

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：110201e301

# 行政院農業委員會林務局九十四年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：942928

計畫名稱：**土肉桂種原精油品系遺傳分型與分子鑑定 (第1年/ 全程2年)**

(英文名稱) **Molecular genotyping and identification of essential oil composition of *Cinnamomum osmophloeum***

計畫編號：94農科-11.2.1-務-e3(1)

全程計畫期間：94年1月1日至95年12月30日

本年計畫期間：94年1月1日至94年12月31日

計畫主持人：黃士穎

執行機關：私立中國文化大學

## 土肉桂種原精油品系遺傳分型與分子鑑定

Molecular genotyping and identification of essential oil composition of *Cinnamomum osmophloeum*

期末報告

黃士穎

### 摘要

本研究利用 ISSR(簡單序列間的重複片段)分子標記來估算土肉桂種原的遺傳歧異度,以 10 個 ISSR 引子分析 103 個種原,十組分子標記共夾出 255 個條帶,條帶的大小範圍為 200~2000bp。其中單形性條帶為 36 條,多形性條帶有 219 條,平均每個引子可以夾出 25 個條帶。UBC876 所擴增出的條帶數最多為 34 條,而 UBC864 所擴增的條帶數最少,只有 17 條。所有引子平均多型性條帶百分比為 86.1%,遺傳歧異度為 0.2576。精油之絕乾收率介於 0.09~2.65%,平均收率為 0.45%。使用 GC-MS 鑑定出土肉桂精油包含有桂皮醛(cinnamaldehyde)、桉羅木醇(linalool)、乙酸桂皮酯(cinnamyl acetate)、檸檬油醇 2(citral 2)、檸檬油醇 1(citral 1)、 $\beta$ -cabebene 等 51 個成分。

### Abstract

Genetic diversity was estimated for 103 clonal garden individuals of *Cinnamomum osmophloeum* using inter simple sequence repeats markers. Two hundreds and fifty-five total markers were obtained for 10 ISSR primer pairs, of which 36 were monomorphic and 219 were polymorphic. On average, 25 markers were amplified for each ISSR primer pair. UBC876 primer pair amplified 34 markers that was the highest. In contrast, UBC864 amplified the least 17 markers. The average polymorphism was 86.1% and the genetic diversity was 0.2576. The absolute dry recovery of essential oil was ranged between 0.09 and 2.65%, and averaged 0.45%. GC-MS detected 51 different components of essential oils including cinnamaldehyde, linalool, cinnamyl acetate, citral 2, citral 1, and  $\beta$ -cabebene.

### 前言

土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh,  $2n=24$ ) 分類上屬於樟科(Lauraceae)、樟屬(*Cinnamomum*)。為台灣之特有樹種,分佈於海拔 400~1200 公尺之闊葉林中。土肉桂因含有肉桂醛(cinnamaldehyde),與中藥常用的茵桂(*Cinnamomum cassia* Blume)非常相似,所以又稱假肉桂。土肉桂特殊之處在於其葉部富含「精油」(Essential oils),精油多半存在於植物的油腺或線毛當中,有些則溶在樹脂充塞在植物體的空腔內(張, 2003)。

精油是植物在生理代謝的過程中會釋放出具獨特香味的物質,構成精油的主要成份為萜類,萜類是由異戊間二烯(Isoprene)為組成單元所組成。萜類依異戊間二烯個數來區分,可以分成單萜類(2 個異戊間二烯所組成,碳數為 10 個)、倍半萜類(3 個異戊間二烯所組成,碳數為 15 個)、二萜類(4 個異戊間二烯所組成,碳數為 20 個)。其中單萜類、倍半萜類具有高揮發性與特殊氣味,可經由水蒸氣蒸餾獲得,所蒸餾出來具有特殊香味的物質,泛稱精油(張、王, 1998)。與茵桂相比,土肉桂的優點為可以不用砍樹或剝樹皮,只要直接採取葉片萃取精油即可,故可以連年採收,提高利用率。

胡等學者(1985) 為了解台灣特產不同品系的土肉桂所含精油之組成份,以做為育種之依

據。採集了台灣中、南、東部地區的肉桂種原，在中國文化大學位於台北縣新店的華林實驗林場，建立了肉桂的營養系庫。建立營養系庫的目的為使肉桂的基因資源受到保護，也可提供做為進一步試驗研就之場所，而生產之插穗，可提供大量繁殖的苗木提供推廣之用。胡大維(1985)等人分析所採得的肉桂精油成份，將個精油所含各化學成分之高低，將肉桂分成 9 種不同之化學品系，分別是 (1)茵桂型(Cassia type) (2)桂皮醛型(Cinnamaldehyde type) (3)香豆素型(Coumarin type) (4)桉羅木醇型(Linalool type) (5)丁香酚型(Eugenol type) (6)樟腦型(Camphor type) (7)四-? 品醇型(4-Terpineol type) (8)桉羅木醇-? 品醇型(Linalool-terpineol type) (9)混合型(Mixed type)。其分類的依據為表 2。張(2003)研究十六種不同的肉桂的地理品系之精油成分，再依不同的組成份當作特徵做歸群分析 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic)，得到依精油的組成份與相對含量可將十六種地理品系的肉桂分為六種化學品系。此六種化學品系為：桂皮醛型、桉羅木醇型、樟腦型、桂皮醛-桂皮乙酸酯型、桂皮乙酸酯型、混合型。

多年來 DNA markers 常用於植物遺傳歧異度的研究，原因是 DNA markers 不易受環境影響，且能直接反應出生物的遺傳物質(Ude, 2002)。分子標記用於植物分析的優點有減少育種的世代、記錄方式簡單、DNA markers 的 data 有兩種一種為 Binary data：以 0 或 1 來記錄條帶的有無，如 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphisms)、ISSR (inter-simple sequence repeats) 這些分子標記，另一種資料為 Sequence data：是以 DNA 的序列來做分析，另外還具有的優點為不需要表型的資料、可以知道從雙親獲得的 genome%、到每個染色體的特殊部分源於哪個雙親。挑選分子標記需考慮的因素有再現性(reliability)、實驗操作的困難度(difficulty)、所花的費用(expensive)、多形性的考慮(polymorphism)。

ISSR(inter simple sequence repeat) (Zietkiewicz et al., 1994) 的原理是以 SSR 序列為基礎，於 3' 端或 5' 端加上由 1~3 個核苷酸所組成的錨(anchor)，於 3' 端加上錨的引物所放大的片段是位於染色體組內兩段 SSR 之間的序列，由於鍊合位置的序列變異，以及 SSR 之間序列的插入與缺失造成的長度變異，使得產物能表現出多型性，而於 5' 端加上錨的引物所放大的片段包含了被鍊合的染色體組 SSR 片段，因此其產物的型性除了來自上述的變異外，還包含鍊合的 SSR 序列本身的長度變異，是經由擴增簡單重複序列與簡單重複序列間的片段，因為 SSR 普遍存在動植物的基因組中，包括動物至植物，使其很適合發展成分子標誌系統。ISSR 技術之應用方面：1998 年 Wolfe 等人以 ISSR 分子標誌來研究 Penstemon(玄參科植物)利用八種引子來測定花粉傳播所造成的基因流，看其種化(speciation)，了解雜交種之間的關係。1999 年 Blair 等人以 ISSR 分子標誌研究米(Oryza sativa L.) 判斷其遺傳歧異度。2001 年 Hsiao 等人利用 ISSR 分子標記其中使用了六個 ISSR 引子研究台灣栽培茶樹與野生茶樹的遺傳歧異度與親緣關係。Paris and Yoash., (2003) 等人以 ISSR 標記研究南瓜(Cucurbita pepo) 的栽培品種與野生種間的關係，利用了五對 ISSR 引子，區分了四十五個品系間的關係，且 ISSR 產物的再現性相當高，證實 ISSR 的解析力可以運用於近緣的品系鑑定。本研究之目的為：利用 ISSR 分子標記以判定肉桂單株之主要精油成份，藉以進行種原品系認證並提供育種或優良品系篩選指標。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

樣本取自中國文化大學華林林場所採集的 103 個土肉桂種原，並以數字 1~103 作為標示，取各標葉片 3 至 5 片。將摘回的葉片以清水洗淨、擦乾，再以 75%酒精噴灑於葉的表面做消毒，再擦乾。每品種各取葉片尖端稱 0.5 克置於研鉢中，加入已滅菌的海沙及液態氬後研磨成粉末。在粉末回溫吸水前，將粉末裝入離心管以備萃取用。

## 二、DNA 萃取與 PCR 反應

採用修改自 Doyle and Doyle (1990) 之 Mini-CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) DNA 萃取法 ISSR 標誌分析，取得 ISSR 引子 (Primer)、試驗最適黏合溫度 (Annealing temperature)。從 University of British Columbia Nucleic Acid-Protein Service Unit (UBC)，取得 ISSR Primers 之序列並合成以 PCR 擴增。

## 三、土肉桂精油分析：

精油成分鑑定，使用氣相層析儀為 Hewlett-Packard 6890 連接 HP 5973A MSD 質譜儀 (EI mode, 70 eV) 鑑定各成分，層析管柱為 CP-Wax52CB 的 fused silica 毛細管柱 (i.d. 0.25 mm × 60 m, 0.25 μm film thickness, Chrompack, Middelburg)。氬氣為載流氣體，流速為 1 ml/min。管柱初溫為 40°C，升溫速度為 5°C/min，終溫 220°C；GC 注射器溫度為 250°C，GC-MSD 界面溫度為 265°C。並使用共同注射法進行鑑定 (coinjection)，依照已進行 GC/MS 鑑定的精油圖譜選出所含精油之標準品，將標準品與精油以 1:10 之比例混合，混合均勻後取 1 μl 之混合精油注入氣相層析儀，以所得之圖譜與未添加標準品之精油之圖譜進行比對，若相同的波峰有明顯增大，則確定此波峰則為此標準品。

## 結果與討論

### 一、土肉桂種原分析與分子指紋鑑定

目前土肉桂的研究多重於土肉桂精油層面的探討，較少由土肉桂的分子層面進行研究探討。本研究將 103 個中國文化大學華林林場所採得的土肉桂種原，以 10 個 ISSR 引子進行分析研究，因為華林林場的土肉桂種原資料遺失，故藉由此次的研究將土肉桂營養系庫的資料重新建立，使胡 (1985) 所建立的土肉桂營養系庫發揮最大的功效。本研究的主要目的有二：一為偵測土肉桂的遺傳變異、遺傳歧異度，偵測遺傳歧異度是在群間或是在群內。另一目的為利用 ISSR 分子標記鑑定精油品系的組成，利用特定的分子標記流程，可以找出特定的種原，此些種原含有其特定的精油成分與含量。

十組分子標記共夾出 255 個條帶，條帶的大小範圍為 200~2000bp，其中單形性條帶為 36 條，多形性條帶有 219 條，平均每個引子可以夾出 25 個條帶。UBC876 所擴增出的條帶數最多為 34 條佔全部引子的 13.33%，而 UBC864 所擴增的條帶數最少，只有 17 條，佔全部引子的 6.67%。UBC891 所夾出的條帶多型性最多，其百分比為 100%，多形性百分比最小的是 73.3% 為引子 UBC855 所擴增，所有引子平均多型性條帶百分比為 86.1% 表 9。

引子的挑選最先是採取土肉桂 5、7、9、10 號由 100 組的引子中挑出合適的引子，所採用的 PCR program 為反應，反應的起始條件為 94°C，4 分鐘；再以 94°C，1 分鐘、42°C，1 分 30 秒、72°C，3 分鐘循環 42 次；最後在 72°C，10 分鐘，反應終了反應產物保存在 4°C。然後跑電泳，找出可產生多條帶的引子做為本研究的引子，其中十組可以產生明顯條帶者，分別是引子 UBC834、UBC841、UBC842、UBC855、UBC864、UBC868、UBC876、UBC888、UBC891、UBC899 十組。在許多發表的文章中，ISSR 分子標記鍊合的溫度大多使用單一且較低的溫度 (Sanchez de la Hoz *et al.*, 1996)，因為在試驗中會產生模糊 (smear) 現象，故參考

(Borner, B., 2001)將各引子鏈合(anneal)溫度做修正，採用 Wallace rule，公式為  $T_m = 4(\#C+\#G)+2(\#A+\#T)^\circ C$  計算出個引子的合適溫度，在經由試驗找出各引子最適溫度。

另外一點，雖然有學者 (Nagaoka, 1997 ; Mattioni, 2002) 提到在植物體中以有大量的 (AT)重複，但本研究的所挑出的引子卻沒有 (AT) 重複者，推測可能原因為因為(AT)重複的引子形成了髮夾(hair-pin)結構而無法與模版上的 DAN 結合故無法產生擴增片段。

以本研究所選擇的 10 個引子做討論，單以 5' anchor 的引子與 3' anchor 的引子做比較，在此 10 對引子中可以發現 3' anchor 的引子佔了全部引子的 40%，而 5' anchor 的引子只佔了全部的 20%，故可以說 3' anchor 的引子擴增的效果佳，由表 9 中可以發現 3' anchor 的引子，平均每個引子擴增出 28 個條帶，而 5' anchor 的引子平均每個引子擴增出 24 個條帶。此結果符合 3' anchor 的引子擴增效果佳(Raina *et al.*, 2001)。

## 二、土肉桂葉部精油含量

本研究土肉桂種原葉部精油絕乾收率最高為 2.65%，最低為 0.09%，平均收率為 0.45%，與王振瀾 (1987) 所測得的有很大的差異，其可能是因為採收葉子的季節、種原、採取樣本數不同。收率的不同受許多因素的影響，包括營養品系、採集季節、地理位置及樣本數等條件均會影響精油的收率及精油成分的含量及比例。以氣相層析儀(GC)之滯留指數數(retention index)及氣相層析-質譜儀(GC-MS)之質譜鑑定，共鑑定出土肉桂精油含 51 個成分，包含有桂皮醛(cinnamaldehyde)、桉羅木醇(linalool)、乙酸桂皮酯(cinnamyl acetate)、檸檬油醇 2(citral 2)、檸檬油醇 1(citral 1)、 $\beta$ -cabebene 等。

## 參考文獻

- 張上鎮、王升陽 1998 來自台灣森林之芳香維他命。台灣林業，24(3):33-37。
- 張上鎮 2003 「傑出的生物化學家」台灣鄉土林木。科學發展，366:6-11。
- 張上鎮、劉如芸 2003 不同地理品系土肉桂葉部精油之化學多態性。中華林學季刊，36(4):411-422。
- 胡大維、林耀堂、何政坤 1985 台灣土肉桂葉部精油化學成分之天然變異。台灣省林業試驗所試驗報告 No.78。
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., (1990) Isolation plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Mattioni, C., Casasol, M., 2002. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize their Chilean *Nothofagus* species. Theor Appl Genet. 104: 064-1070.
- Nagaoka, T., Ogihara, Y., 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet. 94:597-602.
- Paris, H. S. and Yonash, N. 2003. Assessment of genetic relationship in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. Theor Appl Genet 106 : 971-978.

- Raina, S. N., Singh, K. P., Devarumath. R. M., 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peonut (*Arachis hypogaea*) cultivated and wild species. *Genome*.44:763-772
- Sanchez de la Hoz, M. P., Dávila, J. A., Loarce, Y., and Ferrer, E. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplification to study genetic diversity in barley. *Genome* 39:112-117.
- Ude, G., Pillay, M., 2002. Genetic diversity in *Musa acuminata* colla and *Musa Balbisiانا* colla and some of their natural hybrids using AFLP markers. *Thero Appl Genet*.104:1246-1252.
- Wolfe, A. D., Q. Y. Xiang, and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophurariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7 :1107-1125.
- Zitekiewicz, E., Rafalsk, A., and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomic. 20:176-183*  
*culturae*.96:225-234.

表一、ISSR 各引子鏈合最適溫度

引子編號	鏈合溫度	引子序列(5' 3')	引子整理
UBC-834	53°C	AGAGAGAGAGAGAGAG(CT)T	(AG) <sub>8</sub> YT
UBC-841	50°C	GAGAGAGAGAGAGAGA(CT)C	(GA) <sub>8</sub> YC
UBC-842	50°C	GAGAGAGAGAGAGAGA(CT)G	(GA) <sub>8</sub> YG
UBC-855	55°C	ATGATGATGATGATGATG	(AC) <sub>8</sub> YT
UBC-864	55°C	ACACACACACACACAC(CT)T	(ATG) <sub>6</sub>
UBC-868	55°C	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	(GAA) <sub>6</sub>
UBC-876	45°C	GATAGATAGACAGACA	(GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>
UBC-888	52°C	(CGT)(AGT)(CGT)CACACACAC ACACA	BDB(CA) <sub>7</sub>
UBC-891	50°C	(ACT)(ACG)(ACT)TGTGTGTGT GTGTG	HVH(TG) <sub>7</sub>
UBC-899	46°C	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	-

(University of British Columbia Biotechnology Laboratory)

(註) Y=(C,T); B=(C,G,T); D=(A,G,T); H=(A,C,T); V=(A,C,G);

表二、土肉桂 ISSR 引子擴增結果、多型性及遺傳歧異度比較

引子 編號	引子序列 5' ? 3'	條帶大 小範圍		總條 帶數(a)	單型性 條帶數(c)	單型性百分 比%(c/a)	多型性 條帶數(b)	多型性百分 比%(b/a)	平均遺傳歧 異度(H <sub>i</sub> )
		條帶大	條帶小						
834	(AG) <sub>8</sub> YT	200~1500	28	4	14.3%	24	85.7%	0.2416	
841	(GA) <sub>8</sub> YC	240~1400	26	2	7.7%	24	92.3%	0.2760	
842	(GA) <sub>8</sub> YG	240~1300	31	3	9.7%	28	90.3%	0.3026	
855	(AC) <sub>8</sub> YT	420~2000	30	8	26.7%	22	73.3%	0.2080	
864	(ATG) <sub>6</sub>	280~1200	17	2	11.8%	15	88.2%	0.2677	
868	(GAA) <sub>6</sub>	280~1450	22	4	18.2%	18	81.8%	0.2262	
876	(GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>	280~1300	34	6	17.7%	28	82.3%	0.2055	
888	BDB(CA) <sub>7</sub>	310~1350	24	3	12.5%	21	87.5%	0.3106	
891	HVH(TG) <sub>7</sub>	350~1800	23	0	0.0%	23	100.0%	0.2745	
899	CATGGTGTGGTC AT TGTTC A	320~1800	20	4	20.0%	16	80.0%	0.2637	
Average		200~2000	255	36	13.9%	219	86.1%	0.2576	



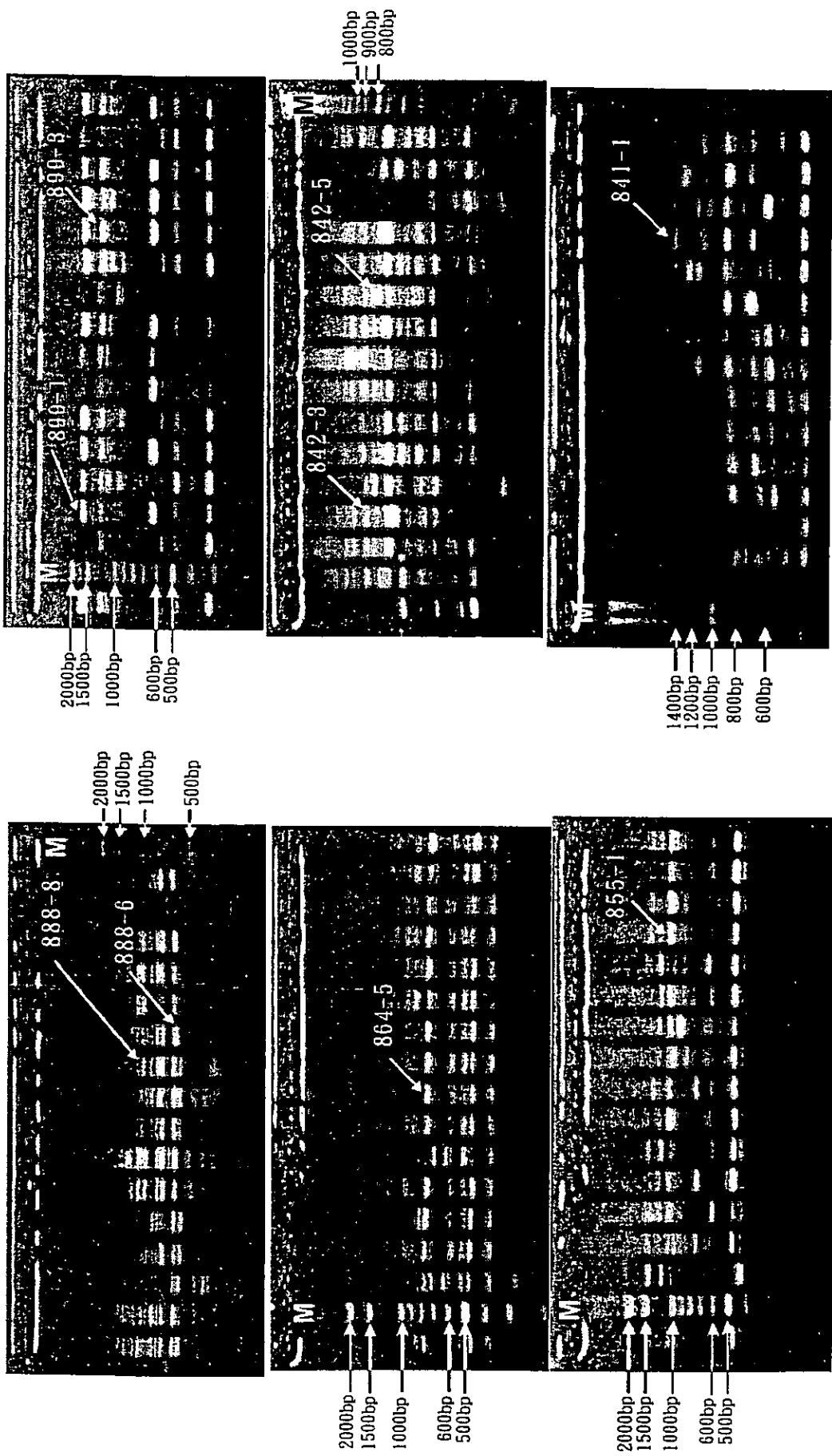
表三、92個土肉桂植株之精油收率平均值

編號	平均值(%)	標準差	編號	平均值(%)	標準差	編號	平均值(%)	標準差
1	0.43	0.04	34	1.00	0.38	71	0.91	0.17
2	1.23	0.17	35	0.40	—	72	1.16	0.11
3	1.31	0.33	★ <sub>1</sub> 36	0.09	—	73	0.61	0.00
4	1.53	0.11	37	0.46	0.16	75	0.57	0.76
5	0.37	0.05	38	0.73	0.03	76	1.36	0.50
6	1.37	0.60	40	0.78	0.36	78	0.82	0.17
☆ <sub>3</sub> 7	2.31	0.39	41	1.29	0.49	79	1.04	0.26
8	1.48	1.13	42	0.22	0.06	80	0.77	—
☆ <sub>1</sub> 9	2.65	0.90	43	0.74	0.06	81	1.04	0.29
10	1.17	0.64	44	1.04	0.36	82	0.82	0.05
11	1.74	0.58	49	0.33	0.08	84	0.59	0.21
12	1.05	0.46	50	0.93	0.37	★ <sub>1</sub> 85	0.09	0.08
13	0.94	0.04	★ <sub>4</sub> 51	0.22	0.08	86	1.19	0.12
14	0.78	0.07	52	0.36	0.08	87	1.26	0.08
15	0.39	0.19	53	1.22	0.57	88	0.81	0.08
16	1.17	0.24	54	0.25	0.08	☆ <sub>4</sub> 89	2.19	0.53
17	1.37	0.38	55	1.99	0.54	90	0.94	0.51
18	0.64	0.10	☆ <sub>3</sub> 56	2.31	—	92	1.19	0.03
☆ <sub>2</sub> 19	2.45	0.95	★ <sub>3</sub> 57	0.13	0.01	93	1.97	0.78
20	0.58	0.03	59	1.10	0.39	94	0.68	0.13
21	1.78	0.53	60	0.87	0.14	95	1.71	0.20
22	1.69	—	61	1.05	0.34	96	0.77	0.29
23	1.76	0.23	62	0.38	0.19	★ <sub>1</sub> 97	0.09	0.04
24	1.69	0.69	63	0.76	0.30	98	1.34	0.37
25	0.25	0.05	64	1.06	0.39	99	1.53	0.09
26	0.52	1.27	65	0.94	0.44	100	0.36	0.47
☆ <sub>5</sub> 27	2.08	0.22	66	1.04	0.19	★ <sub>2</sub> 101	0.11	0.03
28	1.35	0.05	67	0.75	0.20	102	0.82	0.42
29	0.29	0.06	68	1.68	0.75	103	0.75	0.14
31	1.24	0.64	69	1.23	0.66	104	1.29	1.02
33	1.02	0.43	70	1.19	0.19			

表四、土肉桂 62 號精油組成分

Peak no.	Compound	Kovats Index*
1	$\alpha$ -Pinene	1039
2	Camphene	1082
3	$\beta$ -Pinene	1125
4	$\delta$ -3-Carene	1164
5	Myrcene	1172
6	Phellandrene	1180
7	Limonene	1212
8	1,8-Cineole	1224
9	E-2-Hexenal	1234
10	P-Cymene	1284
11	6-Methyl-5-hepten-2-one	1346
12	Z-3-Hexen-1-ol	1383
13	Linalool oxide 1	1448
14	Linalool oxide 2	1476
15	Linalool	1540
16	Benzaldehyde	1545
17	Benzyl acetate	1597
18	Citral 1	1698
19	Borneol	1714
20	Methyl methacrylate	1725
21	Citral 2	1752
22	Citronellol	1761
23	$\delta$ -Cadinene	1781
24	Geraniol	1844
25	Caryophyllene oxide	2027
26	Cinnamic aldehyde	2074
27	Spathulenol	2147
28	Isospathulenol	2244

圖一、土肉桂分子標記電泳圖



圖二、土肉桂 62 號精油 GC 圖

