

文章编号: 1001-1498(2006)05-0590-05

印楝素含量与种子形态及成熟期关系的初步研究

吴疆翀, 彭兴民, 郑益兴, 张燕平*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要:对印楝素含量与种子形态表征及成熟期的关系进行了初步研究。种子的长宽比与印楝素含量相关,并且认为它是能反映印楝素含量的主要表征,得出种子长宽比(X)与印楝素含量(Y)的关系为: $Y = 0.295 + 0.134X - 0.028X^2$ 。种子长宽比接近 2.39 时,种仁的印楝素含量出现峰值,可将印楝种子的形态表征作为初步估测印楝素含量的指示参数,而种子的成熟期与印楝素含量无关。在印楝原料林良种优良母树筛选中应尽量选择各个种源中生长良好、结实量大、种子饱满且长宽比接近 2.39 的植株。

关键词:印楝;印楝素;种子

中图分类号: S727.3

文献标识码: A

A Preliminary Study on the Relationship between the Content of Azadirachtin and the Modality and the Autumn of Seed

WU Jiang-chong, PENG Xing-min, ZHENG Yi-xing, ZHANG Yan-ping

(Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The relationship between the content of azadirachtin, the modality and the autumn of seeds was studied. The length/width ratio of seed is the morphological characteristic which related to the content of azadirachtin among the kernel yield, the kilo-grain weight, and the length/width ratio of seed. The correlation between the length/width ratio of seed (X) and the content of azadirachtin (Y) was concluded as the model: $Y = 0.295 + 0.134X - 0.028X^2$. The content of azadirachtin of kernel reach the peak when its length/width ratio around 2.39. It can be used as an indicating index to estimate the content of azadirachtin of kernel for the selection of superior mother trees. But there is no relation between the autumn of seed and the content of azadirachtin. A tree with high yield of seeds which was full and its length/width ratio around 2.39 is the most promisingly to be a superior mother tree of neem plantation on pesticide purpose.

Key words: *Azadirachta indica*; azadirachtin; seed

印楝 (*Azadirachta indica* A. Juss.) 为楝科 (Meliaceae) 印楝属 (*Azadirachta*) 植物, 热带常绿乔木, 其种仁中含多种活性成分, 可用于制备生物农药。早在几个世纪前, 印度农民就已经用印楝种子粉浸过的水来防治农作物病虫害^[1]。近年来, 由于使用化

学农药造成的环境污染日益严重, 而印楝生物农药降解快无残留, 不污染环境, 害虫也不会对其产生抗药性^[2], 所以目前全世界已有近 20 个国家对印楝生物农药进行研究、开发和利用。1995 年, 印楝被引种到云南省元江县、元谋县等干热河谷地区, 引种栽

收稿日期: 2005-10-14

基金项目: 云南省“十五”攻关项目: “印楝农药原料林优质丰产种源试验示范及印楝杀虫剂研制”(2001NG31)

作者简介: 吴疆翀(1982—), 男, 云南昆明人, 在读硕士生, 主要从事经济林栽培方面的研究。

* 通讯作者

培成功后,经大面积推广种植,至今云南省已种植印楝 7 800 hm²[3],成为目前世界上印楝人工林种植面积最大的地区,并将成为我国印楝生物农药原料的潜在中心产区。

在印楝提取物中,杀虫活性最高的是印楝素(Azadirachtin, AZ)的 11 种异构体及其衍生物:印楝素 A,印楝素 B,印楝素 C, D, E, F, G, H, I, J 和 K。另外,还有 3 种主要的印楝杀虫活性成分——苦味素 Salannin, Nimbin, Gedunin^[4]。其中, AZ-A 的含量占印楝种仁提取物总量的 80%左右,而 AZ-B 在种仁提取物中的含量近 20%^[5]。本文报道印楝农药原料林优良母树筛选研究的部分内容,旨在探讨印楝素含量与种子形态表征及成熟期的关系,为印楝农药原料林良种选育的深入研究积累基础性材料和提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 种子及植株 成熟种子分别采自云南省元谋县和元阳县,树龄为 4~6 年生的初选母树,以株为样本单元,共采集 168 份样本。植株为初选母树及 3 块 15 m × 15 m 标准样地中的个体。

1.1.2 仪器 安杰伦 HPLC1100 型高效液相色谱仪。

1.1.3 统计软件 数据的统计分析采用 SPSS (版本 13.0)。

1.2 方法

1.2.1 种子形态表征数据的测定 每份样本随机抽取 50 粒种子测定该样本种子的平均长宽比和平均出仁率,每份样本随机抽取 100 粒种子测定该样

本种子的千粒质量。

1.2.2 印楝素含量的测定 高效液相色谱(HPLC)法测定各样本种子种仁中的印楝素 A(AZ-A)、印楝素 B(AZ-B)以及印楝素 A 和 B 的总含量(AZ-A + B)。

1.2.3 印楝素含量与种子形态关系的分析 分别进行 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A + B 含量与种子长宽比、千粒质量和出仁率的相关性分析。

1.2.4 印楝素含量与种子成熟期关系的分析

(1)在 168 份样本中,9 株树体分别採收了早期成熟和中期成熟的种子,5 株树体分别採收了中期成熟和晚期成熟的种子。采用配对 *t* 检验,分别进行同株树体 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A + B 含量与种子成熟期关系的分析。(2)在 168 份样本中,共有早期成熟样本 46 份,中期成熟样本 104 份,晚期成熟样本 18 份。采用 *q* 检验,分别进行总体样本 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A + B 与种子成熟期关系的分析。

1.2.5 印楝素含量与主要表征关系的分析 采用逐步回归法,分别对 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A + B 含量与种子长宽比、出仁率和千粒质量的相关性进行多元线性回归分析,得出能反映印楝素含量的主要表征。

1.2.6 结实量的比较 采用 *t* 检验,进行初选母树与标准样地中树体间结实情况的比较。

2 结果与分析

2.1 样本分布情况(表 1)

2.1.1 长宽比的分布 长宽比的最小值为 1.60,最大值为 2.58,均数为 2.04,中位数 2.01,约 70% 的样本集中在 1.80~2.27 之间(图 1)。

表 1 样本分布情况

测量指标	最小值	最大值	均数	中位数	偏度系数	峰度系数	70%分布区间	样本数
长宽比	1.60	2.58	2.04	2.01	-0.569	0.290	1.80~2.27	168
千粒质量	89.04	290.60	204.87	205.22	-0.198	-0.054	150.00~250.00	168
出仁率	35.79	61.70	50.59	51.46	0.304	-0.559	45.00~57.50	168
AZ-A 含量	0.27	0.85	0.55	0.56	0.132	-0.096	0.40~0.63	168
AZ-B 含量	0.07	0.39	0.19	0.18	1.614	0.726	0.12~0.22	168
AZ-A + B 含量	0.37	1.15	0.74	0.74	0.129	-0.113	0.55~0.90	168

2.1.2 千粒质量的分布 千粒质量的最小值为 89.04 g,最大值为 290.60 g,均数为 204.87 g,中位数 205.22 g,约 70% 的样本集中在 150.00~250.00 g 之间(图 2)。

2.1.3 出仁率的分布 出仁率的最小值为

35.79%,最大值为 61.70%,均数为 50.59%,中位数 51.46%,约 70% 的样本集中在 45.00%~57.50% 之间(图 3)。

2.1.4 印楝素 A 含量的分布 AZ-A 含量的最小值为 0.27%,最大值为 0.85%,均数为 0.55%,中位数

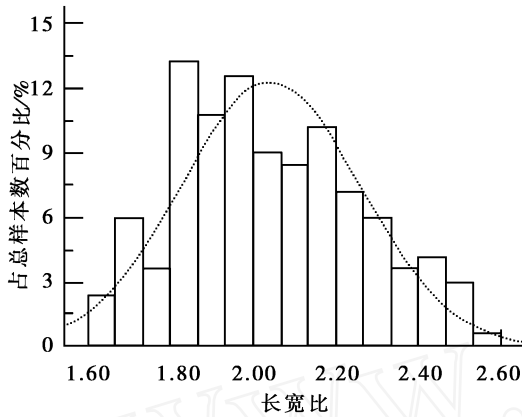


图 1 印楝种子长宽比分布情况

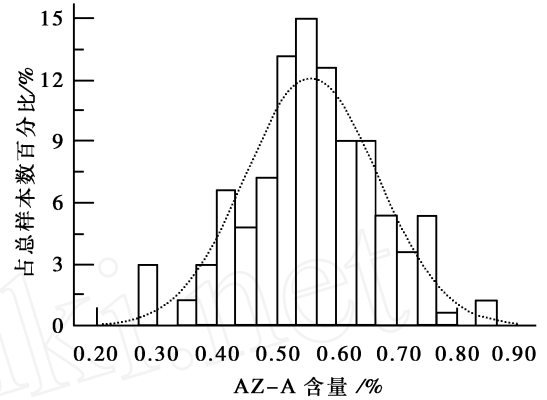


图 4 印楝素 A 含量分布情况

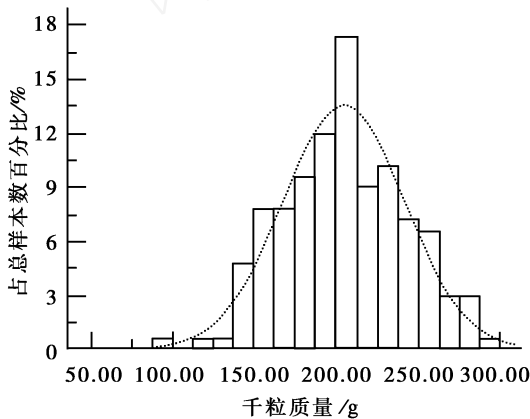


图 2 印楝种子千粒质量分布情况

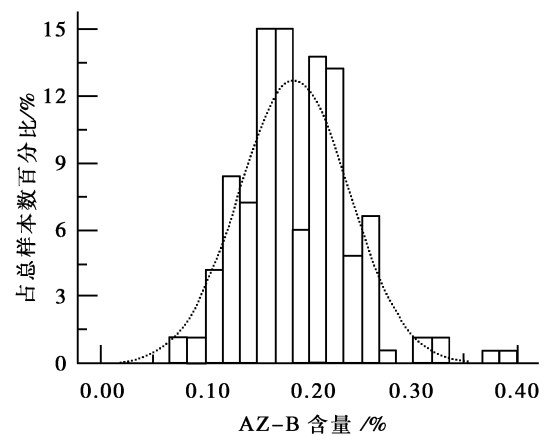


图 5 印楝素 B 含量分布情况

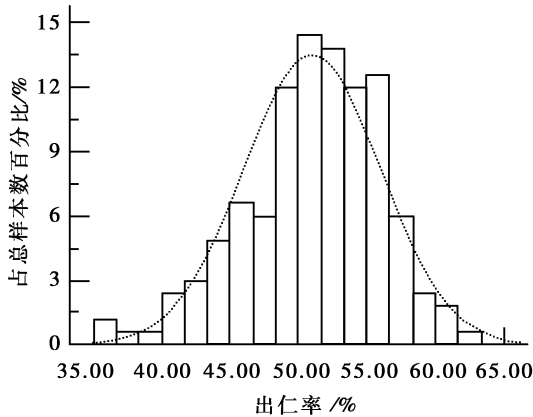


图 3 印楝种子出仁率分布情况

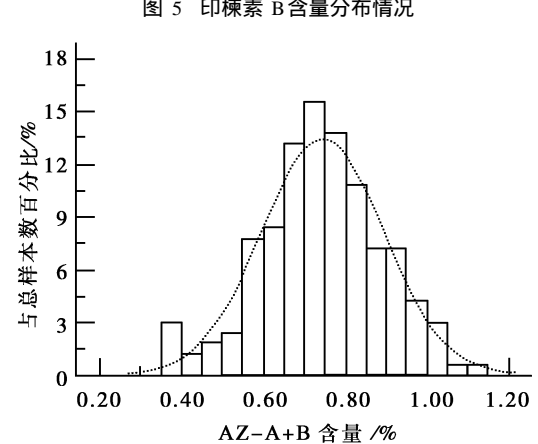


图 6 印楝素 A 和 B 总含量分布情况

0.56%, 约 70% 的样本集中在 0.40% ~ 0.63% 之间 (图 4)。生产上采收印楝种子混合样品的印楝素 A 含量为 0.33% ~ 0.37%。

2.1.5 印楝素 B 含量的分布 AZ-B 含量的最小值为 0.07%, 最大值为 0.39%, 均数为 0.19%, 中位数为 0.18%, 约 70% 的样本集中在 0.12% ~ 0.22% 之间 (图 5)。

2.1.6 印楝素 A 和 B 总含量的分布 AZ-A + B 含

量的最小值为 0.37%, 最大值为 1.15%, 均数为 0.74%, 中位数 0.74%, 约 70% 的样本集中在 0.55% ~ 0.90% 之间 (图 6)。

2.2 印楝素含量与种子形态表征的关系

相关分析的结果 (表 2) 表明, AZ-A、AZ-B 和 AZ-A + B 含量与种子长宽比的相关系数较大, 分别为 0.331, 0.194 和 0.306, 且相伴概率 (P 值) 小于 0.01, 均具有统计学意义; 而与出仁率和千粒质量的

相关系数,其相伴概率都大于 0.05,均无统计学意义。

表 2 印楝素含量与种子长宽比、出仁率和千粒质量的相关性

印楝素种类	种子形态指标	相关系数	相伴概率 (P)值	统计学意义	样本数
AZ-A	出仁率	-0.132	0.088	无	168
	千粒质量	-0.037	0.630	无	168
	长宽比	0.331	<0.001	极显著	168
AZ-B	出仁率	-0.157	0.051	无	168
	千粒质量	-0.073	0.345	无	168
	长宽比	0.194	0.009	显著	168
AZ-A+B	出仁率	-0.153	0.057	无	168
	千粒质量	-0.054	0.491	无	168
	长宽比	0.306	<0.001	极显著	168

2.3 印楝素含量与种子成熟期的关系

2.3.1 同株树体 配对 *t* 检验的结果 (表 3) 表明,同株树体早期成熟与中期成熟的种子 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A+B 含量的 *t* 检验值分别为 0.289, -0.197 和 0.183,相伴概率都大于 0.05,差异不显著;而同株树体中期成熟与晚期成熟的种子 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A+B 含量的 *t* 检验值分别为 1.246, 0.237 和 1.021,相伴概率也都大于 0.05,差异也不显著,即同株树体印楝素含量与种子成熟期无关。

表 3 同株树体印楝素含量与种子成熟期的关系

成熟期	印楝素种类	<i>t</i> 值	相伴概率 (P)值	统计学意义	样本数 / 对
早中	AZ-A	0.289	0.780	差异不显著	9
	AZ-B	-0.197	0.849	差异不显著	9
	AZ-A+B	0.183	0.859	差异不显著	9
中晚	AZ-A	1.246	0.268	差异不显著	5
	AZ-B	0.237	0.822	差异不显著	5
	AZ-A+B	1.021	0.354	差异不显著	5

2.3.2 总体样本 *q* 检验的结果 (表 4) 表明,总体样本早期成熟、中期成熟与晚期成熟的种子 AZ-A、AZ-B 和 AZ-A+B 含量的相伴概率值分别为 0.400, 0.147 和 0.568,都大于 0.05,差异不显著,即印楝素含量与种子成熟期无关。

表 4 总体样本印楝素含量与种子成熟期的关系

印楝素种类	相伴概率 (P)值	统计学意义	样本数		
			早熟	中熟	晚熟
AZ-A	0.400	差异不显著	46	104	18
AZ-B	0.147	差异不显著	46	104	18
AZ-A+B	0.568	差异不显著	46	104	18

2.4 反映种子印楝素含量的主要表征

2.4.1 反映印楝素 A 含量的主要表征 将长宽比 (X_1)、千粒质量 (X_2)、出仁率 (X_3) 与 AZ-A 含量 (Y) 进行逐步回归分析。回归方程的复相关系数为 0.321,决定系数 (即 R^2) 为 0.103,经方差分析, $F = 19.079, P < 0.001$,回归关系极显著。

$$\text{回归方程为: } Y = 0.163X_1 + 0.227$$

回归系数中,长宽比的回归系数达到显著水平 ($t = 4.368, P < 0.001$),进入回归方程,是能反映种子印楝素 A 含量的主要表征。

2.4.2 反映印楝素 B 含量的主要表征 将长宽比 (X_1)、千粒质量 (X_2)、出仁率 (X_3) 与 AZ-B 含量 (Y) 进行逐步回归分析。回归方程的复相关系数为 0.194,决定系数 (即 R_2) 为 0.038,经方差分析, $F = 6.512, P = 0.012$,回归关系显著。

$$\text{回归方程为: } Y = 0.047X_1 + 0.090$$

回归系数中,长宽比的回归系数达到显著水平 ($t = 2.552, P = 0.012$),进入回归方程,是能反映种子印楝素 B 含量的主要表征。

2.4.3 反映印楝素 A 和 B 的总含量的主要表征 将长宽比 (X_1)、千粒质量 (X_2)、出仁率 (X_3) 与 AZ-A+B 含量 (Y) 进行逐步回归分析。回归方程的复相关系数为 0.306,决定系数 (即 R^2) 为 0.094,经方差分析, $F = 17.177, P < 0.001$,回归关系极显著。

$$\text{回归方程为: } Y = 0.210X_1 + 0.317$$

回归系数中,长宽比的回归系数达到显著水平 ($t = 4.145, P < 0.001$),进入回归方程,是能反映种子印楝素 A 和 B 的总含量的主要表征。

2.5 应用模型

将种子长宽比 (X) 与印楝素 A 和 B 的总含量 (Y) 进行曲线拟合,其中二次方程的拟合优度最高,方程为: $Y = 0.295 + 0.134X - 0.028X^2$ 。该模型的相关系数为 0.306,决定系数 (R^2) 为 0.094,剩余均方差为 0.021, $F = 8.541$,相伴概率 (P) < 0.001 ,模型有意义。模型的相对误差为 0.41%,均方误差为 1.15%,适用范围 1.60 X 2.58。当 1.60 X 2.39 时,随着种子长宽比的增大,印楝素含量增加;当 2.39 X 2.58 时,随着种子长宽比的增大,印楝素含量减少。

2.6 结实量的比较

初选母树单株的最大结实量为 11 000 粒,单株平均结实量 2 575 粒;标准样地植株单株最大结实量 4 500 粒,单株平均结实量 253 粒。*t* 检验的结果

表明,初选母树的结实量与标准样地植株的结实量之间差异极显著 ($t=3.593, P=0.002$),初选母树具有丰产性状。

3 初步结论与讨论

(1)在印楝种子的长宽比、千粒质量和出仁率这 3 个指标中,仅长宽比与印楝素含量相关,而且是相关性最密切的形态表征;但这仅是从统计分析结果考虑,目前尚无足够的依据从生理和遗传学的角度来解释环境和遗传因子影响种仁印楝素含量的程度极其作用机理,需要进一步的实验研究,探讨印楝种子表型变异的本质。同株树体种仁的印楝素含量与果实成熟期无关,表明印楝素含量主要是受遗传因子控制,印楝果实生长发育时间及环境因子对印楝素的合成与积累影响并不显著。

(2)印楝种子样本的长宽比值 (X) 在 1.60 ~ 2.58 区间,当长宽比值为 2.39 时,其种仁内印楝素含量 (Y) 有峰值出现,它们的关系可用函数模型 $Y = 0.295 + 0.134X - 0.028X^2$ 表示。印楝种仁印楝素的含量是评价印楝种子作为农药原料品质的指标,因分析测定的成本较高,在印楝优良母树筛选的生产实践中,很难做到对每株初选母树种仁的印楝素含量逐一测定,若以种子的长宽比值作为评价初选母树品质的指示参数,注重选择种子长宽比接近 2.39 的植株,将显著提高初选母树的达标率,减少优树筛选的工作量。

(3)印楝农药原料林培育的目的产品是印楝种子,印楝单株间结实量及其种仁的印楝素含量的差异极显著,筛选同时具有优质性状和丰产性状的优良单株作为印楝农药原料林的繁殖材料,对提高农药原料林目的产品品质和产量具有很大的潜力。在优良母树筛选策略上,以丰产性状作为初选母树的主要评价指标,单株结实量高于平均结实量的 5 倍以上。目前优良母树的质量性状要求是种仁的印楝

素 A 含量应达到 0.7%、印楝素 B 含量应达到 0.2%、印楝素 A 和 B 的总含量应达到 0.9%。在具丰产性状的初选母树中,具有优良母树条件的比率约 8%。

(4)对不同种源间印楝进行 AFLP 分析结果显示,种源间的变异只占总变异的 14.81%,说明 85.19% 的遗传变异来自种源内,种源内的个体变异远高于种源间^[6]。Singh, Farooqui 等用 RAPD、AFLP、SAPLE 分子标记技术对印度次大陆、缅甸、泰国的种源研究也证实了印楝种源间的遗传相似度极高,种源间的分化不明显^[7,8]。目前尚缺少依据证明印楝种子的形态变异与种源相关,所以,目前印楝优树筛选研究的重点放在种源内的个体变异,选择那些经济性状符合农药原料这一目标的优良单株,作为无性繁殖材料和有性繁殖的亲本材料。

参考文献:

- [1] Govindachari T R, Geetha Gopala Krishnan, Sunesh G. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels[J]. *Fitoterapia*, 1999, 70: 558 ~ 560
- [2] Ramesh C S. Neem: its potential in pest and vector management [C]. *Proceeding of International Symposium on Neem-Based Products for Industrialization in China*, 2001: 196 ~ 218
- [3] 张燕平, 赖永棋, 彭兴民, 等. 印楝的世界地理分布与引种栽培概况 [J]. *林业调查规划*, 2002, 27(3): 98 ~ 101
- [4] 彭黎旭, 冯信平, 吴莉宇. 印楝杀虫活性物质的结构分析和分离提取方法 [J]. *热带农业科学*, 2001, 94(6): 78 ~ 83
- [5] 荣晓东, 徐汉虹, 赵善欢. 植物性杀虫剂印楝的研究进展 [J]. *农药学报*, 2000, 2(2): 9 ~ 14
- [6] 刘新龙. 印楝 (*Azadirachta indica* A. Juss) 引种区不同种源的生物生态学差异及 AFLP 分析 [D]. 云南: 云南大学, 2004: 21 ~ 34
- [7] Singh A, Negi M S. Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(1-2): 272 ~ 279
- [8] Farooqui, Nuzhat, Ranade S A. RAPD profile variation amongst provenances of neem [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, 45(5): 931 ~ 939