

樟树幼苗机械损伤叶片对挥发性有机化合物及叶绿素荧光参数的影响

周 帅¹ 林富平¹ 王玉魁³ 沈应柏² 张汝民¹ 高荣孚² 高 岩^{1*}

¹浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江临安 311300; ²北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100091; ³国家林业局竹子研究中心, 杭州 310012

摘 要 为探讨植物在机械损伤后C₆–C₁₀醛类化合物的释放机理, 及C₆–C₁₀醛类化合物对叶片光系统II (PSII)的影响, 以樟树(*Cinnamomum camphora*)为材料, 采用动态顶空气体循环法和热脱附/气相色谱/质谱联用技术(TDS-GC-MS), 对樟树幼苗叶片损伤后释放的C₆–C₁₀醛类化合物进行采集与分析, 并同步测定了脂氧合酶活性和损伤叶片的叶绿素荧光动力学参数。结果表明: 樟树幼苗叶片损伤后, 其挥发性有机化合物中己醛、庚醛、辛醛、壬醛和癸醛的释放量比损伤前分别增加了2.47、0.99、1.34、0.91和28.38倍($p < 0.01$); 同时新增4种醛类化合物, 分别是: 2-己烯醛、2,4-己二烯醛、(E)-2-辛烯醛和(E)-2-壬烯醛。脂氧合酶活性比损伤前增加1.2倍($p < 0.01$)。PSII单位反应中心复合体吸收的能量和被核心捕获的能量分别比损伤前下降12.8%和9.8% ($p < 0.01$)。单位面积反应中心的数量、电子传递量子产额、捕获激子能导致电子传递效率和叶片性能指数分别比损伤前增加23.3%、24.4%、22.6%和82.7% ($p < 0.01$)。损伤24 h后, 醛类化合物的种类、释放量、脂氧合酶活性及叶片叶绿素荧光动力学参数基本恢复到损伤前水平。说明机械损伤使PSII供体侧受损、脂氧合酶活性升高, 致使C₆–C₁₀醛类化合物大量释放, 樟树幼苗通过增加单位面积反应中心的数量来提高光合效率应对胁迫。

关键词 醛类化合物, 叶绿素荧光, 樟树, 机械损伤, 热脱附/气相色谱/质谱联用技术(TDS-GC-MS)

Effects of mechanical damage of leaves on volatile organic compounds and chlorophyll fluorescence parameters in seedlings of *Cinnamomum camphora*

ZHOU Shuai¹, LIN Fu-Ping¹, WANG Yu-Kui³, SHEN Ying-Bai², ZHANG Ru-Min¹, GAO Rong-Fu², and GAO Yan^{1*}

¹The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; ²College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100091, China; and ³China Bamboo Research Center, State Forestry Administration, Hangzhou 310012, China

Abstract

Aims Our objective was to reveal the mechanism of the effects of mechanical damage of leaves on emission of C₆–C₁₀ aldehydes and the variation of PSII in *Cinnamomum camphora* leaves.

Methods We analyzed the composition and content of the C₆–C₁₀ aldehydes in seedlings of damaged *C. camphora* by the dynamic headspace air-circulation method and thermal desorption system/gas chromatography/mass spectrum (TDS-GC-MS), measured the activity of lipoxygenases (LOX) in leaves after mechanical damage, and investigated the effects of mechanical damage of leaves on chlorophyll a fluorescence parameters.

Important findings Results showed that the emissions of hexanal, heptanal, octanal, nonanal and decanal were increased by 2.47, 0.99, 1.34, 0.91 and 28.38 ($p < 0.01$) times, respectively, and four kinds of C₆–C₁₀ aldehydes were induced: (E)-2-hexenal, (E, E)-2,4-hexadienal, (E)-2-octenal and (E)-2-nonanal. The activity of LOX was increased by 1.2 times. The absorption flux per PSII reaction center and trapping flux were significantly decreased by 12.8% ($p < 0.05$) and 11.1% ($p < 0.01$), respectively. The density of the active reaction centers per cross section, quantum yield of electron transport, electron transport chain further than primary quinone acceptor of PSII (Q_A⁻) and the performance of PSII activity were increased by 23.3%, 24.4%, 22.6% and 82.7% ($p < 0.01$), respectively. The species and emissions of C₆–C₁₀ aldehydes, activity of LOX and chlorophyll fluorescence parameters nearly recovered after 24 h. This suggested that the damage caused by mechanically damaged stress is more prominent at the donor side of PSII. The activity of LOX was increased, and as a result the emission of C₆–C₁₀ aldehydes increased. In response to high salt stress, *C. camphora* seedlings improve the quantity of the active

reaction centers.

Key words aldehydes, chlorophyll fluorescence, *Cinnamomum camphora*, mechanical damage, Thermal Desorption System/Gas Chromatography/Mass Spectrum (TDS-GC-MS)

自然环境因素的变化会对植物构成非生物胁迫, 诱导植物启动多重响应机制, 其中一个显著的应变机制是诱导挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs) 改变释放规律 (Holopainen, 2011)。高温胁迫诱导植物大量释放异戊二烯、萜类和绿叶性气体(green leafy volatiles; GLVs) (Sharkey *et al.*, 2008; Hartikainen *et al.*, 2009)。干旱胁迫会导致气孔关闭, 进而阻碍低挥发性物质(如甲醇、C₆醛和乙醇)的释放(Loreto & Schnitzler, 2010)。高挥发性物质(如异戊二烯和单萜类)则不受气孔关闭的影响(Gouinguéné & Turlings, 2002; Niinemets *et al.*, 2004; Grote *et al.*, 2010; Loreto & Schnitzler, 2010)。弱光或强光照环境下, VOCs释放量普遍降低(Gouinguéné & Turlings, 2002; Schaub *et al.*, 2010), 但受损植株在强光照射下, VOCs释放量会增加(Holopainen, 2011); 适当地提高CO₂浓度能增加异戊二烯的释放量(Pegoraro *et al.*, 2004; Wilkinson *et al.*, 2009), 但过高的CO₂浓度会抑制单萜(Sallas *et al.*, 2001, 2003)和异戊二烯(Holopainen, 2011)的释放。

机械损伤能够诱导植物叶片释放大量的C₆–C₁₀醛类化合物(Matsui *et al.*, 2000; 平立岩等, 2001; 左照江等, 2010; Piesik *et al.*, 2011)。合作杨(*Populus simonii* × *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’)扦插苗机械损伤后释放16种醛类化合物, 主要包括11种直链饱和醛、3种直链不饱和醛和2种环状醛(Hu *et al.*, 2008)。短链醛类在环境化学中具有十分重要的作用, 一些种类可以被紫外线光解形成自由基, 或参与对流层中O₃和过氧乙酰硝酸酯的形成, 影响动、植物生长发育(Graus *et al.*, 2004)。此外, C₆–C₁₀醛类化合物能抑制细菌及真菌繁殖(Gao *et al.*, 2005; Shiojiri *et al.*, 2006; 张凤娟, 2007), 并且具有传递预警信息和吸引植食性昆虫天敌的功能(Engelberth *et al.*, 2004; Kishimoto *et al.*, 2005)。

植物的机械损伤诱导C₆–C₁₀醛类化合物释放与植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量变化关系密切。研究证实: 植物体内过量积累ROS, 会诱导醛类化合物形成(Wojtaszek, 1997); 同时,

C₆–C₁₀醛类化合物的释放与光合作用也有关联。例如, 植物将光合作用固定碳的5%–10%用于合成VOCs, 当环境胁迫发生时, 这一比例会更高(Peñuelas & Staudt, 2010)。沈应柏(2008)研究发现, 机械损伤诱导C₆–C₁₀醛类化合物释放与叶片PSII最大量子产率 F_v/F_m 存在联系。ROS导致膜脂过氧化、细胞内游离的不饱和脂肪酸增加, 促使催化C₆–C₁₀醛类化合物合成的关键酶——脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)活性升高, 而13-LOX与光系统II(PSII)均位于叶绿体类囊体膜(Matsui *et al.*, 2000), 很可能与光合作用存在关联。上述研究结果显示, 植物因机械损伤释放C₆–C₁₀醛类化合物与ROS、LOX及PSII存在密切联系。

许多研究证实, 机械损伤会导致植物体内产生大量的ROS (Bi & Felton, 1995; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; León *et al.*, 2001; Bown *et al.*, 2002)。为进一步研究植物在机械损伤后C₆–C₁₀醛类化合物的释放机理, 及释放的C₆–C₁₀醛类化合物对植物叶片PSII的影响, 为植物抗性等领域研究提供数据与理论支持, 本研究以樟树(*Cinnamomum camphora*)为实验材料, 以机械损伤作为胁迫模式, 采用动态顶空气体循环采集法与热脱附/气相色谱/质谱联用技术(Thermal Desorption System/Gas Chromatography/Mass Spectrum, TDS-GC-MS), 对樟树幼苗损伤后不同时期释放的C₆–C₁₀醛类化合物进行采集与分析, 并测定了LOX的活性变化; 利用快速叶绿素荧光诱导动力学分析技术研究了机械损伤对PSII的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取浙江农林大学植物园3年生樟树实生苗为实验材料, 2010年3月带土球移植入装有果园土、直径为25 cm的塑料盆中, 于日光温室中遮阴40%进行培养。

1.2 处理方法

待幼苗适应生长2个月后, 选取长势良好、且一致的5株幼苗, 于2010年5月置于人工气候箱(温度

(25 ± 2) °C; 每天光照12 h (6:00–18:00); 光照强度为100 μmol·m⁻²·s⁻¹; 相对湿度为(60 ± 3)%; 适应培养2天。机械损伤处理采用直径为0.5 cm的打孔器, 在幼苗成熟叶片主脉两侧共打10个孔, 每株处理6–8片, 约占全株叶片总数的30%。

1.3 VOCs采集分析方法

应用动态顶空气体循环采集法收集整株樟树幼苗VOCs样品, 分别于损伤前(对照, CK)和损伤后1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h采集, 采样时间25 min。VOCs成分分析采用TDS-GC-MS法。仪器及参数设置条件参考Gao等(2005)文献。TDS (TD3型, GERSTEL, Mülheim an der Ruhr, Germany)工作条件: 系统载气压力为20 kPa; 进样口温度250 °C; 脱附温度250 °C (10 min); 冷阱温度–100 °C (保持3 min); 冷阱进样时温度骤然升至260 °C。GC (7890A型, Agilent, Wilmington, USA)工作条件: 色谱柱为30 m × 250 μm × 0.25 μm的HP-5MS柱; 程序升温: 初始温度40 °C, 保持4 min后, 以6 °C·min⁻¹的速率升至250 °C, 保持3 min后, 以10 °C·min⁻¹的速率升至270 °C, 保持5 min。MS (5975C型, Agilent, Wilmington, USA)工作条件: 电离方式为EI; 电子能量为70 eV; 质量范围28–450 aum; 接口温度280 °C; 离子源温度为230 °C; 四级杆温度150 °C。

1.4 叶绿素荧光动力学参数的测定

采用非调制式叶绿素荧光仪(Yaxin-1161型, 北京雅欣理仪科技有限公司, 北京)进行损伤叶片叶绿素荧光动力学参数的测定。叶片暗适应10 min后, 选取叶肉部分用3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹饱和蓝闪光照射1 s, 以10 μs (2 ms之前)和1 ms (2 ms之后)的间隔记录荧光信号, 测得叶绿素荧光动力学参数。分别在损伤前(对照, CK)和损伤后1 h、2 h、4 h、8 h、24 h测定各项参数, 每株测定3次, 计算平均值和标准误差。

叶绿素荧光动力学参数的计算, 参考Strasser等(2000)的计算方法。暗适应下PS II最大量子产率 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; 单位面积反应中心数目 $RC/CS = (F_v/F_m) \times (V_j/M_0) \times F_0$; 单位反应中心复合体吸收的能量 $ABS/RC = M_0/V_j/(F_v/F_m)$; 单位反应中心复合体中被核心捕获的能量 $TR_0/RC = M_0/V_j$; 捕获的激子将电子传递到电子传递链中 Q_A^- 下游的其他电子受体的概率 $\psi_0 = (1 - V_j)$; 电子传递的量子产额 $\Phi E_0 = (1 - F_0/F_m) \times \psi_0$; 单位反应中心捕获的用于电

子传递的能量 $ET_0/RC = M_0 \times (1/V_j) \times \psi_0$; 叶片性能指数 $PI_{ABS} = I/ABS/RC \times [F_v/F_m/(1 - F_v/F_m)] \times [\psi_0/(1 - \psi_0)]$; 荧光曲线的相对初始斜率 $M_0 = 4 \times (F_{300\mu s} - F_0)/(F_m - F_0)$; 2 ms时的可变荧光 $V_j = (F_j - F_0)/(F_m - F_0)$ 。上述公式中, F_m 表示暗适应后的最大荧光强度; F_0 表示暗适应后的最小荧光强度; $F_{300\mu s}$ 表示在暗适应后照光300 μs时的荧光强度; F_j 表示在暗适应后照光2 ms时的荧光强度。

1.5 樟树叶片LOX活性的测定方法

参照Hatanaka (1993)的方法并加以改进, 来测定樟树叶片LOX的活性。分别在损伤前(对照, CK)和损伤后1 h、2 h、4 h、8 h、24 h取樟树幼苗的叶片0.2 g, 加入5 mL预冷的0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.5)研磨后, 4 °C下10 000 r·min⁻¹离心30 min, 回收上清液, 用于LOX活性测定。3 mL反应体系中含有亚油酸(1 mol·L⁻¹)母液25 μL, 磷酸缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0) 2.775 mL, 反应温度25 °C, 测234 nm波长处吸光度的变化。加0.2 mL酶液启动反应, 4 s后计时, 记录2 min内234 nm波长处吸光度的变化。

酶活性定义: 在25 °C, pH 7.0, 234 nm波长处, 以亚油酸为底物, 3 mL反应体系每分钟增加的吸光度0.01对应一个酶活单位。

1.6 数据分析

采用NIST2008谱库检索, 并根据已报道的植物VOCs保留时间对其各组分进行定性, 然后选取特征离子进一步定量分析。VOCs定量方法: 采用单位采样时间内单株幼苗释放出的VOCs特征离子峰峰面积进行定量。采用SPSS和Origin进行数据处理、制图及统计分析, 方差分析及多重比较采用Duncan新复极差法。

2 结果和分析

2.1 机械损伤对C₆–C₁₀醛类化合物释放的影响

樟树幼苗机械损伤后, 叶片在不同时间释放的C₆–C₁₀醛类化合物种类存在差异。损伤1 h后, 增加2种C₆–C₁₀醛类化合物, 分别为(E)-2-己烯醛和(E,E)-2,4-己二烯醛; 损伤2 h后, 增加(E)-2-壬烯醛; 损伤8 h后, 增加(E)-2-辛烯醛; 损伤48 h后, 减少1种醛类化合物, 为(E,E)-2,4-己二烯醛, 较损伤前增加3种C₆–C₁₀醛类化合物, 分别为(E)-2-己烯醛、(E)-2-辛烯醛和(E)-2-壬烯醛(图1; 表1)。

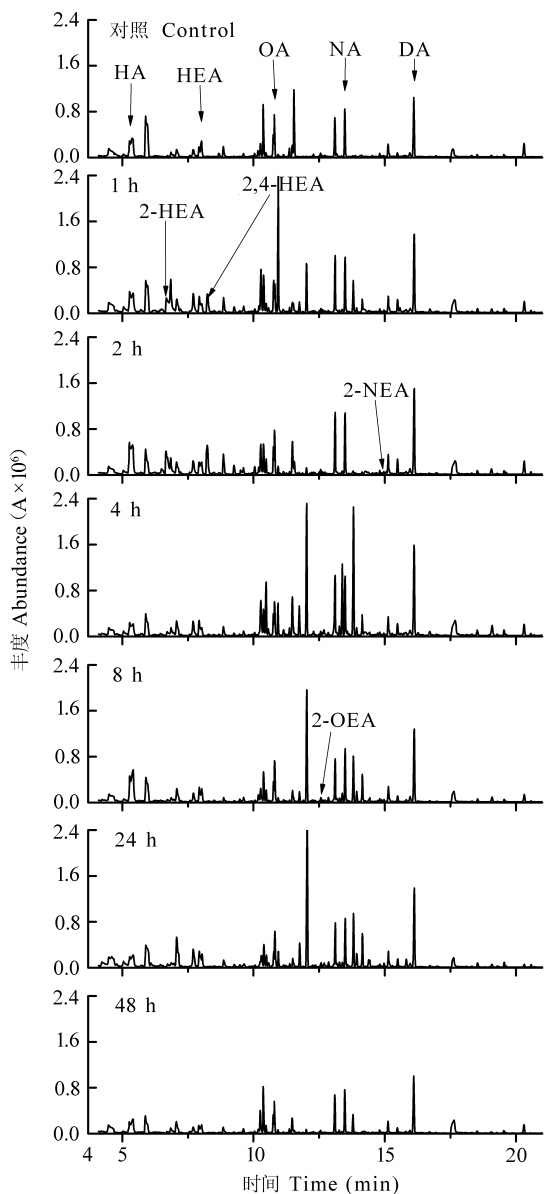


图1 机械损伤后樟树幼苗叶片挥发性有机化合物总离子流。A, 峰面积; DA, 癸醛; FA, 糠醛; HA, 己醛; HEA, 庚醛; 2-HEA, (E)-2-己烯醛; 2,4-HEA, (E,E)-2,4-己二烯醛; 2-NEA, (E)-2-壬烯醛; NA, 壬醛; OA, 辛醛; 2-OEA, (E)-2-辛烯醛。
Fig. 1 Total ion current of volatile organic compounds in mechanically damaged leaves of *Cinnamomum camphora* seedlings. A, peak area; DA, decanal; FA, furfural; HA, hexanal; HEA, heptanal; 2-HEA, (E)-2-hexenal; 2,4-HEA, (E,E)-2,4-hexadienal; 2-NEA, (E)-2-nonenal; NA, nonanal; OA, octanal; 2-OEA, (E)-2-octenal.

幼苗机械损伤后, 叶片 C_6 – C_{10} 醛类化合物的释放速率随时间推移呈现先升后降的变化趋势(表1)。糠醛、己醛、2-己烯醛、2,4-己二烯醛、辛醛、壬醛和癸醛的释放量在1–2 h达到最高值, 己醛、辛醛、壬醛和癸醛分别比损伤前增加2.47倍、1.34倍、0.91

倍和28.38倍($p < 0.01$)。庚醛在损伤后4 h释放量达到最大值, 比损伤前增加0.99倍。(E)-2-辛烯醛在8 h时释放量达到最大值, (E)-2-壬烯醛在24 h时释放量达到最大值。损伤48 h后, 糠醛、己醛、庚醛、辛醛、壬醛和癸醛的释放量均恢复到损伤前水平, 2-己烯醛、2,4-己二烯醛、(E)-2-辛烯醛和(E)-2-辛烯醛是损伤诱导产生的, 48 h后释放量均显著降低。

2.2 机械损伤对叶绿素荧光动力学曲线的影响

樟树幼苗叶片经过暗适应后转入饱和和脉冲光强照射, 叶绿素荧光迅速上升, 如图2A所示, 经过O、J、I、P各点后逐渐平稳。损伤1 h后O点和P点的荧光强度上升幅度较大, 2 h后有所下降, 损伤24 h后仍然略高于对照(CK) (图2A)。J点的相对可变荧光强度在损伤1 h后下降, 损伤2 h后下降明显, 之后随时间推移而缓慢上升(图2B)。损伤后1 h, J、I两点间的相对可变荧光强度差值明显增加, 损伤后2 h下降幅度又有所加大, 从损伤后4 h开始恢复(图2C)。

2.3 机械损伤对叶片叶绿素荧光动力学参数的影响

基于生物膜能量流动理论(Strasser *et al.*, 2000)计算损伤后各时间点的荧光动力学参数, 可以观察到损伤后叶片叶绿素荧光动力学参数发生明显变化, 多项参数在1 h或2 h达到峰值, 24 h后基本恢复到损伤前的水平。

2.3.1 机械损伤对光合机构单位反应中心量子效应的影响

损伤后1–2 h, 单位反应中心复合体吸收的能量 ABS/RC 和单位反应中心复合体中被核心捕获的能量 TR_0/RC 均呈现下降趋势, 分别比损伤前下降了12.8%和9.8% ($p < 0.01$); 单位反应中心捕获的用于电子传递的能量 ET_0/RC 略微上升。损伤24 h后, ABS/RC 和 TR_0/RC 恢复到损伤前水平; ET_0/RC 比损伤前增加19.6% ($p < 0.01$) (表2)。

2.3.2 机械损伤对 RC/CS 、 ΦE_0 和 ψ_0 的影响

损伤后1–2 h, 单位面积光合机构含有的反应中心数目 RC/CS 呈现增加趋势, 损伤后1 h和2 h的 RC/CS 分别比损伤前增加了11.6% ($p < 0.05$)和23.3% ($p < 0.01$); 电子传递的量子产额 ΦE_0 和捕获的激子将电子传递到电子传递链中 Q_A^- 下游的其他电子受体的概率 ψ_0 均呈现增加趋势, 分别比损伤前增加了24.4%和22.6% ($p < 0.01$)。损伤24 h后,

表1 机械损伤后樟树幼苗叶片C₆-C₁₀醛类化合物释放量的变化(平均值±标准误差)Table 1 Variation of the release amount of C₆-C₁₀ aldehydes in mechanically damaged leaves of *Cinnamomum camphora* seedlings (mean ± SE)

C ₆ -C ₁₀ 醛类化合物 C ₆ -C ₁₀ aldehydes	时间 Time (h)						
	对照 Control	1	2	4	8	24	48
糠醛 Furfural	1.58 ± 0.54	2.61 ± 0.59*	1.18 ± 0.42	0.83 ± 0.25	1.30 ± 0.35	1.08 ± 0.36	1.32 ± 0.34
己醛 Hexanal	9.53 ± 1.02	32.53 ± 4.92**	33.05 ± 1.62**	29.03 ± 3.19**	18.39 ± 0.86**	14.44 ± 3.01*	7.06 ± 1.55
庚醛 Heptanal	6.23 ± 0.97	8.82 ± 1.21*	11.22 ± 0.84**	12.53 ± 2.80**	9.45 ± 0.87*	7.67 ± 0.95	6.56 ± 0.84
辛醛 Octanal	10.11 ± 2.65	13.34 ± 3.67*	23.66 ± 2.31**	17.37 ± 3.33*	16.43 ± 3.01*	14.32 ± 2.95*	11.03 ± 2.55
壬醛 Nonanal	14.26 ± 3.43	22.02 ± 4.07**	27.24 ± 3.34**	22.91 ± 3.90*	19.97 ± 2.85*	18.97 ± 3.56	15.59 ± 2.77
癸醛 Decanal	1.72 ± 0.67	44.67 ± 9.35**	50.53 ± 4.94**	48.84 ± 3.31**	45.57 ± 4.06**	36.43 ± 2.18**	4.76 ± 1.23*
(E)-2-己烯醛 (E)-2-hexenal	-	20.75 ± 2.72	22.05 ± 1.25	5.37 ± 1.63	1.85 ± 0.04	1.61 ± 0.41	1.22 ± 0.23
(E,E)-2,4-己二烯醛 (E,E)-2,4-hexadienal	-	12.54 ± 3.46	16.43 ± 2.89	3.81 ± 1.06	1.32 ± 0.36	0.43 ± 0.16	-
(E)-2-壬烯醛 (E)-2-nonenal	-	-	0.43 ± 0.05	0.51 ± 0.10	0.64 ± 0.14	0.69 ± 0.13	0.30 ± 0.10
(E)-2-辛烯醛 (E)-2-octenal	-	-	-	-	0.68 ± 0.08	0.55 ± 0.06	0.30 ± 0.10

-, 未检测到化合物。

-, no compounds were found. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

表2 机械损伤后樟树幼苗叶片主要叶绿素荧光参数的变化(平均值±标准误差)

Table 2 Variations of main chlorophyll fluorescence parameters in mechanically damaged leaves of *Cinnamomum camphora* seedlings (mean ± SE)

参数 Parameter	时间 Time (h)					
	对照 Control	1	2	4	8	24
ABS/RC	2.35 ± 0.17	2.21 ± 0.15	2.05 ± 0.04**	2.30 ± 0.06	2.37 ± 0.07	2.40 ± 0.17
TR_0/RC	1.84 ± 0.08	1.71 ± 0.05	1.66 ± 0.03**	1.91 ± 0.07	1.86 ± 0.06	1.96 ± 0.14
ET_0/RC	0.96 ± 0.14	1.04 ± 0.09	1.01 ± 0.11	1.03 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.15 ± 0.06**
ψ_0	0.52 ± 0.01	0.61 ± 0.01*	0.64 ± 0.08**	0.54 ± 0.03	0.50 ± 0.06	0.51 ± 0.00
ΦE_0	0.45 ± 0.19	0.43 ± 0.05	0.56 ± 0.01**	0.41 ± 0.01	0.40 ± 0.00	0.48 ± 0.06
RC/CS	3.82 ± 0.37	4.26 ± 0.19*	4.71 ± 0.59**	3.77 ± 0.37	4.21 ± 0.08	3.91 ± 0.11
F_v/F_m	0.87 ± 0.01	0.89 ± 0.07	0.89 ± 0.06	0.85 ± 0.01	0.75 ± 0.07	0.74 ± 0.03
PI_{ABS}	1.86 ± 0.46	2.77 ± 1.06**	3.41 ± 0.83**	2.27 ± 0.16*	1.99 ± 0.36	1.89 ± 0.51

ABS/RC , 单位反应中心吸收的能量; TR_0/RC , 单位反应中心捕获的能量; ET_0/RC , 单位反应中心捕获的用于电子传递的能量; ψ_0 , 捕获的激子将电子传递到电子传递链中 Q_A^- 下游的其他电子受体的概率; ΦE_0 , 电子传递的量子产额; RC/CS , 单位面积反应中心数目; F_v/F_m , PSII最大量子产率; PI_{ABS} , 叶片性能指数。

ABS/RC , absorption flux per PSII reaction center; TR_0/RC , trapped energy flux per PSII reaction center; ET_0/RC , trapped energy used for electron transport per PSII reaction center; ψ_0 , probability that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A^- ; ΦE_0 , quantum yield for electron transport; RC/CS , amount of PSII reaction center per cross section; F_v/F_m , maximum quantum yield of PSII; PI_{ABS} , performance index of leaf. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

RC/CS 、 ΦE_0 和 ψ_0 均恢复到损伤前水平(表2)。

2.3.3 机械损伤对PSII最大量子产率 F_v/F_m 和性能参数 PI_{ABS} 的影响

以损伤前的荧光参数值为基准, 依次计算损伤后不同时期荧光参数的升高或降低百分率, 可知损伤后樟树幼苗叶片PSII最大量子产率 F_v/F_m 无明显变化, 最大变化值出现在损伤2 h和4 h后, 4 h以后呈现逐渐下降趋势。损伤后1 h和2 h, 叶片性能指数 PI_{ABS} 呈显著增加趋势, 比损伤前分别增加48.39%

和82.80% ($p < 0.01$)。损伤24 h后, F_v/F_m 略低于损伤前水平, PI_{ABS} 恢复到损伤前水平(表2)。

2.4 机械损伤对LOX活性的影响

图3显示了机械损伤后不同时间LOX活性的变化, 从图3中可以看出, 损伤诱导后1 h, LOX活性极显著升高, 较损伤前酶活性增加1.2倍($p < 0.01$)。损伤后2 h有所下降, 但幅度不明显。从损伤后4 h开始, LOX活性随时间推移而渐渐恢复到损伤前水平。

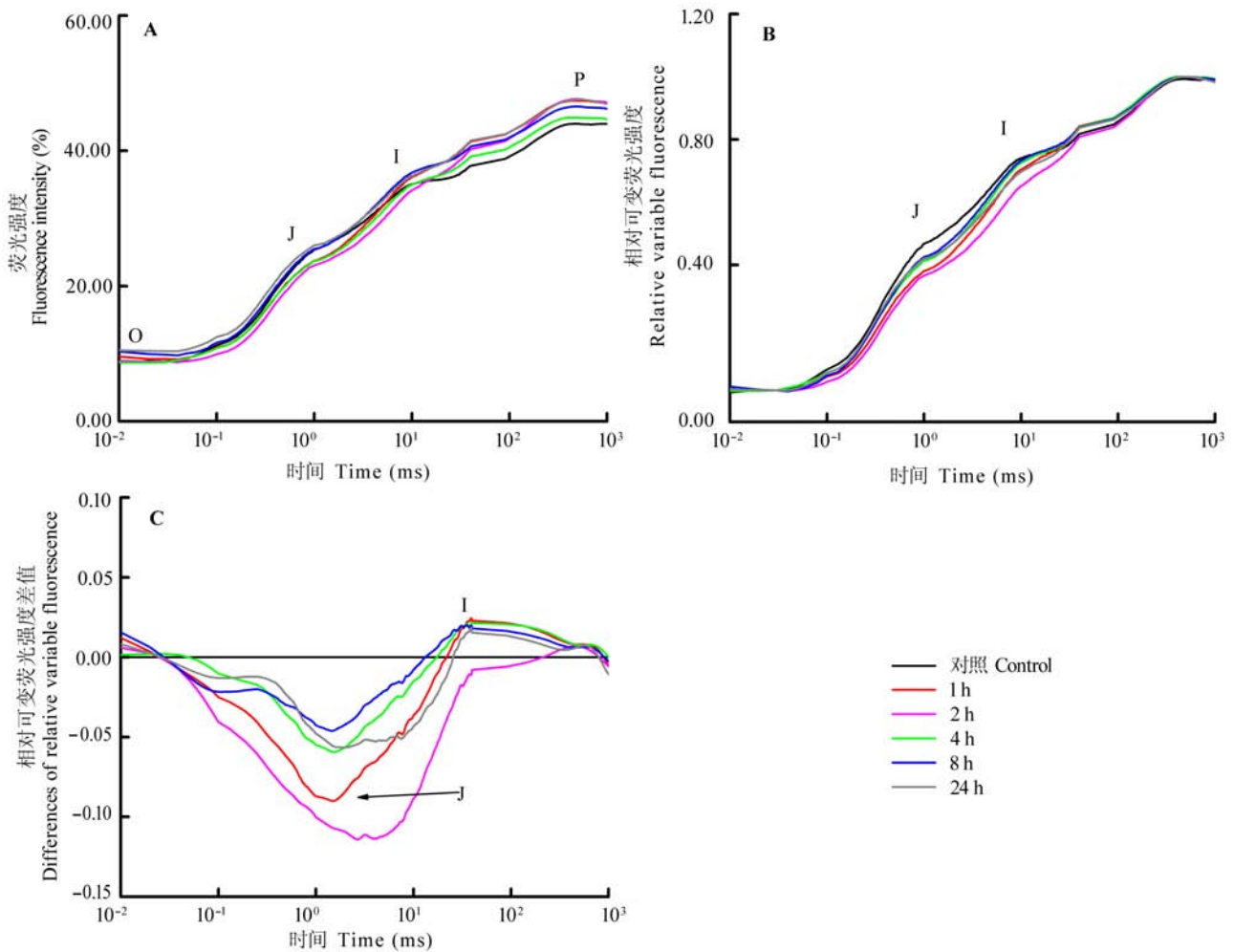


图2 机械损伤后樟树幼苗叶片叶绿素荧光动力学曲线的变化。A, 机械损伤后樟树幼苗叶片O-J-I-P荧光诱导曲线(3次重复的平均值)。B, F_0 与 F_m 间相对可变荧光强度(V_t)随时间的变化, $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$, F_t 表示 t 时的荧光强度, F_0 表示暗适应后的最小荧光强度, F_m 表示暗适应后的最大荧光强度。C, V_t 与对照的差值 ΔV_t , $\Delta V_t = V_t(\text{处理}) - V_t(\text{对照})$ 。O、J、I、P各点含义详见李鹏民等(2005)。

Fig. 2 Variation of chlorophyll fluorescence transients in mechanically damaged leaves of *Cinnamomum camphora* seedlings. A, O-J-I-P transient recorded in seedlings leaves of *C. camphora* after mechanical damage (average of three samples). B, relative variable fluorescence (V_t) between F_0 and F_m , $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$, F_t description fluorescence at time t , F_0 description minimum fluorescence intensity after dark adaptation, F_m description maximum fluorescence intensity after dark adaptation. C, differences (ΔV_t) of V_t to the CK, $\Delta V_t = V_t(\text{treatment}) - V_t(\text{CK})$. Meaning of O, J, I and P referred to Li *et al.* (2005).

3 讨论和结论

机械损伤诱导植物启动多重响应机制, 引发的一个“外在性”现象是 C_6 - C_{10} 醛类化合物的种类及释放量发生变化。研究表明热胁迫能诱导芦苇(*Phragmites australis*)叶片释放大量(E)-2-己烯醛(Loreto *et al.*, 2006)。在明暗交替实验中, 暗适应下的*Populus* × *canescens*叶片能释放出大量乙醛和己醛挥发物(Graus *et al.*, 2004), 而强光胁迫则会诱导饱和 C_6 - C_9 醛类化合物和E-2-己烯醛大量释放(Loreto *et*

al., 2006; Hu *et al.*, 2009)。O₃胁迫诱导玉米(*Zea mays*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、红茄(*Solanum integrifolium*)和芸薹(*Brassica campestris*)大量释放己醛、庚醛、辛醛、壬醛和癸醛(Wildt *et al.*, 2003)。高于常态浓度的O₂能促使复叶槭(*Acer negundo*)释放更多醛类化合物, 低于常态浓度的CO₂则会显著降低醛类化合物的释放量(Hu *et al.*, 2009)。本研究发现机械损伤樟树幼苗释放的醛类化合物主要是己醛、(E,E)-2,4-己二烯醛、(E)-2-己烯醛等C₆醛类化合物及庚醛、辛醛、

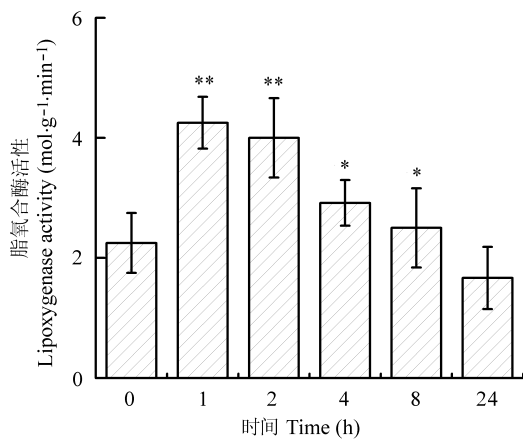


图3 机械损伤后不同时间樟树幼苗叶片脂氧合酶的活性(平均值±标准误差)。

Fig. 3 Activity of lipoxygenase in leaves of *Cinnamomum camphora* seedlings at different time after mechanical damage (mean ± SE). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

壬醛和癸醛等。损伤1–8 h内上述醛类化合物先后达到释放高峰,可知机械损伤与其他非生物胁迫一样均能促使植物释放C₆–C₁₀醛类化合物。实验中发现环状醛——糠醛的释放规律明显异于直链醛类化合物,已知短链植物醛类的来源有两个:植物存储池或特殊酶负责的合成路径(Wildt *et al.*, 2003),糠醛很可能只来自存储池。机械损伤叶片破坏糠醛的存储池,致使糠醛释放量短暂升高(1 h);之后胁迫效应显现,作为副产品的糠醛合成受阻,导致其存储量逐渐减少,出现2–4 h的释放低值。当胁迫效应基本解除后,糠醛的合成又恢复到常态(24–28 h)。相比之下,损伤诱导的直链C₆–C₉醛类化合物更偏向于通过由LOX负责调控的脂肪酸/脂氧合酶途径,因为实验中检测到LOX活性的时序性变化与直链C₆–C₉醛类化合物释放量变化相吻合,并且这条途径已被证实负责合成短链的C₆和C₉醛类化合物(Loreto & Schnitzler, 2010; Feussner & Wasternack, 2002)。脂肪酸/脂氧合酶途径是利用脂酶把膜系统中的十八碳不饱和脂肪酸(如亚油酸^{Δ^{9,12}}和 α -亚麻酸^{Δ^{9,12,15}})分离出来,在LOX催化下形成13-(S)-羟基过氧化亚油酸,之后,13-(S)-氢过氧化物裂解酶(13-(S)-hydroperoxides, HPL)将其分解为n-己醛(由亚油酸产生)和(Z)-3-己烯醛(由 α -亚麻酸产生),然后再进一步形成其他衍生物(Hatanaka, 1993)。根据上述理论,实验中C₆–C₁₀醛类化合物依次出现释放高峰的可能机理是:胁迫初期, α -亚油酸12号碳原

子双键断裂,脱落的6碳链加氧形成己醛。 α -亚麻酸12号碳原子双键断裂,脱落的6碳链上原15号碳原子上的双键由于发生双键转移异构化反应,同时受到醛基影响而迁移到14号碳原子上,形成2-己烯醛,进而形成衍生物2,4-己二烯醛;随着胁迫程度加深,同样存在于膜脂中的不饱和脂肪酸——油酸^{Δ⁹}9号碳原子双键也发生断裂形成壬醛,同时,亚油酸9号碳原子双键断裂形成2-壬烯醛,壬醛和2-壬烯醛,进一步反应形成辛醛、庚醛和2-辛烯醛。

机械损伤引起的一个“内在性”变化是对PSII反应中心产生影响。损伤后1–2 h, O点和P点的荧光强度及J、I两点间的相对可变荧光强度差值增加,说明损伤加大叶片荧光散射。机械损伤合作杨叶片0.5 h后, F_v/F_m 呈现下降趋势,4 h内恢复到损伤前水平(沈应柏, 2008)。从机械损伤樟树幼苗叶片的研究同样发现, F_v/F_m 在4 h内恢复到损伤前水平,但损伤后1–2 h却呈现上升趋势,推测可能与损伤程度及树种有关。天线色素吸收的能量除以热能和荧光的形式耗散掉外,大部分被捕光复合体(light-harvesting complex II, LHC-II)捕获, LHC-II将捕获的光能依次传递给P680受体侧的去镁叶绿素(pheophytin, Pheo) → 初级醌受体(Q_A) → 次级醌受体(Q_B),把吸收的能量用于固定CO₂或其他用途(Strasser *et al.*, 2000; 李鹏民等, 2005)。损伤后1–2 h, ABS/RC 和 TR_o/RC 均呈现下降趋势,而 ET_o/RC 略微上升(表2),表征放氧复合体的参数OEC没有明显变化,说明机械损伤胁迫很可能对天线色素造成损伤或形成抑制,导致天线色素吸收的能量和反应中心捕获的能量减少,表观上显示为 ABS/RC 和 TR_o/RC 下降,而 ET_o/RC 呈略微上升,表明PSII的电子受体侧接受电子的能力基本没受到影响。反映单位面积反应中心数量的参数 RC/CS 在损伤后快速上升(表2),可能预示着机械损伤胁迫发生的同时,樟树叶片通过提高PSII有活性反应中心的效率以弥补由于天线色素受损而导致的光能吸收不足, ΦE_o 、 ψ_o 两个反映电子传递到电子传递链中超过Q_A的概率参数以及叶片性能指数 PI_{ABS} 在损伤后1–2 h上升(表2),表明这一防御机制取得了一定成效。反映叶片活力的性能指数 PI_{ABS} 由3个独立参数构成,包括: F_v/F_m 、比活性参数 ABS/RC 和捕获激子能导致电子传递效率 ψ_o 。(李鹏民等, 2005),被认为比 F_v/F_m 更能准确地反映植物光合机构的状态(Appenroth *et al.*, 2001; 薛伟等, 2011)。从

变化幅度看, 损伤2 h后 PI_{ABS} 比损伤前增加了82.8% ($p < 0.01$), 而 F_v/F_m 只增加了1.8%, 前者的变化幅度明显大于后者, 因此我们认为性能指数 PI_{ABS} 不仅能反映机械损伤胁迫对PSII反应中心 F_v/F_m 的影响, 还可以反映机械损伤对光合器官光能吸收和耗散的影响(Appenroth *et al.*, 2001; van Heerden *et al.*, 2003, 2004)。

根据实验结果及上述分析, 机械损伤很可能导致PSII共体侧受损, 而在光照条件下 Q_A 和 Q_B 仍然不断被氧化, 使得P680电荷分离不完全。氧化的P680与剩余未被氧化的Pheo结合, 最终导致三线态叶绿素分子和单线态氧不断增加, 并进一步反应形成多种ROS (Apel & Hirt, 2004)。ROS破坏类囊体膜结构, 使膜系统中的十八碳不饱和脂肪酸与膜上的LOX接触, 所以膜脂成分中的亚油酸、油酸和亚麻酸经催化形成己醛、2-己烯醛、壬醛和2-壬烯醛及其他衍生物(Hatanaka, 1993)。另一方面, 机械损伤破坏叶片结构, ROS改变膜透性, 使细胞内形成的 C_6 – C_{10} 醛类化合物加速释放出体外。由此可见, 机械损伤初期 C_6 – C_{10} 醛类化合物大量释放与损伤叶片PSII光化学效率改变存在关联。但还需指出, 机械损伤胁迫下细胞中其他膜系统也可能受损, 通过脂肪酸/脂氧合酶途径释放 C_6 – C_{10} 醛类化合物, 相关细节还需要进一步研究。

现有研究表明, 损伤诱导产生的醛类能直接或间接地增强植物的抵御能力(Engelberth *et al.*, 2004; Kishimoto *et al.*, 2005), 虽然对 C_6 – C_{10} 醛类化合物是否具有广谱抗虫性还存在争议(Holopainen, 2011), 但多数实验结果显示 C_6 – C_{10} 醛对细菌及真菌有很好的抑制效果(Zeringue, 1991; Shiojiri *et al.*, 2006; 张凤娟, 2007), 而且能作为信号物质吸引植食性昆虫的天敌或警告邻近未受伤害的植株(Engelberth *et al.*, 2004; Kishimoto *et al.*, 2005)。实验中我们模拟昆虫取食对樟树幼苗叶片进行中等程度的机械损伤, 发现 C_6 – C_{10} 醛类化合物释放量较损伤前增加数倍甚至数十倍, 而同期叶绿素荧光参数显示樟树幼苗光合作用并没受到很大影响。据此我们进一步推测: 提前进行适当程度的机械损伤, 诱导大量 C_6 – C_{10} 醛类化合物释放, 或许是一种短期内提高植株抗病虫害能力的应急措施。当然, 这一措施还受到 C_6 – C_{10} 醛类化合物浓度和衰变时间、昆虫口腔分泌物及植株生长状况等诸多因素的制约。

致谢 国家自然科学基金(30972397和30760193)资助。

参考文献

- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001). Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollution*, 115, 49–64.
- Bi JL, Felton GW (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1511–1529.
- Bown AW, Hall DE, MacGregor KB (2002). Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiology*, 129, 1430–1434.
- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1781–1785.
- Feussner I, Wasternack C (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275–297.
- Gao Y, Jin YJ, Li HD, Chen HJ (2005). Volatile organic compounds and their roles in bacteriostasis in five conifer species. *Journal of Integrated Plant Biology*, 47, 499–507.
- Gouinguéné SP, Turlings TCJ (2002). The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, 129, 1296–1307.
- Graus M, Schnitzler JP, Hansel A, Cojocariu C, Rennenberg H, Wisthaler A, Kreuzwieser J (2004). Transient release of oxygenated volatile organic compounds during light-dark transitions in grey poplar leaves. *Plant Physiology*, 135, 1967–1975.
- Grote R, Keenan T, Lavoie AV, Staudt M (2010). Process-based simulation of seasonality and drought stress in monoterpene emission models. *Biogeosciences*, 7, 257–274.
- Hartikainen K, Nerg A, Kivimäenpää M, Kontunen-soppela S, Mäenpää M, Oksanen E, Rousi M, Holopainen T (2009). Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiology*, 29, 1163–1173.
- Hatanaka A (1993). The biogenesis of green odour by green

- leaves. *Phytochemistry*, 34, 1201–1218.
- Holopainen JK (2011). Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? *Tree Physiology*, 31, 1356–1377.
- Hu ZH, Shen YB, Luo YQ, Shen FY, Gao HB, Gao RF (2008). Aldehyde volatiles emitted in succession from mechanically damaged leaves of poplar cuttings. *Plant Biology*, 51, 269–275.
- Hu ZH, Shen YB, Su XH (2009). Saturated aldehydes C₆–C₁₀ emitted from ashleaf maple (*Acer negundo* L.) leaves at different levels of light intensity, O₂, and CO₂. *Journal of Plant Biology*, 52, 289–297.
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J (2005). Volatile C₆-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against botrytis cinerea in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1093–1102.
- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001). Wound signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1–9.
- Li PM (李鹏民), Gao HY (高辉远), Strasser RJ (2005). Application of the fast chlorophyll fluorescence induction dynamics analysis in photosynthesis study. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), 31, 559–566. (in Chinese with English abstract)
- Loreto F, Barta C, Brillì F, Nogues I (2006). On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant, Cell & Environment*, 29, 1820–1828.
- Loreto F, Schnitzler JP (2010). Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science*, 15, 154–166.
- Matsui K, Kurishita S, Hisamitsu A, Kajiwara T (2000). A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. *Biochemical Society Transactions*, 28, 857–860.
- Niinemets Ü, Loreto F, Reichstein M (2004). Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science*, 9, 180–186.
- Pegoraro E, Rey A, Bobich EG, Barron-Gafford G, Grieve KA, Malhi Y, Murthy R (2004). Effect of elevated CO₂ concentration and vapour pressure deficit on isoprene emission from leaves of *Populus deltoides* during drought. *Functional Plant Biology*, 31, 1137–1147.
- Peñuelas J, Staudt M (2010). BVOCs and global change. *Trends in Plant Science*, 15, 133–144.
- Piesik D, Pańka D, Delaney KJ, Skoczek A, Lamparski R, Weaver DK (2011). Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal of Plant Physiology*, 168, 878–886.
- Ping LY (平立岩), Shen YB (沈应柏), Jin YJ (金幼菊), Hao JH (郝建华) (2001). Leaf volatiles induced by mechanical damage from diverse taxonomic tree species. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 43, 261–266. (in Chinese with English abstract)
- Sallas L, Kainulainen P, Utriainen J, Holopainen T, Holopainen JK (2001). The influence of elevated O₃ and CO₂ concentrations on secondary metabolites of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Global Change Biology*, 7, 303–311.
- Sallas L, Luomala EM, Utriainen J, Kainulainen P, Holopainen JK (2003). Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree Physiology*, 23, 97–108.
- Schaub A, Blande JD, Graus M, Oksanen E, Holopainen JK, Hansel A (2010). Real-time monitoring of herbivore induced volatile emissions in the field. *Physiologia Plantarum*, 138, 123–133.
- Sharkey TD, Wiberley AE, Donohue AR (2008). Isoprene emission from plants: why and how. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 101, 5–18.
- Shen YB (沈应柏) (2008). *Responses of Populus simonii × Populus pyramidalis 'Opera 8277' Cuttings to Wounding and Airborne Defensive Signals* (合作杨苗木对伤害和气体防御信号的响应). PhD dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 7–35. (in Chinese with English abstract)
- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Matsui K, Takabayashi J (2006). Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 16672–16676.
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P eds. *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London. 445–483.
- Thordal-Christensen H, Zhang ZG, Wei YD, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11, 1187–1194.
- van Heerden PDR, Strasser RJ, Krüger GHJ (2004). Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as

- indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiologia Plantarum*, 121, 239–249.
- van Heerden PDR, Tsimilli-Michael M, Krüger GHJ, Strasser RJ (2003). Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum*, 117, 476–491.
- Wildt J, Kobel K, Schuh-Thomas G, Heiden AC (2003). Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants. Part II: Emissions of saturated aldehydes. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 45, 173–196.
- Wilkinson MJ, Monson RK, Trahan N, Lee S, Brown E, Jackson RB, Polley HW, Fay PA, Fall R (2009). Leaf isoprene emission rate as a function of atmospheric CO₂ concentration. *Global Change Biology*, 15, 1189–1200.
- Wojtaszek P (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322, 681–692.
- Xue W (薛伟), Li XY (李向义), Lin LS (林丽莎), Wang YJ (王迎菊), Li L (李磊) (2011). Effects of short time heat stress on photosystem II, rubisco activities and oxidative radicals in *Alhagi sparsifolia*. *Chinese Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), 35, 441–451. (in Chinese with English abstract)
- Zeringue HJ (1991). Effect of C₆ to C₉ alkenals on aflatoxin production in corn, cottonseed, and peanuts. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2433–2434.
- Zhang FJ (张凤娟), Li JQ (李继泉), Xu XY (徐兴友), Meng XD (孟宪东), Chen FJ (陈发菊) (2007). The volatiles of two greening tree species and the antimicrobial activity. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 34, 4973–4978. (in Chinese with English abstract)
- Zuo ZJ (左照江), Zhang RM (张汝民), Wang Y (王勇), Hou P (侯平), Wen GS (温国胜), Gao Y (高岩) (2010). Analysis of main volatile organic compounds and study of above-ground structures in *Artemisia frigida*. *Chinese Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), 34, 462–468. (in Chinese with English abstract)

责任编辑: 李凤民 责任编辑: 王 葳