

利用 ISSR 分子標誌鑑定臺灣菟絲子屬植物

謝玉貞、林芳妘、蔣慕琰、袁秋英*

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所公害防治組。台中。台灣

摘要

菟絲子屬(*Cuscuta* spp.)植物蔓生性的莖纏繞寄主,且由吸器攝取寄主植物之水分及養分,導致寄主死亡,為植物檢疫關注之危險性莖葉寄生雜草。台灣的3種菟絲子屬植物有平原菟絲子(*Cuscuta campestris* Yunck.)、台灣菟絲子(*C. japonica* Choisy var. *formosana* (Hay.))及日本菟絲子(*Cuscuta japonica* Choisy var. *japonica*),其中台灣菟絲子與日本菟絲子未開花前不易以外觀區分,因此本研究利用簡單序列重複區間(Inter-simple sequence repeat, ISSR)標誌,建立台灣3種菟絲子分子鑑定之技術。田間採集外觀形態不同之46個菟絲子樣品,先依形態特徵區別,台灣菟絲子:筒狀花長度4-6 mm,莖較粗壯,莖直徑約1.5-3 mm,紫色莖且帶有紫紅色瘤狀斑點;日本菟絲子:筒狀花長度3-4 mm,莖較粗壯,莖直徑約1.5-3 mm,依莖色及瘤狀斑點的差異,又分為黃色莖不帶有紫紅色瘤狀斑點、黃色莖帶有紫紅色瘤狀斑點或黃色莖與少部分紫色莖夾雜且帶有紫紅色瘤狀斑點之3種類別;平原菟絲子:筒狀花長度2-3 mm,莖較細絲狀,莖直徑小於1 mm,淡黃色。46個菟絲子樣品區別為14個台灣菟絲子、16個日本菟絲子及16個平原菟絲子。利用ISSR-PCR反應篩選45個UBC ISSR引子,結果有9個引子皆可於3種菟絲子增幅不同長度及數量之多型性DNA片段,其中以UBC 823引子(5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3')可於3種菟絲子分別增幅出特異性DNA片段,日本菟絲子16個樣品皆增幅647 bp片段;平原菟絲子16個樣品皆增幅800、900及1100 bp 3條DNA片段。台灣菟絲子樣品有2種增幅結果:9個樣品增幅647及431 bp 2條DNA片段,5個樣品只增幅647 bp DNA片段,推測此5樣品為外觀似台灣菟絲子,但遺傳質似日本菟絲子的中間型生物種。本研究結果顯示利用UBC 823引子之ISSR-PCR檢測方法,配合外觀形態之比對,可提供未來台灣地區菟絲子種類之鑑定。

關鍵詞: 菟絲子屬、簡單序列重複區間、分子標誌、聚合酵素鏈鎖反應、物種鑑定。

* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

ISSR molecular marker in detection of *Cuscuta* spp. in Taiwan

Yu-Chen Hsieh, Fang-Yun Lin, Mou-Yen Chiang and Chiou-Ing Yuan*

Taiwan Agriculture Chemicals and Toxic substances Research Institute, Council of
Agriculture, Taichung, Taiwan

Abstract

Cuscuta spp. plants prostrate stems wrapped host and host plants of moisture and nutrients uptake by haustoria, leading to host death, the risk of phytosanitary concern stems and leaves of parasitic weeds. *Cuscuta japonica* is Choisy var *japonica*, *Cuscuta japonica* is Choisy var *formosana* (Hay.) and *Cuscuta campestris* Yuncker are common three kinds of dodder in Taiwan. *Cuscuta japonica* is Choisy var *japonica* and *Cuscuta japonica* is Choisy var *formosana* (Hay.) flowering is not easy to be distinguished from the appearance of type. In this study using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers molecular identification of the three types of dodder. We collected the morphology of different dodder species samples in field, using 45 ISSR random primers for PCR reaction and gel electrophoresis analysis of differences in comparative DNA fragments. The UBC 823 primer (5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3') with the appearance of morphological differences, clearly showing a sign of DNA fragments of three different specific. *Cuscuta campestris* Yunck. had 3 bands whose molecular weights were 800 bp, 900 bp and 431 bp respectively; *Cuscuta japonica* Choisy var. *formosana* (Hay.) had 2 types, bands 647 bp and 431 bp another one band 647 bp and *Cuscuta japonica* Choisy var. *japonica* had a 647 bp specific band. The results of this study shows that of the *Cuscuta* spp could be identified with using UBC823 primers for different types of dodder ISSR-PCR amplified DNA fragment fingerprints of high specificity and cooperation with dodder seed identification in Taiwan.

Key words: ISSR (inter-simple sequence repeat), molecular marker, PCR, species identification.

前言

寄生性植物為國際間檢疫管理之重要對象，菟絲子屬(*Cuscuta* spp.)植物中雖然早期只有 14 種被列為寄生性雜草(Parker and Riches 1993)，但此屬所有種類都被中國列為 A2 類檢疫性有害生物(許 2008)，若生長環境適宜時，亦即成為進境植物檢疫之危險性莖葉寄生雜草。菟絲子屬植物根與葉退化，由蔓生性的莖纏繞寄主，不具寄主專一性，藉由吸器(haustorium)攝取寄主之水分及養分，導致寄主死亡，再迅速蔓延至其他植物。同時寄生性菟絲子具有強勢的繁殖潛力，不僅可以種子繁殖，斷裂的莖節亦可纏繞寄主，發育成為新植株，因此以人力清除的效率低，而噴施除草劑或以機械割除易傷及寄主植物，造成防治困難度極高。

近年台灣出現日本菟絲子(*Cuscuta japonica* Choisy var. *japonica*)之報導，引起社會各界對此寄生性外來入侵植物之高度關切。由於日本菟絲子與台灣特有種—台灣菟絲子(*C. japonica* Choisy var. *formosana* (Hayata) Yunck.)皆為 *C. japonica* 之變種，親緣極相近，不易從外觀區別，因此如何建立簡易鑑別方法，減少外來日本菟絲子對於農林生產、生物多樣性等環境生態之衝擊，以及積極維繫台灣原生性植物資源，為當前重要的課題。

菟絲子屬植物為旋花科(Convolvulaceae)寄生性植物，Yuncker (1932)於菟絲子屬專論中記載全球之菟絲子共有 121 種(Yuncker 1932)。目前台灣有紀錄之菟絲子植物有 5 種，包括菟絲子(又名南方菟絲子；*C. australis* R. Br.)、中國菟絲子(*C. chinensis* Lam.)、平原菟絲子(*C. campestris* Yunck.)、台灣菟絲子及日本菟絲子(呂 1972; 牧 1947; Chang 1978; Kuoh and Chiang Tasi 1989; Yuncker 1932)。其中平原菟絲子廣泛分佈於低海拔地區，危害之寄主以草本植物為主。台灣菟絲子大都出現於中南部山區，寄主以木本植物為主。日本菟絲子首度出現於南投信義鄉山區(廖等 1990)，近年在低海拔發現的黃色菟絲子，以觀賞樹木(如榕樹)為寄主，疑似新入侵之日本菟絲子，其主要危害亦是以血桐、鹿仔樹及榕樹等木本植物為主(廖等, 1990)。而菟絲子及中國菟絲子可能族群較少或滅絕，不易被發現及採集。菟絲子屬植物主要以花果形態特徵為種間之鑑別依據，但同屬植物外觀形態相似，尤其未開花前之近緣種難以分辨(方等 1979; 呂 1972; 廖等 1990; Zietkiewicz *et al.* 1994)。

DNA 分子標誌(molecular marker)技術之分析，能呈現生物物種的遺傳變異，故廣泛應用於品種鑑定、遺傳圖譜建構、物種之間的親緣關係，以及系統演化等研究(Berg *et al.* 2003; Bornet *et al.* 2002; Bornet and Branchard 2004; Capparelli *et al.* 2004; Godwin *et al.* 1997; Jauhar, 1996)。其中由 Zietkiewicz 等在 1994 年所發展的簡

單序列重複(Internal Simple Sequence Repeat; ISSR)分子標誌技術，應用 1~6 個核苷酸重複性短序列引子，增幅基因組 DNA 之片段發展為分子標誌，由增幅的 DNA 片段長度及數目具有多型性之特性，顯示出生物體遺傳質的差異(Kojoma *et al.*, 2002; Kolodinska *et al.* 2004; Rakocy-Trojanowska and Bolibok 2004; Sica *et al.* 2005; Zietkiewicz *et al.* 1994)。

有關菟絲子屬植物遺傳質之前人研究，包括有針對轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)序列、16S ribosomal RNA 等(Krause *et al.* 2003; 高 2006)，廖氏(2004)亦曾利用 RAPD 方式探討台灣的菟絲子屬遺傳變異，結果由 RAPD 歸群或花粉形態特徵皆無法明確區分日本菟絲子與台灣菟絲子 2 變種(廖 2004)。目前尚無應用 ISSR 標誌於菟絲子親緣或分類之相關報導。本研究採集 13 縣市不同形態的菟絲子樣品，利用 ISSR-PCR 技術，篩選專一性引子，應用於鑑定台灣的平原菟絲子、日本菟絲子與台灣菟絲子等 3 種主要菟絲子屬植物。

材料與方法

一、菟絲子屬植物形態特徵及樣品分群

本研究於 2007-2009 年間在西部地區 13 縣市採集菟絲子，以外觀形態不同且為開花結果時期的菟絲子為主，共有 46 個樣品。依據 Yuncker (1932)於菟絲子屬專論中描述之形態分類特徵，可將 46 個樣品區別為 14 個台灣菟絲子、16 個日本菟絲子及 16 個平原菟絲子，其中日本菟絲子因莖部顏色及瘤狀斑點之差異，又可分為 3 類別，各樣品的採集地及寄主植物列於表 1。

二、菟絲子樣品之 DNA 萃取及定量

取 0.2 g 菟絲子莖部，採用 DNeasy^R Plant Mini 試劑(QIAGEN 公司)萃取菟絲子基因組(genomic) DNA。將萃取之 DNA 以分光光度計測定波長 260nm 之吸光值，估算菟絲子樣品之 DNA 濃度($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$)。

三、篩選鑑別 3 種菟絲子之 ISSR 專一性引子

選用 45 個 UBC ISSR 重複性短序列引子(購自 The University of British Columbia, Dr. J. B. Hobbs, Director 實驗室)及 Fast-RunTM Taq Master Mix Kit (波仕特公司)，進行 PCR 反應，篩選可區別 3 種菟絲子之專一性引子。取 2 μl 菟絲子樣品之 genomic DNA，分別加 1 μl 0.3 μM primer，、10 μl 5X Taq Master Mix (1.25 u Taq DNA polymerase, reaction buffer, MgCl_2 final concentration 1.5 mM, 200 μM

dNTP)，再加無菌去離子水使總體積為 50 μl ，對照組則以無菌去離子水取代菟絲子樣品之 genomic DNA。PCR 反應條件：起始變性溫度為 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘，循環 1 週期；變性溫度 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒，煉合溫度 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒，延展溫度 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘，循環 35 週期；最後延展溫度 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 分鐘。取 10 μl PCR 產物，加入 2 μl 6X DNA Loading Dye，注入 1.2% (w/v) 0.5X TBE agarose gel 中，以 100 伏特電壓，進行 30 分鐘 DNA 之電泳分析，agarose gel 以 ethidium bromide (EtBr) 染色並於紫外燈下觀察結果，利用 Gen-100 DNA marker (吉恩馬克公司) 估算 DNA 片段長度。

四、3 種菟絲子基因組 DNA 可檢出濃度之測定

分別取 10 ng 3 種菟絲子之 genomic DNA，連續稀釋 10 倍，以 10 ng、1 ng、100 pg 或 10 pg 進行 ISSR-PCR 反應，重複進行 3 次，測試 UBC 823 引子之最佳靈敏度，以及增幅的 DNA 片段之再現性。

結果與討論

一、菟絲子屬植物形態特徵及樣品分群

依據 Yuncker (1932) 於菟絲子屬專論中描述之形態分類特徵，可將 46 個樣品區別為 14 個台灣菟絲子 (No.1-14)、16 個日本菟絲子 (No.15-30) 及 16 個平原菟絲子 (No.31-46)，其中日本菟絲子因莖部顏色及瘤狀斑點之差異，又可分為 3 類別 (No.15-24, 25-28 及 29-30)，3 種菟絲子的形態特徵及寄主植物分述如下 (表 1、圖 1)：

(一) 台灣菟絲子：莖纏繞，較粗壯，直徑 1.5-3 mm，紫色及黃色莖夾雜甚至深紅紫色莖，帶有紫紅色瘤狀斑點，多分枝，無葉 (圖 1A(1,2))。花長 4-6 mm，花近無柄，穗狀花序簇生，花冠型為筒狀 (圖 1A(3))；果實為蒴果卵球形，成熟時由近基部周裂；柱頭 2 裂，花柱 1 個，柱頭裂瓣呈多舌狀 (圖 1A(4))。14 個台灣菟絲子樣品分別採集於南投縣 (7 樣品)、高雄縣 (4 樣品) 及屏東縣 (3 樣品)，寄主大部份為木本植物，包括血桐、鹿仔樹、相思樹及樟樹等 (表 1)。

(二) 日本菟絲子：莖纏繞，較粗壯，直徑 1.5-3 mm，莖部多分枝，無葉，另依莖的顏色及瘤狀斑點之差異，又可分為黃色莖不帶紫紅色瘤狀斑點、黃色及少部分紫色莖夾雜帶紫紅色瘤狀斑點，以及黃色莖帶紫紅色瘤狀斑點等 3 種形態類別 (圖 1B(1,2))。花長為 3-4 mm，花近無柄，穗狀花序簇生，花冠型為筒狀 (圖 1B(3))；果實為蒴果卵球形，成熟時由近基部周裂；柱頭 2 裂，花柱 1 個，柱頭裂瓣呈稜形 (圖 1B(4))。16 個日本菟絲子樣品分別採集於南投縣 (9 樣品)、台中市 (6 樣品) 及嘉義縣 (1 樣品)，寄主皆為木本植物，包括血桐、榕樹、美人樹及阿勃勒等 (表 1)。

表 1. 46 個菟絲子屬植物之樣品來源、寄主植物及 3 種菟絲子分類特徵。

Table 1. Classification by characteristic of *Cuscuta* in 46 samples.

Sample No.	Collected site	Host plants	Species	Flower and fruit	Stems externals
1	南投縣水里鄉	水麻	台灣菟絲子	花近無柄，穗狀	莖較粗壯，直徑
2	南投縣神木林道	薔薇科植物	<i>Cuscuta japonica</i>	花序簇生，花冠	1.5-3mm，紫色莖且
3	南投縣桐林國小	漢氏山葡萄	Choisy	型為筒狀，花長	帶有紫紅色瘤狀斑
4	南投縣桐林國小	鹿仔樹	var. <i>formosana</i>	4-6mm；柱頭 2	點，多分枝，無葉
5	南投縣神木林道 蕃茄園	火炭母草	(Hay.)	裂，花柱 1 個， 柱頭裂瓣呈多舌	
6	南投縣仁愛鄉力 行產業道路 4K	血桐		狀；果實為蒴果	
7	南投縣仁愛鄉力 行產業道路 16.2K	鹿仔樹		卵球形，成熟時 由近基部周裂	
8	高雄縣桃源鄉梅 山	鹿仔樹			
9	高雄縣桃源鄉 20 省道	香澤蘭			
10	高雄縣桃源鄉樟 山 20 省道	樟樹			
11	高雄縣桃源鄉 20 省道	榕樹			
12	屏東縣霧台山地 門	山麻黃			
13	屏東縣霧台山地 門	相思樹			
14	屏東縣霧台 24 省 道	血桐			
15	台中市崇德路	榕樹	日本菟絲子	花近無柄，穗狀	莖較粗壯，直徑
16	台中市南屯路	美人樹	<i>Cuscuta japonica</i>	花序簇生，花冠	1.5-3mm，黃色莖不
17	台中縣烏日鄉	血桐	Choisy	型為筒狀，花長	帶有紫紅色瘤狀斑
18	台中縣省議會	血桐	var. <i>japonica</i>	3-4mm；柱頭 2	點，多分枝，無葉
19	台中縣中投公路 10.1 km	阿勃勒		裂，花柱 1 個， 柱頭裂瓣呈稜	
20	南投縣集集鎮	血桐		形；果實為蒴果	
21	南投市長青公園	榕樹		卵球形，成熟時 由近基部周裂	
22	南投縣中寮鄉	萬桃花			
23	南投縣仁愛鄉	芭樂樹			
24	南投縣水里鄉	蕨類			
25	南投縣埔里鄉	榕樹			莖較粗壯，直徑
26	南投縣魚池鄉	榕樹			1.5-3mm，黃色莖帶
27	南投縣中寮鄉	龍眼樹			有紫紅色瘤狀斑
28	嘉義縣觸口村	榕樹			點，多分枝，無葉
29	台中縣中投公路 9.2 km	黃花英竹桃			莖較粗壯，直徑
30	南投市長青公園	榕樹			1.5-3mm，黃色莖與 少部分紫色莖夾雜 且帶有紫紅色瘤狀 斑點，多分枝，無葉

Sample No.	Collected site	Host plants	Species	Flower and fruit	Stems externals
31	台北縣林口鄉	大花咸豐草	平原菟絲子	花 3-8 朵簇生成	莖較細絲狀，直徑約
32	桃園縣大園鄉	大花咸豐草	<i>Cuscuta</i>	較疏散的球形團	1mm，淡黃至橙黃
33	桃園縣蘆竹鄉	大花咸豐草	<i>campestris</i>	傘狀花序，花冠	色，無葉
34	新竹縣新豐鄉	大花咸豐草	Yunck.	型為短鐘狀，花	
35	新竹縣湖口鄉	大花咸豐草/ 槭葉牽牛		長 2-3mm；柱頭	
36	苗栗縣竹南鎮	大花咸豐草/ 馬鞍藤		呈頭狀，2 個細	
37	苗栗縣後龍鄉	大花咸豐草/ 馬鞍藤		長花柱；果實為	
38	台中縣大肚鄉	葎草		球形，成熟時由	
39	台中縣霧峰鄉	南美蟛蜞菊		基部不規則周裂	
40	南投縣水里鎮	大花咸豐草			
41	彰化縣北斗鎮	草海桐			
42	彰化縣福興鄉	槭葉牽牛			
43	屏東縣東港鎮	大花咸豐草			
44	雲林縣麥寮鄉	南美蟛蜞菊			
45	金門縣金門酒廠	大花咸豐草			
46	金門縣尚義鄉	馬鞍藤			

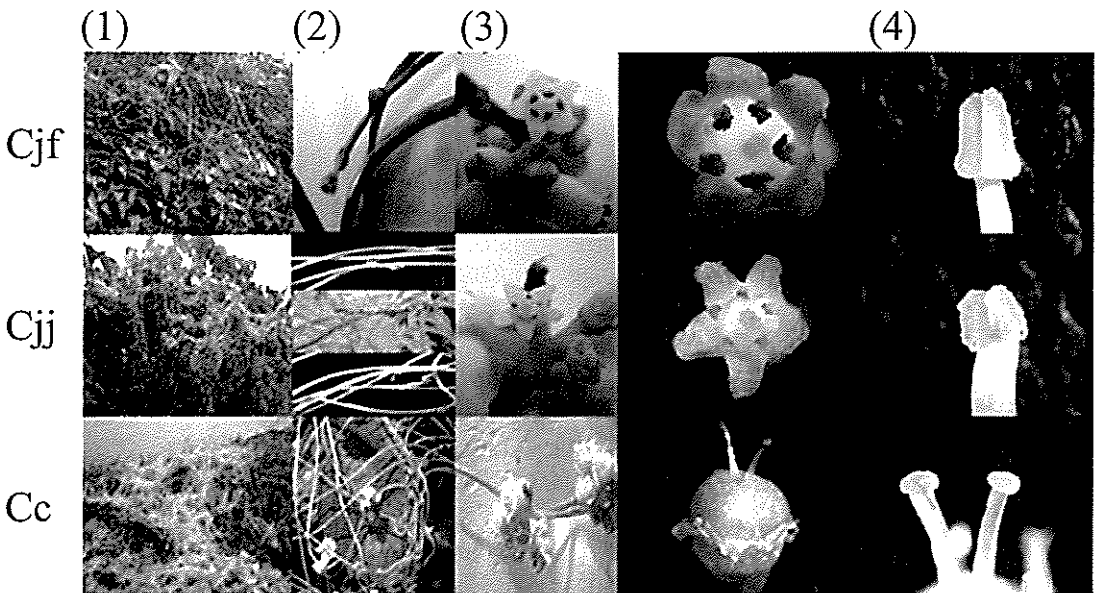


圖 1. 臺灣 3 種菟絲子之外觀形態。(A) 台灣菟絲子 (*Cuscuta japonica* var. *formosana*, Cjf)、(B) 日本菟絲子 (*C. japonica* var. *japonica*, Cjj)、(C) 平原菟絲子 *C. campestris* (Cc)，(1-4) 分別為族群、莖、花朵及雌蕊。

Fig. 1. Morphological features of 3 *Cuscuta* species in Taiwan. (A) *Cuscuta japonica* var. *formosana* (Cjf), (B) *C. japonica* var. *japonica* (Cjj), (C) *C. campestris* (Cc), sub figures 1-4 were populations, stems, flowers and stigma, respectively.

(三)平原菟絲子：莖纏繞，細絲狀，直徑約 1 mm，淡黃至橙黃色，無葉(圖 1C (1,2))。花長 2-3 mm，花 3-8 朵簇生成較疏散的球形團傘狀花序，花冠型為短鐘狀(圖 1C (3))；果實為球形，成熟時由基部不規則周裂；柱頭呈頭狀，2 個細長花柱(圖 1C (4))。16 個平原菟絲子樣品分別採集於台北縣、桃園縣、新竹縣、苗栗縣、金門縣等 10 個縣市，寄主皆為草本植物，包括大花咸豐草、南美蟛蜞菊、馬鞍藤及葎草等(表 1)。

一般而言，平原菟絲子外觀形態與台灣及日本菟絲子差異較大，易於區別，但台灣菟絲子與日本菟絲子莖及花果之相似度高，台灣菟絲子花冠(4-6 mm)較日本菟絲子者(3-4 mm)長，但二者於柱頭形狀及花冠大小，常有中間型出現，且未開花前日本菟絲子於莖部顏色及瘤狀斑點的特性變異多，更增加與台灣菟絲子區別的難度。

二、篩選鑑別 3 種菟絲子之 ISSR 專一性引子

採集的 46 個菟絲子樣品，分別以 45 個購自 UBC 的 ISSR 引子進行 PCR 反應，初步篩選出編號 811、813、823、835、836、840、841、844 及 846 等 9 個 ISSR 引子，皆可於台灣菟絲子、日本菟絲子及平原菟絲子增幅出不同之多型性核酸片段，其中 UBC 811、813、835、836、840、841、844 及 846 引子雖可穩定增幅出核酸片段，但同種菟絲子樣品之間增幅的核酸長度及數量亦明顯不同(表 2)，如 14 個台灣菟絲子樣品最分歧，以此 8 種 ISSR 引子分別可增幅出 3-9 條核酸片段，多型性有 2-8 種；16 個日本菟絲子可增幅出 2-7 條核酸片段，多型性有 2-3 種；16 個平原菟絲子樣品增幅的核酸片段一致性最高，除了 UBC 841 引子之外，PCR 產物皆為相同核酸片段(表 2)。

僅以 UBC 823 引子(5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3')可於 3 種菟絲子分別增幅出特異性 DNA 片段(圖 2)，14 個台灣菟絲子樣品有 2 種增幅結果：9 個樣品(No.1-9)增幅 647 及 431 bp 2 條 DNA 片段，5 個樣品(No.10-14)只增幅 647 bp DNA 片段，主要採集於屏東縣霧台山地門(3 樣品)及高雄縣桃源鄉(2 樣品)，此 5 樣品形態外觀似台灣菟絲子，但遺傳質卻似日本菟絲子。16 個日本菟絲子樣品(No.15-30)皆增幅 647 bp 片段；16 個平原菟絲子樣品(No.31-46)皆增幅 800、900 及 1100 bp 3 條 DNA 片段(表 3)。

三、3 種菟絲子基因組 DNA 可檢出濃度之測定

3 種菟絲子分別取 10 ng genomic DNA，連續稀釋 10 倍為 10 ng、1 ng、100 pg 或 10 pg，測試 UBC 823 引子之 PCR 增幅效果。結果菟絲子之 genomic DNA 濃度低於 10 pg DNA，則無法增幅出核酸片段，100 pg DNA 濃度即可於 3 種菟絲子分別增幅明顯核酸片段(圖 3)。

表 2. 利用 9 個 UBC ISSR 引子增幅 3 種菟絲子之多形性核酸片段。

Table 2. The diverse DNA fragments of 3 *Cuscuta* species from 46 samples were obtained by ISSR-PCR amplification using 9 UBC primers.

Primer		Amplified DNA (bp)								
UBC 811	台灣菟絲子			1000		780			495	
				1000	900	780			495	
	日本菟絲子			1000		780		590	495	
				1000		780			495	
		1450	1100		900	780	700	590	495	
UBC 813	平原菟絲子	2800	1600	980	370					
		1200	900			720	700	600	540	
	台灣菟絲子	1200	900	850	800		700	600	540	400
		1200	900	850	800	720	700	600	540	400
		1200	900		800	720	700	600	540	400
UBC 823	日本菟絲子	1200	900			720	700	600	540	
		1200	900			720	700	600	540	450
	平原菟絲子	1550	1250							
		647	431							
		647								
UBC 835	台灣菟絲子	990	900	800			520	420		
		990	900				520	420		
	日本菟絲子	990	900				520	420	370	
		990	900				520	420		
		990	900		700		520	420		
UBC 836	平原菟絲子	3000	1900	690						
				700	530	470				
	台灣菟絲子			700	530					
				700	530					
		1000		700	530					
UBC 840	日本菟絲子		750							
				700						
	平原菟絲子	1950	900	700						
		1500	1400			800		590	480	
		1500	1400			800	650		400	
UBC 840	台灣菟絲子	1500	1400			800	650	590	480	
		1500	1400			800	650	590	480	
	日本菟絲子	1500	1400		1000	800	700	590		
		1500	1400		1000	800		590		
		1500	1400			800	650	590	480	
UBC 840	平原菟絲子	1500	1400			800		590	480	
		1500	1400			800		590	480	

Primer		Amplified DNA (bp)						
UBC 841	台灣菟絲子	1000	820		700			
			820		700			
		1000	820	750	700			
	日本菟絲子	1000	820		700			
			820		700			
			790					
UBC 844	台灣菟絲子	900	790					
		1200	1050		800	750	590	
		1200	1050	900	800		590	
		1200	1050	900	800	750	590	
		1200	1050		800	750	590	500
	日本菟絲子	1200	1050		800	750	590	
		1200	1050	900				550
		1200	1050	900				
		1500	990	850				
		1500		1100	890	700	600	
UBC 846	台灣菟絲子	1500		1100		700	600	
		1500		1100	890	700		
	日本菟絲子	1500		1100	890	700	600	
			1300	1100		700	600	
		950	580					

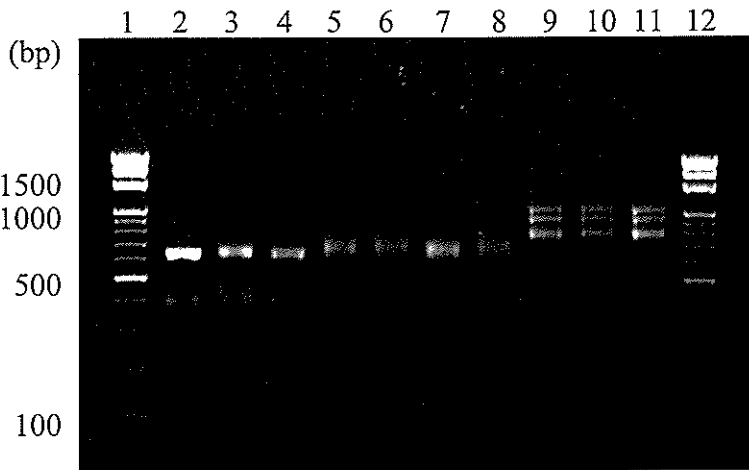


圖 2. 利用 UBC 823 引子增幅 10 個菟絲子樣品之核酸片段。(第 1 與 12 欄為 DNA markers, 第 2-4 欄為台灣菟絲子(No.1-3 樣品), 第 5 欄為台灣菟絲子(No.10 樣品), 第 6-8 欄為日本菟絲子(No.15-17 樣品), 第 9-11 欄為平原菟絲子(No.31-33 樣品)。)

Fig. 2. The DNA fragments of 3 *Cuscuta* species from 9 samples were obtained by ISSR-PCR amplification using UBC 823 primer. (Lanes 1 and 12 were DNA markers, lanes 2 to 4 were samples No. 1-3 of *C. japonica* Choisy var. *formosana* (*Cjf*), lane 5 was samples No. 10 of *Cjf*, lanes 6 to 8 were samples No. 15-17 of *C. japonica* Choisy var. *japonica* and lanes 9 to 11 were samples No. 31-33 of *C. campestris* Yunck.)

表 3. 利用 UBC 823 引子增幅 46 個菟絲子樣品之核酸片段。

Table 3. The DNA fragments of 3 *Cuscuta* species from 46 samples were obtained by ISSR-PCR amplification using UBC 823 primer.

Sample No.	<i>Cuscuta</i>	Amplified	DNA (bp)
1-9	Cjf*	431	647
10-14			647
15-30	Cjj		647
31-46	Cc	800	900
			1100

*Cjf: *Cuscuta japonica* Choisy var. *formosana* (Hay.) (台灣菟絲子)

Cjj: *Cuscuta japonica* Choisy var. *Japonica* (日本菟絲子)

Cc: *Cuscuta campestris* Yunck. (平原菟絲子)

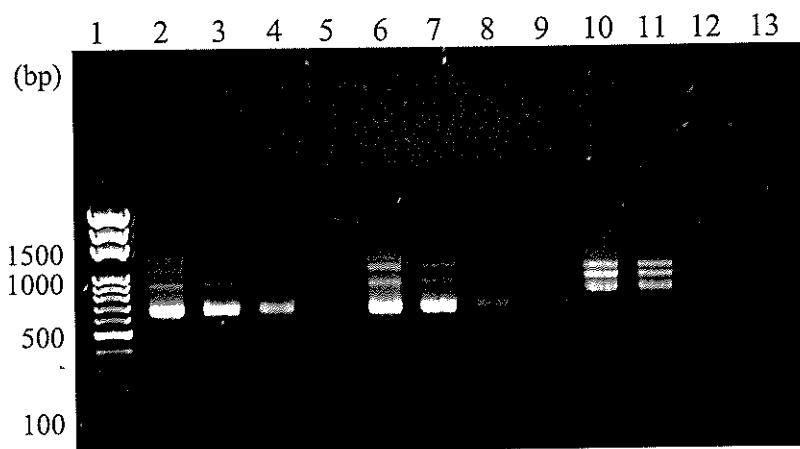


圖 3. 利用 UBC 823 引子比較 3 種菟絲子不同基因組 DNA 含量所增幅之核酸片段。(第 1 欄為 DNA marker, 第 2-5 欄為台灣菟絲子, 第 6-9 欄為日本菟絲子, 第 10-13 欄為平原菟絲子。DNA 含量於第 2, 6 及 10 欄為 10 ng, 第 3, 7 及 11 欄為 1 ng, 第 4, 8 及 12 欄為 100 pg, 以及第 5, 9 及 13 欄為 10 pg。)

Fig. 3. The DNA fragments of 3 *Cuscuta* species from 4 different genomic DNA contents of samples were obtained by ISSR-PCR amplification using UBC 823 primer. (Lanes 1 was DNA markers, lanes 2 to 5 were and 12 were DNA markers, lanes 2 to 5 were *C. japonica* Choisy var. *formosana* (Hayata) Yunck., lanes 6 to 9 were *C. japonica* Choisy var. *japonica*, lanes 10-13 were *C. campestris* Yunck. DNA contents: lanes 2, 6 and 10 were 10 ng, lanes 3, 7, 11 were 1 ng, lanes 4, 8 and 12 were 100 pg and lanes 5, 9 and 13 were 10 pg.)

討論

菟絲子屬物種的主要鑑定依據為莖、花果及種子之外觀形態特徵, 包括花瓣、花柱、花粉、蒴果及種子花紋、種臍等(Parker and Riches 1993)。然而不同菟絲子

的花果形態近似，種子型小，細微特徵不明顯，同時莖部常出現中間形態，極易發生鑑定錯誤之現象(Liao *et al.* 2000)。因此，菟絲子屬植物鑑定方法之研究亦有種子組織、種皮細胞、內含物之細胞學鑑定(金和李 1990)；酚類或類黃酮含量之生化鑑定(Christiane *et al.* 1997; Ye *et al.* 2002)；過氧化物酶(peroxidase, *POD*)及麩氨酸草醋酸轉氨基酶(glutamine-oxaloacetic transaminase, *GOT*)之同工酶鑑定(郭等 2000)，此等方法之結果易因生長環境、發育時期或樣品的不同組織部位而改變，且分析步驟繁瑣，限制了快速檢驗之應用。

分子標誌已普遍應用於植物親緣及物種鑑別，前人研究顯示 7 種藥用菟絲子的轉錄區間(internal transcribed spacer, *ITS*)序列具高度保留性，只用於區別是否為菟絲子屬植物(高, 2006)。而不同菟絲子於 16S ribosomal RNA (16S *rRNA*) 至 valine transfer RNA (*TrnV*)基因區間長度及 16S *rRNA* 啟動子長度具特异性(Krause *et al.* 2003)，其鑑別之應用性仍待探討。探討台灣中部地區平原菟絲子於核糖體基因的遺傳變異與群叢關係，利用 nrDNA *ITS* 核酸序列分析 40 個平原菟絲子，可區分為兩大群，此 2 群相似度(identity)介於 96-97%之間(袁等 2005)。廖(2004)曾以 RAPD 方法應用於寄生植物菟絲子之遺傳研究，台灣產菟絲子屬於種間及種內皆呈現高度的 DNA 多型性，經親緣關係分析以日本菟絲子與台灣菟絲子親緣最近(廖, 2004)，但此 RAPD 歸群的結果無法明確鑑別日本菟絲子與台灣菟絲子兩變種。

本研究於田間採集外觀形態不同之 46 個菟絲子樣品，先依形態特徵區別為 14 個台灣菟絲子、16 個日本菟絲子及 16 個平原菟絲子。利用 ISSR-PCR 反應篩選 45 個 UBC ISSR 引子，其中編號 811、813、823、835、836、840、841、844 及 846 等 9 種 ISSR 引子，皆可於台灣菟絲子、日本菟絲子及平原菟絲子增幅出不同之多型性核酸片段，以台灣菟絲子樣品最分歧，多型性有 2-8 種，日本菟絲子多型性有 2-3 種(表 2)，平原菟絲子樣品增幅的核酸片段一致性最高，顯示 3 種菟絲子種內遺傳變異性之高低。

僅以 UBC 823 引子可於 3 種菟絲子分別增幅出特异性 DNA 片段：日本菟絲子分布於台中市、南投縣市及嘉義縣的 16 個樣品，只要花冠長介於 3-4 mm，不論莖部是否有紫紅色瘤狀斑點，皆增幅 647 bp 單一片段；平原菟絲子分布於 10 個縣市的 16 個樣品，皆增幅 800、900 及 1100 bp 3 條 DNA 片段；而 14 個台灣菟絲子樣品有 2 種增幅結果：9 個樣品(包括南投縣 7 個樣品及高雄縣 2 樣品)，增幅 647 及 431 bp 2 條 DNA 片段，5 個樣品(包括屏東縣 3 個樣品及高雄縣 2 樣品)，只增幅 647 bp DNA 片段，此 5 個樣品，外觀形態似台灣菟絲子，但遺傳質卻似日本菟絲子的中間型生物種。廖(2004)亦曾報導日本菟絲子與台灣菟絲子的外部形態差異不大，此 2 種菟絲子形態特徵有相左或中間型而難以鑑定。

進行 ISSR 的實驗前萃取 DNA 基因組之品質是個影響之一，不同抽取方式與步驟會影響 DNA 分解(degradation)的速度(Jauhar 1996)。PCR 過程中主要影響因素為引子與 DNA 模板的比例，尤其是 DNA 模板濃度與 PCR 反應條件會影響引子的所增幅 DNA 片段的靈敏度及專一性。李等(2007)針對平原菟絲子 ISSR-PCR 反應過程中，探討煉合溫度、鎂離子、BSA 濃度、DNA 模版濃度、引子濃度及 Taq DNA polymerase 濃度，對增幅核酸片段的影響。本研究測定 3 種菟絲子基因組 DNA 可檢出之濃度，顯示使用 100 pg DNA 濃度可於 3 種菟絲子分別增幅明顯核酸片段。

本研究建立以 UBC 823 引子之 ISSR 分子標誌，可於台灣菟絲子、日本菟絲子及平原菟絲子分別增幅出特異性 DNA 片段，配合外觀形態之比對，亦證實日本菟絲子已出現於台中市、南投縣市及嘉義縣，且於屏東縣霧台鄉及高雄縣桃源鄉的菟絲子出現台灣菟絲子及日本菟絲子的中間型，此檢測方法可提供未來台灣地區菟絲子種類之鑑定，及協助入侵植物的管理與防除。

謝誌

本研究為執行行政院農委會『96 農科-14.2.1-藥-P5(2)』計畫，之部分成果。

引用文獻

- 方瑞征、黃素華。1979。旋花科。中國植物志。第64卷。78頁。
- 呂福原。1972。台灣產旋花科植物分類之研究。中華林學季刊6：105-160。
- 李建輝、金則新、李鈞敏。2007。田野菟絲子ISSR-PCR反應體系的建立與優化。江蘇農業科學4：58-60。
- 牧野富太郎。1947。旋花科。牧野新日本植物圖鑑。507-508頁。
- 金曉、李家實。1990。中藥菟絲子的顯微鑑定研究。中國中藥雜誌15(4): 9- 11, 58。
- 高必達、程毅等。2006。基於ITS序列的菟絲子PCR 鑑定。湖南農業大學學報32(4):368- 370。
- 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。
- 許志剛。2008。植物檢疫學。高等教育出版社。345頁。
- 郭鳳根、李揚漢。2000。雲南省菟絲子的同工酶分析。西南農業學報13(4): 118- 121。
- 廖國焜、蔡進來、陳明義。1990。台灣之新記錄植物—日本菟絲子。中華林學季刊23：23-25。
- 廖國焜。2004。台灣產菟絲子屬植物之族群生態研究。國立中興大學生命科學系研究所博士論文。
- Berg S, K Krupinska, K Krause (2003) Plastids of three *Cuscuta* species differing in plastid coding capacity have a common parasite-specific RNA composition. *Planta* 218: 135-142.
- Bornet B, C Muller, F Paulus, M Branchard (2002). Highly informative nature of inter simple

- sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflowerer (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome* 45(5): 890-6.
- Bornet B, M Branchard (2004) Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas* 140(3): 245-8.
- Capparelli R, M Viscardi, MG Amoroso, G Blaiotta, M Bianco (2004) Inter-simple sequence repeat markers and flow cytometry for the characterization of closely related *Citrus limon* germplasms. *Biotechnol Lett.* 26(16): 1295-9.
- Chang CE (1978) *Convolvulaceae*. In H. L. Li, T. C. Huang, T. Koyama, and C. E. DeVol (eds.) . *Flora of Taiwan*, Vol. IV. Epoch Pub. Co., Ltd., Taipei, Taiwan, pp. 351-354.
- Christiane L, FC Czygan, P Prokscht (1997) Phenolic constituents as taxonomic markers in the genus *Cuscuta* (Cuscutaceae) [J]. *Biochem. Syst. and Ecol.* 25: 297- 303.
- Godwin ID, EA Aitken, LW Smith (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis.* 18(9): 1524-8.
- Jauhar PP (1996) *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press.
- Kojoma M, O Iida, Y Makino, S Sekita, M Satake (2002) DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Planta Med.* 68(1): 60-3.
- Kolodinska BA, R von Bothmer, C Dayteg, I Rashal, S Tuveesson, J Weibull (2004) Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas* 141(2): 186-92.
- Krause K, S Berg, K Krupinska (2003) Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP- promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta* 216(5): 815- 823.
- Kuoh CS, SH Tasi Chiang (1989) Host plants and the haustorium of *Cuscuta japonica* Choisy var. *formosana* (Hay.) Yuncker (*Convolvulaceae*) . *Taiwania* 34: 11-27.
- Liao GI, MY Chen, CS Kuoh (2000) *Cuscuta* L. (Convolvulaceae) in Taiwan. *Taiwania* 45:226-234.
- Parker C, CR Riches (1993) *Parasitic Weeds of the World: Biology and Control*. CAB Int., Wallingford, UK.
- Rakoczy-Trojanowska M, H Bolibok (2004) Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell Mol Biol Lett.* 9(2): 221-38.
- Sica M, G Gamba, S Montieri, L Gaudio, S Aceto (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genet.* 18; 6(1):17.
- Staples GW, SZ Yang (1998) *Convolvulaceae*. In T. C. Huang *et al.*(eds.), *Flora of Taiwan*, Vol. IV, 2nd ed. Department Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, pp. 341-384.
- Ye M, LI Yan, Y Yan, H Liu, JI Xiuhong (2002) Determination of flavonoids in Semen *Cuscutae* by RPHPLC. *Journal of Pharm aceutical and Biomedical Analysis* 28: 621- 628.
- Yuncker TG. (1932) The genus *Cuscuta*. *Memoirs of the Torrey Botanical. Club* 18:253.
- Zietkiewicz E, A Rafalski, D Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20(2):176-183.