

柳杉樹皮乙醇萃取物對種子發芽及生長抑制之研究

洪晨書¹ 蘇裕昌²

¹ 中興大學森林學系。

² 中興大學森林學系，通訊作者。

【摘要】植物會為了生存或控制族群而產生化學成分去影響其他植物生長與發展，稱為植物相剋作用 (Allelopathy)。本研究的目的為評估柳杉樹皮 70% 乙醇抽出物對種子的發芽及生長抑制性，經初步篩選試驗指出，經液-液分離萃取後分成幾次分離部進行試驗，發現對種子發芽抑制以酸性部成分及酚性部成分較為顯著，其濃度在達到 2000 ppm 時可達到 90 % 以上的抑制率，在對阿拉伯芥的發芽抑制 IC₅₀ 分別為 894 及 490 ppm。而生長抑制仍以酸性部成分及酚性部成分較為有效。經 GC-MC 分析後發現，酸性部之主要成分為 3,4-二羥基苯甲酸、4-對羥基苯甲酸及香草酸等，酚性部成分則為 2-甲基戊二酸、3-甲基戊二酸等。試驗結果顯示柳杉樹皮 70 %乙醇抽出物之酸性部成分和酚性部成分具有抑制活性，可作為植物相剋作用的開發與利用。

【關鍵詞】植物相剋作用、柳杉、阿拉伯芥

Study on Seed Germination and Growth Inhibition of *Cryptomeria japonica* Bark Ethanolic Extractives

Cheng-shu Hung¹ Yu-Chang Su²

¹ Department of Forest, National Chung Hsing University, 250 Kuo-Kuang Road, Taichung 402, Taiwan.

² Department of Forest, National Chung Hsing University, Corresponding Author, 250 Kuo-Kuang Road, Taichung 402, Taiwan.

【Abstract】 Plant on control the population or the survive to produce the chemicals to influence other plant on growth and development were known as plant allelopathic.

The purpose of this study was to assess the *C. japonica* bark 70% ethanolic extract on seed germination and growth inhibition, after initial screening, and ethanolic extractives were separated by liquid - liquid partition extraction into several sub-fraction. Results showed inhibition of seed germination by acidic fraction and phenolic fraction showed good inhibition. The IC₅₀ of acidic and phenolic fraction on *A. thaliana* germination inhibition IC₅₀ were 894 and 490 ppm respectively.

Seed germination inhibition and plant growth their inhibition can be reached ration more than 90% at 2000 ppm addition, while the growth inhibition of the acidic or phenolic surpression test were made. Ingredients showed more effective. Analysis by GC-MC and found that the major components of the acidic fraction was 3,4 - dihydroxybenzoic acid, 4 - hydroxybenzoic acid and vanillic acid ; the phenolic fraction was 2-methyl-Pentanedioic acid and 3-Methylglutaric acid. The results showed that *C. japonica* bark 70% ethanolic

extract of the acidic and phenolic fractions and their ingredients showed wish inhibition, resulting capable used for natural weed control reagent allelopathic plant can be used as the development and utilization.

【key words】 allelopathic, *C. japonica*, *A. thaliana*

I. 前言

植物相剋作用 (Allelopathy) 的現象，乃是植物利用其所產生之化學成分去影響另一個植物的發芽生長與發展，此種現象，早在兩千年前就已爲人所知。在西元前三百年之前，就已知以大麥與豌豆可以抑制雜草及其他作物之生長。相剋作用被定義爲「在環境裡造成任何直接或間接的造成幫助或者是抑制生長之一種或是其他種植物 (包含微生物) 直接製造之化合物之效果」(Rice 1984)。柳杉 (*Cryptomeria japonica* D. Don.)，英文名 Peacock pine、*Cryptomeria*，日本習稱 Sugi 或爲 Japanese cedar，又別名杉、日本杉、吉野杉等。其原產於中國大陸江南各省與日本，於 1896 年由日本引進台灣種植，由於柳杉之木材木理通直，堅軟適宜，加工容易而用途廣，故向來是日本最主要造林樹種之一 (陳振榮，1995)。此外其生長快速而適應性強，故於各地均有種植，今已爲台灣中海拔地區的主要造林樹種之一 (章樂民，1980)。

由先前的研究結果發現 (周英倫，2008)，柳杉精油具有抑制種子發芽及生長的效果，在對種子發芽及生長抑制的精油主成分中，以含氧單萜化合物 Citral、Citronellol、Citronellal、(-)-Carveol、Cineole、D (+)-Camphor 與 Eugenol、Thymol 等酚類化合物具有明顯的抑制效果，此外，柳杉樹皮分別含有高達 46.45 % 的 D (+)-Camphor 與 0.78 % 的 Cineole，可當作柳杉未來應用在於植物相剋作用之研究方向。而在萃取物方面，前人研究顯示柳杉樹皮水萃取與樹皮 70 % 乙醇萃取物，對於大花咸豐草之種子發芽及生長抑制具有極佳之抑制效果。

本次報告主要以柳杉樹皮 70 % 乙醇萃取物，進行酸性部成分與酚性部成分的 GC-MS 分析鑑定，並將所獲得之抽出成份進行抑制活性分析，並分析其組成化合物、篩選及評估各成份對各植物種子發芽及生長之抑制活性。

II. 研究方法

(I) 研究材料包含

1. 柳杉 (*Cryptomeria japonica* D. Don.) 樹皮採集自鞍馬山，萃取 70% 乙醇抽出物。
2. 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因型野生種、黑麥草 (*Lolium multiflorum*)、律柏草 (*Festuca arundinacea*)。

(II) 抽出物之製備與分析

1. 樹皮 70% 乙醇抽出物

取柳杉樹皮 300 g 裝入圓底燒瓶中，並加入 3 L 70% 乙醇萃取，共萃取三次，

萃取時間分別為 16、6 及 6 hr，萃取後獲得之萃取液，以乙酸乙酯進行液液分離，將獲得之乙酸乙酯層，再進一步進行分離，將上述之乙酸乙酯先後以 2% NaHCO₃ 與 4% NaOH 進行分離萃取三次，所殘留之乙酸乙酯部歸為中性部。將獲得之 2% NaHCO₃ 與 4% NaOH 萃取液則以 1 N 之 HCl 調配至 pH = 2，而後以乙酸乙酯分離萃取，所得之乙酸乙酯部分別歸為酸性部與酚性部。

2. GC-MS 分析

將分離獲得之各部經TMS衍生化後以GC-MS進行鑑定。所作用GC-MS HP 6890 GC與HP 5973 MSD，所採用之管柱為DB-5。注射口溫度 270°C，載流氣體為氦氣，流速 1 mL/min。而烘箱之升溫條件則為：50°C維持5 min，而後以 5°C/min之速度升至 325°C，最後 325°C維持 10 min。

3. 種子發芽及生長抑制試驗

(1) 種子發芽抑制試驗

將化合物以乙醇溶解，調配製預設濃度添加於培養皿中，之後置入濾紙使其充分含浸於含有試樣的溶液中，待溶劑揮發後，再加入 2 ml 0.05% (v/v) DMSO 水溶液，將種子 10 顆播於培養皿中，以石蠟膜密封，放入溫度 25±2°C、濕度 80%及光照強度 56.87 μmol/m²s⁻¹ 的生長箱內培育，每 2 天觀察一次，共培育一週，記錄最終發芽數，與控制組比較，計算其發芽抑制率，胚根突出種皮 0.5 mm 即算發芽，控制組只添加 0.05% (v/v) DMSO 水溶液，試驗重複 3 次。

發芽抑制率 (%) = $(1 - \text{試驗組平均發芽數} / \text{控制組平均發芽數}) \times 100\%$

(2) 幼苗生長抑制試驗：

將種子播入預發芽盤中，放入生長箱中培育 3 天，以上述相同添加試樣方式進行試驗，由預發芽盤中挑選胚根突出種皮 1 ± 0.5 mm的種子 10 顆，置於培養皿中，於 23°C，相對濕度 50%的黑暗環境中培育，共培育一週，之後測量胚根及胚軸長計算平均值，控制組只添加 0.05% (v/v) DMSO水溶液，試驗重複 3 次。

生長抑制率 (%) = $(1 - \text{試驗組平均生長長度} / \text{控制組平均生長長度}) \times 100\%$

III. 結果與討論

(I) 柳杉樹皮70%乙醇抽出物對種子發芽及生長抑制

由表1可得知將柳杉樹皮70%乙醇抽出物以分離萃取法分成酸性部、酚性部及中性部，其含量百分比分別約為24%、18%及48%。

表1 柳杉樹皮部萃取法及分離部之收率

萃取溶劑	粗萃物含量 (%)	粗萃 → EA 萃 取物含量 (%)	各部種類	各部含量 (%)
70%乙醇	11.823	59.021	酸性部	24.68
			酚性部	17.61
			中性部	47.93

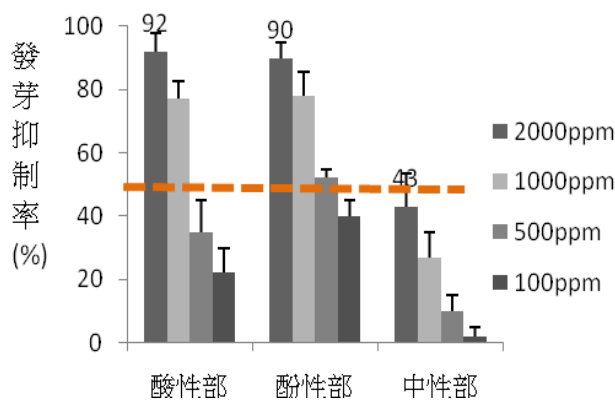


圖 1. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對阿拉伯芥種子發芽抑制效果

由圖1可發現柳杉樹皮 70%乙醇抽出物各分離部對於抑制阿拉伯芥種子發芽時，以酸性部及酚性部較為顯著，其濃度在達到 2000 ppm時可達到 90%以上的抑制率，其 IC_{50} 分別為 894 及 490ppm。由圖 2、3、4 可發現柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對於抑制黑麥種子發芽 IC_{50} 均在 500 ppm 左右，而生長抑制只有酚性部較有效果。

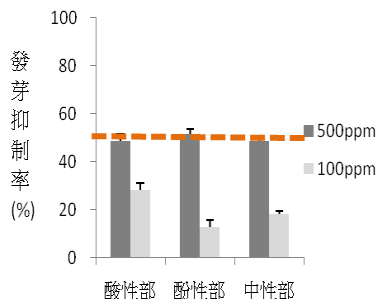


圖 2. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對黑麥種子發芽抑制效果

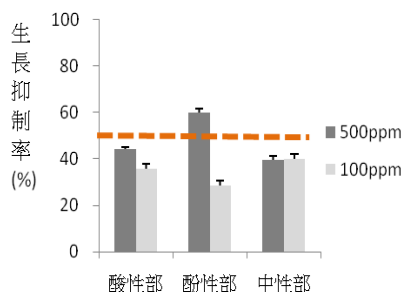


圖 3. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對黑麥種子胚根抑制效果

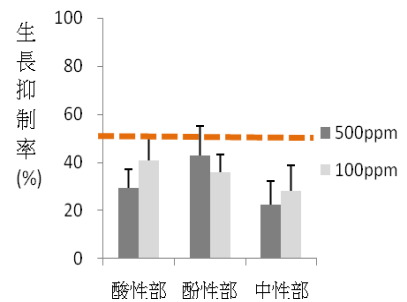


圖 4. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對黑麥種子胚軸抑制效果

而在圖 5 中可發現柳杉 70%乙醇抽出物酸性部對於抑制律柏種子發芽，具有較好的效果，在圖 6、7 中不管是胚根或胚軸抑制， IC_{50} 約在 100 ppm 左右。

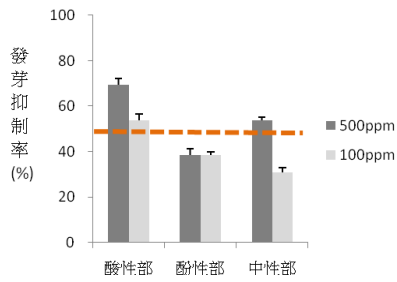


圖 5. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對律柏種子發芽抑制效果

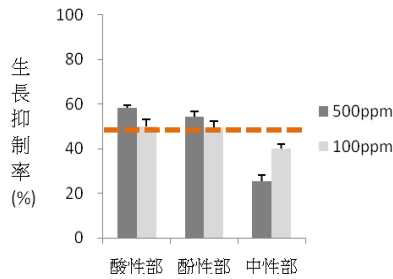


圖 6. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對律柏種子胚根抑制效果

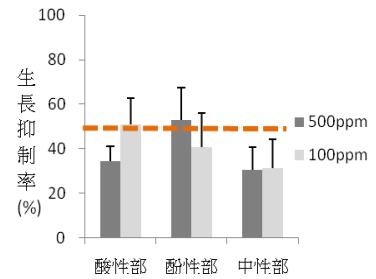


圖 7. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物對律柏種子胚軸抑制效果

(II) 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物之成份鑑定

再將酸性部及酚性部以 GC-MS 進行鑑定，如圖 8、9 中發現其主要成分 3,4-二羥基苯甲酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid)、4-對羥基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoic acid) 及香草酸 (Vanillic acid) 等。前人亦於許多植物中發現，如稻米、咖啡、黃荊、高山芒及五節芒等植物 (Chou and Lee,1991；Chou and Leu,1992；Xuan et al.,2004)。在前人研究中，An et al. (2000, 2001) 亦於鼠茅立地之土壤中鑑定出 Catechol、Pyrogallol、2-Hydroxybenzoic acid 及 4-Hydroxybenzoic acid 等成分，並將其對小麥幼苗經行試驗，並測定其胚軸及胚根長，發現此 4 成分對胚軸抑制之 IC₅₀ 分別為 644、729、273 及 886 ppm，而對胚根之抑制則為 200、275、169 及 463 ppm。呈現 2-Hydroxybenzoic acid 效果最佳，Catechol 次佳，而 Pyrogallol 及 4-Hydroxybenzoic acid 最差之結果。而 Batish et al. (2002) 以銀膠菊素對大花咸豐草進行試驗之結果，其不論胚根或胚軸之半抑制濃度，亦均小於 190 μM。

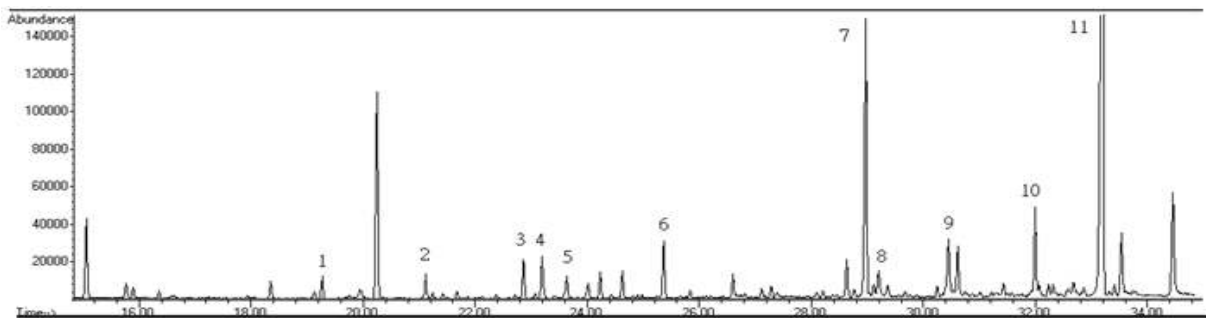


圖 8. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物酸性部之 GC-MS 圖譜

表 2 酸性部之 GC-MS 鑑定結果

編號	名稱	分子式	KI 值	含量 (%)	鑑定方式
1	Trimethylsilyl ethylhydrogensuccinate	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	1251	1.314	MS
2	Trimethyl[2-[[trimethylsilyl]oxy]phenoxy]silane	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	1310	1.225	MS,KI

3	1,6- Diethyl hexanedioate	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	1373	3.406	MS
4	Methyl 2,4- dimethoxy -6- methylbenzoate	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	1385	3.996	MS, KI
5	Myrtenoic acid, trimethylsilyl ester	C ₁₃ H ₂₂ O ₂ Si	1405	2.204	MS
6	Methyl 2,4-dimethoxy-6-methylbenzoate	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	1474	1.427	MS,KI
7	Trimethylsilyl 4-[[trimethylsilyl]oxy]benzoate	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	1625	11.608	MS,KI
8	Methyl 4-methoxy-3-[[trimethylsilyl]oxy]- Benzoate	C ₁₂ H ₁₈ O ₄ Si	1643	4.600	MS,KI
9	2,4'-bis[[trimethylsilyl]oxy], 3'-methoxy- Acetophenone	C ₁₅ H ₂₆ O ₄ Si ₂	1698	9.715	MS
10	Trimethylsilyl 3-methoxy-4-[[trimethylsilyl]- oxy]benzoate	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	1761	2.702	MS,KI
11	Trimethylsilyl 3,4-bis[trimethylsilyloxy]- Benzoate	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	1817	12.689	MS,KI
總和				54.886	

在上述成分中，選擇了 2-Furancarboxylic acid、Catechol、Butanedioic acid、Ethyl 4-ethoxybenzoate、4-Hydroxybenzoic acid、Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate (Vanillic acid, methylester)、Vanillic acid、3,4-Dihydroxybenzoic acid，及類似結構之酚 (Phenol) 與水楊酸 (2-Hydroxybenzoic acid) 進行試驗，以供比較。

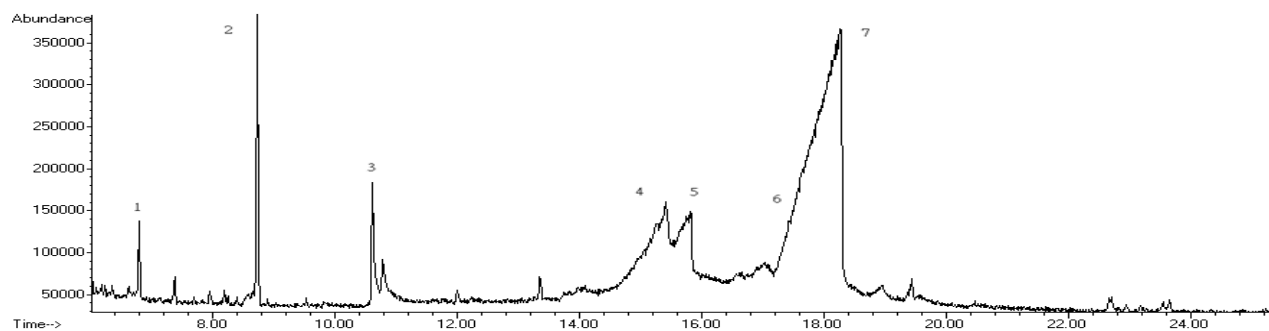


圖 9. 柳杉樹皮 70%乙醇抽出物酚性部之 GC-MS 圖譜

表 3 酚性部之 GC-MS 鑑定結果

編號	名稱	分子式	KI 值	含量 (%)	鑑定方式
1	5-hydroxy-1-Indole-3-carboxylic acid,	C ₉ H ₇ NO ₃		1.57	MS
2	Trimethylsilyl amine	C ₉ H ₂₇ NSi ₃		5.34	MS
3	3-Methylglutaric anhydride	C ₆ H ₈ O ₃	1047	2.66	MS
4	3-Methylglutaric acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	1123	13.74	MS
5	2-methyl-Pentanedioic acid, (2S)	C ₆ H ₁₀ O ₄	1130	7.41	MS,KI

6	(R)-(+)-3-Methyladipic acid	C ₇ H ₁₂ O ₄	1283	12.91	MS
7	Ethyl[3,4-bis[[trimethylsilyl]oxy]phenyl]acetate	C ₁₆ H ₂₈ O ₄ Si ₂	1311	15.62	MS, KI
總和				59.25	

結果發現 1000 ppm 添加量下，除 Butanedioic acid 及 3,4-二羥基苯甲酸外，其餘成份均可突破半抑制率，其中 Catechol、Phenol、ethyl 4-ethoxybenzoate、2-Furancarboxylic acid、2-Hydroxybenzoic acid 及 Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate 均具有 90%以上，甚至達 100%之發芽抑制率。當濃度下降至 200 ppm 時，則僅餘 Phenol 及 Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate 具 80%以上之發芽抑制率，此時兩者之抑制率分別為 93% 及 89%。不過若濃度再降低為 100 ppm 時，則僅餘 Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate 可達半抑制之效果，其餘均無法達到 50%之抑制效果。

表 4 酸性部成分中的化合物對阿拉伯芥發芽抑制之半抑制濃度

酸性部成分	對粗萃物的含量 (%)	對酸性部的含量 (%)	IC ₅₀ (ppm)
3,4-Dihydroxybenzoic acid	1.85	12.689	1524
Butanedioic acid	0.04	0.281	1347
Vanillic acid	0.39	2.702	923
4-Hydroxybenzoic acid	1.69	11.608	511
Ethyl 4-ethoxybenzoate	0.16	1.076	201
Catechol	0.18	1.225	198
2-Furancarboxylic acid	0.07	0.466	172
Vanillic acid, methylester	0.67	4.6	73
2-Hydroxybenzoic acid	—	—	168
Phenol	—	—	123
total	5.05	34.65	

在生長抑制方面，於最高濃度 1000 ppm 下，除了 Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate 外，均具有 90%以上之胚根抑制率。不過當濃度下降後，則大多數成分之抑制效果亦跟著大幅下降，僅 2-Furancarboxylic acid 及 2-Hydroxybenzoic acid 於濃度 200 ppm 時，依舊具有 90%以上之胚根抑制效果，此時兩者之抑制率分別為 93%及 97%。而於高濃度 1000 ppm 下具 80%以上胚軸抑制率的成分包括了 Phenol、Catechol、ethyl 4-ethoxybenzoate、2-Hydroxybenzoic acid、2-Furancarboxylic acid 及 3,4-Dihydroxybenzoic acid 等成分。而同樣的，當濃度下降時其抑制效果均會隨之降低，僅餘 Ethy 4-ethoxybenzoate 於濃度僅 100 ppm 下，亦能展現高達 67%之胚芽抑制率。整體來看，不論於發芽抑或生長，Butanedioic acid、3,4-Dihydroxybenzoic acid Vanillic acid 均無極佳之抑制效果。Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate、Ethy 4-ethoxybenzoate 則分別對抑制發芽及生長具高度之抑制作用，而成分 Phenol、2-Furancarboxylic acid 及 2-Hydroxybenzoic acid 則不論對生長或發芽的抑制，均極為有效。

由上述結果可得知柳杉樹皮 70%乙醇萃取物之酸性部及酚性部對抑制雜草發芽及生長有明顯的抑制作用。

IV. 結論

經實驗後發現，柳杉 70%乙醇抽出物經液-液分離萃取後進行試驗，對於抑制種子發芽時，以酸性部及酚性部較為顯著，其濃度在達到 2000 ppm 時可達到 90%以上的抑制率。而不論於發芽抑或生長，成分 Phenol、2-Furancarboxylic acid 及 2-Hydroxybenzoic acid，均極為有效。試驗結果顯示柳杉樹皮 70%乙醇抽出物之酸性部和酚性部具有抑制活性，可作為植物相剋作用的開發與利用。

V. 參考文獻

- 章樂民（1980）柳杉。台灣農家要覽。pp.1216-1220。
- 陳振榮（1995）柳杉。台灣農家要覽-林業篇。pp.12-14。
- 周英倫（2008）柳杉抽出成分對大花咸豐草種子發芽及生長抑制之研究。碩士論文。
- An M., T. Haig and J. E. Pratley（2000）Phytotoxicity of vulpia residues：II separation, identification and quantitation of allelochemicals from *Vulpia myuros*. Journal of chemical ecology. 26：1465-1476.
- An M., J. E. Pratley and T. Haig(2001)Phytotoxicity of vulpia residues：III Biological activity of identified allelochemicals from *Vulpia myuros*. Journal of chemical ecology. 27：383-394.
- Batish D. R., H. P. Singh, R. K. Kohli and D. B. Saxena（2002）Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. Environmental and experimental botany. 47：149-155.
- Chou C. H. and Y. F. Lee(1991) Allelopathic dominance of *Miscanthus transmorrisonensis* in an alpine grassland community in Taiwan. Journal of chemical ecology. 17：2267-2281
- Chou C. H. and L. L. Leu（1992）Allelopathic substances and interactions of *Delonix regia* (boj) raf. Journal of chemical ecology. 18：2285-2303
- Fujihara S. and T. Shimizu（2003）Growth inhibitory effect of peel extract from *Citrus junos*. Plant growth regulation. 39：223-233
- Macias, F. A., J.M.G. Molinillo, R. M. Varela and J. CG Galindo (2007) Allelopathy – a natural alternative for weed control. Pest Manag Sci 63:327–348.
- Rice E. L.（1984）Allelopathy. Academic press, inc.
- Xuan T. D., T. Shinkichi, N. H. Hong, T. D. Khanh and C. I. Min（2004）Assessment of phytotoxic action of *Ageratum conyzoides* L. (billy goat weed) on weeds. Crop protection. 23：915-922.