

台灣地區茶樹種植資源基因歧異度及分子基原資料庫之建構

顏呈恩、李世傑

E-mail: 345321@mail.dyu.edu.tw

摘要

本實驗利用茶葉改良場所保存的台灣地區茶樹品種為材料，將茶菁製備為綠茶，以HPLC定量茶葉中的10種兒茶素含量，並以兒茶素作為生化標誌進行茶種基因歧異度的變化的探討。同時也根據茶種兒茶素含量及分布的數據資料，進行主成份分析及依據UPGMA的群聚分析，以探討不同茶種兒茶素成分與品種、採收季節和適製性等農藝性狀關聯性之探討。並且以pITS2、trnL intron、trnL-trnF IGS之核?酸序列作為分子標誌將茶葉改良場所保存的臺灣地區茶樹品種進行遺傳歧異度分析，並比對生化標誌之結果加以探討，以期建立臺灣茶樹品種之指紋資料庫的建立。實驗結果顯示，臺灣育成品種的總兒茶素含量普遍高於其他品種，其中臺茶四號（TD04）總甲基化兒茶素含量又為所有茶種之冠，其含量占茶葉乾重3.3（g/100g d.w.），具有抗過敏保健功能之潛力。臺灣野生山茶品種的兒茶素普遍偏低，原生種雖然較一般栽培型茶樹具有較強的抗逆境能力，但通常帶有某些不良性狀，如產量及品質方面的缺陷。將兒茶素與農藝性狀做相關性分析，總兒茶素（TC）與Caffeine、EC、ECG、EGC、EGCG及四種甲基化兒茶素含量有極顯著正相關，Caffeine與EGCG、ECG含量也有極顯著正相關，而EGCG、ECG為酯型兒茶素，占為總兒茶素含量60~70%，因此推論茶種之兒茶素總含量較高時，咖啡因含量可能也會屬於偏高的茶種。咖啡因與EGCG的含量與於抗蟲害能力有很大關連性，抗?能力、抗卷葉蟲能力、抗捲葉蟲、抗薊馬皆有顯著或極顯著之正相關性，擁有高含量的咖啡因或EGCG對於抗病蟲害能力較優。主成份分析結果，臺灣野生山茶品種落在第三與第四象限，臺灣野生山茶適合製成紅茶茶葉，而適製紅茶品種之茶種也大部分落於第三與第四象限，而適製綠茶品種及適製部份發酵茶品種以原點為中心散佈於四個象限並且有重疊的現象，發現兒茶素的含量與分佈和茶種的適製性有關連性，可供作製茶之參考。使用MVSP軟體以UPGMA方法計算，對茶種做群聚分析，在Euclidean距離為8作為分群依據時，很明顯的將赤芽山茶（TD85）和水井（TD100）與其他茶種區隔開來成為獨立之群集，顯示出此兩株山茶品種的特異性。將pITS2序列112條、trnL intron序列104條、trnL-trnF IGS序列98條分別以BioEdit進行多重序列排比（Multiple sequence alignments），發現pITS2序列具有較高之核?酸序列多型性，序列相似度為0.379~0.994，且變異位點高達149個；cpDNA序列保守性高，因此trnL intron與trnL-trnF IGS皆有相似度達100%的序列，trnL intron序列相似度為0.948~1.000，trnL-trnF IGS序列相似度0.979~1.000。可利用此三種DNA片段之分子標記技術以分析茶葉品種之差異之技術建立台灣地區茶種的DNA圖譜資料庫。系統發育樹（Phylogenetic trees）之pITS2分析結果顯示，利用鄰位連接法（Neighbor Joining Method，簡稱NJ）、最小進化法（Minimum Evolution methods，簡稱ME）及最大簡約法（Maximum parsimony methods，簡稱MP）可將臺灣山茶分為兩個獨立之群集，證明臺灣野生茶之ITS2序列具有獨特性，但無法成功將臺灣地區茶種依親緣性或來源類型或茶葉適製性分群。本實驗結果除可建立茶樹的種質資源資料庫並可提供未來選種育種的參考。

關鍵詞：茶、兒茶素、分子標誌、種質資源、基因歧異度

目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要iii 英文摘要vi 誌謝viii 目錄ix 圖目錄xii 表目錄xiv 1.前言1 2.文獻回顧3 2.1茶葉簡史3 2.1.1茶葉簡介3 2.1.2茶樹在生物學上的分類3 2.1.3臺灣茶樹簡史 5 2.2茶葉主要化學成分介紹8 2.2.1兒茶素8 2.2.2咖啡因9 2.2.3其他化學成分13 2.2.4以化學成分分析遺傳變異性13 2.3臺灣茶樹樹種之分子鑑定技術14 2.3.1臺灣茶樹種原介紹17 2.3.2分子標記之應用17 2.3.3細胞核內特定基因片段及葉綠體基因體的組成及其分子標誌之應用22 2.3.4DNA分子標記在臺灣茶樹品種資源研究24 2.4建立臺灣茶樹樹種DNA指紋資料庫29 3.材料與方法31 3.1材料與儀器31 3.1.1實驗材料31 3.1.2兒茶素含量分析之實驗藥品31 3.1.3兒茶素含量分析之儀器設備32 3.1.4萃取genomic DNA之實驗藥品33 3.1.5偵測DNA濃度之儀器設備34 3.2研究方法39 3.2.1兒茶素測定39 3.2.2茶樹種原兒茶素及葉部性狀之分析39 3.2.3萃取Genomic DNA40 3.2.4引子設計41 3.2.5聚合?鏈鎖反應43 3.2.5電泳分析46 3.2.6定序46 3.2.7臺灣茶種DNA資料庫之建立與序列分析46 4.結果與討論47 4.1以生化標誌將臺灣茶種建立種原資料庫 47 4.1.1茶葉葉片中兒茶素的HPLC分析與定量47 4.1.2臺灣茶樹種原兒茶素差異及相關性分析60 4.1.3臺灣茶樹種原兒茶素與農藝性狀之相關性分析62 4.1.4茶樹品種間兒茶素的主成份分析65 4.1.5依據生化標誌將臺灣茶樹種原進行群集分析71 4.2以分子標誌將臺灣茶種建立種原資料庫 75 4.2.1pITS2序列分析75 4.2.2依據pITS2序列進行茶樹種原之群集分析85 4.2.3cpDNA序列分析88 4.2.4依據cpDNA序列進行茶樹種原之群集分析102 5.結論108 參考文獻110 圖目錄 圖2.1兒茶素結構圖10 圖2.2甲基化兒茶素結構圖11 圖2.3兒茶素前驅物與咖啡因結構圖12 圖3.1pITS2序列結構示意圖42 圖3.2trnL-trnF IGS與trnL intron序列結構示意圖43 圖4.1(-)-Gallocatechin (GC) 和caffeine之檢量線48 圖4.2(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) 和(-)-Epigallocatechin (EGC) 之檢量線49 圖4.3(-)-Catechin (C) 和(-)-Epicatechin

(EC)之檢量線50 圖4.4(-)-Epicatechin gallate (ECG)之檢量線51 圖4.5兒茶素、咖啡因和甲基化兒茶素HPLC圖譜52 圖4.6臺東茶葉改良場107種茶樹種編號對照之主成分散佈圖68 圖4.7臺東茶葉改良場107種茶樹種原類型主成分散佈圖69 圖4.8臺東茶葉改良場107種茶樹種親緣性原類型主成分散佈圖70 圖4.9以化學成分進行將臺灣茶樹種107種作群集分析所得UPGMA圖73 圖4.10裁切pITS2序列示意圖，以臺茶12號為例76 圖4.11臺灣茶樹種原pITS2多重序列比對圖77 圖4.12臺灣茶樹種原pITS2分子標誌群集分析圖86 圖4.13臺灣茶樹種原trnL intron多重序列比對圖90 圖4.14臺灣茶樹種原trnL-trnF IGS多重序列比對圖97 圖4.15臺灣茶樹種原trnL intron分子標誌群集分析圖104 圖4.16臺灣茶樹種原trnL-trnF IGS分子標誌群集分析圖106 表目錄 表2.1茶葉的分類及製法4 表2.2臺灣茶業改良場培育的茶種及其形態特徵表7 表3.1臺灣育成茶樹品種資料表35 表3.2臺東茶業改良場保存茶樹之品種資料表36 表3.3pITS2、trnL-trnF IGS與trnL intron PCR反應液配方44 表3.4pITS2 PCR溫度循環參數45 表3.5trnL-trnF IGS與trnL intron PCR溫度循環參數45 表4.1臺東茶業改良場107種茶樹品種化學成分分析表53 表4.2不同茶樹品種兒茶素與咖啡因含量範圍59 表4.3臺東茶葉改良場107種茶葉生化成分之相關性61 表4.4兒茶素與農藝性狀之相關性64 表4.5臺灣主要茶種10項化學成分之主成分分析特徵向量67 表4.6利用生化標誌得到107個茶樹種原群集聚分群表74 表4.7臺灣茶樹種原pITS2序列相似度79 表4.8臺灣茶樹種原pITS2序列變異位點與核?酸比例表80 表4.9臺灣茶樹種原trnL intron序列相似度89 表4.10臺灣茶樹種原trnL intron序列變異位點與核?酸比例表95 表4.11臺灣茶樹種原trnL-trnF IGS序列相似度96 表4.12臺灣茶樹種原trnL-trnF IGS序列變異位點與核?酸比例表101

參考文獻

- 1.王建波、張文駒、陳家寬。1999。核rDNA的ITS序列在被子植物系統與進化研究中的應用。植物分類學報。37(4):407-416。
- 2.史樞、陳永盛、楊宗國、石振原、廖增祿。1972。臺灣野生茶之調查。臺灣農業 8(4):199-201。
- 3.李臺強、張清寬。2003。臺灣茶樹種原圖誌-建廠100週年紀念特刊。第1-202頁。行政院農委會茶業改良場編印。臺北，臺灣。
- 4.甘子能。1983。近二十年來茶葉化學的研究發展。食品工業15(10):23-27。
- 5.甘子能。1985。製茶原理的生化觀。食品工業17(7):25-37。
- 6.池宗憲、林芊玲、何南輝。2002。臺灣茶街。宇河文化出版有限公司。臺北，臺灣。
- 7.吳振鐸。1973。從茶湯之化學成分談臺灣茶葉品質之改進問題。臺灣農業季刊。9(1):194-198。
- 8.呂海鵬、譚俊峰、林智。2006。茶樹種質資源EGCG3"Me含量及其變化規律研究。茶葉科學26(4):310-314。
- 9.汪毅。2006。茶葉中甲基化EGCG的調查研究:34。西南大學碩士論文。重慶，中國。
- 10.阮逸明、陳英玲。1998。茶葉中兒茶素類萃取及純化之研究。臺灣茶業研究彙報17:1-8。
- 11.阮逸明。1996。臺灣省茶業改良場場誌。第130-164頁。臺灣省茶業改良場編印。桃園，臺灣。
- 12.阮逸明。1997。臺灣之茶文化及其科學。臺灣茶業研究彙報16:79-85。
- 13.林木連、蔡右任、張清寬等著。2003。臺灣的茶葉。第23-25頁。行政院農委會茶業改良場。臺北，臺灣。
- 14.林亞平、胡智益、蔡右任、林福順。2010。成茶品種快速分子鑑定技術之研究及應用。作物、環境與生物資訊7:37-51。
- 15.林福順。2006。中草藥基原之DNA鑑定。『中醫藥基因體研究及其核心技術訓練』暨『系統生物學虛擬實驗室研討會』，2006年10月20-21日，臺北市。
- 16.林世昱。2002。應用隨機增殖DNA片段檢測茶樹品種的親緣關係。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。臺北，臺灣。
- 17.今惠淑、梁月榮、陳建良。2001。中、韓兩國主要茶樹品種基因組DNA多態性比較研究。茶葉科學，21:103-107。
- 18.張捷。2010。臺灣地區高甲基化兒茶素茶樹種篩選及其種質資源歧異度研究。大葉大學生物產業科技學研究所碩士論文。彰化，臺灣。
- 19.胡益智、蔡右任、林順福。2007。利用DNA分子標誌鑑別臺灣茶樹品種極評估種原之遺傳歧異度。中國農學通報，23:380-385。
- 20.胡智益。2004。臺灣茶樹種原葉部性狀及DNA序列變異之探討。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。臺北，臺灣。
- 21.徐英祥編譯。1995。臺灣之茶樹品種。臺灣日據時期茶業文獻編譯。第1-25頁。臺灣省茶業改良場編印。桃園，臺灣。
- 22.徐英祥、阮逸明。1993。臺灣茶樹育種回顧。臺灣茶業研究彙報12:1-18。
- 23.張如華、阮逸明、蔡永生。1995。茶葉主要化學成分於製茶過程中之變化及其對品質之影響。農特產品加工研討會專刊:120-148。
- 24.陳右人。1998。茶樹品種與育種介紹。茶葉技術推廣手冊茶作篇。第7-14頁。臺灣省茶業改良場編印。桃園，臺灣。
- 25.陳右人。2005。臺灣茶之種源與育種。臺灣學者論文。第11屆。臺北，臺灣。
- 26.陳志輝。2004。分子標記技術在茶樹研究中的應用。福建茶業試驗方法，3:22-24。
- 27.劉本英、成浩。2007。分子指紋圖譜技術及其在茶樹品種資源中的應用。茶葉 33卷4期:198-202。
- 28.蔡俊明、張清寬、陳右人、陳國任、蔡右任、邱垂豐、林金池、范宏杰。2004。2004年度命名茶樹新品種臺茶19號及臺茶20號試驗報告。臺灣茶業研究彙報 23:57-78。
- 29.蔡憲宗、蔡依真、廖文如、張清寬、王裕文。2003。利用AFLP及RAPD分子標誌分析臺灣茶樹品種(系)遺傳歧異度。臺灣茶業研究彙報，22:17-32。
- 30.蔡憲宗、蔡依真、廖文如、張清寬、王裕文。2004。臺灣地區青心烏龍品種外表型及AFLP標記變異之研究。臺灣茶業研究彙報，23:21-30。
- 31.蔡依真。2003。臺灣茶樹種原遺傳歧異度研究。國立臺灣大學農藝研究所碩士論文。臺北，臺灣。
- 32.蘇夢淮。2006。臺灣山茶之分類研究。國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所碩士論文。臺北，臺灣。
- 33.賴正南編譯。1990。茶業技術推廣手冊製茶技術。行政院農業委員會茶業改良場編印。桃園，臺灣。
- 34.賴昭安。1998。應用RAPD及ISSR研究臺灣栽培與野生茶樹之遺傳歧異度及親緣關係。國立中興大學植物學系碩士論文。
- 35.Astrid Nehlig, Daval Jean-Luc, Gerard Debry. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. Brain Research Reviews 17(2):139-170。
- 36.Alvarez, I. Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol. Phylogenet. Evol. 29:417-434。
- 37.Ariyaratna, C. and Gunasekare, K. 2006. Genetic base of tea (*Camellia sinensis* L.) cultivars in Sri Lanka as revealed by pedigree analysis. J. Appl. Genet., 48:125-128。
- 38.Cao, G., Sofic, E. Prior, R. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. J Agric Food Chemistry 44:3426-3431。
- 39.Carmen Cabrera, Reyes Artacho, Rafael Gimenez. 2006. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. Journal of the American College of Nutrition. 25(2):79-99。
- 40.Chiu Feng-Lan, Lin Jen-Kun. 2005. HPLC Analysis of Naturally Occurring Methylated Catechins, 3"- and 4"-Methyl-epigallocatechin Gallate, in Various Fresh Tea Leaves and Commercial Teas and Their Potent Inhibitory Effects on Inducible Nitric Oxide Synthase in

Macrophages, *J. Agric. Food Chemistry* 53:7035-7042. 41. Chiou, S. J. Yen, J. H. Fang, C. L. Chen, H. L. Lin, T. Y. 2007. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Med* 73:1421-1426. 42. Chen, S. Yao, H. Han, J. Liu, C. Song, J. Shi, L. Zhu, Y. Ma, X. Gao, T. Pang, X. Luo, K. Li, Y. Li, X. Jia, X. Lin, Y. Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*. 5:e8613. 43. Chung, F.L. Schwartz, J. Herzog, C.R. Yang, Y. M. 2003. Tea and cancer prevention: Studies in animals and humans. *J Nutr* 133:3268 – 3274. 44. Fujimura Yoshinori. Umeda Daisuke. Yamada Koji. Tachibana Hirofumi. 2008. The impact of the 67 kDa laminin receptor on both cell-surface binding and anti-allergic action of tea catechins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume 476 (2) :133-138. 45. Fukuda, T. Yokoyama, J. Ohashi, H. 2001. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19:246 – 258. 46. Gerats, A. M. Martin, C. 1992. Flavanoid synthesis in *Petunia hybrida*: genetics and molecular biology of flower colour. *Phenolic Metabolism in Plants* 167 – 175. 47. Gupta, S., K. Hastak., N. Ahmad, J.S. Lewin, and H. Mukhtar. 2001. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10350-10355. 48. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. 49. Hirasawa M., Takada K. 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 53:225 – 229. 50. Hodgson, J.M. Devine, A. Puddey, I.B. Chan, S.Y. Beilin, L.J. Prince, R. L. 2003. Tea intake is inversely related to blood pressure in older women. *J Nutr* 133:2883 – 2886. 51. Kaundun, S.S., A. Zhyvoloup, and Y.G. Park. 2000. Evaluation of genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica* 115:7-16. 52. Kim, J. H. Kang, B. H. Jeong, J. M. 2003. Antioxidant antimutagenic and chemopreventive activities of a phyto-extract mixture derived from various vegetables fruits and oriental herbs. *Food Sci Biotechnol* 12:631 – 638. 53. Kojoma, M. Kurihara, K. Yamada, K. Sekita, S. Satake, M. Iida, O. 2002. Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the trnL-trnF chloroplast DNA. *Planta Med.* 68:94 – 96. 54. Lambert, J. D. Yang, C.S. 2003. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 133:3262 – 3267. 55. Lau, D. T. Shaw, P. C. Wang, J. But, P. P. 2001. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Planta Med* 67:456-460. 56. Lee, S. C. Lee, C. H. Lin, M. Y. Ho., K. Y. 2010. Genetic identification of *Cinnamomum* species based on partial internal transcribed spacer 2 of ribosomal DNA. *J. Food and Drug Anal.* 18:225-231. 57. Lee Shin-Chieh. Yan Rui-Hong. Cheng Hun-Yuan. Wu Sang-Shung. Liu Shu-Ying. 2009. Screen and Genetic Assessment of Tea Germplasms with Elevated Methylated Catechin, (-)-Epigallocatechin-3-O-(3-Omethyl)gallate. *Food Chemistry.* 57 (19) :8906 – 8912. 58. Magoma, G. N. Wachira, F. N. Obanda, M. Imbuga, M. Agong, S. G. 2000. The use of catechins as biochemical markers in diversity studies of tea (*Camellia sinensis*) . *Genetic Resources and Crop Evolution* 47:107-114. 59. Millin, D. J. and Rustidge, D. W. 1967. Tea manufacture. *Process Biochem.* 6:9-13. 60. Mittal, A. Pate, M. S. Wylie, R. C. 2004. EGCG down regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 24:703 – 710. 61. Negishi, H. Xu, J. W. Ikeda, K. Njlekela, M. Nara, Y. Yamory, Y. 2004. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 134:38 – 42. 62. Ni, S., Yao, M., Chen, L., Zhao, L., Wang, X. 2008. Germplasm and breeding research of tea lant based on DNA maker approaches. *Front. Agric. China*, 2:200-207. 63. Saravanan, M. Maria John, K. M. Raj Kumar, R. Pius, P.K. Sasikumar, R. 2004. Genetic diversity of UPASI tea clones (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) on the basis of total catechins and their fractions. *Phytochemistry* 66:561 – 565. 64. Saini, A. Reddy, S. K. Jawali, N. 2008. Intra-individual and intra-species heterogeneity in nuclear rDNA ITS region of *Vigna* species from subgenus *Ceratotropis*. *Genet Res (Camb)*. 90:299-316. 65. Sano Mitsuaki. Suzuki Masazumi. Miyase Toshio. Yoshino Kyoji. Mari Maeda-Yamamoto. 1999. Novel Antiallergic Catechin Derivatives Isolated from Oolong Tea. *J. Agric. Food Chemistry* 47:1906-1910. 66. Takabayashi, F. Harada, N. Yamada, M. Murohisa, B. Oguni, I. 2004. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 39:61 – 63. 67. Taberlet P. Gielly, L. Pautou, G. Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol.* 17:1105-1109. 68. Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599. 69. Tsai, L. C. Yu, Y. C. Hsieh, H. M. Wang, J. C. Linacre, A. Lee, J. C. 2006. Species identification using sequences of the trnL intron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Sci Int.* 164:193-200. 70. Vijayan, K. and Tsou, C.-H. 2008. Technical report on the molecular phylogeny of *Camellia* with nrITS: the need for high quality DNA and PCR amplification with Pfu-DNA polymerase. *Bot. Stud.*, 49:177-188. 71. White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In “ PCR protocols: a guide to methods and applications. ” , 315-322. 72. Wight, W., 1959. Nomenclature and classification of the tea plant. *Nature* 183:1726 – 1728. 73. Yang, Y. C. Lu, F. H. Wu, J.S. Wu, C. H. Chang, C. J. 2003. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med* 164:1534 – 1540. 74. Yao, H. Song, J. Liu, C. Luo, K. Han, J. Li, Y. Pang, X. Xu, H. Zhu, Y. Xiao, P. Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*. 5:e13102. 75. Yip, P. Y. Chau, C. F. Mak, C. Y. Kwan, H. S. 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chin. Med.* 2:9. (doi:10.1186/1749-8546-2-9) 76. Yi, T. Miller, A. J. Wen, J. 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Mol Phylogenet. Evol.* 33:861 – 879. 77. Zhang, Y.-B., Shaw, P.-C., Sue, C.-W., Wang, Z.-T. Tong, Y. 2007. Molecular authentication of Chinese herbal materials. *J. Food and Drug Anal.*, 15:1-9.