

研究報告

茉莉酸甲酯對紅檜葉子揮發成分含量之影響

郭佩旻¹ 曲芳華² 王升陽^{1,3,4,*}

【摘要】紅檜為台灣特有樹種，木材具有極佳的耐久性並具特殊的香味。為瞭解紅檜葉子的揮發性成分組成，本研究除利用水蒸氣蒸餾法製備精油外，並利用固相微萃取技術收集葉子的揮發性成分，續以氣相層析質譜鑑定成分。此外，本研究並以茉莉酸甲酯模擬葉子受到機械創傷或是昆蟲、真菌的侵害後，其揮發性成分的變化。由分析結果可知，共108種紅檜葉子之化合物被鑑定出，在揮發性成分中以 α -Pinene 為最主要成分，佔30.29%，而在精油中則是以 β -Myrcene 為主成分，佔22.45%。紅檜葉子在茉莉酸甲酯處理後，其揮發性成分之釋出量大幅提高，揮發量為未以茉莉酸甲酯處理的葉子的1.92倍；而在茉莉酸甲酯處理後對於時間上的影響上，在施加10 mM茉莉酸甲酯經過5 hr後，其揮發量增加最多，之後揮發量就開始減少。

【關鍵詞】紅檜、揮發成分、精油、茉莉酸甲酯

Research paperEffect of Methyl Jasmonate on the Amounts of Volatile Compounds Emitted from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. LeavesPei-Min Kuo¹ Fang-Hua Chu² Sheng-Yang Wang^{1,3,4,*}

【Abstract】*Chamaecyparis formosensis* is an endemic tree grown in Taiwan. The durability of *C. formosensis* wood is excellent and with fragrance odor. In order to analysis the volatile compounds of *C. formosensis*, in addition to the essential oil of leaves was prepared by water distillation, the solid phase micro extraction technology was also conducted to collect the compounds emitted from leaves. Moreover, the leaves of *C. formosensis* were treated by methyl jasmonate (MeJA) to mimic it wounded or attacked by fungus or insects. According to the results obtained in our study, totally 108 compounds were identified

1. 國立中興大學森林學系

Department of Forestry, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan

2. 國立台灣大學森林環境暨資源學系

School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

3. 國立中興大學實驗林管理處

Experimental Forest, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan

4. 中央研究院農業生物科技研究中心

Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

* 通訊作者

Corresponding author. E-mail: taiwanfir@dragon.nchu.edu.tw

from *C. formosensis*, the amount of α -Pinene is 30.29% is the most dominant compound in the volatile compound emitted from leaves; however, β -Myrcene (22.45%) is the most dominant compound in the essential oil. After MeJA treatment, the amount of volatile compound was increased to 1.92-fold. Meanwhile, we also found that the amount of volatiles would reach to the highest concentration after 5 hr treatment at the dosage of 10 mM MeJA.

【Key words】 *Chamaecyparis formosensis*, volatile compounds, essential oil, methyl jasmonate

一、前言

檜木為臺灣優良木材之代表，在此所泛稱之檜木係指柏木科 (Cupressaceae)，扁柏屬 (*Chamaecyparis*) 之臺灣扁柏 (*Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*) 和紅檜 (*Chamaecyparis formosensis* Matsum.)。就分類學的角度而言，臺灣扁柏與原產日本之日本扁柏非常接近，二者不同之處僅為日本扁柏之毬果及鱗葉較大，因此將臺灣扁柏視為日本扁柏之變種，則為目前分類學家之共識；而將紅檜處理為單一的臺灣特有數種，則被植物學家所普遍接受 (郭寶章, 1995)。同時，紅檜亦為第一個被以福爾摩沙之拉丁文為命名之植物，並曾被樹木學巨擘金平亮三譽為東亞第一大針葉樹。截至目前為止，臺灣林業研究人員已針對臺灣紅檜之相關主題，包括：分佈、生育地、造林撫育、組織培養、木材性質與利用等，累積了相當豐碩的成果。關於其抽出成分方面的研究，亦已有超過百種的成分自其木材、葉等部位分離、鑑定 (Fang *et al.*, 1986a; 1986b; Lin *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1995; Kafuku and Ichikawa, 1931)。雖然目前已有一些研究利用分子標記的策略來探討紅檜之種源、遺傳變異及親源關係 (黃麗虹等, 2000; Hwang *et al.*, 2001)，但就紅檜木材形成機制及其抽出成分之生合成機制的研究仍在初始階段。2004年起我們的研究團隊即開始利用扣除雜合反應建構紅檜小苗以及成熟木材韌皮部表現差異的cDNA資料庫 (郭佩旻等, 2006)；同時，我們亦於紅檜之基因庫中，選擇了於木質素生合成過程中扮演相當重要角色的Caffeoyl-CoA-3-O-methyl transferase

基因 (*CCoAOMT*) 進行全長選殖及功能解析之工作，經由自行設計的引子於紅檜中選殖出大小為526個鹼基對之片段，再經由5'與3'RACE (Rapid Amplify of cDNA Ends) 和Genome Walking後，獲得共計1,724個鹼基對，其中蛋白質轉譯區共有750個鹼基對，可產生249個胺基酸，並透過南方雜合分析顯示*CCoAOMT*在紅檜基因體核酸中應該具有2個拷貝數，而在北方雜合分析結果發現*CCoAOMT*以發育中木質素表現量最高 (林彥良等, 2006)。我們將紅檜*CCoAOMT*基因轉入大腸桿菌中大量表現重組蛋白，並製作成多株抗體進行免疫雜合反應。在轉基因的試驗中，我們發現木質素生成的總量在正譯股*CCoAOMT*的轉植株中並無太大的改變，而反譯股的轉植株中有些微升高的趨勢；然而，無論正譯股或反譯股的煙草轉植株在Guaiacy lignin的比值上皆有明顯增加的趨勢 (林彥良等, 2006)。

由我們先前的研究成果得知，紅檜所含有多樣性的萜類化合物，除具有令人愉悅的芳香氣味外，更具有特殊的生物活性 (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Hsieh, *et al.*, 2007)，極具開發利用的潛力。其中萜類化合物為植物二次代謝產物中骨架種類最為繁多且數量最為龐大的一群化合物，目前已從自然界中鑑定出超過36,000種以上屬於此類的化合物 (El Tamer *et al.*, 2003)。萜類化合物基本由5個碳的異戊二烯 (isoprene) 為結構單位組成而成的，進而形成各種的萜類化合物 (Trapp and Croteau, 2001)。一般而言，具揮發性的萜類化合物之碳數大多低於15個碳，即10個碳的單萜類化

合物(及15個碳的倍半萜類化合物(張上鎮和王升陽, 1998), 另外, 我們亦針對紅檜萜類化合物之生合成基因(Terpenoids synthase, TPS)進行選殖, 在單萜類化合物之生合成酵素(Terpene synthase, TPS)方面, 我們的團隊已選殖出 α -Pinene生合成酵素之基因, *Cf-Pin* (Gen Bank accession no. EU099434; 1887-bp ORF, a 53-bp 5' non-coding region, and a 160-bp 3' non-coding region), 此基因為第一個於柏科植物中所獲得全長之TPS, 我們並利用大腸桿菌表現此酵素, 續以Geranyl diphosphate (GPP)為其受質進行反應, 證實了其生成之主產物確為 α -Pinene (Chu *et al.*, 2009)。最近, 我們更進一步從紅檜葉子中選殖出第一條倍半萜類化合物 β -Cadinene之生合成酵素, 命名為*Cf-Cad*, 此亦為柏科植物中第一條發表的倍半萜類化合物之生合成酵素 (Kuo *et al.*, 2012)。除此之外, 針葉樹所含之油性樹脂, 為其重要的防禦機制, 油性樹脂的組成即為萜類化合物, 特別是倍半萜及二萜類化合物。透過大量產生之樹脂, 可使針葉樹避免了昆蟲及其他菌類的侵害 (Boucher *et al.*, 2001; Byun-McKay *et al.*, 2006; Franceschi *et al.*, 2000), 因此, 若能進一步瞭解不同科、屬植物在面對生物性侵害時, 所被誘導產生的萜類化合物組成, 將可對裸子植物在自然生態上與其他種生物間的交互作用有進一步的認識。

於研究針葉樹受外在因子所引發之萜類化合物生合成之機制研究已有了不少的成果, 但大都集中在一些松科的林木, 尤其是雲杉屬林木 (Huber *et al.*, 2004; Martin and Bohlmann, 2005)之成果。茉莉酸 (jasmonic acid) 與其衍生物—茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 為植物荷爾蒙的一種, 存在於高等植物中, 可用於刺激植物揮發性成分的增加 (Dicke *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 1999), 當植物受到創傷, 例如機械性傷害或是昆蟲傷害時, 內生性茉莉酸會急速增加, 為防衛反應信號 (Pluskota *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007), 啟動抗病機制, 可刺激揮發

性物質、萜類等二次代謝產物產生 (Martin *et al.*, 2002, Martin *et al.*, 2003, Faldt *et al.*, 2003)。本研究即是利用MeJA模擬植物受到創傷, 並探討紅檜葉子揮發性成分之揮發量之變化, 並觀察施加MeJA後不同時間揮發量的差異, 進一步可探討當紅檜遭受的外在生物性或非生物性損傷時, 於施加MeJA使紅檜快速產生大量的萜類化合物, 提升間接防禦的功效。

二、材料與方法

(一) 植物材料

4年生紅檜苗木培育之生長條件為日夜長12/12 hr的光照週期、日夜溫度23/10°C、相對溼度90%之條件模擬紅檜生長環境(此條件為根據中央氣象局鹿谷鄉間測資料而定)。14天後取出測定其揮發成分及含量變化。此外, 並採取紅檜葉子以水蒸餾法萃取紅檜精油。

(二) 揮發成分之測定

自紅檜葉子 (100 mg) 作為一次分析之樣本, 利用液態氮將葉子磨碎後, 直接放入20 mL樣品瓶中, 置入水溫50°C水浴槽中, 加熱30 min, 之後插入75 mm CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxane) 之SPME吸附30 min, 將SPME吸附纖維注入GC注射口的溫度脫附1 min, 接著以GC/MS進行成分分析。

(三) 水蒸餾法萃取精油

取新鮮200 g紅檜葉子裝入圓底燒瓶中, 並加入1000 mL蒸餾水進行水蒸餾法萃取精油, 加熱萃取8 hr後收集精油, 並利用GC/MS進行成分分析。

(四) 茉莉酸甲酯模擬遭受傷害處理

利用外施茉莉酸甲酯活化紅檜苗木之防衛反應, 95% (w/w) MeJA購自Sigma-Aldrich。根據Martin等人 (2002) 利用MeJA處理挪威雲杉模擬外力影響下林木會被誘發生成癒傷樹脂 (traumatic resin duct) 的研究報告加以修改, 以去離子水配置所需要的濃度, 1、5、10及50 mM, 以便找出適當的MeJA濃度。將所配置的MeJA噴灑於新鮮紅檜的葉子, 再利用三

角瓶將葉部包覆，留有一個進氣孔以及一個放置SPME吸附針的孔。SPME的吸附纖維為Carboxen/polydimethylsiloxane。經過1 hr後，取下葉片磨碎放置於20 mL樣品瓶中，放入水浴鍋50°C加熱30 min，利用SPME吸附30 min，其後利用GC/MS分析。接著，使用10 mM MeJA噴灑於紅檜葉子，經過不同時間(1、3、5、7與24 hr)，觀察紅檜葉子揮發量的改變，當時間足夠時，取下葉片磨碎放置於20 mL樣品瓶中，放入水浴鍋50°C加熱30 min，利用SPME吸附30 min，其後利用GC/MS分析。

(五) 揮發性成分分析

本試驗利用氣相層析質譜儀進行成分分析，所使用的GC/MS為Trace GC Ultra ITQ900 mass system (Thermo)，管柱為DB-5MS毛細管柱(30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm)，離子化電壓70 eV，載送氣體為氮氣，流速為1.0 mL/min，分流比為1:50，注射孔溫度為250°C，離子源溫度為280°C，質譜範圍45-425 m/z，升溫條件則為起始溫度40°C持溫1 min，以10°C/min升溫至130°C，接著以4°C/min升至140°C，最後以10°C/min升溫至250°C且持溫5 min。氣相層析圖中各波峰利用滯留時間的KI值(Kovats index)、裂解質譜與標準品、NIST (National Institute of Standard and Technology)、Wiley資料庫分析鑑定，利用波峰面積計算各成分之含量。

三、結果與討論

(一) 紅檜苗木之揮發性成分分析

本研究利用微固相萃取法採集紅檜苗木之揮發性成分，續以氣相層析質譜儀分析其成分組成，結果如表1所示，共108個化合物於本次研究中被鑑定。其中，紅檜葉子所揮發出之主要成分為 α -Pinene，含量佔30.29%，其餘之成分大多為單萜類與倍半萜類。另外本研究也利用的水蒸氣蒸餾法萃取新鮮紅檜葉子精油，分析結果顯示經水蒸氣蒸餾所得精油成分與利用SPME萃取由葉部揮發出之成分之組成有些許

不相同，水蒸氣蒸餾所得精油之主要成分為 β -Myrcene (22.45%) 與 α -Pinene (21.58%)，其餘之成分大多為單萜類與倍半萜類，以及少許的雙萜類化合物。Fang等人(1986a)同樣利用水蒸氣蒸餾法萃取了紅檜葉子的精油，經分析主要成分為 α -Pinene佔了57%以及其他萜類化合物。不同方法萃取所得的精油成分與含量不盡相同，這與各化合物的揮發性質有關，而以萃取的時間、採樣的方法而言，SPME法最為快速，且所需要的材料最少，並可同時快速且連續地偵測植物揮發成分的變化，適合應用於評估環境差異對植物揮發成分的影響以及各成分含量的變化偵測；而水蒸餾與水蒸氣蒸餾法所收集而得的精油適合用於評估其抗發炎、抑菌、鎮痛等實驗。利用以上方法萃取而得的主要成分中 α -Pinene已被證實之生理活性包括抗發炎(Gil *et al.*, 1989)、降低支氣管擴張舒緩支氣管所產生的不適感(Falk *et al.*, 1990)、乙醯膽鹼酶抑制劑、增強記憶力等(Perry *et al.*, 2000)。 β -Myrcene具有鎮定、安眠、肌肉鬆弛等作用(Rao *et al.*, 1990)；成分中單萜類如Limonene (2.67%) 則具有抗焦慮(Cheng *et al.*, 2009, Carvalho-Freitas and Costa, 2002, Pultrini Ade *et al.*, 2006)、抑菌(Kim *et al.*, 2008)等作用、 α -Phellandrene (4.12%) 具有鎮痛的作用(Lima *et al.*, 2011)；另外，屬於倍半萜類的Caryophyllene (2.67%) 亦被證實具有抗瘡疾等活性(Campbell *et al.*, 1997)。

誠如所知，森林除了景色宜人、可調節環境、降低溫室效應、淨化空氣和防阻噪音，更會產生對人類有益之揮發物質。其不只釋放了我們熟悉的一次代謝(光合作用)副產物氧氣外，還有二次代謝中所製造出許多微量的特殊化學成分揮散出。總而言之，所謂森林浴是在森林中遊憩、活動，而吸收森林植物群所釋放出來的香味和氣體，而這些揮發出來的氣體稱之為芬多精(phytoncide)。森林的精氣、香氣可使人心平氣和情緒穩定，人們進入森林時，每每感到清爽而輕鬆，此即是芬多精所產生的

效果。因為芬多精瀰漫於森林之中，所以當我們行走於其間，無形之中也享受了森林浴，藉由風吹、樹葉摩擦、空氣中的水分、和瀑布、溪流所濺散的水花或植物光合作用所產生的陰離子所形成整個芬多精環境，可消除人們的文明病 (Morita et al., 2007 ; Yamaguchi et al., 2006 ; Ohtsuka et al., 1998)，林間小徑漫步則能恢復身體韻律，鍛鍊運動神經和反射神經，

實為一種有氧運動，能使身材苗條健美 (林文鎮，1983；張上鎮和王升陽，1998)。由分析成果，利用SPME法自紅檜葉子一共鑑定出80種以單萜類與倍半萜類為主的揮發性成分 (表1)，而這些成分可以說明於紅檜林中的休憩活動可吸收來自於林木的芬多精，至於對於經呼吸作用所吸取的化合物種類與含量對於人體的影響則需進一步地加以探討。

表1. 利用水蒸餾法與SPME收集之紅檜葉子揮發成分

Table 1. Volatile compounds from the leaves of *Chamaecyparis formosensis* by hydrodistillation and SPME

Peak no.	KI	Composition	Hydrodistillation	SPME	Identification
			Concentration (%)		
1	918	Tricyclene	0.01	0.08	MS,KI
2	931	α -Thujene	0.01	0.26	MS,KI
3	937	α -Pinene	21.58	30.29	MS,KI,ST
4	946	Camphene	0.23	— ^a	MS,KI
5	974	β -Pinene	5.68	2.17	MS,KI,ST
6	992	β -Myrcene	22.45	—	MS,KI,ST
7	999	α -Phellandrene	0.12	4.13	MS,KI,ST
8	1018	3-Carene	0.23	0.26	MS,KI,ST
9	1023	α -Terpinene	—	2.86	MS,KI
10	1036	(-)-Limonene	—	2.68	MS,KI,ST
11	1045	<i>cis</i> - β -Ocimene	5.09	0.06	MS,KI
12	1054	<i>trans</i> - β -Ocimene	0.12	0.09	MS,KI
13	1061	γ -Terpinene	0.52	0.10	MS,KI
14	1087	iso-Terpinolene	0.01	1.20	MS,KI
15	1096	Linalool	1.51	0.03	MS,KI,ST
16	1129	(<i>E,Z</i>)-Alloocimene	0.23	0.01	MS,KI
17	1132	α -Campholenal	0.12	—	MS,KI
18	1136	3-Terpinenol	0.01	0.03	MS,KI
19	1139	(<i>E,E</i>)-Alloocimene	0.12	—	MS,KI
20	1147	Ipsdienol	—	0.02	MS,KI
21	1151	β -Phellandrene	0.02	—	MS,KI
22	1155	iso-Borneol	0.12	—	MS,KI
23	1170	α -Phellandren-8-ol	0.01	0.01	MS,KI,ST
24	1171	iso-Pinocamphone	0.11	0.02	MS,KI

25	1184	(Z)-Dihydrocarvone	0.17	—	MS,KI
26	1189	α -Terpineol	—	0.02	MS,KI,ST
27	1193	Dihydrocarveol	1.44	0.01	MS,KI
28	1200	Myrtenol	0.15	0.02	MS,KI
29	1242	<i>cis</i> -Carveol	—	0.01	MS,KI
30	1244	(Z)-2-Decenal	0.05	—	MS,KI
31	1247	Carvone	0.05	—	MS,KI
32	1252	Carvenone	0.04	0.01	MS,KI
33	1267	Geranial	0.15	0.02	MS,KI
34	1282	Piperitone	0.03	—	MS,KI
35	1288	Bornyl acetate	1.51	0.40	MS,KI
36	1291	Dihydroedulan I	0.06	—	MS,KI
37	1293	Neral	0.06	0.02	MS,KI
38	1295	(E,Z)-2,4-Decadienal	0.01	—	MS,KI
39	1348	α -Longipinene	0.13	0.02	MS,KI
40	1353	α -Cubebene	0.02	0.10	MS,KI
41	1357	α -Cyclogeraniol	0.13	0.31	MS,KI
42	1362	Cyclosativene	0.26	1.18	MS,KI
43	1369	α -Terpinyl acetate	1.48	0.03	MS,KI
44	1378	β -Elemene	0.13	0.02	MS,KI
45	1380	β -Maaliene	0.04	1.03	MS,KI
46	1383	β -Patchoulene	0.12	1.42	MS,KI,ST
47	1386	β -Bourbonene	0.98	0.17	MS,KI
48	1391	β -Cubebene	0.03	0.74	MS,KI
49	1392	Cyperene	0.14	—	MS,KI
50	1455	Caryophyllene	0.81	2.68	MS,KI,ST
51	1460	β -Santalene	0.94	1.59	MS,KI
52	1472	β -Cadinene	0.23	0.03	MS,KI
53	1475	β -Chamigrene	3.07	0.04	MS,KI
54	1477	γ -Muurolene	1.22	8.85	MS,KI
55	1489	Valencene	—	7.76	MS,KI
56	1491	β -Guaiene	2.03	—	MS,KI
57	1491	α -Selinene	1.40	0.69	MS,KI
58	1493	Germacrene-D	0.21	0.66	MS,KI
59	1495	Bicyclogermacrene	0.59	2.17	MS,KI
60	1497	<i>epi</i> -Zonarene	0.54	—	MS,KI

61	1499	α -Muurolene	—	5.81	MS,KI
62	1526	δ -Cadinene	0.29	0.59	MS,KI
63	1530	1,4-Cadinadiene	0.76	4.09	MS,KI
64	1535	<i>epi</i> -Globulol	2.68	7.17	MS,KI
65	1538	α -Cadinene	0.45	3.09	MS,KI,ST
66	1542	8,14-Cedranoxide	0.23	—	MS,KI
67	1544	3,7-Selinadiene	0.12	2.29	MS,KI
68	1546	Elemol	0.32	0.06	MS,KI
69	1551	α -Calacorene	0.15	0.21	MS,KI
70	1554	6-Methylcoumarin	0.33	0.10	MS,KI
71	1556	Germacrene B	0.12	0.01	MS,KI
72	1560	(<i>E</i>)-Nerolidol	0.58	0.03	MS,KI
73	1564	Ledol	0.29	0.04	MS,KI
74	1568	Caryophyllene alcohol	0.12	0.02	MS,KI
75	1570	Germacrene D-4-ol	0.29	0.03	MS,KI
76	1631	γ -Eudesmol	2.14	0.76	MS,KI
77	1635	τ -Cadinol	0.93	0.03	MS,KI
78	1636	Cubebol	0.91	—	MS,KI
79	1642	Cubenol	0.27	0.16	MS,KI
80	1645	T-Muurolol	—	0.05	MS,KI
81	1646	β -Eudesmol	1.30	—	MS,KI
82	1647	Torreyol	0.90	0.14	MS,KI
83	1650	α -Eudesmol	0.59	—	MS,KI
84	1652	α -Cadinol	3.30	0.02	MS,KI
85	1655	Intermedeol	0.05	0.36	MS,KI
86	1656	Patchouli alcohol	0.17	0.01	MS,KI
87	1738	(<i>E,Z</i>)-farnesol	0.02	0.02	MS,KI
88	1744	Unknown	0.03	—	MS,KI
89	1748	Xanthorrhizol	0.04	—	MS,KI
90	1750	α -Sinenal	0.04	0.02	MS,KI
91	1757	(<i>E</i>)-Nuciferol	0.01	0.01	MS,KI
92	1758	Aristolone	0.01	0.01	MS,KI
93	1761	Unknown	—	0.02	MS,KI
94	1766	Benzyl benzoate	0.01	—	MS,KI
95	1845	Phytone	0.01	0.04	MS,KI
96	1855	Unknown	0.02	—	MS,KI

97	1864	Unknown	0.02	—	MS,KI
98	1934	Cembrene A	0.25	0.06	MS,KI
99	1947	<i>iso</i> -Phytol	0.45	0.01	MS,KI
100	1957	<i>neo</i> -Cembrene-A	1.07	0.20	MS,KI
101	1965	Biformene	0.04	—	MS,KI
102	2039	<i>ent</i> -16-Kaurene	3.16	0.19	MS,KI
103	2045	Abietariene	0.19	—	MS,KI
104	2154	Unknown	0.12	—	MS,KI
105	2254	Unknown	0.17	0.02	MS,KI
106	2256	Dehydroabietal	0.12	—	MS,KI
107	2337	Ferruginol	0.24	—	MS,KI,ST
108	2353	Unknown	0.15	—	MS,KI

a: —, It's not detected.

(二) 茉莉酸甲酯對紅檜葉子揮發成分含量之影響

在自然環境中，樹木在遭受蟲害或是物理性的創傷時，會被誘導生成較多量的萜類化合物。本研究乃利用MeJA模擬遭受傷害的狀況，外施不同濃度（1、5、10及50 mM）的MeJA，並分析MeJA對紅檜葉子揮發性成分生成量之影響。MeJA處理1 hr後，分析紅檜葉子成分揮發量的變化結果如圖1所示，紅檜在外施不同濃度的MeJA時，葉子成分的揮發量皆被提升，未施加MeJA經過1 hr後葉子揮發量為180 $\mu\text{g/g}$ ，施加1 mM MeJA時葉子揮發量為233 $\mu\text{g/g}$ 、為未施加MeJA的1.29倍；施加5 mM MeJA時葉子揮發量為301 $\mu\text{g/g}$ 、為未施加MeJA的1.67倍；施加10 mM MeJA時葉子揮發量為345 $\mu\text{g/g}$ 、為未施加MeJA的1.92倍；施加50 mM MeJA時葉子揮發量為290 $\mu\text{g/g}$ 、為未施加MeJA的1.61倍，其中以外施10 mM MeJA時紅檜葉子揮發量增加最多，但當MeJA濃度為50 mM時，紅檜葉子經過6 hr後呈現枯黃，這現象說明了濃度過高的MeJA會使紅檜遭受過大的損傷而枯黃。因此，接續的實驗，MeJA濃度的選擇以使葉子揮發量增加最多且不致造成傷害的10 mM。

本研究續將紅檜葉子利用10 mM MeJA處理，再經過不同時間（1, 3, 5, 7, 24 hr），測定其揮發量的改變，結果如圖2顯示。5 hr之後紅檜葉子揮發量增加最多，揮發量為950 $\mu\text{g/g}$ 。而經過1 hr後，揮發量則增加為322 $\mu\text{g/g}$ ；3 hr後成分之揮發量則增加為792 $\mu\text{g/g}$ ；經過7 hr後揮發量增加為529 $\mu\text{g/g}$ ；即便經過了24 hr揮發量也是有增加，增加為283 $\mu\text{g/g}$ 。由此結果可以得知，當紅檜遭受到外的損傷時，其葉子之揮發量就會漸漸地增加；此外，紅檜葉子利用MeJA處理後，不論單萜類或是倍半萜類的化合物幾乎是全面性地增加，無特定化合物大量增加。Martin 等人（2002）曾利用MeJA處理挪威雲杉模擬外力影響下林木會被誘發生成癒傷樹脂（traumatic resin duct），並誘導萜類化合物的累積，同時，他們亦證實prenyltransferase與TPS這兩類與萜類化合物合成有關的酵素，其活性於MeJA的處理下活性會被激化；同樣的處理亦可觀察到挪威雲杉苗木會大量釋出Linalool和 (*E*)- β -Farnesene等萜類化合物，並且於莖部組織中無論是 mono-TPS或di-TPS 轉錄表現上均被大幅提升 (Faldt *et al.*, 2001)。雖然目前已證實雲杉屬之針葉樹之TPS於傷害處理下，會被激化，但本研究則是首次以柏科樹

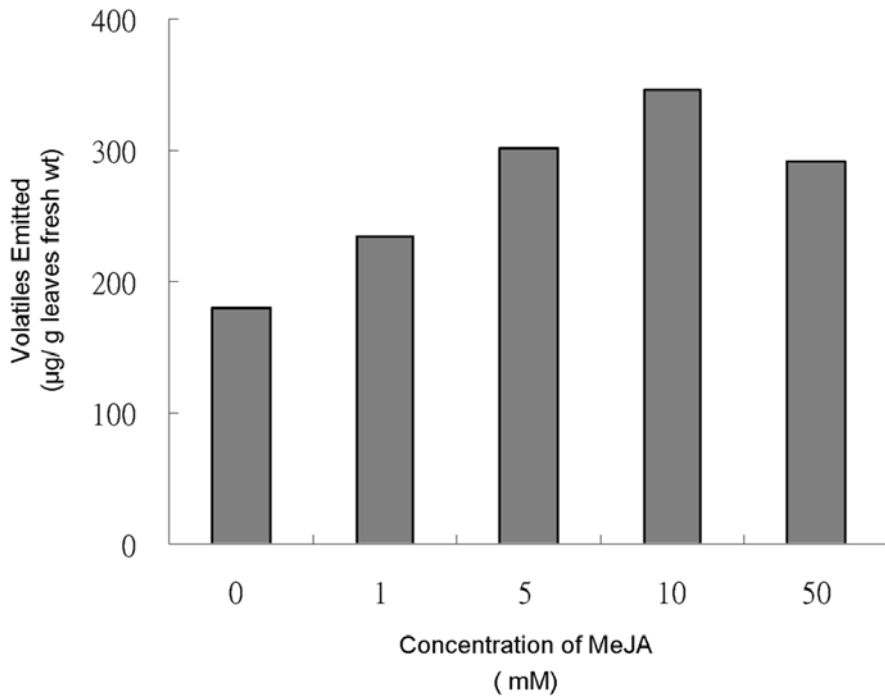


圖1. 不同濃度MeJA的處理1 hr對紅檜葉子揮發量之影響。

Fig. 1. Influence of concentration of 1 hr after MeJA treatment on leaves of volatilization of *Chamaecyparis formosensis*.

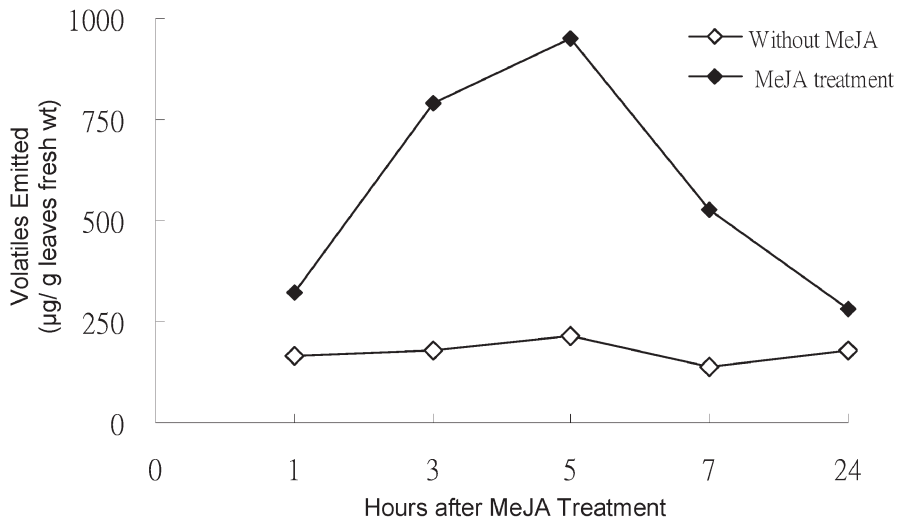


圖2. 經過不同時間10 mM MeJA處理後，紅檜葉子揮發量。

Fig. 2. Time course of accumulation of volatile in leaves of *Chamaecyparis formosensis* after treatment with 10 mM MeJA.

木模擬受癒傷處理來探討揮發成分揮發量之變化，未來將進一步就分子層面來探討相關基因與蛋白質的變化。

四、結論

紅檜為臺灣優良木材之代表，紅檜所含有多樣性的萜類化合物，除具有令人愉悅的芳香氣味外，更具有特殊的生物活性，極具開發利用的潛力。此外，針葉樹之萜類化合物，可使針葉樹避免了昆蟲及其他菌類的侵害，因此，若能進一步瞭解不同科、屬植物在面對生物性侵害時，所被誘導產生的萜類化合物組成，將可對裸子植物在自然生態上與其他種生物間的交互作用有進一步的認識。茉莉酸甲酯為植物荷爾蒙的一種，存在於高等植物中，可用於刺激植物揮發性成分的增加，當植物受到創傷，例如機械性傷害或是昆蟲傷害時，內生性茉莉酸會急速增加，為防衛反應信號，啟動抗病機制，可刺激揮發性物質、萜類等二次代謝產物產生。本研究即是利用MeJA模擬植物受到創傷，並探討紅檜葉子揮發性成分之揮發量之變化，並觀察施加MeJA後不同時間揮發量的差異，進一步可探討當紅檜遭受的外在生物性或非生物性損傷時，於施加MeJA使紅檜快速產生大量的萜類化合物，提升間接防禦的功效。本研究除利用水蒸氣蒸餾法製備精油外，並利用固相微萃取技術收集葉子的揮發性成分，續以氣相層析質譜鑑定成分。此外，本研究並以茉莉酸甲酯模擬葉子受到機械創傷或是昆蟲、真菌的侵害後，其揮發性成分的變化。由分析結果可知，共108種紅檜葉子之化合物被鑑定出，在揮發性成分中以 α -Pinene為最主要成分，佔30.29%，而在精油中則是以 β -Myrcene為主成分，佔22.45%。已有許多的證據顯示，萜類化合物的釋出是樹木保護自身不受溫度傷害的主要機制之一 (Vallat et al., 2005; Kim, 2001)，而此大量釋出萜類化合物的現象是否與TPS的調節有關，因此運用到紅檜遭受傷害時的緊急處理下，是否可以利用MeJA處理以

達到自我保護的效果，則需要進一步的加以釐清。同時，目前受到重視的森林浴 (green shower) 或是芬多精 (phytocide) 等課題，大都強調水分與揮發性氣體的釋出有相輔相成的效果，而在不同濕度下，林木TPS是否亦具有不同的表現？亦是接續可以進行研究之重點。

五、參考文獻

- 林文鎮 (1983) 談森林浴—德國、日本的國民健身法。台灣林業9:36-40。
- 林彥良、王升陽、曲芳華 (2006) 紅檜Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase基因之選殖及其轉基因煙草木質素分析。中華林學會論文集 41-49 pp.。
- 張上鎮、王升陽 (1998) 來自台灣森林之芳香維他命。台灣林業 24:33-37。
- 郭佩旻、王儷儒、曲芳華、王升陽 (2006) 紅檜基因體學研究- ESTs的建立。中華林學會論文集31-40 pp.。
- 郭寶章 (1995) 臺灣貴重針葉五木。中華林學會叢書956號。510 pp.。
- 黃麗虹、黃士穎、林讚標 (2000) 紅檜與台灣扁柏的葉綠體DNA遺傳變異及族群分化。台灣林業科學 15:229-23。
- Boucher, D., R. Lavalley and Y. Mauffette (2001) Biological performance of the white pine weevil in relation to the anatomy of the resin canal system of four different host species. Canadian J. Forest Res. 31:2035-2041.
- Byun-McKay, A., K. A. Godard, M. Toudefallah, D. M. Martin, R. Alfaro, J. King, J. Bohlmann and A. L. Plant (2006) Wound-induced terpene synthase gene expression in Sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. Plant Physiol. 140(3):1009-1021.
- Campbell, W. E., D. W. Gammon, P. Smith, M. Abrahams and T. D. Purves (1997) Composition and antimalarial activity in vitro

- of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Med.* 63:270-272.
- Carvalho-Freitas, M. I. and M. Costa (2002) Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm. Bull.* 25:1629-1633.
- Cheng, W. W., C. T. Lin, F. H. Chu, S. T. Chang and S. Y. Wang (2009) Neuropharmacological activities of phytoncide releasing form *Cryptomeria japonica*. *J. Wood Sci.* 55:27-31.
- Chu, F. H., P. M. Kuo, Y. R. Chen and S. Y. Wang (2009) Cloning and characterization of α -pinene synthase from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. *Holzforschung* 63:69-74.
- Dicke, M., R. Gols, D. Ludeking and M. A. Posthumus (1999) Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *J. Chem. Ecol.* 25:1907-1922.
- El Tamer, M. K., J. Lucker, D. Bosch, H. A. Verhoeven, F. W. A. Verstappen, W. Schwab, A. J. Van Tunen, A. G. J. Voragen, R. A. De Maagd and H. J. Bouwmeester (2003) Domain swapping of Citrus limon monoterpene synthases: impact on enzymatic activity and product specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 411:193-203.
- Fäldt, J., D. M. Martin, B. Miller, S. Rawat and J. Bohlmann (2003) Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Mol. Biol.* 51:119-133.
- Fäldt, J., K. Sjödin, M. Persson, I. Valterova and A. K. Borg-Karlon (2001) Correlations between selected monoterpene hydrocarbons in the xylem of six Pinus (Pinaceae) species. *Chemoecology* 11:97-106.
- Falk, A. A., M. T. Hagberg, A. E. Lof, E. M. Wigaeus-Hjelm and Z. P. Wang (1990) Uptake, distribution and elimination of alpha-pinene in man after exposure by inhalation. *Scand. J. Work Environ. Health* 16:372-378.
- Fang, J. M., L. J. Lai and Y. S. Cheng (1986a) The constituents of the leaves of *Chamaecyparis formosensis*. *J. Chin. Chem. Soc.* 33:265-266.
- Fang, J. M., C. M. Sheu and Y. S. Cheng (1986b) A study of the constituents of the bark of *Chamaecyparis formosensis*. *J. Chin. Chem. Soc.* 33:245-249.
- Franceschi, V. R., P. Krokene, T. Krekling and E. Christiansen (2000) Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 87:314-326.
- Gil, M. L., J. Jimenez, M. A. Ocete, A. Zarzuelo and M. M. Cabo (1989) Comparative study of different essential oils of *Bupleurum gibraltarium* Lamarck. *Pharmazie.* 44:284-287.
- Hsieh, Y. H., P. M. Kuo, S. C. Chien, L. F. Shyur and S. Y. Wang (2007) Effects of *Chamaecyparis formosensis* Matsumura extractives on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Phytomedicine* 14:675-680.
- Hsu, K. C., J. M. Fang and Y. S. Cheng (1995) Diterpenes from pericarps of *Chamaecyparis formosensis*. *J. Nat. Prod.* 58:1592-1595.
- Huber, D. P., S. Ralph and J. Bohlmann (2004) Genomic hardwiring and phenotypic plasticity of terpenoid-based defenses in conifers. *J. Chem. Ecol.* 30:2399-2418.

- Hwang, S. Y., H. W. Lin, Y. S. Kuo and T. P. Lin (2001) RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. Botanical Bulletin Academia Sinica 42:173-179.
- Kafuka, K. and N. Ichikawa (1931) The volatile compounds from leaves of *Chamaecyparis formosensis*. Nippon Kagaku Kalshi. 52:222-228.
- Kim, J. C. (2001) Factors controlling natural VOC emissions in a southeastern US pine forest. Atmospheric Environment 35:3297-3292.
- Kim, S. S., J. S. Baik, T. H. Oh, W. J. Yoon, N. H. Lee and C. G. Hyun (2008) Biological activities of Korean *Citrus obovoides* and *Citrus natsudaidai* essential oils against acne-inducing bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:2507-2513.
- Koch, T., T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth and W. Boland (1999) Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid signaling pathway. Plant Physiol. 121:153-162.
- Kuo, P. M., K. H. Hsu, Y. R. Lee, F. H. Chu and S. Y. Wang (2012) Isolation and characterization of β -cadinene synthase cDNA from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. Holzforschung Accepted and in press.
- Lima, D. F., Brandao, M. S., Moura, J. B., Leitao, J. M. R. S., Carvalho, F. A. A., Miura, L. M. C. V., Leite, J. R. S. A., Sousa, D. P. and F. R. C. Almeida (2011) Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. J. Pharm. Pharmacol. 64:183-292.
- Lin, T. C., J. M. Fang and Y. S. Cheng (1999) Terpenes and lignans from leaves of *Chamaecyparis formosensis*. Phytochem. 51:793-801.
- Martin, D. and J. Bohlmann (2005) "Molecular biochemistry and genomics of terpenoid defenses in conifers". Recent Advances in Phytochemistry 39:29-56.
- Martin, D. M., D. Tholl, J. Gershenzon and J. Bohlmann (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. Plant Physiol. 129:1003-1018.
- Martin, D. M., J. Gershenzon and J. Bohlmann (2003) Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. Plant Physiol. 132: 1586-1599.
- Morita, E., S. Fukuda, J. Nagano, N. Hamajima, H. Yamamoto, Y. Iwai, T. Nakashima, H. Ohira and T. Shirakawa (2007) Psychological effects of forest environments on healthy adults: Shinrin-yoku (forest-air bathing, walking) as a possible method of stress reduction. Public Health 121:54-63.
- Ohtsuka, Y., N. Yabunaka and S. Takayama (1998) Shinrin-yoku (forest-air bathing and walking) effectively decreases blood glucose levels in diabetic patients. Int. J. Biometeorol 41:125-127.
- Perry, N. S., P. J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner and E. K. Perry (2000) In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. J. Pharm. Pharmacol. 52: 895-902.
- Pluskota, W. E., N. Qu, M. Maitrejean, W. Boland and I. T. Baldwin (2007) Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence

- responses in *Nicotiana attenuata*. J. Exp. Bot. 58:4071-4082.
- Pultrini, A. M., L. A. Galindo and M. Costa (2006) Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. Life Sci. 78:1720-1725.
- Rao, V. S., A. M. Menezes and G. S. Viana (1990). Effect of myrcene on nociception in mice. J. Pharm. Pharmacol. 42:877-878.
- Trapp, S. C. and R. B. Croteau (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. Genetics 158:811-832.
- Vallat, A., H. Gu and S. Dorn (2005) How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. Phytochemistry 66:1540-1550.
- Wang, S. Y., C. L. Wu, F. H. Chu, S. C. Chien, Y. H. Kuo, L. F. Shyur and S. T. Chang (2005) Chemical composition and antifungal activity of essential oil isolated from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. wood. Holzforschung 59:295-299.
- Wang, S. Y., Y. S. Wang, Y. H. Tseng, C. T. Lin and C. P. Liu (2006) Analysis of fragrance compositions of precious coniferous woods grown in Taiwan. Holzforschung 60:528-532.
- Wu, J., C. Hettenhausen, S. Meldau and I. T. Baldwin (2007) Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. The Plant Cell 19:1096-1122.
- Yamaguchi, M., M. Deguchi and Y. Miyazaki (2006) The effects of exercise in forest and urban environments on sympathetic nervous activity of normal young adults. J. Int. Med. Res. 34:152-159.

