

## 应用 zNose<sup>TM</sup> 分析被害茶树的挥发物

蔡晓明, 孙晓玲, 董文霞, 王国昌, 陈宗懋\*

(中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008)

**摘要:**与传统的植物挥发物分析手段相比, zNose<sup>TM</sup> 具有采样时间短、快速分析、便于携带等不可比拟的优势。以茶树为研究对象, 应用 GC-MS、zNose<sup>TM</sup> 对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物进行了同步分析; 并发挥 zNose<sup>TM</sup> 采样时间短、快速分析的优势, 研究了机械损伤茶树叶片后, 4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯等 3 种绿叶气味物质的释放规律。结果表明: GC-MS 与 zNose<sup>TM</sup> 对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物的定性分析结果差别不大; 但两者测定茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物中顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、反-石竹烯等 4 种组分的相对含量有一定差异。在此基础上, 通过 zNose<sup>TM</sup> 测定发现, 无论磨损还是针扎损伤新叶, 机械损伤的程度越大, 3 种绿叶气味物质的释放量越大; 新、老叶片在遭受同样的机械损伤后, 3 种绿叶气味物质的释放不完全相同; 新叶经针扎损伤后, 3 种绿叶气味物质释放高峰的出现时间不同。就 zNose<sup>TM</sup> 在植物挥发物分析中的应用前景进行了讨论。

**关键词:** zNose<sup>TM</sup>; GC-MS; 茶树; 挥发物; 茶尺蠖; 机械损伤

文章编号: 1000-0933(2009)01-0169-09 中图分类号: Q143, Q948, Q968 文献标识码: A

## Application of zNose<sup>TM</sup> for the analysis of the volatiles emitted by damaged tea plants

CAI Xiao-Ming, SUN Xiao-Ling, DONG Wen-Xia, WANG GUO-Chang, CHEN Zong-Mao\*

Tea Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310008, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(1): 0169 ~ 0177.

**Abstract:** zNose<sup>TM</sup> possesses the following advantages including short sampling time, rapid analysis and portability compared with conventional analytical method. We analyzed synchronously the volatiles emitted from tea plants damaged by *Ectropis obliqua* Prout larvae with GC-MS and zNose<sup>TM</sup>, and the emission of the green leaf volatiles (4-methyl-3-pentenal, (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-3-hexenyl acetate) produced by tea leaves after mechanical damage were analyzed with zNose<sup>TM</sup>. The qualitative analysis of the volatiles emitted from tea plants infested by *Ectropis obliqua* Prout with GC-MS or zNose<sup>TM</sup> showed the similar results, however the relative contents of (Z)-3-hexen-1-ol, benzyl nitrile, indole, (E)-caryophyllene obtained from both showed a certain difference. A further investigation with by zNose<sup>TM</sup> showed that more damage level resulted in the more emission of green leaf volatiles when young leaves were damaged mechanically with needle (sting) or abrasive paper (scratch); the emission of green leaf volatiles induced by the same degree mechanical damage from old leaves and young leaves was different; and the emission peak of 4-methyl-3-pentenal, (Z)-3-hexen-1-ol and (Z)-3-hexenyl acetate appeared at different time after young leaves were stung. Finally, the prospect on the application of zNose<sup>TM</sup> in plant volatiles analysis were discussed.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30571255, 30771449); 农业立体污染防治科学创新条件建设资助项目(140102-9); 浙江省重大科技专项资助项目(2007C12G3020014); 浙江省自然科学基金资助项目(Z306394); 浙江省科技计划资助项目(2007C22073); 公益性行业(农业)科研专项经费子资助项目(nyhyz07-021-X); 中国农业科学院科技经费资助项目([2008]27)

**收稿日期:** 2008-07-30; **修订日期:** 2008-11-03

**致谢:**本研究得到北京瑞多科技发展有限公司的热情帮助, 中国科学院动物所张钟宁研究员赠送(E)- $\beta$ -farnesene, 特此致谢。

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zmchen2006@163.com

**Key Words:** zNose<sup>TM</sup>; GC-MS; tea plant; volatiles; *Ectropis obliqua* Prout; mechanical damage

从微生物到哺乳动物,化学信息都是一个主要的信息源,它既可以影响物种的种群动态还可改别食物网的相互关系<sup>[1]</sup>。其中植物就可释放挥发性有机化合物(VOCs, volatile organic compounds)来表明身份,吸引传粉昆虫和植食性昆虫;而且还可通过改变其组成或浓度来展示它们的生理状态,以及它们所遭受到的生存压力<sup>[1]</sup>。例如:植物被植食性昆虫危害后,可通过释放虫害诱导植物挥发物(HIPVs, herbivore-induced plant volatiles)招引天敌、诱发临近植物的抗虫性,借此抵御植食性昆虫的攻击<sup>[2]</sup>。因此,这些化学信息对植物的繁衍,植食性昆虫、天敌的种群变化以及三营养层间相互关系的调节起着重要作用。

目前科学工作者主要是通过顶空采样技术(headspace sampling)、固相微萃取技术(SPME, solid phase microextraction),并结合气质连用仪(GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry)对植物释放的化学信息进行收集和分析。尽管这些技术已基本满足目前研究的需求,但是其也有不足的地方。例如:由于溶剂峰的存在,顶空采样-GC-MS对VOCs中小分子物质的检测能力较差;而SPME-GC-MS不能对VOCs进行定量分析<sup>[3]</sup>。此外,这两种技术在吸附柱的清洗与淋洗,萃取头的解吸以及取样等过程中都将花费大量的时间与劳力<sup>[4]</sup>。

1998年电子鼻(zNose<sup>TM</sup>)的问世,为化学生态研究提供了一项新式武器。它已被用于测定HIPVs释放的时间动态、虫害或机械损伤后绿叶气味的快速释放以及蚜虫报警信息素的实时分析等<sup>[5-9]</sup>。其实zNose<sup>TM</sup>就是一台小型气相色谱,可用于检测空气、土壤、水以及其它物质中所释放的气体,主要包括一个可移动的采样装置(由抽气泵接一根填充Tenax的吸附柱,并附有一个加热装置组成)、一根短的气相色谱柱和一个表面声波检测器(SAW, surface acoustic wave quartz microbalance detector)。因此zNose<sup>TM</sup>将采样与样品分析集于一身,极大地减少了操作过程。zNose<sup>TM</sup>还具有快速分析(分析一个样品只需1min左右),灵敏度高(可在10s内检测到浓度在5pg以下的物质)等优势。由于其便于携带并配有蓄电池,因此为田间植物挥发物监测提供了可能。

但目前zNose<sup>TM</sup>还未在国内昆虫化学生态学中得到应用。因此本文通过顶空采样利用zNose<sup>TM</sup>、GC-MS同步分析了茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物;并发挥zNose<sup>TM</sup>的快速、灵敏特点,分析了机械损伤茶树叶片后,绿叶气味物质的释放规律。

## 1 实验方法

### 1.1 供试材料

本试验所用茶树为2~3年生扦插茶苗,品种为“龙井43”,种于室温为26℃的温室中。“GC-MS与zNose<sup>TM</sup>对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物的分析比较”试验中所用茶苗单株种于高14cm、内径15cm的营养钵中;而“茶树叶片机械损伤后绿叶气味物质的释放”试验中所用茶苗种于高27cm、内径25cm的营养钵中,每钵种4~5株茶苗。

茶尺蠖(*Ectropis obliqua* Prout)为室内饲养种群。饲养条件为:温度24℃、湿度70%、光照:黑暗=16h:8h,饲料为新鲜的茶树叶片。

### 1.2 实验仪器、装置与试剂

#### 1.2.1 实验仪器

气相色谱质谱联用仪:型号为GCMS-QP2101(岛津公司,日本),内接DB-5(长60m,内径0.25mm,厚0.25μm)毛细管柱。柱温起始温度为45℃,保持2min;然后5℃/min升至210℃;再25℃/min升至260℃,保持10min。载气为氮气,流速1ml/min。质谱采用EI电离方式,70eV轰击电压,扫描频率2次/s,检测器温度为250℃。检索谱库为NIST27和NIST147。

电子鼻:型号为zNose<sup>TM</sup>4200(EST公司,美国)。泵吸后采集得到气体被内置的Tenax吸附柱吸附,然后迅速热解吸(165℃),由氦气(流量:3ml/min)带入毛细管柱(1m, DB-5, 内径0.25mm, 厚0.25μm)。柱温在

5℃/s 速率下,由 40℃ 升至 180℃。最后经毛细管柱分离的物质由 SAW 检测器(30℃)检出。

### 1.2.2 实验装置

茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物收集采用顶空动态活体吸附法。收集装置主体为无底无盖的玻璃筒(外径 180mm,高 250mm,壁厚 8mm),玻璃筒顶部和底部用带中心孔的磨砂玻璃板密封。磨砂玻璃板边长 250mm × 250mm,底部玻璃板中心孔孔径 55mm;顶部玻璃板除中心孔(孔径 45mm)外,还有一个孔径为 10mm 的小孔(接 zNose<sup>TM</sup> 采样针)。底板中心孔用被劈成两半,中心带槽(槽径 6mm,大小与茶苗枝干适合)的橡皮塞塞紧;顶板中心孔用连有进气管与出气管的橡皮塞塞紧。装置中所用橡皮塞均用 PET 塑料包裹。进气管、出气管通过 Teflon 管分别与活性炭、吸附柱相连。进气口气流量为 1360ml/min;出气口气流量为 1040ml/min。吸附柱内径 4mm,填塞 35mg SuperQ(80~100 目)吸附剂。

“茶树叶片机械损伤后绿叶气味物质的释放”中挥发物收集装置为用 Teflon 垫片封闭的 45ml 玻璃瓶。制作 zNose<sup>TM</sup> 校准曲线时,所用装置为 1.5ml 安捷伦样品瓶。

### 1.2.3 实验试剂

顺-3-己烯醇((*Z*)-3-hexen-1-ol;Fluka 公司,瑞士),顺-3-己烯醇醋酸酯((*Z*)-3-hexenyl acetate;东京化成工业株式会社,日本),苯甲醇(benzyl alcohol;Sigma-aldrich 公司,美国),芳樟醇(linalool;Fluka 公司,瑞士),苯乙腈(benzyl nitrile;Sigma-aldrich 公司,美国),顺-丁酸-3-己烯酯((*Z*)-3-hexenyl butyrate;Sigma-aldrich 公司,美国),顺-2-甲基丁酸-3-己烯酯((*Z*)-3-hexenyl 2-methylbutyrate;东京化成工业株式会社,日本),吲哚(indole;双香助剂厂,中国,上海),顺-己酸-3-己烯酯((*Z*)-3-hexenyl hexanoate;东京化成工业株式会社,日本),反-石竹烯((*E*)-caryophyllene;东京化成工业株式会社,日本),法尼烯(farnesene;东京化成工业株式会社,日本),反-橙花叔醇((*E*)-nerolidol;Fluka 公司,瑞士),(反)- $\beta$ -法尼烯((*E*)- $\beta$ -farnesene;由中国科学院动物所赠送)。

## 1.3 研究方法

### 1.3.1 茶尺蠖取食诱导茶树挥发物收集与分析

茶苗于实验前两天置于挥发物收集装置内,以适应环境。挑选 5 日龄茶尺蠖 100 头接于茶苗上,52h 后收集挥发物,收集时间为 1h。另设未接茶尺蠖的健康茶苗作为对照,挥发物收集重复 4 次。样品用 500 $\mu$ l 色谱纯二氯甲烷洗脱。无分流进样,进样量为 1 $\mu$ l。采用质谱库检索及比较标准样品的 GC 保留时间或考马斯指数以及相关资料中质谱图对茶树释放的挥发物中各组分进行定性分析;通过标准曲线法对顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、反-石竹烯进行定量分析。

动态顶空采样的同时,将 zNose<sup>TM</sup> 的进气针插入顶部玻璃板的小孔,泵吸 45s(流量:30ml/min),对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物进行实时分析。通过比对 GC-MS 分析结果和标准品的 zNose<sup>TM</sup> 保留时间对被害茶树释放的挥发物中各组分进行定性分析。通过校准曲线法对顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、反-石竹烯进行定量分析。

zNose<sup>TM</sup> 校准曲线的制作方法:用微量进样器取 2 $\mu$ l 稀释成不同浓度的 4 种化学标准品混合溶液注入 1.5ml 安捷伦样品瓶中。待溶液气化后,将两根 zNose<sup>TM</sup> 进气针通过垫片同时插入玻璃瓶中(一根连接 zNose<sup>TM</sup> 采样头,另一根作为进气口。),立即开始采样,泵吸 40s(流量 30ml/min)。4 种化学标准品混合溶液溶剂为二氯甲烷(色谱纯),不同浓度混合溶液中顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、反-石竹烯的浓度(ng/ $\mu$ l)分别为:① 0.8480、0.3386、0.2998、0.4000;② 0.6784、0.2709、0.2399、0.3200;③ 0.5088、0.2031、0.1799、0.2400;④ 0.3392、0.1354、0.1199、0.1600;⑤ 0.1696、0.0677、0.0600、0.0800;⑥ 0.0848、0.03386、0.0300、0.0400。每个浓度,重复 5 次。

### 1.3.2 zNose<sup>TM</sup> 分析茶树叶片机械损伤后绿叶气味物质的释放

实验于 2008 年 4 月底进行,分别通过“针扎”、“磨擦”对盆栽茶苗“新叶”和“老叶”进行机械损伤。新叶为芽下第二叶;而老叶为茶枝下部去年成叶(比新叶硬、色深)。针扎损伤是利用 2 号昆虫针从茶树叶片背面

穿刺,损伤程度分3级,即:轻度损伤为10针/叶;中度损伤为30针/叶;重度损伤为90针/叶。磨损损伤是利用2号磨砂纸,磨损茶树叶片背面,损伤程度分3级,即:轻度损伤为磨损面积 $20\text{mm}^2$ /叶;中度损伤为磨损面积 $75\text{mm}^2$ /叶;重度损伤为磨损面积 $240\text{mm}^2$ /叶。叶片摘下后立刻进行处理,所有操作在30s内完成。处理完毕的叶片立即放入玻璃瓶中,密闭4min。密闭完毕后,将两根zNose<sup>TM</sup>进气针通过Teflon垫片同时插入玻璃瓶中(一根连接zNose<sup>TM</sup>采样头,另一根作为进气口),立即开始采样,泵吸10s(流量 $30\text{ml}/\text{min}$ )。3种程度针扎损伤新叶各重复5次;3种程度磨损损伤新叶各重复8次。对老叶只施以中度的针扎损伤和中度的磨损损伤,各重复8次。每株茶苗只使用1次。

选取芽下第二叶,摘下后立刻施以60针/叶的损伤处理,操作在30s内完成。然后分立即放入玻璃瓶中,敞开放置2、4、6、8、10、12、16、20、24min后放入玻璃瓶中。密闭2min后,同上利用zNose<sup>TM</sup>对瓶中物质进行分析,泵吸时间为40s。每个时间点重复10次,每株茶苗使用1次。

针扎损伤试验、磨损损伤试验以及机械损伤后绿叶气味物质释放的时间动态试验均以未受损茶树叶片为对照,并分别在一次开机内完成。

## 1.4 数据分析

通过GC-MS或zNose<sup>TM</sup>校准曲线测得茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物中顺-3-己烯醇、苯乙腈、吡啶、反-石竹烯的量分别按其占4种物质总量的比例,即相对含量计算,采用SAS 8.02统计软件Two Sample *T* Test分析;机械损伤后新老叶释放的3种绿叶气味物质的量分别采用SAS 8.02统计软件进行Two Sample *T* Test分析;轻、中、重度机械损伤后,新叶释放的3种绿叶气味物质的量分别采用SAS 8.02统计软件进行Duncan式多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GC-MS与zNose<sup>TM</sup>对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物的分析比较

与对照相比,100头茶尺蠖危害52h后,被害茶苗释放了大量正常茶苗不能释放的物质。利用GC-MS共从中鉴定出16种新产生的物质,分别是:4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯、苯甲醇、反- $\beta$ -罗勒烯、芳樟醇、反-4,8-二甲基-壬三烯、苯乙腈、顺-丁酸-3-己烯酯、顺-2-甲基丁酸-3-己烯酯、吡啶、顺-己酸-3-己烯酯、反-石竹烯、(反)- $\beta$ -法尼烯、(反,反)- $\alpha$ -法尼烯、反-橙花叔醇(图1)。通过与对照相比,zNose<sup>TM</sup>共检测出17种新生物质(图1),经比对GC-MS结果或标准品保留时间从中鉴定出16种物质(同上)。

zNose<sup>TM</sup>检测器SAW的响应值与被测物质的量呈线形关系,如本实验中顺-3-己烯醇( $R^2 = 0.9825$ )、苯乙腈( $R^2 = 0.9861$ )、吡啶( $R^2 = 0.9832$ )、(反)-石竹烯( $R^2 = 0.9939$ )(图2),依此zNose<sup>TM</sup>可对被测物质进行定量分析。但是SAW对不同物质的反应是不一样的,如低沸点的顺-3-己烯醇其校准曲线斜率为415.2,而高沸点的(反)-石竹烯其校准曲线斜率为11015,两者相差较大(图3A,B)。

由图3看出,通过GC-MS与zNose<sup>TM</sup>测得的茶尺蠖危害后茶苗挥发物中顺-3-己烯醇、苯乙腈、吡啶、(反)-石竹烯4种物质的相对含量有较大差异。除(反)-石竹烯外,两种仪器测得的其它3种物质的相对含量均有显著差异。但是无论GC-MS还是zNose<sup>TM</sup>的分析结果均显示,4种物质中顺-3-己烯醇所占比例都为最大(分别为62.29%、81.91%),其次为苯乙腈(分别为32.88%、7.52%)、吡啶(分别为3.68%、5.41%),最小为(反)-石竹烯(分别为1.15%、5.16%)。

### 2.2 茶树叶片机械损伤后绿叶气味物质的释放

通过与GC-MS对茶尺蠖取食诱导茶树挥发物的定性分析结果或标准品的保留时间比对,与未受损叶片相比,磨损与针扎后茶树叶片大量释放的物质主要有4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯。其中顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯的鉴定是通过比对GC-MS对茶尺蠖取食诱导茶树挥发物的定性分析结果和标准品的保留时间,而4-甲基-3-戊烯醛的鉴定仅是通过比对GC-MS对茶尺蠖取食诱导茶树挥发物的定性分析结果。这3种物质都是植物遭受机械损伤后能够立即释放的绿叶气味物质<sup>[12,13]</sup>。

无论磨损损伤还是针扎损伤,当对新叶施以重度的机械损伤后,4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯

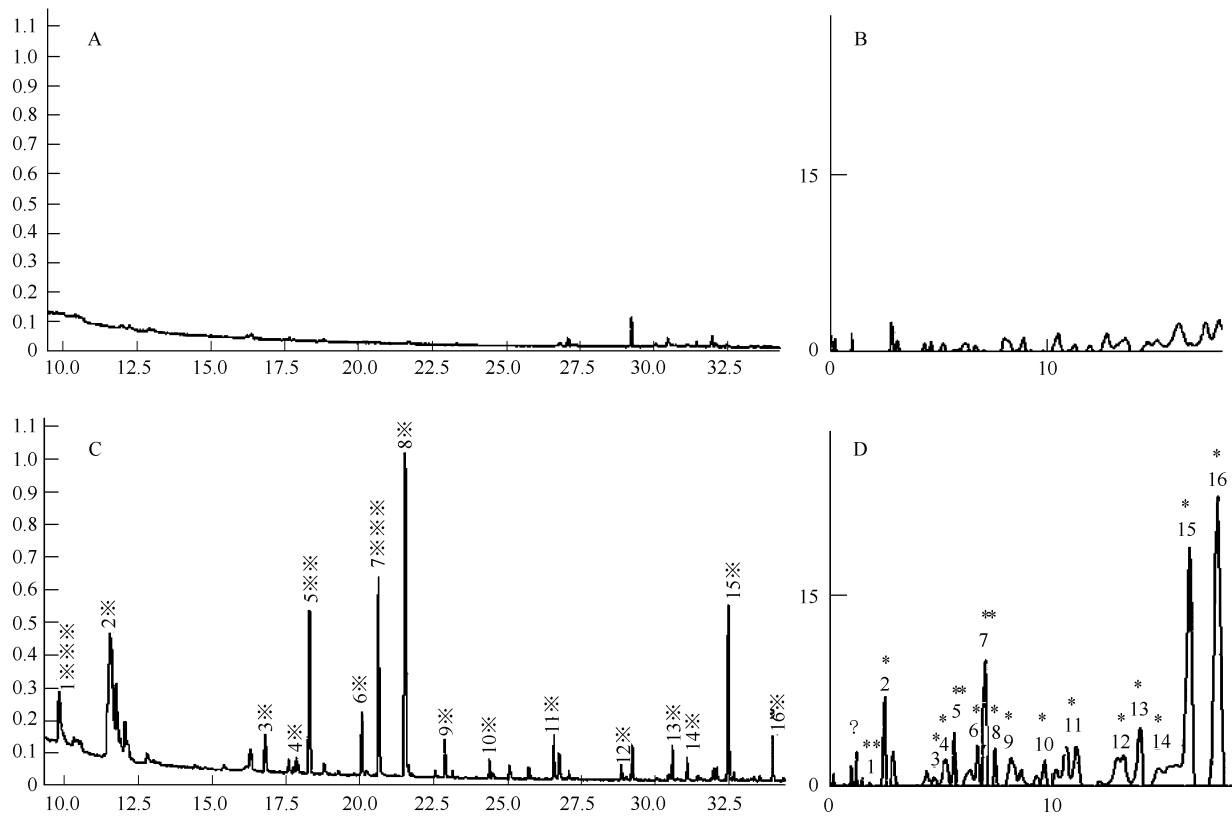


图1 GC-MS与zNose™对茶尺蠖危害后茶树挥发物的定性分析比较

Fig. 1 The comparison on the qualitative analysis of the volatiles emitted from tea plants infested by *Ectropis obliqua* Prout with GC-MS or zNose™  
A:正常茶苗挥发物的GC-MS气相色谱图 The GC-MS chromatogram of volatiles emitted from healthy tea plant; B:正常茶苗挥发物的zNose™气相色谱图 The zNose™ chromatogram of volatiles emitted from healthy tea plant; C:茶尺蠖危害52h后茶苗挥发物的GC-MS气相色谱图 The GC-MS chromatogram of volatiles emitted from tea plants damaged by *Ectropis obliqua* Prout after 52 h; D:茶尺蠖危害52h后茶苗挥发物的zNose™气相色谱图 The zNose™ chromatogram of volatiles emitted from tea plants damaged by *Ectropis obliqua* Prout after 52 h

?:未知 Unknown; 1:4-甲基-3-戊烯醛 4-methyl-3-pentenal; 2:顺-3-己烯醇(Z)-3-hexen-1-ol; 3:顺-3-己烯醇醋酸酯(Z)-3-hexen-1-ol, acetate; 4:苯甲醇 benzyl alcohol; 5:反-β-罗勒烯(E)-β-ocimene; 6:芳樟醇 linalool; 7:反-4,8-二甲基-壬三烯(E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT); 8:苯乙腈 benzyl nitrile; 9:顺-丁酸-3-己烯酯(Z)-3-hexenyl butyrate; 10:顺-2-甲基丁酸-3-己烯酯(Z)-3-hexenyl 2-methylbutyrate; 11:吲哚 indole; 12:顺-己酸-3-己烯酯(Z)-3-hexenyl hexanoate; 13:反-石竹烯(E)-caryophyllene; 14:(反)-β-法尼烯(E)-β-farnesene; 15:(反,反)-α-法尼烯(E,E)-α-farnesene; 16:反-橙花叔醇(E)-nerolidol

※表示物质鉴定是通过比对标准品的质谱图与保留时间,※※表示物质鉴定是通过比对标准品的质谱图与考瓦斯指数<sup>[10]</sup>,※※※表示物质鉴定是通过比对质谱图(来源于NIST库或文献<sup>[11]</sup>); \*表示物质鉴定是通过比对GC-MS结果和标准品保留时间, \* \*表示物质鉴定是通过比对GC-MS结果 ※ As determined by fragmentation pattern (mass spectrometry) and retention time of authentic standards, ※※ as determined by fragmentation pattern (mass spectrometry) and Kovats indices<sup>[10]</sup>, ※※※ as determined by fragmentation pattern (mass spectrometry) from the library of NIST or the reference<sup>[11]</sup>; \* as determined by the result of GC-MS and retention time of authentic standards, \* \* as determined by the result of GC-MS

醇醋酸酯的释放量都显著大于中度损伤;针扎损伤后顺-3-己烯醇醋酸酯的释放除外,施以中度的损伤后这3种物质的释放量都显著大于轻度损伤(图4)。

对新叶、老叶施以中度的“磨损”损伤后,新叶顺-3-己烯醇醋酸酯的释放量明显高于老叶,而其它两种物质的释放量新叶老叶无差异;对新叶、老叶施以中度的“针扎”损伤后,新叶4-甲基-3-戊烯醛的释放量明显低于老叶,而顺-3-己烯醇醋酸酯的释放量明显高于老叶,顺-3-己烯醇的释放量两者无明显差别(图4)。

当对芽下第二叶施以60针/叶的机械损伤后,损伤叶在2min内即能释放4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、

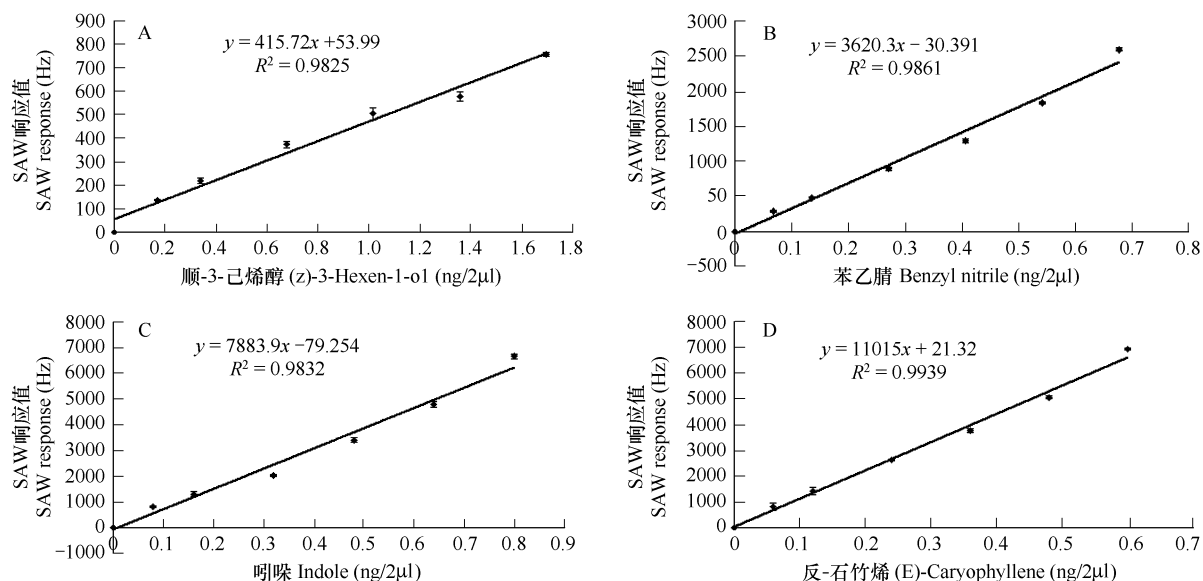


图2 4种物质的zNose™校准曲线

Fig. 2 Calibration about 4 volatiles of the zNose™

A: 顺-3-己烯醇 (Z)-3-Hexen-1-ol; B: 苯乙腈 benzyl nitrile; C: 吲哚 indole; D: (反)-石竹烯 (E)-caryophyllene

图中数据为平均数 ± 标准误 The data in the figure were mean ± SE

顺-3-己烯醇醋酸酯。4-甲基-3-戊烯醛在损伤后立刻到达释放高峰,随后其释放量逐渐降低;顺-3-己烯醇在损伤后 6min 到达释放高峰;而顺-3-己烯醇醋酸酯在损伤后 10min 才到达释放高峰。这 3 种物质的释放量在损伤后 26min 即可下降到几乎检测不到的水平(图 5)。

### 3 讨论

#### 3.1 GC-MS 与 zNose™ 对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物的分析比较

尽管本试验中 zNose™ 采集的气体量仅为 20ml、其色谱柱仅 1m 长,但由于其检测器的高灵敏性以及采用了柱上控温技术,所以其对茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物的定性分结果与 GC-MS 差别不大。但 GC-MS 未能检出 zNose™ 检出的未知化合物,这可能是由于该物质的色谱峰被溶剂峰所覆盖,因此需结合 SPME-GC-MS 等技术做更加细致的分析。GC-MS 与 zNose™ 测定茶尺蠖取食诱导的茶树挥发物中 4 种组分的相对含量有一定差异,这可能与两种方法所用吸附剂不同,采样时间的长短不一致以及两种仪器的检测器检测原理不同所致。

#### 3.2 机械损伤与绿叶气味物质的释放

HIPVs 的释放主要由两方面引起,一方面由植食性昆虫取食造成的机械损伤引起,主要产生绿叶气味;而另一方面则涉及到植食性昆虫口腔分泌物中诱导物对植物次生代谢途径的调控,以及植物体内复杂的信号传递途径<sup>[14]</sup>。本实验通过两种方式进行机械损伤,即磨损、针扎,其目的是模仿茶尺蠖低龄幼虫和假眼小绿叶

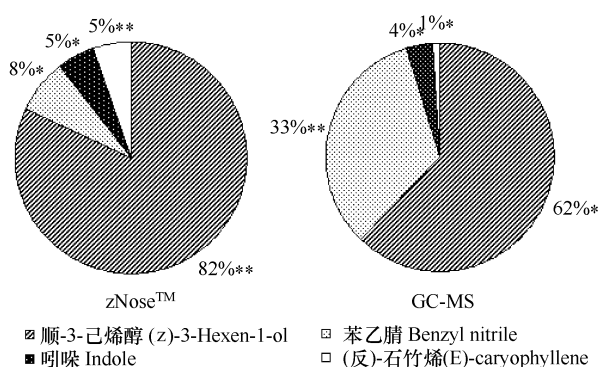


图3 GC-MS 与 zNose™ 测得的茶尺蠖危害后茶树挥发物中顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、(反)-石竹烯 4 种物质相对含量的比较

Fig. 3 The comparison on the relative contents of (Z)-3-hexen-1-ol, benzyl nitrile, indole and (E)-caryophyllene from tea plants from infested by *Ectropis obliqua* Prout analyzed with GC-MS and zNose™ 图中数据为顺-3-己烯醇、苯乙腈、吲哚、(反)-石竹烯相对含量的平均数;\*,\*表示同一物质的相对含量在不同测定方法间差异不显著( $P > 0.05$ , T 测验) The data in the figure were mean about the relative contents of (Z)-3-Hexen-1-ol, benzyl nitrile, indole and (E)-caryophyllene, those in the same volatile followed by \*,\* between different measures meant no significant difference at 0.05 level by Two Sample T Test

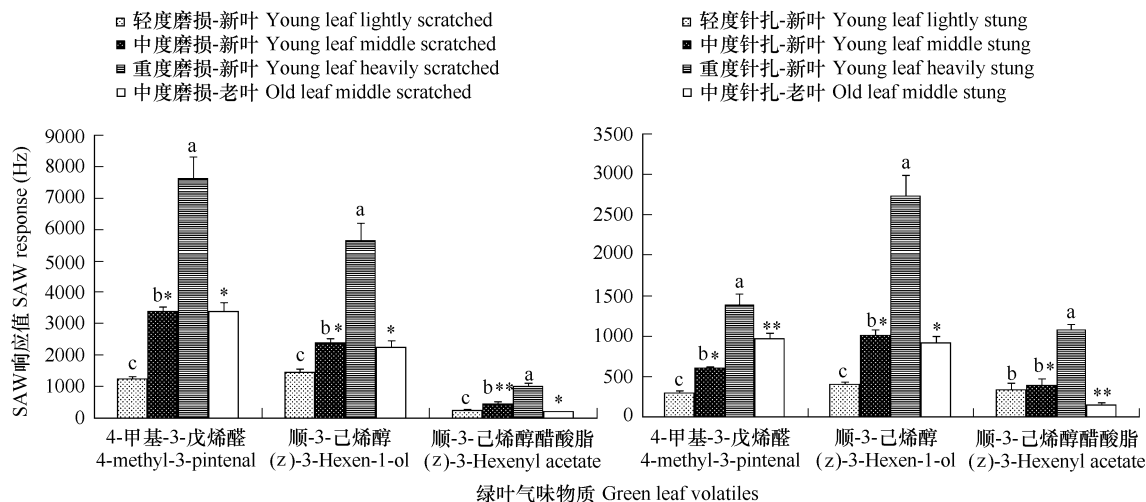


图4 不同程度机械损伤后茶叶叶片3种绿叶气味物质(4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯)的释放量比较

Fig. 4 Change in the amounts of 4-methyl-3-pentenal, (Z)-3-hexen-1-ol and (Z)-3-hexenyl acetate produced by tea leaves wounded mechanically with different degrees

图中数据为平均数 + 标准误, 相同字母表示同一物质在不同处理间差异不显著 ( $P > 0.05$ , 新复极差法); \*, \* 表示同一物质在两处理间差异不显著 ( $P > 0.05$ ,  $T$  检验) The data in the figure were mean + SE, and those in the same volatile followed by the same letters between different treatments meant no significant difference at 0.05 level by Duancan's multiple range test, those in the same volatile followed by \*, \* between two treatments meant no significant difference at 0.05 level by Two Sample  $T$  Test

蝉 (*Empoasca vitis*) 取食所造成的机械损伤。但是假眼小绿叶蝉取食茶苗后, 通过顶空采样并结合 GC-MS 未检测到 4-甲基-3-戊烯醛的释放 (未发表数据), 与针扎损伤的诱导结果相矛盾。这可能是因为针扎损伤时所用 2 号昆虫针相对假眼小绿叶蝉的口针还是要大很多, 因此它对茶叶叶片造成的损伤也要比假眼小绿叶蝉取食造成的损伤大。

机械损伤后, 植物细胞破裂, 其质膜上的亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸等脂肪酸游离到细胞质中, 经脂氧合酶、过氧化物裂解酶等催化形成绿叶气味物质<sup>[15]</sup>。研究表明机械损伤的程度越大, 绿叶气味物质的释放量也越大<sup>[16]</sup>, 这与本试验结果一致。新、老叶在遭受机械损伤后, 3 种绿叶气味物质的释放不完全相同, 可能与新、老叶的生理、生化存在差异有关。这些绿叶气味物质在损伤后, 可立即释放。如: 拟南芥叶片破损后 20s 就能可产生 (顺)-3-己烯醛<sup>[17]</sup>; 但相对己烯醇、己烯醛, (顺)-己烯基乙酸酯的释放放相对较慢。玉米、棉花等植物遭到损伤后几个小时才可释放 (顺)-己烯基乙酸酯<sup>[18~20]</sup>。而本试验发现茶叶叶片在遭受机械损伤后 2min, 不但可释放 4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇, 还可释放顺-3-己烯醇醋酸酯。这可能是不同植物间的生理、生化等差异造成。而茶叶叶片损伤后 3 种绿叶气味物质释放的高峰期不同, 则可能是由其前体物、以及合成途径不同造成。

### 3.3 zNose™ 在植物挥发物分析中的应用前景

应用 GC-MS 结合顶空采样对植物挥发物进行分析时, 从吸附柱或 SPME 的预处理到采样再到仪器分析

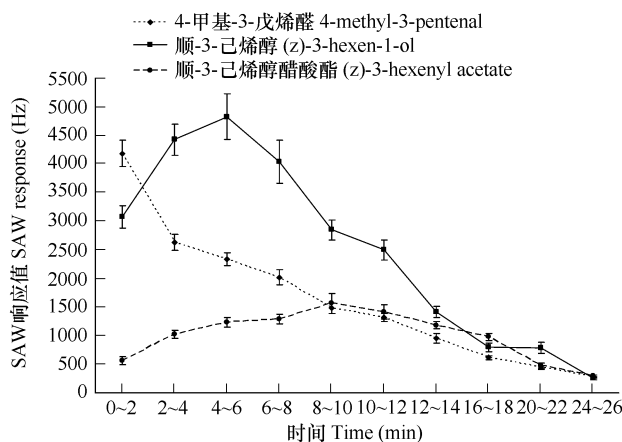


图5 茶叶叶片针扎损伤后 4-甲基-3-戊烯醛、顺-3-己烯醇、顺-3-己烯醇醋酸酯的释放时间动态

Fig. 5 Monitoring of 4-methyl-3-pentenal, (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-3-hexen-1-ol, acetate emission from tea leaves stung with the zNose™ 图中数据为平均数 ± 标准误 The data in the figure were mean ± SE

一般需数小时,因此耗费了大量的时间与劳力。而 zNose<sup>TM</sup>与 GC-MS 不同,其本身可直接进行顶空采样。它通过一个内置的泵将待测的植物挥发物吸附在内置的 Tenax 吸附柱上,然后立即热解吸,再由载气将样品送进特制的色谱柱(长度为 1m)进行快速分离。因此 zNose<sup>TM</sup>处理一个样品只需 1~2min,这与常规分析方法相比极大的节省了时间与劳力。但同时由于其自身构造的特点(采样头的上部有一排热风扇),以及进样量少(一次泵吸不宜超过 1min,每次采集气体最多为 30ml)。所以笔者认为应用 zNose<sup>TM</sup>分析植物挥发物时,最好将待测植物置于容积较小的密闭容器中,然后直接连接 zNose<sup>TM</sup>进行分析;或通过吸附柱先将待测植物挥发物浓缩,再将吸附柱与 zNose<sup>TM</sup>连接,由吸附柱加热器热解析后,再采样分析。

由于 zNose<sup>TM</sup>实际上是一台集采样、分析于一体的 GC,因此它不能像 GC-MS 那样通过质谱图和保留时间的配合进行定性分析。并且由于某些化学标准品很难获得以及很多物质的保留时间十分接近甚至相同,所以不适合直接应用 zNose<sup>TM</sup>对未知样品进行定性分析。但是通过比对 GC-MS 对未知样品的分析结果并结合化学标准品的保留时间,就可对 zNose<sup>TM</sup>分析未知样品所得到的色谱图中各个色谱峰进行准确的定性翻译。

应用 GC-MS 对样品进行定量分析时,可选用归一化法、内标法、标准曲线法等方法。但由于 zNose<sup>TM</sup>的检测器——SAW 检测器——是一个高频石英共鸣器,其对不同物质的定量范围可能会相差很大,即同一响应值所对应的不同物质的量可能会相差很多。例如:当 SAW 温度为 40℃时,对低沸点的顺-3-己烯醇醋酸酯的定量范围为 1~40ng;而对高沸点的石竹烯的定量范围为 0.1~5ng<sup>[4]</sup>。本试验中 4 种物质的 zNose<sup>TM</sup>校准曲线,也反映出 SAW 的这一特性。因此应用 zNose<sup>TM</sup>进行定量分析时只适合使用标准曲线法,并且由此它只能对样品中已拥有标准品的组分进行定量分析。此外 SAW 的温度会影响其定量分析的结果。Kunert 等人的研究结果显示,当 SAW 的温度较低时,物质在其上停留时间较长,从而提高其敏感性;而当 SAW 的温度较高时,物质在其上停留时间缩短,从而降低其敏感性,但此时被测物质的可定量的范围将变大<sup>[4]</sup>。因此应用 zNose<sup>TM</sup>定量分析时,应根据实际情况设定 SAW 的温度。zNose<sup>TM</sup>的校准曲线一般是通过其附件——3100 样品解析仪——制作,但是其操作相对较繁琐,不适合在野外操作。而本试验中的校准曲线是在常温下通过顶空采集气化的标准品溶液获得。其操作相对简便,便于在田间实施。但此方法不适合分析高沸点的物质,如:反-橙花叔醇(数据未给出)。

综上,尽管 zNose<sup>TM</sup>有其自身不足之处,但其采样时间短、快速分析,可携带等优势还是传统的分析方法所不能比拟的。因此可运用 zNose<sup>TM</sup>对机械损伤后绿叶气味物质的快速释放进行实时分析以及多角度地(如:时间、空间等)对已知 HIPVs 的释放进行监测。

## References:

- [1] D'Alessandro M, Turlings T C J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *The Royal Society of Chemistry*, 2006, 131, 24–32.
- [2] Heil M. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 2008, 178 (1), 41–61.
- [3] Tholl D, Boland W, Hansel A, *et al.* Practical approaches to plant volatiles analysis. *The Plant Journal*, 2006, 45, 540–560.
- [4] Kunert M, Biedermann A, Koch T, *et al.* Ultrafast sampling and analysis of plant volatiles by a hand-held miniaturized GC with pre-concentration unit; Kinetic and quantitative aspects of plant volatile production. *Journal of Separation Science*, 2002, 25, 677–684.
- [5] Pettersson E M, Boland W. Potential parasitoid attractants, volatile composition throughout a bark beetle attack. *Chemoecology*, 2003, 13, 27–37.
- [6] Schwartzberg E G, Kunter G, Stephan C. Real-Time Analysis of Alarm Pheromone Emission by the Pea Aphid (*Acyrtosiphon Pisum*) Under Predation. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34, 76–81.
- [7] D'Auria J C, Pichersky E, Schaub A, *et al.* Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2007, 49, 194–207.
- [8] Halitschke R, Baldwin I. Antisense LOX expression increase herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuate*. *The Plant Journal*, 2003, 36, 794–807.
- [9] Arimura G, Kpke S, Kunert M, *et al.* Effects of feeding *spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. *Plant Physiology*, 2008, 146, 965–973.



- [10] Adams R T. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation, 2004. 87.
- [11] Degenhardt J, Gershenzon J. Demonstration and characterization of (*E*)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (*3E*)-4,8-1,3,7-nonatriene biosynthesis. *Planta*, 2000, 210, 815—822.
- [12] Arimura G, Kost C, Boland W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1734, 91—111.
- [13] Njagi P G N, Torto B. Responses of nymphs of desert locust, *Schistocerca gregaria* to volatile of plants used as rearing diet. *Chemoecology*, 1996, 7, 172—178.
- [14] Lou Y G, Chen J An. Herbivore-induced plant volatiles: primary characteristics, ecological functions and its release mechanism. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, 20 (6), 1097—1106.
- [15] Farag M A, Par P W. C6-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry*, 2002, 61, 545—554.
- [16] Mith fer A, Wanner G, Boland W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology*, 2005, 137 (3), 1160—1168.
- [17] Matsui K, Kurishita S, Hisamitsu A, *et al.* A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28, 857—860.
- [18] Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, *et al.* Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 2000, 406, 512—515.
- [19] Turlings T C J, Loughrin J H, McCall P J, *et al.* How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of National Academy Science of the United States America*, 1995, 92, 4169—4174.
- [20] Röse U S R, Tumlinson J H. Volatiles released from cotton plants in response to *Helicoverpa zea* feeding damage on cotton flower buds. *Planta*, 2004, 218, 824—832.

#### 参考文献:

- [14] 娄永根, 程家安. 虫害诱导的植物挥发物:基本特性、生态学功能及释放机制. *生态学报*, 2000, 20(6), 1097~1106.