

红松木倾斜角度对其木材形成组织的影响

石江涛¹, 孙庆丰², 邢东², 刘一星², 李坚^{2*}

(1. 南京林业大学木材工业学院, 江苏 南京 210037; 2. 东北林业大学生物质材料与科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为研究树干倾斜角度对应压木木材细胞壁形成过程的影响,以7年生红松苗木为研究对象,对其茎干进行不同角度的倾斜处理。先后测定苗木的树高和胸径、木材形成组织中的木质素和纤维素含量、傅里叶红外变化光谱和极性代谢产物。结果表明:倾斜角度对高生长的抑制作用非常显著,对直径生长无显著影响。倾斜后木质素含量增加,纤维素含量降低;倾斜角度对木质素和纤维素含量均有显著影响。不同倾斜角度 FTIR 吸收峰强度也有明显差异。糖类、脂类、氨基酸、含氮化合物、有机酸等代谢物随倾斜角度呈现不同的变化规律。因此,红松苗木 50° 倾斜处理形成典型的应压木结构。代谢物相对含量的变化规律与形成的木材宏观性质相吻合。代谢物的变化也反映了树木对应力刺激的响应机制。

关键词:木材形成;应压木;代谢物;倾斜角度

中图分类号:S791.247

文献标识码:A

Effect of Stem Bending Angle on Formative Tissue During Wood Formation of *Pinus koraiensis*

SHI Jiang-tao¹, SUN Qing-feng², XING Dong², LIU Yi-xing², LI Jian²

(1. College of Wood Science and Technology, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Key Laboratory of Bio-based Material Science and Technology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to study the effect of stem inclination angle on compression cell wall formation, seven-year-old *Pinus koraiensis* was chosen for different mechanical bend angle treatments. The height and diameter at breast height, lignin and cellulose content, FTIR and polar metabolites were measured. The results showed that high growth rate was obviously restrained by inclination angle but diameter growth showed no marked effect. The lignin content increased and the cellulose content decreased in bended samples, and all showed significantly effected by inclination angle. FTIR also showed distinctly difference among different angles. The metabolites like carbohydrate, lipids, amino acids, N-compounds and organic acids showed different varying patterns. Therefore, the typical compression wood was formed when the stem was bended by 50° in *P. koraiensis*. The variation pattern of metabolites was in accord with macroscopic properties in newly formed wood. The changes of metabolites reflected the response mechanism in stress of tree.

Key words: stem bending angle; wood formation; compression wood; metabolites

树木的生长发育与环境因子具有密不可分的关系,环境因子的改变必然使树木产生的木材结构与化学性质发生变异,并将影响其最终的应用性能。

应力木是树木受外界刺激(重力、风、雪、机械力等)后,试图使倾斜或弯曲的主干或枝条回复原来的生长方向,形成的一种具有特殊解剖结构和化学组成

收稿日期:2012-04-15

基金项目:国家外专局高等学校学科创新引智计划项目(B08016)

作者简介:石江涛(1983—),男,陕西白水人,博士,研究方向为生物木材学. Email: shijiangtao128@163.com

*:通讯作者

的木材^[1]。针叶树应力木结构常出现在倾斜或弯曲树干的下侧,被称为应压木^[2]。较高的木质素含量、横截面管胞近圆形、细胞壁增厚、螺旋裂隙加剧、较大的微纤丝倾角等是应压木显著的特征。该木材在木材加工行业常被视为一种天然缺陷。对应压木的研究多集中在解剖结构和化学组成。但是,它可以作为研究木材细胞壁生物合成的有效实验系统^[3]。

树木茎干的机械弯曲处理可以诱导产生应压木。应压木的形成程度不仅与倾斜时间有关,还与倾斜角度有关。过去的研究表明,应压木与正常木中纤维素合成相关基因、木质素合成相关基因、细胞骨架运动蛋白基因等的表达量差异显著^[4-6],其蛋白质水平上也存在不同^[7-8]。而代谢物是在基因指导蛋白质调控下的最终产物,也是树木对环境变化响应机制的主要层面。所以两种木材形成过程中代谢物质之间会有差异。应压木中木质素合成的重要单体相对含量高于正常木^[9],纤维素合成相关的底物和单糖相对含量低于正常木^[10]。

本文以红松苗木为研究对象,对其茎干进行不同角度的倾斜处理,分析应压木木材形成组织的木质素和纤维素含量、红外光谱及代谢物质,总结各化学物质在不同倾斜角度间的变化规律,以期揭示应压木木材细胞壁生物合成提供一些参考。

1 材料与方法

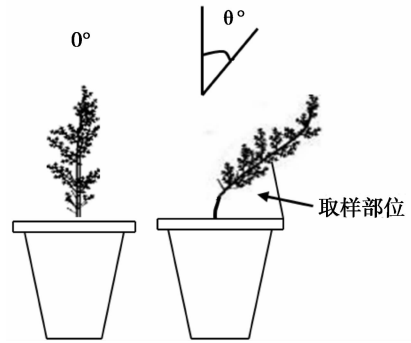
1.1 试剂

核糖醇(Ribitol, CAS No. 488-81-3)、甲氧胺盐酸盐(Methoxyamine hydrochloride, CAS No. 593-56-6)、吡啶(Pyridine, CAS No. 110-86-1)、四十烷(Alkanes, CAS No.)、N-甲基-(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺(MSTFA, CAS No. 24589-78-4)均购于美国Sigma公司;甲醇(液相色谱级)、氯仿(液相色谱级)购于天津科密欧化学试剂有限公司。

1.2 植物材料样品制备

实验于2010年10月至2011年7月在东北林业大学花卉生物工程研究所完成。选7年生健康红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)25株,分为5组,每组5株重复;平均株高63.03 cm、平均胸径1.05 cm;栽植于塑料盆中,基质是黑土和复合肥的混合物,定期浇水除草。4月初将每组幼苗茎干分别弯曲10°、30°、50°和70°(图1)。另一组不弯曲,作为参照。弯曲固定3个月后统一采集木材形成组织。样品采集于距树干基部10 cm处。应压木为茎干倾

斜部位下侧。采集方法参照文献[10]。依次除去树皮、韧皮部和形成层,用手术刀刮取木材形成组织,液氮处理后贮存于-80℃冰箱备用。取适量冷冻木材形成组织,置于预冷研钵中,在液氮条件下充分研磨。真空冷冻干燥。



0°为对照组,θ°为倾斜角度

图1 苗木茎干倾斜处理示意图

1.3 生长量与主要化学成分测定

树高采用卷尺从地面往上沿着树干的倾斜方向至树干顶部。胸径采用游标卡尺测量,位置在距离土层表面10 cm处,卡尺与树干生长方向垂直。木质素含量测定采用乙酰溴紫外光谱法^[11-12]。纤维素含量测定采用蒽酮比色法^[13]。

1.4 傅里叶红外光谱分析 (FTIR)

采用溴化钾压片法。美国尼高力(Nicolet)公司Magna-IR 560 E. S. P型傅里叶变换红外光谱仪。取适量样品与KBr压片后用傅立叶变换红外光谱仪测试,光谱分辨率设置为4 cm⁻¹,扫描次数40次。用OMNIC V7.0软件分析测量红外光谱中吸收峰的峰位和峰高。以吸收峰两侧最低点的切线做基线,从吸收峰顶端向横轴引垂线,垂线与基线的交点到吸收峰顶端的距离为峰高。

1.5 代谢物的提取及衍生化

代谢物的提取参考文献[14]。称取50 mg ± 2 mg -80℃冷冻的木材形成组织,加入1 mL -20℃预冷100%甲醇和45 μL核糖醇(2 mg · mL⁻¹贮存于蒸馏水,内标物质),振荡10 s;混合物在70℃、950 r · min⁻¹条件下孵育15 min后12 000 g离心10 min;取500 μL上清液置于新的离心管中,加入等体积-20℃预冷的氯仿,振荡10 s;混合物在37℃、950 r · min⁻¹条件下孵育5 min;然后加入500 μL 4℃保存的蒸馏水,振荡15 s。4 000 g离心15 min后将上层液(甲醇/水相)相转移至新离心管-80℃贮存备用。

取 200 μL 样品于 -60°C 冷冻真空干燥 4 h; 加入 50 μL 溶液 A (Methoxyamine hydrochloride 溶于 Pyridine, 浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 2 h; 加入 100 μL 溶液 B (Alkanes 溶于 MSTFA, 浓度为 $20\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 30 min; 使衍生化反应充分进行, 室温静置过夜。

GC/MS 分析在 Varian450GC-240MS (美国) 气相色谱质谱联用仪上进行。色谱柱为 VF-5ms ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$)。气相色谱条件设置^[9-14]如下: 进样口温度 250°C , 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 色谱柱初始温度 70°C , 保持 1 min, 以 $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 300°C 保持 5 min, 再冷却到 70°C 。1 个样品用时 52 min。载气为氮 (99.99%), 流量为 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 分流 50:1 000。质谱条件: 电离方式为电子轰击源 (EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度 300°C , 接口温度 250°C , 扫面质量范围 $50\sim 1\ 000\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 。

1.6 代谢物鉴定和数据处理

用软件 MS Workstation version 6.9.3 对气相色谱质谱图进行读取。未知化合物质谱图经计算机检索, 与 NIST2005 (National Institute of Standard and Technology, USA) 质谱库相匹配, 相似度达到 79% 以上, 并结合人工图谱解析及参考文献相对确认代谢物质的组份^[15]。用 Origin 8.0 进行数据分析作图。根据 GC-MS 色谱图中各峰的保留时间选择共有峰, 采集每个色谱图中峰与内标峰的峰面积数据, 用色谱峰与内标峰面积比值 (相对峰面积) 来表示代谢物的含量。

2 结果与分析

2.1 倾斜角度对红松株高和胸径的影响

木材形成是树干不断进行高生长和直径生长的结果。图 2 是红松苗木在不同倾斜角度处理下的树干高度和胸径生长的变化模式。由图可知, 在倾斜 10° 时, 株高和胸径生长都有小幅增加; 而在 30° 时, 两者呈现大幅度减弱; 50° 时树高生长继续下降趋势, 而胸径小幅增加; 随后至 70° 树高趋稳, 胸径生长有小幅减小。总体来说, 倾斜处理 10° 时, 红松苗木树高和胸径生长量有增加趋势, 30° 至 70° 处理时, 树高和胸径生长受到抑制, 生长量呈现下降趋势。树高生长的减小幅度更加明显。即红松苗木倾斜处理后, 其高生长和直径生长都受到抑制。方差结果显示倾斜角度对高生长有非常显著的影响; 对直径生长无显著影响。众多研究表明, 一些针叶材树种如

花旗松 (*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco)、加拿大铁杉 (*Tsuga canadensis* (Linnaeus) Carrière)、美国五针松 (*Pinus strobus* Linn.)、湿地松 (*Pinus elliotii* Engelm.)、火炬松 (*Pinus taeda* L.) 等, 树干的倾斜处理会抑制其轴向生长, 使生长速度减慢^[16-17]。这与本研究的结论一致。刘亚梅等^[18]研究发现, 火炬松苗木树干倾斜处理 3~12 个月后, 随树干倾斜角度增加, 树干高生长并未呈现明显的变化趋势; 而处理 15~21 个月时, 才出现随倾斜角度增加树高生长减小趋势。但是在本研究中, 处理 3 个月时, 树干高生长就随倾斜角度的增大而减小。

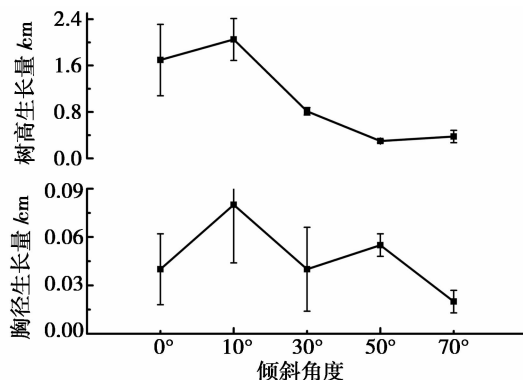


图 2 3 个月后倾斜角度对红松树干高度和胸径生长的影响

2.2 木质素和纤维素含量

不同倾斜角度处理后, 木材形成组织中木质素和纤维素含量变化如图 3 所示。处理后木质素含量均高于正常植株, 而纤维素含量均低于正常植株。在倾斜 10° 处理时, 木质素和纤维素含量变化比较明显; 30° 时增加量和减少量略有缩小; 50° 和 70° 时变化幅度有所增大。总体来说, 随倾斜角度的增大, 木质素含量增加, 而纤维素含量减少。方差分析结果表明倾斜角度对木质素含量和纤维素含量均有显著的影响。该结果说明了其具有应压木的化学组成特征, 可以从该水平上认识应压木的形成过程。

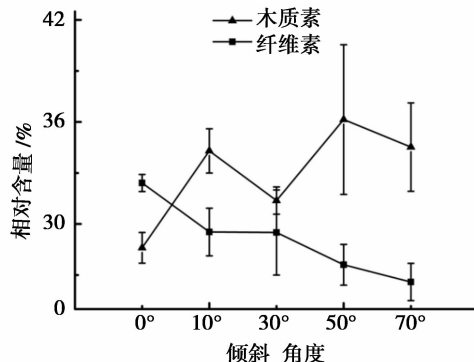


图 3 3 个月后倾斜角度对木材形成组织木质素和纤维素含量的影响

2.3 FTIR 分析

红松苗木茎干不同角度弯曲处理后木材形成组织的 FTIR 光谱如图 4 所示。各吸收峰的相对强度以占最强吸收峰吸光度的百分比表示,并经过基线校正和归一化处理的谱图基线为测量依据。由图可见,倾斜后木材形成组织的 FTIR 光谱图在 $2\ 927\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 740\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 510\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 425\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 371\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 266\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 232\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 160\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收带发生了明显变化,吸收峰的归属按参考文献 [19-20]。处理后, $2\ 927\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收带减弱,这主要是新产生的木材组织中纤维素含量降低的缘故;随着倾斜角度的增大,吸收呈现减弱趋势。 $1\ 740\text{ cm}^{-1}$ 由非共轭羰基伸缩振动引起,来自多糖物质特别是半纤维素的贡献;倾斜处理后其吸收也明显减弱,并在 50° 时达到最小值。 $1\ 510\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 457\text{ cm}^{-1}$ 与苯环碳骨架伸缩振动有关,主要来自木质素贡献;倾斜处理后它们的吸收均增强,并都在 50° 时达到最大值。 $1\ 372\text{ cm}^{-1}$ 是纤维素和半纤维素 C-H 弯曲振动引起的,也被认为是纤维素的特征吸收峰之一;倾斜处理后其吸收均减弱,吸收强度与倾斜角度并没有明显变化规律。 $1\ 266\text{ cm}^{-1}$ 与苯环-氧键伸缩振动有关,来自于木质素的贡献;其吸收随倾斜角度的增大而增强, 50° 时达到最大值。 $1\ 232\text{ cm}^{-1}$ 是木质素酚羟基 C-O 伸缩振动引起的,在正常生长的苗木中并没有明显吸收峰,倾斜后其强度随倾斜角度增大而增强, 50° 时达最大值。 $1\ 159\text{ cm}^{-1}$ 和 900 cm^{-1} 吸收主要来自纤维素和半纤维素,处理后吸收强度减弱;在 10° 时减弱最明显。FTIR 结果验证了倾斜处理后,木材形成的木质素含量增加,而纤维素含量降低。

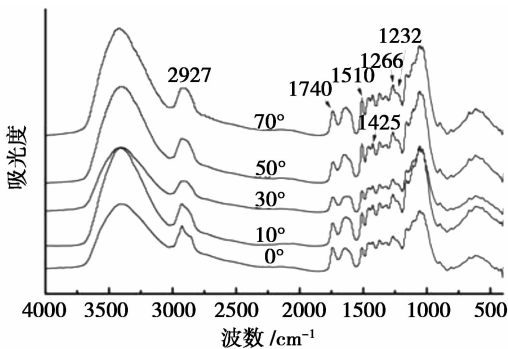


图4 3个月后不同倾斜角度木材形成组织的红外光谱图

2.4 木材形成组织代谢物的变异分析

木材形成组织中代谢物可归类为糖类、脂类、含氮化合物、氨基酸、有机酸和未知化合物。其中糖类

含量较高、未知化合物也占有较大比例。不同倾斜角度下木材形成组织中部分代谢物含量的变化趋势如图 5 所示。倾斜处理后,木材形成组织中硬脂酸和软脂酸含量都有升高,并且在 50° 时增幅显著;单硬脂酸甘油酯也具有相似的表达模式。倾斜处理后,糖类物质含量总体来说降低,但没有共同的变化规律。 α 、D-吡喃葡萄糖苷含量随倾斜角度增大而降低, 50° 时在 0.01 水平呈显著差异。果糖含量在茎干倾斜 0° 至 30° 间降低,但 50° 时与对照组接近, 70° 时略有降低。相比对照组,葡萄糖含量在 10° 稍有增加,但 30° 至 70° 为降低趋势。松二糖的变化不是很明显。倾斜树干木材形成组织中天冬氨酸含量低于对照植株,且随着倾斜角度的增大而降低。L-脯氨酸含量在 10° 处理时增加,但在 30° 至 70° 时降低。胺类物质含量在 0° 至 30° 间变化不明显,但在 50° 时显著增加, 70° 又回落,与脂类具有相似的变化模式。木材形成组织中有机酸种类较多,随倾斜角度的增加其含量增加降低互现。倾斜处理后,辛二酸和 1-环己烯-1-羧酸含量均降低, 10° 时降幅较大, 30° 时降幅缩小, 50° 降至最低,分别在 0.01 和 0.05 水平差异显著。倾斜处理后苹果酸含量增加, 10° 时增幅最大。乳酸和草酸含量在 0° 至 30° 变化不明显, 50° 突然增加至最大, 70° 又有所降低。

3 结论与讨论

本研究对红松幼苗茎干在 0° 、 10° 、 30° 、 50° 和 70° 进行弯曲处理,其生长性状、化学组成和代谢物含量皆发生变化。人工种植针叶树轻度的应压木通常具有较高的生长速率,轻度应压木的木材性质和特征结构介于正常材和重度应压木之间。这与 Donaldson 等的研究结果相似^[21]。倾斜角度大于 30° 后,高生长和直径生长均受到抑制。

特殊的木材组织结构可以用来判定或评估应力木形成程度。Yamashita 等^[6] 发现日本柳杉幼苗生长层宽度、横截面细胞壁占有率和木质素含量在 30° 增至最大值,形成应压木试图将倾斜树干回复垂直生长;角度大于 30° 会形成最大程度的应压木,但树干无法快速完全回复垂直生长。本实验测定倾斜条件下红松木材形成组织的木质素和纤维素含量,与成熟木材具有相似的变化趋势。但与其它针叶材不同的是木质素含量在 50° 处理时达到最大值,而且傅里叶变换红外光谱显示木质素贡献的吸收峰强度也呈现相同变化规律。从代谢物的角度来讲,木质素

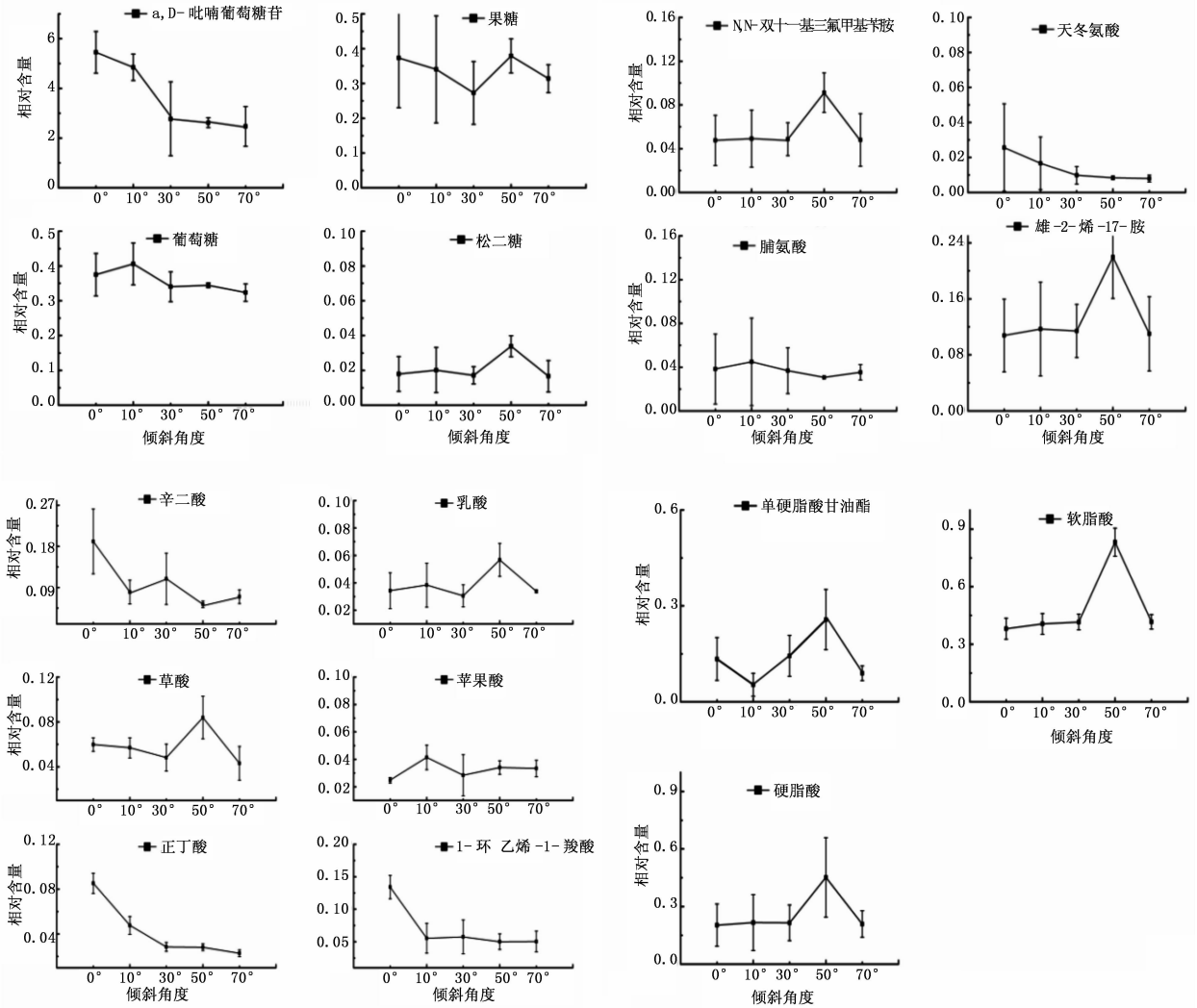


图5 3个月后不同倾斜角度木材形成组织中部分代谢物含量变化(数据点用平均值+标准差表示,对照组为0°组)

合成量的增加,碳元素的代谢和流向发生改变,使多糖物质(纤维素、半纤维素等)的含量相对减少。

在新陈代谢过程中,大多数物质都不是稳定化合物,都是在某代谢网络或途径中的中间物或起始物。所以它们含量的变化常由两种原因造成。其一,上游代谢途径发生变化;其次是下游生理反应受到影响。假设木材形成组织中葡萄糖含量的增高,可能是同化作用增强,也有可能是呼吸作用受到抑制而无法有效利用糖类进行下游贮能反应。

红松苗木木材形成组织葡萄糖含量在轻微倾斜(10°)处理时稍有增加,反映树木快速生长促进了蔗糖的生成。随后过大倾斜角度处理后,树木生长受到强烈抑制,果糖和葡萄糖的迅速减少,将导致木材组织中纤维素合成量减少。另外,单糖含量的迅速降低,也表明有氧呼吸受限,无氧呼吸可能增强,乳酸含量的变化证实了这一点。树木生长受到限制

后,糖类物质的次生代谢途径被改变,丙三醇和脂类物质含量随倾斜角度的增加而升高,表明有机质合成纤维素的机会下降,最终使红松倾斜处理后木材形成组织中纤维素含量降低。一些研究表明,脯氨酸富集蛋白的基因在弯曲树干未成熟木质部中的表达量远高于正常木^[22-23]。该蛋白可能为木质素单体聚合作用的起始和反应提供位点。应压木细胞壁中过量的脯氨酸富集蛋白基因可能调控应力条件下木质素的生物合成^[24]。

参考文献:

- [1] 崔克明. 植物发育生物学[M]. 北京:北京大学出版社,2007
- [2] Du S, Yamamoto F. An overview of the biology of reaction wood formation [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(2): 131-143
- [3] 崔克明. 木质部细胞分化的程序 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(8):1735-1748

- [4] Koutaniemi S, Warinowski T, Karkonen A, *et al.* Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(3): 311–328
- [5] Saori Yamashita, Masato Yoshida, Hiroyuki Yamamoto, *et al.* Screening genes that change expression during compression wood formation in *Chamaecyparis obtuse* [J]. *Tree Physiology*, 2008, 28(9): 1331–1340
- [6] Yamashita S, Yoshida M, Yamamoto H. Relationship between development of compression wood and gene expression [J]. *Plant Science*, 2009, 176: 729–735
- [7] Plomion C, Pionneau C, Brach J, *et al.* Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 959–969
- [8] Mast S, Peng L, Jordan T W, *et al.* Proteomic analysis of membrane preparations from developing *Pinus radiata* compression wood [J]. *Tree Physiology*, 2010, 30(11): 1456–1468
- [9] Yeh T, Morris C, Goldfarb B, *et al.* Utilization of polar metabolite profiling in the comparison of juvenile wood and compression wood in loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. *Tree Physiology*, 2010, 269(11): 1497–1503
- [10] 石江涛, 李 坚. 红松正常木与应力木木材形成组织中极性代谢物对比分析 [J]. *北京林业大学学报*, 2011, 33(6): 196–200
- [11] Iiyama K, Wallis A F A. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps [J]. *Wood Science and Technology*, 1988, 22: 271–280
- [12] Foster C E, Martin T M, Pauly M. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (Lignocellulosic biomass) part I [J]. *Lignin*, 2010, 37(10): 3791–1745
- [13] 陈钧辉. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [14] Lisec J, Schauer N, Kopka J, *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants [J]. *Nature Protocols*, 2006 (1): 387–396
- [15] Nicolas S, Steinhauser D, Strelkov S, *et al.* GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579: 1332–1337
- [16] Vanhaverbeke D E, Barber J C. Less growth and no increased flowering from changing slash Pine branch angle [J]. *Southeast Forestry Experimental Sta., Research Note*. 1961, 167: 2
- [17] Sinnott E W. Reaction wood and the regulation of tree form [J]. *Amer J Bot*, 1952, 39: 69–78
- [18] 刘亚梅. 人工倾斜树干应力木形成机理研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010, 18–19
- [19] 李 坚. 木材波谱学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [20] 秦特夫, 黄洛华, 李改云. 慈竹, 毛竹木质素的化学官能团和化学键特征研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(3): 161–165
- [21] Donaldson L A, Grace J C, Downes G. Within tree variation in anatomical properties of compression wood in radiata Pine [J]. *IAWA J*, 2004, 25: 253–271
- [22] Déjardin A, Leplé J C, Lesage-Descauses M C, *et al.* Expressed sequence tags from poplar wood tissues—a comparative analysis from multiple libraries [J]. *Plant Biology*, 2004, 6: 55–64
- [23] Whetten R, Sun Y H, Zhang Y, *et al.* Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47: 275–291
- [24] Zhang Y, Sederoff R R, Allona I. Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly Pine trees [J]. *Tree Physiol*, 2000, 20: 457–466