

奥地利黑松和花旗松的抗寒性研究^{*}

龚月桦^a, 樊军锋^b, 周永学^b, 孙 群^a, 杨俊峰^a

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对黄土高原丘陵沟壑区引种栽培的奥地利黑松、花旗松和乡土树种油松的针叶进行冰冻后测定其电导率, 比较三者间的抗寒性; 并对3个树种与抗寒性相关的生理生化指标进行了测定, 探讨其抗寒的内在机理。结果表明, 奥地利黑松的抗寒性与油松接近, 而花旗松的抗寒性比二者稍强; 花旗松的束缚水/自由水比值和组织中 K^+ 含量非常高, 奥地利黑松的可溶性糖和脱落酸(ABA)含量较高, 油松则是 K^+ 和ABA含量较高。另外, 油松较高的类胡萝卜素/叶绿素比值可能也对抗寒性有贡献。可见, 3个树种虽然都是抗寒树种, 但其抗寒机理有差异。

[关键词] 奥地利黑松; 花旗松; 油松; 抗寒性

[中图分类号] Q 791.161.04; S 791.256.04 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)12-0105-05

为了丰富黄土高原丘陵沟壑区的树种资源, 加速黄土高原森林植被和城市森林生态体系建设, 20世纪70年代中期至80年代初期, 陕西开始了针叶树的引种工作。延安树木园先后搜集引种松科16个针叶树种, 其中表现较好的有樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)、奥地利黑松(*Pinus nigra* var. *austriaca*)和美国黄松(*Pinus ponderosa* Law s.)等, 其次花旗松(*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*, 别名北美黄杉)的表现也不错。国外有报道称奥地利黑松、花旗松的抗寒性较强^[1], 但植物的抗寒性不仅与植物种类有关, 还与其生长环境有关^[2]。因此, 这些树种引种到黄土高原后抗寒力如何, 仍然需要进行研究。本试验以早期延安树木园引种的奥地利黑松和花旗松为材料, 以乡土树种油松(*Pinus tabulaeformis*)为对照, 对其抗寒能力进行了比较。

一般认为, 多年生木本植物在秋季日照逐渐变短、气温逐渐降低的过程中, 其体内总含水量逐渐降低, 束缚水含量升高, 细胞内大量累积可溶性溶质(可溶性糖、氨基酸、 K^+ 等), 脱落酸(ABA)大量合成, 植物生长停止, 进入休眠期, 此时其抗寒性大大提高^[3]。依据植物的上述生理特点, 本试验还对3个树种的抗寒机理进行了探讨, 以进一步掌握奥地利黑松和花旗松的生理生态特性, 为扩大引种区域奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试材取自西北农林科技大学林学院延安树木园。花旗松为松科黄杉属(*Pseudotsuga* Carr)植物, 别名北美黄杉, 种子来源于美国落基山, 种类为落基山花旗松(*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*), 树龄20年。奥地利黑松(*Pinus nigra* var. *austriaca*)为欧洲黑松的变种, 种子来源不详, 树龄30年。乡土树种油松(*Pinus tabulaeformis*)树龄30年。

树木生长于海拔1 050 m的台地, 土壤母质为黄土(以黄绵土为主), pH 8.4, 土层厚度达100 cm以上。年平均气温9.4℃, 极端最高气温39.9℃, 极端最低气温-28.5℃, 1月平均气温-6.7℃, 7月平均气温22.9℃^[4]。

1.2 测定项目及方法

2005-01中旬, 取奥地利黑松、花旗松和油松的当年生新梢针叶500 g进行以下项目的测定。

(1) 相对电导率(电解质渗出率)。将样品针叶分别置于-10、-20、-30和-40℃(波动范围±1℃)低温冰箱中处理12 h。然后用电导仪测定相对电导率^[5]。以温度(T)为自变量, 用Logistic方程拟合电导率, 以电导率50%时的温度为半致死温度。

(2) 可溶性糖含量测定。采用硫酸-蒽酮法^[6]。

(3) 游离氨基酸总量的测定。采用茚三酮法^[6]。

* [收稿日期] 2005-12-05

[基金项目] 国家林业局“948”引进项目(2000-04-03)

[作者简介] 龚月桦(1971-), 女, 四川简阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物逆境生理研究。E-mail: gongyh01@163.com

[通讯作者] 樊军锋(1963-), 男, 陕西扶风人, 副研究员, 博士, 主要从事林木育种研究。E-mail: fanjf@public.xa.sn.cn

(4) 自由水和束缚水含量的测定。采用马林契克法^[6]。

(5) 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定。将样品用体积分数80%的丙酮于黑暗条件下浸提24 h,然后在663, 646和470 nm处比色测定吸光度,用Lichtenthaler公式^[7]计算叶绿素和类胡萝卜素含量。

(6) K⁺含量的测定。用原子吸收分光光度法。

(7) 脱落酸(ABA)含量测定。取松树针叶鲜样0.5 g,放入3 mL体积分数80%的甲醇中,于-40℃保存备用。用酶联免疫吸附检测法^[8](ELISA,试剂盒由中国农业大学激素研究室提供)测定ABA含量。以上测定均重复3次,结果取其平均值。

2 结果与分析

2.1 低温处理后3个树种针叶电导率的变化比较

从表1可以看出,各树种针叶的相对电导率随

处理温度降低而明显上升。为进一步分析,比较各树种的抗寒性,用Logistic方程配合电导率,拟合了3个树种的低温电导率回归模型。由表2可以看出,3个模型的P值均小于0.01,表明方程拟合效果好。Sukumaran等^[9]基于电解质渗出率为50%时的温度正好与半致死温度一致,提出了以电解质渗出率为50%时的温度作为组织的半致死温度(LT₅₀),并在植物抗寒性鉴定上得到了广泛的应用^[10-11]。用拟合的Logistic方程可测算出组织半致死温度LT₅₀(表2)。表2的结果表明,花旗松的离体组织LT₅₀为-17.9℃,奥地利黑松和油松的LT₅₀分别为-15.4℃和-15.2℃。说明这3个树种的抗寒性均较强,但抗寒性最强的是花旗松,奥地利黑松与油松的抗寒性接近。

表1 低温处理后3个树种针叶相对电导率的变化

Table 1 Conductivity of conifers at different low temperatures

树种 Tree species	处理温度/ Treatment temperature			
	- 10	- 20	- 30	- 40
花旗松 <i>P. menziesii</i> var. <i>glauca</i>	36.12 ± 2.36	56.43 ± 1.84	56.80 ± 1.42	67.55 ± 0.15
奥地利黑松 <i>P. nigra</i> var. <i>austriaca</i>	34.35 ± 2.75	65.11 ± 2.28	70.43 ± 2.12	80.39 ± 1.77
油松 <i>P. tabulaeformis</i>	37.44 ± 1.93	58.95 ± 2.08	63.39 ± 3.15	65.66 ± 2.73

表2 3个针叶树种低温电导率回归模型及离体组织半致死温度(LT₅₀)

Table 2 Regression models of conductivity and the tissue's median lethal temperature (LT₅₀) of three kinds of pines

树种 Tree species	回归模型 Regression model	决定系数 R ²	概率 P	离体组织半致死温度/ LT ₅₀ of the tissue
花旗松 <i>P. menziesii</i> var. <i>glauca</i>	$y = \frac{66.3}{1 + e^{0.9375 + 0.1147T}}$	0.904 7	0.000 0	- 17.9 a
奥地利黑松 <i>P. nigra</i> var. <i>austriaca</i>	$y = \frac{78.9}{1 + e^{1.8353 + 0.1548T}}$	0.962 6	0.000 0	- 15.4 b
油松 <i>P. tabulaeformis</i>	$y = \frac{67.5}{1 + e^{1.2221 + 0.1497T}}$	0.917 4	0.000 3	- 15.2 b

注: 同列数据后标不同字母者表示差异显著, 下表同。

Note: The different letters indicate significant difference. It is the same in the following tables.

2.2 不同树种针叶的自由水和束缚水含量的比较

植物体内的水分以自由水和束缚水2种形式存在。自由水可参与各种代谢,而束缚水不参与代谢,其作用在于稳定原生质的结构。因此,一般自由水含量高表明代谢旺盛,而束缚水含量高表明抗性强^[12]。

一般新鲜植物组织中含水量较高,约占组织鲜

重的70%~80%。但从表3可以看出,这3个树种针叶的含水量均较低,而且都是束缚水含量较高,自由水含量较低。这说明3个树种的代谢均较弱而抗寒性均较强。由表3还可看出花旗松自由水含量最低,束缚水含量最高,因而束缚水/自由水比值最大;奥地利黑松和乡土树种油松相似,其自由水含量相对较高,因而束缚水/自由水比值较花旗松小得多。

表 3 3 个树种针叶中自由水和束缚水的含量

Table 3 Free water and bound water content of conifers

树种 Tree species	自由水/% Free water content	束缚水/% Bound water content	总含水量/% Total water content	束缚水/自由水 Bound water/ Free water
花旗松 <i>P. menziesii</i> var. <i>glauca</i>	3 50 b	45 19 a	48 69 b	12 89 a
奥地利黑松 <i>P. nigra</i> var. <i>austriaca</i>	14 80 a	36 06 b	50 87 ab	2 44 b
油松 <i>P. tabulaeformis</i>	14 61 a	37 72 b	52 32 a	2 58 b

2 3 3 个树种针叶中可溶性糖、游离氨基酸和钾含量的比较

植物在遭受水分亏缺、寒冷或盐渍等逆境时, 可以通过累积可溶性糖、氨基酸、 K^{+} 、 Cl^{-} 等可溶性物质来进行渗透调节, 以增强植物对逆境的适应能力^[12-13]。从表 4 可以看出, 3 个树种针叶中累积的可

溶性糖和 K^{+} 含量均较高, 但游离氨基酸总量均很低, 说明可溶性糖和 K^{+} 在这 3 个树种的抗寒性中有较大作用, 而游离氨基酸的作用很小。其中奥地利黑松的可溶性糖含量最高, 而花旗松和油松的 K^{+} 含量均较高。

表 4 3 个树种针叶中可溶性糖、游离氨基酸和 K^{+} 含量

Table 4 Content of soluble sugar, free AA and K^{+} in conifers

树种 Tree species	可溶性糖含量/% Content of soluble sugar	游离氨基酸总量/($ng \cdot g^{-1}$) Content of free AA	K^{+} 含量/($\mu g \cdot g^{-1}$) K^{+} content
花旗松 <i>P. menziesii</i> var. <i>glauca</i>	17. 44 b	0 36 a	4 888 a
奥地利黑松 <i>P. nigra</i> var. <i>austriaca</i>	22 83 a	0 35 a	3 288 c
油松 <i>P. tabulaeformis</i>	18 68 b	0 37 a	4 538 b

2 4 3 个树种针叶中叶绿素和类胡萝卜素含量的比较

叶绿素是光合作用中吸收光能的主要色素, 类胡萝卜素除了可以吸收光能用于光合作用外, 还是植物体内的保护物质, 可以清除逆境或衰老过程中

累积的自由基和活性氧^[14]。从表 5 可以看出, 3 个树种针叶的类胡萝卜素含量无显著差异; 花旗松的叶绿素含量较高, 奥地利黑松和油松叶绿素含量较低; 类胡萝卜素和叶绿素的比值以油松最高, 花旗松最低。

表 5 3 个树种针叶中叶绿素和类胡萝卜素的含量

Table 5 Content of chlorophyll and carotenoid in conifers

树种 Tree species	叶绿素含量/ ($mg \cdot g^{-1}$) Chlorophyll content	类胡萝卜素含量/ ($mg \cdot g^{-1}$) Carotenoid content	类胡萝卜素/叶绿素比值 Carotenoid/chlorophyll ratio
花旗松 <i>P. menziesii</i> var. <i>glauca</i>	12 72 8 a	2 608 a	0 205 b
奥地利黑松 <i>P. nigra</i> var. <i>austriaca</i>	9 365 b	2 205 a	0 235 ab
油松 <i>P. tabulaeformis</i>	10 598 ab	2 695 a	0 254 a

2 5 3 个树种针叶中 ABA 含量的比较

ABA 含量与植物的抗逆性密切相关。一般植物体内的 ABA 含量很低, 在 $nmol/L$ 级。但越冬植物经过自然界秋末冬初的低温锻炼后, ABA 含量会大大提高, 抗寒性也随之增强^[3]。从图 1 可以看出, 1 月份取样的 3 个树种针叶中 ABA 含量都较高, 这与其经历了自然界从秋到冬逐渐降温的锻炼有关。但是不同树种的 ABA 含量有较大差异, 以花旗松的 ABA 含量最低, 为 $45.6 \mu g/g$, 而奥地利黑松和油松的 ABA 含量分别为 89.0 和 $95.8 \mu g/g$, 二者间无显著差异, 但均显著高于花旗松 ($P < 0.05$)。

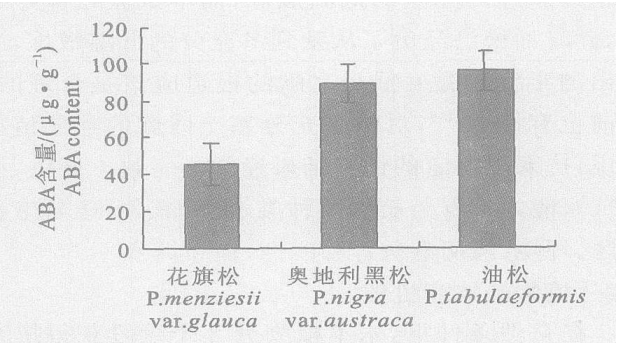


图 1 3 个树种针叶中 ABA 的含量

Fig 1 Content of ABA in conifers

3 讨 论

3.1 植物抗寒性的鉴定

松科树木广泛分布于北半球,其适应性强,耐干旱贫瘠,能耐 -60°C 的低温或 50°C 的高温^[15]。但不同树种间的抗寒性仍有差异,因此在引种工作中要对其抗寒性进行鉴定。唐季林等^[5]曾用电导法测定油松的电导率,用直线方程进行拟合,研究其抗寒性。史清华等^[11]也曾用电导法对杨树无性系的电导率进行测定,配合指数方程测算其 LT_{50} ,进行抗寒性评价。朱根海等^[16]认为,由于同一组织不同细胞的异质性,所以细胞不会在同一逆境条件下同时死亡。同一细胞在致死性伤害出现之前往往有一个从可逆到不可逆伤害的逐渐发展过程,在这一过程中,有的细胞有“修复”能力,因而整个组织在不同温度下电导率总是呈“S”形曲线,故用Logistic方程进行拟合,与真实情况较为接近。另外电导率的大小,除了受处理温度的影响外,还会因浸泡时间的长短而发生变化,但用拐点温度表示组织半致死温度则受浸泡时间影响很小。

本试验以人工冰冻和电导法对引种20年后的奥地利黑松、花旗松和乡土树种油松的电导率进行测定,然后用Logistic方程进行拟合,用拐点温度表示组织半致死温度。结果表明,3个树种的半致死温度(LT_{50})均小于 -15°C ,说明其抗寒性均较强。其中花旗松的半致死温度(LT_{50})最低,抗寒性最强,奥地利黑松与油松的抗寒性接近。

国内曾有报道^[17],油松在 -10°C 时的电导率已超过50%,而本文测算出的半致死温度为 -15.2°C ,低于文献报道的结果。可能的原因是文献报道中的试验是9月份在沈阳地区测定的,此时油松并未经历完全的低温锻炼;而本试验在深冬进行,此时油松已经历了从秋到冬充分的低温锻炼,测算出的半致死温度低于文献的报道应该是合理的。以前也有报道^[18],对经过充分寒冷锻炼的越冬植物来说,抗寒性测定的试验结果经常不一致。所以,植物抗寒能力不仅与植物的种类、起源有关,还与生长地区、环境、经历有关。

3.2 植物的抗寒机理

在自然条件下,木本植物分2个阶段获得抗寒性。第一阶段,初秋的低温和短日照使植物生长停止,累积可溶性糖等溶质和ABA,抗寒力增强,细胞

可以忍耐 -5°C 左右的低温;第二阶段,木本植物经受几天 -5°C ~ -10°C 低温的刺激,抗寒力进一步增强,可忍耐 -40°C 甚至更低的温度。在第一阶段ABA对抗寒性的提高起重要作用,其既促使生长停止,还会诱导与抗性有关的基因表达;而溶质的累积可以降低冰点,防止结冰。在第二阶段抗冻的机制主要是细胞过冷(supercooling),即温度低于冰点后细胞质仍不会结冰^[1,13]。

本研究结果表明,3个树种针叶中的总含水量均较低,束缚水含量较高,组织 K^{+} 含量、可溶性糖含量和ABA含量均较高,这是其抗寒性强的共同内在机理,但不同树种仍有较大差异。花旗松虽然ABA含量低一些,但 K^{+} 含量和可溶性糖含量均较高,因此细胞液冰点会较低;另外,花旗松的束缚水/自由水比值特别高,束缚水很多而自由水非常少(3.5%),在低温时少量的自由水容易撤退到细胞外,只留下束缚水围绕在细胞内容物和大分子周围,束缚水既不能结冰也不会蒸发,却可以稳定细胞质,因此细胞不易结冰,耐冻性强。奥地利黑松和油松的束缚水/自由水比值较低,但 K^{+} 含量、可溶性糖含量和ABA含量较高。ABA含量高促使其秋冬季节生长停止早,诱导其抗寒性增强; K^{+} 和可溶性糖含量高使得细胞冰点降低,抗寒性增强。所以3个针叶树种虽然均是抗寒树种,但内在的抗寒机理仍有差异。尽管由于条件限制,本试验未直接进行过冷方面的研究,但推测过冷现象可能也是导致3个树种抗寒性差异的原因之一。

3.3 植物叶片中色素的作用

色素虽然与植物的抗寒力并无直接关系,但已有研究^[3,19]表明,光合作用中的光反应是物理过程,对温度不敏感,而碳同化是酶促反应,很容易受低温抑制,因此与落叶树木不同,越冬常绿植物在冬季气温很低时,光合碳同化的能力很弱,而较多的叶绿素仍会吸收较多光能,容易发生光抑制,产生单线态氧 $\text{O}_2^{\cdot}$,对植物造成伤害,而类胡萝卜素则可以清除 $\text{O}_2^{\cdot}$ 。因此油松较低的叶绿素含量和较高的类胡萝卜素与叶绿素比值有利于清除活性氧,对植物体有保护作用,可能对耐受低温也有一定贡献。靳月华^[20]也曾报道,耐寒性强的松树冬季叶绿素含量下降,至1月时最低,以后又回升,暗示叶绿素一定程度的降解有利于耐冻性的提高。

[参考文献]

- [1] Bigras F J, Colombo S J. Conifer cold hardiness[M]. Dordrecht: Kluwer, 2001.
- [2] Beck E H, Heim R, Hansen J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening[J]. J Bio Sci, 2004, 29(4): 449-459.
- [3] Taiz, Zeiger. Plant physiology[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2002.
- [4] 刘建军, 王得祥, 雷瑞德, 等. 美国黄松、奥地利黑松和油松光合、蒸腾及生长特性分析[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(3): 1-4.
- [5] 唐季林, 徐化成. 油松抗寒性与种源关系的研究[J]. 北京林业大学学报, 1989, 11(1): 53-60.
- [6] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [7] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版公司, 2000.
- [8] 上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] Sukumakan N P, Weiser C J. Method of determining cold hardiness by electrical conductivity in potato[J]. Hort Science, 1972, 7: 467-468.
- [10] 潘晓云, 王根轩, 曹琴东. 兰州地区引种的美国扁桃的越冬伤害与临界致死低温[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 63-65.
- [11] 史清华, 高建社, 王军. 5个杨树无性系抗寒性的测定与评价[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 1937-1941.
- [12] 王荣富. 植物抗寒指标的种类及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1987(3): 49-55.
- [13] Thomashow M F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! [J]. Plant Physiol, 2001, 125: 89-93.
- [14] Gilmore A M. Mechanistic aspects of xanthophylls cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves[J]. Plant, 1997, 99: 197-209.
- [15] 吴中伦. 国外树种引种概论[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [16] 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): 9-17.
- [17] Jin Y H, Tao D L, Hao Zh Q. Environmental stresses and redox status of ascorbate[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(7): 795-801.
- [18] Gusta L V, Fowler D B. Effects of temperature on dehardening and rehardening of winter cereals[J]. Can J plant Sci, 1976, 56: 673-678.
- [19] Oquist G, Huner N P A. Photosynthesis of overwintering evergreen[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 329-355.
- [20] 靳月华, 陶大立, 杜英君. 沈阳5种针叶树的抗冻性、色素和SOD[J]. 植物学报, 1990, 32(9): 702-706.

Research on the cold resistance of *P. inus nigra* var. *austriaca* and *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*

GONG Yue-hua^a, FAN Jun-Feng^b, ZHOU Yong-xue^b, SUN Qun^a, YANG Jun-feng^a

(a College of Life Science, b College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The cold resistance of *P. nigra* var. *austriaca*, *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* and *P. tabulaeformis* was determined with artificial freezing method and conductometry. The results show that the cold resistance of *P. nigra* var. *austriaca* is similar with that of *P. tabulaeformis*, and the cold resistance of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* is stronger than that of the other two. And the mechanism of cold resistance was studied. It demonstrates that bound water/free water ratio and K⁺ content of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* is very high, the contents of soluble sugar and ABA in *P. nigra* var. *austriaca* and the contents of ABA and K⁺ in *P. tabulaeformis* are high. Additionally, high carotenoid/chlorophyll ratio may contribute to cold resistance of *P. tabulaeformis*. So the mechanism of cold resistance is different in these cold-hardy trees.

Key words: *P. inus nigra* var. *austriaca*; *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*; *P. inus tabulaeformis*; cold resistance