

张萍, 郝秀英, 胡德昌, 朱建军. 石楠和蜡梅茎结冰动力学过程的差热扫描分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(4): 551~558

Zhang P, Hao XY, Hu DC, Zhu JJ. Differential thermal analysis on the freezing dynamics of *Chimonanthus praecox* and *Photinia serrulata* stems[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(4): 551~558

石楠和蜡梅茎结冰动力学过程的差热扫描分析

张萍¹, 郝秀英², 胡德昌¹, 朱建军^{1*}

(1. 鲁东大学生命科学院, 山东烟台 264025; 2. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 在(0.66 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($0^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$)的降温速度下, 采用高分辨率差热分析法分别对石楠(*Photinia serrulata* Lindl.)和蜡梅(*Chimonanthus praecox* (L.) Link)活体幼茎和经过10 min高温煮沸的幼茎在结冰过程中的热力学行为进行分析, 并根据茎的形态解剖结构对他们的结冰特征进行研究。结果显示: 石楠和蜡梅的活体幼茎在结冰过程中的差热扫描曲线均出现3个放热峰; 而经过高温杀死后的茎仅出现1个单放热峰。分析结果表明, 2种植物活体幼茎的3个放热峰可能与其木质部、质外体、韧皮部、形成层的结冰、脱水以及髓组织的结冰、脱水过程有关。进一步采用生理盐水浸湿的滤纸进行模拟实验, 结果发现差热扫描曲线出现与高温杀死的茎类似的放热峰。实验结果表明, 采用高分辨率差热分析法可以探测植物组织结冰过程中的放热强度、结冰温度及其与结冰动力学过程相关的大量细节, 适用于植物的结冰动力学分析。

关键词: 石楠; 蜡梅; 冰冻胁迫; 差热扫描分析; 结冰动力学

中图分类号: Q947

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)04-0551-08

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.40551

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Differential thermal analysis on the freezing dynamics of *Chimonanthus praecox* and *Photinia serrulata* stems

Zhang Ping¹, Hao Xiu-Ying², Hu De-Chang¹, Zhu Jian-Jun^{1*}

(1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China; 2. Institute of Applied Microbes, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: At a cooling rate of (0.66 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, the thermodynamic behavior of living and heat-killed (100°C for 10 min) young stems of *Photinia serrulata* Lindl and *Chimonanthus praecox* (L.) Link. were investigated using high-resolution differential thermal analysis (DTA) during freezing from $0^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$. The freezing features of the stems were also analyzed based on their morphological structures. The DTA curves from living stems of *P. serrulata* and *C. praecox* showed three exothermic peaks, whereas those from heat-killed stems showed one exothermic peak. Based on the dynamics of the exotherms, structures of the stems, and thermal conductance, the three exothermic peaks from living tissues likely represented the freezing process in the stems in the following order: freezing of apoplastic water, freezing dehydration of cambium and phloem, and finally freezing dehydration of pith cells. The simulation of uniform tissue sap using filter papers drenched with normal saline also showed a

收稿日期: 2019-01-16, 退修日期: 2019-02-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371540, 31260080); 山东省农业良种工程项目(2016LZGC038); 烟台市科技发展计划(2016ZH064)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31371540, 31260080), Shandong Agricultural Engineering Projects for Improved Seeds (2016LZGC038), and Yantai Developing Projects for Science and Technology (2016ZH064).

作者简介: 张萍(1962-), 女, 教授, 研究方向为林木植物种质资源的评价与保护(E-mail: ping.zh@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence). E-mail: agars@126.com。

single exothermic peak, which was similar to the thermal behavior of the killed stems, indicating the freezing of a solution with no isolation of the cell membrane. These results showed that many details on heat release, freezing temperature, and dynamics of the freezing process in tissues can be revealed by DTA, which is thus suitable for analysis of freezing dynamics in plants.

Key words: *Photinia serrulata*; *Chimonanthus praecox*; Freezing stress; Differential thermal analysis; Freezing dynamics

冰冻胁迫是越冬植物必须面对的环境胁迫因素之一，植物在进化过程中发展出了不同的抗冻能力和策略。目前已知植物的抗冻性与很多因素有关^[1, 2]，首先是植物的遗传特性^[3]，不同纬度的植物具有不同的低温遗传特性；其次是不同的发育时期以及越冬的器官或部位，如落叶植物的茎能够抵御冬季的结冰胁迫^[4, 5]；另外也与植物的生理状态、组织器官的含水量及其溶液的渗透势^[6-8]以及是否经历过低温锻炼等有关^[6, 9-11]。不仅常绿植物的茎和叶能耐受低温胁迫，大部分落叶植物也能通过地上的茎越冬，因此，植物的茎通常具有较高的抗冻性，但植物茎的抗冻机理尚不明确。已经发现，不同植物的抗冻性可能涉及一系列不同的机理。这些机理包括：通过过冷大幅度降低结冰温度产生抗冻蛋白^[12-15]阻止冰晶在细胞间隙形成及再结晶^[16, 17]；通过提高抗旱能力使细胞抗脱水能力增强，以避免冬季茎部组织结冰、水分输导阻断，或结冰本身导致的水分胁迫^[10, 18]；通过降低细胞膜脂的饱和度维持膜脂在低温下的流动性^[19, 20]或维持保护酶的活性，减轻膜质的过氧化，稳定细胞质膜的结构^[21]；通过低温锻炼，使可溶性糖、山梨醇、甘露醇等小分子同化物的积累增加^[10, 11, 22]，降低细胞液的冰点和水势等。这些抗冻机制都与植物组织在低温下的结冰过程有关。此外，植物细胞的结冰模式也直接影响植物的抗冻性。研究表明，植物组织内结冰的位置是不同的，分为细胞外结冰^[23-25]与细胞内结冰^[23, 26, 27]两种模式。细胞内结冰会破坏细胞的精细结构，直接导致细胞死亡^[10, 11, 23]，而细胞外结冰则使细胞间隙水势降低造成细胞脱水变性或机械损伤^[28, 29]，一般不会直接导致细胞死亡。由于植物组织的质外体溶液在膨压不为0时的渗透浓度总是低于细胞浆，因此冰点温度更高，理论上在低温条件下更容易结冰。

目前，通过光学显微镜^[6, 23]、电子显微镜^[24, 25]

© Plant Science Journal

以及相对较新的红外差热成像^[30-32]等方法，已经发现植物组织结冰时一般都是细胞外先结冰。由于技术上的困难，国内外针对植物结冰过程中的热力学行为和细胞外结冰的热力学方面的研究还开展较少，仅有通过热敏电阻对顶花板凳果(*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.)的活叶片和死叶片的冷却结冰曲线分析^[27]，以及女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)和冬青卫矛(*Euonymus japonicus* Thunb.)叶片结冰过程的显微观察和差热分析^[29]等研究。植物结冰过程的热力学行为通常采用差热技术进行分析，由于经典技术分辨率较低，迄今在生物学研究中主要用于分析膜脂的相变温度或不饱和度，以及休眠芽或其他组织在低温下的过冷度分析。因此，本研究以常绿植物石楠(*Photinia serrulata* Lindl.)和落叶植物蜡梅(*Chimonanthus praecox* (L.) Link)为材料，采用高精密差热扫描分析技术，对两种木本植物的茎在冷却结冰过程中的放热特征进行研究，并对茎的显微结构进行观察，比较他们结冰模式的差异，以期为从热力学角度深入理解植物的冰冻伤害机制提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为2017年11月上旬取自鲁东大学校园栽培的、自然生长多年的蜡梅和石楠的当年生幼茎。从植株上取下幼茎后，立即去除叶片并装入塑料袋密封保存。将两种植物的幼茎分为两组：一组为活体茎不做任何处理；另一组装入双层薄膜塑料袋并用重物将塑料袋压在水下，加热沸腾10 min，以杀死茎上的活细胞，破坏细胞膜结构。在差热分析过程中，两种植物都以取自在植株上自然死亡并已经完全干燥，直径相同的幼茎为差热分析的温度参照物，在完全相同的冷却条件下记录温度和差热分析曲线。

1.2 差热分析

差热分析采用TC-08 USB型8通道热电偶数据
<http://www.plantscience.cn>

记录仪 (Pico Technology, 英国), 并用 PicoLog Recorder 软件记录和分析。以降温过程中水浴槽内干燥茎的温度为对照。为保证温度测定的灵敏度高和反应速度, 并将热电偶结点对样品的干扰和迟滞降到最低, 本研究使用特制的热电偶 (直径 0.127 mm, OMEGA TT-T-36-SLE, 美国), 整个系统分辨率为 0.00025°C。样品的过冷度以样品的水势值计算出的理论冰点温度和实际测定的结冰温度之差表示^[29]。差热扫描和水势测定实验重复 3 次。

样品的冷却在以异丙醇为冷却介质, 控温精度为 0.01°C 的低温、恒温水浴中进行。从 0°C ~ -20°C 的平均降温速度为 (0.66 ± 0.2) °C/min。热电偶结点用一层厚约 5 mm 的橡胶海绵作为温度缓冲物固定在茎上, 再将带有热电偶的茎固定在一个面积为 15 cm × 12 cm、厚 3 mm 的泡沫塑料板上, 然后放入双层塑料袋中, 在低温、恒温水浴中进行冷却, 连续记录温度和差热分析曲线, 每种样品重复 3 次, 将可比参数弛豫时间进行差异显著性分析。

1.3 水势测定

茎的水势测定使用 L-51 探头和 HR-33T 微伏计连接成的水势仪 (Wescor, 美国)。数据采集记录使用 NI-6009 数据采集卡 (National Instruments, 美国) 和 EasyDaq 2.1 版 (泛华测控公司) 记录软件进行。其中 HR-33T 微伏计的模拟信号输出直接连接到 NI-6009 数据采集卡的模拟信号输入端, 数据采集频率为 10 赫兹。为了即时监控 L-51 探头的测量端, 以免污染影响测定过程的精确控制

和记录, 以及包括针对水势高低不同的样品的最佳冷却时间的控制, 所有水势和渗透势的测定需要全部采用湿度测定 (Psychrometer) 模式而非通常的露点测定 (Hygrometer) 模式。每种样品的水势测定和冰点分析的测定重复 3 次。

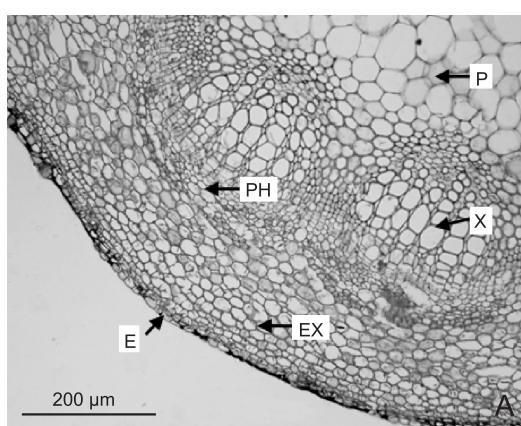
1.4 幼茎结构的显微观察

将石楠和蜡梅的幼茎用 FAA 固定液固定, 采用酒精-叔丁醇梯度脱水, 石蜡包埋; 旋转切片机进行切片, 切片厚度为 8~10 μm; 番红-固绿对染, 加拿大树胶封片。切片用 Olympus BX50 型显微镜观察并照相。

2 结果与分析

2.1 蜡梅和石楠幼茎的结构

为了便于分析差热扫描结果中的放热行为, 首先需要了解待测植物的结构及水分在待测样品中的大致分布。因此, 本研究首先在显微镜下观察了植物茎的横切面结构 (图 1)。观察结果显示, 茎中的活细胞大致分为两部分, 外部的皮层、韧皮部和形成层细胞, 然后是环状的木质部将中央的髓细胞分隔开。理论上, 由于细胞间隙和木质部导管内的水分这些质外体水是互相连通的, 并且这些质外体所含溶质较少, 水势通常较高、冰点较高, 因此在低温下, 这部分的溶液 (质外体溶液) 更容易首先结冰。而位于茎外部的皮层、韧皮部、形成层细胞和位于茎中央的髓细胞一方面由于有细胞膜的分隔, 加上溶质浓度较高, 冰点较低, 低温下不容易结冰, 这些均应在差热分析结果中有所体现。



E: 表皮; EX: 皮层; PH: 韧皮部; BF: 韧皮纤维; X: 木质部; P: 髓部。
E: Epidermis; EX: Exodermis; X: Xylem; BF: Bast fiber; P: Pith; PH: Phloem.

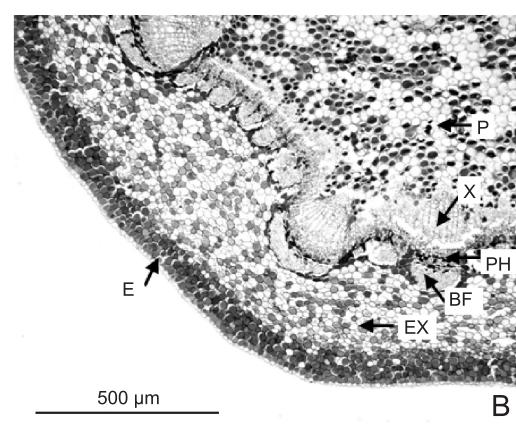


图 1 蜡梅(A)和石楠(B)幼茎的横切面

Fig. 1 Transverse sections of young stem of *Chimonanthus praecox* (A) and *Photinia serrulata* (B)

2.2 蜡梅茎在降温过程中的温度变化

本研究采用热电偶记录蜡梅的茎在降温过程中的温度变化曲线,结果显示(图2):蜡梅的离体活茎与高温杀死的茎温度变化曲线具有一定差别,活茎的曲线可以看到第一个明显的放热峰及其峰值参数,第二个放热峰隐约可见;高温杀死的茎仅能看到单一放热峰。

2.3 蜡梅的茎在降温过程中的差热扫描分析

研究结果显示(图3),蜡梅的活茎样品在降温过程中出现3个明显的放热峰,表明样品中有被分隔开的3种溶液,对应的结冰放热峰值分别为 3.31°C 、 3.29°C 和 1.73°C ,样品的初始结冰温度为 -3.83°C ,其中第一个峰从 -3.83°C 瞬间急升到 -0.69°C (图2: A),说明溶液互相连通的质外体过冷溶液的突然结冰导致了温度急剧上升。而预先经高温杀死的茎只呈现单一峰,对应的峰值为

4.27°C (图3: B),样品的初始的结冰温度为 -4.53°C ,结冰时从 -4.53°C 瞬间急升到 -0.26°C (图2: B)。死亡组织由于没有细胞膜的分隔,呈现单一的放热峰。

2.4 石楠茎在降温过程中的温度变化

石楠茎在降温过程中的温度变化曲线显示(图4),离体活茎的降温曲线上可以观察到第一个明显的放热峰和其后两个不明显的放热峰,这与高温杀死的茎显示的单一放热峰具有明显差别。虽然从曲线上可以看到样品结冰温度和放热峰峰值等参数,但相关的放热动力学细节和量仅根据两条曲线难以进行准确的区分,因此需要进一步的差热分析。

2.5 石楠茎在降温过程中的差热扫描分析

由石楠茎在降温过程中的差热扫描曲线可知(图5),石楠活茎样品在降温过程中出现了3个明显的放热峰,表明样品中有被膜分隔开的3种溶液,

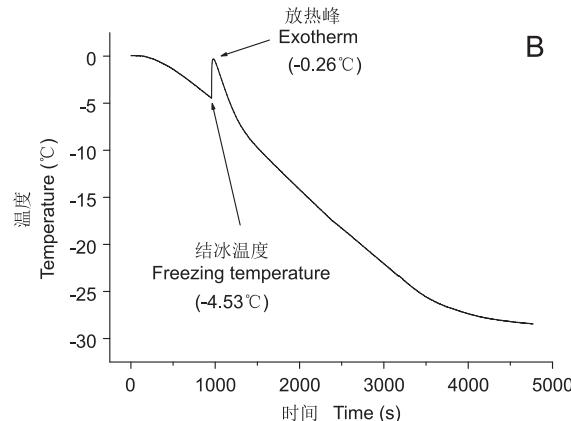
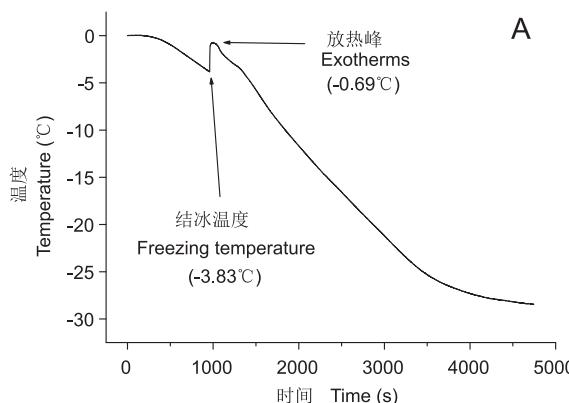


图2 蜡梅离体活茎(A)和高温杀死的茎(B)在降温过程中的冷却曲线

Fig. 2 Thermograms of living (A) and heat-killed (B) *C. praecox* stems during cooling

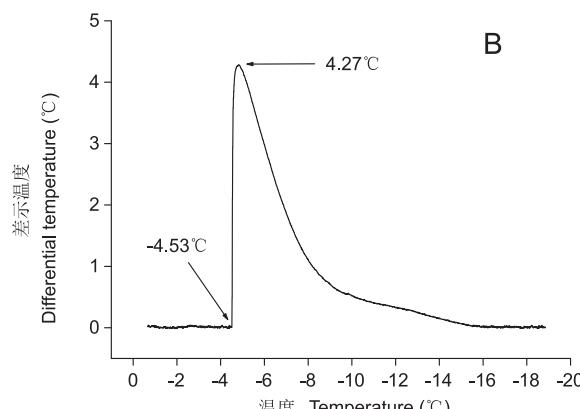
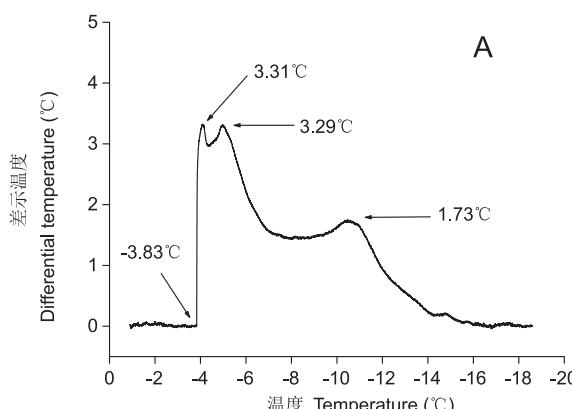


图3 蜡梅活茎(A)与高温杀死茎(B)在降温过程中的差热扫描曲线

Fig. 3 Differential thermograms of living (A) and heat-killed (B) *C. praecox* stems during cooling

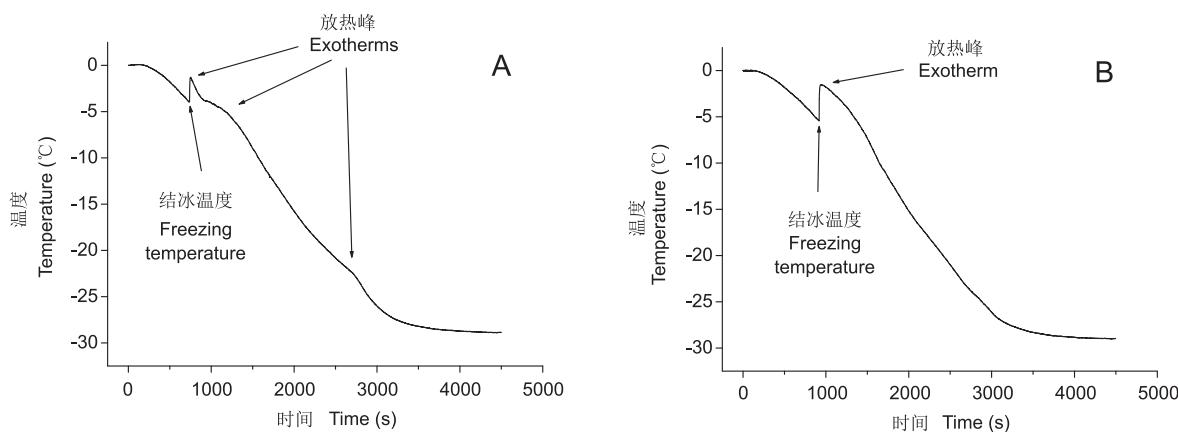


图4 石楠离体活茎(A)和高温杀死的茎(B)在降温过程中的冷却曲线

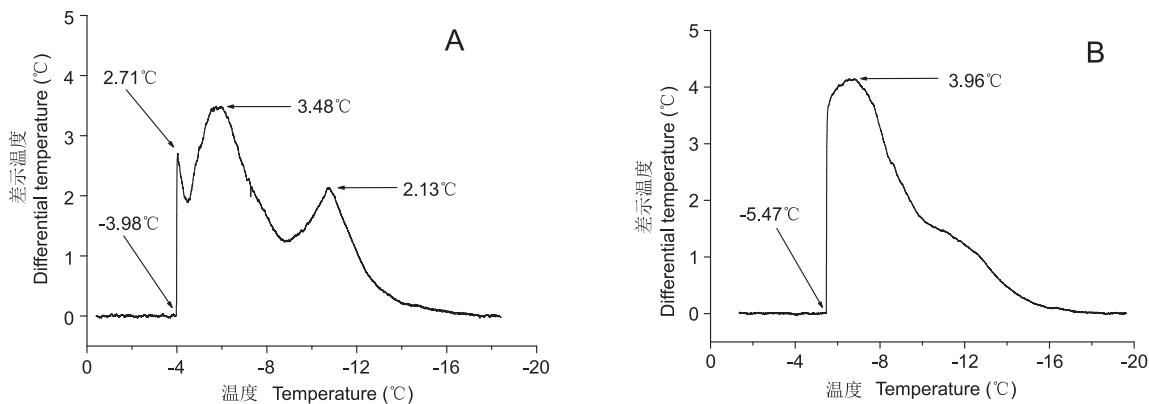
Fig. 4 Thermograms of living (A) and heat-killed (B) *P. serrulata* stems during cooling

图5 石楠活茎(A)与高温杀死茎(B)在降温过程中的差热扫描曲线

Fig. 5 Differential thermograms of living (A) and heat-killed (B) *P. serrulata* stems during cooling

对应的结冰放热峰值分别为 2.71°C 、 3.48°C 和 2.13°C ，样品的初始的结冰温度为 -3.98°C 。而预先经高温杀死的茎只呈现单一峰，对应峰值为 3.96°C ，初始结冰温度为 -5.47°C 。与腊梅一样，石楠活组织结冰时也出现瞬间的温度急剧上升。死亡的石楠组织由于细胞膜被破坏，仅出现一个单一的放热峰。

2.6 生理盐水湿润滤纸的冷却过程和差热扫描曲线

为了分析比较两种植物茎内各个组织和细胞中的溶液的结冰模式与简单溶液结冰模式的差别，本研究采用生理盐水湿润的滤纸重复了上述茎的冷却结冰过程和差热扫描分析，得到了温度变化曲线和差热扫描曲线(图6)，结果发现生理盐水湿润滤纸的冷却曲线和差热扫描曲线均与两种植物高温杀死茎的曲线相似，即呈现单个的放热峰，说明有细胞膜分隔的植物活组织的结冰过程是一个非常复杂

的过程(图3，图5)，与生理盐水的结冰过程具有很大差别。

2.7 不同样品的水势、冰点、结冰温度、过冷度以及差热扫描参数的比较

本研究对两种植物的水势、冰点、结冰温度、过冷度以及差热扫描参数进行了总结(表1)，发现植物的实际结冰温度均明显低于植物的冰点温度，都具有一定的过冷度($3.21^{\circ}\text{C} \sim 5.76^{\circ}\text{C}$)。由于活样品和高温杀死样品的水势高低、溶质分布等情况和条件不一致，过冷度只能大致反映他们的结冰特性，过冷度范围在 $3^{\circ}\text{C} \sim 6^{\circ}\text{C}$ 之间，表明枝条的抗冻性不依赖于深度过冷。样品中一半的水结冰所需时间，即结冰弛豫时间则表现出较大差别，相差均在 $1 \sim 2$ 倍以上，且活样品比高温杀死样品的结冰完成一半所需的时间高出 $1 \sim 2$ 倍，表明活样品中的结冰过程受到了大幅阻滞。

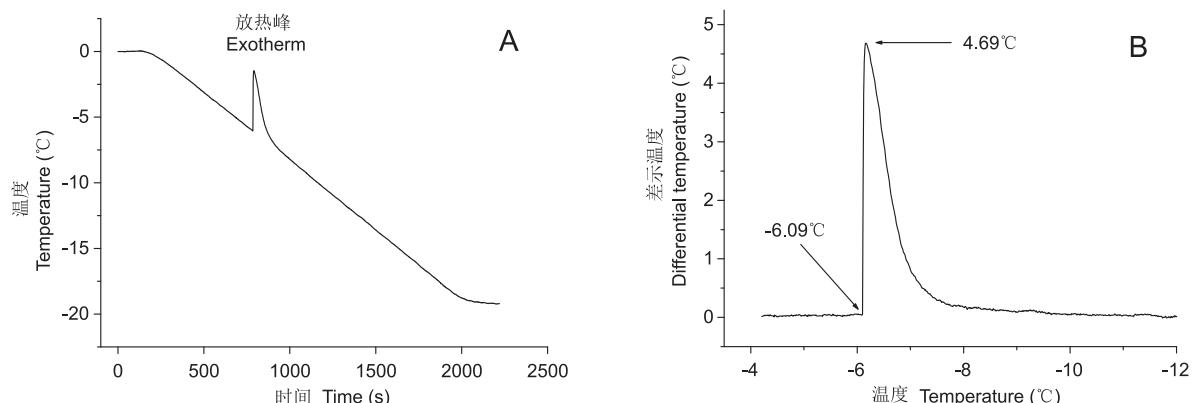


图6 生理盐水浸润的滤纸在降温过程中的冷却曲线 (A) 和差热扫描曲线 (B)

Fig. 6 Thermogram (A) and differential thermogram (B) of filter papers drenched with normal saline during cooling

表1 不同植物的水势、冰点、结冰温度、过冷度以及差热扫描参数

Table 1 Water potential, freezing point, freezing temperature, supercooling degree, and parameters of differential thermal analysis from different samples

样品种类 Type of sample	水势 (MPa) Water potential	冰点 (°C) Freezing point	结冰温度 (°C) Freezing temperature	过冷度 (°C) Supercooling degree	结冰弛豫时间 (s) Freezing relaxation time
蜡梅(活)	-0.57 ± 0.22	-0.43 ± 0.16	-3.83 ± 0.25	3.40 ± 0.22	362 ± 43a
蜡梅(杀死)	-1.26 ± 0.04	-0.95 ± 0.04	-4.53 ± 0.42	3.58 ± 0.25	114 ± 18b
石楠(活)	-0.83 ± 0.17	-0.62 ± 0.17	-3.98 ± 0.31	3.36 ± 0.20	397 ± 39a
石楠(杀死)	-1.42 ± 0.06	-1.07 ± 0.05	-5.47 ± 0.28	4.40 ± 0.17	179 ± 24b
生理盐水	-0.58	-0.44	-6.20	5.76	26

注: a、b 表示同一植物不同处理在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著。

Note: a and b indicate differences between different treatments of the same plant are extremely significant ($P < 0.01$).

3 讨论

本研究发现, 蜡梅和石楠活幼茎中的结冰放热曲线和结冰动力学过程均与高温杀死幼茎具有很大差异, 表明细胞膜可以阻挡和防御细胞内部溶液的结冰, 并且迟滞了整个活茎样品的结冰过程。当活体样品细胞内部结冰时, 会立即释放出大量的熔化热, 像杀死组织那样出现陡峭的放热峰。虽然胞外结冰会导致细胞脱水和胞内溶液体积的大幅度压缩, 但细胞膜的防御可避免胞内结冰造成的细胞死亡, 可能是防止活体组织冰冻伤害的重要机制。从冰冻脱水导致的伤害来看, 植物细胞的抗冻性直接与干旱和盐胁迫导致的细胞脱水、收缩具有类似的地方, 因此抗冻性也和抗旱性和抗盐性有关。本研究发现, 与常规温度记录曲线相比, 差热扫描分析可以给出样品在结冰过程中的大量细节和参数, 通过分析这些细节和参数将有助于揭示植物的冰冻伤害机理。有研究应用这一技术分析常绿植物叶片的抗冻性, 已经取得很好的结果, 并获得了叶片组织

结冰过程中的大量信息^[29]。虽然, 差热扫描技术在植物抗冻性研究中主要用于分析膜脂的不饱和度和过冷度, 但在研究植物抗冻性方面也具有很大的应用潜力。

研究表明, 活组织由于细胞间隙和木质部等质外体溶液所含溶质较少, 冰点较高, 因此在低温下会首先结冰, 进而随着温度的降低引起细胞的脱水^[23-25, 27, 29]。由于茎中细胞壁和木质部导管等部位的溶液是互相连通的, 因此在低于冰点的过冷温度下, 一旦某个部位冰晶形成, 整个质外体溶液就会瞬间结冰, 并迅速放出大量的热, 使样品温度急剧上升。本研究中, 活体茎样品的第一个放热峰符合这一特征。组织结冰后, 随着质外体冰晶的温度和水势下降, 进而引起茎的形成层及其外层韧皮部和皮层的薄壁细胞冰冻脱水, 最后是中央髓薄壁细胞脱水。这些研究结果进一步支持了低温条件下, 植物会首先发生胞外结冰的普遍观点^[6, 10, 11, 23]。

从茎样品的结冰动力学过程来看, 由于高温杀死茎的细胞膜被破坏, 细胞内外形成一个连通的溶

液体系, 因此呈现单一的放热峰, 放热峰形态类似于生理盐水浸润的滤纸的结冰特征。杀死的茎在过冷条件下一旦结冰, 则出现温度快速上升, 蜡梅的结冰弛豫时间不到活组织的 1/3, 而石楠不到活组织的 1/2, 表明组织内的溶液是相互连通的, 即细胞膜结构已经被完全破坏, 研究结果与前人在显微镜下观察到的结果一致^[14, 27]。而活茎的结冰弛豫时间高于杀死的茎 1~2 倍, 表明活组织对结冰有高度的抵抗和迟滞作用, 这一作用是否与植物的抗冻性有关还有待进一步研究。此外, 本实验中所有测试样品均不同程度出现了过冷现象, 即样品的实际结冰温度比样品的冰点低 3.2°C ~ 5.8°C, 该温度范围相对于植物过冬温度还是太小。因此, 虽有研究报道了植物可以靠深度过冷防止冻害^[12~14], 但这两种植物不可能依靠过冷方式越冬。

本研究从热力学角度进一步提供了高等植物组织在低温条件下细胞外首先结冰的证据, 以及细胞膜在抵抗和迟滞细胞结冰方面的重要作用。理论上, 差热分析可用于分析所有含水植物组织的结冰放热过程, 并且灵敏度高, 需要的样品量少, 同时还能提供组织的结冰和放热速度以及实际结冰温度和过冷度等结冰过程的动力学参数。采用差热分析法研究不同植物组织在低温条件下的结冰过程, 尤其是在自然条件下的结冰放热过程以及冰冻组织升温时的融冰吸热过程, 将有利于揭示植物体内结冰过程的细节和冰冻伤害机理, 使我们对植物抗冻性的内在机制有更深入的了解。

参考文献:

- [1] Sklenář P, Kučerová A, Macek P, Macková J. The frost-resistance mechanism in páramo plants is related to geographic origin[J]. *New Zeal J Bot*, 2012, 50(4): 391–400.
- [2] Briceño VF, Harris-pascal D, Nicotra AB, Williams E, Balla MC. Variation in snow cover drives differences in frost resistance in seedlings of the alpine herb *Aciphylla glacialis*[J]. *Environ Exp Bot*, 2014, 106: 174–181.
- [3] Gusta LV, Wisniewski M. Understanding plant cold hardiness, an opinion[J]. *Physiol Plant*, 2013, 147(1): 4–14.
- [4] Martin M, Gavazov K, Körner C, Hattenschwiler S, Rixen C. Reduced early growing season freezing resistance in alpine treeline plants under elevated atmospheric CO₂[J]. *Global Change Biol*, 2010, 16(3): 1057–1070.
- [5] Koehler K, Center A, Cavender-bares J. Evidence for a freezing tolerance-growth rate trade-off in the live oaks (*Quercus series Virentes*) across the tropical-temperate divide[J]. *New Phytol*, 2012, 193(3): 730–744.
- [6] Sakai A, Larcher W. Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987: 1–321.
- [7] Miura K, Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 5312–5337.
- [8] 袁金凤, 牛亚洁, 陈红贤, 董倩倩, 范亚丽, 刘忠华. 春季-冻融交替时期 9 种落叶及半常绿小灌木抗寒性综合评价[J]. 植物科学学报, 2014, 32(6): 630–637.
- [9] Yuan JF, Niu YJ, Chen HX, Dong QQ, Fan YL, Liu ZH. Comprehensive evaluation on cold resistance of nine kinds of deciduous and semi-evergreen dwarf shrubs from the freeze to melt period in spring[J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(6): 630–637.
- [10] Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology[M]. 5th ed. New York: Sinauer Associates Incorporated, 2010.
- [11] Li PH, Sakai A. Plant Cold Hardiness and Freezing Stress: Mechanisms and Crop Implications [M]. Cambridge: Academic Press, 1978.
- [12] Li PH, Christersson L. Advances in Plant Cold Hardiness [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [13] Arias NS, Bucci SJ, Scholz FG, Goldstein G. Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity[J]. *Plant Cell Environ*, 2015, 38(10): 2061–2070.
- [14] Kuprian E, Munkler C, Resnyak A, Zimmermann S, Tuong TD, et al. Complex bud architecture and cell-specific chemical patterns enable supercooling of *Picea abies* bud primordia[J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40: 3101–3112.
- [15] 董红业, 孙万仓, 刘自刚, 张正丽, 杨刚, 等. 自交对白菜型冬油菜生理生化特性及抗寒性的影响[J]. 西北植物学报, 2014, 34(11): 2277–2282.
- [16] Dong HY, Sun WC, Liu ZG, Zhang ZH, Yang G, et al. Effect of selfing on physiological and biochemical characteristics and cold resistance of winter turnip rape (*Brassica campestris* L.) [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2014, 34(11): 2277–2282.
- [17] 杨玉珍, 雷志华, 彭方仁. 低温诱导蛋白及其与植物的耐寒性研究进展[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 421–428.
- [18] Yang YZ, Lei ZH, Peng FR. Research advances about low-temperature-induced proteins and the cold tolerance in plants[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2007, 27(2): 421–428.

- [17] Melissa B, Walker VK. Ice-binding proteins in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2153–2162.
- [18] Wisniewski M, Gusta L, Neuner G. Adaptive mechanisms of freeze avoidance in plants: a brief update [J]. *Environ Exp Bot*, 2014, 99: 133–140.
- [19] Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions [J]. *Photosynthesis Research*, 2013, 116 (2–3): 489–509.
- [20] Shahandashti SSK, Amiri RM, Zeinali H, Ramezanpour SS. Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea [J]. *Mol Bio Rep*, 2013, 40(2): 893–903.
- [21] 冯兆忠, 王静, 冯宗炜. 三唑酮对黄瓜幼苗生长及抗寒性的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(10): 1637–1640.
Feng ZZ, Wang J, Feng ZW. Effect of triadimenol on cucumber seedlings growth and their resistance to chilling injury [J]. *Chin J App Ecol*, 2003, 14(10): 1637–1640.
- [22] Riikonen J, Kontunen-soppe S, Vapaavuori E, Tervahauta A, Tuomainen M, et al. Carbohydrate concentrations and freezing stress resistance of silver birch buds grown under elevated temperature and ozone [J]. *Tree Physiol*, 2013, 33(3): 311–319.
- [23] Asahin AE. The freezing process of plant cells [J]. *Contrib Inst Low Temp Sci*, 1956, 10: 83–126.
- [24] Pearce RS. Extracellular ice and cell shape in frost-stressed cereal leaves: A low-temperature scanning-electron-microscopy study [J]. *Planta*, 1988, 175 (3): 313–24.
- [25] Pearce RS. Plant freezing and damage [J]. *Ann Bot*, 2001, 87(3): 417–424.
- [26] Diller KR. Intracellular freezing, effect of extracellular supercooling [J]. *Cryobiology*, 1975, 12(5): 480–485.
- [27] Zhu JJ, Beck E. Water relations of *Pachysandra* leaves during freezing and thawing: Evidence for a negative pressure potential alleviating freeze-dehydration stress [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 1146–1153.
- [28] Rajashekhar CB, Burke MJ. Freezing characteristics of rigid plant tissues: development of cell tension during extracellular freezing [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(2): 597–603.
- [29] 于瑞风, 朱建军. 女贞和冬青卫矛叶片低温下胞外结冰模式的热力学新证据 [J]. 植物学报, 2018, 53(2): 203–211.
Yu RF, Zhu JJ. New evidence for the mode of extracellular freezing in leaves of *Ligustrum lucidum* and *Euonymus japonicus* under low temperatures [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(2): 203–211.
- [30] Ball MC, Wolfe J, Canny M, Hofmann M, Nicotra AB. Space and time dependence of temperature and freezing in evergreen leaves [J]. *Funct Plant Biol*, 2002, 29(11): 1259–1272.
- [31] Stier JC, Filiault DL, Wisniewski M, Palta JP. Visualization of freezing progression in turfgrasses using infrared video thermography [J]. *Crop Sci*, 2003, 43(1): 415–420.
- [32] Hacker J, Neuner G. Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA) [J]. *Tree Physiol*, 2007, 27(12): 1661–1670.

(责任编辑: 周媛)