

# 檢測陰香引子之開發與應用

陳季倫、李世傑、梁志欽

E-mail: 387166@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh.)為台灣原生種的樟科喬木，國際上使用肉桂已有相當多年的歷史，且廣泛的被運用在醫藥、食品、水土保持、綠化及化妝品工業上，乃是極具有發展之高經濟作物。近年來，種苗業者將外來引進之陰香(*Cinnamomum burmannii* Bl)以土肉桂之名極力推薦為環境綠美化樹種，由於在外觀形態上乍看土肉桂與陰香確有幾分相似，不易分辨而易魚目混珠，造成樹種鑑定上之紛爭。且有研究發現，陰香與土肉桂有天然雜交之可能性，更加深了鑑定上之困難。本研究利用前人所設計的引子組，以同時產生三個條帶為基準，來測試土肉桂與陰香是否有天然雜交的可能性，而結果顯示陰香可能已有天然雜交的情況發生。故本研究利用以PCR為基礎的DNA分子標誌技術 - RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)，找出具有陰香特有性的DNA條帶，設計出陰香之專一性引子，經由電泳分析後於323bp處能夠出現特有的條帶，能確實鑑定出陰香，在常規的外觀型態以及化學成分鑑定方法之外，提供另一種不同但有效的鑑定方式。

關鍵詞：台灣土肉桂、陰香、RAPD、專一性引子

## 目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要 iii 英文摘要 iv 誌謝 v 目錄 vii 圖目錄 x 表目錄 xi 1前言 1 2前人研究 3 2.1肉桂及土肉桂之簡介 3 2.1.1肉桂之簡介 3 2.1.2肉桂於傳統中藥及臨床之應用 4 2.1.3土肉桂之簡介 6 2.1.4土肉桂之應用 7 2.1.5土肉桂的開發前景 7 2.2陰香之簡介 10 2.2.1陰香之應用 12 2.3土肉桂與陰香形態特徵與區別 13 2.4陰香與土肉桂雜交之可能性 15 2.5 DNA分子標誌技術 15 2.5.1 RAPD 16 2.5.2 SSR與ISSR 16 2.5.2.1 SSR ( Simple Sequence Repeat ) 16 2.5.2.2 ISSR ( Inter Simple Sequence repeat ) 17 2.5.3 ITS 17 2.6設計專一性引子進行單一物種分子鑑定 18 3材料與方法 20 3.1利用RAPD設計專一性引子與雜交測試 20 3.1.1研究材料 20 3.1.2 Genomic DNA之萃取與定量 20 3.1.3聚合?連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 24 3.1.4 RAPD (random amplified polymorphic DNA)試驗 25 3.1.5電泳分析與照相 27 3.1.6 PCR產物之純化回收 27 3.1.7 DNA定序 28 3.2 設計專一性引子與陰香進行分子鑑定 28 3.2.1陰香專一性引子設計 30 3.2.2再現性測試 30 3.2.3聚合?連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 31 3.3 土肉桂與陰香之雜交測試 32 3.3.1聚合?連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 33 4結果與討論 34 4.1 RAPD分子標誌於土肉桂及陰香蒐集品系之分析 34 4.1.1 DNA萃取 37 4.1.2 RAPD對於土肉桂及陰香之分析 37 4.2 土肉桂與陰香搜集品之專一性引子鑑定 39 4.2.1專一性引子對於陰香收集品的分析結果與討論 43 4.3 土肉桂與陰香之雜交可能性測試 43 4.3.1台灣土肉桂及陰香經由PCR反應後進行電泳跑膠結果 45 4.3.2土肉桂與陰香雜交可能性探討 49 5結論 50 參考文獻 52

## 參考文獻

- 1.尹華文。1991。不同營養系之省產土肉桂葉部精油收率及成分組成之差異。中華林學季刊, 24: 83-104。
- 2.尹華文、陳正豐、呂勝由。2007。土肉桂與陰香形態特徵及精油特性之研究。中華林學季刊 40(4):535 - 546。
- 3.王亞男、林建良。2002。利用RAPD分子標誌研究臺灣山毛櫸之族群變異。中華林學季刊 35(3): 265 - 272。
- 4.王振瀾、尹華文。1991。栽培地區及生長季節對土肉桂?子精油含?成分之影響。?業試驗所研究報告季刊 6: 313-328。
- 5.何坤益、楊政川、鄧書?、陳財輝。2004。應用ISSR 解析山木麻黃國際種原之遺傳變異與種原關係。台灣林業科學, 19 ( 1 ) :79-88。
- 6.何坤益。2006。台灣產土肉桂、山肉桂及胡氏肉桂之遺傳變異與分類地位。生物學報41(2):93-102。
- 7.李郁萱。2006。DNA 技術在臺灣產土肉桂基原鑑定及其理化特性之研究。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。
- 8.余勇建。2002。葉綠體trnL intron與trnL-trnF IGS序列於刑事鑑識應用之研究。中央警察大學鑑識科學研究所碩士論文。
- 9.林讚標編。1992。土肉桂專論。台灣省林業試驗所林業叢刊第38號。
- 10.洪賜耀。2006。應用葉部形態、ISSR、ITS 探討台灣樟屬植物(樟科)之親緣關係。嘉義大學森林暨自然資源學系碩士論文。
- 11.胡大維、?耀堂、何政坤。1985。台灣土肉桂?子精油化學成分之天然變?。台灣??業試驗所試驗報告 No.78。
- 12.胡大維。1992。土肉桂的分佈、營養系收集與營養系庫的建立。林業叢刊第38號p1-6。
- 13.許盟宗。2008。台灣土肉桂抑菌性及抗氧化性之研究。亞洲大學生保健營養生技學系研究所碩士論文。
- 14.陳秀蓮。2002。肉桂與其偽品陰香的鑑別。海峽藥學14(5):74-75。
- 15.陳品方。2000。台灣杉與土肉桂精油及其成分之生物活性。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。
- 16.陳品方、張上鎮、吳懷慧。2002。土肉桂?子精油及其成分之抗?活性。中華?學季刊 35(4): 397-403。
- 17.陳正豐、尹華文、呂勝由。2008。正視陰香對土肉桂的衝擊。台灣林業 34(6) : 26-30。
- 18.張上鎮、陳品方。2000。精油之抗細菌與抗真菌活性。林產工業 19 (2): 275-284。
- 19.張上鎮 2002 土肉桂葉精油的抗細菌活性與應用。林業研究專訊, 9(3):23-8。
- 20.張上鎮。2003。土肉桂葉子精油的生物活

性與應用。台灣林業, 28(6):31-5。 21.黃建曄。2007。利用RAPD與ISSR分子標誌評估台灣土肉桂之遺傳歧異度。亞洲大學生物科技與生物資訊學系碩士論文。 22.程必強、喻學儉、丁靖塏、孫漢董。1997。土肉桂與陰香形態特徵及精油特性之研究中國樟屬植物資源及其芳香成分。雲南科技出版社。p68-71。 23.楊開聰。1992。肉桂類在食品上的利用。土肉桂專欄-林業叢刊第38號。p85-90。 24.楊政川、李世傑、何坤益、林敏宜。2010。臺灣森林特產物 - 土肉桂。科學發展月刊 2(446):p28-33。 25.薛士緯。2009。以ITS序列探討台灣土肉桂和其相似種之親緣關係。國立嘉義大學森林暨自然資源研究所碩士論文。 26.謝瑞忠。2006。肉桂類天然香料的成分與應用。林業研究專訊 13(4):14-16。 27.蕭?文。2004。土肉桂ISSR遺傳分型。中國文化大學生物科技研究所碩士論文。 28.龐運同、董元玉。2004。肉桂及其偽品的鑑別。中國醫院藥學雜誌 24 (12):788。 29.Alvarez, I.; Wendel, J. F. Ribosomal. 2003. ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol. Phylogenet. Evol. 29, 417-434. 30.Aeschbach, R., J. Lolliger, B.C. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halli-well, O. I. Aruoma. 1994. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food Chem. Toxicol. 32: 31-36. 31.Barrata, M.T., H.J.D. Dorman, S. G. Deans, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, G. Ruberto. 1998. Antimicrobial and Antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour Frag J. 13: 235-244. 32.Blair, M. W., Panaud, O., and McCouch, S. R. 1999. Inter-simple sequence repeat amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet. 98:780-792. 33.Chester, T.L., J.D. Pinkston, D.E. Raynie. 1996. Supercritical fluid chromatography and extraction. Anal. Chem. 68 (12):487-514. 34.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. 35.Cheng, S. S., J. Y. Liu, C. G. Huang, Y. R. Hsu, W. J. Chen and S. T. Chang. 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. Bioresour. Technol. 100(1):457-464. 36.Chang, S.T. and S.S. Cheng. 2002. Antitermitic activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophloeum*. J. Agric. Food Chem. 50(6):1389-1392. 37.Deans, S. G. and Richie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. Int. J. Food Microbiol. 5: 165. 38.Dziezak, J. D. 1986. Preservatives: antioxidant. Food Technol. 40: 94-102. 39.Dey, P. M. and J. B. Harborne. 1991. Terpenoids. Methods in plant biochemistry.(Charlwood, B.V. and D.V. Banthorpe Eds.). 17:1-185. Academic Press. New York. 40.Fang, S. H., Y. K. Rao and Y. M. Tzeng. 2004. Cytotoxic Effect of trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum osmophloeum* leaves on human cancer cell lines. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2(2):136-147. 41.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. 42.Huang, T. C., H. Y. Fu, C. T. Ho, D. Tan, Y. T. Huang and M. H. Pan. 2007. Induction of apoptosis by cinnamaldehyde from indigenous cinnamon *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh through reactive oxygen species production, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia K562 cells. Food Chem. 103:434 – 443. 43.Hussain, R. A., J. Kim, T. W. Hu, J. M. Pezzuto, D. D. Soejarto and A. D. Kinghorn. 1986. Isolation of a highly sweet constituent from *Cinnamomum osmophloeum* leaves. Planta Med. 52: 403-404. 44.Kim, H. K., J. R. Kim and Y. J. Ahn. 2004. Acaricidal activity of cinnamaldehyde and its congeners against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). J. Stored Prod. Res. 40:55-63. 45.Lee, S.M., N.A. Garas, A.C. Waiss. 1986. High-performance liquid chromatographic determination of sesquiterpenoid stress metabolites in *Verticillium dahlia* binfected cotton stele. J. Agric. Food Chem. 34: 490-493. 46.Lee, H. C., S. S. Cheng and S. T. Chang. 2005. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. J. Sci. Food Agric. 85 (12): 2047-2053. 47.Lee, C. C., Wa, S. J., Chang, C. H.,and Ng, L. T. 2003 Antitermitic activity of *Cinnamomum cassia*. Phytotherapy Research. 48.Madsen, H.L., G. Bertelsen.1995. Species as antioxidants. Food Sci & Tech. 6(8): 271-277. 49.Rouseff, R. and Nagy, S. 1994. Health and nutritional benefits of citrus fruit component. Article., 48:125-126. 50.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. 51.Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 945-948. 52.Wang, S. Y., P. F. Chen and S. T. Chang. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. Bioresour. Technol. 96:813-818. 53.Wolf K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447. 54.Yen, T. B. and S. T. Chang. 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. Bioresour. Technol. 99:232-236. 55.Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Hung, Y., Ho, W. K. K. and Chen, Z. Y. 2001. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. J. Nutr. Biochem. 12: 144-152.