

以揮發性成分探討烏心石舅族群間親緣初步成果

文、圖 ■ 洪昆源 ■ 農委會林業試驗所森林生物組助理研究員

一、緒言

植物分類之研究可應用於不同階層，大致可分為種以上及以下之分類，種以上為科及屬之分類，種以下則包括族群、變種、型等變異之分析。利用二次代謝物進行植物分類，最常用的方法之一為精油（Essential oil）。精油的萃取方法有水蒸餾萃取法、水蒸氣萃取法、冷吸法、超臨界萃取法、及溶劑萃取法等。

從種間階層之分類，而言Grombone *et al.* (2005) 利用層析質譜分析技術，成功鑑別鬼針草屬之3個種，包括咸豐草 (*Bidens alba*)、小白花鬼針 (*Bidens pilosa*) 及 *Bidens subalternans* 等3個種之差異，在分析24個成分後，確認E - Caryophyllene、 α - Humulene、Germacrene - D、Bicyclogermacrene 及 α - Muurolene 等5種成分為3個種所共有之化合物，可作為這3個種群間鑑別時共同之特徵產物。Nitta *et al.* (2006) 以20種成分，鑑別172株紫蘇屬) 單株，包括野生種及栽培種，其中栽培種通常作為提取精油或蔬菜食用，從分析結果發現Limonene之衍生物Piperitone及Piperitenone可以在*P. citriodora* 野生種中發現，因此推測野生種是栽培種之基因組

提供者，因為Limonene合成酶在栽培種中是一特化酶類之標誌，此結果可作為評估紫蘇遺傳資料有用之數據。曾月華等 (2007) 以不同化學分類法探討樟科木薑子屬，也確認揮發性成分分析成果與外觀型態有較高關連性。

種以下階層之氣相層析法質譜研究方面，Suau *et al.* (2004) 將紫堇科 (Fumariaceae) *Platycapnos saxicola* 單一種中之6個族群，利用3種生物鹼Sinoacutine、Glaucine、及Protopine之含量以鑑別種內族群間之差異，另用於雜交種鑑定方面，以唇形科植物Thymus屬為例，該物種已在歐洲作為藥用超過2,000年，在種間常有雜交 (Hybridization) 現象，使得屬內之分類及化學非常複雜，利用GC - MS分析後確認化學成分Germacrene - D及 β - Bisabolene佔Thymus samius種所有成分之一半，為重要之化學鑑別特徵之一 (Tzakou and Constantinidis, 2005)。

烏心石舅屬於木蘭科 (Magnoliaceae)，台灣植物誌第二版將其歸為木蘭屬 (Gen, 1996)，在中國則歸為獨立一屬，擬單性



木蘭 (*Parakmeria*) 屬，中名為恆春擬單性木蘭，又稱恆春厚朴 (Liou, 2004)，常綠樹高可以到達20 m，胸徑可以到達1.2 m，樹皮是深棕色，花兩性，不具完全花，僅具花被片是重要特徵，花被片是3的倍數，雄蕊多數通常50~60。Jiang (2000) 分析兩族群胞器間之親緣關係，發現二胞器DNA之分子親緣不一致，推測遺傳變異型式主要受冰河歷史影響，且物種最早出現在冰河期的更新世。此外烏心石舅多列為台灣稀有植物 (Liu and Hyu, 1971; Su, 1980; Hyu and Lyu, 1984; Hyu *et al.*, 1985; Lai, 1991; Yang *et al.*, 1998)，由於其天然更新不易，在10年或3個世代內將可能會絕滅到50%以上，隔離且能繁殖之個體少於250株 (Lyu and Chiou, 1996)。於是Hong等人 (2007) 以高壓法配合NAA處理，有效縮短烏心石舅發根時間及增加發根數目。對於烏心石舅化學成分的研究；Li and El-Ferly (1981) 從葉子萃取物中分離出4種木質素，其中Licaria-A是第1次從自然界中發現之化合物；Kazuo等人 (1984) 從葉子中發現2種新的Neolignans命名為Kachirachirol-A及Kachirachirol-B。早期研究多著重於生物鹼的研究 (Yang, 1962; Yang and Lu, 1963)，其中Tomita *et al.* (1968) 單離出4種生物鹼包括d-glaucine、d-N-norglaucine、magnoflorine及D-N-norarmepavine。烏心石舅各族群呈現陸生島嶼狀分布，目前全世界僅分布於大武山、恆春半島、海拔500~1,300 m的闊葉樹稜線上，在葉型上僅有些微的差異，但因分布海拔差異、微環境的差異，及隔離機制，使得

族群間的地理區別明顯，故本研究目的為將區分之3個主要族群，分析其揮發成分的差異，瞭解族群與地理分布之關係，由於其地理分布及分類的特殊性，更彰顯其指標成分之重要性。

二、材料和方法

(一) 材料

本試驗烏心石舅之材料於2004年10月中旬取自台東歸田、太麻里及屏東萬里得天然林山區 (圖1)，樣品為30~50年生之新鮮葉片，採集後用大型的封口袋加以密封低溫儲藏。為控制因採集時間差異對材料的影響，各族群採集的間隔天數皆小於3天，且萃取精油在3天內完成，後又隨即進行成分鑑定。

(二) 精油萃取

烏心石舅因單株稀少，又族群之定義為同分類群之集合，因此採用Suau (2004) 分析方式，於同一地區中採集3~5株單株，選擇無受傷且完全展開頂稍葉子，每一單株葉片重500 g，將所有葉子合併後一起萃取代表同一族群，各單株皆到達可開花結果之年齡，且採集在一週內完成，故無季節及年齡上之差異，將採集之烏心石舅葉子以水蒸餾法 (Hydro distillation) 萃取其精油，故萃取加熱方式採加熱包逐步加熱方式，逐步收集不同沸點的化合物。

(三) 精油成分鑑定

本研究以GC-Aligent6890及MS-Aligent5890機型之氣相層析質譜儀 (Gas chromatography - Mass spectrometry，

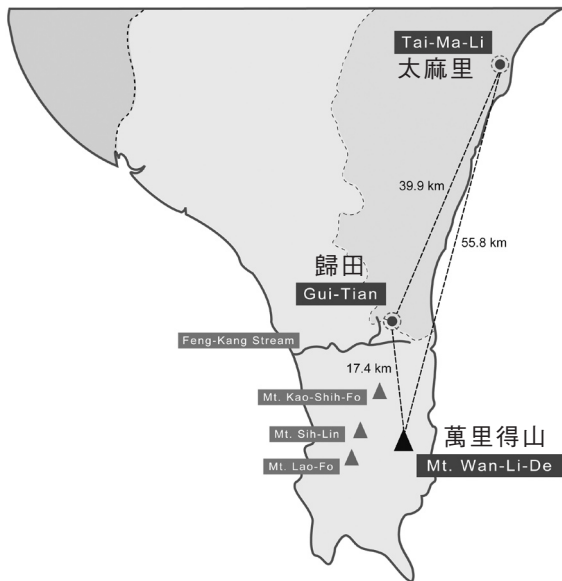


圖1 烏心石鼻之3個族群及樣區間的地理距離。

GC - MS) 進行精油之成分鑑定及分析，所得之質譜數據委託台灣檢驗科技股份有限公司 (Societe Generale de Surveillance)，進行 Wiley275 及自建資料庫之比對以確定其揮發成分。

(四) 統計分析

將定量數據利用 Kovach 公司所出產的 MVSP (Multivariate statistical package for windows, 2005) 分析軟體，以多變數分析方法之主成分分析 (Principal component analysis, 簡稱 PCA)，除了進行成分間之歸群之外，對於主要成分所佔的比例亦進行分析。另外再利用 BiOM 程式以 Mantel 模組進行族群間相似度矩陣 (Population similarity) 及地理矩陣 (Geographic matrix) 間 Matrix 相關性之顯著分析，以確認其與地理間是否存在顯著的相關性。

三、結果

從表1定量數據分析UPGMA採用Simple match法所得到的結果，歸田與太麻里之相似度指數是0.17，顯示其相似度最低，歸田與萬里得山之相似度指數是0.37，太麻里與萬里得山之相似度指數是0.14，由樹狀歸群圖 (圖2) 所顯示萬里得山及歸田族群兩者之相似度或親緣性較高，而在太麻里與兩族群之親緣性較低。

從主成分分析結果可以得到3個代表向量，分別為3個主要軸，第一軸 (Axis 1) 可以解釋變異的百分比是42.35%，第二軸 (Axis 2) 是30.6%，第三軸 (Axis 3) 是27.05%，合計3個軸可解釋變異之百分比可以達到100%，可以充分代表所有成分的變異。圖3中3個主要軸的空間分布也顯示萬里得山及歸田較為接近，而太麻里則距離較遠。圖4中採所有成分以圓餅圖之方式呈現，發現主成份分析結果中之重要成分為 β - Caryophyllene、Aromadendrene E、Germacrene B、及delta-Cadinene。

從地理距離矩陣與主成分歸群之相似度矩陣，得到相關係數 (r) 為0.91

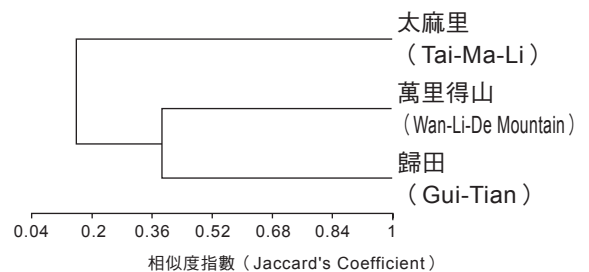


圖2 烏心石鼻之3個族群間的歸群圖。



表1 種族間之相似度矩陣數值及其與地理矩陣相關係數

	歸田 Gui-Tian	太麻里 Tai-Ma-Li	萬里得山 Wan-Li De Mountain	R
歸田 (Gui-Tian)	1			
太麻里 (Tai-Ma-Li)	0.165	1		
萬里得山 (Wan-Li De Mountain)	0.385	0.155	1	
				0.91

註：R：相似度與地理位置之相關係數。

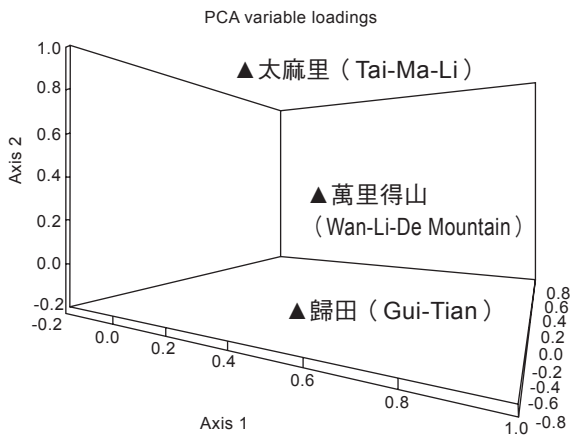


圖3 應用主成分分析法，分析烏心石舅3個族群之空間分布。

($p \leq 0.05$)，顯示兩者間存在著非常顯著的相關 (Table 1)。地理上之直線距離從太麻里至萬里得山為55.8 km，太麻里至歸田距離為39.9 km；歸田至萬里得山為17.4 km。

四、討論

本研究以精油之定量法分析烏心石舅成分，所得之歸群結果呈現歸田與太麻里之相似度高於太麻里及萬里得山之相似度指數，推測太麻里隔離的機制受距離影響，陸生島嶼化可能也扮演重要的角色。從地理矩陣與族群間化

學成分的相似度矩陣之相關分析，可以確認地理的隔離確實與烏心石舅分化有相關性。以化合物定量分析法配合主成分分析，及3個主要軸顯示空間分布上之結果與歸群圖結果一致，顯示歸田與萬里得山族群之親緣相關性。

Wang and Hu (1996) 鑑定直幹、耳莢及其雜交種為例，結果發現雜交種與純種之相似度指數介於0.522~0.535間；Ho (2006) 以簡單序列重覆 (Inter-Simple Sequence repeat, 簡稱ISSR) 鑑定樟科土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum*)、山肉桂 (*Cinnamomum insularimontanum*) 及胡氏肉桂 (*Cinnamomum macrostemon*) 之遺傳差異，亦顯示種間之相似度指數高於0.56，由以上兩個例子，顯見以化合物分析種內族群間可能有較高的歧異度且較敏銳 (Sensitivity)。烏心石舅族群間化學成分相似度僅介於0.14~0.37間，顯示族群間之成分與量亦有很大的變異存在，故化合物所作之分類，相似度指數略低於DNA之指數範圍，但因烏心石舅目前無確切DNA之相似度數據，故無從比較。

Jiang (2000) 僅針對烏心石舅兩個族群進行研究，從葉綠體atpB-rbcL非解碼間隔區 (Noncoding spacer) 及粒腺體DNA內轉錄間隔區 (Internal transcribed spacer, ITS) 進行分析，結果顯示兩胞器基因座呈現高度之變異；本研究以精油成分分析族群間關係，與Jiang (2000) 所得到的結果相似。代謝物的生合成由酵素催化，與遺傳之內在因子和環境之外在因子皆有相關性，植物型態學上稱有外在表現能力之型態為表現型 (Phenotype)，本篇出現之化合物，我們可稱該分類群之化學表現型 (Chemophenotype)，從許多報告皆可證實利用化合物建立之親緣關係，與利用去氧核糖核酸 (DNA) 和型態 (Morphology) 特徵所產生之結果是一致的，從理論上推論DNA可間接影響化合物生成，在實際表現上也是一致的 (圖4)。植物精油為二次代謝產物，其中

粒腺體為生化反應主要之胞器，族群間基因高度重排之結果，勢必影響反應路徑 (Pathway) 中關鍵性之催化酶產生，因此改變反應中化學合成路徑，從因果角度，隔離及自然選擇 (Natural selection) 影響基因排列差異，而重排也促使化合物生合成產生差異，因此會得到相似之結果。台灣鮮少以揮發成分對於天然分布之植物族群進行分析，僅曾月華等 (2007) 針對台灣產木薑子屬 (Litsea) 植物，比較化學、型態及分子生物學等分類法之差異，所得結論為揮發性成分與型態分析歸群之結果最接近。本研究之成分資料為2004所測得，以2000~2005國際間所發表之相關報告發現，研究族群與揮發性成分之方法多並未參照KI指標，僅以滯留時間及斷裂質譜圖為比對之基礎，亦可得到利用同工酶研究相似的歸群結果 (Grombone *et al.*, 2005)，此情況就如同RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 與ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)，RAPD雖有再現性的問題，但較靈敏，故對於尺度較小的分類群，反而具優越性，直至2007年仍有很多研究報告使用RAPD法，作為分析親源相近得個體或族群之方法，故可知只要能得到與事實趨勢相同的結果所使用的方法都是好方法。♻️

*謝誌：本研究承行政院農業委員會之經費補助及林業試驗所王相華、葉若璽、潘清連、陳昱成、黃琪雯、陳銘瑄 (繪圖) 等悉心協助，使本文臻於完善，謹此一併致謝。

(圖片／高遠文化)

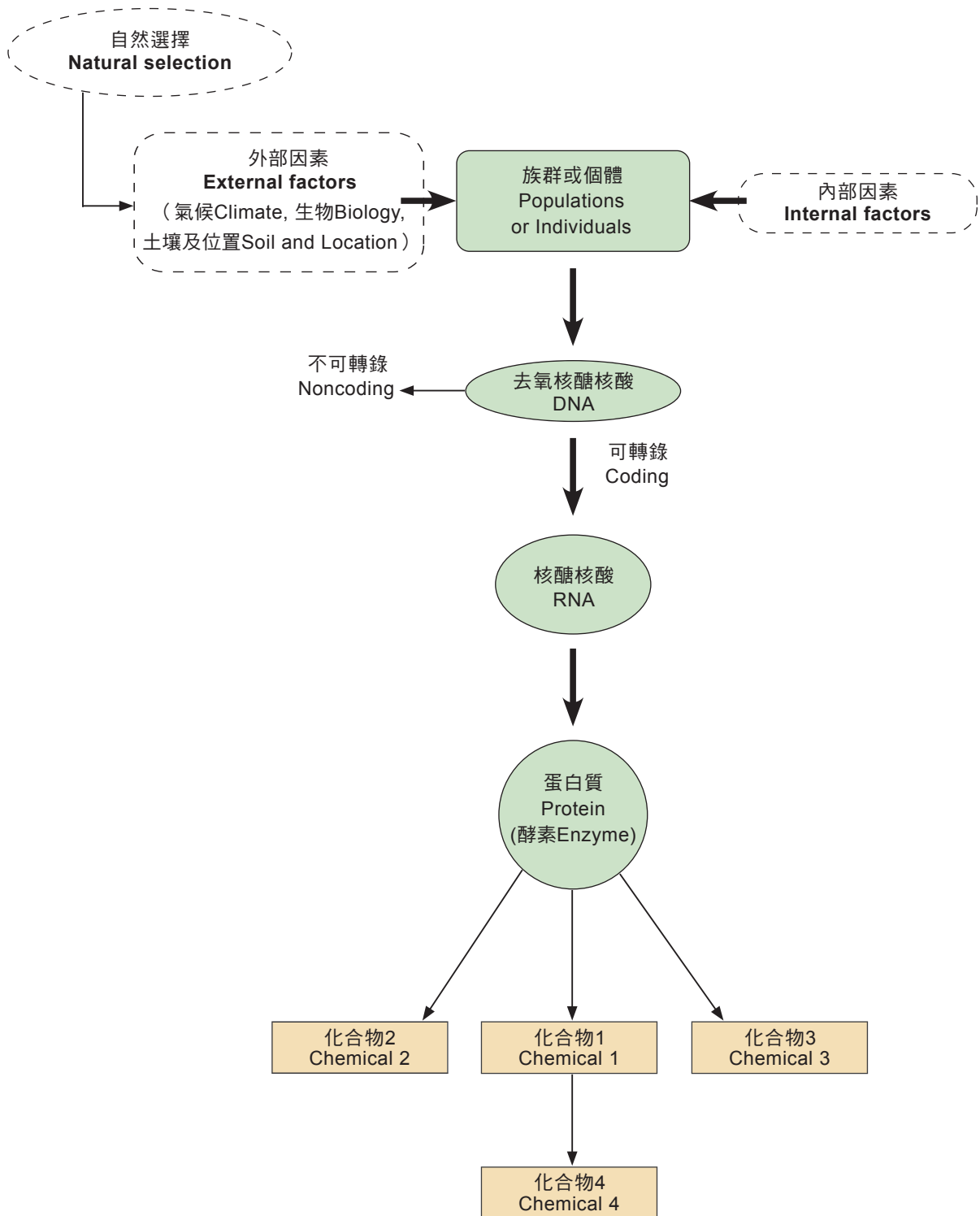


圖4 DNA之可轉錄區及自然選擇是直接和間接影響植物化合物產生種類的原因，也造成植物世界在不同生長環境之化合物多樣性。