潮州鄉樣品(PT-CJ2) 缺失 6 個鹼基(第 215-221 鹼基)，造成其二級結構形態明顯改變(圖 4B)，另一彰化縣竹塘鄉樣品(CH-JT1)略有差異；ITS2 部份雖樣品之間有 8 處鹼基之差異，但於二級結構皆相同(圖 4C)，因此 26 個銀膠菊中雖有屏東縣九如鄉樣品(PT-JR1)及潮

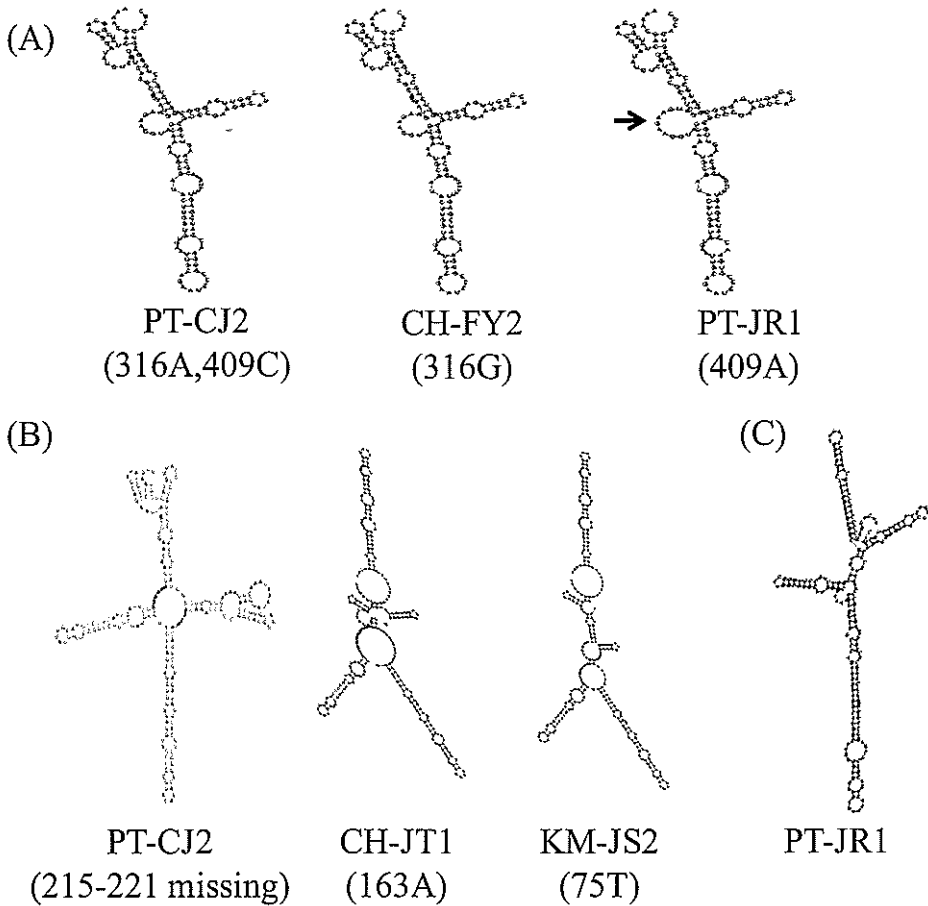


圖 4. 銀膠菊 5.8S rRNA, ITS1 及 ITS2 序列之二級結構比較。(A)5.8S rRNA：屏東縣潮州鄉樣品(PT-CJ2)、彰化縣芳苑鄉樣品(CH-FY2)及九如鄉樣品(PT-JR1)，(B)ITS1：屏東縣潮州鄉樣品(PT-CJ2)、彰化縣竹塘鄉樣品(CH-JT1)及金門縣金沙鎮樣品(KM-JS2)，(C)ITS2：屏東縣九如鄉樣品(PT-JR1)。

Fig.4. The RNA secondary structures based on 5.8S rRNA, ITS1 and ITS2 sequences of *Parthenium hysterophorus*. (A) 5.8S rRNA: PT-CJ2, CH-FY2 PT-JR1 samples, (B)ITS1: PT-CJ2, CH-JT1, KM-JS2 samples, (C)ITS2: PT-JR1 sample.

州鄉樣品(PT-CJ2)分別於 5.8S rRNA 及 ITS1 二級結構之改變,但 ITS2 部份二級結構皆相同,顯示,以二級結構的折疊區鑑定同源核苷酸位點,可做為調整樣品分群的依據,而增加遺傳質變異分析的正確性(Pace *et al.*, 1998)。

三、銀膠菊親源關係分析

利用 Mega 4.0 軟體進行 26 個銀膠菊樣品遺傳距離分析,結果屏東縣佳冬鄉(PT-JD1)、林邊鄉(PT-LB1)及潮州鄉(PT-CJ1、PT-CJ2)等 4 樣品 5.8S rRNA-ITS 序列完全相同,遺傳距離為零,而遺傳距離最遠者僅為 0.009 之差異,為金門縣金寧鎮(KM-JN1)分別與屏東縣佳冬鄉(PT-JD1)、潮州鄉(PT-CJ1、PT-CJ2)、彰化縣大城鄉(CH-DH1)及芳苑鄉(CH-FY5)之距離(資料未呈現)。

依據鄰位連接法原理構築不同地區銀膠菊樹狀圖(圖 5),由於銀膠菊各樣品間 5.8S rRNA-ITS 序列僅有 2-3 個鹼基之差異,而且屏東縣及彰化縣的銀膠菊變異位點亦有相同處,因此 26 個銀膠菊僅區別為 2 群,一群為以屏東縣及彰化縣的銀膠菊為主,另一群為金門縣的銀膠菊,主要由於金門縣銀膠菊於第 75 及 449 鹼基特異位點之故(表 1)。Tang 等人(2009)亦曾利用簡單序列重複區間(Inter simple sequence repeat, ISSR)分生技術及葉綠體 *trnQ-5'rps16* 基因進行銀膠菊於中國的多重侵入分析,結果不論以主成分分析(Principle coordinator analysis)或鄰位連接法分析,皆僅將銀膠菊分為 2 群,一群為中國南方的廣東省、廣西省、雲南省、福建省及海南省之銀膠菊,另一群為山東省的銀膠菊,作者認為此 2 群銀膠菊呈現遺傳組成之高度差異性,因此推論山東省的銀膠菊為不同於南方各省的親源,屬於 2 次入侵中國的境外植物。

根據前人針對銀膠菊於細胞學之研究顯示:臺灣南部銀膠菊減數分裂絲球期(diakinesis)的染色體數為 $n=17$ (Peng *et al.*,1988)。另有 8 株新熱帶區銀膠菊有不同之體細胞染色體數,其中 7 株為 $2n=34$, 1 株為 $2n=35$ (Rollins, 1950)。後續 Hakoo(1963)於印度的銀膠菊研究結果,認為其配子染色體數 $2n=18$ 。Peng 等學者推論:若是銀膠菊 $2n=18$ 為正確者,而之前其他研究有 $2n=34-35$ 之現象,則顯示銀膠菊可能為單套染色體數為 $9(X=9)$ 的 4 倍體植物(Peng *et al.*, 1988)。雜交和多倍化是高等植物進化的最重要途徑之一,同時,多倍化、異源多倍化、孤雌生殖、世代週期長和雜交等因素都可能導致致同進化(concerted evolution)之不完全(Baldwin *et al.*,1992)。本研究中國銀膠菊於 5.8S rRNA -ITS 序列鹼基缺失或置換之多樣性、二級結構之變異,以及臺灣中南部與離島金門縣樣品分群之差異,顯示銀膠菊遺傳質仍處於致同進化不完全狀態,可能是銀膠菊為 4 倍體植物之故。

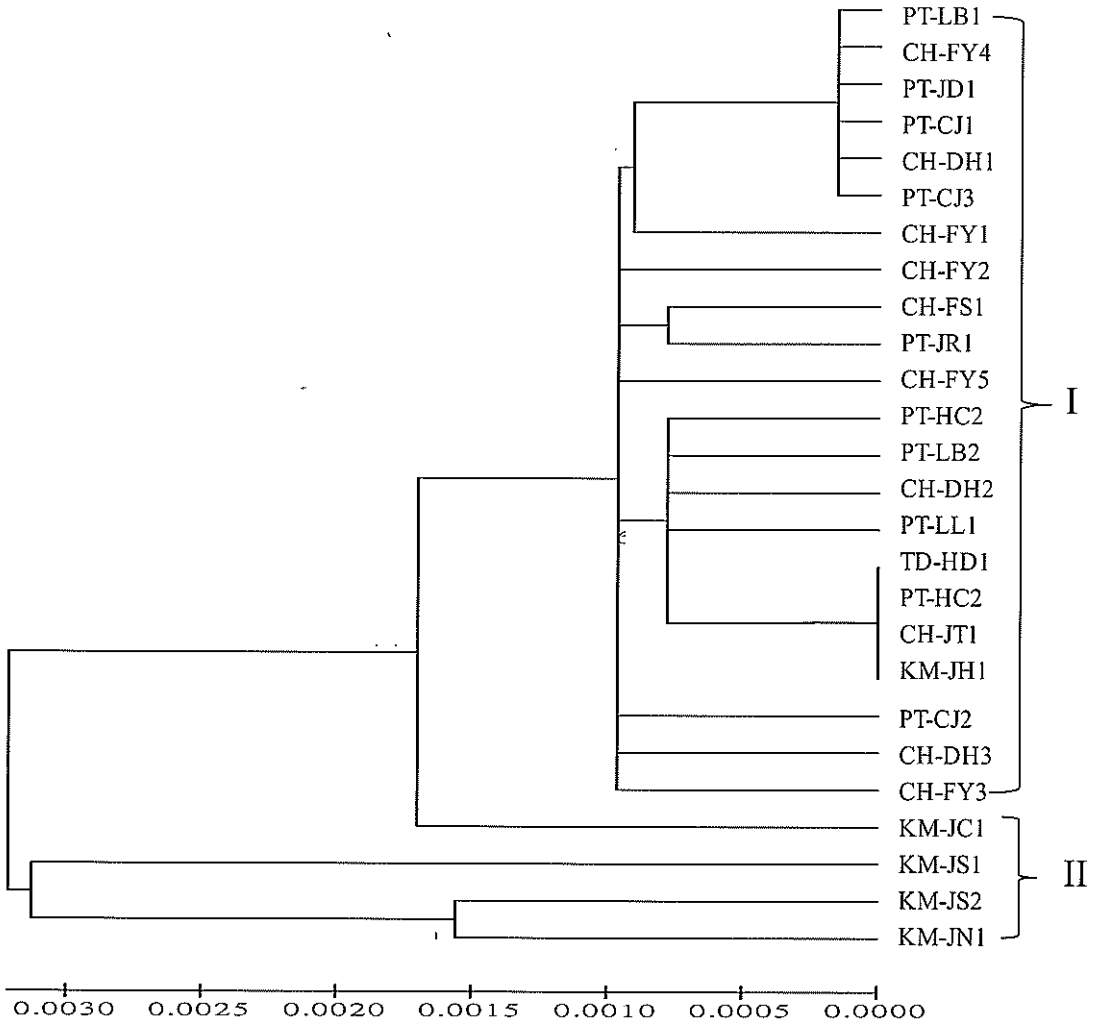


圖 5. 利用 5.8S rRNA-ITS 序列建構屏東縣、彰化縣、金門縣及臺東縣銀膠菊之親源樹狀圖。樣品來源：屏東縣佳冬鄉(PT-JD1)、林邊鄉(PT-LB1~2)、恆春鎮(PT-HC1~2)、潮州鄉(PT-CJ1~3)、麟洛鄉(PT-LL1)；彰化縣大城鄉(CH-DH1~3)、竹塘鄉(CH-JT1)、芳苑鄉(CH-FY1~5)、福興鄉 CH-FS1)；台東縣東河鄉(TT-DH1)；金門縣金城鎮(KM-JC1~2)、金湖鎮(KM-JH1~2)、金沙鎮(KM-JS1~2)與金寧鎮(KM-JN1)。

Fig.5. Phylogenetic analysis based on 5.8S rRNA-ITS sequences of *Parthenium hysterophorus* from Pingtung, Changhua, Kinmen and TaiTung county in Taiwan. Samples from Pingtung county: PT-JD1, PT-LB1~2, PT-HC1~2, PT-CJ1~3, PT-LL1 ; Changhua county: CH-DH1~3, CH-JT1, CH-FY1~5, CH-FS1, TT-DH1 ; Kinmen county: KM-JC1~2, KM-JH1~2, KM-JS1~2, KM-JN1.

引用文獻

- 朱世新、覃海甯、陳藝林。2005。中國菊科植物外來種概述。廣西植物。25: 69-76。
- 袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰。2005。台灣本土與外來近緣植物之鑑定與族群探討。台灣植物資源之多樣性發展。花蓮區農業改良場編印。89-101頁。
- 徐玲明、蔣慕琰。2005。銀膠菊(*Parthenium hysterophorus* L.)發芽特性及化學防治。中華民國雜草會刊。25: 11-21。
- 曾東強、韋家書、張國良、周國輝。2008。外來入侵植物銀膠菊的生物學特性。廣西農業生物科學。27(3):261-265。
- 蔣慕琰、徐玲明、袁秋英、陳富永、蔣永正。2003。台灣外來植物之野化與生態。植物生物多樣性與植物資源永續開發利用。47-65頁。
- 臺東林區管理處。2010。林務局訂定四年計畫防治入侵植物銀膠菊。
<http://www.forest.gov.tw/ct.asp?xItem=52039&ctNode=1787&mp=351>
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. *Mol. Phylogen. Evol.* 1: 3-16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson and J. M. Porter 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard* 82:247-277.
- Chippenda, J. F. and F. D. Panetta. 1994. The cost of *Parthenium hysterophorus* in the Queensland cattle industry. *Plant protection Quarterly* 9: 73-76.
- Cote, C. A., C. L. Greer and B. A. Peculis. 2002. Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA* 8: 786-797.
- David, V. J. and L. B. Thien. 1997. A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 326-334.
- Goertzen, L. R., J. J. Cannone, R. R. Gutell and R. K. Jansen. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol. Phyl. Evol.* 29: 216-234.
- Hakoo, M. L. 1963. A diploid *Parthenium* in Jammu. *Curr. Sci.* 32: 273.
- Hess, J., J. W. Kadereit and P. Vargas. 2000. The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer I (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD) and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mole. Ecol.* 9: 857-868.
- Holm, L., J. Doll, E. Hm., J. Pancho and J. Herberger. 1997. *World weeds: Natural Histories and Distribution*. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. 610 pp.
- Mcfadyen, R. E. 1995. *Parthenium* weed and human health in Queensland. *Australia Family Physician* 24: 1455-1459.

- Pace, N. R., D. K. Smith, G. J. Olsen and B. D. James. 1989. Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—a review. *Gene* 82: 65-75.
- Peng, C. I., L. A. Hu and M. T. Kao. 1988. Unwelcome naturalization of *Parthenium hysterophorus* in Taiwan. *J of Taiwan Museum* 41: 624-625.
- Qian, W., S. Ge and D. Y. Hong. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. App. Genet.* 102: 440-449.
- Ranaswani, P. P. 1997. Proc. First internal Conference on *Parthenrun* management. 77-80.
- Ratnaparkhe, M.B., D. K. Santra and 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.
- Rollins, R. C. 1950. The guayule rubber plant and its relatives. *Contr. Gray Herb.* 172:3-72.
- Saitou, N and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Tamado T., P. Milberg. 2000. Weed flora in arable fields of eastern Ethiopia with emphasis on the occurrence of *Parthenium hysterophorus*. *Weed Res.* 40: 507- 521.
- Tang, S. Q., F. Wei, L. Y. Zeng, X. K. Li, S. C. Tang, Y. Zhong and Y. P. Geng. 2009. Multiple introductions are responsible for the disjunct distributions of invasive *Parthenium hysterophorus* in China: evidence from nuclear and chloroplast DNA. *Eur. Weed Res. Soc. Weed Res.* 49: 373-380.
- van Nues, R. W., J. M. Rientjes, S. A. Morre, E. Mollee, R. J. Planta, J. Venema and H. A. Raue. 1995. Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 250: 24-36.