

网络出版时间:2018-04-26 15:24

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.10.006

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180426.1522.012.html>

板栗抗寒性相关指标筛选与评价方法建立

郭 燕, 张树航, 李 颖, 张馨方, 王广鹏, 杨 阳

(河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

【摘 要】【目的】建立板栗抗寒性的鉴定评价方法, 筛选可用于板栗抗寒性鉴定的形态和生理指标。【方法】以源自 8 个省份的 16 个板栗品种(系)休眠期 1 年生枝条为试验材料, 采用电导法、氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法和组织褐变法, 配合 Logistic 方程确定枝条的低温半致死温度(LT_{50}), 分析 3 种方法确定的 LT_{50} 之间的相关性, 以及板栗枝条各生理指标和组织结构与 LT_{50} 的相关性。【结果】16 个板栗品种(系)枝条相对电导率均呈近似“S”型变化趋势, 基于相对电导率拟合的 LT_{50} 差异较大, 其值为 $-26.64 \sim -17.73$ °C。16 个板栗品种(系)枝条 TTC 染色的总着色度随处理温度下降呈倒“S”型曲线变化, 而枝条冻害指数和芽褐变率均随温度下降呈“S”型曲线变化, 基于这 3 个指标拟合的 LT_{50} 基本一致, 且与基于相对电导率拟合的 LT_{50} 接近; 电导法、组织褐变法及 TTC 染色法确定的 16 种板栗的 LT_{50} 之间呈极显著正相关; 板栗枝条木栓层厚度与木栓层比率与 LT_{50} 呈极显著负相关, -20 °C 冷冻处理下的相对电导率和丙二醛含量与 LT_{50} 呈极显著正相关, 可作为抗寒性鉴定的辅助形态和生理指标。【结论】电导法、组织褐变法及 TTC 染色法均可用于休眠期板栗树种的抗寒性鉴定, 且以电导法测定的板栗抗寒性结果最为准确。

【关键词】 板栗; 休眠期; 抗寒性; 电导法; 组织褐变; TTC 染色

【中图分类号】 S664.201

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)10-0040-09

Screening of cold resistance related indexes and establishment of evaluation method for Chinese chestnut

GUO Yan, ZHANG Shuhang, LI Ying, ZHANG Xinfang, WANG Guangpeng, YANG Yang

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: 【Objective】This study established an accurate and reliable method for identifying cold resistance of chestnut to screen the morphological and physiological indexes for identifying cold resistance of chestnut. 【Method】The test materials were annual dormant branches of 16 chestnut varieties (strains) from 8 provinces. The semi-lethal temperatures (LT_{50}) were assessed by conductometry, triphenyl tetrazolium chloride (TTC) dyeing and tissue browning method with Logistic equation separately. The correlations of LT_{50} assessed by 3 methods were analyzed, and the correlations between LT_{50} and physiological index or organizational structure were analyzed. 【Result】The relative electrical conductivities of the 16 chestnut varieties (strains) were in “S” trend approximately, and the LT_{50} based on the relative conductivity were different, ranging from -26.64 to -17.73 °C. The dyeing degree of the 16 chestnut varieties (strains) were in inverted “S” trend with the decrease of treatment temperature, while the branch freeze injury index and the bud browning rate were in “S” trend. The LT_{50} based on the three indicators were basically identical, and were close to LT_{50} based on the relative electrical conductivities. LT_{50} assessed by conductometry, tissue browning and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) dyeing method had significant posi-

〔收稿日期〕 2017-07-28

〔基金项目〕 河北省财政专项(F17R06007)

〔作者简介〕 郭 燕(1987—), 女, 四川营山人, 助理研究员, 硕士, 主要从事板栗育种与栽培生理研究。E-mail: 529127092@qq.com

〔通信作者〕 王广鹏(1978—), 男, 河北赞皇人, 研究员, 博士, 主要从事板栗育种与栽培技术研究。E-mail: 845034984@qq.com

tive correlations. The significant negative correlation was obtained between LT_{50} and phellem layer thickness or phellem layer ratio in the branch, and there was significant positive correlation between LT_{50} and relative electrical conductivities (REC) or malonaldehyde content at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The phellem layer thickness or phellem layer ratio in the branch could be used as morphological indexes, and REC and malonaldehyde content of branch at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ could be used as physicochemical indexes. 【Conclusion】 Conductometry, tissue browning and TTC dyeing method could be used to identify the cold resistance of chestnut in dormant period. The conductometry method was the best.

Key words: Chinese chestnut; dormant period; cold resistance; conductometry; tissue browning; TTC dyeing

冻害是中国高纬度栽培区板栗常见的一种生理性病害^[1],板栗遭受冻害后,轻者造成不同程度减产,重者枝条或树体死亡,给生产造成重大损失。构建科学的抗寒性鉴定方法,准确评价种质抗寒性,筛选抗寒种质资源,对现有板栗种质利用、栽培区合理规划及抗寒良种选育具有重大意义。

植物抗寒性鉴定包括田间鉴定和室内鉴定两种方式。田间鉴定周期长,可控度低,受外界环境因素影响较大;而室内鉴定在可控环境下进行测量,具有操作简便、可控性强的优势,因此目前在植物的抗寒性鉴定上应用较多。国内外关于植物室内抗寒性鉴定与测试的方法很多,如电导法、组织褐变法、TTC 染色法以及植物解剖特征和生理指标观测等。其中,电导法是木本植物上应用最广泛的一种抗寒性鉴定方法^[2-4],由于用电导法得到的相对电导率配以 Logistic 方程计算出的半致死温度 (LT_{50}) 与植物田间抗寒表现或冷害症状基本一致^[5-6],因此该方法已被广泛应用于葡萄、苹果、核桃等多种果树的抗寒性鉴定。组织褐变法是通过测定低温处理后组织的褐变情况来鉴定植物的抗寒性^[7-8],在葡萄、桃、核桃等多种果树上均已取得了较好的应用效果^[9-11]。TTC 染色法是通过测定低温处理后枝条的组织活力来判断其抗寒性^[12-13],在核桃、杜仲、茶树等植物上已证实该方法简单、可靠^[11,13-14]。利用植物组织形态解剖特征也能鉴别其抗寒性^[15],如木质部、木栓层厚度及其在茎结构中所占比例,可以作为葡萄和核桃抗寒性鉴定的形态指标^[11,16]。另外,植物在受到低温胁迫时,体内的相关生理指标会有所响应^[17-18],植物组织含水量、可溶性糖含量、MDA 含量、SOD 活性、POD 活性、膜脂脂肪酸组成等多个指标的变异特性,已被用于苹果、葡萄、核桃等树种的抗寒性鉴定^[19-21]。

目前,有关板栗抗寒性鉴定的研究报道较少。陈楚莹等^[22]通过板栗枝条的质壁分离程度、贮藏物

质含量、蒸腾强度及低温下枝条受冻程度指标,比较了 7 个板栗品种的抗寒性。陈丽华^[23]采用越冬调查法比较了 10 个板栗品种的抗寒性,分析了气候条件、树体生长状况与板栗抗寒性的关系。目前,有关电导法、组织褐变法和 TTC 染色法在板栗树种抗寒性鉴定上的应用效果尚未见报道。为此,本研究以 8 个省份的 16 个板栗品种(系)休眠期 1 年生枝条为材料,比较了 3 种方法在板栗抗寒性鉴定中的应用效果,分析了各相关生理指标和组织结构与抗寒性的相关性,以期建立准确可靠的板栗抗寒性评价方法,筛选可用于板栗抗寒性鉴定的形态和生理指标,为我国板栗种质的抗寒性鉴定、抗寒育种及现有品种栽培区划提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以源自 8 个省份的 16 个板栗品种(系)休眠期 1 年生枝条为试验材料,其基础资料见表 1,供试材料全部取自河北省昌黎果树研究所板栗种质资源圃,栽植株行距 $2\text{ m}\times 4\text{ m}$,树龄 13 年,树体修剪、肥水管理及病虫害防控等措施一致。

1.2 试验处理

2015 年 1 月 15 日,每品种随机选取 30 株树,于每株树冠外围随机剪取粗度基本一致的一年生休眠期枝条 10 根。将剪取的枝条按品种混合后,先后用自来水、蒸馏水冲洗干净。之后每品种随机选取 30~35 根枝条为 1 份,共取 7 份分别放入自封袋中,在袋中加入适量水密封,其中 6 份分别置高低温交变湿热试验箱中进行不同冷冻温度处理。试验共设 -10 , -15 , -20 , -25 , -30 , $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 个低温处理,每处理均以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 的速率降温,达到设定温度后保持 12 h,再以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 的速率升温至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 2 h,后放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。另 1 份枝条直接置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中作为对照(CK)。各项指标测定前均将冷

冻枝条置于室温(25 ℃)下 8 h。每处理随机选取 3 根枝条为 1 个重复,共 3 个重复。

表 1 供试板栗品种(系)的基础资料

Table 1 Chestnut varieties (strains) tested in this study

来源 Source	品种 Cultivar	来源 Source	品种 Cultivar
河北 Hebei	燕山早丰 Yanshanzaofeng	辽宁 Liaoning	辽宁 2 号 Liaoning 2
	燕宽 Yankuan	山东 Shandong	华丰 Huafeng
	燕金 Yanjin		红栗 Hongli
	燕兴 Yanxing		杂 35 Za 35
	燕奎 Yankui	安徽 Anhui	粘底板 Niandiban
	燕山短枝 Yanshanduanzhi	江苏 Jiangsu	处暑红 Chushuhong
	紫珀 Zipo	湖北 Hubei	罗田 1 号 Luotian 1
北京 Beijing	燕红 Yanhong	广西 Guangxi	玉林 11 号 Yulin11

1.3 测定指标及方法

1.3.1 相对电导率 相对电导率采用电导法测定^[10]。将样品枝条切成 0.5 cm 小段,称取 2.0 g 置于 25 mL 试管中,加入去离子水 25.0 mL,盖好瓶塞,于摇床上 25 ℃振荡浸提 12 h,用 DDS-11C 型数显电导率仪测定各样品浸提液的电导值(C_1)。再将样品浸提液在沸水中加热 25 min 杀死组织,25 ℃下浸提 12 h,测定总电导值(C_2)。然后计算相对电导率:相对电导率(REC)= $C_1/C_2\times 100\%$ 。

1.3.2 枝条冻害指数、芽褐变率及组织活力 枝条冻害指数采用组织褐变法^[11]测定。冻害指数的分级标准参照贺普超等^[24]的方法但略有改动。从冷冻枝条节间中部截断,观察枝条不同组织截面低温处理后的褐变情况,确定冻害级次。冻害级次分级标准为:0 级,无冻害,髓部绿色,木质部绿色,韧皮部绿色;1 级,轻微冻害,髓部白色,原生木质部部分变褐,韧皮部绿色;2 级,髓部白色,木质部大部分褐色,韧皮部绿色;2.5 级,髓部白色,木质部全部褐色,韧皮部部分褐色;3 级,髓部白色,木质部全部褐色,韧皮部全部褐色。按级别进行统计,用冻害指数反映各品种枝条的受冻程度:冻害指数= $\Sigma(\text{冻害级次}\times\text{枝段数})/(4\times\text{枝段总数})$ 。

芽褐变率的统计参照田景花等^[11]的方法进行,计算公式为:芽褐变率=褐变芽数/总芽数 $\times 100\%$ 。

枝条组织活力采用氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定^[14]。低温处理后,从各枝条上切取长 0.4 cm 的小段,每个种质取 10 段,放入 50 mL 0.5%的 TTC 溶液中,于黑暗中静置 15 h,观察木质部着色情况。抗寒力以着色程度表示,着色越深,表示抗寒力越强,未着色记为 0,淡红色记为 1,粉红色记为 2,红色记为 3。总着色度的计算公式为:总着色度= $\Sigma(\text{着色程度}\times\text{枝段数})/\text{枝段总数}$ 。

1.3.3 枝条组织结构 枝条组织结构观测参照田景花等^[11]的方法并略有改动。每个品种随机选取

洗净的 4 ℃环境下(对照)的枝条 30 根,先用游标卡尺在枝条中部的节位之间测量枝条直径及髓直径,然后测量去皮后枝条直径(仅包括木质部和髓),计算木质部厚度和髓半径:木质部厚度=(去皮后枝条直径-髓直径)/2,髓半径=髓直径/2。自每品种枝条中部切取 0.3 cm $\times$ 0.3 cm 大小的树皮 30 片,FAA 固定液固定,Leica 冷冻切片机(Leica CM1850)切片,厚度 15~18 μm ,番红-固绿染色,石蜡封片。Olympus BX-51 显微镜观察树皮横切面解剖结构并拍照,以目镜测微尺测量木栓层厚度,并计算木栓层在茎结构中所占的比率:木栓层比率=木栓层厚度/枝条半径 $\times 100\%$ 。

1.3.4 生理指标 MDA 含量采用硫代巴比妥酸 TBA 显色法^[25]测定;脯氨酸含量采用酸性茚三酮显色法^[25]测定;可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[26]测定。

1.4 数据处理与分析

试验数据采用 Excel 2003 进行处理。参照莫惠栋^[27]的方法,将不同温度处理下的相对电导率、枝条冻害指数、总着色度和芽褐变率,分别用改进的 Logistic 方程 $y=K/(1+ae^{-bx})$ 拟合,求该方程的二阶导数并令其等于 0,可获得方程曲线的拐点 x ,即为半致死温度 LT_{50} 。数据的相关性分析和差异显著性测验采用 SPSS 20.0 进行。

2 结果与分析

2.1 基于电导法的板栗枝条抗寒性鉴定

不同冷冻温度处理下,16 种板栗枝条的相对电导率及由其拟合的低温半致死温度(LT_{50})见表 2。由表 2 可以看出,随冷冻温度的降低,细胞膜透性增加,电解质外渗增多,16 个板栗品种(系)枝条相对电导率均近似呈“S”型变化趋势,说明板栗枝条对低温胁迫的响应具有一致性,其细胞电解质外渗量随温度的降低呈现“缓慢增加 $\rightarrow$ 急剧增加 $\rightarrow$ 保持平稳”

的变化趋势,但不同板栗品种电解质外渗趋势出现明显变化拐点时所处的温度各不相同。

LT₅₀是指在该温度时植物处于半致死状态,当温度继续低于该温度时,植物所受的伤害将不可恢复甚至死亡^[25]。由表 2 可见,16 个板栗品种(系)的 LT₅₀ 差异较大,其值为-26.64~-17.73℃,部分品种间的差异达到显著水平,说明基于电导法的 LT₅₀ 可以很好地区分板栗休眠期 1 年生枝条的抗寒性。

表 2 低温处理下板栗枝条的相对电导率及其低温半致死温度(LT₅₀)

品种 Variety	相对电导率/% Relative electrical conductivities							半致死温度/℃ LT ₅₀
	4℃	-10℃	-15℃	-20℃	-25℃	-30℃	-35℃	
燕山早丰 Yanshanzaofeng	37.51	39.94	41.67	43.39	58.37	68.62	70.05	-25.27 a
燕宽 Yankuan	34.74	37.66	40.75	42.16	53.84	66.76	66.14	-26.64 a
燕金 Yanjin	31.83	39.51	41.84	44.08	58.55	69.64	65.46	-25.26 ab
燕兴 Yanxing	33.95	35.80	37.97	42.45	51.26	65.30	68.19	-25.48 ab
燕奎 Yankui	38.79	36.88	42.48	46.23	52.44	63.77	75.90	-22.89 c
燕山短枝 Yanshanduanzhi	37.96	39.41	42.12	47.49	63.65	72.98	73.20	-21.51 cd
紫珀 Zipo	37.07	39.35	41.38	50.66	61.30	75.23	77.21	-21.01 de
燕红 Yanhong	36.24	41.84	50.51	65.43	75.16	89.90	88.24	-17.73 g
辽宁 2 号 Liaoning 2	37.15	37.85	39.31	41.56	50.13	60.64	69.80	-25.67 ab
华丰 Huafeng	35.76	38.60	43.32	60.75	66.81	76.38	82.14	-20.22 de
红栗 Hongli	39.84	43.30	53.44	65.64	75.49	80.92	85.02	-18.46 fg
杂 35 Za 35	35.63	40.43	48.17	63.87	74.76	88.34	89.88	-18.37 fg
粘底板 Niandiban	35.81	38.68	40.34	57.20	68.12	78.76	81.25	-20.18 def
处暑红 Chushuhong	36.80	41.13	44.67	56.06	65.95	72.92	75.07	-21.92 cd
罗田 1 号 Luotian 1	38.10	43.29	47.19	58.13	70.18	86.60	87.15	-19.34 efg
玉林 11 号 Yulin11	37.14	41.83	51.87	65.33	72.90	85.94	86.37	-18.53 fg

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),表 6 同。

Note:Different lowercase letters in each row mean significant difference($P<0.05$),the same for Table 6.

将各品种不同冷冻温度处理的相对电导率与 LT₅₀ 进行相关性分析,结果见表 3。由表 3 可以看出,除对照(4℃)外,-10~-35℃ 6 个低温冷冻处理枝条的相对电导率均与其 LT₅₀ 呈极显著正相关,相关系数分别为 0.640,0.782,0.960,0.915,0.909和 0.942,其中以-20℃处理的相关系数最高,为 0.960。

表 3 各低温处理下板栗枝条的相对电导率与其低温半致死温度(LT₅₀)的相关性

项目 Item	处理温度/℃ Treating temperature					
	4	-10	-15	-20	-25	-30
LT ₅₀	0.335	0.640**	0.782**	0.960**	0.915**	0.909**

注:* 表示在 $P<0.05$ 水平显著相关,** 表示在 $P<0.01$ 水平显著相关,下同。

Note:* means significant at $P<0.05$,** means significant at $P<0.01$,The same below.

2.2 基于 TTC 染色法及组织褐变法的板栗枝条抗寒性鉴定

生枝条组织的褐变情况进行观察,不同冻害级别的冻害症状如图 1 所示。

基于组织褐变法,对 16 个板栗枝条休眠期 1 年



A~E. 冻害级别分别为 0,1,2,2.5,3 级的枝条
A~E. 5 freezing injury levels (0,1,2,2.5,3 class) of branches

图 1 板栗休眠期 1 年生枝条不同冻害级别的冻害症状

Fig.1 Different levels of freezing injury symptom of annual branches of chestnut in dormant period

从图 1 可以看出,不同组织对冻害的响应症状不同,髓部受冻后变白色,木质部和韧皮部受冻后变

褐色,并且不同组织的抗寒性有明显差异,依据不同组织开始发生冻害时温度的高低,判定板栗枝条组织抗寒性强弱顺序为韧皮部>木质部>髓部。本试验中,当冷冻温度达到电导法拟合的 LT_{50} 时,可以明显观察到枝条木质部大部分发生褐变,表明低温胁迫下的木质部大部分褐变可以作为枝条半致死的一个形态标记。

不同冷冻温度处理下 16 个板栗品种(系)枝条的总着色度、冻害指数和芽褐变率数据表明,16 个板栗品种的 3 个指标随处理温度下降的变化规律基本一致,以燕山早丰板栗为例,3 个指标的变化规律如图 2 所示。由图 2 可见,板栗枝条 TTC 染色的总着色度随处理温度的下降呈倒“S”型曲线变化,而枝条的冻害指数和芽褐变率均随温度下降呈“S”型曲线变化。用改进的 Logistic 方程拟合温度拐点,得到基于 3 个指标各品种枝条的 LT_{50} 见表 4。由表 4 可以看出,各板栗品种基于 3 个指标拟合的 LT_{50} 基

本一致,且与电导率法拟合的 LT_{50} 接近。

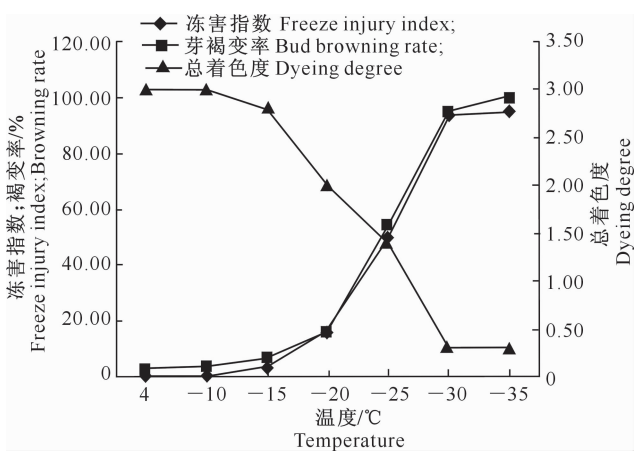


图 2 不同低温处理下燕山早丰板栗枝条的总着色度、枝条冻害指数和芽褐变率

Fig. 2 Changes of dyeing degree, branch freeze injury index and bud browning rate of Yanshanzaofeng under different low temperatures

表 4 低温处理后基于板栗枝条总着色度、冻害指数及芽褐变率 3 个指标拟合的 LT_{50}

Table 4 LT_{50} estimated by dyeing degree, freeze injury index of branches and browning rate of buds under different low temperatures				℃			
品种 Variety	总着色度 By dyeing degree of branches	冻害指数 By freeze injury index of branches	芽褐变率 By browning rate of buds	品种 Variety	总着色度 By dyeing degree of branches	冻害指数 By freeze injury index of branches	芽褐变率 By browning rate of buds
燕山早丰 Yanshanzaofeng	-26.66	-27.45	-25.01	辽宁 2 号 Liaoning 2	-26.21	-25.58	-25.68
燕宽 Yankuan	-25.42	-26.73	-25.56	华丰 Huafeng	-20.01	-22.51	-20.16
燕金 Yanjin	-26.93	-26.76	-25.01	红栗 Hongli	-19.46	-20.53	-18.52
燕兴 Yanxing	-25.97	-25.57	-26.56	杂 35 Za 35	-18.73	-18.26	-17.98
燕奎 Yankui	-22.80	-22.34	-23.57	粘底板 Niandiban	-21.82	-22.63	-20.92
燕山短枝 Yanshanduanzhi	-21.84	-22.10	-21.51	处暑红 Chushuhong	-22.26	-23.42	-21.89
紫珀 Zipo	-22.83	-23.13	-22.16	罗田 1 号 Luotian 1	-19.15	-20.08	-18.34
燕红 Yanhong	-17.36	-18.12	-16.59	玉林 11 号 Yulin11	-18.93	-20.31	-17.56

2.3 3 种抗寒性鉴定方法所得 LT_{50} 的相关性分析

将基于电导法、TTC 染色法、组织褐变法拟合

的 LT_{50} 分别进行相关性分析,结果见表 5。

表 5 3 种鉴定方法所得 LT_{50} 之间的相关性

Table 5 Correlation of LT_{50} estimated by different methods

方法 Method	电导法 Conductivity	TTC 染色法 TTC dyeing	组织褐变法 Browning	
			枝条 Branch	芽 Bud
电导法 Conductivity	1			
TTC 染色法 TTC dyeing	0.966 **	1		
组织褐变法 Browning	枝条 Branch	0.931 **	1	
	芽 Bud	0.973 **	0.906 **	1

由表 5 可以看出,3 种方法确定的 LT_{50} 之间均呈极显著正相关。说明利用电导法、TTC 染色法、组织褐变法对板栗 1 年生枝条抗寒性的鉴定结果较为一致,方法均比较可行。

2.4 不同板栗枝条组织结构与抗寒性的关系

16 个板栗品种枝条木质部厚度、木栓层厚度和髓半径、枝条半径及木质部比率、木栓层比率的测定结果见表 6。由表 6 可以看出,16 个板栗品种(系)1

年生枝条上述各指标差异均较大。16 个品种(系)的木质部厚度为 1.59~3.17 mm,其中最大值是最小值的 2.0 倍;木栓层厚度为 14.60~32.10 μm ,最大值是最小值的 2.1 倍;髓半径为 0.72~0.94 mm,最大值是最小值的 1.3 倍;枝条半径为 3.13~4.78

mm,其中最大值是最小值的 1.5 倍;木质部比率为 42.54%~66.37%,最大值是最小值的 1.6 倍;木栓层比率为 0.40%~0.89%,最大值是最小值的 2.2 倍,其中燕山早丰、燕宽、燕金、燕兴和辽宁 2 号之间木栓层厚度差异不明显,但均显著高于其他品种。

表 6 16 个板栗品种(系)1 年生枝条组织结构指标的测定

Table 6 Average values of anatomical structures of annual branches of 16 chestnut varieties(strains)						
品种 Variety	木质部厚度/mm Xylem thickenss	木栓层厚度/ μm Phellem thickness	髓半径/mm Pith radius	枝条半径/mm Branch radius	木质部比率/% Xylem ratio	木栓层比率/% Phellem ratio
燕山早丰 Yanshanzaofeng	2.02 bc	32.10 e	0.79 ab	3.59 ab	62.01 bc	0.89 h
燕宽 Yankuan	2.67 fg	28.95 e	0.86 bcd	4.19 cd	63.44 fg	0.69 fg
燕金 Yanjin	1.59 a	29.82 e	0.72 a	3.72 bcd	57.32 a	0.80 h
燕兴 Yanxing	2.23 cde	27.90 e	0.82 bc	3.72 bcd	56.30 cde	0.75 gh
燕奎 Yankui	2.19 bcde	22.87 d	0.83 bc	3.78 bcd	58.27 bcd	0.61 ef
燕山短枝 Yanshanduanzhi	2.19bcde	20.40 cd	0.83 bc	3.95 bcd	62.79 b	0.52 bcde
紫珀 Zipo	2.56 efg	20.12 cd	0.85 bc	4.07 bcd	61.37 efg	0.49 abcd
燕红 Yanhong	2.18 bcde	14.60 a	0.81 b	3.73 bcd	57.98 bcd	0.39 ab
辽宁 2 号 Liaoning 2	2.50 defg	27.91 e	0.85 bc	4.07 bcd	59.96 def	0.68 fg
华丰 Huafeng	2.69 fg	17.74 abc	0.88 bcd	4.21 cd	57.88 fg	0.42 ab
红栗 Hhongli	1.79 ab	17.10 ab	0.72 a	3.13 a	55.44 bc	0.55 de
杂 35 Za 35	2.10 bcd	14.88 a	0.81 b	3.69 bc	63.65 bc	0.40 a
粘底板 Niandiban	3.17 h	19.59 bc	0.94 d	4.78 f	42.54 g	0.41 a
处暑红 Chushuhong	2.46 defg	20.30 cd	0.83 bc	3.95 bcd	66.37 ef	0.51 cde
罗田 1 号 Luotian 1	2.73 g	17.45 abc	0.90 cd	4.30 ef	63.88 efg	0.41 a
玉林 11 号 Yulin11	2.29 cdef	17.42 abc	0.85 BC	3.95 bcd	56.91 bcd	0.44 abc

将 16 品种(系)木质部厚度、木栓层厚度、髓半径、枝条半径以及木质部比率和木栓层比率的测定结果与相对电导率拟合的 LT_{50} 进行相关性分析,结果见表 7。由表 7 可以看出,板栗 1 年生枝条的木质部厚度、髓半径和木质部比率与其 LT_{50} 呈正相关,但相关性未达到显著水平;而木栓层厚度和木栓

层比率与其 LT_{50} 呈极显著负相关,相关系数分别为-0.960和-0.874。可以认为,木栓层越厚,其在茎结构中所占比率越大,抗寒性越强,因此 1 年生枝条木栓层厚度及其在茎结构中所占的比率可作为板栗休眠期抗寒性鉴定的形态结构指标。

表 7 低温处理下板栗枝条组织结构与相对电导率拟合 LT_{50} 的相关性

Table 7 Correlation between anatomical structure and LT_{50} of chestnut branch under different low temperatures						
项目 Item	组织结构 Anatomical structure					
	木质部厚度 Xylem thickness	木栓层厚度 Phellem thickness	髓半径 Pith radius	枝条半径 Branch radius	木质部比率 Xylem ratio	木栓层比率 Phellem ratio
LT_{50}	0.075	-0.960**	0.093	-0.031	0.165	-0.874**

2.5 板栗枝条生理指标与其抗寒性的关系

将不同温度冷冻处理的 16 个板栗品种(系)枝

条的丙二醛、脯氨酸和可溶性糖含量测定结果与基于电导率拟合的 LT_{50} 进行相关性分析,结果见表 8。

表 8 低温处理下板栗枝条生理指标与相对电导率拟合的 LT_{50} 的相关性

Table 8 Correlation between physiological index and LT_{50} of chestnut branch under different low temperatures			
处理温度/ $^{\circ}\text{C}$ Processing temperature	丙二醛 MDA	脯氨酸 Proline	可溶性糖 Soluble sugar
4	-0.214	-0.313	0.185
-10	0.365	-0.044	-0.145
-15	0.811**	-0.468	0.157
-20	0.875**	-0.458	-0.236

由表 8 可以看出,各冷冻温度下枝条脯氨酸、可溶性糖含量与电导率拟合的 LT_{50} 均无显著相关性,

而在-15,-20 和-25 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻温度处理下,枝条丙二醛含量与电导率拟合的 LT_{50} 呈极显著正相关,说

明 1 年生枝条的丙二醛含量越低, LT_{50} 也越低, 其抗寒性越强, 其中以 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻温度下的相关系数最高, $r=0.875$ 。

3 讨 论

在植物抗寒性鉴定中, 经最适冷冻温度处理后的相关抗寒指标差异较大, 可以将植物抗寒性强弱区分开来, 因此确定最适冷冻温度是准确评价植物抗寒性的先决条件。何伟^[3]认为, $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下不同山葡萄相对电导率的差异达极显著水平, $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可以作为鉴定山葡萄抗寒性的最适冷冻温度。田景花等^[11]认为, $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理后核桃枝条的相对电导率与其 LT_{50} 表现为极显著正相关, LT_{50} 和 $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下的相对电导率均可作为鉴定休眠期核桃抗寒性的物理指标。本研究结果显示, 经 -20 , -25 和 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理后, 板栗枝条的相对电导率与其 LT_{50} 均呈极显著正相关, 其中以 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下的相关系数最高($r=0.960$)。枝条丙二醛含量在 -15 , -20 和 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理下与 LT_{50} 呈极显著正相关, 其中也以 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下的相关系数最高($r=0.875$)。说明 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 是鉴定板栗 1 年生枝条抗寒性的最适冷冻温度。综合对比各品种 LT_{50} 可以发现, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 正是略高于大部分板栗品种 LT_{50} 的温度, 因此 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻处理下的相对电导率和丙二醛含量可以分别作为休眠期板栗抗寒性鉴定的生理指标。

木本植物组织结构不同, 抗寒性有明显差异。其中木栓层、木质部与髓均是果树枝干的重要组成部分, 其体量大小和所占比率与抗寒性密切相关^[28]。前人研究表明, 桃、仁用杏和蜡梅 1 年生枝条木质部比率与抗寒性呈显著正相关^[29-31], 而樱桃枝条木质部厚度及木质部比率与抗寒性无相关性, 韧皮部厚度与抗寒性呈正相关^[32]; 核桃、柑桔、葡萄则表现为木栓层比率越高, 抗寒性越强^[11,15,33]。本研究中, 板栗 1 年生枝条木质部厚度、木质部比率和髓半径与其 LT_{50} 均无显著相关性, 不宜作为鉴定休眠期板栗抗寒性的形态指标; 而木栓层厚度及木栓层比率与其 LT_{50} 呈极显著负相关, 说明板栗木栓层越厚或比率越高则抗寒性越强, 因此木栓层厚度和木栓层比率可以作为鉴定休眠期板栗抗寒性的形态指标, 此研究结果与前人的研究结果^[11,15,33]一致。

电导法、TTC 染色法、组织褐变法和抗寒生理指标分析法是目前植物抗寒性鉴定中常用的方法, 其基本原理不同, 在应用过程中也各有优缺点。本研究结果表明, 由电导法、TTC 染色法、枝条和芽褐

变法确定的各板栗品种 1 年生枝条的 LT_{50} 基本一致, 并呈极显著正相关, 但不同品种间 LT_{50} 却差异明显, 说明电导法、TTC 法、组织褐变法均可用于板栗树种的抗寒性鉴定, 并能准确区分不同品种间抗寒性的强弱。然而, 在实际测定过程中, 组织褐变法及 TTC 染色法在目测褐变程度和着色程度时易受人为主观性的影响, 导致误差较大, 为达到良好的重复效果, 需要操作者具备熟练的实验技巧, 对于初试者来说取得准确测定结果的难度较大, 因此认为基于电导法测定板栗抗寒性的结果最为准确, 在熟练掌握实验技巧的前提下, 可将组织褐变法和 TTC 染色法作为一种快捷评价方法对电导法加以补充确认。因此建议在鉴定板栗种质抗寒性时, 优先选用电导法, 但应将其与组织褐变法、TTC 染色法及丙二醛含量等测定指标结合起来综合考虑, 结果将更为可靠、准确。

4 结 论

电导法、组织褐变法及 TTC 染色法均可用于休眠期板栗树种的抗寒性鉴定, 且以电导法测定的结果最为准确; 同时, 可将枝条木栓层厚度与木栓层比率作为形态指标, 将 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻温度处理下的枝条相对电导率(REC)和丙二醛含量作为生理指标对板栗抗寒性进行辅助判断。

[参考文献]

- [1] 张静会, 齐永顺, 陈 崇, 等. 低温对燕山板栗枝条生理特性的影响研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(16): 65-68.
Zhang J H, Qi Y S, Chen C, et al. Influence of low temperature on the physiological characteristics of Yanshan chestnut branches [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(16): 65-68.
- [2] 梁锁兴, 席海源, 王文平, 等. 电解质渗出率配合 Logistic 方程鉴定 7 个平欧杂种榛品种(系)的抗寒性 [J]. 农学报, 2017, 7(4): 34-38.
Liang S X, Xi H Y, Wang W P, et al. Determination of cold-resistance for 7 flat-european hazel cultivars through electrical permeation rate combining logistic equation [J]. Journal of Agriculture, 2017, 7(4): 34-38.
- [3] 何 伟. 山葡萄种质资源抗寒性评价方法的建立及评价研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
He W. Development of evaluation method and utilization for cold resistance of germplasm resources of *Vitis amurensis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2015.
- [4] Lukatkin A S, Brazaityte A, Bobinas C, et al. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review [J]. Agriculture, 2012, 99

- (2);111-124.
- [5] Liu W P,Su S C,Liu X,et al. Comparison of different cultivars of blueberry overwintering ability in Qingdao of China [J]. American Journal of Plant Sciences,2012,3(3):391.
- [6] Palonen P,Buszard D. Current state of cold hardiness research on fruit crops [J]. Canadian Journal of Plant Science,1997,77(3):399-420.
- [7] Pellett N E,Heleba D A. Comparing callus growth with discoloration and electrical conductivity as measures of stem injury after freezing woody plants [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,1998,123(5):826-831.
- [8] Jones K S,Paroschy J,Mckersie B D,et al. Carbohydrate composition and freezing tolerance of canes and buds in *Vitis vinifera* [J]. Journal of Plant Physiology,1999,155(1):101-106.
- [9] 刘天明,张振文,李 华,等. 桃品种耐寒性研究 [J]. 果树科学,1998,15(2):107-111.
- Liu T M,Zhang Z W,Li H,et al. The hardiness for peach cultivars [J]. Journal of Fruit Science,1998,15(2):107-111.
- [10] 袁军伟,郭紫娟,马爱红,等. 葡萄砧木抗寒性的鉴定与综合评价 [J]. 中国农学通报,2013,29(4):99-103.
- Yuan J W,Guo Z J,Ma A H,et al. Cold resistance identification and comprehensive evaluation of grape rootstocks [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2013,29(4):99-103.
- [11] 田景花,王红霞,高 仪,等. 核桃属植物休眠期的抗寒性鉴定 [J]. 园艺学报,2013,40(6):1051-1060.
- Tian J H,Wang H X,Gao Y,et al. Assessment of freezing tolerance of *Juglans* germplasms by using annual dormant branches [J]. Acta Horticulturae Sinica,2013,40(6):1051-1060.
- [12] Steponkus P L,Lanphear F O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury [J]. Plant Physiology,1967,42(10):1423-1426.
- [13] 杨跃华. TTC 分析法在茶树抗寒性鉴定中的应用 [J]. 中国茶叶,1989(5):15-16.
- Yang Y H. Studies on assessment of freezing tolerance of tea plant by TTC analytical method [J]. China Tea,1989(5):15-16.
- [14] 张博勇,张康健,张 檀,杜仲 15 个初选优良无性系抗寒性研究 [J]. 西北林学院学报,2003,18(2):4-5.
- Zhang B Y,Zhang K J,Zhang T. Cold-resistance of fifteen preliminary selected eucommia ulmoides clones of plus trees [J]. Journal of Northwest Forestry University,2003,18(2):4-5.
- [15] 张谷雄,胡国谦,王 宁,等. 柑桔枝叶形态解剖特征与抗寒性的关系 [J]. 南京农业大学学报,1988,11(4):24-28.
- Zhang G X,Hu G Q,Wang N,et al. Relationships between morphologic and anatomic characters of shoots and leaves in citrus and its cold resistance [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,1988,11(4):24-28.
- [16] 高庆玉,崔 方. 黑龙江省 5 个主栽葡萄品种抗寒性鉴定 [J]. 中国果树,2009(2):21-23.
- Gao Q Y,Cui F. Assessment of freezing tolerance of five grape cultivars in Heilongjiang province [J]. China Fruits,2009(2):21-23.
- [17] Lyons J M. Chilling injury in plants [J]. Annual Review of Plant Physiology,1973,24(1):445-466.
- [18] Nukuntornprakit O,Chanjirakul K, van Doorn W G, et al. Chilling injury in pineapple fruit: fatty acid composition and antioxidant metabolism [J]. Postharvest Biology and Technology,2015,99:20-26.
- [19] 付 超,周雪玲,朱春林. 应用隶属函数法综合评价高酸苹果抗寒性及果实品质 [J]. 北方园艺,2017(2):11-15.
- Fu C,Zhou X L,Zhu C L. Comprehensive evaluation of cold resistance and fruit quality of apple with high acidity by subordinate function [J]. Northern Horticulture,2017(2):11-15.
- [20] 李鹏程,苏学德,王晶晶,等. 8 种葡萄砧木品种的低温半致死温度与抗寒性综合评价 [J]. 甘肃农业大学学报,2017,52(1):92-96.
- Li P C,Su X D,Wang J J,et al. Semi-lethal temperature and comprehensive evaluation of hardiness on eight kinds of grape rootstock [J]. Journal of Gansu Agricultural University,2017,52(1):92-96.
- [21] 申桂艳. 林木抗寒性研究方法 [J]. 吉林林业科技,2017,46(1):32-34.
- Shen G Y. The forest cold resistance research methods [J]. Journal of Jilin Forestry Science and Technology,2017,46(1):32-34.
- [22] 陈楚莹,王开平,陈吉录. 不同板栗品种抗寒鉴定 [J]. 林业科技通讯,1980(11):7-10.
- Chen C Y,Wang K P,Chen J L. Assessment of freezing tolerance in different cultivars of *Castanea mollissima* Bl. [J]. Forest Science and Technology,1980(11):7-10.
- [23] 陈丽华. 板栗冻害调查分析 [J]. 辽宁林业科技,1995(5):43-59.
- Chen L H. Investigation on freezing injury of chestnut [J]. Journal of Liaoning Forestry Science & Technology,1995(5):43-59.
- [24] 贺普超,牛立新. 我国葡萄属野生种抗寒性的研究 [J]. 园艺学报,1989,16(2):81-88.
- He P C,Niu L X. Study of cold hardiness in the wild vitis native to China [J]. Acta Horticulturae Sinica,1989,16(2):81-88.
- [25] 汤章城. 现代植物生理学实验指南 [M]. 上海:科学出版社,1999:303-306.
- Tang Z C. Modern plant physiology experiment guide [M]. Shanghai:Science Press,1999:303-306.
- [26] 张义贤,张丽萍. 重金属对大麦幼苗膜脂过氧化及脯氨酸和可溶性糖含量的影响 [J]. 农业环境科学学报,2006,25(4):857-860.
- Zhang Y X,Zhang L P. Effects of heavy metals on membrane lipid peroxidation,proline and soluble sugar in roots of *Hordeum vulgare* [J]. Journal of Agro-Environment Science,2006,25(4):857-860.
- [27] 莫惠栋. Logistic 方程及其应用 [J]. 江苏农学院学报,1983,4(2):53-57.
- Mo H D. Logistic equation and its application [J]. Journal of

Jiangsu Agriculture,1983,4(2):53-57.

[28] Renaut J,Hausman J F,Bassett C,et al. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch) [J]. Tree Genetics & Genomes,2008,4(4):589-600.

[29] 王召元,张立莎,常瑞丰,等. 桃枝条组织结构与抗寒性的关系研究 [J]. 河北农业科学,2014,18(4):29-33.

Wang Z Y,Zhang L S,Chang R F,et al. Study on the relationship between tissue structure and cold resistance of peach branches [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences,2014,18(4):29-33.

[30] 杨建民,李艳华,杨敏生,等. 几个仁用杏品种抗寒性的比较 [J]. 中国农业科学,1999,32(1):46-50.

Yang J M,Li Y H,Yang M S,et al. Comparative study on cold resistance of apricot varieties [J]. Scientia Agriculture Sinica,1999,32(1):46-50.

[31] 张昕欣,芦建国,朱亚丽. 三个蜡梅品种枝条组织结构与抗寒性关系的初步研究 [J]. 河北林果研究,2012,27(4):432-434.

Zhang X X,Lu J G,Zhu Y L. Study on the shoot tissue structure of *Chimonanthus* varieties in relation to cold resistance [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research,2012,27(4):432-434.

[32] 吴 瑕. 樱桃抗寒生理与抗寒性鉴定指标研究 [D]. 沈阳:沈阳农业大学,2004.

Wu X. Study on cold resistant physiology and identification index of cold resistance in cherry [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2004.

[33] 王丽雪,李荣富,马兰青,等. 葡萄枝条中淀粉、还原糖及脂类物质变化与抗寒性的关系 [J]. 内蒙古农牧学院学报,1994,15(4):1-7.

Wang L X,Li R F,Ma L Q,et al. Changes of starch,reducing sugar and lipids in grape shoots,and their relationships to cold resistance [J]. Journal of Inner Mongolia Institute of Agriculture & Animal Husbandry,1994,15(4):1-7.

(上接第 39 页)

[20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2000.

Lu R K. Analysis methods of soil agricultural chemistry [M]. Beijing:Chinese Agricultural Science and Technology Press,2000.

[21] 宗 宁,石培礼,耿守保,等. 北方山区主要森林类型树木叶片氮、磷回收效率研究 [J]. 中国生态农业学报,2017,25(4):520-529.

Zong N,Shi P L,Geng S B,et al. Nitrogen and phosphorus re-sorption efficiency of forests in North China [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,2017,25(4):520-529.

[22] 林宝平,何宗明,林思祖,等. 不同林龄杉木针叶大量元素转移特征 [J]. 森林与环境学报,2017,37(1):34-39.

Lin B P,He Z M,Lin S Z,et al. Needles macronutrient concentrations and retranslocation characteristics in Chinese fir plantations of different ages [J]. Journal of Forest and Environment,2017,37(1):34-39.

[23] 殷秀琴,宋 博,邱丽丽,等. 红松阔叶混交林凋落物-土壤动物-土壤系统中 N、P、K 的动态特征 [J]. 生态学报,2017,27(1):128-133.

Yin X Q,Song B,Qiu L L,et al. Dynamic characteristics of N,P,K in the litter-soil fauna-soil system of mixed *Pinus koraiensis* and broad-leaved forest [J]. Acta Ecologica Sinica,2017,27(1):128-133.

[24] 高 超,袁德义,袁 军,等. 花期喷施营养元素及生长调节物质对油茶坐果率的影响 [J]. 江西农业大学学报,2012,34(3):505-510.

Gao C,Yuan D Y,Yuan J,et al. The Effect of spraying nutrient elements and growth regulators at bloom on fruit setting rate of *Camellia oleifera* [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2012,34(3):505-510.

[25] Sterner R W,Elser J J. Ecological Stoichiometry:the biology of elements from molecules to the biosphere [M]. Princeton:Princeton University Press,2002.

[26] Vanni M J,Flecker A S,Hood J M,et al. Stoichiometry of nutrient recycling by vertebrates in a tropical stream:linking species identity and ecosystem processes [J]. Ecology Letters,2002,5(2):285-293.

[27] 李雪峰,韩士杰,胡艳玲,等. 长白山次生针阔混交林叶凋落物中有机物分解与碳、氮和磷释放的关系 [J]. 应用生态学报,2008,19(2):245-251.

Li X F,Han S J,Hu Y L,et al. Decomposition of litter organic matter and its relations to C,N and P release in secondary conifer and broad leaf mixed forest in Changbai Mountains [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2008,19(2):245-251.

[28] Güsewell S,Verhoeven J T A. Litter N:P ratios indicate whether N or P limits the decomposability of graminoid leaf litter [J]. Plant and Soil,2006,287(1/2):131-143.