

HYMENAEA 和 COPAIFERA 幼树叶内倍半萜类 化合物昼夜和季节性变化*

王锦亮

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

Jean H. Langenheim

(Department of Biology, Thimann Laboratories, University of California, Santa Cruz, CA 95064.)

摘要 运用气相色谱对在温室栽培的 *Hymenaea courbaril* 和 *Copaifera officinalis* 及 *C. pubiflora* 幼树叶内倍半萜类化合物昼夜和季节性变化进行了分析测定。*Hymenaea* 和 *Copaifera* 这二个属植物叶内具有基本相同的一组倍半萜类化合物, 对认为具有生态意义的它的主要成分: 石竹烯 (caryophyllene), α , β -瑟林烯 (selinene) 和树脂含量进行了分析统计。在三个季节和昼夜的资料中, 这二个属植物的石竹烯、 α , β -瑟林烯和树脂含量昼夜变化是很小的, 而在植株间 (遗传型) 和不同的季节里它们有明显而有意义的变化。

关键词 热带豆科树; 倍半萜; *Hymenaea*; *Copaifera*

萜类化合物在植物种内和种间的昼夜和季节性变化都为化学生态学家和化学分类学家渴望了解的。*Hymenaea* 和 *Copaifera* 是豆科相近二个属植物, 它们均起源于热带雨林, 分布于大西洋两岸 [1]。在非洲, *Hymenaea* 仅分布于东非和其邻近的岛屿, 而 *Copaifera* 仅分布于西非。在拉丁美洲它们有相同的地理分布, 仅在中美洲 *Hymenaea* 比 *Copaifera* 分布范围更北一些和还分布于墨西哥。它们的叶子、茎和果实里均含有树脂 [1—5]。在 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 全部种的植物叶子里其树脂主要由倍半萜类化合物组成, 它们的树脂组成成分基本相同 [6—7]。它们树脂中 13 种倍半萜类化合物已有 11 种成分已经被证实。

本试验是热带树脂植物的进化和生态学研究工作的一部分。我们选择了温室栽培的 *Hymenaea courbaril*, *Copaifera officinalis* 和 *C. pubiflora* 为材料, *H. courbaril* 四个种群来自于 2°S 到 23°N, *C. officinalis* 和 *C. pubiflora* 均来自 8°N。从光的昼夜和季节性变化来分析它们对植物叶内倍半萜类化合物含量的影响。鉴于以前一系列的研究工作 [8—13], 本文现只对于在这些植物中有生态意义的树脂含量和它的重要组成成分含量 (即石竹烯和 α , β -瑟林烯) 进行季节 [D]、时间 [H] 和植株 [T] 以及这些因素的相互影响 [DH]、[DT] 和 [TH] 进行了变量分析。

材 料 和 方 法

叶片样品取样于温室栽培的 *H. courbaril* (7株), *C. officinalis* (2株) 和 *C. pubiflora* (3株) 幼树, 树龄为9—16年的实生树。它们的种子分别来自 Curua Curua Una, Para (*H. courbaril*, JHL 5624); Caracas, Venezuela (*H. courbaril*, JHL 5591); Villa Colon, San Jose, Costa Rica (*H. courbaril*, JHL 5776); Aca-poneta, Nayarit, Mexico (*H. courbaril*, JHL 5558), 以及 Ciudad Bolivar, Bolivar, Venezuela (*C. officinalis*, JHL 6075); Pariaguan, Anzoatecqui, Venezuela (*C. officinalis*, JHL 6081) 和 Laguna de Los Patos, Guarico, Venezuela (*C. pubiflora* JHL 6070和 Xena 55), 植株生长在 UCSC 温室里, 它们被保持在良好的土壤水分和70%以上的空气湿度, 白天温度为26°C, 晚上温度为21°C, 在 Santa Cruz (36°50'N) 的自然光周期下。

取样时间为1984.8.16, 1984.11.19和1985.2.22, 每次从午夜0:00开始, 每隔3小时取样一次, 一昼夜内共取样8次。由于树脂成分和含量变化与叶子发育阶段有关^[9-10], 选择充分伸展和已硬化的叶子为分析材料。每次从每一植株上取叶龄相近的一片叶片, 叶片样品在室温和黑暗条件下干燥10天, 然后称重。叶片在研钵中加少量石英砂研磨, 用高纯度的戊烷(pentane)提取, 过滤, Na_2SO_4 干燥和氮气浓缩, 然后加入一定数量的四葵酸(n-tetradecane)作为内部参数标准。浓缩的提取液直接用气相色谱分析(2.5%聚乙二醇20M Gas-chrom Q, 8m×3mm柱, 120°, FID电子集成电路)。

数据分析用SAS系统在UCSC Magnusson M80电子计算机处理运算。凭证标本保存于UCSC标本室里。

结 果 和 讨 论

从表1和表2可以看出三方面全因子设计的变量分析(ANOVA)的结果。

对于 *H. courbaril* 和 *C. officinalis*/*C. pubiflora* 最大概率(P)> F 出现在植株(T), 其石竹烯含量, 瑟林烯含量和树脂含量的变化都为 $P > 0.0001$, 这表明植株(遗传型)是明显不同的。季节[D]的石竹烯、瑟林烯和树脂含量, 在 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 也都有明显而有意义的变化($P > 0.001$)。然而, 从表中看出它们的昼夜变化却是微小的, 仅仅在 *Hymenaea* 的瑟林烯和树脂含量才稍有意义的昼夜变化($P > 0.01$)。在因素间相互影响[DH], [DT]和[HT]中, [DT]的石竹烯、瑟林烯和树脂含量在 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 均有明显的变化, 在[DH]和[HT]中它们的变化都很小。

根据表1和表2结果, 我们进行了Duncan's季节和昼夜变化的复合排列试验分析。从表3也表明了仅 *H. courbaril* 的 α , β -瑟林烯和树脂含量有昼夜变化, 虽然瑟林烯含量在9:00与12:00之间的差异是微小的, 但是它们在9:00和12:00之间的变化是明显的。9:00和21:00之间其树脂含量也有显著的不同。

表 1 *H. courbaril* 四个种群的石竹烯, α , β -瑟林烯和叶内树脂含量的全因子设计的变量分析 (ANOVA). $n = 7$.

Three-way analysis of variance (ANOVA), complete factored design for caryophyllene

α , β selinene and total yield of leaves from four populations of *H. courbaril*. $n = 7$.

变量种类 source of variation	石竹烯 caryophyllen				α , β -瑟林烯 α , β selinene				树脂含量 resin yield			
	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F
季节 Data (D)	2	2.218359	10.03	0.0002	48.727432	56.08	0.001	79.54924	44.73	0.0001		
时间 Hour (H)	7	0.272018	1.23	0.3043	3.3789842	3.89	0.0037	6.2778935	3.53	0.0037		
植株 Tree (T)	16	19.772701	89.41	0.0001	46.091831	53.05	0.0001	40.375096	22.71	0.0001		
(DH)	14	0.0772231	0.35	0.9827	0.08241589	0.95	0.7758	1.2221612	0.69	0.7758		
(DT)	8	1.797757	813	0.0001	9.3812637	10.80	0.0001	15.338631	8.63	0.0001		
(HT)	42	0.123481	0.555	0.9759	0.7640836	0.88	0.8686	1.2509552	0.70	0.8786		

表 2 *C. pubiflora*/*C. officinalis* 的石竹烯, α , β -瑟林烯和叶内树脂含量的全因子设计的变量分析 (ANOVA). $n = 5$.

Three-way analysis of variance (ANOVA), complete factored design for caryophyllene

α , β selinene and total yield for *C. officinalis* and *C. pubiflora*. $n = 5$.

变量种类 source of variation	石竹烯 caryophyllene				α , β -瑟林烯 α , β selinene				树脂含量 resin yield			
	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F	平方根的平均值 mean square	F 值 F	可能性 > F 值 prob > F
季节 Data (D)	2	0.266882	30.92	0.0001	1.6871126	15.32	0.0001	3.4755977	11.93	0.0003		
时间 Hour (H)	7	0.0164415	1.90	0.1196	0.0816187	0.74	0.6403	0.3354998	1.15	0.3702		
植株 Tree (T)	4	0.7539776	87.36	0.0001	15.872858	144.16	0.0001	29.86895	102.57	0.0001		
(DH)	14	0.0088639	1.03	0.4655	0.0928231	0.84	0.6217	0.1503065	0.52	0.8969		
(DT)	3	0.3295554	38.18	0.0001	5.5054143	50.00	0.0001	16.200047	55.63	0.0001		
(HT)	28	0.0103676	1.20	0.3365	0.1209479	1.10	0.4178	0.313986	1.24	0.3083		

表3 *H. courbaril* 的石竹烯, α , β -瑟林烯和树脂含量的Duncan's 复合排列试验。(此试验是在表1中显示有意义的F比值后进行的。平均值下有横线的话则表示为无意义的差异。) Duncan's multiple range tests of diurnal changes of caryophyllene α , β selinene and total yield in *H. courbaril*. Tests were made for compounds or yield which showed significant F ratios in the 3-way ANOVA (table 1). Any means underlined by a common line are not significantly different.

毫克/克 干重 mg/g/dry wt	时 间 hours							
α , β -瑟林烯 α , β selinene	9:00 4.17	12:00 3.93	15:00 3.73	6:00 3.70	3:00 3.60	0:00 3.44	18:00 3.16	21:00 2.75
树 脂 含 量 resin yield	9:00 7.27	12:00 7.13	15:00 6.70	6:00 6.93	3:00 6.86	0:00 6.49	18:00 6.13	21:00 5.44

表4 *H. courbaril* 和 *C. pubiflora*/*C. officinalis* 的石竹烯, α , β 瑟林烯和叶内树脂含量的Duncan's 复合排列试验 (此试验是在表1和表2中显示有意义的F比值后进行的。平均值下有横线的话则表示为无意义的差异)

Duncan's multiple range tests of seasonal changes of caryophyllene, α , β -selinene and total yield in *H. courbaril* and *C. officinalis* and *C. pubiflora*. Tests were made for compounds or yield which showed significant or highly significant ratios in the 3-way ANOVA (tables 1 and 2). Any means underlined by a common line are not significantly different.

毫克(倍萜类化合物)/克(叶子干重) mg sesquiterpene/g leaf dry wt	季 节 Date (season)			季 节 Date (season)		
	<i>H. courbaril</i>			<i>C. officinalis</i> / <i>C. pubiflora</i>		
石 竹 烯 caryophyllene	Aug 1.89	Feb 1.52	Nov 1.51	Aug 0.47	Feb 0.39	Nov 0.28
α , β -瑟林烯 α , β selinene	Nov 4.85	Aug 3.30	Feb 2.66	Nov 2.06	Feb 1.71	Aug 1.59
树 脂 含 量 resin yield	Nov 7.91	Aug 6.80	Feb 5.11	Feb 4.31	Aug 3.64	Nov 3.50

在表4中, *H. courbaril* 的瑟林烯和树脂含量二月、八月、十一月都有显著的季节变化, 它的石竹烯含量仅在八月与二月, 十一月有明显的不同。表4也表明 *C. pubiflora* 和 *C. officinalis* 只有石竹烯在三个不同季节里有明显的季节性变化, 它们的树脂含量只有二月份有较大的不同。

在图1 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 树脂含量的季节和昼夜变化中, 它们在三个季节里的昼夜变化是微小的, 而它们的季节性变化是明显的。不同季节树脂含量的排列顺序也很有意思的。在 *Copaifera* 树脂含量为二月最高, 八月和十一月的含量相接近, 而在 *Hymenaea* 为十一月树脂含量最高, 二月树脂含量最低, 八月树脂含量居中, 这些季节性变化经变量分析统计结果都是有意义的。

在上述试验结果中, 它们的石竹烯含量变化我们认为这可能由于如以前 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 光照试验 [14] 所证实的石竹烯的分离问题所致。至于 *H. courbaril* 的 α, β - 瑟林烯含量变化不同于以前光周期试验的结果 [15], 这可能因为它们是使用来自相同纬度的植株。试验中 *Hymenaea* 和 *Copaifera* 不同光强下树脂含量的变化正与以前光照试验所得到的结果相一致 [14]。

Copaifera 在二月份树脂含量最高, 这似乎有些意外, 然而从光照强度的测定说明二月份和十一月份的光照强度水平差异并不大, 而实际上 1984. 2. 22 比 1984. 11. 19 光照强度较长时间保持在较高水平上, 见图 1)。

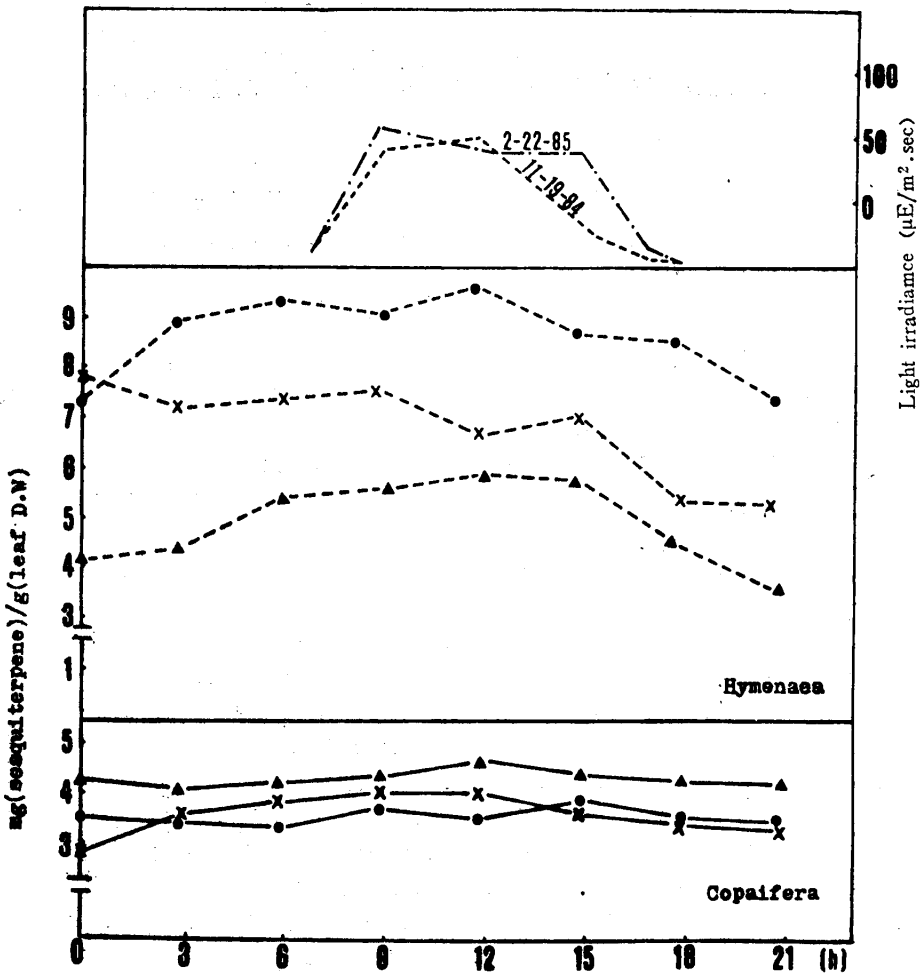


图 1 *H. courbaril* 和 *C. pubiflora* *C. officinalis* 的倍半萜类化合物在三个季节的昼夜变化
 Fig. 1 Diurnal variation of sesquiterpene yield for three dates (August 1984, November 1984 and February 1985) for *H. courbaril* and *C. pubiflora* and *C. officinalis*.

× August; ● November; ▲ February

如果光周期影响树脂产量的话, 可以期望在 *H. courbaril* 将有较大的季节性变化, 因为它们植株来自不同纬度 (2°S—23°N), 而 *Copaifera* 的植株来自相同纬度

(8°N),然而试验结果有些错综复杂, *Copaifera*八月树脂含量居于二月和十一月之间。Burbott和Loomis [16]证实,在 *Mentha piperita* 虽然长光照条件能增加单萜化合物的数量;但这不是由于光周期的直接影响的结果而是增加了植株生长从而生成较多数量的类萜类化合物。可是在我们的试验中没有测定和比较不同季节的生长量。

除了在 *H. courbaril* (9:00和21:00) 这二个时间有些差异外,这些在温室生长的 *Hymenaea*和 *Copaifera*幼树都没有明显的昼夜变化,这不同于在 *Mentha piperita*[16]和 *Juni perus scopulorum* [17] 中单萜化合物的变化。在这二种植物中白天氧化的萜类化合物增加,在夜晚它们的碳氢化合物增加,这些被假设为单萜类化合物的氧化还原水平反映了生成类萜类化合物细胞中呼吸酶的氧化还原状态,而这些呼吸酶的氧化还原状态又取决于白天的光合作用和黑夜里光合产物利用之间的平衡。 *H. courbaril* 的很少昼夜变化,实际上很可能由于植株大小,年龄和来自不同种群的差异以及全因子分析产生的统计误差所引起的。

致谢 我们的试验工作得到K. S. Stopol, Mercedes Merrillwilson 和 Donna Armstrong的协助,在数据统计分析中得到Donna Armstrong 和 Dr. G. D. Hall的帮助。

参 考 文 献

- 1 Langenheim J H. In Tropical Forest Ecosystems in Africa and South America, A Comparative Review (Meggers B J, Ayensu E S and Duckworth W D, eds.), Smithsonian Institution Press, 1973:89
- 2 Langenheim J H. *Science* 1969; 163:1157
- 3 Langenheim J H. Proc. XII Int. Bot. Congress, Leningrad, 1975:26
- 4 Langenheim J H. In Advances in Legume Systematics (Polhill R M and Raven P H., eds.) Royal Botanic Gardens, Kew, England. 1981; 627
- 5 Langenheim J H. In Physiological Ecology of Plant in the Wet Tropics (Medina E, Mooney H A and Vasquez-Yanes C. eds.) W. Junk, The Hague. 1984; 189
- 6 Martin S S, Langenheim J H, Zavarin E. *Phytochemistry* 1972; 11:3049
- 7 Arrhenius S P, Foster C E, Edmonds C C et al. *Phytochemistry* 1983; 22:471
- 8 Martin S S, Langenheim J H, Zavarin E. *Biochem Syst Ecol* 1976; 4:81
- 9 Langenheim J H, Stubblebine W H, Foster C E et al *Acta Amazonica* 1977; 7:335
- 10 Langenheim J H, Hall G D. *Biochem Syst Ecol* 1983; 11:29
- 11 Langenheim J H, Stubblebine W H. *Biochem Syst Ecol* 1983; 11:97
- 12 Langenheim J H, Convis C L Macedo C A et al. *Biochem Syst Ecol* 1986; 14:41
- 13 Nascimento J C, Langenheim J H. *Biochem Syst Ecol* 1986; 14:61
- 14 Langenheim J H, Mecedo C A, Ross M K et al. *Biochem Syst Ecol* 1986; 14:51
- 15 Crankshaw D E, Langenheim J H. *Biochem Syst Ecol* 1989; 9:115
- 16 Burbott A J, Loomis W D. *Plant Physiology* 1967; (1):20
- 17 Adams C P, Hagerman A. *Amer J Bot* 1977; 64:278

SEASONAL AND DIURNAL VARIATION IN LEAF SESQUITERPENES OF GREENHOUSE-GROW SAPLINGS OF HYMENAEA AND COPAIFERA

Wang Jinliang

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Jean. H. Langenheim

(*Department of Biology, Thimann Laboratories, University
of California, Santa Cruz, CA 95064 USA*)

Abstract Leaf sesquiterpene hydrocarbons of greenhouse-grown saplings of *Hymenaea courbaril*, and *Copaifera officinalis* and *C. pubiflora* were analyzed by GC for seasonal and diurnal variation. Of the suite of essentially the same sesquiterpenes in leaves of both genera, only the major compounds (caryophyllene and α , β -selinene) and total quantity (yield) were analyzed statistically as they were considered most likely to be of ecological significance. Diurnal variation was minimal in both *Hymenaea* and *Copaifera* during the three dates sampled. Both individual tree (genotype) and seasonal variation were different at highly significant levels for caryophyllene, selinene and yield in both *Hymenaea* and *Copaifera*.

This study was supported in part by U. S. National Science Foundation.

Key words Tropical tree legumes; Sesquiterpenes; *Hymenaea*, *Copaifera*