

华山松大小蠹的入侵对华山松挥发物成分的影响

张蕾蕾,陈 辉*,陈 霞

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:采用气质联动技术对秦岭林区华山松健康木、枯萎木针叶、树脂和韧皮部组织内挥发性物质的组成、含量和生物活性进行了分析。结果表明:华山松针叶、树脂和韧皮部组织内的挥发性成分主要由单萜、倍半萜和二萜组成,其中以 α -蒎烯、 β -蒎烯、乙酸-龙脑酯、 β -石竹烯、 α -石竹烯、 α -杜松醇、异杜松醇、萜烯醇、杜松二烯为主;华山松针叶、树脂、韧皮部组织内挥发性物质在组成和含量上均有差异,其中以针叶中挥发性物质成分最丰富,其次是韧皮部组织,而树脂的成分则更纯;同时华山松健康木与枯萎木间挥发性物质的种类和含量也具有明显差异。

关键词:华山松;华山松大小蠹;挥发性物质;GC/MS

中图分类号: S736.38 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2011)02-0114-05

Effect of *Dendroctonus armandi* Infection on the Volatile Constituents of *Pinus armandi* in Qinling Mountains

ZHANG Lei-lei, CHEN Hui*, CHEN Xia

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, volatile compounds were extracted from the different infected stages of Chinese white pine (*Pinus armandi*) needle, resin and phloem in Qinling forest ecosystem by steam distillation. Constituents of the volatile were identified by GC-MS. The major compounds were monoterpenoids, sesquiterpenoids and diterpenoids, of which α -pinene, β -pinene, bomyl acetate, β -caryophyllene, α -caryophyllene, α -cadinol, tau-cadinol, spathulenol, epi-bicyclosesquiphellandrene were dominant compounds. Moreover, the volatile constituents and contents were significant different at needles, resin and phloem of Chinese white pine, and the diversity of volatile constituents was obvious high than needle and resin. On the other hand, there were significant difference both in volatile compounds and constituents between healthy trees and infected trees.

Key words: *Pinus armandi*; *Dendroctonus armandi*; volatile materials; GC/MS

华山松(*Pinus armandii*)是我国秦岭巴山林区森林生态系统的主要构成树种,集中分布于海拔1 600~2 200 m的中山地带,多与牛皮桦、红桦、锐齿栎、辽东栎、油松等树种以点片状构成松桦、松栎混交林。同时华山松在秦岭巴山林区生长速度和材质优于油松,而且具有良好的天然更新能力。为此,华山松也被选择为我国长江中上游、西北和华北地

区的主要造林树种。然而,自1932年至今秦岭巴山林区的健康华山松持续遭受华山松大小蠹(*Dendroctonus armandi*)的危害,导致30 a以上健康华山松的大量死亡,直接影响秦岭森林生态系统的稳定性和可持续发展^[1-2]。众多研究表明树脂和树脂的流动性是针叶树木抵御小蠹虫和蓝变真菌入侵危害重要的抗性,特别是针叶树木在小蠹虫和蓝变真

收稿日期:2010-03-22 修回日期:2010-04-23

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30730073);教育部博士点基金(200807120013)。

作者简介:张蕾蕾,女,在读硕士研究生,研究方向:森林保护。

* 通讯作者:陈 辉,男,博士,教授,主要从事森林昆虫学的教学与研究。

菌的诱导下合成诱导性树脂(induced resin)或愈伤性流脂(traumatic resinosis)抵御小蠹虫和真菌在韧皮部和木质部组织内的发育^[3-8]。同时针叶树木以树脂为主的挥发性物质(单萜、倍半萜和二萜)是小蠹虫识别和选择寄主树木的主要化学信号,并且小蠹虫能够充分利用寄主树木萜烯类挥发性化合物合成自身聚集信息素,以及在小蠹虫和共生真菌的作用下合成抗聚集信息素和告警信息素,以达到对寄主树木韧皮部和木质部组织内种群数量的调节^[9-11]。充分利用华山松大小蠹对寄主华山松挥发性物质的定向选择性行为,以降低秦岭巴山林区华山松大小蠹种群数量为目标,实施华山松大小蠹的行为调控,已成为控制华山松大小蠹种群数量和危害范围的有效措施。

本研究应用水蒸气蒸馏法和气相色谱-质谱-计算机联动技术,研究秦岭华山松针叶、松脂和树皮组织内挥发性代谢物质的组成与含量,揭示华山松大小蠹和共生真菌的入侵危害对华山松挥发性物质代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 华山松挥发性物质的提取

2008 年 4 月和 9 月分别在西北农林科技大学秦岭火地塘林区和太白林区采集选择 30 a 以上华山松健康木和枯萎木,自树冠上中下东西南北 12 个方位采集针叶;在华山松健康木、枯萎木和枯立木胸径处采集韧皮部组织和木质部边材组织;在健康华山松胸径处用具塞试管采集华山松松脂,密封装入冰壶内进行室内分析。

将华山松针叶(粉碎成 2~3 mm 小段)、华山松韧皮部(粉碎成 1 cm³ 小块)和华山松松脂分别装入圆底烧瓶中,加 500 mL 水,在 100 V 的电压下加热进行水蒸气蒸馏 6 h,然后用乙醚萃取馏出液 3 次,无水硫酸钠干燥乙醚萃取液,放置过夜,低温浓缩挥发出乙醚,得到无色透明油状华山松挥发性物质混合物。

1.2 华山松挥发性物质气相色谱-质谱测定

1.2.1 气相色谱条件 型号 6890N,气化室温度 250 ℃,高纯 He(99.999 %)载气,载气流速 1.2 mL·min⁻¹,线速度 40 cm·s⁻¹。美国 J&W. DB-5,30 m×0.25 mm×0.25 μm 弹性石英毛细柱,40 ℃恒温 4 min,以 4 ℃·min⁻¹的升温速率由 40 ℃程序升温至 290 ℃,恒温 20 min。

1.2.2 质谱条件 5973N 四极杆质谱仪,EI 离子

泵,离子源温度 230 ℃,离子源电离能 70 eV,四极杆温度 150 ℃,质量扫描范围 30~500 AMU,用美国 NIST02L 库进行谱库分析。

1.3 数据分析

采用毛细管气相色谱分离挥发性成分^[12]。通过 HP59970C 化学站数据处理系统,利用色谱峰面积归一化法,测得各化学组分在挥发油中的百分含量,再经 GC-MS 测定,运用 NIST 质谱数据库进行自动检索、解析,确认其化学成分,并在计算机检索的基础上进行人工识别和判读^[13]。

1.4 华山松挥发性物质生物引诱活性测定

采用 Y 型玻璃管测定各个挥发油的生物活性,在 Y 型玻璃管的上端一边通过乳胶管与挥发性物质连接,另一边与空气相通,下端放待测试的小蠹虫。引诱 30 min,用正己烷作对照,重复 3 次,观察小蠹虫的选择或驱避行为反应。

2 结果与分析

2.1 华山松挥发性物质成分

对华山松健康木、枯萎木针叶,华山松健康木、枯萎木和枯立木韧皮部组织和木质部边材组织,以及健康华山松松脂挥发性物质的总离子流分析,分别从健康木针叶、枯萎木针叶、健康木松脂、健康木韧皮部和枯萎木韧皮部检测和鉴定出 76、56、47、85 和 71 种化合物。在所有鉴定出的物质中单萜和倍半萜的数量种类最多,占总挥发性物质的 78% 以上。其中单萜、倍半萜和二萜的含量在健康木针叶、枯萎木针叶、健康木松脂和健康木韧皮部中分别为 6.91 %、71.95 %和 0.51 %,7.63 %、64.85 %和 0.13 %,94.68 %、1.72 %和 0.10 %,70.92 %、9.26 %和 0.60 %,26.78 %、2.92 %和 0.15 %。

从华山松健康木与枯萎木针叶、健康木和枯萎木韧皮部组织挥发性物质的比较可以看出,挥发物成分基本相同主要包括单萜类(α-蒎烯、β-蒎烯、Δ3-蒎烯等)、倍半萜类(衣兰烯、β-石竹烯、α-石竹烯、杜松二烯等)、二萜类(西柏四烯、海松二烯)等。但也存在一些化学物质种类与含量的变化,如在健康华山松针叶和韧皮部组织中只含有 α-蒎烯、β-蒎烯、Δ3-蒎烯,不含有 1S-α-蒎烯、1R-α-蒎烯、1S-β-蒎烯、1R-β-蒎烯等,并且其含量也不相同,其中健康木挥发性物质 α-蒎烯、β-蒎烯、Δ3-蒎烯、D-苧烯、莰烯的含量分别为 4.27、0.33、0.02、1.00 和 0.44,而枯萎木针叶中挥发性物质 1S-α-蒎烯、1R-α-蒎烯、莰烯、1S-β-蒎烯、1R-β-蒎烯、Δ3-蒎烯、D-苧烯的含量分别

为 0.05、5.07、0.45、0.41、0.60、0.04 和 0.73(表 1)。

表 1 华山松健康木和枯萎木主要萜烯类化合物的相对含量

化合物	Table 1 Mainly terpenoids in needles,resin and phloem of <i>P. armandi</i>			
	健康木 针叶	枯萎木 针叶	健康木 松脂	健康木 韧皮部
α-Pinene	4.27	—	—	37.6
Camphene	0.44	0.45	0.75	1.29
β-Pinene	0.33	—	39.27	3.07
1R-α-Pinene	—	5.07	52.39	—
β-Myrcene	0.37	—	0.64	10.17
1S-β-Pinene	—	0.41	—	—
D-Limonene	1.00	0.73	—	17.69
γ-Elementene	0.10	—	—	—
β-Caryophyllene	29.09	—	—	0.60
Cadinene	26.10	28.61	0.38	3.73
α-Caryophyllene	5.34	3.93	0.01	—

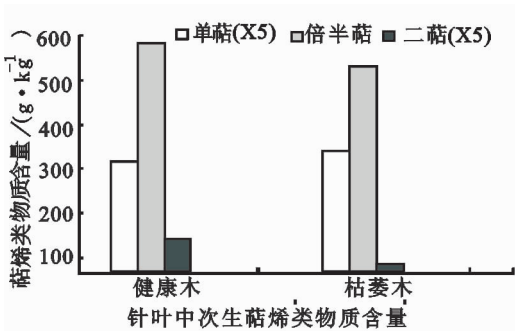


图 1 华山松不同阶段针叶和韧皮部组织内挥发性萜类物质含量差异

Fig. 1 Variation of terpenes contents in needles and phloem of healthy and different infected stages of *P. armandi*

2.3 华山松挥发性物质对华山松大小蠹的引诱活性

应用华山松健康木和枯萎木针叶、树脂和韧皮部内挥发性物质混合提取液对华山松大小蠹成虫的引诱反应测定结果表明,华山松针叶、树脂和韧皮部组织内的挥发性物质对华山松大小蠹成虫均具有明显的引诱活性,其中以树脂内挥发性物质对华山松

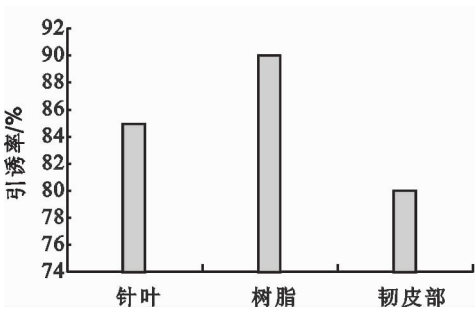


图 2 华山松挥发性物质对华山松大小蠹的引诱活性

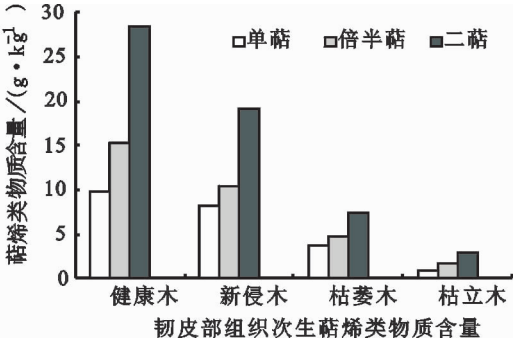
Fig. 2 Trapped activities of volatile compounds from Chinese white pine to adult of *D. armandi*

3 结论与讨论

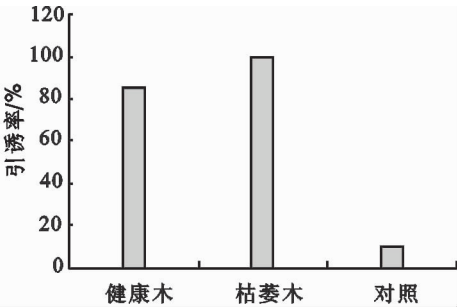
秦岭森林生态系统内的华山松对华山松大小蠹

2.2 不同健康状况华山松次生代谢物质差异

从图 1 中可以看出,随着华山松大小蠹和共生真菌的危害华山松从健康木—枯萎木—枯立木的过程中,针叶和韧皮部组织内挥发性物质中倍半萜、二萜含量呈下降趋势,而且在枯萎木针叶和韧皮部组织内中明显少了β-香叶烯、龙脑、茴香醚及其衍生物和一些桥环烯烃,但β-石竹烯的含量反而增加了28%。这与华山松大小蠹携带蓝变真菌 *Lep-tographium qinlingensis* 入侵健康华山松,并迅速在寄主华山松韧皮部和木质部边材组织树脂道和细胞内扩散,分解寄主树木树脂道泌脂细胞,并同时利用寄主树木挥发性物质合成聚集信息素有关;也与华山松大小蠹利用寄主树木挥发性萜烯类物质合成自身信息素,以及华山松大小蠹和共生真菌诱导健康华山松产生诱导性或愈伤性树脂有关。



大小蠹的引诱活性最高,而韧皮部的引诱活性最低;华山松健康木与枯萎木挥发性物质对华山松大小蠹也均具有引诱活性的生物活性或华山松大小蠹对华山松具有明显的行为敏感性,其中华山松枯萎木挥发性物质的引诱活性较高,达到 100%,而健康的华山松挥发性物质的引诱活性为 85%(图 2)。



具有较强的引诱活性,能够引诱华山松大小蠹的入侵危害,也就是说华山松大小蠹对森林生态系统内的华山松挥发性物质的行为敏感性是华山松大小蠹

能够准确地寻找和识别 30 a 以上健康和枯萎的华山松。而在华山松大小蠹和共生真菌入侵健康华山松后,在华山松大小蠹和共生真菌的协同作用下,不仅导致健康华山松树树脂抗性迅速衰退,而且改变健康华山松萜烯类挥发性物质的组成和含量,以及有效利用寄主华山松挥发性物质合成自身聚集信息素,使被害的华山松对华山松大小蠹具有更大的引诱活性,从而造成华山松大小蠹在华山松立木上的聚集危害。这与 Amman, Paine, Byers, Whitney 提出的小蠹虫能够有效利用寄主树木分泌的挥发性化学物质马鞭烯醇合成自身聚集信息素马鞭烯酮的结果一致^[7, 9, 14]。

华山松针叶、韧皮部组织和树脂中挥发性物质的组成和含量的差异与挥发性物质的挥发能力有一定的关系。同时在华山松针叶、韧皮部组织和树脂中均出现了相同分子量的化合物,但这些化合物存在分子结构和生物功能与活性的多样性,在华山松针叶、韧皮部和树脂中出现的 6 种杜松二烯,尽管分子式、分子量相同,但每一种的保留时间和百分含量都不相同,这说明它们并非同一化合物,而是同分异构体,杜松二烯(cadindiene)能够形成众多同分异构体,类似情况也出现在二氢-咔达烯(α -calacorene)和 β -石竹烯(β -caryophyllene)等均有同分异构体化合物中,这些同分异构体对华山松大小蠹可能存在不同的活性或作用,这有待于进一步研究。

针叶树木挥发物质组成和结构的复杂性是生物多样性的组成部分,也是长期生物进化的结果,而专性昆虫与寄主树木的协同进化和对寄主树木挥发性物质的有效识别、解毒和利用则是昆虫生理生化、生态选择和赢得资源与空间竞争优势的决定性因素之一。另一方面,小蠹虫对寄主树木的识别与挥发性物质的感应也受到寄主树木挥发性物质的挥发时间与空间节律,挥发强度和森林生态系统内的林分结构,非寄主树木挥发性物质的干扰,温度、湿度和风向等生态因素的复合影响^[7, 11, 15-17]。同时,小蠹虫在寄主树木选择中触角等感觉器官起着重要的作用,尤其是华山松大小蠹成虫触角的化学感受器(毛型感受器、栓锥型感受器、锯齿型感受器等)在华山松大小蠹寄主选择、定位中起着关键作用,同时小蠹虫的摩擦等也与对异性的吸引有密切关系^[10-11, 18-19]。

参考文献:

[1] 陈辉,唐明,叶宏谋. 秦岭华山松小蠹生态位研究[J]. 林业

科学, 1999, 35(4): 40-44.
CHEN H, TANG M, YE H M. Niche of bark beetles within *Pinus armandi* ecosystem in inner Qinling Mountains [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1999, 35(4): 40-44. (in Chinese)
[2] 唐明, 陈辉. 华山松大小蠹共生真菌对寄主树木的影响[J]. 林业科学, 1999, 35(6): 63-66.
TANG M, CHEN H. Effect of symbiotic fungi of *Dendroctonus armandi* on host trees [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1999, 35(6): 63-66. (in Chinese)
[3] BERRYMAN A A, ASHRAF M. Effects of *Abies grandis* resin on the attack behavior and brood survival of *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. Canadian Entomologist, 1970, 102: 1229-1236.
[4] RAFFA K F, BERRYMAN A A. Physiological aspects of lodgepole pine wound responses to a fungal symbiont of the mountain pine beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. Canadian Entomologist, 1983. 115: 723-734.
[5] CHRISTIANSEN E, WARING R H, BERRYMAN A A. Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships [J]. Forest Ecological Management, 1987, 22: 89-106.
[6] CROISE L, LIEUTIER F. Effects of drought on the induced defense reaction of scots pine to bark beetle-associated fungi [J]. Annales Des Sciences Forestières, 1993,50: 91-97.
[7] PAINE T D, RAFFA K F, HARRINGTON T C. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers [J]. Annual Review of Entomology, 1997, 42: 179-206.
[8] FRANCESCHI V R, KROKENE P, CHRISTIANSEN E, *et al.* Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests [J]. New Phytologist, 2005, 167: 353-376.
[9] BYERS J A. Male specific conversion of the host plant compound myrcene to the pheromone (+) - ipsdienol in the bark beetle *D. brevicomis* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1982, 82: 363-372.
[10] 陈辉. 化学信息素对小蠹虫入侵危害的调控[J]. 林业科学, 2003, 39(6): 154-158.
CHEN H. The regulation on role of semiochemicals in the host selection and colonization of bark beetles [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2003, 39(6): 154-158. (in Chinese)
[11] 陈辉, 唐明, 朱长俊, 等. 华山松大小蠹和共生真菌分泌酶组成分析[J]. 林业科学, 2004,40(5): 123-126.
CHEN H, TANG M, ZHU C J, *et al.* The enzymes in the secretions of *Dendroctonus armandi* (Scolytidae) and their symbiotic fungus of *Leptographium qinlingensis*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2004. 40(5): 123-126. (in Chinese)
[12] 李浩春. 气相色谱法[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 299-304.
LI H C. Gas Chromatography [M]. Beijing: Science Press, 1987: 299-304. (in Chinese)
[13] XIANG W, LI Y Y. Analysis of volatile components from

Chimonocalamus pallens Hsueh et Yi [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2001, 20(4): 59-61.

[14] WHITNEY H S. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms [M]// MITTON J B, STURGEON K B, eds. Bark beetles in North American conifers. A system for the study of evolutionary biology. USA: University of Texas Press, 1982: 183-211.

[15] HUGHES P R, RENWICK J A A. Hormonal and host factors stimulating pheromone synthesis in female western pine beetles *D. brevicornis* [J]. Physiological Entomology, 1977 (2):289-292.

[16] 陈辉, 袁锋. 树木抗性与小蠹虫生存策略的进化[J]. 林业科学, 2002,38(5): 147-151.

CHEN H, YUAN F. Resistance of host trees and existence strategy evolution of bark beetles [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(5): 147-151. (in Chinese)

[17] 陈辉, 唐明. 华山松大小蠹共生真菌对华山松木质部危害的解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1391-1395.

CHEN H, TANG M. Microstructure of blue-stain fungi (*Leptographium terebrantis*) associated with *Dendroctonus armandi* in the xylem tissue of *Pinus armandi* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(6): 1391-1395. (in Chinese)

[18] WOOD D L. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles [J]. Annual Review of Entomology, 1982,27: 411-446.

[19] 陈辉, 李宗波, 唐明. 华山松大小蠹成虫触角感受器的扫描电镜观察[J]. 林业科学, 2006,42(11): 156-158.

CHEN H, LI Z B, TANG M. Scanning electron microscope observation on antenna of *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(11): 156-158. (in Chinese)

(上接第 85 页)

[11] 吴霞. 小陇山林区森林固碳效益的研究[J]. 西北林学院学报, 2008,23(5):164-167.

WU X. Research on forest solid carbon benefit in Xiaolongshan Forest Region[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(5):164-167. (in Chinese)

[12] 刘建福. 红千层叶片光合速率和叶绿素荧光参数日变化[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2007,29(5):95-100.

LIU J F. Diurnal changes of photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters in *Callistemon viminalis* DC [J]. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2007, 29(5): 95-100. (in Chinese)

[13] 康博文, 王得祥, 刘建军, 等. 城市不同绿地类型降温增湿效应的研究[J]. 西北林学院学报, 2005,20(2):54-56.

KANG B W, WANG D X, LIU J J, et al. The effects of reducing temperature and increasing humidity by different greenland in urban area[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(2):54-56. (in Chinese)

[14] 祝宁, 李敏, 柴一新. 哈尔滨市绿地系统生态功能分析[J]. 应用生态学报, 2002,13(9):1117-1120.

ZHU N, LI M, CHAI Y X. Ecological functions of greenland system in Harbin[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(9): 1117-1120. (in Chinese)

[15] 鲁敏, 李英杰. 绿化树种对大气金属污染物吸滞能力[J]. 城市环境与城市生态, 2003,16(1):51-52.

LU M, LI Y J. Absorption and purification ability of tree species to heaavy metal pollutants of the atmosphere[J]. Urban Environment & Urban Ecology, 2003, 16(1): 51-52. (in Chinese)

[16] 韦朝阳, 陈同斌. 重金属超富集植物及植物修复技术研究进展[J]. 生态学报, 2001,21(7):1196-1203.

WEI C Y, CHEN T B. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: a review of studies in China and abroad[J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(7): 1196-1203. (in Chinese)