

利用 ISSR 及 RAPD 分子標誌鑑定外來入侵植物—南美獨行菜(*Lepidium bonariense* L.)與獨行菜(*L. virginicum* L.)

蘇承鉉¹ 林李昌² 蔣慕琰² 袁秋英^{1,2*}

¹私立朝陽科技大學生化科技研究所

²農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組

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。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，本研究以簡單序列重複區間(Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)及隨機增幅片段多型性(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)分子標誌技術，針對南美獨行菜與獨行菜葉片中基因組核酸之差異，篩選出 ISSR 編號為 UBC807、818、820、823、846、849、855、873 及 881 等 9 個引子，可於南美獨行菜與獨行菜分別增幅 300-3,000 bp 之間的 2 至 7 條多型性核酸條帶；亦篩選出 RAPD 編號為 4、16、17、23、25、30、31 及 50 等 8 個引子，可分別增幅 400-2,000 bp 之間的 2 至 8 條多型性核酸條帶。再以可明顯區別此 2 植物的 ISSR UBC820、823、846、849 等 4 個引子及 RAPD 16、17 及 31 等 3 個引子進行南美獨行菜與獨行菜種子之檢測，僅需 50 ng DNA 為模板，皆可增幅出與葉片相同長度的主要核酸，具顯著區別南美獨行菜及獨行菜之效果，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，協助外來入侵植物風險評估之舉證。

關鍵詞：入侵植物、南美獨行菜、獨行菜、分子標誌、簡單序列重複區間、隨機增幅片段多型性。

* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

Use of ISSR and RAPD markers in identification of invasive plants-*Lepidium bonariense* L. and *L. virginicum* L.

C. H. Su¹, L. C. Lin², M. Y. Chiang², and C. I. Yuan^{1,2*}

¹ Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of technology, Taichung, Taiwan.

² Division of Plant Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan.

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. Thus developing accurate, fast and sensitive methods to detect harmful exotic plants is one of the most important projects of plant inspection and quarantine works. *Lepidium bonariense* L., an annual Brassicaceae plant native to South America, has become a naturalized plant in Taiwan in recent decades. As the morphological characteristics are similar, *L. bonariense* L. has been easily misidentified with *L. virginicum* L. DNA-based molecular markers have been used to detect the genetic diversity of invaded alien species. Novel methods for the identification of *L. bonariense* and *L. virginicum* at the early stage of plant development based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in this study. The results of ISSR and RAPD analysis, only #820, 823, 846, 849 ISSR UBC primers and # 16, 17, 31 RAPD primers could significantly distinguish *L. bonariense* and *L. virginicum* by 2-7 and/or 2-8 different polymorphic markers. These results indicated that ISSR and RAPD methods can rapid, accurate identification of *L. bonariense* and may assist the effective management of this invasive species to maintain the balance of biodiversity in agricultural ecosystems.

Key words: Invasive plant, *Lepidium bonariense* L., *L. virginicum* L., molecular marker, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

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了本土植物原有生態性的平衡，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、時程及經費於防除入侵植物，因此，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。目前台灣外來植物已超過 2,600 種，而歸化(或野化)植物約有 300 種(蔣等 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(*Bidnes pilosa* L. var. *radiata* Schultz-Bip)、平原菟絲子(*Cuscuta ampestris* Yunck.)以及銀膠菊(*Parthenium hysterophorus* L.)等，皆造成台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，其花費高達約 6.5 億元(陳及蕭 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，由於台灣非聯合國會員，因此無法直接參與公約組織的運作與資訊交流，農委會於 2001 年擬定「生物多樣性推動方案」，2002 年 12 月永續會再通過「生物多樣性行動計畫」，成為台灣生物多樣性政策目前的施政依據。推動的業務主要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(方國運 2006)。

根據「臺灣地區歸化植物之侵略性評估系統建立」(張等 2008)的研究資料顯示，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(2005)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。而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台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，此外，太魯閣國家公園中也出現過南美獨行菜的蹤跡(孫麗珠 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(許等 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中差異之特性的分生辨識技術，已普遍應用於分析物種之遺傳關係(Qian *et al.* 2001; Tsumura *et al.* 1996)、族群之遺傳結構(Culley *et al.* 2001)、品種鑑定(Fang *et al.* 1997)、演化系統(Hess *et al.* 2000)及特定基因標誌(Ratnaparkhe *et al.* 1998)等研究。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; 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，以評估此二種分子標誌之適用性及優缺點，期望後續可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、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)、1 kb plus DNA Ladder 核酸標準品(GeneMark)、ISSR UBC 引子(編號 UBC 801-900, 共 100 個)(明欣公司合成)、RAPD 引子(編號 1-50, 共 100 個)(明欣公司合成)、PCR 熱循環器(DNA Enginer, MJ Research PTC-200)。

二、南美獨行菜與獨行菜植材收集

2009 年 4-10 月間於台中縣霧峰鄉、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 克新生葉片萃取基因組 DNA。

三、南美獨行菜與獨行菜基因組 DNA 之萃取

依據 Qiagen 操作步驟略修改，萃取基因組 DNA：將 0.1 g 幼葉以液態氮磨碎，加入 400 μ l AP1 buffer 及 4 μ l RNase A stock 溶液，混合均勻倒入 1.5 μ l 離心管中，

置於 65°C 水浴加熱 10 min，每隔 2-3 min 上下搖動離心管。再加入 130 µl AP2 buffer，並放置於冰上 5 min。以 13,000 *xg* 離心 10-15 min。取澄清液置於 QIA shredder mini spin colum，以 13,000 *xg* 離心 2 min。將澄清液置於乾淨離心管後，再加入澄清液 1.5 倍體積之 AP3/E buffer。將樣品液移入 DNeasy mini spin colum，以 13,000 *xg* 離心 1 min，倒去濾液後加入 500 µl AW buffer 於 DNeasy mini spin colum 靜置 30 min，以 6,000 *xg* 離心 1 min，倒去濾液後，再次加入 500 µl AW buffer 於 DNeasy mini spin colum，靜置 30 min，以 6,000 *xg* 離心 2 min，倒去濾液。隨後以 13,000 *xg* 再離心 5 min，去除 AW buffer，將 DNeasy mini spin colum 移至乾淨離心管，加入 50 µl AE buffer 於膜上，室溫中靜置 5 min，以 12,000 *xg* 離心 2 min，收集萃取之 DNA，其中取出 10 µl DNA 加入 40 µl 無菌水，稀釋 5 倍，以分光光度計(WPA，Biowave II)，測定於波長 260 nm 之吸光值，估算 DNA 之濃度(ng/µl)，再置於 -20°C 備用。

四、ISSR 及 RAPD 標誌之聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

取南美獨行菜與獨行菜幼菜或種子之基因組 DNA 約 50 ng，分別添加 1 µl 10 µM ISSR 或 RAPD 引子(種子檢測之引子序列於 Table 1)、5 µl 5X Fast-Run Taqmaster mix PCR buffer (Protech)、適量無菌二次水，總體積為 25 µl，進行 PCR 反應。ISSR 及 RAPD 之 PCR 增幅條件為(1) 94°C 5 min 1 個循環(2)94°C 30 sec、50°C 30 sec、72°C 30 sec 35 個循環(3)72°C 7 min 1 個循環。取 8 µl 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，利用內差法估計核酸長度。

Table 1. Four ISSR and 3 RAPD primers used in identification of *Lepidium bonariense* L. and *L. virginicum* L seeds in this study.

Primer name	DNA sequence (5'→3')
UBC #820	GTGTGTGTGTGTGTGTC
UBC #823	TCTCTCTCTCTCTCA
UBC #846	CACACACACACACART
UBC #849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
RAPD #16	GGTGGGCCTG
RAPD #17	CCTGGGCCTG
RAPD #31	CCGGCCTTCC

R: A or G; Y: C or T

結果與討論

一、檢測南美獨行菜之 ISSR 分子標誌

利用 ISSR 技術進行南美獨行菜與獨行菜之間的多形性核酸條帶分析。共篩選 80 個 ISSR UBC 引子，經由電泳圖譜分析，結果顯示 UBC#807、818、820、823、846、849、855、873 及 881 等 9 個引子可分別增幅 300-3,000 bp 之間的 2-7 條多型性核酸條帶(Fig.1)，尤其 820、823、846、849 及 881 引子可明顯區別南美獨行菜及獨行菜。

菊科多種的外來植物與同科植物外觀形態極為相似，例如臺灣的小花蔓澤蘭除了可以 5.8S rRNA-ITS 序列與蔓澤蘭區別以外，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(*Mikania cordata* (Burm. f.) B. L. Rob.)，並可獲得個別植物特有之核酸條帶(陳等 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(曾及周 2003)。另如貓腥草(*Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M.

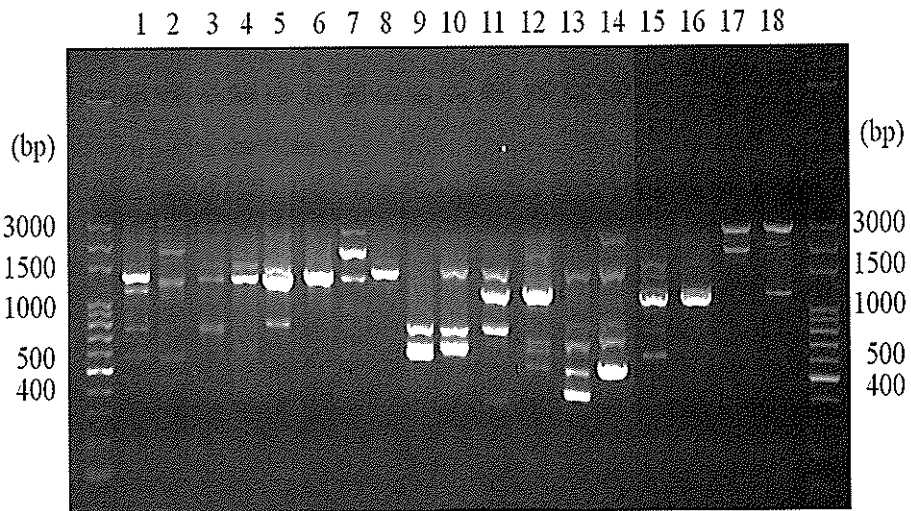


Fig. 1. Polymorphic fragments of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum* were obtained from the PCR amplification by nine ISSR UBC primers. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, and 17 were *L. bonariense*, Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 were *L. virginicum*. PCR products were amplified with UBC807 (lane 1,2), UBC818 (lane 3,4), UBC820 (lane 5,6), UBC823 (lane 7,8), UBC846 (lane 9,10), UBC849 (lane 11,12), UBC855 (lane 13,14), UBC873 (lane 15,16) and UBC881 (lane 17,18).

King & H. Rob)與紫花藿香薊(*Agerum houstonianum* Mill) 及藿香薊(*Ageratum conyzoides* L.)僅花色明顯不同，植株於未開花前不易區別，經由利用 ISSR UBC #822、844、857 及 868 等 4 個引子進行 PCR 反應，可增幅 200-2,000 bp 之間的 2-8 條多型性核酸條帶，具有快速鑑別貓腥草、紫花藿香薊及藿香薊之效果(袁等 2009)；此外，櫻絨花(*Emilia fosbergii* Nicoison)與紫背草(*E. sonchifolia* L. var. *javanica*)外觀的主要差異也在於花色，利用 ISSR 857 引子於櫻絨花與紫背草(分別增幅 1,000、1,400 bp 及 1,500、2100 bp 多型性條帶，亦可明顯鑑別櫻絨花與紫背草(袁等 2008)。

ISSR 技術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 標誌亦可應用於外來植物遺傳結構分析，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)，經以 ISSR 和 RAPD 標誌分析中國南方熱帶和亞熱帶地區的 6 個布袋蓮種群的遺傳結構，結果發現所有種群均顯示相同的基因型 (Li *et al.* 2006)。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，適用於外來入侵植物之鑑定。

二、檢測南美獨行菜之 RAPD 分子標誌

利用 RAPD 技術進行分析南美獨行菜與獨行菜之間的多型性條帶分析。共篩選 50 個 RAPD 引子，經由電泳圖譜分析，結果顯示 RAPD #4、16、17、23、25、30 及 31 等 8 個引子，可分別增幅 400-2,000 bp 之間的 2-8 條多型性核酸條帶(Fig.2)。

菟絲子的鑑定除了可運用 ISSR 標誌以外，也可利用 RAPD 技術探討日本菟絲子(*Cuscuta japonica* Choisy var. *japonica*)與台灣菟絲子(*Cuscuta japonica* Choisy var. *formosana* (Hayata) Yuncker.)的親緣關係(廖國瑛 2004)。大米草(*Spartina anglica* C. E. Hubbard)原產于英國南海岸，是一種宿根性很強的草本植物，目前已由先鋒植物轉變成為一種全球性害草(Xu and Wang 2004)，法國大米草 17 個種群以 RAPD 技術分析其遺傳結構，發現法國大米草的基因型均為 1 個多位點的基因型(Baumel *et al.* 2001)。Hollingsworth 等學者(1998)亦曾以 RAPD 標誌研究英國境內蓼科蔓蓼屬的 3 種入侵雜草的遺傳結構，發現日本紫菀 (*Fallopia japonica* (Houtt.) Dcne) 只有 1 種基因型，大紫菀 (*F. sachalinensis* (F. Schmidt ex Maxim.) Dcne)有 2 種基因型，但日本紫菀和大紫菀的雜交後代(*F. x bohémica*)則呈現有 5 種不同基因型，顯示雜交是遺傳多樣性增加的原因之一。利用 RAPD 技術鑑定植物品系已相當普

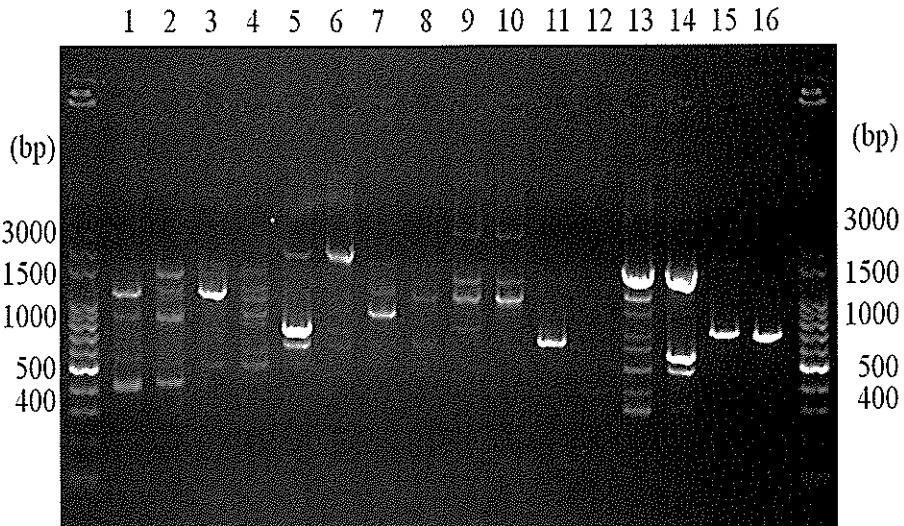


Fig. 2. Polymorphic fragments of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum* were obtained from the PCR amplification by eight RAPD primers. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, and 17 were *L. bonariense*, Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 were *L. virginicum*. PCR products were amplified with # 4(lane 1,2), #16 (lane 3,4), #17 (lane 5,6), #23 (lane 7,8), #25 (lane 9,10), #30 (lane 11,12), #31 (lane 13,14) and #50 (lane 15,16).

遍，因為 RAPD 分子標誌具有快速、DNA 使用量低、不需預知序列、操作簡易以及經濟等優點。然而初期篩選合適的引子，常需要耗費時間及反覆測試，另可能會因為 RAPD 引子序列較短，或 DNA 模板品質因素，造成 PCR 反應的再現性較差等問題。

三、利用初選之 4 個 ISSR 與 3 個 RAPD 引子檢測南美獨行菜種子

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(徐及蔣 2010)，由於多種同科屬雜草於形態相似度較高，欲進一步快速鑑定物種，可配合分子鑑定技術，然而單一粒雜草種子生物量低，檢測方法的靈敏度及專一性為分子標誌適用性的重要因素。

本研究針對採集之南美獨行菜及獨行菜，經由葉片及花穗外觀特徵區別，先篩選可區別葉片基因組 DNA 的 ISSR 及 RAPD 引子，再進一步選用可增幅出主要核酸條帶的引子，檢測二者種子的基因組 DNA，結果顯示取約 50 ng 南美獨行菜

及獨行菜種子萃取的基因組 DNA 為模板，以 ISSR UBC#820、823、846 及 849 之 4 個引子進行 PCR 反應，可分別增幅 400-2,000 bp 之間的 1-3 條多型性核酸條帶 (Fig.3(A))，與以葉片為檢體者主要核酸條帶長度相同 (Fig.1)，僅部份核酸含量較少，如 ISSR UBC#846 增幅的獨行菜種子於約 600 bp 片段含量較葉片者少。另取約 50 ng 南美獨行菜及獨行菜種子萃取的基因組 DNA 為模板，以 RAPD #16、17 及 31 之 3 個引子進行 PCR 反應，也可分別增幅 500-2,000 bp 之間的 1-3 條多型性核酸條帶 (Fig.3(B))。與以葉片為檢體者相同 (Fig.2)，僅 RAPD # 31 引子增幅的獨

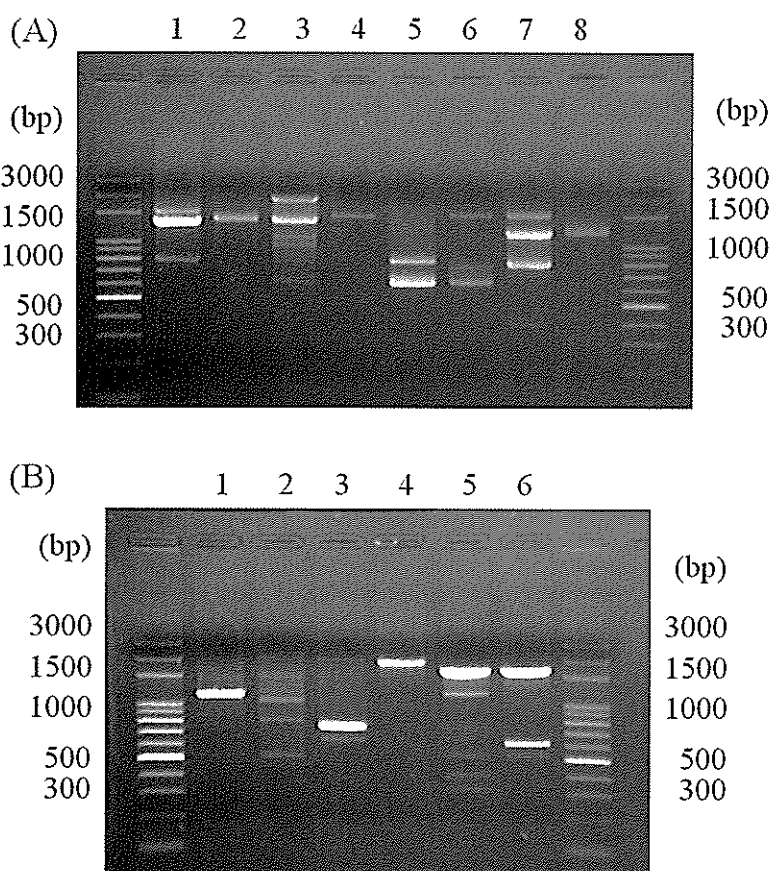


Fig. 3. ISSR and RAPD markers to identify seeds of *Lepidium bonariense* and *L. virginicum*. (A) ISSR, *L. bonariense* (lane 1, 3, 5, 7 and 9), *L. virginicum* (lane 2, 4, 6, 8 and 10), PCR products were amplified with UBC #807 (lane 1,2), 818 (lane 3,4), 855 (lane 5,6), 873 (lane 7,8), 881 (lane 9,10) (B) RAPD, *L. bonariense* (lane 1, 3, 5, 7 and 9), *L. virginicum* (lane 2, 4, 6, 8 and 10), PCR products were amplified with #4 (lane 1,2), 16 (lane 3,4), 17 (lane 5,6), 25 (lane 7,8), 30 (lane 9,10).

行菜種子於約 500 bp 片段含量較葉片者略少，顯示南美獨行菜及獨行菜葉片及種子基因組 DNA 中重覆序列及短片段序列的相似度極高，只有核酸含量的少許差異，因此 ISSR UBC#820、823、846 及 849 之 4 個引子，以及 RAPD #16、17 及 31 之 3 個引子皆可應用於南美獨行菜及獨行菜種子或幼苗期的鑑定。

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南美獨行菜，與種子及外觀形態相似的獨行菜，建立 ISSR 及 RAPD 兩種檢測之分子標誌，二者皆可直接針對葉片或種子檢體進行一次 PCR 反應，其中 ISSR 檢測方法極簡便，所需的核酸量少，適用的引子有 UBC#820、823、846 或 849 之 4 種引子；RAPD 可應用的引子有 #16、17 或 31 等 3 種引子，由核酸條帶的長度及數量即可區別南美獨行菜與獨行菜。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。

引用文獻

- 方國運。2006。第八屆生物多樣性公約締約方大會之重要議題及對策。農政與農情。No.169。52-55頁。
- 徐麗珠。2008。太魯閣國家公園入侵植物初探。自然保育季刊。61：24-29。
- 徐玲明、蔣慕琰。2010。植物檢疫與進口農產品之雜草種子鑑定。農致與農情。No.216。89-93頁。
- 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研討會專刊。89-101頁。
- 袁秋英、林李昌、蔣慕琰。2008。櫻絨花(*Emilia fosbergii* Nicolson)與紫背草(*E. sonchifolia* L. var. *javanica*)之分子鑑定。雜草會刊。29：109-120。
- 袁秋英、林李昌、鄭麗華、蔣慕琰。2009。外來入侵植物貓腥草(*Praxelis clematidea*)之分子鑑定。雜草會刊。30(2)：129-141。
- 許再文、蔣鎮宇、彭鏡毅。2005。台灣十字花科的新歸化植物—南美獨行菜。特有生物研究。7(1)。89-94頁。
- 陳阿興、蕭祺暉。2003。小花蔓澤蘭防治與管理。小花蔓澤蘭危害與管理研討會論文集。花蓮。69-77頁。
- 陳富永、徐玲明、蔣慕琰。2002。小花蔓澤蘭與蔓澤蘭形態區別及RAPD-PCR分析。植保會刊。44：51-60。

- 張芷葵、曾喜育、呂金誠、曾彥學。2008。臺灣地區歸化植物之侵略性評估系統建立。林業研究季刊。30(4)：29-40。
- 曾國洋、周昌弘。2003。台灣蔓澤蘭屬植物之族群遺傳變異。小花蔓澤蘭危害與管理研討會專刊。行政院農業委員會花蓮區農業改良場與中華民國雜草學會。1-10頁。
- 廖國瑛。2004。台灣產菟絲子屬植物之族群生態學研究。國立中興大學生命科學系研究所博士論文。1-158頁。
- 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。
- Baumel A, ML Ainouche, JE Levasseur (2001) Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C. E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). Mol. Eco. 10: 1689-1701.
- 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.
- Fank DQ, ML Rose (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and applied Genetics 95: 408-417.
- 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), Mole. 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 Jenkinsj (1998) The use of molecular to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). Mole. Ecol. 7: 1681-1691.
- Holms LG, DL Plucknett, JV Pancho (1977) The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. 18th Ed. Honolulu: Hawaii University Press. USA
- 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.
- Liao GI (2004) Population Ecology on the genus *Cuscuta* in Taiwan. Master Thesis, Department of Life Science, National Chung Hsing University.
- 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 granulate* 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.
- Shimizu T (2003) Naturalized plants of Japan. p.1-337. Heibonsha Ltd., Publishers, Tokyo, Japan.
- 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.
- Tsumura Y, K Ohba, SH Strauss (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesfi*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. App. Genet.* 92: 40-45.
- Xu ZH, YP Wang (2004) Disastrous mechanisms and control strategies of alien invasive plants. *Chin. J. Ecol.* 23: 124-127.