

## 中草藥基原之 DNA 鑑定

林順福 國立台灣大學農藝系助理教授

### 中文摘要

基原及品種鑑定不但可確保純正中草藥之供應源頭，亦是監控產銷品質之良好工具。由於中草藥種類及來源眾多，常發生名稱混淆或品質不穩定之現象，而影響藥效及危害人體健康；爲了保護中草藥之原生種或稀有種等遺傳資源，確保新品種之智慧財產權，及因應未來有機栽培、標準化優良栽培及生產履歷制度之需要，必須加強中草藥基原或品種鑑定。然而，因爲外觀性狀易受栽培環境影響，及切片或加工後產品不易由外觀性狀區分，有必要採用 DNA 分子鑑定技術。爲了有效鑑定中草藥之基原或品種，必需先瞭解中草藥植物之育種與繁殖方式，及基原(或品種)之遺傳特性，以達到正確取樣及選擇適當鑑定方法。中草藥之 DNA 鑑定原理主要係基於個體間之 DNA 序列差異，而目前主要利用 PCR 專一性增幅 DNA 及限制酵素選擇性剪切 DNA 分子之功能來鑑別不同遺傳組成之個體，近年來更針對染色體特定區域之 DNA 直接定序及比對。本報告將介紹 DNA 分子標誌在中草藥基原鑑定之近況及其他相關之研究，並且討論中草藥基原鑑定應注意之事項。目前較常以 ITS 及葉綠體 DNA 序列鑑別中草藥基原，未來則需以 SSR、SNP、SCAR 及功能性標誌(functional markers)鑑別中草藥品種，而核心標誌(core markers)及生物晶片將深具有發展潛力。

### 一、中草藥基原鑑定之重要性

#### (一)避免中草藥名稱混淆而影響藥效及危害人體健康

中草藥大部分來自植物，目前主要採集自野生物種或由野生物種馴化栽培，且多數中草藥基原(germplasm)並未實施正規之育種選拔，常因爲同一中草藥基原內植株之遺傳變異過大，故無法供應品質穩定之藥材。另外，也常發生同一物種(基原)具有多種名稱(俗名)，或者多個不同物種(species)具有相同商品名稱之現象，又因爲不同物種之乾燥或切片藥材混淆或混雜而不易區分(Hosokawa *et al.*, 2005)，導致品質無法提升及藥性不確定現象，而延誤疾病治療時間，甚至會危害人體健康。例如，俗稱黃耆之中草藥涵蓋十個以上之物種(species)，但是其中僅有一物種(*Stephania tetrandra*)具有肌肉鬆弛作用之成份(Yuan and Hong, 2003)；而羅勒(*Ocimum basilicum*)品種易受田間栽培環境影響其類胡蘿蔔素及葉綠素含量，有些品種則較不易受栽培環境影響(Kopsell *et al.*, 2005)；不同木犀(*Melissa officinalis*)品種之精油含量及有效成份亦有明顯差異(Blum and Lorenz, 2005)。因此，有必要藉由基原或品種(variety)鑑定以提供正確及品質優良之藥材。

另以台灣民間正在流行種植之薰衣草為例，薰草原產於地中海沿岸地區，可利用於田園景觀、花藝、料理、花草茶、沐浴、美容、精油等功能。然而，薰衣草依其來源和遺傳特性而有不同生長習性及用途，例如，狹葉薰衣草及寬葉薰衣草均為提煉精油之品種，但前者適合於較寒冷地區栽培，且所提煉精油品質優良，市場售價可達十倍，而後者則較耐熱；羽葉及齒葉薰衣草則較耐熱、低香味、含黃樟素會造成孕婦流產，較適合觀賞用；甜薰衣草則是由狹葉或寬葉薰衣草與齒葉薰衣草雜交而來。近年來種苗業者及農民自行引種及農友間交換種苗，造成品種名稱及用途混淆，非但增加育種與栽培之困難，亦無法確保消費者購買所需之薰衣草產品(林，2005；簡，2004)。

## (二)保護遺傳資源及智慧財產權

許多中草藥基原為原生之物種，經過大量採集或輸出國外，不斷造成遺傳資源之流失，而近幾年各國已逐漸重視中草藥之品種改良，並且投入人力及研究資源於中草藥育種 (Schippmann *et al.*, 2005)。因此，為了穩固中草藥長期發展之根基，必需保護中草藥之原生種或稀有種，並需進行原生物種之基原鑑定；而為了落實保護育種家之智慧財產權，有必要執行中草藥品種鑑定(Primavera, 2005)。

## (三)配合未來優良栽培制度(GAP)及生產履歷制度

保健及治病為消費者服用中草藥之基本要求，為確保無農藥毒害及穩定有效成份之藥材供應，推行標準化(standardization)之優良栽培制度(GAP)(Awang, 2004; Craker *et al.*, 2004)、有機栽培及生產履歷產銷制度為未來中草藥生產之趨勢(Rohricht, 2005)，為配合各地栽培環境(例，氣候及土壤)之需要，選擇適應性良好且遺傳特性均一之優良品種為優質栽培之先決條件(Rohricht, 2005)，因此必需應用品種鑑定技術，以確保正確之種苗來源，而為了健全生產履歷制度，對於整個中草藥產銷過程也必需藉由品種鑑定加以取樣監控，以確保消費者能夠購買高品質之中草藥(Lees, 2003)。

## 二、中草藥之基原(品種)改良及其遺傳特性

近二十年中草藥市場蓬勃發展，且未來商機無限，如前面所述，傳統之野外採集方式不但無法穩定供應要來之來源，而且容易造成野生物種之滅亡，因此近幾年逐漸重視中草藥之育種及栽培技術改良，但早期品種改良主要針對提煉精油之香草植物。而一般植物之育種主要根據其繁殖特性而採行不同育種策略，也因此得到不同遺傳組成形式之品種，因此為了有效進行中草藥之基原或品種鑑定，必需先瞭解中草藥植物之育種原理及品種(或基原)之遺傳特性(Sleper and Poehlman, 2006)。

(一)自交植物之基原(品種)：係指高度自花授粉之植物，即使經過人為雜交兩個品種，在經過多代之自交(自花授粉)繁殖形成一族群，當種植族群中任一植株所收穫之種子，理論上其遺傳特性均一致(純系)，故由此族群所選拔之品

種，其繁殖之後代表現應整齊一致。而在野外收集同一棲息地之野生物種也因為經過長期之自交，其多為遺傳特性一致之族群。但若是其種子容易隨風力、流水或昆蟲散播，則同一族群內之個體有可能具有遺傳變異(差異)。

除非在同一地區所栽培之中草藥植物外觀性狀有明顯之變異，此類基原(無論野生或馴化栽培)之鑑定通常僅需選取少數個體進行分析即可；而經選拔育成或純化之品種，其取樣之個體數更可減少。

(二)異交植物之基原(品種)：係指高度異花或異株授粉之植物，此種植物之商業化品種通常為雜交種(F1)或天然授粉族群。雜交種(F1)品種在種植當代(F1)雖然具有異結合(heterozygous)之基因型(genotype)，但是族群內個體間之遺傳特性一致，故性狀表現整齊。但是下一世代因為天然雜交或異結合基因型之自交分離，族群內之個體具有高度之遺傳變異，即個體間有明顯之性狀差異。至於天然授粉品種則在每一世代之個體間均有高度之遺傳變異，因此族群中單一個體或少數樣品常無法代表整個族群之遺傳組成。而野生物種也因為天然雜交或異結合基因型之自交分離，族群內之個體具有高度之遺傳變異，個體間有明顯之性狀差異。

此類基原(無論野生或馴化栽培)除了雜交種(F1)因為整個族群之遺傳特性一致，可取少量樣品鑑定，其後裔或其他天然授粉植物，通常需要取多量個體進行分析，當花粉傳播距離較遠或具有較高異交程度時，取樣數目應適度增加。

(三)無性繁殖植物之基原(品種)：係指經由營養繁殖器官(例如，根、莖、葉、枝條等)繁殖後代之品種，由於體細胞與原有母體植株具有相同之遺傳組成，因此所繁殖後代其外表性狀與母體植株相同，且個體間之遺傳組成或性狀表現一致。同一棲息地之野生物種除了因少數體細胞突變而個體間有不同性狀表現外，理論上整個族群之遺傳組成應趨於一致，但須特別留意有些無性繁殖作物，亦可同時經由種子繁殖後代，族群內則具有高度之遺傳變異，故個體間之性狀可能有很大之差異。

此類基原(無論野生或馴化栽培)之鑑定需先考慮其是否具有種子繁殖能力，若有種子繁殖能力，則需選取較多個體以供鑑定；而無種子繁殖能力之個體則僅需選取少量樣品進行分析。

(四)組織培養植物之基原(品種)：指經由組織培養方式繁殖植物品種，其繁殖材料來源主要包括體細胞、體胚、花藥(花粉)等。依據其繁殖材料來源及細胞誘導之差異，組織培養之品種有不同之遺傳組成：

(1)由體細胞變異選種：是目前中草藥品種選育常採行之方法。將植物之無性繁殖細胞進行組織培養，理論上所產生之植株與母體植株具有相同之遺傳組成(基因型)，但是因為組織培養過程容易發生突變，尤其是細胞繼代

培養(subculture)更容易產生突變，因此可由突變株選拔所需之優良個體，經大量繁殖為一品種(Ramawat, 2004)。若是自採集野生物種進行組織培養，則不同植株之體細胞應分別編號處理，否則可能受到原有野生個體間遺傳差異之混雜，而無法與體細胞變異區分。但是當選獲一新品種需進行大量繁殖時，反而需避免體細胞變異個體之產生，以維持品種之整齊一致。

(2)由多倍體選種：若是中草藥品種並非以收穫果實或種子為主要利用部位，則可由體細胞或胚部進行組織培養，並且以秋水仙素(colchicine)處理，促使染色體加倍而得到多倍體之品種(Chapman, 2005)，因為多倍體植株除了可能造成不稔或種子生產降低外，通常多倍體植株之生長較健壯，故經由染色體加倍途徑可望選育多倍體新品種。需特別注意多倍體品種與原有母體植株之遺傳組成不易由 DNA 分子檢定而區分，需由外觀性狀差異或在顯微鏡下檢視染色體數目，才可以區分。

(3)由單倍體倍加(doubled haploids)選種：係取兩品種相互雜交植株(F1)或天然授粉植株上之花藥(內含小孢子)進行組織培養，經由染色體自然倍加或人工染色體倍加處理，而獲得二倍體(2n)之植株，因為這些小孢子之遺傳組成不同，故可以進行選拔，而又因為染色體加倍處理，所選到之植株均為同結合基因型(例如，AABBcc、aabbcc、aaBBCC等)(Chapman, 2005)，故由所選拔相同植株所繁殖之後代可經由種子繁殖，且均具有相同之遺傳組成，此種方法目前已經成功應用在大茴香(*Pimpinella anisum*)、葛縷子(*Carum carvi*)、蒔蘿(*Anethum graveolens*)、茴香(*Foeniculum vulgare*)、獨活草(*Levisticum officinale*)及麥藍(*Saponaria vaccaria*)等中草藥之品種改良(Ferrie et al., 2005)。

同一地區所栽培此種植物之基原(品種)除了具有異花授粉之特性外，僅需少量樣品即可進行鑑定。但是當欲分析組織培養所產生體細胞變異時，則需要大量之個體，並且單株個別分析。

(五)基因改造植物之基原(品種)：由於各種植物基因轉殖技術漸趨於成熟，已有多種中草藥植物嘗試進行基因轉殖之研究，主要係將不同物種基因轉入中草藥植物藉以增強其對逆境(抗病蟲害、耐旱及抗殺草劑等)之抗性或增加中草藥之有效成份。目前進行基因轉殖之中草藥植物包括：筋骨草(*Ajuga reptans*)、甘菊(*Anthemis nobilis*)、黃耆(*Astragalus species*)、顛茄(*Atropa belladonna*)、長春花(*Catharanthus roseus*)、曼陀羅(*Datura species*)、蕎麥(*Fagopyrum species*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、半邊蓮(*Lobelia species*)、罌粟(*Papaver somniferum*)、人蔘(*Panax ginseng*)、駱駝蓬(*Peganum harmala*)、茴芹(*Pimpinella anisum*)、丹蔘(*Salvia miltiorrhiza*)、黃芩(*Scutellaria baicalensis*)等物種；而我國亦已成功獲得將矮牽牛之 *CHS*(chalcone synthase) 基因轉入紫錐菊(*Echinacea purpurea*)之轉殖植株(Wang and To, 2004)。這些基因改造植物之遺傳特性除了受到繁殖特性影響外，所採用之轉殖方法、轉

入基因之種類、轉入基因構築(construct)、轉入基因構築之倍份(copy number)、轉殖所誘導之突變等亦可能影響遺傳組成及性狀表現。

此外，需特別注意有些生物技術公司利用基因轉殖作物大量生產疫苗、生理代謝酵素、賀爾蒙等醫藥或化工用途產物(Nilesh *et al.*, 2004)，此種策略應與中草藥之研發區隔，雖然兩者所採用之基因轉殖技術相同或相似，但是生產醫藥用途之基因轉殖作物其主要產物來自外來基因，而基因轉殖中草藥其主產物則來自原有植物之基因。由於民眾對於基因改造中草藥植物之生物安全(包括環境安全及食品安全)要求遠高於一般之作物，在投資中草藥基因改造產品研發之前，除了需考慮其市場需求及民眾接受度外，亦應考慮生物安全評估所需之經費與時間(林，2006)。

基因改造基原(品種)鑑定著重於所轉入外來基因之追蹤，故與一般中草藥或作物品種鑑定不同，應隨時收集相關研究資訊而參照一般基因改造食品之鑑定方法進行。

### 三、常用中草藥基原 DNA 鑑定方法及其原理

個體間之遺傳特性差異為中草藥植物基原或品種鑑定之依據(林，2001；林及陳，2002)，而生物個體間所具有不同之遺傳特性稱為遺傳標誌(genetic marker)，作物之遺傳標誌可分為(一)外觀或形態標誌：例如，花色及果實形狀等；(二)細胞遺傳標誌：需藉由顯微鏡觀察染色體數目或組織結構之差異；(三)分子標誌：包括蛋白質、RNA 及 DNA 等分子層次之差異。外觀或形態標誌具有易於判斷且穩定性高之優點，但是同一種作物可利用這類型之遺傳標誌數目相當有限。細胞遺傳標誌在遺傳或育種利用上亦有良好的效果，但是因為材料建立與維持不易，且需較專業人員進行遺傳分析，故此種遺傳標誌通常利用於較具有經濟價值之作物之研究與利用。蛋白質標誌中最常用者為同功酵素之遺傳標誌，在 1980 年代間廣泛被使用於作物遺傳研究，但通常仍然無法滿足品種鑑定或遺傳研究所需之數目。RNA 標誌由於抽取及保存不易，而不同生育階段或組織部位之測定結果常不一致，且易受外界環境之影響，很少使用於作物品種鑑定。DNA 分子標誌因為具有可在任何發育時期選取任何器官之組織分析，少量樣品即可供多次分析，取樣時可避免影響植株生育，DNA 樣品方便長期保存，試驗結果之穩定性及重複性高等優點，故為中草藥基原或品種鑑定之良好工具。

DNA 分子鑑定主要係依據物種間或個體間之 DNA 序列差異進行比對及分析，又依據其分析原理及分析基因體之範圍可分為下列三個類別：

(一)以限制酵素(restriction enzyme)之特定 DNA 序列切位為基礎：由於限制酵素可以識別特定之 DNA 序列且有專一性之剪切位置，而兩不同物種(或基原)理論上具有不同之 DNA 序列，故有些對應區域具有限制酵素能否剪切之差異，因而產生不同長度之限制酵素剪切 DNA 片段，此種 DNA 片段長度差異可藉由電泳分析呈現。此種方法係隨機針對基因體之 DNA 序列進行分析，但因為產生 DNA 片段數目過多，造成電泳比對困難，必需使用探針(probe)針對染色體上特定區域

進行分析，而 RFLP(restriction fragment length polymorphism) (Botstein *et al.*, 1980)即在此背景下研發而來，RFLP 為中草藥基原鑑定偶爾使用工具之一，但是因為涉及放射性同位素標定探針，加上另有其他鑑定方法可供選擇，在台灣目前很少採用此種技術進行中草藥基原或一般作物品種鑑定。

(二)以聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)產物為基礎：PCR 為 DNA 複製之工具，可選擇性大量複製 DNA 片段以供電泳分析。其鑑定基礎在於 PCR 反應之引子(primer)是否可以與分析樣品之 DNA 模版(template)互補黏合(annealing)而進行 DNA 複製反應，因為不同中草藥基原具有 DNA 序列差異，會造成引子與 DNA 模版黏合之差異，而產生出現電泳條帶(引子能黏合)或未出現電泳條帶(引子無法黏合)之差異。此外，基於有些區域發生小片段 DNA 缺失或插入等現象，PCR 反應亦可分析染色體特定區域之 DNA 片段長度。藉由 PCR 反應而常利用於中草藥基原鑑定之分子標誌如下(林，2001)：

(1)RAPD(random amplification of polymorphic DNA)標誌為早期作物品種鑑定工具(Williams *et al.*,1990)，係利用 10 個鹼基長度之引子(primer)對不同個體之 DNA 模版 (template)具有專一性之黏合作用，而複製不同長度之 DNA 片段，可在電泳膠體上判別。因為 RAPD 分析易於學習，操作方便，且研究室分析系統設立方便，所以此種技術很快被利用。此一類型之分子標誌由於其引子長度較短，偶而造成試驗分析不穩定之結果，因此選用 RAPD 分子標誌時常需重複確認分析結果。

(2)AFLP(amplified fragment length polymorphism)分子標誌(Zabeau and Voss,1992)係利用限制酵素將 DNA 分子切割成許多小片段，再於小片段兩端連結長度約 17~24 個鹼基之已知序列 DNA (adapter)，此一已知序列 DNA 可做為 PCR 反應之引子黏合點，可知此技術係限制酵素及 PCR 反應觀念之綜合應用。因為每一次之電泳分析可觀察約 50 至 100 個 DNA 片段(分子標誌)，所以分析效率高，加上使用之引子長度約 17~24 個鹼基，所得之 PCR 產物較穩定，故成為普遍接受之一分子標誌。但是因為每次 PCR 反應之 DNA 產物甚多，且分子量相近，需採用 DNA 定序電泳膠體，及涉及放射性標定或採用銀染法顯現電泳產物，需有較專業人員操作等缺點。

(3)SCAR(sequence characterized amplified regions)分子標誌則是利用 PCR 操作之便利性，將重要之 RFLP、RAPD 及 AFLP 等分子標誌轉換為具有較長引子之 PCR 分析技術，因此具有操作方便與分析結果可靠之優點，常利用於重要性狀或基因之篩檢。然此方法之前提為需先測得重要之 RFLP、RAPD 及 AFLP 等分子標誌，再將重要 DNA 片段經過定序分析後設計較長之引子。

(4)SSR(simple sequence repeat) DNA 分子標誌雖然早在 1984 年 Tautz 與 Renz 即有關 SSR DNA 之報導，但是直到近幾年才被重視，其遺傳機制主要是根據高等生物具有很高比例的 DNA 重複序列，不但在不同物種間重複序列的數目有

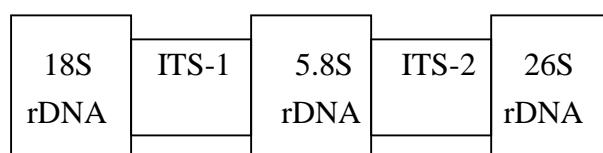
很大遺傳變異，在不同品種間亦有很大的差異。根據 PCR 反應之產物不同，SSR DNA 分子標誌可分為重複序列內之產物 (intra-SSR) 與重複序列間之產物 (inter-SSR 或稱 ISSR) 兩種類型。ISSR 分子標誌為目前中草藥基原或作物品種鑑定較常用工具之一。

(三)以 DNA 序列比對為基礎：係直接分析及比對染色體特定區域之 DNA 序列差異，做為不同基原或品種鑑定之依據。由於許多植物整個基因體定序陸續完成，DNA 序列資料也更加充實，以基因序列或 DNA 序列為遺傳分析工具將日益便利，且所需分析費用亦逐漸降低。又由於以 DNA 序列為基礎之 DNA 指紋鑑定具有下列優點：(1)僅分析一個或兩個 DNA 片段即可獲得 500~1000 個鹼基序列，供指紋鑑定；(2)可在 1-2 天內提供客觀而明確之 DNA 指紋資料(以 A、T、C、G 判讀)，不需如分子標誌分析進行多條引子(primer)鑑定；(3)無以 PCR 為基礎之分子標誌所產生分子標間相互競爭之問題；(4)不需分子標誌分析所需之對照品種，可隨時針對未知樣品分析。因此，以 DNA 序列為基礎之 DNA 指紋技術在中草藥基原鑑定極具有應用之潛力。依據所分析 DNA 區域所屬基因體之差異可分為細胞核內特定區域 DNA 序列分析及細胞核外(包括葉綠體及粒線體)特定區域 DNA 序列分析兩大類別：

(1)細胞核內特定基因部分片段 DNA 定序分析：

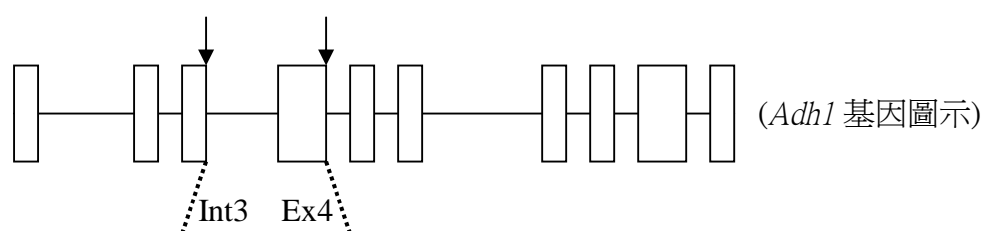
(A)ITS (internal transcribed spacer) DNA 序列分析

係選擇細胞核內 18S 及 26S rDNA 間之 DNA 做為分析對象，此區域具有植物屬間及種間之高度 DNA 序列變異性。ITS DNA 序列為目前中草藥基原鑑定最常用工具之一。



(B)*Adh1*(alcohol dehydrogenase)基因之部分 DNA 序列分析

高等植物具有兩對 *Adh* 基因(*Adh1* 及 *Adh2*)，其中以 *Adh1* 具有較大之 DNA 序列變異，而 *Adh1* 基因包括 10 個 exon 及 9 個 intron，其中又以 intron 3 與 exon 4 之間具有最大之變異性。



(2)細胞核外特定基因部分片段 DNA 定序分析：

(A)葉綠體特定基因部分片段之 DNA 定序分析：常分析之區域包括 *rbcL* (large subunit of rubulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RUBISCO)及 *matK* (又稱 *orfK*, maturase)等基因之部份 DNA 序列分析。由於葉綠體 DNA 序列分析常可偵測物種間之 DNA 序列變異或數個鹼基(base pair)之插入或缺失，因此常利用於中草藥之基原鑑定。

(B)粒線體體特定基因部分片段之 DNA 定序分析：常分析之區域包括 *CoxI* 基因及 19S rDNA 等 DNA 定序。由於植物粒線體常發生大片段之 DNA 重組且較少發現物種間之 DNA 序列變異或數個鹼基之插入或缺失，所以較少利用於中草藥基原或作物品種鑑定。

#### 四、中草藥基原 DNA 鑑定及相關研究之近況

(一)中草藥基原鑑定：早期中草藥基原鑑定多以 RAPD 分子標誌進行，近幾年則多以 ITS DNA 序列及葉綠體 DNA 序列，而綜合多種方法進行基原鑑定亦常見，較少利用 AFLP 或 RFLP 分子標誌，近幾年利用 ISSR 分子標誌於基原鑑定則有增加之趨勢，現將各種分子標誌在中草藥基於鑑定之應用整理如下：

(1)利用 RAPD 分子標誌鑑定中草藥基原：包括馬喬蓮(*Origanum majorana*)(Klocke *et al.*, 2002)、羅勒(*Ocimum species*)(Singh *et al.*, 2004)、聖約翰草(*Hypericum perforatum*) (Arnholdt-Schmitt, 2002)、丹蔘(*Salvia officinalis*)(Bazina *et al.*, 2002)、紫錐菊(*Echinacea species*)(Kapteyn *et al.*, 2002；Zhang *et al.*, 2002)、白朮物種(*Atractylodes species*)(Chen *et al.*, 2001；Huh and Bang, 2006)、薄荷物種(*Mentha species*)(Shiran *et al.*, 2004)、石蒜屬物種(*Lycoris species*)(Roh *et al.*, 2002)等。

(2)利用 ITS DNA 序列鑑定中草藥基原：包括區分具有不同精油成份之薑黃(*Rhizoma curumae*)(Xia *et al.*, 2005)、柴胡屬物種(*Bupleurum*) (Neves and Watson, 2004)、貝母屬物種(*Fritillaria species*)(Li *et al.*, 2003)、蒙古黃耆物種(*Astragalus membranaceus*)及其地方種(Yip and Kwan, 2006)、石斛物種(*Dendrobium species*) (Hong *et al.*, 2006)、橐吾屬物種(*Ligularia species*) (Zhang *et al.*, 2005)等。

(3)利用葉綠體 DNA 序列鑑別中草藥基原：包括虎耳草物種(*Saxifraga hirculus*)(Oliver *et al.*, 2006)、八角蓮物種(*Dysosma species*) (Wei *et al.*, 2006)、黃芩物種(*Scutellaria species*)(Hosokawa *et al.*, 2005)。

(4)利用 SSR 分子標誌鑑別中草藥基原：例如，鑑定野生秋海棠(*Begonia socotrana*)(Hughes *et al.*, 2002)。



(5)利用 RFLP 分子標誌鑑別中草藥基原：例如 RFLP 分子標誌鑑定人蔘屬物種(*Panax species*) (Shim *et al.*, 2005)。

(6)利用 AFLP 分子標誌中草藥基原：例如，鑑定黃耆(*Radix astragali*)及近似物種(Gu *et al.*, 2005)。

(7)綜合利用多種類分子標誌鑑別中草藥基原：包括 ITS 及葉綠體 DNA 序列鑑別真珠草物種(*Phyllanthus species*) (Lee *et al.*, 2006)；以 ITS 及 PCR-RFLP 鑑別鼠尾草(*Salvia divinorum*)近似物種(Berteau *et al.*, 2006)及貝母物種(*Fritillaria species*)(Wang *et al.*, 2005)；以 ITS 及葉綠體 DNA 序列鑑別黃堇屬物種(*Senecio species*)(Pelser *et al.*, 2002)及紫草科物種(Boraginaceae) (Hilger *et al.*, 2004)；利用 AFLP 及 ITS DNA 序列鑑別新加坡及中國市場販售三七人蔘(*Panax notoginseng*)基原及其與皂甘含量之關係(Hong *et al.*, 2005)。

## (二)中草藥基原鑑定之其他相關研究

(1)檢測中草藥品種種子繁殖之一致性：例如，利用 RAPD 檢測洋薊(*Cynara scolymus*)栽培品種在繁殖種子過程是否受外來花粉污染(Messmer *et al.*, 2002)。

(2)評估不同栽培地區之中草藥遺傳變異：例如，以 SSR 及葉綠體 DNA 序列鑑別櫻草(*Primula sieboldii*)不同栽培區域之族群間及族群內遺傳變異(Kitamoto *et al.*, 2005)；以 ITS 及 AFLP 鑑別同一栽培地區人蔘基原之遺傳變異(Hong *et al.*, 2005)；以 SSR 分子標誌及葉綠體 DNA 序列偵測櫻草屬物種(*Primula kisoana*)不同族群內部之遺傳變異(Ohtani *et al.*, 2005)；以 RFLP 分子標誌偵測不同地理分佈之玉竹(*Polygonum thunbergii*)族群之遺傳變異(Konuma and Terauchi, 2001)。

(3)檢測中草藥基原組培繁殖之一致性：例如，以 RAPD 確認澤瀉(*Chlorophytum arundinaceum*)組織培養苗無遺傳變異(Lattoo *et al.*, 2006)。

(4)生物晶片之開發利用：包括利用生物(DNA)晶片鑑別不同石斛物種(*Dendrobium species*)(Zhang *et al.*, 2003)；專一性引子快速檢測石斛物種(Hong *et al.*, 2006)、白朮物種(*Atractylodes species*)(Huh and Bang, 2006)及人蔘屬物種(*Panax species*) (Shim *et al.*, 2005)；利用 ITS DNA 序列設計生物(DNA)晶片以鑑別混合中藥(複方)中是否含石斛(*Dendrobium species*)之成份(Zhang *et al.*, 2003)。

(5)特殊加工品之偵測：例如，利用 SCAR 分子標誌鑑定膠囊粉末內是否含有豆蔻(*Elettaria cardamomum*)成份(Syamkumar *et al.*, 2005)。

## 五、中草藥基原鑑定常見之問題及應注意事項

(一)需區別基原鑑定與品種鑑定：目前中草藥之鑑定多以基原為基礎，在植物分類上多屬物種(species)間差異之層次，此時以建立具有物種專一性之分子標誌為優先考量，故以 ITS DNA 序列及葉綠體 DNA 序列較適合。而未來將逐漸培育遺傳質均一之品種，則未來中草藥將以品種鑑定為基礎，在植物分類上多屬物種內差異之層次，此時以建立可有效率檢測之核心分子標誌(core markers)為優先考量，故以 SSR 分子標誌及變異性較大之細胞核內 DNA 序列較適合。

(二)正確對照樣品及更新：在進行品種或基原鑑定之前，需收集未來可能比對之基原或品種，而所收集之對照材料儘可能經全株外觀性狀調查(並記錄)及確認，並且分別以葉片(一般可得較佳品質 DNA)及加工後產品(符合市場狀況)抽取 DNA 進行 DNA 指紋資料庫之建立，以避免日後錯誤比對之結果。由於新的基原不斷開發及常有新品種釋出，應隨時充實對照基原或品種，以擴充鑑定效能。

(三)取樣及封存樣品(重複及設定未知樣品)：品種鑑定樣品應由具有公信力之單位或鑑定單位進行取樣，抽取之樣品需分裝兩份，一份當場封瓶及貼上封條，另一份則提供鑑定分析。取樣之數量應考慮基原或品種之遺傳特性，一般會比估期鑑定之數量多取，以備部分樣品之 DNA 品質不良或鑑定結果出現疑問需要檢測更多樣品確認結果時所需。有時為了使委託單位對鑑定效力具有信心，可請委託單位重新編定樣品代號或設定重複之待檢樣品，而檢測單位亦應對關鍵之檢測結果重複驗證。

(四)瞭解鑑定工具之極限及鑑定目的：除了需瞭解相同中草藥基原或品種內之個體間仍存在不同程度之遺傳變異特性外，亦應瞭解任何鑑定工具均有其適用範圍及使用限制，例如，ITS 及葉綠體 DNA 序列較適合於物種(含)層次差異之鑑定，RAPD、AFLP、SSR 則較適合於同一物種內個體間差異之鑑定，且存在鑑定錯誤之可能性。此外，亦需先瞭解主要鑑定目的(2005，林)，再規劃或設計鑑定流程，常見之鑑定目的包括：(1)鑑定兩樣品是否為不同基原(或)品種；(2)鑑定兩樣品是否為相同基原(品種)；(3)鑑定未知樣品為何種基原(品種)；(四)鑑定待檢樣品是否為混合兩個以上之基原(品種)；(五)鑑定樣品是否為基因改造基原(品種)。

(五)鑑定報告之提出：鑑定結果係基於現有對照樣品及取樣樣品之分析結果所進行推論，因此，對於對照樣品、鑑定樣品來源、取樣方法、鑑定方法及分析過程等均應詳實描述，且發現有任何疑問亦應詳細註明。此外，有時鑑定結果係基於

機率觀點之推論，應註明支持推論之機率。

(六)中草藥基原鑑定原則：由於中草藥基原(品種)鑑定常涉及重大商業利益或人體健康之危害，且眾多分析樣品需在短期限內完成檢測，因此目前分子檢測應用之關鍵在於根據不同產業需要開發高精確性且高效率之檢測系統或流程；簡言之，「正確」、「快速」、「穩定」及「經濟」等四項目標為未來分子檢測商品化之基本要求。

## 六、中草藥基原 DNA 鑑定之未來展望

(一)開發各種加工之中草藥樣品之檢測技術：中草藥植物之種類眾多且有不同加工處理方式，例如，乾燥藥材、萃取液、藥液、粉末、膠囊、複方等樣品，有必要開發不同加工處理後樣品之 DNA 抽取技術及特殊 DNA 分子鑑定技術，以符合實際檢測之需要(胡等，2006)。

(二)現階段仍以基原(物種)鑑定為主：雖然近幾年中草藥之基原鑑定受到重視，目前以 ITS 及葉綠體 DNA 序列為鑑定工具之效果良好，但是未來必需以品種鑑定為基礎，必需研發 SSR 或細胞核內 DNA 序列(例如，single nucleotide polymorphisms, SNPs)等鑑定工具。

(三)發展與有效成份相關之功能性分子標誌：功能性分子標誌(functional markers)係指先分析與中草藥植物有效成份含量相關之基因，再由基因內部 DNA 序列變異與有效成份之關係設計分子標誌，此種分子標誌不但可利用於基原或品種鑑定，且直接與中草藥之成份或功能相關，在育種選拔上亦可有效利用，故此種分子標誌深具發展潛力(Andersen and Lubberstedt, 2003)。目前應用實例如：利用影響黃連(*Coptidis rhizoma*)小蘗鹼或稱黃連素(berberine)之基因進行基原及品種鑑定(Hara *et al.*, 2005)。

(四)核心標誌及生物(基因)晶片可快速鑑定大量樣品：為符合中草藥分子鑑定之近程、中程及長程發展之需要，我國應先建立重要中草藥植物之分子鑑定技術及 DNA 指紋資料庫，進一步發展核心分子標誌(core markers)以提高鑑定效率，若有鑑定市場需求時，再發展生物晶片之中草藥鑑定技術，而基因晶片之開發亦將有助於帶動中草藥基因體之研究與應用。

## 七、主要參考文獻

林順福。2001。分子標誌在作物育種上之應用。生物技術在農業上之應用。pp21-30。楊盛行編。國立台灣大學農業陳列館。

- 林順福、陳成 2002。作物育種觀念與技術之發展。科學農業 50:110-121。
- 林順福。2004。作物品種鑑定常見之問題。植物品種純度檢定技術座談會專刊。pp24-28。黃玉梅、楊佐琦、蕭吉雄主編。中華種苗學會編印。
- 林順福。2005。作物品種之 DNA 鑑定技術。二十一世紀農業發展與新興科技應用研討會，P25-35。中華農學會/救國團編印。
- 林順福。2006。高科技、高資金、高利潤、高風險下的農業生技產業--台灣要走出自己的方向。農訓雜誌 23：22-24。
- 胡智益、林順福、蔡右任。2006。成茶之品種分子鑑定可行性探討。中華農學會報 7(5) (已接受)。
- 簡銘錦。2004。利用 ISSR 及細胞質 DNA 標誌探討薰衣草品種之遺傳歧異性。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。
- Andersen, J. R. and T. Lubberstedt. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science 8:554-560.
- Awang, D. V. C. 2004. Standardization of herbal medicinal products. Acta Hort. 629:111-114.
- Chapman, K. 2005. Production of medicinal plants in Asia. Acta Hort. 679:45-59.
- Ferie, A. M. R., T. Bethune, and Z. Kernan. 2005. An overview of preliminary studies on the development of doubled haploid protocols for nutraceutical species. Acta Physiologiae Plantarum 27:735-741.
- Hara, A., N. Iizuka, Y. Hamamoto, S. Uchimura, T. Miyamoto, R. Tsunedomi, K. Miyamoto, S. Hazama, K. Okita, and M. Oka. 2005. Molecular dissection of a medicinal herb with anti-tumor activity by oligonucleotide microarray. Life Science 77:991-1002.
- Hong, D. Y. Q., C. R. Yang, H. L. Koh, Y. Hong, A. J. Lau, C. L. Yeo, and X. K. Liu. 2005. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm. J. of Agri. and Food Sci. 53:8460-8467.

- Kopsell, D. A. D. E. Kopsell, and J. Curran-Celentano. 2005. Carotenoid and chlorophyll pigments in sweet basil grown in the field and greenhouse. *HortScience* 40:1230-1233.
- Nigel, H. 2006. *Plant Biotechnology-- Current and Future Applications of Genetically Modified Crops*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Ohtani, M., H. Terauchi, J. Nishihiro, S. Ueno, Y. Tsumura, and I. Washitani. 2005. Population and genetic status of *Primula kisoana* var. *kisoana*, a local endemic of the northern Kanto region, Japan. *Plant Science Biology* 20:209-218.
- Ramawat, K. G. 2004. *Biotechnology of Medicinal Plants-- Vitalizer and Therapeutic*. Science Publishers, Inc. Enfield (NH). USA.
- Rohricht, C. 2005. Organic production of spice and medical plants, results of survey. *Zeitschrift fur Arznei - & Gewurzpflanzen* 10:197-205.
- Schippmann, U., D. J. Leaman, A. B. Cunningham, and S. Walter. 2005. Impact of cultivation and collection on the conservation of medicinal plants-- global trends and issues. *Acta Hort.* 676:3-14.
- Sleper, D. A. and J. M. Poehlman. 2006. *Breeding Field Crops*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Wang, H.-M. and K.-Y. To. 2004. Agrobacterium-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Plant Science* 166:1087-1096.
- Yuan, M. and Y. Hong. 2003. Heterogeneity of Chinese medical herbs in Singapore assessed by fluorescence AFLP analysis. *Amer. J. of Chinese Medicine* 31:773-779.
- Zhang, Y.-B., J. Wang, Z.-T. Wang, P.-H. But, and P.-C. Shaw. 2003. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal formulations. *Planta Medica* 69:1172-1174.