

文章编号: 100F 1498(2004) 02 0172 06

印楝种源间抗寒能力比较研究

廖声熙, 张春华, 李立, 李文良, 赵培仙²

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224;

2. 云南省元谋县林业局, 云南 元谋 651300)

摘要: 通过组织褐变法、膜脂脂肪酸含量分析和电导法配合 Logistic 方程求拐点温度的方法, 对引种的 4 个种源抗寒力进行研究评价。结果表明: (1) 印楝是一种不耐寒的植物, 0℃以下的短暂低温可对其嫩叶造成伤害, 低于-1℃保持 1 h 即可造成部分幼苗死亡; (2) 印楝种源间抗寒能力差异不显著; (3) 叶膜脂脂肪酸组成含量与抗寒力大小无明显相关关系; (4) 印楝 4 种源半致死温度分别为 -1.651、-1.675、-1.750、-1.682℃。根据上述试验研究和冷冻处理实验结果, 4 个印楝种源抗寒力大小排序为 IND95003 > IND95004 > IND95001 > IND95002, 在我国有低温寒害的地区引种印楝应该慎重, 在轻霜地区可选择抗寒力稍强的 IND95003 种源先行试验性引种。

关键词: 印楝; 种源; 抗寒力; 干热河谷

中图分类号: S722.7 文献标识码: A

印楝 (*Azadirachta indica* A. Juss) 属楝科 (Meleacea) 植物, 自然分布于南亚次大陆的热带亚热带地区, 耐旱耐瘠薄, 但对霜冻敏感。它用途广泛, 种子提取物印楝素 (Azadirachtin) 可杀灭 8 目 200 余种昆虫及多种线虫、螨虫, 为当今最有潜力的生物农药最佳原料^[1]。近年来, 我国从印度、缅甸、泰国、多哥等国引种印楝的多个种源, 在我国西南干热河谷地区试种, 生长良好, 造林 3~4 a 开花结实, 种子印楝素含量较高^[2]。目前, 印楝在我国的栽培面积迅速扩大, 遍及云南、广东、海南等 4 省 30 余县, 以云南省面积最大。1999 年, 云南省大部分地区遭遇几十年一遇的低温寒害, 干热河谷区也不能幸免, 印楝普遍遭受寒害, 严重的成片全株死亡。根据区域性引种试验结果, 低温成为扩大印楝引种栽培区域的主要限制性因子。因此, 印楝的抗寒性研究, 特别是印楝种源间抗寒能力差异性的比较, 是今后发展印楝产业的重要途径之一, 对印楝成功引种和发挥出应有的效益具有重要意义。

目前, 评价植物抗寒性大多数采用细胞外渗电导法、褐变观察法和恢复生长法等常用方法。研究证明, 膜系统是植物遭受低温伤害和抵抗低温伤害的关键结构, 低温对膜的伤害可以导致电解质透出率增加, 并明显地先于外部形态的变化, 可作为抗寒性或冻害鉴定的生理指标^[3,4]。电导法是基于这一原理产生的一种测定方法, 即对植物组织采用人工低温处理后, 测定组织的电解质透出率。另外, 在植物细胞膜中, 脂肪酸配比在不同植物的同一部分和在不同环境条件下生长的同种植物中都会有很大的差异, 这就造成了不同抗寒能力的植物脂肪酸总

收稿日期: 2003 06 12

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2000C0027Q)、国家“十五”农业科技攻关课题 (2001BA606A07) 和科技部公益研究所专项“干热河谷生态综合整治技术与示范”

作者简介: 廖声熙 (1973-), 男, 贵州黎平人, 助理研究员。

的不饱和度的变化,而这种变化与植物对环境的适应性有关^[5]。一般认为,植物膜系统中饱和脂肪酸含量高可以维持膜在低温条件下的液晶相,并保持膜的流动性和正常功能。大量研究结果显示,膜系统中磷脂及脂肪酸的不饱和性与细胞抗冷性关系密切,膜脂不饱和度大的植物抗寒性也较强^[6,7]。为此,本研究通过电导法、膜脂脂肪酸含量分析、褐变观察法和恢复生长法,来观察印楝不同种源幼苗冷冻处理后的生长表现,测定了叶膜脂肪酸组成含量以及叶细胞电导率,根据试验结果综合比较分析了印楝不同种源的抗寒能力,以期对印楝的引种栽培提供科学依据。

1 试验材料

参试种源为 1995 年从印度引入的 4 个种源,其地理来源见表 1。

材料取自元江试验站中国林科院资源昆虫所 1995 年从印度引入的印楝种源试验林,面积 1.4 hm²,造林密度为 1 112 株/hm²。试验站位于 23°36' N, 101°59' E, 海拔 397 m, 年均温 23.8 °C, 最冷月均温 15.3 °C, 最热月均温 29.4 °C, 极端最高温 42.3 °C, 极端最低温 - 0.1 °C, ≥10 °C 活动积温 8 687 °C, 年均降水量 781 mm, 蒸发量超过 3 000 mm。旱季从 11 月到次年 5 月, 气候炎热干燥, 昼夜温差不大, 终年无霜。造林地为缓坡平台, 土壤为石砾含量较多的燥红土, 有机质含量低, 土壤贫瘠。

表 1 印楝不同种源地理来源

种源号	种源名	国家	纬度	年降水量/mm
IND95001	Man	印度	26°18' N	254~ 381
IND95002	Kul	印度	22°08' N	1 270~ 190 5
IND95003	Kal	印度	23°01' N	1 270~ 190 5
IND95004	Ck	印度	—	—

2 测定内容和方法

2.1 褐变法测定印楝种源间的低温适应性差异

2000 年 9 月用 20 cm × 30 cm 规格营养袋培育印楝 4 个种源的容器苗, 于次年 2 月苗高 20 ~ 30 cm 时, 每个种源选择苗高、地径、长势一致的幼苗 30 株, 在室内进行冷冻处理。处理温度为 - 1 °C (误差为 ±0.5 °C), 处理时间 1 h, 处理后的样品于室内放置 1 d 后, 移到田间苗圃地观察其受冻情况和受冻后的生长表现。

2.2 脂肪酸组成的分析

印楝叶细胞膜脂肪酸组成的测定是在 2003 年 1 月, 采取 4 个种源树冠中部上层成熟叶片样品 100 g, 用恒温干燥箱 80 °C 干燥到恒质量, 送云南省农科院生物所分析中心用气相色谱法分析其脂肪酸组成, 用日本 HP5890A 气相色谱仪, 直接甲酯化, 归一化法定量, 测定并分析了印楝每个种源脂肪酸组成。

2.3 细胞膜透性的测定

电导法是对材料进行人工低温处理后, 测定组织的电解质透出率。它能直接测定细胞膜忍耐低温的能力, 因而能较好地反映植物抗冻能力的变化, 并可据此来区别不同品种的抗冻性差异。具体方法是剪下进入休眠期印楝树冠中部枝条, 用自来水冲洗干净, 再用无离子水洗 3 遍, 纱布包好放在聚乙烯薄膜中, 置于低温冰箱中冷冻。共分 7 个低温处理: 0、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6 °C, 每 12 h 降低 1 °C 的速度降温, 并取出枝条, 从中剪下第 7~ 9 复叶的小叶组成混合样, 用 1/1000 天平称取 1 g 样品, 剪成 2 mm 薄片, 放入烧杯中, 加入 100 mL 无离子水, 摇

动后静置 10 h 后,用 DDS-11C 型电导仪测定电导值,然后将样品加热至 98 ℃持续 15 min,静置冷却后测电导值。以相对电导率表示原生质膜透性的大小,配合 Logistic 方程,确定不同印楝种源的半致死温度和抗寒力。

计算公式:电解质渗出率(%) = 浸泡液电导值/煮沸后浸泡液电导值 × 100%。

运用 SPSS 统计软件计算 Logistic 方程 $y = \frac{k}{1 + ae^{-bx}}$ 的参数 a, b , 其中 $k = 1$, 求二阶导数,并令其等于零,解出方程 $x = \frac{1}{b} \ln a$ 的 x 值,即为该曲线的拐点温度,作为半致死温度(LT₅₀),即 $LT_{50} = \frac{1}{b} \ln a$ 。

3 研究结果

3.1 印楝不同种源幼苗冷冻处理后的受害情况比较

冷冻处理实验结果如表 2,印楝各种源幼苗在低于 0 ℃的短暂低温处理后,叶片和顶芽均受到不同程度的伤害,再经 -1 ℃低温处理 1 h 后,幼苗遭受严重伤害,但各种源幼苗间的受害程度有一定差别。从叶片伤害率看,IND95003 抗寒表现

表 2 低温处理苗木受害状况及生长恢复情况

种源	叶片受害率	顶芽干枯率/%	新芽萌发率/%	存活率/%
IND95001	叶全卷、失绿,受害率 100%	100	43.3	60.0
IND95002	叶全卷、失绿,受害率 100%	100	30.0	40.0
IND95003	叶部分卷、失绿,受害率 70%	60	73.3	80.0
IND95004	叶部分卷、失绿,受害率 95%	100	36.6	66.6

最好,其次为 IND95004,IND95001 和 IND95002 表现差;顶芽干枯率除 IND95003 为 60% 外,其余 3 个种源都为 100%,说明 IND95003 种源在苗期抗寒力较强;从生长恢复能力来看,IND95003 种源受冻后第 5 天即有新芽萌发,第 6 天大量萌芽,萌芽率达 73.3%,而其它种源在第 6 天以后才有新芽萌发,萌芽株数比例均低于 50%。另外,冷冻处理 1 个月后,4 个种源苗存活率分别为 60%、40%、80%、66.6%,IND95003 种源最高。根据各个种源受害程度、受冻后生长恢复能力和存活率的综合分析,其抗寒能力排序大致为:IND95003 > IND95004 > IND95001 > IND95002。

3.2 印楝不同种源叶细胞膜脂肪酸组成与抗寒能力的关系分析

印楝叶细胞膜脂肪酸的测定结果表明:主要由棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)组成,各种源在总脂肪酸含量上几乎相同,在脂肪酸组成上稍有差别,部分种源含有少量廿碳烯酸(C20:1)。在组成成分中,以 C18:3 为最大组分,含量占 53% 以上,3 个主要成分 C18:3、C18:2 和 C16:0 的含量占脂肪酸总量的 88.4% ~ 89.8%。不同种源在脂肪酸配比上差异不明显,4 个种源饱和脂肪酸分别占总脂肪酸含量的 23.4%、24.6%、24.4%、24.8%,IND95001 最低,IND95004 最高(表 3)。

印楝不同种源叶细胞膜脂肪酸不饱和度略有不同。从不饱和脂肪酸指数上看,印楝 4 个种源的 IUFA 分别为 16 295.58、16 016.72、16 151.40、15 618.09,以 IND95001 的最高,IND95004 最低;而不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比率,则是 IND95001 的不饱和比较高,为 3.2,IND95003、IND95002 居其次,分别为 3.11 和 3.05,IND95004 的不饱和比只有 3.04,比 IND95001 种源低 5%。

表 3 印楝种源叶片膜脂脂肪酸组成*

种源名	棕榈酸 (C16:0)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	α -亚麻酸 (C18:3)	廿碳烯酸 (C20:1)	总脂肪酸 含量/%	饱和占 总含量/%	不饱和比 $\Sigma U/\Sigma S$	脂肪酸不饱和 指数 IUFA
IND95001	16 518	2 775 2	12 524	6 274	43 794	0 559 9	82 444	23.74	3.20	16 295.58
IND95002	17 129	3 114 1	9 317	5 320	47 544	—	82 424	24.75	3.05	16 016.72
IND95003	17 354	2 748 3	7 909	4 487	48 418	1 523 8	82 440	23.91	3.11	16 151.40
IND95004	16 870	3 420 4	11 505	5 756	44 282	—	81 834	24.80	3.04	15 618.09

注: IUFA = [(18:1)摩尔分数+ (18:2)摩尔分数×2+ (18:3)摩尔分数×3] × 100;

$\Sigma U/\Sigma S = \Sigma(18:1+ 18:2+ 18:3)/\Sigma[16:0 + 18:0]$, 指不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之比

有关研究表明, 植物的抗寒性与植物细胞膜脂肪酸成分有密切的关系^[7,8]。印楝 4 种源的不饱和比以及不饱和指数比较的大小顺序为 IND95001> IND95003> IND95002> IND95004, 与冷冻处理的抗寒能力比较结果不相符; 从印楝磷脂脂肪酸配比与抗寒力两者的相关关系来看, 两者之间也没有明显的相关关系, 这可能与印楝的抗寒能力较弱有关。

3.3 印楝种源半致死温度的比较

从 Dexter 等^[9] 使用电导法测定植物抗性以来, 这种方法得到了不断完善和发展, Sukumaran 等^[10] 提出了电解质透出率达 50% 时为半致死温度(简称 LT₅₀)的观点, 但半致死温度并不总是表现为电解质透出率达 50% 时的温度。Rajashekar^[11] 利用 logistic 曲线描述低温对植物细胞膜的伤害过程, 提出曲线拐点为 LT₅₀的观点, 现在这种观点在我国得到了广泛的认同^[12-15]。本研究采用这一方法对印楝 4 个种源进行测定计算, 结果如表 4。

表 4 处理温度与印楝叶细胞伤害率的关系

种源	处理温度/℃							Logistic 方程的参数		曲线拟合度		拐点温度
	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	a	b	r	p	LT ₅₀
IND95001	8.89	18.30	28.09	33.12	49.87	54.38	58.99	0.076 5	1.556 6	0.976 3	< 0.01	- 1.651
IND95002	11.90	18.60	19.42	21.24	45.47	50.57	60.15	0.080 1	1.506 8	0.964 5	< 0.01	- 1.675
IND95003	11.75	19.73	20.80	23.98	42.47	45.42	61.45	0.075 2	1.476 9	0.976 0	< 0.01	- 1.752
IND95004	10.11	18.55	19.46	19.48	20.65	35.25	63.20	0.090 4	1.429 0	0.889 0	< 0.05	- 1.682

从以上结果看, 利用电解质渗出率配合 Logistic 方程求印楝 4 个种源的半致死温度(LT₅₀), 方程的拟合度均达到显著水平。结果表明, 不同种源的半致死温度不同, 但差别不大, 其中 IND95003 最低(- 1.752 ℃), 以后依次是 IND95004(- 1.682 ℃)、IND95002(- 1.675 ℃)、IND95001(- 1.651 ℃)。根据半致死温度越低, 抗寒性越强, 印楝 4 个种源 LT₅₀的比较结果与幼苗冷冻处理后生长恢复观察结果十分接近, 说明电解质渗出率配合 Logistic 方程求 LT₅₀的测定方法比较准确, 可以作为印楝种源间抗寒能力评价的方法。根据上述结果综合比较, 印楝种源的抗寒能力大小顺序为: IND95003> IND95004> IND95002> IND95001。

4 结果与讨论

(1) 印楝叶细胞膜脂肪酸组成主要是棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3), 部分种源含有少量廿碳烯酸(C20:1)。各种源在总脂肪酸含量上几乎相同, 在脂肪酸组成上稍有差别。从不饱和脂肪酸配比和含量上分析印楝各种源的抗寒能力差异, 两者之间无明显相关关系, 这可能与印楝为热带亚热带树种有关。

(2) 根据电导法结合 Logistic 方程所确定的印楝 4 个种源半致死温度分别为 $-1.752\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IND95003)、 $-1.682\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IND95004)、 $-1.675\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IND95002)、 $-1.651\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IND95001), 其平均值为 $-1.69\text{ }^{\circ}\text{C}$, 仅比冰点温度 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稍低。另外, 从田间生长和冷冻处理观察来看, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的短暂低温可对其嫩叶及茎尖造成伤害, 低于 $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 1 h 即可造成部分幼苗死亡, 因此得出印楝是一种不耐低温的植物, 不适宜在低温地区引种栽培。

(3) 根据低温处理受害及恢复生长状况、叶膜电导率变化等指标综合评定印楝 4 种源的抗寒能力大小排序为 IND95003 > IND95004 > IND95001 > IND95002, IND95003 种源较其他 3 个种源抗寒能力稍强, 种源间抗寒能力差异不明显。另一方面, 印楝幼苗经低温处理后, 都有一定恢复生长能力, 其中 IND95003 种源处理后存活率为 90%, 萌芽率超过 70%, 说明印楝有一定的抵抗短暂低温的能力, 可在我国干热河谷有微霜的地区先行试验性引种, 然后再逐步向北和气温更低的地区扩展。

(4) 在植物抗寒性测定方法上, 本研究用电导法对印楝不同种源测得的结果, 与植株幼苗低温冷冻处理的受害结果基本吻合, 可以作为评价印楝等不耐寒树种抗寒能力的一个有效方法。

参考文献:

- [1] Schmutterer H. The Neem Tree[M]. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Gemary. 1995
- [2] 廖声熙, 刘娟, 和菊, 等. 印楝叶解剖结构与抗旱性关系初步研究[J]. 林业科学研究, 2001, 14(4): 435~ 440
- [3] 陈正洪. 植物抗寒力指标的研究[J]. 湖北林业科技, 1991(4): 17~ 19
- [4] 朱根海, 朱培仁. 小麦抗冻性的季节变化以及温度对脱锻炼的效应[J]. 南京农学院学报, 1984(2): 9~ 15
- [5] 王洪春, 汤章城, 苏维埃, 等. 水稻干胚膜脂脂肪酸组分差异分析[J]. 植物生理学报, 1980, 6(3): 227~ 235
- [6] 王毅, 杨宏福, 李树德. 园艺植物冷害和抗冷性的研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 239~ 244
- [7] 沈漫. 不同抗寒性的杜鹃品种叶片磷脂和脂肪酸组成差异性比较分析[J]. 南京林业大学学报, 1997, 21(2): 66~ 69
- [8] 邓令毅, 王洪春. 葡萄的膜脂和脂肪酸组分与抗寒性关系的研究[J]. 植物生理学报, 1982, 8(3): 273~ 283
- [9] Dexter S T, Totting ham W E, Grebe L F. Preliminary results in measuring the hardness of plants[J]. Plants Physiology, 1930, 5: 215 ~ 223.
- [10] Sukumaran N P. An excise leaflet test for evaluating potato frost tolerance[J]. Hortisci, 1972(7): 467~ 468
- [11] Rajashekar C. Membrane structural transitions: Probable relation to frost damage in hardy herbaceous species, Low temperature stress in crop plants[C]. Academic Press, 1979. 255~ 274
- [12] 王洪春. 修正的 logistic 公式在植物抗性研究中的作用[A]. 全国第二次植物抗性生理学术会议论文集, 1984
- [13] 朱根海, 刘祖祺, 朱培仁. 应用 logistic 方程确定植物组织低温半致死温度的研究[J]. 南京农业大学学报, 1985(3): 11~ 16
- [14] 郭修武. 葡萄根系抗寒性鉴定方法研究[J]. 葡萄栽培与酿酒, 1994(4): 26~ 29
- [15] 张德瞬. 八种常绿阔叶树种抗寒性的研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 283~ 287

Cold Resistance Analysis of Neem Provenances

LIAO Sheng-xi¹, ZHANG Chun-hua¹, LI Li¹, LI Wen-liang¹, ZHAO Pei-Xian²

(1. Research Institute of Resources Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Yunnan Forestry Bureau, Yuanmou 651300, Yunnan, China)

Abstracts: Neem grows well in the hot-dry valley in China, but it is easy to be harmed by cold. The cold resistance of 4 provenances was valued through tissue browning method, membrane fatty acid analysis and the electric conductivity method which Logistic equation was used to determine the inflexion temperature. The results showed that: (1) neem is a plant which has low cold resistance, short cold temperature below 0 °C can damage its tender leaves, and 1h temperature below - 1 °C will lead part of infant seedlings to death; (2) the cold resistant capability has no distinct difference among neem provenances; (3) membrane fatty acid content of leaves has no correlative relation with cold resistance; (4) the medium lethal temperatures of 4 neem provenances are - 1.651, - 1.675, - 1.75, - 1.682 °C. According to the results above-mentioned and the results of freezing experiment, the cold resistance sequence of neem provenances is IND95003 > IND95004 > IND95001 > IND95002. The results showed that it should be careful to import neem to cold zones in China, and IND95003 can be used in the zones with light frost.

Key words: neem; provenances; cold resistance; hot dry valley