

马尾松 (*Pinus massoniana*)、湿地松 (*Pinus elliottii*) 挥发性化学物质的昼夜节律释放

胡永建¹, 任 琴^{1,2}, 金幼菊^{1,*}, 李镇宇^{1,3}, 陈华君¹

(1. 北京林业大学, 北京 100083; 2. 内蒙古集宁师专, 集宁 012000; 3. 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 用 TCT-GC/MS 分析了马尾松、湿地松挥发性有机化合物的昼夜节律变化。结果表明: 马尾松昼夜节律中检测到的挥发物主要是萜烯类化合物, 其中单萜种类最多, 且 α -蒎烯和 β -蒎烯含量约占整个挥发物的 80%, 其次是含氧化合物等。这些挥发物的释放高峰多数在 10:30, 少数在 1:30, 整个变化中有两个低峰期, 即 13:30 和 22:30。湿地松中检测到的挥发物组分与马尾松相似, 多数释放高峰在 12:00 ~ 15:00 之间; 另一些在 6:00, α -蒎烯的释放高峰在 3:00, 而此时其它挥发性化合物的释放量最低。挥发物的释放也受到外界环境的影响, 一定范围内随着温度的升高、湿度的减小, 其释放量增加。

关键词: 马尾松; 湿地松; 挥发性化学物质; 昼夜节律; TCT-GC/MS

文章编号: 1000-0933 (2007) 02-0565-06 中图分类号: Q948.5718.5 文献标识码: A

Diurnal cycle of emission of volatile compounds from *Pinus massoniana* and *Pinus elliottii*

HU Yong-Jian¹, REN Qin^{1,2}, JIN You-Ju^{1,*}, LI Zhen-Yu^{1,3}, CHEN Hua-Jun¹

¹ Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

² Inner Mongolia Jining Teachers Advanced College, Jining 012000, China

³ Beijing Forestry University Key Laboratory of Forest Silviculture and Conservation, Beijing 100083, China

Acta Ecologica Sinica 2007, 27 (2): 0565 ~ 0570.

Abstract: Using TCT-GC/MS technique, diurnal emission cycles of volatile organic compounds (VOCs) from *Pinus massoniana* and *Pinus elliottii* were analyzed respectively. Results showed that terpenes, especially monoterpenes were the dominant components released from *P. massoniana*. Nearly eighty percent of the total VOCs were consisted of α - and β -pinenes, but the oxygenated VOCs was less abundant. Releasing peak of most VOCs was around 10:30am but a few VOCs at 1:30am. The lowest releasing points of VOCs were at 1:30pm and 10:30pm, respectively. Volatile components detected from *P. elliottii* were similar to those from *P. massoniana*. Releasing peaks of most VOCs from *P. elliottii* lasted from 12:00pm to 3:00pm while the others were at 6:00am. The peaking time of α -Pinene's was around 3:00am when the other VOCs were at their lowest releasing point. The emission rates of VOCs were also influenced by environmental factors. The emission rates of VOCs increased corresponding to the temperature rising and the decline of humidity.

Key Words: *Pinus massoniana*; *Pinus elliottii*; volatile compounds; diurnal cycle; TCT-GC/MS

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30330490)

收稿日期: 2005-12-23; 修订日期: 2006-12-27

作者简介: 胡永建 (1983 ~) 男, 河南省人, 硕士生, 主要从事化学生态学研究. E-mail: hu_yongjian@163.com

* 通讯作者: Corresponding author. E-mail: youjujin@bjfu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30330490)

Received date 2005-12-23; **Accepted date** 2006-12-27

Biography: HU Yong-Jian, Master candidate, mainly engaged in chemical ecology. E-mail: hu_yongjian@163.com

马尾松 (*Pinus massoniana*)、湿地松 (*Pinus elliottii*) 是我国南方主要林木及采脂树种, 分布面积广, 但常遭到马尾松毛虫 (*Dendrolimus Punctatus* Walker) 的危害。松毛虫是中国森林的最大食叶害虫, 其灾害是除乱砍滥伐和森林火灾外, 威胁我国森林的最大害虫。湿地松 (*P. elliottii*) 原产北美东南部, 遗传和环境因素决定了湿地松与马尾松在生物学和生态学特性等方面有较大的差别, 具有适应性强、生长快、产脂量高、病虫害少等特点。研究表明, 湿地松挥发物中一定浓度的 β -蒎烯是吸引马尾松毛虫产卵的因子, 但当马尾松毛虫幼虫取食湿地松时, 死亡率明显升高^[1]。鉴于上述原因, 在研究马尾松挥发物昼夜节律变化以及诱导抗性时以湿地松作为比较和参照。

正常情况下, 马尾松 (*P. massoniana*)、湿地松 (*P. elliottii*) 针叶树脂道中贮存有各种萜烯类物质, 这些物质的释放维持在基线水平, 当植物受到危害时会释放大量的挥发性化学物质。这些挥发物可以防御昆虫的取食、引诱害虫天敌, 而且具有信号转导的作用。挥发物的释放是以其昼夜节律变化为基础的。例如, 棉花受昆虫危害后所诱导出的萜烯类化合物的释放遵循昼夜节律变化, 挥发物的释放高峰在中午^[2]。Martin 等^[3]用茉莉酸甲酯喷施挪威云杉后, 所诱导出的挥发性化学物质的变化也以昼夜节律变化为基础, 而且光期释放量最大。环境因子的改变使挥发性化学物质的种类和数量发生变化, 影响挥发物的昼夜节律释放。因此, 通过研究挥发物的释放节律及其影响因子, 可以预测各种挥发性化合物的释放量, 为研究受害马尾松挥发物的释放奠定基础, 这对马尾松毛虫的防治具有重要的理论和实践意义。

1 试验材料与方法

1.1 植物材料和挥发物的采集

2005 年 6 月在江西省高安市荷岭镇荷岭林场选定一片天然林, 在林中分别选择树龄相同、长势一致的马尾松、湿地松各两株作为试验树种, 标记后分别测定挥发物的变化。取样方法为动态顶空收集法, 采样时间 15 min。采样期间均为晴天, 用 HOBO 自动温湿度数据记录仪连续记录采样期间温度、湿度的变化。

健康马尾松挥发性物质释放的昼夜节律 2005 年 6 月 20 ~ 21 日, 从 7:30 开始, 每间隔 3 h 采集一个样, 直至第 2 天 16:30。每个样重复 2 次, 共采集 16 个样。

健康湿地松挥发性物质释放的昼夜节律 2005 年 6 月 21 ~ 22 日, 从 9:10 开始, 每间隔 3 h 采集一个样, 直至第 2 天 6:10。每个样重复 2 次, 共采集 16 个样。

1.2 植物挥发物的测定

取样后采用 TCT-GC/MS 进行测定。具体方法参见《受害马尾松、湿地松挥发性化学物质的释放》^[4]。

马尾松挥发物成分的鉴定采用 Xcalibur1.2 版本软件, NIST98 谱图库兼颜色谱保留时间及萜烯标样的出峰顺序完成。通过面积归一化法以各类挥发物的相对含量定量。

2 试验结果与分析

2.1 马尾松挥发性化学物质的昼夜节律释放

马尾松挥发性物质的昼夜节律测定结果表明, 检测到的挥发物中主要是萜烯类化合物, 如三环烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯、(4S)-10-宁烯、柠檬烯、水芹烯、石竹烯、大香叶烯、雪松烯等。其中单萜的种类最多, 且 α -蒎烯和 β -蒎烯含量约占整个挥发物的 80%, 其次是含氧单萜化合物、醇、醛、酮、酸、酯, 包括里那醇、苯甲醛、乙基己醇、马鞭草烯醇、马鞭草烯酮、辛醛、壬醛、癸醛等。这些挥发性化合物的释放高峰可以分为两类, 多数在 10:30, 少数挥发物的释放高峰在 1:30 (见表 1)。整个变化中有两个低峰期, 分别在 13:30 和 22:30。

植物释放的单萜化合物是大气中挥发性有机化合物的主要来源^[5]。在许多植物种类中, 单萜合成的速率依赖于光照和温度, 如地中海常绿植物意大利松 (*Pinus pinea*) 在光下释放的挥发物远大于暗处, Standt 等^[6]认为单萜释放的最初来源是植物体中重新合成而非树脂道中贮存。因此, 植物的光合作用及气孔开度与挥发物的释放密切相关, 而光照是引起气孔运动的主要环境因素。大多数植物的气孔在光照下张开, 黑暗中关闭。采样期间, 由于中午的气温很高, 高温 (30 ~ 35℃) 会导致气孔的关闭^[7], 这可能是一种间接的影响。于是, 马尾松昼夜节律变化中出现了两个低峰期。 α -蒎烯、柠檬烯、 p -薄荷-1,4 (8)-二烯等挥发物的释放速率

缺乏明显的气孔控制,导致释放高峰出现在夜间^[8]。

2.2 湿地松挥发性物质的昼夜节律释放

湿地松的试验结果表明:多数挥发性化学物质的释放高峰在 12:00~15:00,如三环烯、莰烯、β-蒎烯、(4R)-宁烯、柠檬烯、β-水芹烯、p-薄荷-1,4(8)-二烯、里那醇、乙基己醇、苯乙基酮、壬醛、β-石竹烯、石竹烯、大香叶烯、杜松烯;另一些挥发物的释放高峰在 6:00,包括辛醛、癸醛、马鞭草烯醇、马鞭草烯酮;α-蒎烯的释放高峰在 3:00,此时正是多数挥发性化合物释放的最低点(见图 1)。

表 1 2005 年马尾松挥发物昼夜节律释放(相对含量,%)
Table1 Diurnal Cycle of Emission of Volatile Compounds from Pinus massoniana (Relative contents, %)

化合物 Compounds	取样时间 Time							
	7:30	10:30	13:30	16:30	19:30	22:30	1:30	4:30
三环烯 Tricyclene	0.001	0.022	0.009	0.018	0.007	0.004	0.003	0.020
α-蒎烯 α-Pinene	79.22	77.76	73.15	65.17	73.27	15.26	83.05	71.20
莰烯 Camphene	0.36	0.48	0.28	0.32	0.29	0.14	0.29	0.47
(4R)-宁烯 (4R)-Thujene	0.01	0.04	0.001	0.02	0.005	0.003	0.01	0.01
β-蒎烯 β-pinene	5.21	16.08	5.60	10.18	14.64	1.28	12.97	12.79
辛醛 Octanal	0.04	0.12	0.01	0.01	0.03	0.04	0.10	0.05
乙基己醇 Ethylhexanol	0.06	0.03	0.02	0.04	0.09	0.01	0.44	0.01
柠檬烯 Limonene	0.28	0.19	0.09	0.11	0.20	0.09	0.30	0.23
β-水芹烯 β-phellandrene	0.18	0.25	0.11	0.18	0.22	0.12	0.33	0.38
6,6-二甲基-2-甲烯基-二环[2.2.1]己烷-3-酮 Bicyclo[2.2.1]heptan-3-one, 6,6-dimethyl-2-methylene	0.01	0.15	0.03	0.06	0.02	0.01	0.005	0.01
苯乙酮 Acetophenone	0.004	0.02	0.01	0.003	0.001	0.001	0.002	0.018
壬醛 Nonanal	0.15	0.09	0.03	0.18	0.06	0.12	0.35	0.15
癸醛 Decanal	0.16	0.09	0.03	0.31	0.14	0.16	0.01	0.25
壬酸 Nonanoic acid	0.52	0.53	0.01	0.09	0.24	0.12	0.08	0.005
p-薄荷-1,4(8)-二烯 p-mentha-1,4(8)-diene	0.01	0.06	0.06	0.01	0.07	0.03	0.11	0.08
己内酰胺 Caprolactam	0.28	0.43	0.01	0.17	0.01	0.34	0.06	0.15
马鞭草烯酮 Verbenone	0.08	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.04
6,6-二甲基-2-降蒎烯-2-羧基醛 2-Norpinene-2-Carboxaldehyde, 6,6-dimethyl	0.01	0.09	0.01	0.06	0.01	0.01	0.01	0.06
β-石竹烯 β-Caryophyllene	0.43	0.36	0.07	0.46	0.68	0.43	0.87	0.74
α-石竹烯 α-Caryophyllene	0.03	0.11	0.01	0.02	0.09	0.06	0.08	0.07
大香叶烯 D Germacrene D	0.03	0.02	0.05	0.15	0.02	0.10	0.06	0.08
雪松烯 Cadinene	0.03	0.050	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02

湿地松采样期间温度(27℃左右)、湿度变化较小,气孔在午间开度最大,随着光照的加强,植物光合作用加速,光合产物增加,导致次生代谢物的产生及释放增多。这与植物正常的代谢规律相吻合。Niinemets等^[5]研究结果表明,意大利松(Pinus pinea)除氧化单萜里那醇、1,8-桉树脑的释放速率在午间显著降低外,其余挥发物的释放速率没有明显的降低。氧化型单萜释放速率降低与气孔导度和净碳同化率相伴随,因为植物释放的部分单萜在叶绿体中合成,异戊二烯的合成依靠光合作用为媒介。单萜释放速率常常由碳同化速率所决定。试验中里那醇的释放速率在午间升高,这与上述结论相反。说明马尾松针叶净碳同化速率及其单萜合成速率的增加。最近的研究表明:单萜的合成速率与光合电子的转运更接近。例如,叶绿体中 NADPH 和 ATP 的利用^[9]。

2.3 温度、湿度对马尾松、湿地松挥发性物质释放的影响

环境因子如温度、湿度影响着植物的代谢活动,从而对挥发物的释放产生间接的影响。本实验的结果表

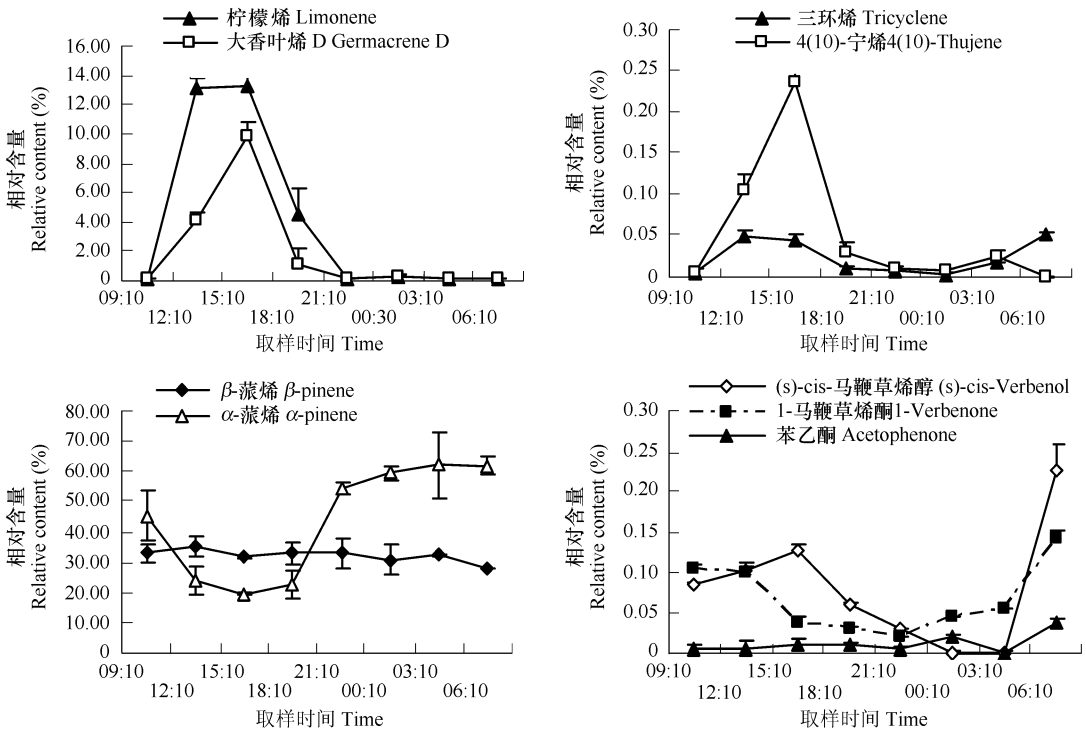


图1 湿地松挥发物昼夜节律释放

Fig. 1 Diurnal cycle of emission of volatile compounds from *Pinus elliottii*

明 在不考虑其它影响因子的条件下 ,一定范围内随着温度的升高、湿度的减小 ,挥发性化学物质的释放量增加 (图2 图3)。

Guenther 等^[01]认为在光强一定的条件下 ,随着叶温的升高 ,异戊二烯的释放以指数形式增加 ,达到最大值后下降 ,这可能是叶片受到破坏和酶失活的结果。高温使植物释放大量的挥发物^[11] ,尤其是萜烯类 ,尽管萜烯类的生物功能还没有完全清楚 ,但它的释放是对高温的策略反应^[12]。当温度超过了植物的最适温度时 ,脂溶性的碳氢化合物溶解在类囊体膜中 ,抑制了叶绿体的降解。随着温度的升高 ,这些碳氢化合物蒸发。因此 ,萜烯类的挥发作用降低了叶绿体的温度 ,对叶绿体起到保护作用^[13]。Jakobsen 等^[14]研究发现 20℃ 时白三叶 (*Trifolium repens* L.)花的香气释放量比 10℃ 高 58% ,这可能是由于高温增加了这些物质的挥发性或其生物合成过程所致^[15]。

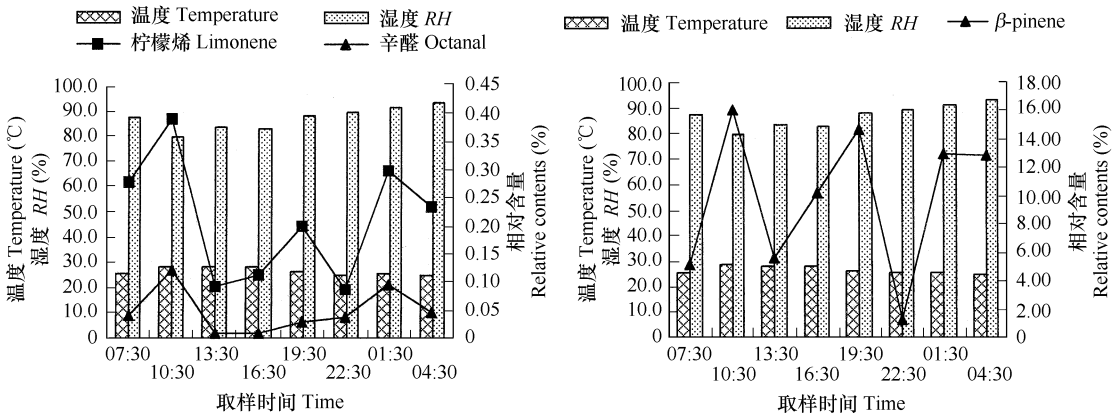


图2 温度、湿度对马尾松挥发物释放的影响

Fig. 2 Effects of temperature and humidity on volatile organic compounds from *Pinus massoniana*

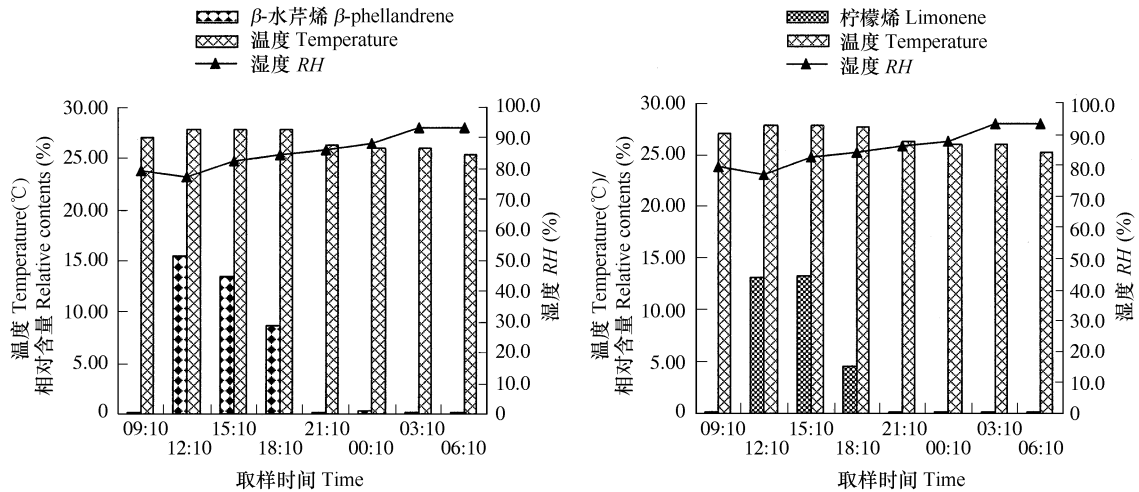


图 3 温度、湿度对湿地松挥发物释放的影响

Fig. 3 Effects of temperature and humidity on volatile organic compounds from *Pinus elliottii*

湿度是影响挥发物释放的另一因子。低湿度可以引起植物挥发物的释放^[6]，这在试验中也得到了证实。但 Guenther 等^[10]研究发现剥皮桉 (*Eucalytus* spp) 叶周围湿度的变化对其单萜物质的释放没有一致的影响。许多植物对大气中水蒸气压非常敏感，当空气干燥，空气中水蒸气压和气孔下空间水蒸气压之间的差值达到一定的阈值时，气孔就会关闭。当发生水分亏缺时，无论其它有关气孔运动的因素如何，气孔都会发生关闭。湿度对挥发物释放的影响可能主要通过影响气孔开闭来实现。

3 结论与讨论

植物释放挥发性化学物质的相对含量在一天之内是可以变化的。试验结果表明：马尾松、湿地松昼夜节律变化中检测到的挥发物主要是萜烯类化合物，其中单萜种类最多，且 α -蒎烯和 β -蒎烯的相对含量约占整个挥发物的 80%，其次是含氧化合物。多数挥发性化合物的释放遵循昼夜节律变化，即白天挥发物的释放量增加，而夜间释放量减小，但也有一些挥发物的释放高峰在夜间。挥发物的释放受到外界环境的影响，一定范围内随着温度的升高、湿度的减小，其释放量增加。

我国对松毛虫的防治经历了人工控制阶段、化学防治阶段和综合治理阶段，尽管在松毛虫的防治上取得了一定的成效，但从马尾松-马尾松毛虫-天敌 3 层营养关系研究其周期性暴发的机理较少，以至对森林生态系统中自然因素的调控作用仍不清楚，森林的自然抗性、诱导抗性以及天敌作用未能发挥，目前仍以化学防治为主。挥发物作为植物防御的一种主要形式，在 3 层营养关系相互作用的进化过程中起着重要作用。因此，对马尾松挥发物的研究就显得极为重要。

马尾松、湿地松挥发物昼夜节律变化为其受害后诱导抗性的研究奠定了基础。由于单萜在大气化学特别是在臭氧形成反应中起重要作用，因此，测定和预报植物单萜释放速率的工作已有一些报道，但通过 TCT-GC/MS 系统地研究植物挥发物昼夜节律变化未见报道。Niinemets 等^[5]研究发现，部分开环单萜化合物如里那醇和月桂烯或反式- β -罗勒烯的释放呈负相关。当白天里那醇释放减少的时候，月桂烯和反式- β -罗勒烯的释放增加。这表明合成里那醇和反式- β -罗勒烯的反应紧密相连，其合成过程中的调节方式是等同的^[17]。尽管马尾松、湿地松挥发物中开环单萜化合物较少，但可以推测环状单萜化合物同样存在着相互的促进或者拮抗，因为特异性单萜合成酶催化从共同单萜前体 GPP 向单萜的合成。当某种单萜化合物由于气孔关闭被选择性地抑制时，整个反应途径会补偿性地合成其它化合物。挥发物的释放也受到环境条件的影响，两种松树中多数挥发物的释放高峰在白天，说明气孔调节着它们的释放，这与 Consuelo 等^[18]的研究结果相似，即植食性昆虫诱导的几种主要萜烯类化合物在光合作用最大期释放量最高，而 α -蒎烯等少数挥发物的释放高峰在夜间，可能与某些夜间活动的昆虫规律相一致，这是植物与昆虫间长期适应的结果，体现了两者的协同进化^[19, 20]；

挥发物的释放同时受到各种环境因子的影响,是在各自影响的基础之上的综合反映。

References :

[1] Ge F , Li Z Y , Xie Y P , *et al.* Some characteristics of induced resistance of *China pines* to pest population dynamics. *Journal of Beijing Forestry University* ,2002 24 (3) :61—65.

[2] Loughrin J H , Manukian A , Heath R R , *et al.* Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore — injured cotton plants. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 ,91 :11836—11840.

[3] Martin D , Gershenzon J , Bohlmann J. Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology* ,2003 ,132 (3) :1586—1598.

[4] Ren Q , Li Z Y , Hu Y J , *et al.* Volatile compounds release from damaged *Pinus massoniana* and *Pinus elliottii*. *Acta Ecologica Sinica* ,2005 ,25 (11) :2928—2932.

[5] Niinemänt , Reichstein M , Staudt M , *et al.* Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*. *Plant Physiology* ,2002 ,130 :1371—1385.

[6] Staudt M , Bertin N , Hansen U , *et al.* Seasonal and diurnal patterns of monoterpene emissions from *Pinus pinea* (L.) under field conditions. *Atmos Environ* ,1997 ,31 :145—156.

[7] Wu W H. *Plant Physiology* . Beijing. Science Press ,2003. 57—61.

[8] Loreto F , Ciccioli P , Cecinato A , *et al.* Influence of environmental factors and air compositions on the emission of α -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiology* ,1996 ,110 :267—275.

[9] Niinemänt s , Hauff K , Bertin N , *et al.* Monoterpene emission in relation to foliar photosynthesis and structural variables in Mediterranean evergreen *Quercus* species. *New Phytol* ,2002 ,153 :243—256.

[10] Guenther A B , Monson R K , Fall R. Isoprene and monoterpene emission rate variability : observations with eucalyptus and emission rate algorithm development. *J Geophys Res* ,1991 ,96 :10799—10808.

[11] Sharkey T D , Singsaas E L. Why plants emit isoprene. *Nature* ,1995 ,374 :769.

[12] Mlot C. A clearer view of why plants make haze. *Science* ,1995 ,268 :641—642.

[13] Paul W , Par J , Tumlinson H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* ,1999 ,121 :325—331.

[14] Jakobsen H B , Olsen C E. Influence of climatic factors on rhythmic emission of volatiles from *Trifolium repens* flowers in situ. *Planta* ,1994 ,192 :365—371.

[15] Dudareva N , Pichersky. Biochemistry and molecular aspects of floral scent. *Plant Physiol* ,2000 ,122 :627—634.

[16] Ursula S R , Ara M , Robert R H , *et al.* Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves. *Plant Physiology* ,1996 ,111 :487—495.

[17] Cseke L , Dudareva N , Pichersky E. Structure and evolution of linalool synthase. *Mol Biol Evol* ,1998 ,15 :1491—1498.

[18] Consuelo M , De Moraes , Mark C , *et al.* Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* ,2001 ,410 :577—579.

[19] Li X , Bai S F. Advances in the studies on the chemical ecology of tritrophic interactions among host-plant , herbivore and natural enemies. *Journal of Henan Agricultural University* ,2003 ,37 (3) :224—232.

[20] Zhang F , Kan W , Zhang Z N. Progress in chemical ecology of tritrophic interactions among host-plant , aphids and natural enemies. *Acta Ecologica Sinica* ,2001 21 (6) :1025—1033.

参考文献 :

[1] 戈峰 ,李镇宇 ,谢映平 ,等. 我国主要松树诱导抗虫性的一些规律比较. *北京林业大学学报* 2002 24 (3) :61~65.

[4] 任琴 ,李镇宇 ,胡永建 ,等. 受害马尾松、湿地松挥发性化学物质的释放. *生态学报* 2005 25 (11) :2928~2932.

[7] 武维华. *植物生理学*. 北京: 科学出版社 2003. 57~61.

[19] 李欣 ,白素芬. 寄主植物-植食性昆虫-天敌三重营养关系中化学生态学的研究进展. *河南农业大学学报* ,2003 ,37 (3) :224~232.

[20] 张峰 ,阚炜 ,张钟宁. 寄主植物-蚜虫-天敌三重营养关系的化学生态学研究进展. *生态学报* ,2001 ,21 (6) :1025~1033.