

桂花抗冻种质的筛选及抗冻机理初探

毕绘蟾 孙醉君 顾 烟 缪启新 黄树芝 郑生智

(江苏省植物研究所, 南京 210014)
中国科学院

摘要 采用田间调查及人工模拟冰冻鉴定的方法, 比较测定了4个桂花品种的抗冻性, 其抗冻性强弱顺序为金桂(*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*) > 银桂(*O. fragrans* var. *latifolius*) > 丹桂(*O. fragrans* var. *aurantiacus*) > 四季桂(*O. fragrans* var. *semperflorens*)。筛选出5株抗冻性最强的单株, 它们的致死温度都在 -26°C 左右。桂花叶片膜脂脂肪酸组成随季节呈周期性变化, 随着气温下降亚麻酸(18:3)含量增加而亚油酸(18:2)含量降低。不同品种均表现出一致的变化趋势, 抗性强的品种这种变化则更为显著。在自然脱锻炼过程中, 叶面喷施脱落酸(200 ppm)能使亚麻酸含量保持稳定, 延缓桂花的脱锻炼。

关键词 桂花; 抗冻机理; 膜脂脂肪酸; 脱落酸

Screening for freezing resistant germplasms of *Osmanthus fragrans* Lour. varieties and its mechanism of freezing resistance Bi Hui-Chan, Sun Zui-Jun, Gu Yin, Miao Qi-Xin, Huang Shu-Zhi, Zheng Sheng-Zhi (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(1): 18~22

Freezing resistance of four varieties of *Osmanthus fragrans* Lour. were determined. Among them, *O. fragrans* var. *thunbergii* was the hardiest. The freezing resistance of the others were arranged in an order of *O. fragrans* var. *latifolius*, *O. fragrans* var. *aurantiacus* and *O. fragrans* var. *semperflorens*. Five plants, Xuan-5, Zh-4, Zh-7, Zh-10 and Zh-8 were selected out as the hardiest ones among 19 trees tested, their LT_{50} temperature were about -26°C . The composition of membrane fatty acid in the leaves were also measured. The results showed that the composition of membrane fatty acid in the leaves changed periodically with the change of growing seasons. The content of 18:3 acid significantly increased whereas that of 18:2 acid decreased as the air temperature dropped. The variation trends were much the same in various varieties, but it is more evident in hardy varieties. The content of 18:3 acid in leaves treated with 200 ppm abscisic acid (ABA) maintained more steady during dehardening and delayed the dehardening processes of *Osmanthus fragrans*.

Key words *Osmanthus fragrans* Lour.; freezing resistant mechanism; membrane fatty acid; abscisic acid (ABA)

桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)是木犀科常绿小乔木或灌木, 四季常青, 叶革质, 花淡黄至橙红色, 香气浓郁。原产我国西南部, 为国内十大名花之一。在长江以南各省广泛栽培, 用于园林绿化或提取香料。因耐寒力不太强, 苏北地区仅东部一些城市在具有良好小气候条件的庭园内偶有种植。一般来说南京是桂花广为栽培的北缘地区, 通常能安全越冬, 大寒年

份叶片或部分嫩梢虽遭冻害,但植株不致死亡。冻害程度在品种和单株间有较大的差异,为了筛选出抗冻的品种和单株,扩大栽植范围,作者于1990~1993年进行了抗冻试验,并在此基础上,通过叶片膜脂脂肪酸的测定,对桂花的抗冻机理进行了探索。

1. 材料和 方法

1.1 材料

在南京中山植物园、玄武湖公园和南京园林科学研究所药物园内选择金桂(*O. fragrans* Lour. var. *thunbergii* Mak)、银桂(*O. fragrans* Lour. var. *latifolius* Mak)、丹桂(*O. fragrans* Lour. var. *aurantiacus* Mak)和四季桂(*O. fragrans* var. *semperflorens* Hort)^[1]作材料进行离体叶片人工冰冻试验,比较品种间的抗冻性差异。另外在上述地点广泛调查冻害情况后,分别选出19株冻害0级或I⁻级的单株,取其叶片进行离体人工冰冻试验,以鉴定各单株的抗冻性。提取膜脂的4个品种的材料均采自南京中山植物园。

1.2 方法

1.2.1 抗冻性鉴定 采用人工模拟冰冻鉴定法^[2]。本试验处理分CK, -12℃, -14℃, -16℃, -18℃, -20℃, -22℃, -24℃, -26℃和-28℃共10组,用电导法求致死温度LT₅₀(℃)。

1.2.2 膜脂提取及脂肪酸定量分析 取5根一年生春梢,在3~6节位任意取2片叶,混匀后取0.5g,重复3次。100℃高温热杀5min,纯化脂酶,然后用氯仿-甲醇提取总类脂,再用甲醇-石油醚提取极性酯^[3]。极性酯经氢氧化钾甲醇液甲酯化后,用气相色谱分析其脂肪酸组成。气相色谱条件为:日本岛津Gc-5A色谱仪,氢火焰离子化检测器(FID),2m×3mm不锈钢色谱柱,填15%DEGS/Chromosorb W(60~80目),柱温175℃,进样温度270℃,载气N₂流速45ml/min,氢气50ml/min,空气800ml/min。数据用IA Chromatopac C-R_{1A}数据处理器处理。峰面积用归化法计算。

1.2.3 冻害级别 分5级。0级:叶片和嫩枝全部完好;I⁻:叶尖和枝梢顶端略有褐色,变褐数小于20%;I级:症状同I⁻,变褐数占20~50%;I⁺级:症状同I⁻,变褐数占50%以上;II级:叶片边缘及尖部变褐,枝梢顶端焦枯,数量约占30%。

2. 结果与分析

2.1 冻害调查

1991~1992年南京冬季绝对最低温达-12.8℃,桂花普遍受冻,但在不同品种间和初选的单株间表现有差异。通过调查分级,其结果大致为:

0级 钟山7(金桂)、玄5(金桂)、玄3(金桂)、钟山10(银桂)、钟山8(银桂)。

I⁻级 药4(银桂)、药3(丹桂)、钟山3(银桂)、钟山1(金桂)、药1(银桂)、药2(丹桂)、钟山4(银桂)。

I级 钟山5(银桂)、玄2(金桂)、玄1(金桂)、钟山6(金桂)。

I⁺级 玄4(丹桂)、钟山2(金桂)、钟山丹桂。

II级 钟山9(四季桂)

在金桂与银桂间花色往往有过渡色,有些单株很难确切地归于哪一种,但从总体来看品种的抗冻性强弱顺序大致为:金桂>银桂>丹桂>四季桂。

2.2 品种和单株的抗冻性鉴定

2.2.1 人工冰冻试验 1989.12~1990.1和1990.12~1991.1连续两年对初选品种和单株进行人工冰冻试验。单株间致死温度第一年为 $-16.5\sim-26^{\circ}\text{C}$,变幅 9.5°C ;第二年为 $-18\sim-26^{\circ}\text{C}$,变幅 8°C 。两年致死温度在 -20°C 以上的单株有8株,抗冻性最强的是玄5,钟山4,钟山7,钟山10,钟山8,它们的致死温度都在 -26°C 左右(见表1)。这与实地冻害调查结果基本一致。

2.2.2 自然低温后的电导率 1991.12~1992.1南京绝对最低温达 -12.8°C ,桂花各品种单株都有不同程度的冻害,其中最严重的为四季桂,电导率测定为50.01%,正好达到致死温度,再次证实它是各品种中最不抗冻的。其余品种电导率均较低,多数在10~20%之间(见表1)。电导率未达到50%前,百分率的高低不能确切地反映抗冻力的强弱^[2]。

表1 桂花各品种单株的抗冻性

Tab 1 Freezing resistance of per tree of *Osmanthus fragrans* varieties

株号 No of tree	致死温度 LT ₅₀ ($^{\circ}\text{C}$)		电导率 EC (%) [*] '91.12~'92.1	株号 No of tree	致死温度 LT ₅₀ ($^{\circ}\text{C}$)		电导率 EC (%) [*] '91.12~'92.1
	'89.12~'90.1	'90.12~'91.1			'89.12~'90.1	'90.12~'91.1	
金桂 <i>O. fragrans</i> var. <i>thunbergii</i>				银桂 <i>O. fragrans</i> var. <i>latifolius</i>			
钟-1	-17.9	-19.8	19.47	钟-5	-22.1	-26.0	—
钟-2	-17.4	-19.4	—	钟-8	-20.9	-25.3	9.00
钟-3	-22.9	-23.1	13.84	钟-10	-23.0	-25.8	12.25
钟-4	-20.7	-26.0	22.10	药-1	-16.9	-18.2	13.75
钟-6	-19.4	-22.4	16.13	药-4	-18.6	-21.3	33.92
钟-7	-23.3	-26.0	14.72	丹桂 <i>O. fragrans</i> var. <i>aurantiacus</i>			
玄-1	-18.2	-18.6	11.23	药-2	-18.1	-20.0	20.50
玄-2	-19.5	-19.9	11.25	药-3	-19.5	-21.1	16.29
玄-3	-20.6	-23.0	11.65	玄-4	-18.2	-20.2	17.25
玄-5	-26.0	-24.3	8.28	四季桂 <i>O. fragrans</i> var. <i>semperflorens</i>			
				钟-9	-16.5	-18.0	50.01

* 经自然低温(-12.8°C)后测得的叶片电导率

Electrical conductivity (EC) of leaves measured after natural low temperature (-12.8°C).

2.3 膜脂脂肪酸组分与抗冻性的关系

2.3.1 叶片膜脂脂肪酸组分及品种间的差异 桂花各品种叶片膜脂脂肪酸组分相同,由棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)组成。其中亚麻酸、棕榈酸和亚油酸约占脂肪酸总含量的88~90%。不饱和脂肪酸约占80%(见表2)。品种间膜脂脂肪酸的配比差异较大,主要反映在亚麻酸和亚油酸的含量上。抗冻性强的金桂亚麻酸含量高,亚油酸含量低;抗冻性弱的四季桂则相反。因此不饱和脂肪酸总量与品种的抗冻性之间没有明显的相关性,而膜脂脂肪酸中亚麻酸含量与品种的抗冻性呈正相关(见表2)。

2.3.2 不同生长季节膜脂脂肪酸配比的变化及品种间的差异 以抗冻性差异较大的桂花品种(抗冻性强的金桂和抗冻性弱的四季桂)为对象,于1992.7~1993.7隔月和逐月取样分析

叶片膜脂脂肪酸组成,观察叶片膜脂脂肪酸配比的季节变化。结果表明:在生长季节(5月~11月)各类脂肪酸含量的逐月变化不大;入冬后(12月),气温下降,出现零下低温,叶片中

表2 桂花各品种叶片膜脂脂肪酸组成

Tab 2 The composition of membrane fatty acids in the leaves of *Osmanthus fragrans* varieties

品种 Varieties	脂肪酸组成 Composition of fatty acid (mole %)						不饱和脂肪酸总量 Total content of UFA (mole %)	IUFA*
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3		
金桂 var. <i>thunbergii</i>	16.25	1.64	2.01	7.03	13.37	59.70	81.74	214.5
银桂 var. <i>latifolius</i>	15.76	1.64	2.16	6.88	13.56	59.50	81.58	214.1
丹桂 var. <i>aurantiacus</i>	16.43	1.58	1.98	7.98	14.43	57.47	81.46	210.8
四季桂 var. <i>semperflorens</i>	16.50	1.68	2.11	8.13	14.46	57.10	81.37	210.0

* IUFA: 不饱和脂肪酸指数 Index of unsaturated fatty acid
 $IUFA = 16:1 \text{ mole\%} + 18:1 \text{ mole\%} + (18:2 \text{ mole\%} \times 2) + (18:3 \text{ mole\%} \times 3)$

亚麻酸含量明显增加而亚油酸含量降低;严寒期间(1~3月)亚麻酸和亚油酸含量保持相对稳定,此时亚麻酸含量达到最大值;3月以后,气温回升,亚麻酸含量又很快下降而亚油酸含量增加。生物统计分析表明,月平均气温与亚麻酸含量呈负相关($r = -0.949$),即亚麻酸的含量随着冷锻炼的进行而增加;与亚油酸含量呈正相关($r = 0.846$)。这种变化趋势在金桂和四季桂中的表现基本一致,但金桂叶片中亚麻酸含量增加的速度比四季桂稍快。从7月到次年2月金桂叶片中亚麻酸含量由59.70%上升至64.24%,增加4.54%;而四季桂由57.12%上升至60.53%,增加3.41%(见表3)。

表3 桂花叶片膜脂脂肪酸组成的季节变化

Tab 3 Seasonal variation of membrane fatty acid composition in the leaves of *Osmanthus fragrans* varieties

月份 Month	脂肪酸组分 Fatty acid composition (%)												IUFA	
	16:0		16:1		18:0		18:1		18:2		18:3		Th	Se*
	Th	Se	Th	Se	Th	Se	Th	Se	Th	Se	Th	Se		
'92.7	16.25	16.50	1.64	1.68	2.01	2.11	7.03	8.13	13.37	14.46	59.70	57.10	214.51	210.03
'92.9	16.64	17.42	1.56	1.43	1.51	1.88	6.28	6.28	14.48	14.51	59.53	58.48	215.39	212.17
'92.11	16.73	16.53	1.21	1.87	1.48	2.00	6.38	5.96	14.43	14.81	59.77	58.83	215.76	213.94
'92.12	15.76	16.95	1.64	1.84	2.16	1.99	6.40	5.80	11.16	13.64	62.88	59.78	219.00	214.26
'93.1	15.39	15.11	1.70	1.40	1.28	2.50	6.83	7.50	10.94	12.63	63.86	60.86	221.99	216.74
'93.2	14.55	16.27	1.69	1.50	1.49	2.17	6.95	7.33	11.08	12.20	64.24	60.53	223.52	214.82
'93.3	14.23	13.86	1.73	1.42	1.29	2.47	7.05	7.37	12.12	12.42	63.58	60.46	223.76	215.01
'93.5	15.63	17.31	1.45	1.66	2.06	2.20	7.47	5.64	14.07	14.44	59.32	58.75	215.02	212.43
'93.7	17.80	17.06	1.59	1.70	1.82	2.60	6.17	7.93	14.96	14.21	57.66	56.59	210.66	207.64

* Th—金桂 *O. fragrans* var. *thunbergii*, Se—四季桂 *O. fragrans* var. *semperflorens*

从脂肪酸不饱和度来看,随着气温的下降,抗冻性强的金桂叶片膜脂的 IUFA 值逐渐增加,3月到达最高值,以后随着气候转暖, IUFA 值很快下降;而抗冻性弱的四季桂叶片膜脂的 IUFA 值只有很小的变化(图1)。

2.4 外源脱落酸(ABA)对桂花叶片膜脂脂肪酸配比的影响

1993年3月20日和4月10日两次叶面喷施脱落酸(200 ppm),观察膜脂脂肪酸的变化。由图2可见:在喷过2次 ABA 后,2个品种叶片中的亚麻酸含量一直保持稳定,5月份开始

降低,至6月份才与对照接近。其中在第一次喷后10天内含量还略有增加,金桂和四季桂叶片亚麻酸含量分别从63.8%和60.81%上升到64.1%和60.98%。而它们的对照则自3月份起即明显下降,至5月它们的含量分别为处理的93%和95%。由此看来,在桂花脱锻炼过程中喷施ABA,不管品种抗冻性强弱,均能使亚麻酸的降解延缓2个月。

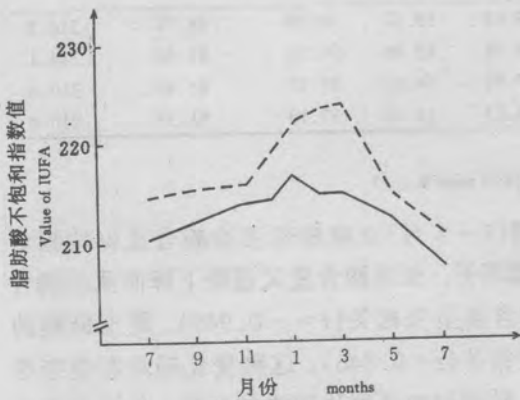


图1 不同生长季节叶片膜脂肪酸不饱和指数的变化
Fig 1 Changes of IUFA of membrane in the leaves of *Osmanthus fragrans* varieties during different growing seasons

--- 金桂 *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*
—— 四季桂 *O. fragrans* var. *sempreflorens*

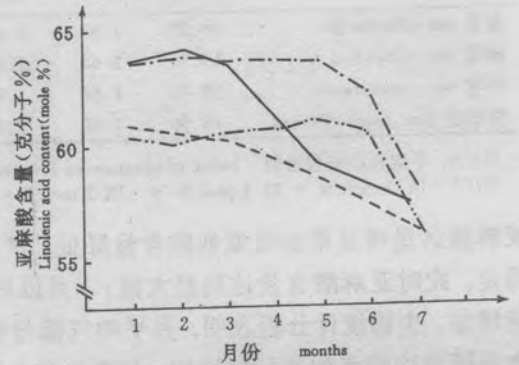


图2 喷施ABA(200 ppm)后桂花叶片亚麻酸含量的变化
Fig 2 Changes of linolenic content in the leaves of *Osmanthus fragrans* varieties after ABA treatment

--- 金桂(ABA处理) var. *thunbergii* (ABA treatment)
—— 金桂(对照) var. *thunbergii* (control)
····· 四季桂(ABA处理) var. *sempreflorens* (ABA treatment)
- · - · - 四季桂(对照) var. *sempreflorens* (control)

在第二次喷施ABA后20天,与测定亚麻酸含量同步,将经ABA处理的和未经ABA处理的叶片一同置于冰箱的结冰室(-2~-4℃)中进行冷冻处理,肉眼观察其在冷冻过程中冻害出现的天数和冻害症状。结果表明:未经ABA处理的叶片,冷冻处理1天即出现冻害症状,随着冷冻天数增加冻害症状越来越严重;经ABA处理的叶片,四季桂在第3天,金桂在第5天才开始出现冻害症状。由此可见,喷施脱落酸有利于减慢桂花脱锻炼进程。

参 考 文 献

- 1 陈建业, 宁玉霞, 赵翠花等. 1995: 园艺学报 22(2):176~180.
- 2 毕绘麟, 顾 姻, 孙醉君等. 1986: 常绿阔叶树抗冻种质评选方法的研究, 见: 南京中山植物园研究论文集, 江苏科学技术出版社, 南京. 68~74.
- 3 苏维埃, 王文英, 李锦树. 1980: 植物生理学通讯 (3):54~60.

(责任编辑:赵 逢春)