

編號：CCMP92-RD-025

中藥材基因資料庫的建立— 薯蕷品種分子鑑定之研究

鄭可大

臺北醫學大學生化學科

摘 要

本研究計劃針對所收集的四個薯蕷品種：三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷、恆春薯蕷及穿龍薯蕷，進行 rDNA 序列分析及擴增片段長度多型性分析。排列比對 rDNA 序列的結果顯示，三角葉薯蕷和圓三角葉薯蕷的序列相似度最高（89%）；三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 80%，和恆春薯蕷的序列相似度僅 62%；由此可見恆春薯蕷與本計劃中的其他三種薯蕷的親源關係較遠。若以變異性較大的 ITS 區域分析，恆春薯蕷的 ITS-I 序列分別與三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 66%、65%及 73%；恆春薯蕷的 ITS-II 序列分別與三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 53%、55%及 70%。其中以恆春薯蕷和三角葉薯蕷的 ITS-II 相似度最低，僅 53%。ITS-I 與 ITS-II 的序列變異性比較，因 ITS-II 的變異性較大，因此被認為較具鑑別能力。本計劃之 AFLP 分析，利用六組引子組合，分析四個薯蕷品種共十二個樣品，結果共產生約 264 個多型性條帶，其中以 EcoRI+ACG 和 MseI+CAA 的引子組合產生的條帶數最少；EcoRI+ACT 和 MseI+CAG 的引子組合產生的條帶數最多；共分析 3168 個標誌，總平均變異度為 12.61%。

關鍵詞：山藥、薯蕷、鑑定、基源、擴增片段長度多型性分析

Number : CCMP92-RD-025

The Study of Molecular Identification of the *Dioscorea* Species

Kur-Ta Cheng

Taipei Medical University

ABSTRACT

In this study, rDNA sequencing and AFLP analysis were performed to differentiate four *Dioscorea* species, *D. deltoidea*, *D. deltoidea* var. *orbiculata*, *D. nipponica* and *D. doryphora*. Totally twelve samples obtaining from three samples for each species were collected. The results of rDNA alignment analysis showed that the highest similarity is 89% between *D. deltoidea* and *D. deltoidea* var. *orbiculata*. The similarity between *D. deltoidea* and *D. nipponica* is 80%, however, only 62% with *D. doryphora*. It suggests that *D. doryphora* is far away from the others three species in the study in genetic relationship. Basing on the ITS-I sequence comparison, the similarities between *D. doryphora* and *D. deltoidea*, *D. deltoidea* var. *orbiculata*, *D. nipponica* respectively are 66%、65% 及 73%. Basing on the ITS-II sequence comparison, the similarities between *D. doryphora* and *D. deltoidea*, *D. deltoidea* var. *orbiculata*, *D. nipponica* respectively are 53%、55% 及 70%. Higher sequence diversity is found in the ITS-II region, which is thought to be a higher ability in differentiation. In AFLP analysis, six sets of primers were selected for detecting the variation among the twelve samples in the study. Totally 264 polymorphic markers were produced in the analysis. Out of the primers we tested, the set of the primer EcoRI + ACG and MseI + CAA produced the least products, and the set of the primer produced the most. 3168 markers generating from the twelve samples were calculated in the AFLP analysis. The total diversity among the twelve samples is 12.61%.

Keywords: yam, *Dioscorea*, rDNA, species identification, AFLP

壹、前言

薯蕷科雖然是單子葉植物中的小科，但卻是要用植物比較集中的一科。全世界共五屬，約有 750 種之多，廣布全球熱帶至溫帶地區，其中以熱帶美洲和非洲種類較多，亞洲次之，歐洲最少。中國僅薯蕷屬 *Dioscorea* L. 一屬，共約 60 種，其中二分之一的種類為藥用植物。而台灣產的薯蕷屬共有 9 種。薯蕷類植物資源主要包括兩大類：第一類山藥含較多的多醣、氨基酸和維生素等，因而有滋養強壯的作用；而第二類山藥則含薯蕷皂 3 元 (diosgenin)，是合成雌體激素要用的原料。以薯蕷皂 3 元為原料所合成的口服避孕藥及腎上腺皮質激素、固醇類荷爾蒙等藥物，有 50 種以上。近來又發現該類成分有抗炎、平喘、降血壓及抗腫瘤等生理活性。

台灣為因應中藥規格化的品質要求，藥材基源的確認，是開發中藥的基礎，也因而備受產官學界的重視；為了更精準的鑑別藥材之品種，解決品種變異、偽品及混淆品種等問題，分子鑑別遂成為重要的鑑定工具之一。本計劃的執行乃根據行政院 SRB 會議的政策導向，經中醫藥委員會公告，要求該計劃的執行需包含國際保育的三角葉薯蕷及圓三角葉薯蕷兩種樣品，並自行挑選其他兩個品種的薯蕷分析之；本人考慮臺灣較具特色之山藥品種為恆春山藥，因此將其納入本計劃中；至於基隆山藥，因其形態分類上更為複雜，應另行專案計劃執行之，並不適合再納入本計劃中，因此沒有選擇基隆山藥為本計劃的分析材料，而以大陸常用的穿龍薯蕷中藥材為對照的樣品。因此，本計劃針對三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷、穿龍薯蕷、及恆春薯蕷、共計四個山藥品種，以聚合酵素連鎖反應將 rDNA 片段進行擴增；除了完成各山藥品種之 rDNA 的定序工作，比對其序列之同源性、相似度及建立其親源關係樹狀圖之外；並進行 AFLP 分析，建立足以鑑別各山藥品種之引物及限制酵素的分析條件，以達到今後鑑定其他山藥品種之參考的目的。AFLP 的基本原理為針對基因組內限制片段進行 PCR 擴增的技術，因此亦屬於以 PCR 反應為基礎的分子標記，所以基本上也承襲了 PCR 分析流程“快速”的特色。Vos 等原創 AFLP 的學者稱 AFLP 是綜合了 RFLP 技術“可靠”（再現性高），以及 PCR 技術“快速高效率”的優點 (Vos et al., 1995)。此外，利用 AFLP 分子標記每次分析所可偵得的基因座數目，也較以往所使用的 RFLP、RAPD 與 SSR 為多。同時，以該技術分析繁雜的山藥品種，將來亦可計算臺灣本土山藥或特定山藥品種的種內變異程度；種內變異程度大的山藥，其具有的活性成分之生合成潛能亦大，更具篩選價值。以 DNA 指紋分析技術應用於藥用植物的分類，並與其有效成分連結，是中草藥品管的必然趨勢，其精準性將無庸置疑，惟其分析成本昂貴，將在技術平臺

建立之後，針對大量樣品的分析，將可大幅降低成本；以 DNA 定序為例，現在費用已經非常便宜，將來成本將更低，可節省更多的人工費用。

貳、材料與方法

一、山藥品種收集

由農試所劉新裕博士所提供的恆春薯蕷各三株植株的葉子；另由四川中醫藥大學萬德光教授提供四川的穿龍薯蕷，由中科院植物所昆明分所姚新生院士提供三角葉及圓三角葉薯蕷之植株的葉子。

D. deltoidea 三角葉薯蕷（雲南）

D. deltoidea var. *orbiculata* Prain et Burkill 圓三角葉薯蕷（雲南）

D. nipponica Makino 穿龍薯蕷（四川）

D. doryphora Hance 恆春薯蕷（臺灣）

二、DNA 的抽取

先取薯蕷葉片 0.1 克，加 1 毫升 urea extraction buffer（50mM Tris-HCl, pH8.0; 50mM NaCl; 20mM EDTA; 2.5M urea; 1% sarcosine），在研鉢中予以研磨，再將研磨液倒入 1.5ml eppendorf 中，靜置於室溫 10 分鐘後加入一倍體積 phenol/chloroform/isoamyl alcohol = 25:24:1，混勻並以 13000 x g，離心 10 分鐘；取上層液，加入 0.1 倍體積的 4.4M NH₄OAc；再以 phenol/chloroform/isoamyl alcohol = 25:24:1 抽取一次，離心，留下 DNA pellet，並以 70% 酒精清洗之；最後溶於 1/10 TE buffer 中。

三、rDNA 之 PCR 分析

本研究使用引子為依照 Emmanuel J. P. Douzery 等人（1999）發表蘭科 ribosomal 之 ITS sequences 設計合成，其序列為：forward primer L：5'-ATT,GAA,TGG,TCC,GGT,GAA,GTG,TTC,G-3'，reverse primer H：5'-AAT,TCC,CG,GTT,CGC,TCG,CCG,TTA,C-3'，此引子可將 18S rDNA 及 26S rDNA 之間的 ITS1、5.8S rDNA 及 ITS2 擴增。每一 PCR 樣品反應總體積為 25 μ l，其中包含 1X PCR buffer（ProTech, U.S.A.），0.2 mM dNTP, 1 μ M forward primer L 和 reverse primer H，

0.625 U Taq polymerase (ProTech) 和 2 ng DNA。以 Perkin Elmer Cetus 2400 反應器，進行 DNA 的擴增反應；反應條件為 40 次循環的 94°C, 1 分鐘; 52°C, 1 分鐘; 72°C, 1 分鐘。

四、PCR 反應產物的純化

PCR 產物經瓊脂糖凝膠電泳檢查，有目的產物擴增出來後，進行 PCR 產物的純化。在 100 ul 反應產物中加入少量加樣緩沖液，點樣於 2% 的瓊脂糖凝膠上進行電泳，電泳結束後，在弱的紫外燈下切下 DNA 條帶，稱重，加入一定量的 capture buffer (300mg 膠中加入 300 uL capture buffer)，60°C 水浴加熱 5-15 min 使膠完全溶解；然後將溶液轉入一個下端接有收集管 (Collection Tubes) 的微柱 (GFX™ Columns) 中，室溫下放置 1 min，12000rpm 離心 1 min，棄去收集管中的液體，在上端微柱中再加入 500ul wash buffer 溶液，12000 rpm 離心 1 min，棄去收集管中的液體，然後 12000 rpm 再離心 1 min，以除去管、柱中殘留的溶液；洗滌完畢後，取下微柱插入一 1.5ml 的離心管上，加入適量預熱的 TE 緩沖液，室溫放置數分鐘，12000rpm 離心 1 min。取 5ul 點樣，經瓊脂糖凝膠電泳檢查後使用。放大之產物以 2 % 的 agarose 膠體電泳予以分離，電泳緩衝液為 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0)，以 100 V 電壓進行電泳 1.5 小時後，經 0.5 µg/ml ethidium bromide 染色，在 UV 燈下觀察。觀察後，切下最亮的條帶，以 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 純化 DNA，加入 15µl 滅菌蒸餾水以溶解 DNA，再將之交給明欣生物科技公司定序 (使用 ABI PRISM BioDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 的方法進行定序)。

五、AFLP 分析法 (amplified fragments length polymorphism)

1. 植物體基因組 DNA 之抽取

主要依據 Doyle and Doyle (1990) 的 CTAB 抽取步驟進行部分修改以萃取植物基因組 DNA。取約 0.10g 新鮮葉片至 1.5 ml 小離心管中，以液態氮研磨後迅速加入 600µl 已預熱至 65°C 的 CTAB-PVP 溶液 (Lodhi et al., 1994) 【2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), 100 mM Tris (pH8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid), 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) 及 0.2% β-ME (2-Mercaptoethanol)】後，利用振盪器劇烈搖盪至完全混合，置於 65°C 乾浴和水浴中 30 分鐘，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14000rpm 離心 5 分鐘，將上清液倒至另一新的 1.5ml 小離心管中，並加入 500µl chloroform/isoamylalcohol (24:1) 溶液以振盪器劇烈搖盪成乳

液狀態後，再以 1400rpm 離心 5 分鐘使兩液相分離，取 450 μ l 上層液至另一內裝 50 μ l M NaCl 的小離心管中，再加入 1 ml -20 $^{\circ}$ C 的絕對酒精沉澱 DNA 過夜。以 14000rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 1 ml wash buffer (0.2M sodium acetate, 75% ethanol) 後靜置 20 分鐘，以 14000 rpm 離心 3 分鐘，倒出 wash buffer，倒立小離心管陰乾 5~10 分鐘。加入 50 μ l TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH8.0) 以溶解 DNA，並以 65 $^{\circ}$ C 水浴處理 10 分鐘去除殘存的酒精。

2. 植物基因組 DNA 之雙酵素切割 (double digestion)

取 250 ng 經上述酵素切割品質檢定合格的樣品 DNA，加入 EcoR I / Mse I 酵素各 2.5units, 5 μ l 5X 反應緩衝液【50mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM Mg-acetate, 250 mM K-acetate】，至反應總體積 25 μ l，於 37 $^{\circ}$ C 中進行酵素切割反應 2 小時，再以 70 $^{\circ}$ C 處理 15 分鐘後迅速置入冰中以終止反應。基因組 DNA 可被酵素「完全地」切割是影響 AFLP 分析再現性最關鍵的步驟，為確保穩定的再現性，因此在正式進行植物體基因組 DNA 的雙酵素切割步驟前，先抽取少量樣品 DNA 加入 EcoR I 與所附之反應緩衝液，置於 37 $^{\circ}$ C 下 2 小時以進行基因組 DNA 之酵素切割反應，再以 70 $^{\circ}$ C 處理 15 分鐘後，迅速放入冰中以終止切割反應，反應後的全產物以 100 V 之電泳，至追蹤染劑約至底部時始停，觀察電泳結果以確認基因組 DNA 是否已被完全地切割。若有無法完全切割之情形，即表示溶液中含有妨礙酵素切割的因子存在，則該樣品棄卻之。

3. 轉接子之連接 (ligation of adapters)

取前述已完成雙酵素切割的樣品 DNA，再加入 1 μ l (1unit/ μ l) T4 DNA ligase 及 24 μ l 之 adapter ligation solution【內含 EcoR I / Mse I adapters, 0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM Mg-acetate, 50 mM K-acetate】，置於 20 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，反應完成後加入 TE buffer 稀釋 10 倍以進行後續的前擴增步驟。前擴增反應總體積共 51 μ l，內含 5 μ l 前述已完成轉接子連接與稀釋 10 倍的樣品 DNA, 5 μ l 10X PCR buffer【100m M Tris-HCl (pH8.3), 15mM MgCl₂, 500 mM KCl】，1 μ l (1unit/ μ l) Taq DNA polymerase, 40 μ l 引子混合液【內含 EcoR I 切端向一個“A”延伸序列的引子與 Mse I 切端具一個“C”延伸序列的引子】。PCR 反應係於 Perkin-Elmer 9700 機器進行，反應條件為 94 $^{\circ}$ C, 30sec; 56 $^{\circ}$ C, 60sec; 72 $^{\circ}$ C, 60sec; 共循環 20 次。以上 AFLP 分析中，由正式進行基因組 DNA 雙酵素切割至前擴增反應完成的過程中，所需的酵素與緩衝液等係均購自 Life Technologies 公司之 AFLP Analysis System I。在前擴增產物之偵測方面，為確實掌握 AFLP 分析的試驗流程。適時找出可能的問題點與追蹤樣品狀態，以及減少不必要的投資與時間浪費，前擴增反應完成之後便是一個極佳的“檢查點”。即抽取部分已完成前擴增反應的樣品，以 1.5% NuSieve3:1 agarose(FMC)

在 1 X TBE buffer 中以 4V/cm 進行電泳 3~4 小時，經染色與 UV 顯像後，若於約 100~600bp 的位置可見到模糊的帶狀產物（“smear”），即可確定至前擴增反應前的 AFLP 分析步驟已成功。而合格的樣品加入 TE buffer 稀釋 10 倍以進行後續的選擇性擴增。選擇性擴增反應總體積共 20 μ l，內含 3 μ l 前述已完成前擴增反應與稀釋 10 倍的樣品 DNA，1 μ l MseI 引子（濃度 5 μ M；帶有 3 個核甘酸延伸序列），1 μ l EcoRI 引子（濃度 1 μ M；帶有 3 個核甘酸延伸序列，且已經螢光所標定），15 μ l 內含 AmpliTaq enzyme 與 dNTPs 的 AFLP core mix 緩衝液【以上均購自 Perkin-Elmer 公司】。PCR 反應亦於 Perkin-Elmer 9700 機器進行，反應條件為第一循環 94 $^{\circ}$ C，30sec；56 $^{\circ}$ C，60sec；72 $^{\circ}$ C，2min，之後採每下一個循環其引子與模板黏合（annealing）溫度即遞減 0.7 $^{\circ}$ C 的方式再進行 12 個循環；然後續以 94 $^{\circ}$ C，30sec；56 $^{\circ}$ C，60sec；72 $^{\circ}$ C，2min 的反應條件進行 23 個循環。

六、序列分析

將 rDNA 序列資料以 Vector NTI 套裝軟體 (InforMax, Inc.) 之中的 Align X 軟體處理分析，得到這些序列的對比排列 (multiple alignment)、相似度 (similarity) 及親源關係圖 (phylogenetic tree)；Align X 分析軟體基於 Saitou 和 Nei 的 Neighbor joining (NJ) algorithm 程式而開發，計算序列的距離及建立其親源關係。排列及相似度的分析則源自 Waterman, 1988 及 Altschul, 1991 的計算方式。AFLP 數據以 UPGMA 的方法，對樣品之間做群叢分析 (cluster analysis)，得知其親源關係及歧異度 (diversity)。

參、結果與討論

本研究計劃針對所收集的四個薯蕷品種，進行 rDNA 多型性分析；我們以中科院植物所昆明分所姚新生院士提供的三角葉薯 (*D. deltoidea*) 蕷及圓三角葉薯蕷 (*D. deltoidea* var. *orbiculata*)、農試所劉新裕博士所提供的恆春薯蕷 (*D. doryphora*)，以及由四川中醫藥大學萬德光教授提供四川的穿龍薯蕷 (*D. nipponica*) 各三株植株的葉子，定出這四種薯蕷品種的 rDNA 序列 (圖一)。全段 rDNA (ITS-I- 5.8S- ITS-II) 大約 600 bp；排列比對的結果顯示，三角葉薯和圓三角葉薯蕷的序列相似度最高，為 89% (表一)；三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 80%，和恆春薯蕷的序列相似度僅 62%；由此可見恆春薯蕷與本計劃中的其他三種薯蕷的親源關係較遠。我們以 Align X 軟體處理分析，得到其親源關係如圖二所示；若以變異性較大的 ITS 區域分析，ITS-I (約 115 bp) 及 ITS-II (約 240 bp) 區域在品種之間呈現較高度的差異性。在 ITS-I 方面，三角葉薯和圓三角葉薯蕷的序列相似度 84% 為最高；而恆春薯蕷分別與三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 66%、65% 及 73% (表二)。在 ITS-II 方面，三角葉薯和圓三角葉薯蕷的序列相似度最高，為 88%；而恆春薯蕷分別與三角葉薯蕷、圓三角葉薯蕷和穿龍薯蕷的序列相似度為 53%、55% 及 70% (表三)。其中以恆春薯蕷和三角葉薯蕷的 ITS-II 相似度最低，僅 53%。ITS-I 與 ITS-II 的序列變異性比較，因 ITS-II 的變異性較大 (相似度較低)，因此被認為較具鑑別能力；若將來分析更多薯蕷品種，將更能比較出薯蕷品種間的差異性。

Dillon 等人 (2001) 利用 ITS 區域在長度及序列上，常有很大的變異 (D'Ovidio, 1992; Baldwin et al., 1995) 的特性，以 ITS 序列區分高粱的 25 個品種、甚至建立其親緣關係。另一方面，以蘭科植物的石斛為例，Lau 等人 (2001) 將十六個石斛品種的 rDNA 之 ITS-I 序列作比較，各品種間的歧異度為 12.4%，但在各種內的差異不達 1%；Fu 等人 (1999) 則發現，在四個黨參品種之間，ITS-I 及 ITS-II 序列差異則不達 2%。可見隨著植物的不同，rDNA 序列的歧異度之差異性頗大，不一定可以區別品種；本計劃的種內各三個樣品，其序列遺傳差異度甚小，有可能是取樣不具代表性的關係，或甚至是同一植株的不同葉子，所以必需親自到野外採樣，並增加樣品數，回來分析後，始可確認薯蕷種內之歧異度。依據薯蕷品種如此繁多的情形來看，種內歧異度應該較一般植物物種的種內變異大。

在遺傳物質 DNA 的變異性分析方面，RFLP 操作時間較長，且需利用放射線物質；RAPD 不需事先得知基因組相關資料，是一個簡單而有效率的工具，

使用 RAPD 分析裸麥 (Linacero, 1992)、大蒜 (Al-Zahim, 1999)、棕櫚 (Saker, 2000) 等植物體細胞變異的文獻也很多。但 Fourre 等人 (1997) 用許多 RAPD 引物分析經組織培養、且外表型態有顯者不同的 *Picea abies* 後發現, RAPD 未能偵測出體細胞變異; 另外, Rival (1998)、Bouman (2001) 等人分別對於組織培養的油椰子、橡樹或秋海棠等不同植物分析後亦指出, RAPD 未偵測出體細胞變異。Vos 等人 (1995) 發表之 AFLP 技術, 所需 DNA 數量少、不需事先得知序列相關資料、再現性高及每次分析所可偵得的基因座數目較以往所使用的 RAPD 與 SSR 等為多 (Hill et al., 1996; 陳述, 2000; Nan et al., 2001; A. Wong et al., 2001; Anthony et al., 2002) 的優點, 到目前為止, 已被運用在體細胞變異之分析上, 且可信度高 (Vendrame, 1999; Vendrame, 2000)。

Carlos 等人 (2002) 利用 12 組 AFLP 引子組合, 分析來自同一阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 母株的 51 株組織培養分生苗, 結果共產生 778 個條帶, 平均條帶長度為 175.1 bp, 但被偵測的條帶中有 31% 小於 100 bp。平均每組引子對各個材料產生之條帶數目為 54.84 條。引子組合中, EcoRI+AC 和 MseI+CAG 產生的條帶數最少; EcoRI+AC 和 MseI+CAA 產生的條帶數最多; 總平均變異度為 0.59%。Miyashita 等人利用 10 組 AFLP 引子組合, 分析野生種阿拉伯芥的 DNA 變異情形, 其總平均變異為 16.9%。本計劃篩選 24 組引子組合, 挑選其中 6 組圖譜較清晰者 (表四), 分析四個薯蕷品種共 12 個樣品; 圖三為 M-CAG 及 E-ACA 引物組合之 AFLP 圖譜。結果共產生約 264 個多型性條帶, 被偵測的條帶大部分皆大於 100 bp, 平均每組引子對各個材料產生之條帶數目為 42 條。引子組合中, EcoRI+ACG 和 MseI+CAA 產生的條帶數最少; EcoRI+ACT 和 MseI+CAG 產生的條帶數最多; 共分析 $264 \times 12 = 3168$ 個標誌, 總平均變異度為 12.61%。其實阿拉伯芥為十字花科植物, 而薯蕷為薯蕷科植物, 隨著植物本身品種的不同、基因組大小的不同, 其變異性自然有所差別。

肆、結論與建議

這四個薯蕷品種在 ITS-I 及 ITS-II 區域，呈現較高度的差異性，但因種內的三個樣品無法正確採樣（就該種植物在採樣地的自然分佈面積，決定採樣分佈之代表性），因此仍應繼續取得更多具有代表性之樣品，始可歸納出薯蕷品種內的序列具有一致性而品種之間具有差異性的關鍵片段，這些片段將可放在生物晶片上，作為快速、大量之藥材樣品品種鑑定的技術平台。

本研究計劃在建立薯蕷品種的分子鑑定模式，但因為藥材的 DNA 經常受污染或斷裂嚴重或太少，導致 AFLP 分析結果的不穩定性高；因此，我們認為惟有 DNA 序列才是鑑別藥材品種的最可靠工具；再者，中藥材積源鑑定分析的標準化，必須藉由 DNA 的序列資料，才可以達到國內外之標準的統一性，不會因為人為、藥品、儀器或其他因素而造成誤差。

本研究的結果因樣品數及品種確認尚未釐清等問題，暫不宜就 DNA 的數據，與化學及形態的數據做成合併的分析及討論，需待更確切的結果出來，始可分析並公佈。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP92-RD-025 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Al-Saheal Y.A., Larik A.S.. 1987. Genetic control of environmentally induced DNA variation in flax genotrophs. *Genome* 29:643-646.
2. Altschul, S. F. 1991. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J. Mol. Biol.* 219: 555-565.
3. Barrett, B. A., and K. K. Kidwell. 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38: 1261-1271.
4. Barrett, B. A., K. K. Kidwell, and P. N. Fox. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1271-1278.
5. Bohn, M., H.F. Utz, and A.E. Melchinger. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.* 39: 228-237.
6. Bouman H., Klerk G.J. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in beongia plants regenerated under various conditions; Comparison of three assays. *Theor. Appl. Genet.* 102:111-117.
7. Carlos P., Maria L.R. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science.* 162: 817-824.
8. Cheng K. T., H. S. Tsay, C. F. Chen and T. W. Chou. 1998. Determination of the Components in a Chinese prescription, Yu-Ping-Feng San by RAPD analysis. *Plant Medica* 64: 563-565. Dillon S.L., Lawrence P.K., Henry R.J. 2001. The use of ribosomal ITS to determine phylogenetic relationships within *Sorghum*. *Plant Syst. Evol.* 230:97110
9. D,Ovidio R. 1992. Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoids*. *Plant Mol. Biol.* 19:1069-1072.
10. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Fous* 12:13-15.
11. Hartl, L. and S.Seefelder. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Tehor. Appl. Genet.* 96:112-116.
12. Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel,

- G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez, and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plant y a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
13. Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, Bonfante P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology*. 4(1): 61-86.
 14. Linacero R., Vazquez A.M. 1992. Genetic analysis of chlorophyll-deficient somaclonal variants in rye. *Genome*. 35:981-984.
 15. Nakai R, Shoyama Y, Shiraishi S. 1996. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 19(1): 67-70.
 16. Negi MS, Singh A, Lakshmikumaran M. 2000. Genetic variation and relationship among and within *Withania* species as revealed by AFLP markers. *Genome*. 43(6): 975-980.
 17. Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino, and M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97:1248-1255.
 18. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
 19. Rival A., Bertrand L., Beule T., Combes M.C., Trouslot P., Lashermes P. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breed.* 117: 73-76.
 20. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *MolBiol. Evol.* 4: 406-425.
 21. Saker M.M., Bekheet S.A., Taha H.S., Fahmy A.S., Moursy H.A. 2000. Detection of somaclonal variation in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biol. Plant.* 43: 347-351.

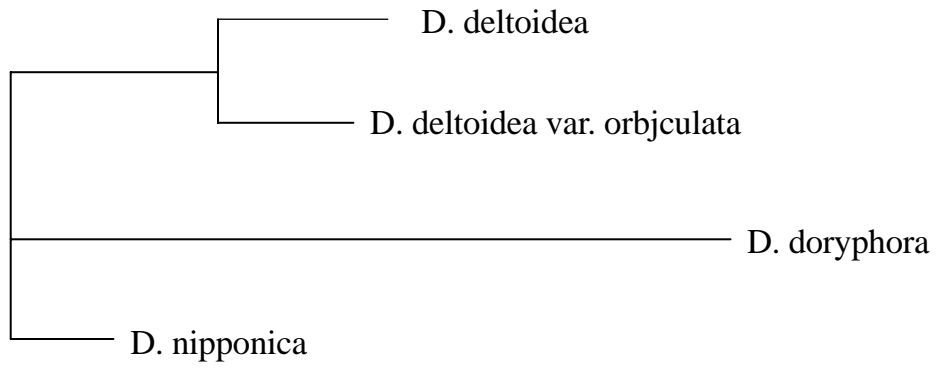
22. Schut, J.W., X. Qi, and P. Stam. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 95:1161-1168.
23. Shen, Y, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ. 1998. Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity.* 80 (5): 624-632.
24. Subudhi, P.K., S. Nandi, C. Casal, S. S. Virmani, and N. Huang. 1998. Classification of rice germplasm: III. High-resolution fingerprinting of cytoplasmic genetic male-sterile (CMS) lines with AFLP. *Theor. Appl. Genet.* 96: 941-949
25. Vendrame W.A., Kochert G., Wetzstein H.Y. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 18:853-857.
26. Vendrame W.A., Kochert G., Sparks D., Wetzstein H.Y. 2000. Field performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryogenic cultures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125:542-546.
27. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
28. Waterman M. S. 1988. Computer analysis of nucleic acid sequences. *Methods Enzymol.* 164: 765-793.
29. Yee, E., K.K. Kidewll, G.R. Sills, and T.A. Lumpkin. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39: 268-275.

陸、圖、表

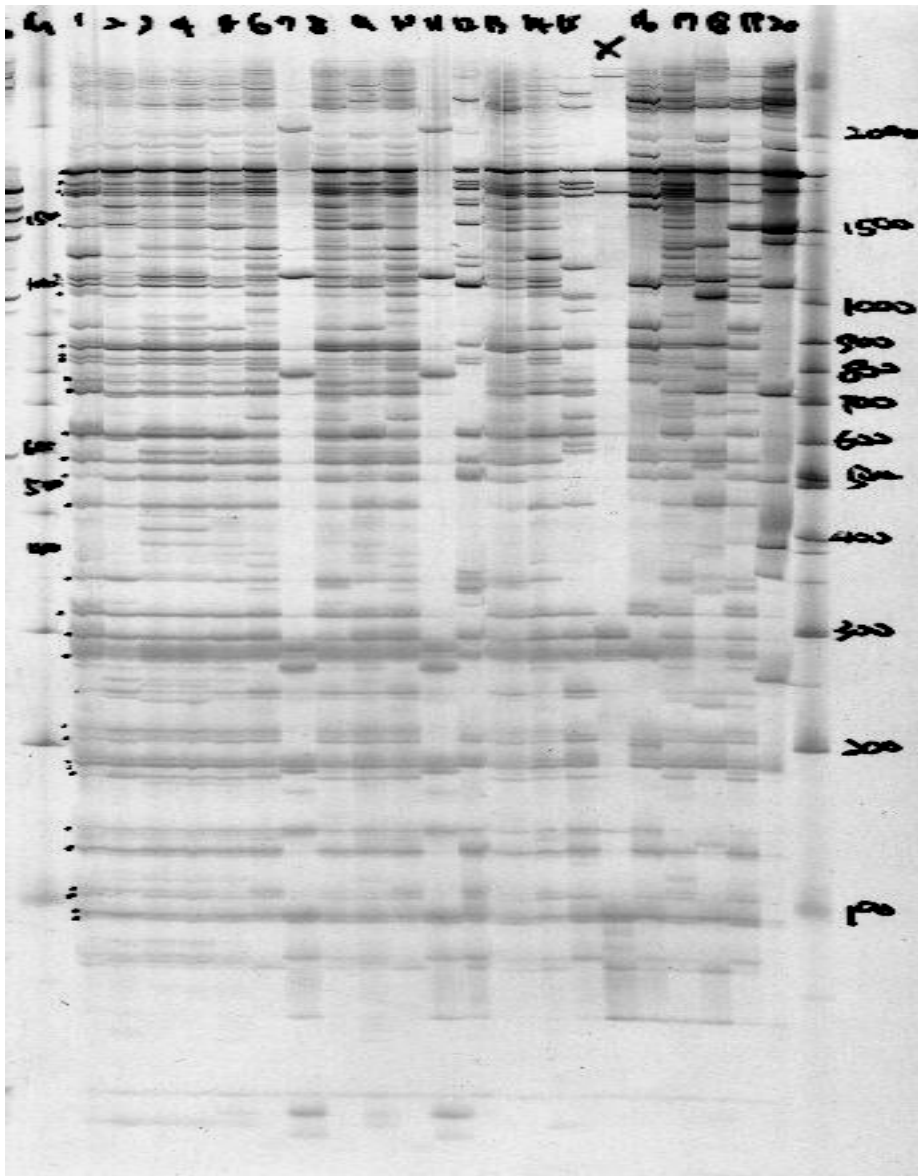
	1	50
Dde	(1) TCGAGACTGAAATATATTGAGCGATCTTGAGAACCCGTCAAATAAGCGA	
Ddeo	(1) TCGAGATTAATAATATATTGAGTGATCTTGAGAACCCGTCAAATAATCGG	
Dni	(1) TCGAGACCGAAACACAACGAGCAATTTTGTGAACCCGTAAAAAAGCGG	
Ddo	(1) TCGAGACCGAAACACAACGAGCGATTTTGTGAACCTGTAAAAATAAGCGG	
Consensus	(1) TCGAGACTGAAATATATTGAGCGATTTTGTGAACCCGTCAAATAAGCGG	
	51	100
Dde	(51) TGGCTATAGTTGTTCGAGATAAAAATTCATCCCAGTCGTCATGTCATCCTCT	
Ddeo	(51) TGGCTATAGCTTCCGAGATAAAAATTCATCCCAATCTTCGCCTCATCCCCT	
Dni	(51) CGGCTCTTGCTGCTGAGATAAAAATCCACTGAAGTCATCGCCTCATCCCCT	
Ddo	(51) TGCCTGTTGCTGTTGCAATAAAAATCCATCCAAGTATTGGCTT-ATCCCT	
Consensus	(51) TGGCTATTGCTGTTGAGATAAAAATTCATCCCAGTCTTCGCCTCATCCCCT	
	101	150
Dde	(101) TTGCGGGGTTGGGGACATGATGAAGGATGGATGAACCCACAAATCGGCG	
Ddeo	(101) CTT-CGGGGT-GTGGACGTGATGAAGGATGGATGAACCCCAAATCGGCG	
Dni	(101) CTA-TGGGGT-GTGGACGTGATGAAGGATGGATGAACCCATAAATCGGCG	
Ddo	(100) TTTTGGGAT-GGGACCTTAATAAAGGATG-ATTAACCCTTAAATTCGGG	
Consensus	(101) TTT TGGGGT GTGGACGTGATGAAGGATGGATGAACCCCAAATCGGCG	
	151	200
Dde	(151) CAGCATCGCGCCAAGGAAATAAT-GAAATACGAGCCCTAAAATGGGTTTT	
Ddeo	(149) CAGCGTCGCGCCAAGGAAATATC-GTAGCACAAGCCCTTAAATGGATTG	
Dni	(149) CAGCGTAGCGCCAAGGGAATCTT-GAAACACAAGCCATAA-TGGGTTTT	
Ddo	(148) CAACGGAACCCCAAGGAATTTTGAACCCCAACCCTTAAATTGGTTTTT	
Consensus	(151) CAGCGTCGCGCCAAGGGAATATT GAAACACAAGCCCTTAAATGGGTTTT	
	20	1250
Dde	(200) ATGAAATGGGGTGTGTTGCATTCCCTTATG-ATTGACATGACTCTCGGCA	
Ddeo	(198) -TGGAATGGGTGCTGTTGCATGCCATATGGATTGACACGACTCTCGGCA	
Dni	(197) GTGGGATGGGGTGTGTCGCACGCCATATCGATTGACACGACTCTCGGCA	
Ddo	(198) GGGGAAGGGGGGTTGGCCACCCCTTATTCTTGGACCCAATT-TTGGGA	
Consensus	(201) GTGGAATGGGGTGTGTTGCATGCCTTATGGATTGACACGACTCTCGGCA	
	251	300
Dde	(249) ATGGATATCTCGGCTCT-CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATA	
Ddeo	(247) ATGGATATCTCGGCTCT-CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATA	
Dni	(247) ATGGATATCTCGGCTCT-CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATA	
Ddo	(247) ATGGATTTTTTGGGTTTTCCCTTCAATAAAAACCCACCAAATGGCAATT	
Consensus	(251) ATGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATA	
	301	350
Dde	(298) TGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG	
Ddeo	(296) TATGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG	
Dni	(296) TGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG	
Ddo	(297) TGGGGGCAAATGGCAAATCCCCCAACCCTTCAATTTTTTAACCCCAAG	

Consensus	(301) TGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG	400
	351	
Dde	(348) TCGCCTCGAGGCCAACCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAGTCA	
Ddeo	(346) TTGCGCCCGAGGCCAATCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAGGCA	
Dni	(346) TTGCGCCCAAGGCCAACCGGCTAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCA	
Ddo	(347) TTGCCCTTAAGGCCACCTGGTTAAGGCCCTTCCCCTTGGCCTTAAACCC	
Consensus	(351) TTGCGCCCGAGGCCAACCGGCTAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAGGCA	450
	401	
Dde	(398) TTTTATCGCTCTGTGCCAAGCTACCCATCGATTGATGTGTTGGCGAAGGC	
Ddeo	(396) TTTTGTGCTTCGTGCCTAGCCACCCATCGATGGATGTGCTGGCGAGGGC	
Dni	(396) TTTTATCTCTCCGTGCCTAATCTCCCATCCATGGATGTGTTA-CTAAGGC	
Ddo	(397) TTTATTCATTCTGGGCTAATCTTCCAATCATTGAATGGG-TGGCCAAGCT	
Consensus	(401) TTTTATCGCTCTGTGCCTAGCTTCCCATCGATGGATGTGTTGGCGAAGGC	500
	451	
Dde	(448) TTGGATGTGCA-TTATGGCTCATCGTGCCCTGGGCGCGGCGGGC-TGAA	
Ddeo	(446) TCGGATGTGCA-TGGTGGCTCGTGTGCCCTCGGCGCGGCGGGC-TGAA	
Dni	(445) TCGGATGTGCAATGGTGGCTCCTCGTGCCCTTGGTGC GCGGGC-TGAA	
Ddo	(446) TCGAAT-TGCC-CCGGGGCTTCTTCTGCCCTTGGTGCCGGGGCCTTAA	
Consensus	(451) TCGGATGTGCA TGGTGGCTCCTCGTGCCCTTGGTGC GCGGGC TGAA	550
	501	
Dde	(496) GAGCGGGT—ATCATCTCGTTGGCTGCGAACAATAAGGGGTGGACTGAAG	
Ddeo	(494) GAGCGGATC-ATCGTCTTGTGGCTGCGAACAATAAGGGGTGGATTTAAA	
Dni	(494) GGGCGGGTC-ATCTTCTCGTTGGTTGCCAACAATAAGGGGTGGA-TTAAA	
Ddo	(494) AGGCCGGTCAATTTTTTCTTTGCTTGCCACCATTAAGGGTGGGA-TAAAA	
Consensus	(501) GGGCGGGTC ATCTTCTCGTTGGTTGCGAACAATAAGGGGTGGA TTAAA	600
	551	
Dde	(544) GGAGACCTATGCTATTGTGTCGTGCATGCCTAAGAGTTGATCATAACCTTT	
Ddeo	(543) TGAGGCCTATGCTATTGTGTCGTGCATGCCTAAGAGATGATCACACCTTT	
Dni	(542) AAAGGCCTATGCTATTGTGATAAACGCCCCGAGAGATGATCATACTTTT	
Ddo	(543) TTAGGCTTTTGTGGGGTCAAGCCCCCTTGA-AAAAGGGCATAACCTTT	
Consensus	(551) TGAGGCCTATGCTATTGTGTCGTGCATGCCTGAGAGATGATCATAACCTTT	646
	601	
Dde	(594) GAGGAGA-TCCCAAATCATGCGTCGATCTATGGACGGCGCTTTGAA	
Ddeo	(593) GAGGTGA-TCCCAAATCATGTGCCGATCCATGGATGGCGCTTTGAA	
Dni	(592) TAGGTGA-TCCCAAATCCATGCGCTAATCC-----	
Ddo	(592) TAAGGGAATCCCAAATTATTCCTTGAATCC-----	
Consensus	(601) TAGGTGA TCCCAAATTCATGCGTCGATCCATGGA GGCGCTTTGAA	

圖一、本研究薯蕷樣品的 ITS I - 5.8S - ITS II 區域之 rDNA 序列排列的比對結果



圖二、本研究薯蕷樣品的親緣關係樹狀圖



圖三、M-CAG 及 E-ACA 引物組合對本研究之各薯蕷樣品之 AFLP 圖譜

表一、本研究薯蕷品種的 ITS I - 5.8S - ITS II 區域之 rDNA 序列相似度

	<i>D. deltoidea</i>	<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>	<i>D. nipponica</i>	<i>D. doryphora</i>
<i>D. deltoidea</i>	100	89	80	62
<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>		100	83	61
<i>D. nipponica</i>			100	69
<i>D. doryphora</i>				100

表二、本研究薯蕷品種的 ITS-I 序列相似度

	<i>D. deltoidea</i>	<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>	<i>D. nipponica</i>	<i>D. doryphora</i>
<i>D. deltoidea</i>	100	84	76	66
<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>		100	80	65
<i>D. nipponica</i>			100	73
<i>D. doryphora</i>				100

表三、本研究薯蕷品種的 ITS-II 序列相似度

	<i>D. deltoidea</i>	<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>	<i>D. nipponica</i>	<i>D. doryphora</i>
<i>D. deltoidea</i>	100	88	70	53
<i>D. deltoidea</i> <i>var. orbiculata</i>		100	72	55
<i>D. nipponica</i>			100	70
<i>D. doryphora</i>				100

表四、AFLP 分析之二十四組引子組合

E-ACA+M-CAA	E-ACT+M-CAA	E-ACC+M-CAA	E-ACG+M-CAA
E-ACA+M-CAC	E-ACT+M-CAC	E-ACC+M-CAC	E-ACG+M-CAC
E-ACA+M-CAG	E-ACT+M-CAG	E-ACC+M-CAG	E-ACG+M-CAG
E-ACA+M-CTA	E-ACT+M-CAA	E-ACC+M-CAA	E-ACG+M-CAA
E-ACA+M-CTC	E-ACT+M-CAC	E-ACC+M-CAC	E-ACG+M-CAC
E-ACA+M-CTG	E-ACT+M-CAG	E-ACC+M-CAG	E-ACG+M-CAG

M=Mse I，E=Eco RI。紅色字的引子代表分析效果佳者。