

台灣蔓澤蘭屬植物之族群遺傳變異

曾國洋¹、周昌弘^{1,2,3}

¹國立中山大學生物科學所

²國立屏東科技大學

(³通訊作者 E-mail:choumasa@mail.npust.edu.tw)

摘 要

利用直接定序 (PCR- Sequencing) 和簡單序列重複區間 (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeat) 分子標誌技術以確認「節位突起 (enation-structure)」辨識蔓澤蘭 (*Mikania cordata* (Burm. f.) B. L. Robinson) 和小花蔓澤蘭 (*Mikania micrantha* H. B. K.) 的穩定性和族群遺傳變異的情形。結果顯示核內核醣體 DNA 內轉錄基因間隔區 (nrDNA ITS region) 序列和 ISSR 分子指紋分析均支持節位突起辨識的穩定性, 因此建議農政單位利用節位突起的辨識方法推廣「除蔓活動」, 如此可降低對本土弱勢的蔓澤蘭所造成的衝擊。進一步以 ISSR 的數據分析蔓澤蘭和小花蔓澤蘭的族群遺傳變異, 結果顯示兩種蔓澤蘭屬植物種內族群間有很高的遺傳分化 ($G_{st} > 0.55$), 其中小花蔓澤蘭的遺傳距離與地理距離無關 ($r = 0.0053$, $p = 0.47$), 推測小花蔓澤蘭入侵台灣時具有不同的遺傳變異, 受到人為活動隨機的散佈, 各地族群由少數個體 (先驅者) 所建立, 由於此種族群結構易受遺傳漂變 (genetic drift) 的影響, 使對偶基因隨機漂失或固定造成族群分化, 其中分化主要發生在東、南部族群與離島 (澎湖、綠島) 或北部族群 (台北、苗栗) 之間; 本土蔓澤蘭則與地理距離相關 ($r = 0.44$, $p = 0.025^*$), 符合距離隔離模式 (isolation by distance model), 推測應是自然散佈的結果。整體來說, 小花蔓澤蘭的族群結構呈現穩定的狀態, 故建議防治研究應針對分化大的族群進行。

(關鍵詞: 小花蔓澤蘭、蔓澤蘭、族群遺傳變異、簡單序列重複區間)

前 言

在分類上蔓澤蘭屬 (*Mikania*) 植物係屬菊科 (Asteraceae), 澤蘭族 (Eupatorieae), 蔓澤蘭亞族 (Mikaniinae), 在全世界約有 430 多種, 主要分布在熱帶美洲, 其中有三種廣布的有害雜草, 分別是米甘草 (*M. scandens* (L.) Willd.) 小花蔓澤蘭 (*M. micrantha* H. B. K.) 以及蔓澤蘭 (*M. cordata* (Burm. f.) B. L. Robinson) (孔等, 2000b), 然三者當中又以小花蔓澤蘭的入侵性最強 (Hills, 1999), 國際保育聯盟 (IUCN, 2001) 已將其列入全球 100 種最具危害力的外來入侵物種之一。在台灣地區除了有原生的蔓澤蘭 (*M. cordata*) 之外, 尚有入侵種小花蔓澤蘭 (*M. micrantha*), 而米甘草 (*M. scandens*) 目前則未被紀錄。三種蔓澤蘭屬雜草的區分主要依據花器特徵 (總苞、頭花、瘦果、冠毛等) (孔等, 2000b; 陳等, 2002)。但由於三者的營養器官十分相似, 不易區分, 經常造成混淆, 影響防治工作的進行。根據行政院農委會農業藥物毒物試驗所, 陳等 (2002) 的報告指出, 蔓澤蘭和小花蔓澤蘭除了花器大小上的差異外, 莖節上的節位突起 (enation structure) 形態亦有顯著的不同, 小花蔓澤蘭呈半透明薄膜狀撕裂形突起, 而蔓澤蘭則呈不透明皺褶耳狀突起。利用隨機多型性核酸 (RAPD-PCR) 技術所產生的專一性條帶, 也可輔助確認兩種蔓澤蘭屬植物。由於該研究僅分析中部地區 (太平、埔里、國姓、南投市) 的樣本, 有必要擴大取樣範圍以及應用更多的分子標誌技術, 一方面確認營養器官節位突起辨識的穩定性, 另一方面, 由於 RAPD 的條帶在同種不同個體間有所不同, 值得進一步探討兩種蔓澤蘭屬雜草的族群遺傳變異 (population genetic variation) 的情形, 作為農業單位防治小花蔓澤蘭時的參考依據。

現代分子生物學所發展各類 DNA 分子標誌 (molecular marker) 技術, 能直接反應 DNA 水平的遺傳變異, 在品種鑑定、遺傳圖譜建構、物種親緣關係、系統演化、以及親緣地理等研究方面獲得廣泛的應用。以 PCR 技術為核心的 DNA 分子標誌技術快速發展, 主要有兩大類, 一為針對標的序列分析的技術, 例如直接定序 (PCR-sequencing) 切割擴增多型性序列 (CAPS, Cleaved Amplified Polymorphic sequence 或 PCR-RFLP), 簡單序列重複 (Simple Sequence Repeat, SSR) 等; 一為偵測整個基因組變異的技術, 例如: 隨機擴大多型性核酸 (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) 擴大大片段長度多型性 (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphisms) 簡單序列

重複區間 (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) 等，其中由 Zietkiewicz 等 (1994) 所發展出的 ISSR 技術，具有高多型性、高再現性、操作方便以及花費較少等優點。

本研究應用節位突起辨識法在台灣北、中、南、東及離島地區各設置 2~4 個取樣點，依分布情形與實驗目的進行採集。共採集小花蔓澤蘭 16 個族群，84 個樣本，蔓澤蘭 9 個族群，48 個樣本，藉由 PCR-sequencing 及 ISSR 兩種分子標誌技術的分析，確認節位突起辨識法的穩定性以及進一步分析台灣兩種蔓澤蘭屬植物族群遺傳變異的情形和族群分化程度。其中在 PCR-sequencing 方面選取核糖體 DNA 內轉錄間隔區 (nrDNA ITS, nuclear rDNA Inter-Transcribed Spacer) 及葉綠體 DNA *trn L* (UAA) intron、*trn L* (UAA) -*trn F* (GAA) IGS，此三段序列是基因組中變異較快的區域，適合作為近緣種間的分分子標誌 (Scheiber *et al.*, 2000; 黃&徐, 2001; Gielly and Taberlet, 1996)。

結果與討論

一、物種的鑑定

由實驗結果可知 PCR-sequencing 中兩段葉綠體序列 (*trn L* intron 和 *trn L-trn F* IGS) 無法區分蔓澤蘭和小花蔓澤蘭，僅 nrDNA ITS 序列可將蔓澤蘭、小花蔓澤蘭甚至米甘草，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% 的序列相似度。利用鄰接法所獲得的樹狀圖顯示，蔓澤蘭和小花蔓澤蘭親緣關係較之與米甘草來的接近。另外 ISSR 的條帶分析中，根據 DICE 相似度矩陣，經 UPGMA 歸群的結果發現蔓澤蘭和小花蔓澤蘭在相似度 0.23 之處立即被分成兩群，而 AMOVA 的分析也顯示種間的變異佔總變異的 93% ($p < 0.001$)，nrDNA ITS 序列和 ISSR 分析的結果除了顯示蔓澤蘭和小花蔓澤蘭的差異之外，亦支持節位突起辨識法的高穩定性。因此，節位突起辨識法可作為蔓澤蘭和小花蔓澤蘭非開花時期種間辨識的依據，nrDNA ITS 序列，及 ISSR 種間的專一性條帶則一方面可作為輔助確認，另一方面也可作為未來疑似雜交種的判定，由 ISSR 的分析雜交種可能介於兩者之間。例如蔡 (2001) 應用 ISSR 研究台灣水柳與水社柳之遺傳變異時，根據 UPGMA 歸群圖及主座標分析的結果，可將水柳及水社柳分成兩群，但水

柳中的左營族群介於水柳和水社柳之間，且較偏水社柳，葉部型態也介於兩種柳樹之間，被判定為雜交種。Hollingsworth 等 (1998) 利用 ISSR 和 RAPD 分析蓼科 (Polygonaceae) 兩種 *Fallopia* 屬的外來入侵種 (*F. saxhalinensis* 和 *F. japonica*) 族群遺傳結構和種間的交互作用，根據兩種分子標誌技術 split decomposition 圖所顯示的基因型關係，雜交種 (*F. bohemica*) 介於兩種之間，且型態上疑似 *F. japonica* 和 *F. bohemica* 的回交種亦忠實的介於兩者之間。

二、族群遺傳變異

以 ISSR 的結果分析兩種蔓澤蘭屬植物族群遺傳變異的分布情形。從多型性條帶的紀錄來看，小花蔓澤蘭 34 個多型性條帶中有 13 個 (佔 38%) 條帶僅出現在特定族群內或僅在特定族群不出現，如條帶 810-8 僅出現在壽卡族群內、條帶 825-8 僅在壽卡族群不出現；而蔓澤蘭 13 個多型性條帶，則有 8 個 (佔 61%) 條帶僅出現在特定族群內或僅在特定族群不出現，如條帶 886-16 僅在宜蘭族群出現，顯示族群的特殊性。從奈氏 (Nei) 基因歧異度 (H) 所推估的遺傳分化值來看，小花蔓澤蘭族群間的遺傳分化 $G_{st}=0.5969$ ，略高於蔓澤蘭的遺傳分化 $G_{st}=0.5537$ ，顯示族群間的基因歧異度佔總基因歧異度 55% 以上。從分子變異分析 (AMOVA) 來看，小花蔓澤蘭族群間的變異佔總變異的 47.41%，而蔓澤蘭族群間的變異則佔總變異的 41.92%。若比較一般異交植物的 RAPD 分子標誌所得的結果， G_{st} 、AMOVA 通常 $<20\%$ (Bussell, 1999)，因此台灣地區蔓澤蘭和小花蔓澤蘭的族群遺傳變異主要分佈在族群間，且有顯著的遺傳分化。

進一步分析台灣小花蔓澤蘭和蔓澤蘭族群分化主要發生在哪些族群之間。依 Wright (1931) 的意見，若基因流傳 $N_m > 1$ ，則族群間至少每個世代有超過 1 個個體的遷移，可使族群均質化避免族群分化。依此標準，將 UPGMA 的歸群圖上較相近的族群合併，計算其族群間的基因流傳值。結果顯示在小花蔓澤蘭方面 (整體的基因流傳值僅 0.34)，可將台灣 14 個族群歸為三大群和其他 7 個小族群。第一群是大武山和花蓮 ($N_m=1.56$)，第二群是雲林、藤枝、小琉球 ($N_m=1.38$)，第三群是嘉義和綠島 (1.23)，從主座標分析的立體圖來看，這三大群內的族群在立體空間的位置也較接近，但歸群方式似乎和地理無關。利用 Mantel test 檢測小花蔓澤蘭西部族群地理距離和遺傳距離 (Φ_{st}) 的相關性 ($r=0.0053$, $p=0.47$)，顯示沒有顯著相關。這可能是入侵之後，受人為活動的影響 (如交通、栽種)，隨機的散佈，使族群間的親源關係與地理無關。若依據 Ellstrand and Elam (1993) 的意見，基因流傳

值只要大於 0.5 則被認為足以克服隨機漂變所造成的分化，那麼可將這三大群及台東、壽卡等 9 個族群再併為一大群（基因流傳值 $N_m = 0.5168$ ）。因此以較不嚴格的基因流傳為標準（ $N_m > 0.5$ ），台灣 14 個小花蔓澤蘭族群的分化主要發生在 9 個族群所併成的大群和其他 5 個小族群之間。在本土蔓澤蘭方面（整體 N_m 值約 0.40），9 個族群依據 $N_m > 1$ 的標準可分為兩大群和其他三個族群，第一群是西部群（ $N_m = 2.54$ ），包括新竹、台中、嘉義、藤枝；第二群是東部群（ $N_m = 1.17$ ），包括屏東壽卡和宜蘭。依據主座標分析，這兩大群和其他三個族群在空間關係上似乎與地理相關。利用 Mantel test 檢測蔓澤蘭族群（除宜蘭族群外）地理距離和遺傳距離（ Φ_{st} ）的相關性（ $r = 0.438$, $p = 0.025$ ），顯示有顯著的相關性。由此可知本土蔓澤蘭自然散佈的結果符合 Wright（1943）所提出的距離隔離（isolation by distance）模式。也就是基因流傳主要發生在鄰近的族群間，因此距離越相近的族群，遺傳組成也越相似。若以 $N_m > 0.5$ 的標準來看，可將東部群、西部群和綠島等 7 個族群再歸為一大群（ $N_m = 0.6$ ）。因此台灣的蔓澤蘭族群分化主要發生在 7 個族群併成的大群和烏來、蘭嶼兩個小族群之間。蘭嶼族群在葉部型態上與台灣的族群有顯著的差異，其較為多毛且厚，此特徵在帶回台灣的枝條所冒出的新葉上仍可發現，但因其溫室中培養生長不良半年後全數死亡，無法繼續觀察此特徵的穩定性，未來可直接從蘭嶼帶回種子播種，檢測幼苗是否具有該特徵，可確定是否具有遺傳性，進一步說明該特徵是蘭嶼族群為了適應多風且高鹽的環境方向性天擇的結果。另外，烏來與其他族群的高度分化，因為和西部群似乎沒有明顯的地理隔離因素，推論可能是當初拓殖時創始者效應，再加上受長期天擇（如溫度或土壤特性）的影響，與其他族群產生分化，此點有待進一步驗證。

依據 Hamrick and Godt（1989）的意見（主要是 allozyme 的數據），異交植物的 $G_{st} = 0.2$ 而自交植物的 $G_{st} = 0.5$ 。若以此為標準，小花蔓澤蘭和蔓澤蘭應該歸為自交植物類群（ $G_{st} > 0.55$ ）。但從文獻中得知，小花蔓澤蘭是屬於異交或自交均可的植物，且為雙子葉、多年生草本、昆蟲傳粉、可產生大量的種子，種子藉由風力傳播，其依據 Hamrick and Godt（1989）的統計， G_{st} 值介於 0.143 到 0.273 之間。顯然台灣的小花蔓澤蘭和蔓澤蘭族群實際的 G_{st} 值和與其生活史特性匹配的 G_{st} 值有顯著差異。族群遺傳變異的分布除了受植物本身的特性及分布狀況（如交配系統、物候、生殖方式、花部型態、種子傳撥機制等）影響之外，尚受三種主要的自然力所左右，分別是天擇（natural selection）、基因漂變（genetic drift）和基因流傳（gene flow）（Loveless and

Hamrick, 1984; Hamrick and Godt, 1989; Huang, 1992)。隨著世界貿易和旅遊的增加，非原生植物、動物和病原菌的侵擾和威脅也跟著增加。這些物種不只威脅人類的健康和農業，也危害整個自然生態。通常新的入侵族群是來自原產地少數幾個個體所組成（具有原族群部分的遺傳變異）(Elton, 1958)。由於創始者效應（founder effect）和瓶頸效應（bottleneck effect）因基因漂變而導致族群內遺傳歧異度的降低，而增加族群間的歧異度（Nei *et al.*, 1975）。由此推論台灣地區的小花蔓澤蘭族群高度的遺傳分化主要是因為小族群受到遺傳漂變的影響，使族群內的基因隨機流失，降低遺傳變異，致使族群間的遺傳分化程度增加。另一方面，本土蔓澤蘭族群的高度遺傳分化則可能與早期進入台灣後經創始者效應的基因漂變和長期在不同環境下的天擇有關。創始者效應是隨機的基因流失，沒有方向性，而天擇通常帶動有方向性的族群分化，和環境因子呼應，兩者均會提高族群內的均質度增加族群間的分化。

結論與建議

根據 nrDNA ITS 序列以及 ISSR 分析的結果，均支持小花蔓澤蘭和蔓澤蘭節位突起辨識的有效性及穩定性。建議農政單位在推動「除蔓活動」時，可教導民眾這個在非開花時期的簡易辨識方法，如此可降低對本土弱勢蔓澤蘭的衝擊。研究期間發現小花蔓澤蘭在南部山區已可達海拔 1600 公尺，與原生蔓澤蘭的棲地重疊。在南部、東部山區均可發現小花蔓澤蘭和蔓澤蘭混生，根據 nrDNA ITS 序列以及 ISSR 分析的結果，並未發現疑似雜交的個體或族群。11 月至翌年 2 月是花期的重疊期，未來可針對這些混生區進行形態觀察及應用適當的分子標誌（如 ISSR 或胞器 DNA 定序等），了解其雜交或漸滲雜交情形，並注意雜交種的新基因型組合與其入侵能力的關係。

ISSR 的分析結果得知，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（ $G_{st} > 0.55$ ）。因此在生物防治上的建議是應從原產地不同的地區引進天敵，選取分化較大的族群如雲林（或藤枝）、大武山（或花蓮）、壽卡、壽山、台東、嘉義、彰化，分別測試其與天敵的專一性，提高防治的成效。未來可利用分子標誌比較原產地與入侵地族群的親緣關係，可進一步縮小至原產地搜尋天敵的範圍，節省生物防治的時間和金錢。其他防治方法，如化學殺草劑的使用，也應注意分化程度高的族群，是否有不

同程度的抗藥性。

引用文獻

1. 孔國輝、吳七根、胡啟明。2000a。外來雜草(*Mikania micrantha* H. B. K.) 在我國的出現。熱帶亞熱帶植物學報 8(1): 27。
2. 孔國輝、吳七根、胡啟明、葉萬輝。2000b。微甘菊(*Mikania micrantha* H. B. K.)的形態、分類與生態資料補記。熱帶亞熱帶植物學報 8(2):128-130。
3. 陳富永、徐玲明、蔣慕琰。2002。小花蔓澤蘭形態區別及 RAPD-PCR 分析。植物保護學會會刊 44: 51-60。
4. 黃士穎、徐國凱。2001。應用葉綠體 *trn F-trn L* 核酸序列探討台灣八種杜鵑花之分子親緣關係。台灣林業科學 16(3): 153-60。
5. 蔣慕琰、徐玲明、陳富永。2002。入侵植物小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha* Kunth) 之確認。植物保護學會會刊 44: 61-65。
6. 蔡承憲。2001。應用 ISSR 研究台灣水柳與水社柳枝遺傳變異。國立中興大學植物學系碩士論文。
7. Bussell, J. D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.* **8**, 775-789.
8. Elton, C. 1958. The ecology of invasions by animals and plants. Chapman and Hall, London, 181.
9. Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **24**, 217-242.
10. Gielly, L. and P. Taberlet. 1996. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trn L* (UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* **120**, 57-75.
11. Hamrick, J. E. and M. J. W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plants. In: Broen, A. H. D., Clegg, M. T., Kahier, A. L., Weir, B. S. (Eds.), Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resource. Sinauer, Sunderland, Massachuset, 43-63.

12. Hills, L. A. 1999. Mile-a-minute (*Mikania micrantha*). *Agnote*, 535.
<http://www.dpif.nt.gov.au/dpif/pubcat>
13. Hollingsworth, M. L., P. M. Hollingsworth, G.I.Jenkins, J. P. Bailey, and C. Ferris. 1998. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). *Mol. Ecol.* **7**, 1681-1691.
14. Huang, S. 1992. Patterns of genetic variation in northern red oak (*Quercus rubra* L.) populations in midwestern United Staes. Ph. D. dissertation, Univ. of Missouri, St. Louis.
15. IUCN. 2001. Aliens. http://www.issg.org/aliens_newsletter/Aliens13.pdf
16. Loveless, M. D. and J. L. Harmrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **15**, 65-95.
17. Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.
18. Nei, M., T. Maruyama, and R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in population. *Evolution* **29**, 1-10.
19. Scheiber, S. M., R. L. Jarret, D. Robacker, and M. Newman. 2000. Genetic relationships within *Rhododendron* L. section Pentanthera G. Don bases on sequence of the internal transcribed spacer (ITS) region. *Sci. Hort.* **85**, 123-35.
20. Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
21. Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian population. *Genetics* **16**,97-159.
22. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplication. *Genome* **20**, 176-183.

Population genetic variation of *Mikania* species in Taiwan

GUO-YANG TZENG,¹ CHANG-HUNG CHOU^{1,2,3}

¹Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University.

²National Pingtung University of Science & Technology.

(³Corresponding author E-mail: choumasa@mail.npust.edu.tw)

Summary

The objective of this study is to elucidate the efficiency of enation-structure (at node) recognition method at pre-flowing stage and to understand the population genetic variation of the *Mikania* weeds in Taiwan. Using PCR–sequencing and ISSR marker techniques, the recognizing techniques of enation-structure was supported by the nrDNA ITS region and ISSR results. Thus the finding can be recommended to the Council of Agriculture in order to eliminate the weed and to reduce the impact on *M. cordata*, which is native in Taiwan. Moreover, the findings of ISSR analysis in the aspect of population genetic variation indicated that high genetic differentiation ($G_{st} > 0.5$) was found among the *M. cordata* and *M. micrantha* populations. Based on the Mantle test, there was no relationship between genetic distance and geographic distance in *M. micrantha* ($r = 0.0053$, $p = 0.47$). This phenomenon revealed that populations of *M. micrantha* had complex population variability within the short-term invaded into Taiwan that might be resulted from the random dispersion of human activities. The population of *M. micrantha* was established by few individuals (founders) and grown rapidly in Taiwan, resulting in population differentiation via genetic drift. In contrast to *M. micrantha*, there was relationship between genetic distance and geographic distance in *M. cordata* ($r = 0.44$, $p = 0.025^*$). It revealed that populations of *M. cordata* agreed to the concept of isolation by distance model, which might be evolved from the result of natural dispersion. In conclusion, the population structure of *M. micrantha* in Taiwan is stable, suggesting that control

of *Mikania* population should be based on different populations where have large differentiation among them.

(Key words : *Mikania micrantha*, *Mikania cordata*, population genetic variation, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR))

Conference “The Harmful Effect and Field Management of *Mikania micrantha*”, p.1-10, WSSROC.