

以 RAPD 技術進行白及種原之遺傳歧異度分析¹

曹進義² 許絨誌³ 闕甫仁³ 陳威臣² 夏奇銳^{2,4}

摘 要

曹進義、許絨誌、闕甫仁、陳威臣、夏奇銳。2009。以 RAPD 技術進行白及種原之遺傳歧異度分析。台灣農業研究 58:254–264。

本研究以 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分子標誌對採集自台灣不同地區之台灣白及以及白及屬之不同種原共 25 個樣品進行分析，據此結果對台灣地區的台灣白及以及其近緣種原進行親緣關係與遺傳相似性評估。經由 80 個 RAPD 引子進行初步篩選，選出 12 個具高再現性與多型性條帶表現的引子，以此引子進行 PCR 反應總共獲 165 個片段，其中 161 個為多型性片段，多型性百分率為 97.6%。以 UPGMA (unweighted pair-group mean arithmetical) 法進行親緣分析結果顯示，參試的 25 個白及樣品可區分為中國、日本與台灣 3 大群，而台灣不同地理位置採集之白及可再區分成 5 個小群，離島之蘭嶼白及被分在台灣白及群組內，推測蘭嶼白及與台灣本島之台灣白及應為同種。依據台灣白及所呈現之遺傳相似度，推論影響台灣白及親緣關係之因素可能為山脈阻隔所造成。

關鍵詞：逢機擴增多型性 DNA、白及、親緣分析、分子標誌。

前 言

台灣白及 [*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.] 為台灣特有之蘭科 (Orchidaceae) 植物，與常用之中藥白及 [*B. striata* (Thunb.) Reichb. f.] 同為蘭科白及屬 (*Bletilla*) 之多年生草本植物，白及假球莖可做為藥材使用，開花時並兼具觀賞價值 (Na *et al.* 1978)。台灣白及由平地至海拔高度 3000 m 的高山均有採集紀錄，是台灣蘭科植物中地理分布相當廣泛的物種 (Lin 1977)，而在離島蘭嶼所產之蘭嶼白及

[*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. f. *kotoensis* (Hayata) T. P. Lin] 亦屬於台灣白及之一型 (Lin 1977; Yang *et al.* 2001)。白及屬植物依據傳統之形態分類共有 7 種，包括白及 [*B. striata* (Thunb.) eichb. f.]、黃花白及 (*B. ochracea*)、小白及 (*B. yunnanensis*)、台灣白及 [*B. formosana* (Hayata) Schltr.]、華北白及 (*B. sinensis*)、*B. szetschuanica* 及 *B. hyacinthina*，主要分布於亞洲的緬甸、越南、中國、台灣及日本 (Wu & Raven 1990)。

蘭科植物的種原鑑定主要依據為花器形態 (Arditti 1992)，然而形態的表現除了受內在遺

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2374 號。接受日期：98 年 10 月 15 日。
 2. 本所生物技術組聘用助理研究員、助理研究員、副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 3. 亞洲大學保健營養生技學系研究生、助理教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 4. 通訊作者，電子郵件：hsia@tari.gov.tw；傳真：(04)23302806。

傳控制，亦會受外在環境因子及人為觀點所影響，產生鑑定結果的差異 (Fu *et al.* 1997; Weising *et al.* 1995)。利用 DNA 分子標誌可直接鑑定植物基因型之遺傳歧異度 (genetic diversity)，不會受環境、植物發育時期及人為因素影響，其結果較傳統利用植物性狀鑑定更具客觀、準確與快速性 (Fu *et al.* 1997; Millan *et al.* 1996; Pejic *et al.* 1998; Williams *et al.* 1990)。由於白及屬植物一般難以植株與花朵外表形態進行辨別；且台灣各地理位置所採集之台灣白及其花朵與植株形態雖有差異存在但卻為同種植物，更增加鑑別的困難度，因此以分

子標誌釐清其遺傳歧異度有其必要性。本研究以分子標誌之逢機增幅多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 探討台灣各地所採之台灣白及種內遺傳歧異度並輔以白及屬之其他白及種原進行分析，藉此探討台灣白及以及白及屬種原之間的親緣關係。

材料與方法

植物材料

本研究使用的 25 個白及樣品來源分別為野外採集或蒐集自民間業者 (表 1)。

表 1. 試驗白及樣品之編號、物種名及其產地或採集地資料

Table 1. *Bletilla* samples' name and its collection information

Code name	Species	Collected country or region	Note
BS1	Unknow	China	Bought from Ying Qiao Orchids
BS2	<i>B. striata</i>	Japan	Bought from He Chen Orchids
BS3	<i>B. striata</i>	Japan	Bought from Shan Ye Orchids
BL	<i>B. formosana</i>	Region unknown, Taiwan	Gift from Ms. G. C. Chen
BO	<i>B. ochracea</i>	China	Gift from Ion Angel Orchids
BFS	<i>B. formosana</i>	Lanyu, Taitung county	Self Collected
BF1	<i>B. formosana</i>	Nangang, Taipei county	Self Collected
BF2	<i>B. formosana</i>	Pingsi, Taipei county	Self Collected
BF3	<i>B. formosana</i>	Shihding, Taipei county	Self Collected
BF4	<i>B. formosana</i>	Wulai, Taipei county	Bought from Banciao flower market
BF5	<i>B. formosana</i>	Lalasan, Taoyuan county	Bought from Banciao flower market
BF6	<i>B. formosana</i>	Fushan, Yilan county	Bought from Banciao flower market
BF7	<i>B. formosana</i>	Beipu, Hsinchu county	Self Collected
BF8	<i>B. formosana</i>	Suhua Highway, Yilan	Self Collected
BF9	<i>B. formosana</i>	Suhua Highway, Hualien	Gift from Ms. G. C. Chen
BF10	<i>B. formosana</i>	Nanshan, Yilan county	Gift from H. L. Lay Pro., NPUST
BF11	<i>B. formosana</i>	Lishan-Yilan branch line	Bought from Shan Ye Orchids
BF12	<i>B. formosana</i>	Lochao, Hualien county	Gift from H. L. Lay Pro., NPUST
BF13	<i>B. formosana</i>	Kukuan, Taichung county	Collected from Mr. Zhen-Yu Weng, TARI
BF14	<i>B. formosana</i>	Shueili, Nantou county	Gift from Flower Research Center, TARI
BF15	<i>B. formosana</i>	Region unknown	Bought from Banciao flower market
BF16	<i>B. formosana</i>	Tongpu, Nantou county	Self Collected
BF17	<i>B. formosana</i>	Alishan-1, Chiayi county	Self Collected
BF18	<i>B. formosana</i>	Alishan-2, Chiayi county	Self Collected
BF19	<i>B. formosana</i>	Wutai, Pingtung county	Gift from H. L. Lay Pro., NPUST

DNA 之萃取與分析

葉片 DNA 萃取參考 Boret & Branchard (2001) 的 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 方法進行。所萃取的 DNA 經 OD 值測定濃度後以電泳分析判別 DNA 品質後使用。

PCR 反應與分析

PCR 反應試劑 PCR Pro Taq 反應套組購自波士特生技公司 (ProTECH, 台灣)。以 100 ng DNA 為模板在總體積 20 μ L 反應溶液中進行, 反應內含 2 μ L 10 \times PCR buffer、1.6 μ L 2.5 μ M dNTPs (dATP、dTTP、dGTP、dCTP)、4 μ L 2.5 μ M random primer (Operon)、0.4 μ L ProTaq DNA polymerase (2 unit/ μ L), 反應置於 PCR 儀 (BIORAD MyCycler, USA) 中進行, 反應條件為 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 再以 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 37 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 循環 39 次, 最後一次循環 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 37 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 72 $^{\circ}$ C 12 分鐘, 反應完成後以 4 $^{\circ}$ C 保存。反應取出後加入 4 μ L 的 6 \times loading dye 混合後, 以 2.0% 的瓊脂凝膠進行電泳分析, 經 ethidium bromide 染色後在 UV 燈下觀察膠體上條帶之呈現, 並照相存檔做為後續分析之用。

隨機引子篩選

以 A1-20、B1-20、Y1-20、Z1-20 (Operon, USA) 共 80 個隨機引子進行 PCR 反應, 初步以台灣坪林地區採集之白及 DNA 為模板進行引子篩選, 依其結果選出可顯現清楚條帶並產生多型性的 12 個引子, 作為後續 25 個白及樣品分析之用, 試驗共重複進行 3 次。

PCR 標誌資料分析

利用 Gel-Compar II, Version 3.5 軟體依 Dice coefficient 方法 (Nei & Li 1979) 計算兩樣本間的相似度, 之後以軟體中的 UPGMA (unweighted pair-grouping mean arithmetical) (Sneath & Sokal 1973) 法估算樣品間的遺傳相似度, 並據此繪製親緣關係樹狀圖。

結 果

首先以 Operon A1-20、B1-20、Y1-20、Z1-20 等共 80 個 RAPD 引子經由初步篩選獲得清晰、具有多型性及再現性良好之 12 個引子, 其引子編號分別為 OPA08、10、12、18; OPB07、08、10、13; OPY03、15、16; OPZ13。接著以中國、日本與台灣共 25 個白及樣品之 DNA 模板配合上述 12 個引子進行 PCR 反應, 結果共產生 165 個條帶, 其中 161 個為多型性條帶, 平均每個引子可產生 13.8 個條帶及 13.4 個多型性條帶, 多型性百分率為 97.6% (表 2)。PCR 的電泳分析圖顯示, 以 OPA08 分別於 280 bp 與 490 bp 分子量產生中國白及與黃花白及專一性條帶, 於 200 bp 產生部份台灣產區之白及 (BL、BF7、BF11-14、BF16-18) 專一性條帶, 於分子量 250 bp 產生紫紅色花日本白及 (BS3) 專一性條帶 (圖 1A)。OPA10 引子可分別於分子量 520 bp 與 650 bp 產生中國白及專一性條帶 (圖 1B)。以 OPA12 引子可於分子量 490 bp 產生日本白及之專一性條帶, 部份台灣白及 (BL、BF2-4、BF6-9 與 BF15-17) 可於 260 bp 產生專一性條帶, 與其他種白及區分 (圖 1C)。以 OPB08 引子於分子量 430 bp 與 300 bp 產生中國白及專一性條帶 (圖 2A); 使用 OPB13 引子可產生中國產區之中國白及與黃花白及此二白及共有的專一性條帶, 分子量為 210 bp 與台灣、日本白及加以區分, 台灣白及則於 200 bp 與 300 bp (BF16-18) 分子量產生專一性條帶 (圖 2B)。

利用 Nei & Li (1979) 方法計算兩兩樣本間的相似度, 並以軟體中的 UPGMA (Sneath & Sokal 1973) 法估算樣品間的遺傳相似度, 結果顯示中國、日本與台灣地區之白及相似度在 39.3–94.7% 之間 (表 3), 且經由軟體之群叢分析與所建構出親緣關係樹狀圖之結果, 可將參試之 25 個白及物種區分成中國、日本與台灣 3

表 2. RAPD 分子標誌使用的引子名稱、DNA 序列、PCR 產生之條帶數、多型性條帶數及其比率

Table 2. DNA fragments and polymorphism produced from 12 of RAPD primers

Primer	Primer sequence (5'→3')	Total fragments	No. of polymorphic fragments	Polymorphic index (%)
OPA08	gTg ACg TAg g	16	16	100.0
OPA10	gTg ATC gCA g	15	14	93.3
OPA12	TCg gCg ATA g	18	18	100.0
OPA18	Agg TgA CCg T	13	12	92.3
OPB07	ggT gAC gCA g	13	12	92.3
OPB08	gTC CAC ACg g	14	14	100.0
OPB10	CTg CTg ggA C	15	15	100.0
OPB13	TTC CCC CgC T	15	15	100.0
OPY03	ACA gCC TgC T	16	16	100.0
OPY15	AgT CgC CCT T	11	11	100.0
OPY16	ggg CCA ATg T	8	8	100.0
OPZ13	gAC TAA gCC C	11	10	90.9
Total		165	161	97.6

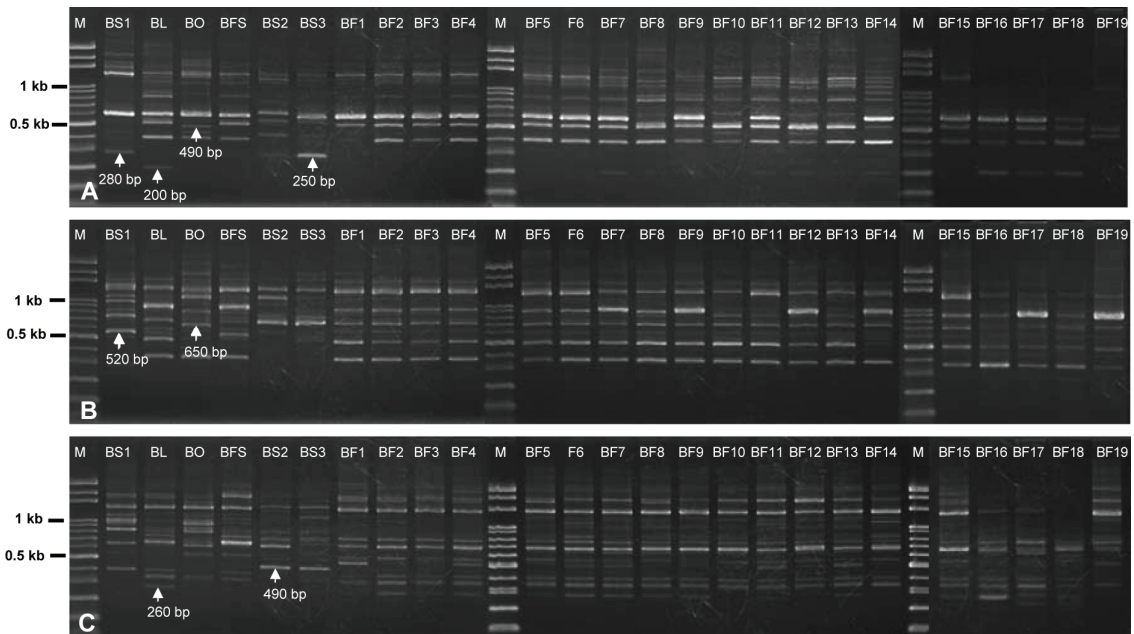


圖 1. 參試之 25 個白及樣品以 (A) OPA08；(B) OPA10；(C) OPA12 引子進行 PCR 反應之 RAPD 電泳分析圖譜。M：分子量標誌；樣品號碼參照表 1。

Fig. 1. RAPD profile of 25 *Bletilla* samples. Primers of (A) OPA08, (B) OPA10, and (C) OPA12 were used for PCR reaction. Names of tested samples are listed in Table 1.

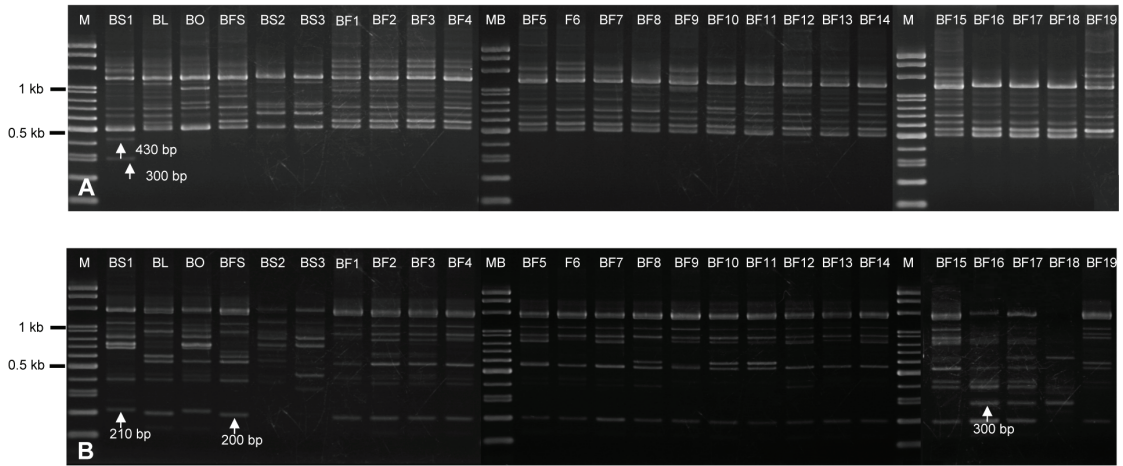


圖 2. 參試之 25 個白及樣品以 (A) OPB08、(B) OPB13 引子進行 PCR 反應之 RAPD 電泳分析圖譜。M：分子量標誌；樣品號碼參照表 1。

Fig. 2. RAPD profile of 25 *Bletilla* samples. Primers of (A) OPB08 and (B) OPB13 were used for PCR reaction. Names of tested samples are listed in Table 1.

大群，而台灣不同地理位置之白及又可區分成 5 個小群，相似度為 63.8–88.7% (表 3)，第 1 小群內相似度為 76.6%，由離島之蘭嶼白及、贈白花蓮改良場蘭陽分場搜集地點不詳之白及 (BL) 與花蓮縣蘇花公路白及所組成；第 2 小群內相似度為 79.4%，主要為台灣北部地區，由台北縣南港、石碇、平溪、烏來、宜蘭縣福山、桃園縣拉拉山與新竹縣北埔地區所組成，而購自板橋花市之 BS15 樣品亦被歸在此類群中；第 3 小群內相似度為 80.1%，以中央山脈與東北部地區為主，由宜蘭縣南山、宜蘭縣蘇花公路、花蓮縣洛韶、台中縣梨山、台中縣谷關與南投縣水里地區白及所組成；第 4 小群相似度為 71.5%，以單一屏東縣霧台白及組成；第 5 小群相似度為 64%，以嘉義縣阿里山與南投縣東埔地區白及組成，為台灣白及中差異較大的一群 (圖 3)。

討 論

由外表形態觀察 25 個參試白及樣品，除了日本白及 (BS3) 其植株葉片較為寬大，可藉由

葉片形態與中國及台灣白及區別外，中國白及與台灣白及難以藉由植株外觀與假球莖形態加以區分。蘭嶼白及花朵為純白色，在開花期時較易以花器作為辨別依據。而自台灣不同地區採集之白及其花朵與唇瓣顏色有差異性存在 (圖 4)，推測花朵形態上的差異容易受外在環境因子影響所造成 (Millan *et al.* 1996; Weising *et al.* 1994)。

本試驗以 RAPD 作為鑑別白及屬植物分子標誌的群叢分析結果顯示，可將中國、日本與台灣白及三地區之白及清楚區隔開來 (圖 3)，顯示參試之中國、日本與台灣白及為不同的白及原生種。在專一性的條帶產生方面，以 OPA12 引子可產生日本白及之專一性條帶，紫紅色花之日本白及 (BS3) 以 OPA08 引子可產生專一條帶加以分別。以 OPA10 引子可區別中國產區之中國白及與黃花白及，以 OPB13 引子則可產生中國產區白及共有的專一性條帶，中國白及亦可以 OPB08 引子分別於分子量 430 bp 與 300 bp 產生專一性條帶與其他白及區

表 3. 25 個參試白及之 RAPD 相似度表
Table 3. Similarity coefficients among 25 tested *Bletilla* samples based on RAPD analysis

	BF4	BF15	BF5	BF6	BF7	BF2	BF3	BF1	BL	BF9	BF10	BF13	BF11	BF8	BF12	BFS	BF14	BF19	BF16	BF17	BF18	BS1	BO	BS2	BS3		
BF4	100.0																										
BF15	86.1	100.0																									
BF5	86.1	84.8	100.0																								
BF6	87.4	86.3	83.8	100.0																							
BF7	81.4	83.6	81.2	88.6	100.0																						
BF2	86.7	84.3	85.5	82.1	83.2	100.0																					
BF3	84.5	84.5	84.5	83.4	83.3	94.7	100.0																				
BF1	84.5	78.3	79.5	81.0	78.6	86.4	85.4	100.0																			
BL	81.4	80.0	80.0	79.0	80.2	79.8	78.6	72.6	100.0																		
BF9	84.0	78.7	83.9	84.1	81.5	79.8	81.0	77.2	85.2	100.0																	
BF10	79.3	79.0	81.5	78.1	78.1	78.8	77.6	75.2	79.3	76.7	100.0																
BF13	81.2	78.5	81.0	81.3	80.0	79.5	78.3	77.0	72.7	81.3	87.7	100.0															
BF11	84.2	81.7	81.9	83.0	81.4	80.2	74.3	77.2	78.3	85.7	85.4	100.0															
BF8	82.4	79.8	83.4	82.4	82.4	84.2	81.9	78.3	81.2	82.5	83.8	82.2	85.2	100.0													
BF12	77.6	79.8	82.3	76.3	78.8	80.7	78.3	75.8	76.4	77.4	84.0	81.0	82.9	78.5	100.0												
BFS	77.6	78.5	82.3	78.8	82.4	83.1	83.2	78.3	78.8	81.3	79.0	79.8	81.7	83.4	78.5	100.0											
BF14	77.6	77.2	83.6	80.0	80.0	79.5	80.8	70.8	80.0	81.3	79.0	79.8	80.5	82.2	81.0	83.6	100.0										
BF19	70.8	74.0	72.7	73.1	72.1	74.1	77.7	73.9	70.8	75.5	70.9	68.8	66.3	69.2	74.0	72.7	68.8	100.0									
BF16	61.1	64.2	65.7	63.3	62.5	66.2	65.7	57.1	65.3	67.2	56.7	61.3	57.3	62.0	62.8	64.2	62.8	58.7	100.0								
BF17	65.3	68.6	67.1	67.6	65.3	68.9	68.5	60.1	69.4	65.7	62.5	64.3	64.4	67.6	62.9	65.7	64.3	61.8	85.7	100.0							
BF18	57.6	62.1	63.6	58.2	56.1	62.9	62.2	53.3	64.8	58.9	57.4	56.1	58.0	61.3	59.1	63.6	63.6	57.8	75.7	77.2	100.0						
BS1	58.1	57.0	59.4	59.9	62.8	59.0	57.1	57.1	62.8	61.7	59.2	57.0	59.7	58.8	55.8	64.2	64.2	54.7	41.7	39.5	41.7	100.0					
BO	55.4	51.6	56.6	55.9	59.0	59.9	59.3	53.1	53.0	52.6	55.2	55.4	61.8	56.1	59.1	59.1	56.6	51.6	50.7	46.8	42.1	66.3	100.0				
BS2	53.2	47.0	54.6	53.7	53.2	52.9	53.3	51.9	48.9	49.6	51.5	51.5	56.5	48.2	53.0	57.6	54.6	43.8	45.1	45.6	45.3	50.4	54.1	100.0			
BS3	48.6	43.6	49.6	51.9	48.6	49.7	48.5	48.5	47.1	49.2	52.6	48.1	50.4	44.9	48.1	51.1	49.6	43.4	41.1	45.2	39.3	54.3	49.3	78.5	100.0		

Mean = 71.19

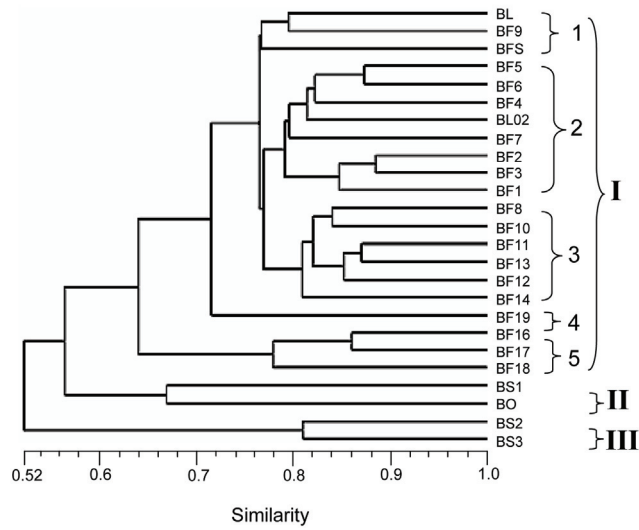


圖 3. 25 個白及參試樣品之 RAPD 條帶結果經 UPGMA 群叢分析之樹狀圖。

Fig. 3. Phylogenetic tree based on RAPD bands among 25 tested *Bletilla* samples using UPGMA method. Names of tested samples are listed in Table 1.

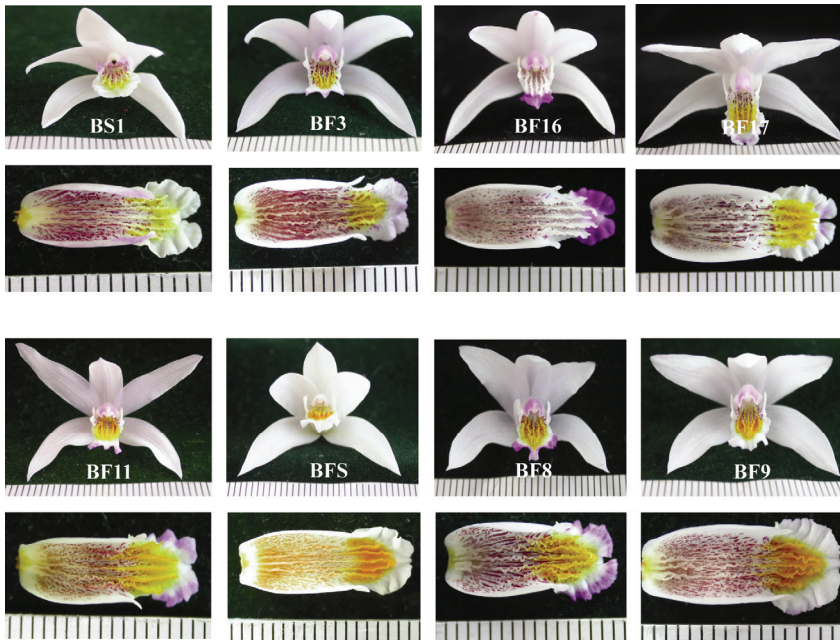


圖 4. 中國白及與採自不同地理位置之台灣白及花朵與唇瓣形態。

Fig. 4. Flower and lip morphological traits of *Bletilla formosana* collected from various areas of Taiwan and *B.* species from China. Names of tested samples are listed in Table 1.

別。綜合而言，以 OPA08、OPA12 引子可作為鑑別日本白及之分子標誌，而以 OPB13 引子可作為同時鑑別中國、日本與台灣白及之分子標誌。台灣目前白及藥材皆仰賴中國進口，中國白及與台灣白及在外觀上本來就不易區別，在乾品藥材上就更難有辨別依據，因此本研究初步篩選出之分子標誌將進一步針對品種專一性進行重複試驗，或更進一步以 SCAR (sequence characterized amplified region) 標誌，評估這些分子標誌作為種原與藥材基原鑑定之可行性。

在台灣白及遺傳歧異度分析結果方面，依 UPGMA 所建構之親緣關係樹狀圖初步可將台灣白及區分成 5 個小群，其中蘭嶼白及被歸於台灣白及之內，應為台灣白及之一型，符合 Lin (1977) 與 Yang *et al.* (2001) 的分類結果。各地採集之台灣白及樣品間的遺傳歧異度頗大 (相似度在 52.1–87.3% 之間) (表 3)。在第 1 小群部分，由於在台灣本島過去亦曾有過蘭嶼白及之採集紀錄 (Lin 1977; Na *et al.* 1978)，因此推測可能因鳥類、昆蟲、風力或人類旅行交流而使得蘭嶼白及種子傳播至台灣本島，花蓮改良場蘭陽分場所提供之採集地不詳之台灣白及，宜蘭縣蘇花公路旁小路 (海岸邊) 與蘭嶼白及均屬在東部沿海同一小群有其可能性；第 2 小群以雪山山脈為分群，主要為台灣北部地區，由台北縣南港、石碇、平溪、烏來、宜蘭縣福山、桃園縣拉拉山與新竹縣北埔地區之白及所組成，而購自業者謂採自南投的白及樣品亦歸為在此類群中，有可能是業者混淆所致；第 3 小群為中央山脈與中橫公路為分群，以宜蘭縣南山、宜蘭縣蘇花公路、花蓮縣洛韶、台中縣梨山、台中縣谷關與南投縣水里地區白及所組成；第 4 小群以大武山為分群，以屏東縣霧台白及自成一類；第 5 小群以阿里山山脈為分群，以嘉義縣阿里山與南投縣東埔地區白及組成。對照台灣白及採集之地理位置 (圖 5) 與親

緣分析樹狀圖的分群結果，推論山脈的阻隔、生長環境與其繁殖方式有可能是造成不同地理位置之台灣白及遺傳歧異度與親緣關係差異的原因，依據台灣白及採集地之生態觀察與 Na *et al.* (1978) 的研究顯示，台灣白及主要生長在中海拔之濕潤向陽岩石或泥壁上以及平野濕潤之草叢中，有其特殊之生長環境條件，在繁殖方式方面，觀察顯示台灣白及極易自花授粉且單花壽命短 (2–3 天)，再加上山脈及河流阻隔之地理因素，使花藥不易流佈及擴散至其他地區，造成不同地理位置之台灣白及族群於在演化及親緣關係上有其獨特性。目前收集之種原在相同條件及環境種植下記錄其形態特徵，將進一步利用此資料與分子標誌之親緣分析樹狀圖比較其異同，交互驗證其正確性。

分子標誌必需要產生一定數量以上之標誌數目作為分析才能有其正確性 (Pejic *et al.* 1998)，越多的標誌數目能讓相似係數與分群歸類趨於穩定，文獻中顯示標誌數目達到 150 個以上是較為具有可信度之數目 (Weising *et al.* 1994)，本實驗中 RAPD 分析之標誌數目 165 個已達到標準之上，且以 OPB13 引子可作為同時鑑別中國、日本與台灣白及之分子標誌。此外，若能配合 ISSR (inter simple sequence repeat) 分子標誌，增幅生物體基因組中的重複序列間之產物進行比較，利用物種基因的序列組合有一定的規則，而在同物種中重複基因出現之模式有所差異，而顯現出相近物種的差異來，對於整個台灣白及的演化與遺傳變異將能得到更多的了解，本研究目前正以 ISSR 分子標誌以及增加採集地點及改善樣品的採樣方法，輔以形態之資料更進一步研究台灣白及族群演化關係的發展。

在蘭科植物之白及蘭屬目前尚未見有以分子標誌進行相關鑑定與親緣分析之研究，對於台灣區所產之台灣白及間演化的親緣關係資料更付之如闕，本試驗以 RAPD 分子標誌所建立



圖 5. 台灣與蘭嶼白及樣品採集地點分佈之情形。

Fig. 5. Samples collection sites of *Bletilla formosana* populations in Taiwan and Orchid Island. Name of tested samples are listed in Table 1.

之初步資料，將朝品種專一性引子發展，希望未來可供鑑別藥材用途之白及屬植物，更可將台灣白及與中國、日本白及加以區分，作為種間基原鑑定與親緣分析輔助工具，對於台灣特有之台灣白及親緣演化間的關係提供參考。

誌 謝

本研究承行政院農委會經費補助 [96-98 農科-8.1.1-農 C1 (Z)]，謹此致謝。本試驗部分研究材料承農試所種原組黃勝忠組長、應動組翁振宇先生、古坑花卉研究中心吳容儀助理研

究員、花蓮區農業改良場蘭陽分場陳季呈助理
研究員、屏科大農園系賴宏亮教授協助種原收
集與提供，謹此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons. U.S.A. 668 pp.
- Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:209–215.
- Fu, Y. M., W. H. Chen, W. T. Tsai, Y. S. Lin, M. S. Chyou, and Y. H. Chen. 1997. Phylogenetic studies of taxonomy and evolution among wild species of *Phalaenopsis* by random amplified polymorphic DNA markers. *Rep. Taiwan Sugar Res. Inst.* 157: 27–42. (in Chinese with English abstract)
- Lin, T. P. 1977. *Bletilla* Rchb. f. p.62–66. *in*: Native Orchids of Taiwan. Vol. 2. SMC Publishing, Inc. Taipei, Taiwan. (in Chinese)
- Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. M. Torres, and J. I. Cubero. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 92:273–277.
- Na, G., W. S. Kan, N. Y. Chiu, and R. J. Yang. 1978. Pharmacognostical researches on *Bletillae* tuber. *China Med. Coll. Annu. Bull.* 10:451–467. (in Chinese with English abstract)
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical modes for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 5269–5273.
- Pejic, I., P. A. 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.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman Pub. San Francisco, USA. 573 pp.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1994. DNA fingerprinting in plant and fungi. p.24–35. *in*: Detection of DNA Polymorphism by PCR-Based Fingerprinting. (Weising, K., ed.) CRC Press. Florida.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535.
- Wu, Z. Y. and P. H. Raven. 1990. *Bletilla* Rchb. f. p.50. *in*: Flora of China. Vol. 18. (Wu, Z. Y. and P. H. Raven, eds.) Science Press. Beijing, China. (in Chinese with English abstract)
- Yang, Y. P., H. Y. Liu, and T. P. Lin. 2001. Orchidaceae *Bletilla*. p.222–223. *in*: Manual of Taiwan Vascular Plants. Vol. 5. (Yang, Y. P., H. Y. Liu, and T. P. Lin, eds.) Council of Agriculture. Taipei. (in Chinese with English abstract)

Genetic Diversity Analysis of *Bletilla* Species Using RAPD Technique¹

Chin-Yi Tsao², Cheng-Zhi Xu³, Fu-Shin Chueh³, Uei-Chern Chen²,
and Chi-Ni Hsia^{2,4}

Abstract

Tsao, C. Y., C. Z. Xu, F. S. Chueh, U. C. Chen, and C. N. Hsia. 2009. Genetic diversity analysis of *Bletilla* species using RAPD technique. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:254–264.

Genetic makers of random amplified polymorphic DNA (RAPD) were used to analyze 25 samples containing different species in *Bletilla* genus and *B. formosana* collected from different regions of Taiwan. A total 12 primers with high reproduction was screened from 80 RAPD primers for consecutive experiments. A total of 165 DNA fragments was detected, among them, 161 markers (97.6%) were polymorphic. Three major groups of *Bletilla* genus from China, Japan, and Taiwan were separated according to unweighted pair-group mean arithmetical (UPGMA) analysis in this study. Five sub-groups of *B. formosana* were classified and *Bletilla* species collected from Lanyu Island was found in the same group of Taiwan. It assumed that *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. f. *kotoensis* (Hayata) T. P. Lin is the same species with *B. formosana*. The geographical barrier of mountains was presumed for constituting the genetic differentiation among ethnic groups of *B. formosans* in Taiwan.

Key words: RAPD, *Bletilla*, Genetic diversity, Molecular marker.

-
1. Contribution No.2374 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: October 15, 2009.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Biotechnology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Master and Assistant Professor, Graduate Department of Health and Nutrition Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.