

從中草藥品種分子鑑定談中草藥品質管制

鄭可大

臺北醫學大學 醫學系生化學科

近年來分子生藥學在鑑定上的進展

近年來，分子生物技術的迅速發展，尤其是聚合酶連鎖反應（PCR）技術的誕生，使檢測物種的基因型變的簡化。它不但在植物分子系統學研究中的到廣泛應用，同時也滲透到生藥（中藥）學研究領域。如隨機擴增多態 DNA（RAPD）、任意引物 PCR（AF-PCR）、限制性片段長度多態性（RFLP）等技術應用於人蔘、淫羊藿、蒼朮、甘草、當歸；柴胡、大麻、蒲公英等基源鑑定、植物親緣關係及品質評價的研究。應用直接測序技術，通過測定核糖體基因（rDNA）族中的 18S rDNA、5S rDNA、內轉錄間隔區（ITS）、核酮糖-1,5-二磷酸化羧酶大基（rbcL）基因的鹼基序列來辨鑑別升麻、石斛、蛇床子、骨碎、砂仁、荳蔻等常用中藥材。近幾年來，採用分子生物學技術進行基源鑑定、系統分類的藥用植物已數十種。

採用 AP-PCR 和 RAPD 技術對不同產地的黨蔘 *Codonopsis pilosula* 進行指紋分析，發現山西、甘肅、四川黨蔘有明顯區別，也有區別，表明 RAPD 技術可用於藥材道地性的研究。RAPD 法具有省時、操作簡單的特點。但對 DNA 模板要求較高，模板的降解會直接影響擴增的結果。同時 RAPD 不但在種間、屬間變異水平高，而且同一物種的不同產地（或居群）也有極大的差異。中藥材在採收、加工、炮製、儲藏過程中，DNA 會發生不同程度的降解甚至產量降解，這無疑限制了 RAPD 法的應用。

採用直接測定法測定特定基因的鹼基排列，既可避免因藥材的特殊性造成的誤差，又具高度的專屬性。對短片段的 DNA 進行序列分析，選用限制性內切酶消化 PCR 產物，所獲得 DNA 圖譜具有較高的專屬性和穩定性。對黨蔘類藥材 ITS 區 DNA 序列的 PCR 產物進行 RAPD 分析，可鑑別黨蔘及其偽品。藉著序列分析，可建立中藥材高特異性 PCR 鑑定法。人蔘、西洋蔘、紫茉莉 *Mirabilis jalapa*、商陸 *Phytolacca acinosa* 的 ITS 鹼基序列，其 PCR 產物的 RFLP

圖譜可資鑑別。

RAPD 分析技術

聚合酶連鎖反應 (PCR) 以其優越性極大影響到了分子生物學的所有領域，並以其基本程序和變性梯度膠體電泳，開發出多種檢測核苷酸變異的方法。隨機擴增多型性去氧核糖核酸 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 指紋分析技術就是其中的一種，它是 1990 年美國杜邦公司科學家 J. G. K. Williams 和加利福尼亞生物研究所 J. Welsh 領導的兩個小組幾乎同時發展起來的一項新技術。Williams 稱之為 RAPD，Welsh 叫它 AP-PCR (Arbitrary Primer PCR) (Welsh et al, 1990; Williams J G K et al, 1990)；該技術經 PCR (polymerase chain reaction) 修改而成，與一般 PCR 相比，RAPD 反應僅用一條引物，且此引物只有 10 個核苷酸，它所擴增的片段並非如 PCR 用兩條特定序列的引物，複製 DNA 上特殊的片段，而是任意序列隨機複製與其結合 (anneal) 的不特定片段。因此該反應的煉合溫度較低，36-40°C，並非如 PCR 的 55-68°C 之間。該技術最大的特色在於它不需預先得知所欲測試草藥的基因序列資料，就可用任意序列的引物，擴增 DNA 片段，將供試草藥的 DNA 差異性比較出來。它與其他指紋分析技術比較，其優點包括 (1) 只需極少量的 DNA，幾個 ng 即可。(2) 操作簡便，省時，省工。(3) 無需做選殖 (4) 不須預知序列的資料。因此該技術可在短時間內找到適合需要的多型性 DNA 片段 (標誌, marker)，達到分析的目的。事實上 RAPD 的分析，就是要從一連串引子的篩選當中，找出足以區分樣品基因組之間差異的標誌，而這些遺傳標誌可以分屬不同的分類地位 (Hadrys et al., 1992) 有「屬」特異性的標誌，有「種」特異性的標誌當然也可篩得個體所特有的標誌。我們可將該技術應用於中藥材基源的鑑定，甚至不同產地所衍生之不同生態型的藥材植物上。值得注意的是，RAPD 亦有其再現性低的缺點，舉凡藥品 (Taq, dNTP, MgCl₂) 的廠牌及濃度，PCR 機器，甚至隨著操作者的不同，都可能影響 RAPD 的結果 (Meunier and Grimont, 1993; MacPherson et al., 1993; Ellsworth et al., 1993)。尤其中藥材的 DNA，污染物很高，更降低了結果的可信度。因此，除了 RAPD 之外，應配合其它指紋分析生物技術，如 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 或 SSCP (single strand conformation polymorphism) 等方法，予以解決。RAPD 的優點就在於該方法可針對各種藥材，無限制篩選所需的標誌，再分析這些標誌的序列，設計專一性高的特定引子，進行 PCR 反應。

植物間基因組 (genome) 的大小，因重複序列多寡的影響即使是相近的品種，

其差異亦可能甚大。這些變異較大的序列包括 rDNA (ribosomal DNA) (Oxelman, 1996), 衛星 DNA (satellite DNA) (Ramser et al., 1997) 和 VNTR (variable number tandem repeats) (Beyermann et al., 1992)。Ramser 等人 (1996) 就用一種 RAPD 技術, 叫作以 RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism), 以 (GA)₈, (GA)₈, (GTGA)₄, (GAA)₅ 等當作探針, 對 RAPD 圖譜進行雜合分析, 去偵測各山藥品種之間的差異。其他如芹菜 (Vierling et al., 1994)、高粱 (Yang and Quiros, 1993) 等植物品種, 亦以 RAPD 分析之。我們曾以此方法應用於臺灣金線連與高雄金線連品種的鑑定上 (Cheng et al., 1998)。除臺灣金線連與高雄金線連之外, 我們有發現少數金線植株的花部特徵介於這兩品種金線連之間。RAPD 分析為金線連品種的鑑定, 提供了一個既快速又簡便的工具。我們即針對該目的, 進行四十條引子的篩選, 結果自八條引子, 得到共十九個具有種特異性的標誌, 其中九個標誌專一於臺灣金線連, 另十個標誌則專一於高雄金線連。在這八條引子當中, OPC-08 及 OPL-07 的 RAPD 圖譜均產生專一於臺灣金線連與高雄金線連的標誌, 且這些標誌又同時出現於雜交植株的圖譜之中。RAPD 分析, 使得金線連的品種無需待其開花始可確定, 只要取其葉部, 抽取 DNA, 即可鑑定之。RAPD 標誌的篩選, 將有利於今後藥用植物育種之用。

除了藥用植物之外 RAPD 亦被應用於中藥材基源的鑑定上。中國的中藥材的有 12000 之多, 涵蓋範圍包括動物、植物、礦物及真菌等, 其中植物佔 80% 以上。植物可供藥用的部分從根、莖、葉、花、果實到種子, 無一不包括在內。由於藥用成分的含量不定, 中藥材的品質不一, 因此, 中藥的品管應從基源著手, 始可有效達成中藥科學化的目的。我們利用 RAPD 技術鑑別中藥材的品種、真偽及方劑組成份, 試圖為藥材的品管, 在組織鏡檢、化學分析之外, 再開創另一個可以有效運用的工具。目前完成 DNA 分析的藥材包括黃連 (Cheng et al., 1997)、黃耆 (Cheng et al.; Lin et al., 1995; Tseng et al., 1991)、冬蟲夏草 (Cheng et al., 1998)、當歸 (Cheng et al., 1999)、枸杞 (Cheng et al., 2000) 等, 其他數種市售的藥材, 目前正在分析中。除單方藥材之外, 複方藥材的成份分析, 亦可藉由該技術, 加以確認。我們已同時鑑定玉屏風散中的黃耆、白朮及防風三成份 (Cheng et al., 1998)。我們希望在今後的研究中, 能收集更完整的中藥材樣品, 篩選出足以鑑別其基源的 RAPD 引子, 並更進一步設計有效的 PCR 特異性引子, 建立完整且準確的藥材 DNA 指紋分析圖譜, 作為中藥基源品質管制之用。此外, 簡化 DNA 抽取程序, 甚至直接自藥材中進行 PCR 反應 (Panaccio et al., 1993; Thomson and Henry, 1995), 將有助於提升該技術的發展潛力。

AFLP 分析技術

擴增酶切片段多型性(amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)是一種基於 PCR，也是一種 RAPD 與 PCR 相結合的技術，它承襲了 RFLP 的可靠性和 RAPD 的方便敏捷。AFLP 只需要極少量的 DNA 材料，不需要 Southern 雜交，不需預先知道 DNA 的順序信息，實驗結果可提供大量穩定可靠的信息。AFLP 產物是典型的孟德爾方式遺傳。

AFLP 的基本原理是對基因組 DNA 限制酶切片段進行選擇性擴增。首先限制酶產生基因組 DNA 酶切片段，然後使用雙鏈接與基因組 DNA 的酶切片段相連接形成擴增反應的模板。接與接相鄰的酶切片段的幾個鹼基序列作為引物的結合位點。擴增的 DNA 限制性酶切片段由兩個限制性內切酶產生，一個為酶切位點較少的限制酶（如 Eco R I），另一個為多酶切位點的限制酶（如 Mse I）。所以，AFLP 反應的結果是主要擴增那些由上述兩種酶共同酶切的片段。採用雙酶切的原因是：（1）切點數少的酶可減少擴增片段的數目。（2）經由不同引物的組合，產生大量不同的 AFLP 指紋。

AFLP 是 1993 年 Zabeau 與 Vos 提出一個新的 DNA 指紋分析技術。其主要試驗步驟為首先將基因組 DNA 以兩種限制酶切開（double digestion），之後再以帶有前述所使用之酶專一序列的兩個雙股接子（adapter）分別黏於被切出之 DNA 片段的兩端，以產生模板 DNA 進行後續的 PCR 擴增，而進行 PCR 擴增時所使用的引子，其 5' 端為與轉接子核心序列（core sequence）及酶專一序列互補的序列，而 3' 端則帶有選擇性的核苷酸延伸序列（selective extension）。擴增程序分兩階段進行，第一個擴增程序稱為前擴增（preamplification），係以帶有一個選擇性核苷酸延伸序列的引子進行擴增反應；第二個擴增程序稱為選擇性擴增（selective amplification），係以帶有較長選擇性核苷酸延伸序列的引子進行擴增反應。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，所以基本上也成襲了 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。就再現性而言，其中規模最大的研究比較是，1997 年數個歐洲分生實驗室共同嘗試比較在同一種試驗操作步驟下，由各不同實驗室所作出的條帶圖譜是否一致，以瞭解於各實驗室間交換彙集試驗結果資料的可行性，參與比較的分子標記包括 RAPD、AFLP 與 SSR，結果顯示 AFLP 再現性最高，來自於 6 個實驗室針對兩個甜菜品系，以 2 對引子組合進行 AFLP 分析所得的條帶圖譜中，僅其中一個實驗室有一條帶缺失，其餘結果均同（Jones et al.,1997）。

目前已應用 AFLP 分子標記進行遺傳歧異研究之作物包括：水稻 (Subudhi et al., 1998; Zhu et al., 1998)、玉米 (Pejic et al., 1998)、大麥 (Schut et al., 1997)、小麥 (Bohn et al., 1999)、大豆 (Powell et al., 1996)。這些研究大部分仍沿用 Vos 等學者的原始作法，係採用放射性磷進行引子之標定；而少部分研究是以非放射性螢光進行引子之標定 (Lu et al., 1996; Hartl and Seefelder, 1998)，並不針對引子進行任何標定，直接於執行序列膠體電泳後以銀染方式偵測產物。

AFLP 是 20 世紀 90 年代初期發展起來的用於檢測基因組限制性片段多態性的 DNA 指紋技術。它類似於 RFLP，是對限制酶切片段進行分析，穩定而可靠；又類似於 RAPD，是一種半隨機的 PCR 擴增。因此，這個技術兼顧了 PCR 的高效性與 RFLP 的準確性的雙重優點。另一方面它所顯示的只是擴增片段的有與無，是顯性標記，並不能區分二倍體生物的純合與染合狀態，因此在進行指紋分析時受到與 RAPD 指紋同樣的限制。由於 AFLP 引子設計的巧妙與搭配的活使其成為當今獲得多態性效率最高的分子標記。

AFLP-PCR 是一種半隨機擴增

AFLP-PCR 是一種半隨機擴增，不需預先知道被分析基因組 DNA 的序列信息。AFLP 引子 5'-端的核心部份與人工接點互補，而接點是按合成隨機物的原則設計的。引子的中間部份與所採用的限制性內切酶的識別位點互補，引子的 3'-端是 2~3 個選擇性鹼基。如此巧妙的設計使得 AFLP 技術在許多領域得到廣泛應用，特別是對那些目前為止序列信息還很貧乏的野生物種的研究更具現實意義。

多態性高，信息量大

設計不同的人工接點就會相應的產生不同的 AFLP 引子。進行雙酶切時，除了通常採用 EcoR I 和 Mse I 外，還可用 Hind III、Pst I、Bgl III、Xba I、Taq I 等多種限制性內切酶。引子 3'端加的選擇性鹼基的數目可以是 2+2、2+3 也可以是 3+3，這些鹼基的組成也是多種多樣的。因此在理論上，AFLP 能產生的標記數目是無限的。通常進行一次 AFLP 可得 50~100 多條擴增帶。迄今為止，每個 AFLP 反應所能檢出的多型性片段之多，效率之高，是任何一種其他的分子標記無可比擬的。

是定位與選殖基因的有利工具

AFLP 不但是很好的 DNA 指紋技術，也是定位選殖的有利工具。AFLP 既可

作為指紋技術用來分析不同複雜程度的基因 DNA，又是當前作圖效率最高的一種分子標記，用於構建高密度的連鎖圖譜。它既可研究基因組，又可分析選殖的 DNA 大片段。因此 AFLP 是定位選殖目的基因的強有利工具。經由 AFLP 多型性檢測，尋找到優良品系或抗逆品系專一的標記，建立起一個標記與某一目的之間的連鎖關係，然後通過各種選殖策略，最終分離鑑定出該目的基因。大多數 AFLP 擴增片段與基因組的單一位置相對應，因此 AFLP 也可作為遺傳圖譜與物理圖譜的界標。

操作 AFLP 有一定難度

進行 AFLP 的步驟多，流程長，提升每一步驟的條件十分重要。模板 DNA 的純化、內切酶的選擇與完全消化、接點的連接效率、預擴增的條件與產物的稀釋、選擇性擴增時引子組合的篩選（選擇鹼基數目與組成）、引子對濃度的比例以及在現實可能條件下檢測手段的確定等，一系列決定過程都需要反覆摸索。因此簡化操作步驟勢在必行，按照我們的經驗，酶切點與連接兩步完全可在一次反應中完成，因而大幅縮短反應時間，簡化了實驗流程。由此可見，AFLP 指紋分析在操作上確有一定難度，但只要克服技術障礙，一切將迎刃而解。在 ABI 310 或 377 自動測序儀上作螢光檢測，並使用 GeneScan 軟體處理數據，已可順利進行，但價格昂貴。一般實驗室仍需採用同位素檢測，有些實驗室銀染效果也可行（Cho et al. 1996, Chalhoub et al. 1999）。

近年來中草藥生物科技已儼然成為臺灣發展生技產業的重點之一，保健食品的開發亦蔚為風潮；惟功效之證據的科學化、栽培制度之規範、產品製程之管控，亟待進一步加強，以符合全球市場之需求。我們先進的農業技術，是中草藥科學化的穩固基礎，亦是我們面對大陸及其他國家競爭，最有發展潛力的關鍵。但在此過程中，活性成份仍需確定，如此才能有效建立 cGMP 制度，產品製程之品管，也才會有所依據。

中草藥品管包括兩部分，一是化學成分，二是品種（基源）。在選種、育種方面，得到優良的品種是發展藥用植物生技產業的必要條件；因此，如何建立該優良品種之 DNA 指紋圖譜，並得到專一性高的遺傳標誌或特定鑑別序列，是刻不容緩的工作。常用來鑑別品種的 DNA 指紋分析技術主要包括：RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD ((random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)等；這些分析技術各有其優缺點；面對草藥，甚至中藥的 DNA 萃取，量少且污染嚴重，是造成聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 或限制酶分解不穩定的主要原因；因此，DNA 指紋分析結果之再現性低，是分析過程中最要小心

避免的地方；分析過程的軟、硬體條件，必須予以規範。與其標誌的篩選，特定 DNA 序列之獲得，將可更清楚的將品種予以確定，就像鑑定人的身份一樣準確；因此，中草藥 DNA 資料庫的建立，是龐大且必須執行的工作。該資料庫建立的目的，是為了一、品質管控，二、品鑑定，三、真偽鑑別；至於該資料庫界定的範圍，則有以下的考量，以決定材料的優先順序，一、以臺灣每年中藥材進口量大的為主，二、以品種或真偽難以辨認的中藥材或藥用植物為主，三、以保育類的中藥材或藥用植物為主，四、以道地藥材為主，五、以臺灣特有藥用植物為主。除了顧及中藥的龐大市場，我們應選擇性與大陸競爭之外，本土草藥的發展，仍需大家共同努力，而安全性是首要的考量，如何證明不具有慢性毒性及長期不良副作用，是必須特別注意之處。建立該資料庫的具體做法應有下列幾個方向，一、篩選有效成分作用的多目標相關基因，二、篩選有效成分生合成的相關基因，三、篩選足以鑑別基源品種的分子標誌，四、設計高專一性的引物，五、生物晶片的開發。

面對中草藥龐大的生技市場，我們應認清我們的優勢何在，我們要克服的瓶頸在哪裡；在品質管制方面，藥用植物開發過程中所面臨的難題與中藥材類似，我們提出以下幾點，作為今後的參考，一、品種混雜，不易區分的問題，二、同名異物，同物異名的問題，三、有效成分無法確定的問題，四、主成分因方劑而異的問題，五、複方藥效無法決定的問題，六、加工之後，原料鑑別的問題。

目前藥用植物正進行開發的有金線連、石斛、樟芝、山藥、野苦瓜.....等；值得一提的是，除了保健食品的開發之外，化妝品的市場亦具有十足的潛力，例如護膚的系列產品。不論在製藥、保健或化妝品的生技研發，相信我們很快就有更亮麗的成績展現。

參考文獻

1. Carlos P, Maria LR. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Pl. Sci.* 2002; 162: 817-24.
2. Chen KP, Zhan QC, Xing QH, Wang ZP, Jin DM, He DJ, Wang B. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. *Theor. Appl. Genet.* 2003; 106: 293-7.
3. Cheng KT, Chang HC, Su CH and Hsu FL. Identification of dried rhizomes of *Coptis* species using random amplified polymorphic DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 1997; 38:241-244.
4. Cheng KT, Su CH, Chang HC, and Huang JY. Differentiation of genuines and counterfeits of *Cordyceps* species using random amplified polymorphic DNA.

- Planta Medica, 1998; 64:451-453.
5. Cheng KT, Fu LC, Wang CS, Hsu FL, Tsay HS. Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* species with RAPD markers. *Pl. Med.* 1998; 64: 46-9.
 6. Cheng KT, Tsay HS, Chen CF, and Chou TW. Determination of the Components in a Chinese prescription, Yu-Ping- Feng San by RAPD analysis. *Planta Medica*, 1998; 64:563-565.
 7. Cheng KT, Su BC, Chen CT and Lin CC. RAPD analysis of *Astragalus* Medicines in Taiwan Market. *American Journal of Chinese Medicine* 2000; 28: 273-278.
 8. Cheng KT, Huang H and Tzeng CH. RAPD analysis of *Lycium barbarum* Medicine in Taiwan Market. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2000; 41:11-14.
 9. Doyle JD, Doyle JL, Bailey LH. Isolation of plant DNA from fresh tissue. 1990; *Focus*. 12: 13.
 10. Du XM, Sun NY, Hayashi J, Chen Y, Sugiura M, Shoyama Y. Hepatoprotective and antihyperliposis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*. *Phytother. Res.* 2003; 17: 30-3.
 11. Du XM, Sun NY, Irino N, Shoyama Y. Glycosidic constituents from in vitro *Anoectochilus formosanus*. *Chem. Pharm. Bull.* 2000; 48: 1803-4.
 12. Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Soderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey KM. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 8595-600.
 13. Hodkinson TR, Chase MW, Renvoize SA. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany.* 2002; 89: 627-36
 14. Kyeong MP, Young SK, Tae CJ, Cheol OJ, Han JS, You HL, Ki YN, Jong DP. Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*. *Pl. Med.* 2001; 67: 122-6.
 15. Lin CC, Huang PC, Lin JM. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am. J. Chin. Med.* 2000; 28: 87-96.
 16. Lin JM, Lin CC, Chiu HF. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Am. J. Chin. Med.* 1993; 21: 59-69.
 17. Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, Ipinaz R, Villani F. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. *Theor.*

- Appl. Genet. 2002; 104: 1064-70.
18. Menz MA, Klein RR, Mullet JE, Obert JA, Unruh NC, Klein PE. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. *Pl. Mol. Biol.* 2002; 48: 483-99.
 19. Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997; 94: 597-602.
 20. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Amerliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 77: 233-8.
 21. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002; 29: 684-8.
 22. Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glossl J, Steinkellner H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome.* 1999; 42: 367-73.
 23. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, Calif. 1973.
 24. Tseng CC, Shang HF, Wang LF, Su B, Hsu CC, Kao HY, Cheng KT. Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus*. *Phytomedicine* 2004. (in press).
 25. Vendrame WA, Kochert G, Sparks D, Wetzstein HY. Field performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryogenic cultures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2000; 125: 542-6.
 26. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 4407-14.
 27. Wang SY, Kuo YH, Chang HN, Kang PL, Tsay HS, Lin KF, Yang NS,
 28. Shyur LF. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1859-65.