

不同发育时期樟子松 (*Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.) 的电阻抗参数与抗寒性的关系

王爱芳^{1,2}, 张 钢^{1,*}, 魏士春³, 崔同祥³

(1. 河北农业大学园艺学院, 保定 071001; 2. 河北农业大学林学院, 保定 071001;
3. 河北省孟滦国营林场管理局, 承德 068450)

摘要: 采用电阻抗图谱(EIS)法和电导(EL)法对不同发育时期的樟子松(*Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.)茎和针叶进行了抗寒性测定, 试图通过比较两种方法测定抗寒性结果的相关性, 找到适合冷冻处理后樟子松抗寒性测定和不经冷冻处理估测抗寒性的 EIS 参数, 完善 EIS 法测定抗寒性。以 8 年生樟子松苗为试材, 在抗寒锻炼阶段(10 月份)和脱锻炼阶段(3 月份)分别取样进行 EIS 和 EL 测定。结果表明, EIS 法胞外电阻率(r_e)与 EL 法测定的樟子松抗寒性相关性较高($R^2 = 0.97$), 但比 EL 法求出的抗寒性高。针叶的细胞膜时间恒量(τ_m)和茎的弛豫时间(τ_1)随冷冻温度变化与 r_e 表现相似的 S 曲线, 相关分析表明, r_e (茎和针叶)与 τ_1 (茎)和 τ_m (针叶)的变化有较好的相关性($R^2 = 0.74 \sim 0.84$)。经 Logistic 方程拟合, EIS 的 τ_m (针叶)和 τ_1 (茎)法与 EIS(r_e)法、EL 法测定的樟子松抗寒性相关性也较高($R^2 = 0.88 \sim 0.91$), 说明针叶 τ_m 和茎 τ_1 也可以作为计算抗寒性的参数。另外, 8 年生樟子松两个发育时期(10 月和 3 月份)未经冷冻的针叶 τ_m 与茎的 τ_2 随抗寒性的增强而显著增加, 表明不经过冷冻处理样本用 τ_2 (茎)和 τ_m (针叶)估计樟子松抗寒性是很有前途的方法。

关键词: 樟子松; 抗寒性; 电阻抗图谱; 胞外电阻; 弛豫时间; 细胞膜时间恒量

文章编号: 1000-0933(2008)11-5741-09 中图分类号: Q948 文献标识码: A

Relation between frost hardiness and parameters of electrical impedance spectroscopy in saplings of different development stage of *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.

WANG Ai-Fang^{1,2}, ZHANG Gang^{1,*}, WEI Shi-Chun³, CUI Tong-Xiang³

1 College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

2 College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

3 Mengluan State Forest Administration Bureau of Hebei, Chengde 068450, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5741 ~ 5749.

Abstract: Electrical impedance spectroscopy (EIS) and electrolyte leakage (EL) methods were used to measure frost hardiness of stems and needles of Mongolia Scotch pine (*Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.) saplings in different development stage. By comparing the frost hardiness results measured by the two methods, the aim of the study was to find suitable EIS parameters evaluating the frost hardiness of frost-exposed and non-frost-exposed Mongolia Scotch pine, and to

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2005-2007); 河北农业大学留学回国人员科研启动基金资助项目(2004-2006)

收稿日期: 2007-12-07; **修订日期:** 2008-09-16

作者简介: 王爱芳(1982~), 女, 河北邯郸人, 博士生, 主要从事为观赏植物抗性生理生态研究。E-mail: wangaifang82@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanggang1210@126.com

Foundation item: The project was financially supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry(2005-2007) and Agricultural University of Hebei(2004-2006)

Received date: 2007-12-07; **Accepted date:** 2008-09-16

Biography: WANG Ai-Fang, Ph. D. candidate, mainly engaged in stress-resistance physiological ecology of ornamental plant. E-mail: wangaifang82@126.com

optimize EIS method for studying frost hardiness on plant. Eight-year-old Mongolia Scotch pine saplings were sampled in frost hardening (October) and dehardening (March) stage for EIS and EL measurement. The results indicated that the determination coefficient of frost hardiness between EIS (r_e) and EL is 0.97, however, the frost hardiness results evaluated by EIS (r_e) was higher than those by EL. The trend of membrane time constant τ_m in needles and relaxation time τ_1 in stems changed with the freezing temperatures showed the similar "Sigmoid function" curve as specific extracellular resistance r_e , and the correlation analysis showed that r_e (stems and needles) correlated with τ_1 (stems) and τ_m (needles) after freezing temperature treatment ($R^2 = 0.74 \sim 0.84$). Through calculating by Logistic function, the frost hardiness of Mongolia Scotch pine measured by τ_1 (stems) and τ_m (needles) methods had high correlations with that measured by EIS (r_e) and EL methods ($R^2 = 0.88 \sim 0.91$). It suggested that τ_m of needles and τ_1 of stems might be the parameters to calculate the frost hardiness after exposed to freezing temperatures. In addition, τ_m of needles and τ_2 of stems in non-frost-exposed samples increased significantly with the enhanced frost hardiness in two development stages of 8-year-old Mongolia Scotch pine, indicating that τ_m (needles) and τ_2 (stems) of non-frost-exposed saplings would be good parameters to estimate frost hardiness in Mongolia Scotch pine.

Key Words: Mongolia Scotch pine; frost hardiness; electrical impedance spectroscopy; extracellular resistance; relaxation time; membrane time constant

抗寒性(frost hardiness)是指植物不受冻害所能忍受的冰冻温度^[1]。测定植物抗寒性,获得植物年生长周期不同阶段抗寒性变化的准确信息,对研究植物冻害、低温锻炼和育种具有重要意义^[2]。测定植物抗寒性的方法有多种,如全株冰冻测试(WPFT)法、电导(EL)法、叶绿素荧光(CF)法和电阻抗图谱(EIS)法等。EIS法提供了非破坏性地测定胞内电阻、胞外电阻和膜变化的手段^[3],目前被广泛应用于植物抗寒性方面的研究^[4~7]。与其他测定方法相比,它容易、快速,是一种研究植物抗寒性的有效实用的物理方法^[8]。

用EIS法测定抗寒性,胞外电阻率(r_e)是冷冻处理后确定抗寒性最适合的参数^[9]。以前的研究中大都是在数个不同的人工控制冷冻温度处理后,采用 r_e 的变化估测一个温度值(LT₅₀)来表示某一样本的抗寒性^[8]。Repo等^[10]报道,除 r_e 外,弛豫时间(τ_1, τ_2),弛豫时间的分布系数(ψ_2)等电阻抗参数也随冷冻逆境改变而变化。近年来在欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)^[5,11]、北美杜鹃(*Rhododendron*)^[12]的研究中发现,不经冷冻处理的样本的某些参数变化与样本冷冻处理后估测的抗寒性明显相关。在抗寒性快速增强阶段,不经冷冻处理的样本用 τ_1 求出的抗寒性与常规方法求出的抗寒性的差异不超过 $\pm 2^\circ\text{C}$ 范围^[5]。因此,开发EIS参数及不经人工冷冻处理测定植物抗寒性的方法对于完善EIS方法,快速估测植物抗寒性具有重要的研究意义。

本文以不同发育时期的樟子松(*Pinus Sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.)为材料,采用EIS法和EL法测定樟子松的抗寒性。通过比较两种方法测定结果的相关性,分析未冷冻樟子松针叶和茎的EIS参数和抗寒性的关系,拟找到适合樟子松抗寒性测定的EIS参数及适合不经冷冻处理快速估测植物抗寒性的EIS参数,为植物抗寒性研究及生产提供理论依据和可借鉴方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为8年生樟子松。选择抗寒锻炼(10月份)和脱锻炼(3月份)两个时期分别取样。2006年10月和2007年3月从承德围场龙头山种苗场取8年生樟子松,分别选取10棵作为供选株,每棵随机剪取6个当年生枝,共60个,放入取样箱,带回实验室进行抗寒性的测定。取样箱中盛有冰块,以保证在长距离运送样本过程中,样本不失水,抗寒特性及物候特性没有改变^[13~15]。

1.2 电导(EL)法和电阻抗图谱(EIS)法测定抗寒性

1.2.1 冷冻处理

样本用清水清洗3次,去除表面污染物,再用去离子水洗3次。按7个冷冻温度分别装入塑料袋中,每袋

7 个枝段(剩余枝段用于未冷冻样本测定电阻抗参数)。在塑料袋中喷少许去离子水,以免发生过冷现象。然后放入冰箱(BCD-252WBCS,青岛海尔;BD-100LT,青岛海尔;U410-86,英国)中进行冷冻处理。其中4℃为对照。到达每个设定的温度,保持4h,再取出放入4℃冷藏室缓慢解冻24h。降温速率为6℃·h⁻¹[16]。根据植物抗寒发育时期的不同,使它们包括使植物材料全部成活和全部死亡的温度(表1)。

表1 2次冷冻处理抗寒性测定的设置温度

Table 1 The temperatures used for determining frost hardiness in 2 controlled freezing tests

发育时期 Development stage	温度 Temperature (℃)						
10 月 October	4	-3	-6	-9	-15	-25	-35
3 月 March	4	-4	-10	-22	-30	-45	-60

1.2.2 电导(EL)法测定抗寒性^[2,11]

缓慢解冻后,每枚针叶从中部切取10mm,用去离子水洗净后放入试管中,每个试管放8段针叶。每段枝从中部切取10mm,再纵切成4段,用去离子水洗净后放入试管中,每个试管放4段茎段。每个温度设4个重复。每试管加12ml去离子水,用蜡膜封口,放入摇床中振荡24h。用DDSL-308型电导仪(上海京科雷磁)测渗出液的初电导值(C_1)。封口后将试管置于沸水中煮沸20min,再放入摇床中振荡24h,测终电导值(C_2)。每次测定时,用去离子水作对照,测定空白电导值。用公式(1)计算相对电导率(REL):

$$REL = \frac{C_1 - C_{\text{空白1}}}{C_2 - C_{\text{空白2}}} \quad (1)$$

式中,以冷冻温度为横坐标,REL为纵坐标作图。参照Logistic方程^[17]计算抗寒性。

$$y = \frac{A}{1 + e^{B(C-x)}} + D \quad (2)$$

式中, y 为REL(%); x 为冷冻温度(℃); B 为斜率(%·℃⁻¹), C 为拐点(℃), A 表示受冻害时REL的最大值, D 表示未受冻害时REL的基础值。用SPSS8.0软件,通过计算方程(2)的拐点温度表示组织半致死温度值(LT₅₀),估算抗寒性。

1.2.3 电阻抗图谱(EIS)法测定抗寒性^[10]

冷冻处理后,每个冷冻温度从当年生枝的中部随机选取8枚针叶(从中部取15mm),取8段茎(15mm)进行电阻抗图谱测定。用测厚仪(Mitutoyo NO. 7331, Japan)测茎的直径,针叶的厚度和宽度,精确到0.01mm。EIS测定仪器为阻抗分析仪(HP4284A, Agilent, USA)。将Ag/AgCl电极(RC 1, WPI Ltd., Sarasota, FL, USA)与阻抗分析仪相连,加电极凝胶,消除电极的极化电阻^[10,18]。将针叶和茎的横切面与凝胶相连。测定样本在42个频率下的电阻值和电抗值,测定频率为80~1MHz。

将上述频率下测定样本的电阻和电抗值分别作为实部和虚部,作出电阻和电抗随频率的变化曲线,即EIS。根据样本的EIS确定适用的等效电路。

针叶的阻抗图谱适用于等效电路模型A^[13,19]。模型A的总阻抗($Z_{\text{model-A}}$)是:

$$Z_{\text{Model-A}} = R_{\infty} + \frac{(R_0 - R_{\infty}) \cdot (1 + \beta)}{1 + \beta \cdot (1 + j \cdot \omega \cdot \tau_m)^{0.5}} \quad (3)$$

式中, R_{∞} 和 R_0 分别是在极高频与极低频下的电阻; τ_m 是细胞膜的时间恒量, $\tau_m = R_3 \times C_m$,其中 R_3 和 C_m 分别为细胞膜的电阻及电容;系数 β 是控制图谱偏度及凹陷中心的一个因子^[18]; $j = \sqrt{-1}$,是负数算符; $\omega = 2 \times \pi \times f$,是角频率(f 为AC频率)^[13,19]。

模型A的参数用复合非线性最小二乘方下的曲线进行估算^[20]。用LEVM v 8.06软件进行拟合。针叶模型A拟合的参数如下: R_{∞} (高频电阻,Ω)、 R_0 (低频电阻,Ω)、 β 系数、 τ_m (细胞膜的时间恒量,s)。

胞内电阻(R_i)和胞外电阻(R_e)分别按下列公式计算得到:

$$R_e = R_0 \quad (4)$$

$$R_i = R_\infty \cdot \frac{R_0}{R_0 - R_\infty} \quad (5)$$

由于样本的横切面面积及长度的大小会成比例地分别降低和提高阻抗,需要考虑组织的几何形状。即需要对测定的阻抗参数求出其电阻率(r_x),由测定的电阻乘以样本横切面面积,再除以样本长度来计算 r_x :

$$r_x = \frac{A}{l} \cdot R_x \quad (6)$$

其中, r_x (x 表示胞外 e 或胞内 i) 是电阻率,单位为 Ωm ; R_x (x 表示胞外 e 或胞内 i) 是测定的电阻,单位为 Ω ; A 是样本的横切面面积,樟子松针叶的横切面面积可看作是个半椭圆形,故 $A_{\text{针叶}} = \pi ab/4$, a 是针叶的厚度, b 是针叶的宽度; l 表明样本的长度(15mm)。

茎的阻抗图谱适用于双-DCE 模型^[21]。总阻抗是:

$$Z = R + \frac{R_1}{1 + (i \cdot \tau_1 \cdot \omega)^{\psi_1}} + \frac{R_2}{1 + (i \cdot \tau_2 \cdot \omega)^{\psi_2}} \quad (7)$$

式中, Z 为总阻抗, ω 为角速度($\omega = 2 \times \pi \times f$, 其中 f 为 AC 频率), i 为虚数单位。双-DCE 模型共有 7 个需测定的参数。它们是 3 个电阻(R 、 R_1 和 R_2 , Ω)、2 个弛豫时间(τ_1 和 τ_2 , μs)、2 个在不同弛豫时间的分布系数(ψ_1 和 ψ_2)。图 1 为欧洲赤松茎的电阻抗图谱的示意图,展现了双-DCE 模型各参数的数学解释^[5]。 R_1 和 R_2 分别根据高频弧和低频弧与 X 轴的交叉点获得, τ_1 和 τ_2 由阻抗图谱高频弧或低频弧最高值求得,位于 X 轴下方的圆心分别定义为 ψ_1 和 ψ_2 。等效电路模型的参数值可用复合非线性最小二乘方下的曲线进行估算^[20]。

胞外电阻(R_e)和胞内电阻(R_i)分别按下面公式计算:

$$R_e = R + R_1 + R_2 \quad (8)$$

$$R_i = R \cdot \left(1 + \frac{R}{R_1 + R_2} \right) \quad (9)$$

相应的电阻率由公式(6)计算,其中茎的横切面面积 $A_{\text{茎}} = \pi \times d^2/4$ (d 为茎的直径),单位为 m^2 。

根据以前的研究^[5, 11],胞外电阻率(r_e)是冷冻处理后确定抗寒性最适合的参数。以冷冻温度为横坐标, r_e 为纵坐标作图,用方程(2)拟合求出该曲线出现拐点时的温度,为 r_e 法估测的抗寒性。除了 r_e 外,其它几个电阻参数也随冷冻逆境而改变。以冷冻温度为横坐标,分别以针叶和茎的其他几个电阻抗参数为纵坐标作图,找出和 r_e 及 REL 变化曲线相似的参数用方程(2)拟合求抗寒性。

1.3 不经人工冷冻处理样本的电阻抗参数

除去用于冷冻处理的枝段,将剩余的枝段,经去离子水冲洗干净后,从中部随机选取 16 个针叶(从中部取 15mm), 16 段茎(15mm)直接进行电阻抗测定。测定方法同 1.2.3。

1.4 统计分析

EL 法测定抗寒性,用 Microsoft excel 计算 REL,作图。EIS 法测定抗寒性用 LEVM v 8.06 软件拟合出 EIS 参数值,将数据导入 Microsoft excel,作图。参照 Logistic 方程(2),用 SPSS8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., U. S. A.) 软件,计算抗寒性。用 independent-samples T test (SPSS8.0) 分析两个发育时期 EIS 参数差异。

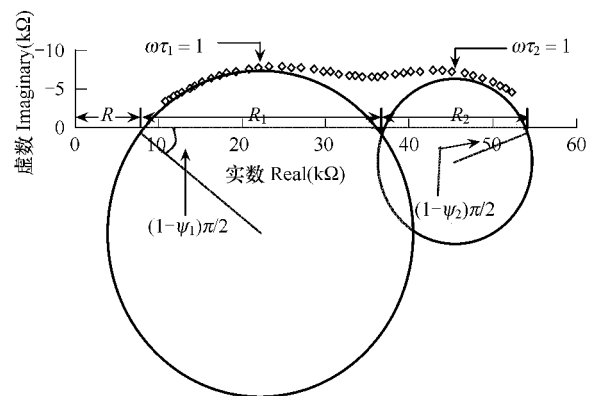


图 1 欧洲赤松茎的电阻抗图谱示意图^[5]

Fig. 1 A schematic drawing of an impedance spectrum of stem of *Pinus sylvestris*^[5]

分布模型(Double-DCE)参数的数学解释详见^[5]图 1 和附录 1, 图谱从 80 Hz 到 1 MHz 共 42 个频率(从右至左) The mathematical interpretation of the distributed model parameters (double-DCE) see ^[5], Fig. 1 and Appendix 1. The spectrum is composed of 42 different frequencies ranging from 80 Hz to 1 MHz from right to left, respectively

2 结果与分析

2.1 EL 法和 EIS 法测定抗寒性结果的比较

以 3 月的樟子松针叶和茎为例,在可忍受的冷冻温度范围内, REL 、 r_e (针叶和茎)、 τ_m (针叶)、 τ_l (茎)变化不大,低于一定温度,细胞膜的结构和功能受到伤害,将受到伤害的组织浸在去离子水中,其外渗液中电解质的含量比正常组织外渗液中的含量增加,因此 REL 增大(图 2),而 r_e 、 τ_l 、 τ_m 降低(图 3,4)。有研究表明^[22],低温胁迫引起植物组织细胞的伤害加重而引起的胞外电阻的减小与受损原生质膜的 H^+ -ATPase 活性及细胞内的相对电解质渗透率直接相关。弛豫时间的降低反映了细胞膜组成的变化、细胞内离质体和共质体中离子的迁移率及它们对频率变化的响应。 τ_m 的降低也反映了细胞膜特性的改变, $\tau_m = R_3 \times C_m$, 由于细胞膜的电容 (C_m) 被认为是一个常量 $1 \mu F cm^{-2}$ ^[19], τ_m 的改变取决于细胞膜的电阻 (R_3)^[13], 当低温引起细胞膜受害时, R_3 必然降低, 所以 τ_m 相应降低。

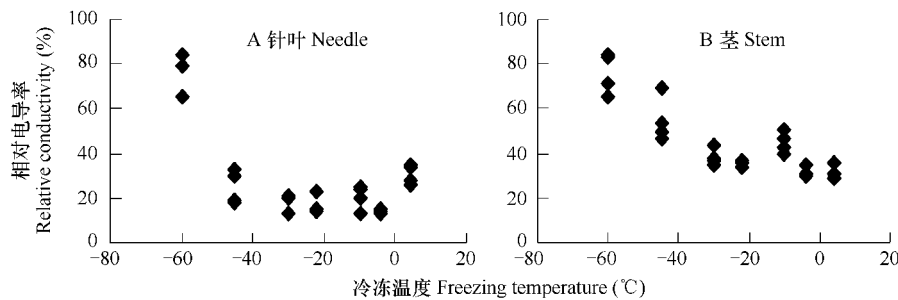


图 2 3 月份 8 年生樟子松的针叶(A)和茎(B)经不同冷冻温度处理后相对电导率(REL)的变化

Fig. 2 Change in relative conductivity of freezing needles(A) and stems(B) in 8-year-old Mongolia Scotch pine saplings measured in March

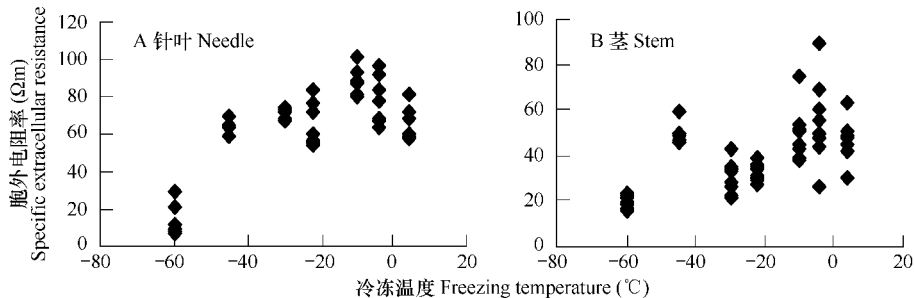


图 3 3 月份 8 年生樟子松的针叶(A)和茎(B)经不同冷冻温度处理后胞外电阻率(r_e)的变化

Fig. 3 Change in specific extracellular resistance(r_e) of freezing needles(A) and stems(B) in 8-year-old Mongolia Scotch pine saplings measured in March

比较图 3A 和 4A 可以看出,不同冷冻温度处理后针叶 τ_m 与针叶 r_e 曲线相似;茎 τ_l 与茎 r_e 曲线相似(比较图 3B 和 4B)。从表 2 看出,不同冷冻温度处理后的参数,除了茎的 REL 和 r_e 相关性较差外,其他的参数之间相关性都较高。用 logistic 方程(2)拟合求出各曲线的拐点温度,作为该方法求出的抗寒性。

不同发育时期樟子松针叶和茎的抗寒性用以上几种方法估测结果见表 3。3 月抗寒性较强, r_e 法和 EL 法测定的针叶抗寒性值相差 $10^{\circ}C$ 左右,10 月抗寒性较弱,两种方法测定的针叶抗寒性值相差不到 $2^{\circ}C$ 。总体上看,EIS(r_e)法较 EL 法求得的抗寒性高。 τ_m 和 τ_l 法与电导法的结果比与 r_e 法的结果更接近。其中,用 τ_m 与 EL 法求出的 3 月针叶抗寒性结果相差不到 $2^{\circ}C$ ($-46.19 \sim -47.80^{\circ}C$);用 τ_l 与 EL 法求出 10 月的茎抗寒性相差不到 $3^{\circ}C$ ($-8.53 \sim -6.25^{\circ}C$)。几种方法测定的针叶和茎抗寒性的相关性较高(表 4)。

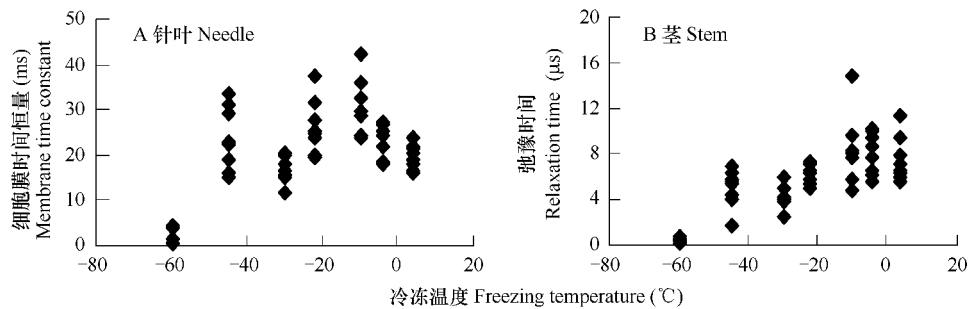


图4 8年生3月樟子松的针叶(A)和茎(B)经不同冷冻温度处理后细胞膜时间常量(τ_m)和弛豫时间(τ_1)的变化

Fig. 4 Change in membrane time constant(τ_m) and relaxation time(τ_1) of freezing needles(A) and stems(B) in 8-year-old Mongolia Scotch pine saplings measured in March

2.2 未冷冻樟子松针叶和茎的 EIS 参数

8年生樟子松在不同发育时期针叶的电阻抗图谱都是一个弧。两个时期的波幅(图谱中虚部的最大绝对值)差异较小(如图5A)。在高频电流下,3月和10月樟子松针叶的实部和虚部值基本一样,随着电流频率的降低,两个时期的电阻抗图谱变得不一致。

8年生樟子松在不同发育时期茎的电阻抗图谱相差较大。3月图谱波幅低,10月波幅高。两个时期均呈现不明显的两个弧(图5B)。图谱的这些变化表明,不同发育时期植物组织发生了结构和生理的改变。

表2 不同冷冻温度下针叶和茎各参数变化的相关性

Table 2 Correlation in each parameter of needles and stems under different freezing temperatures

器官 Organs	方法 methods	相关性 Correlation	R^2
茎 Stems	$REL + r_e$	$y = -0.6916x + 72.459$	0.31
	$REL + \tau_1$	$y = -4.5442x + 70.18$	0.63
针叶 Needles	$r_e + \tau_1$	$y = 0.1876x - 1.9245$	0.74
	$REL + r_e$	$y = -0.873x + 84.152$	0.89
	$REL + \tau_m$	$y = -2.0669x + 70.382$	0.76
	$r_e + \tau_m$	$y = 0.3571x - 2.5233$	0.84

表3 电导(EL)法和电阻抗图谱(EIS)法测定8年生樟子松抗寒性结果的比较

Table 3 Comparison in frost hardiness of 8-year-old Mongolia Scotch pine saplings between electrolyte leakage and electrical impedance spectroscopy methods

发育时期 Development stage	器官 Organ	抗寒性 Frost hardiness(°C)		
		电导(EL)法 Electrolyte leakage method	胞外电阻率(r_e)法 Extracellular resistance method	针叶细胞膜时间常量(τ_m)法和茎弛豫时间(τ_1)法 Membrane time constant of needle and relaxation time of stem methods
10月 October	针叶 needle	-20.06	-21.08	-15.51
	茎 stem	-8.53	-15.92	-6.25
3月 March	针叶 needle	-46.19	-57.73	-47.80
	茎 stem	-46.44	-59.35	-34.08

对以上图谱用模型A(针叶)和双DCE模型(茎)拟合,得到相应的EIS参数值(表5,表6)。由表5可以看出,3月份茎的弛豫时间(τ_2)显著大于10月份($P < 0.01$),与抗寒性变化一致;3月份茎 τ_1 也高于10月份,但是差异不显著。两个时期 ψ_1 、 ψ_2 差异不显著。3月份茎胞外电阻率显著低于10月份($P < 0.05$)。

由表6可以看出,3月樟子松针叶的 τ_m 显著高于10月份($P < 0.05$),与抗寒性变化一致。相反, β 系数显著低于10月份($P < 0.05$)。3月份针叶的胞外和胞内电阻率略高于10月份,但差异不显著。

表4 EL法、 r_e 法及 τ_1 (茎)和 τ_m (针叶)法测定的樟子松针叶和茎抗寒性的相关性

Table 4 Correlation of the frost hardiness in needles and stems of Mongolia Scotch pine measured by EL, r_e with τ_1 (stems) and τ_m (needles) methods

方法 Methods	相关性 Correlation	R^2
EL法 + r_e 法	$y = 1.2017x - 2.1015$	0.97
EL法 + τ_m (针叶)、 τ_1 (茎)	$y = 0.9289x + 2.2413$	0.91
r_e 法 + τ_m (针叶)、 τ_1 (茎)	$y = 0.7519x + 3.0517$	0.88

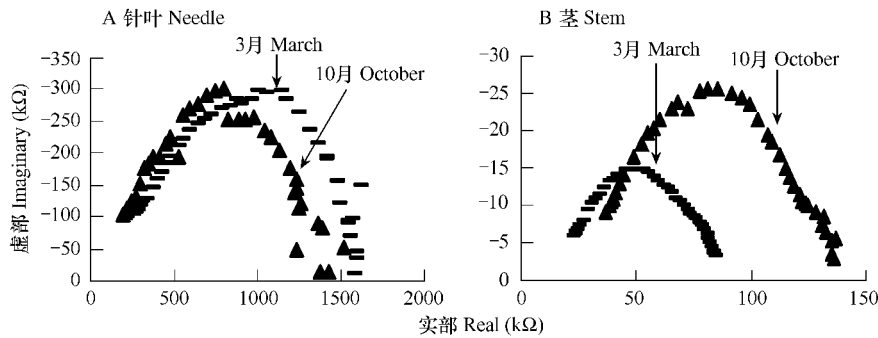


图 5 不同发育时期樟子松未冷冻针叶(A)和茎(B)的电阻抗图谱

Fig. 5 Impedance spectra of non-frost-exposed needles (A) and stems (B) of Mongolia Scotch pine saplings in different development stage
电阻抗图谱由 80Hz ~ 1 × 10⁶ Hz 范围内的 42 个频率构成(分别从右到左);每个点是 16 个针叶和 16 个茎在此频率下的平均值 The spectra are composed of 42 different frequencies ranging from 80Hz to 1MHz (from right to left, respectively); Each point is the mean of 16 needles and stems in each frequency

表 5 不同发育时期樟子松未冷冻茎的电阻抗参数比较

Table 5 Comparison in impedance spectra parameters of non-frost-exposed stems of Mongolia Scotch pine saplings in different development stage

发育时期 Development stage	胞外电阻率 Specific extracellular resistance $r_e(\Omega m)$	胞内电阻率 Specific intracellular resistance $r_i(\Omega m)$	弛豫时间 Relaxation time $\tau_1(\mu s)$	弛豫时间 Relaxation time $\tau_2(\mu s)$	τ_1 的分布系数 Distribution coefficient of relaxation time τ_1 ψ_1	τ_2 的分布系数 Distribution coefficient of relaxation time τ_2 ψ_2
10 月 October	53.69 *	12.01	6.98	30.52	0.62	0.87
3 月 March	45.85	10.73	7.51	245.83 **	0.61	0.83

Independent-Samples *T* Test 差异显著性 Significant of difference: * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

表 6 不同发育时期樟子松未冷冻针叶的电阻抗参数比较

Table 6 Comparison in impedance spectra parameters of non-frost-exposed needles of Mongolia Scotch pine saplings in different development stage

发育时期 Development stage	胞外电阻率 Specific extracellular resistance $r_e(\Omega m)$	胞内电阻率 Specific intracellular resistance $r_i(\Omega m)$	细胞膜时间恒量 Membrane time constant $\tau_m(ms)$	β 系数 β coefficient
10 月 October	61.98	11.65	12.83	0.64 *
3 月 March	66.71	12.01	19.06 *	0.57

T-Test 差异显著性 Significant of difference: * $P < 0.05$

3 讨论

EIS 法是一种测定植物抗寒性的有效实用的物理方法,与 EL 法相比较,具有简单、快速的优点^[8]。本试验比较了两种方法测定樟子松抗寒性结果的相关性,结果表明,EIS(r_e)法与 EL 法测定的樟子松针叶和茎的抗寒性有很高的相关性($R^2 = 0.97$)。当樟子松抗寒性较弱时,EIS(r_e)法和 EL 法测定的针叶抗寒性相差不到 2℃,抗寒性较强时,相差较大,与对欧洲赤松抗寒性的研究一致^[9,10],然而,本试验 EIS(r_e)法比 EL 法高估抗寒性,这与对欧洲赤松及其它树种的研究不一致,即 EIS 法和 EL 法测定白皮松(*Pinus bungeana*)茎和针叶抗寒性也具有明显的线性相关,EIS 法较 EL 法低估抗寒性^[23]。Väinölä⁺等^[12]对杜鹃的研究显示,EIS(r_e)法估测的抗寒性与褐变法($r = 0.81 \sim 0.86$)和电导法($r = 0.84 \sim 0.90$)明显相关,但是 EIS(r_e)法比它们低估抗寒性。Mancuso 等^[24]的研究结果显示,用 EIS 法和 EL 法测定 4 种红千层属(*Callistemon*)和 2 种银桦属(*Grevillea*)植物的抗寒性,两种方法求出的抗寒性结果非常相似。从以上的文献报道可以看出,尽管不同的树种之间有差异,但是 EIS(r_e)法与常规的 EL 法测定的抗寒性之间存在明显的关系,EIS(r_e)法可以用来估测

樟子松的抗寒性。

研究发现,樟子松茎的 τ_1 和针叶的 τ_m 经冷冻处理后也呈和 r_e 相似的曲线(比较图 3 和图 4 可以看出),在受到冻害时均下降。一些相关研究得到相似的结果。对欧洲赤松幼苗针叶^[10] 的研究表明,在受到低温胁迫后,所有的电阻参数均减小,弛豫时间和弛豫时间分布系数减小。在对英国黑麦草(*Lolium perenne*)的抗寒性研究中发现,经过 -16°C 的冷冻处理后,茎的胞外电阻和弛豫时间均减小^[25]。Zhang 等研究^[26] 表明,对甘蓝(*Brassica oleracea*)叶片经过 -6°C 的冷冻-冻融胁迫后,胞外电阻、细胞质电阻和液泡内电阻(用双壳模型对阻抗数据进行拟合)均减小。对冷冻处理后樟子松 EIS 参数的变化作了相关性分析发现,茎的 r_e 与 τ_1 、针叶的 r_e 与 τ_m 有较好的相关性($R^2 = 0.74 \sim 0.84$)。经 Logistic 方程拟合, τ_m (针叶)和 τ_1 (茎)法与 EIS(r_e)法、EL 法测定的樟子松抗寒性相关性也较高($R^2 = 0.88 \sim 0.91$)。张钢等^[8] 认为,EIS 分析中,胞外电阻率(r_e)是确定抗寒性最适用的一个参数,弛豫时间(τ_1)是精确度最高的参数。从本研究来看, τ_m (针叶)可作为评估樟子松针叶抗寒性的重要参数。

电阻抗图谱变化表明,不同发育时期未冷冻樟子松针叶和茎发生了结构和生理上的变化。在欧洲赤松的 EIS 分析中,分布模型的等效电路参数经历季节变化与抗寒性的变化相吻合^[5,13]。在对白皮松的研究中,也发现未经冷冻处理样本的弛豫时间 τ_1 (茎)、胞内电阻率 r_i (茎和针叶)与抗寒性有较高的相关性($R^2 = 0.79 \sim 0.86$)^[23]。对杜鹃^[12] 的研究表明,一个无性系杜鹃抗寒锻炼过程中,未冷冻叶的胞外和胞内电阻与抗寒性的改变相关,而属于另一个亚种的无性系不相关。本试验中,8 年生樟子松 3 月的抗寒性明显比 10 月强,其茎 τ_2 和针叶 τ_m 也显著高于 10 月,与抗寒性的变化一致。说明不经冷冻处理,直接用 τ (茎)和 τ_m (叶)估测樟子松年周期不同发育阶段的抗寒性是很有前途的方法。

References:

- [1] Glerum C. Frost hardiness of coniferous seedling: principles and applications. In: Duryea M. L. ed. Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major test. Cottralis (USA): Forest Research laboratory oregon state university, 1985. 107—123.
- [2] Zhang G. A review of methods for measuring frost hardiness in woody plants abroad. World Forest Science and Research, 2005, 18(5): 14—20.
- [3] Mancuso S. Seasonal dynamics of electrical impedance parameters in shoots and leaves relate to rooting ability of olive (*Olea europaea*) cuttings. Tree Physiology, 1998, 19: 95—101.
- [4] Repo T, Zhang M I N. Modelling woody plant tissues using a distributed electrical circuit. Journal of Experimental Botany, 1993, 44: 977—982.
- [5] Repo T, Zhang G, Ryyppä A, et al. The electrical impedance spectroscopy of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) shoots in relation to cold acclimation. Journal of Experimental Botany, 2000, 51: 2095—2107.
- [6] Stout D G. Effect of cold acclimation on bulk tissue electrical impedance I. Measurements with birdsfoot trefoil at subfreezing temperatures. Plant Physiology, 1988, 86: 275—282.
- [7] Stout D G. Effect of cold acclimation on bulk tissue electrical impedance II. Measurements with alfalfa and birdsfoot trefoil at nonfreezing temperatures. Plant Physiology, 1988, 86: 283—287.
- [8] Zhang G, Xiao J Z, Chen D F. Electrical impedance spectroscopy method for measuring cold hardiness of plants. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(1): 19—26.
- [9] Ryyppä A, Repo T, Vapaavuori E. Development of freezing tolerance in roots and shoots of Scots pine seedlings at nonfreezing temperatures. Canadian Journal of Forest Research, 1998, 28: 557—565.
- [10] Repo T, Zhang M I N, Ryyppä A, et al. Effects of freeze-thaw injury on parameters of distributed electrical circuits of stems and needles of Scots pine seedlings at different stages of acclimation. Journal of Experimental Botany, 1994, 45: 823—833.
- [11] Zhang G, Ryyppä A, Vapaavuori E, et al. Quantification of additive response and stationarity of frost hardiness by photoperiod and temperature in Scots pine. Canadian Journal of Forest Research, 2003, 33: 1772—1784.
- [12] Väinölä A, Repo T. Impedance spectroscopy in frost hardiness evaluation of Rhododendron leaves. Annals of Botany, 2000, 86: 799—805.
- [13] Zhang G, Ryyppä A, Repo T. The electrical impedance spectroscopy of Scots pine needles during cold acclimation. Physiologia Plantarum, 2002, 115: 385—392.
- [14] Sakai A, Fuchigami L, Weiser C J. Cold hardiness in the genus *Rhododendron*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1986, 111: 273—280.

- [15] Capiello P E, Dunham S W. Seasonal variation in low-temperature tolerance of *Vaccinium angustifolium* Ait. *HortScience*, 1994, 29: 302—304.
- [16] Burr K E, Tinus R Q, Wallner S J, *et al.* Comparison of three cold hardiness tests for conifer seedlings. *Tree Physiology*, 1990, 6: 351—369.
- [17] Repo T, Lappi J. Estimation of standard error of impedance-estimated frost resistance. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 1989, 4: 67—74.
- [18] Repo T. Influence of different electrodes and tissues on the impedance spectra of Scots pine shoots. *Electro- and Magnetobiology*, 1994, 13(1): 1—14.
- [19] Zhang M I N, Repo T, Willison J H M, *et al.* Electrical impedance analysis in plant tissues; on the biological meaning of Cole-Cole (in Scots pine needles. *European Biophysics Journal*, 1995, 24: 99—106.
- [20] Macdonald J R. Emphasizing solid materials and systems. In: John Wiley & Sons eds. *Impedance Spectroscopy*. New York: Inc, 1987.
- [21] Hurme P, Repo T, Savolainen O, *et al.* Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Canadian Journal of Forest Research*, 1997, 27: 716—723.
- [22] Zhang M I N, Willison J H M. Electrical impedance analysis in plant tissues; in vivo detection of freezing injury. *Canadian Journal of Botany*, 1992, 70: 2254—2258.
- [23] Li Y Q, Zhang G, Que S P, *et al.* Relation between electrical impedance spectroscopy parameters and frost hardiness in stems and needles of *Pinus bungeana*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2008, 44(4): 28—34.
- [24] Mancuso S, Nicese F P, Masi E, *et al.* Comparing fractal analysis, electrical impedance and electrolyte leakage for the assessment of cold tolerance in *Callistemon* and *Grevillea* spp. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2004, 79: 627—632.
- [25] Repo T, Pulli S. Application of impedance spectroscopy for selecting frost hardy varieties of English ryegrass. *Annals of botany*, 1996, 78: 605—609.
- [26] Zhang M I N, Willison J H M. Electrical impedance analysis in plant tissues: a double shell model. *Journal of Experimental botany*, 1991, 42: 1465—1475.

参考文献:

- [2] 张钢. 国外木本植物抗寒性测定方法综述. *世界林业研究*, 2005, 18(5): 14—20.
- [8] 张钢, 肖建忠, 陈段芬. 测定植物抗寒性的电阻抗图谱法. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(1): 19—26.
- [23] 李亚青, 张钢, 郗书鹏, 等. 白皮松茎和针叶的电阻抗参数与抗寒性的相关性. *林业科学*, 2008, 44(4): 28—34.