

王 静, 乔 飞, 江雪飞, 等. 不同倍性西瓜原生质体制备与低温耐受性分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 206–209.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.066

# 不同倍性西瓜原生质体制备与低温耐受性分析

王 静<sup>1</sup>, 乔 飞<sup>2</sup>, 江雪飞<sup>1</sup>, 党选民<sup>2</sup>, 詹园凤<sup>2</sup>

(1. 海南大学园艺园林学院/热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南海口 570228;

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南儋州 571737)

**摘要:**以同源二倍体、四倍体西瓜为试验材料, 对其叶片及叶片制备的原生质体进行低温处理, 分别测定叶片电解质外渗率、原生质体细胞膜导水系数, 分析不同倍性西瓜对亚低温的耐受能力。结果表明: (1) 将 2.7% 纤维素酶 + 0.78% 离析酶 R-10 溶于 0.4 mol/L 甘露醇中, 于 80 r/min 下酶解 120 min, 西瓜叶片原生质体产率最高, 制备效果最好; (2) 四倍体西瓜原生质体直径为 11.26  $\mu\text{m}$ , 比二倍体直径为 10.41  $\mu\text{m}$  的高 8.2%; (3) 用电导法测西瓜叶片电解质外渗率发现, -20.0  $^{\circ}\text{C}$  处理时, 二倍体西瓜的抗寒性略高于四倍体, 但 10~20  $^{\circ}\text{C}$  的亚低温范围内没有检出差异; (4) 15~25  $^{\circ}\text{C}$  的亚低温处理原生质体, 测定细胞膜导水系数发现, 二倍体导水系数的增幅极显著小于四倍体, 说明二倍体西瓜对亚低温的耐受能力明显高于四倍体。研究结果为植物种质资源低温抗性鉴定及多层次评价提供了新的研究思路和技术参考。

**关键词:** 西瓜; 多倍体; 低温胁迫; 原生质体; 导水系数

**中图分类号:** S651.034 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0206-04

西瓜 (*Citrullus lanatus*) 起源于热带, 为喜温作物, 极不耐寒, 遇霜即死, 属于冷敏感植物, 尤其在冬春反季节栽培的西瓜常会遇到低温天气导致其产量、品质的下降<sup>[1]</sup>。近年来,

随着日光温室、塑料大棚的大面积应用, 设施栽培西瓜几乎很少出现 0  $^{\circ}\text{C}$  以下低温冻害, 偶尔会遭遇极端低温冷害 (0~8  $^{\circ}\text{C}$  左右), 但最常见的低温逆境其实是亚低温冷害。所谓亚低温 (也称亚适温或偏低温) 是指仅使作物生长缓慢但不使作物受到较大伤害而导致其生长停滞的温度条件<sup>[2]</sup>。植物对亚低温的耐受能力被称为低温耐受性, 它与植物对冷害的抵抗能力即耐冷性之间既有联系又相互区别<sup>[3-4]</sup>。大多起源于热带、亚热带的喜温耐热植物的亚低温范围在 10~23  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[5-7]</sup>。

目前关于亚低温对蔬菜的影响研究报道不多, 袁伟、白洁

的探讨[J]. 中国西瓜甜瓜, 2005(1): 1-3.

[21] 张 瑞, 廖新福, 杨 军, 等. 太空诱变哈密瓜花性变异初报[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(增刊 2): 113-115.

[22] 徐 兰, 顾海峰, 金春英, 等. 厚皮甜瓜太空辐射突变体的筛选与应用研究初报[J]. 上海农业学报, 2009, 25(3): 111-114.

[23] 王洋洋, 韩 雨, 盛云燕. 空间诱变对薄皮甜瓜 SP<sub>1</sub> 田间主要性状变异的影响[J]. 北方园艺, 2013(24): 14-17.

[24] 余纪柱, 顾晓君, 金海军, 等. 空间诱变选育特小型黄瓜新种质[J]. 核农学报, 2007, 21(1): 41-43.

[25] 吴岳轩, 曾富华. 空间飞行对番茄种子活力及其活性氧代谢的影响[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 62-66.

[26] 马鸿艳. 甜瓜白粉病抗性遗传分析及相关基因 SSR 标记[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.

[27] 崔艳玲, 路志学, 芦金生. 航天诱变选育航兴 1、2、3 号西甜瓜新品种[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 326-326.

[28] 李 瑜, 廖新福, 王惠林. 航天育种及其在蔬菜作物上的应用[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(增刊): 11-15.

[29] 郑积荣, 汪炳良, 王世恒, 等. 飞船搭载番茄种子 SP<sub>1</sub> 的生物学效应[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 311-313.

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 海南省自然科学基金 (编号: 20153059); 海南大学中西部计划学科建设项目 (编号: ZXBJH-XK008)。

作者简介: 王 静 (1988—), 女, 安徽宿州人, 硕士, 从事作物栽培与生理研究。E-mail: 442596086@qq.com。

通信作者: 江雪飞, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物逆境生理研究工作。E-mail: hnjiangxuefei@gmail.com。

[11] 郭亚华, 谢立波, 王 雪, 等. 辣椒空间诱变育种技术创新及新品种 (品系) 培育[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 265-268.

[12] 李金国, 刘 敏, 王培生, 等. 空间条件对番茄诱变作用及遗传的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2000, 13(2): 114-118.

[13] 郭亚华, 邓立平, 于志明, 等. 空间条件处理蕃茄种子获得优良的新品系[J]. 北方园艺, 1993, 93(6): 17-19.

[14] 崔广琴. 黄瓜、大葱航天育种研究及产业化[J]. 中国航天诱变育种, 2007, 413-479.

[15] 张志友, 倪利锋, 芮明方, 等. 航天育种黄瓜——太空 96-1[J]. 上海蔬菜, 2005(5): 26.

[16] 伊鸿平, 吴明珠, 冯炯鑫, 等. 哈密瓜空间诱变育种研究与应用 [C]//空间诱变育种研究与开发进展——航天育种高层论坛论文集选编, 2005: 104-109.

[17] 朱方红, 喻小洪, 徐小军. 西甜瓜航天育种研究初报[J]. 江西园艺, 2000(5): 36-37.

[18] 田书沛, 刘国栋, 陈宗光, 等. 玉金香型甜瓜新品种——航天玉金香的选育[J]. 中国瓜菜, 2005(4): 20-22.

[19] 王双伍, 李赛群, 刘建雄, 等. 甜瓜空间诱变育种研究初报[J]. 湖南农业科学, 2010(23): 28-30.

[20] 吴明珠, 伊鸿平, 冯炯鑫, 等. 新疆厚皮甜瓜辐射诱变育种效果

发现,长时间亚低温下,黄瓜表现出生长缓慢或停滞、花打顶、黄化、萎蔫、坐果率低、畸形瓜多、产量下降等<sup>[5,8]</sup>;王丽娟等研究得出,长期夜间亚低温(15℃)改变了西红柿光合产物分配方向<sup>[7]</sup>;Ventura 等发现,只要设置适当的亚低温,果实质量不但不会下降,反而会得到改良<sup>[6]</sup>。

有关同源多倍体西瓜抗性也已有多方面的研究<sup>[9-12]</sup>。郭启高等试验发现,四倍体西瓜耐热能力明显高于同源二倍体<sup>[12]</sup>。但亚低温能否对西瓜产生影响,如果产生影响,会是什么样的影响;不同倍性西瓜经短时间亚低温处理后,其低温耐受性有何区别,这些都尚未见报道。

Lyons 早就提出细胞膜系是低温冷害发生的首要部位<sup>[13]</sup>,本研究以不同倍性西瓜叶片制备原生质体,对其进行短时间的亚低温处理,通过测定原生质体的细胞膜导水系数、细胞电解质外渗率分析不同倍性西瓜的低温耐受能力,以期西瓜多倍体抗性形成机制和抗性育种精确鉴定等方面提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以同源二倍体(FR-32-1B-2n)、四倍体(FR-32-1B-4n)西瓜为试验材料,其中四倍体由同源二倍体通过秋水仙素诱导获得。试验材料由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 原生质体制备方法的优化:以二倍体和同源四倍体西瓜叶片为材料,设置 2 种酶液组合:酶 1(2.7% 纤维素酶 + 0.78% 离析酶 R-10)、酶 2(2.7% 纤维素酶 + 0.78% 离析酶 R-10 + 0.155% 果胶酶),2 种酶液组合均溶解在 0.40 mol/L 的甘露醇中;设置 5 个酶解时间:30、75、120、165、210 min;设置 5 个甘露醇浓度:0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 mol/L,通过测定不同处理原生质体产出率等综合筛选最佳制备方法。

不同倍性西瓜叶片细胞大小的比较:以制备好的原生质体为试验材料,采用显微照相, AxioVision Re1.4.8 软件测量原生质体直径,比较不同倍性西瓜细胞直径的差异。

不同倍性西瓜低温耐受性比较:(1)以制备好的原生质体为试验材料,对其进行短时间的亚低温处理,处理温度分别设为 15、20、25℃(25℃为对照,CK),处理时间为 15 min,通过测定并计算细胞膜导水系数( $L_p$ )评价不同倍性西瓜低温耐受性。(2)以西瓜叶片为试验材料,对其进行低温处理,处理温度设为 -20、0、10、15、20、25℃(25℃为对照,CK),处理时间为 30 min,通过电导法测定其相对电解质外渗率,评价不同倍性西瓜低温耐受性。试验均设 3 次重复。

1.2.2 试验方法 原生质体的制备:取西瓜完全展开的叶片,切成 5 mm<sup>2</sup> 左右的块状,称取 1 g 叶片,加入 5 mL 酶解液混匀,于 25℃、80 r/min 摇床上振荡酶解。酶解后的溶液用 160 目的尼龙网过滤,收集滤液。用 0.4 mol/L 甘露醇清洗,定容至 6 mL,于 400 r/min 下离心 5 min,弃上清,重复 1 次。为降低细胞壁的再生对测定细胞膜导水系数的影响,在已制备出的原生质体悬浮溶液中加入酶液(1% 纤维素酶、0.3% 离析酶 R-10,溶于 0.4 mol/L 甘露醇),加入量为悬浮液:

酶液 = 15 : 1。

原生质体产出率的测定:采用血球计数板计数法测定,吸取 20 μL 稀释后的原生质体悬浮液滴在血球计数板上,然后置于 10×物镜显微下观察(Zeiss, M1)计数,  $n \geq 200$ , 重复 3 次,取平均值。

原生质体初始直径测定:取制备好的原生质体滴在血球计数板上显微观察照相,样本数  $n \geq 30$  个/次,重复 3 次,然后用 AxioVision Re1.4.8 软件对原生质体直径进行测定,每个重复测定 30 个原生质体,取平均值。

细胞膜导水系数测定:细胞膜导水系数的测定参考 Liu 等的方法<sup>[14]</sup>。具体如下:取制备好的原生质体 20 μL,加入等体积水混合,即开始计时( $t=0$ );迅速将混合液转移至血球计数板上,再在 40×物镜下分别于 90、150 s 照相;通过测量原生质体直径的变化计算原生质体体积的变化,再用以下公式计算细胞膜导水系数:

$$L_p = \frac{dV/dt}{S\Delta\Psi_w} \approx \frac{(V_{150s} - V_{90s})/60s}{S\Delta osm}$$

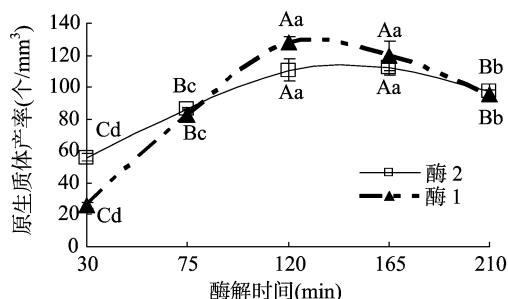
式中: $\Delta\Psi_w$  为水势的变化值; $V_{90s}$  为 90 s 时原生质体的体积, μm<sup>3</sup>;  $V_{150s}$  为 150 s 时原生质体的体积, μm<sup>3</sup>;  $\Delta osm$  为加水混匀前后渗透势的差值, mmol/kg, 渗透势由 WESCOR 5600 渗透势仪测定; $S$  为原生质体的表面积, μm<sup>2</sup>。

西瓜叶片相对电解质外渗率测定:参考史树德等的测定方法<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同酶组合在不同酶解时间下对原生质体制备的影响

由图 1 可以看出,2 种酶液组合均可制备获得西瓜叶片原生质体,原生质体产率均随着酶解时间的延长呈先升高后降低的趋势。酶解时间不同,原生质体产率差异很大,经方差分析,2 种酶液组合的最佳酶解时间都在 120~165 min 范围内, <120 min 或 >165 min 原生质体产率都极显著降低。



同一处理、不同时间间标有不同大写、小写字母分别表示差异极显著( $P < 0.01$ )、显著( $P < 0.05$ )

图1 不同酶组合和解时间对原生质体产率的影响

2 种酶液组合的变化一致,但变化幅度并不一样,酶 1 的上升幅度和下降幅度均大于酶 2,且酶 1 组合的原生质体最高产率可达  $1.28 \times 10^5$  个/mL,比酶 2 高 15.4%。由此可知,选用酶 1 组合,在酶解 120 min 下制备西瓜叶片原生质体既省时产出率又高。

### 2.2 不同甘露醇浓度对原生质体制备的影响

去除细胞壁后的原生质体需要一个合适的渗透环境才能维持正常形态。Cochrane 等研究发现,甘露醇在水中的浓度和渗透势有着较好的线性关系<sup>[16]</sup>,所以将甘露醇作为渗透调

节剂在很多研究中都有应用。由图 2 可知,甘露醇浓度对西瓜叶片原生质体产率有较大影响,浓度过低或过高都会降低原生质体的产率。当甘露醇浓度为 0.40 mol/L 时,原生质体产率最高,且经方差分析,与 0.30、0.50 mol/L 处理的差异达到极显著水平,说明 0.40 mol/L 甘露醇最有利于西瓜叶片原生质体的形成。因此,本研究的西瓜原生质体制备方法优化为:酶 1 组合(2.7% 纤维素酶+0.78% 离析酶 R-10)溶于 0.4 mol/L 甘露醇中,于 80 r/min 下酶解 120 min,西瓜叶片原生质体的产出率最高,制备效果最好(图 3)。

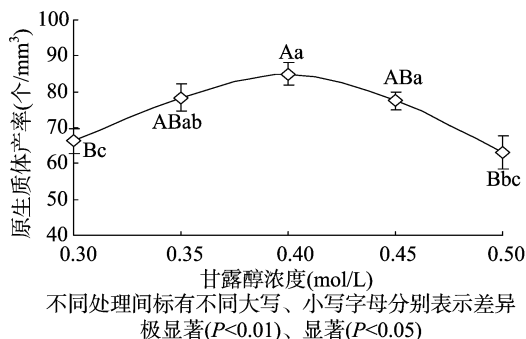


图2 不同渗透势对原生质体游离的影响

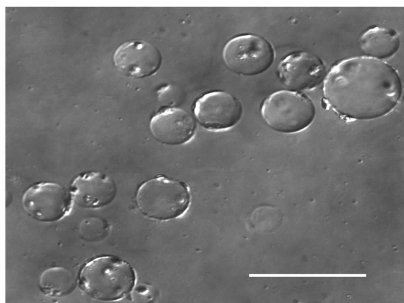


图3 优化条件后制备的西瓜叶片原生质体(标尺=50 μm)

### 2.3 不同倍性西瓜叶片细胞直径的比较

多倍体与普通二倍体西瓜相比,不仅染色体数量增加,大多还表现出细胞体积增大或某些器官的巨型化,例如花瓣、果实或种子等器官的大型化。本试验选用的四倍体西瓜(FR-32-1B-4n)的叶片就比其同源二倍体(FR-32-1B-2n)的叶片大,但是其叶片大是由于叶片中细胞的体积较大还是细胞数量较多引起的并不清楚。本研究通过比较不同倍性西瓜叶片原生质体的直径分布(图4)可知,二倍体西瓜叶片原生质体的平均直径为 10.41 μm,分布在 8.0~10.0 μm 之间的原生质体数约占总数的 40%,分布在 10.0~14.0 μm 之间的原生质体数约占总数的 60%;四倍体的平均直径为 11.26 μm,分布在 8.0~10.0 μm 之间的原生质体数约占总数的 22.9%,分布在 10.0~14.0 μm 之间的原生质体数占总数的 71.4%,另外还有 5.7% 的分布在 14.0~16.0 μm 范围内。由此可知,细胞个体增大是四倍体西瓜叶片巨型化的重要原因之一。

### 2.4 低温处理对不同倍性西瓜叶片相对电导率的影响

从 Dexter 将电导法应用于生物抗寒性鉴定<sup>[17]</sup>以来,人们已公认此方法较可靠。由图 5 可以看出:(1)处理温度与西瓜叶片相对电导率间有较好的相关关系,即在 -20~25 °C 范

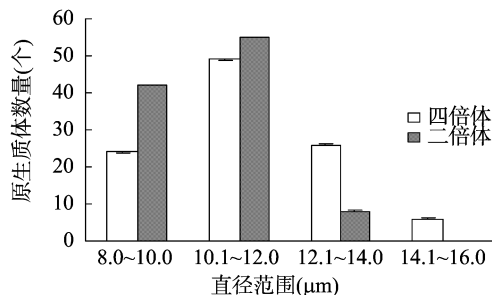
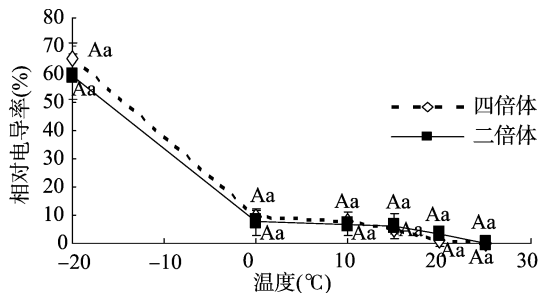


图4 二倍体(2n)和四倍体(4n)叶片原生质体直径分布



同一温度、不同倍性间标有不同大写、小写字母分别表示差异极显著( $P<0.01$ )、显著( $P<0.05$ )

图5 不同温度处理对不同倍性西瓜叶片电解质渗漏的影响

围内,温度越低,其西瓜叶片的相对电导率越大,表明西瓜叶片细胞内电解质外渗的越多,细胞膜受伤害程度越大;(2)不同倍性西瓜在同一温度处理下的相对电导率差异不大,只有 -20.0 °C 处理能看出四倍体西瓜叶片的相对电导率稍高于二倍体,而 10~20 °C 的亚低温范围内,两者的相对电导率几乎重叠在一起,没有显著差异。二倍体和四倍体西瓜对亚低温的耐受性是否真的没有差异,对此我们进一步用细胞膜导水系数法进行分析。

### 2.5 亚低温处理对不同倍性西瓜细胞膜导水系数的影响

低温逆境下,植物对水分的吸收、运输受限<sup>[18]</sup>,而细胞体积的迅速变化可以通过原生质体来观察<sup>[14]</sup>。如图 6 所示,将原生质体转移到低渗透势的溶液中,原生质体体积会逐渐变大,而其增大的速度可以通过细胞膜导水系数( $L_p$ )来表示。本研究表明,15、20 °C 亚低温处理后,同源二倍体和四倍体西瓜原生质体的  $L_p$  明显比对照(25 °C)的  $L_p$  有大幅提高,但二者的增幅不同,经方差分析,四倍体的原生质体细胞膜导水系数的增幅( $\Delta L_p$ )极显著高于同源二倍体的(图 7)。由此也可看出,亚低温处理下,二倍体西瓜原生质体的  $L_p$  表现出比四倍体更好的稳定性,即二倍体西瓜对亚低温逆境有更好的耐受能力。

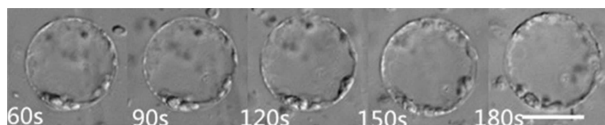
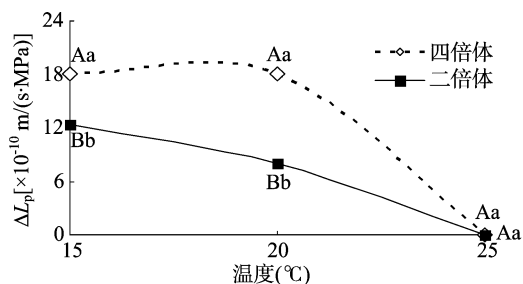


图6 西瓜叶片原生质体吸水膨大过程(标尺=10 μm)

## 3 结论与讨论

多倍体育种在西瓜中极其普遍,生产上常见的有二倍体、三倍体和四倍体。刘文革等研究发现,西瓜染色体经加倍后,其抗逆性也会发生改变<sup>[19]</sup>。这在其他多倍体物种中也普遍存在,如杜鹃和黑麦草的同源四倍体就比二倍体适应性更强,



同一温度、不同倍性间标有不同大写、小写字母分别表示差异极显著( $P < 0.01$ )、显著( $P < 0.05$ )

图7 亚低温处理对不同倍性西瓜细胞膜导水系数增幅的影响

但其耐冷性却较差<sup>[20-21]</sup>。可是经过抗逆锻炼后,不同倍性材料的抗性提高程度表现不同。如经低温锻炼后,四倍体西瓜幼苗细胞膜保护酶 SOD、POD 活性较高,比二倍体表现出更加耐冷<sup>[22]</sup>。以上研究表明,同源多倍体抗性形成可能存在多种机制。

细胞膜作为植物内部与外界环境交流的界面,对逆境最为敏感<sup>[18]</sup>。低温可对细胞膜造成直接物理损伤从而导致细胞内电解质外渗,渗漏的多少可以体现损伤程度,渗漏的多少可以用 Dexter 等提出的电导率法<sup>[17]</sup>测定。目前,该方法结合 Logistic 方程还可以进一步定量确定植物组织的半致死温度( $LT_{50}$ ),抗热性<sup>[23]</sup>和抗寒性<sup>[24]</sup>。本研究应用该方法测定不同低温条件下,同源二倍体和四倍体西瓜叶片电解质渗漏的情况时,发现该方法能较好地地区分不同处理温度时的样品电解质的渗漏情况,但是不能区分不同倍性西瓜的电解质的渗漏差异,特别是在亚低温(10~20 °C)范围内。但通过测定原生质体的细胞膜导水系数却能明显区分,且差异达到了极显著水平( $P < 0.01$ )。由此表明,细胞膜导水系数或许可用于植物亚低温下低温耐受能力的分析。

通过原生质体体积变化测定细胞膜导水系数涉及各种生理过程。在原生质体体积快速增大或缩小的情况下,细胞膜的表面积在几秒钟内就表现出明显变化,而细胞膜面积的迅速增大与囊泡运输、细胞骨架等多种亚细胞结构和功能有关<sup>[14,25]</sup>,说明染色体加倍后细胞自身生理调节机制也发生了变化。

本研究优化了不同倍性西瓜叶片原生质体的制备方法,同时从细胞膜导水系数和细胞膜伤害率 2 个方面对不同倍性西瓜的低温耐受能力进行了分析。这些结果为研究多倍体西瓜抗性提供了新的思路,为西瓜抗性的多层次评价提供了技术参考。

## 参考文献:

- [1] Korkmaz A, Dufault R J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. I. Watermelon[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(4): 404-409.
- [2] 刘景安. 夜间亚低温对甜瓜幼苗生长和生理生化特性的影响[D]. 合肥:安徽农业大学, 2009.
- [3] 陈青君, 张福媛, 王永健, 等. 黄瓜对低温弱光反应的生理特征研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 77-81.
- [4] 马国成, 张福媛. 日光温室不同光温环境对黄瓜光合产物运输及分配的影响[J]. 北京农业大学学报, 1995, 21(1): 34-38.
- [5] 袁伟. 亚低温对温室黄瓜生长发育及产量的影响[D]. 扬州:

扬州大学, 2006.

- [6] Ventura Y, Mendlinger S. Effects of suboptimal low temperature on yield, fruit appearance and quality in muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivars[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 1999, 74(5): 602-607.
- [7] 王丽娟, 李天来, 齐红岩, 等. 长期夜间亚低温对番茄生长发育及光合产物分配的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(3): 300-303.
- [8] 白洁. 外源生长调节物质对亚低温下番茄幼苗生理特性的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2007.
- [9] 王镇, 党选民, 詹园凤, 等. 不同倍性小型西瓜主要农艺性状的比较分析[J]. 中国蔬菜, 2010(2): 51-55.
- [10] 郑锋. 小型西瓜四倍体诱变及不同倍性果实性状与胚胎发育研究[D]. 海口:海南大学, 2012.
- [11] 阎志红, 刘文革, 石玉宝, 等. NaCl 胁迫对不同染色体倍性西瓜种子发芽特性的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1): 204-207.
- [12] 郭启高, 宋明, 杨天秀, 等. 西瓜子叶组织培养中四倍体的产生及鉴定[J]. 西南农业大学学报:自然科学版, 2000, 22(4): 298-300.
- [13] Lyons J M. Chilling injury in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1973, 24: 445-466.
- [14] Liu Q, Qiao F, Ismail A, et al. The plant cytoskeleton controls regulatory volume increase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828(9): 2111-2120.
- [15] 史树德, 孙亚卿, 魏磊, 等. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国林业出版社, 2011.
- [16] Cochrane T T, Cochrane T A. Osmotic potential properties of solutes common in the soil plant solution continuum[J]. Soil Sci, 2005, 170(6): 433-444.
- [17] Dexter S T, Tottingham W E, Graber L F. Preliminary results in measuring the hardiness of plants[J]. Plant Physiology, 1930, 5(2): 215-223.
- [18] 胡博, 吕滢, 肖素妮, 等. 水分胁迫下花生叶片 AhNCED1 蛋白表达与气孔开度的变化[J]. 植物生理学报, 2012, 48(8): 815-820.
- [19] 刘文革, 王鸣, 阎志红, 等. 不同倍性蜜枣西瓜幼苗在低温胁迫下的生理生化特性[J]. 果树学报, 2003, 20(1): 44-48.
- [20] Vainola A, Repo T. Cold hardiness of diploid and corresponding autotetraploid rhododendrons[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 1999, 74(5): 541-546.
- [21] Sugiyama S. Differentiation in competitive ability and cold tolerance between diploid and tetraploid cultivars in *Lolium perenne* [J]. Euphytica, 1998, 103(1): 55-59.
- [22] 刘文革, 王鸣, 阎志红, 等. 冷锻炼对不同倍性西瓜幼苗 SOD、POD 活性及 MDA 含量的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 578-582.
- [23] 徐康, 夏宜平, 徐碧玉, 等. 以电导法配合 Logistic 方程确定茶梅‘小玫瑰’的抗寒性[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 148-150.
- [24] 李秀玲, 刘君, 宋海鹏, 等. 应用 Logistic 方程测定 13 种观赏草的耐热性研究[J]. 江苏农业科学, 2010(3): 184-186.
- [25] Wolfe J, Dowgert M F, Steponkus P L. Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions[J]. The Journal of Membrane Biology, 1986, 93(1): 63-74.