

DOI: 10.11913/PSJ. 2095-0837. 23009

张萍, 韩彪, 丁平, 朱建军. 探索用差热分析技术测定麻栎叶片的自由水含量[J]. 植物科学学报, 2023, 41(5): 687~693

Zhang P, Han B, Ding P, Zhu JJ. An approach to quantify the free water content in leaves of *Quercus acutissima* Carruth. with differential thermal analysis[J]. Plant Science Journal, 2023, 41(5): 687~693

探索用差热分析技术测定麻栎叶片的自由水含量

张萍¹, 韩彪^{2,3}, 丁平³, 朱建军^{1*}

(1. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; 2. 暖温带林草种质资源保存与利用国家林业和草原局重点实验室, 山东省林草种质资源中心, 济南 250102; 3. 山东省林草种质资源中心, 济南 250102)

摘要: 探索了用差热扫描曲线分析麻栎 (*Quercus acutissima* Carruth.) 在不同状态下的自由水含量的方法。结果显示, 在降温过程中以时间为主轴的时域差热扫描曲线能够清楚地显示叶片降温过程中样品的结冰温度、放热峰高度和峰下积分面积与组织含水量的关系, 而以温度为主轴的温域差热扫描曲线具有更大的峰下积分面积, 在测定样品中的自由水含量时有更高的灵敏度。结冰麻栎叶片在升温过程中的温域差热分析曲线显示, 组织内自由水与束缚水的分界点为 (-8.23 ± 0.21) MPa, 接近 2 mol/kg NaCl 溶液的渗透势 (-8.71 MPa)。死亡麻栎叶片的结冰放热峰显示出均一溶液的结冰特征, 即快速结冰升温和快速降温形成尖锐的峰形和高峰值 (活叶片峰高的 1.91 倍), 而活叶片的结冰放热过程则有明显的受细胞膜系统阻碍和迟滞的特征, 出现较低的峰值和缓慢的散热峰。研究结果表明, 差热分析不仅能够获得植物组织的结冰-融冰过程的自由水相变参数, 也能够定量分析植物组织的自由水含量。

关键词: 麻栎叶片; 差热分析; 放热峰; 自由水; 束缚水

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2023)05-0687-07

An approach to quantify the free water content in leaves of *Quercus acutissima* Carruth. with differential thermal analysis

Zhang Ping¹, Han Biao^{2,3}, Ding Ping³, Zhu Jian-Jun^{1*}

(1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China; 2. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Conservation and Utilization of Warm Temperate Zone Forest and Grass Germplasm Resources, Shandong Provincial Center of Forest and Grass Germplasm Resources, Ji'nan 250102, China; 3. Shandong Provincial Centre for Conservation and Utilization of Forest and Grass Germplasm Resources, Ji'nan 250102, China)

Abstract: An approach was devised to quantify free water content in the leaves of sawtooth oak (*Quercus acutissima* Carruth.) under different states using differential thermal analysis. The freezing temperatures, peak heights of the exotherms and the areas under the exotherms were clearly observed in the time-domain scanning curve of the differential thermal analysis during cooling, while the larger areas under the exotherms were seen in the temperature-domain scanning curve of the differential thermal analysis, providing a higher sensitivity in quantifying the free water content in the samples. The boundary between free and bound water in the tissues was (-8.23 ± 0.21) MPa, close to the osmotic potential of a 2 mol/kg NaCl solution (-8.71 MPa). Freeze-killed leaves demonstrated uniform solution freezing features with sharp, narrow peaks and higher peak

收稿日期: 2023-01-12, 修回日期: 2023-02-01。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31870376); 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC01805)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31870376) and Provincial Engineering Project of Shandong for Elite Agricultural Varieties (2019LZGC01805).

作者简介: 张萍 (1963-), 女, 教授, 研究方向为植物生理生态 (E-mail: ping.zh@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: jzjzhu@ldu.edu.cn)。

values (1.91 times that of living leaves) attributed to rapid temperature changes. In living leaves, the peaks were broader, and values were lower, suggesting notable delays in water phase change within cellular membranes. Thus, differential thermal analysis could effectively determine the phase change parameters of free water in plant tissues during freeze-thaw cycles and quantify the free water content in plant tissues.

Key words: Leaves of *Quercus acutissima*; Differential thermal analysis; Exotherms; Free water; Bound water

差热分析 (Differential thermal analysis, DTA) 是通过记录经历相同的加热或冷却过程的待测样品和惰性参照样品之间温差的热分析技术^[1-3]。当固体样品在被加热熔化或液体样品被冷却凝固时, 就会吸收或释放出大量的熔化热, 改变待测样品和惰性参照样品之间的温差。通过记录温差-时间曲线或温差-温度曲线, 能够分析样品在相变过程中的一些特性和参数, 如曲线上的放热或吸热峰可以给出关于相变温度、玻璃化转变温度或液体过冷度的信息, 峰下面的积分面积能给出相变热的热量信息等。

在正常生长的植物组织中一般都含有大量的水分, 其中的自由水在低温条件下能够结冰, 结冰时能放出大量的熔化热, 通过差热扫描可以记录到对应的放热峰。理论上, 组织中的自由水含量越高, 组织结冰时释放的热量也就越大, 产生的放热峰也越大。因此在条件恒定, 并且有放热峰下面积可以定量分析组织中的水分含量。由于商业化差热分析仪器的设计目的和早期热电偶温度补偿的灵敏度限制, 到目前为止, 差热分析在植物学上主要用于在研究植物抗冷性时分析细胞中膜脂的相变温度或膜脂的不饱和度^[4-6], 以及在植物抗冻性研究中测定样品的过冷度^[1, 7-9], 近年来也有根据差热分析中的结冰温度确定植物抗冻性的报道^[10-13], 但至今尚未见到将差热分析用于测定分析植物组织中水分含量的研究。与常规烘干测定植物组织含水量的方法相比, 差热分析一方面具有速度快的优点, 另一方面由于冰的熔化热很高, 结冰或融冰时的热信号强度高, 如果使用高灵敏度热电偶, 理论上能够有很高的精度。本研究以盆栽麻栎 (*Quercus acutissima* Carruth.) 幼苗叶片为材料, 探索用差热分析技术快速分析叶片中的自由水含量 (束缚水难以结冰没有差热信号) 的方法。研究结果旨在为快速原位测定植

物叶片的含水量提供一种新的方法。

1 材料与方法

实验材料为在光照培养箱中 (白天 25 °C, 夜间 22 °C, 光照时间 12 h, 光照强度 150 μmol/m²) 盆栽的麻栎幼苗 (约 30 cm 高) 中上部的成熟叶片, 取样时间为上午 9: 00-10: 00。麻栎是一种叶片较薄、单位面积叶片含水量较低、结冰时放热相对较少而信号相对较弱的材料, 如果麻栎叶片能给出较为准确的定量信号, 测定含水量较高的其他植物叶片在理论上将相对更加容易。为了防止水分散失, 每个叶片从植物上取下后立即放入一个薄膜保鲜袋备用。为了尽可能提高灵敏度, 差热分析用目前商业化的直径最小 (0.127 mm) 的 T 型热电偶线 (Omega, 美国) 制作的热电偶连接一台 TC08USB 型 20 位热电偶温度记录仪 (Pico technology, 英国), 整体分辨率 0.000 25 °C, 以干燥叶片为差热参比^[14], 降温过程在一台 JY-DC3010 程序控温低温水浴槽 (杭州聚同) 中进行 (理论控温精度 0.01 °C), 同步记录时域和温域差热扫描曲线。叶片的渗透势用冰点渗透压计测定。

叶片总含水量 W_T 用 DHS20A 型电子卤素水分测定仪 (上海青海) 测定 (仪器的内设烘干温度为 80 °C), 测定结束记录叶片样品的干重 W_D 后, 将样品放入一个直径 14 cm 的塑料培养皿, 然后将叶片和培养皿放入塑料袋, 用塑料支架撑起塑料袋 (防止叶片接触塑料袋) 并密封, 塑料袋内部的下面铺有 2 层浸透了 2 mol/L NaCl 溶液 (渗透势 -8.71 MPa) 的吸水纸, 平衡 24 h 后取出称重得到电子卤素水分测定仪的烘干叶片 (原重 W_D) 在盐溶液平衡的空气中吸水后的重量 W_A , 叶片的束缚水占总含水量的百分比 W_B 和自由水占总含水量的百分比 W_F 分别按下式计算:

$$W_B = \frac{W_A - W_D}{W_T} \times 100\%;$$

$$W_F = \frac{W_T - W_B}{W_T} \times 100\%.$$

由于只有自由水才能够结冰, 因此差热分析放热峰的峰值, 或者放热峰下的积分面积, 代表的仅仅是植物组织的自由水含量, 与束缚水无关。所有测定至少重复3次, 计算各个参数的平均值和标准差。

2 结果与分析

2.1 麻栎叶片的水分状况

研究结果显示, 电子卤素水分测定仪测定的麻栎叶片的总含水量为(63.06 ± 1.61)%, 自由水含量为(57.08 ± 1.85)%, 束缚水含量为(5.83 ± 0.67)%, 冰点渗透压计测定的细胞渗透势为(-16.97 ± 1.17) MPa, 其中的自由水含量决定着差热分析放热峰的大小, 渗透势与样品的冰点即理论结冰温度有关, 麻栎叶片的理论平均冰点为-1.28 °C(水势为-16.97 MPa的溶液的冰点)。由于差热分析中代表着自由水的结冰放热峰的积

分面积是一个没有物理单位的数字量, 因此标定样品的自由水含量是差热技术分析植物组织含水量的基础。

2.2 麻栎活叶片在降温结冰过程中的差热分析

如图1所示, 图1: A为同一麻栎离体活叶片在降温结冰过程中记录的以时间为主轴的即时域(Time domain)差热扫描曲线。图1: B为麻栎离体活叶片在降温结冰过程中同时记录的以温度为主轴的即温域(Temperature domain)差热扫描曲线。图1: A以时间为主轴的即时域差热扫描曲线能够清楚地观察叶片降温过程中样品的温度变化速度及其与环境温度的变化关系, 时域差热扫描曲线的放热峰积分面积占整个时域的8.91%, 峰值为2.83 °C。图1: B的温域差热扫描曲线的放热峰积分面积占整个温域的14.81%, 因此温域扫描曲线的灵敏度为时域扫描曲线的1.66倍。本例中活叶片的结冰温度为-8.90 °C, 比细胞溶液的理论冰点-1.28 °C低7.62 °C, 表明麻栎叶片具有很高的过冷度。时域扫描曲线的放热峰灵敏度和误差都要明显低于温域扫描曲线。

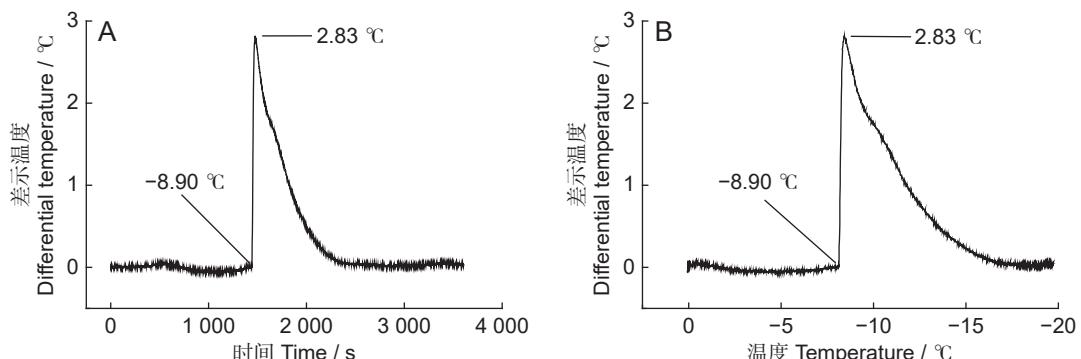


图1 麻栎活叶片在降温过程中以时间为主轴的时域差热分析放热曲线(A)及以温度为主轴的温域差热分析放热曲线(B)

Fig. 1 Differential thermal analysis of time domain exotherm (A) and temperature domain exotherm (B) of living leaves of *Quercus acutissima* during cooling

2.3 结冰麻栎叶片在升温过程中的差热分析

与降温结冰相比, 结冰组织的升温过程不存在过冷等异常现象, 是一个稳定的热力学过程, 因此理论上可以观察到组织溶液渗透势和融冰温度的一些细微关系。与降温结冰过程相反, 结冰组织升温过程的差热曲线会出现一个吸热峰。图2: A为同一麻栎离体叶片在-20 °C结冰后, 升温融冰过程中记录的以时间为主轴即时域的差热扫描曲线; 图2: B为麻栎离体叶片在升温融冰过程中

记录的以温度为主轴即温域的差热扫描曲线。在曲线所示的例子中, 时域差热扫描曲线的热吸收峰积分面积占整个时域的9.70%, 温域差热扫描曲线的热吸收峰积分面积占整个温域的20.1%, 因此温域扫描曲线的灵敏度为时域扫描曲线的2.14倍, 时域扫描曲线的热吸收峰灵敏度也低于温域扫描曲线1.03倍。

图2: B显示, 叶片明显可见的融冰过程从-9.2 °C开始(出现吸热峰时段基线拐点), 在

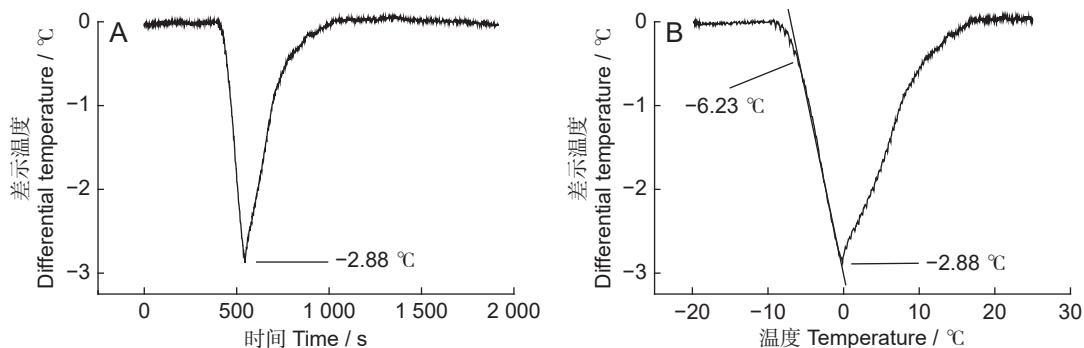


图 2 结冰麻栎叶片在升温过程中以时间为主轴的时域差热分析放热曲线 (A) 及以温度为主轴的温域差热分析放热曲线 (B)

Fig. 2 Differential thermal analysis of time domain exotherm (A) and temperature domain exotherm (B) of frozen leaves of *Quercus acutissima* during rewarming

-6.23 °C 到接近 0 °C 的区间内接近线性关系。由于冰的水势随温度下降基本呈线性关系，温度每下降 1 °C 冰的水势下降 1.22 MPa^[15, 16]，因此在降温过程中，溶液中形成冰晶的部分为纯水，使得余下未结冰的溶液不断浓缩，直到溶液的浓度浓缩到冰点等于溶液所处环境的零下温度为止^[15-17]，冰和溶液的水势随温度下降与温度近似呈线性关系。升温过程是一个细胞溶液的浓度被升温中融解的冰逐渐稀释并吸热、冰点不断上升的过程，细胞溶液的浓度变化和融解的冰的量与温度的上升也近似为线性关系。因此差热曲线开始偏离这一线性关系的点可以看作是束缚水的作用开始出现的温度。在图 2: B 所示的样品中，这一偏离点出现在-6.23 °C，可以近似看作自由水-束缚水的分界点，冰在-6.23 °C 的水势为-8.28 MPa，与本文测定束缚水含量时采用的人为的分界值-8.71 MPa (2 mol/L NaCl 溶液) 的水势值比较接近。升温过程结束后，叶片从绿色变为褐色并变软，表明叶片经过这一结冰-融冰过程后已经死亡。

2.4 死亡麻栎叶片在降温过程中的差热分析

图 3 为麻栎离体死亡叶片在降温结冰过程中同时记录的以温度为主轴即温域的差热扫描曲线。在曲线所示的例子中，时域差热扫描曲线的放热峰积分面积占整个时域的 3.77%，温域差热扫描曲线的放热峰积分面积占整个温域的 7.43%，温域扫描曲线的灵敏度为时域扫描曲线的 2.42 倍，但都不到活叶片积分面积的 1/2。从死亡叶片的放热峰可以看到典型的均一溶液结冰时的放热曲线特征^[14]，放热峰的峰值为 5.30 °C，为活叶片 2.89 °C 的 1.91 倍。本例死亡叶片的结冰温度为-9.45 °C，

比细胞溶液的理论冰点-1.28 °C 低 8.17 °C，比活叶片具有更高的过冷度。理论上，这可能与细胞结冰后细胞浆溶液与浓度较低的质外体溶液混合，降低了胞外溶液的冰点有关。

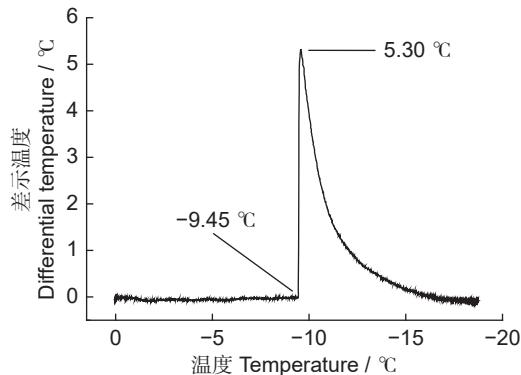


图 3 麻栎死亡叶片在降温过程中以温度为主轴的温域差热分析放热曲线

Fig. 3 Differential thermal analysis of temperature domain exotherm of killed leaves of *Quercus acutissima* during cooling

由于冷却过程中存在过冷，放热峰导致温度的急剧升高使得叶片和环境温差比活叶片 (图 1) 高得多，因此温度梯度更高，热量散失速度也更快，这可能是放热峰的积分面积大大缩小的原因。相比之下，麻栎活叶片结冰时由于有细胞膜和液泡膜的阻隔，当细胞外或细胞浆结冰时不能像均一溶液一样迅速结冰，冰晶受到膜系统的阻隔使得这一过程速度减缓。在图 1 中的放热峰中都可以看到不太明显的肩状曲线，在死亡叶片中完全看不到，并且放热峰的宽度明显变小，与图 1 中的活叶片相比呈现出高度“压缩”变尖锐的放热峰。

2.5 上述实验结果的综合分析

由表1可知,所有麻栎叶片样品的代表水分含量的相变放热峰或吸热峰都有很高的分辨率和较高的重复性。活叶片放热峰的时域积分面积为(9.64 ± 0.71)%,温域积分面积为(15.61 ± 0.84)%,两者都代表了等量的叶片自由水含量(57.08%)。由于温域积分面积大于时域积分面积,自由水与时域放热峰的比值(5.92 ± 0.07)%大于自由水与温域放热峰的比值(3.66 ± 0.05)%,因此用温域放热峰分析自由水含量有更高的灵敏度。结冰叶片的升温过程的吸热峰也类似,时域积分面积为(9.89 ± 0.47)%,温域积分面积为(19.85 ± 0.63)%,自由水与时域放热峰的比值(5.77 ± 0.05)%也大于自由水与温域放热峰的比值(2.87 ± 0.03)%。死亡叶片的放热峰面积减少到不足活叶片的一半,放热峰的时域积分面积为(4.07 ± 0.47)%,温域积分面积为(7.73 ± 0.55)%,但自由水与时域放热峰的比值(14.02 ± 0.11)%也大于自由水与温域放热峰的比值(7.83 ± 0.03)%,采用温域放热峰分析自由水含量有更高的灵敏度。这些结果表明差热分析能够用于叶片水分含量的定量分析。

从表1还可以看到麻栎叶片结冰过程的一些

特征和参数,这是其他水分含量测定方法不能提供的。例如,麻栎叶片的结冰温度很低,活叶片的结冰温度为(-8.86 ± 0.28)℃,由于叶片的渗透势为(-16.97 ± 1.17)MPa,因此结冰温度减去溶液的结冰温度,过冷度为7.58℃,即麻栎叶片具有很高的过冷度,这可能与麻栎叶片含水量较低,质外体溶液的量少,在细胞壁表面的水膜厚度很小不容易形成冰晶有关。麻栎死亡叶片也有同样的趋势,但是具有更高的过冷度,接近8℃,这可能与细胞膜崩溃后细胞溶液与质外体溶液混合后的渗透势与活叶片质外体溶液的渗透势相比有所降低有关。活叶片结冰时的放热峰和冰冻叶片融冰时的吸热峰峰值都接近但不超过3℃,但死亡叶片结冰时的放热峰峰值平均高达5.54℃,表明死亡叶片细胞膜崩溃后组织呈现均匀成核(Homogeneous nucleation)的结冰模式,也可以从尖锐狭窄的放热峰看出(图3)。结冰叶片的吸热峰出现点的平均温度为-9.17℃,但自由水的平均分界温度为-6.19℃,这一区间可能代表了部分束缚水的融冰吸热(图2:B),如果积分与整个放热峰比会是非常小的一部分。样品的放热峰或吸热峰的积分面积占整个时域即温域面积都比较小。

表1 麻栎叶片经历不同变温过程的差热分析
Table 1 Results of differential thermal analysis of *Quercus acutissima* leaves

样品/变温过程 Sample / Temperature change	活叶片/冷却 Living leaves / cooling	结冰叶片/升温 Frozen leaves / warming	死亡叶片/冷却 Dead leaves / cooling
结(融)冰温度/℃ Freezing (melting) temperature / °C	-8.86 ± 0.28	-9.17 ± 0.11	-9.25 ± 0.19
过冷度/℃ Supercooling / °C	7.58 ± 0.26	—	7.97 ± 0.18
放(吸)热峰值/℃ Heat peak value / °C	2.89 ± 0.07	-2.97 ± 0.14	5.54 ± 0.23
自由水分界温度/℃ Freeze-thaw transition temperature / °C	—	-6.19 ± 0.16	—
峰下面积 Peak area	时域 Time domain	(9.64 ± 0.71)%	(4.07 ± 0.47)%
	温域 Temperature domain	(15.61 ± 0.84)%	(7.73 ± 0.55)%
自由水/峰下面积比 Free water/peak area ratio	时域 Time domain	(5.92 ± 0.07)%	(14.02 ± 0.11)%
	温域 Temperature domain	(3.66 ± 0.05)%	(7.83 ± 0.03)%

3 讨论

实验结果表明,用差热分析技术分析植物组织的自由水含量具有快速(1 h内完成)、重复性好,能够同时给出组织的一些其他的参数,如结冰温度、过冷度、放热峰高度和面积等信息,也有可能显示出组织内自由水和束缚水的水势分界点,在

植物生理生态学研究中多方面的应用价值^[10, 13, 14]。且以温度为主轴的差热扫描分析灵敏度比时域扫描分析灵敏度更高,更适合于定量分析。由于植物叶片的含水量受环境条件如温度、湿度、光照强度、时间以及土壤供水条件影响较大,取样时应当注意并记录这些条件。同时,由于降温或升温过程,植物组织的结构(例如图1和图3中细

胞膜系统崩溃后的死亡叶片和活叶片的差别)也能明显地影响差热分析的结果,因此在放热曲线标定和计算时必须充分考虑。需要注意的是,当组织结冰时其中只有部分液态水结冰,结冰部分为纯水,另一部分水则以高浓度溶液中的液态水形式存在并且随着结冰温度的下降而不断浓缩,液态水的含量也随之不断降低,还有一部分是不能结冰的吸附水或束缚水^[18-20]。因此,在降温过程中,结冰组织会因为温度的连续降低而不断有热量逐渐放出,而不是一次性的放热。冷却速度,样品与冷却介质的热交换速度,都会极大地影响放热峰的高度和面积,在标定和差热分析时需要保证这些条件不变。另外,由于不同植物叶片的厚度和传热特性有差别,为了更准确地测定叶片的含水量,应用差热分析测定叶片含水量时,最好事先针对要测定的同种植物的叶片进行一次标定。

用差热扫描分析组织含水量的缺点是这一技术不能直接给出具体的含水量数据,必须要事先对某一种植物样品进行标定,将结冰放热峰的面积与组织的自由水含量对应起来才能够给出含水量的数据。理论上,由于水在结冰或融冰时涉及到非常大量的熔化热的放出或吸收,与生物学中常用的测定脂肪酸的相变等微弱信号相比^[4-6],结冰或融冰的信号强度高并且持久,因而能够定量地分析测定植物组织的自由水含量。一旦完成了某一待测植物样品中的自由水-束缚水的标定,仅仅通过测定自由水的含量也能够根据相应的比率间接计算出该组织的束缚水和总含水量,为植物生理生态学研究提供一种快速的直接测定自由水、束缚水含量和总含水量的新方法。

参考文献:

- [1] Londo JP, Kovaleski AP. Characterization of wild north American grapevine cold hardiness using differential thermal analysis[J]. *Am J Enol Vitic*, 2017, 68 (2): 203-212.
- [2] Smykatz-Kloss W. Differential Thermal Analysis: Application and Results in Mineralogy[M]. Berlin: Springer, 1974: 15-44.
- [3] Vold MJ. Differential thermal analysis[J]. *Anal Chem*, 1949, 21 (6): 683-688.
- [4] Palta JP, Whitaker BD, Weiss LS. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of solanum species[J]. *Plant Physiol*, 1993, 103 (3): 793-803.
- [5] Pearce RS. Molecular analysis of acclimation to cold[J]. *Plant Growth Regul*, 1999, 29 (1): 47-76.
- [6] Gaburjakova J, Gaburjakova M. Reconstitution of ion channels in planar lipid bilayers: new approaches[J]. *Adv Biomembr Lipid Self-Assem*, 2018, 27: 147-185.
- [7] 文彬. 植物种质资源超低温保存概述[J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(3): 311-329.
Wen B. An introduction to cryopreservation of plant germplasm[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2011, 33 (3): 311-329.
- [8] Gao Z, Li J, Zhu HP, Sun LL, Du YP, Zhai H. Using differential thermal analysis to analyze cold hardiness in the roots of grape varieties[J]. *Sci Hortic*, 2014, 174: 155-163.
- [9] Kuprian E, Briceño VF, Wagner J, Gilbert N. Ice barriers promote supercooling and prevent frost injury in reproductive buds, flowers and fruits of alpine dwarf shrubs throughout the summer[J]. *Environ Exp Bot*, 2014, 106: 4-12.
- [10] 陈仁伟, 张晓煜, 丁琦, 杨豫, 南学军, 等. 基于差热分析技术的4个酿酒葡萄品种不同部位抗寒性综合评价[J]. 中国生态农业学报, 2020, 28(7): 1022-1032.
Chen RW, Zhang XY, Ding Q, Yang Y, Nan XJ, et al. Comprehensive evaluation of cold resistance in different parts of four wine grape varieties based on different thermal analysis[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2020, 28 (7): 1022-1032.
- [11] Malyshev AV, Beil I, Kreyling J. Differential thermal analysis: a fast alternative to frost tolerance measurements[M]// Hincha DK, Zuther E, eds. Plant Cold Acclimation: Methods and Protocols. New York: Humana, 2020: 23-31.
- [12] Kaya O, Kose C. How sensitive are the flower parts of the sweet cherry in sub-zero temperatures? Use of differential thermal analysis and critical temperatures assessment[J]. *New Zeal J Crop Hort*, 2022, 50 (1): 17-31.
- [13] Kaya O, Kose C, Sahin M. The use of differential thermal analysis in determining the critical temperatures of sweet cherry (*Prunus avium* L.) flower buds at different stages of bud burst[J]. *Int J Biometeorol*, 2021, 65 (7): 1125-1135.
- [14] 于瑞凤, 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.
- [15] 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.
- [16] Zhu JJ, Beck E. Water relations of *Pachysandra* leaves during freezing and thawing: evidence for a negative pres-

- sure potential alleviating freeze-dehydration stress[J]. *Plant Physiol.*, 1991, 97 (3): 1146-1153.
- [17] 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.
- [18] Cameron IL, Hunter KE, Ord VA, Fullerton GD. Relationships between ice crystal size, water content and proton NMR relaxation times in cells[J]. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1985, 17 (4): 371-386.
- [19] Hansen J, Beck E. Evidence for ideal and non-ideal equilibrium freezing of leaf water in frosthardy ivy (*Hedera helix*) and winter barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Bot Acta*, 1988, 101 (1): 76-82.
- [20] Pukacka S, Hoffmann SK, Goslar J, Pukacki PM, Wójkiewicz E. Water and lipid relations in beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds and its effect on storage behaviour[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj.*, 2003, 1621 (1): 48-56.

(责任编辑:周媛)