



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC90-2317-B-038-001

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：鄭可大 台北醫學大學生化學科

共同主持人：

### 一、中文摘要

臺灣金線連依據其外表形態特徵可分為紅骨、綠骨、長葉和圓葉四個品系，本研究利用 DNA 指紋分析技術篩選其特有的分子標誌。rDNA(ribosomal DNA) 序列的分析結果發現，種內各品系間無顯著差異；RAPD 分析結果，發現 T12+A、T12+T 及 D1+G 引物可產生對紅骨及綠骨二品系具多型性標誌；在 inter SSR (inter simple sequence repeat) 分析中，成功地利用 808、827、835、836、841 及 842 六條引物，將四個品系完全區分出來。另一方面，利用 AFLP 偵測臺灣金線連體細胞變異的程度，單株 DNA 變異程度介於 0~5.92%，平均為 2.89%，本研究結果推薦五組引物組合可效偵測金線連之體細胞變異。臺灣金線連的多醣體具有提高免疫的功能；雖然總多醣體含量在各品系之間並無顯著差異，但根據我們的初步分析結果，各品系之酸性及鹼性多醣含量，具有較明顯的差異；各品系多醣體含量的差異，配合本研究所篩選的 RAPD 及 inter SSR 遺傳標誌，及 AFLP 對臺灣金線連體細胞變異之分析，可建立優良金線連品系的篩選模式，並提供在大量繁殖之過程仍能維持高品質之評估工具。

**關鍵詞：**臺灣金線連，品系，標誌，多醣體。

### Abstract

*Anoetochilus formosanus* Blume, belonging to Orchidaceae, is a perennial herb. It is used as a medicinal plant in folk. There are four lines different lines within the species according to their appearance: red stem, green stem, narrow leaf, and round leaf. In rDNA sequence analysis, no significant

variation was found among the four lines. In RAPD analysis, three primers, T12+A, T12+T and D1+G, generated polymorphic markers between the lines of red stem and green stem. However, six screened primers, 808, 827, 835, 836, 841, and 842, were able to completely differentiate the four lines when ISSR analysis was performed. In addition, five sets of AFLP primers were recommended in our study to detect the somatic variation among the excised shoots derived from the same individual.

No significant difference in total polysaccharide content was found among the four lines, but acidic and basic polysaccharide contents were different. The polysaccharide content along with RAPD markers and ISSR markers obtained in the study will be employed to set up a model for selection in breeding program.

**Keywords:** *Anoetochilus formosanus*, polysaccharide, line, marker.

### 二、緣由與目的

臺灣金線連為臺灣的特有種，是民間珍稀草藥之一，其全草皆可入藥，經科學評估，台灣金線連具有抗癌、抗氧化、抗菌性、預防動脈硬化、降血糖等藥效(Du, 2000; Shih, 2001; Wang, 2002)。

栽培品系依據其外表型態大致將其分為：圓葉（別名黑寶）、長葉、紅骨（莖為紅色的）及綠骨（莖為綠色）四種品系，而四種品系中以黑寶品系之生育性狀表現最為優異，因其植株較高，株形優美，且全株收量最大。根據我們的實驗結果顯示，臺灣金線連的多醣體具有提高免疫的功能；且各品系之酸性及鹼性多醣含量，具有較明顯的差異；而各品系多醣體含量的差異，就是

提供作為選擇優良品系植株的參考。為建立優勢金線連（多醣產量高）品系的篩選模式，以利大量育種之用，所以本計劃以 rDNA 序列分析、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、inter SSR (inter simple sequence repeat) 等分子標誌篩選臺灣金線連四個品系特有的分子標誌；另外，因為臺灣金線連現今大都經過組織培養的方式產生，本試驗利用 AFLP 技術分析來自同一金線連植株，經組織培養所產生之後代的變異情形，以控制優勢金線連的品質，以利大量繁殖生產用。

### 三、結果與討論：

臺灣金線連種內四個品系的 ITS 區域序列相似度很高，彼此間僅有 1 至 2 個鹼基不同；Fu 等人 (1999) 則發現，在四個黨參品種之間，ITS1 及 ITS2 序列差異則不達 2 %。但 Lau 等人 (2001) 將十六個石斛品種的 rDNA 之 ITS1 序列作比較，在各種內的差異亦不達 1 %；因種內 ITS 序列差異不大，區分臺灣金線連四個品系較不可適合。RAPD 分析結果，雖篩選出具有多型性且再現性良好的 T12+A、T12+T 和 D1+G 等三條引物，但皆無法區分出圓葉和長葉品系，無法完全鑑別出四個品系。在本 ISSR 方面，成功地篩選出六條引物，達到區分臺灣金線連四個品系的目的。其中，827、841 及 842 引物除了圓葉品系與紅骨品系無法區分外，其餘兩兩品系間均具有明顯的標記以供鑑別；808 引物除了圓葉品系與長葉品系無法區分外，其餘兩兩品系間均具有明顯的標記以供鑑別；835 及 836 引物則具有區分臺灣金線連個品系之能力。針對 RAPD 及 ISSR 兩種技術在多型性分析的比較，Fernandez 等人 (2002) 用大麥為材料，各十條 RAPD 及 ISSR 引物分析，結果發現，雖然 ISSR 和 RAPD 都具有區分 *Nothofagus nervosa*、*Nothofagus obliquan* 及 *Nothofagus dombeyi* 三個品種之能力，但在多型性條帶出現的比例，ISSR(83%) 高於 RAPD(63%)；每條引物放大產物之平均

數量，ISSR(22.8) 高於 RAPD(12.5)；同時 ISSR 因為它的簡單、高重覆性及不需事先知道生物體之序列資訊等優點，因此作者認為 ISSR 技術是一種較有效率之分子技術。我們使用 Life 公司之商品 AFLP<sup>R</sup> analysis system I，稍作修正其方法流程後，利用 17 組 *Mse*I 及 *Eco*RI 引物，對來自同一母株之組織培養的二十株分生苗進行分析，結果共產生約 850 個條帶，被偵測的條帶皆大於 100 bp。平均每組引物對各個材料產生之條帶數目為 40 條。引物組合中，*Eco*RI+AAG 和 *Mse*I+CAA 產生的條帶數最少；*Eco*RI+ACT 和 *Mse*I+CAT 產生的條帶數最多；共分析 473×20=9460 個標誌，總平均變異度為 273/9468=2.89%。臺灣金線連的 2.89 % 變異度。Carlos 等人 (2002) 利用 12 組 AFLP 引物組合，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。平均每組引物對各個材料產生之條帶數目為 54.84 條。引物組合中，*Eco*RI+AC 和 *Mse*I+CAG 產生的條帶數最少；*Eco*RI+AC 和 *Mse*I+CAA 產生的條帶數最多；總平均變異度為 0.59 %。臺灣金線連的 2.89 % 變異度，高於阿拉伯芥的 0.59 %。

### 四、參考文獻：

- Du X.M., Sun N.Y., Irino N., Shoyama Y. 2000. Chem. Pharm. Bull. 48(11): 1803-1804.
- Fernandez M.E., Figueiras A.M., Benito C. 2002. Theor Appl Genet 104: 845-851.
- Fu R.Z., Wang J., Zhang Y.B., Wang Z.T., But P.P.H., Li N., Shaw P.C. 1999. Planta Medica 65:648-50.
- Lau D.T.W, Shaw P.C., Wang J, But P.P.H. 2001. Planta Medica 67: 456-460.
- Shih C.C., Wu Y.W., Lin W.C. 2001. J. Ethnopharmacol. 77: 233-8.
- Wang S.Y., Kuo Y.H., Chang H.N., Kang P.L., Tsay H.S., Lin K.F., Yang N.S., Shyur L.F. 2002. J. Agric Food Chem. 50(7): 1859-65.